

Aus dem Institut der Klinischen Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regulationsunterschiede der Endothelin-1-induzierten
calciumunabhängigen Kontraktion im Ziliarmuskel und
Trabekelwerk als Möglichkeit der therapeutischen Nutzung
beim Glaukom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Susann Meißner

aus Suhl

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Fromm
2. Prof. Dr. med. U. Pleyer
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Liekfeld

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsübersicht

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	18
3	ERGEBNISSE	32
4	DISKUSSION	44
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	66
7	ANHANG	79
	Erklärung	83

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Glaukom	1
1.1.1	Geschichte des Glaukoms	1
1.1.2	Epidemiologie des Glaukoms	2
1.1.3	Risikofaktoren	2
1.1.4	Symptomatik des Glaukoms	2
1.1.5	Diagnostik des Glaukoms	3
1.1.6	Einteilung der Glaukome	4
1.2	Der Augeninnendruck (IOD)	5
1.2.1	Physiologie des Kammerwassers	5
1.2.2	Aufbau des Kammerwinkels	6
1.2.3	Das Trabekelwerk (TM) und seine Bedeutung beim Glaukom	7
1.2.4	Der Ziliarmuskel (ZM) und seine Bedeutung beim Glaukom	9
1.2.5	Antagonismus von Ziliarmuskel und Trabekelwerk	9
1.2.6	Senkung des Augeninnendrucks als Therapie des Primären Offenwinkelglaukoms (POWG)	11
1.3	Kontraktionsformen glatter Muskulatur	11
1.3.1	Calciumabhängige Kontraktion	11
1.3.2	Calciumunabhängige Kontraktion	12
1.3.3	Calciumunabhängige Kontraktion von TM und ZM	14
1.4	Endothelin-1	14
1.5	Fragestellung / Ziel der Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Kontraktionsmessungen	18
2.1.1	Gewebe	18
2.1.2	Präparation	18
2.1.3	Messvorrichtung	20
2.1.4	Versuchsablauf	21
2.1.5	Statistische Auswertung	23
2.1.6	Verwendete Lösungen	24
2.2	Molekularbiologische Untersuchungen	25
2.2.1	Zellkulturen	25
2.2.2	Zelllysis	26
2.2.3	Proteinquantifizierung	27
2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.2.5	Western Blot	28
2.2.6	Immunologischer Proteinnachweis	29
2.2.7	Auswertung	30
2.2.8	Lösungen	30
2.2.9	Antikörper	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Ergebnisse der Kontraktionsexperimente	32
3.1.1	Carbachol- und Endothelin-1-induzierte calciumunabhängige Kontraktion im bovinen TM	32

3.1.2	Carbachol- und Endothelin-1-induzierte calciumunabhängige Kontraktion im bovinen ZM	33
3.1.3	Der Einfluss von Y-27632 auf die calciumunabhängige Endothelin-1-induzierte Kontraktion im bovinen TM	36
3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Kontraktions-messungen	37
3.2	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	38
3.2.1	Western Blot-Untersuchungen zum Nachweis der Expression von Rho-A	38
3.2.2	Western Blot-Untersuchungen zum Nachweis der Expression von ROCK-1	41
3.2.3	Zusammenfassung der Western Blot-Analysen.....	43
4	DISKUSSION	44
4.1	Kontraktionseigenschaften des TM und ZM.....	44
4.1.1	Allgemeine Regulation.....	44
4.2	Calciumunabhängige Kontraktion	46
4.2.1	Allgemeiner Mechanismus bei glatter Muskulatur	46
4.2.2	Calciumunabhängige Kontraktion von TM und ZM.....	49
4.3	Endothelin-1.....	53
4.3.1	Endothelin-Synthese.....	53
4.3.2	Systemische Endothelin-Effekte	54
4.3.3	Endothelin-Rezeptoren	54
4.3.4	Endothelin-Effekte am Auge	56
4.3.5	Wirkung von Endothelin-1 auf TM und ZM	58
4.4	Bedeutung von Endothelin-1 für das Glaukom	60
4.5	Ausblick	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	66
7	ANHANG	79
7.1	Abkürzungsverzeichnis	79
7.2	Danksagung.....	80
7.3	Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit	81
7.4	Lebenslauf	82
	Erklärung.....	83

1 EINLEITUNG

Diese Arbeit beinhaltet experimentelle Grundlagenforschungen an Geweben des Auges, welche den Kammerwasserabfluss und somit den intraokularen Druck (IOD) beeinflussen und soll einen Beitrag zu neuen Aspekten möglicher medikamentöser Glaukomtherapie leisten.

1.1 Das Glaukom

Das Glaukom ist eine der häufigsten Erkrankungen in der Augenheilkunde. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe ätiologisch nicht einheitlicher Krankheitsbilder, bei denen ein individuell zu hoher IOD akut oder über einen längeren Zeitraum zur Atrophie des Sehnervenkopfes, parazentralen Gesichtsfeldausfällen und zur Visusminderung führt (Lang, 2000).

1.1.1 Geschichte des Glaukoms

Der Begriff „Glaukom“ wurde bereits von Hippokrates verwendet und bezeichnete bis ins 18. Jahrhundert allgemein Augenerkrankungen, die ohne ersichtliche äußere Ursache zur Sehverschlechterung oder Erblindung führten. Häufig kam es zur Verwechslung mit Katarakten, doch nachdem Daviel 1753 die Kataraktoperation einführte, zeigte sich, dass nur ein Teil des Visusverlustes durch Entfernen der Linse heilbar war. Schon im 10. Jahrhundert wies der arabische Arzt At-Tabari auf eine Augenerkrankung mit erhöhter Härte des Bulbus hin. Seit Beginn des 19. Jahrhunderts wurde unter dem Glaukom eine zur Erblindung führende Augenerkrankung mit einem zu hohen IOD verstanden. Die Entdeckung der Erblindungsursache gelang erst nach der Einführung des Augenspiegels 1850 durch Helmholtz und die dadurch mögliche Beobachtung des Augenhintergrundes. Die Exkavation der Papille und die festgestellte Optikusatrophie wertete der Anatom Heinrich Müller (1858) als direkte Folge des erhöhten IOD. Das heutige Glaukomverständnis ist in seinen Schwerpunkten seit circa 140 Jahren belegt, jedoch bleibt die Untersuchung der pathologischen Vorgänge, besonders im Kammerwinkel, ein wichtiger Ansatzpunkt in der Glaukomforschung (Pfeiffer, 2001).

1.1.2 Epidemiologie des Glaukoms

Weltweit sind 66,8 Millionen Menschen am Glaukom erkrankt (Coleman, 1999). Nach der altersbedingten Makuladegeneration und diabetischen Retinopathie handelt es sich beim Glaukom um die dritthäufigste Erblindungsursache in den westlichen Industrieländern. Bis zu 20% der Erblindeten haben ihr Augenlicht durch diese Erkrankung verloren. Der IOD ist bei circa 10% der deutschen Bevölkerung über dem 40. Lebensjahr erhöht. Davon erblinden 10% der Betroffenen, wenn das Glaukom nicht rechtzeitig diagnostiziert und therapiert wird (Grehn, 2006).

1.1.3 Risikofaktoren

Mit zunehmendem Alter nimmt die Häufigkeit dieser Erkrankung exponentiell zu. In der Gruppe der 70 - 80-Jährigen ist die Zahl der Betroffenen mindestens achtmal höher als in der Gruppe der 30 - 40-Jährigen.

Somit stellt das Alter den größten Risikofaktor für die Entstehung eines Glaukoms dar. Zudem ist bekannt, dass für das Glaukom eine erbliche Prädisposition vorliegt. Auch ethnologische Unterschiede wurden beschrieben. Das Erkrankungsrisiko ist bei der schwarzen Bevölkerung vierfach und das Erblindungsrisiko fünffach höher als bei gleichaltrigen Weißen. Weitere Risikofaktoren sind schwere Augenentzündungen, starke Myopie und Kortisonbehandlungen. Da es auch Glaukompatienten mit einem normalen IOD gibt (Normal- oder Niederdruckglaukom), werden neben einem erhöhten IOD als Ursache auch Durchblutungsstörungen am Nervus opticus und in der Retina diskutiert. Eine systemische vaskuläre Dysregulation führt zu okularen Blutflussveränderungen. Dies wurde in einer klinischen Studie mit Glaukompatienten gezeigt (Emre et al., 2004). Des Weiteren gibt es auch Personen, die einen deutlich über der Norm erhöhten IOD aufweisen ohne ein Glaukom zu entwickeln (okulare Hypertension) (Grehn, 2006).

1.1.4 Symptomatik des Glaukoms

Die glaukomatösen Gesichtsfeldausfälle zeigen sich anfangs in der Vergrößerung des blinden Fleckes und einem nasal oberhalb des blinden Fleckes gelegenen parazentralen Skotom. Dabei ist im Augenhintergrund eine randständige Exkavation im temporalen und basalen Quadranten durch die Schädigung der Sehnervfasern zu erkennen, die in diesem Bereich verlaufen.

Im weiteren Verlauf nimmt die Exkavation zu und die Lamina cribrosa wird sichtbar. Diese Progredienz zeigt sich in einer Einengung des nasal oberen Gesichtsfeldes. Die parazentral gelegenen Skotome fließen zusammen mit dem blinden Fleck - es entsteht das Bjerrum-Skotom. Fortschreitend kommt es zur generalisierten Verdünnung der neuroretinalen Randzone und nasaler Verdrängung der Gefäße. Somit schreitet der Gesichtsfeldverlust fort und ein neues nasal unten entstehendes Skotom weist auf die Schädigung weiterer Nervenfasern hin.

Im Endstadium zeigt sich dann die totale glaukomatöse Optikusatrophie mit bajonettförmig abgeknickten Gefäßen und einem daraus resultierenden fast vollständigen Gesichtsfeldverlust des Patienten (Sachsenweger, 2002).



Abb. 1: Gesichtsfeldeinschränkung im Anfangsstadium (links), fortgeschrittenen Stadium (Mitte) und Endstadium (rechts) der Glaukopatienten (aus Augentagesklinik Spreebogen, Berlin)

1.1.5 Diagnostik des Glaukoms

Zur Beurteilung der Vorderkammertiefe wird die Spaltlampenuntersuchung durchgeführt, der Kammerwinkel wird dabei mit einem Gonioskop beurteilt, welches direkt auf die Hornhaut aufgesetzt wird. Die Messung des IOD erfolgt meist durch die Applanationstonometrie nach Goldmann. Dabei wird ein Druckkörper nach Gabe von fluoreszierenden, anästhesierenden Augentropfen auf die Cornea aufgesetzt. Die Hornhaut wird abgeplattet, bis sich beim Blick durch die Spaltlampe die Innenmenisken der fluoreszierenden Halbkreise berühren. Der Druck, der dafür benötigt wird, entspricht dem IOD. Mit dem Halbkugelperimeter nach Goldmann wird der Gesichtsfeldbefund erhoben. Ophthalmoskopisch wird der Augenhintergrund mit der Papille und den Gefäßen beurteilt (Lang, 2000; Grehn, 2006). Häufig sind langjährige Verlaufskontrollen mit der Dokumentation aller Befunde nötig, um ein Glaukom sicher zu diagnostizieren.

1.1.6 Einteilung der Glaukome

I. Offenwinkelglaukom

Eine Abflussbehinderung des Kammerwassers bei einem normal weiten Kammerwinkel verursacht das Offenwinkelglaukom. Dieses Glaukom ist gekennzeichnet durch einen relativ zu hohen IOD, der oft über lange Zeit unbemerkt bleibt.

Klinisch liegt dieser bei ca. 20-40 mmHg mit erhöhten Tagesschwankungen. Das Auge ist äußerlich unauffällig. Durch die entstehende Atrophie des Sehnervs, welche durch die Dysregulation des Blutflusses im Sehnervenkopf bedingt ist, kommt es zu langsam progredienten, parazentralen Gesichtsfeldausfällen, die der Patient meist erst wahrnimmt, wenn das zentrale Sehen betroffen ist und als Folge ein Visusverlust eintritt.

Das primär entstehende Offenwinkelglaukom macht 90% aller Glaukome aus. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen.

Sekundär können Erythrozyten, Pigment- oder auch Entzündungszellen den Kammerwinkel verstopfen, das ist bei 2-4% der Glaukome der Fall.

II. Winkelblockglaukom

Infolge eines stark verengten bzw. verschlossenen Kammerwinkels kommt es zur Abflussbehinderung des Kammerwassers und damit zu einer höhergradigen Steigerung des IOD mit starken klinischen Beschwerden und schnell auftretender Sehnervatrophie. Eine Erweiterung der Pupille (Mydriasis) beispielsweise nachts oder durch Auslöser wie Sympathomimetika oder Schrecksituationen bewirkt eine Erhöhung des Widerstandes an der Pupille und damit einen Pupillarblock. Das in der Hinterkammer vom Ziliarepithel gebildete Kammerwasser gelangt durch diesen Widerstand nicht in die Vorderkammer. Es kommt folglich zu einer Drucksteigerung in der Hinterkammer, wobei sich die Iris an ihrer Wurzel nach vorn bläht und damit den Kammerwinkel verlegt.

Das akute Winkelblockglaukom kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten, auch hier nimmt die Häufigkeit mit höherem Lebensalter deutlich zu. Frauen sind im Alter etwas häufiger betroffen als Männer.

Primäre Winkelblockglaukome haben einen Anteil von 5% aller Glaukome. Sekundär (2 - 4% der Glaukome) entstehen sie durch Narben, Gefäßneubildungen oder Verklebungen der Iris mit der Linse bzw. Hornhaut (Synechien).

III. Kindliches/kongenitales Glaukom

Bei dieser Form, welche 1% aller Glaukome ausmacht, ist der Kammerwinkel nicht vollständig ausdifferenziert und/oder durch embryonales Gewebe verlegt. Hierbei liegt eine erbliche Disposition vor, der genaue Vererbungsmodus ist aber noch nicht hinreichend bekannt.

1.2 Der Augeninnendruck (IOD)

Da der individuell erhöhte IOD als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Glaukomschäden gilt, haben alle zum gegenwärtigen Zeitpunkt angewandten Glaukomtherapien das Ziel, eine Senkung des IOD zu induzieren. Diese kann durch verschiedene Maßnahmen erreicht werden, für deren Verständnis Kenntnisse über die die Physiologie des Kammerwassers, die Regulation des IOD und die daran beteiligten Gewebe notwendig sind.

Der IOD ist für die Formgebung des Bulbus, eine gute optische Abbildung und die gleichmäßige Anlage der Netzhaut verantwortlich (Erb, 1999).

Zur Aufrechterhaltung des IOD sind zwei wesentliche Größen maßgebend: die Bildung des Kammerwassers und der Abfluss.

Dem pathophysiologischen Mechanismus der multifaktoriellen Glaukomerkrankung liegt ein Ungleichgewicht, d.h. eine erhöhte Kammerwasserproduktion bzw. ein gestörter Abfluss des Kammerwassers zugrunde, wobei eine Abflussstörung in den meisten Fällen die Ursache ist. Durch das Ungleichgewicht zwischen der fortwährenden Produktion des Kammerwassers und dem gestörten Abfluss staut sich die Flüssigkeit im Auge und folglich erhöht sich der IOD. Dies führt zur Schädigung des Sehnervs, so dass die Informationsweiterleitung an das zentrale Nervensystem gestört wird und es zu den für das Glaukom typischen Gesichtsfeldausfällen führt.

Der Normwert des IOD beträgt beim Erwachsenen durchschnittlich 15 mmHg mit Tagesschwankungen unter 4 mmHg. Im Alter und in den Morgenstunden liegt der Wert etwas höher, er unterliegt einem circadianen Rhythmus. Der IOD wird durch die Menge des Kammerwassers bestimmt.

1.2.1 Physiologie des Kammerwassers

Das Kammerwasser wird durch Diffusion, Ultrafiltration und aktive Sekretion (80%) in den Ziliarzotten des Ziliarkörpers aus Blutplasma gebildet und in die Hinterkammer

sezerniert. Durchschnittlich werden 2,3 – 2,7 $\mu\text{l}/\text{min}$ Kammerwasser gebildet (Lang, 2000). Die Produktion unterliegt tageszeitlichen Schwankungen (Erb, 1999). Durch die Pupille hindurch gelangt es stoßweise in die Vorderkammer. Die Pupille bildet somit den ersten physiologischen Widerstand. Durch das Trabekelwerk (TM), den zweiten physiologischen Widerstand (Rohen and Lütjen-Drecoll, 1989; Lutjen-Drecoll et al., 2001), fließen 85% des Kammerwassers im Kammerwinkel in den Schlemm-Kanal und anschließend in die episkleralen Kammerwasservenolen. Die restlichen 15% gelangen uveoskleral in den allgemeinen venösen Kreislauf (Gong et al., 1996; Lang, 2000). Im Alter über 60 Jahren liegt die uveosklerale Abflussmenge anteilig nur noch bei 3% (Toris, 1996). Die Abbildung 2 stellt den Weg des Kammerwassers von der Hinterkammer in die Vorderkammer dar, sowie die zwei Abflusswege.

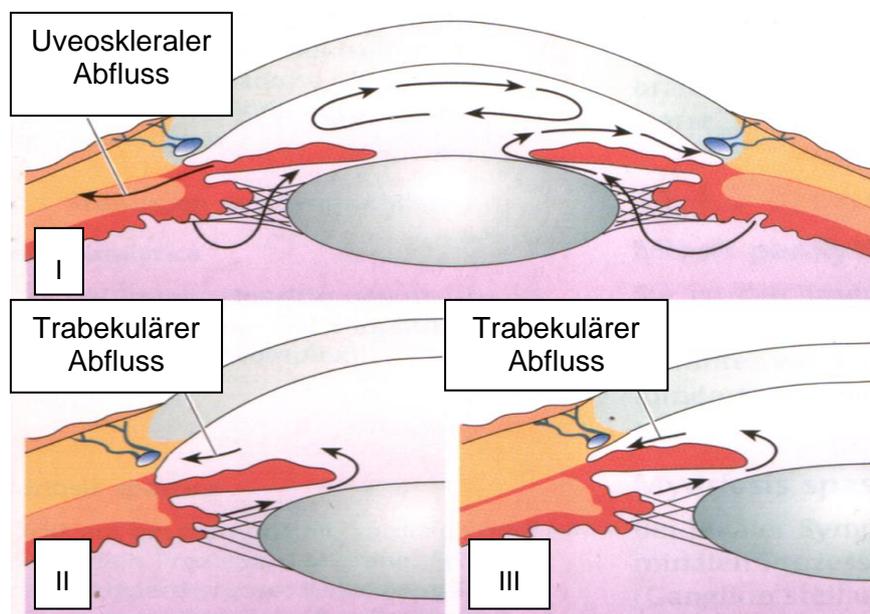


Abb. 2: Der Weg des Kammerwassers (Pfeile) von der Hinter- in die Vorderkammer und der uveosklerale (I) und trabekuläre Abfluss bei weitem Kammerwinkel (II) und engem Kammerwinkel (III) [aus (Sachsenweger, 2002)]

1.2.2 Aufbau des Kammerwinkels

Der Kammerwinkel besteht von außen (Hornhaut) nach innen (Iris) aus dem Schwalbe-Grenzring als Abschluss der Descemet-Membran, dem TM mit dem Schlemm-Kanal, dem Skleralsporn, dem Ziliarkörperband und der Iriswurzel.

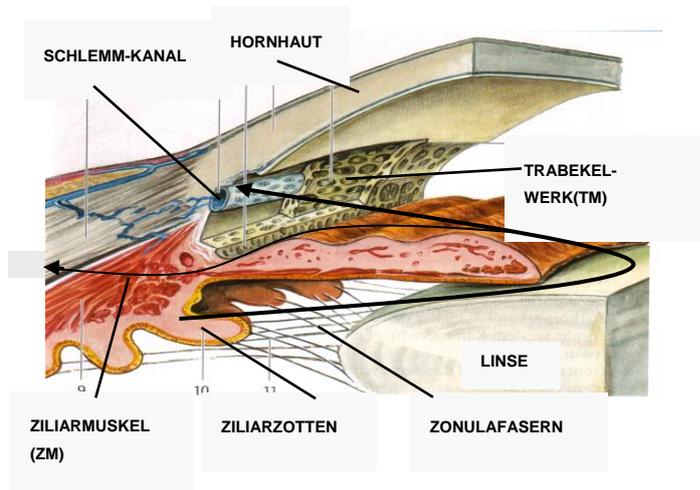


Abb. 3: Aufbau des Kammerwinkels mit Darstellung der Lage des TM und ZM
[aus (Sachsenweger, 2002)]

1.2.3 Das Trabekelwerk (TM) und seine Bedeutung beim Glaukom

Das Trabeculum corneosklerale spannt sich als lockeres, blutgefäßreiches, schwammartiges Gewebe zwischen dem Skleralsporn und dem Schwalbe-Grenzring aus über den Schlemm-Kanal.

Als innerste, der Vorderkammer zugewandte Schicht liegt der uveale Anteil des TM, der sich zwischen der Iris und dem Ziliarkörper einerseits und dem Schwalbeschen Grenzring andererseits ausspannt. Des Weiteren gibt es den korneoskleralen Anteil, der den Raum zwischen dem Skleralsporn und der Schwalbeschen Linie ausfüllt. Der tiefste, feinmaschige Teil des TM, dem das Endothel des Schlemm-Kanals anliegt, wird als Trabeculum cribriforme bezeichnet (Grehn, 1993).

Es handelt sich um den zweiten physiologischen Widerstand des Kammerwasserabflusses. Dieses Gewebe liegt wie ein Filter über dem Schlemm-Kanal, durch den der größte Anteil des Kammerwassers abfließt. An glaukomatösen Augen konnten Veränderungen der TM-Morphologie und der intratrabekulären Räume sowie Ablagerungen verschiedener Materialien in der juxtakanalikulären Schicht nachgewiesen werden (Lutjen-Drecoll, 1999).

Das TM besitzt kontraktile Eigenschaften, die ähnlich denen glatter Muskulatur sind (Barany, 1962). Vor dieser Entdeckung wurde angenommen, dass das Gewebe ein passiver Filter ist, welcher durch die Kontraktilität des ZM reguliert wird.

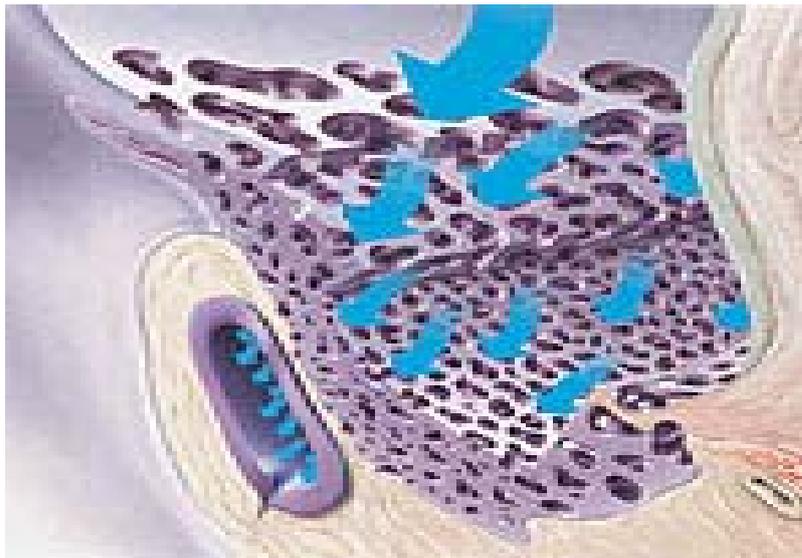


Abb. 4: Darstellung des Kammerwasserabflusses (blaue Pfeile) über das TM in den Schlemm-Kanal [(Uniklinikum Dresden)]

Bei Kontraktion des TM wird der Kammerwasserabfluss gesenkt, was wiederum den IOD steigert. Damit zeigt sich der direkte Effekt des TM auf den okularen Widerstand des Kammerwasserabflusses.

Wiederholt et al. erbrachten zahlreiche Beweise für die kontraktile Eigenschaften des TM. In elektrophysiologischen Experimenten konnten in kultivierten bovinen und humanen TM-Zellen Spannungsspitzen gezeigt werden, welche typisch für glatte Muskulatur sind (Pawlowski and Morgan, 1992; Wiederholt and Stumpff, 1998a). Ferner zeigten sie die Anwesenheit intrazellulärer Muskelfilamente, wie das alpha-Aktin, welches spezifisch für glatte Muskulatur ist (Wiederholt and Stumpff, 1998a).

Iwamoto et al. wiesen spezifische alpha-Isoaktin-Intermediärfilamente in humanen TM-Zellen histologisch nach (Iwamoto and Tamura, 1988). Neben dem Aktin wurde auch das Glattmuskelyosin (Myosin II) im humanen und bovinen TM nachgewiesen (Coroneo et al., 1991). Es bildet mit Aktinfilamenten das Filamentverschiebesystem für die glattmuskulären Kontraktionsvorgänge (Rüegg, 2000). Molekularbiologisch wurde Myosin II in humanem und bovinem TM mittels Western Blot dargestellt und damit der endgültige Nachweis für das Vorliegen der essentiellen Kontraktionsfilamente im TM entsprechend der glatten Muskelzellen erbracht (Thieme, 2002). Auch die Expression der Myosin Light Chain Kinase (MLCK) und ihre funktionelle Bedeutung im TM wurde gezeigt (Rosenthal et al., 2005b).

1.2.4 Der Ziliarmuskel (ZM) und seine Bedeutung beim Glaukom

Der ZM ist ein parasympathisch innervierter, ringförmiger Muskel, der einen Bestandteil des Ziliarkörpers darstellt und die Akkomodation reguliert. Er wird als schneller Multiunit-Glattmuskel ohne spontane Aktivität angesehen. Die Sehnen des äußeren Teils ankern teilweise im Skleralsporn. Andere Muskelbündel durchziehen das gesamte TM ohne Kontakt zu diesem Gewebe zu nehmen und setzen im hinteren Hornhautstroma an. Ein dritter Sehnentyp zieht durch den Skleralsporn in den cribriformen Anteil des TM sowie in die Wand des Schlemm-Kanals (Grehn, 1993). Somit stellt dieser Anteil des ZM den Anschluss an die Faserbündel des TM dar.

Aus morphologischer Sicht handelt es sich beim ZM um eine Kombination aus glatten und quergestreiften Muskelzellen (Ito and Yoshitomi, 1986).

Durch Kontraktion des ZM durch Parasympathomimetika kommt es zum Zug am Skleralsporn. Folglich werden die Lamellenfächer des TM aufgeweitet, durch die das Kammerwasser abfließen kann.

Die gleichzeitige Aufdehnung des Schlemm-Kanals führt zur weiteren Verbesserung des Abflusses. Im Alter wird im ZM verstärkt extrazelluläres Material aufgefunden und es erfolgt eine Reduktion der intermuskulären Räume des ZM (Toris et al., 1999).

