

## **4 Diskussion**

Es ist erwiesen, dass PG-Analoga den uveoskleralen Abfluss des Kammerwassers verbessern [61-65]. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob PGF-2- $\alpha$  auch den konventionellen Weg des Kammerwassers beeinflusst, an dem das TM durch seine Kontraktilität maßgeblich beteiligt ist.

Die Kontraktionsexperimente haben gezeigt, dass PGF-2- $\alpha$  die ET-1-induzierte Kontraktion inhibierte. Untersuchungen mit FP-Rezeptor-Antagonisten haben erwiesen, dass die PGF-2- $\alpha$ -vermittelte Hemmung der ET-1-induzierten Kontraktion blockiert wurde, wodurch belegt werden konnte, dass PGF-2- $\alpha$  seine Wirkung durch Bindung an den FP-Rezeptor vermittelt.

PGF-2- $\alpha$  allein war nicht befähigt, eine Kontraktion am TM auszulösen, ebenso hatte es keinen Einfluss auf die Carbachol-induzierte Kontraktion.

Calciummessungen haben gezeigt, dass ET-1 an BTM- und HTM-Zellen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkte, dieser Effekt konnte durch Zugabe von PGF-2- $\alpha$  inhibiert werden. PGF-2- $\alpha$  allein führte an BTM- und HTM-Zellen nicht zu einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration.

### **4.1 Effekt von PGF-2- $\alpha$ auf die Kontraktilität von bovinem TM**

#### **4.1.1 Einfluss von PGF-2- $\alpha$ auf die TM-Kontraktilität**

Unsere Experimente haben gezeigt, dass PGF-2- $\alpha$  am TM keine Kontraktion auslöste.

Experimente anderer Arbeitsgruppen belegten, dass die Aktivierung des FP-Rezeptors durch PGF-2- $\alpha$  eine Kontraktion der Irismuskulatur bei Hunden, Rindern und Katzen auslöste [75-77].

Es ist erwiesen, dass PGF-2- $\alpha$  zum größten Teil an FP-Rezeptoren bindet. Die dadurch aktivierten G-Proteine, stimulieren nun ihrerseits die Phospholipase C, wobei dann die second messenger Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP3) entstehen, welche eine Muskelkontraktion auslösen. Bekanntermaßen ist PGF-2- $\alpha$  kein selektiver FP-Rezeptor-Agonist [78]. Es besteht die Möglichkeit, dass PGF-2- $\alpha$  am TM auch an andere PG-Rezeptoren (z.B. EP-Rezeptoren) bindet, von denen bekannt ist, dass sie durch Bindung anderer PG eine Relaxation des TM auslösen. Wenn nun PGF-2- $\alpha$  am TM zu gleichen Anteilen an Rezeptoren bindet, die eine Muskelkontraktion oder eine Relaxation bedingen, würden sich die genannten Effekte gegenseitig aufheben, so dass keine Veränderung der TM-Kontraktibilität nachweisbar ist.

Ferner ist auch denkbar, dass die FP-Rezeptordichte am TM zu gering ist, um eine Kontraktion auszulösen. Eine andere Erklärung wäre die Verteilung der beiden FP-Rezeptor-Isoformen FPA- und FPB, es liegt die Vermutung nahe, dass beide Isoformen unterschiedliche Signaltransduktionswege auslösen, wodurch eine Relaxation durch den einen und Kontraktion durch den anderen Rezeptor resultiert. Demzufolge heben sich beide Effekte auf und am Gewebe wird keine Reaktion registriert.

Es ist denkbar, dass PGF-2- $\alpha$  an der glatten Irismuskulatur stärker als am TM an FP-Rezeptoren bindet. Dann könnte die Affinität zu EP-Rezeptoren geringer sein, wodurch eine Muskelkontraktion resultiert. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die FP-Rezeptordichte an der Irismuskulatur stärker als jene am TM ist oder die Verteilung der Isoformen gegenüber dem TM verändert ist. Wie schon beschrieben, resultiert die Vermutung, FP-Rezeptor-Isoformen lösen unterschiedliche Signaltransduktionswege aus, wodurch eine Relaxation durch den einen und eine Kontraktion durch den anderen Rezeptor resultiert. Ein Überwiegen der einen Isoform an der Irismuskulatur ermöglicht so eventuell die Auslösung des Signaltransduktionsweges, bei dem eine Muskelkontraktion induziert wird.

Bisher konnten zwei FP-Rezeptor-Subtypen (FPA, FPB) identifiziert werden [79], an denen PG, wie PGF-2- $\alpha$  oder Latanoprost binden und ihre Wirkung entfalten. FP-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Gq-Familie. Wird die Phospholipase C nach entsprechender G-Protein-Aktivierung stimuliert, entstehen die second messenger DAG

und IP3 [80-82]. IP3 bewirkt eine Freilassung des intrazellulären Calciums. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Außerdem kann es, bedingt durch den FP-Rezeptor, zu einer Reduktion des cAMP kommen.

