

4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt die Expression und funktionelle Bedeutung des muscarinergen m2 Rezeptors in Trabekelmaschenwerk (TM) und Ziliarmuskel (ZM). Das Rezeptorprotein ist in Membranpräparationen von humanen und bovinen Zellkulturen, sowie bovinem Nativgewebe nachweisbar. Die hemmende Wirkung von m2-Rezeptor Antagonisten auf den Muskeltonus des TM deutet darauf hin, dass der m2 Rezeptor an der Regulation der Kontraktion des TM beteiligt ist.

4.1 Der muscarinerge Rezeptor

4.1.1 Klassifikation der Subtypen

Am genauesten lassen sich muscarinerge Rezeptorsubtypen anhand ihrer Aminosäuresequenzen klassifizieren. Die 5 Subtypen m1 - m5 werden von unterschiedlichen Genen codiert (Bonner et al., 1987; Bonner et al., 1988; Peralta et al., 1987a; Peralta et al., 1987b). Vor der Klassifizierung anhand der Aminosäuresequenzen und der unterschiedlichen Gene wurden 3 pharmakologisch differenzierbare Subtypen M₁ - M₃ unterschieden. Mit den ersten Antagonisten Pirenzipin gegen M₁ (Hammer et al., 1980), AF-DX 116 gegen M₂ (Giachetti et al., 1986; Giraldo et al., 1987) und 4-DAMP gegen M₃ (Barlow et al., 1976) wurde die Verteilung der Subtypen mittels funktioneller Studien und Radioliganden-Bindungs-Studien in unterschiedlichen Geweben untersucht. Es wurden weitere Antagonisten entwickelt, die einzelne Subtypen möglichst selektiv antagonisieren sollten. Die Selektivität der verschiedenen Antagonisten ist aber selbst unter idealen Bedingungen nur gering (Eglen et al., 1996). Darüber hinaus beruhten die in funktionellen Studien geschätzten Affinitäten der Antagonisten auf der Annahme einer homogenen Rezeptorverteilung in der glatten Muskulatur. Es sind jedoch mehrere Subtypen in glatter Muskulatur vorhanden, die alle zur funktionellen Antwort beitragen. Die pharmakologische Klassifikation führte zu einer verwirrenden Nomenklatur der Subtypen, die 1989 an die genetische Klassifikation angeglichen wurde (siehe Abb. 4.1.). Zusätzlich wurden zwei neue Subtypen m4 und m5

beschrieben, die mit den herkömmlichen Antagonisten nicht gegen die drei anderen Subtypen abgegrenzt werden konnten. Da sie aber auch in unterschiedlichem Maße auf diese Pharmaka ansprechen, z.B. auf Pirenzipin und Methoctramin, könnten in Studien vor 1989 m4 und m5 fälschlicherweise M₁, M₂, bzw. M₃ zugerechnet worden sein (Eglen et al., 1996; Goyal, 1989). Der M₄ Rezeptor kann seit kurzem auch pharmakologisch durch spezifische Antagonisten (Augelli-Szafran et al., 1998; Olianas und Onali, 1999) von M₁-M₃ unterschieden werden, wohingegen für m5 noch kein spezifischer Antagonist existiert (Eglen et al., 1999).

Pharmakologische Einteilung	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	
Andere Namen (frühere Bezeichnungen)	M ₁ neural mAch I HM ₁	M ₂ cardiac M _{2α} , M _{2A} mAch II HM ₂	M ₂ M ₂ muscle M ₂ glandular M _{2β} , M _{2B} , Glandular mAch III HM ₄		
Genetische Einteilung	m1	m2	m3	m4	m5
Erste selektive Antagonisten	Pirenzipin	AF-DX 116	4-DAMP	Benzoxazin Isoquinoline ¹ PD 102807 ²	keine

Tabelle 1.1.: Einteilung der Subtypen nach genetischen und pharmakologischen Kriterien.

Bei Literatur von vor 1989 ist auf die abweichenden Bezeichnungen für den M₂ bzw. M₃ Rezeptor zu achten, die auf mangelnde Spezifität der verwendeten Antagonisten zurückzuführen sind. Aus: (Goyal, 1989) ¹ aus: (Augelli-Szafran et al., 1998) ² aus: (Olianas und Onali, 1999)

4.1.2 Aufbau des muscarinergen Rezeptors

Genau wie die α_2 -, β_1 -, bzw. β_2 - adrenergen Rezeptoren gehören die muscarinergen Rezeptoren zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese bestehen aus 7 α -Helix transmembranären Domänen, welche durch jeweils 4 intra- und extrazelluläre Schleifen (loops) miteinander verbunden sind.

Die 5 verschiedenen Subtypen bestehen aus 460 – 590 Aminosäuren mit einem entsprechenden Gewicht zwischen 51 und 66 kDa (Goyal, 1989). Die Aminosäuresequenz der 5 Subtypen zeigt ~ 43% homologe Sequenzen, wobei die homologen Anteile vornehmlich in den transmembranären Domänen und kurzen loops liegen. Anhand dieser homologen Sequenzen können die 5 Subtypen in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste bilden m1, m3 und m5, die zweite m2 und m4 (Ashkenazi und Peralta, 1994).