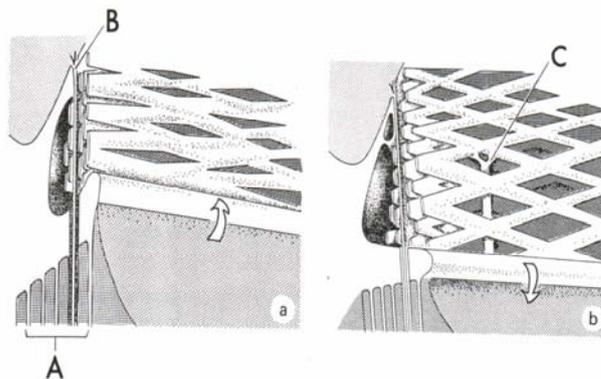


Abb. 5: Ansatz der ZM-Fasern am Skleralsporn (A), Ansatz am hinteren Hornhautstroma (B), Ansatz am TM (C) [(Grehn, 1993)]

1.2.5 Antagonismus von Ziliarmuskel und Trabekelwerk

Im intakten Auge bestimmt die Balance zwischen der Kontraktilität des TM und ZM die Abflussrate des Kammerwassers und damit den IOD. Während bei der Kontraktion des TM der Kammerwasserabfluss gesenkt wird, verbessert die Kontraktion des ZM den

Abfluss. Daraus lässt sich schließen, dass ein funktioneller Antagonismus bei gleichsinniger Reaktion zwischen diesen beiden Geweben vorliegt.

Welche der beiden Wirkungen sich durchsetzt, hängt von der Affinität und Potenz des jeweiligen Wirkstoffes an dem entsprechenden Gewebe ab. Mit entsprechenden Substanzen wurden am bovinen TM und ZM isoliert Kontraktionsmessungen durchgeführt. Die in der Glaukomtherapie eingesetzten Parasympathomimetika Carbachol und Pilocarpin kontrahieren die TM-Streifen, wodurch eine Reduktion des Kammerwasserabflusses hervorgerufen würde. Da die Parasympathomimetika jedoch auch den ZM kontrahieren und dieser Effekt der dominante ist, wird das TM aufgeweitet. Damit kommt es zu einer Steigerung des Kammerwasserabflusses und der IOD wird gesenkt. Nitrate oder andere Vasodilatoren führen zu einer Relaxation des TM und erhöhten den Kammerwasserabfluss (Wiederholt et al., 1994).

Bei der Regulation des Kammerwasserabflusses besteht somit ein funktioneller Antagonismus zwischen Kontraktibilität von TM und ZM, denn eine ZM- Kontraktion führt, wie in Kapitel 1.2.4 beschrieben, über die Vergrößerung der Filtrationsfläche des TM zur Abflussverbesserung des Kammerwassers. Die Abbildung 6 zeigt den Antagonismus am Beispiel des Parasympathomimetikums Pilocarpin.

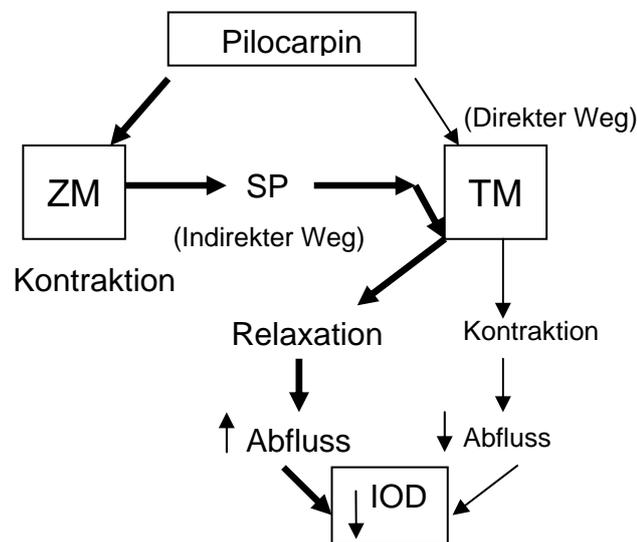


Abb. 6: Antagonismus zwischen TM und ZM. Pilocarpin bewirkt über die stärkere Kontraktion des ZM die Relaxation des TM und damit eine Senkung des IOD (Wiederholt et al., 2000)

1.2.6 Senkung des Augeninnendrucks als Therapie des Primären Offenwinkelglaukoms (POWG)

An erster Stelle einer Therapie zur IOD-Senkung beim POWG steht die medikamentöse Behandlung. Bei einem nicht ausreichenden Effekt der medikamentösen Therapie, Unverträglichkeitsreaktionen oder mangelnder Compliance besteht die Indikation zur operativen Therapie.

Es bieten sich prinzipiell zwei Ansatzpunkte zur Behandlung entsprechend der Ursache dieser Erkrankung: die Hemmung der Kammerwasserproduktion bzw. die Erhöhung des trabekulären oder uveoskleralen Abflusses.

Hierzu stehen verschiedene Wirkstoffgruppen zur Verfügung, die zumeist als lokale Augentropfen appliziert werden. Dazu zählen zum Beispiel die Parasympathomimetika wie Carbachol, die den Kammerwasserabfluss verbessern, indem sie eine Kontraktion im parasympathisch innervierten Ziliarmuskel (ZM) auslösen.

Diese Kontraktion bewirkt die Dehnung des schwammartigen TM im Kammerwinkel, durch das das Kammerwasser, wie bereits erwähnt, zu 85% abfließt. Das TM ist ebenfalls ein kontraktiles Gewebe (Barany, 1962). Die bisher angewandten antiglaukomatösen Medikamente beeinflussen beide Augenstrukturen, den ZM und das TM.

An Nebenwirkungen durch die Beeinflussung des ZM sind die häufig schlecht tolerierte vorübergehende Myopie, die Verschlechterung des Nachtsehvermögens, die Einengung des peripheren Gesichtsfeldes und Akkomodationsstörungen bekannt. Obwohl über das TM 85 % des Kammerwassers aus dem Auge abfließen, gibt es bisher kein Glaukompharmakon, das selektiv auf dieses Gewebe wirkt.

1.3 Kontraktionsformen glatter Muskulatur

1.3.1 Calciumabhängige Kontraktion

Generell wird die Kontraktion der glatten Muskulatur durch eine Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration eingeleitet (Beech, 1997). Die extrazelluläre Komponente reguliert den langanhaltenden Calciumeinstrom durch nicht-selektive Kationenkanäle und spannungsabhängige Calciumkanäle (Bolton et al., 1999; Oberdisse, 2001). Der L- (long lasting) Typ-Calciumkanal ist aufgrund seiner hohen Calcium-Leitfähigkeit für den transmembranären Calcium-Einstrom bei Muskelzellen am

bedeutungsvollsten. In Patch-Clamp Experimenten wurde die Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen in humanen und bovinen TM-Zellen nachgewiesen (Steinhausen et al., 2000). Es wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der Aktivität dieser Kanäle bei beiden Augengeweben gefunden. Die Arbeitsgruppe Wiederholt et al. vermutete eine Beteiligung der Calciumkanäle bei der Regulation der Kontraktilität im TM wie bei der Kontraktion von Zellen der glatten Muskulatur (Wiederholt et al., 2000).

Über die intrazelluläre Komponente wird die frühe, transiente Freisetzung von Calcium aus verschiedenen Calciumspeichern moduliert. Diese Speicher besitzen ebenfalls zwei verschiedene Kanäle. Der eine Kanal wird über Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) aktiviert, der andere durch einen Anstieg des intrazellulären Calciums geöffnet.

Zytoplasmatisches Ca^{2+} führt zur Aktivierung von Calmodulin (CaM), welches dann an die regulatorische Untereinheit der MLCK bindet (Hashimoto and Soderling, 1990).

Die hierdurch ausgelöste Aktivierung dieser Kinase katalysiert die Phosphorylierung der 20 kDa-Kette des Myosins und erleichtert somit die Aktin-Myosin-Interaktion.

1.3.2 Calciumunabhängige Kontraktion

Neben der calciumvermittelten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur besteht ein calciumunabhängiger Weg.

Über eine G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion mit der Aktivierung von Proteinen aus der Rho-Familie und durch die Proteinkinase C (PKC) werden Muskelkontraktionen induziert. Rezeptoren für kontrahierende Agonisten koppeln an das G-Protein 12/13. Bei der Bindung kommt es zur Aktivierung von Proteinen aus der Rho-Familie. Rho-A, eine GTPase, wird durch den GEF (guanine nucleotide exchange factor) aktiviert, welche wiederum eine weitere Rho-Kinase (ROCK) aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung der Myosin-Light-Chain-Phosphatase (MLCP), die inaktiviert wird. Daraus ergibt sich, dass die 20-kDa-Kette des Myosins phosphoryliert bleibt und somit die Interaktion mit Aktin erleichtert ist. Im Ergebnis kommt es zur Kontraktion des glatten Muskels (Kageyama et al., 1996).

Das Rho-A-Protein ist eine kleine GTPase mit einem Molekulargewicht von etwa 21 kDa, die im Zytosol verschiedener Zellen funktionell an die G-Proteine G12/13 gekoppelt ist. Es ist an zahlreichen G-Protein-vermittelten Zellfunktionen wie Genexpression, Wachstum und Kontraktion beteiligt (Seasholtz et al., 1999).

Die ROCK wird durch die Bindung von Rho-A-GTP an eine Rho-Bindungsdomäne aktiviert und phosphoryliert die MLCP (Somlyo and Somlyo, 2000), die im phosphorylierten Zustand inaktiv ist. Durch den Inhibitor der ROCK, Y-27632, wird die Phosphorylierung der MLCP unterbunden und somit die Dephosphorylierung der MLC (Myosin Light Chain) aktiviert und die Muskelkontraktion gehemmt (Rao et al., 2001). Neben dieser calciumunabhängigen Kontraktion unter Beteiligung von RhoA/ROCK wurden PKC-abhängige Signalwege beschrieben. Die PKC gehört zur Familie der Serin-/Threoninkinasen. Sie ist an intrazellulären Signaltransduktionsabläufen beteiligt. Mindestens 10 Isoenzyme mit gewebe-spezifischer Verteilung sind bekannt, welche in 3 Gruppen eingeteilt werden: calciumabhängige, calciumunabhängige und atypische Isoformen (Toker, 1998; Wiederholt et al., 1998b). Bei den ersten Untersuchungen der Rolle der PKC bei der Kontraktilitätsregulation von glatten Muskelzellen wurde beobachtet, dass Phorbol-Ester, die die PKC aktivieren, eine sich langsam entwickelnde Kontraktion induzieren. Die Aufgaben der spezifischen Iso-Formen bei der Regulation der Muskelkontraktion wurden untersucht (Andrea and Walsh, 1992; Allen and Walsh, 1994).

Abbildung 7 zeigt die Signaltransduktion der Kontraktion glatter Muskulatur.

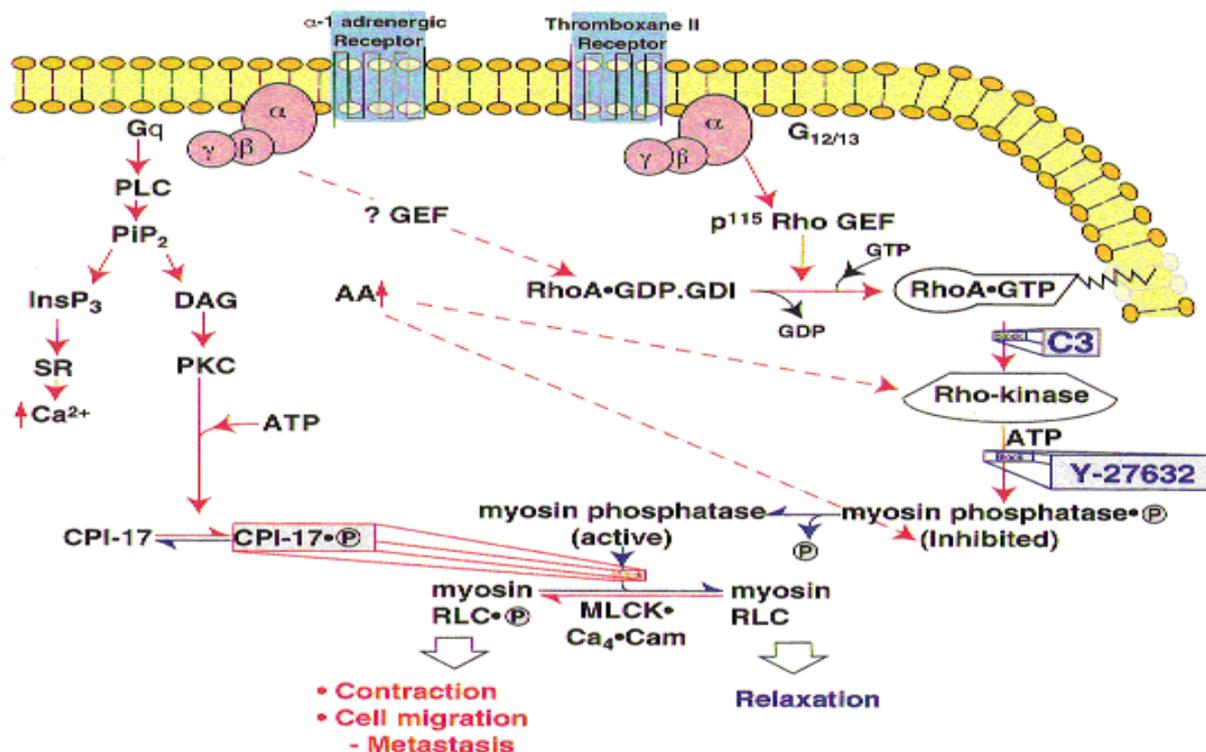


Abb. 7: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskette der Kontraktion von glatter Muskulatur [aus (Somlyo and Somlyo, 2000)]

1.3.3 Calciumunabhängige Kontraktion von TM und ZM

Da der ZM ein glatter Muskel ist und es sich bei TM um ein Gewebe mit glattmuskelähnlichen Eigenschaften handelt, wurde untersucht, ob ebenfalls calciumunabhängige Kontraktionen auslösbar sind, die über die gleiche Signaltransduktion wie die glatter Muskelzellen vermittelt werden.

Schon 1991 wurde bei Carbachol-induzierten Kontraktionsexperimenten mit bovinem ZM und TM festgestellt, dass beim TM ein zusätzlicher Mechanismus vorliegt, der unabhängig vom Vorhandensein des extrazellulären Calciums ist (Lepple-Wienhues et al., 1991b).

Neben der calciumabhängigen PKC-alpha-Isoform findet man im menschlichen und bovinen TM und ZM die calciumunabhängige PKC-epsilon-Isoform (Thieme 1999), die durch Western Blot im bovinen TM nachgewiesen wurde und eine Phosphorylierung von MLC bewirkt. Durch die Phosphorylierung wird die Kontraktion von TM und ZM induziert. Hemmstoffe der PKC sind Chelerythrin, Myristoilate und H-7, welche eine Relaxation des TM bewirken, während der ZM unberührt bleibt (Pang and Yorio, 1997; Thieme, 1999; Pfeiffer, 2001).

Nach diesen ersten Nachweisen einer calciumunabhängigen Kontraktion ist nun von Interesse, ob weitere Substanzen wie das an der Pathogenese des Glaukoms beteiligte Endothelin-1 (ET-1) ebenfalls calciumunabhängige Kontraktionen im TM und ZM auslösen können.

1.4 Endothelin-1

ET-1 ist der gegenwärtig stärkste bekannte physiologische Vasokonstriktor. Erstmals wurde das 21 Aminosäuren umfassende Isopeptid in Endothelzellkulturen isolierter Aortazellen bei Schweinen nachgewiesen (Yanagisawa et al., 1988).

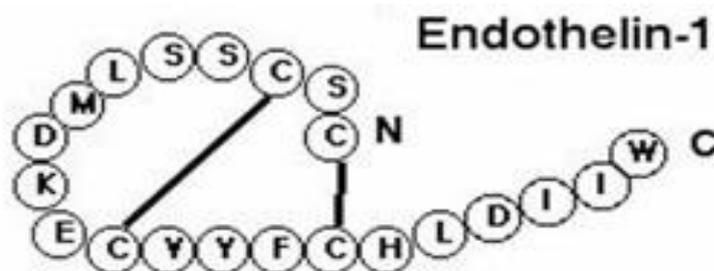


Abb. 8: Chemische Struktur des Endothelin-1 [aus (Haefliger et al., 1999)]

Dieses Peptid wird in Endothelzellen durch eine zweistufige Proteolyse de novo gebildet (Pang and Yorio, 1997). Das Isopeptid ET-1 wurde in Gefäß-Endothelzellen entdeckt. Nur ein kleiner Teil des in Endothelzellen produzierten Endothelins gelangt ins Lumen der Gefäße, was darauf schließen lässt, dass Endothelin vor allem eine lokale Wirkung hat (Wenzel and Lüscher, 1995).

Endotheline können die Blut-Retina-Schranke nicht passieren und somit auch nicht die glatte Muskulatur der Netzhautgefäße oder den optischen Nerv bei Gesunden erreichen (Haefliger et al., 1999).

ET-1 konnte in folgenden Augengewebe nachgewiesen werden: im Ziliarkörper, der Iris und der Retina bei Ratten; in der humanen Retina (Blutgefäße, Ziliarkörper, Nerven); im humanen und bovinen Kammerwasser in zwei bis drei mal höherer Konzentration als im Plasma (Yanagisawa et al., 1988; Lepple-Wienhues et al., 1992a). Die Konzentration von ET-1 im Plasma beträgt circa 1 pMol. Im Kammerwasser von Glaukompatienten konnten im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant erhöhte Endothelinspiegel gemessen werden (Noske et al., 1997).

Die drei bekannten Isopeptide des Endothelin, ET-1, ET-2 und ET-3, binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren ET-A und ET-B (Tao et al., 1998). Diese Rezeptoren wurden molekularbiologisch im TM und ZM nachgewiesen (Choritz et al., 2005).

Durch die Vasokonstriktion, welche durch Bindung von ET-1 an den ET-A-Rezeptor ausgelöst wird, kommt es zur Senkung des retinalen Blutflusses am menschlichen Auge. Bei langfristig erhöhter ET-1-Konzentration in Augengewebe führt der Vasospasmus zur Ischämie (Haefliger et al., 1992). Folglich kommt es zum Verlust von Axonen und zur Demyelinisierung der Nervengewebe. ET-1 löst des Weiteren Kontraktionen am bovinen ZM und TM aus (Lepple-Wienhues 1991; Wiederholt, 1998c).

Wie bereits erwähnt führt die Kontraktion des ZM, ausgelöst durch muskarinerge Agonisten wie Carbachol und Pilocarpin, zur Relaxation des TM und damit zur Aufweitung der Lamellenfächer. Somit wird der Kammerwasserabfluss verbessert. ET-1 hat jedoch einen stärkeren Effekt auf die Kontraktilität des TM und bewirkt somit eine Steigerung des IOD (Wiederholt et al., 2000).

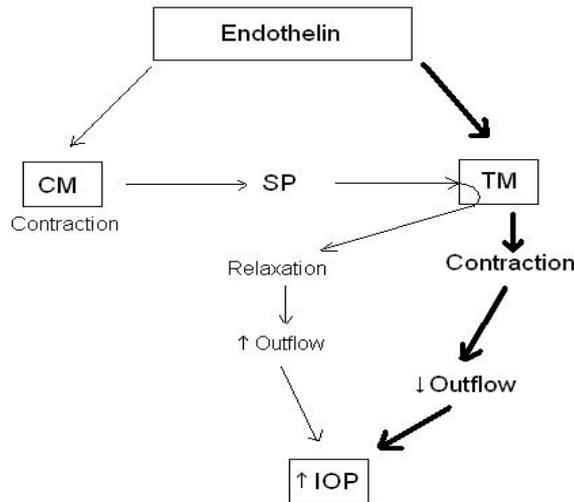


Abb. 9: Wirkung von ET-1 auf den ZM und TM. Durch den überwiegenden Effekt des Endothelins auf das TM wird dieses Gewebe kontrahiert und senkt somit den Abfluss des Kammerwassers. Daraus resultiert die Erhöhung des IOD [aus (Wiederholt et al., 2000)]

Mit direkten Kontraktionsmessungen von isolierten TM- und ZM-Streifen verglichen Wiederholt et. al. ET-1-induzierte Kontraktionen beider Gewebe. Als Referenzkontraktivität wurde der cholinerge Agonist Carbachol (10^{-6} mol/l) verwendet. Calciumabhängig wird in beiden Geweben eine Kontraktion durch ET-1 induziert. ET-1 erzeugte im TM eine effektivere Kontraktion im Vergleich zum ZM. Da der Effekt von ET-1 auf das TM dominant ist, senkt diese Substanz durch die Kontraktion dieses Gewebes den Kammerwasserabfluss und kann somit für eine Steigerung des IOD mitverantwortlich sein. Somit stellen die ET-1-abhängigen Signalwege des TM einen möglichen Angriffspunkt für die Glaukomtherapie dar.

ET-1-induzierte Kontraktionen des TM sind nur teilweise abhängig von extrazellulärem Kalzium und L-Typ-Calciumkanälen (Kageyama et al., 1996; Wiederholt, 1998c). Im Vergleich zur calciumabhängigen Kontraktion waren 23% der Endothelin-Antwort nach dem Ausschalten des extrazellulären Calciums bei bisher durchgeführten Kontraktionsmessungen noch vorhanden. Der ZM hingegen kontrahierte nicht unter diesen Versuchsbedingungen. Somit liegt ein Unterschied in der Kontraktionseigenschaft beider Gewebe über einen calciumunabhängigen Mechanismus vor (Thieme et al., 2000). In dieser Arbeit wurde neben dem extrazellulären Calcium auch das intrazelluläre Calcium geblockt, so dass die Kontraktionsmessungen mit ET-1 unter komplett calciumfreien Bedingungen erfolgten.

1.5 Fragestellung / Ziel der Arbeit

In Fortführung der bisher unternommenen Kontraktionsexperimente zur Erforschung der calciumunabhängigen Kontraktion von bovinem ZM und TM sollte untersucht werden, ob durch ET-1 nach Entzug von intra- und extrazellulärem Calcium noch Kontraktionen in diesen Augengeweben auszulösen sind. In diesem Fall ergibt sich die Frage, ob diese mit Hilfe eines spezifischen Hemmstoffs des Schlüsselenzyms des beteiligten Signalweges, der ROCK, wieder aufgehoben werden können.

Zudem sollte untersucht werden, ob die Schlüsselenzyme dieser Kaskade, die GTPase Rho-A und das Enzym ROCK in diesen Geweben auf Proteinebene nachweisbar sind. Somit würde die Hypothese der calciumunabhängigen ET-1 Kontraktion über diesen Signaltransduktionsweg erhärtet.

Des Weiteren war von Interesse, ob Unterschiede zwischen beiden Geweben vorliegen, wie es sich bereits bei den Kontraktionsexperimenten unter extrazellulär calciumfreien Bedingungen herausstellte.

Eine Hemmung des ET-1-induzierter Kontraktionsmechanismus, welcher ausschließlich auf das TM einwirkt und den ZM unbeeinflusst lässt, würde über die Relaxation des TM den Kammerwasserabfluss verbessern. Die Nebenwirkungen, die bei anderen Therapien über den ZM hervorgerufen werden, würden somit wegfallen. Dies wäre ein Ansatz zur Optimierung der medikamentösen IOD-Senkung des POWG.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kontraktionsmessungen

2.1.1 Gewebe

Für die Kontraktionsexperimente wurden ausschließlich TM und ZM von Augen gesunder zwei- bis vierjähriger Rinder isoliert. Die Rinderaugen wurden von einem Berliner Schlachthof geholt und eisgekühlt ins Labor transportiert. Die Rinderaugen standen in ausreichender Anzahl für die Messungen zur Verfügung.

Aufgrund der anatomischen Nähe von ZM und TM und das Hineinwachsen der Ziliarfasern in das TM bei Primatenaugen ist das bovine Augengewebe für die Kontraktionsxperimente besser geeignet. Das bovine TM lässt sich bei der Präparation viel leichter von den einstrahlenden ZM-Fasern separieren als das humane TM, da der ZM bei Rindern nur rudimentär angelegt ist (Flugel et al., 1991). Ein weiterer Vorteil des bovinen Augengewebes liegt darin, dass im Gegensatz zu humanem TM und ZM die bovinen Versuchsstreifen in ausreichender Größe und Anzahl für die Messapparatur präpariert werden konnten.

Wiederholt et. al berichteten von äquivalenten kontraktile Eigenschaften von humanem und bovinem TM und ZM. Durch die Anwendung verschiedener Zellkulturtechniken wurden humane und bovine Gewebe bezüglich ihrer Eigenschaften verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der Gewebe festgestellt werden (Wiederholt et al., 2000). Somit sind Kontraktionsexperimente mit bovinen Geweben reliabel. Die Proteinnachweise der Enzyme mittels Western Blot wurden für humane und bovine Gewebe erbracht, um so eine zusätzliche Bestätigung für die Übertragbarkeit der bovinen Daten auf humanes Gewebe zu erbringen.

2.1.2 Präparation

Bei der Präparation wurde zunächst der Bulbus vorsichtig von der äußeren Muskulatur, den Augenlidern und dem umgebenden Fettgewebe befreit. Anschließend erfolgten die Halbierung entlang des Äquators und das Verwerfen der hinteren Hälfte. Mit Hilfe einer Schere und Pinzette wurde das Herauslösen der Linse und des Glaskörpers vorgenommen und anschließend ein Quadrant des Augengewebes herausgeschnitten. Dieser Quadrant wurde auf einer Unterlage mit Nadeln an den Ecken fixiert. Unter dem Mikroskop wurden das bovine TM und der ZM freipräpariert. Diese Gewebe befinden sich unter dem Ziliarkörperepithel. Da beim Rinderauge die Iriswurzel durch das

Ligamentum pectinatum am corneoskleralen Übergang fixiert ist, wurde dieses Band zuerst durchtrennt. Mit dem Skalpell wurde dann das Ziliarkörperepithel vom TM getrennt. Die Präparation mit horizontalen Schnitten wurde fortgeführt bis der blauschwarze ZM sichtbar war. Die Fasern des weißlichen TM verlaufen parallel zum Rand der Cornea, der dunkle ZM im senkrechten Winkel dazu, so dass die Strukturen gut voneinander abgrenzbar waren. Zur Gewinnung der ZM-Streifen wurde zunächst ein senkrecht verlaufender Schnitt dicht zur Grenze des TM durchgeführt. Es wurden dann 5 mm breite Streifen mit einer Mindestlänge von 3 mm herausgeschnitten. Anschließend wurde durch zwei parallele Schnitte ober- und unterhalb des TM in der Verlaufsrichtung der Fasern das Gewebe ausgestanzt und ein 1 mm breiter und ca. 8-10 mm langer Streifen präpariert. Dieser wurde durch vorsichtiges Anheben und Abpräparieren von der Sklera gewonnen und in Segmente mit einer Länge von 4 mm geschnitten. In Abbildung 10 werden die Anordnung der Strukturen sowie die Schnitfführung dargestellt. Die Aufbewahrung der Gewebstreifen erfolgte gekühlt bei 4°C in Ringerlösung bis zum Versuchsstart.