PGF-2- $\alpha$  bindet mit geringer Affinität auch an EP1- und EP3-Rezeptoren [83]. Dadurch kommt es zur Aktivierung von G-Proteinen und zur Stimulierung der Adenylatzyklase. FPA und FPB-Rezeptoren konnten in vielen Geweben des Auges nachgewiesen werden, so in der Iris, im CM und in der Sklera [84], aber nur die FPA-Isoform wurde im TM isoliert [85]. Die beiden FP-Rezeptoren unterscheiden sich lediglich durch ihre Carboxyl-Enden, diese sind in den ersten neun Aminosäuren identisch. Im Gegensatz zum FPB-Rezeptor enthält der FPA-Rezeptor an den nächsten 46 Aminosäuren ebenfalls Carboxylgruppen, die wahrscheinlich für die Phosphorylierung in der Signaltransduktion verantwortlich sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I die durch PGF-2- $\alpha$  induzierte, PKC abhängige, Phosphorylierung verminderte, wenn an Zellen der FPA-Rezeptor exprimiert war. Dieser Effekt konnte jedoch nicht an Zellen nachgewiesen werden, die den FPB-Rezeptor exprimieren [86]. Diese Tatsache bestätigt, dass die PKC-abhängige Phosphorylierung für Regulationen verantwortlich ist, die durch den FPA-Rezeptor vermittelt werden.

#### **4.1.2 Einfluss von PGF-2- $\alpha$ auf die ET-1-induzierte Kontraktion**

PGF-2- $\alpha$  löste am TM keine Kontraktion aus, aber es inhibierte die ET-1-induzierte Kontraktion. Es wurde gezeigt, dass die FP-Rezeptor-Antagonisten PGF-2- $\alpha$ -Amin/Amid die hemmende Wirkung von PGF-2- $\alpha$  auf die ET-1-Kontraktion durch Rezeptorblockade aufhoben. Damit konnte belegt werden, dass PGF-2- $\alpha$  seine Wirkung über den FP-Rezeptor entfaltet. Die Wirkung von PGF-2- $\alpha$  kann einmal auf der Ebene des beteiligten ET-1-Rezeptors als auch in jedem Bereich des intrazellulären Signaltransduktionsweges stattfinden.

Eine Möglichkeit wäre, dass PGF-2- $\alpha$ , vermittelt durch den FP-Rezeptor, eine heterologe Desensitivierung des ET-1-Rezeptors induziert. Man unterscheidet zwischen homologer

und heterologer Desensitivierung. Die homologe Desensitivierung betrifft nur den aktivierten Rezeptor, so dass nach seiner Stimulation die zelluläre Antwort vermindert wird. Bei der heterologen Desensitivierung ist aufgrund der Beteiligung von Mediatoren des Signaltransduktionssystems auch der Effekt, der über andere Rezeptoren vermittelt wird, beeinträchtigt.

Eine heterologe Rezeptordesensitivierung wurde bereits in anderen Instituten durch unterschiedliche Substanzen beschrieben. Es konnte beispielsweise eine ATP- und TNF- $\alpha$ -induzierte heterologe Rezeptordesensitivierung belegt werden, wodurch die ET-1-vermittelten Effekte vermindert wurden [88, 89]. Möglicherweise zeigt PGF-2- $\alpha$  ähnliche Effekte, in Folge dessen kann ET-1 seine Wirkung nicht entfalten und die ET-1-vermittelte Kontraktion wird abgeschwächt.

Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass es durch PGF-2- $\alpha$  zu einer Rezeptorblockade des ET-1 Rezeptors kommt.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die durch PGF-2- $\alpha$ - und ET-1-aktivierten Signalwege interagieren, so dass eine Hemmung des ET-1-Effektes resultiert. Auf welcher Ebene diese Interaktion stattfinden könnte, kann auf Grund unserer Experimente nicht vorausgesagt werden. Unsere Daten zeigen, dass eine Verminderung der ET-1-induzierten intrazellulären Calciumfreisetzung durch PGF-2- $\alpha$  resultiert.

#### **4.1.3 Effekt von PGF-2- $\alpha$ auf die Carbachol-induzierte Kontraktion**

Im Gegensatz zu ET-1 konnte PGF-2- $\alpha$  die Carbachol-induzierte Kontraktion nicht inhibieren.

Carbachol entfaltet seine Wirkung durch Bindung an muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren. Die fehlende Wirkung von PGF-2- $\alpha$  auf die Carbachol-induzierte Kontraktion lässt vermuten, dass es im Unterschied zu ET-1 nicht zu einem Überschneiden der Signaltransduktionswege von FP- und muskarinergem Rezeptor kommt.

#### **4.1.3.1 Der muskarinerge Rezeptor**

Bisher sind 5 muskarinerge Rezeptorsubtypen bekannt (M1-M5), welche von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Sie gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus 7  $\alpha$ -Helix transmembranären Domänen, welche durch jeweils 4 intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind.

