

## **4 Diskussion**

### **4.1 Arbeitshypothese**

Dieser Arbeit liegen drei Hypothesen zu Grunde:

1. Das Trabekelmaschenwerk (TM) besitzt Kontraktionssysteme wie sie aus der Forschung mit glatter Gefäßmuskulatur bekannt sind, die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung unabhängig von Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels reguliert werden.
2. Das TM hat ein vollständig ausgeprägtes, glattmuskuläres Kontraktionssystem.
3. Die Proteine Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) und deren Phosphoserine, sowie Myosin und Rho-Kinase (ROCK) sind auch in nativem Trabekelwerksgewebe des Rindes nachweisbar.

Im Folgenden werden die molekularbiologischen und kontraktionsexperimentellen Daten dieser Arbeit zu den obigen Hypothesen und dem aktuellen Forschungsstand in Beziehung gebracht. Die Hypothesen werden dabei erläutert.

### **4.2 Kontraktionsregulation in glatter Muskulatur**

#### **4.2.1 Kalziumunabhängiger Kontraktionsmechanismen im Trabekelwerk**

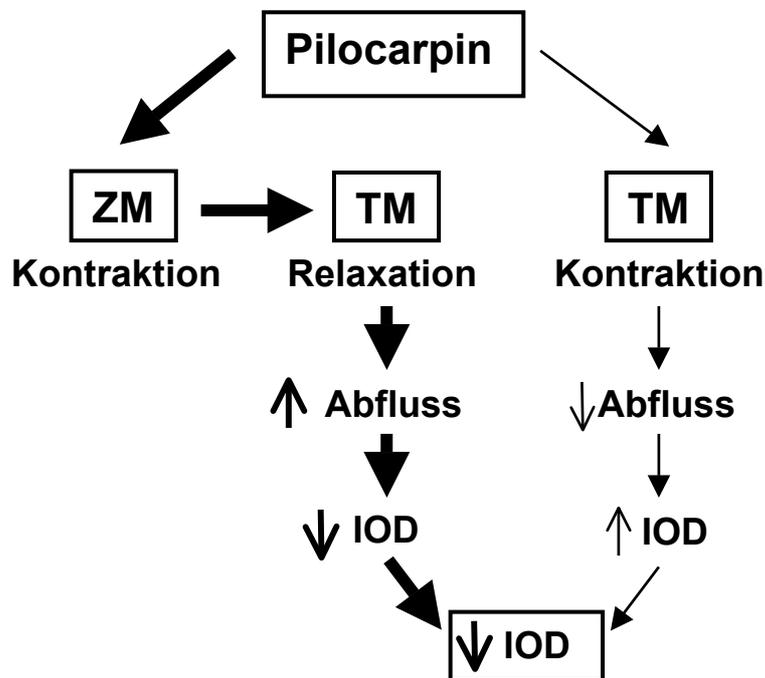
Die therapeutische TM-Relaxation zur IOD-Senkung stellt einen Schwerpunkt in der Forschung zur Therapie des Primären Offenwinkelglaukoms (POWG) dar.

Zwischen TM und dem Ziliarmuskel (ZM) besteht ein funktioneller Antagonismus (vergl. Abb 21): Werden beide Gewebe durch Pharmaka oder endogene Stoffe zur Kontraktion gebracht, so wirkt diese in TM dem Kammerwasserabfluss entgegen. ZM hingegen bewirkt durch seine in TM einstrahlenden Fasern eine Relaxation, bzw. Dehnung des TM, die den Kammerwasserabfluss fördert. Für relaxierende Substanzen ist das umgekehrte gültig. Welcher der antagonistischen Effekte sich durchsetzt, hängt von Potenz und Affinität des anwesenden Pharmakons am jeweiligen Gewebe ab (Wiederholt et al., 2000).

Folglich darf ein ideales Pharmakon ZM nur wenig oder gar nicht beeinflussen. Um isoliert an TM zu wirken, müsste ein Pharmakon also auf Kontraktionsmechanismen Einfluss nehmen, die sich von denen des ZM unterscheiden. Auf einen solchen Unterschied wiesen Kon-

traktionsexperimente mit Gewebstreifen aus bovinem TM und ZM hin (Lepple-Wienhues et al., 1991b):

Nach Kontraktion der Gewebstreifen durch das Parasympathomimetikum Carbachol und den Vasokonstriktor Endothelin ist extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  entfernt worden, indem die Perfusionslösung, von der die Gewebstreifen während des Experiments umgeben waren, gegen eine komplett kalziumfreie Lösung ausgetauscht wurde. Während die Kontraktionskraft in ZM vollständig von der Anwesenheit extrazellulären Kalziums abhängig war, blieb in TM ca. 23% der maximalen durch Endothelin und ca. 42% der durch Carbachol induzierten Kontraktionskraft erhalten.



**Abb. 21:**

Schema des funktionellen Antagonismus zwischen Trabekelwerk und Ziliarmuskel im Bezug auf die Regulation des intrakulären Drucks. Im Beispiel mit Pilocarpin ist dessen Wirkung am Ziliarmuskel ausschlaggebend für die Regulation des Kammerwasserabfluss. (Abgewandelt nach Wiederholt et al., 2000).

Dieser bedeutende Unterschied zwischen ZM und TM rechtfertigt die Untersuchung der Kontraktionsvorgänge ohne Beteiligung extrazellulären Kalziums hinsichtlich einer therapeutischen Beeinflussung des Trabekelwerks beim Glaukom.

#### 4.2.2 Übersicht verschiedener Regulationsmechanismen der Kontraktion

Die übliche Kontraktion der glatten Muskulatur ist abhängig von Kalzium (Rüegg, 2000): Die Änderung des Membranpotentials bewirkt einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch spannungsabhängige Kalziumkanäle.  $\text{Ca}^{2+}$  führt im Komplex mit Kalmodulin und MLCK zur Phosphorylierung von Leichtketten des Kontraktionsproteins Myosin. Dadurch kommt es zur Interaktion des Myosins mit Aktin und zur Kontraktion des Aktin-Myosin-Verschiebesystems.

Auch pharmakomechanische Kontraktionsvorgänge sind genau erforscht: G-Proteinvermittelt über Phospholipase C (PLC) und Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) kommt es zur Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher wie das sarkoplasmatische Retikulum oder es werden rezeptorgesteuert Kalziumkanäle geöffnet. Kalziumspiegelanstieg führt zur Myosinphosphorylierung und zur Kontraktion (Rüegg, 2000).

Neben diesen Vorgängen wurden in Glattmuskel- und Nichtmuskelzellen pharmakomechanische Regulationsmechanismen erforscht, die erstens unabhängig von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  arbeiten, und zweitens auch nicht auf intrazelluläre Kalziumspeicherentleerung angewiesen sind. Sie arbeiten also vollständig unabhängig von Änderungen des Kalziumspiegels durch so genannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung.

Kontraktionsexperimente mit isolierten TM- und ZM-Streifen (Thieme et al., 2000) legten nahe, dass solche Mechanismen für die Kontraktionsregulation des TM eine wichtige Bedeutung haben könnten, während sie in ZM keine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Kontraktionen zu spielen scheinen. Es wird also die Voraussetzung für den Eingriff eines Pharmakons erfüllt, dass in TM Regulationsmechanismen existieren, die in ZM nicht oder nur geringfügig an der Kontraktionsregulation beteiligt sind. Dementsprechend wurde die Existenz einer Kontraktionsregulation durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung als erste Arbeitshypothese für die Untersuchung des TM formuliert. Den Regulationsmechanismen ohne Kalziumspiegelveränderung kommt also in dieser Arbeit besondere Bedeutung zu. Sie werden deshalb, wie sie aus der Glattmuskelforschung bekannt sind, im Folgenden kurz dargestellt (vergl. Abb. 22).