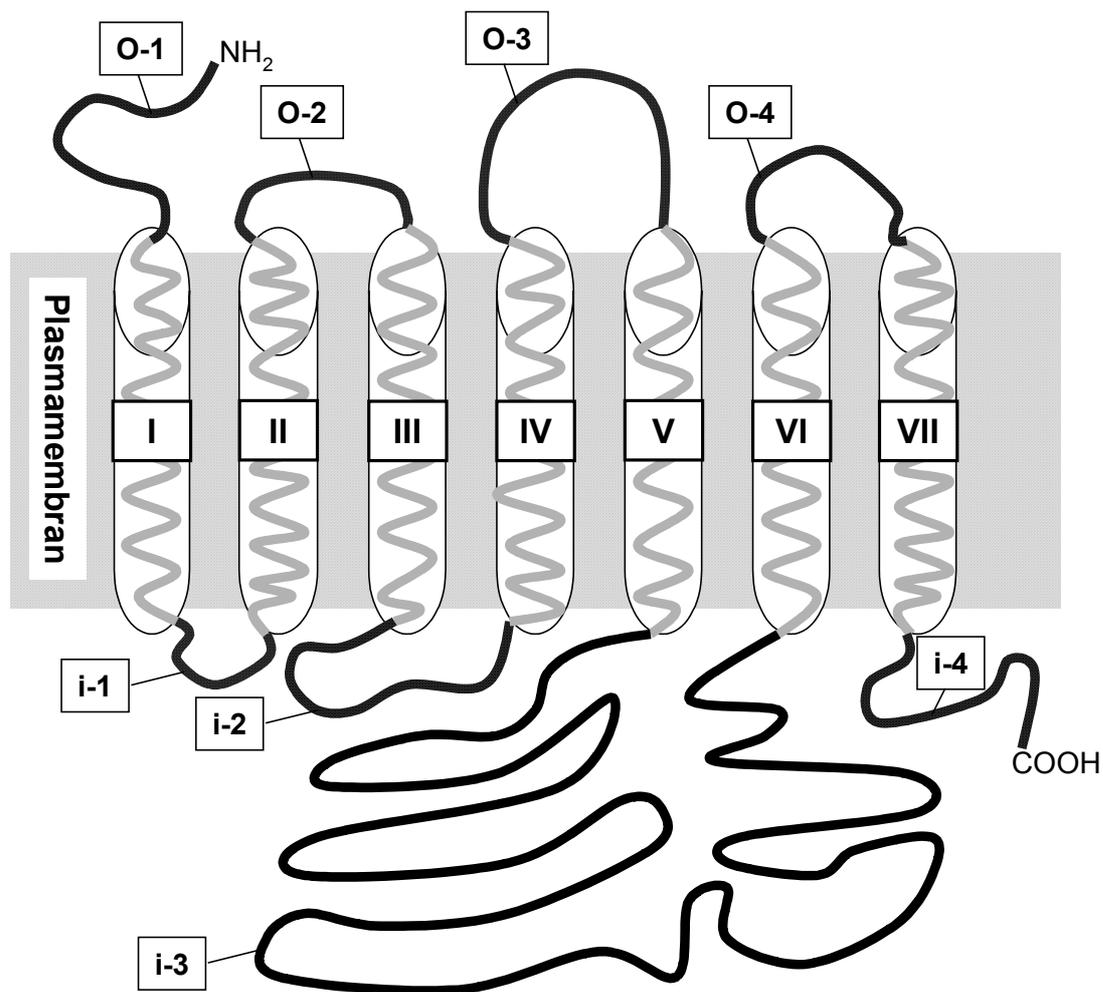


Abb. 4.1.: Aufbau und Lokalisation des muscarinergen Rezeptors

Das Rezeptorprotein besteht aus 7 α -helikalen, lipophilen transmembranären Domänen (I bis VII), die durch 4 extrazelluläre (o-1 bis o-4) und 4 intrazelluläre (i-1 bis i-4) loops miteinander verbunden sind. Verändert aus: (Goyal, 1989)

4.1.3 Signaltransduktion des muscarinergen Rezeptors

Die zytoplasmatische Schleife i-3 zwischen den Domänen V und VI zeigt eine große subtypspezifische Divergenz und ist der größte intrazelluläre loop. Wahrscheinlich befinden sich auf ihr die spezifischen Bindungsstellen für die unterschiedlichen G-Proteine (Goyal, 1989). Durch Hybridstudien mit m2 und m3 ist es gelungen, das hierfür wichtige VTIL- Motiv (Valin385, Threonin386, Isoleucin389, Leucin390) im m2

Rezeptor zu identifizieren, welches sich an der Verbindungsstelle von i-3 mit VI befindet. Es besteht aus 4 Aminosäuren, die eine kontinuierliche hydrophobe Oberfläche bilden und ist mit der α -Untereinheit der $G_{0/i}$ funktionell gekoppelt (Kostenis et al., 1997).

Die funktionellen Eigenschaften und die Signaltransduktion der einzelnen Subtypen konnten an Expressions-Zellmodellen („chinese hamster ovary“ (CHO) und „human embryo kidney“ (HEK) 293 Zellen), welche jeweils einen Subtyp auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, untersucht werden. Die exogenen Rezeptoren konnten die zelleigenen Signaltransduktionssysteme über Interaktion mit endogenen G-Proteinen aktivieren (Ashkenazi und Peralta, 1994; Eglén et al., 1996).

Die Signaltransduktion erscheint zunächst einfach, da Subtypen mit ähnlicher Primärstruktur auch ähnliche Signaltransduktionswege beschreiten. So sind m1, m3 und m5 vornehmlich über das G-Protein G_p gekoppelt, was zur Phospholipase C (PLC) vermittelten Hydrolyse von Phosphoinositol (PI) führt, mit den nachfolgenden Effektoren Inositol-3-Phosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PKC); IP_3 bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Ca^{++} Konzentration über Ca^{++} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Dagegen sind m2 und m4 über das G-Protein G_i für die Inhibition der Adenylatzyklase und damit das Sinken der cAMP- Konzentration verantwortlich. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA) und bewirkt so eine Reduktion der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration.

Andererseits kann ein Rezeptorsubtyp sowohl in unterschiedlichen Zellen als auch innerhalb einer Zelle verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren (Ashkenazi und Peralta, 1994). Für den m2 Subtyp konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung eines G-Proteins über die $G_{\alpha i}$ -Untereinheit die Adenylatzyklase inhibiert und über die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit die $PLC_{\beta 2}$ aktiviert wird. Die durch m2-Stimulation ausgelöste PI-Hydrolyse und Ca^{++} -Ausschüttung ist schwächer als die durch m1 ausgelöste (Ashkenazi et al., 1989; Lechleiter et al., 1989). Die Aktivierung der $PLC_{\beta 2}$ über die $\beta\gamma$ -Untereinheit wird komplett durch Pertussistoxin (PTX) inhibiert. Dagegen ist die durch Aktivierung des m1 Subtyps über die α -Untereinheit des G_q -Proteins ausgelöste Aktivierung der $PLC_{\beta 1}$ gegen PTX unempfindlich (Katz et al., 1992). In einem anderen Zellmodell mit Xenopus Oozyten weist die Ausschüttung von Ca^{++} charakteristische Unterschiede auf, je nachdem ob sie durch Stimulation des m2

oder des m3 Rezeptors ausgelöst wurde (Lechleiter et al., 1991). Auch in diesem Model wurde die Ausschüttung über die oben genannten PTX-sensitiven bzw. -insensitiven Untereinheiten der G-Proteine und PLC ausgelöst. Im Irismuskel scheint m3 sowohl an PTX-sensitives wie auch an PTX-insensitives G-Protein gekoppelt (Masuda et al., 1995).

4.1.4 Funktionelle Bedeutung der muscarinerge Rezeptorsubtypen an glatter Muskulatur

Der m3 Subtyp ist wahrscheinlich über die Stimulation der PLC und den nachfolgenden Effektoren IP3 und DAG direkt für die Kontraktion verantwortlich. Der m2 Subtyp scheint dagegen die Relaxation zu regulieren, indem er die durch β_2 Rezeptoren erhöhte Konzentration von cAMP und damit die Relaxation hemmt (Eglen et al., 1996).