M1, 3 und 5 sind Gq-Protein gekoppelt, wodurch die Phospholipase C stimuliert wird und nachfolgend die second messenger DAG und IP3 entstehen. M2 und M4 binden an Gi-Proteine, wodurch die Adenylatzyklase inhibiert wird. Andererseits kann ein Rezeptorsubtyp sowohl in unterschiedlichen Zellen als auch innerhalb einer Zelle verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren. Im TM werden die Rezeptor-Subtypen M1, M2 und M3 exprimiert und sind bei der Kontraktion dieses Gewebes involviert.

## **4.2 Signaltransduktionswege der Rezeptoren**

Es ist bekannt, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine große Rolle in Geweben des Auges spielen. Diese Rezeptoren sind Ziel therapeutischer Ansätze bei Erkrankungen des Auges. Um die Tränenflüssigkeit zu beeinflussen oder beim Glaukom den Augeninnendruck zu senken, sind muskarinerge Rezeptoren mögliche Therapieansätze.

Es existieren unterschiedliche G-Protein-Subtypen, welche mit verschiedenen Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben gekoppelt sind. Bei Stimulation der G-Proteine durch entsprechende Rezeptoren, kann es zur Aktivierung von Calciumsignalen kommen. Calcium ist verantwortlich für viele Zellfunktionen. Veränderungen des zellulären Zustandes werden durch spezifische Änderungen der intrazellulären Signalmoleküle erreicht, den sogenannten second messengern. In Ruhe haben Zellen eine relativ niedrige zytosolische Calciumkonzentration, die durch Rezeptorstimulation um das 10fache ansteigen kann [90]. Die Fähigkeit des intrazellulären Calciums, mit anderen Signalwegen zu agieren, führt zu einem flexiblen und hochentwickelten Netzwerk [91]. Wenn die Zelle die Fähigkeit verliert, die Signaltransduktion zu kontrollieren, könnten daraus bestimmte

Erkrankungen resultieren [90]. Die Konzentration von freien Ca-Ionen im Zytosol ist mit ( $10^{-7}$  M) im Vergleich zur extrazellulären Flüssigkeit mit ca. ( $10^{-3}$  M) sehr niedrig. Dieses Konzentrationsgefälle hält die Zelle auf mehreren Wegen aufrecht. Alle Eukaryontenzellen besitzen auf der Plasmamembran eine Ca-ATPase, die durch Hydrolyse von ATP Ca-Ionen aktiv aus der Zelle pumpt. Muskel- und Nervenzellen verfügen zusätzlich über ein Na/Ca-Antiportsystem. Dabei treibt der Na-Einstrom in die Zelle die Ca-Ausschleusung an. Außerdem pumpt eine zweite Ca-ATPase Ca-Ionen aus dem Zytosol in das Endoplasmatische oder Sarkoplasmatische Retikulum. Dort wird Ca von einem Ca-bindenden Protein (Calsequestrin) gespeichert. Bei sehr hohen zytosolischen Ca-Konzentrationen, z.B. nach Verletzung der Zelle, transportiert eine Ca-Pumpe der inneren Mitochondrienmembran Ca in die Matrix. Das Enzym nutzt dazu den Protonengradienten der Atmungskette. Intrazelluläre Calciumsignale werden durch Oberflächenrezeptoren (G-Proteine) getriggert, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind, an diese binden extrazellulär Hormone oder Neurotransmitter.

G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (alpha, beta, gamma). In der inaktiven Form bindet die alpha Untereinheit ein GDP, der aktivierte Wirkstoff-Rezeptor-Komplex bewirkt einen Austausch dieses GDP gegen GTP. Die gamma-Untereinheit löst sich, diffundiert mit GTP und aktiviert die Phospholipase C ( $PLC\beta$ ), welche die Esterbindung des Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) hydrolysiert. Dieses Lipid der Plasmamembran wird durch Phosphorylierung des Phosphatidylinositols (PI) erzeugt. Die häufigsten Fettsäuren des PIP<sub>2</sub> sind Stearat und Arachidonat. Dabei entstehen die second messenger DAG und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> aktiviert dann den IP<sub>3</sub> Rezeptor, der in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Calciumkanäle werden geöffnet und Calcium wird ins Zytoplasma freigesetzt, wodurch die zytosolische Ca-Konzentration sprunghaft um den Faktor 10 ansteigen kann. Calcium kann auch aus dem ER durch Ryanodin-Rezeptoren freigesetzt werden. Vielfältige Prozesse werden ausgelöst, wie die Kontraktion der glatten Muskulatur, es kommt zur Aktivierung von Calmodulin, das an die MLCK bindet. Diese Kinase katalysiert die Phosphorylierung des Myosins und erleichtert damit die Aktin-Myosin-Interaktion.