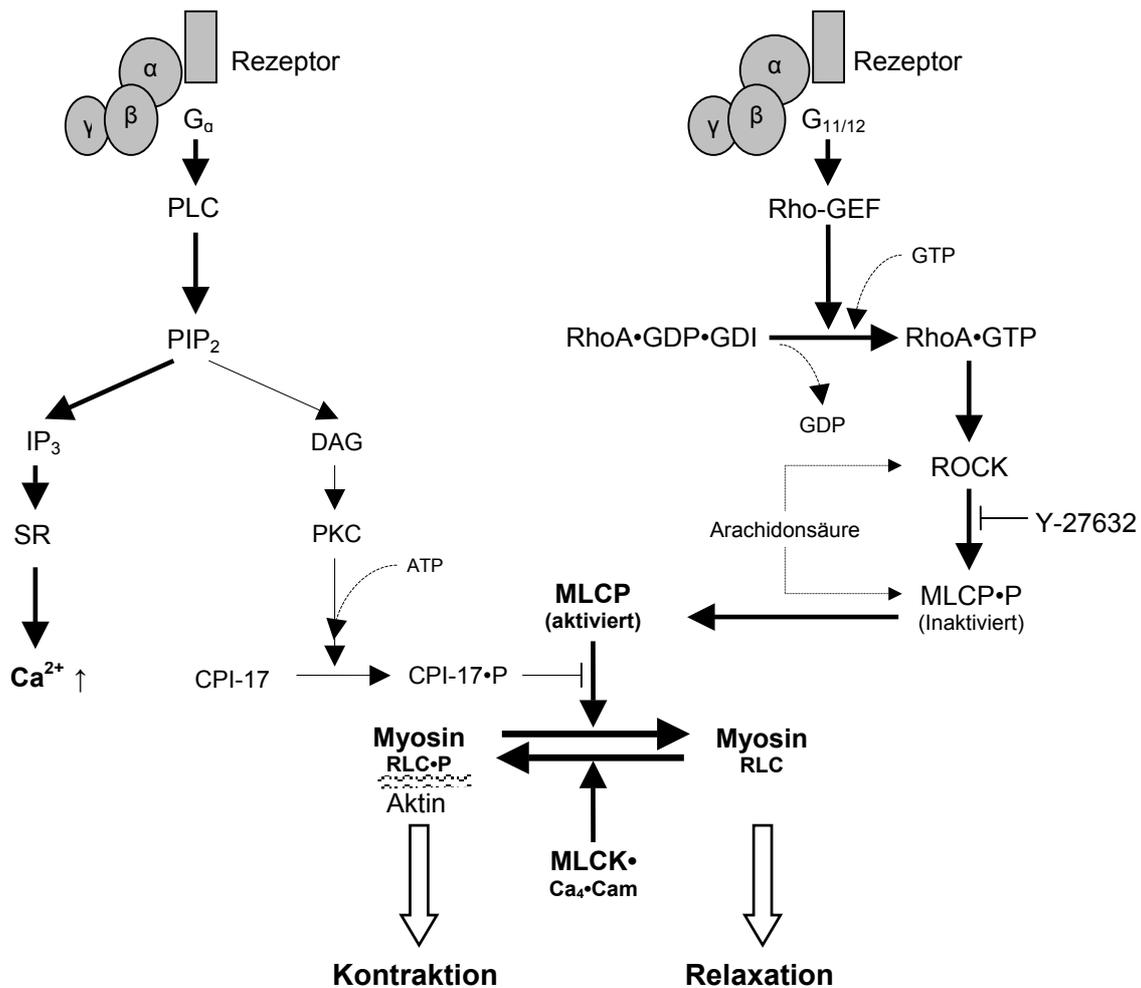


Abb. 22:

Schema zur Darstellung verschiedener Regulationsmechanismen der Kontraktion glatter Muskulatur. ( Abgewandelt nach Somlyo & Somlyo, 2000).

### 4.2.3 Kontraktionsregulation durch Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung

Die Kontraktionsregulation durch Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung erfolgt über zwei konvergierende Signaltransduktionskaskaden:

#### 4.2.3.1 Signaltransduktion über Rho-A

Verschiedene Agonisten an Zellmembranrezeptoren aktivieren über die α-Untereinheit des rezeptorgekoppelten G<sub>12/13</sub>-Proteins die GTPase Rho-A. Zuvor liegt diese komplexiert mit Guanine Nucleotide Diphosphat (GDP) und Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor (GDI)

vor und wird, vermittelt durch Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEF), die mit der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins assoziiert sind, aktiviert, wobei GDP gegen GTP ausgetauscht wird (Somlyo & Somlyo, 2000). Der Rho-A-GTP-Komplex aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Rho-Kinase (ROCK), welche ihrerseits die regulatorische Untereinheit der Myosin-Light-Chain-Phosphatase (MLCP) phosphoryliert. Diese ist im phosphorylierten Zustand inaktiv und kann ihre Funktion, regulatorische Leichtketten (RLC) des Kontraktionsproteins Myosin zu dephosphorylieren, nicht ausüben (Somlyo & Somlyo, 2000). An Serin 19 phosphorylierte Myosinleichtketten führen zur Interaktion mit Aktin und zur Kontraktion (Rüegg, 2000). Während die Kontraktion im oben erwähnten elektromechanischen Vorgang durch Kalziumspiegelanstieg und MLCK vermittelt wird, führt hier allein die Hemmung der Dephosphorylierung ohne einen Kalziumspiegelanstieg zur Kontraktion. Durch die ausbleibende Dephosphorylierung werden die Myosinleichtketten empfindlicher für das zur Kontraktion erforderliche  $\text{Ca}^{2+}$ , man spricht daher von der so genannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung (engl.: – Sensitization).

Experimente in vitro zeigten, dass auch Arachidonsäure (AA) zur Inhibition von MLCP führt, Dies erfolgt einerseits, indem AA die katalytische von der regulatorischen Untereinheit der MLCP abdissoziiert (Gong et al., 1992) und andererseits durch direkte Aktivierung von ROCK (Feng et al., 1999; Fu et al., 1998).

Der beschriebene Signaltransduktionsweg ist an mehreren Stellen durch verschiedene Einflüsse inhibierbar. Von besonderer Bedeutung bei der Inhibition von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängiger Kontraktionen ist der ROCK-Inhibitor Y-27632 (Uehata et al., 1997a).

#### **4.2.3.2 Signaltransduktion über die Proteinkinase C (PKC)**

Bei diesem Signaltransduktionsablauf (Somlyo & Somlyo, 2000) besetzen Agonisten Zellmembranrezeptoren, die über ein trimeres  $G_q$ -Protein gekoppelt, die Phospholipase C aktivieren. Durch Spaltung von Phosphatidylinositol-bis-phosphat ( $\text{PIP}_2$ ) entsteht Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Während  $\text{IP}_3$  zum Kalziumspiegelanstieg durch Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher im Sarkoplasmatischen Retikulum führt und damit Kontraktionen auslöst, aktiviert DAG die PKC, die das Protein CPI-17 phosphoryliert, welches seinerseits die katalytische Untereinheit PP-1C der MLCP direkt inhibiert. So wird hier ebenfalls eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung hervorgerufen, die, wie oben dargestellt, zur Kontraktion führt. Allerdings spielt dieser Weg über das CPI-17 Protein eine sehr viel geringere Rolle als der über Rho-A (Somlyo & Somlyo, 2000).

### **4.3 Das glattmuskuläre Kontraktionssystem des Trabekelwerks**

Gemäß der ersten Arbeitshypothese werden auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung beruhende Kontraktionsmechanismen der gerade dargestellten Art im TM angenommen. Wie aus ihrer Beschreibung zu entnehmen ist, bedürfen sie eines vollständig ausgeprägten glattmuskulären Kontraktionssystems mit Bestandteilen wie Aktin, Myosin und MLCK. Vorhandensein dieses glattmuskulären Kontraktionssystems in TM muss zunächst nachgewiesen werden, und wurde daher als zweite Arbeitshypothese formuliert.

#### **4.3.1 Bisherige Befunde zur Unterstützung der Hypothese glattmuskelartiger Kontraktionssysteme in TM**

Lange Zeit ist das TM als passives Gewebe angesehen worden, welches ausschließlich durch einstrahlende Fasern des ZM beeinflusst wird (Wiederholt et al., 2000). Hier werden einige Befunde zusammengetragen, die deutlich darauf hindeuten, dass es sich beim TM um ein aktives Gewebe mit einem eigenständigen Kontraktionssystem, wie es aus glatter Muskulatur bekannt ist, handelt:

Mit verschiedenen Methoden konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass TM die Morphologie kontraktile Zellen aufweist. Verschiedenen Arbeitsgruppen ist es gelungen, kontraktile Filamente im TM nachzuweisen (de Kater et al., 1992; Flügel et al., 1991; Ringvold, 1978; Tripathi & Tripathi, 1980). Dazu gehörte der Nachweis des Kontraktionsproteins  $\alpha$ -Isoactin (Coroneo et al., 1991), das aus glatter Muskulatur bekannt ist.

Elektrophysiologisch hat sich durch Messungen mit konventionellen Microelektroden das Muster des Membranspannungsverlaufs von TM-Zellen als entsprechend dem erregbarer Glattmuskelzellen charakterisieren lassen (Coroneo et al., 1991). Messungen an kultiviertem, humanen TM mittels Glasmikroelektroden haben nachgewiesen, dass die Applikation von  $\text{Ba}^{2+}$ , Acetylcholin, Isoproterenol und Endothelin-1 Veränderungen des Membranpotentials bewirkte, wie sie für glatte Muskulatur charakteristisch sind (Lepple-Wienhues et al., 1994). Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik konnte gezeigt werden, dass die relaxierende Wirkung von cGMP/NO auf das TM durch den für glatte Muskulatur typischen und bedeutungsvollen maxi- $\text{K}^+$ -Kanal vermittelt wird (Stumpff et al., 1997). Auch der kontraktionsregulierende L-type-Kalziumkanal glatter Muskulatur ist im TM mit Patch-Clamp Methoden charakterisiert worden (Steinhausen et al., 2000).

Wie zahlreiche Forschungsergebnisse belegen, haben Protein-Tyrosin-Kinasen eine große Bedeutung bei der Kontraktionsregulation glatter Muskulatur (Di Salvo et al., 1993;

Hollenberg, 1994) und werden als Ziele neuer Pharmaka zum Eingriff in das Kontraktionsverhalten diskutiert. Auch an TM hat durch Kontraktionsexperimente gezeigt werden können, dass sowohl Substanzen die aktivierend (Epidermal-Growth-Factor, EGF), als auch solche die hemmend (Genistein) auf Protein-Tyrosin-Kinasen wirken, den Tonus des TM verändern (Stumpff et al., 1999; Wiederholt et al., 1998). Protein-Tyrosin-Kinasen scheinen also wie in glatter Muskulatur an der Kontraktionsregulation des TM beteiligt zu sein.

Ein anderes wichtiges Protein der Kontraktionsregulation glatter Muskulatur ist die Protein-Kinase C (PKC) (Ruzycky & Morgan, 1989). Kontraktionsexperimente haben gezeigt, dass verschiedene unspezifische (H-7) und hochspezifische (Chelerythrine und myristoylated PKC-substrate) (Herbert et al., 1990) PKC-Inhibitoren auch in TM zur Relaxation führen (Thieme et al., 1999). Die PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\epsilon$ , die für ihre Beteiligung an kalziumunabhängiger Kontraktionsregulation glatter Muskulatur bekannt sind (Allen & Walsh, 1994), konnten bereits durch Western-Blot-Analyse in TM nachgewiesen werden (Thieme et al., 1999).

Ebenfalls mittels Western-Blot ist der Nachweis des Rho-A-Proteins in TM gelungen (Thieme et al., 2000). Wie oben beschrieben spielt Rho-A an Regulation kalziumabhängiger Kontraktionsvorgänge der glatten Muskulatur eine wichtige Rolle (Somlyo & Somlyo, 2000; Wang & Bitar, 1998).