Es ist gezeigt worden, dass β_2 -adrenerge Rezeptoren über die G_s -Untereinheit einen Ca^{++} -abhängigen K^+ -Kanal aktivieren (Kume et al., 1992; Torphy, 1994). Die Aktivierung des Kanals führt zur Membranhypolarisation, damit zur Hemmung des Ca^{++} -Einstroms und zur Relaxation glatter Muskulatur. Der Kanal ist in glatter Muskulatur der Bronchien, des Ureter, des Intestinums und in Arterien nachgewiesen worden (Eglen et al., 1996). In bronchialer glatter Muskulatur ist der Kanal an der durch β -adrenerge Agonisten ausgelösten Zellantwort beteiligt (Eglen et al., 1996). Im gleichen Gewebe konnte gezeigt werden, dass der m2 Rezeptor über die G_i -Untereinheit diesen K^+ -Kanal hemmt (Kume und Kotlikoff, 1991). Es gibt Anzeichen dafür, dass die relaxierende Wirkung der β_2 Rezeptoren so, auch unabhängig von cAMP, durch den m2 Rezeptor reguliert werden kann (Hakonarson et al., 1995).

4.2 Verteilung der Subtypen am Gewebe der vorderen Augenkammer

Die Verteilung der Rezeptorsubtypen am Auge ist von mehreren Arbeitsgruppen funktionell, pharmakologisch und molekularbiologisch untersucht worden.

Northern-Blot-Analysen an glatter Muskulatur boviner Irissphinkter und in den Ziliarfortsätzen zeigen hauptsächlich mRNA des m3 Rezeptors und nur in geringem

Ausmaß des m2 Rezeptors. Nur in den Ziliarfortsätzen wurde Spuren von m4 mRNA detektiert (Honkanen et al., 1990).

Immunhistochemische Untersuchungen an kultivierten humanen Zellen von Irissphinkter und Ziliarmuskel unter der Verwendung der Antagonisten Pirenzipin, AF-DX 116 und 4-DAMP lassen auf eine hohe Dichte des M₃ Rezeptors schließen, wohingegen M₂ kaum vertreten zu sein scheint (WoldeMussie et al., 1993).

Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern (AK) gegen die 5 muscarinergen Rezeptorsubtypen und PCR auf Rezeptor-mRNA zeigen jedoch, dass auch der m2 Rezeptor im Gewebe der vorderen Augenkammer vorhanden ist (siehe Tab. 4.1.). Die AK gegen m3 und m5 zeigten eine Kreuzreaktion von 2%. Die Sensitivität des AK gegen m2 lag bei 50%, wohingegen alle anderen AK eine Sensitivität zwischen 80-90% zeigten (Gil et al., 1997). Daher läßt sich der m2 Anteil 30% höher kalkulieren. Damit wäre der m2 Subtyp im Ziliarmuskel nach dem m3 Subtyp am stärksten exprimiert.

Gewebe	m1	m2	m3	m4	m5
HISM Zellen		+	++	+	
Irissphinkter	7,4 +	7,8±5,5 +++	59,1±7,8	11,4±4,1 +	5,4±3,1 +
HCSM Zellen		+	+	+	
Ziliarmuskel	0,8±1,3	5,4±2,6 +	73,5±0,9 ++	4,9±4,7 +	2,4±2,1
Ziliarfortsätze	6,6±4,1	4,9±2,4	57,6±5,5	4,6±3,5	2,0±1,6

Tab. 4.1.: Verteilung der Rezeptorsubtypen in Prozent

HISM = human Irissphinkter smooth muscle; HCSM = human ciliary smooth muscle

Anwesenheit von Fragmenten, die mittels RT-PCR amplifiziert wurden: + = niedrig; ++ = mittel; +++ = hoch

Aus: (Gil et al., 1997)

Funktionelle Versuche bestätigen die vorherrschende Rolle des M_3 Rezeptors.

Am Auge des Rhesusaffen wurden der Kammerwasserabfluss, Akkomodation und Miosis am stärksten durch 4-DAMP und am schwächsten durch AF-DX 116 inhibiert (Gabelt und Kaufman, 1994). Bei direkter Messung der Kontraktilität von Ziliarmuskel (ZM) und Trabekelwerk (TM) vom Rinderauge, zeigte 4-DAMP eine stärkere Hemmung der Kontraktion als Pirenzipin, es wurde jedoch in dieser Arbeit kein Antagonist gegen M_2 getestet (Wiederholt et al., 1995).

An humanen Trabekelwerkszellen erhöhen die muscarinergen Agonisten Carbachol und Acetylcholin die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration über L-Type Ca^{++} -Kanäle (Steinhausen et al., 2000). Die Antagonisten gegen M_3 4-DAMP und fHHSiD führten am TM zu einer stärkeren Hemmung der carbacholinduzierten Ca^{++} -Mobilisation und PI-Hydrolyse als Pirenzipin (Shade et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse sind an humanen Irissphinkter- und Ziliarmuskelzellen beobachtet worden. AF-DX 116 konnte die carbacholinduzierte Ca^{++} -Mobilisation und PI-Hydrolyse ebenfalls hemmen, obwohl diese Signaltransduktionswege eher typisch für den m_3 Rezeptorsubtyp sind und nur in geringem Maße durch den m_2 Rezeptorsubtyp beeinflusst werden (WoldeMussie et al., 1993). AF-DX 116 kann jedoch schlecht zwischen M_2 und M_3 differenzieren (Eglen et al., 1996). Wahrscheinlich beruht dieser Effekt daher auf einer Wirkung von AF-DX 116 auf den M_3 Rezeptor und ist kein Zeichen für eine funktionelle Beteiligung des m_2 Rezeptors. Darüber hinaus ist eine Einteilung der Rezeptoren anhand ihrer Signaltransduktionswege ungenau (Goyal, 1989). Rückschlüsse von intrazellulären Veränderungen allein auf die Verteilung der Rezeptorsubtypen im Gewebe sind kritisch zu bewerten.

4.2.1 Sonderstellung der glatten Muskulatur am Augengewebe

Die glatte Muskulatur im Auge nimmt eine Sonderstellung ein. An der glatten Muskulatur des Auges wird eine Kontraktion durch Stimulation des M_3 Rezeptors ausgelöst wie auch bei der Mehrheit der an verschiedenen Spezies untersuchten Gewebe (Eglen et al., 1996). Das Verteilungsverhältnis des m_2 und m_3 Rezeptors unterscheidet sich jedoch insofern, als m_2 bei allen Spezies und in allen Geweben, außer dem okulären, im Verhältnis 4:1 über dem m_3 Rezeptor überwiegt (Eglen et al., 1996).

Die Beteiligung des M₂ Rezeptors an der Funktion von ZM und TM wurde bisher nur wenig untersucht. Am Rhesusaffenmodell konnte AF-DX 116 als spezifischer Antagonist den Kammerwasserabfluss nur geringfügig hemmen (Gabelt und Kaufman, 1994).

4.3 Molekularbiologie

Obwohl Augengewebe intensiv auf die Verteilung der muscarinergen Subtypen hin untersucht worden ist, wurde das TM, als wichtigstes Gewebe in der Regulation des Abflusswiderstands im Kammerwinkel, bisher nicht molekularbiologisch untersucht. Zum ersten mal konnte hier der m₂ Rezeptor mittels Immunopräzipitation und Western-Blot-Analyse in Membranpräparationen von TM und ZM nachgewiesen werden. Es wurde sowohl TM und ZM aus humanen Zellkulturen als auch aus bovinem Nativgewebe, wie es für die Kontraktionsversuche verwendet wird, untersucht. Zusätzlich wurden Versuche an kultivierten bovinen Trabekelwerkszellen durchgeführt. Das Signal ist im bovinen Nativgewebe deutlich stärker als in humanen und bovinen Zellkulturen. Im Zytosol war der Rezeptor nicht nachweisbar.

Die mit dem Antikörper (AK) gegen den m₂ Subtyp angefärbte Bande liegt in allen Versuchen im Bereich von 56 kDa und entspricht somit der in der Literatur für muscarinerge Rezeptoren angegebenen Größe von 466 Aminosäuren (Ashkenazi und Peralta, 1994; Goyal, 1989). In allen Experimenten wurden außerdem zusätzliche, höheren und niedrigeren kDa Werten entsprechenden Banden vom Antikörper gegen m₂ detektiert. Dies könnte auf eine Dedifferenzierung der Zellen unter Zellkulturbedingungen zurückzuführen sein. So zeigt sich bei einem Vergleich zwischen TM aus bovinen Augen eine Zunahme zusätzlicher Banden bei kultivierten Zellen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass diese Signale auf unspezifische Bindungen des Antikörpers an andere Proteinkomplexe im Membranlysat zurückzuführen sind.

AK gegen die 5 Subtypen sind gegen die dritte intrazelluläre Schleife (i3) der Rezeptoren gerichtet. Sie bietet sich an, weil sie mit 157-203 Aminosäuren groß, hoch subtypspezifisch und hydrophil ist. An CHO Zellen zeigte der Antikörper gegen m₂ keine Kreuzreaktion mit anderen muscarinergen Rezeptorsubtypen (Levey et al., 1990).

Mit dem spezifischem Blockpeptid lässt sich das Signal bei 56 kDa unterdrücken und so als Signal entsprechend dem m2 Rezeptorprotein identifizieren.

Immunopräzipitation (IP) mit dem AK gegen m2 führte zu einer Anreicherung der Bande bei 56 kDa. Auch hier führte der Einsatz des Blockpeptids zu einer deutlichen Reduktion des Signals, konnte es jedoch nicht vollständig unterdrücken, da auch der AK selbst, welcher ja zusammen mit dem Protein auf das SDS-Gel aufgetragen wird, ein Molekulargewicht zwischen 50 und 60 kDa hat. Die Antikörper-Bande und die Rezeptorprotein-Bande liegen somit auf gleicher Höhe. Das Rezeptorprotein war im Überstand nachweisbar. Dies ist möglicherweise ein Zeichen dafür, dass der AK das m2 Rezeptor-Protein nicht zu 100% aus dem Lysat isoliert hat. Der wahrscheinlichste Grund für das Auftreten einer solchen Bande im Überstand ist die Lösung der Bindungen zwischen den Fc-Teilen der AK und den Sepharose-beads. Die Bindungen könnten sich durch Erwärmung der Proben auf über 4°C, oder mechanisch gelöst haben. An CHO Zellen konnten mittels IP mit dem AK gegen m2 nur knapp 30% des m2 Rezeptorproteins gebunden werden (m1: 27%, m3: 84%, m4: 86%, m5: 54%) Die Antikörperkonzentration war nicht der limitierende Faktor. Neben einer Dissoziation der Liganden sind Denaturierung, bzw. Degradierung des Rezeptorproteins, oder posttranslationelle Modifikation andere mögliche Gründe (Levey et al., 1990).

Die Ergebnisse der IP zeigen, dass es sich bei der Bande bei 56 kDa eindeutig um das m2 Rezeptorprotein handelt.

4.4 Kontraktionsversuche

In Augen höherer Primaten lassen sich Trabekelwerk (TM) und Ziliarmuskel (ZM) aufgrund ihrer anatomischen Nähe und der vom ZM ins TM einstrahlenden Fasern schlecht voneinander trennen. Direkte Kontraktionsmessungen mit dem force-length-transducer wurden deshalb an TM und ZM Gewebestreifen vom Rinderauge durchgeführt (Lepple-Wienhues et al., 1991a; Wiederholt et al., 2000). Der Kammerwinkel des Rinderauges wurde bereits ultrastrukturell und immunhistochemisch untersucht (Flügel et al., 1991). Bei dieser Spezies ist der ZM nur rudimentär angelegt und weit hinten lokalisiert. Die Gewebe können bei der Präparation leicht voneinander getrennt werden, der an den ZM angrenzende Anteil

des TM wurde verworfen, um Verunreinigungen auszuschließen. Das Rinderaugenmodell hat sich für die direkte Kontraktionsmessung und die Übertragung der dadurch gewonnenen Daten auf das menschliche Auge vielfach bewährt (Wiederholt et al., 2000).

Basierend auf den Ergebnissen der Molekularbiologie, die deutlich eine Expression des Rezeptors auf Proteinebene zeigen, wurden die Effekte von zwei spezifischen Antagonisten gegen M_2 auf die Regulation der Kontraktilität untersucht.

4.4.1 Effekte von 3- α -Chloroimperalin

3- α -Chloroimperalin zeigte keinen Effekt an TM und ZM. 3- α -Chloroimperalin ist ein Imperalin-Derivat, ein steroidales Alkaloid, welches aus der Pflanze *F. imperalis* gewonnen wird (Baumgold et al., 1994). Imperalin hat anticholinerge Aktivität (Eglen et al., 1999). An CHO Zellen mit definierter Verteilung der muscarinergen Rezeptorsubtypen zeigte 3- α -Chloroimperalin in kompetitiven Bindungsstudien eine 400fach höhere Affinität zum M_2 Rezeptor als Imperalin. Sie liegt im subnanomolaren Bereich (K_i Wert $0,32 \pm 0,06$ nM) und ist damit 66fach höher als die zum M_3 Rezeptor (K_i Wert $21,3 \pm 5$ nM) und 11fach höher als die zum M_1 Rezeptor (K_i Wert $3,8 \pm 0,6$ nM). 3- α -Chloroimperalin ist aufgrund seiner steroidalen Struktur lipophil und penetriert rasch die Blut-Hirn-Schranke (Baumgold et al., 1994). Trotz seiner hohen Affinität und Spezifität zu M_2 konnte 3- α -Chloroimperalin die durch Carbachol in TM und ZM ausgelöste Kontraktion nicht antagonisieren. Möglicherweise hat es die Bindungsstelle am Rezeptor aufgrund unzureichender Permeabilität der Gewebestreifen nicht erreicht. Es liegen wenig andere funktionelle Daten bezüglich 3- α -Chloroimperalin vor, die Klärung dieser Frage ist daher schwierig.

4.4.2 Effekte von Methoctramin

Applikation von Methoctramin bewirkte eine dosisabhängige Antagonisierung der durch Carbachol ausgelösten Kontraktion am TM. Am ZM zeigte es keine Wirkung. Methoctramin gehört zur Gruppe der Polymethylen Tetramide. Methoctramin kann M_2 gut gegen M_1 und M_3 abgrenzen, aber nur schlecht zwischen M_2 und M_4 differenzieren (Eglen et al., 1996).

Eine Vielzahl von Studien sind mit Methoctramin durchgeführt worden. In kompetitiven Bindungsstudien an CHO Zellen zeigt Methoctramin eine 16fach höhere Affinität zu M_2 als zu M_3 (Dorje et al., 1991). In Radioliganden-Bindungsstudien an Ratten zeigt Methoctramin eine 158fach höhere Affinität zu M_2 am Herzen als zu M_3 in der Speicheldrüse (dort M_2 glandular) und eine 16fach höhere Affinität als zum kortikalen M_1 Rezeptor. AF-DX 116 hatte hier lediglich eine 5fach höhere Affinität zu M_3 und konnte nur schlecht zwischen M_2 und M_1 differenzieren (Michel und Whiting, 1988). In funktionellen Studien in vitro fanden Melchiorre et al. eine 275fach höhere Affinität zum kardialen M_2 als zu M_3 im Ileum (dort M_2 muscle), 10fach mehr als AF-DX 116 (Melchiorre, 1990). Bei funktionellen Versuchen an anästhesierten Ratten konnte Methoctramin eine parasymphatisch ausgelöste Bradykardie über M_2 (dort $M_{2\alpha}$) antagonisieren, ohne den Tonus der Gefäße über M_3 (dort $M_{2\beta}$) zu beeinflussen. Auch hier lag die Kardioselektivität von Methoctramin 10fach höher als die von AF-DX 116 (Wess et al., 1988). Die unterschiedlichen Angaben zu Bindungsaffinitäten von Methoctramin zeigen, dass präzise Vergleiche der Bindungsaffinitäten von muscarinergen Antagonisten auch heute noch schwierig sind. Bei funktionellen Studien sind mehrere muscarinerge Rezeptorsubtypen für einen messbaren Effekt am Gewebe verantwortlich. Daher ist eine Zuordnung von Funktionen zu einzelnen Subtypen ungenau. Des Weiteren bestehen Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen endogenen und in Expressionsmodellen verwendeten Rezeptoren. Der Gebrauch von hypotonen Puffern in Radioligandenstudien führt zur Messung hoher Werte der Affinität am M_2 Rezeptor (Eglen et al., 1996). Die Fülle der auf unterschiedliche Weise gewonnenen Daten zeigt aber deutlich, dass Methoctramin besser geeignet ist, zwischen M_2 und M_3 zu unterscheiden, als AF-DX 116. Es muss bei den vorangegangenen Versuchen mit AF-DX 116 am Augengewebe berücksichtigt werden, dass die funktionelle Bedeutung des M_2 Rezeptors unterschätzt worden sein könnte.

Methoctramin konnte die durch Carbachol ausgelöste Kontraktion nach Gabe von Pirenzipin bzw. 4-DAMP zusätzlich antagonisieren. Die relaxierende Wirkung der beiden Substanzen am Trabekelwerk und Ziliarmuskel war vorher gezeigt worden (Wiederholt et al., 1996). 4-DAMP kann gut zwischen M_3 und M_2 differenzieren; mit einer 7fach höheren Affinität zu M_3 . Pirenzipin grenzt M_1 gut gegen M_2 und M_3 ab (Dorje et al., 1991). Die Wirkung von Methoctramin auf das Trabekelwerk ist also

eindeutig nicht auf eine unspezifische Wirkung an M_3 oder M_1 zurückzuführen. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist der Effekt über den M_2 Rezeptor vermittelt. Ob auch der M_4 Rezeptor daran beteiligt ist, lässt sich nicht ausschließen. Der m_4 Rezeptor konnte in glatter Muskulatur des Auges nachgewiesen werden, seine Bedeutung für die Kontraktion wird in der Literatur aber als gering eingestuft (Eglen et al., 1996). Aufgrund mangelnder spezifischer Antagonisten ist der M_4 Rezeptor nur wenig funktionell untersucht.

4.5 Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Effekte von Methoctramin

4.5.1 Molekularbiologie

Es lassen sich keine Hinweise in den molekularbiologischen Versuchen finden, die erklären könnten, warum Methoctramin sich in seiner Wirkung auf TM und ZM unterscheidet. Die Unterschiede zwischen ZM und TM in der Rezeptorkonzentration waren in bovinem sowie im humanem Gewebe nicht signifikant.

4.5.2 Signaltransduktion

Möglicherweise unterscheidet sich die Signaltransduktion von m_2 im TM von der im ZM und kann so die unterschiedlichen Effekte von Methoctramin erklären.

Andere Beispiele zeigen solche Unterschiede zwischen TM und ZM (Wiederholt et al., 2000).

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Familie von Serin/Threonin Kinasen, die an der intrazellulären Signaltransduktion einer Vielzahl von Rezeptoren beteiligt sind. Die humanen PKC Isoformen können in kalziumabhängige, kalziumunabhängige und atypische unterteilt werden (Livneh und Fishman, 1997). Verschiedene PKC Aktivatoren und Inhibitoren zeigen unterschiedliche Einflüsse auf die Kontraktion in ZM und TM. So relaxiert der spezifische PKC Inhibitor Chelerythrin das Trabekelwerks-, nicht aber das Ziliarmuskelgewebe. Die kalziumunabhängige PKC Isoform ϵ ist im TM stärker exprimiert als im ZM. Bei Kontraktionsversuchen unter kalziumfreien Bedingungen ließ sich durch Carbachol am Trabekelwerk nicht jedoch am Ziliarmuskel eine Kontraktion auslösen. Direkte Stimulation der PKC durch

Phorbol ester führte nur in Trabekelwerksstreifen zu einer Kontraktion (Thieme et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass die durch muscarinerge Agonisten ausgelöste kalziumunabhängige Kontraktion im TM über Aktivierung der PKC vermittelt wird.

Das cGMP/NO System spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion. Der relaxierende Effekt von organischen und nicht-organischen Nitraten ist im TM ausgeprägter als im ZM (Wiederholt et al., 1994). Patch-clamp-Versuche zeigten, dass dieser relaxierende Effekt über den kalziumabhängigen Maxi-K⁺-Kanal vermittelt wird (Stumpff et al., 1997).

Endothelin-1 depolarisiert das Membranpotential von Trabekelwerks- und Ziliarmuskelzellen und erhöht so die intrazelluläre Ca⁺⁺-Konzentration. Die dadurch ausgelöste Kontraktion ist im TM stärker ausgeprägt als im ZM und konnte darüber hinaus auch noch nach Entfernung des extrazellulären Kalziums teilweise ausgelöst werden. (Lepple-Wienhues et al., 1991b; Wiederholt et al., 2000).

Diese Beispiele machen deutlich, dass die Kontraktion in TM und ZM unterschiedlich reguliert wird. Weitere Untersuchungen über die Signaltransduktionswege von m2 müssen zeigen, ob hier Unterschiede zwischen TM und ZM zu finden sind.

4.5.3 Regulation des m2 Rezeptors

Signaltransduktionsvorgänge werden durch verschiedene Mechanismen kontrolliert, welche die Aktivierung des Rezeptors beenden und die Zelle so in den nicht-stimulierten Ruhezustand zurückversetzen. Die Phosphorylierung des Rezeptors oder von Elementen der Signaltransduktionskette spielt dabei eine entscheidende Rolle (Barnes et al., 1997; Haga et al., 1990; Hosey et al., 1996; Hosey et al., 1999; Rousell et al., 1995). Die mittels Immunopräzipitation anti-m2 aus dem Membranlysat von TM und ZM isolierten m2 Rezeptoren enthalten phosphoryliertes Serin und Threonin. Die aus Kulturen gewonnenen Zellen liegen also im unstimulierten Zustand phosphoryliert vor.

Sowohl an nativen, als auch an kultivierten Zellen bewirken Agonisten eine Phosphorylierung der muscarinergen Rezeptoren. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Desensibilisierung des Rezeptors, d.h. trotz gleichbleibender Konzentration des Agonisten nimmt die Signalweiterleitung des Rezeptors und der nachgeschalteten G-Proteinen ab (Hosey et al., 1996; Kwatra et al., 1987; Richardson und Hosey, 1992).

Die Desensibilisierung von G-Protein Rezeptoren kann durch 3 Mechanismen beeinflusst werden: 1. Eine Entkopplung des Rezeptors vom nachgeschalteten G-Protein, das sog. „uncoupling“, 2. eine Internalisierung des Rezeptors und 3. einen Abbau des Rezeptors, die sog. „down-regulation“.

Beim m2 Rezeptorsubtyp liegen 60–70% der phosphorylierten Serin- und Threoninaminosäuren im i3 loop. Das intrazelluläre Protein Arrestin bindet an diese phosphorylierten Aminosäuren und verhindert so die Kopplung des G-Proteins an den Rezeptor und damit die Signalweiterleitung. Eine Mutation im Bereich der Aminosäuren 307-311 im i3 bewirkt eine Hemmung der Arrestinbindung und der Entkopplung von G-Proteinen.

Die Internalisierung des m2 Rezeptors verläuft unabhängig von der Arrestinbindung (Pals-Rylaarsdam und Hosey, 1997).

Die Desensibilisierung des m2 Rezeptors wird durch komplexe Mechanismen reguliert (Barnes et al., 1997). Möglicherweise existieren Unterschiede innerhalb dieser Mechanismen zwischen dem TM und dem ZM, welche die Ergebnisse der Kontraktionsversuche erklären können. An der Regulation des m2 Rezeptors sind auch andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt, die über den sog. „cross-talk“ die Aktivität des Rezeptors beeinflussen (Barnes et al., 1997; Rousell et al., 1995).

4.5.3.1 Die Rolle der G-Protein Rezeptorkinasen für die Regulation von m2

Die Phosphorylierung des m2 Rezeptors durch G-Protein Rezeptorkinasen (GRK) wurde intensiv erforscht (Hosey et al., 1996). Die GRK Isoformen 2 und 3 phosphorylieren den Rezeptor in Abhängigkeit von der Dosis des Agonisten.

Die GRK 2 und 3 besitzen Bindungsstellen für $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinrezeptoren (Pitcher et al., 1992). Der Zusatz von $\beta\gamma$ -Untereinheiten verdoppelt das Maß der Phosphorylierung am humanen m2 Rezeptor (Richardson et al., 1993). Es ist also eine Interaktion zwischen anderen G-Proteinen und dem m2 Rezeptor denkbar. Am Rinderaugenmodell konnten α_2 Antagonisten die Kontraktion nur im Trabekelwerk und nicht im Ziliarmuskel inhibieren (Wiederholt et al., 1996); ein mögliches Zeichen für unterschiedliche Verteilung zwischen beiden Geweben. Die α_2 adrenergen Rezeptoren vermitteln einen Grossteil der Rezeptorantwort über ein

PTX-sensitives, inhibitorisches G-Protein (G_i), bestehend aus einer α - und einer $\beta\gamma$ -Untereinheit (Pepperl und Regan, 1994). Möglicherweise könnten sie über ihre $\beta\gamma$ -Untereinheit die GRK stimulieren und so zu einer Entkopplung des m2 Rezeptors führen.

4.5.3.2 Die Rolle der PKC für die Regulation des m2 Rezeptors

Die Phosphorylierung von verschiedenen kontraktilen Proteinen durch Isoformen der PKC spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontraktion glatter Muskelzellen (Eglen et al., 1996).

Die Proteinkinase C (PKC) scheint an der Entkopplung von m2 Rezeptor und G-Protein beteiligt zu sein. Bei Experimenten in vitro mit isolierten m2 Rezeptoren zeigte sich eine von Agonisten unabhängige Phosphorylierung durch PKC. Es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass eine Anwesenheit von Agonisten in intakten Zellen nötig ist, damit sich G-Proteine vom Rezeptor lösen und so die Bindungsstelle für PKC freigeben (Hosey et al., 1995).

In „human embryonic lung“ (HEL) 299 Zellen konnte die m2 Rezeptor-mRNA durch Stimulation der PKC reduziert werden (Rousell et al., 1995). Dieser Vorgang scheint unabhängig von Ca^{++} zu sein (Barnes et al., 1997). Es zeigen sich Unterschiede in der Verteilung der Ca^{++} -unabhängigen ϵ -Isoform der PKC. Sie ist im TM stärker exprimiert als in ZM (Thieme et al., 1999). Die PKC vermittelte down-regulation ließ sich in HEL 299 Zellen über eine Stimulation von β_2 -Rezeptoren auslösen (Rousell et al., 1995).

Funktionell gibt es keine Anzeichen für Unterschiede in der Verteilung der β Rezeptoren an TM und ZM (Wiederholt et al., 1996).

4.6 Die Regulation des Kammerwasserabflusses und ihre Bedeutung für die Pharmakotherapie des Glaukoms

4.6.1 Überblick über die in der Klinik angewandte Therapie des Glaukoms

Der Hauptteil der Antiglaukommedikamente wirkt über eine Senkung des IOD. Durch neue Medikamente wird versucht, die Durchblutung des Sehnervenkopfes zu

verbessern und eine Neuroprotektion der Axone des Sehnerven zu erreichen (Sugrue, 1997). Die medikamentöse Senkung des IOD stützt sich einerseits auf eine Hemmung der Kammerwasserbildung und andererseits auf eine Verbesserung des Abflusses (Shields und Krieglstein, 1993). Zur Hemmung der Kammerwasserbildung werden β -Adrenorezeptor-Antagonisten (Timolol, Levobunolol, Metipranolol, Betaxolol (β_1 -selektiv), Carteolol (mit ISA)), α_2 -Adrenorezeptor-Agonisten (Clonidin, Apraclonidin, Brimonidin) und der lokal anwendbare Carboanhydrasehemmer Dorzolamid verwendet. Zur Verminderung des Abflusswiderstandes im Trabekelwerk werden die muscarinergen Rezeptor-Agonisten Pilocarpin, Carbachol und Aceclidin, der Cholinesteraseinhibitor Ecothiopatiodid und der α/β – Adrenorezeptor-Agonist Adrenalin eingesetzt (Shields und Krieglstein, 1993). Die Derivate des Prostaglandins $\text{PGF}_{2\alpha}$ Latanoprost und Travoprost und der α_2 -Adrenorezeptor-Agonist Brimonidin senken den IOD über eine Steigerung des uveoskleralen Abflusses (Sugrue, 1997). $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Agonisten haben keinen Einfluss auf die Kontraktibilität des Trabekelwerks (Krauss et al., 1997). Die lokale Verabreichung von Unoproston, einem neuen Dokosanoid, senkt den IOD und wird in Japan seit mehreren Jahren zur Therapie des Glaukoms eingesetzt (Azuma et al., 1993). Sein Wirkungsmechanismus sowie die intrazelluläre Signalübertragung wurden kürzlich von Thieme et al. untersucht (Thieme et al., 2001b). Dabei konnte gezeigt werden, dass Unoproston zu einer Relaxation der glatten Muskulatur in HTM und HCM führt, wenn vorher eine Kontraktion mit Endothelin ausgelöst wurde. Wahrscheinlich senkt Unoproston den IOD also durch direkten Einfluss auf das HTM und eine Abflusssteigerung im Kammerwinkel. Einige Autoren sehen aber auch den uveoskleralen Abfluss als Hauptangriffspunkt für Unoproston. Neben seiner den IOD senkenden Wirkung hat Unoproston einen positiven Effekt auf die Durchblutung des Sehnervenkopfes und zeigt neuroprotektive Eigenschaften.

Um systemische Nebenwirkungen möglichst gering zu halten, werden die oben genannten Medikamente topisch am Auge appliziert und erreichen die vordere, bzw. hintere Augenkammer nach Diffusion durch die Kornea. Trotzdem treten bei den einzelnen Substanzen neben lokalen Nebenwirkungen wie Rötung und Brennen der Augen in unterschiedlichem Ausmaß auch vegetative Nebenwirkungen auf (Shields und Krieglstein, 1993).

4.6.2 Die Bedeutung des Trabekelwerks für die Regulation des Kammerwasserabflusses

Viele der in der Klinik etablierten Pharmaka beeinflussen den Tonus der glatten Muskulatur. Der Ziliarmuskel (ZM) wird als glatter Muskel beschrieben, der jedoch einige Besonderheiten aufweist (Flügel et al., 1990; Stahl et al., 1991; Wiederholt et al., 2000). Pilocarpin und Carbachol lösen eine Kontraktion des Ziliarmuskels aus. Es gilt als gesichert, dass der ZM durch direkten Zug auf das Trabekelwerk (TM) die Zwischenräume des TM und auch den Schlemm'schen Kanal aufweiten kann (Lütjen-Drecoll, 1999a; Lütjen-Drecoll und Rohen, 1994; Shields und Krieglstein, 1993). Dadurch wird der Kammerwasserabfluss gesteigert und der IOD gesenkt (Kaufmann, 1984). Aber auch das TM selbst reguliert den Abfluss. Immunhistochemische, elektrophysiologische, funktionelle und molekularbiologische Versuche zeigen, dass das TM Eigenschaften glatter Muskulatur besitzt (Lütjen-Drecoll, 1999a; Shields und Krieglstein, 1993; Wiederholt et al., 1993). Muscarinerge, α - und β -adrenerge und Endothelin 1- Rezeptoren wurden funktionell am TM nachgewiesen (Wiederholt et al., 1993). Bei direkten Kontraktionsmessungen am TM ließ sich durch Gabe von muscarinergen, α -adrenergen und Prostaglandin (TP) - Agonisten, Indomethacin, Endothelin und durch eine hohe extrazelluläre K^+ Konzentration eine Kontraktion auslösen. Durch Applikation von β -adrenergen und Prostaglandin (EP_2) - Agonisten, Blockern von Ca^{++} und nichtselektiven Kationkanälen, Stimulatoren des cGMP/NO-Systems, Ethacrynsäure, Inhibitoren der Tyrosinkinase PKC und PKA und bei niedrigem Ca^{++} wurde eine Relaxation des Gewebes erreicht. Versuche an Vorderkammern perfundierter Rinderaugen mit entferntem ZM und erhaltenem TM zeigten eine Verminderung des Abflusses bei Applikation von Substanzen, welche das TM kontrahieren und eine Steigerung bei Substanzen, welche das TM relaxieren (Wiederholt et al., 1995; Wiederholt et al., 1997; Wiederholt et al., 2000).

Eine weitere Feinregulierung des Abflusswiderstandes erfolgt möglicherweise über Myofibroblasten, die vom Skleralsporn ins TM einstrahlen (Tamm et al., 1992). Im Ganzen sind also drei verschiedene Gewebe an der Regulation des Abflusswiderstandes beteiligt.

4.6.3 Funktioneller Antagonismus

Wichtige Nebenwirkungen bei der Behandlung des POWG mit Pilocarpin und Carbachol sind deren miotische Wirkung durch Stimulation des M. sphincter iridis. Diese Stimulation führt zu konzentrischen Gesichtsfeldeinschränkungen, gestörtem Nachtsehen und einer Störung der Akkomodation durch Kontraktion des ZM. Vereinzelt berichten Patienten über Schmerzen, die durch einen Spasmus des Ziliarmuskels ausgelöst werden (Shields und Kriegstein, 1993). Es gibt Anzeichen dafür, dass bei der physiologischen Regulation des Abflusswiderstands ein vom ZM und damit der Akkomodation unabhängiger Mechanismus im TM beteiligt sein könnte. (1) In menschlichen Augen mit einem entwickelten Akkomodationssystem zeigt das TM morphologische Unterschiede im Vergleich mit Augen anderer Säugetiere ohne Akkomodationssystem (Lütjen-Drecoll, 1999a). (2) Zwischen dem TM und dem ZM besteht ein funktioneller Antagonismus (Wiederholt et al., 2000). Die Abbildung zeigt dies am Beispiel der Wirkungsweise von Pilocarpin.

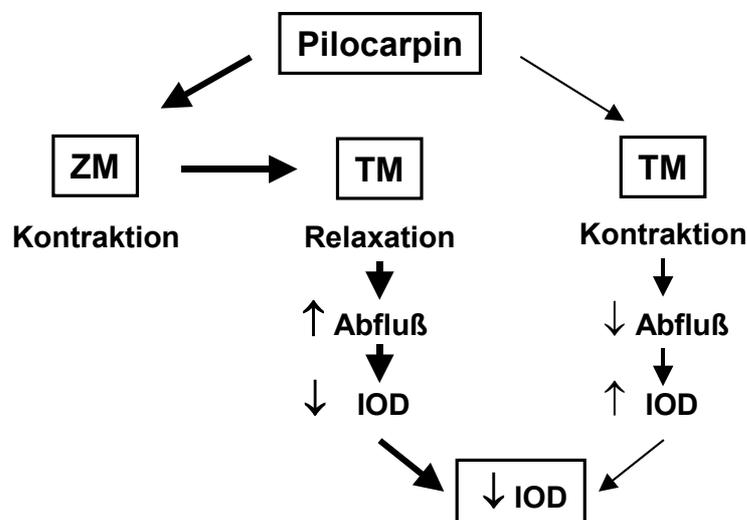


Abb. 1.4.: Funktioneller Antagonismus von Trabekelwerk (TM) und Ziliarmuskel (ZM) am Beispiel von Pilocarpin
 Pilocarpin führt zu einer Kontraktion des ZM. Dadurch wird das Maschenwerk des TM aufgeweitet; Abflusswiderstand und intraokularen Druck (IOD) sinken. Die Kontraktion des TM führt hingegen zu einer Verengung der Abflusswege und theoretisch zu einem Anstieg des IOD. Die Wirkung von Pilocarpin ist jedoch am ZM stärker als am TM. Aus: (Wiederholt et al., 2000)

4.6.4 Unterschiede zwischen Trabekelwerk und Ziliarmuskel

Bei elektrophysiologischen und funktionellen Versuchen zeigen sich Unterschiede zwischen TM und ZM in Bezug auf die maximale Kontraktionskraft, in der Abhängigkeit von Ca^{2+} , im cGMP/NO-System und im Ansprechen auf K^+ , α -adrenerge Agonisten, Prostaglandin und Endothelin (Wiederholt et al., 2000). Aufgrund dieser funktionellen Unterschiede könnte unter physiologischen Bedingungen eine akkomodationsunabhängige Regulation des Kammerwasserabflusses und des IOD durch Angreifen am TM erfolgen. Im Normalfall wird der IOD durch Pilocarpin gesenkt (Kaufmann, 1984). Beim malignen Glaukom jedoch kommt es nach Pilocarpingabe zu einem Anstieg des IOD. Dieses Phänomen lässt sich mit dem Modell des funktionellen Antagonismus erklären: der ZM spricht aufgrund eines Ziliarmuskelblocks, ausgelöst durch den sehr hohen IOD, nicht auf Pilocarpin an, und es wirkt einzig auf das TM. Die pilocarpininduzierte Kontraktion führt zu einem weiteren Anstieg des IOD (Wiederholt, 1998).

4.7 Die Bedeutung muscarinerner Rezeptoren für die Regulation des Gefäßmuskeltonus

Ein weiterer Vorteil muskelrelaxierender Substanzen wie Methoctramin gegenüber Carbachol, Pilocarpin und anderen kontrahierend wirkenden Pharmaka ist der vasodilatatorische Effekt und damit möglicherweise eine verbesserte Hämodynamik an der Papille. Die endothel-abhängige Relaxation in Gefäßen wird jedoch hauptsächlich über den M_3 (Eglen et al., 1996) und vereinzelt über den M_2 (Eglen et al., 1996; Liu und Lee, 1999) Rezeptorsubtyp vermittelt. Die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur wird ebenfalls über M_3 vermittelt (Eglen et al., 1996). Eine über den M_2 Rezeptor vermittelte Wirkung von Methoctramin auf den Tonus der Gefäßmuskulatur an der Sehnervenpapille ist daher unwahrscheinlich.

5 Zukünftige Untersuchungen

Die Beurteilung der Rolle des m2 Rezeptors für den Muskeltonus von ZM und TM wird durch die unzureichende Spezifität von Methoctramin erschwert. Weitere Versuche mit neuen M₄ Antagonisten wie den Benzoxazin Isoquinolinen (Augelli-Szafran et al., 1998) und PD 102807 (Olianas und Onali, 1999) oder mit Tripitramin, einem Derivat von Methoctramin, welches besser zwischen M₂ und M₄ differenzieren kann (Eglen et al., 1996), könnten hier Klarheit schaffen. Desweiteren müssen Versuche mit Methoctramin an perfundierten Vorderkammern und anderen Tiermodellen durchgeführt werden, um offene Fragen zu beantworten:

- Ist die für die Relaxation des Trabekelwerks nötige Konzentration von 10⁻⁶M in vivo erreichbar?
- Lässt sich durch die isolierte Relaxation des Trabekelwerks eine signifikante Senkung des IOD erreichen?
- Hat Methoctramin auch Einfluss auf die Hämodynamik der Papille?

Versuche müssen zeigen, wie sich der Phosphorylierungszustand der Rezeptoren bei Stimulation mit Agonisten verändert, um mehr Erkenntnisse über die Regulation der muscarinergen Rezeptoren in TM und ZM zu gewinnen

6 Zusammenfassung

Das Glaukom ist eine der häufigsten Ursachen für Erblindung weltweit. Das primär chronische Offenwinkelglaukom (POWG) ist darunter die häufigste Glaukomform. Ein erhöhter intraokularer Druck (IOD) gilt als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung eines POWG und ist als einziger direkt behandelbar. Bei einem erhöhten IOD liegt ein Ungleichgewicht zwischen Kammerwasserproduktion und – abfluss vor. 80-90% des Kammerwasserabflusses erfolgen über das Trabekelwerk. Für viele der zur Senkung des intraokularen Drucks (IOD) verwendeten Pharmaka ist ein Einfluss auf den Tonus der glatten Muskulatur gezeigt worden. Das Trabekelwerk (TM) besitzt Eigenschaften glatter Muskulatur und ist aktiv an der Regulation des IOD beteiligt. Eine Relaxation führt zu einer Steigerung des Abflusses und damit zu einer Senkung des IOD, eine Kontraktion hat den gegenteiligen Effekt. Somit besteht ein funktioneller Antagonismus zwischen (TM) und Ziliarmuskel (ZM). „Ideale“ Glaukommedikamente müssten daher spezifisch das TM relaxieren und den ZM unbeeinflusst lassen.

- Der m₂ Rezeptorsubtyp ließ sich molekularbiologisch in humanem und bovinem TM und ZM nachweisen.
- Der M₂ spezifische Antagonist Methoctramin reduzierte die durch Carbachol ausgelöste Kontraktion im TM signifikant.
- Der ZM blieb unbeeinflusst.
- Der m₂ Rezeptor ist an der Tonusregulation des TM beteiligt.
- Methoctramin könnte daher ein ideales Glaukommedikament sein:
 - 1) Es weitet die Zwischenräume des TM direkt und könnte so den Kammerwasserabfluss steigern und den IOD senken.
 - 2) Methoctramin hätte gegenüber dem derzeitig eingesetzten Pilocarpin den Vorteil, nicht zu einer Kontraktion des M. sphincter iridis zu führen.
 - 3) So könnten die durch die Miosis verursachten Nebenwirkungen wie konzentrische Gesichtsfeldeinschränkungen, Akkomodationsstörungen und gestörtes Nachtsehen verhindert werden.