Ca-Ionen bewirken vermutlich auch die Translokation der inaktiven PKC aus dem Zytosol an die Plasmamembran, dort wird die PKC von DAG, welches in der Plasmamembran

diffundiert, aktiviert. Es kommt zur Phosphorylierung von zellulären Proteinen, wodurch eine Vasokonstriktion ausgelöst wird. Zur Desensibilisierung des hormonellen Reizes wird DAG schließlich am C3 zu Phosphatidat phosphoryliert. Damit wird zugleich die Resynthese von PIP<sub>2</sub> über CDP-Diacylglycerin eingeleitet. IP<sub>3</sub> wird von einer Phosphatase zu Inositol-1,4-Bisphosphat hydrolysiert. Es kann allerdings auch zu Inositol-1, 3, 4, 5-tetrakisphosphat (IP<sub>4</sub>) umgesetzt werden. Man vermutet hier weiterreichende Messenger-Funktionen. Beim Abbau von IP<sub>4</sub> entsteht 1, 3, 4-IP<sub>3</sub>, das von einer Phosphatase zu 3, 4-IP<sub>2</sub> hydrolysiert wird [92].

Im TM wurden G-Protein gekoppelte  $\alpha$ 2-adrenerge,  $\beta$ -adrenerge, cholinerge (M1-M3), ET-1 und FP-Rezeptoren nachgewiesen. Das könnte bedeuten, dass diese Einfluss auf den Kammerwasserabfluss haben. Eventuell stimulieren die genannten Rezeptoren unterschiedliche G-Protein gekoppelte Subtypen, wodurch verschiedene Effekte erzielt werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass PGF-2- $\alpha$  Einfluss auf den Rezeptor und/oder den Signaltransduktionsweg von ET-1 hat, während der des Carbachol unberührt bleibt. Dies lässt sich mit den Versuchsergebnissen / -erkenntnissen (vgl. 4.1.2 und 4.1.3) dieser Arbeit begründen.

### **4.3 Einfluss von PGF-2- $\alpha$ auf den ET-1-induzierten Calciumanstieg**

#### **4.3.1 Wirkung von PGF-2- $\alpha$ auf die intrazelluläre Calciumkonzentration**

An kultivierten BTM-Zellen wurde unter Ruhebedingungen eine intrazelluläre Calciumkonzentration von  $89,4 \pm 14,0$  nM und an kultivierten HTM-Zellen eine intrazelluläre Calciumkonzentration von  $88,2 \pm 14,8$  nM gemessen. Diese Messungen stimmen mit denen anderer Institute überein.

Calciummessungen an HTM- und BTM-Zellen erwiesen, dass durch PGF-2- $\alpha$  keine Veränderung der Calciumkonzentration auszulösen war. Das steht im Gegensatz zu dem,

was andere Institute gefunden haben, diese zeigten, dass andere FP-Rezeptoragonisten, wie Travoprost oder Unoproston, zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führten. Gleichzeitig wurde die IP<sub>3</sub>-Produktion an HTM-Zellen gemessen, welche durch Bindung von PG an den FP-Rezeptor stimuliert wird. Es wurde eine Erhöhung von IP<sub>3</sub> ermittelt, wobei jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen FP-Agonisten existieren (Travoprost > Cloprostenol > Fluprostenol > Latanoprost > Bimatoprost) [93].

Erklärungen dafür könnten in der Rezeptorspezifität der einzelnen PG liegen, denn PGF-2- $\alpha$  ist kein selektiver FP-Rezeptoragonist. Dieses bindet auch an EP<sub>1</sub>- und EP<sub>3</sub>-Rezeptoren, wodurch die Adenylatzyklase aktiviert wird, dadurch kommt es nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Travoprost hat die größte Selektivität und Affinität zum FP-Rezeptor, eine geringe Affinität konnte auch für den DP-, IP-, TP-, EP<sub>3</sub>- und EP<sub>4</sub>-Rezeptor beschrieben werden [60]. Latanoprost zeigt eine relativ hohe Affinität für den FP-Rezeptor, es bindet jedoch auch an den EP<sub>1</sub>-Rezeptor [60]. Bimatoprost weist eine geringere Selektivität, aber hohe Affinität zum beschriebenen Rezeptor auf, es bindet auch an EP<sub>1</sub>- und EP<sub>3</sub>-Rezeptoren.

#### **4.3.2 Effekt von ET-1 auf die intrazelluläre Calciumkonzentration**

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass ET-1 zu einem Anstieg der Calciumkonzentration führte. Vorherige Calciummessungen mit ET-1-Rezeptorantagonisten haben erwiesen, dass an diesem Ca-Anstieg im TM zum größten Teil der ETA-Rezeptor beteiligt ist [94].

Die Bindung von ET-1 an den ETA-Rezeptor erfolgt G-Protein gekoppelt, wodurch die Phospholipase C stimuliert wird. Dabei entstehen die second messenger DAG und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> führt zu einer Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels, wie unsere wissenschaftlichen Nachweise belegten.

Patch clamp-Experimente am TM haben gezeigt, dass ET-1 keinen Effekt auf die L-Typ-Calcium-Kanäle aufzeigte, die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ist daher unabhängig von den L-Typ-Calciumkanälen [95].

#### **4.3.3 Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration bei Zugabe von PGF-2- $\alpha$**

Wie oben erläutert, führt ET-1 zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Diese konnte nach Vorinkubation mit PGF-2- $\alpha$  inhibiert werden. Möglicherweise interagiert PGF-2- $\alpha$  mit einem Signalweg, der zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt, wodurch es zur Hemmung der ET-1 vermittelten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt.

Wie bereits beschrieben, besteht die Möglichkeit einer Rezeptordesensibilisierung durch PGF-2- $\alpha$ , wodurch der Effekt von ET-1 an dem entsprechenden Rezeptor abgeschwächt wird. Damit würde auch die ET-1 induzierte Signaltransduktion gehemmt werden, wodurch dann der intrazelluläre Calciumanstieg beeinflusst wird.

#### **4.4 Kontraktionsformen am TM**

In bisherigen Ergebnissen zeigte sich, dass PGF-2- $\alpha$  die ET-1-induzierte Kontraktion durch Inhibition des intrazellulären Calciumanstiegs blockiert.

Neben dieser Calcium-abhängigen Kontraktion wurde am TM eine Calcium-unabhängige Kontraktion nachgewiesen [96], für ET-1 konnte sowohl eine Calcium-abhängige als auch eine Calcium-unabhängige Kontraktion belegt werden [97]. Ob PGF-2- $\alpha$  Einfluss auf die Calcium-unabhängige ET-1 Kontraktion hat, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

#### 4.4.1 Signaltransduktion über Rho-A (Calcium-unabhängiger Weg)

Verschiedene Agonisten an Zellmembranrezeptoren aktivieren über die  $\alpha$ -Untereinheit des rezeptorgekoppelten  $G_{12/13}$ -Proteins die GTPase Rho-A. Diese liegt zuvor komplexiert mit Guanine Nucleotide Diphosphat (GDP) und Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor vor und wird, vermittelt durch Guanine Nucleotide Exchange Factors, die mit der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins assoziiert sind, aktiviert. Dabei wird GDP gegen GTP ausgetauscht [98]. Der Rho-A-GTP-Komplex aktiviert die Rho-Kinase. Diese ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche ihrerseits die regulatorische Untereinheit der Myosin-Light-Chain-Phosphatase phosphoryliert. Diese ist im phosphorylierten Zustand inaktiv und kann ihre Funktion, regulatorische Leichtketten des Kontraktionsproteins Myosin zu dephosphorylieren, nicht ausüben [98]. An Serin 19 phosphorylierte Myosinleichtketten führen zur Interaktion mit Aktin und zur Kontraktion. Während die Kontraktion im oben erwähnten elektromechanischen Vorgang durch Calciumspiegelanstieg und MLCK vermittelt wird, führt hier allein die Hemmung der Dephosphorylierung ohne einen Calciumspiegelanstieg zur Kontraktion. Durch die ausbleibende Dephosphorylierung werden die Myosinleichtketten empfindlicher für das zur Kontraktion erforderliche Calcium, man spricht daher von der so genannten Calcium-Sensitivierung.

Am TM konnte gezeigt werden, dass der calciumfreie Signalweg durch muskarinerge Agonisten und durch ET aktiviert wird und zahlreiche Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention bietet. Außerdem wurde eine Inhibition der Calcium-unabhängigen Kontraktion im TM durch den Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 beschrieben [99]. In Tierversuchen wurde ein erhöhter Kammerwasserabfluss und eine Reduktion des IOD durch Y-27632 erreicht [100, 101], was eine mögliche Beteiligung dieses Signalweges an der Regulation des Augeninnendruckes zeigt.

#### 4.4.2 Effekte der PKC am TM

Die PKC gehört zur Familie der zytosolischen Serin-Threonin-Kinasen. Sie phosphoryliert Proteine, wodurch eine Muskelkontraktion resultiert. Bisher wurden 10 Isoformen identifiziert. Diese werden noch einmal in drei Gruppen unterteilt:

1: calciumabhängige Isoformen =  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ , 2: calciumunabhängige Unterformen =  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ , 3: atypische Isoformen =  $\lambda$ ,  $\xi$

Die PKC-Isoformen sind an diversen zellulären Funktionen beteiligt. Es wird postuliert, dass sie auch bei der Kontraktion der glatten Muskulatur eine Rolle spielen [27]. Die  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\varepsilon$ , und  $\xi$ -Isoformen konnten in Geweben mit glatter Muskulatur nachgewiesen werden. Die Calcium unabhängige Unterform  $\varepsilon$  wurde hauptsächlich im TM dokumentiert [96]. Angenommen werden kann, dass die PKC an der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt ist. Die PKC spielt im TM bei der Vermittlung von Kontraktionen eine Rolle, die von Veränderungen des intrazellulären Calciumspiegels unabhängig sind [102], diesen Befunden müssen also Kontraktionsmechanismen zu Grunde liegen, die über die PKC vermittelt werden und unabhängig von Calciumspiegelveränderungen arbeiten. Anzunehmen ist, dass es sich dabei um Regulationsmechanismen handelt, die auf Calcium-Sensitivierung basieren. Experimente machten deutlich, dass PKC-Inhibitoren, wie Chelerythrine, H7, oder NPC15437 zu einer Relaxation des TM führten [103].