Zur Untersuchung der Wirkung des Vasokonstriktors Endothelin auf TM sind intrazelluläre Kalziummessungen nach der Fura-2 Methode, Messungen der Membranpotentialveränderung und Kontraktionsexperimente durchgeführt worden. Der resultierende intrazelluläre Kalziumanstieg, der Membranpotentialverlauf (Lepple-Wienhues et al., 1992b) und das Kontraktionsverhalten (Lepple-Wienhues et al., 1991b) entsprachen der Charakteristik glatter Muskulatur.

Alle genannten Befunde weisen darauf hin, dass TM und glatte Muskulatur in Morphologie, Ausstattung mit Proteinen der Kontraktionsregulation und funktionellem Verhalten nahezu übereinstimmen. Die Arbeitshypothese, dass glattmuskuläre Regulationsprozesse für die Kontraktion des TM verantwortlich sind, ist also zahlreich und eindeutig begründet.

#### **4.3.2 Andere Ansätze zur Erklärung der Rolle des Trabekelwerks für den Kammerwasserabfluss**

Während die obigen Ausführungen betonen, dass TM aufgrund seines glattmuskulären Kontraktionssystems für die Regulation des Kammerwasserabflusses und damit der Einstellung des IOD verantwortlich ist, versuchen mehrere Arbeitsgruppen und Autoren die Regulationseigenschaften des TM durch verschiedene andere Mechanismen zu erklären:

#### **4.3.2.1 Veränderung von Zytoskelettstrukturen des Trabekelwerks**

Einen Schwerpunkt bildet die Annahme, die Abflussregulation durch TM könne aufgrund von Veränderungen seines Zytoskeletts erfolgen (Epstein et al., 1999; Honjo et al., 2001; Peterson et al., 1999; Tian et al., 2000).

In verschiedenen Zellen des trabekulären Kammerwasserabflussweges sind Mikrofilament-systeme vorhanden, deren Hauptkomponente das kontraktile, filamentäre Aktin bildet. Umgebungsfaktoren und Faktoren des Zytoplasmas wie die extrazelluläre Kalziumkonzentration, Aktivierung von G-Proteinen, mechanische Spannung und hydrostatischer Druck seien für die Regulation der Interaktionen dieses Zytoskelettsystems verantwortlich und so an der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt. Auch die Beteiligung von Mikrotubuli und Intermediärfilamenten an der IOD-Regulation durch das TM wird erwogen, indem z.B. Rupturen der Mikrotubuli zu Aktin-Myosin vermittelter Kontraktion führen sollen (Tian et al., 2000). Bei Applikation von Substanzen wie Ethacrynsäure, Colchizin und Vinblastin, die Mikrotubuli verändern, haben tatsächlich TM-Kontraktionen beobachtet werden können. Durch Vorbehandlung mit H-7, einer Verbindung die das Aktinzytoskelett zerstört, ließen sich diese Effekte inhibieren (Gills et al., 1998).

In einem Affenmodell hat sich eine Senkung des Kammerwasserabflusswiderstandes nach Applikation von Cytochalasin beobachten lassen (Kaufman & Erickson, 1982). Dieser Effekt und eine Ablösung von Endothelzellen von den Balkenstrukturen des TM wird durch Zerreißen des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin und eine nachfolgende Ausdehnung des Gewebes erklärt (Kaufman & Erickson, 1982; Tian et al., 2000).

Ethacrynsäure (ECA) hat ebenfalls den Abflusswiderstand in einem Affenmodell gesenkt (Epstein et al., 1987), die Zellform kultivierter TM-Zellen verändert, zur Lösung von TM-Zellen von Zellen der inneren Wand des Schlemm-Kanals geführt und das Anfärbemuster der Hauptkomponenten des Zytoskeletts abgeändert (Tian et al., 2000).

Im Affenmodell und an enukleierten Augen des Schweins hat der Serin-Threonin-Kinase-Inhibitor H-7 eine Senkung des Abflusswiderstandes bewirkt. Seine geweberelaxierende und -erweiternde Wirkung wird durch Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts und der Membranverankerung an Matrixadhäsionsstellen innerhalb des TM erklärt (Tian et al., 1998; Volberg et al., 1994).

Die Wirkung von Latrunculinen, den IOD bei Affen für mehrere Stunden zu senken, wird ihrer Fähigkeit zugeschrieben, Mikrofilamentorganisationen zu zerstören und durch Bindung an G-Aktin, die Zellform zu verändern (Peterson et al., 1999).

Auch die abflusswiderstandsenkende Wirkung der Protein-Kinase-Inhibitoren Staurosporin, Chelerythrin und ML-7 im Affenmodell wird durch deren zytoskelettzerstörenden Effekt erklärt (Tian et al., 2000a).

Ein selektiver Inhibitor der Rho-Kinase (ROCK) Y-27632, auf den später noch genauer eingegangen wird, ist in der Lage gewesen, im Tiermodell mit Kaninchen eine Abflussverbesserung des Kammerwassers und eine IOD-Senkung hervorzurufen. Auf der Suche nach einer Erklärung für diesen Effekt ist gezeigt worden, dass Y-27632 in TM-Kulturen zu einer starken Alteration der Verteilung von F-Aktin bis hin zum Verlust der meisten Aktin-Bündel führt. Die Morphologie der TM-Zellen, beobachtet durch ein Phasenkontrastmikroskop, hat sich ebenfalls verändert. Y-27632 hat Rundung und Retraktion der Zellen induziert. Der diese Untersuchungen referierende Autor zieht neben den genannten Befunden auch Beeinflussungen der Aktin-Myosin vermittelten Kontraktion durch Y-27632 als Erklärung für die IOD-Regulation in Erwägung (Honjo et al., 2001).

Butandion 2-monoxim (BDM) ist eine Verbindung die mit dem Aktin-Myosin-System interagiert und dieses in seiner Funktion behindert. Die Applikation dieser Substanz in perfundierte, enukleierte Augen des Schweins hat eine Verbesserung des Kammerwasserabflusses bewirkt. Die gleiche Substanz hat in TM-Kulturen zum Verlust von Zell-Zellverbindungen, zur Änderung und zu teilweisem Verlust des Färbemusters filamentären Aktins und zu Veränderungen der Zellform geführt, was als Erklärung für die Abflussregulation herangezogen wird (Epstein et al., 1999).

#### **4.3.2.2 Die Rolle des Myocilin/TIGR-Protein bei der Regulation des Kammerwasserabflusses**

Die Forschung der letzten Jahre bildet durch die Entdeckung eines eventuell für das POWG und das Juvenile Offenwinkel Glaukom mitverantwortlichen Gens einen weiteren Schwerpunkt innerhalb der zahlreichen Erklärungsansätze für die Rolle des TM bei der Regulation des Kammerwasserabflusses.

Das Myocilin/TIGR-Gen, dessen Sequenz analysiert wurde (Nguyen et al., 1998), kodiert für das *trabecular meshwork inducible glucocorticoid response proteine* (TIGR-protein), auch zunehmend Myocilin (MYOC) genannt (Johnson, 2000). Dieses Protein konnte in kultivierten TM-Zellen in verstärkter Expression nachgewiesen werden, nachdem die Kultur längere Zeit mit Kortikosteroiden behandelt worden war (Polansky et al., 1991). Es wird verdächtigt, bei entsprechendem Genotyp vermehrt in TM synthetisiert zu werden und durch Einlagerung im Extrazellulärraum durch Obstruktion des Kammerwasserabflussweges zur IOD-Erhöhung und

zur Entstehung des POWG beizutragen (Lütjen-Drecoll, 1999; Lütjen-Drecoll et al., 1998; Nguyen et al., 1998; Polansky & Nguyen, 1998; Tamm & Russell, 2001).

Weitere exogene und endogene Faktoren sind in der Diskussion, ebenfalls eine verstärkte Expression des Proteins hervorzurufen: Die Stimulation kultivierter TM-Zellen mit TGF- $\beta_1$ , Dexamethason und mechanischer Dehnung hat eine verstärkte Expression von MYOC/TIGR-mRNA bewirkt (Tamm et al., 1999). In nativem TM konnte nach Stimulation mit Dexamethason eine Expressionsverstärkung des extrazellulären Glykoproteins (TIGR-protein) direkt mittels Western-Blot detektiert werden (Nguyen et al., 1998).

In histologischen Experimenten ist es gelungen, TIGR-Proteine mit Fluoreszenz-Antikörpern zu markieren. In glaukomatösen Augen haben erheblich mehr Bereiche des TM und der Abflusswege des Kammerwassers eine intensive Fluoreszenzantwort gezeigt als in gesunden Kontrollaugen (Lütjen-Drecoll et al., 1998). Rekombinantes TIGR-Protein (rTIGR) hat sich als fähig erwiesen, zu oligomerisieren und an TM-Zellen zu binden (Nguyen et al., 1998). Beides wird als wichtiger Hinweis für eine mögliche Rolle bei der Blockade des Kammerwasserabflusses gesehen.

Eine Mutation des Myocilin/TIGR-Gens konnte nur bei ca. 4% der an POWG leidenden Patienten festgestellt werden (Colomb et al., 2001), und ist somit als seltener Risikofaktor für das POWG anzusehen (Wang et al., 2002). Der prognostische Wert dieses Risikofaktors ist dementsprechend vernachlässigbar gering (Kitazawa, 2001), so dass Myocilin bezüglich des POWG hauptsächlich im Zusammenhang mit der Erforschung verschiedener Pathomechanismen des erhöhten IOD interessant ist.