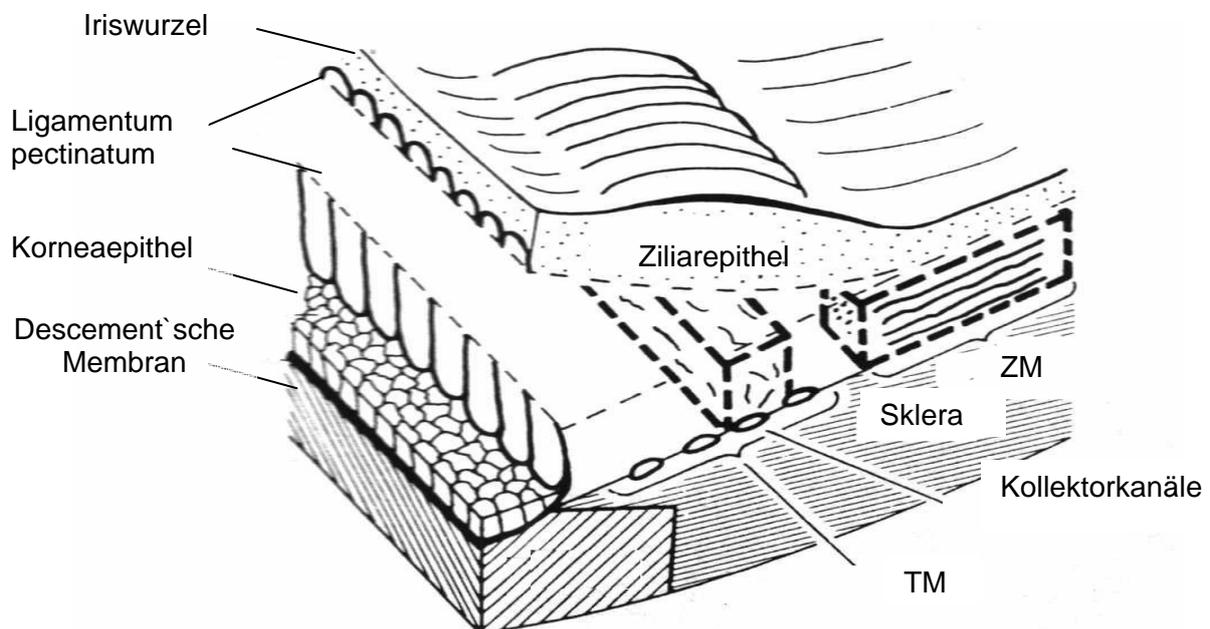


Abb. 10: Schema des Kammerwinkels mit Illustration der Schnitfführung zur Präparation sauber isolierter TM- und ZM-Streifen [aus (Lepple-Wienhues et al., 1991a)]

2.1.3 Messvorrichtung

Zur Kontraktionsmessung des bovinen ZM und TM diente eine Kombination aus einem Kraft-Längen-Umwandler und einem Perfusionssystem (Lepple-Wienhues et al., 1991a). Diese beiden Systeme waren mit einem gemeinsamen Computer verbunden.

Durch den Kraft-Längen-Messer wurden isometrische Kontraktionen in einer Größenordnung von 0,5 bis 500 μN gemessen. Sieben synchron koordinierte, doch unabhängig voneinander arbeitende Messkammern waren vorhanden.

Über das Perfusionssystem konnten verschiedene Wirkstoffe die Gewebe erreichen und stimulieren.

2.1.3.1 Kraft-Längen-Umwandler

Mit Hilfe eines Gewebeklebers wurden die Gewebestreifen zwischen zwei Nadeln geklebt. Eine Nadel war fixiert, die andere beweglich und mit einem langen Hebel am Drehpulinstrument verbunden. In einer Lichtschranke befand sich der kurze Hebel. Dieser bewirkte eine positionsabhängige Verschattung einer Photodiode. Eine zweite Diode zur Subtraktion von störenden Lichteinflüssen befand sich in der Nähe. Als weiterer Lichtschutz war diese Apparatur in einem schwarzen Kasten untergebracht. Bei Auslenkung des Hebels durch eine Relaxation bzw. Kontraktion des fixierten Gewebestreifens wurde diese durch die Verschattung der Photodiode registriert. Um die Länge des Gewebes konstant zu halten, wirkte der Auslenkung eine Spannung entgegen. Bei einer Kontraktion wurde folglich die Stromstärke erhöht, bei einer Relaxation gemindert. Mit dem Pentium I-Rechner, der mit dem Kraft-Längen-Umwandler verbunden war, wurde alle 15 Sekunden für die sieben Kanäle die entsprechende Kraft der isometrischen Messung in μN aufgezeichnet.

Für die Kontraktionen im TM ergaben sich durchschnittlich Werte von 50 bis 500 μN , bei dem ZM zwischen 200 und 800 μN . Der Kraft-Längen-Umwandler war so geeicht, dass die Längenänderungen unter 10 μm lagen.

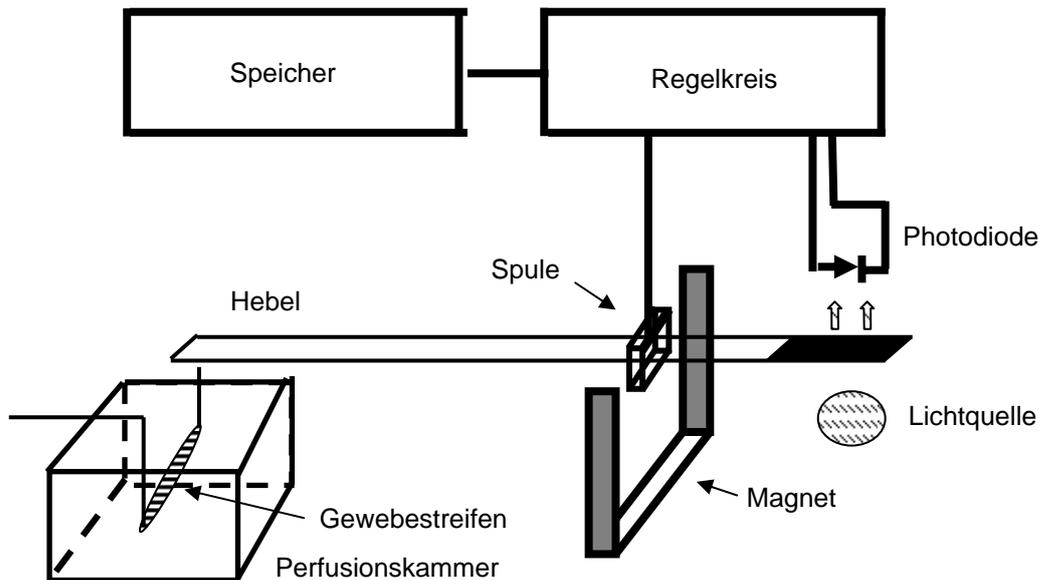


Abb. 11: Schema des Aufbaus eines Kraft-Längen-Messers [aus (Lepple-Wienhues et al., 1991a)]

2.1.3.2 Perfusionssystem

Die oben erwähnten zwischen zwei Nadeln fixierten Gewebestreifen wurden jeweils in eine der 7 Versuchskammern von je 2 ml Volumen eingetaucht. Jede Kammer wurde mit 5 ml Perfusionslösung pro Minute mit Hilfe eines zuführenden Schlauches turbulenzarm umspült. Beim Wechseln der zugeführten Versuchslösungen wurden über dieses System in einer Minute 95% der Lösungen in der Kammer ausgetauscht.

Die Schläuche aller Kammern liefen über eine gemeinsame Rollerpumpe (Ismatec, Schweiz), durch die eine zeitsynchrone Steuerung aller Kammern gewährleistet war. Eine Ummantelung um alle Kammern und Schläuche mit durchfließendem, vorgewärmtem Wasser diente durch den Wärmeaustausch mit den Versuchslösungen zur Erhaltung eines konstanten Temperaturniveaus von 36°C.

2.1.4 Versuchsablauf

Zuerst wurden die Kammern mit 36°C warmer Ringerlösung durchgespült. Die Gewebestreifen wurden mit Histoacrylkleber (Braun, Deutschland) an den Nadeln fixiert

und sofort in die höhenverstellbaren Kammern getaucht, bis sie vollständig mit Ringerlösung umspült wurden. Der Abstand der Nadeln wurde durch eine Justierschraube so lange verändert, bis eine Vorspannung von 100 μN auf die Gewebestreifen einwirkte. Die Lösungen wurden während des gesamten Versuchsablaufs mit 5%-igem CO_2 begast, um den physiologischen pH-Wert bei 7,4 zu erhalten. Die Experimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 36°C durchgeführt.

Der Versuchsablauf wird in Abbildung 12 mit Hilfe einer Beispielkurve dargestellt.

Nach Erreichen einer Baseline wurde zu Beginn des Versuchs für 15 Minuten das Parasympathomimetikum Carbachol in der Konzentration 10^{-6} mol/l über das Perfusionssystem den einzelnen Kammern zugeführt und eine Vorkontraktion der Gewebe erreicht.

Anschließend erfolgte das Auswaschen mit Ringerlösung, diesmal für etwa 30 Minuten bis die Baseline wieder erreicht war. Dann durchlief Carbachol die Kammern für 20 Minuten in der gleichen Konzentration wie bei der Vorkontraktion. Die nun gemessene Kontraktion entsprach der Maximalkontraktion (100%), auf die alle Messungen mit den Versuchslösungen prozentual ins Verhältnis gesetzt wurden. Erneut wurde für 30 Minuten mit Ringerlösung ausgewaschen um wiederum die Baseline darzustellen. Danach wurde der Versuchsablauf unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen weitergeführt. Dies wurde erreicht durch Verwendung von extrazellulär Ca-freier Lösung, die mit dem Calciumchelator EGTA, der Ethylenbistetraessigsäure, versetzt war. Zur intrazellulären Calciumbindung wurde BAPTA-AM (ein Acetoxymethylester) hinzugesetzt, ein membrangängiger Calciumchelator.

Nach ca. 20 Minuten unter calciumfreien Bedingungen wurde erneut Carbachol zugesetzt für die Messung der calciumunabhängigen Carbachol-induzierten Kontraktion. Dieses Parasympathomimetikum wurde danach wieder ausgewaschen. Anschließend erfolgte das Zuführen der Versuchslösung mit ET-1 in der entsprechenden Konzentration. Im dritten Versuchsblock wurde der ROCK-Inhibitor Y-27632 20 Minuten vor der zusätzlichen Gabe des ET-1 appliziert.

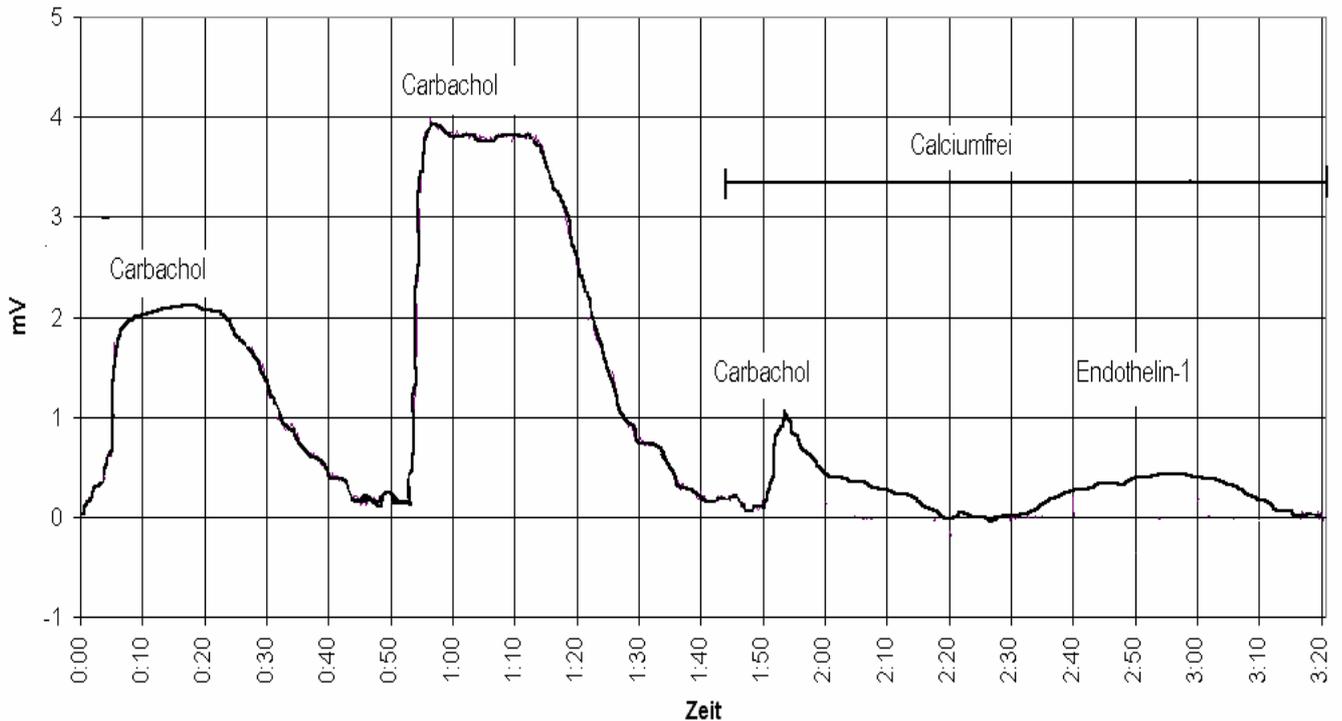


Abb. 12: Beispielkurve des Versuchsablaufes mit der calciumabhängigen Carbachol-Vorkontraktion und dem Carbachol-Maximalpeak. Anschließende Carbachol-Kontraktion und ET-1-induzierte Kontraktion unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen.

2.1.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Kontraktionsmessung wurden mindestens sieben Mal bestätigt. Repräsentative Einzelmessungen sind in den Abbildungen für den jeweiligen Versuchsablauf dargestellt, die Summe der Daten werden als Balkendiagramme dargestellt.

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Daten gespeichert und mit dem Programm Microsoft Excel die Kurven des Versuchsablaufes für alle gemessenen Gewebestreifen erstellt. Mit dem Programm Sigmaplot erfolgte die Auswertung der Daten und die Anfertigung der Balkendiagramme. Für die statistische Auswertung wurde der gepaarte Student t-Test herangezogen, um Vergleichsdaten aus derselben Versuchsreihe zueinander in Bezug zu setzen. Bei Darstellung des Vergleiches der Daten aus unterschiedlichen Versuchsreihen wurde zudem der ungepaarte t-Test verwendet. Die Werte wurden angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler, „n“ gibt die Anzahl der Versuche an. Die bereits beschriebene Maximalkontraktion von Carbachol diente als

Referenzwert. Durch diese Referenzkontraktion wurden Streuungen aufgrund von unterschiedlichen Gewebedurchmessern oder Präparationsbedingungen ausgeglichen. Der Standardfehler in den Balkendiagrammen zeigt einen Bereich um die Mittelwerte, in denen der reale Mittelwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 68% liegt. Des Weiteren wurde mit dem t-Test die Signifikanz von Kontraktionsunterschieden ermittelt und im p-Wert angegeben. Ein p-Wert kleiner als 0,05 gilt als signifikant und wurde mit (*) markiert. P-Werte < 0,01 wurden mit (**) und < 0,001 mit (***) gekennzeichnet.

2.1.6 Verwendete Lösungen

2.1.6.1 Ringerlösung

Die Ringerlösung setzt sich aus folgenden Ionenkonzentrationen (in mmol/l) zusammen: Na^+ 151, K^+ 5, Ca^{2+} 1,7, Mg^{2+} 0,9, Cl^- 131, $\text{SO}_4^{(2-)}$ 0,9, $\text{H}_2\text{PO}_4^{(1-)}$ 1, $\text{HCO}_4^{(2-)}$ 28, Glucose 5 mmol/l.

Ein pH von 7,4 wurde durch Titration mit der Base NaOH gewährleistet. Die hierfür verwendeten Substanzen wurden von der Firma Sigma (Deutschland) bezogen.

2.1.6.2 Calciumfreie Lösung

Die calciumfreie Ringerlösung hat folgende Zusammensetzung (in mmol/l): Na^+ 151, K^+ 5, Mg^{2+} 0,9, Cl^- 131, $\text{SO}_4^{(2-)}$ 0,9, $\text{H}_2\text{PO}_4^{(1-)}$ 1, $\text{HCO}_4^{(2-)}$ 28, Glucose 5, BAPTA-AM 10^{-5} mol/l, EGTA 3×10^{-5} mol/l.

2.1.6.3 Verwendete Versuchssubstanzen

Carbachol (Sigma, Deutschland)

Endothelin-1 (Alexis, Deutschland)

Y-27632 (Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Osaka, Japan)

BAPTA-AM, EGTA (Sigma, Deutschland)

2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.1 Zellkulturen

Vom TM und ZM wurden bovine als auch humane Kulturen und Nativgewebe molekularbiologisch untersucht. Die bovinen Gewebe stammen von den Augen, die für die Kontraktionsmessungen verwendet wurden. Die humanen Gewebe stammten von enukleierten Augen nach malignem Aderhautmelanom oder von Hornhautspendern aus der Augenklinik der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin. Im Vorfeld wurde eine Glaukomerkrankung bei den Spendern ausgeschlossen. Die Isolation der humanen Gewebe erfolgte nach der Methode von Flügel et al. (Flügel et al., 1991).

Zunächst wurden die Spenderaugen am Äquator mit einer Schere aufgeschnitten und der hintere Abschnitt verworfen. Mit einer feineren Schere erfolgten die Entfernung der Linse sowie das Durchtrennen der Zonulafasern. Dann wurde der Ziliarkörper mit einer Pinzette erfasst und langsam von der Sklera abgehoben. Das Präparat mit dem Ziliarkörper, dem ZM und der Iris wurde mit der Muskelseite nach oben in eine sterile Petrischale gelegt. Unter mikroskopischer Sicht konnte der ZM isoliert werden und nur die äußeren Anteile wurden zur Zellkultivierung weiterverwertet. Um das TM zu gewinnen, wurde zunächst der Schlemm-Kanal mit einem 0,5 mm dicken Draht sondiert. Danach erfolgte das Herausschneiden des darüber liegenden TM, welches ebenfalls unter ein Abdeckplättchen in eine Petrischale gelegt wurde. Das verwendete Kulturmedium setzte sich aus DMEM (Dulbeco's Modification of Eagle's minimal essential Medium), 20%igem FCS (Fetal Calf Serum), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zusammen. Bei konstanten 37°C wurden die Zellkulturen bei 95% Luft und 5% CO₂ gehalten und das Medium alle 3 – 4 Tage erneuert. Nach dem Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen nach der Trypsin-EGTA-Methode passagiert. Danach erfolgte die Aufteilung der aus dem Zellverband isolierten Zellen auf mehrere neue Petrischälchen. Im Brutschrank wurden die Zellen anschließend weitere Male passagiert und nach der dritten bis siebten Passage und nach dem Prüfen der Einschichtigkeit und Konfluenz für die Experimente verwendet.

Mikroskopisch und immunhistochemisch wurden die verwendeten Zellkulturen von Prof. Elke Lütjen-Decroll (Universität Erlangen) untersucht. Die Kulturen zeigten die für das TM und ZM typischen Charakteristika (Flügel et al., 1991).

2.2.2 Zelllysierung

Zum Nachweis intrazellulärer Proteine wurden diese zunächst durch spezielle Lysepuffer in wässrige Lösung gebracht. Im Lysepuffer befindliche Protease-Inhibitoren verhinderten durch Hemmung der zelleigenen Proteasen den Abbau der Proteine. Des Weiteren wurden die Arbeitsgeräte und Lösungen auf 4°C gekühlt. Durch anschließende Zentrifugation wurden die verschiedenen Zellfraktionen voneinander getrennt.

2.2.2.1 Lysierung kultivierter Zellen

Das Kulturmedium wurde von den in Zellkulturflaschen kultivierten Zellen mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen dreimalig mit gekühltem Phosphat Buffered Saline (PBS) gespült. Anschließend wurde die verbliebene Flüssigkeit aufgesaugt. In jede Flasche wurde Lysepuffer gegeben und dann die Zellen mit einem Zellscraper (Costar, Corning inc. USA) von der Unterlage getrennt. Das gewonnene Zelllysate wurde nach Überführung in Eppendorfgefäße im Wechsel je zweimal für 10 min. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend schnell auf 37°C erwärmt. Zusätzlich wurde die Zellsuspension mehrfach durch eine 26G-Kanüle gezogen, um eine möglichst vollständige Lyse zu bewirken und die Ausbeute an Protein im Lysat zu maximieren. Durch Zentrifugation (Zentrifuge: Hermle Z233MK-2, Denville Scientific, USA) bei 500 x g für 5 min. wurden grobe Zelltrümmer aus dem Lysat entfernt. Der Überstand wurde abpipettiert und in einem zweiten Schritt erneut zentrifugiert, diesmal für 30 min. bei 14000 x g. Der Überstand der zweiten Zentrifugation enthielt die zytosolischen Zellbestandteile. Der Proteingehalt dieses Zelllysats wurde anschließend quantifiziert. Dann wurden die Proben entweder sofort der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zugeführt oder zunächst bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Lysierung nativer Gewebe

Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, wurden das bovine TM und der ZM präpariert. Zusätzliche Arbeitsschritte waren nötig um den Zellverband zu lösen, da im Gegensatz zur Zellkultur eine wesentlich festere Verbindung zwischen den Zellen bestand.

Mit einem Homogenisator (Polytron, Kinematic AG, Schweiz) wurde die Zerkleinerung des Gewebes in 1 ml Lysepuffer erreicht. Durch wiederholtes Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C der Proben wurden anschließend die intrazellulären

Verbindungen gelöst. Danach wurden die Proben für 30 Minuten im Lysepuffer belassen und zuletzt wie oben beschrieben zentrifugiert.

2.2.3 Proteinquantifizierung

Dieses Verfahren dient dazu, für alle Gesamtlisatproben die gleiche Proteinkonzentration zu gewährleisten. Dies ist notwendig, um im darauf folgenden elektrophoretischen Trennungsverfahren mehrere gleiche Proteinmengen aufzutrennen und die beim immunologischen Proteinnachweis entstehenden Signalbanden verschiedener Proben zu vergleichen.

Nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion erfolgte die Bestimmung mit Hilfe des BCA-Tests (Pierce, USA). In alkalischer Lösung bilden sich Protein-Cu²⁺-Komplexe. Durch Reduktion der Kupferionen zu Cu⁺ bildete dieses mit Bicichonininsäure (BCA) violette Farbkomplexe. Die Absorption der Farbkomplexe wurde nach 30minütiger Inkubation mittels eines computergesteuerten Photometers (Shimadzu CS 9301 PC, Japan) bei 562 nm gemessen. Als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA) mit 0,2, 0,8 und 1,2 mg/ml verwendet (Pierce, USA).

Durch den Vergleich mit den Standardproben konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden. Anschließend wurden die Proben mit Lysepuffer so weit verdünnt, bis jede in gleicher Proteinkonzentration vorlag.

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine werden anhand ihres Molekulargewichtes und ihrer Ladung aufgetrennt. Sie wandern in einem elektrischen Feld durch eine dichte Gitterstruktur aus Polyacrylamid-Gel und befinden sich in einer Lösung mit negativ geladenem Sodiumdodecylsulfat (SDS). Durch die Komplexbildung von SDS und den Proteinen wird deren denaturierter Zustand fixiert. Dies hat zur Folge, dass alle Proteine negativ geladen sind und keine Bindung untereinander eingehen können. Im elektrischen Feld wandern sie durch die Gitterstruktur zur Anode, dabei haben die kleinen, niedermolekularen Proteine die höchste Wanderungsgeschwindigkeit. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden verschiedene Marker eingesetzt, welche größendefinierte angefärbte Proteine enthielten. Als Trenngel zur Auftrennung der im Lysat enthaltenen Proteine in der Mini-Protein-Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Life-Science-Group, USA) diente ein 8,5%iges Polyacrylamid-Gel. Diesem war ein Sammelgel vorgeschaltet, in das Taschen

für die Proben eingelassen waren. Die Protein-SDS-Komplexe richteten sich im Sammelgel entsprechend ihrer Ladung aus. Die Proben, welche mit Lämmli-Puffer (LAE) versetzt waren, wurden 5 Minuten bei 95°C gekocht zur Denaturierung und Auflösung der Sekundärstrukturen. Dann erfolgte das Auftragen der Proben mit einem Proteingehalt von 20 µg auf das Gel. Auf jedes Gel wurden zusätzlich 5 µl eines standardisierten Markers (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Dieser enthielt gefärbte Proteine definierter Molekülgrößen, so dass nach seiner Auftrennung eine Molekulargewichtsskala entstand. An dieser konnte die Molekülgröße der detektierten Proteine nach deren Auftrennung abgelesen werden.

Mit einer Spannung von 100 Volt erfolgte der Transfer der Proteine vom Sammelgel in das Trenngel. Im Trenngel wurde eine Spannung von 150 Volt angelegt.

Sobald die kleinsten Proteine das Gel durchwandert hatten, wurde die Elektrophorese beendet.

2.2.5 Western Blot

Den Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran mit hoher Proteinbindungskapazität (Polyscreen NEM, Life Science Products, USA) bezeichnet man als Western Blot.

Die widerstandsfähige Membran wurde zuerst für mindestens 15 Minuten in 100%igem Ethanol auf der Wippe inkubiert und danach mit den Gelen aus der Elektrophorese in Transferpuffer äquilibriert. Dieser Puffer enthielt Methanol, welches zur Lösung der Proteine aus dem Gel diente. Mit einer Spannung von 100 Volt fand der elektrische Proteintransfer in der Mini-Protein-Elektrophoresekammer bei 4°C über einen Zeitraum von 60 Minuten statt.

Anschließend wurde die Blot-Membran für den immunologischen Proteinnachweis weiterverwendet.

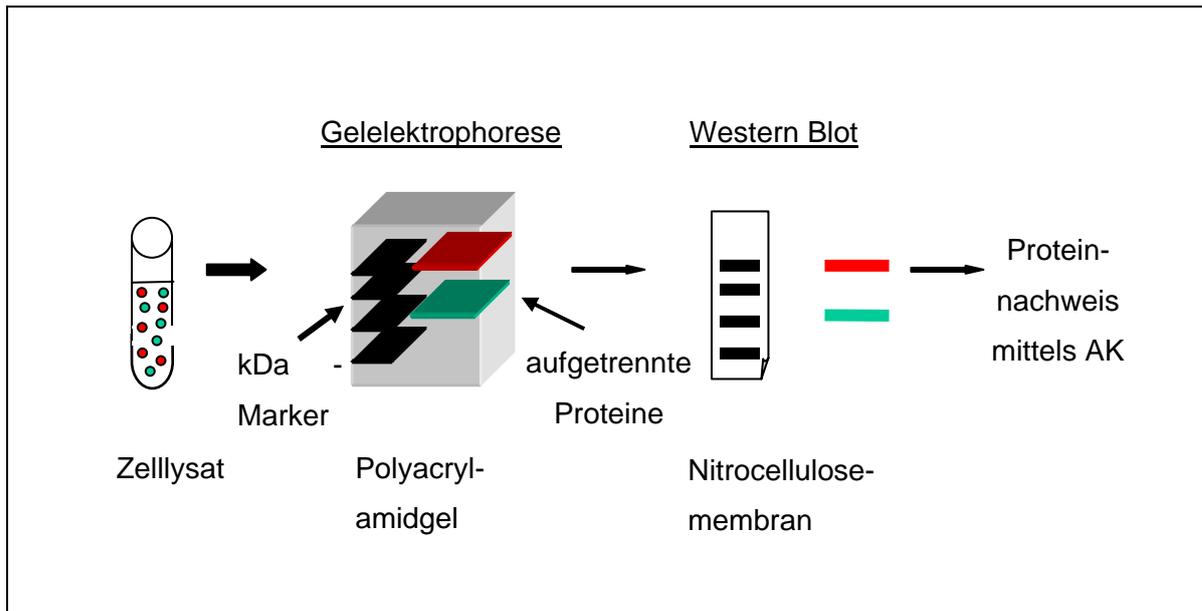


Abb. 13: Prinzip der SDS-Gelelektrophorese und des Western Blots

2.2.6 Immunologischer Proteinnachweis

Die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine werden auf der Membran mit einem Antikörper inkubiert. Auf dem gesuchten Protein bindet der AK mit seiner Bindungsstelle an das passende Epitop, dieses wird als entsprechende Bande sichtbar. Zur Unterscheidung spezifisch und unspezifisch angefärbter Proteine wird ein Blockpeptid (BP) eingesetzt. Das BP besetzt die Bindungsstelle des AK, so dass dieser das gesuchte Protein nicht binden kann und somit die Bande nicht angefärbt wird. Bei Vorliegen einer von der spezifischen Bindungsstelle unabhängigen Bindung zwischen dem AK und Protein bleibt die Bande trotz Einsatz des BP sichtbar.

Bevor die Reaktion der Blot-Membran mit dem AK stattfinden konnte, musste diese zunächst 60 Minuten mit einem speziellen Blockpuffer auf der Wippe inkubiert werden. Dabei handelte es sich in diesem Fall um 5%iges Rinderalbumin (BSA) (Merck, Deutschland) in PBS/Tween-Lösung. Durch diesen Arbeitsschritt wurden die Proteinbindungsstellen der Blot-Membran blockiert und unspezifische Bindungen der AK auf der Oberfläche der Membran verhindert. Über Nacht wurde die Blot-Membran bei 4°C mit dem spezifischen AK auf einer Wippe inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Membran mit PBS/Tween auf der Wippe um den nicht gebundenen AK zu entfernen. Danach wurde die Membran bei Raumtemperatur mit einem zweiten AK inkubiert, welcher gegen den Fc-Teil des ersten AK gerichtet war. Der zweite AK ist mit dem Enzym Peroxydase gekoppelt, das nach Zugabe eines entsprechenden Substrates

(Lumi-LightPlus, Western Blot kit, Roche Diagnostik, Deutschland) eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert, die unter Verwendung eines Lumineszenz-Analysators (LAS-1000-Image-Analyzer, Fujifilm, Tokyo, Japan) und geeigneter Software (AIDA 2.1, Raytest, Berlin) registriert wurde. Damit waren die durch den ersten spezifischen AK markierten Proteine als Banden sichtbar.

Die Spezifität der Banden wurde durch die gleichzeitige Inkubation des ersten AK mit dem Antigen-spezifischen BP verifiziert.

2.2.7 Auswertung

Die proteinbiochemischen Untersuchungen wurden mindestens dreimal durchgeführt und repräsentative Ergebnisse in den Abbildungen dargestellt.

2.2.8 Lösungen

Lysepuffer (Gesamtlysat)

In mmol/l: 20 Tris, 137 NaCl

In %: 1 NP 40 Stocklösung, 10 Glycerol

Proteaseinhibitoren: Aprotinin (Sigma, Deutschland), 0,1 mg/ml, und zusätzlich 1 Tablette Complete® Protease inhibitor cocktail (Boehringer, Deutschland) in 10 ml Lysepuffer

Elektrophoresepuffer

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

Transferpuffer

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

PBS/Tween

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

Trenngel

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

Sammelgel

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

2.2.9 Antikörper

1. AK RhoA, ROCK, Santa Cruz Biotechnology, Inc. , Santa Cruz, CA, USA
2. AK zur Markierung der 1. AK : Lumi Light Western blot Kit

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der Kontraktionsexperimente

3.1.1 Carbachol- und Endothelin-1-induzierte calciumunabhängige Kontraktion im bovinen TM

Zunächst wurde calciumabhängig mit Carbachol (10^{-6} mol/l) die Maximalkontraktion gemessen und das Carbachol nach 20minütiger Zugabe wieder mit Ringerlösung ausgewaschen bis zum Erreichen der Baseline. Anschließend wurde der Versuch unter calciumfreien Bedingungen fortgeführt. Dazu wurden der extrazelluläre Calciumchelator EGTA und der membrangängige Calciumchelator BAPTA-AM (Acetoxymethylester) in der Konzentration $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l eingesetzt. Mit Carbachol konnte auch unter diesen Bedingungen eine geringe Kontraktion induziert werden, die $23,1 \pm 2,6$ % ($n=8$) der Maximalkontraktion (10^{-6} mol/l Carbachol in Ringerlösung) betrug. Nach Auswaschen von Carbachol und erneutem Erreichen der Baseline wurde die Versuchssubstanz ET-1 (10^{-8} mol/l) appliziert. Im bovinen TM konnte durch ET-1 eine calciumunabhängige Kontraktion von $13,9 \pm 2,5$ % ($n=8$) der Maximalkontraktion induziert werden (siehe Abb. 14 und 15).

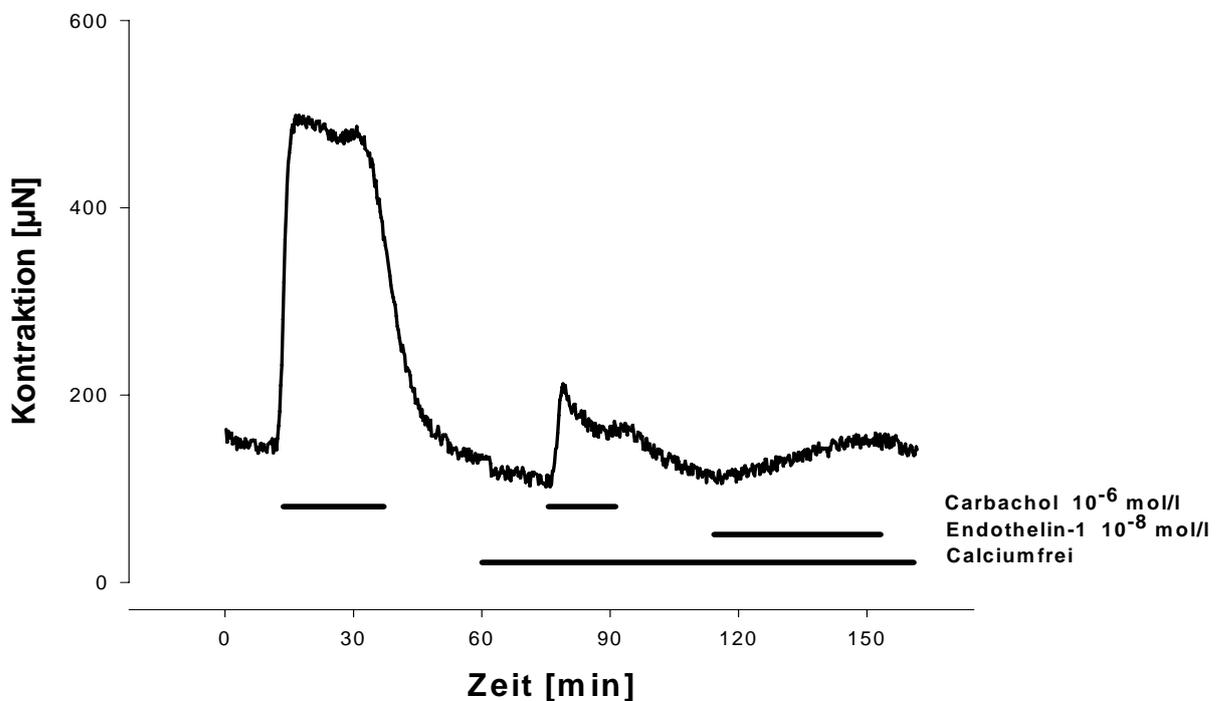


Abb. 14: Carbachol **und ET-1-induzierte** Kontraktion unter calciumfreien Bedingungen im bovinen TM. Originalaufzeichnung der isometrischen Kontraktionsmessung

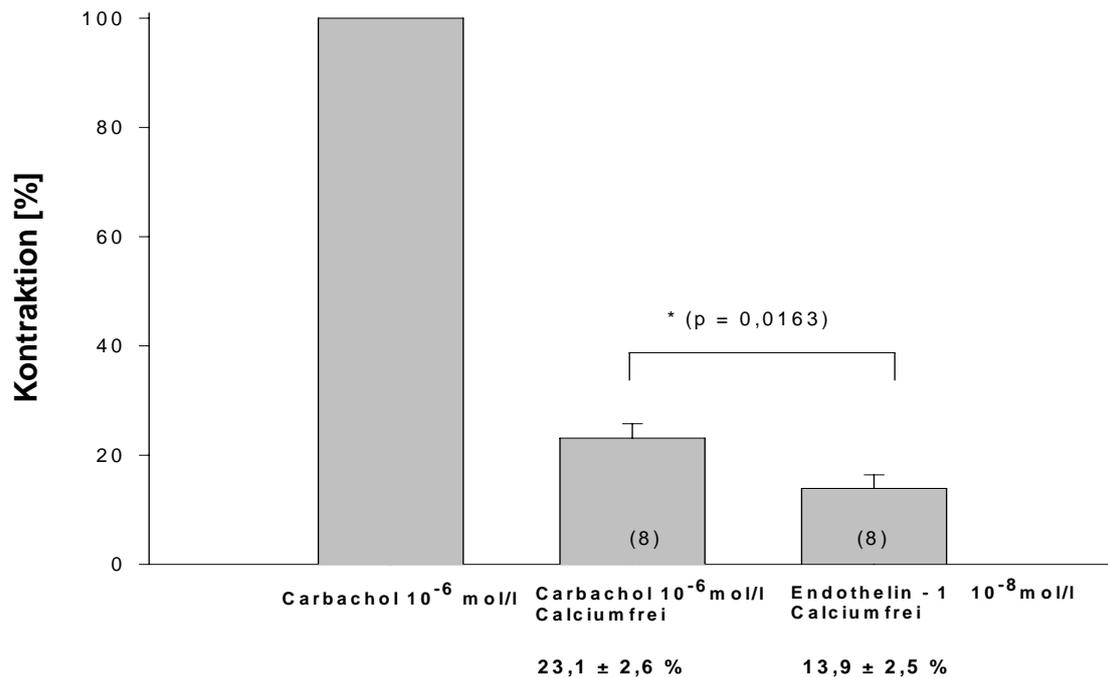


Abb. 15: Zusammenfassung der Carbachol- und ET-1-induzierten Kontraktion unter calciumfreien Bedingungen im bovinen TM

3.1.2 Carbachol- und Endothelin-1-induzierte calciumunabhängige Kontraktion im bovinen ZM

Der oben beschriebene Versuchsablauf wurde mit bovinen ZM unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt.

Mit Carbachol wurde wie im ZM eine calciumunabhängige Kontraktion von $21,9 \pm 6,8\%$ (n=8) vs. 100% 10^{-6} mol/l Carbachol in Ringerlösung induziert. ET-1 löste unter extra- und intrazellulär calciumfreien Bedingungen keine Kontraktion ($-0,8 \pm 0,4\%$ vs. 100% 10^{-6} mol/l Carbachol in Ringerlösung, n=8) in diesem Gewebe aus (siehe Abb. 16 und 17).

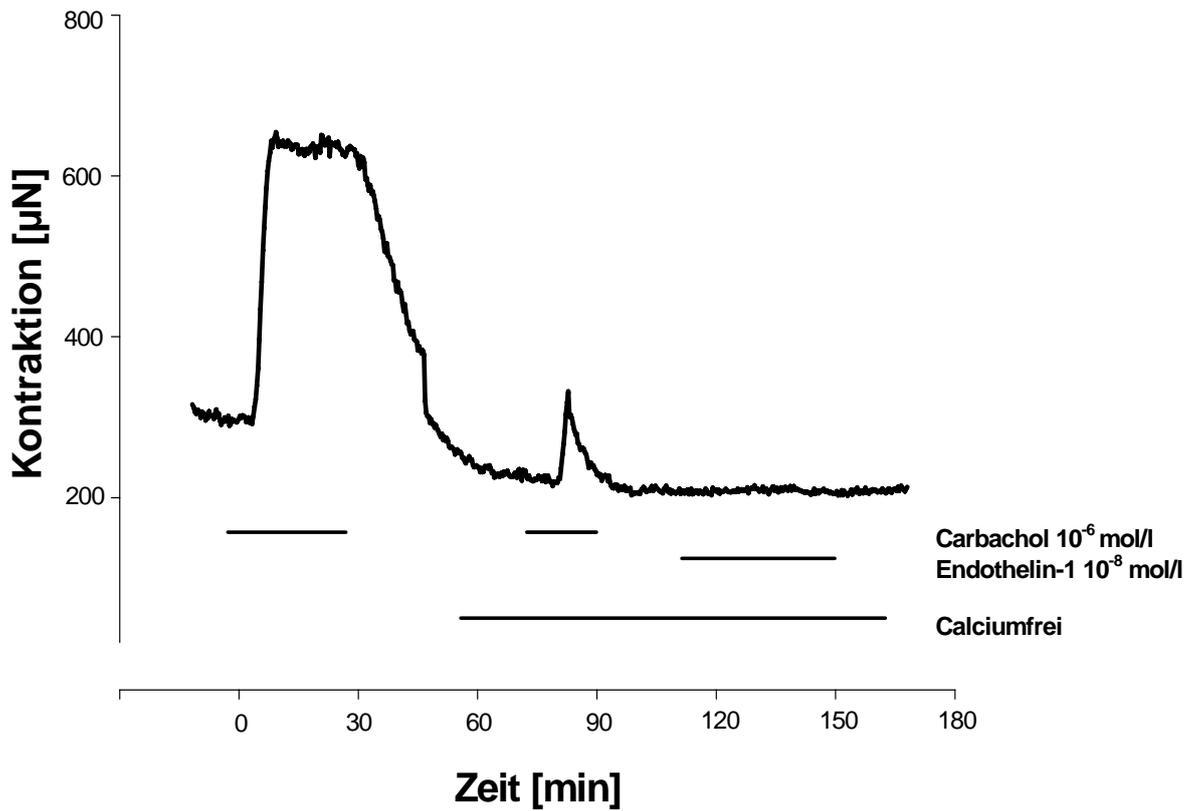


Abb. 16: Carbachol und ET-1-induzierte Kontraktion unter calciumfreien Bedingungen im bovinen ZM. Originalaufzeichnung der isometrischen Kontraktionsmessung

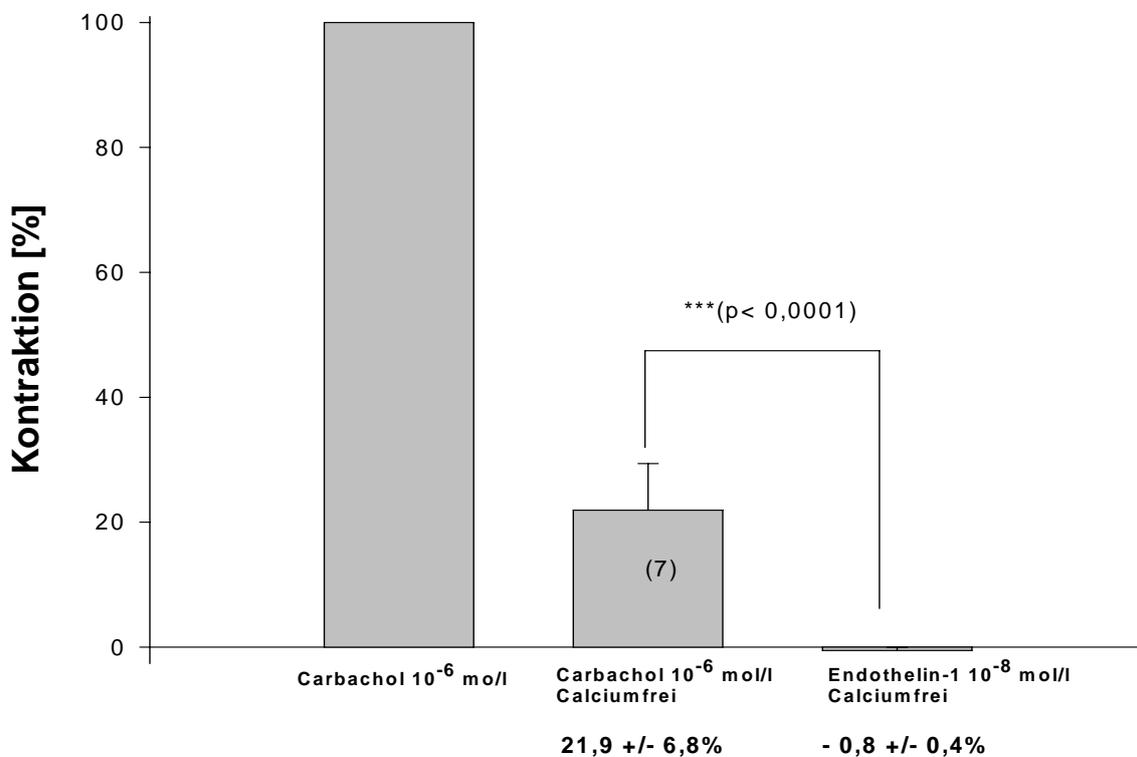


Abb. 17: Zusammenfassung der Carbachol- und ET-1-induzierten Kontraktion unter calciumfreien Bedingungen im bovinen ZM

Somit liegt unter diesen Versuchsbedingungen ein signifikanter Unterschied zwischen bovinem TM mit einer calciumunabhängigen ET-1-Kontraktion und dem ZM vor, bei dem die calciumunabhängige ET-1-Kontraktion ausbleibt. Abbildung 18 zeigt den Vergleich der calciumunabhängigen ET-1-Kontraktion von bovinem TM und ZM.

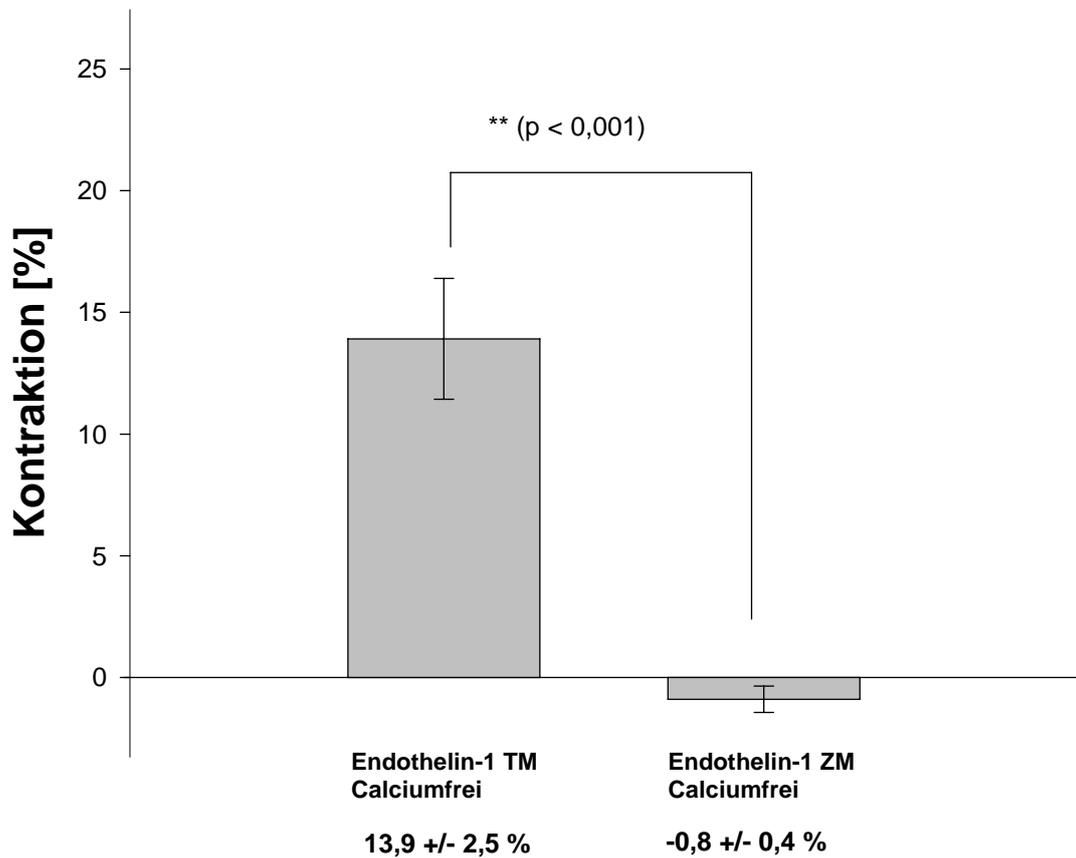


Abb. 18: ET-1-induzierte Kontraktion unter calciumfreien Bedingungen im bovinen TM und ZM. Balkendiagramm des Vergleiches der prozentualen Kontraktion der ET-1-induzierten calciumunabhängigen Kontraktion im TM versus ZM

3.1.3 Der Einfluss von Y-27632 auf die calciumunabhängige Endothelin-1-induzierte Kontraktion im bovinen TM

Um zu untersuchen, ob die ROCK an der calciumunabhängigen ET-1-induzierten Kontraktion im bovinem TM beteiligt ist, wurde der hochspezifische ROCK-Inhibitor Y-27632 eingesetzt. Zunächst wurde die Carbachol-induzierte Kontraktion (10^{-6} mol/l) in Ringerlösung als Maximalpeak gemessen. Unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen wurde anschließend das Y-27632 (10^{-6} mol/l) zugegeben und nach 20 Minuten zusätzlich zum Hemmstoff das ET-1 (10^{-8} mol/l).

Im bovinen TM wurde die mit ET-1 unter calciumfreien Bedingungen induzierte Kontraktion durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 aufgehoben (n=8).

In Abbildung 19 wird die repräsentative Originalkurve der Kontraktionsmessungen dieses Versuchsablaufes gezeigt. Abbildung 20 fasst die Ergebnisse der calciumunabhängigen ET-1-Kontraktion und die Hemmung der Kontraktion mit Y-27632 zusammen.

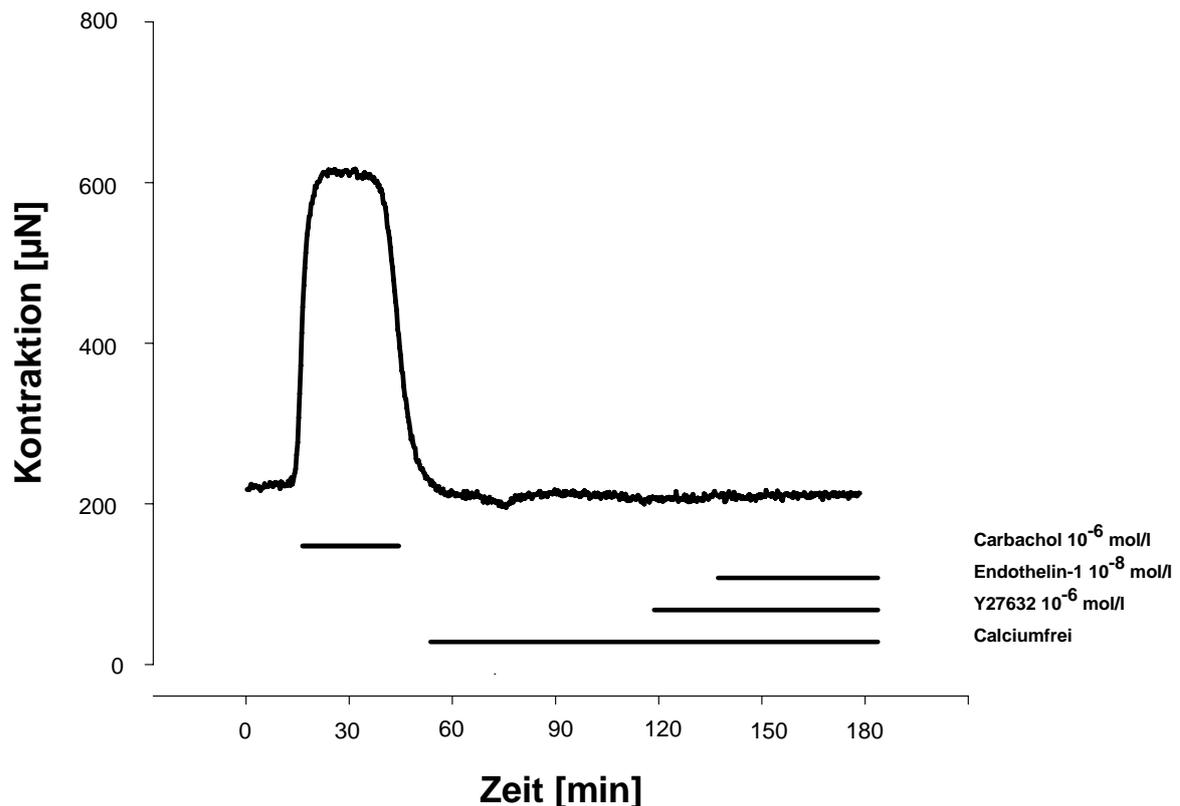


Abb. 19: Hemmung der ET-1-induzierten calciumunabhängigen Kontraktion im bovinen TM durch den ROCK-Inhibitor Y-27632. Originalaufzeichnung der isometrischen Kontraktionsmessung

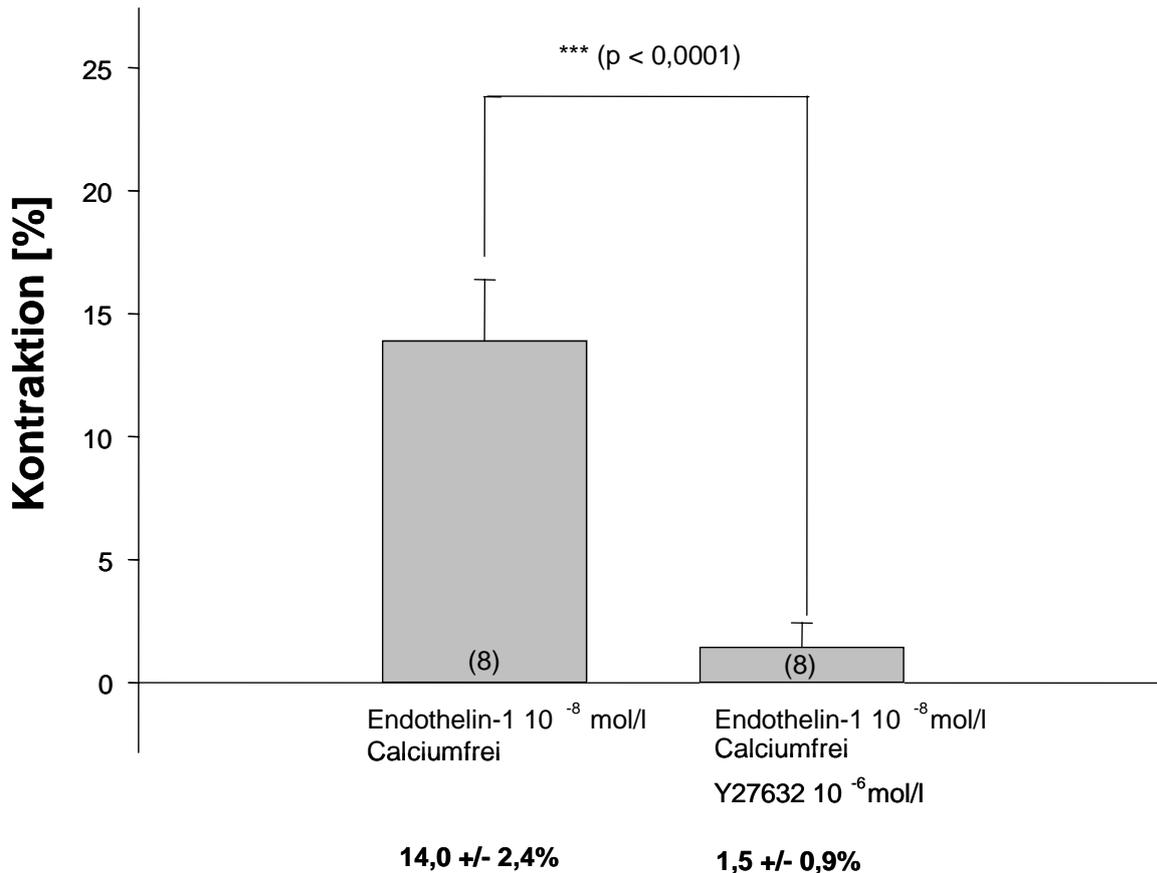


Abb. 20: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Hemmung der ET-1-induzierten calciumunabhängigen Kontraktion im bovinen TM durch den ROCK-Inhibitor Y-27632

3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kontraktionsmessungen

Im bovinen TM und ZM können nach Entzug des intra- und extrazellulären Calciums signifikante Carbachol-induzierte Kontraktionen gemessen werden.