Aufgrund unserer Ergebnisse kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob PGF-2- $\alpha$  auch in diese Signalwege eingreift oder ob allein die Reduktion des ET-1-induzierten intrazellulären Ca-Anstiegs durch PGF-2- $\alpha$  für die Abschwächung der Kontraktion verantwortlich ist.

## 4.5 Die Bedeutung von ET-1 beim Glaukom

### 4.5.1 Endotheline

Im Jahr 1988 beschrieben Yanagisawa und Kollegen die Klonierung eines vasokonstriktiven Peptids, das zunächst aus dem Kulturmedium isolierter Schweineaortazellen isoliert worden war. Sie nannten das Peptid ET [28]. Es ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Bisher sind drei Subtypen bekannt, ET-1, -2 und -3, die sich nur durch geringfügige Änderungen der Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden [29]. Sie besitzen zwei Disulfidbrücken (Cys1-Cys15 und Cys3-Cys11) am N-terminalen Ende sowie ein hydrophobes C-terminales Ende mit der Aminosäure Tryptophan an Position 21. Die Struktur des N-terminalen Endes bestimmt die Affinität zum Rezeptor. Die ET-Isoformen werden in den verschiedensten Geweben und von den unterschiedlichsten Zelltypen produziert: ET-1: alle Endothelien, Ziliarkörper, Kammerwasser, Makrophagen, Keratinozyten, Kardiomyozyten, Mesangiumzellen [104], ET-2: Darm, Skelettmuskelzellen, Magen, ET-3: Darm, Lunge, Gehirn. Nur ET-1 wurde in Endothelzellen von Gefäßen entdeckt.

Endotheline werden aus größeren Peptiden (Präproendotheline), bestehend aus 160-238 Aminosäuren, gebildet. Dabei entstehen durch die Einwirkung einer Endopeptidase zunächst biologisch inaktive Vorstufen (big Endothelin-1, -2, -3), welche 37-41 Aminosäuren beinhalten, die dann durch spezifische Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) zu den wirksamen Endprodukten umgewandelt werden [105]. Bisher sind ECE Typ 1, 2 und 3 bekannt. Sie gehören in die Gruppe der Metalloproteasen. Gegenstand der Forschung sind spezifische ECE-Hemmer, um therapeutisch den ET-1 Spiegel zu senken, der bei zahlreichen Erkrankungen eine Rolle spielt.

Erhöhtes LDL-Cholesterin, Hypoxie, die calciumabhängige PKC, TNF-alpha, IL1, erhöhter Blutzucker, Östrogenmangel und proagulatorische Stoffe wie Thrombin stimulieren die Synthese von ET. Zu den Hemmstoffen der ET-Synthese gehören NO [106], Prostazyklin, atriales natriuretisches Peptid, Heparin und Östrogene. PKC-Inhibitoren reduzieren ebenfalls die ET-1 Freisetzung [107].



kontrovers diskutiert. Dieser wurde bisher nur in Xenopus-Arten nachgewiesen und bindet vor allem ET-3 [110, 111].

ETA-Rezeptoren finden sich hauptsächlich auf glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten und vermitteln kontraktile Effekte [32]. Sie binden ET-1 > ET-2 > ET-3. Die Affinität für ET-1 ist 1000fach höher als die für ET-3 [112]. ETB-Rezeptoren werden hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert und stimulieren die NO-Bildung (ETB1) [33], auf glatten Muskelzellen kommen sie jedoch auch vor, wo sie eine Kontraktion auslösen (ETB2) [34-37]. Sie binden ET-1, -2, -3 gleichermaßen [113]. Die ET-Rezeptoren gehören zur Gruppe der siebenfach gefalteten Transmembran-Rezeptorproteine. Die Rezeptortypen sind G-Protein gekoppelt. Durch die Bindung von ET an die entsprechenden Rezeptoren werden G-Proteine aktiviert, nachfolgend die Phospholipase C stimuliert. Über ETA- und ETB2-Rezeptoren werden die second messenger DAG und IP3 aktiviert, wodurch eine Muskelkontraktion ausgelöst wird [114-118]. Im Gefäßendothel aktiviert ET die Synthese von NO (über ETB1-Rezeptoren). NO führt dann durch Hemmung des Calciumeinstroms zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur [119]. In der Fachliteratur wird berichtet, dass ET über den ETB1-Rezeptor G-Proteine aktiviert, die dann die Adenylatzyklase stimulieren. Diese Effekte, verbunden mit einem erhöhtem cAMP-Spiegel, wurden im CM von Kaninchen und der Irismuskulatur von Rindern nachgewiesen [120].