Die Ergebnisse und Ansichten der beiden dargestellten Forschungsschwerpunkte scheinen nicht in Widerspruch zueinander zu stehen. Auch den weiter oben angeführten Resultaten, welche die Annahme glattmuskulärer Kontraktionssysteme im TM bestätigen, widersprechen sie zunächst nicht. Es wird vielmehr deutlich, dass gleichen Effekten, wie z.B. der Wirkung von H-7 auf TM offensichtlich unterschiedliche Erklärungen zu Grunde gelegt werden. Hier kann noch nicht beurteilt werden, welche Erklärungsansätze letztlich genauer zutreffen. Für ein genaues Verständnis der komplizierten Zusammenhänge der IOD-Regulation müssen vorerst alle unterschiedlichen Ergebnisse berücksichtigt werden.

## **4.4 Unterstützung der Hypothese glattmuskelartiger Kontraktionssysteme im Trabekelwerk durch neue Forschungsergebnisse dieser Arbeit**

Die Erforschung des glattmuskulären Kontraktionsmechanismus in TM wird im Folgenden weiterhin im Zentrum stehen. Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Anknüpfung an die unter 4.3.1 erläuterten Untersuchungen, welche die Hypothese glattmuskelartiger Kontraktionssysteme in TM unterstützten. Die Experimente richteten sich schwerpunktmäßig auf die molekularbiologischen Nachweise der zentralsten Proteine im Kontraktionssystem glatter Muskulatur, Myosin und dessen Leichtkettenkinase (MLCK).

### **4.4.1 Das Glattmuskelmyosin**

Glattmuskelmyosin (Myosin II) ist neben  $\alpha$ -Isoaktin, das in humanem und bovinem TM bereits nachgewiesen wurde (Coroneo et al., 1991; Gipson & Anderson, 1979) das zentralste Protein glattmuskulärer Kontraktionsvorgänge überhaupt, denn es bildet mit Aktinfilamenten das Filamentverschiebesystem (Rüegg, 2000).

Glattmuskelmyosin unterscheidet sich von Myosin quergestreifter Muskulatur und kommt ubiquitär in Glatt- und vielen Nichtmuskelzellen vor. Das Hexamer besteht aus zwei  $\alpha$ -helikal umeinandergewundenen, identischen schweren Ketten von je ca. 200 kDa Molekulargewicht, deren N-terminale Enden globulär vorliegen und so einen Doppelkopf bilden. In der Halsregion sind beiderseits zwei unterschiedliche Leichtketten von je 18-25 kDa assoziiert. Mehrere Myosinmoleküle lagern sich mit ihren  $\alpha$ -helikalen Superspiralen antiparallel zu den dicken Filamenten der Myofibrille zusammen. Die globulären Köpfe interagieren mit Aktin, während die durch MLCK an Serin 19 phosphorylierbaren Leichtketten (RLC) diesen Prozess regulieren. Ebenfalls an den globulären Köpfen befinden sich Bindungsstellen für Adenosin-Triphosphat (ATP). Myosin agiert als ATPase indem es ATP hydrolysiert und die freiwerdende Energie dem Kontraktionsprozess zuführt. (Jockusch & Hinssen, 1996; Somlyo & Somlyo, 2000; Stryer, 1994).

Während andere Myosintypen (I und III-IV) nicht in der Lage sind, bipolare Filamente auszubilden und nur eine vermittelnde Rolle zwischen Aktin und Membranstrukturen haben (Jockusch & Hinssen, 1996), ist Myosin II Bedingung für die glattmuskuläre Kontraktion. Alle verschiedenen Mechanismen der Kontraktionsregulation, elektromechanische wie pharmakomechanische, münden letztlich in einer gemeinsamen Endstrecke, welche durch Myosin

und Aktin dargestellt wird (Di Salvo et al., 1993; Hollenberg, 1994; Rüegg, 2000; Somlyo & Somlyo, 1994; Somlyo & Somlyo, 2000).

Immunhistochemische Untersuchungen einiger humaner Augen haben bereits auf das Vorhandensein von Glattmuskelmyosin in Zellen des TM und des juxtakanalikulären Gewebes hingewiesen (de Kater et al., 1990).

#### **4.4.1.1 Molekularbiologischer Myosin-Nachweis im Trabekelwerk**

Experimente dieser Arbeit erbringen mittels Western-Blot den sicheren und endgültigen Nachweis von Myosin II in k-HTM, k-BTM und n-BTM (s. Kap. 3.1.1).

Spezifische Signalbanden sind im Immunoblot bei ca. 250 kDa aufgetreten, obwohl sie bei Proteinsequenzen von ca. 205 kDa erwartet worden waren (Sigma, 1999). Im Lyseverfahren nicht abgespaltene Leichtketten von zusammen ca. 30-50 kDa könnten dieses Ergebnis erklären.

#### **4.4.2 Die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK)**

Ebenso bedeutend für die glattmuskuläre Kontraktionsfähigkeit wie Myosin ist die Myosin-Light-Chain-Kinase, ohne welche die Anregung des Aktin-Myosin-Filamentsystems zur Kontraktion nicht denkbar wäre.

MLCK ist ein ca. 160 kDa großes Protein, das in Muskel- und mehreren Nichtmuskelzellen vorliegt (Somlyo & Somlyo, 2000). Elektromechanische und pharmakomechanische Kontraktionsmechanismen (vergl. 4.2.2) die zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels führen, bewirken die Zusammenlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem kalziumbindenden Eiweißkörper Kalmodulin. Die entstehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Kalmodulin-Komplexe aktivieren die MLCK. In diesem Zustand überträgt sie über ihre Serindomänen eine Phosphatgruppe von Adenosin-Triphosphat auf die RLC des Myosins (Gao et al., 2001; Rüegg, 2000; Somlyo & Somlyo, 2000). Außer Myosin sind derzeit keine weiteren Substrate der MLCK bekannt (Kamm & Stull, 2001).

#### **4.4.2.1 Molekularbiologischer Nachweis von MLCK im Trabekelwerk**

Nachdem in vielen Experimenten bereits Einzelheiten des Kontraktionsverhaltens von TM untersucht worden sind (vergl. Kap. 4.3.1), erbringen Versuchsergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal den sicheren, molekularebiologischen Nachweis von MLCK in k-HTM, n-HTM, k-BTM, n-BTM und n-BZM (s. Kap. 3.1.2). Die mit Antikörpern gegen MLCK detektierten

Signale sind, z.T. zusätzlich bestätigt durch 2. Antibody-only-Tests, als spezifisch für MLCK zu bewerten.

Im Falle des MLCK-Nachweises in n-HTM sind Signale bei ca. 150 kDa statt wie erwartet bei 160 kDa aufgetreten. Eine mögliche Ursache dafür kann eine Abspaltung von Proteinteilen während des Lyseverfahrens sein.

#### **4.4.3 Gebundenes Vorliegen von Myosin und Myosin-Light-Chain-Kinase**

Zur Vermittlung von Kontraktionsvorgängen in TM durch das Aktin-Myosin-Filamentsystem muss notwendigerweise eine Interaktion zwischen MLCK und Myosin stattfinden, da es sonst nicht zur Phosphorylierung von Myosinleichtketten kommen kann. MLCK und Myosin liegen also möglicherweise für einen bestimmten Zeitraum assoziiert vor. Ein molekularbiologischer Nachweis des gebundenen Vorliegens von Myosin und MLCK kann somit einen verlässlichen Hinweis auf ein interagierendes Aktin-Myosin Kontraktionssystem liefern.

##### **4.4.3.1 Molekularbiologischer Nachweis des gebundenen Vorliegens von Myosin und MLCK im Trabekelwerk**

Kopräzipitationsexperimente dieser Arbeit liefern deutliche Belege dafür, dass MLCK und Myosin in k-HTM und n-BTM miteinander assoziiert vorliegen (s. Kap. 3.1.3): In Immunopräzipitaten, die getrennt mit Antikörpern gegen Myosin und Antikörpern gegen MLCK gefällt worden sind, konnten bei Färbung mit der jeweils nicht in der IP verwendeten Antikörpersorte Banden in gleicher Höhe detektiert werden. Das spricht dafür, dass beide Proteine in der gleichen Bande zusammen vorgelegen haben. Unklar ist, weshalb sich diese Bande bei 110 kDa befand, obwohl jedes der beiden Proteine alleine schwerer als 110 kDa ist. Wiederum könnte eine mögliche Erklärung sein, dass einzelne Ketten der Proteine zuvor im Lyseverfahren abgespalten worden sind. Es muss jedoch auch in Erwägung gezogen werden, dass die 110 kDa-Banden unspezifisch sind, obwohl der 2. Antibody-only-Test negativ ausgefallen ist. Dieser ist mit einem Protein durchgeführt worden, das - im Gegensatz zu den anderen Proteinen - zuvor keiner IP unterzogen worden war. Bei der IP können jedoch Antikörperüberschüsse zurückbleiben, die für die Verursachung unspezifischer Signale in Frage kommen. Die Spezifität der Banden konnte nicht stichhaltig bewiesen werden.

#### **4.4.4 Phosphoserine der Myosin-Light-Chain-Kinase**

Die glattmuskuläre Isoform der MLCK besitzt eine katalytische Untereinheit, welche zur RLC-Phosphorylierung mit Myosin interagiert und eine regulatorische Einheit, die Bindungs-

stellen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Kalmodulin sowie Serindomänen aufweist (Kamm & Stull, 2001). Letztere übernehmen die Phosphatgruppen von Adenosin-Triphosphat bei Aktivierung der MLCK durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kalmodulin-Komplexe und liegen dann als sogenannte Phosphoserine vor. Dieser Vorgang ist unbedingt notwendig für die RLC-Phosphorylierung. Daher deutet ein Nachweis phosphorylierter Serindomänen der MLCK stark auf eine funktionsfähige Kontraktionsvermittlung durch MLCK, Myosin und Aktin hin.

#### **4.4.4.1 Molekularbiologischer Nachweis von Phosphoserinen der MLCK in Trabekelwerk**

Der Nachweis von phosphorylierten Serindomänen der MLCK in TM wird in Experimenten dieser Arbeit mittels Western-Blot zum ersten Mal erbracht (s. Kap. 3.1.4). Signale für Phosphoserine werden dem Molekulargewicht der MLCK entsprechend bei ca. 160 kDa erwartet.