Im TM zeigten sich auch calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktionen. Hingegen blieb beim bovinen ZM unter den gleichen Versuchsbedingungen die Kontraktion aus.

Unter Zusatz des ROCK Inhibitors Y-27632 wurde die calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktion des TM gehemmt.

3.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

3.2.1 Western Blot-Untersuchungen zum Nachweis der Expression von Rho-A

3.2.1.1 Natives bovines TM und ZM

Des Weiteren ist von Interesse, ob die Schlüsselenzyme des calciumunabhängigen Kontraktionsmechanismus der glatten Muskelzellen auch in den kontraktile Geweben TM und ZM exprimiert werden. Natives bovines TM und boviner ZM wurden mittels Western Blot auf die Expression der GTPase Rho-A untersucht.

Von drei verschiedenen nativen, bovinen TM und ZM zeigt die Abbildung 21 repräsentativ für Gesamtlysate mehrerer Gewebe eine deutliche Bande bei 24 kDa. Unter Verwendung des Blockpeptids (BP) ist das Signal bei 24 kDa deutlich abgeschwächt.

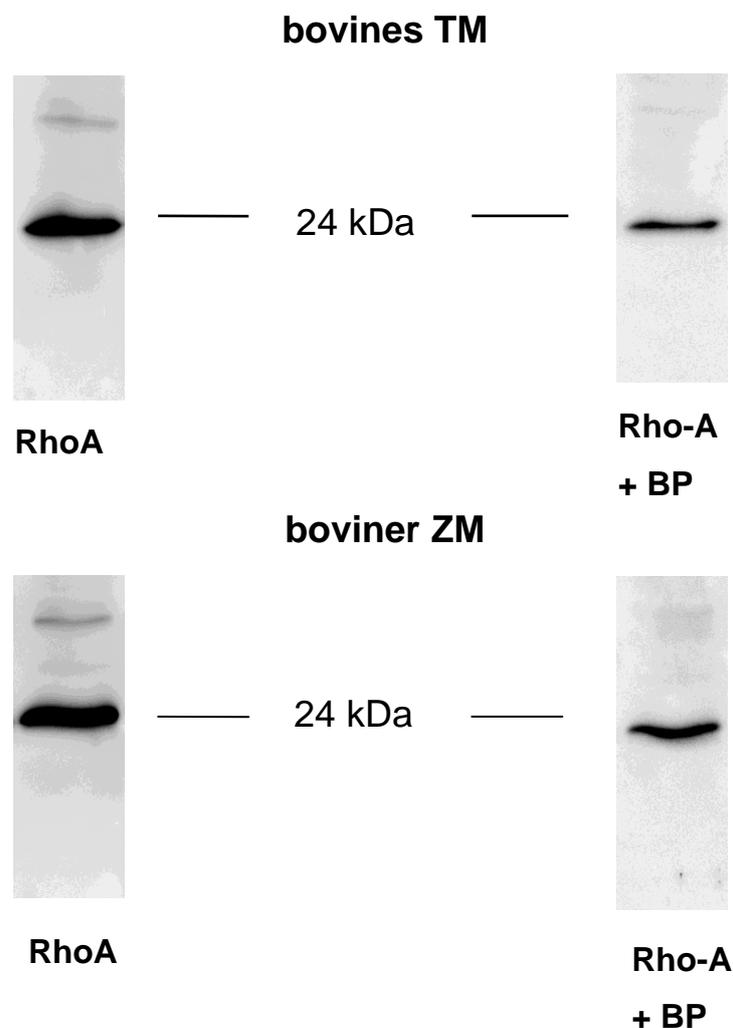


Abb. 21: Expression von Rho-A in nativem, bovines TM und ZM (links)
Abgeschwächte Banden durch das BP als Spezifitätsnachweis (rechts)

3.2.1.2 Kultivierte bovine TM- und ZM-Zellen

Zellkulturen von bovinem TM und ZM wurden ebenfalls mittels Western Blot auf die Expression der Rho-A untersucht.

Es wurden mehrere TM- und ZM-Kulturen, die jeweils von unterschiedlichen Rindern angezüchtet wurden, auf die Expression von Rho A untersucht. Diese Protein konnte in allen untersuchten Kulturen nachgewiesen werden, Abbildung 22 zeigt eine deutliche Bande bei 24 kDa. Unter Verwendung des BP ist das Signal bei 24 kDa deutlich abgeschwächt.

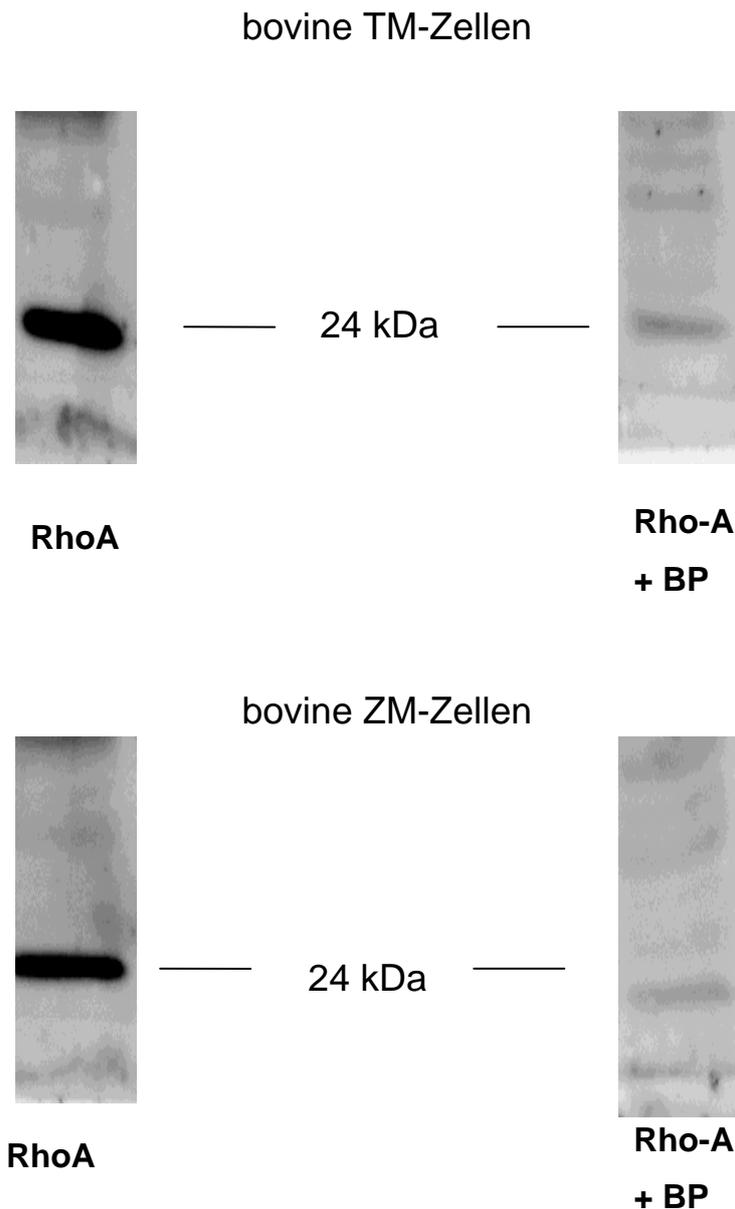


Abb. 22: Expression von Rho-A in kultivierten, bovinen TM- und ZM-Zellen (links)
Abgeschwächte Banden durch das BP als Spezifitätsnachweis (rechts)

3.2.1.3 Kultivierte humanes TM- und ZM-Zellen

Auch Kulturen von humanem TM und ZM, die von mehreren Spenderaugen kamen, wurden molekularbiologisch auf die Expression der Rho-A untersucht.

Die Bande bei 24 kDa zeigte sich in Kulturen von beiden humanen Augengeweben (siehe Abb. 23) und wiederum deutlich abgeschwächt nach Inkubation mit Antikörper und BP.

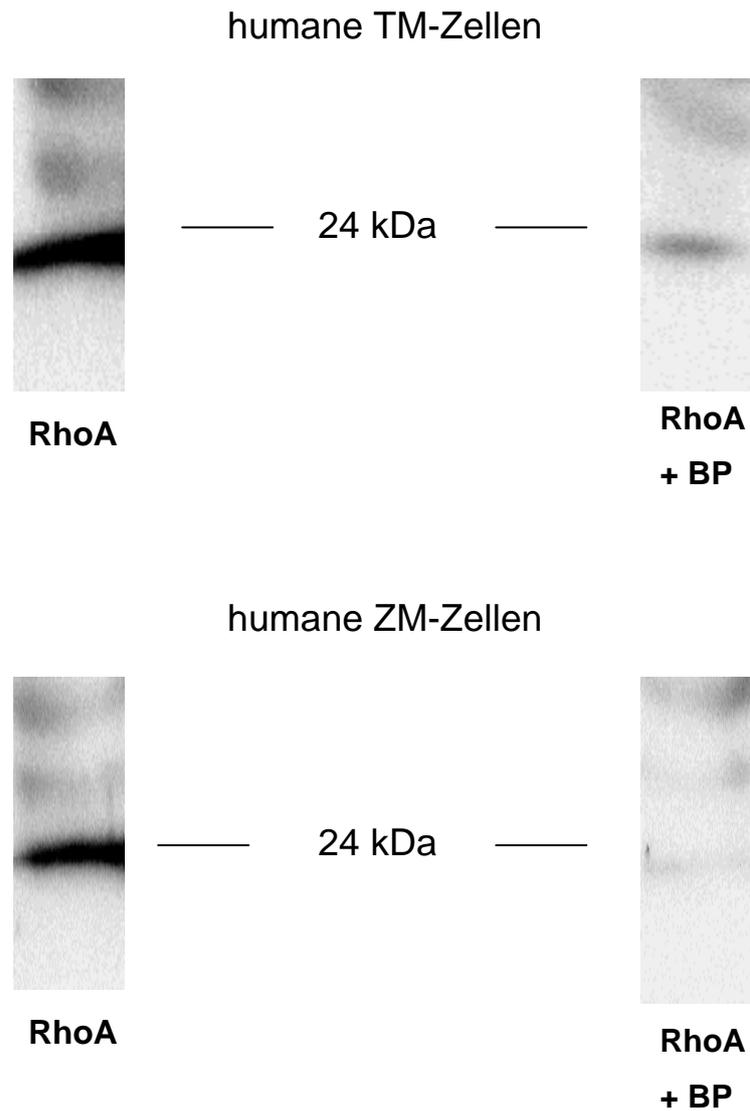


Abb. 23: Expression von Rho-A in kultivierten, humanen TM- und ZM-Zellen (links)
Abgeschwächte Banden durch das BP als Spezifitätsnachweis (rechts)

3.2.2 Western Blot-Untersuchungen zum Nachweis der Expression von ROCK-1

3.2.2.1 Natives bovines TM und ZM

Ein weiteres Schlüsselenzym des calciumunabhängigen Kontraktionsmechanismus ist die ROCK. Molekularbiologisch wurde die Expression der ROCK-1 im TM und ZM untersucht.

Natives bovines TM und ZM wurden mittels Western Blot Analysen auf das Vorliegen von ROCK-1 untersucht. In allen Geweben konnte dieses Enzym bei 160 kDa nachgewiesen werden (siehe Abb. 24). Die Spezifität dieser Bande wurde durch die Verwendung des BP verifiziert.

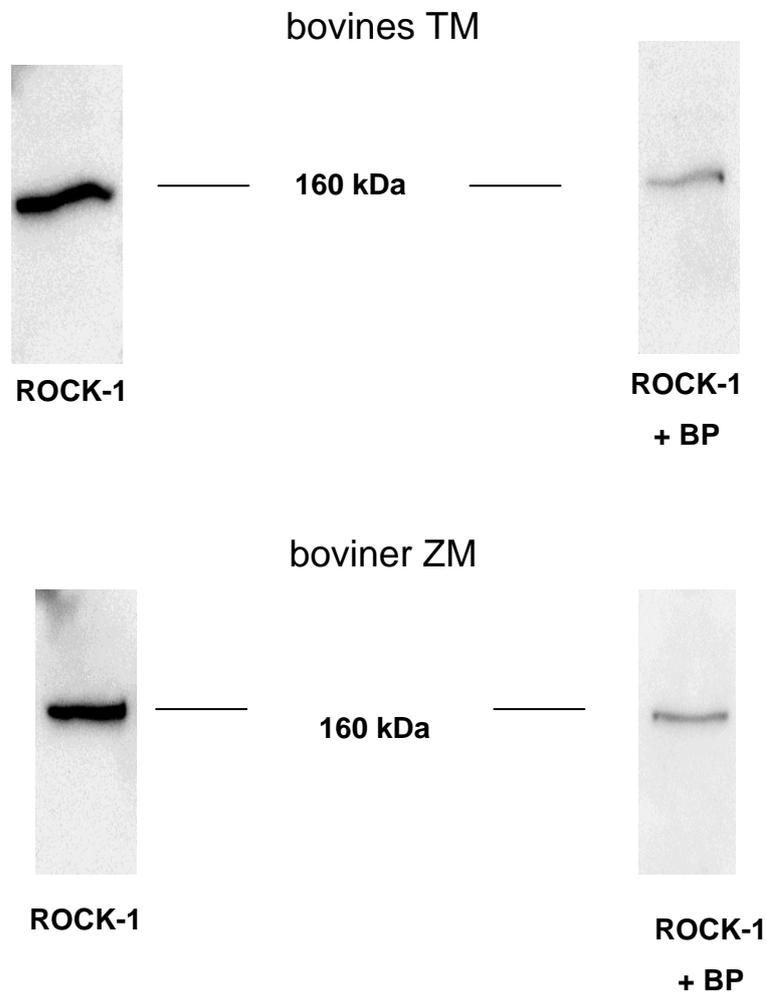


Abb. 24: Expression von ROCK-1 in nativem, bovinen TM und ZM (links)
Abgeschwächte Banden durch das BP als Spezifitätsnachweis (rechts)

3.2.2.2 Kultivierte bovine TM- und ZM-Zellen

Zellkulturen von bovinem TM und ZM wurden ebenfalls mittels Western Blot auf die Expression der ROCK-1 untersucht.

Es wurden mehrere TM- und ZM-Kulturen, die jeweils von unterschiedlichen Rindern angezüchtet wurden, auf die Expression von ROCK-1 untersucht. Dieses Protein konnte in allen untersuchten Kulturen nachgewiesen werden, Abbildung 25 zeigt eine deutliche Bande bei 160 kDa. Unter Verwendung des BP ist das Signal bei 160 kDa deutlich abgeschwächt.

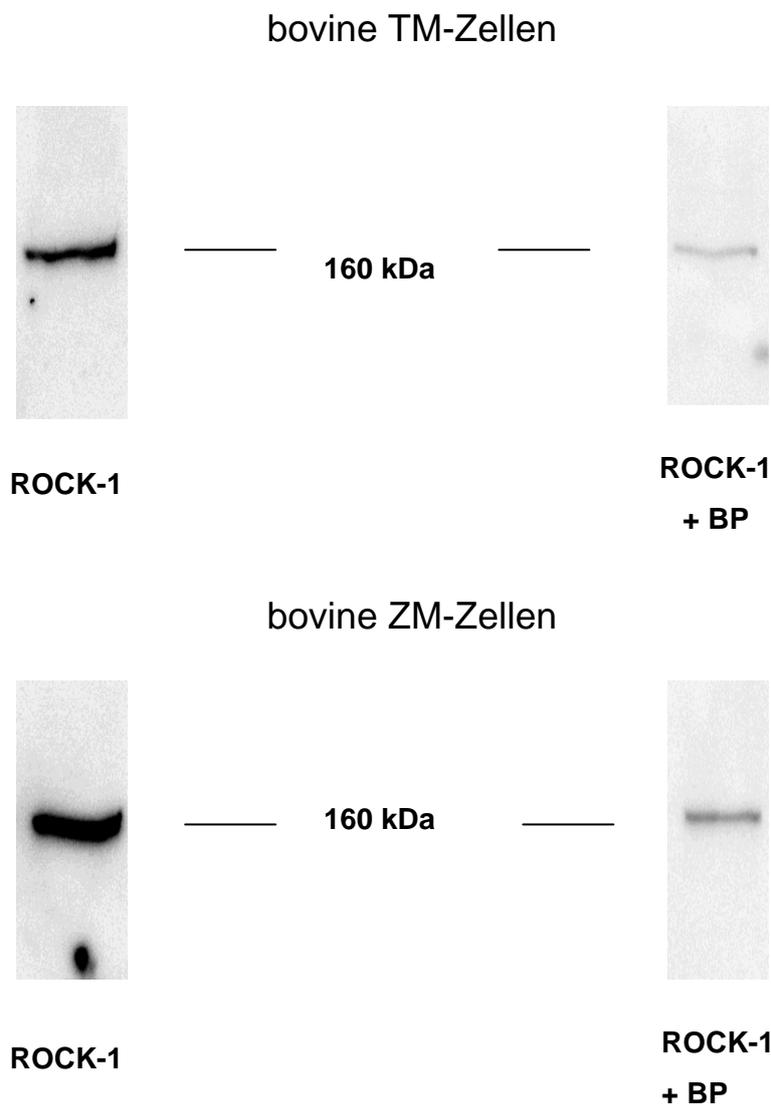


Abb. 25: Expression von ROCK-1 in kultivierten, bovinen TM- und ZM-Zellen (links)
Abgeschwächte Banden durch das BP als Spezifitätsnachweis (rechts)

3.2.2.3 Kultiviertes humanes TM und ZM

Zudem wurden Kulturen von humanem TM und ZM, die von mehreren Spenderaugen stammten, molekularbiologisch auf die Expression der ROCK-1 untersucht.

Die Bande bei 160 kDa zeigte sich in Kulturen von beiden humanen Augengeweben (siehe Abb. 26) und war wiederum deutlich abgeschwächt nach Inkubation mit Antikörper und BP.

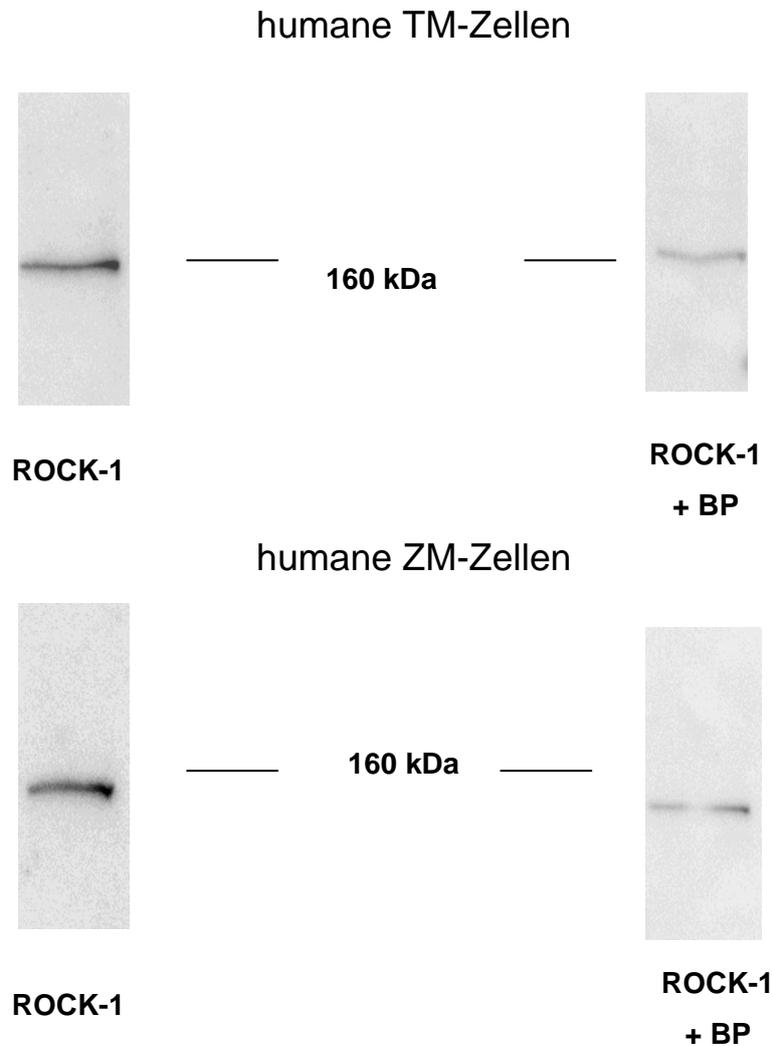


Abb. 26: Expression von ROCK-1 in kultivierten, humanen TM- und ZM-Zellen (links)
Abgeschwächte Banden durch das BP als Spezifitätsnachweis (rechts)

3.2.3 Zusammenfassung der Western Blot-Analysen

Mittels der Western Blot Analysen konnten im nativem und kultiviertem bovinem TM und ZM und ebenso in kultiviertem humanem TM und ZM die GTPase Rho-A und ROCK nachgewiesen werden. Die spezifischen Banden für Rho-A lagen bei 24 kDa und für ROCK bei 160 kDa.

4 DISKUSSION

Aus den Ergebnissen der Kontraktionsexperimente und Western Blot Analysen in dieser Arbeit ergeben sich folgende Aussagen:

Während mit Carbachol in TM und ZM unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen Kontraktionen nachgewiesen werden konnten, wurde eine ET-1-induzierte calciumunabhängige Kontraktion nur im TM beobachtet. Somit ist die ET-1-induzierte ZM-Kontraktion vollständig calciumabhängig und damit liegen Unterschiede in der calciumunabhängigen Kontraktion zwischen TM und ZM vor.

Da die calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktion des TM durch den ROCK-Hemmstoff Y-27632 inhibiert wird, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass in diesem Gewebe die ET-1-Kontraktion mit Beteiligung der GTPase Rho-A und der ROCK stattfindet.

Im bovinen und humanen TM und ZM wurden die am calciumunabhängigen Kontraktionsmechanismus glatter Muskulatur beteiligten Proteine Rho-A und ROCK mittels Western Blot Analyse auf Proteinebene nachgewiesen.

4.1 Kontraktionseigenschaften des TM und ZM

4.1.1 Allgemeine Regulation

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, besitzt das TM kontraktile Eigenschaften. Erste elektrophysiologische Untersuchungen mit Mikroelektroden zeigten in TM-Zellen einen Membranspannungsverlauf vergleichbar mit dem erregbarer glatter Muskelzellen. Bei kultiviertem humanen TM konnten Veränderungen des Membranpotentials durch Substanzen wie Acetylcholin und ET-1 gemessen werden, wie sie auch für glatte Muskulatur charakteristisch sind (Lepple-Wienhues et al., 1994).

Ferner weist dieses Gewebe die Morphologie kontraktiler Zellen auf. Kontraktile Filamente (Flügel et al., 1992) sowie das Kontraktionsprotein Isoaktin-alpha (Coroneo et al., 1991), welches auch in glatter Muskulatur zu finden ist, wurden nachgewiesen.

Molekularbiologische Nachweise für ein glattmuskuläres Kontraktionssystem sind neben dem erwähnten Nachweis des Glattmuskelmyosins die MLCK, welche im humanen und bovinen TM und ZM detektiert wurde (Rosenthal et al., 2005b).

Kontraktionsexperimente zeigten eine signifikante Abnahme der Carbachol- und ET-1-induzierten Kontraktion im TM nach Applikation von ML-7, einem spezifischen Inhibitor

der MLCK (Rosenthal et al., 2005b). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die MLCK nicht nur im TM exprimiert wird, sondern auch funktionell aktiv ist.

Eine Beteiligung der MLCK an der Regulation des IOD wurde an Affen gezeigt, dort führte ML-7 bei intrakameraler Injektion zur Senkung des IOD (Tian et al., 2000b).

Die Regulation der Kontraktilität von TM und ZM wurde intensiv untersucht. Dabei wurden wichtige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zwischen beiden Geweben bezüglich der Kontraktionsauslösung durch verschiedene Substanzen festgestellt.

Gemeinsamkeiten sind zum Beispiel die Expression von muskarinergen Rezeptoren und nicht-selektiven Kationen-Kanälen. Mit selektiven muskarinen Antagonisten wurde die Präsenz von funktionellen muskarinen Rezeptoren der Subtypen M2 und M3 in TM- und ZM-Zellen nachgewiesen (Lepple-Wienhues et al., 1991a; Wiederholt et al., 1996; Thieme et al., 2001a). Die mRNA des M2-Rezeptors konnte auch in humanem TM und ZM detektiert werden (Gupta et al., 1994). Der M1-Rezeptor spielt eine untergeordnete Rolle bei der Carbachol-induzierten Kontraktion in diesen Augengeweben.

Mit β -adrenergen Agonisten oder Prostaglandinen werden ebenfalls Kontraktionen in beiden Augengeweben induziert (Lepple-Wienhues et al., 1991a).

Auf TM- und ZM-Zellen wurden weitere Neurotransmitter-Rezeptoren gefunden: alpha-adrenerge, beta-adrenerge und Bradykinin-Rezeptoren sowie Neurotransmitter wie Substanz P oder NO (Haefliger et al., 1992). Über die entsprechenden Rezeptoren und die Verfügbarkeit von Neurotransmittern können diese Augengewebe direkt angesteuert werden.

Unterschiede der kontraktilen Eigenschaften ergaben sich u.a. bezüglich der K^+ -induzierten Kontraktion, welche im ZM einen stärkeren Effekt zeigt als im TM, und des adrenergen Systems, α -adrenerge Agonisten wirken nur im TM. Auch das cGMP/NO-System wirkt im TM ausgeprägter als im ZM.

Ein weiterer Unterschied, der möglicherweise therapeutisch genutzt werden kann, ist die ET-1-induzierte Kontraktion, welche im TM stärker als im ZM ist (Wiederholt et al., 2000).

Aufgrund der kontraktilen Eigenschaften von TM und ZM können somit Kontraktionen und Relaxationen bewirkt werden, wodurch eine Widerstandserhöhung oder – erniedrigung hervorgerufen und der Kammerwasserabfluss reguliert wird.

Die zurzeit für die Verbesserung des Kammerwasserabflusses zur IOD-Senkung beim POWG eingesetzten Wirkstoffe beeinflussen gleichzeitig das TM und den ZM.

Um Nebenwirkungen einzudämmen, die den ZM und damit die Akkomodation betreffen, ist die Forschung derzeit daran interessiert, Mechanismen der kontraktiven Beeinflussung des TM zu finden, die unabhängig vom funktionell antagonistischen ZM funktionieren.

4.2 Calciumunabhängige Kontraktion

4.2.1 Allgemeiner Mechanismus bei glatter Muskulatur

Neben einem Kontraktionsmechanismus der glatten Muskulatur, der von einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum und der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern abhängig ist (Rüegg, 2000), gibt es einen Mechanismus, der unabhängig von der zytosolischen Calciumkonzentration abläuft (Andrea and Walsh, 1992; Somlyo and Somlyo, 2000).

An diesen calciumunabhängigen Signalwegen sind unter anderem die Schlüsselenzyme PKC, RhoA sowie die ROCK und die MLCP beteiligt.

Die Regulation der Kontraktion erfolgt über zwei konvergierende Kaskaden. Die Signaltransduktion über die GTPase Rho-A und ROCK stellt eine Kaskade dar, die zweite findet mittels der PKC statt. Beide führen zur Inaktivierung der MLCP. Somit bleibt die 20 kDa-Kette des Myosin phosphoryliert, die Interaktion mit Aktin wird erleichtert und die calciumunabhängige Muskelkontraktion ausgelöst (Beech, 1997).

In Abbildung 27 werden die Regulationsmechanismen der Kontraktion glatter Muskulatur zusammengefasst.

Glatte Muskulatur wird in einen intestinalen und einen vaskulären Typ differenziert. Die Kontraktion des intestinalen Typs wird über die Bindung der Agonisten Histamin, Serotonin, Acetylcholin und Prostaglandin F und E an die entsprechenden Membranrezeptoren vermittelt. Die vaskuläre glatte Muskulatur wird über $\alpha_{1/2}$ -, Vasopressin-, Thromboxan- A_2 -, Angiotensin-II-, Serotonin- und Endothelin-Rezeptoren (ETA, ETB) durch die jeweiligen Agonisten kontrahiert.

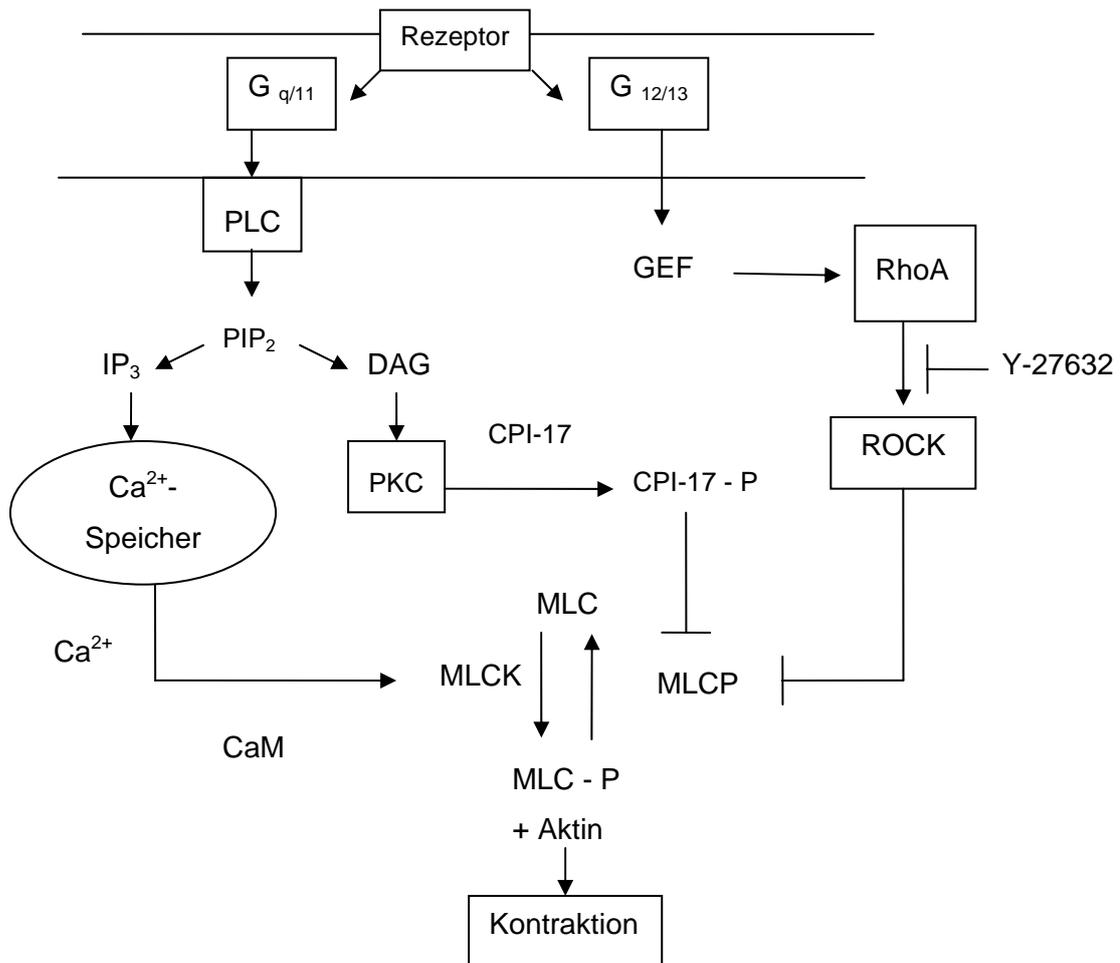


Abb. 27: Schematische Übersicht des calciumabhängigen und –unabhängigen Signalweges der Kontraktion glatter Muskulatur [abgewandelt nach (Oberdisse, 2001)].

PLC: Phospholipase C; PIP₂: Phosphatidylinositol-bis-phosphat; IP₃: Inositoltriphosphat; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; CaM: Calmodulin; GEF: guanine nucleotide exchange factor; ROCK: Rho-Kinasen; MLC: Myosin-light-chains; MLCK: Myosin-light-chain-kinase; MLCP: Myosin-light-chain-phosphatase

4.2.1.1 Der GTPase Rho-A/ROCK-Signalweg

Über die Bindung von Agonisten an die Membranrezeptoren wird die GTPase Rho-A über die alpha-Untereinheit des rezeptorgekoppelten G-Proteins_{12/13} aktiviert. Dabei wird das komplex gebundene GDP durch GTP ersetzt. Der Rho-A-GTP-Komplex aktiviert die ROCK (Leung et al., 1995), die ihrerseits eine Untereinheit der MLCP phosphoryliert und damit inaktiviert (Somlyo and Somlyo, 2000). Die phosphorylierten MLC führen durch die Interaktion mit Aktin schließlich zur Kontraktion (Rüegg, 2000).

Somit führt allein die Hemmung der Dephosphorylierung der MLC ohne einen Ca^{2+} -Anstieg zur Kontraktion.

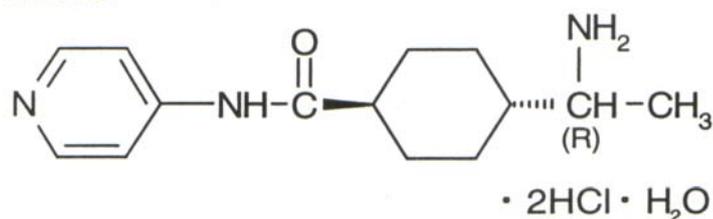
Die Serin-/Threonin-Kinase ROCK mit einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa (Ishizaki et al., 1997) liegt in glatten Muskelzellen in den Isoformen ROCK1 und ROCK2 vor (Yoshii et al., 1999).

Der hochspezifische Hemmstoff der ROCK Y-27632 ((+)-R-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)-cyclohexacarboxamid) ist ein Pyridinderivat mit einem Molekulargewicht von 338 kDa (Uehata et al., 1997; Ishizaki et al., 2000).

Abb. 28 stellt die chemische Struktur und die Molekularformel dar. Y-27632 inhibiert die Aktivierung der ROCK (Uehata et al., 1997). Dies führt durch die Dephosphorylierung von Myosin zur erschwerten Interaktion mit Aktin und damit zur Relaxierung der glatten Muskulatur. Der relaxierende Effekt von Y-27632 ist für die Gefäßmuskulatur bereits ausgiebig erforscht (Fu et al., 1998). Dies zeigte sich auch in der Blutdrucksenkung bei hypertensiven Ratten (Sauzeau et al., 2000). Bei glatter Muskulatur des Analbereiches von Mäusen zeigte die Anwendung von Y-27632 eine konzentrationsabhängige Hemmung der Carbachol-induzierten Muskelkontraktion (Ayman et al., 2003).

Der relaxierende Effekt des ROCK-Inhibitors auf glatte Muskulatur wurde bereits bei der Aorta von Hasen und Ratten (Uehata et al., 1997; Sauzeau et al., 2000), humanen Bronchialarterien (Yamagata et al., 2000; Ito et al., 2001) sowie bei Mesenterialarterien von Ratten (VanBavel et al., 2001) gezeigt.

Chemical Structure:



Molecular Formula:



Abb. 28: Chemische Struktur und Molekularformel des ROCK Hemmstoffes Y-27632

4.2.1.2 Die Proteinkinase C (PKC)

Bei Besetzung der an G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren durch Agonisten wie Endothelin und Serotonin und muskarinerge Agonisten wie Carbachol wird die Phospholipase C aktiviert. Durch die folgende Spaltung von Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) entsteht Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern im Sarkoplasmatischen Retikulum. DAG aktiviert hingegen die PKC. Die zur Familie der zytosolischen Serin- Threonin-Kinasen gehörende PKC phosphoryliert das Protein CPI-17, welches die MLCP direkt inhibiert (Walsh et al., 1994; Somlyo and Somlyo, 2000).

Bisher wurden 10 Isoformen der PKC identifiziert. Diese werden noch einmal in drei Gruppen unterteilt: calciumabhängige Isoformen (α , β_1 , β_2 , γ); calciumunabhängige Isoformen (δ , ϵ , η , θ) und atypische Isoformen (λ , ξ) (Thieme et al., 1999; Strauss et al., 2002). In glatter Muskulatur konnten die α , β , ϵ , und ξ -Isoformen nachgewiesen werden.

4.2.2 Calciumunabhängige Kontraktion von TM und ZM

In dieser Arbeit wurden Kontraktionsmessungen im TM und ZM unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen durchgeführt. Diese Bedingungen wurden erreicht, indem der calciumfreien Ringerlösung EGTA zugeführt wurde, um das extrazelluläre Calcium zu puffern. Der Zusatz des membrangängigen Calciumchelators BAPTA-AM zur Extrazelluärlösung bewirkte einen Eintritt der Substanz in die Zellen, wo der Esterrest durch zelleigene Esterasen abgespalten wird. Das nun membranimpermeable BAPTA band das intrazelluläre Calcium.

Unter diesen Bedingungen konnten calciumunabhängige Kontraktionen in beiden Augengewebe nachgewiesen werden.

4.2.2.1 Die Carbachol-induzierte Kontraktion über die PKC

Die Carbachol-induzierte calciumabhängige Kontraktion im TM und ZM wird über muskarinerge Rezeptoren vermittelt. Muskarinerge Rezeptoren aktivieren ebenfalls die Signalwege der calciumunabhängigen Kontraktion.

In Kontraktionsexperimenten mit bovinem ZM und TM wurde eine teilweise calciumunabhängige, Carbachol-induzierte Kontraktion nach Entfernung des extrazellulären Calciums gemessen.

Im TM blieben unter diesen Versuchsbedingungen 42% der maximalen durch Carbachol induzierten Kontraktionskraft erhalten, im ZM blieb die Carbachol-induzierte Kontraktion aus (Lepple-Wienhues et al., 1991b). Ein calciumunabhängiger Kontraktionsweg glatter Muskulatur verläuft, wie vorbeschrieben über die PKC.

ZM und TM zeigten hier deutliche Unterschiede bei Kontraktionsexperimenten in Bezug auf verschiedene inhibierende und aktivierende Wirkstoffe. H-7, ein Hemmstoff der PKC, hat eine relaxierende Wirkung auf das TM und lässt den ZM unbeeinflusst (Thieme, 1999). Die gleichen Effekte wurden mit höherspezifischen Inhibitoren wie Chelerythrin und Myristhoilate beobachtet.

Molekularbiologisch wurden natives, bovines TM und der ZM sowie humane TM- und ZM-Zellen untersucht, um die spezifischen Isoformen zu isolieren. Die Alpha- und Epsilon-Iso-Formen, deren Beteiligung an der Kontraktion glatter Muskulatur bekannt ist (Allen and Walsh, 1994), wurden in beiden Geweben mittels Western Blot nachgewiesen. Die calciumunabhängige ϵ -Form war sehr stark im TM ausgeprägt mit vergleichsweise schwachem Signal im ZM (Thieme et al., 1999). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigte sich bei isometrischen Kontraktionsmessungen, dass die Applikation des PKC-Agonisten Phorbol ester unter intra- und extrazellulär calciumfreien Versuchsbedingungen im bovinen TM eine signifikante Kontraktion auslöste, nicht aber beim ZM (Thieme et al., 2000). Die PKC vermittelt somit im TM calciumunabhängige Kontraktionen. Bei Anwendung des spezifischen ROCK-Hemmers Y-27632 erfolgte die komplette Blockierung der Phorbol ester-induzierten Kontraktion im bovinem TM.

Y-27632 ist somit nicht nur ein spezifischer ROCK-Inhibitor, sondern eine Rolle im PKC-Signalweg wird vermutet. Allerdings erfolgt die Hemmung nur bei Einsatz deutlich höherer Konzentrationen (Thieme et al., 2000). Ein unspezifischer Effekt kann daher nicht ausgeschlossen werden. An enukleierten Schweine- und Affenaugen bewirkte die Applikation der PKC-Inhibitoren Chelerythrine und H-7 in isolierten Augenvorderkammern durch Gewebsrelaxierung und –erweiterung eine Senkung des Abflusswiderstandes und damit eine Verbesserung des Kammerwasserabflusses. Dies wurde jedoch durch eine Zerstörung des Zytoskeletts erklärt (Tian et al., 1999; Tian et al., 2000a) und nicht durch eine Hemmung der Kontraktilität glatter Muskelzellen.

Während die Beteiligung des PKC-Signalweges bei der durch muscarinerge Agonisten induzierten, calciumunabhängigen Kontraktion nachgewiesen wurde, wurde dieser Signalweg bei der ET-1-induzierten, calciumunabhängigen Kontraktion im TM bisher nicht untersucht.

4.2.2.2 Die Endothelin-1-induzierte Kontraktion über Rho-A/ROCK

In den letzten zehn Jahren wurde eine Beteiligung der GTPase RhoA bei verschiedenen G-Protein-vermittelten Prozessen wie Kontraktion, Wachstum und Zelladhäsion festgestellt (Seasholtz et al., 1999). Im humanen, kultivierten TM wurde durch molekularbiologische Untersuchungen dieses Protein nachgewiesen (Thieme et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde molekularbiologisch bestätigt, dass die GTPase RhoA mit einem Molekulargewicht von 24 kDa im bovinen TM und ZM vorliegt, dies wurde an nativem Gewebe und an Zellkulturen nachgewiesen. Weiterhin war RhoA in humanen TM- und ZM-Kulturen zu finden. Diese Proteinnachweise unterstützen die Vermutung, dass RhoA im TM an der calciumunabhängigen Signaltransduktion der Kontraktion beteiligt ist. Der Nachweis des Enzyms in nativem, bovinen TM und ZM sowie in kultiviertem TM und ZM bestätigt, dass das Zellkulturmodell für die Erforschung der Signalwege herangezogen werden kann. Die identischen Ergebnisse der Western Blot Analysen der humanen und bovinen Gewebe haben gezeigt, dass die Ergebnisse der bovinen Augengewebe tatsächlich auf die humanen übertragbar sind. In glatten Muskelzellen liegt RhoA mit einem Molekulargewicht von 21 kDa vor (Fujihara et al., 1997). Die Banden bei ca. 24 kDa im TM und ZM liegen somit in einem Bereich des Molekulargewichts dieses Proteins, welcher vergleichbar mit glatter Muskulatur ist.

Western Blot Analysen erbrachten in dieser Arbeit zudem den Nachweis der ROCK-1-Expression im humanen und bovinen TM und ZM. Diese Arbeit zeigt zudem, dass die calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktion durch Y-27632 im bovinen TM inhibiert werden konnte. Somit liegt ein weiterer Beweis der calciumunabhängigen Kontraktionsregulation in diesen Geweben vor. Das Molekulargewicht der ROCK von 160 kDa in den Augengeweben ist vergleichbar mit dem Proteinnachweis in glatten Muskelzellen (Yoshii et al., 1999).

Die potentielle Rolle des membrangängigen ROCK-Hemmers Y-27632 bei der Modulation des Kammerwasserabflusses wurde in mehreren Studien untersucht. Bei perfundierten Schweineaugen bewirkte die Inaktivierung der ROCK durch Y-27632 eine Steigerung des Kammerwasserabflusses (Rao et al., 2001).

Zellen des Schlemm-Kanals zeigten unter Einfluss von Y-27632 Veränderungen in der Zellmorphologie mit einer Minderung von fokalen Adhäsionen und einem Verlust von Aktinfasern. Die Permeabilität der SC-Zellen wurde um ca. 80% gesteigert und eine Abflusssteigerung des Kammerwassers um 40 - 80% registriert (Rao et al., 2001).

Studien mit MLCK-Inhibitoren wie ML-9 (Honjo et al., 2002) zeigten, dass die Phosphorylierung der MLC eine Rolle bei der Kontraktion und Relaxation von humanem TM und Schlemm-Kanal-Zellen (SC) und damit beim Kammerwasserabfluss spielt (Epstein et al., 1999; Tian et al., 2000a). Bei humanem TM und SC wurde gezeigt, dass bei Anwendung des ROCK-Hemmers die Phosphorylierung der MLC reduziert wird (Rao et al., 2001).

In Tierversuchen mit Kaninchen führte die topische und intravitreale Applikation von Y-27632 zu einem erhöhten Kammerwasserabfluss und damit zu einer signifikanten Reduktion des IOD (Honjo et al., 2000). Weiterhin wurde keine Veränderung der Pupillenweite festgestellt (Waki et al., 2001). Ein entsprechendes Ergebnis wurde in einem ähnlichem Experiment mit Schweineaugen beobachtet (Rao et al., 2001). Neben der Kontraktionshemmung der am Kammerwasserabfluss beteiligten Gewebe hat Y-27632 weitere Effekte auf das TM. In kultiviertem TM führte die Zugabe von Y-27632 zum fast vollständigen Verlust der Aktin-Bündel, sowie zur Rundung und Retraktion der Zellen. Mittels eines Phasenkontrastmikroskopes wurde beobachtet, dass sich die Morphologie der TM-Zellen veränderte (Honjo et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe Koga et al. untersuchte den Effekt von Y-27632 auf humane TM-Zellen und stellten fest, dass dieser ROCK-Hemmer Effekte auf die TM-Zellaktivität in Bezug auf die Adhäsion, Gel-Kontraktion und Zellmotilität hervorruft. In Zelladhäsionstests zeigte sich, dass Y-27632 dosisabhängig die Zelladhäsion des Fibronectins und Kollagen Typ I fördert. Die Kollagen-Gel-Kontraktionsaktivität der humanen TM-Zellen wird ebenfalls dosisabhängig durch Y-27632 (Koga et al., 2006) inhibiert. Aufgrund fehlender Toxizität auf humane TM-Zellen und die fehlende Beeinflussung der Proliferation dieser Zellen durch den ROCK-Hemmer (Koga et al., 2006) könnte dieser Wirkstoff eventuell therapeutisch eingesetzt werden.

Diesen Y-27632-induzierten Veränderungen auf die TM-Zellen wird eine Bedeutung auf die Physiologie des Kammerwasserabflusses zugeschrieben und die in dieser Arbeit aufgezeigte Kontraktionshemmung der ET-1-induzierten Kontraktion durch diesen ROCK-Inhibitor festigt diese Vermutung. Die bisherigen zellmorphologischen Ergebnisse und Kontraktionsmessungen des TM mit Y-27632 unterstützen die Vermutung, dass diese Substanz durch isolierte Relaxierung des TM ein ideales antiglaukomatöses Medikament sein könnte, welches zu einem erhöhten Kammerwasserabfluss führt und dabei den ZM unbeeinflusst lässt.

4.3 Endothelin-1

4.3.1 Endothelin-Synthese

Bei den Endothelinen handelt es sich um drei strukturell verwandte, 21 Aminosäuren lange Isopeptide, das ET-1, ET-2 und ET-3, die jeweils mit zwei Disulfidbanden verbunden sind.

Die zweistufige Proteolyse zur Bildung dieses Peptids beginnt mit dem ca. 200 Aminosäuren umfassenden Prä-pro-Endothelin, aus dem mit Hilfe einer Endopeptidase zunächst biologisch inaktive Vorstufen aus ca. 40 Aminosäuren entstehen (Big Endothelin-1, -2, -3). Durch die spezifische Metalloprotease Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) wird die Vorstufe zu den wirksamen Endprodukten umgewandelt.

Die Synthese wird zum Beispiel durch Hypoxie, die PKC, TNF-alpha, einen erhöhten Blutzucker und Östrogenmangel stimuliert (Magnusson et al., 1994). Hingegen hemmen NO, Prostazyklin, atriales natriuretisches Peptid (ANP), Heparin und Östrogene sowie PKC- Inhibitoren die Neubildung dieser Isopeptide.

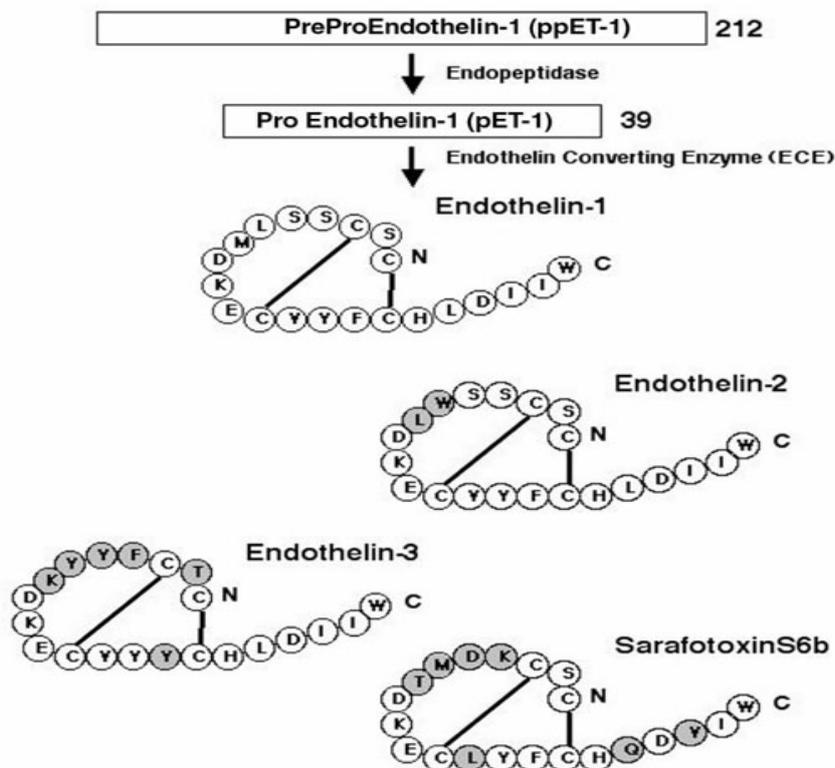


Abb. 29: Zweistufige Proteolyse der Endothelinsynthese [aus (Haefliger et al., 1999)]

Die mRNA des Prä-pro-Peptids von ET-1 konnte im Linsenepithel, der Cornea der Maus, sowie im humanen Ziliarkörper nachgewiesen werden (Prasanna et al., 2000; Yorio et al., 2002).

Der Nachweis der Expression der mRNA des ET-1 erfolgte zudem in der Retina und im optischen Nerv in Schweine- und humanen Augen (Ripodas et al., 2001). Im humanen TM wurde hingegen keine Expression des Prä-pro-Peptids und ECE-1 Isoformen bei PCR-Untersuchungen festgestellt (Rosenthal, 2007).

Spezifische ECE-Hemmer, die den ET-1 Spiegel im Auge senken, werden für therapeutische Anwendungen erforscht (Wiederholt et al., 2000).

4.3.2 Systemische Endothelin-Effekte

ET-1 vermittelt die stärkste bekannte Vasokonstriktion (Yanagisawa et al., 1988). Zu den Endothelinwirkungen zählen ferner die Vermittlung von Fibrosierungen von Geweben, Zellproliferationen, Herzhypertrophie und Remodeling (Yanagisawa and Masaki, 1989). Außerdem spielt es eine Rolle bei proinflammatorischen Prozessen.

Bei Patienten mit multipler Sklerose und anderen Autoimmunerkrankungen zeigten sich Plasmaspiegel von ET-1, die ca. 225% über dem Plasmaspiegel der Kontrollgruppe lagen (Haufschild et al., 2001). Eine erhöhte ET-1-Aktivität wurde auch bei der diabetischen Neuropathie festgestellt, vermutlich durch einen verminderten endoneuralen Blutfluss (Cameron et al., 1994).

Ob die erhöhten ET-1-Plasmaspiegel bzw. eine erhöhte Aktivität bei systemischen Erkrankungen auf eine erhöhte Produktion, einen verminderten Metabolismus oder eine gehemmte Exkretion zurückzuführen sind, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt (Haufschild et al., 2001).

4.3.3 Endothelin-Rezeptoren

Die Isopeptide binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren ET-A und ET-B und lösen eine G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion aus. Die Affinität wird durch die Struktur des N- terminalen Endes des Peptids bestimmt.

Im Auge wurden beide Rezeptoren mittels molekularbiologischer Untersuchungen in Blutgefäßen der humanen Retina und im Ziliarkörper und der Iris von Ratten entdeckt (Ripodas et al., 1998), sowie im bovinen TM und ZM (Choritz et al., 2005).

Der ET-A-Rezeptor wurde in Neuronen, Epithelien und in glatter Muskulatur nachgewiesen. Außerdem wurde er mittels PCR im humanen ZM, TM und nicht

pigmentierten Epithelzellen des Ziliarkörpers identifiziert (Tao et al., 1997; Tao et al., 1998) sowie in der Tränendrüse des Affen (Matsumoto et al., 1997). Er bindet ET-1 mit höherer Affinität als ET-2 (Pang and Yorio, 1997). Bei Bindung eines Agonisten wird die Phospholipase C aktiviert, welche das Membranlipid PIP_2 hydrolysiert und die second messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3) entstehen. Über DAG wird die PKC-Aktivität gesteigert und eine Kontraktion ausgelöst (Levin, 1995). Die Stimulation der Phospholipase C über den ET-A-Rezeptor ist bereits in humanen TM-Zellen nachgewiesen worden (Haque et al., 1998).

Der ET-A-Rezeptor ist vermehrt in vaskulären Glattmuskelzellen vorhanden. Ein selektiver Antagonist des ET-A-Rezeptors ist das BQ 123. In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass dieser Antagonist die Effekte von ET-1 signifikant blockiert (Haque et al., 1996; Matsumoto et al., 1996). Isometrische Kontraktionsmessungen im bovinen TM und ZM zeigten, dass die ET-1-induzierte Kontraktion durch die ET-A-Rezeptor-Blockade mit BQ 123 in beiden Augengeweben signifikant reduziert wurde. Die Expression des Rezeptors wurde mittels Western Blot im nativen bovinen TM und ZM und in Zellkulturen nachgewiesen. Bei ca. 40 kDa zeigte sich nach Inkubation mit einem spezifischen AK des ET-A-Rezeptors ein eindeutiges Signal (Choritz et al., 2005).

Da die Inhibition des ET-B-Rezeptors im TM keine signifikante Kontraktionsreduktion ergab, ist davon auszugehen, dass in diesem Gewebe die Kontraktion über den ET-A-Rezeptor vermittelt wird.

Somit würde auch die in dieser Arbeit nachgewiesene calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktion des TM über den ET-A-Rezeptor vermittelt. Da dieser Rezeptor jedoch auch im ZM exprimiert wird und die calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktion bei den Kontraktionsmessungen mit diesem Gewebe ausblieb, kann die Rezeptorebene nicht die Schlüsselrolle bei diesem unterschiedlichen Kontraktionsverhalten von TM und ZM spielen. Es ist davon auszugehen, dass sich die anschließenden Signalkaskaden in beiden Geweben unterscheiden.

Der ET-B-Rezeptor kommt ebenfalls in glatter Muskulatur und im Endothel vor. Er wurde des Weiteren durch Western Blot Analyse im nativen bovinen TM und ZM bei ca. 35 kDa nachgewiesen (Choritz et al., 2005).

Dieser Rezeptor bindet ET-3 stärker als ET-1 und führt über eine Kopplung mit der NO-Synthetase zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin. Eine Vasodilatation in Endothelzellen durch NO und eine Hemmung der Kontraktion von glatten Muskelzellen durch das Prostazyklin ist die Folge. Endothelin aktiviert über den

ET-B-Rezeptor G-Proteine, die die Adenylatzyklase stimulieren. Im ZM von Kaninchen und Rindern wurden diese Effekte mit einem erhöhten cAMP nachgewiesen (Prasanna et al., 2003).

Die Rolle des ET-B-Rezeptors bei der Kontraktion des TM und ZM wurde untersucht und dazu der selektive Antagonist BQ 788 für die isometrischen Kontraktionsmessungen im bovinen TM und ZM eingesetzt. Die ET-1 induzierte Kontraktion wurde im bovinen TM durch das BQ 788 nicht reduziert. Hingegen zeigte sich im bovinen ZM eine geringe, jedoch signifikante Reduktion der ET-1-Kontraktion (Choritz et al., 2005).

Die Kontraktionsexperimente mit den spezifischen ET-1-Rezeptorblockern lassen zusammenfassend darauf schließen, dass die ET-1-induzierte Kontraktion im TM durch den ET-A-Rezeptor vermittelt wird. Der ET-B-Rezeptor scheint keine entscheidende Rolle bei der ET-1-induzierten Kontraktion in diesem Gewebe zu spielen.

Im ZM scheint die ET-1-induzierte Kontraktion über beide Rezeptoren vermittelt zu werden. Jedoch scheint keiner der beiden Rezeptoren eine calciumunabhängige Kontraktion in diesem Gewebe zu vermitteln, da im ZM keine ET-1-induzierte calciumunabhängige Kontraktion ausgelöst werden konnte.

4.3.4 Endothelin-Effekte am Auge

Wie in Kapitel 1.4 der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei dem Peptid ET-1 um einen starken Vasokonstriktor, welcher im Kammerwasser in signifikant höherer Konzentration als im Plasma vorliegt (Lepple-Wienhues et al., 1992c). Ein erhöhter Plasmaspiegel von ET-1 wurde bei Patienten mit Retinitis pigmentosa im Vergleich zu einer gesunden Probandengruppe gemessen und die ausgelöste Vasokonstriktion wurde für die Abnahme des retinalen Blutflusses verantwortlich gemacht (Cellini et al., 2002).

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass ET-1 auch bei der Pathogenese des Glaukoms eine große Bedeutung zukommt.

Dafür spricht unter anderem, dass die Endothelinkonzentration im Kammerwasser und Serum von Glaukompatienten erhöht ist (Cellini et al., 1997; Tezel et al., 1997). Dies gilt nicht nur bei Patienten mit einem erhöhten IOD, sondern auch bei Normaldruckglaukom-Patienten (Kaiser et al., 1995).

In einer retrospektiven Studie mit Glaukompatienten, die einen progressiven Gesichtsfeldverlust aufwiesen, wurden diese mit Glaukompatienten, die ein stabiles

Gesichtsfeld und IOD-Profil aufwiesen, verglichen. Die Plasmakonzentration von ET-1 wurde bei beiden Probandengruppen untersucht und signifikant höhere Konzentrationen bei den Patienten mit fortgeschrittenen Gesichtsfeldverlust gemessen (Emre et al., 2005).

ET-1 wird als weitere Rolle in der Pathogenese des Glaukoms eine astrogliale Proliferation in humanen Sehnervenkopf-Astrozyten zugeschrieben (Hernandez et al., 2000; Prasanna et al., 2002). Verschiedene Experimente in den letzten Jahren zeigten weitere diverse Effekte am Auge, die zur Glaukomentstehung beitragen. Endothelin verursacht eine Kontraktion von glatter Gefäßmuskulatur und Perizyten und scheint daher bei der Regulation von retinaler und chorioidaler Durchblutung beteiligt zu sein (Flammer et al., 1999; Flammer et al., 2002). Konzentrationsabhängig wird durch ET-1 der retinale Blutfluss gesenkt (Pang and Yorio, 1997). Bei längerer erhöhter ET-1 Konzentration im Auge kommt es zum Verlust von Axonen und zur Demyelinisierung und daraus folgend zum Vasospasmus und zur Ischämie (Cioffi and Sullivan, 1999; Oku et al., 1999; Flammer et al., 2001).

Eine IOD-Senkung um bis zu 50% stellte man bei okulärer Applikation von ET-1 in Affen- und Kaninchenaugen fest. Dies wurde auf die Hemmung der Produktion des Kammerwassers im Ziliarkörper zurückgeführt, welche durch den ET-B-Rezeptor vermittelt wird (Yorio et al., 2002). Jedoch wurde bei diesen Tierarten durch intraokulare und retrobulbäre Endothelininjektionen eine Optikusneuropathie entsprechend glaukomatösen Papillenveränderungen hervorgerufen (Orgul et al., 1996a; Orgul et al., 1996b).

ET-1 setzt neurotoxische Substanzen frei und aktiviert calciumabhängig über den ET-B-Rezeptor die endotheliale NO-Synthetase, die zu einer vermehrten NO-Produktion führt. NO fördert die Schädigung des Nervus opticus und der retinalen Ganglienzellen (Haefliger et al., 2001). NO bewirkt eine Vasodilatation und eine Reaktion mit freien Radikalen. Die Minderung des okularen Blutflusses durch den Vasokonstriktor ET-1 verursacht Hämorrhagien und Mikroinfarkte durch die Schädigung der retinalen Gefäße. Die Gefäßschädigung, welche schlussendlich mit einer Zerstörung des Sehnerven einhergeht, wird von der Arbeitsgruppe Flammer et al. für die glaukomatösen Veränderungen verantwortlich gemacht (Flammer, 1994; Flammer et al., 1999).

Eine durch ET-1 hervorgerufene Hypoperfusion in der retinalen Zirkulation wurde diskutiert und untersucht. Kontraktionsexperimente mit Ziliararterien von Schweineaugen zeigten, dass mit Hilfe des Calciumkanalblockers Nifedipin ET-1-

induzierte Kontraktionen selektiv inhibiert werden und eine Vasodilatation resultiert (Meyer et al., 1995). Hingegen zeigten Calciumkanalblocker in der humanen Arteria ophthalmica keinen Effekt auf die ET-1 induzierte Kontraktion (Haefliger et al., 1992), so dass der Kontraktionsmechanismus von ET-1 Unterschiede bei den verschiedenen Spezies aufweist. Weiter wurden ET-1-induzierte Kontraktionen im bovinen ZM und TM gemessen (Lepple-Wienhues et al., 1991b) und damit ein Einfluss auf die Kammerwasserabflusswege gezeigt.

All diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass diesem Peptid eine besondere Bedeutung bei der Glaukom-Erkrankung zukommt. Damit sind die ET-1-induzierten Signalwege als ein pharmakologischer Angriffspunkt für die Glaukombehandlung von Interesse.

4.3.5 Wirkung von Endothelin-1 auf TM und ZM

Es wurde in vielen Studien postuliert, dass ET-1 im ZM und TM eine Depolarisation des Membranpotentials hervorruft und die Konzentration an intrazellulärem Calcium erhöht. Dadurch wird in beiden Augengeweben eine calciumabhängige Kontraktion ausgelöst (Stumpff and Wiederholt, 2000). Isometrische Kontraktionsmessungen zeigten eine calciumabhängige ET-1-induzierte Kontraktion im bovinen ZM und TM.

Messungen des Calciumeinstromes und Änderungen des pH-Wertes in kultiviertem bovinem TM ergaben unter dem Einfluss von ET-1 eine Erhöhung des Ca^{2+} -Influx und pH-Steigerung, so dass angenommen wurde, dass ET-1 durch diese Effekte auf das TM bei der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt ist (Kohmoto et al., 1994). Intrazelluläre Calciummessungen des TM nach der Fura-2 Methode wurden durchgeführt. Der Calciumanstieg und der Membranpotentialverlauf entsprachen den Eigenschaften glatter Muskulatur (Lepple-Wienhues et al., 1992b).

Patch clamp-Experimente haben jedoch gezeigt, dass ET-1 keinen direkten Effekt auf die L-Typ-Calcium-Kanäle des TM ausübt (Thieme et al., 2005). Da ET-1 jedoch eine transiente Reduktion des Maxi- K^+ -Kanals und damit eine Membrandepolarisation induziert, werden die L-Typ-Calcium-Kanäle so indirekt durch ET-1 aktiviert (Stumpff et al., 2005).

In bovinen isolierten Augenvorderkammern, welche perfundiert wurden, konnte nach Zugabe von ET-1 eine Abnahme des Kammerwasserabflusses über das TM festgestellt werden (Wiederholt et al., 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass ET-1 eine Kontraktion des TM und des ZM auslöst (*Thieme et al., 2001b*). Somit wurde in beiden funktionell antagonistischen Augengeweben eine Kontraktion mit ET-1 ausgelöst. Da der Effekt von Endothelin auf das TM den dominanteren darstellt, kommt es zur Erhöhung des IOD aufgrund der durch die Kontraktion des TM hervorgerufenen Reduktion des Kammerwasserabflusses.

Die Effekte von ET-1 auf die Kontraktion von humanen TM-Zellen wurden mit semikonfluenten Zellkulturen von normotensiven Spenderaugen untersucht. Morphologische Analysen des Zytoskeletts ergaben nach Applikation von ET-1 (10µmol/l) eine signifikante Reduktion der Zellarea durch eine Kontraktion des Zytoskeletts mit folgender Formretraktion. Bei Zugabe von ET-1 in verminderter Konzentration traten die Effekte in geringerer Intension auf, so dass es sich um eine dosisabhängige Antwort handelt. Der Calciumkanalblocker Flunarizin inhibierte den Effekt von ET-1 auf die humanen TM-Zellen (*Cellini et al., 2006*). Diese Inhibition war jedoch nicht signifikant, so dass die Vermutung erhärtet wurde, dass zusätzlich eine vom extrazellulären Calcium unabhängige Kontraktion vorliegt.

Schon 1989 wurde im Schweinemodell gezeigt, dass die ET-1-induzierte Kontraktion der vaskulären Glattmuskel-Zellen über intrazellulär calciumabhängige und calciumunabhängige Wege ausgelöst wird (*Kodama et al., 1989*).

Es wurden ET-1-induzierte Kontraktionen bei Aortazellen von Ratten ohne Beteiligung von extrazellulärem Calcium festgestellt und diese Kontraktionen über die Aktivierung der PKC erklärt (*Marsault et al., 1990*). Auch an isolierten TM-Streifen löste die Applikation von ET-1 Kontraktionen in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium aus, wobei eine ausreichende Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern diskutiert wurde (*Lepple-Wienhues et al., 1992b*).

In dieser Arbeit wurde mit BAPTA-AM zusätzlich das intrazelluläre Calcium abgepuffert und somit intra- und extrazellulär calciumfreie Bedingungen geschaffen. Da unter diesen Bedingungen signifikante calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktionen im TM gezeigt wurden, liegt bei diesem Gewebe ein anderer Signalweg vor: der calciumunabhängige Kontraktionsmechanismus über den RhoA/ROCK-Signalweg.

Endotheline sind physiologische Agonisten von RhoA-GTPase-vermittelten Signalwegen (*Hall, 1998*). Dies spricht für den calciumunabhängigen Signaltransduktionsweg mit Beteiligung des Enzyms RhoA (*Rosenthal et al., 2005a*).

In dieser Arbeit wurde zudem aufgezeigt, dass die ET-1-induzierte Kontraktion des TM ebenfalls teilweise über einen calciumunabhängigen Signaltransduktionsweg stattfindet. Weiterhin wurde in den durchgeführten isometrischen Kontraktionsmessungen bewiesen, dass die ET-1-induzierte Kontraktion des ZM vollständig calciumabhängig abläuft. Dies ist ein Unterschied zur calciumunabhängigen Carbachol-induzierten Kontraktion, die über den muskarinergen Rezeptor vermittelt wird und in beiden Augengewebe nachweisbar ist.

Da die ET-Rezeptoren im TM und ZM vorhanden sind und die Expression der Enzyme RhoA und ROCK in beiden Geweben nachweisbar sind, aber nur im TM die calcium-unabhängige ET-1-induzierte Kontraktion auslösbar ist, könnten möglicherweise unterschiedliche Isoformen der ET-Rezeptoren in beiden Geweben exprimiert werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre die Kopplung der ET-Rezeptoren an unterschiedliche G-Proteine.

Die vollständige Aufhebung der calciumunabhängigen ET-1-induzierten Kontraktion des TM gelang mittels des ROCK-Hemmstoffes Y-27632, so dass die Hypothese eines mit dem der glatten Muskulatur vergleichbaren Kontraktionsmechanismus über die GTPase Rho-A und ROCK mit den Ergebnissen weiter gefestigt wird und eine Beteiligung der PKC als Signalweg bei der ET-1-induzierten, calciumunabhängigen Kontraktion eher unwahrscheinlich ist.

4.4 Bedeutung von Endothelin-1 für das Glaukom

Ziel der Erforschung der genauen Funktionsmechanismen von den am Kammerwasserabfluss beteiligten Geweben ist, eine neue Alternative der medikamentösen Glaukomtherapie zu entwickeln, welche Vorteile bezüglich des Nebenwirkungs-Spektrums der bisherigen Therapie des POWG bietet.

Für neue Wirkstoffe wird gefordert, dass diese eine Beeinflussung auf die Regulation des TM hervorrufen ohne den ZM wie bisher mit zu beeinflussen.

Die spezifische Relaxation des TM fördert den Abfluss des Kammerwassers und führt so zur IOD-Senkung. Der beschriebene funktionelle Antagonismus von ZM und TM sollte sich durch die separate Kontraktionsänderung des TM nicht mehr nachteilig auf ZM-abhängige Funktionen auswirken. Dies ist gewährleistet, wenn Mechanismen entdeckt werden, die Unterschiede der Kontraktilität der glattmuskelähnlichen Augengewebe aufweisen.

Einen solchen Mechanismus stellt die calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktion des TM über den RhoA/ROCK-Signalweg dar. Ein weiterer Vorteil für die Glaukomtherapie wäre, dass die calciumunabhängige Kontraktion nicht nur das TM beeinflusst, sondern auch die glatte Gefäßmuskulatur. So könnte eine Inhibition dieses Signalweges möglicherweise durch die Vasodilatation zur Steigerung des okularen und retinalen Blutflusses führen und damit die Durchblutung der Sehnervenpapille verbessern. Durch diese indirekt neuroprotektive Wirkung könnte gegebenenfalls die irreversible Optikusatrophie aufgehalten werden. Die Verbesserung der retinalen Hämodynamik durch die Relaxation von vaskulären Glattmuskelzellen oder Perizyten ist ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der Glaukomtherapie.

ET-1 scheint an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt zu sein, indem es zu Kontraktionen in den am Kammerwasserabfluss verantwortlichen Geweben im Kammerwinkel induziert und zum anderen den okulären Blutfluss verschlechtert.

In dieser Arbeit konnte durch ET-1 eine calciumunabhängige Kontraktion am TM induziert werden ohne gleichzeitige Auswirkung auf den ZM. Damit wurden Unterschiede in den Signalwegen von ET-1 im TM und ZM gefunden, die für die nebenwirkungsfreie Therapie des Glaukoms erforderlich sind.

Mit ET-1 konnte eine calciumunabhängige Kontraktion des bovinen TM von ca. 14% der calciumabhängigen Carbacholkontraktion in Ringerlösung induziert werden beziehungsweise 60% der calciumunabhängigen Carbacholkontraktion.

Der hochspezifische ROCK-Inhibitor Y-27632 hob die calciumunabhängige Kontraktion des Vasokonstriktors ET-1 im TM signifikant auf. Somit wird die separate Relaxation des TM gewährleistet und die durch den ZM verursachten Nebenwirkungen ausgeschlossen.

Die Schlüsselenzyme RhoA und ROCK des calciumunabhängigen Signalweges, die molekularbiologisch im bovinen und humanen TM und ZM nachgewiesen wurden, könnten als Angriffspunkt für Inhibitoren gewählt werden. Das bedeutet, dass Y-27632, welches zur Relaxation kontraktile Gewebe führt, als therapeutischer Wirkstoff zur Abflussverbesserung über das TM und damit zur IOD-Senkung angewendet werden könnte.

4.5 Ausblick

Da sowohl im TM als auch im ZM beide ET-Rezeptoren und auch die Enzyme RhoA und ROCK exprimiert werden, ET-1 aber nur im TM den RhoA/ROCK-Signalweg aktiviert, liegt die Vermutung nahe, dass die ET-Rezeptoren im TM und ZM an unterschiedliche G-Proteine oder Signalwege gekoppelt sind oder dass unterschiedliche Isoformen exprimiert werden.

Die Erforschung der Expression der G-Proteine würde den Signalweg in den Zielgeweben weiter sichern und gegebenenfalls das unterschiedliche Kontraktionsverhalten der ET-1-induzierten calciumunabhängigen Kontraktion im TM und ZM erklären. Zum anderen würde das Spektrum der möglichen Angriffspunkte der pharmakologischen Beeinflussung der Kontraktilitäts-Regulation erweitert.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob unterschiedliche Rezeptor-Subtypen in den beiden Augengeweben vorliegen und in diesem Fall doch auf der Rezeptorebene der Signalweg unterschiedlich vermittelt wird. Zudem sollte untersucht werden, ob eventuell weitere Enzyme zusätzlich zu denen des beschriebenen Signalweges in glatten Muskelzellen die calciumunabhängige Kontraktion regulieren.

Welchen Anteil der calciumunabhängige Kontraktionsmechanismus an der gesamten Kontraktion ausmacht, muss noch genau geklärt werden. In den bisher durchgeführten Kontraktionsexperimenten mit bovinem TM wurde gezeigt, dass die calciumunabhängige Kontraktion nur einen Anteil von ca. 15% an der gesamten Carbachol-induzierten Kontraktion ausmacht (Thieme et al., 2000).

Um die Signaltransduktionswege noch genauer zu verstehen und zu beeinflussen, müssen weitere Kontraktionsuntersuchungen mit stimulierenden und hemmenden Substanzen durchgeführt werden.

Die ET-1-induzierte calciumunabhängige Kontraktion des bovinen TM sollte auch im humanen Gewebe nachgewiesen werden. Ob diese Kontraktion dann auch in vivo mit dem ROCK-Hemmstoff Y-27632 inhibiert wird und damit einen günstigen Effekt auf den Abfluss des Kammerwassers auslöst, bleibt abzuwarten.

Ob dies für einen neuen pharmakologischen Therapieansatz des POWG ausreichend ist, müssen weitere Untersuchungen klären. Falls dies der Fall ist, müsste eine geeignete Applikation entwickelt werden ohne ungünstige systemische Wirkungen.

Ein Wirkstoff, der spezifisch und nebenwirkungsfrei eine isolierte Relaxation des TM auslösen kann, unter Umgehung der Effekte des ZM mit seinen unerwünschten Wirkungen wie Akkomodationsstörungen, würde die medikamentöse Therapie einer der

häufigsten Augenerkrankungen optimieren und die Lebensqualität der Glaukoma Patienten verbessern.

Eine Endothelin-Antagonisierung stellt hierbei ein vielversprechendes Therapiekonzept zur Behandlung des Glaukoms dar; einerseits durch eine IOP-Senkung infolge der Relaxation des TM, andererseits die Förderung der Durchblutung durch Vasodilatation retinaler und parapapillärer Gefäße.

Weitere Untersuchungen der Kontraktilitätsmechanismen dieses Augengewebes und die genaue Klärung der an der Pathogenese beteiligten Substanzen stehen im Mittelpunkt der klinisch physiologischen Forschung der Glaukomerkrankung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Glaukom ist eine der häufigsten Augenerkrankungen und Erblindungsursachen in den Industrieländern. Ein individuell zu hoher IOD führt zur Atrophie des Sehnervenkopfes, Gesichtsfeldausfällen und letztendlich zur Verminderung der Sehleistung. Für die Erhöhung des IOD ist ein gesteigerter Abflusswiderstand des Kammerwassers die Hauptursache.

An der Regulation des Kammerwasserabflusses sind das TM und der ZM beteiligt. Die Kontraktion des TM bewirkt eine Erhöhung des IOD, während die Kontraktion des ZM eine IOD-Senkung zur Folge hat.

Die zurzeit einzig mögliche Therapie des Glaukoms stellt die Senkung des IOD dar. Die bisher eingesetzten Pharmaka zur IOD-Senkung beeinflussten die Kontraktilität beider Gewebe mit unerwünschten Nebenwirkungen des ZM, so dass ein ideales Pharmakon eine isolierte Hemmung der Kontraktilität des TM hervorrufen sollte.

Die Kontraktionsmessungen und Western Blot Analysen beider Gewebe haben Folgendes ergeben:

1. Mit Carbachol konnten unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen sowohl im bovinen TM als auch im ZM Kontraktionen induziert werden.
2. ET-1 löst unter intra- und extrazellulär calciumfreien Bedingungen Kontraktionen nur im bovinen TM aus.
3. Die ET-1-induzierte ZM - Kontraktion ist vollständig calciumabhängig.
4. Die calciumunabhängige ET-1-induzierte Kontraktion des TM kann durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 wieder aufgehoben werden.
5. Im bovinen und humanen TM und ZM werden die Enzyme Rho-A und ROCK1 exprimiert.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

TM und ZM besitzen zusätzlich zum calciumabhängigen Kontraktionsmechanismus ein calciumunabhängiges Kontraktionssystem. Die Expression der Schlüsselenzyme RhoA und ROCK im humanen und bovinen TM und ZM stützen diese Hypothese.

Dieses System ist in beiden Geweben durch muskarinerge Agonisten aktivierbar, im TM aktiviert auch ET-1, das eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese des Glaukoms hat, das calciumunabhängige System, nicht aber im ZM. Im TM ist an dieser calciumunabhängigen Kontraktion der RhoA/ROCK-Signalweg beteiligt.

Die Hemmung dieses Signalweges bewirkt eine isolierte Kontraktionshemmung des TM. Somit stellt die RhoA/ROCK-Hemmung ein ideales Target für eine Optimierung der medikamentösen Therapie des POWG dar. Weitere Untersuchungen zum Verständnis der Kontraktilitätsregulation mittels Agonisten und Antagonisten und deren mögliche klinische Relevanz stehen im Mittelpunkt der Forschung der Glaukomtherapie.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Allen, B. G. and M. P. Walsh (1994). "The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction." *Trends in Pharmacological Sciences* 15: 362-368.
- Andrea, J. and M. P. Walsh (1992). "Protein kinase C of smooth muscle." *Hypertension* 20(5): 585-594.
- Ayman, S., P. Wallace, C. P. Wayman, A. Gibson and I. McFadzean (2003). "Receptor-independent activation of Rho-kinase-mediated calcium sensitisation in smooth muscle." *Br J Pharmacol* 139(8): 1532-8.
- Barany, E. H. (1962). "The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate (*Cercopithecus ethiops*)." *Invest Ophthalmol* 1: 712-27.
- Beech, D. J. (1997). "Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca²⁺ channels and K⁺ channels in smooth muscle cells." *Pharmacol Ther* 73(2): 91-119.
- Bolton, T. B., S. A. Prestwich, A. V. Zholos and D. V. Gordienko (1999). "Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles." *Annu Rev Physiol* 61: 85-115.
- Cameron, N. E., K. C. Dines and M. A. Cotter (1994). "The potential contribution of endothelin-1 to neurovascular abnormalities in streptozotocin-diabetic rats." *Diabetologia* 37(12): 1209-15.
- Cellini, M., G. L. Possati, V. Profazio, M. Sbrocca, N. Caramazza and R. Caramazza (1997). "Color Doppler imaging and plasma levels of endothelin-1 in low-tension glaucoma." *Acta Ophthalmol Scand* (224): 11-3.
- Cellini, M., L. Santiago, P. Versura and R. Caramazza (2002). "Plasma levels of endothelin-1 in retinitis pigmentosa." *Ophthalmologica* 216(4): 265-8.
- Cellini, M., P. Versura, E. Zamparini, E. Bendo and E. C. Campos (2006). "Effects of endothelin-1 and flunarizine on human trabecular meshwork cell contraction." *Exp Biol Med (Maywood)* 231(6): 1081-4.
- Choritz, L., R. Rosenthal, M. Fromm, M. H. Foerster and H. Thieme (2005). "Pharmacological and functional characterization of endothelin receptors in bovine trabecular meshwork and ciliary muscle." *Ophthalmic Res* 37(4): 179-87.