Es wird vermutet, dass geringe Dosen an ET-1 die Endothelzellen zur Freilassung von NO stimulieren und höher verabreichte Dosen an ET-1 befähigt sind, Endothelzellen zu passieren, um an glatten Muskelzellen direkt eine Kontraktion zu bewirken [121]. Der vasodilatatorische Effekt des ETA/ ETB-Antagonisten verhält sich umgekehrt zur NO-Verfügbarkeit. Je niedriger die NO-Konzentration, desto stärker ist die Vasodilatation ausgeprägt, die durch ET-Antagonisten erreicht werden kann. Alle drei Endotheline sind starke Vasokonstriktoren, die stärkste pressorische Wirkung geht von ET-1 aus und wird über glattmuskuläre ETA-Rezeptoren vermittelt. Seine vasokonstriktorische Wirkung ist 10 fach größer im Vergleich zu Angiotensin II. Darüber hinaus weisen Endotheline, insbesondere ET-1, noch weitere Effekte auf, die zu einer blutdrucksteigenden Wirkung beitragen. Hierzu zählen im Wesentlichen die Freisetzung von Aldosteron, die Beeinträchtigung der glomerulären Filtration und die Potenzierung der Wirkungen von Noradrenalin, welches seinerseits die Bildung von Endothelinen fördert. Es existiert eine

Reihe von Untersuchungen, die eine Beteiligung des ET-Systems an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen wahrscheinlich machen. Dazu zählen Zustand nach Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Störungen der Nierenfunktion, Asthma, pulmonale Hypertonie, Präeklampsie und Vasospasmen nach Subarachnoidalblutungen [122]. Bosentan ist die erste in Deutschland zugelassene Wirksubstanz, die das ET-System direkt durch kompetitiven, unselektiven Antagonismus an ET-Rezeptoren beeinflusst. Es wird bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie verabreicht.

### **4.5.3 Endothelin-1-Effekte im Auge**

Es konnte gezeigt werden, dass ET-1 im vorderen Bereich des Auges Effekte verursacht, die den Kammerwasserabfluss verbessern [45]. Es hemmt, vermittelt durch den ETB-Rezeptor, die Na-K-ATPase im Ziliarepithel [105], diese ist ein Enzym der Kammerwasserformation und verändert das intra- und interzelluläre Volumen [123, 124]. Im Kaninchen konnte eine ET-1-induzierte Senkung des IOD nachgewiesen werden, welche durch den ETB1-Rezeptor vermittelt wird [125].

Im hinteren Bereich des Auges zeigt ET-1 pathophysiologische Auswirkungen. Es senkt den Blutfluss retinaler und Sehnerv versorgender Gefäße, wodurch es zur Schädigung des Sehnervs und retinaler Ganglienzellen kommt, was bei Glaukompatienten sehr häufig gesehen wird [43-47]. Der choroidale Blutfluss wird nicht so stark vermindert, vermutlich reagieren die Gefäße verstärkt auf NO, vermittelt durch den ETB1-Rezeptor [126]. ET-1 stimuliert, vor allem unter ischämischen Bedingungen, die Astrozytenproliferation [127] und verlängert den axonalen Transport im Sehnerven [48]. Außerdem zeigten Experimente an Kaninchen, dass verabreichtes ET-1 ein Axonverlust sowie eine Demyelinisierung der überlebenden Axone auslöste [128]. ET-1 setzt auch neurotoxische Substanzen frei. Es aktiviert calciumabhängig über den ETB1-Rezeptor die endotheliale NO-Synthetase, wodurch es zur vermehrten NO-Produktion kommt [119], NO stimuliert dann die Guanylatzyklase, durch die dann über mehrere Zwischenschritte eine Vasodilatation resultiert. NO reagiert mit freien Radikalen, es kommt zur Schädigung des Nervus opticus und von retinalen Ganglienzellen [129].

Der ETA-Rezeptor wurde vor allem in choroidalen und retinalen Blutgefäßen dokumentiert, während der ETB-Rezeptor in neuronalen und glialen Nervenzellen der Retina aufgefunden wurde [130]. Im TM und CM wurden beide Rezeptoren nachgewiesen [39]. Es wird angenommen, dass bei Glaukopatienten der kontraktile Effekt von ET-1 am TM überwiegt, wodurch der IOD steigt. Kontraktionsexperimente mit ET-1-Rezeptorblockern wiesen nach, dass die ET-1-induzierte Kontraktion am TM durch den ETA-Rezeptor vermittelt wird. Der ETB-Rezeptor scheint keine entscheidende Rolle bei der ET-1-vermittelten Kontraktion zu spielen, obwohl dieser im TM nachgewiesen werden konnte [94]. Kontraktionsexperimente und Calciummessungen zeigten einen PGF-2- $\alpha$ -induzierten Endothelin-Antagonismus, wobei vermutet wird, dass PGF-2- $\alpha$  den ETA-Rezeptor-vermittelten Signalweg von ET-1 inhibiert. Hierdurch wurde erwiesen, dass die Kontraktilität am TM durch PG beeinflussbar ist.

#### **4.6 Wirkung der PG-Analoga beim Glaukom**

Es ist bekannt, dass PG zu einer verstärkten Biosynthese bestimmter Metalloproteinasen in den extrazellulären Räumen des CM, der Iris und der Sklera führen. Dadurch kommt es zu einer Verminderung der extrazellulären Matrix innerhalb des CM, der Iris und der Sklera. Ein verbesserter uveoskleraler Abfluss wird vermutet. Es ist bei den vorbeschriebenen Prozessen einleuchtend, dass hierfür ein großes Zeitfenster zur Verfügung stehen muss. Dies bedeutet, der Wirkungseintritt nach Applikation sollte eigentlich Tage bis Wochen betragen, bis der Kollagenabbau stattgefunden hat. Es kommt jedoch zu einer schnellen Senkung des IOD, denn die Medikamente haben einen relativ raschen Wirkungseintritt von wenigen Stunden. Es ist davon auszugehen, dass diese Medikamente auch am konventionellen Abfluss angreifen. Diese Arbeit belegt einen Endothelin-Antagonismus durch PGF-2- $\alpha$  [131]. Dies zeigt, dass die Kontraktilität am TM durch PG beeinflusst wird, was eine bedeutende Rolle bei dem konventionellen Weg des Kammerwasserabflusses spielen könnte.

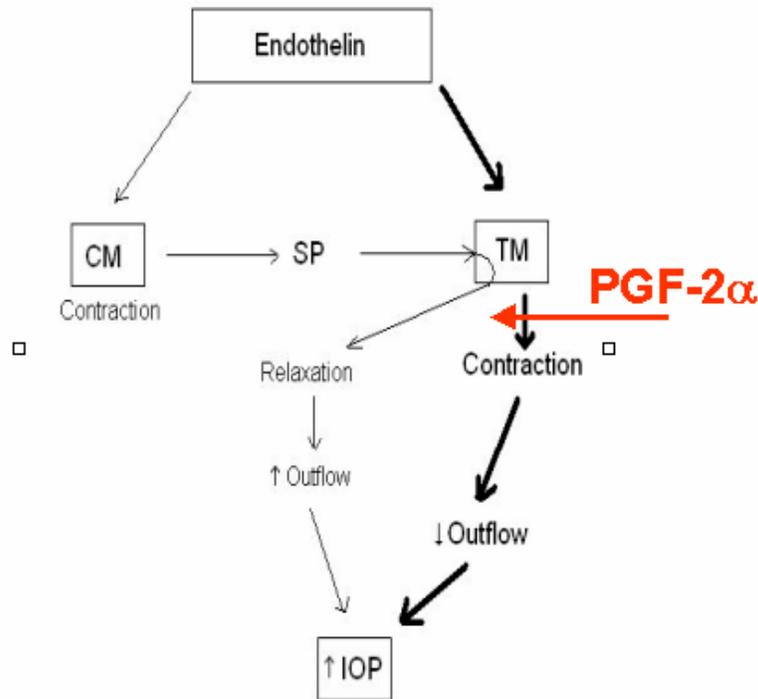


Abb. 26: Model zur Wirkung von PGF-2- $\alpha$  bei der Regulation des IOD: PGF-2- $\alpha$  inhibiert die ET-1-induzierte Kontraktion am TM, dadurch wird der Kammerwasserabfluss verbessert und der IOD sinkt.

Andere Autoren beschreiben eine Beteiligung von MLCK an dem augeninnendrucksenkenden Effekt dieser Substanzen [132, 133]. Dabei sollen Veränderungen der Kontraktion/Relaxation glatter Muskulatur in der Vorderkammer bei der Wirkung von PG-Analoga bedeutsam sein. Neuroprotektive Effekte der Retina durch Unoproston wurden an Ratten gezeigt [134].

Neben der von uns gezeigten kontraktilen Wirkung auf das TM, wurde nachgewiesen, dass Unoproston die Blutzirkulation der Sehnerv versorgenden Gefäße bei Menschen und Kaninchen verbessert [135]. Experimente an Kaninchen belegten, dass PGF-2- $\alpha$  die Blutzirkulation im Bereich der vorderen Uvea verbesserte. An Gefäßen der Choroidea wurde kein Effekt beobachtet, was bedeutet, PGF-2- $\alpha$  erreicht die Choroidea nicht, obwohl

die Konzentration hoch genug ist. Wahrscheinlich diffundiert die besagte Substanz in keinem starken Ausmaß durch die Sklera, wodurch die Konzentration bereits wieder abnimmt, bevor die Blutgefäße der Choroidea erreicht werden [136]. 17-phenyl-PGF-2- $\alpha$  bewirkte keinen Anstieg der Durchblutung im vorderen Anteil der Uvea und im hinteren Bereich des Auges, es wurde aber eine verbesserte Blutzirkulation der vorderen Sklera beobachtet [136].

15-Keto-17-phenyl-PGF-2- $\alpha$  führte zu einem signifikanten Anstieg des Blutflusses in der vorderen Sklera und vorderen Uvea, in hinteren Segmenten des Auges zeigte sich keine Änderung der Blutzirkulation [136].

Bei der Verbesserung des Blutflusses durch PG könnte der hier nachgewiesene Endothelin-Antagonismus ebenfalls involviert sein.