Bei der Untersuchung von k-HTM sind weitere unspezifische Banden bei ca. 200 kDa aufgetreten.

n-HTM zeigte Signale bei ca. 150 kDa statt 160. Diese geringe Abweichung kann mit Proteinabspaltungen während des Lyseverfahrens zusammenhängen. Nach Membranstrip und Markierung mit Antikörpern gegen MLCK haben sich Signale in gleicher Höhe wie vor dem Membranstrip detektieren lassen. Dies bedeutet, dass MLCK phosphorylierte Serinreste enthält und diese damit an gleicher Stelle zur Darstellung kommen.

Letzteres ist auch bei der Untersuchung von n-BTM beobachtet worden, die detektierte Bande befand sich jedoch erwartungsgemäß bei ca. 160 kDa.

Die Nachweise phosphorylierter Serine der MLCK in k-HTM, n-HTM und n-BTM weisen deutlich darauf hin, dass sich MLCK im TM offenbar in aktivierter Form befindet, das Aktin-Myosin System also seine Funktion ausführen kann.

#### **4.4.5 Die Bedeutung von Endothelin am Trabekelwerk**

Endothelin ist ein Peptid von 21 Aminosäuren, das erstmalig in Endothelzellkulturen nachgewiesen wurde (Yanagisawa et al., 1988) und als einer der stärksten endogenen Vasokonstriktoren gilt (Pang & Yorio, 1997). Seine Beteiligung an der Kontraktionsregulation glatter Muskulatur ist detailliert erforscht worden: Über Membranrezeptoren aktiviert Endothelin die Phospholipase C und A, Kalziumkanäle und die Adenylat-Zyclase (Pang & Yorio, 1997; Rubanyi & Polokoff, 1994). Es induziert sowohl Kontraktionen ohne Beteiligung extrazellu-

lären Kalziums (Marsault et al., 1990), als auch vollständig kalziumspiegelkonstante, über Proteinkinase C vermittelte Kontraktionen (Kodama et al., 1989).

An isolierten TM-Streifen führte die Applikation von Endothelin sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit extrazellulären Kalziums zur Kontraktion (Lepple-Wienhues et al., 1991b). An perfundierten, isolierten, bovinen Augenvorderkammern hat Endothelin eine Abnahme des Kammerwasserabflusses über das TM bewirkt (Wiederholt et al., 1995). Im Tierversuch mit Kaninchen führte die intrakamerale Injektion von Endothelin zum Anstieg des IOD (Granstam et al., 1991).

In verschiedenen Geweben sind Membranrezeptoren für Endothelin nachgewiesen worden, die sich in zwei Hauptgruppen  $ET_A$  und  $ET_B$  unterteilen lassen und sich in mehrerer Hinsicht unterscheiden (Pang & Yorio, 1997). In TM konnte  $ET_A$  mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nachgewiesen werden (Tao et al., 1998). Die Stimulation von TM mit Endothelin-1 ( $ET_1$ ), welches vor den beiden anderen ET-Typen ( $ET_2$ ,  $ET_3$ ) die höchste Affinität zu  $ET_A$  besitzt (Pang & Yorio, 1997), hat einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt (Tao et al., 1998). Auch die Stimulation von Phospholipase C über den  $ET_A$ -Rezeptor ist in HTM nachgewiesen worden (Haque et al., 1998).

Überdies weisen Befunde auf Zusammenhänge von ET mit der IOD-Regulation bzw. der Glaukomentstehung hin: So ist im Kammerwasser gesunder humaner und boviner Augen eine 2- bis 3-fach höhere Endothelinkonzentration gemessen worden als im Blutplasma (Lepple-Wienhues et al., 1992a). Radioimmunoessay-Messungen im Kammerwasser von Patienten, die sich einer Kataraktoperation unterzogen hatten, haben bei Patienten mit zusätzlichem POWG signifikant höhere Endothelinkonzentrationen ergeben, als bei Patienten ohne POWG (Noske et al., 1997).

Nach diesen Ergebnissen kommt Endothelin als Auslöser kalziumabhängiger und kalziumunabhängiger Kontraktionen des TM in Frage. Die zu Grunde liegenden Mechanismen in TM sind dabei noch weitgehend unbekannt.

#### **4.4.6 Hemmung ET<sub>1</sub>- und Carbachol-induzierter Kontraktion durch MLCK-Inhibitor ML-7 im TM**

Nachdem die Expression der MLCK und ihrer phosphorylierten Serindomänen in TM molekularbiologisch nachgewiesen werden konnte, bieten sich von MLCK ausgehend weitere Möglichkeiten, die Regulation der glattmuskelartigen Kontraktionsprozesse des TM und ihre Induktion durch Endothelin zu untersuchen.

Die Verbindung 1-(5-iodonaphthalen-1-sulphonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepin hydrochlorid (ML-7) ist ein hochpotenter und spezifischer Inhibitor der MLCK, der in einem Modell mit Affenaugen bei intrakameraler Injektion zur Senkung des IOD geführt hat (Tian et al., 2000a). Gemäß der Hypothese glattmuskulärer Kontraktionssysteme in TM, könnte die IOD-Senkung dieses Experiments auf eine Kontraktionshemmung des TM durch Inhibition der MLCK zurückgeführt werden.

Kontraktionsexperimente dieser Arbeit mit isolierten Gewebstreifen aus TM und ZM haben für TM eine mäßige aber signifikante Abnahme sowohl der Carbachol- als auch der ET<sub>1</sub>-induzierten Kontraktionskraft nach Applikation von ML-7 gezeigt. In ZM dagegen ist keine signifikante Abnahme Carbachol-induzierter Kontraktionskraft beobachtet worden (s. Kap. 3.2.1).

Dieses Ergebnis lässt folgende Aussagen zu: 1. Die Kontraktionsabnahme nach spezifischer Inhibition der MLCK beweist deutlich, dass Kontraktionen im TM über MLCK, Myosin und Aktin vermittelt werden. 2. Durch ET<sub>1</sub> und Carbachol induzierte Kontraktion, wird über MLCK vermittelt. Die Endstrecke der Signaltransduktion von ET<sub>1</sub> und Carbachol ist also identisch, mag sie vorher auch über unterschiedliche Wege verlaufen. 3. Die Unvollständigkeit der Kontraktionshemmung durch ML-7 könnte darauf hinweisen, dass Carbachol und ET<sub>1</sub> in TM noch über weitere Wege zur Kontraktion führen, als über MLCK, oder dass die Potenz von ML-7 in der verwendeten Konzentration nicht für eine vollständige Hemmung der MLCK ausgereicht hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie sie in diesem Kapitel diskutiert wurden, haben zum Verständnis der Kontraktionsvermittlung im TM beigetragen: Der Nachweis von Glattmuskelyosin und MLCK belegt, dass TM die wesentlichsten Charakteristika glatter Muskulatur vorweist. Die Kopräzipitation von Myosin mit MLCK, der Nachweis von Phosphoserinen der MLCK und die Kontraktionshemmung durch MLCK-Inhibition belegen überdies,

dass das Kontraktionssystem aus Aktin, Myosin und MLCK im TM voll funktionsfähig und für die Vermittlung von Kontraktionen verantwortlich ist. Alle Tatsachen unterstützen die Arbeitshypothese, dass TM ein vollständig ausgeprägtes glattmuskuläres Kontraktionssystem besitzt.

Weiterhin werden durch diese Erkenntnis alle bisherigen Experimente bestätigt, die von der Annahme glattmuskulärer Kontraktionsmechanismen in TM ausgegangen sind und in Kap. 4.3.1 teilweise erläutert wurden.

## **4.5 Kontraktionsregulation durch $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung im Trabekelwerk**

Wie Kap. 4.3 und 4.4 darstellten, konnte die Existenz glattmuskulärer Kontraktionssysteme im TM hinreichend gesichert werden, um die genauere Untersuchung ihrer eventuell auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung beruhenden Regulationsmechanismen (vergl. Kap. 4.2.3) anzuschließen.

Über die Ebene der Rezeptoren und G-Proteine im TM, die den Beginn der Signaltransduktionskaskaden dieser Kontraktionsmechanismen darstellt, ist noch wenig bekannt. Zu den Proteinen PKC, Rho-A, ROCK, MLCP und MLCK, die sich weiter unterhalb in der Signaltransduktionskaskade anschließen, können folgende Aussagen gemacht werden:

### **4.5.1 Die Proteinkinase C (PKC)**

PKC stellt eine Familie vieler Serin/Threonin-Kinase-Isoenzyme dar, die in verschiedenen Zellen vorkommen und ausgelöst durch unterschiedliche Agonisten an mehreren Zellfunktionen wie z.B. Kontraktionsvorgängen, Zelldifferenzierung, Wachstumsregulation und Tumorentstehung beteiligt sind. Es lassen sich kalziumabhängige Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ) von kalziumunabhängigen ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) und atypischen ( $\zeta$ ,  $\lambda$ ) unterscheiden (Andrea & Walsh, 1992; Newton, 1995; Thieme et al., 1999). Alle werden von vielfältigen Mechanismen reguliert und beeinflussen ihrerseits, je nach Zellart in der sie vorkommen, wiederum mehrere verschiedene Proteine.

Die Isoformen PKC- $\epsilon$  und PKC- $\alpha$  konnten sowohl in humanen TM- und ZM-Kulturen, als auch im nativem, bovinen TM und ZM nachgewiesen werden. PKC- $\epsilon$  hat in TM deutlich stärker exprimiert vorgelegen als in ZM (Thieme et al., 1999). Diese  $\epsilon$ -Isoform ist dafür bekannt, an kalziumunabhängigen Kontraktionsvorgängen in glatter Muskulatur beteiligt zu sein (Allen & Walsh, 1994).

In Kontraktionsexperimenten mit isolierten, bovinen TM- und ZM-Streifen hat die Carbachol-induzierte Kontraktion des TM nach Entfernung extrazellulären Kalziums auf ca. 22% abgenommen. Nach Pufferung des intrazellulären Kalziums durch den membranpermeablen Kalzium-Chelator BAPTA-AM ist die Kontraktion des TM komplett inhibiert worden. In diesem Zustand hat die Applikation des PKC-Agonist Phorbol ester (PMA) eine erneute Kontraktion des TM von ca. 16% hervorgerufen, was unter gleichen Bedingungen in ZM nicht möglich gewesen war. Diese kalziumunabhängige PMA-induzierte Kontraktion konnte durch Vorinkubation mit einem spezifischen ROCK-Inhibitor Y-27630 unterdrückt werden (Thieme et al., 2000).

Die genannten Ergebnisse machen folgendes deutlich:

Erstens spielt die PKC in TM eine Rolle bei der Vermittlung von Kontraktionen, die von Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels unabhängig sind, während ihre Aktivierung in ZM unter gleichen Bedingungen ohne Reaktion bleibt. Diesen Befunden müssen also Kontraktionsmechanismen zu Grunde liegen, die über PKC vermittelt werden und unabhängig von Kalziumspiegelveränderungen arbeiten. Die Annahme liegt nahe, dass es sich dabei um Regulationsmechanismen handelt, die auf  $Ca^{2+}$ -Sensitivierung basieren. Dementsprechend ist die erste Arbeitshypothese (s. Kap. 4.1) aufgestellt worden.

Zweitens zeigen die obigen Ergebnisse, dass eine Verbindung von PKC zu Rho-A bzw. ROCK zu bestehen scheint, da die PKC-vermittelte Kontraktion mit dem ROCK-Inhibitor gehemmt werden konnte. Noch ist unklar, ob die PKC Rho-A bzw. ROCK direkt beeinflusst, oder ob dies über Zwischenschritte (z.B. G-Proteine) erfolgt. Experimente haben gezeigt, dass die Isoformen PKC- $\alpha$ , - $\delta$  und - $\epsilon$  in der Lage sind,  $\alpha$ -Untereinheiten des  $G_{12/13}$ -Proteins zu phosphorylieren (Kozasa & Gilman, 1996), welches auch als Aktivator von Rho-A bekannt ist (vergl. Kap. 4.2.3.1) (Somlyo & Somlyo, 2000).

Ergebnisse der Glattmuskelforschung sagen aus, dass Phorbol ester-induzierte  $Ca^{2+}$ -Sensitivierung nicht durch Y-27632 zu inhibieren sei (Fu et al., 1998) und die in MLCP-Hemmung mündenden Signaltransduktionswege über PKC und Rho-A unabhängig voneinander verliefen (Somlyo & Somlyo, 2000). Den oben genannten Ergebnissen zufolge scheint dies für TM keine Gültigkeit zu haben.

Mit Carbachol vorkontrahierte, isolierte TM-Streifen haben sich durch selektive (N-myristoylated peptide substrate, mPKC) und unselektive (H-7) PKC-Blocker (Ward & O'Brian, 1993) relaxieren lassen, während in gleicher Weise behandelte ZM-Streifen keine Veränderungen ihrer Kontraktionskraft gezeigt haben (Thieme et al., 1999). Die obigen Ergebnisse zur Rolle der PKC in TM (Thieme et al., 2000) könnten eine plausible Erklärung

gebnisse zur Rolle der PKC in TM (Thieme et al., 2000) könnten eine plausible Erklärung für die Befunde beider Experimente darstellen.

In Experimenten mit isolierten Augenvorderkammern des Affen ist nachgewiesen worden, dass die Applikation der PKC-Inhibitoren Chelerythrine und H-7 zu einer Verbesserung des Kammerwasserabflusses führt (Tian et al., 2000a; Tian et al., 1999). Auch diese Resultate könnten mit den Befunden zur Rolle der PKC im TM erklärt werden. Allerdings hat der PKC-Aktivator, von dem eigentlich eine Abflussverschlechterung zu erwarten gewesen wäre, im gleichen Experiment eine zusätzliche Widerstandssenkung des Kammerwasserabfluss bewirkt. Weitere Experimente haben gezeigt, dass H-7 Veränderungen des Aktinzytoskeletts hervorruft (Tian et al., 1998). Diese Resultate veranlassten den Autor der Studien zu der Annahme, nicht PKC sei an der Abfluss verbessernden Wirkung von Chelerystrine und H-7 beteiligt, sondern die Effekte dieser Substanzen auf Elemente des Zytoskeletts seien für die Senkung des Abflusswiderstands verantwortlich.

Mit der Einschränkung durch die zuletzt genannten Ergebnisinterpretationen führen alle anderen aufgeführten Resultate zu der Annahme, dass PKC eine Schlüsselrolle bei der Kontraktionsvermittlung über Rho-A/ROCK spielt.

#### **4.5.2 Das Rho-A-Protein**

Rho-A ist eine kleine GTPase von ca. 21 kDa Molekulargewicht, die im Cytosol verschiedener Zellen GDI-gebunden vorliegt und funktionell an G-Proteine wie G<sub>12/13</sub> gekoppelt ist. In den letzten Jahren konnte ihre Beteiligung an vielen G-Protein-vermittelten Zellfunktionen wie Kontraktion, Genexpression, Wachstum, Zelladhaesion- und Migration festgestellt werden (Seasholtz et al., 1999).

Das Protein ist kürzlich durch Western-Blot und Immunopräzipitation im kultivierten, humanen TM nachgewiesen worden (Thieme et al., 2000). Welche Rolle Rho-A im TM spielt, ist nicht geklärt. Doch auch hier können die schon in Bezug auf die PKC erwähnten Experimente Aufschluss geben: Der Inhibitor der Rho-Kinase Y-27632, welche von Rho-A aktiviert wird, ist in der Lage gewesen, PMA-induzierte Kontraktionen des TM zu hemmen. Dies, unterstützt durch den molekularen Nachweis von Rho-A in TM, lässt vermuten, dass Rho-A eine vermittelnde Funktion zwischen näher zur Rezeptorebene gelegenen Proteinen wie PKC und G-Proteine und den Effektorproteinen wie Myosin und Aktin hat.

Auch andere Untersuchungen lassen auf Zusammenhänge der PKC mit Rho schließen. So konnte z.B. der Rac-Guanine Exchange Factor (Rac-GEF) Tiam1, der seinerseits Rho-

Proteine aktiviert, in Swiss 3T3 Fibroblasten durch PKC phosphoryliert werden (Fleming et al., 1997). Über seine Existenz und Rolle in TM gibt es bisher keine sicheren Erkenntnisse.

### **4.5.3 Die Rho-Kinase (ROCK)**

Rho-Kinase ist eine ca. 160 kDa große Serin-/Threonin-Kinase die in zwei identischen Isoformen (ROCK<sub>1</sub> und ROCK<sub>2</sub>) (Leung et al., 1995) in Glattmuskelzellen vorliegt (Yoshii et al., 1999). ROCK wird über einen bisher unbekanntem, wahrscheinlich an der Plasmamembran stattfindenden Mechanismus durch Bindung von Rho-A-GTP an eine Rho-Bindungsdomäne aktiviert (Leung et al., 1995) und ist dann ihrerseits fähig, die regulatorische Untereinheit der MLCP zu phosphorylieren (Somlyo & Somlyo, 2000).

#### **4.5.3.1 Inhibition der ROCK**

Experimente, in denen ROCK inhibiert worden ist, haben erste Anhaltspunkte für die Rolle von ROCK in TM gegeben.

Die spezifische Inhibition von ROCK ist mit dem aus der Bluthochdruckforschung als Vasodilatator bekannten Pyridinderivat Y-27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexan carboxamid dihydrochlorid monohydrat) möglich (Uehata et al., 1997a).

PKC-induzierte Kontraktionen bovinen Trabekelwerks sind durch Y-27632 in Abwesenheit extrazellulären und unter Pufferung intrazellulären Kalziums inhibiert worden (Thieme et al., 2000). Dies weist stark darauf hin, dass ROCK in TM vorliegt und stützt die Annahme eines auf Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung beruhenden Kontraktionsmechanismus in TM. Ein anderer kontraktionshemmender Effekt von Y-27632 als die Inhibition von ROCK ist dabei unwahrscheinlich, da Y-27632 als hochgradig selektiv und spezifisch für ROCK bekannt ist (Uehata et al., 1997a).

Die Vollständigkeit der Kontraktionshemmung durch Y-27632 spricht dagegen, dass MLCP noch über andere Wege, wie z.B. den in Kap. 4.1.3 beschriebenen über CPI-17, von PKC beeinflusst wird.

Im Tiermodell mit Kaninchen hat die intrakamerale, intravitreale und topische Applikation von Y-27632 eine signifikante, dosisabhängige Senkung des IOD gezeigt (Honjo et al., 2001). Auch an enukleierten Augen des Schweins konnte bei Perfusion der Augen mit Y-27632 eine Zunahme des Kammerwasserabfluss gemessen werden (Rao et al., 2001). Die Behandlung humaner Trabekelwerkszellen mit Y-27632 hat, nachgewiesen durch Western-Blot-Analysen, zur Abnahme der Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten geführt (Rao et al., 2001). Durch diese Ergebnisse wird die Annahme unterstützt, dass ROCK, von Rho-A aktiviert, an

der Kontraktionsvermittlung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung in TM beteiligt ist. Andere Erklärungsansätze für die Befunde postulieren durch Y-27632 hervorgerufene Veränderungen von Zytoskelettstrukturen und damit einhergehende Lockerung von Geweben der Kammerwasserabflusswege als Ursache des verbesserten Kammerwasserabfluss. Sie basieren auf der Beobachtung, dass Y-27632 in TM-Kulturen Rundung und Zusammenziehen von Zellen, Zerreißen von Aktinmikrofilamentbündeln und Schwächung von Adhäsionsbereichen bewirkt (Honjo et al., 2001; Rao et al., 2001). Auch an anderen Zellen sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden (Hirose et al., 1998).

#### **4.5.3.2 Versuch des molekularbiologischen Nachweises der ROCK im Trabekelwerk**

Dem Hinweis der genannten Experimentdaten folgend, sind in dieser Arbeit Versuche durchgeführt worden, Kulturen humanen und bovinen Trabekelwerks auf das Vorliegen der beiden ROCK-Isoformen molekularbiologisch zu untersuchen (s. Kap. 3.1.5). Ein ROCK-Nachweis konnte trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente mit verschiedenen TM-Kulturen nicht erbracht werden.

Wenig später wurde ein ROCK-Nachweis mittels Western-Blot in k-HTM und bovinem ZM-Gewebe durch eine andere Arbeitsgruppe publiziert (Honjo et al., 2001).

Die Gegensätzlichkeit dieser Ergebnisse ist am ehesten auf Unterschiede des Proteinstatus der untersuchten Zellkulturen zurückzuführen. So kann die ROCK-Konzentration während der Inkubation der Zellkulturen abgefallen sein. Das Experiment wäre eventuell mit nativem Gewebe zu wiederholen.

Zusammenfassend kann folgendes festgehalten werden: Der ROCK-Nachweis im TM, die Hemmbarkeit von TM-Kontraktionen durch den ROCK-Inhibitor und die Senkung des Kammerwasserabflusswiderstands durch ROCK-Inhibition in Tiermodellen sprechen stark dafür, die Bedeutung von ROCK im TM in der Kontraktionsvermittlung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung zu sehen. Weitere ROCK-Effekte, wie Veränderung von Zytoskelettelementen, sollten in Erwägung gezogen werden.

#### **4.5.4 Die Myosin-Light-Chain-Phosphatase (MLCP)**

MLCP stellt ein Heterotrimer aus einer katalytischen Untereinheit (PP-1c) von 37 kDa, einer regulatorischen Untereinheit ( $M_{130}$ ) von 130kDa und einer 20 kDa großen Einheit unbekannter Funktion dar (Alessi et al., 1992; Somlyo & Somlyo, 2000). Außer in Glattmuskelzellen konnte MLCP auch in Nichtmuskelzellen nachgewiesen werden (Nakai et al., 1997).

Phosphoryliert durch ROCK an der regulatorischen Untereinheit ist MLCP inaktiv, dephosphoryliert agiert es seinerseits dephosphorylierend an RLC des Myosins (Somlyo & Somlyo, 2000).

Mit MLCP-Inhibitoren wie Calyculin und Microcystin konnte in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  eine RLC-Phosphorylierung im Sinne der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung induziert werden, die entsprechend zur Zellkontraktion geführt hat (Somlyo & Somlyo, 2000; Walker et al., 1998).

Das Vorliegen von MLCP in HTM ist sehr wahrscheinlich, da sonst der Effekt der experimentellen Kontraktionshemmung durch selektive ROCK-Inhibition schwer zu erklären wäre. Ein molekularbiologischer Nachweis steht jedoch noch aus.

Als weiterer Effekt der MLCP wird die Dephosphorylierung von MLCK diskutiert (Kamm & Stull, 2001). So ist bei Inhibition der MLCP eine Zunahme der Phosphorylierung der MLCK beobachtet worden (Tang et al., 1993). Dieser Effekt könnte eine Feedback-Hemmung des Kontraktionsmechanismus durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung darstellen (Kamm & Stull, 2001; Somlyo & Somlyo, 2000).

#### **4.5.5 Myosin-Light-Chain-Kinase als Gegenspieler der MLCP**

An dem Regulationsmechanismus basierend auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung ist MLCK indirekt beteiligt, indem sie als Gegenspieler von MLCP mit dieser zusammen das Feinspiel von Kontraktion und Relaxation des Myofilamentsystems reguliert. Genauso wie das Kontraktionssystem aus Aktin und Myosin ist die MLCK für den Kontraktionsmechanismus durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung erforderlich. Dem wurde Rechnung getragen, indem erst die Existenz des vollständigen, glattmuskulären Kontraktionssystems im TM sichergestellt worden ist (vergl. Kap. 4.2 und 4.3), bevor die Rolle der Kontraktionsmechanismen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung in TM erörtert wurde.

Über den Kontraktionsmechanismus durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung im TM kann festgehalten werden, dass seine wichtigsten Schlüssel-Proteine PKC, Rho-A, und ROCK im TM vorliegen und sich den bisherigen Experimenten zufolge funktionell im wesentlichen so verhalten, wie es entsprechend den Erkenntnissen aus der Glattmuskelforschung charakteristisch für sie ist. Die eingangs formulierte erste Arbeitshypothese, dass TM durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung regulierte Kontraktionsmechanismen aufweist, wird also durch alle aufgeführten Ergebnisse in wesentlichen Punkten eindeutig belegt.

## **4.6 Proteinnachweise in bovinem TM zur Bestätigung der Aussagen verschiedener Kontraktionsexperimente**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Regulationsmechanismen des IOD im Hinblick auf eine Therapie beim Glaukom des Menschen. Entsprechend ist das humane TM das primär zu untersuchende Gewebe. Trotzdem stellt die parallel dazu erfolgte Analyse bovinen Trabekelwerks einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit dar, auf den in diesem Kapitel eingegangen wird.

Es wurden und werden weiterhin zahlreiche Kontraktionsexperimente durchgeführt, um Aufschlüsse über die kontraktile Eigenschaften des TM und auch des ZM und deren Regulationsmechanismen zu erhalten. Diese Experimente (s.a. Methoden Kap. 2.2) werden aus mehreren Gründen mit bovinem Nativgewebe ausgeführt: Zunächst lässt sich BTM sehr viel leichter durch Präparation von einstrahlenden ZM-Fasern trennen als HTM, da der ZM beim Rind nur rudimentär angelegt ist (Flügel et al., 1991; Rohen, 1964). Diesem Unterschied kommt große Bedeutung zu, da es gerade Absicht vieler Experimente gewesen ist, Effekte des TM unabhängig von solchen des ZM zu untersuchen. Weiterhin lassen sich aus BTM im Gegensatz zu HTM ausreichend große Streifen herauspräparieren, um mit den der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden Messgeräten verlässliche Messungen der Kontraktilität durchführen zu können. Schließlich stehen Rinderaugen in ausreichender Zahl zur Verfügung. Es bedarf stets kritischer Sorgfalt, Schlussfolgerungen aus Resultaten von Experimenten mit tierischen Untersuchungsobjekten auf den Menschen zu übertragen. Ähnlich verhält es sich, wenn Daten aus Experimenten mit tierischem Gewebe mit solchen aus Experimenten mit humanem Gewebe in Zusammenhang gebracht werden. Entsprechend der dritten oben verfassten Arbeitshypothese wurde in dieser Arbeit angestrebt, alle essentiellen Proteinnachweise außer für humanes auch für bovines TM-Gewebe zu erbringen. Wie aus dem Ergebnisteil (s. Kap. 3) zu entnehmen ist, gelang dies im Falle des Nachweises von Myosin, MLCK, Phosphoserinen der MLCK und der Kopräzipitation von Myosin mit MLCK.

Mit Einschränkung des ROCK-Nachweises, der für bovines Gewebe bisher nicht erbracht werden konnte (vergl. Kap. 4.5.3.2) wird also die dritte Arbeitshypothese eindeutig belegt.

Alle mit BTM durchgeführten Experimente mit der Grundannahme der Existenz glattmuskulärer Kontraktionssysteme in TM werden durch die Proteinnachweise in BTM entschieden bestätigt. Dies gilt für die Kontraktionsexperimente dieser Arbeit und zahlreiche Experimente der Arbeitsgruppe in der diese Arbeit entstand, wie z.B. Experimente zur Kontraktionsinduk-

tion und -inhibition in bovinem TM durch verschiedenen Substanzen wie Carbachol, Endothelin, Indomethacin, muscarinerge Agonisten,  $\alpha$ -adrenerge Agonisten, cGMP/NO, Kalziumkanalblocker und viele weitere (s. ((Thieme et al., 2001a; Wiederholt et al., 2000))).

#### **4.7 Inhibitionsmöglichkeiten der durch $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung geregelten TM-Kontraktion zur Therapie des Glaukoms**

In den letzten Kapiteln wurden die Hypothesen bestätigt, dass TM glattmuskuläre Kontraktionssysteme besitzt und diese durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung reguliert werden. Obwohl es weiterer Forschung bedarf, um detailliertere Kenntnisse der Vorgänge im TM zu erhalten, kann nun über eine mögliche pharmakologische Beeinflussung der Kontraktionsregelmechanismen zur Relaxation des TM und der damit einhergehenden IOD-Senkung zur Therapie des POWG nachgedacht werden.

Bisher konnte nicht bewiesen werden, ob der IOD-Erhöhung bei der natürlichen Entstehung des POWG, pathophysiologisch eine Tonuszunahme des TM zu Grunde liegt. Einige Befunde legen dies jedoch nahe: So haben Patienten mit Normaldruckglaukom signifikant höhere Endothelin-Plasmakonzentrationen gezeigt, als eine gesunde Kontrollgruppe (Sugiyama et al., 1995). Auch Radioimmunoessay-Messungen im Kammerwasser von Patienten, die sich einer Kataraktoperation unterzogen hatten, haben bei Patienten mit zusätzlichem POWG höhere Endothelinkonzentrationen nachgewiesen, als bei Patienten ohne POWG (Noske et al., 1997). Wie oben erwähnt, hat Endothelin, als eine der wenigen physiologisch vorkommenden Substanzen, den Kammerwasserausfluss in isolierten bovinen Augenvorderkammern reduziert (Wiederholt et al., 1995). So könnte man schließen, dass erhöhte Endothelinkonzentrationen in Plasma und Kammerwasser bei Glaukom, für eine Abflusswiderstandserhöhung des TM verantwortlich sein könnten. Allerdings waren die experimentellen Endothelinkonzentrationen im Modell mit perfundierten Augenvorderkammern um vielfaches höher als die ET-Konzentrationen im Kammerwasser von POWG-Patienten. Ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten ET-Konzentrationen bei POWG-Patienten und einer Tonuszunahme des TM ist also nicht eindeutig bewiesen.

Unabhängig davon, ob es einer Erhöhung des TM-Tonus bedarf, um die IOD-Erhöhung bei POWG hervorzurufen, ist gesichert, dass die Relaxation des TM zur Verbesserung des Kammerwasserabflusses führt: Im Experiment mit isolierten Augenvorderkammern des Affen hatte der PKC-Inhibitor H-7 eine Senkung des Abflusswiderstandes bewirkt (Tian et al., 1999) (vergl. Kap. 4.5.1). Im in vivo Experiment mit Kaninchen hatte die intrakamerale,

lokale und intravitreale Applikation des ROCK-Inhibitors Y-27632 zur IOD-Senkung und zur Kammerwasserabflussverbesserung geführt (Honjo et al., 2001) und entsprechendes war im ähnlichen Experiment mit Augen des Schweins zu beobachten gewesen (Rao et al., 2001) (vergl. Kap. 4.5.3.1). Alle Resultate sind nur durch eine Relaxation des TM zu erklären.

Soweit lassen sich folgende Forderungen an ein Pharmakon zur Senkung des IOD durch TM-Relaxation formulieren: Das Pharmakon sollte einen Mechanismus beeinflussen, der möglichst spezifisch das TM reguliert und im ZM keine bedeutende Rolle spielt. So würde sich die funktionell antagonistische Wirkung des ZM kaum oder gar nicht auswirken. Das Pharmakon sollte die Durchblutung der Sehnervenpapille verbessern, auf deren Gefäße also einen dilatierenden Effekt haben. Es sollte möglichst an Stellen der Signalkaskade eingreifen, die nahe den Effektorproteinen liegen, um so effektiv wie möglich die nach abwärts zusammenlaufende Summe aller auf das System wirkenden Einflüsse verändern zu können. Schließlich sollte das Pharmakon ausschließlich am Auge wirken und keine weiteren systemischen Effekte haben.

Der Mechanismus der Kontraktionsregulation durch  $Ca^{2+}$ -Sensitivierung scheint für die Beeinflussung durch ein Pharmakon geeignet, da er in ZM offenbar keine bedeutende Rolle spielt (vergl. Kap. 4.5.1). Seine Beteiligung an der Kontraktionsregulation in glatter Muskulatur und insbesondere in Gefäßmuskulatur ist bekannt. Dies gibt Anlass zu der Erwartung, dass Pharmaka, welche die Kontraktion durch  $Ca^{2+}$ -Sensitivierung beeinflussen und dadurch zur TM Relaxation führen, auch Gefäßmuskulatur relaxieren und Vasodilatation bewirken. Die Forderung, möglichst nahe der Effektorproteine einzugreifen, könnte erfüllt werden, indem Proteine wie Rho-A und ROCK als Target für einen Eingriff gewählt würden. Pharmaka wie der hochselektive ROCK-Inhibitor Y-27632 scheinen also für eine therapeutische IOD-Senkung prinzipiell in Frage zu kommen. Der relaxierende Effekt von Y-27632 namentlich auf Gefäßmuskulatur ist gut erforscht (Fu et al., 1998; Uehata et al., 1997b). Ob diese oder ähnlich wirkende andere Substanzen letztlich geeignet sind, müssen weitere Experimente klären. So bleibt offen, ob unerwünschte Wirkungen, wie z.B. Pupillenerweiterung (Honjo et al., 2001), vermieden oder toleriert werden können, ob das Pharmakon ungünstige systemische Wirkungen aufweist bzw. ob durch eine geeignete lokale Applikation solche umgangen werden könnten. Überdies könnten weitere anders wirkende Substanzen für die pharmakologische TM-Relaxation in Frage kommen, die z.B. durch Beeinflussung von Rezeptoren oder Kaliumkanälen wirksam werden (Thieme et al., 2001a; Thieme et al., 2001) oder  $ET_1$  antagonisieren. Letztere Wirkung könnte eventuell gleichzeitig an Sehnerv und Netzhaut Nutzen bringen, da Endothelin verdächtigt wird, bei Glaukom auf diesen Strukturen schädigende

Effekte zu ausüben (Orgul et al., 1996; Prasanna et al., 2002; Sugiyama et al., 1995; Yorio et al., 2002).

Über die Effektivität einer vollständigen Inhibition der auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung beruhenden Kontraktion des TM lässt sich noch keine genaue Prognose abgeben. Wie die Kontraktionsexperimente mit isolierten Gewebstreifen (s. Kap. 4.5.1) zeigten, existieren weitere Kontraktionsmechanismen z.B. mit Beteiligung extrazellulären Kalziums (Thieme et al., 2000). Es ist weitgehend unbekannt, ob und in welchem Maße die verschiedenen Kontraktionsmechanismen des TM aktiviert werden. Experimente mit glatter Muskulatur haben darauf hingewiesen, dass es die langsame, tonische Komponente carbacholinduzierter Kontraktion ist, die durch Inhibitoren der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung gehemmt wird (Fu et al., 1998; Himpens & Somlyo, 1988; Somlyo & Somlyo, 2000; Uehata et al., 1997). Auch die Kontraktionsexperimente mit TM (s. Kap. 4.5.1) haben gezeigt, dass die höchstwahrscheinlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung vermittelte Kontraktion, nur einen Anteil von ca. 16% der gesamten carbacholinduzierten Kontraktion ausmacht (Thieme et al., 2000). Möglicherweise, bewirkt die Inhibition der auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung beruhenden Regulationsmechanismen also nur eine sehr geringe Relaxation des TM. Dennoch bliebe die Aussicht, dass die langfristige Hemmung einer langsamen, tonischen Komponente der Kontraktion, das TM ausreichend relaxiert, um eine wesentliche Verbesserung des Kammerwasserabfluss zu erreichen und den IOD beim Glaukom entscheidend zu senken.

## 4.8 Zukünftige Experimente

Während in vielfältiger Weise sicher nachgewiesen werden konnte, dass das TM glattemuskuläre Kontraktionssysteme besitzt, bedarf es noch intensiver Forschung, um ein genaues Verständnis für die Funktion und die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Kontraktionsregulation durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivierung im TM zu gewinnen.

Weitere Proteine, die in anderen Geweben an diesem Regulationsmechanismus beteiligt sind, wie z.B. das  $\text{G}_{12/13}$ -Protein (Himpens et al., 1990) und die MLCP (Kimura et al., 1996; Zhou et al., 1999), müssten auch in TM molekularbiologisch nachgewiesen werden.

Nachdem in den Kontraktionsexperimenten dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass  $\text{ET}_1$ -induzierte TM-Kontraktionen offenbar über MLCK vermittelt werden, müsste als Äquivalent auf molekularbiologischer Ebene der Effekt von ET auf MLCK in einer Zunahme deren Phosphorylierungsgrades zum Ausdruck kommen. Entsprechend wäre von einer Western-Blot-Analyse auf Phosphoserine der MLCK zu erwarten, dass in TM-Zellen, die zuvor mit

ET<sub>1</sub> inkubiert wurden, höhere Signalintensitäten zu detektieren sind, als in Zellen ohne vorherige ET<sub>1</sub>-Stimulation. Versuchstechnisch wäre bei einem solchen Experiment allerdings fraglich, ob der Konzentrationsunterschied von Phosphoserin zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen für einen quantitativen Vergleich mittels Immunoblot ausreichen würde.

Kontraktionsexperimente mit isolierten TM- und ZM-Streifen müssten mit verschiedenen stimulierenden Substanzen und Inhibitoren durchgeführt werden, um genauer zu klären, welche Rezeptoren und Signaltransduktionswege an der Kontraktionsregulation durch Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung beteiligt sind. Dabei wären folgende Fragen zu beantworten:

In welchem Maße werden ET<sub>1</sub>-induzierte TM-Kontraktionen durch Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung vermittelt und wie ausgeprägt ist dabei die Hemmbarkeit durch Substanzen wie Y-27632 ? Ist das G<sub>12/13</sub>-Protein ähnlich wie in glatter Muskulatur (Hart et al., 1998; Himpens et al., 1990; Kozasa et al., 1998) an der Kontraktionsvermittlung durch Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung beteiligt? Das Thromboxanrezeptor-Mimetikum U-46619, das G<sub>12/13</sub>-Protein-vermittelt zur Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung in glatter Muskulatur führt (Hart et al., 1998; Himpens et al., 1990; Kozasa et al., 1998), hat auch Kontraktionen des TM ausgelöst (Krauss et al., 1997). Es wäre zu prüfen, ob diese durch Y-27632 zu inhibieren sind, um zu klären, ob Prostaglandine oder Thromboxane, ähnlich wie in glatter Muskulatur (Pang & Yorio, 1997), zur Induktion der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung führen. Gibt es weitere Rezeptoren, welche die Signaltransduktionskaskade der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung initiieren? Gibt es wirksame Antagonisten solcher Rezeptoren, die eventuell pharmakologisch einsetzbar wären ?

Sollten sich solche Fragen durch weitere Forschungsergebnisse beantworten lassen und weitere Evidenz dafür bieten, dass Ca<sup>2+</sup>-Sensitivierung bei der Trabekelwerkskontraktion eine Rolle spielt und ohne Einfluss auf den ZM inhibiert werden kann, so werden In-vivo-Experimente mit ausgewählten Pharmaka weitere Erkenntnisse darüber bringen, ob mit ihnen tatsächlich eine überlegene Alternative zur gegenwärtigen POWG-Therapie erzielt werden kann.