- Cioffi, G. A. and P. Sullivan (1999). "The effect of chronic ischemia on the primate optic nerve." *Eur J Ophthalmol* 9 : S34-6.
- Coleman, A. L. (1999). *Glaucoma, Lancet* 354:1803-10.
- Coroneo, M. T., C. Korbmayer, C. Flugel, B. Stiemer, E. Lutjen-Drecoll and M. Wiederholt (1991). "Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells." *Exp Eye Res* 52(4): 375-88.
- Emre, M., S. Orgul, K. Gugleta and J. Flammer (2004). "Ocular blood flow alteration in glaucoma is related to systemic vascular dysregulation." *Br J Ophthalmol* 88(5): 662-6.
- Emre, M., S. Orgul, T. Haufschild, S. G. Shaw and J. Flammer (2005). "Increased plasma endothelin-1 levels in patients with progressive open angle glaucoma." *Br J Ophthalmol* 89(1): 60-3.
- Epstein, D. L., L. L. Rowlette and B. C. Roberts (1999). "Acto-myosin drug effects and aqueous outflow function." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(1): 74-81.
- Erb, C. (1999). *Funktionelle Mechanismen der Augeninnendrucksteigerung*, Hans Huber Verlag: 217-22.
- Flammer, J. (1994). "The vascular concept of glaucoma." *Surv Ophthalmol*. 38(5): 3-6.
- Flammer, J., I. O. Haefliger, S. Orgul and T. Resink (1999). "Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage?" *J Glaucoma* 8(3): 212-9.
- Flammer, J., S. Orgul, V. P. Costa, N. Orzalesi, G. K. Kriegelstein, L. M. Serra, J. P. Renard and E. Stefansson (2002). "The impact of ocular blood flow in glaucoma." *Prog Retin Eye Res* 21(4): 359-93.
- Flammer, J., M. Pache and T. Resink (2001). "Vasospasm, its role in the pathogenesis of diseases with particular reference to the eye." *Prog Retin Eye Res* 20(3): 319-49.
- Flugel, C., E. Tamm and E. Lutjen-Drecoll (1991). "Different cell populations in bovine trabecular meshwork: an ultrastructural and immunocytochemical study." *Exp Eye Res* 52(6): 681-90.

- Flügel, C., E. Tamm, E. Lütjen-Drecoll and F. H. Stefani (1992). "Age related loss of a - smooth muscle actin in normal and glaucomatous human trabecular meshwork of different age groups." *Journal of Glaucoma* 1: 165-173.
- Fu, X., M. C. Gong, T. Jia, A. V. Somlyo and A. P. Somlyo (1998). "The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca²⁺-sensitization of smooth muscle." *FEBS Letters* 440(1-2): 183-7.
- Fujihara, H., L. A. Walker, M. C. Gong, E. Lemichez, P. Boquet, A. V. Somlyo and A. P. Somlyo (1997). "Inhibition of RhoA Translocation and Calcium Sensitization by In Vivo ADP-Ribosylation with the Chimeric Toxin DC3B." *Molecular Biology of the Cell* 8(12): 2437-47.
- Gong, H., R. C. Tripathi and B. J. Tripathi (1996). "Morphology of the aqueous outflow pathway." *Microsc Res Tech* 33(4): 336-67.
- Grehn, F. (2006). *Augenheilkunde*. Heidelberg, Springer-Verlag: 325-49.
- Grehn, F., Mackensen, G. (1993). *Die Glaukome*. Stuttgart, Berlin, Köln, Kohlhammer Verlag.
- Gupta, N., S. M. Drance, R. McAllister, S. Prasad, J. Rootman and M. S. Cynader (1994). "Localization of M3 muscarinic receptor subtype and mRNA in the human eye." *Ophthalmic Res* 26(4): 207-13.
- Haefliger, I. O., E. Dettmann, R. Liu, P. Meyer, C. Prunte, J. Messerli and J. Flammer (1999). "Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma." *Surv Ophthalmol* 43: S51-8.
- Haefliger, I. O., J. Flammer, J. L. Beny and T. F. Luscher (2001). "Endothelium-dependent vasoactive modulation in the ophthalmic circulation." *Prog Retin Eye Res* 20(2): 209-25.
- Haefliger, I. O., J. Flammer and T. F. Luscher (1992). "Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(7): 2340-3.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* 279(5350): 509-14.

- Haque, M. S., I. H. Pang, P. E. Magnino and L. DeSantis (1998). "Activation of phospholipase C and guanylyl cyclase by endothelins in human trabecular meshwork cells." *Curr Eye Res* 17(12): 1110-7.
- Haque, M. S., K. Sugiyama, T. Taniguchi and Y. Kitazawa (1996). "Effects of BQ-123, an ETA receptor-selective antagonist, on changes of intraocular pressure, blood-aqueous barrier and aqueous prostaglandin concentrations caused by endothelin-1 in rabbit." *Jpn J Ophthalmol* 40(1): 26-32.
- Hashimoto, Y. and T. R. Soderling (1990). "Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: comparative study of the phosphorylation sites." *Arch Biochem Biophys* 278(1): 41-5.
- Haufschild, T., S. G. Shaw, J. Kesselring and J. Flammer (2001). "Increased endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis." *J Neuroophthalmol* 21(1): 37-8.
- Hernandez, M. R., J. D. Pena, J. A. Selvidge, M. Salvador-Silva and P. Yang (2000). "Hydrostatic pressure stimulates synthesis of elastin in cultured optic nerve head astrocytes." *Glia* 32(2): 122-36.
- Honjo, M., M. Inatani, N. Kido, T. Sawamura, B. Y. Yue, Y. Honda and H. Tanihara (2002). "A myosin light chain kinase inhibitor, ML-9, lowers the intraocular pressure in rabbit eyes." *Exp Eye Res* 75(2): 135-42.
- Honjo, M., H. Tanihara, M. Inatani, N. Kido, Y. Honda, B. Y. Yue and S. Narumiya (2000). "Effects of rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in the rabbit eye." *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* 41(4): 2715-961.
- Honjo, M., H. Tanihara, M. Inatani, N. Kido, T. Sawamura, B. Y. Yue, S. Narumiya and Y. Honda (2001). "Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(1): 137-44.
- Ishizaki, T., M. Naito, K. Fujisawa, M. Meakawa, N. Watanabe, Y. Saito and S. Narumiya (1997). "p160^{ROCK}, a rho associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of rho and induces focal adhesions." *FEBS Letters* 404: 118-124.

- Ishizaki, T., M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, M. Maekawa and S. Narumiya (2000). "Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases." *Mol Pharmacol* 57(5): 976-83.
- Ito, S., H. Kume, H. Honjo, H. Katoh, I. Kodama, K. Yamaki and H. Hayashi (2001). "Possible involvement of Rho kinase in Ca²⁺ sensitization and mobilization by MCh in tracheal smooth muscle." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(6): L1218-24.
- Ito, Y. and T. Yoshitomi (1986). "Membrane and contractile properties of the dog ciliary muscle." *Br J Pharmacol* 88(3): 629-38.
- Iwamoto, Y. and M. Tamura (1988). "Immunocytochemical study of intermediate filaments in cultured human trabecular cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(2): 244-50.
- Kageyama, M., M. Fujita and E. Shirasawa (1996). "Endothelin-1 mediated Ca²⁺ influx does not occur through L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in cultured bovine trabecular meshwork cells." *J Ocul Pharmacol Ther* 12(4): 433-40.
- Kaiser, H. J., J. Flammer, M. Wenk and T. Luscher (1995). "Endothelin-1 plasma levels in normal-tension glaucoma: abnormal response to postural changes." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233(8): 484-8.
- Kodama, M., H. Kanaide, S. Abe, K. Hirano, H. Kai and M. Nakamura (1989). "Endothelin-induced Ca-independent contraction of the porcine coronary artery." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 160(3): 1302-1308.
- Koga, T., M. Awai, J. Tsutsui, B. Y. Yue and H. Tanihara (2006). "Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells." *Exp Eye Res* 82(3): 362-70.
- Kohmoto, H., S. Matsumoto and T. Serizawa (1994). "Effects of endothelin-1 on [Ca²⁺]_i and phi in trabecular meshwork cells." *Curr Eye Res* 13: 197-202.
- Lang, G. K. (2000). *Augenheilkunde*. Stuttgart, New York, Thieme Verlag.

- Lepple-Wienhues, A., M. Becker, F. Stahl, S. Berweck, J. Hensen, W. Noske, M. Eichhorn and M. Wiederholt (1992a). "Endothelin-like immunoreactivity in the aqueous humor and in conditioned medium from cultured ciliary epithelial cells." *Curr Eye Res* 11(11): 1041-1046.
- Lepple-Wienhues, A., M. Becker, F. Stahl, S. Berweck, J. Hensen, W. Noske, M. Eichhorn and M. Wiederholt (1992c). "Endothelin-like immunoreactivity in the aqueous humour and in conditioned medium from cultured ciliary epithelial cells." *Curr Eye Res* 11(11): 1041-6.
- Lepple-Wienhues, A., R. Rauch, A. F. Clark, A. Grassmann, S. Berweck and M. Wiederholt (1994). "Electrophysiological properties of cultured human trabecular meshwork cells." *Exp Eye Res* 59(3): 305-11.
- Lepple-Wienhues, A., F. Stahl and M. Wiederholt (1991a). "Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle." *Exp Eye Res* 53(1): 33-8.
- Lepple-Wienhues, A., F. Stahl, U. Willner, R. Schafer and M. Wiederholt (1991b). "Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel." *Curr Eye Res* 10(10): 983-9.
- Lepple-Wienhues, A., F. Stahl, D. Wunderling and M. Wiederholt (1992b). "Effects of endothelin and calcium channel blockers on membrane voltage and intracellular calcium in cultured bovine trabecular meshwork cells." *Ger J Ophthalmol* 1(3-4): 159-63.
- Leung, T., E. Manser, L. Tan and L. Lim (1995). "A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes." *J Biol Chem* 270(49): 29051-4.
- Levin, E. R. (1995). "Endothelins." *N Eng J Med* 333: 356.
- Lutjen-Drecoll, E. (1999). "Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes." *Prog Retin Eye Res* 18(1): 91-119.
- Lutjen-Drecoll, E., B. T. Gabelt, B. Tian and P. L. Kaufman (2001). "Outflow of aqueous humor." *J Glaucoma* 10(5): S42-4.

- Magnusson, A., H. Halldorsson, G. Thorgeirsson and M. Kjeld (1994). "Endothelin secretion is regulated by cyclic AMP and phosphatase 2A in endothelial cells." *J Cell Physiol* 161(3): 429-34.
- Marsault, R., P. Vigne and C. Frelin (1990). "The effect of extracellular calcium on the contractile action of endothelin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 171(1): 301-5.
- Matsumoto, S., T. Yorio, P. E. Magnino, L. DeSantis and I. H. Pang (1996). "Endothelin-induced changes of second messengers in cultured human ciliary muscle cells." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 37(6): 1058-66.
- Matsumoto, Y., T. Ishibashi, A. Niiya, H. Yamada, K. Kurokawa and S. Kinoshita (1997). "Distribution of endothelin and endothelin-A receptor in the lacrimal glands of the monkey (*Macaca fuscata*)." *Exp Eye Res* 64(2): 127-32.
- Meyer, P., M. G. Lang, J. Flammer and T. F. Luscher (1995). "Effects of calcium channel blockers on the response to endothelin-1, bradykinin and sodium nitroprusside in porcine ciliary arteries." *Exp Eye Res* 60(5): 505-10.
- Noske, W., J. Hensen and M. Wiederholt (1997). "Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235(9): 551-2.
- Oberdisse, E. H., E.; Kuschinsky, K. (2001). *Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag: 283-85.
- Oku, H., T. Sugiyama, S. Kojima, T. Watanabe and I. Azuma (1999). "Experimental optic cup enlargement caused by endothelin-1-induced chronic optic nerve head ischemia." *Surv Ophthalmol* 44: S74-84.
- Orgul, S., G. A. Cioffi, D. R. Bacon and E. M. Van Buskirk (1996a). "An endothelin-1-induced model of chronic optic nerve ischemia in rhesus monkeys." *J Glaucoma* 5(2): 135-8.
- Orgul, S., G. A. Cioffi, D. J. Wilson, D. R. Bacon and E. M. Van Buskirk (1996b). "An endothelin-1 induced model of optic nerve ischemia in the rabbit." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(9): 1860-9.
- Pang, I. H. and T. Yorio (1997). "Ocular actions of endothelins." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 215(1): 21-34.

- Pawlowski, J. and Morgan, K. (1992) "Mechanisms of intrinsic tone in ferret vascular smooth muscle." *J Physiol.* 448: 121-32.
- Pfeiffer, N. (2001). "Glaukom Grundlagen - Diagnostik - Therapie - Compliance". Stuttgart - New York, Thieme Verlag.
- Prasanna, G., A. Dibas, W. Tao, K. White and T. Yorio (1998). "Regulation of endothelin-1 in human non-pigmented ciliary epithelial cells by tumor necrosis factor-alpha." *Exp Eye Res* 66(1): 9-18.
- Prasanna, G., R. Krishnamoorthy, A. F. Clark, R. J. Wordinger and T. Yorio (2002). "Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(8): 2704-13.
- Prasanna, G., R. Krishnamoorthy, C. Hulet, H. Zhang, X. Zhang and T. Yorio (2000). "Endothelin-1 induces nitric oxide synthase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells." *Exp Eye Res* 71(5): 535-9.
- Prasanna, G., S. Narayan, R. R. Krishnamoorthy and T. Yorio (2003). "Eyeing endothelins: a cellular perspective." *Mol Cell Biochem* 253(1-2): 71-88.
- Rao, P. V., P. F. Deng, J. Kumar and D. L. Epstein (2001). "Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(5): 1029-37.
- Ripodas, A., J. A. De Juan, F. J. Moya, A. Fernandez-Cruz and R. Fernandez-Durango (1998). "Identification of endothelin receptor subtypes in rat ciliary body using subtype-selective ligands." *Exp Eye Res* 66(1): 69-79.
- Ripodas, A., J. A. de Juan, M. Roldan-Pallares, R. Bernal, J. Moya, M. Chao, A. Lopez, A. Fernandez-Cruz and R. Fernandez-Durango (2001). "Localisation of endothelin-1 mRNA expression and immunoreactivity in the retina and optic nerve from human and porcine eye. Evidence for endothelin-1 expression in astrocytes." *Brain Res* 912(2): 137-43.
- Rohen, J. W. and E. Lütjen-Drecoll (1989). Morphology of aqueous outflow pathways in normal and glaucomatous eyes. *The Glaucomas.* R. Ritch, M. B. Shields and T. Krupin, Mosby Company, St. Louis, MO: 41-74.
- Rosenthal, R., L. Choritz, S. Schlott, N. E. Bechrakis, J. Jaroszewski, M. Wiederholt and H. Thieme (2005b). "Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-

- 1-induced contraction of bovine trabecular meshwork." *Exp Eye Res* 80(6): 837-45.
- Rosenthal, R., S. Meissner, L. Choritz, M. H. Foerster and H. Thieme (2005a). "Endothelin-1-Induced Calcium-Free Contraction in Trabecular Meshwork: Interaction With RhoA." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: Abstract 3695.
- Rosenthal R., L. Choritz, R. Zorn, G. Münzer, M. Fromm, N. Pfeiffer and H. Thieme (2007). "Endothelin receptor B in trabecular meshwork." *Exp. Eye Res.* 85.
- Rüegg, J. C. (2000) Muskel. In: *Physiologie des Menschen*. (Hrsg: Schmidt, R.F., Thews, G.) Berlin, Heidelberg, New York., Springer Verlag: 67-86.
- Sachsenweger, M. (2002). *Augenheilkunde*, Thieme Verlag, Duale Reihe: 210-36.
- Sauzeau, V., H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, N. Vaillant, A. P. Gadeau, C. Desgranges, E. Scalbert, P. Chardin, P. Pacaud and G. Loirand (2000). "P2Y(1), P2Y(2), P2Y(4), and P2Y(6) receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(6): H1751-61.
- Seasholtz, T. M., M. Majumdar and J. H. Brown (1999). "Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling." *Mol Pharmacol* 55(6): 949-56.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (2000). "Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II [In Process Citation]." *Journal of Physiology* 522 Pt 2: 177-85.
- Steinhausen, K., F. Stumpff, O. Strauss, and M. Wiederholt (1999). "Trabecular meshwork cells express L-type calcium channels." *Pflügers Arch.* 437 (R79): 73-76.
- Steinhausen, K., F. Stumpff, O. Strauss, H. Thieme and M. Wiederholt (2000). "Influence of muscarinic agonists and tyrosine kinase inhibitors on L-type Ca(2+)Channels in human and bovine trabecular meshwork cells." *Exp Eye Res* 70(3): 285-93.
- Strauss, O., R. Rosenthal, D. Dey, J. Beninde, G. Wollmann, H. Thieme and M. Wiederholt (2002). "Effects of protein kinase C on delayed rectifier K⁺ channel regulation by tyrosine kinase in rat retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(5): 1645-54.

- Stumpff, F. and M. Wiederholt (2000). "Regulation of trabecular meshwork contractility." *Ophthalmologica* 214(1): 33-53.
- Stumpff, F., M. Boxberger, A. Krauss, R. Rosenthal, S. Meissner, L. Choritz, M. Wiederholt and H. Thieme (2005). " Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork." *Exp Eye Res.* 2005 May;80(5):697-708.
- Tao, W., G. Prasanna, S. Dimitrijevic and T. Yorio (1998). "Endothelin receptor A is expressed and mediates the $[Ca^{2+}]_i$ mobilization of cells in human ciliary smooth muscle, ciliary nonpigmented epithelium, and trabecular meshwork." *Curr Eye Res* 17(1): 31-8.
- Tao, W., X. Wu, G. I. Liou, T. O. Abney and P. S. Reinach (1997). "Endothelin receptor-mediated Ca^{2+} signaling and isoform expression in bovine corneal epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(1): 130-41.
- Tezel, G., M. A. Kass, A. E. Kolker, B. Becker and M. B. Wax (1997). "Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma." *J Glaucoma* 6(2): 83-9.
- Thieme, H., Choritz I., Schlott, S., Strauss, O., Foerster, M.H., Wiederholt, M. (2002). "Detection of Smooth Muscle Myosin and Myosin Light Chain Kinase in Human Trabecular Meshwork Cells - Effects of ML-7 on Contractility." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43: Abstract No. 4063.
- Thieme, H., J. Hildebrandt, L. Choritz, O. Strauss and M. Wiederholt (2001a). "Muscarinic receptors of the M2 subtype in human and bovine trabecular meshwork." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 239(4): 310-5.
- Thieme, H., J. U. Nass, M. Nuskovski, N. E. Bechrakis, F. Stumpff, O. Strauss and M. Wiederholt (1999). "The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(13): 3254-61.
- Thieme, H., M. Nuskovski, J. U. Nass, U. Pleyer, O. Strauss and M. Wiederholt (2000). "Mediation of Calcium-Independent Contraction in Trabecular Meshwork through Protein Kinase C and Rho-A." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(13): 4240-4246.

- Thieme, H., K. Steinhausen, A. Ottlecz, G. N. Lambrou, O. Strauss, M. Wiederholt and R. Rosenthal (2005). "Effects of unoprostone and endothelin 1 on L-type channel currents in human trabecular meshwork cells." *Ophthalmic Res* 37(6): 293-300.
- Thieme, H., F. Stumpff, A. Ottlecz, C. L. Percicot, G. N. Lambrou and M. Wiederholt (2001b). "Mechanisms of action of unoprostone on trabecular meshwork contractility." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(13): 3193-201.
- Tian, B., L. C. Brumback and P. L. Kaufman (2000b). "ML-7, chelerythrine and phorbol ester increase outflow facility in the monkey Eye." *Exp Eye Res* 71(6): 551-66.
- Tian, B., B. T. Gabelt, J. A. Peterson, J. A. Kiland and K. P.L. (1999). "H-7 increases trabecular facility and facility after ciliary muscle disinsertion in monkeys." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 40(1): 239-242.
- Tian, B., B. Geiger, D. L. Epstein and P. L. Kaufman (2000a). "Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(3): 619-23.
- Toker, A. (1998). "Signaling through protein kinase C." *Front Biosci.* (3): 1134-47.
- Toris, C. B. (1996). "Uveoskleral outflow decreases with age in ocular normotensive humans." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 410.
- Toris, C. B., M. E. Yablonski, Y. L. Wang and C. B. Camras (1999). "Aqueous humor dynamics in the aging human eye." *Am J Ophthalmol* 127(4): 407-12.
- Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa and S. Narumiya (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." *Nature* 389(6654): 990-4.
- VanBavel, E., E. T. van der Meulen and J. A. Spaan (2001). "Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries." *Exp Physiol* 86(5): 585-92.
- Waki, M., Y. Yoshida, T. Oka and M. Azuma (2001). "Reduction of intraocular pressure by topical administration of an inhibitor of the Rho-associated protein kinase." *Curr Eye Res* 22(6): 470-4.

- Walsh, M. P., J. E. Andrea, B. G. Allen, O. Clement-Chomienne, E. M. Collins and K. G. Morgan (1994). "Smooth muscle protein kinase C." *Can J Physiol Pharmacol* 72(11): 1392-9.
- Wenzel, RR., TF Lüscher (1995) "Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications." *Agents Actions*. 45: 237-53.
- Wiederholt, M. (1998c). "Nitric oxide and endothelin in aqueous humor outflow regulation." *Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of Glaucoma*. I. O. F. Haefliger, J. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers: 168-77.
- Wiederholt, M., S. Bielka, F. Schweig, E. Lütjen-Drecoll and A. Lepple-Wienhues (1995). "Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye." *Exp Eye Res* 61: 223-234.
- Wiederholt, M., J. Groth and O. Strauß (1998b). "Role of protein kinases on regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 39: 1012-1020.
- Wiederholt, M., R. Schäfer, U. Wagner and A. Lepple-Wienhues (1996). "Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents." *German Journal of Ophthalmology* 5: 146-153.
- Wiederholt, M. and F. Stumpff (1998a). The trabecular meshwork and aqueous humor reabsorption. In "The eye`s aqueous humor. From Secretion to Glaucoma", *Current Topics in Membranes*. M. M. Civan. San Diego, Academic Press. 45: 163-202.
- Wiederholt, M., A. Sturm and A. Lepple-Wienhues (1994). "Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 35(5): 2515-2520.
- Wiederholt, M., H. Thieme and F. Stumpff (2000). "The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility." *Prog Ret Eye Res* 19(3): 271-95.
- Yamagata, S., M. Ichinose, H. Sugiura, A. Koarai, K. Koike and K. Shirato (2000). "Effect of a calcium sensitization modulator, Y-27632, on isolated human bronchus and pulmonary artery." *Pulm Pharmacol Ther* 13(1): 25-9.

- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* 332(6163): 411-5.
- Yanagisawa, M. and T. Masaki (1989). "Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control." *Biochem Pharmacol* 38(12): 1877-83.
- Yorio, T., R. Krishnamoorthy and G. Prasanna (2002). "Endothelin: is it a contributor to glaucoma pathophysiology?" *J Glaucoma* 11(3): 259-70.
- Yoshii, A., K. Iizuka, K. Dobashi, T. Horie, T. Harada, T. Nakazawa and M. Mori (1999). "Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization." *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(6): 1190-200.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's minimal essential Medium
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fetal Calf Serum
GEF	guanine nucleotide exchange factor
IOD	Intraokularer Druck
IP ₃	Inositoltriphosphat
LAE	Lämmli-Puffer
MLC	Myosin-Light-Chains
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase
MLCP	Myosin-Light-Chain-Phosphatase
PBS	Phosphate-buffered-Saline
PIP ₂	Phosphatidylinositol-bis-phosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
ROCK	Rho-Kinase
SC	Schlemm Kanal-Zellen (cells)
TM	Trabekuläres Maschenwerk (Trabekelwerk)
ZM	Ziliarmuskel

7.2 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie für die freundliche und engagierte Unterstützung während meiner gesamten Dissertationsarbeit bedanken.

Ein weiterer Dank an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Fromm für das Überlassen des Themas und die fachliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern, Frau Dr. Rita Rosenthal und Herrn Priv.-Doz. Dr. Hagen Thieme, die mich in die Forschungsarbeit einwiesen und mich bei der Versuchsplanung und -durchführung sowie bei der Erstellung meiner Arbeit unterstützten und mir bei allen Fragen zur Verfügung standen.

Des Weiteren gilt mein Dank meinem Kollegen Lars Choritz, der mich geduldig in die Messmethoden einarbeitete. Meiner Kollegin und Freundin Christin Schimmat danke ich für den Austausch von theoretischen Hintergründen und die konstruktiv kritische Beurteilung meiner Ausarbeitungen.

Der Kollegin Frau Marianne Boxberger danke ich für die zahlreichen Ratschläge und für die Bereitstellung der Reagenzien.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinem Verlobten Gunnar Wrede, der mir besonders bei der theoretischen Ausarbeitung und Gestaltung dieser Arbeit sehr behilflich war. Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich während der gesamten Arbeit in vieler Hinsicht unterstützte.

7.3 Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit

Abstract

Rosenthal R, Meissner S, Choritz L, Foerster M H, Thieme H (2005).
Endothelin-1-Induced Calcium-Free Contraction in Trabecular Meshwork:
Interaction With RhoA. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, Abstract 3695.

Originalarbeiten

Renieri G, Choritz L, Rosenthal R, Meissner S, Pfeiffer N, Thieme H (2008).
Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular
meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 246, 1107-15.

7.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Susann Meißner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Regulationsunterschiede der Endothelin-1-induzierten calciumunabhängigen Kontraktion im Ziliarmuskel und Trabekelwerk als Möglichkeit der therapeutischen Nutzung beim Glaukom, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift