

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Fromm

Habilitationsschrift

Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk als neue Möglichkeit der Glaukomtherapie

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Experimentelle Biomedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. medic. Rita Rosenthal

Eingereicht:	Juni 2009
Dekanin:	Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. Ernst Tamm / Regensburg
2. Gutachter:	Prof. Dr. Franz Grehn / Würzburg

1	Einleitung	4
1.1	Das Glaukom.....	4
1.1.1	Definition und Befunde	4
1.1.2	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	4
1.1.3	Klassifizierung der Glaukome	5
1.1.4	Das Primäre Offenwinkelglaukom.....	6
1.2	Der intraokulare Druck.....	8
1.2.1	Produktion des Kammerwassers	9
1.2.2	Abfluss des Kammerwassers.....	10
1.2.3	Regulation des intraokularen Drucks	11
1.2.4	Therapieansätze zur Senkung des intraokularen Drucks	12
1.3	Das Trabekelmaschenwerk	13
1.3.1	Trabekelmaschenwerk und Abflusswiderstand	14
1.3.2	Das Trabekelmaschenwerk als kontraktiles Gewebe	16
1.4	Endothelin	18
1.4.1	Endothelin-Rezeptoren	18
1.4.2	Endothelin im Auge.....	19
1.4.3	Bedeutung von Endothelin für das Glaukom.....	20
2	Untersuchung des Trabekelmaschenwerks	22
2.1	Präparation des Gewebes	22
2.2	Messung der Kontraktilität	23
2.3	Zellkulturtechniken.....	25
2.4	Elektrophysiologische Untersuchungen	26
2.5	Messung des intrazellulären Kalziums	28
2.6	Molekularbiologische Untersuchungen	30
2.6.1	Polymerasekettenreaktion	30
2.6.2	Western Blot Analyse	31
3	Eigene Arbeiten.....	33
3.1	Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork.....	33
3.2	Pharmacological and functional characterization of endothelin receptors in bovine trabecular meshwork and ciliary muscle	33
3.3	Endothelin-antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F _{2a} and fluprostenol on trabecular meshwork contractility.....	33
3.4	Endothelin receptor B in trabecular meshwork.....	33

3.5	Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork	33
3.6	Effects of unoprostone and endothelin-1 on L-type channel currents in human trabecular meshwork cells	33
4	Diskussion.....	34
4.1	Regulation des intraokularen Drucks durch die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks	34
4.2	Rolle des Endothelin-1 in der Pathologie des intraokularen Drucks	36
4.2.1	Endothelin und Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks	38
4.2.2	Endothelin-Rezeptoren im Trabekelmaschenwerk	38
4.2.3	Endothelin-abhängige Regulationsunterschiede zwischen Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel	39
4.3	Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk	40
4.3.1	Inhibition der Endothelin-Rezeptoren	40
4.3.2	Beeinflussung intrazellulärer Signalwege.....	41
4.3.3	Wirkungsmechanismus von Unoprostone	42
4.3.4	Wirkmechanismen von Prostaglandin F-Rezeptor-Agonisten	43
4.4	Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk als mögliche Glaukomtherapie	45
4.5	Ausblick und weiterführende Arbeiten.....	46
5	Zusammenfassung	48
6	Literaturverzeichnis.....	50
7	Abkürzungsverzeichnis.....	66
8	Anhang	67
8.1	Danksagung	67
8.2	Eidesstattliche Erklärung	67

1 Einleitung

Diese Arbeit beschreibt die Wirkung von Endothelin auf das Trabekelmaschenwerk und Möglichkeiten zur Inhibition der Endothelin-abhängigen Signalwege. Das Trabekelmaschenwerk bildet den wichtigsten Abflusswiderstand für das Kammerwasser des Auges und ist damit an der Regulation des Augeninnendrucks beteiligt. Dieses Gewebe bietet somit einen potentiellen Angriffspunkt für die medikamentöse Behandlung des Glaukoms, die eine effektive Senkung des Augeninnendrucks zum Ziel hat. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks eine bedeutende Funktion für die Druckregulation im Auge hat. Endothelin, dem eine Beteiligung bei der Pathogenese des Glaukoms zugeschrieben wird, beeinflusst die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks. Somit sind die Endothelin-induzierten Signalwege, die zur Kontraktion dieses Gewebes führen, von besonderem Interesse und Gegenstand dieser Arbeit.

1.1 Das Glaukom

1.1.1 Definition und Befunde

Aufgrund der Vielfalt der Glaukomformen ist eine einheitliche Definition der Erkrankung schwierig. Daher wird heute unter den Glaukomen eine Gruppe von Optikusneuropathien zusammengefasst, die charakterisiert ist durch einen fortschreitenden Untergang von retinalen Ganglienzellen, sichtbaren Veränderungen der Sehnervenpapille (Papillenexkavation) und der Entwicklung von glaukotypischen Gesichtsfeldausfällen. In den meisten Fällen sind beide Augen gleichermaßen betroffen.

Für die Schädigung der Ganglienzellen werden heute verschiedene Ursachen diskutiert. Dazu gehören eine gestörte Durchblutung der Retina und des Sehnervenkopfes, genetische Faktoren, toxische Faktoren und autoimmunologische Mechanismen [1]. Als wichtigster Risikofaktor gilt jedoch bis heute ein erhöhter intraokularer Druck (IOD), für den pathologische Veränderungen der Abflussstrukturen im Kammerwinkel verantwortlich gemacht werden.

1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Glaukom ist mit weltweit etwa 66,8 Millionen Erkrankten eine der häufigsten Augenerkrankungen [2]. Pro Jahr erblinden ca. 6,7 Millionen Menschen, d.h. etwa 10 % der Erkrankten, am Glaukom. In den Industrienationen ist es nach altersabhängiger Makuladegeneration und diabetischer Retinopathie die dritthäufigste Erblindungsursache, in den Entwicklungs-

ländern nach Katarakt die Zweithäufigste, weltweit ist es die häufigste Ursache irreversibler Erblindungen [3, 4].

In Deutschland sind Schätzungen zufolge etwa 800.000 Menschen am Glaukom erkrankt [5], im Jahr 2003 ging man hier von etwa 20.000 Glaukom-bedingt Erblindeten aus. Jährlich kommen etwa 1200 Neuerblindungen dazu, wobei ein Zuwachs auf über 2000 Neuerblindungen für das Jahr 2030 prognostiziert wird [6, 7].

Glaukome treten abhängig von der Form der Erkrankung in allen Altersgruppen auf, die Prävalenz nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Die Prävalenz des Glaukoms wird jenseits des 40. Lebensjahres auf etwa 1,3 - 1,55 % in der weißen Bevölkerung und 4,3 - 4,6 % in der schwarzen Bevölkerung geschätzt [8]. Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter in allen Bevölkerungsgruppen und wird bei den über 70-Jährigen mit 6 % in der weißen und 16 % in der schwarzen Bevölkerung angegeben [9]. Das Lebensalter ist demnach einer der Hauptrisikofaktoren für eine Glaukomerkrankung.

Zudem variiert die Prävalenz zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. Bei Weißen überwiegt das Primäre Offenwinkelglaukom (POWG, ca. 90 % der Fälle). Schwarze haben ein etwa vierfach höheres Risiko, an einem POWG zu erkranken als Weiße und sind bereits in jüngerem Alter betroffen [10, 11]. Bei Asiaten tritt das Winkelblockglaukom sehr viel häufiger auf als in anderen Bevölkerungsgruppen [12].

Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass erstgradige Nachkommen von POWG-Erkrankten ein höheres Erkrankungsrisiko als die Normalbevölkerung haben, deuten darauf hin, dass eine genetische Determination als Risikofaktor für die Glaukomerkrankung angesehen werden muss [13-17].

Daneben gibt es zahlreiche weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer Glaukomerkrankung. Zu den unbeeinflussbaren Risikofaktoren gehören Alter und Geschlecht [16, 17]. Daneben existieren weitere, teilweise beeinflussbare Risikofaktoren wie okuläre Durchblutung, Blutdruck und IOD. Dabei gilt ein erhöhter IOD als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer glaukomatösen Schädigung.

1.1.3 Klassifizierung der Glaukome

Eine Klassifizierung der unterschiedlichen Glaukomformen kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen. Die gebräuchlichsten Einteilungen orientieren sich an der zugrundeliegenden Ursache (primäre und sekundäre Glaukome), am Manifestationsalter (entwicklungsbedingte und adulte Glaukome), an morphologischen Kriterien (Offenwinkel- und Winkelblockglaukome) oder am klinischen Verlauf (akute und chronische Glaukome) [18].

Primäre Glaukome gehen nicht mit anderen Augenveränderungen einher, d.h. die Ursache der glaukomatösen Schädigung ist, zumindest gegenwärtig, nicht bekannt. Sekundäre Glau-

come treten als Folge von anderen Augenerkrankungen, -verletzungen oder -operationen im Kammerwinkel auf, die für die glaukomatöse Schädigung verantwortlich gemacht werden können. In diesen Fällen ist die Ursache der Schädigung bekannt.

Bei den entwicklungsbedingten Glaukomen unterscheidet man kongenitale und juvenile Glaukome, die in der frühen Kindheit bzw. im jugendlichen Alter auftreten und bei denen Entwicklungsstörungen eine unvollständige oder gestörte Ausbildung des Kammerwinkels bzw. der Abflussstrukturen verursachen. Diese Entwicklungsstörungen treten häufig in Kombination mit anderen Fehlbildungen des Körpers auf.

Die morphologische Unterscheidung in Offenwinkel- und Winkelblock-Glaukom richtet sich nach der Weite des Kammerwinkels.

Beim **Offenwinkelglaukom** ist der Kammerwinkel, der Winkel zwischen Cornea und Iris, normal weit und beträgt ca. 40°. Beim POWG verursachen pathologische Veränderungen des Trabekelmaschenwerks, deren Ätiologie bisher ungeklärt ist, eine Abflussbehinderung des Kammerwassers. Zu den wichtigsten Formen des Sekundären Offenwinkelglaukoms gehört das Pseudoexfoliationsglaukom, bei dem es zur Ablagerung von Material aus der Uvea im Bereich des Trabekelmaschenwerks und des Schlemm-Kanals kommt, und das Pigmentdispersionsglaukom, bei dem sich Pigmentgranula aus dem Pigmentepithel der Iris lösen und in das Trabekelmaschenwerk eingelagert werden. Dies führt zu einer „Verstopfung“ dieses Ausflusssystems. Zudem können Blut- und auch Entzündungszellen den Kammerwinkel verstopfen.

Beim **Winkelblockglaukom** kommt es infolge eines stark abgeflachten Kammerwinkels, der nur noch ca. 15° beträgt, zur Abflussbehinderung des Kammerwassers. Beim Primären Winkelblockglaukom werden die Kammerwasserabflusswege teilweise oder vollständig durch die Iris blockiert. Die Sekundären Winkelblockglaukome treten infolge von intraokulären Entzündungen, Blutungen oder Schwellung der Linse auf oder infolge von Tumoren und Metastasen im hinteren Augenabschnitt.

Sowohl unter den Offenwinkel- als auch den Winkelblockglaukomen gibt es kongenitale Formen, bei denen eine Fehlentwicklung des Kammerwinkels vorliegt.

1.1.4 Das Primäre Offenwinkelglaukom

Das Primäre Offenwinkelglaukom (POWG, Glaucoma chronicum simplex) stellt mit 90 % die häufigste Glaukomform in Europa dar. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen [9]. Die Prävalenz für ein POWG ab dem 40. Lebensjahr beträgt in der weißen Bevölkerung etwa 1,2 % [19, 20].

Beim POWG können zwei Formen unterschieden werden, das POWG mit Glaukomschaden bei erhöhtem Augeninnendruck (Hochdruckglaukom) und das POWG mit Glaukomschaden,

aber normalem Augeninnendruck (Normaldruckglaukom). Daneben gibt es Patienten mit einem erhöhten Augeninnendruck, aber ohne sichtbaren Glaukomschaden (okuläre Hypertension). Diese Fälle deuten darauf hin, dass die in der Gesamtbevölkerung ermittelten Normalwerte in Einzelfällen nicht zutreffend sind. Da auch Patienten mit Normaldruckglaukom von einer therapeutischen Senkung des Augeninnendrucks profitieren, wurde der Begriff des „individuell erhöhten Augeninnendrucks“ geprägt, der die Möglichkeit einer verringerten Toleranz gegenüber statistisch normalen Druckwerten einschließt.

Im Gegensatz zu den akuten Glaukomen bleibt diese chronische Glaukomform oft lange Zeit unerkannt, weil initial keine Beschwerden auftreten und die Patienten daher erst in einem relativ späten Stadium den bereits fortgeschrittenen Gesichtsfeldverlust bemerken. Bei der Pathogenese dieser Erkrankung scheinen genetische Faktoren eine bedeutende Rolle zu spielen. Bisher konnten drei Gene mit der Entstehung des POWG assoziiert werden, MYOC (Myocilin), OPTN (Optineurin) und WDR36 [21]. Das erste, in Verbindung mit dem Juvenilem Offenwinkelglaukom gefundene Gen war das Myocilin-Gen [22]. Mutationen des Myocilin-Gens sind auch für einige Formen des POWG verantwortlich [23]. Bisher wurden 73 unterschiedliche Mutationen des Myocilin-Gens gefunden, die bei 3 - 4 % der Patienten mit POWG auftreten [14]. Myocilin (früher: TIGR - trabecular meshwork inducible glucocorticoid receptor) wurde im Auge in zahlreichen Geweben nachgewiesen wie Cornea, Iris, Ziliarkörper, Trabekelmaschenwerk, im Kammerwasser und Glaskörper, aber auch in der Retina, der Lamina cribrosa und dem Nervus Opticus [24]. Die Expression von Myocilin ist im Trabekelmaschenwerk, der Sklera und Iris sehr hoch, während im hinteren Augenabschnitt nur geringe Mengen exprimiert werden [23, 25]. In kultivierten Trabekelmaschenwerkzellen wird die Myocilin-Expression durch Behandlung mit Dexamethason induziert [26, 27], was möglicherweise eine Ursache für das Auftreten einer Steroid-induzierten, okulären Hypertension bei einigen Patienten nach Behandlung mit Dexamethason ist [25].

Über die Funktion des Proteins Myocilin ist bisher wenig bekannt und somit der Zusammenhang zwischen Myocilin, Kammerwasserabfluss und Glaukomentstehung nicht geklärt. Da Myocilin-Knockout-Mäuse keine strukturellen Veränderungen des Kammerwinkels zeigen und einen normalen IOD haben [28], scheint ein Funktionsverlust des mutierten Myocilins nicht Ursache für die Glaukomentstehung zu sein. Myocilin wird vom Trabekelmaschenwerk ins Kammerwasser sezerniert, wobei mutiertes Myocilin nicht sezerniert und im Zytoplasma zurückgehalten wird [29]. Die intrazelluläre Akkumulation dieses Proteins könnte die Funktion des Trabekelmaschenwerks beeinträchtigen.

Aus morphologischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Erhöhung des IOD auf einer Zunahme des Abflusswiderstandes im Bereich des Trabekelmaschenwerks beruht. Das Trabekelmaschenwerk des Glaukopatienten weist spezifische morphologische und biochemische Veränderungen wie Akkumulation von extrazellulärer Matrix (EZM), Zellverlust und eine beschleunigte Alterung auf [30, 31].

Die Ursachen und Vorgänge, die zu diesen Veränderungen führen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. An der vermehrten Ablagerung von EZM im Trabekelmaschenwerk ist möglicherweise der Wachstumsfaktor $TGF\beta_2$ beteiligt, der bei etwa 50 % der Patienten mit POWG in erhöhter Konzentration im Kammerwasser nachgewiesen werden konnte [32]. In Zellkulturen und perfundierten, vorderen Augenabschnitten konnte durch Behandlung mit $TGF\beta_2$ eine Vermehrung von EZM induziert werden [33, 34].

1.2 Der intraokulare Druck

Der intraokulare Druck (IOD) wird bestimmt durch die Produktion und den Abfluss des Kammerwassers. Er ist für die Aufrechterhaltung der Form des Bulbus verantwortlich und bewirkt die gleichmäßige Anlagerung der Netzhaut. Der mittlere IOD der Bevölkerung beträgt 15,5 mmHg. Die Normwerte liegen zwischen 10-21 mmHg und sind abhängig vom Lebensalter und der Tageszeit, wobei Tagesschwankungen von weniger als 4 mmHg im Normalbereich liegen [35-39]. Bei dieser rein statistischen Einteilung ist zu beachten, dass der IOD individuell von diesen Werten abweichen kann.

Ein erhöhter IOD gilt noch heute als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer glaukomatösen Schädigung. Es hat sich jedoch gezeigt, dass ein erhöhter IOD nicht zwingend eine Glaukomerkrankung zur Folge hat, wie es bei der okulären Hypertension der Fall ist, und ein Glaukomschaden auch bei einem im Normbereich liegenden IOD auftreten kann, wie das Normaldruckglaukom zeigt [40]. Es scheinen also weitere Faktoren bei der Pathogenese des Glaukoms von Bedeutung zu sein. Dennoch spielt der individuell zu hohe IOD eine große Rolle für die Progression der Erkrankung, denn auch bei einem Normaldruckglaukom kann die Senkung des IOD auf niedrigere Werte den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen [41]. Auch wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit, einen Sehnervenschaden zu bekommen, exponentiell bei einem erhöhten IOD ansteigt [42].

Die „Glaukomschäden“ manifestieren sich vor allem am Sehnervenkopf, der Papilla nervi optici. Durch diese verlassen die Axone der retinalen Ganglienzellen das Auge und bilden retrobulbär den Nervus opticus. An dieser Austrittsstelle der Sehnervenfasern durch die Lamina cribrosa, einen fenestrierten Anteil der Sklera, werden die Axone auf kleinstem Querschnitt gebündelt und sind für Druckschäden am anfälligsten. Die sukzessive Zerstörung der Sehnervenfasern bleibt lange Zeit vom Patienten unbemerkt. Sie manifestiert sich klinisch als glaukomatöse Papillenexkavation und als Verschmälerung des neuroretinalen Randsaums, der die noch verbliebenen Axone enthält. Histopathologisch zeigt sich der Verlust des Nervengewebes in einer Exkavation der Papillenoberfläche, einhergehend mit einer Kompression und Deformation der Lamina cribrosa. Diese morphologischen Veränderungen der Papille gehen den funktionellen Ausfällen (Gesichtsfeldverlust) oft um Jahre voraus und

können bereits in einer früheren Phase der Erkrankung durch entsprechende Untersuchungen des Augenhintergrundes erfasst werden.

Der progressive Axonverlust ist erkennbar an einer Optikus-Atrophie, die mit dem Untergang retinaler Ganglienzellen einhergeht. Dabei ist bisher nicht geklärt, ob der Untergang primär in der retinalen Ganglienzelle oder im Axon in der Papille beginnt und welcher Pathomechanismus vorliegt. Zur primären Schädigung der Papille gibt es zwei Theorien: Nach der mechanischen Theorie führt der erhöhte Druck zu einer direkten Schädigung der Axone durch mechanische Kompression im Bereich der Lamina cribrosa [43], während die vaskuläre Theorie eine Störung der Mikrozirkulation in der Papille verantwortlich macht, die zur Unterversorgung und damit zum Untergang retinaler Ganglienzellen führt [44].

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

1.2.1 Produktion des Kammerwassers

Das Kammerwasser ist eine elektrolyt-, protein- und nährstoffhaltige Flüssigkeit, die durch Aufrechterhaltung der Bulbusform eine formstabile Wölbung der Hornhaut und eine konstante Refraktion des Auges gewährleistet. Weitere Funktionen sind die Ernährung der avaskulären Gewebe, insbesondere der Linse und der Cornea, und die Detoxifikation des Augeninneren, wobei der hohe Ascorbinsäuregehalt zum Abfangen freier Radikale beiträgt [45].

Das Kammerwasser wird vom Ziliarkörperepithel durch einen kombinierten Prozess aus Ultrafiltration und aktiver Sekretion aus dem Blutplasma gebildet und in die hintere Augenkammer sezerniert, wobei die Ultrafiltration eine untergeordnete Bedeutung bei der Kammerwasserproduktion hat. Die treibenden Kräfte für die Kammerwassersekretion sind aktive Transportprozesse im Ziliarkörperepithel [18]. Beteiligte Enzyme sind die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, welche Natrium-Ionen in die Hinterkammer sezerniert, und die Carboanhydrase. Wasser folgt dem durch aktiven Transport aufgebauten osmotischen Gradienten passiv nach. Neben den genannten Enzymen ist das β -adrenerge System an der Kammerwassersekretion beteiligt. Faktoren wie Hypoxie und Hypothermie, die den aktiven Metabolismus hemmen, schränken die Kammerwasserproduktion ein. Der IOD selbst dagegen hat auf die Produktion keinen nennenswerten Einfluss. Durchschnittlich werden 2 - 4 μl Kammerwasser pro Minute gebildet, wobei die Produktion tageszeitlichen Schwankungen unterliegt und während des

Schlafes stark absinkt [46, 47]. Die Kammerwassersekretion nimmt mit zunehmendem Alter ab, bedingt durch Veränderungen in der Ultrastruktur der Ziliarkörperepithelzellen.

1.2.2 Abfluss des Kammerwassers

Das in die Hinterkammer sezernierte Kammerwasser umspült die Linse, fließt durch die Pupille von der hinteren in die vordere Augenkammer und verlässt das Auge über die Abflussstrukturen im Kammerwinkel, der sich zwischen Cornea und Iris befindet (siehe Abbildung 1). Zwei für den Kammerwasserabfluss entscheidende Strukturen sind der Schlemm-Kanal und das Trabekelmaschenwerk. Der Schlemm-Kanal liegt in der perilimbalen Sklera am corneoskleralen Übergang. Die innere Wand des Kanals wird von unregelmäßigen, spindelförmigen Endothelzellen gebildet. Die Begrenzung des Kanals zur vorderen Augenkammer stellt das Trabekelmaschenwerk dar, das sich gitternetzartig über dem Kanal ausdehnt. Der Skleralsporn trennt das Trabekelmaschenwerk vom Ziliarmuskel, dessen Muskelzellen radiär am Skleralsporn ansetzen.

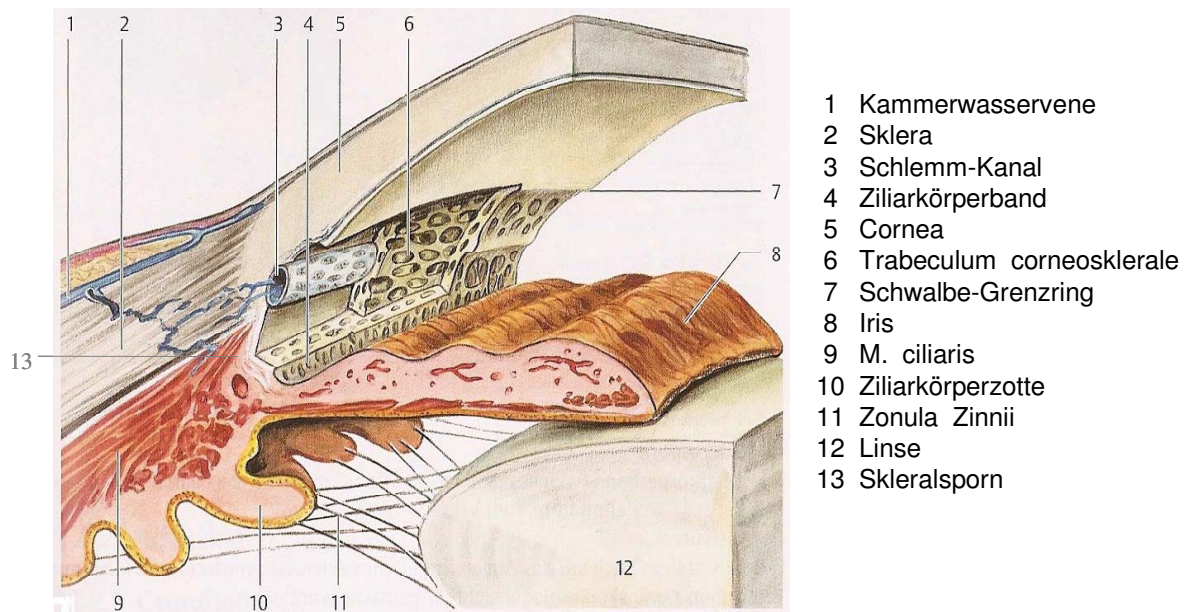
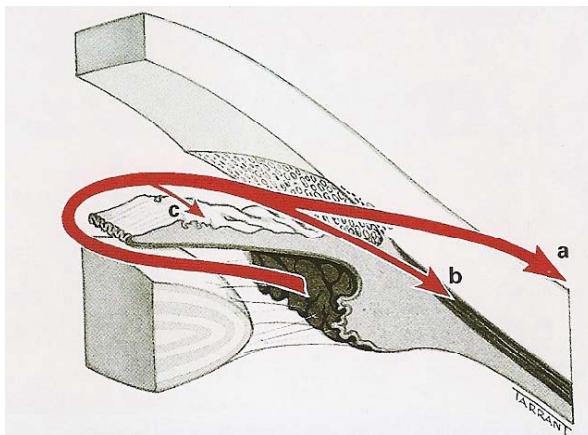


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kammerwinkels [48].

Der Hauptanteil des Kammerwassers (85 %) verlässt das Auge über die trabekuläre (konventionelle) Route (siehe Abbildung 2). Das Kammerwasser fließt durch das Trabekelmaschenwerk in den Schlemm-Kanal und von dort über intrasklerale Sammelkanäle in die episkleralen Kammerwasservenen [49-51]. Dieser Weg ist abhängig vom Druck und der vorhandenen Kammerwassermenge.

Über die uveosklerale Route fließt der geringere Anteil von ca. 15 % des Kammerwassers aus dem Auge ab. Das Kammerwasser gelangt über die Iriswurzel und die interstitiellen Räume des Ziliarmuskels in den suprachorioidalen Raum, von dort in die venösen Gefäße der Iris, des Ziliarmuskels und der Chorioidea und fließt über die Vortexvenen ab. Der Kammerwasserabfluss über den uveoskleralen Weg ist druckunabhängig. Bei jüngeren Menschen kann der uveosklerale Abfluss bis zu 30 % betragen, bei älteren Menschen nimmt er mit zunehmender Hyalinisierung des Bindegewebes im Ziliarmuskel, der den Hauptwiderstand in diesem Abflussweg darstellt, ab.

Ein kaum nennenswerter Anteil des Kammerwassers fließt direkt über die Iris ab. Bei einem Gleichgewicht von Produktion und Abfluss des Kammerwassers wird der Kammerinhalt auf diese Weise alle 1 - 2 Stunden erneuert und der IOD bleibt, von geringen Tagesschwankungen abgesehen, weitgehend konstant.



- a konventionelle Route über das Trabekelwerk
- b uveosklerale Route
- c Abfluss über die Iris

Abbildung 2: *Abflusswege des Kammerwassers [52].*

1.2.3 Regulation des intraokularen Drucks

Da die Kammerwasserproduktion annähernd konstant ist und nur in sehr seltenen Fällen eine Störung der Produktionsrate eintritt, ist für die Regulation des IOD die Beschaffenheit der Abflusswege und damit der Abflusswiderstand von entscheidender Bedeutung [53].

Der Abflusswiderstand des uveoskleralen Abflussweges wird beeinflusst durch den Kontraktionszustand des Ziliarmuskels sowie den Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix dieses Gewebes. Da der Ziliarmuskel durch radiär verlaufende Fasern über den Skleralsporn mit dem Trabekelmaschenwerk verbunden ist, beeinflusst dessen Kontraktionszustand auch den Widerstand des konventionellen Abflussweges. Entscheidend für den Abflusswiderstand dieses Weges ist jedoch die Beschaffenheit des Trabekelmaschenwerks selbst. In den letz-

ten Jahren wurde durch zahlreiche Untersuchungen gezeigt, dass das Trabekelmaschenwerk, entgegen früheren Meinungen, kein passiver Filter ist, sondern dass es selbst aktiv an der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt ist (siehe Kapitel 1.3).

Entscheidend für den Abflusswiderstand sind auch die Endothelzellen, die den Schlemm-Kanal begrenzen. Diese besitzen die einzigartige Fähigkeit, in Abhängigkeit vom Druckgradienten transzelluläre Kanäle zu bilden, die sich dynamisch öffnen und schließen und das Kammerwasser in den Schlemm-Kanal leiten.

Mit zunehmendem Alter kommt es zu Veränderungen der Kammerwasserabflusswege und dadurch zu einer Erhöhung des Abflusswiderstandes. Da gleichzeitig im Alter die Kammerwassersekretionsrate sinkt, bleibt der IOD insgesamt im Normalbereich.

Pathologische Veränderungen des Trabekelmaschenwerks, wie sie beim POWG auftreten, stören das Gleichgewicht zwischen Kammerwassersekretion und -abfluss und führen zu einer Erhöhung des IOD. Diese Störungen machen sich insbesondere bei zunehmendem Alter bemerkbar. Untersuchungen des Trabekelmaschenwerks, der wichtigsten Barriere im konventionellen Abflussweg, bilden daher einen Schwerpunkt der Glaukomforschung.

1.2.4 Therapieansätze zur Senkung des intraokularen Drucks

Alle derzeit in der Therapie des POWG eingesetzten Maßnahmen dienen der Senkung des IOD. Dabei wird zuerst eine medikamentöse Behandlung eingeleitet [54]. Bei einem nicht ausreichenden Effekt der medikamentösen Therapie, Unverträglichkeitsreaktionen oder mangelnder Compliance besteht die Indikation zur drucksenkenden Lasertherapie oder zur operativen Therapie. Es bieten sich prinzipiell zwei Ansatzpunkte zur Behandlung, eine Senkung der Kammerwasserproduktion oder eine Erhöhung des Kammerwasserabflusses. Dabei bietet die Verbesserung des Abflusses den Vorteil, dass die physiologische Kammerwasserproduktion und damit auch die Funktionen des Kammerwassers erhalten bleiben. Wichtig ist hierbei insbesondere das Abfangen freier Radikale, da oxidativer Stress möglicherweise zu den pathologischen Veränderungen des Trabekelmaschenwerks beim Glaukom beiträgt [55, 56].

Bei der medikamentösen Therapie werden in erster Linie lokal applizierbare Medikamente eingesetzt. Zur Senkung der Kammerwasserproduktion werden Carboanhydrase-Hemmer (z.B. Dorzolamid) oder β -Blocker (z.B. Timolol) eingesetzt, eine Erhöhung des Kammerwasserabflusses wird durch Parasympathomimetika (z.B. Pilocarpin), α -adrenerge Agonisten (z.B. Clonidin) oder Prostaglandin-Analoga (z.B. Travoprost, Latanoprost) erreicht. Von den Prostaglandin-Analoga ist bekannt, dass sie zusätzlich eine gefäßdilatorische Wirkung ausüben und dadurch die okuläre Durchblutung verbessern. Somit entfalten sie zusätzlich zur

drucksenkenden eine neuroprotektive Wirkung [57-59]. Häufig werden mehrere Pharmaka kombiniert, um eine optimale Drucksenkung zu erzielen.

Bei den vorwiegend angewandten, drucksenkenden Lasertherapien kann das Kammerwasser-produzierende Gewebe zerstört werden (Zyklophotokoagulation) oder der trabekuläre Abfluss verbessert werden (Lasertrabekuloplastik).

Bewirken diese Therapien keine effektive Drucksenkung, besteht die Möglichkeit zur operativen Therapie. Bei der Trabekulektomie wird dem Kammerwasser ein neuer Abflussweg unter dem Bindegewebe eröffnet. Daneben besteht die Möglichkeit ein Abflussventil einzulegen.

Bei der überwiegenden Zahl der Patienten kann jedoch durch eine medikamentöse Kombinationstherapie die Progression der Erkrankung über einen längeren Zeitraum verhindert oder zumindest verlangsamt werden.

Obwohl der größte Anteil des Kammerwassers über den konventionellen Weg das Auge verlässt, in dem das Trabekelmaschenwerk die wichtigste Barriere darstellt, entfaltet keines der heute in der Pharmakotherapie des Glaukoms eingesetzten Medikamente eine direkte Trabekelmaschenwerk-spezifische Wirkung. Zahlreiche Medikamente wirken entweder hemmend auf die Kammerwassersekretion oder sie beeinflussen den uveoskleralen Abflussweg. Eine Ausnahme bildet das Pilocarpin, welches indirekt über eine Ziliarmuskelkontraktion das Trabekelmaschenwerk beeinflusst. Der Einsatz dieses Medikaments ist jedoch mit Nebenwirkungen wie Akkomodationsstörungen und Störungen der Pupillenmotorik verbunden. Ziel einer optimalen Glaukomtherapie sollte daher sein, den Kammerwasserabfluss über das Trabekelmaschenwerk zu verbessern, ohne dabei andere glatte Muskeln im Auge zu beeinflussen.

1.3 Das Trabekelmaschenwerk

Das Trabekelmaschenwerk spannt sich als lockeres, schwammartiges Gewebe in der Kammerwinkelbucht zwischen Skleralsporn und Schwalbe-Linie der peripheren Cornea aus und bildet die Begrenzung des in der Sklera gelegenen Schlemm-Kanals zur vorderen Augenkammer hin (siehe Abbildung 3).

Im Trabekelmaschenwerk lassen sich drei strukturell und funktionell unterschiedliche Schichten erkennen [33]. Die innere Wand des Schlemm-Kanals bildet die juxtakanalikuläre oder kribriforme Schicht, ein unregelmäßiges Netzwerk feiner Fibrillen. Darüber liegen die corneosklerale Schicht, die sich zwischen Cornea und Sklerasporn aufspannt, und die uveale Schicht, die an die Vorderkammer angrenzt. Bandförmige Trabekellamellen werden von großen Poren durchbrochen, die von Trabekelendothelzellen ausgekleidet sind und zum Endothel des Schlemm-Kanals immer dichter und feiner werden [60].

Das Kammerwasser fließt relativ ungehindert durch die einzelnen Schichten des Trabekelmaschenwerks bis zum juxtakanalikulären Maschenwerk. Dieses kleinporigste, trabekuläre Gewebe bildet zusammen mit der Endothelschicht, die den Schlemm-Kanal begrenzt, den Hauptabflusswiderstand [33].

Die juxtakanalikuläre Schicht ist mit extrazellulärer Matrix (EZM), bestehend aus kollagenen und elastischen Fasern, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen, ausgefüllt. Die Zusammensetzung der EZM ist entscheidend für den Abflusswiderstand und kann zur Abflussbehinderung und Erhöhung des IOD beitragen. Beim POWG konnten verstärkte Ablagerungen verschiedener Materialien in der juxtakanalikulären Schicht sowie Veränderungen der Trabekelmaschenwerk-Morphologie nachgewiesen werden [33]. Auch tritt eine Vermehrung des extrazellulären Materials mit zunehmendem Alter auf.

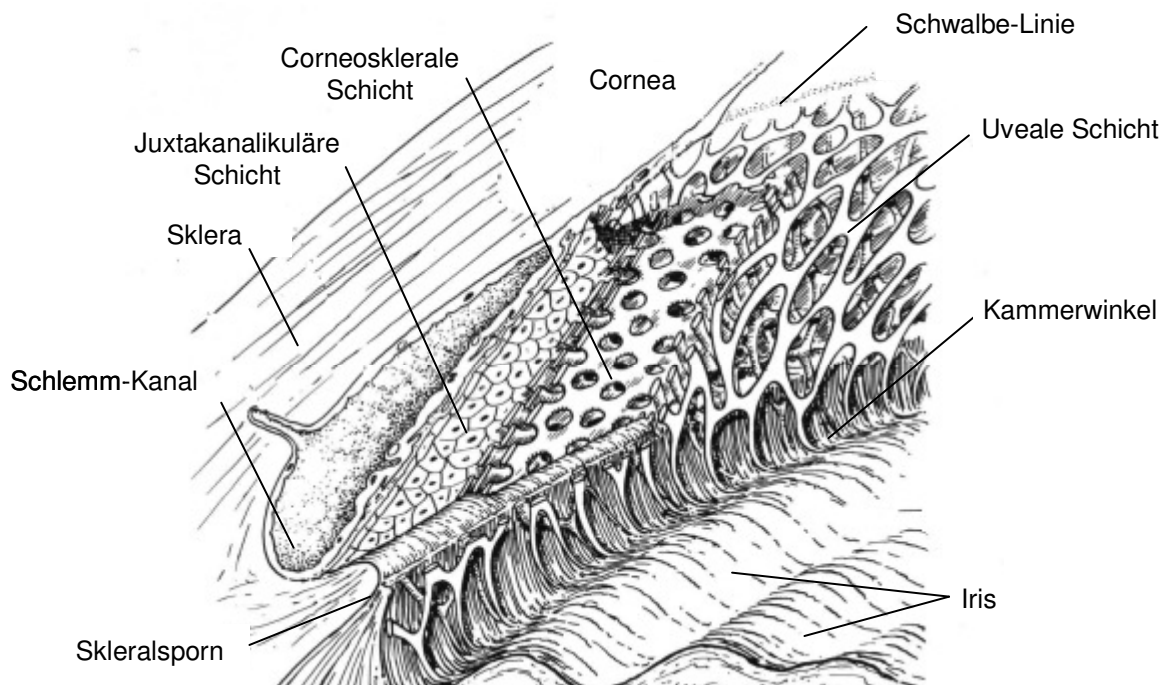


Abbildung 3: Die Schichten des Trabekelmaschenwerks im Kammerwinkel [18].

1.3.1 Trabekelmaschenwerk und Abflusswiderstand

Der Abflusswiderstand wird durch die Größe der intertrabekulären Maschen bestimmt. Eine Verkleinerung dieser Maschen führt zum Anstieg des Abflusswiderstandes, eine Vergrößerung der intertrabekulären Maschen verringert den Abflusswiderstand und damit auch den IOD. Über welchen Mechanismus die Weite der intertrabekulären Maschen reguliert wird ist seit Jahren Gegenstand kontroverser Diskussionen.

Eine Annahme besagt, dass der Abflusswiderstand durch Veränderungen des Zytoskeletts beeinflusst wird [61-67]. In den Zellen des Trabekelmaschenwerks befinden sich Mikrofilamentsysteme, deren Hauptbestandteil das kontraktile, filamentäre Aktin bildet. Extrazelluläre und zytoplasmatische Faktoren wirken auf die Interaktionen des Zytoskelettsystems ein, die den Kammerwasserabfluss regulieren. Auch eine Beteiligung von Mikrotubuli und Intermediärfilamenten an der Regulation des IOD durch das Trabekelmaschenwerk wurde gezeigt.

Ein weiterer Mechanismus, über den das Trabekelmaschenwerk auf den Abflusswiderstand einwirkt, besteht in der Volumenregulation der Zellen [68-71]. In Untersuchungen an perfundierten bovinen und humanen Augenvorderkammern wurde gezeigt, dass gezielte Veränderung des Volumens der Trabekelmaschenwerkzellen durch Änderung der Osmolarität des Perfusats zu Änderungen des Abflusswiderstandes führen [68]. Bei der Volumenregulation des Trabekelmaschenwerks sind Chloridkanäle [71], spannungsabhängige Kaliumkanäle [70], aber auch verschiedene Transporter wie der Na^+/H^+ -Antiporter und der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symporter beteiligt [69], wobei es zur Beteiligung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symporters widersprüchliche Aussagen gibt [69, 72].

Änderungen des Abflusswiderstandes können auch durch den Auf- und Abbau von EZM durch das Trabekelmaschenwerk induziert werden [73]. Trabekelmaschenwerkzellen sind in der Lage, die verschiedenen Komponenten der EZM zu synthetisieren. Gleichzeitig bilden sie Matrixmetalloproteinasen, die den Abbau der EZM bewirken, und deren Inhibitoren. Ein Auf- und Abbau von EZM findet vermutlich ständig im Trabekelmaschenwerk statt und trägt zur Regulation des Abflusswiderstandes bei.

Neben diesen Parametern hat die Kontraktilität sowohl des Ziliarmuskels als auch des Trabekelmaschenwerks einen entscheidenden Einfluss auf die Porengröße. Eine Kontraktion des Ziliarmuskels dehnt das Trabekelmaschenwerk auf, der Abfluss über den konventionellen Abflussweg wird erleichtert und der IOD sinkt (siehe Abbildung 4). Zusätzlich wird durch die Kontraktion des Ziliarmuskels der unkonventionelle Kammerwasserabfluss verringert. Da dieser Effekt jedoch gering ist, bewirken Substanzen, die zur Kontraktion des Ziliarmuskels führen, insgesamt eine Senkung des IOD. Die Maschenweite kann auch durch die Kontraktion bzw. Relaxation des Trabekelmaschenwerks selbst reguliert werden. Eine Kontraktion hat eine Verkleinerung der intertrabekulären Maschen und damit eine Erhöhung des Abflusswiderstandes zur Folge, während eine Relaxation die Vergrößerung der Maschen bewirkt und somit den Kammerwasserabfluss fördert [74, 75].

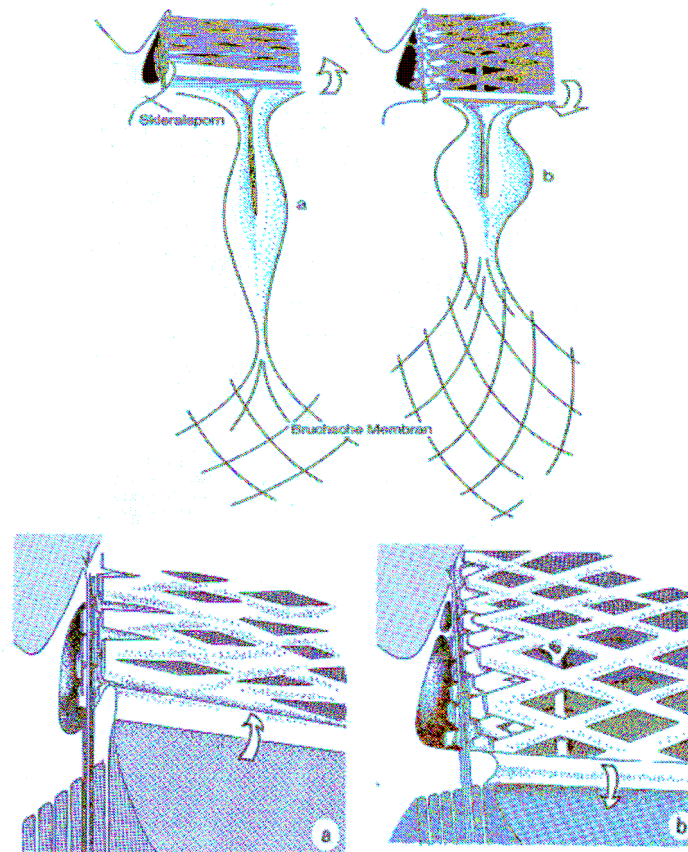


Abbildung 4: Wirkungsmechanismus von Pilocarpin: Bei Kontraktion des Ziliarmuskels induziert durch Pilocarpin werden durch Zug des Muskels am Sklerasporn die intertrabekulären Räume des Trabekelmaschenwerks aufgedehnt (b). Im relaxierten Zustand des Ziliarmuskels sind die Maschen des Trabekelmaschenwerks enger und der Abflusswiderstand höher (a) (modifiziert nach [76]).

1.3.2 Das Trabekelmaschenwerk als kontraktiles Gewebe

Entgegen der früheren Vorstellung, dass das Trabekelmaschenwerk als passiver Filter der Beeinflussung des Ziliarmuskels unterliegt, weiß man heute, dass das Gewebe kontraktile Eigenschaften besitzt und aktiv an der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt ist. Barany war 1962 der Erste, der dem Trabekelmaschenwerk Glattmuskel-ähnliche Fähigkeiten zuschrieb [77]. 1991 konnte erstmals an bovinem Trabekelmaschenwerk eine pharmakologisch ausgelöste Kontraktion nachgewiesen werden [78]. 2005 konnte an einem in vitro Zellkulturmodell der Nachweis für die Kontraktilität von humanem Trabekelmaschenwerk erbracht werden [79]. Kontraktionen des Trabekelmaschenwerks können durch cholinerge und α -adrenerge Agonsiten induziert werden, während β -adrenerge Agonisten eine Relaxation von vorkontrahiertem Gewebe auslösen [80]. Die cholinerge Stimulation verläuft im We-

sentlichen über den muskarinergen M3-Rezeptor, aber auch der M2-Rezeptor wurde im Trabekelmaschenwerk nachgewiesen und ist an der Kontraktion beteiligt, während der M1-Rezeptor eher eine untergeordnete Bedeutung hat [80, 81]. Auch durch den Vasokonstriktor Endothelin konnten Kontraktionen des Trabekelmaschenwerks induziert werden [78, 79, 82-87].

Die Untersuchungen zur Kontraktilität von Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel zeigten, dass die beiden glattmuskulären Gewebe auf alle untersuchten Substanzen jeweils gleichsinnig reagierten, also entweder eine Kontraktion oder eine Relaxation zeigten [78, 80, 88]. Da die Kontraktion der beiden Gewebe einen gegensinnigen Effekt auf den Abflusswiderstand hat, liegt ein funktioneller Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel vor [89]. Es wurden jedoch Unterschiede in der Effektivität der Substanzen zwischen beiden Geweben gefunden. Überwiegt der Effekt einer Kontraktions-induzierenden Substanz auf den Ziliarmuskel, wie es für Parasympathomimetika beschrieben ist, so resultiert daraus eine Senkung des Abflusswiderstandes und damit des IOD (siehe Abbildung 5).

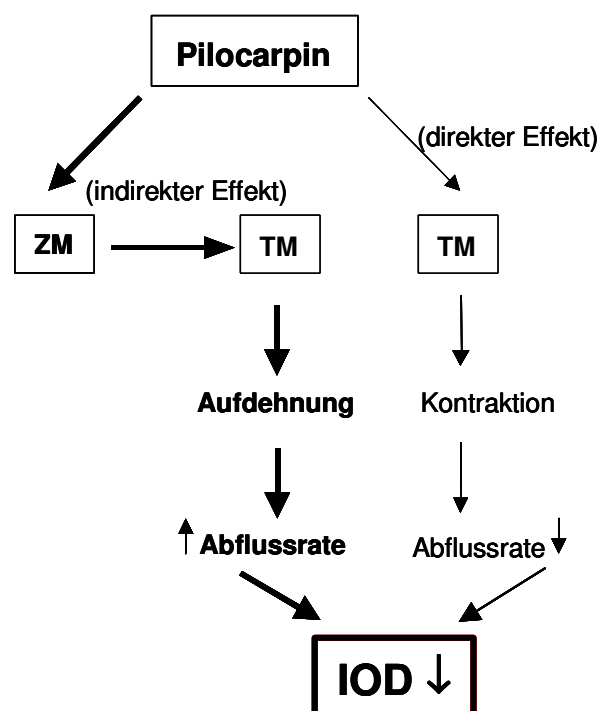


Abbildung 5: Funktioneller Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk (TM) und Ziliarmuskel (ZM). Eine Kontraktion des ZM, induziert durch Pilocarpin, führt über eine Aufdehnung des TM zu einer Steigerung der Abflussrate, während eine Kontraktion des TM zu einer Abnahme der Abflussrate führt. Da der Effekt von Pilocarpin auf den ZM überwiegt, resultiert daraus insgesamt eine Senkung des IOD (modifiziert nach [89]).

Für den Vasokonstriktor Endothelin wurde dagegen gezeigt, dass die Wirkung auf das Trabekelmaschenwerk stärker ist als auf den Ziliarmuskel [78], was eine Erhöhung des Abflusswiderstandes und des IOD durch Endothelin erklären würde.

1.4 Endothelin

Im Jahr 1985 wurde gezeigt, dass das Endothel von Blutgefäßen eine bislang unbekannte, stark vasokonstringierende Substanz sezerniert [90], die endothelium-derived constricting factor genannt wurde und als Peptid mit einem Molekulargewicht von 3 kDa identifiziert wurde [91]. Diese Substanz konnte später aus kultivierten Endothelzellen isoliert und sequenziert werden und wurde Endothelin genannt [92].

Endothelin ist ein Polypeptid aus 21 Aminosäuren und gehört zu den stärksten bekannten Vasokonstriktoren. Bisher wurden drei verschiedene Isoformen des Endothelins identifiziert (Endothelin-1 bis -3) [93], die von unterschiedlichen Genen kodiert werden [94, 95]. Endothelin-1 ist die potenteste und im Körper am weitesten verbreitete Isoform [92, 93, 96-98]. 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) aus 37-41 Aminosäuren, die durch spezifische Endothelin-Converting-Enzyme zu den wirksamen Endprodukten umgewandelt werden [98-100].

Endotheline werden nicht nur in Endothelzellen produziert, sondern wurden auch in anderen Zellen und Geweben nachgewiesen, wobei die Expression der einzelnen Isoformen gewebe-spezifisch ist. So fand man Endothelin-1 in den glatten Muskelzellen der Gefäße, im Herzen, in der Niere und im zentralen Nervensystem. Die Bedeutung der vasokonstriktorisches Eigenschaften des Endothelins für die Entstehung zahlreicher, vor allem kardiovaskulärer Erkrankungen ist hinreichend erwiesen [98]. Auch konnten Effekte auf verschiedene Strukturen des Auges und eine Beteiligung an der Pathogenese des Glaukoms gezeigt werden (siehe Kapitel 1.4.2).

1.4.1 Endothelin-Rezeptoren

Die drei bekannten Isopeptide des Endothelin, Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3, binden mit unterschiedlicher Affinität an zwei pharmakologisch und funktionell unterschiedliche Rezeptoren, den Endothelin-A-Rezeptor (ET-AR) und den Endothelin-B-Rezeptor (ET-BR) [101]. Die Existenz und Funktion eines weiteren Rezeptors (ET-CR) wird noch kontro-

vers diskutiert. Dieser wurde bisher nur in *Xenopus*-Arten nachgewiesen und bindet bevorzugt Endothelin-3 [102, 103].

Endothelin-Rezeptoren gehören zu den klassischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen sieben Transmembrandomänen, die durch drei extrazelluläre und drei zytoplasmatische Loops voneinander getrennt sind. Endothelin-Rezeptoren haben eine Größe von 35 bis 70 kDa. Die Aminosäuresequenzen der zwei Subtypen, ET-AR und ET-BR, sind zu etwa 59 % identisch. Sie unterscheiden sich vor allem am extrazellulären N-Terminus und am zytoplasmatischen C-Terminus [95].

Die beiden Rezeptoren werden in den verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedlich stark exprimiert. ET-AR finden sich hauptsächlich auf glatten Muskelzellen der Gefäße und Kardiomyozyten und vermitteln kontraktile Effekte [104, 105]. Sie binden Endothelin-1 besser als Endothelin-2 und Endothelin-3, wobei die Affinität für Endothelin-1 1000fach höher ist als die für Endothelin-3 [106]. ET-BR werden hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert und bewirken über die Freisetzung von NO aus dem Gefäßendothel eine Vasodilatation [107]. ET-BR wurden auch auf glatten Muskelzellen gefunden, wo ET-BR spezifische Agonisten eine Kontraktion auslösen [97, 108, 109]. Daher wird angenommen, dass auf glatter Muskulatur und Gefäßendothel verschiedene ET-BR-Subtypen exprimiert werden. Vermutlich handelt es sich dabei um verschiedene Splicing-Varianten identischer mRNA [108], deren Bedeutung aber bislang ungeklärt ist, da keine pharmakologischen Unterschiede in der Rezeptorbindung festgestellt werden konnten [110].

1.4.2 Endothelin im Auge

Endothelin-1 wurde im Kammerwasser von humanen und bovinen Augen nachgewiesen, dort liegt es in zwei bis drei mal höherer Konzentration als im Plasma vor [111]. Bedingt durch die Blut-Retina-Schranke im hinteren Abschnitt des Auges und die Blut-Kammerwasser-Schranke im Vorderabschnitt kann Endothelin-1 nicht über den Blutweg ins Auge gelangen, was auf eine lokale Synthese und Sekretion hindeutet. In immunhistochemischen Studien wurde gezeigt, dass Endothelin-1 im humanen Auge vor allem in der Vorderkammer, aber auch in der Chorioidea, in retinalen Blutgefäßen, im retinalen Pigmentepithel und im Nervus opticus vorliegt [112, 113]. In der Vorderkammer konnte Endothelin-1 mittels Immunfärbung in allen Schichten der Cornea entdeckt werden und auch in allen Abschnitten des Trabekelmaschenwerks. Untersuchungen zur Expression von Endothelin-1 mRNA in der Vorderkammer des Auges mittels in situ Hybridisation zeigten ein positives Signal in der Iris, dem Ziliarkörper und dem Ziliarmuskel. Eine starke Expression zeigte sich im nicht pigmentierten Ziliarkörperepithel [113]. Der Nachweis von Endothelin-Converting-Enzym im Ziliarkörperepithel deutet darauf hin, dass dieses Gewebe Endothelin-1 produziert und ins Kam-

merwasser sezerniert [114]. Das zeigten auch Untersuchungen an Kulturen von humanen, nicht pigmentierten Ziliarkörperepithelzellen, bei denen Endothelin-1 mittels Radioimmunoassay im Kulturmedium nachgewiesen wurde [111]. Die lokale Synthese dieses Peptids deutet auf eine physiologische Rolle im Auge hin. Es wurden zahlreiche okuläre Wirkungen des Vasokonstriktors beschrieben (Übersichtsarbeit: [115]), dazu gehören Hemmung der Kammerwasserproduktion [116], Modulation des okulären Blutflusses [117, 118], Stimulation von Astrozytenproliferation [119], Hemmung des anterograden, axonalen Transports [120] und Regulation der Kollagensynthese in der Lamina cribrosa [121]. Aufgrund dieser Effekte hat Endothelin-1 sowohl einen Einfluss auf die Homöostase in der Vorderkammer und damit auf den IOD als auch auf die Funktion retinaler Ganglienzellen. Die genaue Bedeutung von Endothelin-1 im gesunden Auge ist bisher nicht vollständig geklärt und daher Gegenstand intensiver Forschung.

1.4.3 Bedeutung von Endothelin für das Glaukom

Die Frage, ob Endothelin an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt ist, stellte sich, als in den ersten Untersuchungen zur Wirkung von Endothelin-1 auf die am Kammerwasserabfluss beteiligten Gewebe nachgewiesen wurde, dass dieses Peptid eine Kontraktion sowohl des Trabekelmaschenwerks als auch des Ziliarmuskels induziert [78]. Diese Ergebnisse ließen einen Einfluss von Endothelin-1 auf den Kammerwasserabfluss und damit auf den IOD vermuten und führten zu weiteren Untersuchungen, die nach einer Verbindung zwischen Endothelin und Abflusswiderstand suchten.

Messungen der Endothelin-1-Konzentration im Kammerwasser ergaben, dass diese bei Patienten mit POWG höher ist als in einer nichtglaukomatösen Kontrollgruppe [122, 123]. Auch in Tiermodellen zum Glaukom wurden erhöhte Endothelin-1-Konzentrationen im Kammerwasser nachgewiesen [124, 125]. Diese Befunde deuten eine Beteiligung von Endothelin-1 an der Pathogenese des Glaukoms an und rückten den Vasokonstriktor weiter in das Interesse der Glaukomforschung.

Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen ergaben, dass die okuläre Applikation von Endothelin-1 einen Einfluss auf die Kammerwasserproduktion und den Kammerwasserabfluss hat [74, 126, 127]. Mehrere Studien mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen zeigten, dass die Erhöhung der Endothelin-1-Konzentration im Kammerwasser zu einem Anstieg des IOD führt [128-131]. Ferner wurde beobachtet, dass Endothelin-1 eine Hemmung des chorioidalen [118] und retinalen [117] Blutflusses verursacht, die zur Schädigung retinaler Ganglienzellen und zu pathologischen Veränderungen des Sehnervenkopfs führt [132, 133]. Zudem ließ sich bei Kaninchen und Affen durch intraokuläre und retrobulbäre Endothelininjektionen eine Optikusneuropathie ähnlich der glaukomatösen Papillenveränderungen erzeugen [134, 135]. Diese zahlreichen Untersuchungen belegen, dass Endothelin

über die mechanische und auch über die vaskuläre Komponente die Pathogenese des Glaukoms beeinflusst.

Somit ist die okuläre Wirkung von Endothelin im Hinblick auf einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt für die Behandlung des Glaukoms interessant. Eine Antagonisierung der Endothelin-Effekte bietet ein vielversprechendes Therapiekonzept, einerseits durch die Förderung der Durchblutung infolge von Vasodilatation retinaler und chorioidaler Gefäße [136, 137], andererseits durch eine Senkung des IOD infolge von Trabekelmaschenwerksrelaxation [82, 86].

Thema der vorliegenden Arbeit sind die Endothelin-induzierten Signalwege, die eine Kontraktion des Trabekelmaschenwerks auslösen. Die genauen Kenntnisse dieser Signalwege bieten Möglichkeiten zur gezielten Inhibition. Die Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk könnte eine neue Möglichkeit der pharmakologischen Glaukomtherapie darstellen.

2 Untersuchung des Trabekelmaschenwerks

Als Untersuchungsobjekt diente vorwiegend Trabekelmaschenwerk aus bovinen Augen, die von einem örtlichen Schlachthof bezogen wurden. Das Alter der Tiere, deren Augen verwendet wurden, lag zwischen 2 und 4 Jahren. Daneben wurden Untersuchungen an humanem Trabekelmaschenwerk aus enukleierten Augen oder Skleralringen, die nach durchgeführten Keratoplastiken zur Verfügung standen, durchgeführt.

2.1 Präparation des Gewebes

Die Präparation des bovinen Trabekelmaschenwerks erfolgte sowohl für die Kontraktionsmessungen als auch für die Anlage der Zellkulturen nach der von Lepple-Wienhues beschriebenen Methode [138], wobei die Präparation für die Kultivierung von Zellen unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde.

Bei der Präparation wurde zunächst der Bulbus vorsichtig von dem umgebenden Fettgewebe, den Augenlidern und der äußeren Muskulatur befreit. Anschließend wurde das Auge entlang des Äquators halbiert und der hintere Abschnitt verworfen. Vom vorderen Augenabschnitt wurden Linse, Linsenkapsel und Glaskörperreste entfernt. Anschließend wurde dieser in gleichgroße Abschnitte aufgeteilt, die auf einer Unterlage fixiert und unter mikroskopischer Sicht weiterpräpariert wurden. Mit einer Pinzette wurde die Iris vorsichtig angehoben, bis am korneoskleralen Übergang das *Ligamentum pectinatum* sichtbar war, was dann durchtrennt wurde. Die Iris und das an sie anschließende Ziliarkörperepithel konnten durch feine Horizontalschnitte abpräpariert werden, bis das grauweiße Trabekelmaschenwerk und die blauschwarze, radiär verlaufende Schicht der Ziliarmuskulatur freilagen. Zirkulär verlaufende Ziliarmuskelfasern wurden dabei mit dem Ziliarepithel entfernt und verworfen. Durch Längsschnitte in den Ziliarmuskel entsprechend der Faserrichtung wurde dieser in feine Gewebestreifen zerteilt, die dann vom quer gelegenen Trabekelmaschenwerk getrennt wurden. Um eine „Kontamination“ des verbleibenden Trabekelmaschenwerks durch Fremdgewebe, wie etwa einstrahlende Ziliarmuskelfasern, zu vermeiden, wurden als nächstes zwei vertikale Schnitte parallel zum Ansatz des *Ligamentum pectinatum* an den beiden Rändern des Trabekelmaschenwerks durchgeführt. Anschließend wurde der Trabekelmaschenwerk-Streifen vorsichtig von der Sklera abgelöst und in kleinere Streifen zerteilt, die dann für die Kontraktionsexperimente oder das Anlegen von Zellkulturen verwendet wurden.

Die Präparation bei humanem Gewebe erfolgte in ähnlicher Weise. Die humanen Augen wurden unmittelbar nach ihrer E nukleation auf Eis gelagert und präpariert. Unter mikroskopischer Sicht wurden die Augen äquatorial eröffnet. Nach der Durchtrennung der Zonulafasern und Entfernung der Linse konnte der Ziliarkörper mit der Iris von der Sklera gelöst werden. Das Trabekelmaschenwerk konnte bei humanen Augen hier durch das Einlegen eines feinen

Drahtes (\varnothing 0,5 mm) in den Schlemm-Kanal (ähnlich der Trabekulotomiesonde nach *Harms*) sichtbar gemacht werden. Entlang dieses Drahtes wurden dünne Streifen des Trabekelmaschenwerks abpräpariert. Daneben wurde humanes Trabekelmaschenwerk aus Skleralringen präpariert. Diese wurden halbiert und das Trabekelmaschenwerk durch das Einlegen eines Führungsdrahtes in den Schlemm-Kanal markiert. Im humanen Auge besteht eine enge morphologische Verbindung zwischen Ziliarmuskel und Trabekelmaschenwerk, so dass eine Trennung der beiden Gewebe voneinander notwendig ist, was durch diese spezielle Präparationstechnik ermöglicht wurde.

2.2 Messung der Kontraktilität

Während die kontraktilen Eigenschaften von isolierten Ziliarmuskelstreifen verschiedener Spezies bereits früh beschrieben wurden [139, 140], konnte eine Kontraktion des bovinen Trabekelmaschenwerks erstmals 1991 in der Arbeitsgruppe von Professor Wiederholt in Berlin gemessen werden [78], der damit die Grundsteine für die Erforschung der Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks als Regulator des IOD legte. Seitdem wurden die kontraktilen Eigenschaften des Trabekelmaschenwerks umfassend untersucht und die Wirkung zahlreicher Kontraktions-auslösender und Kontraktions-inhibierender Substanzen am Trabekelmaschenwerk getestet [80-82, 86-89, 138, 141-147]. Die Messung der Kontraktilität erfolgte mit Hilfe eines Kraft-Längenmessers, der die isometrische Kontraktion von isolierten Gewebestreifen aufzeichnete. Das Messprinzip bestand darin, dass die isolierten Trabekelmaschenwerk-Streifen in einer Perfusionskammer mit der Versuchslösung inkubiert wurden und gleichzeitig an den Kraft-Längenmesser angeschlossen waren (siehe Abbildung 6). Eine Kontraktion resultierte in der Rotation einer Spule, die an einen kleinen Hebel angeschlossen wurde. Die aufgetretene Rotation wurde durch eine Photodiode registriert und in eine Spannung umgerechnet, die der Kraft entgegenwirkte. Die Spannung, die für diese Gegenreaktion aufgewendet werden musste, wurde auf Mikronewton (μN) kalibriert. Mit dieser Methode gelang es, Kräfte in einem Messbereich von 0,5 - 2000 μN zu erfassen. Die Kraft der präparierten Trabekelmaschenwerk-Streifen mit einer Länge von 2 - 4 mm und einer Dicke von 0,5 mm lag im Durchschnitt zwischen 50 - 500 μN . Die zu untersuchenden Substanzen wurden mit der Versuchslösung appliziert und somit der Effekt auf die Kontraktilität direkt gemessen (siehe Kapitel 3.1 bis 3.5).

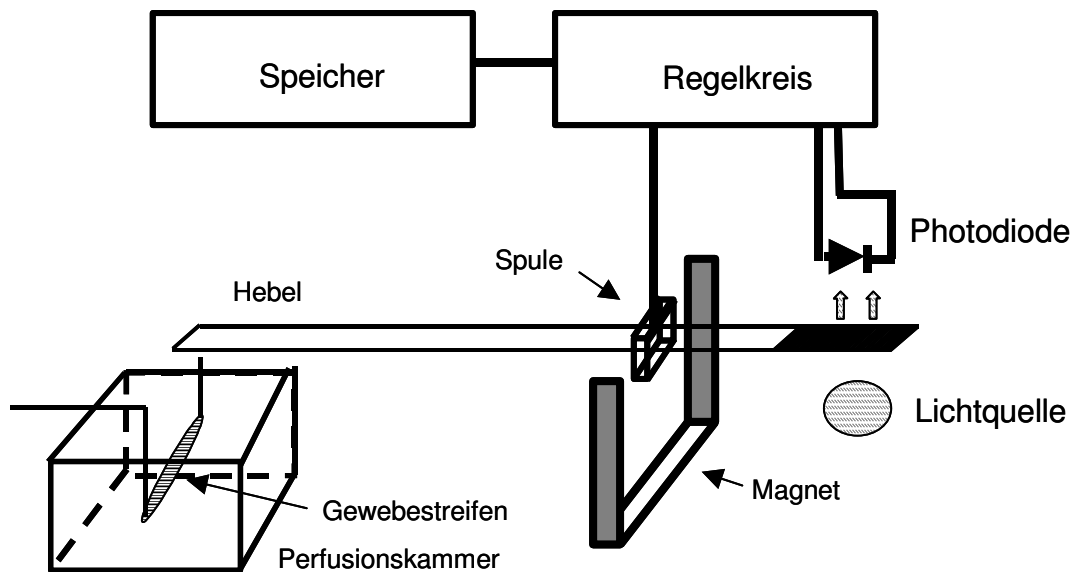


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Kraft-Längen-Messers. Auslenkung des mit der Spule verbundenen Hebels durch eine Kontraktion des Gewebes führt zum Lichteinfall an der Photodiode. Über einen Regelkreis wird der Hebel in seine Ausgangsposition zurückgestellt, so dass die Länge des Gewebestreifens konstant gehalten und eine isometrische Kontraktion gemessen wird. Die dafür benötigte Spannung wird aufgezeichnet und graphisch dargestellt (modifiziert aus [138]).

Trotz standardisierter Präparation der Augen ließen sich Unterschiede in der Dicke, Länge und Qualität der Gewebestreifen nicht vermeiden. Um die Messergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde die jeweils gemessene Kontraktionskraft ins Verhältnis zur maximal erreichbaren Kontraktion, ausgelöst durch 10^{-6} M Carbachol, gesetzt. Die Carbachol-induzierte Kontraktion wurde zu Beginn jedes Versuches vor Applikation der zu untersuchenden Substanzen registriert (siehe Abbildung 7).

Mittels dieser Untersuchungen wurde die Endothelinwirkung auf das Trabekelmaschenwerk, die daran beteiligten Rezeptoren und die Antagonisierung der Endothelineffekte untersucht. Kontraktionsmessungen wurden ausschließlich an isoliertem, bovinem Trabekelmaschenwerk durchgeführt. Da vergleichbare, direkte Messungen an humanem Trabekelmaschenwerk bisher nicht möglich sind, ist das bovine Modell zur Untersuchung der Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks seit vielen Jahren gut etabliert und akzeptiert [89, 141]. Mit proteinbiochemischen Methoden konnten alle wesentlichen Elemente eines kontraktiven Apparates in Zellkulturen sowohl vom bovinen als auch vom humanen Trabekelmaschenwerk nachgewiesen werden [87, 145, 146]. Auch die intrazellulären Kalziumsignale nach Applikation von Kontraktions-induzierenden Substanzen deuten auf gleiche intrazelluläre Signalwege in bovinem und humanem Trabekelmaschenwerk hin [86, 148]. Neben diesen Übereinstimmungen zwischen bovinem und humanem Gewebe gibt es weitere Hinweise für die Kontraktilität

von humanem Trabekelmaschenwerk. So konnte gezeigt werden, dass kultivierte humane Trabekelmaschenwerkzellen auf die Applikation von Endothelin-1 mit einer Oberflächenverkleinerung reagieren, die die Autoren auf eine Kontraktion des Zytoskeletts zurückführen [79, 85]. Ferner konnten in Kollagengelen mit eingebetteten, humanen Trabekelmaschenwerkzellen Gelkontraktionen ausgelöst werden, die in zellfreien Kollagengelen nicht nachweisbar waren und die durch Hemmung von Kontraktions-induzierenden Signalmolekülen inhibiert werden konnten [149].

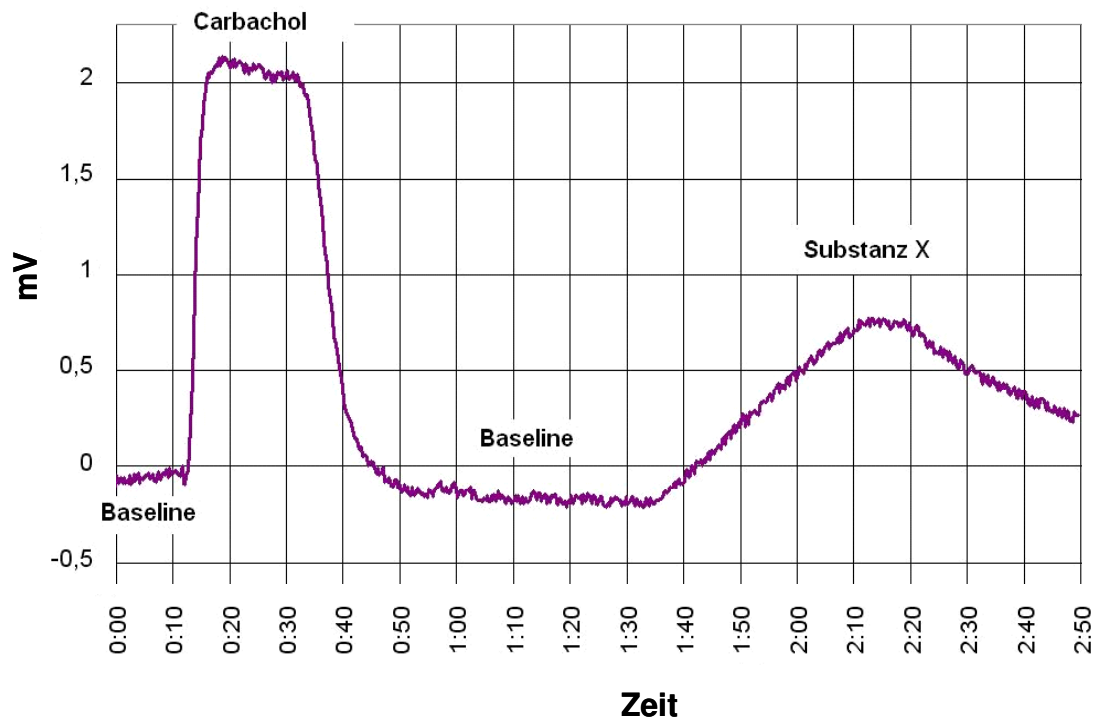


Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf einer Kontraktionsmessung, gezeigt anhand einer Originalregistrierung. Die Kontraktion der zu testenden Substanz x wurde ins Verhältnis zur Maximalkontraktion von Carbachol gesetzt.

2.3 Zellkulturtechniken

Mit der Entwicklung von Zellkulturtechniken wurden viele Gewebe für in vitro Untersuchungen zugänglich. An kultivierten Zellen wurden umfangreiche molekularbiologische und elektrophysiologische Untersuchungen sowie fluorimetrische Messungen des intrazellulären Kalziums durchgeführt. Diese Untersuchungen dienten zum Nachweis der Übertragbarkeit der an bovinem Gewebe erhobenen Daten auf humanes Gewebe. Da der direkte Vergleich der am bovinen Trabekelmaschenwerk erhobenen Kontraktionsdaten mit humanem Gewebe nicht möglich ist, wurden die an bovinen und humanen Zellkulturen erhobenen Befunde mit-

einander verglichen und zeigten große Übereinstimmungen, so dass eine Übertragbarkeit der bovinen Kontraktionsdaten auf humanes Gewebe als zulässig erscheint.

Die Anzucht der bovinen Trabekelmaschenwerkzellen gelang aus den für die Kontraktionsversuche benötigten Augen. Die enukleierten, humanen Augen waren überwiegend solche, die von einem malignen Aderhautmelanom befallen waren und wegen der Tumorgroße und/oder Tumorlokalisation (Optikusnähe oder Optikusinfiltration) nicht strahlentherapeutisch behandelt werden konnten. Es wurden nur Augen für die Kultivierung herangezogen, bei denen weder ein Tumoreinbruch in die vorderen Augenabschnitte noch eine Tumorausssaat in den Glaskörperraum oder die Vorderkammer vorlag. Dadurch wurde verhindert, dass durch Tumorzellen verändertes Trabekelmaschenwerk oder maligne Zellen selbst in Kultur gelangten. Daneben wurde humanes Trabekelmaschenwerk aus Skleralringen kultiviert.

Die durch die Präparation erhaltenen Gewebestreifen wurden in Petrischalen unter einem Deckglas in einem Gasgemisch von 95 % Luft und 5 % Kohlendioxid bei 37°C mit einem speziellen Kulturmedium inkubiert, das fötales Kälberserum zur Proliferationsstimulation und Antibiotika zur Verhinderung von bakteriellen Infektionen enthielt.

Die Zellkulturexperimente wurden nicht an Primärkulturen, sondern an passagierten Zellen der 3. bis 5. Passage durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz mit der Trypsin/EGTA Methode passagiert. Zellen höherer Passagen wurden nicht benutzt, da eine Veränderung der Zellen nach der sechsten Passage nicht mehr auszuschließen war. Die Charakterisierung der ersten, nach dieser Methode erhaltenen, humanen Primärkulturen erfolgte durch Untersuchungen im Anatomischen Institut II der Universität Erlangen von Frau Prof. Elke Lütjen-Drecoll. Hierbei wurde eine Screening auf glattmuskelspezifische Oberflächenmarker sowie den Faktor VIII durchgeführt. Die Primärkulturen wurden so auf Trabekelmaschenwerkzellen überprüft.

2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht die Untersuchung von Ionenströmen an biologischen Membranen. Sie wurde in den siebziger Jahren von Neher und Sakmann entwickelt, die erstmalig Einzelkanalmessungen von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren an Muskelzellmembranen aufzeichneten [150] und für ihre Forschung zur Funktion einzelner Ionenkanäle 1991 den Nobelpreis für Medizin erhielten. In den darauffolgenden Jahren konnte die Methode entscheidend weiterentwickelt und verbessert werden [150, 151], so dass sie heute für Ableitungen an allen Zelltypen eingesetzt wird und zu den am meisten angewandten elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden gehört.

Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von etwa 1 µm mit einer Elektrolytlösung gefüllt und vorsichtig auf die Oberfläche einer Zelle aufge-

setzt. Die Elektrolytlösung in der Pipette ist über eine Elektrode mit einem extrem empfindlichen Verstärker verbunden, der kleinste Ionenströme in der Membran misst. Durch leichten Unterdruck in der Glaspipette wird eine extrem hochohmige Verbindung zwischen Glaswand und Zellmembran hergestellt, der „Gigaohmseal“. In dieser „cell-attached“ Konfiguration können die Ionenkanäle unter der Pipettenöffnung gemessen werden (siehe Abbildung 8). Wenn man den Unterdruck verstärkt oder einen kurzen Spannungspuls anlegt, wird die Zellmembran durchbrochen und die Pipette bildet mit der ganzen Zelle eine Einheit („whole-cell“ Konfiguration). Durch ruckartige Bewegung in der „cell-attached“ Konfiguration kann das Membranstück von der Zellmembran abreißen und an der Pipette zurückbleiben („excised-patch“ Konfiguration) und die Ionenkanäle dieses Membranabschnitts können isoliert analysiert werden. Bei dieser Konfiguration unterscheidet man die „inside-out“ und die „outside-out“-Konfiguration, bei der die ursprüngliche Membrannenseite bzw. Membranaußenseite der Badlösung zugewandt ist.

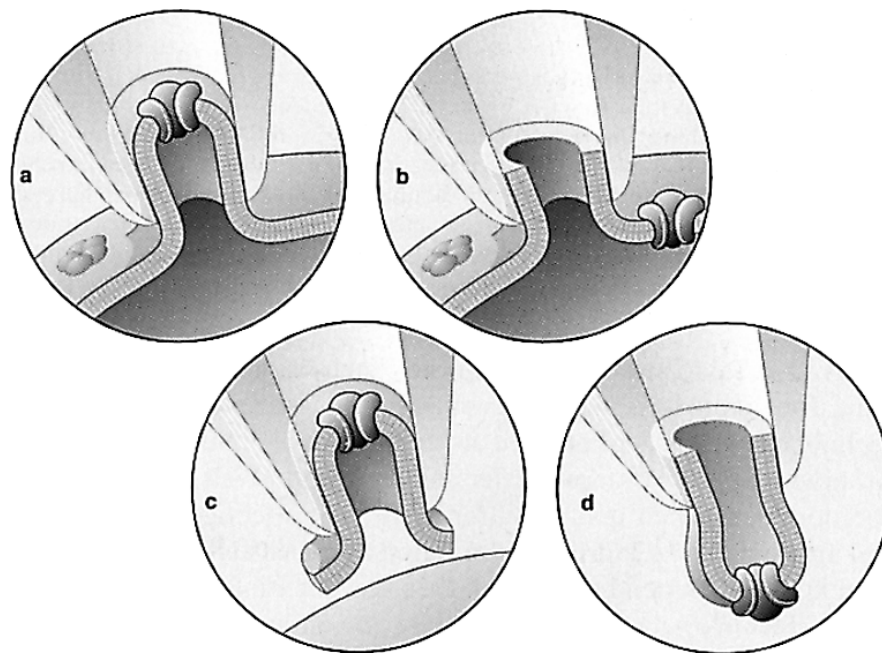


Abbildung 8: Varianten der Patch-Clamp-Technik (a) „cell-attached“-Konfiguration, (b) „whole-cell“-Konfiguration, (c) „inside-out“-Konfiguration, (d) „outside-out“-Konfiguration (aus [152]).

Bei der „whole-cell“-Konfiguration ist das Zellinnere nach einer kurzen Äquilibrierungszeit mit der Pipettenlösung gefüllt, so dass intrazelluläre Substanzen, die für die Funktion vieler Kanäle notwendig sind, wie ATP oder Enzymsysteme, nach kurzer Zeit ausgewaschen werden. Das führt zum sog. „run-down“ der Ströme, d.h. die gemessenen Ströme werden unabhängig von der Aktivierung der Ionenkanäle mit fortschreitender Dauer des Experiments immer geringer. Um Ganzzelleableitungen derartiger Kanäle zu ermöglichen, wurde der „perforated-

patch“ entwickelt, bei dem der Membranfleck unter der Pipettenöffnung durch einen Porenbildner permeabilisiert wird. Dadurch wird eine elektrisch leitende Verbindung zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem hergestellt, die der bei der „whole-cell“-Konfiguration ähnlich ist. Ein häufig genutzter Porenbildner ist das bakterielle Antibiotikum Nystatin, das in der Membran Poren für einwertige Kationen und in geringem Maße auch für Chloridionen bildet. Auf diese Weise gleichen sich lediglich die intrazellulären Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid einige Zeit nach der Porenbildung denen der Pipettenlösung an, ohne dass andere Komponenten des intrazellulären Milieus verändert werden.

Alle Patch-Clamp-Untersuchungen wurden in der „perforated-patch“ Konfiguration an Zellkulturen durchgeführt. An kultivierten bovinen und humanen Zellen wurden die Ionenkanäle untersucht, die für glattmuskuläre Funktionen von Bedeutung sind. Dazu gehört der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal mit hoher Leitfähigkeit (Maxi- K^+ -Kanal), der in hoher Dichte in Zellmembranen des Trabekelmaschenwerks vorliegt und an der Regulation des Membranpotentials maßgeblich beteiligt ist [153-155]. Seine Aktivierung erfolgt durch eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und durch Depolarisation der Zelle.

Eine Bedeutung für den Kalziumeinstrom in die Zelle und damit auch für die Kontraktion hat der spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanal, der im bovinen und humanen Trabekelmaschenwerk elektrophysiologisch nachgewiesen wurde [156]. Die Aktivität dieser Kanäle wird durch muskarinerge Agonisten wie Carbachol und Acetylcholin gesteigert. Eine Aktivierung von Endothelin-Rezeptoren bewirkt ebenfalls einen Einstrom von Kalzium in Trabekelmaschenwerkzellen, jedoch ohne Beteiligung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen [157] (siehe Kapitel 3.6).

2.5 Messung des intrazellulären Kalziums

Glattmuskuläre Kontraktionen können über verschiedene intrazelluläre Signalwege vermittelt werden, die sowohl abhängig als auch unabhängig von Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgen. Für das Trabekelmaschenwerk wurde sowohl eine Kalziumunabhängige als auch eine durch Anstieg des intrazellulären Kalziums ausgelöste Kontraktion nachgewiesen. Daher wurde zur Ergänzung der Kontraktionsdaten die Wirkung von Substanzen auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration untersucht. Diese Untersuchungen wurden an kultivierten Zellen durchgeführt.

Die Messung des freien zytosolischen Kalziums erfolgt mithilfe des Kalzium-sensitiven, fluoreszierenden Farbstoffs FURA-2 nach der von Grynkiewicz beschriebenen, ratiometrischen Methode [158]. FURA-2 wird als lipophiler Azetoxymethylester (Fura-2-AM) appliziert, der durch Diffusion in die Zelle eintritt. Nach Abspaltung der Estergruppe im Zytosol durch zelleigene Esterasen kann der Farbstoff Fura-2, für den die Membran impermeabel ist, die Zelle nicht mehr verlassen und wird dort angereichert.

Das Prinzip der ratiometrischen Kalziummessungen beruht darauf, dass der Farbstoff Fura-2 unterschiedliche Anregungsmaxima für die Kalzium-gebundene (340 nm) und die Kalzium-freie Form (380 nm) besitzt und nach Anregung Licht emittiert (siehe Abbildung 9). Die „ratio“ des bei den jeweiligen Anregungswellenlängen emittierten Lichtes spiegelt die Änderungen der freien zytosolischen Kalziumkonzentration wider. Nach entsprechender Eichung können unter Einbezug der Dissoziationskonstanten die absoluten Änderungen der Kalziumkonzentration berechnet werden [158].

Die so gemessene Kalziumkonzentration unter Ruhebedingungen betrug in humanen Trabekelmaschenwerkzellen etwa 130 nM [82], in bovinen Trabekelmaschenwerkzellen etwa 85 nM [83, 86] und liegt damit in dem Bereich, der von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde [156, 159]. Mit dieser Methode wurde die Wirkung von Endothelin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration untersucht [83, 86], die am Endothelin-Effekt beteiligten Rezeptoren ermittelt [83] und der Einfluss von Endothelin-Antagonisten analysiert [86, 148] (siehe Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4).

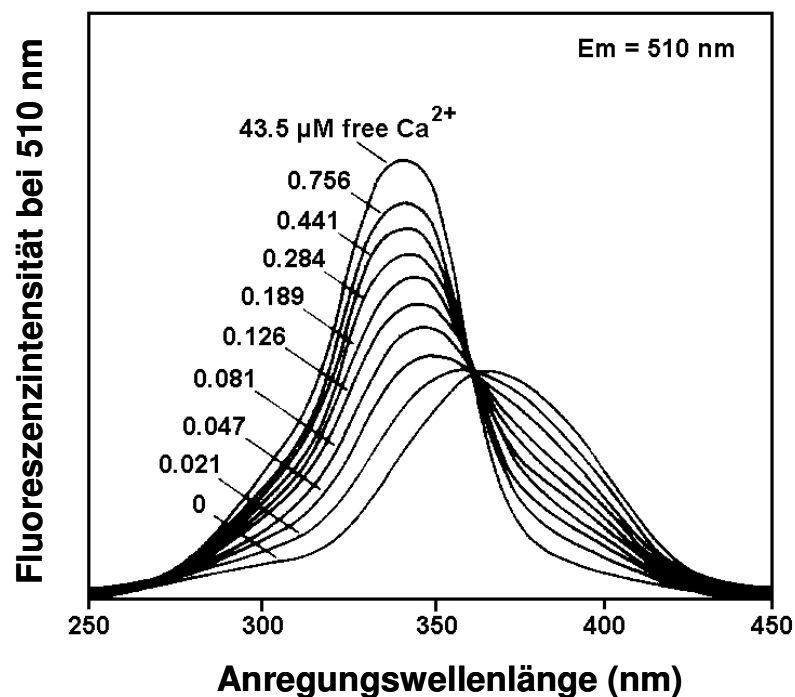


Abbildung 9: Anregungsspektrum von Fura-2. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der freien Ca^{2+} -Konzentrationen, gemessen bei 510 nm für Anregungswellenlängen im Bereich zwischen 250 nm und 450 nm.

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

Die physiologischen Untersuchungen wie Kontraktionsmessungen, Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration und Ionenstrommessungen wurden durch molekularbiologische Untersuchungen ergänzt. Dabei wurde die Genexpression in der Zelle auf mRNA-Ebene mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht, die Western-Blot Analyse diente zum Nachweis der Proteinexpression. Mit diesen Methoden wurde die Expression der Proteine in frisch isoliertem, bovinen Gewebe und in bovinen Zellkulturen verglichen, um auszuschließen, dass unter Kulturbedingungen eine veränderte Expression der untersuchten Proteine auftritt. Nur bei unveränderter Expression konnten die beschriebenen Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit den Kontraktionsdaten verglichen werden.

Ferner wurde mit diesen Methoden die Proteinexpression in bovinen und humanen Zellkulturen verglichen. Da die Kontraktionsmessungen nicht an humanem Gewebe durchgeführt werden konnten, ist eine vergleichbare Proteinexpression in humanem und bovinem Gewebe ein Hinweis auf die Übertragbarkeit der bovinen Daten auf das humane Gewebe.

2.6.1 Polymerasekettenreaktion

Ausgangsmaterial für die Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene waren Zellkulturen von humanem Trabekelmaschenwerk, aus denen zunächst die RNA isoliert wurde. Aus dieser wurde in einem zweiten Schritt mit Hilfe einer reversen Transkriptase die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Bei der PCR werden dann selektiv bestimmte Abschnitte der cDNA amplifiziert. Mit dieser Methode können geringe DNA-Mengen um das millionenfache vervielfältigt und auf diese Weise detektiert werden. Die Neusynthese von DNA-Sequenzen benötigt zwei synthetische Oligonukleotide (sog. Primer, Sense und Antisense), die komplementär zu den Enden einer bekannten Sequenz der DNA-Matrize sind. Die Amplifizierung der durch die Primer begrenzten DNA-Sequenz erfolgt mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase.

Die PCR-Reaktion besteht aus vier Schritten. Zuerst werden die DNA-Stränge durch Erhitzen vollständig voneinander getrennt. Die Einzelstränge bilden Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase. Nach Temperatursenkung können sich die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle anlagern. Diese *annealing*-Temperaturen sind Primerabhängig und können berechnet werden. Anschließend wird die optimale Temperatur für die Aktivität der DNA-Polymerase eingestellt und neue DNA synthetisiert. Am Ende dieser Phase werden die kurzen Stücke doppelsträngiger DNA (der ursprüngliche und der neu synthetisierte komplementäre Strang) durch Erhitzen voneinander getrennt. Dieser Zyklus – Erhit-

zung zur Trennung der Stränge, Bindung der Primer und DNA-Synthese – wiederholt sich, bis ein Optimum der DNA-Synthese erreicht ist.

Nach der PCR-Reaktion wurden die amplifizierte DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Markierung durch Ethidiumbromid können die DNA-Banden durch UV-Licht visualisiert werden. Anhand eines mitlaufenden DNA-Größenmarkers kann die Größe bzw. Anzahl der Basenpaare der amplifizierten DNA-Fragmente bestimmt werden und mit der bedingt durch die eingesetzten Primer erwarteten Größe verglichen werden.

Zur Überprüfung der Nukleotidsequenz des amplifizierten DNA-Fragments wird dieses sequenziert. Zuvor ist die unbegrenzte autonome Replikation des Fragments nötig, um eine ausreichende Menge des PCR-Amplifikats für die Sequenzierungsreaktion zu erhalten. Dies geschieht nach Isolierung der DNA aus dem Gel, anschließender Ligation in ein Plasmid und Transformation in einen E.coli-Stamm. Nach Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte die Sequenzierung der subklonierten DNA-Fragmente nach dem Kettenabbruchverfahren [160]. Die Nukleotidsequenz der PCR-Produkte wurde mit den Sequenzen aus GeneBank-Datenbanken verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih/BLAST>).

Diese Methode diente zur Amplifizierung und zum Nachweis einzelner Komponenten des Endothelinsystems im humanen Trabekelmaschenwerk (siehe Kapitel 3.4).

2.6.2 Western Blot Analyse

Mittels Western Blot Analyse können Proteine in einem zellulären Lysat immunologisch nachgewiesen werden. Das Lysat wird je nach gesuchtem Protein speziell vorbereitet. Durch hohe Zentrifugationskräfte kann die Membranfraktion eines Zelllysates vom Zytoplasma getrennt werden, so dass zytosolische Proteine und Membranproteine isoliert werden können. Durch die Natrium Dodecyl Sulfate Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Western-Blotting), wo sie der immunologischen Detektion zugänglich sind.

Die auf der Nitrozellulosemembran befindlichen Proteinbanden lassen sich mit spezifischen Antikörpern gegen das gesuchte Protein markieren. An den Fc-Teil dieses spezifischen Antikörpers bindet ein zweiter Antikörper, der mit Enzymen (meist Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt ist. Diese Enzyme katalysieren mit entsprechenden Substraten eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion, durch die die markierten Proteinbanden sichtbar gemacht werden können. Anhand mitgeführter Größenmarker werden die markierten Proteine anhand ihres Molekulargewichtes identifiziert. Die Spezifität der markierten Banden kann zusätzlich durch den Einsatz von Blockpeptiden, die die Antigenbindungsstellen der spezifischen Antikörper besetzen, verifiziert werden. Mittels Western Blot Analyse wurden die Signalmoleküle

der Kontraktion sowie die Endothelin- und Prostaglandin F-Rezeptoren (FP-Rezeptor) im Trabekelmaschenwerk nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1 bis 3.5).

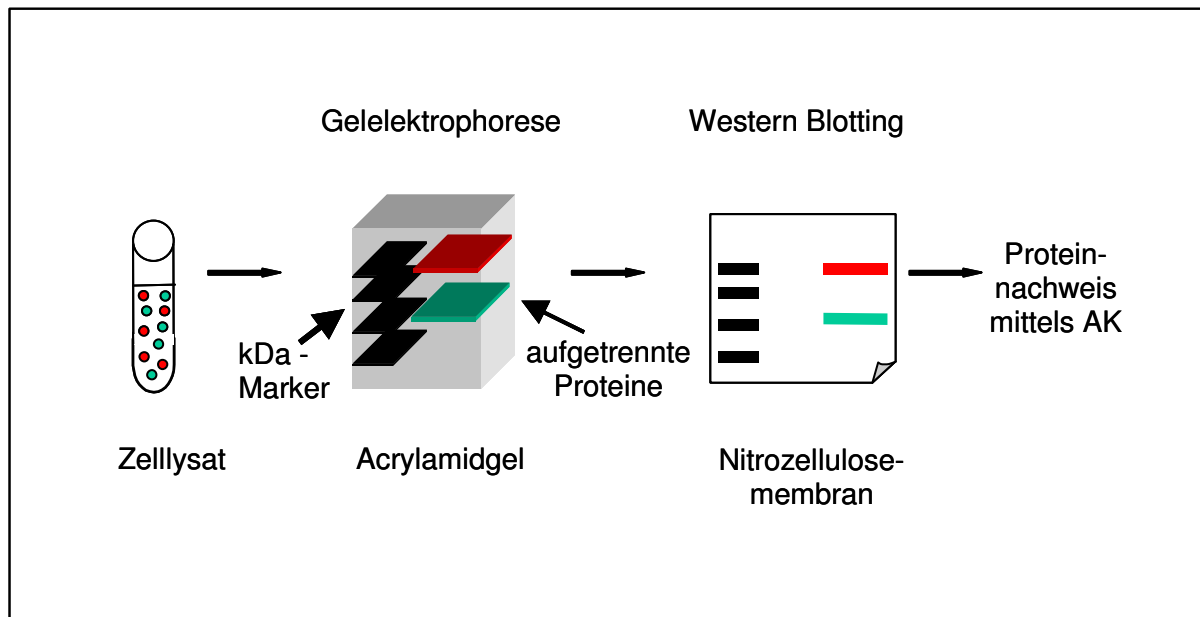


Abbildung 10: Auftrennung der einzelnen Proteine eines Zellysats mittels Gelelektrophorese, Übertragen der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western Blotting, immunologischer Proteinnachweis durch Antikörperbindung.

3 Eigene Arbeiten

3.1 Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork

Rosenthal R, Choritz L, Schlott S, Bechrakis NE, Jaroszewski J, Wiederholt M, Thieme H (2005) *Exp. Eye Res.* 80(6): 837-845.

3.2 Pharmacological and functional characterization of endothelin receptors in bovine trabecular meshwork and ciliary muscle

Choritz L, Rosenthal R, Foerster M H, Thieme H (2005) *Ophthalmic Research* 37: 179-187.

3.3 Endothelin-antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F_{2a} and fluprostenol on trabecular meshwork contractility

Thieme H, Schimmat C, Münzer G, Boxberger M, Fromm M, Pfeiffer N, Rosenthal R (2006) *Invest. Opth. Vis. Sci.* 47(3): 938-945.

3.4 Endothelin receptor B in trabecular meshwork

Rosenthal R, Choritz L, Zorn R, Münzer G, Fromm M, Pfeiffer N, Thieme H (2007) *Exp Eye. Res.* 85, 482-491.

3.5 Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork

Renieri G, Choritz L, Rosenthal R, Meissner S, Pfeiffer N, Thieme H (2007) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2008) 246,1107–1115.

3.6 Effects of unoprostone and endothelin-1 on L-type channel currents in human trabecular meshwork cells

Thieme H, Steinhausen K, Otlecz A, Lambrou GN, Strauss O, Wiederholt M, **Rosenthal R** (2005) *Ophthalm. Res.* 37(6): 293-300.

4 Diskussion

Ursache für den größten Teil der Glaukomerkrankungen ist eine Abflussbehinderung des Kammerwassers, die zu einem erhöhten IOD führt.

Die Senkung des IOD ist deshalb der erste und wichtigste Ansatz bei der Therapie des Glaukoms. Da durch das Trabekelmaschenwerk 80 - 90 % des Kammerwassers in den Schlemm-Kanal abfließt und hier der Hauptabflusswiderstand liegt, ist dieses Gewebe ein idealer pharmakologischer Angriffspunkt zur Augeninnendrucksenkung.

Der Vasokonstriktor Endothelin, der im Kammerwasser von Glaukompatienten in erhöhter Konzentration vorliegt, scheint eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese des Glaukoms zu haben. Aus diesem Grunde sind die Endothelin-induzierten Signalwege von großem Interesse für die Glaukumforschung. Neben zahlreichen okulären Effekten bewirkt Endothelin eine Kontraktion des Trabekelmaschenwerks, die zur Erhöhung des Abflusswiderstandes und dadurch zum Anstieg des IOD führt. Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk, die einen positiven Effekt auf den IOD hat und damit eine neue Möglichkeit der Glaukomtherapie darstellen könnte.

4.1 Regulation des intraokularen Drucks durch die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks

Der größte Teil des Kammerwassers fließt durch das Trabekelmaschenwerk aus dem Auge ab. Entscheidend für den Abflusswiderstand ist dabei die Weite der intertrabekulären Maschen, die durch verschiedene Parameter (siehe Kapitel 1.3.1) reguliert wird. Eine große Bedeutung für die Regulation der Maschenweite hat die Kontraktilität des Gewebes. Bereits 1962 wurde bei Untersuchungen zur Wirkung von Pilocarpin auf den Abflusswiderstand postuliert, dass das Trabekelmaschenwerk über ähnliche Eigenschaften wie glatte Muskulatur verfügt [77].

Zahlreiche Untersuchungen mit Substanzen, die in glatter Muskulatur eine Kontraktion bewirken, haben im Tiermodell zur Verringerung des Kammerwasserabflusses über den Schlemm-Kanal und damit zur Erhöhung des IOD geführt. Dagegen induzierten Substanzen, die zur Relaxation glatter Muskulatur führen, eine über den trabekulären Abflussweg vermittelte Drucksenkung [74, 75, 161]. Diese Befunde unterstützen die Vermutung, dass das TM über einen Glattmuskel-ähnlichen Kontraktionsapparat den Abflusswiderstand reguliert. Dem steht die Annahme gegenüber, dass die Abflussregulation durch das Trabekelmaschenwerk allein durch Veränderungen des Zytoskletts erfolgt [62, 63, 65, 66]. Unsere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass im Trabekelmaschenwerk alle wesentlichen Elemente für eine glattmuskelartige Kontraktion vorhanden und funktionell aktiv sind [87, 147]. Darüber hinaus konnten

wir in direkten Kontraktionsmessungen die pharmakologische Regulierbarkeit dieser Elemente nachweisen [81-83, 86, 87, 145-148] (siehe Kapitel 3.1 bis 3.5). Ein weiteres wichtiges Indiz für die glattmuskulären Eigenschaften des Trabekelmaschenwerks sind die intrazellulären Kalziumsignale nach Applikation von Kontraktions-induzierenden Substanzen [82, 83, 86, 148] (siehe Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4). Heute muss davon ausgegangen werden, dass analog zu glatter Muskulatur [162] die in Abbildung 11 dargestellten Signalwege an der Regulation trabekulärer Kontraktilität beteiligt sind.

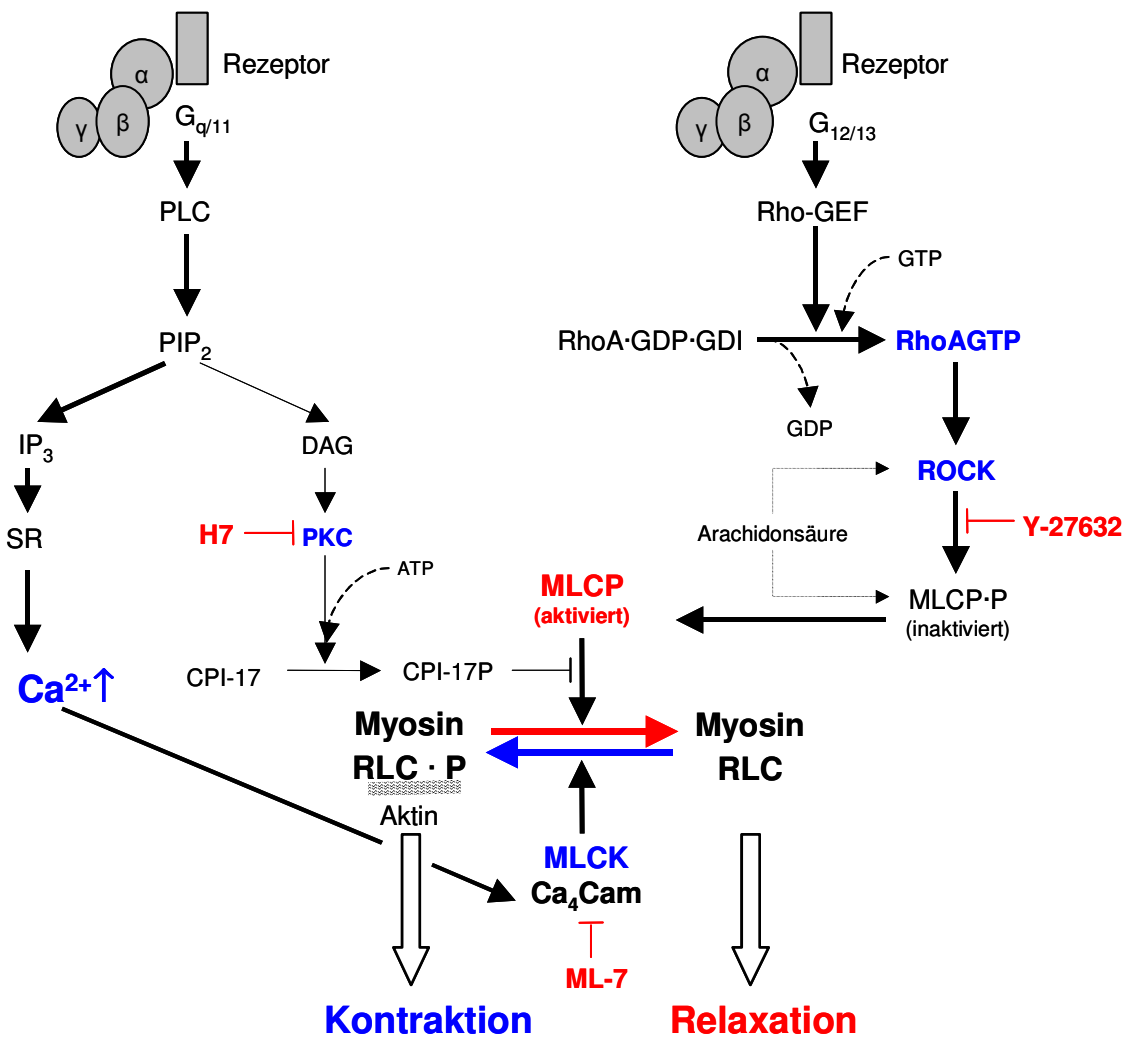


Abbildung 11: Regulationsmechanismen des Trabekelmaschenwerks (modifiziert nach [162]). Kalzium-abhängige Kontraktion unter Beteiligung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol 4,5-disphosphat (PIP_2) spaltet zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 induziert die Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), das an Calmodulin (Cam) bindet und die Myosin Light Chain Kinase (MLCK) aktiviert → Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (regulatory light chain, RLC). Kalzium-unabhängige Kontraktion unter Beteiligung von Proteinkinase C (PKC), RhoKinase (ROCK) und Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP) → Hemmung der Dephosphorylierung der Myosin-RLC-P.

Im Trabekelmaschenwerk existiert ein Kalzium-abhängiger Kontraktionsmechanismus, bei dem unter Beteiligung von Phospholipase C (PLC) und Inositoltriphosphat (IP_3) eine Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum hervorgerufen wird, und ein Kontraktionsmechanismus, der unabhängig vom Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration ist (Kalzium-unabhängige Kontraktion). Dabei führen zwei unterschiedliche Signalwege, unter Beteiligung der Proteinkinase C- ϵ (PKC- ϵ) oder der GTPase Rho-A und der von RhoA aktivierten Kinase ROCK, zu einer Inhibition der Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP) [87, 146, 147]. Dadurch wird bei gleichbleibender Kalziumkonzentration die Kontraktionskraft gesteigert (Ca^{2+} -Sensitivierung).

In zahlreichen Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass eine Inhibition der Signalmoleküle, die im Trabekelmaschenwerk an der Kontraktion beteiligt sind, wie die PKC [75, 163], ROCK [66, 164, 165] oder MLCK [166, 167], den Abfluss des Kammerwassers verbessert.

4.2 Rolle des Endothelin-1 in der Pathologie des intraokularen Drucks

Die Beteiligung von Endothelin-1 an der Pathogenese des Glaukoms wird durch zahlreiche Untersuchungen gestützt (siehe Kapitel 1.4.3). So wurden erhöhte Endothelin-1-Konzentrationen im Kammerwasser von Glaukompatienten und Tiermodellen zum Glaukom nachgewiesen [122-125] und ein Einfluss des Vasokonstriktors auf die okuläre Durchblutung [117, 118], den Sehnervenkopf [133] und den IOD [128-131] gezeigt. Die Bedeutung des Vasokonstriktors für den Augeninnendruck ist jedoch bisher nicht eindeutig geklärt. In Untersuchungen an isolierten, bovinen Augenvorderkammern wurde ein erhöhter Abflusswiderstand und ein reduzierter Kammerwasserabfluss unter Perfusion mit Endothelin-1 nachgewiesen [74]. Im Kaninchenmodell wurde gezeigt, dass eine intrakamerale Injektion von allen drei Endothelin-Isoformen zu einer dosisabhängigen Erhöhung des IOD führt [128]. Ferner wurde am Kaninchenmodell nach einer Argonlaser-Trabekuloplastik sowohl eine erhöhte Endothelin-1-Konzentration im Kammerwasser als auch ein erhöhter IOD nachgewiesen [131]. Untersuchungen zur Wirkung des Vasokonstriktors auf die am Kammerwasserabfluss beteiligten Gewebe zeigten, dass Endothelin-1 eine Kontraktion des Trabekelmaschenwerks und des Ziliarmuskels auslöst, wobei der Effekt auf das Trabekelmaschenwerk stärker ausgeprägt ist als auf den Ziliarmuskel [78, 83] (siehe Kapitel 3.2). Nach dem beschriebenen Modell des funktionellen Antagonismus zwischen beiden Geweben würde die vergleichsweise stärkere Kontraktion des Trabekelmaschenwerks zu einer Erhöhung des Abflusswiderstandes und des IOD führen (siehe Abbildung 12).

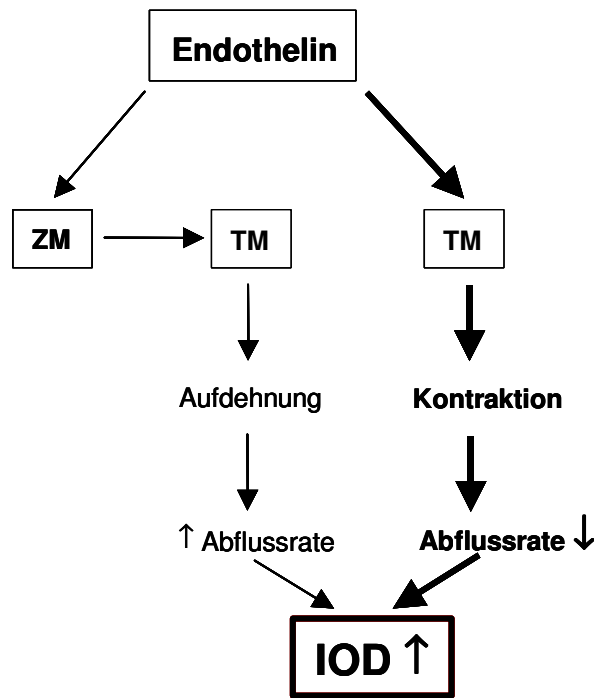


Abbildung 12: Funktioneller Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk (TM) und Ziliarmuskel (ZM). Endothelin-induzierte Erhöhung des intraokulären Drucks (IOD) durch stärkere Kontraktion des Trabekelmaschenwerks (modifiziert nach [89]).

Andere Untersuchungen zeigten nach Injektion von Endothelin-1 in den Glaskörper von Kaninchen zuerst einen ein- bis zweistündigen Anstieg des IOD, gefolgt von einer langanhaltenden Drucksenkung [126, 129, 130, 168-170]. Die anfängliche, transiente Erhöhung des Augeninnendrucks ist auf die Endothelin-induzierte Kontraktion des Trabekelmaschenwerks zurückzuführen. Für die langanhaltende Drucksenkung ist möglicherweise ein indirekter Endothelineffekt verantwortlich. Nach intraokulärer Injektion von Endothelin-1 wurde ein Anstieg der Konzentration von Arachidonsäuremetaboliten wie den Prostaglandinen PGE₂ und PGF_{2α} im Kammerwasser beobachtet [117, 128, 129]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Endothelin-1-induzierte Kontraktion des Trabekelmaschenwerks durch Prostaglandin-Analoga inhibiert werden kann [86] (siehe Kapitel 3.3). Somit könnte der verzögerte, drucksenkende Effekt von Endothelin-1 zumindest partiell auf eine Inhibition der von Endothelin-1 selbst induzierten Kontraktion durch die im Kammerwasser vermehrt vorliegenden Prostaglandine zurückzuführen sein. Für eine Beteiligung der Prostaglandine spricht auch die Beobachtung, dass sich einige der okulären Effekte von Endothelin durch Blockierung der Cyclooxygenase, einem wesentlichen Enzym der Prostaglandinsynthese, inhibieren lassen [117, 128, 130].

4.2.1 Endothelin und Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks

Die ersten Untersuchungen zur Endothelin-induzierten Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks wurden 1991 vorgenommen [78, 138]. Diese zeigten, dass die durch Endothelin-1 hervorgerufene maximale Kontraktion des Trabekelmaschenwerks etwa 73 % der maximalen Carbacholkontraktion beträgt und die Endothelin-Kontraktion nur zu etwa 77 % vom extrazellulären Kalzium abhängig ist [78, 142]. Unsere weiterführenden Untersuchungen ergaben, dass Endothelin-1 im Trabekelmaschenwerk einen Kontraktionsmechanismus induziert, der sowohl vom extrazellulären als auch vom intrazellulären Kalzium unabhängig ist [145-147] (siehe Kapitel 3.5). An dieser Kalzium-unabhängigen Kontraktion sind RhoA und ROCK beteiligt.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Endothelin-induzierte Kontraktion im Trabekelmaschenwerk stets mit einem transienten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration assoziiert. Diese Endothelin-1-induzierte Kalziumantwort verläuft in zwei Phasen, nach einem transienten Kalziumpeak, bedingt durch die Kalziumfreisetzung aus zytosolischen Kalziumspeichern, folgt eine anhaltende Phase erhöhter Kalziumkonzentration, hervorgerufen durch einen Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum [157]. Im Trabekelmaschenwerk kann Kalzium aus dem Extrazellulärraum durch spannungsabhängige L-Type Kalziumkanäle [156] und CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel) Kanäle [171] in die Zelle eintreten. Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass L-Type Kalziumkanäle nicht direkt durch Endothelin-1 beeinflusst werden [157, 172] (siehe Kapitel 3.6). Da die Maxi- K^+ -Kanäle durch Endothelin-1 transient gehemmt werden [84] und dadurch eine Depolarisation der Zelle eintritt, könnte Endothelin-1 über diesen Mechanismus indirekt eine Aktivierung der L-Typ Kanäle und einen Kalziumeinstrom auslösen oder weitere spannungsabhängige Kalziumkanäle aktivieren und darüber einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirken.

4.2.2 Endothelin-Rezeptoren im Trabekelmaschenwerk

Beide Endothelin-Rezeptoren, der ET-AR und der ET-BR, wurden in verschiedenen Geweben des Auges nachgewiesen, wo sie unterschiedliche Effekte vermitteln [115]. Auf mRNA-, Protein- und funktioneller Ebene konnte gezeigt werden, dass im Trabekelmaschenwerk beide Rezeptoren exprimiert werden [79, 83, 148, 157, 159, 173] (siehe Kapitel 3.2 und 3.4). Die Endothelin-Rezeptoren sind hier an verschiedene intrazelluläre Signalwege gekoppelt, unter Beteiligung von Kalzium, RhoA oder Stickstoffoxid. Die Expression beider Rezeptoren im Trabekelmaschenwerk führt zu der Frage nach der Funktion der einzelnen Rezeptoren. Unsere Untersuchungen mit spezifischen Antagonisten konnten zeigen, dass im Trabekelmaschenwerk für die Kontraktionsauslösung und ebenso für die intrazelluläre Kalziummobili-

sation der ET-AR die dominante Rolle spielt [83] (siehe Kapitel 3.2). Eine isolierte Aktivierung des ET-BR mittels spezifischer, hochaffiner Agonisten resultiert ebenfalls in einer Kontraktion und einem Anstieg des intrazellulären Kalziums, die unter physiologischen Bedingungen jedoch keine Bedeutung zu haben scheint [148] (siehe Kapitel 3.4). Damit unterscheidet sich das Trabekelmaschenwerk vom Ziliarmuskel, bei dem auch der ET-BR an der Kontraktionsvermittlung beteiligt ist [83] (siehe Kapitel 3.2). Eine ET-BR vermittelte Relaxation, wie sie in glatter Gefäßmuskulatur beobachtet wurde [107, 174], konnte im Trabekelmaschenwerk nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise hat der Rezeptor hier eine regulatorische Funktion. Dafür spricht, dass die Expression des ET-BR durch Glucocorticoide reguliert wird [173]. Glucocorticoide sind mit der Pathogenese des POWG assoziiert, Patienten mit POWG haben erhöhte Konzentrationen von Cortisol im Blut und Kammerwasser [175] und reagieren häufiger (90 %) auf eine okuläre Applikation von Glucocorticoiden mit einer Erhöhung des IOD als Kontrollpersonen (35 %). Zahlreiche Effekte der Glucocorticoide auf das Trabekelmaschenwerk, die zur Erhöhung des Abflusswiderstandes führen, wurden beschrieben, wie Veränderungen des Zytoskeletts [176], der EZM [177] und der MMP Aktivität [178]. Zudem bewirken sie im Trabekelmaschenwerk eine verstärkte Expression von Myocilin [179] und eine verringerte Expression des ET-BR [173]. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Zusammenhänge und die funktionelle Bedeutung des ET-BR im Trabekelmaschenwerk zu klären.

4.2.3 Endothelin-abhängige Regulationsunterschiede zwischen Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel

Aufgrund des funktionellen Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk und Ziliarmuskel können Regulationsunterschiede zwischen beiden Geweben möglicherweise relevant für die Entwicklung neuer drucksenkender Pharmaka sein. Als Beispiel für einen Endothelin-abhängigen Regulationsunterschied konnten wir die ET-BR-induzierte Kontraktion zeigen, die unter physiologischen Bedingungen nur am Ziliarmuskel, nicht am Trabekelmaschenwerk auftritt [83] (siehe Kapitel 3.2). Eine durch ET-BR-Aktivierung ausgelöste, isolierte Kontraktion des Ziliarmuskels würde über eine Aufdehnung der intertrabekulären Räume des Trabekelmaschenwerks zum verbesserten Kammerwasserabfluss und damit zur Senkung des IOD führen. Dies wurde bereits im Tiermodell gezeigt, im Kaninchenauge konnte durch intravitreale Injektion des hochspezifischen ET-BR-Agonisten Safarotoxin S6c eine Drucksenkung erreicht werden [180].

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Geweben ist die Kalzium-unabhängige Kontraktion, die nur im Trabekelmaschenwerk, nicht im Ziliarmuskel induziert werden kann [78]. Die fehlende Aktivierung des Ca^{2+} -unabhängigen Signalweges im Ziliarmuskel erklärt möglicher-

weise den geringeren Effekt von Endothelin auf dieses Gewebe. Somit existieren Unterschiede in den durch Endothelin ausgelösten Signalkaskaden, die möglicherweise therapeutisch nutzbar sind. Der Vorteil einer solchen Therapie wäre die geringe Beeinflussung des Ziliarmuskels.

4.3 Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk

Die Endothelin-induzierten Signalwege sind im Hinblick auf einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt für die Therapie des Glaukoms von großem Interesse, da Endothelin zwei für die Pathogenese des Glaukoms wesentliche Parameter im Auge beeinflusst, den IOD und den okulären Blutfluss. Die Antagonisierung der Endothelinwirkung stellt hierbei eine vielversprechende Möglichkeit zur Behandlung des Glaukoms dar, einerseits durch eine Augeninnendrucksenkung infolge Trabekelmaschenwerkrelaxation, andererseits durch die Förderung der Durchblutung infolge einer Vasodilatation retinaler und chorioidaler Gefäße. Der Endothelin-Effekt am Trabekelmaschenwerk kann durch Intervention in die Kontraktions-induzierenden Signalwege antagonisiert werden. Dabei kann eine Intervention entweder auf Ebene der Rezeptoren oder der sich anschließenden intrazellulären Signalkaskaden erfolgen. Um Nebenwirkungen gering zu halten, sind dabei Signalwege von Vorteil, die ausschließlich im Trabekelmaschenwerk und nicht in anderen glatten Muskeln im Vorderabschnitt vorliegen und die spezifisch für Endothelin sind und nicht durch weitere Signalmoleküle aktiviert werden.

4.3.1 Inhibition der Endothelin-Rezeptoren

Unsere Untersuchungen zur Kontraktilität haben gezeigt, dass die Endothelin-induzierte Kontraktion im Trabekelmaschenwerk vorwiegend über den ET-AR vermittelt wird [83] (siehe Kapitel 3.2). Da diese Kontraktion an der Erhöhung des IOD beim Glaukom mitzuwirken scheint, wäre eine Blockierung dieses Signalweges durch spezifische ET-AR-Antagonisten als Glaukomtherapie denkbar. Untersuchungen mit ET-AR-Rezeptorblockern liegen bereits am Tiermodell vor. Es konnte gezeigt werden, dass durch Blockierung des ET-AR sowohl der durch Endothelininjektion hervorgerufene, kurzzeitige Anstieg des IOD als auch die anhaltende Drucksenkung aufgehoben werden konnte [116, 169]. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass auch die durch Endothelin hervorgerufene Erhöhung der Prostaglandine im Kammerwasser unterdrückt wurde und die Prostaglandinfreisetzung allein durch Aktivierung des ET-AR induziert wird, der ET-BR ist daran nicht beteiligt.

Weitere Hinweise auf eine Inhibition des ET-AR als mögliche Glaukomtherapie liefern Untersuchungen am Kaninchenmodell. Hier verursacht eine Argonlaser-Behandlung einen Anstieg der Endothelin-1-Konzentration im Kammerwasser und eine Erhöhung des IOD [131]. Durch Vorbehandlung der Augen mit einem ET-AR-Antagonisten konnte der Druckanstieg, nicht aber die Erhöhung der Endothelin-1-Konzentration verhindert werden [181].

Neben dem Effekt auf den IOD vermindert Endothelin-1 den retinalen und chorioidalen Blutfluss [136, 137, 182, 183]. Auch dieser Effekt kann durch einen Antagonisten des ET-AR aufgehoben werden [182, 184].

Die Blockierung des ET-AR-vermittelten Signalweges würde somit positive Auswirkungen sowohl auf den IOD als auch auf den okulären Blutfluss haben und damit zusätzlich zur Drucksenkung eine neuroprotektive Wirkung entfalten.

4.3.2 Beeinflussung intrazellulärer Signalwege

Neben einer direkten Blockade der Endothelin-Rezeptoren können auch die sich anschließenden Signalwege gehemmt werden. So konnte die Endothelin-induzierte Kontraktion durch Inhibition der MLCK und der ROCK abgeschwächt werden. Beide Enzyme konnten wir im bovinen und auch humanen Trabekelmaschenwerk sowohl auf Proteinebene als auch funktionell nachweisen [87, 146, 147] (siehe Kapitel 3.1 und 3.5).

Bei Untersuchungen am Kaninchenmodell konnte durch Applikation des MLCK-Inhibitors ML-9 der Kammerwasserabfluss gesteigert und der IOD reduziert werden. Dabei wurde kein Einfluss auf den uveoskleralen Abfluss beobachtet. Als Ursache für die Drucksenkung wurden Änderungen der Aktinfilamentstrukturen und Form der Trabekelmaschenwerkzellen angeführt [167]. Auch am Affenmodell wurde der Kammerwasserabfluss durch Inhibition der MLCK erhöht [166]. Bei beiden Untersuchungen wurde allerdings ein Einfluss auf den Pupillendurchmesser beobachtet, was bei einem Einsatz zu therapeutischen Zwecken eine unerwünschte Nebenwirkung darstellt.

Der Einfluss von Inhibitoren der ROCK auf die Endothelin-induzierte Kontraktion bestätigt, dass das vasoaktive Peptid einen Kalzium-unabhängigen Kontraktionsmechanismus im Trabekelmaschenwerk aktiviert [87, 147] (siehe Kapitel 3.5). ROCK-Inhibitoren wurden bereits in verschiedenen Tiermodellen eingesetzt und konnten hier eine effektive Senkung des IOD bewirken [66, 164, 165, 185, 186]. Die Behandlung humaner Trabekelmaschenwerkzellen mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 führte zur Abnahme der Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten [164]. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass der RhoA/ROCK Signalweg auch im humanen Auge von Bedeutung ist.

Die Hemmung der MLCK oder des RhoA/ROCK Signalweges beeinflusst nicht nur die Endothelin-induzierte Kontraktion, sondern auch die durch muskarinerge Agonisten ausgelösten

Kontraktionen. Da muskarinerge Agonisten auf die parasympathisch innervierten Muskeln im Vorderabschnitt gleichermaßen wirken, sind von einer Inhibition dieser Signalwege mehrere Gewebe betroffen und physiologische Parameter wie Akkomodation und Pupillenweite beeinflusst. Ein spezifischer Endothelin-Antagonismus am Trabekelmaschenwerk wurde als Erstes von dem Docosanoid Unoprostone beschrieben.

4.3.3 Wirkungsmechanismus von Unoprostone

Isopropyl-Unoprostone (Rescula, Novartis Ophthalmics AG, Basel, Switzerland), meist kurz als Unoprostone bezeichnet, gehört zu den Docosanoiden, Metaboliten der Docosahexaensäure. Die Applikation von Unoprostone bewirkt bei verschiedenen Tiermodellen und beim Menschen eine Senkung des IOD [187-190]. Ferner wurden beim Kaninchen die durch Laserbehandlung hervorgerufene Endothelinfreisetzung und die danach auftretenden Druckspitzen durch Vorinkubation mit Unoprostone gehemmt [191]. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Unoprostone auf das Trabekelmaschenwerk zeigten, dass das Docosanoid eine deutliche Hemmung der Endothelin-1-induzierten Kontraktion hervorrief, während die Basisspannung und die Carbachol-induzierte Kontraktion unbeeinflusst blieben. Messungen des zytosolischen Kalziums bestätigten die Kontraktionsdaten, hier wurde kein Effekt auf die Kalziumkonzentration unter Ruhebedingungen beobachtet, während der Endothelin-induzierte Anstieg des zytosolischen Kalziums durch Unoprostone inhibiert wurde [82].

In Patch-Clamp Experimenten konnten wir zeigen, dass Endothelin-1 eine transiente Reduktion des Auswärtsstromes durch den Maxi-K-Kanal bewirkt [84], was zur Depolarisation der Zelle führt. Dagegen bewirkt Unoprostone in Gegenwart von Endothelin-1 eine deutliche Zunahme des Auswärtsstromes [82]. Die Aktivierung von Maxi-K⁺-Kanälen führt zur Hyperpolarisation und damit zum Schließen von spannungsabhängigen Kalziumkanälen, wie den L-Typ Kalziumkanälen [156], was eine verringerte intrazelluläre Kalziumkonzentration zur Folge hat und die Unoprostone-induzierte Reduktion der Kontraktion des Trabekelmaschenwerks erklärt. Neben diesem indirekten Effekt von Unoprostone auf den L-Typ Kalziumkanal wurde auch eine direkte Hemmung dieser Kanäle durch Unoprostone gezeigt [172] (siehe Kapitel 3.6). Diese direkten und indirekten Effekte von Unoprostone auf das Trabekelmaschenwerk sind vermutlich für die Senkung des IOD mitverantwortlich.

Neben dieser drucksenkenden Wirkung von Unoprostone sind positive Effekte auf den okulären Blutfluss und die Durchblutung des Sehnerven beim Affen und Menschen beschrieben worden [137, 192-194]. Eine retinal-neuroprotektive Wirkung ließ sich bei Ratten nachweisen [195]. Möglicherweise sind diese Effekte ebenfalls auf einen Endothelin-Antagonismus an retinalen und chorioidalen Gefäßen zurückzuführen.

Bindungsstudien haben gezeigt, dass Unoprostone mit geringer Affinität und Selektivität an den FP-Rezeptor bindet [196]. Untersuchungen an Knockout-Mäusen, die keine FP-Rezeptoren exprimieren, haben ergeben, dass die Wirkung von Unoprostone über diese Rezeptoren vermittelt wird. An diesen Mäusen konnte, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen, durch Unoprostone keine Senkung des IOD erreicht werden [197].

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die FP-Rezeptoren am Trabekelmaschenwerk beim Endothelin-Antagonismus durch Unoprostone eine entscheidende Rolle spielen. Daraus ergab sich die Frage, ob spezifische FP-Rezeptor-Agonisten einen ähnlichen Effekt auf die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks ausüben wie Unoprostone.

4.3.4 Wirkmechanismen von Prostaglandin F-Rezeptor-Agonisten

Erste Untersuchungen zur Wirkung von Prostaglandinen am Auge zeigten, dass diese Substanzen im Tiermodell einen Anstieg des IOD bewirken [198, 199]. Weitere detaillierte Untersuchungen ergaben, dass Prostaglandine in geringen Dosen eine effektive, langanhaltende Drucksenkung hervorrufen, während höhere Dosen einen initialen Druckanstieg induzieren, dem eine langanhaltende Drucksenkung folgt [196]. Damit begann die Entwicklung der Prostaglandine zu den heute in der Glaukomtherapie eingesetzten Pharmaka. In den letzten Jahren wurden zur Glaukomtherapie vorwiegend Agonisten des FP-Rezeptors wie Latanoprost und Travoprost eingesetzt [200-203]. Die Wirkmechanismen dieser Substanzen auf den Kammerwasserabfluss und damit auf den Augeninnendruck sind bis heute nicht eindeutig geklärt.

Die von uns durchgeführten Kontraktionsmessungen am Trabekelmaschenwerk haben gezeigt, dass Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) und Fluprostenol (Fluprostenol-Isopropylester = Travoprost) spezifisch die Endothelin-1-induzierte Kontraktion des Gewebes inhibieren ohne Einfluss auf die Basisspannung oder die Carbachol-induzierte Kontraktion zu nehmen. Mit spezifischen FP-Rezeptor-Antagonisten konnten wir bestätigen, dass diese Wirkung über den FP-Rezeptor vermittelt wird [86] (siehe Kapitel 3.3). Auch die drucksenkenden Effekte der FP-Rezeptor-Agonisten Latanoprost, Travoprost, Bimatoprost und Unoprostone werden über diesen Rezeptor vermittelt, wie Untersuchungen an FP-Rezeptor Knockout-Mäusen zeigten [197]. Eine neue Studie an Patienten mit POWG oder okulärer Hypertension hat ergeben, dass Travoprost den trabekulären Kammerwasserabfluss verstärkt und dadurch den IOD senkt [204]. Auch an perfundierten, humanen Vorderabschnitten konnte gezeigt werden, dass Latanoprost den konventionellen Kammerabfluss durch einen direkten Effekt auf das Trabekelmaschenwerk steigert [205]. Der von uns gezeigte Endothelin-Antagonismus von FP-Rezeptor-Agonisten auf die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks scheint damit über

eine Erhöhung des konventionellen Kammerwasserabflusses an der Senkung des Augeninnendrucks mitbeteiligt zu sein.

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass Prostaglandin-Analoga den uveoskleralen Kammerwasserabflusses steigern und dadurch den Augeninnendruck senken [187, 206-208]. Dieser Effekt wird vermutlich durch eine gesteigerte Sekretion von Matrixmetalloproteinasen durch den Ziliarmuskel hervorgerufen [209, 210]. Durch Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen werden Komponenten der EZM wie Kollagen und Laminin abgebaut, dadurch das extrazelluläre Material in den Interfilamenträumen des Ziliarmuskels reduziert und der Widerstand des Gewebes herabgesetzt [209-212]. Auch in Organkulturen von humaner Sklera wurde nach Behandlung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine erhöhte Expression von Matrixmetalloproteinasen und eine erhöhte Sklerapermeabilität festgestellt [213]. Diese Prozesse bewirken eine Zunahme des uveoskleralen Kammerwasserabflusses. Die beschriebenen Abbauprozesse von extrazellulärem Material benötigen eine relativ lange Zeitspanne, so dass der schnelle Wirkungseintritt der Prostaglandin-Analoga nicht allein durch Erhöhung des uveoskleralen Abflusses erklärt werden kann. Die maximale Drucksenkung tritt bereits einige Stunden nach Applikation der Substanzen ein [188, 205, 214, 215]. Dieser Effekt ist auf den beschriebenen Endothelin-Antagonismus am Trabekelmaschenwerk zurückzuführen, während bei den langanhaltenden Effekten die Abbauprozesse der extrazellulären Matrix in den Geweben des uveoskleralen Abflussweges von Bedeutung sind. Die effektive Drucksenkung der Prostaglandin-Analoga kann zudem nicht durch alleinige Erhöhung des uveoskleralen Abflusses erklärt werden. Messungen an humanen Augen haben gezeigt, dass über den uveoskleralen Weg weniger als 15 % des Kammerwassers aus dem Auge abfließen. Die Werte liegen bei 35 % bei jungen Erwachsenen und sinken auf etwa 3 % bei Personen über 60 Jahren [216]. Mit zunehmendem Alter wird im Ziliarmuskel verstärkt extrazelluläres Material akkumuliert, so dass die intermuskulären Räume reduziert werden und dadurch der uveosklerale Abfluss beeinträchtigt wird [217]. Bei Patienten mit POWG trägt der uveosklerale Abfluss daher nur wenig zur Drainage des Kammerwassers bei. Daher scheint der Endothelin-Antagonismus am Trabekelmaschenwerk und die daraus resultierende Steigerung des konventionellen Kammerwasserabflusses maßgeblich zur drucksenkenden Wirkung der FP-Rezeptor-Agonisten beizutragen. Unsere Kontraktionsmessungen am Trabekelmaschenwerk konnten somit dazu beitragen, einen weiteren Effekt der Prostaglandin-Analoga auf den Kammerwasserabfluss zu zeigen. Dabei konnte bisher nicht aufgeklärt werden, über welchen Mechanismus diese Substanzen die Kontraktilität des Gewebes inhibieren (siehe Abbildung 13).

Neben der drucksenkenden Wirkung konnte in mehreren Studien am Kaninchen, an Affen und am Menschen eine Steigerung des okulären Blutflusses durch Prostaglandin-Analoga gezeigt werden [57, 58, 218-220]. Dieser Effekt scheint unabhängig von der Senkung des Augeninnendrucks zu sein [221], der genaue Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Auch

hier könnte eine Hemmung der Endothelin-induzierten Vasokonstriktion okulärer Gefäße durch Prostaglandin-Analoga den erhöhten Blutfluss erklären. Bisher ist noch nicht geklärt, welche Konzentrationen von Prostaglandinen im hinteren Augenabschnitt bei einer Therapie mit einmaliger Applikation pro Tag erreicht werden.

4.4 Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk als mögliche Glaukomtherapie

Zahlreiche Befunde sprechen für eine Beteiligung von Endothelin-1 an der Pathogenese des Glaukoms, die sich im Vorderabschnitt des Auges in einem Einfluss auf den Augeninnendruck äußert. Die im Tiermodell gezeigte Erhöhung des IOD durch Endothelin [122, 123] ist auf die Kontraktion des Trabekelmaschenwerks zurückzuführen, durch die der Abflusswiderstand erhöht wird. Ziel einer direkt am Trabekelmaschenwerk ansetzenden Therapie wäre demnach die Hemmung der Endothelin-induzierten Kontraktion dieses Gewebes. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass Substanzen, die in Tiermodellen bereits erfolgreich den Endothelin-induzierten Anstieg des IOD hemmen, auch in Kontraktionsversuchen am Trabekelmaschenwerk die Endothelinwirkung inhibieren.

Die Bedeutung der weiteren, muskarinerg regulierten glatten Muskeln im Vorderabschnitt für die Akkommodation und Pupillenweite erklärt die Notwendigkeit, Therapien zu entwickeln, die auf die Endothelin-induzierten Signalwege abzielen und weitere Signalwege möglichst unbeeinflusst lassen, um Nebenwirkungen gering zu halten. Wir konnten zeigen, dass spezifische Inhibitoren des ET-AR und FP-Rezeptor Agonisten (Prostaglandin-Analoga) dafür den vielversprechendsten Ansatz bieten, da sie ausschließlich auf die Endothelin-induzierte Kontraktion wirken und die durch muskarinerge Agonisten ausgelöste Kontraktion unbeeinflusst lassen. Eine weitere Möglichkeit zur Intervention in die Endothelin-induzierte Kontraktion ist die Inhibition des RhoA/ROCK Signalweges oder die Hemmung der MLCK, wobei diese Signalwege nicht spezifisch für Endothelin sind und durch weitere Signalmoleküle aktiviert werden können.

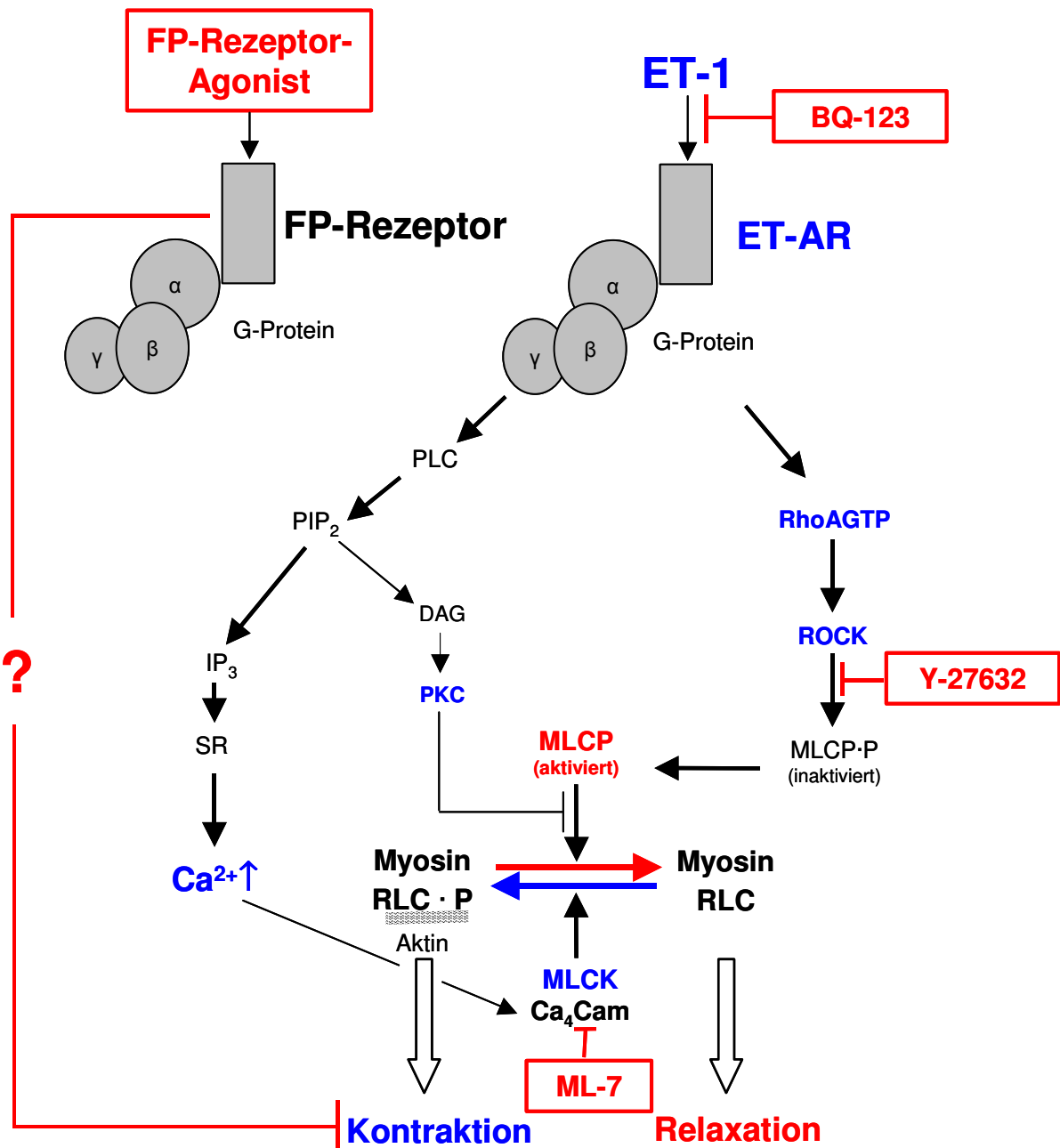


Abbildung 13: Antagonisierung der Endothelin-Effekte am Trabekelmaschenwerk
 BQ-123 – ET-AR-Blocker, Y-27632 – ROCK-Inhibitor, ML-7 – MLCK-Inhibitor

4.5 Ausblick und weiterführende Arbeiten

Da Endothelin an der Pathogenese des Glaukoms beteiligt zu sein scheint, sollten die okulären Effekte des Vasokonstriktors genauestens untersucht werden. Dabei sind die Effekte auf die okuläre Durchblutung und die hier beschriebenen Effekte auf den IOD von Bedeutung. Die Antagonisierung der Endothelin-Effekte auf die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks könnte eine Möglichkeit der Therapie darstellen, die direkt am Trabekelmaschenwerk an-

greift. Obwohl dieses Gewebe den Hauptabflusswiderstand für das Kammerwasser auf seinem Weg aus dem Auge darstellt, gibt es bisher keine medikamentöse Therapie, die direkt dort ansetzt.

Wir konnten zeigen, dass Prostaglandin-Analoga über einen Endothelin-Antagonismus am Trabekelmaschenwerk zur Senkung des IOD beitragen. Dabei ist bisher nicht bekannt, über welchen Mechanismus die beiden Signalwege miteinander interagieren. Diese Interaktion könnte auf Rezeptor- oder G-Proteinebene stattfinden, oder es könnten intrazelluläre Signalwege beeinflusst werden. Da Prostaglandin-Analoga heute verstärkt in der Glaukomtherapie eingesetzt werden, ist eine genaue Kenntnis der Wirkmechanismen dieser Substanzen von entscheidender Bedeutung, insbesondere wenn sie als Kombinationstherapie mit anderen Pharmaka eingesetzt werden sollen.

Ferner sollte analysiert werden, ob der am Trabekelmaschenwerk beobachtete Endothelin-Antagonismus durch Prostaglandin-Analoga auch an anderen okulären Geweben, z. B. den okulären Gefäßen auftritt, und die durch Prostaglandin-Analoga induzierte Steigerung retinaler und chorioidaler Durchblutung auf diesem Effekt beruht.

Insgesamt sollte die wechselseitige Beziehung zwischen Endothelin und Prostaglandinen – Aktivierung der Prostaglandinsynthese durch Endothelin, Hemmung der Endothelineffekte durch Prostaglandine – genau analysiert werden, um daraus Hinweise auf die Bedeutung von Endothelin im Auge unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Das Glaukom stellt heute weltweit die häufigste Erblindungsursache dar. Die einzige bisher mögliche Therapie bei dieser Erkrankung ist die Senkung des intraokularen Drucks (IOD). Das Trabekelmaschenwerk, durch das 80 – 90 % des Kammerwassers drainieren, ist über kontraktile Mechanismen aktiv am Kammerwasserabfluss und damit an der Regulation des IOD beteiligt. Eine Beeinflussung der Kontraktilität dieses Gewebes stellt somit eine Möglichkeit für die Entwicklung Augeninnendruck-senkender Pharmaka dar.

Endothelin-1 liegt im Kammerwasser von Glaukompatienten in erhöhter Konzentration vor und scheint bei der Pathogenese des Glaukoms eine entscheidende Rolle zu spielen. Daran ist vermutlich ein Einfluss auf die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks beteiligt. Damit scheinen Substanzen, die die Endothelin-abhängigen Signalwege in diesem Gewebe inhibieren, zur Senkung des Augeninnendrucks geeignet.

Über die Endothelin-induzierten Signalkaskaden im Trabekelmaschenwerk und die Antagonisierung der Effekte lassen sich aus dieser Arbeit folgende Erkenntnisse ableiten:

1. Der Vasokonstriktor Endothelin-1 bewirkt eine Kontraktion des Trabekelmaschenwerks, die zur Hemmung des Kammerwasserabflusses und damit zur Erhöhung des IOD führt.
2. Die Endothelin-1-induzierte Kontraktion wird teilweise durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration hervorgerufen. Daneben existiert im Trabekelmaschenwerk ein Kalzium-unabhängiger Signalweg unter Beteiligung von RhoA und ROCK, der zur Kontraktion führt.
3. Im Trabekelmaschenwerk werden beide Endothelin-Rezeptoren, der ET-AR und der ET-BR, exprimiert. Die Endothelin-induzierte Kontraktion sowie der Anstieg des intrazellulären Kalziums werden in diesem Gewebe vorrangig durch Aktivierung des ET-AR vermittelt.
4. Eine isolierte Aktivierung des ET-BR bewirkt ebenfalls eine Kontraktion des Gewebes, die unter physiologischen Bedingungen jedoch keine Bedeutung zu haben scheint. Die Bedeutung des ET-BR für die Funktion des Trabekelmaschenwerks ist bisher nicht geklärt.
5. Die Endothelin-induzierte Kontraktion wird durch ML-7, einen Inhibitor der MLCK, und Y-27632, einen ROCK Inhibitor, gehemmt. Von beiden Substanzen ist bekannt, dass sie eine Senkung des IOD bewirken.
6. Agonisten des FP-Rezeptors, wie $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Fluoprostenol, bewirken eine Hemmung der Endothelin-1-induzierten Kontraktion, während die durch muskarinerge Agonisten ausgelöste Kontraktion unbeeinflusst bleibt. Dieser Endothelin-Antagonismus ist vermutlich für

die schnelle Drucksenkung dieser Substanzen verantwortlich. Ein ähnlicher Effekt wird durch das Docosanoid Unoprostone, das ebenfalls eine Affinität zum FP-Rezeptor hat, hervorgerufen.

Die Antagonisierung der Endothelin-Effekte auf die Kontraktilität des Trabekelmaschenwerks stellt eine Möglichkeit dar, den Kammerwasserabfluss zu verstärken und dadurch den IOD zu senken. Die Endothelin-abhängigen Signalkaskaden stellen somit einen geeigneten Angriffspunkt für Augeninnendruck-senkende Pharmaka dar.

6 Literaturverzeichnis

1. **Tezel G, Wax M B (2007)** Glaucoma. *Chem Immunol Allergy* 92: 221-7.
2. **Quigley H A (1996)** Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 80 (5): 389-93.
3. **Kocur I, Resnikoff S (2002)** Visual impairment and blindness in Europe and their prevention. *Br J Ophthalmol* 86 (7): 716-22.
4. **Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel G P, Mariotti S P (2004)** Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 82 (11): 844-51.
5. **Pfeiffer N, Glaukom.** 2001, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
6. **Rohrschneider K, Greim S (2004)** Epidemiology of blindness in Baden, Germany. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 221 (2): 116-21.
7. **Knauer C, Pfeiffer N (2006)** Blindness in Germany - today and in 2030. *Ophthalmologe* 103 (9): 735-741.
8. **Pfeiffer N, Glaukom und okuläre Hypertension.** 2005, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
9. **Cedrone C, Mancino R, Cerulli A, Cesareo M, Nucci C (2008)** Epidemiology of primary glaucoma: prevalence, incidence, and blinding effects. *Prog Brain Res* 173: 3-14.
10. **Tielsch J M, Sommer A, Katz J, Royall R M, Quigley H A, Javitt J (1991)** Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Jama* 266 (3): 369-74.
11. **Rudnicka A R, Mt-Isa S, Owen C G, Cook D G, Ashby D (2006)** Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (10): 4254-61.
12. **Yip J L, Foster P J (2006)** Ethnic differences in primary angle-closure glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 17 (2): 175-80.
13. **Budde W M (2000)** Heredity in primary open-angle glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 11 (2): 101-6.
14. **Gong G, Kosoko-Lasaki O, Haynatzki G R, Wilson M R (2004)** Genetic dissection of myocilin glaucoma. *Hum Mol Genet* 13: 91-102.
15. **Gong G, Kosoko-Lasaki S, Haynatzki G, Lynch H T, Lynch J A, Wilson M R (2007)** Inherited, familial and sporadic primary open-angle glaucoma. *J Natl Med Assoc* 99 (5): 559-63.
16. **Gordon M O, Beiser J A, Brandt J D, Heuer D K, Higginbotham E J, Johnson C A, Keltner J L, Miller J P, et al. (2002)** The Ocular Hypertension Treatment Study:

- baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120 (6): 714-20; discussion 829-30.
17. **AGIS Investigators (2001)** The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 9. Comparison of glaucoma outcomes in black and white patients within treatment groups. *Am J Ophthalmol* 132 (3): 311-20.
 18. **Shields M B, Krieglstein G K**, *Glaukom: Grundlagen, Differentialdiagnose, Therapie*. Kammerwasserdynamik I: Anatomie und Physiologie, ed. M.B. Shields and G.K. Krieglstein. 1993, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 5-33.
 19. **Tuck M W, Crick R P (1998)** The age distribution of primary open angle glaucoma. *Ophthalmic Epidemiol* 5 (4): 173-83.
 20. **Weih L M, Nanjan M, McCarty C A, Taylor H R (2001)** Prevalence and predictors of open-angle glaucoma: results from the visual impairment project. *Ophthalmology* 108 (11): 1966-72.
 21. **Challa P (2008)** Glaucoma genetics. *Int Ophthalmol Clin* 48 (4): 73-94.
 22. **Stone E M, Fingert J H, Alward W L, Nguyen T D, Polansky J R, Sunden S L, Nishimura D, Clark A F, et al. (1997)** Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275 (5300): 668-70.
 23. **Tamm E R, Russell P (2001)** The role of myocilin/TIGR in glaucoma: results of the Glaucoma Research Foundation catalyst meeting in Berkeley, California, March 2000. *J Glaucoma* 10 (4): 329-39.
 24. **Karali A, Russell P, Stefani F H, Tamm E R (2000)** Localization of myocilin/trabecular meshwork--inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (3): 729-40.
 25. **Tamm E R (2002)** Myocilin and glaucoma: facts and ideas. *Prog Retin Eye Res* 21 (4): 395-428.
 26. **Nguyen T D, Chen P, Huang W D, Chen H, Johnson D, Polansky J R (1998)** Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells. *J Biol Chem* 273 (11): 6341-50.
 27. **Tamm E R, Russell P, Epstein D L, Johnson D H, Piatigorsky J (1999)** Modulation of myocilin/TIGR expression in human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (11): 2577-82.
 28. **Kim B S, Savinova O V, Reedy M V, Martin J, Lun Y, Gan L, Smith R S, Tomarev S I, et al. (2001)** Targeted Disruption of the Myocilin Gene (Myoc) Suggests that Human Glaucoma-Causing Mutations Are Gain of Function. *Mol Cell Biol* 21 (22): 7707-13.
 29. **Caballero M, Rowlette L L, Borrás T (2000)** Altered secretion of a TIGR/MYOC mutant lacking the olfactomedin domain. *Biochim Biophys Acta* 1502 (3): 447-60.

30. **Liton P B, Challa P, Stinnett S, Luna C, Epstein D L, Gonzalez P (2005)** Cellular senescence in the glaucomatous outflow pathway. *Exp Gerontol* 40 (8-9): 745-8.
31. **Lutjen-Drecoll E (2005)** Morphological changes in glaucomatous eyes and the role of TGFbeta2 for the pathogenesis of the disease. *Exp Eye Res* 81 (1): 1-4.
32. **Picht G, Welge-Luessen U, Grehn F, Lutjen-Drecoll E (2001)** Transforming growth factor beta 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239 (3): 199-207.
33. **Lutjen-Drecoll E (1999)** Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog Retin Eye Res* 18 (1): 91-119.
34. **Gottanka J, Chan D, Eichhorn M, Lutjen-Drecoll E, Ethier C R (2004)** Effects of TGF-beta2 in perfused human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (1): 153-8.
35. **Leydhecker W (1976)** The intraocular pressure: clinical aspects. *Ann Ophthalmol* 8 (4): 389-92, 395-9.
36. **Leydhecker W (1976)** Pressure tests and tonography. *Buch Augenarzt* (69): 96-108.
37. **Langham M E, Leydhecker W, Krieglstein G, Waller W (1976)** Pneumatographic studies on normal and glaucomatous eyes. *Adv Ophthalmol* 32: 108-33.
38. **Martin X D (1992)** Normal intraocular pressure in man. *Ophthalmologica* 205 (2): 57-63.
39. **Fran-Smith M A, Ophthalmology. Clinical examination of Glaucoma, ed. D.J. Yanoff M. Vol. 12. 1999, London. 4.1-4.3.**
40. **(1998)** The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 126 (4): 498-505.
41. **Mao L K, Stewart W C, Shields M B (1991)** Correlation between intraocular pressure control and progressive glaucomatous damage in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 111 (1): 51-5.
42. **Gramer E, Althaus G (1990)** Significance of raised intraocular pressure in glaucomatous visual field defects. A clinical study. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 197 (3): 218-24.
43. **Yan D B, Coloma F M, Metheetraitut A, Trope G E, Heathcote J G, Ethier C R (1994)** Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure. *Br J Ophthalmol* 78 (8): 643-8.
44. **Haefliger I O, Meyer P, Flammer J, Luscher T F (1994)** The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology? *Surv Ophthalmol* 39 (2): 123-32.
45. **Rose R C, Richer S P, Bode A M (1998)** Ocular oxidants and antioxidant protection. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (4): 397-407.

46. **Brubaker R F (1991)** Flow of aqueous humor in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 (13): 3145-66.
47. **To C H, Kong C W, Chan C Y, Shahidullah M, Do C W (2002)** The mechanism of aqueous humour formation. *Clin Exp Optom* 85 (6): 335-49.
48. **Sachsenweger N**, *Augenheilkunde*. 2002, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
49. **Kaufman P L (1984)** Aqueous humor outflow. *Curr Top Eye Res* 4: 97-138.
50. **Bill A, Maepea O, Hamanaka T (1989)** [Aspects of aqueous humor drainage through Schlemm's canal]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 195 (5): 277-80.
51. **Bill A (1993)** Some aspects of aqueous humour drainage. *Eye* 7: 14-9.
52. **Kanski J J**, *Clinical Ophthalmology - A Systematic Approach*. 2003, München: Elsevier.
53. **Lutjen-Drecoll E, Gabelt B T, Tian B, Kaufman P L (2001)** Outflow of aqueous humor. *J Glaucoma* 10: 42-4.
54. **Thieme H (2006)** Drug therapy in the treatment of glaucoma. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 223 (9): R73-8; quiz R79-80.
55. **Sacca S C, Izzotti A (2008)** Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye. *Prog Brain Res* 173: 385-407.
56. **Izzotti A, Sacca S C, Longobardi M, Cartiglia C (2009)** Sensitivity of ocular anterior-chamber tissues to oxidative damage and its relevance to glaucoma pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
57. **Geyer O, Man O, Weintraub M, Silver D M (2001)** Acute effect of latanoprost on pulsatile ocular blood flow in normal eyes. *Am J Ophthalmol* 131 (2): 198-202.
58. **Ishii K, Tomidokoro A, Nagahara M, Tamaki Y, Kanno M, Fukaya Y, Araie M (2001)** Effects of topical latanoprost on optic nerve head circulation in rabbits, monkeys, and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (12): 2957-63.
59. **Agarwal H C, Gupta V, Sihota R (2003)** Effect of changing from concomitant timolol pilocarpine to bimatoprost monotherapy on ocular blood flow and IOP in primary chronic angle closure glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther* 19 (2): 105-12.
60. **Gong H, Tripathi R C, Tripathi B J (1996)** Morphology of the aqueous outflow pathway. *Microsc Res Tech* 33 (4): 336-67.
61. **Tian B, Kaufman P L, Volberg T, Gabelt B T, Geiger B (1998)** H-7 disrupts the actin cytoskeleton and increases outflow facility. *Arch Ophthalmol* 116 (5): 633-43.
62. **Epstein D L, Rowlette L L, Roberts B C (1999)** Acto-myosin drug effects and aqueous outflow function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (1): 74-81.
63. **Peterson J A, Tian B, Bershadsky A D, Volberg T, Gangnon R E, Spector I, Geiger B, Kaufman P L (1999)** Latrunculin-A increases outflow facility in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (5): 931-41.

64. **Tian B, Gabelt B T, Kaufman P L (1999)** Effect of staurosporine on outflow facility in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (5): 1009-11.
65. **Tian B, Geiger B, Epstein D L, Kaufman P L (2000)** Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (3): 619-23.
66. **Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue B Y, Narumiya S, Honda Y (2001)** Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (1): 137-44.
67. **Honjo M, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue B Y, Honda Y, Tanihara H (2001)** Effects of protein kinase inhibitor, HA1077, on intraocular pressure and outflow facility in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol* 119 (8): 1171-8.
68. **Al-Aswad L A, Gong H, Lee D, O'Donnell M E, Brandt J D, Ryan W J, Schroeder A, Erickson K A (1999)** Effects of Na-K-2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (8): 1695-701.
69. **Mitchell C H, Fleischhauer J C, Stamer W D, Peterson-Yantorno K, Civan M M (2002)** Human trabecular meshwork cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283 (1): C315-26.
70. **Soto D, Comes N, Ferrer E, Morales M, Escalada A, Pales J, Solsona C, Gual A, et al. (2004)** Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (10): 3650-61.
71. **Comes N, Gasull X, Gual A, Borrás T (2005)** Differential expression of the human chloride channel genes in the trabecular meshwork under stress conditions. *Exp Eye Res* 80 (6): 801-13.
72. **Gabelt B T, Wiederholt M, Clark A F, Kaufman P L (1997)** Anterior segment physiology after bumetanide inhibition of Na-K-Cl cotransport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 (9): 1700-7.
73. **Acott T S, Kelley M J (2008)** Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 86 (4): 543-61.
74. **Wiederholt M, Bielka S, Schweig F, Lütjen-Drecoll E, Lepple-Wienhues A (1995)** Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye. *Exp Eye Res* 61: 223-234.
75. **Sabanay I, Gabelt B T, Tian B, Kaufman P L, Geiger B (2000)** H-7 effects on the structure and fluid conductance of monkey trabecular meshwork. *Arch Ophthalmol* 118 (7): 955-62.
76. **Grehn F, Mackensen G, Die Glaukome.** 1993, Stuttgart, Berlin, Köln: Kohlhammer-Verlag.
77. **Barany E H (1962)** The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate (*Cercopithecus ethiops*). *Invest Ophthalmol* 1: 712-27.

78. **Lepple-Wienhues A, Stahl F, Willner U, Schafer R, Wiederholt M (1991)** Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel. *Curr Eye Res* 10 (10): 983-9.
79. **Cellini M, Versura P, Trere D, Campos E C (2005)** Effects of endothelin-1 on human trabecular meshwork cell contraction. *Ophthalmic Res* 37 (1): 43-9.
80. **Wiederholt M, Schäfer R, Wagner U, Lepple-Wienhues A (1996)** Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents. *Ger J Ophthalmol* 5: 146-153.
81. **Thieme H, Hildebrandt J, Choritz L, Strauss O, Wiederholt M (2001)** Muscarinic receptors of the M2 subtype in human and bovine trabecular meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239 (4): 310-5.
82. **Thieme H, Stumpff F, Ottlecz A, Percicot C L, Lambrou G N, Wiederholt M (2001)** Mechanisms of action of unoprostone on trabecular meshwork contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (13): 3193-201.
83. **Choritz L, Rosenthal R, Fromm M, Foerster M H, Thieme H (2005)** Pharmacological and functional characterization of endothelin receptors in bovine trabecular meshwork and ciliary muscle. *Ophthalmic Res* 37 (4): 179-87.
84. **Stumpff F, Boxberger M, Krauss A, Rosenthal R, Meissner S, Choritz L, Wiederholt M, Thieme H (2005)** Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 80 (5): 697-708.
85. **Cellini M, Versura P, Zamparini E, Bendo E, Campos E C (2006)** Effects of endothelin-1 and flunarizine on human trabecular meshwork cell contraction. *Exp Biol Med* 231 (6): 1081-4.
86. **Thieme H, Schimmat C, Munzer G, Boxberger M, Fromm M, Pfeiffer N, Rosenthal R (2006)** Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F2alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (3): 938-45.
87. **Rosenthal R, Choritz L, Schlott S, Bechrakis N E, Jaroszewski J, Wiederholt M, Thieme H (2005)** Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 80 (6): 837-45.
88. **Wiederholt M, Sturm A, Lepple-Wienhues A (1994)** Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (5): 2515-2520.
89. **Wiederholt M, Thieme H, Stumpff F (2000)** The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog Ret Eye Res* 19 (3): 271-95.

90. **Hickey K A, Rubanyi G, Paul R J, Highsmith R F (1985)** Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248: 550-6.
91. **O'Brien R F, Robbins R J, McMurtry I F (1987)** Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol* 132 (2): 263-70.
92. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, et al. (1988)** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 (6163): 411-5.
93. **Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989)** The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (8): 2863-7.
94. **Lee M E, Bloch K D, Clifford J A, Quertermous T (1990)** Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J Biol Chem* 265 (18): 10446-50.
95. **Rubanyi G M, Polokoff M A (1994)** Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46 (3): 325-415.
96. **Kolb E (1991)** Endothelins-properties, formation, mechanism of action and significance. *Z Gesamte Inn Med* 46 (10-11): 355-60.
97. **Luscher T F, Wenzel R R (1995)** Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications. *Agents Actions Suppl* 45: 237-53.
98. **Ortega Mateo A, de Artinano A A (1997)** Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res* 36 (5): 339-51.
99. **Warner T D, Battistini B, Allcock G H, Vane J R (1993)** Endothelin ETA and ETB receptors mediate vasoconstriction and prostanoid release in the isolated kidney of the rat. *Eur J Pharmacol* 250 (3): 447-53.
100. **D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore J C, Carrier E, Labonte J (2003)** Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81 (6): 503-10.
101. **Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T (1992)** Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13 (3): 103-8.
102. **Karne S, Jayawickreme C K, Lerner M R (1993)** Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268 (25): 19126-33.
103. **Kumar C, Mwangi V, Nuthulaganti P, Wu H L, Pullen M, Brun K, Aiyar H, Morris R A, et al. (1994)** Cloning and characterization of a novel endothelin receptor from *Xenopus* heart. *J Biol Chem* 269 (18): 13414-20.

104. **Marsault R, Feolde E, Frelin C (1993)** Receptor externalization determines sustained contractile responses to endothelin-1 in the rat aorta. *Am J Physiol* 264: 687-93.
105. **Sokolovsky M (1995)** Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol Ther* 68 (3): 435-71.
106. **Hosoda K, Nakao K, Hiroshi A, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, et al. (1991)** Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 287 (1-2): 23-6.
107. **Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F (1993)** Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91 (4): 1367-73.
108. **Shyamala V, Moulthrop T H, Stratton-Thomas J, Tekamp-Olson P (1994)** Two distinct human endothelin B receptors generated by alternative splicing from a single gene. *Cell Mol Biol Res* 40 (4): 285-96.
109. **Clozel M, Gray G A (1995)** Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J Cardiovasc Pharmacol* 26(3): 262-4.
110. **Elshourbagy N A, Adamou J E, Gagnon A W, Wu H L, Pullen M, Nambi P (1996)** Molecular characterization of a novel human endothelin receptor splice variant. *J Biol Chem* 271 (41): 25300-7.
111. **Lepple-Wienhues A, Becker M, Stahl F, Berweck S, Hensen J, Noske W, Eichhorn M, Wiederholt M (1992)** Endothelin-like immunoreactivity in the aqueous humour and in conditioned medium from cultured ciliary epithelial cells. *Curr Eye Res* 11 (11): 1041-6.
112. **Wollensak G, Schaefer H E, Ihling C (1998)** An immunohistochemical study of endothelin-1 in the human eye. *Curr Eye Res* 17 (5): 541-5.
113. **Fernandez-Durango R, Rollin R, Mediero A, Roldan-Pallares M, Garcia Feijo J, Garcia Sanchez J, Fernandez-Cruz A, Ripodas A (2003)** Localization of endothelin-1 mRNA expression and immunoreactivity in the anterior segment of human eye: expression of ETA and ETB receptors. *Mol Vis* 9: 103-9.
114. **Prasanna G, Dibas A, Finkley A, Yorio T (1999)** Identification of endothelin converting enzyme-1 in human non-pigmented ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res* 69 (2): 175-83.
115. **Prasanna G, Narayan S, Krishnamoorthy R R, Yorio T (2003)** Eyeing endothelins: a cellular perspective. *Mol Cell Biochem* 253 (1-2): 71-88.
116. **Haque M S, Sugiyama K, Taniguchi T, Kitazawa Y (1996)** Effects of BQ-123, an ETA receptor-selective antagonist, on changes of intraocular pressure, blood-aqueous barrier and aqueous prostaglandin concentrations caused by endothelin-1 in rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 40 (1): 26-32.

117. **Granstam E, Wang L, Bill A (1992)** Ocular effects of endothelin-1 in the cat. *Curr Eye Res* 11 (4): 325-32.
118. **Kiel J W (2000)** Endothelin modulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Exp Eye Res* 71 (6): 543-50.
119. **Prasanna G, Krishnamoorthy R, Clark A F, Wordinger R J, Yorio T (2002)** Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (8): 2704-13.
120. **Stokely M E, Brady S T, Yorio T (2002)** Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (10): 3223-30.
121. **Rao V R, Krishnamoorthy R R, Yorio T (2008)** Endothelin-1 mediated regulation of extracellular matrix collagens in cells of human lamina cribrosa. *Exp Eye Res* 86 (6): 886-94.
122. **Noske W, Hensen J, Wiederholt M (1997)** Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 (9): 551-2.
123. **Tezel G, Kass M A, Kolker A E, Becker B, Wax M B (1997)** Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 6 (2): 83-9.
124. **Kallberg M E, Brooks D E, Garcia-Sanchez G A, Komaromy A M, Szabo N J, Tian L (2002)** Endothelin 1 levels in the aqueous humor of dogs with glaucoma. *J Glaucoma* 11 (2): 105-9.
125. **Prasanna G, Hulet C, Desai D, Krishnamoorthy R R, Narayan S, Brun A M, Suburo A M, Yorio T (2005)** Effect of elevated intraocular pressure on endothelin-1 in a rat model of glaucoma. *Pharmacol Res* 51 (1): 41-50.
126. **Taniguchi T, Okada K, Haque M S, Sugiyama K, Kitazawa Y (1994)** Effects of endothelin-1 on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in the rabbit eye. *Curr Eye Res* 13 (6): 461-4.
127. **Taniguchi T, Haque M S, Sugiyama K, Okada K, Nakai Y, Kitazawa Y (1996)** Effects of endothelin A and B receptors on aqueous humor dynamics in the rabbit eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 12 (2): 123-30.
128. **Granstam E, Wang L, Bill A (1991)** Effects of endothelins (ET-1, ET-2 and ET-3) in the rabbit eye; role of prostaglandins. *Eur J Pharmacol* 194 (2-3): 217-23.
129. **Okada K, Sugiyama K, Haque M S, Taniguchi T, Kitazawa Y (1995)** The effects of endothelin-1 on intraocular pressure and pupillary diameter in rabbits. *Jpn J Ophthalmol* 39 (3): 233-41.
130. **Sugiyama K, Haque M S, Okada K, Taniguchi T, Kitazawa Y (1995)** Intraocular pressure response to intravitreal injection of endothelin-1 and the mediatory role of

- ETA receptor, ETB receptor, and cyclooxygenase products in rabbits. *Curr Eye Res* 14 (6): 479-86.
131. **Hollo G, Lakatos P, Vargha P (2000)** Immediate increase in aqueous humour endothelin 1 concentration and intra-ocular pressure after argon laser trabeculoplasty in the rabbit. *Ophthalmologica* 214 (4): 292-5.
132. **Haefliger I O, Flammer J, Luscher T F (1993)** Heterogeneity of endothelium-dependent regulation in ophthalmic and ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (5): 1722-30.
133. **Sugiyama T, Utsumi T, Azuma I, Fujii H (1996)** Measurement of optic nerve head circulation: comparison of laser speckle and hydrogen clearance methods. *Jpn J Ophthalmol* 40 (3): 339-43.
134. **Orgul S, Cioffi G A, Wilson D J, Bacon D R, Van Buskirk E M (1996)** An endothelin-1 induced model of optic nerve ischemia in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (9): 1860-9.
135. **Cioffi G A, Sullivan P (1999)** The effect of chronic ischemia on the primate optic nerve. *Eur J Ophthalmol* 9 Suppl 1: S34-6.
136. **Strenn K, Matulla B, Wolzt M, Findl O, Bekes M C, Lamsfuss U, Graselli U, Rainer G, et al. (1998)** Reversal of endothelin-1-induced ocular hemodynamic effects by low-dose nifedipine in humans. *Clin Pharmacol Ther* 63 (1): 54-63.
137. **Polska E, Doelemeyer A, Luksch A, Ehrlich P, Kaehler N, Percicot C L, Lambrou G N, Schmetterer L (2002)** Partial antagonism of endothelin 1-induced vasoconstriction in the human choroid by topical unoprostone isopropyl. *Arch Ophthalmol* 120 (3): 348-52.
138. **Lepple-Wienhues A, Stahl F, Wiederholt M (1991)** Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res* 53 (1): 33-8.
139. **Lograno M D, Reibaldi A (1986)** Receptor-responses in fresh human ciliary muscle. *Br J Pharmacol* 87 (2): 379-85.
140. **Ito Y, Yoshitomi T (1986)** Membrane and contractile properties of the dog ciliary muscle. *Br J Pharmacol* 88 (3): 629-38.
141. **Wiederholt M, Lepple-Wienhues A, Stahl F, Contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle, in Basic Aspects of Glaucoma Research III. 1993. p. 287-306.**
142. **Wiederholt M, Dörschner N, Groth J (1997)** Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 211: 153-160.

143. **Wiederholt M, Groth J, Strauß O (1998)** Role of protein kinases on regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1012-1020.
144. **Thieme H, Nass J U, Nuskovski M, Wiederholt M (1999)** The effects of the carbonic anhydrase inhibitors methazolamide, diclofenamide and dorzolamide on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Exp Eye Res* 69 (4): 455-8.
145. **Thieme H, Nass J U, Nuskovski M, Bechrakis N E, Stumpff F, Strauss O, Wiederholt M (1999)** The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (13): 3254-61.
146. **Thieme H, Nuskovski M, Nass J U, Pleyer U, Strauss O, Wiederholt M (2000)** Mediation of Calcium-Independent Contraction in Trabecular Meshwork through Protein Kinase C and Rho-A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (13): 4240-4246.
147. **Renieri G, Choritz L, Rosenthal R, Meissner S, Pfeiffer N, Thieme H (2008)** Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246 (8): 1107-15.
148. **Rosenthal R, Choritz L, Zorn R, Munzer G, Fromm M, Pfeiffer N, Thieme H (2007)** Endothelin receptor B in trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 85: 482-91.
149. **Koga T, Awai M, Tsutsui J, Yue B Y, Tanihara H (2006)** Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 82 (3): 362-70.
150. **Neher E, Sakmann B (1976)** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260 (5554): 799-802.
151. **Hamill O P, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F J (1981)** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recordings from cells and cell-free patches. *Pflüger's Archives* 391: 85-100.
152. **Numberger M, Draguhn A, Patch-Clamp-Technik.** 1996: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
153. **Stumpff F, Strauß O, Boxberger M, Wiederholt M (1997)** Characterization of Maxi-K-channels in bovine trabecular meshwork and their activation by cyclic guanosine monophosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 (9): 1883-1891.
154. **Stumpff F, Que Y, Boxberger M, Strauss O, Wiederholt M (1999)** Stimulation of maxi-K channels in trabecular meshwork by tyrosine kinase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (7): 1404-17.
155. **Stumpff F, Boxberger M, Thieme H, Strauss O, Wiederholt M (2001)** Flufenamic acid enhances current through maxi-K channels in the trabecular meshwork of the eye. *Curr Eye Res* 22 (6): 427-37.

156. **Steinhausen K, Stumpff F, Strauss O, Thieme H, Wiederholt M (2000)** Influence of muscarinic agonists and tyrosine kinase inhibitors on L-type Ca(2+)Channels in human and bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 70 (3): 285-93.
157. **Kageyama M, Fujita M, Shirasawa E (1996)** Endothelin-1 mediated Ca²⁺ influx does not occur through L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in cultured bovine trabecular meshwork cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 12 (4): 433-40.
158. **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y (1985)** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260 (6): 3440-50.
159. **Tao W, Prasanna G, Dimitrijevic S, Yorio T (1998)** Endothelin receptor A is expressed and mediates the [Ca²⁺]_i mobilization of cells in human ciliary smooth muscle, ciliary nonpigmented epithelium, and trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 17 (1): 31-8.
160. **Sanger F, Nicklen S, Coulson A R (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12): 5463-7.
161. **Wiederholt M (1998)** Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow. *Curr Opin Ophthalmol* 9 (2): 46-49.
162. **Somlyo A P, Somlyo A V (2000)** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522: 177-85.
163. **Khurana R N, Deng P F, Epstein D L, Vasantha Rao P (2003)** The role of protein kinase C in modulation of aqueous humor outflow facility. *Exp Eye Res* 76 (1): 39-47.
164. **Rao P V, Deng P F, Kumar J, Epstein D L (2001)** Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (5): 1029-37.
165. **Tokushige H, Inatani M, Nemoto S, Sakaki H, Katayama K, Uehata M, Tanihara H (2007)** Effects of topical administration of y-39983, a selective rho-associated protein kinase inhibitor, on ocular tissues in rabbits and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (7): 3216-22.
166. **Tian B, Brumback L C, Kaufman P L (2000)** ML-7, chelerythrine and phorbol ester increase outflow facility in the monkey Eye. *Exp Eye Res* 71 (6): 551-66.
167. **Honjo M, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue B Y, Honda Y, Tanihara H (2002)** A myosin light chain kinase inhibitor, ML-9, lowers the intraocular pressure in rabbit eyes. *Exp Eye Res* 75 (2): 135-42.
168. **Okada K, Sugiyama K, Haque S R, Taniguchi T, Kitazawa Y (1994)** Biphasic intraocular pressure response to intravitreal injection of endothelin-1. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 98 (10): 935-41.

169. **Sugiyama K, Haque S R, Okada K, Taniguchi T, Hayakawa T, Kitazawa Y (1995)** The effect of an endothelin receptor antagonist, 97-139, on intraocular pressure in rabbits. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 99 (3): 271-6.
170. **Konno T, Maruichi M, Takai S, Oku H, Sugiyama T, Uchibori T, Nagai A, Kogi K, et al. (2005)** Effect of chymase on intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol* 524 (1-3): 132-7.
171. **Shimura M, Yasuda K, Nakzawa T, Kashiwagi K (2006)** The effect of unoprostone isopropyl on Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} currents in cultured monkey trabecular meshwork cells and ciliary muscle cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 22 (4): 219-26.
172. **Thieme H, Steinhausen K, Ottlecz A, Lambrou G N, Strauss O, Wiederholt M, Rosenthal R (2005)** Effects of unoprostone and endothelin 1 on L-type channel currents in human trabecular meshwork cells. *Ophthalmic Res* 37 (6): 293-300.
173. **Zhang X, Clark A F, Yorio T (2003)** Interactions of endothelin-1 with dexamethasone in primary cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (12): 5301-8.
174. **Kamikawatoko S, Tokoro T, Azuma H, Hamasaki H, Ishida A (1995)** The effects of endothelin-1 on isolated bovine ciliary muscles. *Exp Eye Res* 61 (5): 559-64.
175. **Rozsival P, Hampl R, Obenberger J, Starka L, Rehak S (1981)** Aqueous humour and plasma cortisol levels in glaucoma and cataract patients. *Curr Eye Res* 1 (7): 391-6.
176. **Clark A F, Wilson K, McCartney M D, Miggans S T, Kunkle M, Howe W (1994)** Glucocorticoid-induced formation of cross-linked actin networks in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (1): 281-94.
177. **Johnson D H, Bradley J M, Acott T S (1990)** The effect of dexamethasone on glycosaminoglycans of human trabecular meshwork in perfusion organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 (12): 2568-71.
178. **Samples J R, Alexander J P, Acott T S (1993)** Regulation of the levels of human trabecular matrix metalloproteinases and inhibitor by interleukin-1 and dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (12): 3386-95.
179. **Clark A F, Steely H T, Dickerson J E, Jr., English-Wright S, Stropki K, McCartney M D, Jacobson N, Shepard A R, et al. (2001)** Glucocorticoid induction of the glaucoma gene MYOC in human and monkey trabecular meshwork cells and tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (8): 1769-80.
180. **Haque M S, Taniguchi T, Sugiyama K, Okada K, Kitazawa Y (1995)** The ocular hypotensive effect of the ETB receptor selective agonist, sarafotoxin S6c, in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 (5): 804-8.

181. **Hollo G, Kothy P, Lakatos P, Vargha P (2002)** Endothelin-A receptor antagonist BQ-485 protects against intraocular pressure spike induced by laser trabeculoplasty in the rabbit. *Ophthalmologica* 216 (6): 459-62.
182. **Polak K, Luksch A, Frank B, Jandrasits K, Polska E, Schmetterer L (2003)** Regulation of human retinal blood flow by endothelin-1. *Exp Eye Res* 76 (5): 633-40.
183. **Chauhan B C, LeVatte T L, Jollimore C A, Yu P K, Reitsamer H A, Kelly M E, Yu D Y, Tremblay F, et al. (2004)** Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (1): 144-52.
184. **Polak K, Petternel V, Luksch A, Krohn J, Findl O, Polska E, Schmetterer L (2001)** Effect of endothelin and BQ123 on ocular blood flow parameters in healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (12): 2949-56.
185. **Nakajima E, Nakajima T, Minagawa Y, Shearer T R, Azuma M (2005)** Contribution of ROCK in contraction of trabecular meshwork: proposed mechanism for regulating aqueous outflow in monkey and human eyes. *J Pharm Sci* 94 (4): 701-8.
186. **Tamura M, Nakao H, Yoshizaki H, Shiratsuchi M, Shigyo H, Yamada H, Ozawa T, Totsuka J, et al. (2005)** Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application. *Biochim Biophys Acta* 1754 (1-2): 245-52.
187. **Alm A (1998)** Prostaglandin derivatives as ocular hypotensive agents. *Prog Retin Eye Res* 17 (3): 291-312.
188. **Serle J B, Podos S M, Kitazawa Y, Wang R F (1998)** A comparative study of latanoprost (Xalatan) and isopropyl unoprostone (Rescula) in normal and glaucomatous monkey eyes. *Jpn J Ophthalmol* 42 (2): 95-100.
189. **Kashiwagi K, Iizuka Y, Tsukahara S (1999)** Metabolites of isopropyl unoprostone as potential ophthalmic solutions to reduce intraocular pressure in pigmented rabbits. *Jpn J Pharmacol* 81 (1): 56-62.
190. **Gelatt K N, Mackay E O, Dashiell T, Biken A (2004)** Effect of different dose schedules of 0.15% unoprostone isopropyl on intraocular pressure and pupil size in the glaucomatous beagle. *J Ocul Pharmacol Ther* 20 (5): 411-20.
191. **Hollo G, Visontai Z, Lakatos P, Vargha P (2003)** Unoprostone isopropyl pretreatment decreases endothelin-1 release and the intra-ocular pressure spike induced by laser trabeculoplasty in the rabbit. *Ophthalmologica* 217 (3): 231-6.
192. **Makimoto Y, Sugiyama T, Kojima S, Azuma I (2002)** Long-term effect of topically applied isopropyl unoprostone on microcirculation in the human ocular fundus. *Jpn J Ophthalmol* 46 (1): 31-5.
193. **Melamed S (2002)** Neuroprotective properties of a synthetic docosanoid, unoprostone isopropyl: clinical benefits in the treatment of glaucoma. *Drugs Exp Clin Res* 28 (2-3): 63-73.

194. **Kimura I, Shinoda K, Tanino T, Ohtake Y, Mashima Y (2005)** Effect of topical unoprostone isopropyl on optic nerve head circulation in controls and in normal-tension glaucoma patients. *Jpn J Ophthalmol* 49 (4): 287-93.
195. **Hayami K, Unoki K (2001)** Photoreceptor protection against constant light-induced damage by isopropyl unoprostone, a prostaglandin F(2alpha) metabolite-related compound. *Ophthalmic Res* 33 (4): 203-9.
196. **Camras C B, Bito L Z, Eakins K E (1977)** Reduction of intraocular pressure by prostaglandins applied topically to the eyes of conscious rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 (12): 1125-34.
197. **Ota T, Aihara M, Narumiya S, Araie M (2005)** The effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (11): 4159-63.
198. **Beitch B R, Eakins K E (1969)** The effects of prostaglandins on the intraocular pressure of the rabbit. *Br J Pharmacol* 37 (1): 158-67.
199. **Waitzman M B, King C D (1967)** Prostaglandin influences on intraocular pressure and pupil size. *Am J Physiol* 212 (2): 329-34.
200. **Al-Jazzaf A M, DeSantis L, Netland P A (2003)** Travoprost: a potent ocular hypotensive agent. *Drugs Today* 39 (1): 61-74.
201. **Hylton C, Robin A L (2003)** Update on prostaglandin analogs. *Curr Opin Ophthalmol* 14 (2): 65-9.
202. **Perry C M, McGavin J K, Culy C R, Ibbotson T (2003)** Latanoprost : an update of its use in glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Aging* 20 (8): 597-630.
203. **Nguyen Q H (2004)** The role of prostaglandin analogues in the treatment of glaucoma in the 21st century. *Int Ophthalmol Clin* 44 (2): 15-27.
204. **Toris C B, Zhan G, Fan S, Dickerson J E, Landry T A, Bergamini M V, Camras C B (2007)** Effects of travoprost on aqueous humor dynamics in patients with elevated intraocular pressure. *J Glaucoma* 16 (2): 189-95.
205. **Bahler C K, Howell K G, Hann C R, Fautsch M P, Johnson D H (2008)** Prostaglandins increase trabecular meshwork outflow facility in cultured human anterior segments. *Am J Ophthalmol* 145 (1): 114-9.
206. **Villumsen J, Alm A, Soderstrom M (1989)** Prostaglandin F2 alpha-isopropylester eye drops: effect on intraocular pressure in open-angle glaucoma. *Br J Ophthalmol* 73 (12): 975-9.
207. **Camras C B (1995)** Mechanism of the prostaglandin-induced reduction of intraocular pressure in humans. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23: 519-25.
208. **Weinreb R N, Toris C B, Gabelt B T, Lindsey J D, Kaufman P L (2002)** Effects of prostaglandins on the aqueous humor outflow pathways. *Surv Ophthalmol* 47: 53-64.

209. **Lindsey J D, Kashiwagi K, Boyle D, Kashiwagi F, Firestein G S, Weinreb R N (1996)** Prostaglandins increase proMMP-1 and proMMP-3 secretion by human ciliary smooth muscle cells. *Curr Eye Res* 15 (8): 869-75.
210. **Weinreb R N, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Tsukahara S, Lindsey J D (1997)** Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 (13): 2772-80.
211. **Lindsey J D, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Weinreb R N (1997)** Prostaglandins alter extracellular matrix adjacent to human ciliary muscle cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 (11): 2214-23.
212. **Ocklind A (1998)** Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res* 67 (2): 179-91.
213. **Kim J W, Lindsey J D, Wang N, Weinreb R N (2001)** Increased human scleral permeability with prostaglandin exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (7): 1514-21.
214. **Lee P Y, Podos S M, Severin C (1984)** Effect of prostaglandin F2 alpha on aqueous humor dynamics of rabbit, cat, and monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 (9): 1087-93.
215. **Husain S, Whitlock N A, Rice D S, Crosson C E (2006)** Effects of latanoprost on rodent intraocular pressure. *Exp Eye Res* 83 (6): 1453-8.
216. **Nilsson S F (1997)** The uveoscleral outflow routes. *Eye* 11: 149-54.
217. **Toris C B, Yablonski M E, Wang Y L, Camras C B (1999)** Aqueous humor dynamics in the aging human eye. *Am J Ophthalmol* 127 (4): 407-12.
218. **Sponsel W E, Paris G, Trigo Y, Pena M, Weber A, Sanford K, McKinnon S (2002)** Latanoprost and brimonidine: therapeutic and physiologic assessment before and after oral nonsteroidal anti-inflammatory therapy. *Am J Ophthalmol* 133 (1): 11-8.
219. **Sponsel W E, Paris G, Trigo Y, Pena M (2002)** Comparative effects of latanoprost (Xalatan) and unoprostone (Rescula) in patients with open-angle glaucoma and suspected glaucoma. *Am J Ophthalmol* 134 (4): 552-9.
220. **Yu D Y, Su E N, Cringle S J, Schoch C, Percicot C P, Lambrou G N (2001)** Comparison of the vasoactive effects of the docosanoid unoprostone and selected prostanoids on isolated perfused retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (7): 1499-504.
221. **Erkin E F, Tarhan S, Kayikcioglu O R, Deveci H, Guler C, Goktan C (2004)** Effects of betaxolol and latanoprost on ocular blood flow and visual fields in patients with primary open-angle glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 14 (3): 211-9.

7 Abkürzungsverzeichnis

ET	Endothelin
ET-AR	Endothelin-Rezeptor A
ET-BR	Endothelin-Rezeptor B
EZM	Extrazelluläre Matrix
FP-Rezeptor	Prostaglandin F-Rezeptor
IOD	Intraokularer Druck
IP ₃	Inositoltriphosphat
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase
MLCP	Myosin-Light-Chain-Phosphatase
Myosin-RLC	Myosin regulatory light chain
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
ROCK	RhoKinase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TM	Trabekelmaschenwerk
ZM	Ziliarmuskel

8 Anhang

8.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Herrn PD Dr. Hagen Thieme, Herrn Prof. Olaf Strauß und Herrn Prof. emer. Michael Wiederholt. Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Michael Fromm, der mich stets unterstützt hat und dadurch diese Arbeit wesentlich gefördert hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lars Choritz, der durch zahlreiche, fruchtbare Diskussionen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie, die durch exzellente technische Assistenz und gute Zusammenarbeit einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Des Weiteren möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Kolloginnen und Kollegen für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit danken. Auch möchte ich den Doktorandinnen und Doktoranden des Instituts meinen Dank aussprechen, die durch ihren Einsatz maßgeblich am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt sind.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, die meine Arbeit stets unterstützt hat und mir immer wieder zeigt, dass es neben der Forschung noch andere, wesentliche Dinge im Leben gibt.

8.2 Eidesstattliche Erklärung

Nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe.

ich die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben habe.

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift