

Aus der
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F. Grehn

**Über den Einfluss des transformierenden
Wachstumsfaktors $\beta 2$ auf das Zytoskelett
und das Proteinexpressionsmuster
menschlicher Trabekelmaschenwerkszellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Thomas Wecker

aus Heilbronn

Würzburg, September 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. G. Schlunck
Koreferent: Prof. Dr. med. H. Steffen
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung :
28. Januar 2011

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die Glaukome	10
1.1.1	Primäres Offenwinkelglaukom	11
1.1.2	Therapie des primären Offenwinkelglaukoms	11
1.2	Kammerwasser	12
1.3	Augeninnendruck	13
1.4	Trabekelmaschenwerk	14
1.4.1	Trabekelmaschenwerkszellen	15
1.4.2	Biomechanik des Trabekelmaschenwerks	16
1.4.3	Veränderungen des Trabekelmaschenwerks beim Offenwinkelglaukom	17
1.5	TGF- β	18
1.5.1	TGF- β und Trabekelmaschenwerk	19
1.6	β -Catenin	21
1.7	Cadherin	22
1.8	Das Zytoskelett	23
1.8.1	Biophysik	23
1.9	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Einführende Anmerkungen	25
2.2	Zellen	26
2.3	Western Blot	26
2.3.1	Zellernte	27
2.3.2	Trenn- und Sammelgel	27
2.3.3	Ladepuffer	28
2.3.4	Auftrennung der Proteine im Gel	29
2.3.5	Blotting auf eine Membran	30
2.3.6	Nachweis der Proteine	30

2.3.7	Quantitative Beurteilung	31
2.4	Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie	32
2.4.1	Anzucht und Fixierung von Zellen	32
2.4.2	Färbung und Einbettung der Zellen	33
2.5	Fraktionierung der Zellen zur separierten Bestimmung zytosolischer und nukleärer Proteine	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Zellcharakterisierung	35
3.2	TGF- β 2-induzierte Proteinexpression und -phosphorylierung	36
3.3	Fraktionierung von Trabekelmaschenwerkszellen zur Bestimmung der Lokalisation von β -Catenin	39
3.4	Lokalisation von β -Catenin und Zytoskelettproteinen	41
3.5	Einfluss der Zellkontraktilität auf die TGF- β 2-induzierte Expression von β -Catenin und Cadherin	42
3.6	ALK-5-Rezeptorabhängigkeit	44
3.7	Inhibition von Smad3	46
3.8	Inhibition von p38	47
3.9	PI3K-AKT-Inhibitor	49
3.10	Inhibition des MEK/ERK-Pfades	52
4	Diskussion	55
4.1	TGF- β 2-induzierte Proteinexpression und -phosphorylierung	55
4.2	Fraktionierung von Trabekelmaschenwerkszellen zur Bestimmung der Lokalisation von β -Catenin	56
4.3	Lokalisation von β -Catenin und Zytoskelettproteinen	58
4.4	Einfluss der Zellkontraktilität auf die TGF- β 2-Wirkung und den Catenin- Anstieg	59
4.5	ALK-5-Rezeptorabhängigkeit	61
4.6	Smad3-Inhibition	62
4.7	Inhibition von p38	63
4.8	AKT-Inhibitor	64
4.9	MEK/ERK	65
4.10	Zusammenfassung	68
5	Anhang	70
5.1	Verwendete Abkürzungen	70

5.2	Verwendete Antikörper	72
5.3	Verwendete Inhibitoren, Wachstumsfaktoren und Zellkulturmedien . .	74
5.4	Verwendete Pufferlösungen	76
5.5	Pufferlösungen für die Zellfraktionierung	77
6	Literaturverzeichnis	79
7	Abbildungsverzeichnis	94
8	Tabellenverzeichnis	95

1 Einleitung

Die Gruppe der glaukomatösen Erkrankungen gehört zu den wichtigsten Erblindungsursachen weltweit^[140]. Aufgrund der Assoziation der Erkrankung mit höherem Lebensalter und den erwarteten demographischen Entwicklungen ist insbesondere in den westlichen Industriegesellschaften mit einer steigenden Inzidenz der Glaukome zu rechnen^[68,140]. Damit wird diese in aller Regel chronisch-progredient verlaufende Erkrankung in Zukunft eine noch bedeutendere Rolle in der Ophthalmologie spielen.

Ein wesentlicher und häufig zu erhebender Befund bei an Glaukom erkrankten Patienten ist eine Erhöhung des Augeninnendruckes, der sogar lange Zeit ein Definitionskriterium der Krankheit war^[9,14]. In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Senkung des Augeninnendruckes die Progression der glaukomatösen Gesichtsfeldausfälle verlangsamen kann^[80,81,106]. Die pathologische Steigerung des intraokulären Druckes wird auf eine verringerte Abflusskapazität des Trabekelmaschenwerks bei annähernd unbeeinflusster Kammerwassersekretion zurückgeführt^[19]. Die genauen pathogenetischen Vorgänge liegen dabei jedoch noch immer im Dunkeln.

Im Kammerwasser von Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom werden erhöhte Werte des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF- β) gefunden^[181] und es ist anzunehmen, dass das Zytokin eine Rolle in der Glaukomgenese spielt^[109,163]. Der Einfluss von TGF- β auf Quantität und Qualität der von humanen Trabekelmaschenwerkszellen (HTM) sezernierten Extrazellulärmatrix (EZM) ist beschrieben^[59,63]. Da TGF- β zu einer Zunahme der EZM führt, wurden die erhöhten TGF- β -Werte im Kammerwasser von Glaukopatienten in einen kausalen Zusammenhang mit dem erhöhten Abflusswiderstand gebracht: die steigende Menge an EZM gilt heute als ein weitgehend akzeptierter Erklärungsansatz für die Zunahme des trabekulären Abflusswiderstandes^[1,184].

Weitere Folgen erhöhter TGF- β -Werte im Kammerwasser auf das Trabekelmaschenwerk, insbesondere biomechanische Implikationen sind weitgehend unerforscht. Die vorliegende Arbeit untersucht potentiell glaukom-assoziierte Veränderungen der Zell-Zell-Adhäsion unter TGF- β 2-Einfluss in Trabekelmaschenwerkszellen.

1.1 Die Glaukome

Unter der Bezeichnung „Glaukom“¹ oder dem umgangssprachlich verwendeten Synonym „Grüner Star“ werden pathophysiologisch und ätiologisch unterschiedliche Erkrankungen des Auges zusammengefasst, deren morphologische Gemeinsamkeit in einer Abnahme der Anzahl retinaler Ganglienzellen und einer vergrößerten Exkavation der Papille besteht.^[9]

Funktionell führt dies zu langsam progredienten Gesichtsfeldausfällen bis hin zur Erblindung. Aufgrund ihrer großen Prävalenz stellen die Glaukome weltweit die zweithäufigste Ursache für den Verlust des Gesichtssinnes dar^[140]. Auch wenn Patienten in Schwellen- und Entwicklungsländern durch wenig entwickelte medizinische Versorgungsstrukturen von dieser chronischen Erkrankung meist wesentlich schwerer betroffen sind und eine Progression bis zur Erblindung häufiger ist^[111], so verursachen die Glaukome auch in Industrienationen häufig Sehbehinderungen bis hin zum vollständigen Visusverlust^[98].

In Süddeutschland sind Erkrankungen aus der Gruppe der Glaukome die dritthäufigste Erblindungsursache^[152,178]. Für das Jahr 2030 wird für die Bundesrepublik Deutschland eine Zunahme der glaukombedingten Erblindungen auf über 2000/Jahr prognostiziert^[90].

Als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines Glaukoms gelten der (statistisch oder individuell) erhöhte Augeninnendruck und ein fortgeschrittenes Alter. Daneben beeinflussen auch der ethnischen Hintergrund des Patienten^[114,176], eine positive Familienanamnese^[10,20], das Bestehen einer Myopie^[33] sowie eine arterielle Hypotonie die Inzidenz des Glaukoms^[36,50].

Die Basisdiagnostik und Früherkennung des Glaukoms besteht aus einer Messung des IOD und einer visuellen Beurteilung des Durchmessers der Papillenexkavation^[4]. In jüngerer Vergangenheit wird zunehmend eine weiterführende Diagnostik mittels verschiedener Verfahren² angestrebt^[133].

¹Etymologisch ableitbar von *glaukós* (griech. für „(grau)bläulich“ als Beschreibung der Farbe des Meeres; beschreibt die Veränderung der Irisfarbe durch chron. Entzündung

²Heidelberg Retina Tomograph (HRT), Scanning-Laser-Polarimetrie (GDx), Retinal Thickness Analyzer (RTA), Optical Coherence Tomography (OCT)

1.1.1 Primäres Offenwinkelglaukom

In der vorliegenden Arbeit werden zellbiologische Aspekte von menschlichen Trabekelmaschenwerkszellen untersucht. Die Rahmenbedingungen der durchgeführten Experimente sind dabei im Wesentlichen auf die Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen des primären Offenwinkelglaukoms (POWG) ausgerichtet.

Beim POWG handelt es sich um die häufigste Form des Glaukoms in europäischen Populationen^[14,187]. Definitionsgemäß ist eine Exkavation der Papille diagnostizierbar^[54]. Betroffene zeigen obligat typische, korrespondierende Gesichtsfeldausfälle (meist als sog. *Bjerrum-Skotom*) und fakultativ einen erhöhten Augeninnendruck^[139]. Größere (> 5 mmHg) Fluktuationen des IOD im Tagesprofil sind nicht untypisch für das POWG^[157]. Typischerweise tritt das primäre Offenwinkelglaukom bilateral auf^[97,139].

1.1.2 Therapie des primären Offenwinkelglaukoms

Auch wenn der genaue Zusammenhang zwischen gesteigertem Augeninnendruck und Glaukomentstehung noch nicht bekannt ist, konnte doch gezeigt werden, dass eine konsequente Senkung des IOD zu einer verlangsamten oder gar ausbleibenden Progression der erkrankungsbedingten Gesichtsfelddefekte führt. Dagegen ist ein hoher IOD mit fortschreitendem Glaukomschaden assoziiert^[80,81,106,112,113,158,160,167]. Die Hauptwirkung aller heute bekannten, klinisch etablierten Therapieverfahren besteht in der Senkung des Augeninnendruckes. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der erhöhte Augeninnendruck und der entstehende Papillenschaden nicht nur auf einer gemeinsamen Ursache beruhen, sondern vielmehr kausal miteinander verknüpft sind.

Zur Behandlung des POWG stehen medikamentöse, operative und lasergestützte Therapieoptionen zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit soll lediglich auf die Argonlasertrabekuloplastik (ALT) sowie die Kanaloplastik näher eingegangen werden. Bei der ALT wird das Gewebe punktuell mittels eines Lasers stark erhitzt. Die resultierende Senkung des Augeninnendruckes wird hauptsächlich auf die Gewebeschrumpfung im Rahmen der Vernarbung zurückgeführt. Hierbei werden die benachbarten Abschnitte des Trabekelmaschenwerks gedehnt, womit die Durchflusskapazität für das Kammerwasser ansteigt^[192]. Daneben sind auch zelluläre Veränderungen und Modifikationen der Extrazellulärmatrix (EZM) nach Argonlasertrabekuloplastik feststellbar^[28]. Bei der Kanaloplastik geht der Operateur mit einem feinen Katheter in den Schlemm'schen Kanal ein und bringt einen zirkulären gelegenen Faden ein. Durch Verknotung beider

Enden des Fadens wird die Vorspannung des TM erhöht und so die Abflusskapazität erhöht^[135].

1.2 Kammerwasser

Das Kammerwasser (KW) ist eine seröse Flüssigkeit, die den anterioren Teil der Hinterkammer sowie die Vorderkammer des Auges ausfüllt. Es wird durch das unpigmentierte Epithel des Ziliarkörpers und der Processus ciliares aktiv in die Augenhinterkammer sezerniert. Hierbei spielen insbesondere die beiden Enzyme Natrium-Kalium-ATPase und Karboanhydrase eine entscheidende Rolle^[70,185]. Das KW umspült Augenlinse und Iris und tritt dann durch die Pupille in die Vorderkammer ein^[46]. Der weitaus überwiegende Teil verlässt die Vorderkammer über das Trabekelmaschenwerk (*Trabeculum corneosclerale*) und den Schlemm'schen Kanal.

Die Kammerwasserproduktion unterliegt inter- und (tageszeitabhängigen) intraindividuellen Schwankungen^[94]. Im Durchschnitt werden in jedem Auge täglich etwa 3,5-3,9 ml Kammerwasser sezerniert. Das gesamte Kammerwasservolumen des Auges wird damit statistisch in knapp zwei Stunden einmal komplett ausgetauscht^[46]. Der Kammerwasserfluss je Zeiteinheit ist altersabhängig und reduziert sich mit fortschreitendem Alter etwas^[19].

15% des Kammerwassers verlassen das Auge über den sogenannten uveoskleralen Abflussweg durch Septen des Ziliarmuskels. Der überwiegende Anteil von ca. 85% des KW jedoch gelangt über den Kammerwinkel in den Schlemm'schen Kanal und durchfließt zuvor das Trabekelmaschenwerk (vgl. Abb. 1.1)^[67].

Funktion des Kammerwassers ist es, im Zusammenspiel mit dem Glaskörper die Form des Bulbus gegen umgebenden Luft- und Gewebedruck aufrecht zu halten, gemeinsam mit dem retinalen Pigmentepithel eine Ablösung der Netzhaut zu verhindern und insbesondere eine gleichmäßige Krümmung der Hornhaut sicherzustellen. Weiterhin fungiert es als Nährlösung für die unvascularisierten Strukturen Linse, Hornhautendothel und Trabekelmaschenwerk^[185].

1.3 Augeninnendruck

Der Augeninnendruck, der beim Gesunden statistisch zwischen 10 und 21 mm Hg liegt ($15,5 \pm 2,75$)^[107], wird durch das Verhältnis zwischen Kammerwasserproduktion und -abfluss bestimmt^[35]. Das Druckgefälle, das sich zwischen der Vorderkammer und dem episkleralen Venendruck über das Trabekelmaschenwerk aufbaut bewirkt einen passiven Abfluss der intraokulären Flüssigkeit in das venöse System. Hierbei sind keine aktiven Transportmechanismen beteiligt^[162]. In höherem Lebensalter steigt der IOD auch in einer –im Hinblick auf ophthalmologische Erkrankungen– gesunden Population leicht an^[14].

Die Kammerwasserproduktion ist relativ unabhängig vom Augeninnendruck und bleibt im Krankheitsverlauf des Glaukoms recht konstant, nachts lassen sich jedoch im Vergleich mit einer altersentsprechenden gesunden Population erhöhte Sekretionsraten messen^[18,46,103].

Als Regelgröße für den IOD verbleibt somit der Kammerwasserabfluss^[19].

An enukleierten Augen konnte beim POWG ein erhöhter Abflusswiderstand des Trabekelmaschenwerks experimentell nachgewiesen werden^[65]. Diese Beobachtung scheint auch in vivo zu gelten^[19].

1.4 Trabekelmaschenwerk

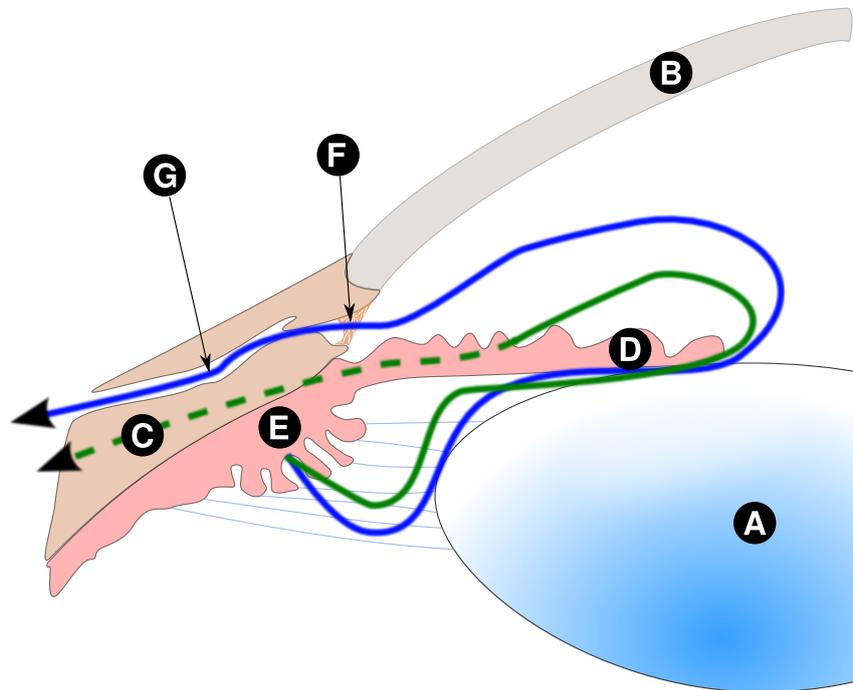


Abbildung 1.1

Schematisches Schnittbild des vorderen Augenabschnittes und Kammerwinkels des menschlichen Auges.

(A) Linse, (B) Hornhaut, (C) Lederhaut, (D) Regenbogenhaut, (E) Ziliarkörper, (F) Trabekelmaschenwerk, (G) Schlemm'scher Kanal. Grün: uveoskleraler Abfluss; blau: Fluss des Kammerwassers vom Ziliarkörper in den Schlemm'schen Kanal.

Dass die Verbindung zwischen der Vorderkammer und dem venösen Gefäßsystem des Auges nicht vollständig offen sein kann, sondern ein den Augeninnendruck aufbauendes und regulierendes Gewebe dazwischen geschaltet sein muss, erkannte der deutsche Ophthalmologe Theodor Carl Gustav von Leber bereits 1873^[104].

Das Trabekelmaschenwerk (TM) ist ein spongiöses Gewebe, das zwischen Skleralsporn und Ziliarkörper aufgespannt ist und so den Kammerwinkel überspannt. Es muss vom Kammerwasser (KW) durchflossen werden, bevor dieses in den Schlemm'schen Kanal gelangen kann (vgl. Abb. 1.1).

Histologisch lassen sich drei Teile des TM unterscheiden: ein uvealer, ein korneoskleraler und einen subendothelialer Anteil^[109]. Das uveale und korneosklerale Trabekelmaschenwerk bestehen aus Lamellenstrukturen. Das Zentrum dieser bilden Elastin-

und Kollagenfibrillen, die nach außen hin von Trabekelmaschenwerkszellen bedeckt sind^[109]. Die Weite der Lamellenzwischenräume wurde von Tripathi und Mitarbeitern mit 25-75 μm für das uveale Maschenwerk und 2-15 μm für das korneosklerale Maschenwerk angegeben^[180]. Die interlamellären Räume sind damit relativ weit. Die Generierung eines entscheidenden Widerstand gegenüber dem Kammerwasserabfluss durch diese beiden Strukturen ist dadurch unwahrscheinlich. Diese Überlegungen konnten sowohl theoretisch-mathematisch^[120] als auch experimentell^[65] verifiziert werden.

Das subendotheliale oder juxtacanaliculäre Maschenwerk hingegen ist wesentlich dichter und wird aufgrund seiner Struktur auch als cribriformes (lat. cribrum: Sieb) Maschenwerk bezeichnet^[109]. Es bildet einen Teil der inneren Wand des Schlemm'schen Kanals und besteht aus Trabekelmaschenwerkszellen, die in Extrazellulärmatrix eingebettet liegen. Der Durchfluss von Kammerwasser wird durch die dichtere Struktur des Gewebes hier nur eingeschränkt ermöglicht. Durch diese Beobachtung gilt das juxtacanaliculäre Maschenwerk als Ort der IOD-Generierung^[13,110]. Neuere Arbeiten zeigen, dass ein erheblicher Anteil des Abflusswiderstandes Gesunder zwischen dem Endothel des Schlemm'schen Kanals und dem juxtacanaliculären TM entsteht^[45,84].

Der Durchflusswiderstand durch das Gewebe, insbesondere den juxtacanaliculären Anteil ist nicht an allen Stellen gleich hoch. Vielmehr existieren porenartige Öffnungen. Dadurch entsteht ein als *funneling* bezeichnetes Phänomen, das den Strömungswiderstand erhöht. Aktuelle Hypothesen gehen von einer Kombination aus EZM-Ablagerung und fluiddynamischen Effekten als Ursache für den Augeninnendruck aus^[131].

1.4.1 Trabekelmaschenwerkszellen

Das TM enthält spezialisierte Zellen (s.u.) welche dem periokulären Mesenchym entstammen^[64]. Die Anzahl der Zellen im Trabekelmaschenwerk im 20. Lebensjahr wird auf ca. 1,2 Millionen geschätzt, wobei sich diese jährlich um etwa 12.000 Zellen reduziert^[61]. Humane Trabekelmaschenwerkszellen zeigen eine ausgeprägte Phagozytoseaktivität^[62].

Erhöhter Augeninnendruck führt zu steigender Gewebespannung im Trabekelmaschenwerk und damit zu wachsenden Zugkräften auf die Trabekelmaschenwerkszellen. Mechanischer Stress in Form von Zugkräften führt bei diesem Zelltyp zu Expressionsänderungen von zahlreichen Proteinen, darunter einige Zytoskelett-assoziierte Proteine sowie vorwiegend extrazellulär lokalisierte Eiweiße wie Kollagene und Fibronectin.

Weiterhin wird der EZM-Umsatz durch eine Expressionssteigerung von Gelatinase und Matrixmetalloproteasen erhöht^[15].

Die Zellen aus dem cribriformen Anteil des TM unterscheiden sich von den übrigen HTM durch ihren hohen Gehalt an α B-Crystallin^[109]. Die Variation der α B-Crystallin-Expression in den verschiedenen Teilen des Trabekelmaschenwerks könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein unterschiedlicher Zellpopulationen in diesem Gewebe sein. Die dürftige Datenlage erlaubt jedoch zur Zeit noch keine Einteilung der HTM in abgrenzbare Subpopulationen^[62].

1.4.2 Biomechanik des Trabekelmaschenwerks

Einzelne Muskelfasern des Ziliarmuskels strahlen in den Sklerasporn ein oder haben direkte Ausläufer in das Trabekelmaschenwerk^[150]. Über beide Anknüpfungspunkte hat der Ziliarmuskel Einfluss auf den Abflusswiderstand des TM: Die Kontraktion des ringförmigen Muskels führt zu einer Rückverlagerung des Skleralspornes und einer Aufweitung der Maschen des TM und damit zur Verbesserung des Kammerwasserabflusses^[110,150,189]. Wegen des Vorkommens kontraktile Elemente im TM wird von einem funktionellen Antagonismus zwischen diesem Gewebe und dem Ziliarmuskel ausgegangen^[150,188,189]. Selbach und Mitarbeiter fanden Nervenendigungen im TM von Primaten und schlugen eine Beteiligung dieser an der Autoregulation der Trabekelmaschenwerksspannung vor^[155].

Bereits 1984 fanden Tripathi und Tripathi Anhaltspunkte in der Zellmorphologie die darauf hindeuteten, dass HTM die Fähigkeit zur eigenständigen Kontraktion besitzen^[179]. Sieben Jahre später konnten elektrophysiologische Untersuchungen diese Vermutung erhärten^[30]. Auch andere Ansätze stützen diese These, da einige molekularbiologische Charakteristika von glatten Muskelzellen auch auf HTM zutreffen und Myofibroblasten im Trabekelmaschenwerk nachweisbar sind^[52,82,105].

Einige Jahrzehnte zuvor war bereits beobachtet worden, dass Pilocarpin den Kammerwasserabfluss erhöht und dieser Effekt sich durch nachfolgende Atropinapplikation weitestgehend wieder rückgängig machen lässt^[8]. Die medikamentöse Beeinflussbarkeit des Kammerwasserabflusses durch die beiden genannten Substanzen erscheint zunächst im Wesentlichen durch deren Variation der Ziliarmuskelkontraktion erklärbar zu sein. Nach diesem Modell führt eine Anspannung des Ziliarmuskels zu einer passiven Dehnung der Maschen des TM und damit zu einem erhöhten Kammerwasserabfluss. Durch

Relaxation des Ziliarmuskels hingegen sinkt die Durchflussmöglichkeit für Kammerwasser aufgrund der passiven Rückstellkräfte des TM wieder ab.

Während eines Aufenthaltes an der Makerere Universität in Kampala (Uganda) entwickelte Bárány die Hypothese einer direkten Wirkung des Pilocarpins auf die Endothelzellen des Schlemm'schen Kanals^[8]. Bis zu diesem Zeitpunkt waren Endothel und TM als passive Gewebe angesehen worden, deren Spannungszustände ausschließlich extrinsisch durch den Ziliarmuskel beeinflussbar seien.

Vor dem Hintergrund dieser Entdeckungen und Überlegungen entwickelte sich die Hypothese eines funktionellen Antagonismus zwischen Trabekelmaschenwerk einerseits und dem anatomisch angrenzenden Ziliarmuskel andererseits^[150,188,189].

Die wachsenden wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Funktionsweise des Trabekelmaschenwerks lassen erkennen, dass es vermutlich wesentlich stärker in die Regulation des Kammerwasserabflusses involviert ist, als bisher angenommen. Zugleich wird dieses Gewebe auch als Zielort neuer medikamentöser Glaukomtherapien interessant^[49].

1.4.3 Veränderungen des Trabekelmaschenwerks beim Offenwinkelglaukom

Bereits seit annähernd 40 Jahren ist eine Änderung der Zusammensetzung und Menge der Extrazellulärmatrix im Trabekelmaschenwerk von Patienten mit Offenwinkelglaukom bekannt^[151]. Als Herkunftsort der glykosaminreichen EZM-Ablagerungen wurde der cribriforme Teil des TM vermutet^[149]. Eine genauere Analyse der sogenannten Plaques ergibt hohe Konzentrationen an Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat^[91], während der relative Anteil von Keratansulfaten abnimmt^[109]. Die Menge des Plaque-Materials korreliert stark negativ mit der Zahl der intakten Axone am Sehnervenkopf, es lassen sich jedoch nicht in allen Augen mit erhöhtem IOD auch pathologische EZM-Ablagerungen finden^[109]. Die Plaquebildung wird zum einen auf eine erhöhte Synthese von Proteinen der Extrazellulärmatrix^[91,125,151,184], zum anderen auf eine verminderte Aktivität von matrixabbauenden Metalloproteasen (MMP) zurückgeführt^[3,16,153]. Beide Annahmen konnten für TGF- β 2-stimulierte menschliche Trabekelmaschenwerkzellen gezeigt werden^[59,63].

1.5 TGF- β

Der transformierende Wachstumsfaktor (transforming growth factor) β (TGF- β) ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Er bildet zusammen mit TGF- α und BMP (bone morphogenetic protein), Aktivinen und weiteren Signalmolekülen die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren^[40]. De Larco und Mitarbeiter erwähnten bereits in der Erstbeschreibung 1978 den Einfluss des Polypeptides auf das adhäsionsabhängige Wachstumsverhalten von Zellen^[102].

Die Vorgänge in der Zelle beeinflusst TGF- β an entscheidenden Stellen des Zellzyklus auf vielfältige Weise und nimmt so –neben zahlreichen anderen Funktionen– unter anderem Einfluss auf Wundheilungs- und Entzündungsvorgänge, Zelldifferenzierung und -tod, aber auch auf Zellmotilität und -adhäsion^[115].

TGF- β kommt bei Säugetieren in drei Isoformen vor (TGF- β 1-3)^[127], die kleinere Unterschiede in der Aminosäuresequenz und in der Affinität zu den verschiedenen Rezeptorsubtypen zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde TGF- β 2 zur Stimulation der Zellkulturen verwendet (s.u.). Das 1987 erstmals beschriebene Homodimer besteht aus zwei 12,5 kDa schweren Untereinheiten, die über Disulfidbrücken kovalent gebunden sind^[22,27]. TGF- β 2 wird durch zahlreiche Gewebe sezerniert und kann sowohl auto- als auch parakrine Effekte haben^[27].

TGF- β wird durch die meisten Zelltypen als sogenannter *large latent TGF- β complex* sezerniert. Hierbei ist TGF- β nicht-kovalent an einen Teil seines N-terminalen Präkursors LAP (TGF- β latency associated proteine) gebunden. TGF- β und LAP werden als *small latent TGF- β complex* bezeichnet. Nach kovalenter Bindung von LAP an ein latent TGF- β binding protein (LTBP) entsteht daraus der large latent TGF- β complex^[93]. Proteine vom Typ der LTBPs vermitteln häufig eine Bindung an die EZM, so dass ein Teil des TGF- β EZM-gebunden vorliegt und durch Degradation der EZM freigesetzt werden kann. In jedem Fall muss das im Komplex vorliegende TGF- β aktiviert werden, bevor es an seine Rezeptoren binden kann^[93].

Die TGF- β -Rezeptoren sind Glykoproteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind und ebenfalls in unterschiedlichen Varianten vorkommen^[75,115].

Damit TGF- β 2 an seine Rezeptoren binden und eine Signaltransduktionskaskade aktivieren kann, müssen diese als Heterodimere³ vorliegen. Bei beiden Untereinheiten

³bestehend aus je einer TGF- β -Rezeptor I (T β R-I)-Untereinheit und einer TGF- β Rezeptor II (T β R-II)-Untereinheit

handelt es sich um Serin-/Threoninkinasen. Nach der Bindung des Signalmoleküls an das TGF-RI/II-Heterodimer, vereinigt sich dieses mit einem zweiten TGF-RI/II-Heterodimer zum aktiven Rezeptorkomplex^[38,40]. Der beschriebene Vorgang führt in der Folge zur Phosphorylierung des T β R-I und damit zur Aktivierung der Kinaseaktivität des Rezeptorkomplexes, durch die es im Anschluss zu einer Reihe weiterer Phosphorylierungen kommt^[75,115,123].

Den Namen *transformierender* Wachstumsfaktor trägt das Zytokin, da zu seinen Aufgaben die Induktion der epithelio-mesenchymalen Transformation (EMT) zählt^[197]. Die EMT spielt insbesondere während der Embryonalphase zahlreicher Lebewesen, u.a. bei Säugetieren, als physiologischer Prozess eine essentielle Rolle^[168]. Darüber hinaus kommt die EMT bei einigen Karzinomen vor und erhöht deren Invasions- und Metastasierungs-wahrscheinlichkeit^[168]. Bei diesem Vorgang verlieren vormals epitheliale Zellen zahlreiche morphologische und molekularbiologische Eigenschaften von Epithelzellen und erwerben Charakteristika von Mesenchymzellen. Mit diesen Vorgängen gehen ein Verlust von E-Cadherin, erhöhte Matrixmetalloproteasenaktivität und Veränderungen des Zytoskeletts einher^[201].

Klassischerweise wird die Weiterleitung des TGF- β -Signals von der Plasmamembran zum Nukleus durch Proteine aus der Familie der Smads vermittelt^[96], es existieren jedoch zahlreiche alternative Signalkaskaden^[40,115,116,123]. So sind neben Smads auch die Kinasen ERK, JNK, und p38 MAPK an den TGF- β -getriggerten intrazellulären Signalwegen beteiligt, die entweder unabhängig vom klassischen TGF- β -Pfad ablaufen, oder mit diesem interagieren^[60]. Zumindest für den MAPK-Pfad ist eine Smad-unabhängige Aktivierung durch den TGF- β -Rezeptor wahrscheinlich^[5,43]. Aktivierung von ERK und JNK kann über eine konsekutive Smad-Aktivierung wieder in die klassische Signalkaskade einmünden^[43,60]. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Pi3K)-Akt-Pfad^[6] spielt bei der TGF- β -Signalübertragung offenbar ebenso eine Rolle wie die Aktivierung von Rho-ähnlichen GTPasen wie RhoA^[12,42].

1.5.1 TGF- β und Trabekelmaschenwerk

TGF- β 2 –in geringerem Ausmaß auch TGF- β 1– kommt physiologischerweise im Kammerwasser vor. Verschiedene okuläre Strukturen sind an der TGF- β -Produktion beteiligt, beispielsweise das Epithel des Ziliarkörpers und die Iris^[74,92] sowie retinale Pigmentepithelzellen^[166]. TGF- β 3 hingegen scheint keine Rolle im KW zu spielen^[134].

Nachgewiesen wurde auch, dass Trabekelmaschenwerkszellen funktionsfähige TGF β -Rezeptoren exprimieren^[193,194].

Ca. 50% der Patienten mit POWG weisen erhöhte Werte des Wachstumsfaktors TGF- β 2 im Kammerwasser auf^[79,137,181]. Die Mittelwerte der Konzentration von biologisch aktivem TGF- β 2 im Kammerwasser bewegen sich in den drei genannten Arbeiten zwischen 205 pg/ml \pm 97 pg/ml und 450 pg/ml \pm 280 pg/ml. Ein kausaler Zusammenhang mit der Glaukomentstehung wird in der Literatur angenommen^[62]. Shepard und Mitarbeiter zeigten, dass der Augeninnendruck von Rattenaugen, welche mit aktivem humanem TGF- β 2 transfiziert wurden, ansteigt. Die Höhe des IOD-Anstieges korreliert dabei positiv mit der TGF- β 2 Menge^[156].

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 und TGF- β 2 die Quervernetzung der EZM im TM durch eine Gewebetransglutaminase erhöhen können^[184]. Weiterhin wird die Verankerung der HTM an die Extrazellulärmatrix durch verstärkte Expression von Fibronectin nach TGF- β -Gabe modifiziert^[51,184]. Auch die Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), welches an Umbauprozessen der EZM beteiligt ist, steigt nach TGF- β 2-Behandlung von TM an^[51].

Wordinger et al. berichten, dass im Trabekelmaschenwerk von Glaukompatienten ein TGF- β -Antagonist (BMP-4) durch das Signalmolekül Gremlin inhibiert wird. Damit wird zusätzlich zu dem TGF- β -Konzentrationsanstieg die TGF- β 2-Wirkung verstärkt^[195].

Nach TGF- β 2-Stimulation von humanen Trabekelmaschenwerkszellen (HTM) ergeben sich Expressionsänderungen an insgesamt 21 untersuchten Genen^[202]. Für andere Zelltypen wurde gezeigt, dass TGF- β zu einer Steigerung der β -Catenin-Spiegel führt^[23].

Die Überexpression von TGF- β in Rattenaugen führt zu okulärer Hypertension. Jedoch lassen sich im Trabekelmaschenwerk kaum Veränderungen der EZM zeigen und α SMA ist reduziert^[148].

1.6 β -Catenin

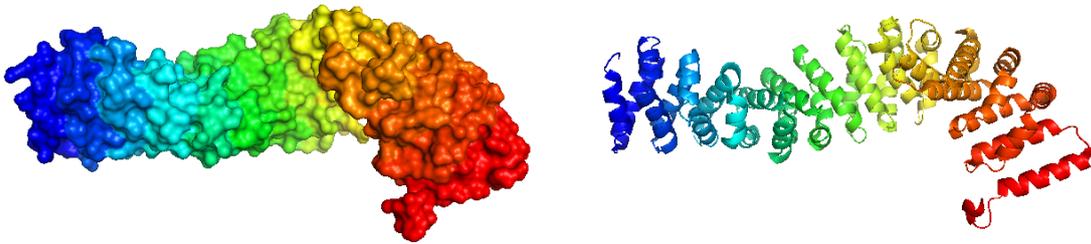


Abbildung 1.2

Ausschnitt aus dem Protein β -Catenin (AS 138-781) in einer Darstellung der Oberflächenstruktur (links) und des schematischen Aufbaus (rechts). Auffallend ist die Vielzahl an α -Helices. Proteinstrukturinformationen: PDB ID: 2Z6H^[196]; grafische Darstellung mit PyMol^[34].

β -Catenin ist ein 85 kDa schweres, aus 12 Armadillo-Repeats⁴ und 781 Aminosäuren bestehendes Protein^[29].

In der Zelle nimmt β -Catenin zwei unterschiedliche Aufgaben wahr^[17,145,190]: Zum einen vermittelt es im Zusammenspiel mit α -Catenin und γ -Catenin die Bindung von Cadherinen an das Aktinskelett der Zelle (vgl. Abb. 1.3)^[88,132]. Zum anderen übernimmt β -Catenin als namensgebender Bestandteil im Wnt- β -Catenin-Signalweg die Rolle eines transkriptionsregulierenden Faktors^[11,78]. Hierzu bewegt sich β -Catenin in den Nukleus der Zelle um dort als Transkriptionsfaktor aktiv zu werden. Nach Komplexbildung mit LEF/TCF bindet es an die DNS^[11].

⁴Das Armadillo-Gen wurde primär bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Später fanden sich auch artübergreifend zahlreiche Proteine, die Sequenzhomologien zum Armadillo-Genprodukt aufweisen und daher als Proteine der Armadillo-Familie bezeichnet werden^[72]

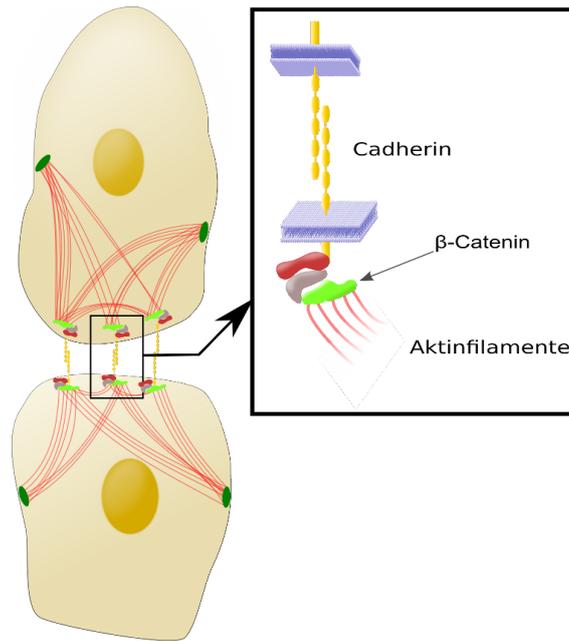


Abbildung 1.3

Stark vereinfachende schematische Darstellung der Funktion und Lokalisation von β -Catenin als Zell-Zell-Bindungen vermittelndes Protein.

Die Verteilung des intrazellulär vorhandenen β -Catenin auf diese beiden Aufgabenbereiche unterliegt einer komplexen Regulation, auf die zu einem späteren Zeitpunkt näher eingegangen wird.

1.7 Cadherin

Cadherine sind eine Gruppe von Proteinen mit transmembranärem Anteil. Sie vermitteln Ca^{2+} -abhängig eine Bindung zu den Cadherinen der benachbarten Zellen und bilden so Zell-Zell-Verbindungen^[88,159].

Mittlerweile sind über 100 zu Familie der Cadherine gehörende Proteine bekannt. N-Cadherin (neurales Cadherin, auch als A-CAM bezeichnet) trägt diese Bezeichnung, da es primär im embryonalen Neuralrohr gefunden wurde^[66,71]. Es besitzt eine transmembranäre Domäne, fünf extrazelluläre Cadherin-Repeats (EC1-5) und gehört ebenso wie E-Cadherin (epitheliales Cadherin) zur Klasse 1 der Cadherine^[37,159]. Epitheloiden Zellen, die vermehrt N-Cadherin exprimieren wird eine erhöhte Neigung zu Zellmigration nachgesagt. Bei einigen Karzinomen ist der Nachweis von gesteigerten N-Cadherin-Spiegel mit einem größeren Metastasierungsrisiko assoziiert^[37].

OB-Cadherin ist ein atypisches Typ-2-Cadherin und gilt als charakteristisch für mesenchymale Zellen^[89,129]. Ein Wechsel von N-Cadherin zu OB-Cadherin wurde bei der TGF- β -bedingten Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beobachtet, wobei dem OB-Cadherin eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Kontraktionskräften über die Zell-Zell-Grenzen hinweg zugeschrieben wurden^[76].

1.8 Das Zytoskelett

Neben seinem Einfluss auf den EZM-Umsatz von humanen Trabekelmaschenwerkzellen (siehe Kapitel 1.5) hat TGF- β 2 Effekte auf das Zytoskelett dieses Zelltyps. Tamm et al. fanden erhöhte α -SMA-Werte (smooth muscle actin) in TGF- β 1 stimulierten HTM^[164]. Es gibt Hinweise, dass zytoskelettale Umstrukturierungsvorgänge für die Erhöhung des Abflusswiderstandes mitverantwortlich sein könnten^[141,143,171,173–175]. Hierbei konzentrierten sich die bisherigen Untersuchungen im Wesentlichen auf die Actin-/Myosinvermittelte Zellkontraktilität. Der α -SMA-Gehalt des Trabekelmaschenwerks nimmt mit steigendem Alter ab. Zwischen Glaukom-Patienten und gesunden Kontrollen lassen sich hierbei allerdings keine Unterschiede feststellen^[53].

1.8.1 Biophysik

Zellen haben die Fähigkeit, ihre Umgebung wahrzunehmen und auf sie zu reagieren. Es ist bekannt, dass auch die Steifigkeit des Kultursubstrates Einfluss auf zelluläre Komponenten, allen voran das Zytoskelett sowie die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen, aber auch Signalwege hat^[41]. Auch die Zell-Zell-Bindungen vermittelnden Cadherine und Catenine werden in Abhängigkeit von der Härte des Substrates auf dem die Zellen wachsen exprimiert. Steifere Substrate führen zu einer Verstärkung der Zell-Zell-Verbindungen und Veränderungen des Zytoskeletts^[100]. Auch für Trabekelmaschenwerkzellen ist gezeigt, dass die Substratrigidität Einfluss auf das Zytoskelett und Zell-Matrix-Verbindungen hat^[154].

1.9 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF- β 2 auf menschliche Trabekelmaschenwerkzellen weiter untersucht werden. Hierbei steht der Effekt

von TGF- β 2 auf das Zytoskelett im Fokus. Besondere Beachtung erhalten dabei β -Catenin und Cadherin. Wie beschrieben, sind diese Proteine für die Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsionen bzw. deren Bindung an das Zytoskelett wichtig (vgl. Abb. 1.3). Es erscheint möglich, dass sie damit einen zentralen Stellmechanismus der Geweberigidität darstellen.

Die Identifikation der Signaltransduktionsmechanismen, die den beobachteten Veränderungen zugrunde liegt, bildet einen weiteren Aspekt der durchgeführten Experimente.

2 Material und Methoden

2.1 Einführende Anmerkungen

Eine Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien, Pufferlösungen, Antikörper und Inhibitoren findet sich im Anhang.

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Versuche wurden unter Einhaltung der Deklaration von Helsinki in der aktuellen revidierten Fassung vom Oktober 2000 durchgeführt.

Diejenigen Versuche, die Eingang in die vorliegende Arbeit fanden, wurden an unterschiedlichen Zelllinien mindestens drei Mal wiederholt. Hierbei ergaben sich keine Ergebnisse, die von den hier publizierten wesentlich abwichen.

Soweit nicht explizit anders angegeben, wurden die Zellen für die Versuche bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose mit 10% FCS inkubiert. Einige Tage vor Beginn des eigentlichen Experiments bis zu dessen Ende bestand das Zellkulturmedium aus DMEM mit 3% FCS.

Im Brutschrank wurden die Zellkulturen bei 37°C in 5%iger Kohlenstoffdioxidatmosphäre inkubiert.

Zur Stimulation der Zellen wurde aktiviertes TGF- β 2 mit einer Endkonzentration im Medium von 2 ng/ml verwendet. Damit liegt die Zytokindosierung etwa um den Faktor 5-10 über den Werten, die im Kammerwasser von Glaukoma Patienten nachweisbar sind, ist aber vergleichbar mit den in anderen Publikationen für HTM verwendeten Konzentrationen^[59,63]. Da sich der Glaukomschaden *in vivo* über Jahre und Jahrzehnte entwickelt, die Zellen im Laborversuch jedoch nur über wenige Stunden bis Tage stimuliert wurden, erscheint die leichte Überhöhung der TGF- β -Konzentrationen gerechtfertigt.

Allen Zellkulturmedien wurden zum Schutz vor bakterieller Besiedlung 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin zugesetzt.

2.2 Zellen

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* an primären Kulturen humaner Trabekelmaschenwerkszellen durchgeführt. Diese stammen aus den post mortem entnommenen Spenderringen von Hornhautspendern, welche zuvor bereits für eine perforierende Keratoplastik Verwendung gefunden haben.

Zur Gewinnung der Zellen wird der das Trabekelmaschenwerk enthaltende Hornhautspenderring zur Äquilibration zunächst einige Tage in Medium (DMEM mit 10% FCS) inkubiert. Im Anschluss wird unter dem Binokularmikroskop mit einem Skalpell das Trabekelmaschenwerk vorsichtig herausgelöst und in Blöcke von ca. 1 mm x 1 mm x 2 mm Kantenlänge geteilt. Je eines dieser Gewebestücke wird in dem Napf einer 24-Well-Platte mit einem Deckgläschen abgedeckt und in DMEM mit 10% FCS erneut einige Zeit inkubiert. Unter diesen Bedingungen erfolgt dann eine spontane Auswanderung der Zellen aus dem Gewebefragment auf den Boden der Nöpfchen, von dem die Zellen nach einigen Wochen durch Trypsinierung in größere Zellkulturschalen überführt werden können.

Eine Beschreibung der Methode findet sich in der Literatur^[138,146,154].

Nach weiterer Inkubation unter wöchentlichem Mediumwechsel (DMEM mit 10% FCS) werden die rasch proliferierenden Zellen in Zellkulturschalen wachsenden Durchmessers überführt.

Vor Beginn der Versuche wurde eine Charakterisierung der kultivierten Zellen als HTM durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1).

2.3 Western Blot

Als „Western Blot“ wird eine Methode zum sensitiven und spezifischen Nachweis von Proteinen bezeichnet. Im Grunde genommen handelt es sich um eine Kombination von drei Einzelmethoden, nämlich der elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches, des Transfers auf eine Membran und der Detektion an der Membran gebundener Proteine mittels immunochemischer Methoden^[101,128,177].

2.3.1 Zellernte

Die Zellen wurden unter den in den einzelnen Versuchen beschriebenen Bedingungen angezüchtet und stimuliert.

Die folgenden Schritte zur Gewinnung eines Zelllysats, welches alle zellulären Protein enthält, werden auf Eis durchgeführt, um eine Autodigestion durch Proteinfreisetzung zu verhindern. Weiterhin kommt zu diesem Zweck auch ein Proteaseinhibitor zum Einsatz.

Der Proteaseinhibitor wird im Verhältnis 1:6 mit dem RIPA¹ gemischt und auf Eis gekühlt. Nach Entfernung des Mediums aus den Zellkulturschalen werden diese kurz mit eiskaltem PBS² gewaschen. Nach Zugabe einer an die Größe der Kulturschalen angepassten Menge der RIPA/Proteaseinhibitor-Mischung werden die Zellen mechanisch mit einem Zellschaber gelöst und die Zellsuspension in ein Probenröhrchen überführt.

Unter ständiger Eiskühlung erfolgt eine 15-minütige Bewegung der Probenröhrchen im Rotor und im Anschluss eine ebenfalls 15-minütige Zentrifugation bei 15.000 U/min und 4°C. Der Überstand wird in ein frisches Probenröhrchen übertragen, im Verhältnis 3:1 mit Probenpuffer und Mercaptoethanol (Endkonzentration: 10%) vermischt und zur Proteindenaturierung fünf Minuten auf 95°C erhitzt.

2.3.2 Trenn- und Sammelgel

Zur Auftrennung der Proteine wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE³ verwendet.

Diese trennt die Proteine weitgehend unabhängig von Ladung und Tertiärstruktur nach ihrem Molekulargewicht auf.

Verwendung finden Gele aus Acrylamid, das mit Bisacrylamid quervernetzt wird. Bei der Polymerisation der Eduktlösung zum fertigen Gel entsteht ein dreidimensionales Gitternetz, das die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit von deren Größe behindert. So zeigen bei konstanter elektrischer Spannung größere Proteine eine niedrigere Wanderungsgeschwindigkeit als kleine, da diese wesentlich besser durch die Maschen des Polyacrylamidnetzes passen.

¹ von engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer* Lysepuffer zur Herstellung eines Zelllysates

² von engl. *phosphate buffered saline* für phosphatgepufferte Salzlösung

³ Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung wird durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Gele, nämlich eines sog. Sammel- und eines Trenngels verbessert. Die Proteinprobe wird dabei zunächst in kleine Taschen des weniger stark quervernetzten Sammelgels gegeben, welches nur sehr kurz ist und direkt in das Trenngel übergeht. Die Proteine durchlaufen das Sammelgel recht zügig und akkumulieren an der Grenzzone zum Trenngel. Dadurch wird die Zeitspanne zwischen dem Eintritt des ersten und des letzten Proteins in das Trenngel komprimiert und die Trennschärfe erhöht.

Die Polymerisation von Acrylamidgel und Bisacrylamid wird durch den Radikalbildner Ammoniumpersulfat induziert und durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Zum Einsatz kam eine vorgefertigte Mischung (Rotiphorese® Gel; siehe Anhang) der beiden Edukte, deren Endkonzentration im Trenngel 12% betrug. Für das Sammelgel wurde eine Konzentration der Acrylamid-/Bisacrylamidmischung von 8,8% eingestellt.

Durch dieses Verfahren ergibt sich eine Gelmatrix mit definierter Porengröße und reproduzierbaren Auftrennungseigenschaften.

2.3.3 Ladepuffer

Der Ladepuffer für die elektrophoretische Auftrennung muss die Proteine denaturieren und gleichzeitig deren Eigenladung aufheben. So wird der Einfluss der Raumstruktur und elektrischen Ladung aufgehoben und die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel hängt im Wesentlichen vom Molekulargewicht der Proteine ab.

In dem Probenpuffer, welcher dem Zellysat zugesetzt wird, ist zur Auftrennung von tertiär- und quartärstrukturstabilisierenden Disulfidbrücken das reduzierende Agens Mercaptoethanol enthalten. Der Ladepuffer besteht unter anderem aus dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat zur Ladungselimination (vgl. Abb. 2.1).

Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate = SDS) ist ein Molekül, das sowohl polare als auch apolare Anteile in sich vereinigt und so als Detergens wirksam werden kann (siehe Abb. 2.1). Weiterhin ist es ein Träger negativer Ladung (Sulfatanion). Die beschriebenen Eigenschaften machen es zu einem idealen Stoff, um im Western Blot eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu ermöglichen:

- die hydrophoben Anteile des Natriumdodecylsulfates gehen eine Wechselwirkung mit den hydrophoben Bestandteilen des Proteins ein und bewirken eine nicht-kovalente Bindung der beiden Partner aneinander



Abbildung 2.1

Strukturformel von Natriumdodecylsulfat. Es lässt sich der lipophile (schraffierter Hintergrund) von dem lipophoben Anteil (gepunkteter Hintergrund) unterscheiden. Erläuterungen im Text.

- durch die lipophilen Wechselwirkungen zwischen SDS und Protein wird dessen Quartär- und Tertiärstruktur zerstört, so dass fibrilläre und globuläre Proteine ähnlichen Molekulargewichts im elektrischen Feld gleich schnell durch das Gel laufen und fibrilläre aufgrund ihrer raumfordernderen Struktur nicht unverhältnismäßig stark durch die Maschenweite des Geles gebremst werden
- die negative Ladung des Natriumdodecylsulfates schirmt die eigentliche Ladung des Proteins ab und führt dazu, dass sich alle Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung im elektrischen Feld auf die Anode zubewegen

2.3.4 Auftrennung der Proteine im Gel

Zur Durchführung des Western Blot kam bei allen vorliegenden Ergebnissen die Blottingkammer BioRad Mini-PROTEAN® zum Einsatz.

Die Eduktmischung für das Trenngel wird bei Raumtemperatur zwischen zwei im Abstand von 1,5 mm parallel zueinander angeordneten Glasplatten gegeben und sofort vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet. Durch dieses Vorgehen, ist die Oberfläche des Gels vollkommen glatt und die Bildung von Menisken an den Grenzflächen zum Glas wird unterbunden. Nach etwa 20 bis 30 Minuten ist das Gel bei Raumtemperatur ausgehärtet und kann mit der Eduktmischung für das Sammelgel überschichtet werden. In dieses wird zügig und möglichst blasenfrei ein Kamm eingesetzt, der später im ausgehärteten Gel taschenförmige Vertiefungen zurück lässt, in welche die Proteine geladen werden. Wiederum nach etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur ist auch das Sammelgel ausgehärtet. Die beiden Glasplatten mit dem nun zwischen ihnen lokalisierten Gel können in die Blotting-Apparatur eingesetzt und der Kamm vorsichtig entfernt

werden. Die Anordnung wird mit Laufpuffer gefüllt und die Taschen im Gel kurz ausgespült um eine Nachpolymerisation von Gelresten zu verhindern und einen glatten Taschengrund zu erhalten.

In Abhängigkeit von gemessener Proteinmenge, Detektionsempfindlichkeit des später verwendeten Primärantikörpers und Zielproteinkonzentration werden etwa 10-40 μ l Zellysate je Tasche eingesetzt. Zur Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine wird als Marker ein Referenzlysate in eine der Ladetaschen gegeben. Es wird eine konstante Stromstärke von 15 mA je Gel für ca. 120 Minuten angelegt. Die Abschaltung der elektrischen Spannung erfolgt unter visueller Kontrolle nach Austritt der Lauffront am unteren Ende des Gels. Dadurch ist die Laufzeit nicht konstant, sondern variiert etwas und ist durch das beschriebene Vorgehen auf eine möglichst deutliche Proteinseparierung optimiert.

2.3.5 Blotting auf eine Membran

Um die Handhabung zu vereinfachen und gleichzeitig die Möglichkeit zum metachronen Auftragen diverser Primärantikörper zu haben werden die Proteine beim „Western Blot“ nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel auf eine haltbarere Membran übertragen. Für die vorliegende Arbeit kamen hierzu beständige Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen zum Einsatz. Nach der Benetzung in Methanol und Transferpuffer wird die PVDF-Membran zwischen dem Gel und der Anode in die Blotting-Apparatur eingesetzt und die Wanderung der Proteine auf die Membran durch Anlegen einer Spannung von 100V für 90 Minuten forciert.

2.3.6 Nachweis der Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wird diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBST⁴ mit 3% bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die Spezifität des anschließenden Proteinnachweises zu erhöhen.

Die Primärantikörper werden in unterschiedlichen Konzentrationen⁵ über Nacht bei

⁴englischsprachige Abkürzung für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) gepufferte NaCl-Lösung mit Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)

⁵die Bestimmung optimalen Verdünnungsstufen für die einzelnen Antikörper erfolgt zuvor experimentell

4°C auf die Blots gegeben, wobei durch kontinuierliche Schwenkbewegungen eine gleichmäßige Benetzung der Membranen sichergestellt ist. Nach dreimaligem Waschen in TBST für je 10-30 Minuten werden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem HRP-gekoppelten⁶Sekundärantikörper inkubiert. Erneutes dreimaliges Waschen in TBST für je 10 Minuten entfernt überschüssigen, ungebundenen Sekundärantikörper. Daraufhin kann die Lokalisation des Sekundärantikörpers und damit auch die des Proteins auf der Membran über eine lichtemittierende Reaktion sichtbar gemacht und mittels eines Filmes archiviert werden.

Hierzu wird der Blot mit Luminolreagenz benetzt und in der Dunkelkammer für einen variablen Zeitraum mit hochempfindlichen Röntgenfilmen in Kontakt gebracht. Die HRP-katalysierte Redox-Reaktion führt zu einem schwach leuchtenden Produkt. Das emittierte Licht schwärzt den der Membran aufliegenden Röntgenfilm an korrespondierenden Stellen. Somit entspricht die Lokalisation der Banden nach der Entwicklung des Filmes der räumlichen Anordnung der Proteine auf dem Blot.

Der Schwärzungsgrad der einzelnen Banden erlaubt dabei eine relative, semiquantitative Beurteilung.

2.3.7 Quantitative Beurteilung

Der Grad der Schwärzung des Röntgenfilmes hängt von der Menge an Sekundärantikörper auf der PVDF-Membran je Flächeneinheit ab. Die Konzentration des Sekundärantikörpers an einem bestimmten Punkt des Blots wiederum ist abhängig von der Menge des gebundenen Primärantikörpers, der seinerseits direkt mit der Proteinmenge korreliert.

Über diese Beziehung hängt der Schwärzungsgrad der einzelnen Banden auf dem Röntgenfilm von der Proteinmenge auf dem Blot ab. Damit ist eine vorsichtige Quantifizierung möglich. Absolute Mengenangaben können selbstverständlich nicht gemacht werden. Die Aussagekraft beschränkt sich auf den Vergleich verschiedener Banden eines Proteins auf dem selben Blot, da eine Vielzahl an Parametern das Ergebnis beeinflussen.

Durch den ausschließlich Blot-internen Vergleich, sind die äußeren Variablen wie Beschaffenheit des Gels, genaue Zusammensetzung der Puffer und Luminolreagenz etc. jedoch für alle Vergleichselemente identisch.

⁶englischsprachige Abkürzung für das Enzym Meerrettichperoxidase

Um den Schwärzungsgrad einzelner Banden zu bestimmen wurden die Röntgenfilme eingescannt und als Graustufen-Bild mit dem Programm ImageJ verarbeitet. Für jede einzelne Bildspalte wurden die Grauwerte der Pixel aufsummiert und in einer Funktion aufgetragen. Hierbei gab die Abszisse die Entfernung in Bildpixeln vom linken Rand des Bildes an, während an der Ordinate der Grauwert aufgetragen wurde. Für jede Bande konnte aus dem Bild die Lokalisation und Ausdehnung in Pixeln abgemessen und in das Diagramm übertragen werden. Durch Integrieren der Fläche unter Kurve zwischen beiden Punkten für jede Bande ergeben sich so Zahlenwerte, die den Schwärzungsgrad der zugehörigen Bande auf dem Röntgenfilm repräsentieren und nun in eine relative Beziehung zueinander gesetzt werden können.

2.4 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Um neben dem quantitativen Nachweis der Proteine mittels Western Blot auch Informationen zu deren intrazellulärer Lokalisation sowie zur Morphologie der Zellen zu erhalten, wurden HTM nach Einfärbung mit der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Bei dieser Methode wird durch einen Laser Licht unterschiedlicher Wellenlänge erzeugt. Dieses Licht regt Farbstoffe, mit denen die zu untersuchenden Gewebe inkubiert wurden, zum Leuchten an. Durch Koppelung der fluoreszierenden Farbstoffe an Antikörper lassen sich gezielt einzelne Proteine farblich markieren. Das Konfokalmikroskop erlaubt einen optischen Schnitt durch die Zelle und stellt einzelne Ebenen des untersuchten Gewebes im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie überlagerungsfrei dar.

2.4.1 Anzucht und Fixierung von Zellen

Durch die Anzucht der Zellen auf Deckgläsern mit einem Durchmesser von 12 mm werden die nachfolgenden Fixations- und Färbeprozesse ohne Zerstörung des Zellverbandes ermöglicht.

Die Deckgläser werden vor den Versuchen ca. 30 Minuten in einer gesättigten KOH-Lösung in Methanol eingelegt und dann bis zur Verwendung in 70%igem Ethanol gelagert um sie möglichst keimarm und fettfrei zu halten.

Vor der Aussaat der HTM werden die Deckgläser für eine Stunde bei 37°C mit 0,1%iger Gelatine oder Kollagenlösung in PBS inkubiert, um den Zellen die Anheftung auf dem

Glas zu erleichtern. Im Anschluss werden ca. 30.000 Zellen je Deckgläschen in einer adäquaten Menge Zellkulturmedium (DMEM mit 3% FCS) ausgesät. Vorversuche zeigen, dass bei dieser Anzahl nach einigen Tagen Inkubation mit der Bildung eines konfluenten Zellrasens zu rechnen ist⁷.

Je nach Fragestellung des Experiments werden die Zellen nach diesen Vorbereitungen mit TGF- β und/oder Inhibitoren inkubiert.

Nach einer Stimulationszeit von 24 bis 48 Stunden werden die Zellen für 15 Minuten mit einer Lösung von 2% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert.

2.4.2 Färbung und Einbettung der Zellen

Die Membranen der fixierten Zellen werden für eine Minute mit 0,2%igem Triton X100 in PBS permeabilisiert. Im Anschluss werden die Deckgläschen gründlich in PBS gewaschen. Durch Inkubation mit 2% NGS (normal goat serum) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C werden unspezifische Bindungsstellen geblockt. Dadurch binden die im folgenden Arbeitsschritt eingesetzten Antikörper deutlich spezifischer an ihre jeweiligen Zielstrukturen.

Zu Beginn der eigentlichen Immunfärbung werden gegen die zu untersuchenden zellulären Zielstrukturen gerichtete Primärantikörper in variabler Konzentration für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf die fixierten Zellen gegeben. Nach dem Abwaschen der Primärantikörper mit PBS werden die Zellen wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Zeitgleich erfolgt meist eine Anfärbung des Aktinskeletts der Zellen mit TRITC-gekoppeltem⁸ Phalloidin, das wie auch der Sekundärantikörper 1:500 mit 2% NGS in PBS verdünnt wird.

Nach Abschluss der Färbeprozedur können die Deckgläser mit den Zellen auf einen Objektträger überführt, mit Einbett-Medium behandelt und bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4°C gelagert werden.

⁷Da die Zell-Zell-Adhäsionen Gegenstand der Untersuchungen sind, wurde auf einen gleich bleibend konfluenten Zellrasen Wert gelegt. Nur so sind die Ergebnisse unterschiedlicher Versuche vergleichbar.

⁸Tetramethylrhodaminisothiocyanat

2.5 Fraktionierung der Zellen zur separierten Bestimmung zytosolischer und nukleärer Proteine

Da β -Catenin in der Zelle einerseits Funktionen als Signalmolekül und Transkriptionsfaktor, andererseits auch bei der Vermittlung der Zell-Zell-Adhäsion wahrnimmt, war es notwendig zu bestimmen, in welchem intrazellulären Kompartiment die β -Catenin Konzentration nach TGF- β 2-Stimulation ansteigt.

Es wird davon ausgegangen, dass die β -Catenin-Fraktion, welche als Transkriptionsfaktor fungiert, vornehmlich im Zellkern zu finden ist, während β -Catenin, das eine Rolle in der Zell-Zell-Bindung wahrnimmt, nahe der Plasmamembran lokalisiert sein sollte. Da β -Catenin an Cadherine gebunden ist, welche wiederum durch einen transmembranen Anteil eine feste Verbindung mit der Plasmamembran eingehen, ist davon auszugehen, dass auch die (indirekte) Bindung von β -Catenin an die äußere Zellmembran recht beständig ist. Von diesen Überlegungen ausgehend, wurde eine Fraktionierung der Zellen zur Auftrennung der Plasmamembran und der zytosolisch lokalisierten Proteine von der Kernmembran und den nukleären Proteine durchgeführt.

Eine modifizierte Form des von Danilkovitch et al.^[32] beschriebenen Verfahrens, das in vorliegender Arbeit zum Einsatz kam, wird im Anhang genauer beschrieben. Grundsätzliches Prinzip der Methode ist die metachrone Zerstörung der Zell- und Kernmembran durch Einsatz verschiedener Detergenzien. Durch Solubilisierung der Plasmamembran können dann nach Zentrifugation im Überstand zytosolische Proteine und Plasmamembranbruchstücke mit transmembranären Proteinen selektiv entnommen werden. Die Zellkerne bleiben primär weitgehend intakt. Dadurch weisen sie eine größere Masse auf und sammeln sich bei der Zentrifugation am Boden des Reagenzgefäßes. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung verbliebener Reste zytosolischer Proteine und Membranbestandteile werden dann auch die Zellkernmembranen mit einem aggressiveren Detergens aufgebrochen und können so nach Zentrifugation als Membranbruchstücke zusammen mit den nukleär lokalisierten Proteinen im Überstand gefunden werden.

3 Ergebnisse

3.1 Zellcharakterisierung

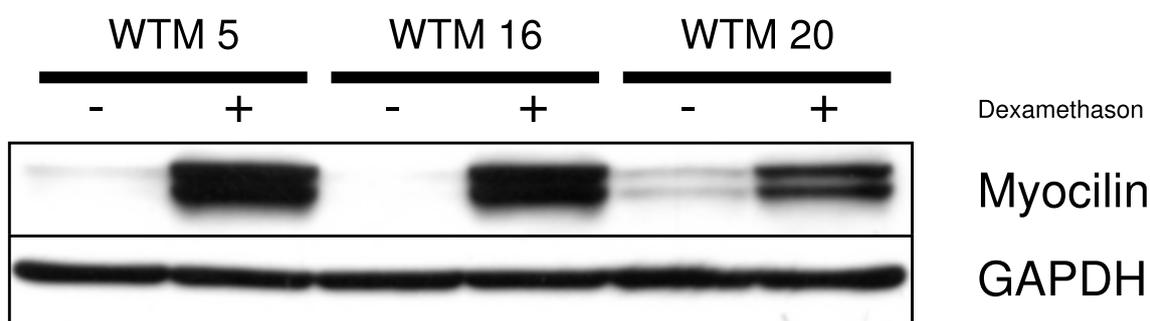


Abbildung 3.1

Charakterisierung einiger der in den Versuchen verwendeten Zelllinien (Würzburger Trabekelmaschenwerkszellen, WTM) als Trabekelmaschenwerkszellen durch Myocilin-Expression nach Glucocorticoid-Stimulation.

Vor der Verwendung neuer Zelllinien zu Versuchszwecken wurden diese charakterisiert. Die Prozedur wurde an Schlüsselpunkten auch mit bereits etablierten Zelllinien wiederholt, beispielsweise bei Erreichen höherer Passagenzahlen oder nach dem Auftauen von Zellen aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff. Eine Transdifferenzierung der *in vitro* gehaltenen Zellen im Rahmen physiologischer oder zellkulturinduzierter Alterungsprozesse konnte so frühzeitig erkannt werden. Nach einwöchiger Stimulation mit $0,1 \mu\text{M}$ Dexamethason in DMEM (mit 3% FCS) als Kulturmedium zeigten alle für die anschließenden Versuche verwendeten Zelllinien im Western Blot eine stark erhöhte Myocilin-Expression (Abb. 3.1). Diese Reaktion gilt als typisch für Trabekelmaschenwerkszellen^[26,85].

3.2 TGF- β 2-induzierte Proteinexpression und -phosphorylierung

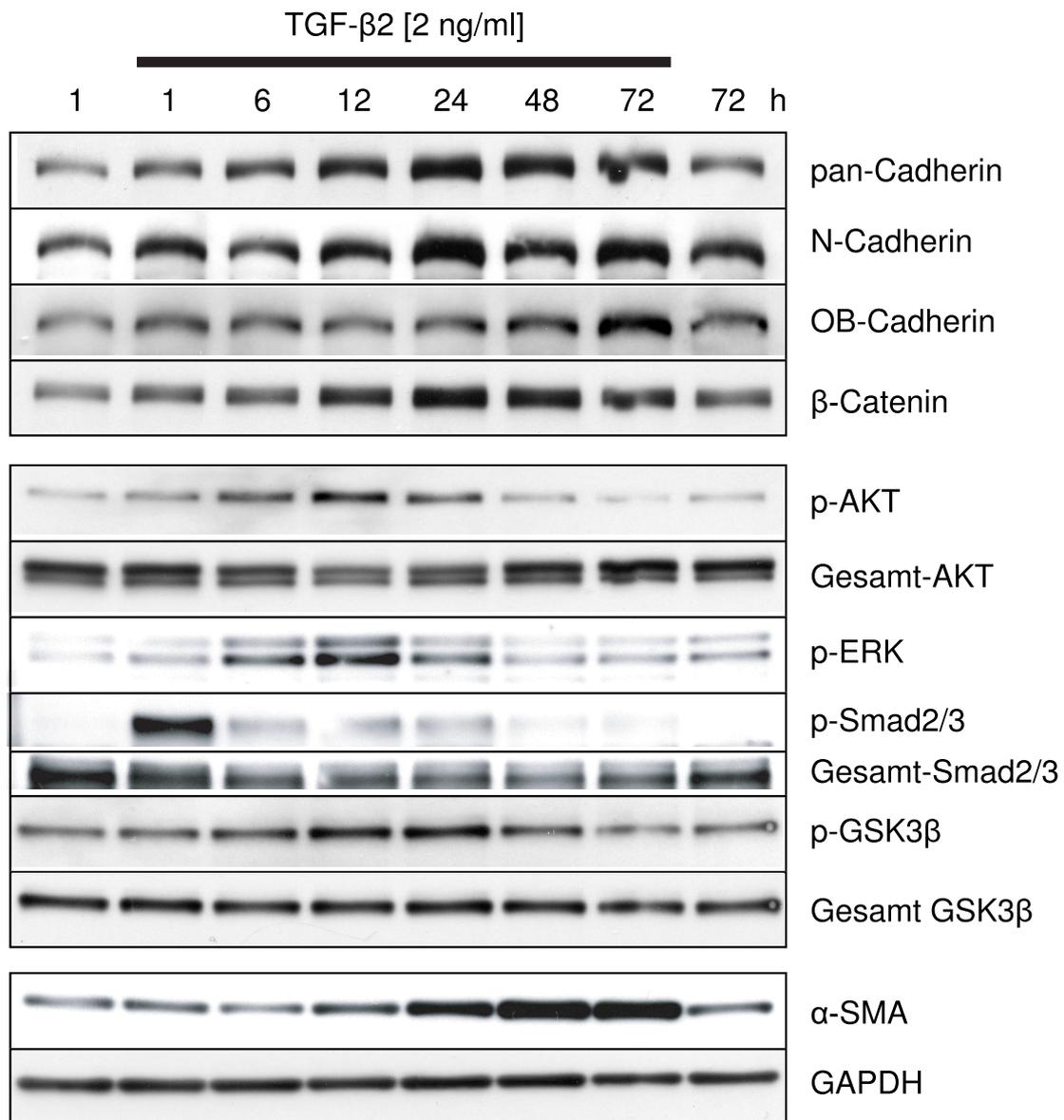


Abbildung 3.2

Änderung der Proteinkonzentration in humanen Trabekelmaschenwerkzellen 1-72h nach Stimulation mit TGF- β 2 in einer Konzentration von 2 ng/ml

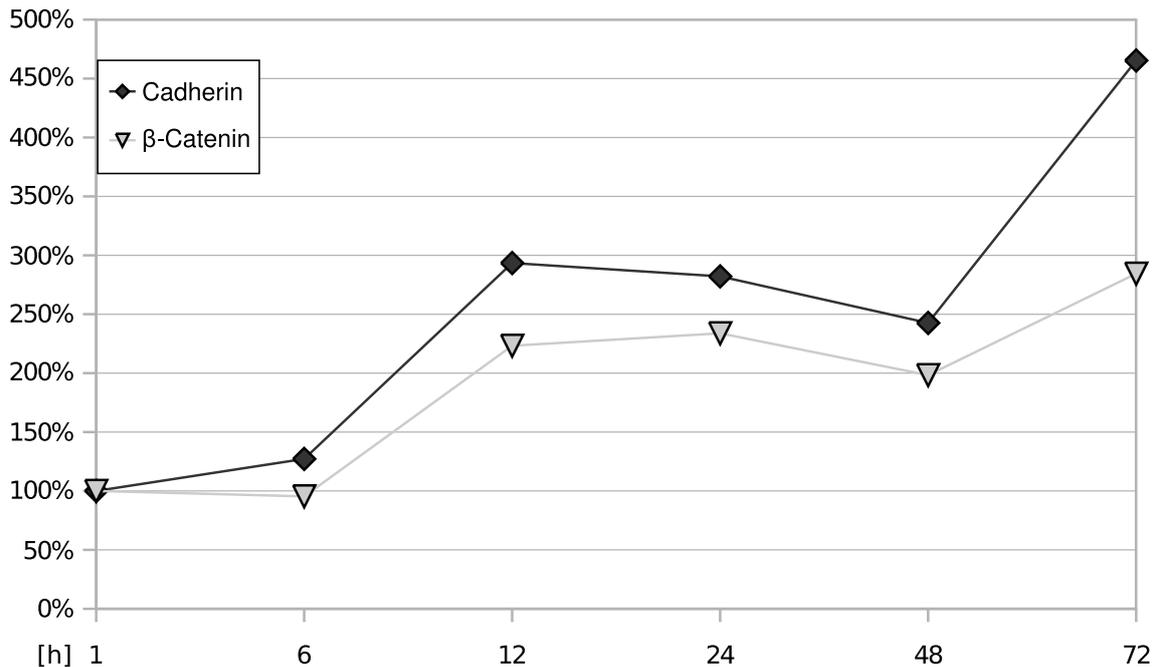


Abbildung 3.3

Graphische Darstellung der Konzentrationsänderung von β -Catenin und Cadherin aus Abb. 3.2 in humanen Trabekelmaschenwerkzellen 1-72h nach Stimulation mit TGF- β 2 in einer Konzentration von 2 ng/ml . Normalisiert für GAPDH.

Zum Zeitpunkt 0 wurde TGF- β 2 [2 ng/ml] dem Medium der Zellkulturen zugegeben. Dem Kulturmedium der Kontrollen wurde eine identische Menge Trägerlösung ohne TGF- β 2 hinzugefügt. Dadurch sollte eine artifizielle Agitationsaktivierung der stimulierten Zellen kontrolliert werden. Die Stimulation erfolgte sechs Tage nach Aussaat der Zellen, um die Ausbildung physiologischer Zell-Zell- und Zell-Matrix-Bindungen zu erlauben. Die Zellernte wurde im Anschluss sukzessive nach der beschriebenen Methode zu den in Abbildung 3.2 bezeichneten Zeitpunkten durchgeführt.

Untersucht wurde der Einfluss von TGF- β 2 auf Strukturproteine der Cadherin-Gruppe sowie α -SMA und β -Catenin und die Signalproteine AKT, ERK, GSK3 β und Smad2/3.

TGF- β 2 induzierte in humanen Trabekelmaschenwerkzellen eine zeitabhängige Konzentrations- und Phosphorylierungsveränderung von Struktur- und Signalproteinen.

Die an Zell-Zell-Verbindungen beteiligten Cadherine und β -Catenin zeigten eine ca. 12 Stunden nach der Stimulation beginnende Konzentrationszunahme (Abb. 3.3). Im Kontrast hierzu wiesen die nach einer bzw. 72 Stunden geernteten Kontrollen ohne TGF- β 2 keine Änderungen auf. Der pan-Cadherin-Antikörper erkennt eine Zielstruktur die allen Cadherinen gemeinsam ist, während die OB- und N-Cadherin-Antikörper gegen

spezifischere Strukturen gerichtet sind. Es zeigte sich, dass N-Cadherin einen großen Anteil am frühen pan-Cadherin-Anstieg hat, während OB-Cadherin erst am Ende des Beobachtungszeitraumes vermehrt exprimiert wird.

Die Signalproteine GSK3 β , AKT, ERK und Smad2/3 wurden transient phosphoryliert (vgl. Abb. 3.2). Bereits eine Stunde nach Stimulation konnte die Phosphorylierung von Smad, ca. 12 Stunden später diejenige von AKT und ERK beobachtet werden. Zeitlich fallen die Maxima der Aktivierungen der vorgenannten Proteine vor den Anstieg von β -Catenin und Cadherin, womit sie potentiell alle an der Vermittlung des TGF- β 2-Effektes auf diese beteiligt sein könnten.

Die Konzentration des glattmuskulären Aktins (α -SMA) stieg mit einer Latenz von ca. 12 Stunden nach TGF- β 2-Stimulation an (Abb. 3.2). Für TGF- β 1 ist die SMA-Induktion in Trabekelmaschenwerkzellen durch Tamm und Mitarbeiter bereits beschrieben^[164].

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen des Western Blots mit Zelllysate. Die Konstanz der Proteinmenge dieses zytosolischen Proteins spricht für eine korrekte technische Durchführung des Versuchs.

Die Signalintensitäten des Western Blot für N-Cadherin und β -Catenin wurden mit der in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Methode quantifiziert und in Abbildung 3.3 graphisch aufgetragen.

3.3 Fraktionierung von Trabekelmaschenwerkzellen zur Bestimmung der Lokalisation von β -Catenin

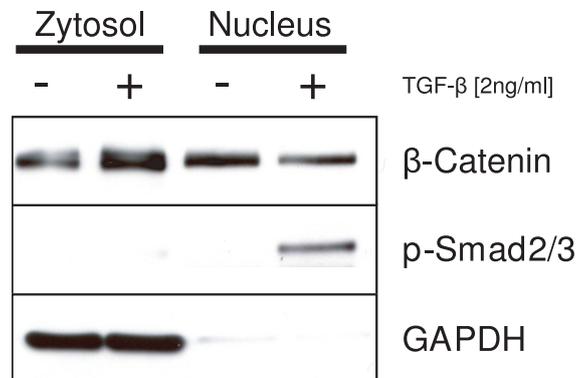


Abbildung 3.4

Auftrennung der nukleären und zytosolischen Proteinfractionen von HTM nach 48-stündiger Stimulation mit TGF- β 2 [2 ng/ml]. Zum Vergleich die unstimulierten Kontrollen.

β -Catenin nimmt in der Zelle eine duale Rolle als zytosolisch lokalisiertes Strukturprotein und im Nucleus vorkommendes Signalprotein ein (vgl. Kapitel 1.6).

Zur Untersuchung der Lokalisation von β -Catenin in HTM wurde neben den Aufnahmen mittels Konfokalmikroskop (siehe Abbildung 3.6) die Methode der biochemischen Fraktionierung angewandt.

Die beiden Proteine GAPDH und p-Smad2/3 dienen dabei zur Kontrolle der Trennung der zytosolischen und nukleären Proteinfractionen. GAPDH ist nur zu einem vernachlässigbar geringen Anteil im Nucleus zu finden^[118], während phosphoryliertes Smad2 und Smad3 als Transkriptionsfaktoren in den Zellkern eintreten^[115].

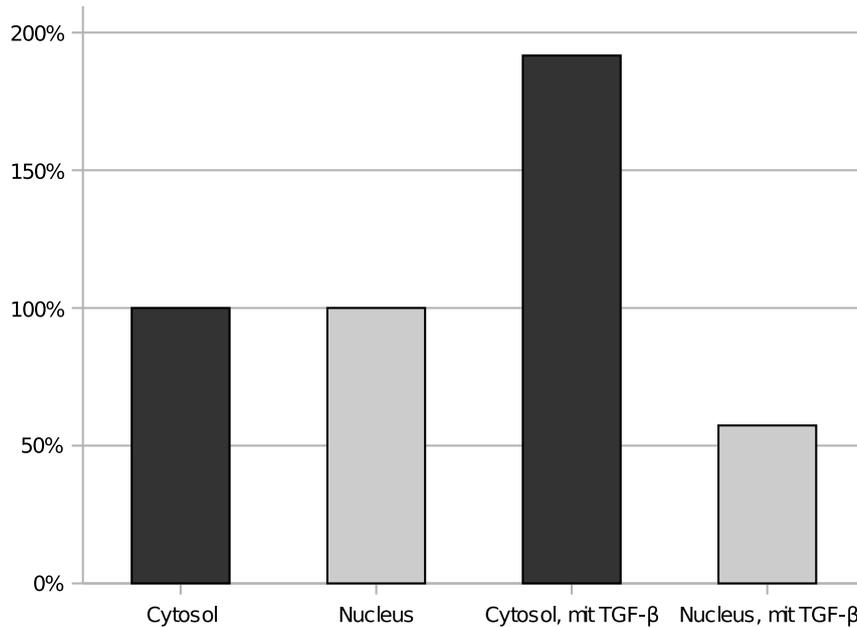


Abbildung 3.5

Graphische Darstellung der Konzentrationsänderung von β -Catenin in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten nach TGF- β 2-Stimulation (vgl. Abb. 3.4). Die Werte der unstimulierten Kontrollen wurden jeweils als 100% gesetzt).

Während in den unstimulierten Kontrollen weder im Zytosol noch im Nukleus signifikante Mengen an aktiviertem Smad2/3 auffindbar waren, wurde dieses unter TGF- β -Stimulation phosphoryliert und nahm dann als Transkriptionsfaktor zu einem sehr hohen Prozentsatz eine nukleäre Lokalisation ein, wo es auch 48h nach Stimulation noch nachweisbar war (vgl. Abb. 3.4).

Beim Vergleich der stimulierten Zellen mit den Kontrollen zeigte sich eine Zunahme der Bandenschwärzung von β -Catenin in der zytosolischen Fraktion. Im Gegensatz dazu blieb die Proteinmenge an β -Catenin im Nukleus nach TGF- β 2-Stimulation unverändert und nahm tendenziell eher sogar etwas ab (vgl. Abb. 3.5).

3.4 Lokalisation von β -Catenin und Zytoskelettproteinen

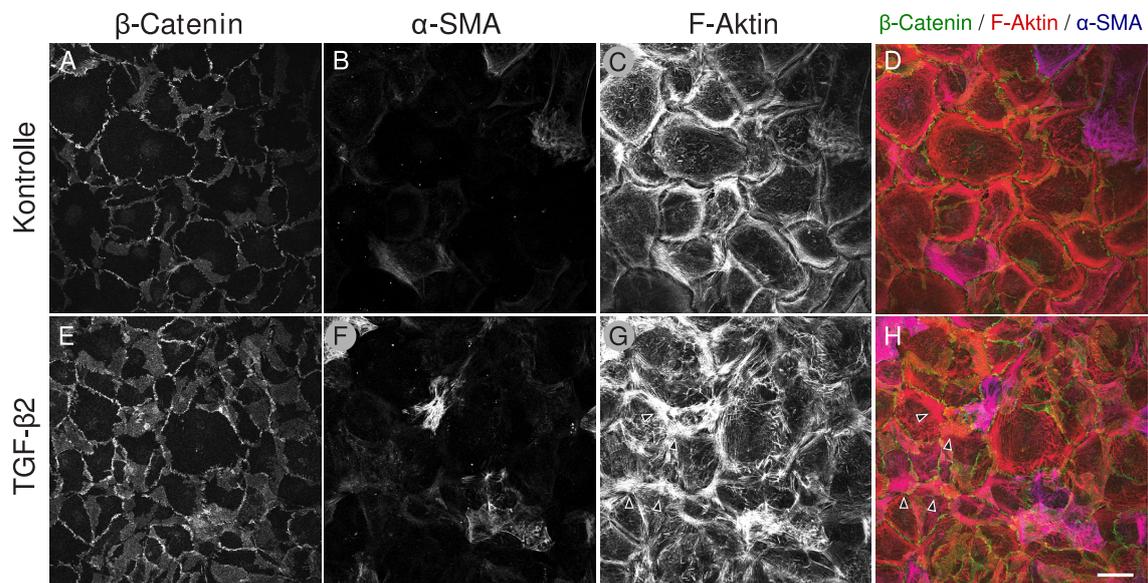


Abbildung 3.6

Konfokalmikroskopisch erstellte Bilder von humanen Trabekelmaschenwerkszellen in einer Dreifachfärbung für β -Catenin (grün), F-Aktin (rot) und α -SMA (blau). Die Zellen wurden mit TGF- β 2 [2 ng/ml] für 48 Stunden stimuliert. Die Pfeile in G und H markieren Stellen, an denen das Aktinzytoskelett der Zellen bündelförmig zusammen gelagert ist.

Die Länge der Markierung entspricht $50 \mu\text{m}$.

Die konfokalmikroskopische Untersuchung immunzytochemisch gefärbter Zellen erlaubt eine visuelle Beurteilung der subzellulären Proteinverteilung.

Es zeigte sich eine deutliche Zunahme von β -Catenin nach TGF- β 2-Stimulation (vgl. Abb. 3.6 E), insbesondere an den Zell-Zell-Grenzen. Diese erschienen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 3.6 A) hervorgehoben. Nukleäres β -Catenin war nicht nachweisbar.

α -SMA zeigte in einzelnen Zellen eine deutliche Zunahme der Färbungsintensität nach Inkubation mit TGF- β 2 (vgl. Abb. 3.6 B und F). Die Lokalisation des glattmuskulären Aktins entsprach im Wesentlichen derjenigen des F-Aktins (Abb. 3.6 C und G). Daher ist von einer Einlagerung von α -SMA in Stressfasern auszugehen.

Besonders auffallend beim Vergleich der stimulierten Zellen mit den Kontrollen war die Bildung transzellulärer Aktin-Netzwerke (vgl. Abb. 3.6 G). Das Aktinzytoskelett bildete knotenförmige Verzweigungen (Pfeilspitzen in Abbildung 3.6 G und H).

3.5 Einfluss der Zellkontraktilität auf die TGF- β 2-induzierte Expression von β -Catenin und Cadherin

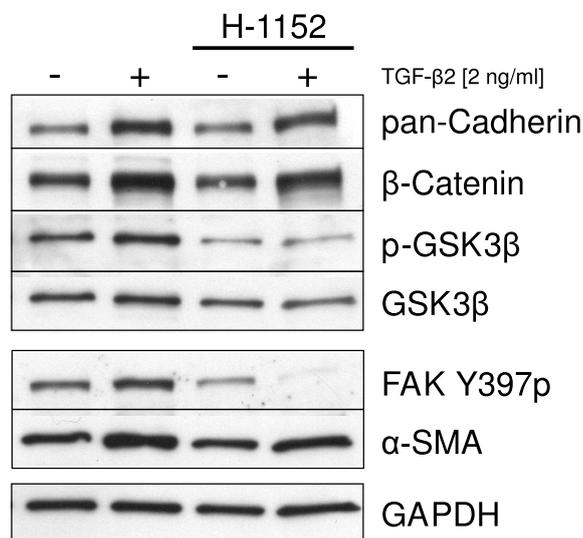


Abbildung 3.7

TGF- β 2-Einfluss auf HTM unter Blockade von ROCK mittels H-1152.

Zell-EZM-Adhäsionen bilden sich in Abhängigkeit von der auf sie einwirkenden Zugkraft aus. Dies gilt z.T. auch für die Zell-Zell-Verbindungen^[100]. Um zu klären, inwiefern eine Kontraktilitätszunahme und daraus resultierende vermehrte Belastung der Zell-Zell-Verbindungen für die gesteigerte Expression von N-Cadherin und β -Catenin verantwortlich ist wurde der ROCK-Inhibitor H-1152 eingesetzt.

Auch unter ROCK-Blockade zeigte sich eine deutliche Zunahme von β -Catenin und Cadherin nach Stimulation mit TGF- β 2 (vgl. Abb. 3.7). Im Gegensatz dazu war die Zunahme von α -SMA unter H-1152 deutlich gehemmt. Ebenso blieb die Phosphorylierung von FAK unter ROCK-Inhibition aus und fiel unter TGF- β -Stimulation sogar noch unter das Ausgangsniveau ab.

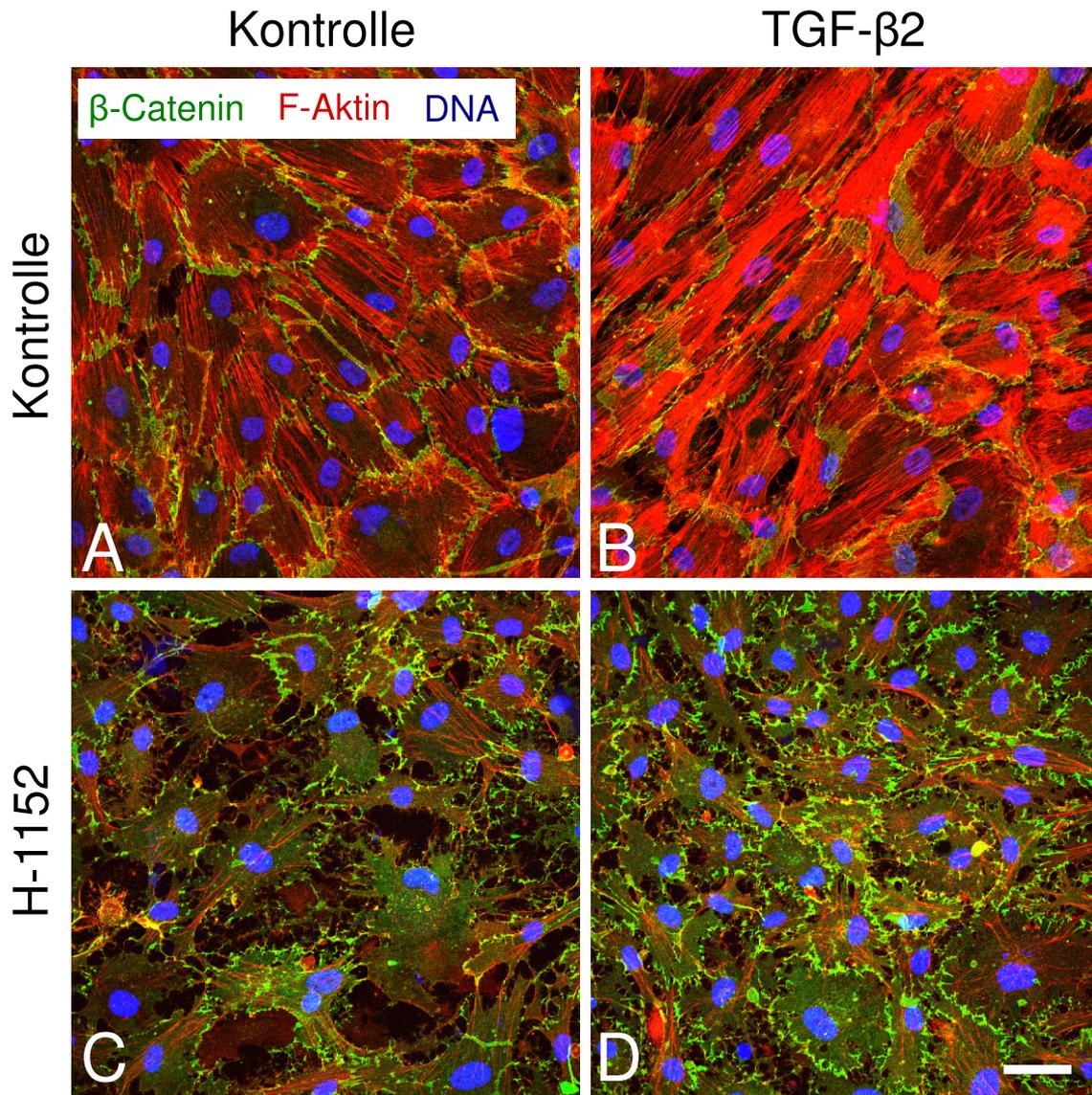


Abbildung 3.8

TGF- β 2-Einfluss auf die Zellmorphologie von HTM unter Blockade von ROCK mittels H-1152. Immunhistochemische Darstellung. Die Länge der Markierung entspricht 50 μ m.

Wie bereits die subzelluläre Lokalisation des β -Catenin, so wurde auch der Einfluss der Kontraktionshemmung konfokalmikroskopisch untersucht. Unter TGF- β -Stimulation zeigte sich ein Zuwachs an F-Aktin (vgl. Abb. 3.8 A und B). Unter Kontraktibilitätsblockade blieb dieser Anstieg aus (vgl. Abb. 3.8 C und D). β -Catenin hingegen war durch H-1152 weitgehend unbeeinflusst an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert.

Der Zellrasen zeigte unter Hemmung der Zellkontraktilität durch den Verlust der Zell-EZM-Haftung ein Retraktionsphänomen (vgl. Abb. 3.8 C und D).

Zusammenfassend zeigte sich unter ROCK-Inhibition ein Verlust von Stressfasern und der Zell-Zell-Adhäsion. TGF- β 2 bewirkte dennoch eine Zunahme von β -Catenin an der Zellmembran.

3.6 ALK-5-Rezeptorabhängigkeit

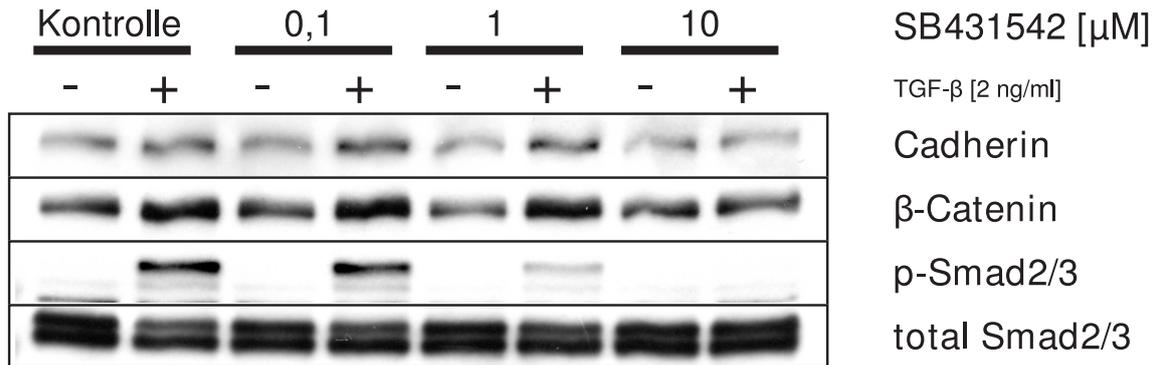


Abbildung 3.9

Wirkung von 48-stündiger Stimulation mit TGF- β 2 [2 ng/ml] auf HTM unter Blockade des TGF- β -Rezeptors.

ALK5 ist der klassische Typ 1 TGF- β -Rezeptor^[40]. Um einen unspezifischen Effekt von TGF- β auszuschließen, wurde der Rezeptor des Wachstumsfaktors blockiert. Hierzu kam die Substanz SB431542 zum Einsatz, die an ALK5 bindet und dessen Kinaseaktivität blockiert.

Es zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Wirkung von SB431542: In einer Konzentration von 10 μ M inhibierte der Rezeptorblocker die TGF- β -induzierte Expressionszunahme von β -Catenin und Cadherinen vollständig (vgl. Abb. 3.9). Die Phosphorylierung von Smad2/3 nach TGF- β -Stimulation fiel in Abhängigkeit von der SB431542-Dosis schwächer aus, während total-Smad2/3 kaum Schwankungen zeigte.

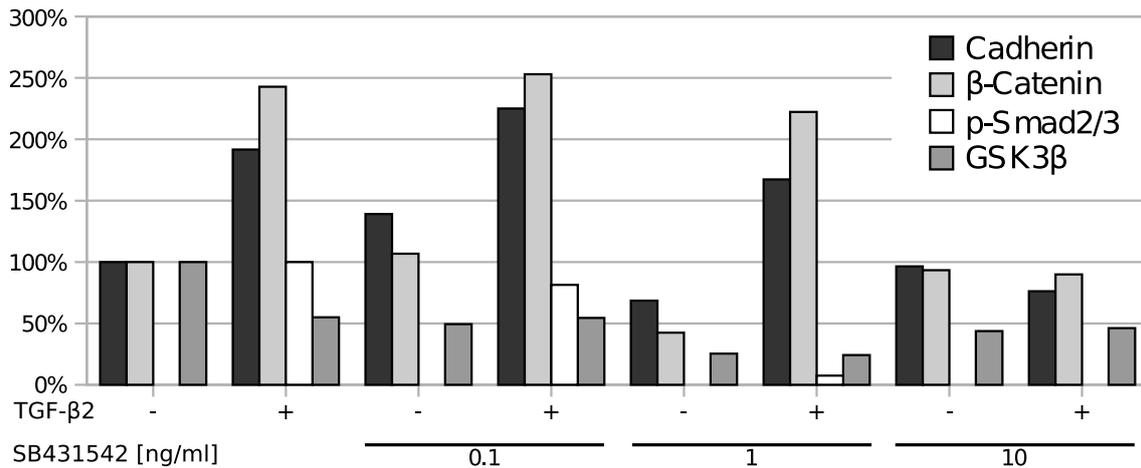


Abbildung 3.10

Quantitative Auswertung von Abb. 3.9. Die Kontrollen (für p-Smad2/3: Kontrolle mit TGF-β2) wurden jeweils gleich 100% gesetzt. Die Zahlenwerte der Abszissenbeschriftung bezeichnen die Konzentration des Inhibitors SB431542 in μM.

Da die Phosphorylierung von Smad2/3 eine direkte Funktion des aktivierten TβR-I/II-Komplexes ist^[96,200], kann deren Ausbleiben unter SB431542 als Positivkontrolle für die korrekte Inhibitorwirkung gewertet werden. Interessant ist jedoch, dass die Smad-Phosphorylierung bereits bei einer Konzentration des Inhibitors von 1 μM deutlich abgeschwächt wurde, während Cadherin und β-Catenin hier noch keine Angleichung der Bandenschwärzung zwischen unblockierter Kontrolle und geblockten Zellen erkennen ließen (vgl. Abb. 3.9).

3.7 Inhibition von Smad3

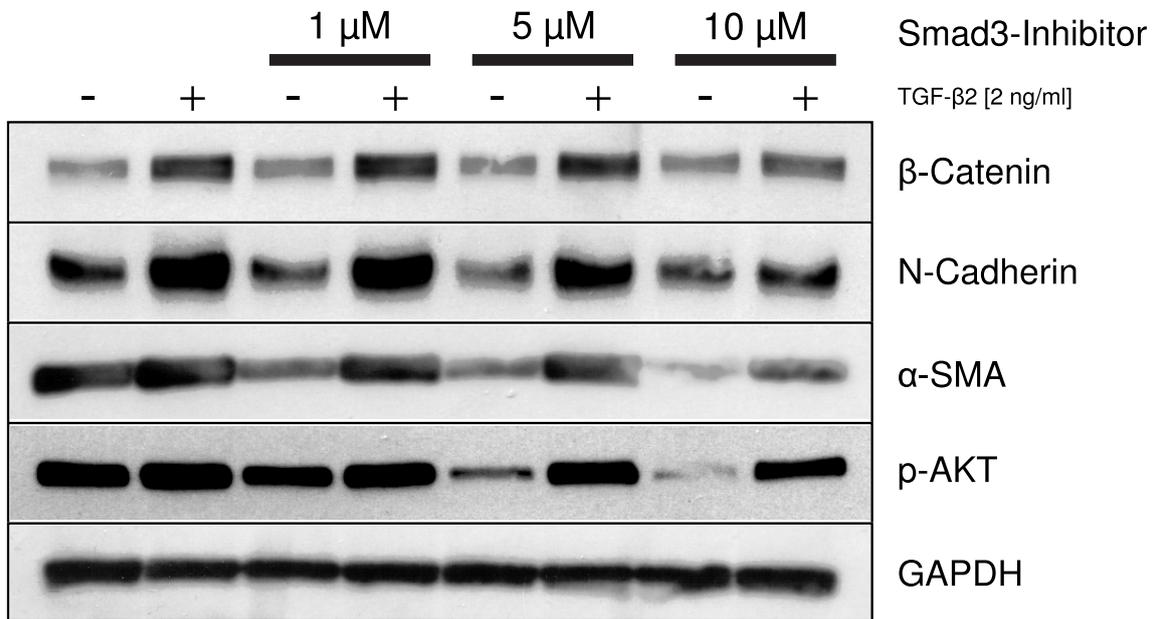


Abbildung 3.11

Der Smad3-Inhibitor SiS3 zeigte bei einer Konzentration von 10 μM eine deutliche Wirkung.

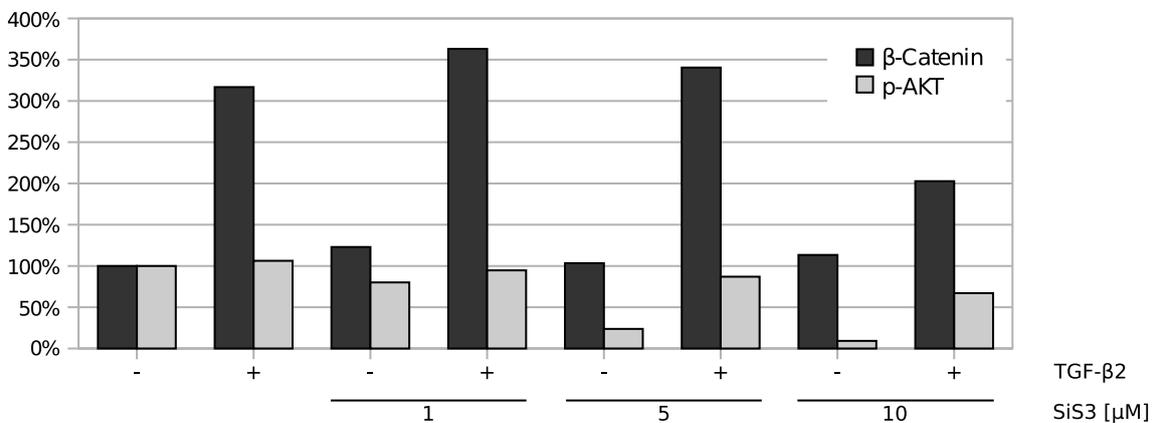


Abbildung 3.12

Graphische Darstellung der Konzentrationsänderung von β-Catenin und p-AKT in humanen Trabekelmaschenwerkszellen unter Smad3-Inhibition mit/ohne TGF-β2 in einer Konzentration von 2 ng/ml für 48 h. Aufgrund der hohen Grundaktivierung von p-AKT sind bei diesem Protein lediglich die Quantifizierungen der Spalten mit 5 μM und 10 μM verwertbar. Die Zahlenwerte der Abszissenbeschriftung bezeichnen die Konzentration des Inhibitors SiS3 in μM.

Nachdem im vorangegangenen Versuch die ALK5-Rezeptorabhängigkeit der TGF-β2-induzierten Expressionsänderungen von Strukturproteinen gezeigt werden konnte (vgl.

Abb. 3.9), stellte sich die Frage, ob der klassische TGF- β -Signalweg über Smad2/3 in humanen Trabekelmaschenwerkszellen für diesen Effekt verantwortlich ist.

Zur weiteren Abklärung des den β -Catenin-Anstieg vermittelnden Signalweges kam daher der Smad3-Inhibitor SiS3 zum Einsatz. Dieser zeigte einer Konzentration von 10 μ M eine Abschwächung des TGF- β 2-Effektes auf β -Catenin in HTM. Die unter TGF- β erwartete Zunahme des Proteins blieb mit Smad2/3-Blockade dieser Dosierung nahezu aus (Abb. 3.11).

Eine Reduktion des β -Catenin-Anstiegs war jedoch bei Inhibitorkonzentrationen von 1 μ M und 5 μ M noch nicht sichtbar.

Im direkten Vergleich mit β -Catenin schienen die Auswirkungen der Smad3-Inhibition auf N-Cadherin schwächer, bei 10 μ M SiS3-Konzentration war aber ebenfalls der geringe Unterschied zwischen TGF- β -stimulierten und nicht-stimulierten Zellen erkennbar.

Weiter fielen besonders die Ergebnisse für p-AKT auf, welches bereits bei geringeren Inhibitor dosierungen recht deutliche Konzentrationsänderungen in den TGF- β 2-freien Kontrollgruppen zeigte, doch TGF- β jedoch weiterhin aktivierbar blieb (Abb. 3.11).

3.8 Inhibition von p38

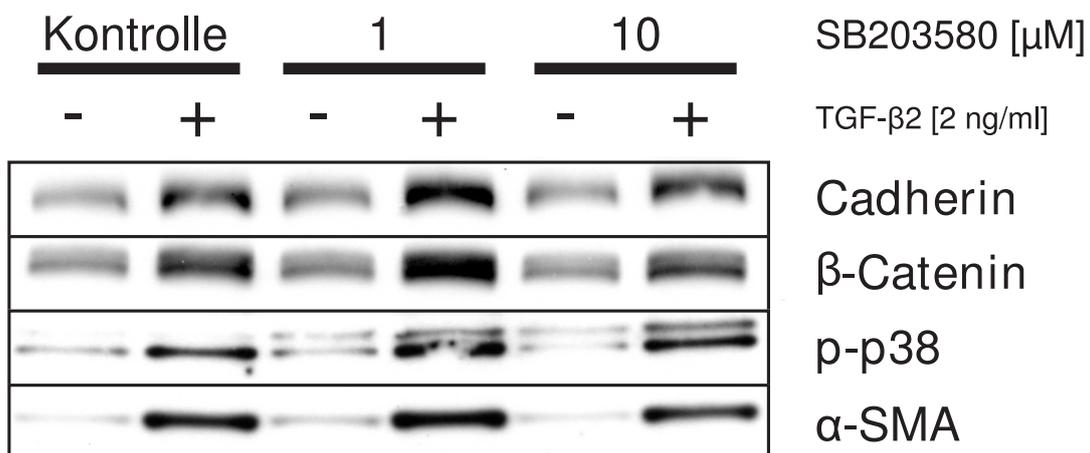


Abbildung 3.13

Wirkung des p38-Inhibitors SB203580 auf TGF- β -stimulierte Zellen und Kontrollen.

Neben Smad2/3 sind an der Transduktion des TGF- β -Signals noch weitere zelluläre Signalkaskaden beteiligt, darunter auch die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)

p38^[201]. Daher wurden in den folgenden Versuchen einige dieser alternativen Signalwege untersucht.

Der Effekt des p38-Inhibitors SB203580 auf die untersuchten Proteine in HTM war nicht sonderlich ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 10 μM Inhibitor schienen die β -Catenin- und Cadherin-Banden jedoch etwas schwächer gefärbt zu sein (Abb. 3.13). Die Quantifizierung des Western Blot (Abb. 3.14) bestätigte diesen Eindruck, unterstrich gleichzeitig aber auch den schwachen Ausprägungsgrad des Effektes.

Die Auswirkungen einer p38-Inhibition auf α -SMA war ebenfalls nicht besonders ausgeprägt.

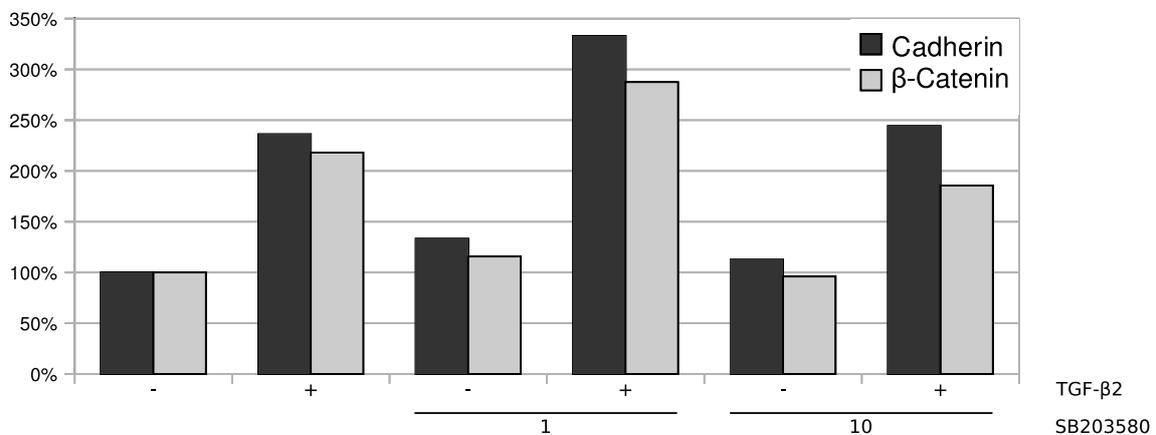


Abbildung 3.14

Quantitative Auswertung von Abb. 3.13. Die Kontrollen wurden jeweils gleich 100% gesetzt. Die Zahlenwerte der Abszisse bezeichnen die Inhibitorkonzentration in μM

3.9 PI3K-AKT-Inhibitor

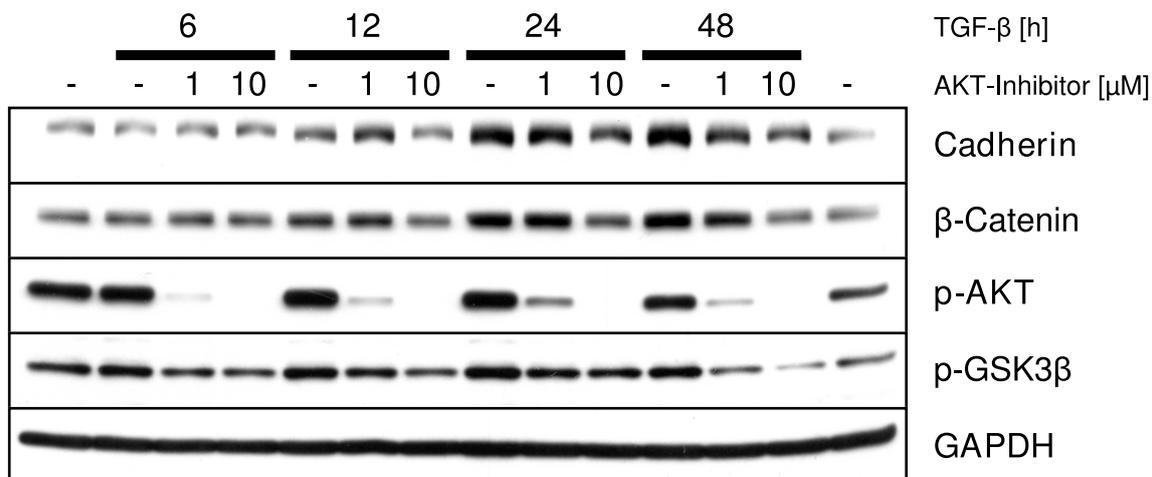


Abbildung 3.15

Partialinhibitorische Wirkung eines AKT-Inhibitors auf TGF-β-stimulierte Zellen und Kontrollen. TGF-β wurde in einer Konzentration von 2 ng/ml zugesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation, wie die Abbildung erkennen lässt.

Neben dem klassischen Smad-Signalweg und p38 kann das TGF-β-Signal auch über den PI3K/AKT-Pfad weitergeleitet werden^[201]. AKT, auch als Proteinkinase B bezeichnet, existiert im menschlichen Organismus in drei Subtypen und spielt bei zahlreichen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle, unter anderem in der Regulation des Zellzyklus, der Zellmigration und des Glukosemetabolismus^[199].

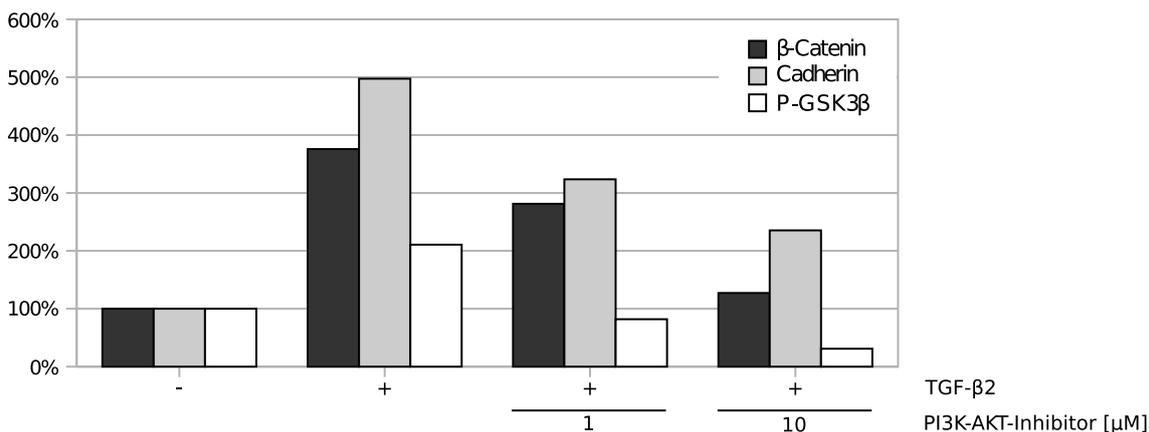


Abbildung 3.16

Quantitative Auswertung von Abb. 3.15 (ausschließlich Banden nach 48-stündiger Stimulation und zeitgleich geerntete Kontrolle dargestellt). Die Grauwerte der Banden in der TGF-β-freien Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Zahlenwerte der Abszisse bezeichnen die Inhibitorkonzentration in μM.

Nach 12-, 24- bzw. 48-stündiger Stimulation der Zellen mit TGF- β 2 zeigte der AKT-Inhibitor jeweils einen zeit- und dosisabhängigen Effekt auf die Proteine β -Catenin und Cadherin. Das Ausbleiben der Phosphorylierung von AKT (gezeigt durch die schwächer werdende Bandenschwärzung von p-AKT) diente als Hinweis auf die korrekte Funktion des Inhibitors. Der Zeitverlauf des Proteinzuwachses unter TGF- β -Einfluss ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Zeitkinetik (vgl. Abb. 3.2).

Die Abnahme an p-GSK3 β korrelierte mit der Menge an β -Catenin (siehe Abb. 3.16). Diese Beobachtungen bestätigten die bereits erwähnten Beziehungen der drei Proteine untereinander: AKT phosphoryliert (und inaktiviert damit) GSK3 β , welches wiederum β -Catenin phosphoryliert und damit seinen proteasomalen Abbau vorbereitet. Auch bei Inhibition der AKT-phosphorylierenden PI3K zeigte sich ein partielles Ausbleiben der TGF- β 2-induzierten N-Cadherin- und β -Catenin-Expressionssteigerung (vgl. Abb. 3.19).

Die konfokalmikroskopische Untersuchung von Zellen, welche mit einem PI3K-AKT-Inhibitor behandelt wurden ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Blockade des Signalweges die Ausrichtung des kortikalen Aktinzytoskeletts beeinflusst. Der Zellverband zeigte einen Verlust von Zell-Zell-Bindungen. Die Zellen grenzten nicht mehr großflächig aneinander, sondern hatten nur noch einige wenige fokale Kontaktpunkte. Diese Beobachtungen ließen sich auch bei Inhibition von PI3K (vgl. Abb. 3.20 D,E,I,J) bestätigen.

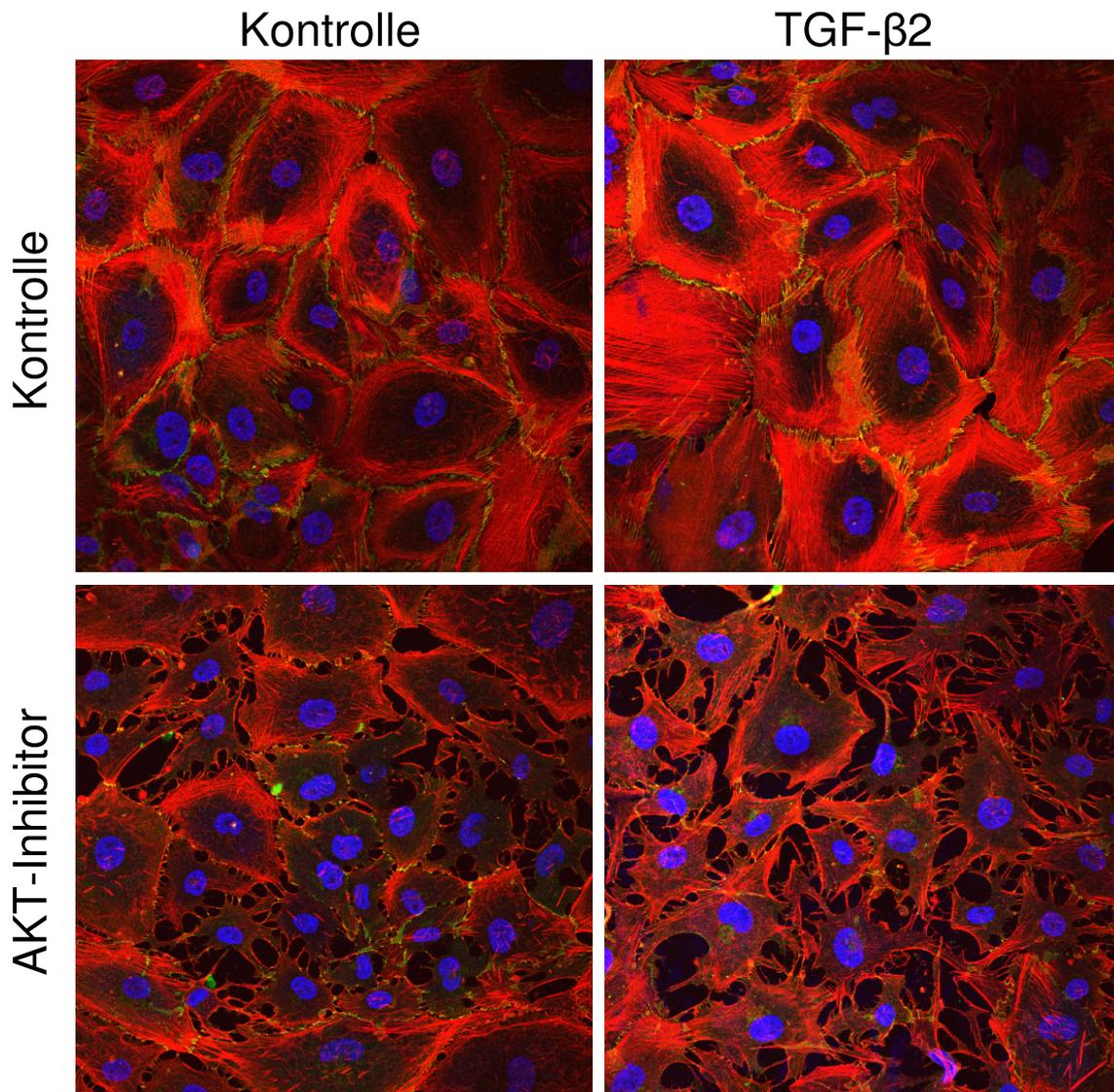


Abbildung 3.17

Auswirkungen der AKT-Inhibitor auf zytoskelettale Elemente und die Zell-Zell-Verbindungen in HTM. TGF- β 2: [2 ng/ml]; AKT-Inhibitor X [10 μ M]. Rot: F-Aktin; Grün: β -Catenin; Blau: Zellkerne (DAPI)

3.10 Inhibition des MEK/ERK-Pfades

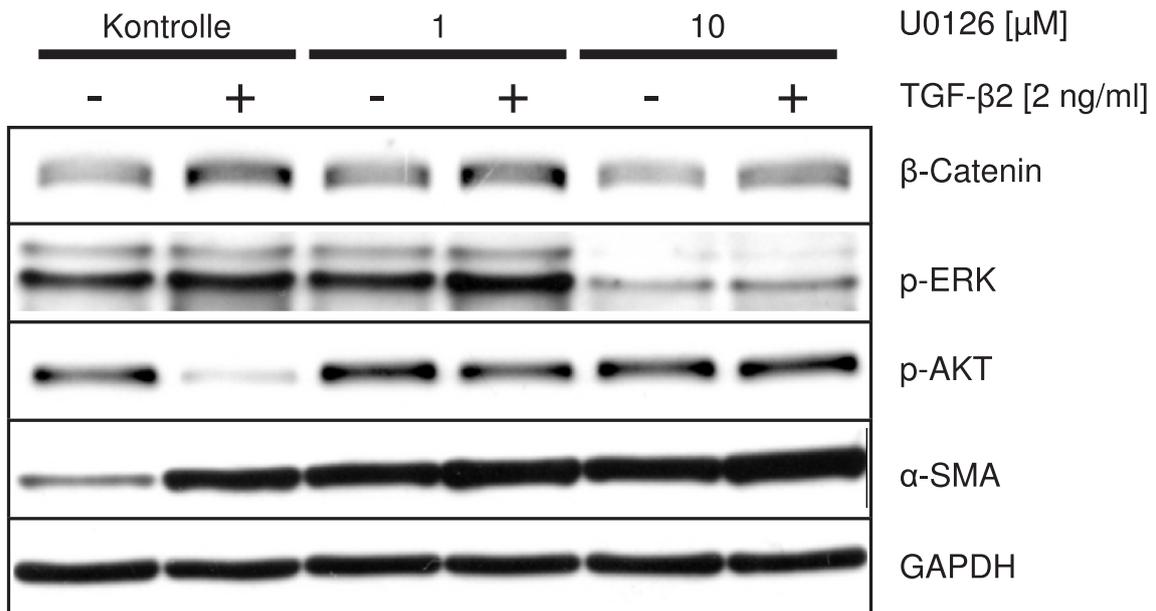


Abbildung 3.18

Der MEK-Inhibitor U0126 zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die β -Catenin-Expression in HTM nach 48-stündiger TGF- β 2-Stimulation. Die α -SMA-Expression wurde durch MEK-Inhibition gesteigert.

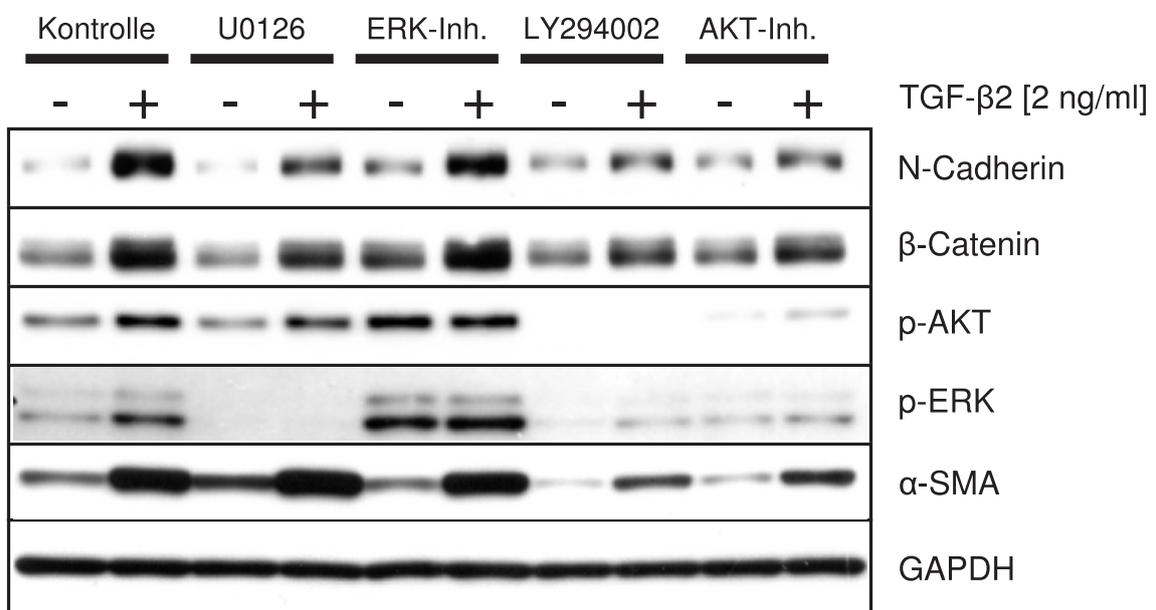


Abbildung 3.19

Die Zellen wurden mit dem MEK-Inhibitor U0126 [10 μM], dem ERK-Inhibitor 328006 der Fa. Calbiochem [10 μM], dem PI3K-Inhibitor LY294002 [20 μM] und dem AKT-Inhibitor X [10 μM] jeweils mit und ohne TGF- β 2 [2 ng/ml] für 48 h inkubiert.

Auch der ERK-Signalweg ist an der Weiterleitung des TGF- β -Signals beteiligt^[40,75]. Um den Einfluss von MEK/ERK auf die TGF- β -induzierten Expressionsänderungen zu untersuchen, wurde MEK1/2 (und damit die Phosphorylierung von ERK) durch den spezifischen Blocker U0126 inhibiert^[48]. Mit dem ERK-Inhibitor 328006 wurde die Kinaseaktivität von ERK blockiert.

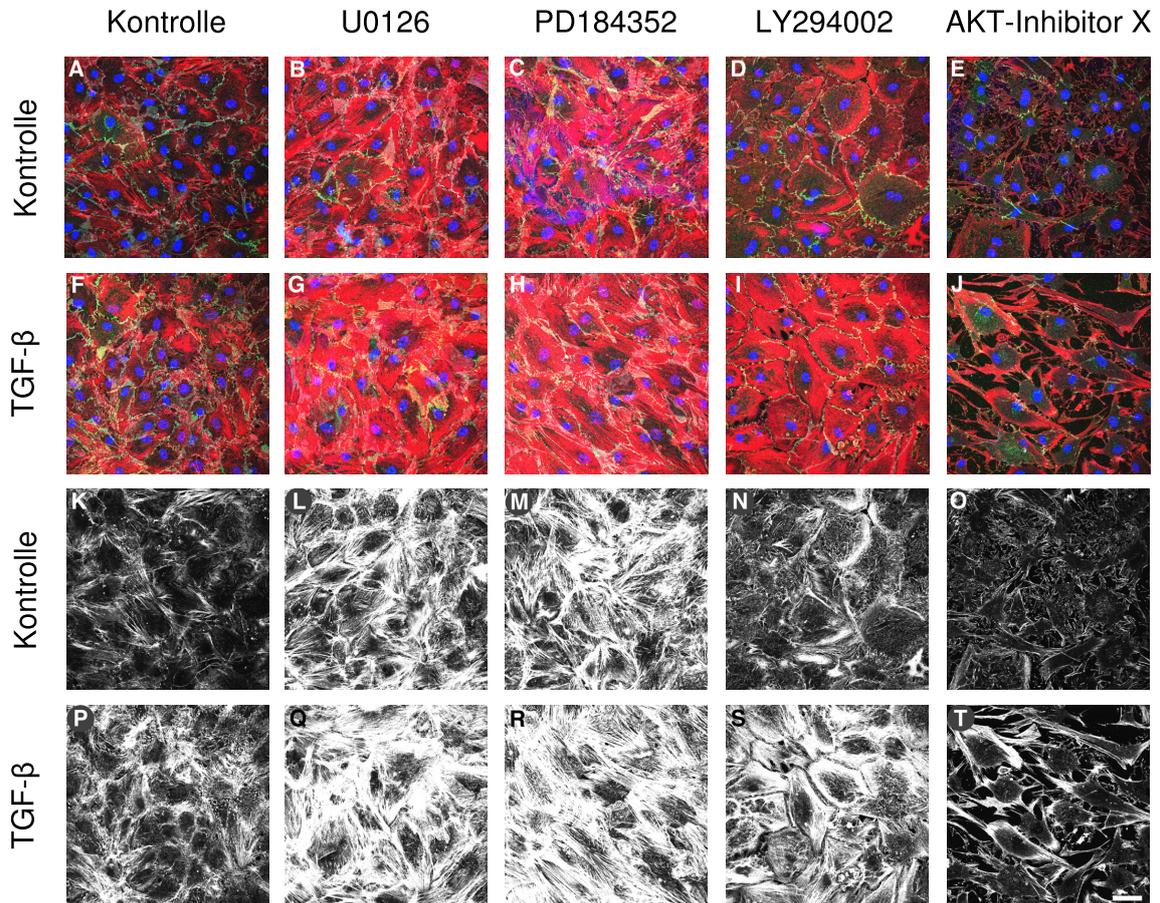


Abbildung 3.20

Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunfluoreszenzgefärbter HTM nach Stimulation mit TGF- β 2 [2 ng/ml]. Rot: F-Aktin; grün: β -Catenin; blau: Zellkerne (DAPI) (A-J); F-Aktin: weiß (K-T). Die Zellen wurden mit dem MEK-Inhibitoren U0126 [$10 \mu\text{M}$] und PD184352 [$10 \mu\text{M}$], dem PI3K-Inhibitor LY294002 [$20 \mu\text{M}$] und dem AKT-Inhibitor X [$10 \mu\text{M}$] jeweils mit und ohne TGF- β 2 für 48 h inkubiert. Die Einstellungen des Konfokalmikroskopes waren für alle gezeigten Aufnahmen identisch. Die Länge der Markierung entspricht $50 \mu\text{m}$.

Die TGF- β 2-abhängige Expressionssteigerung von β -Catenin und N-Cadherin wurde durch U0126 erst ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ merklich gehemmt. Deutlich war allerdings der Einfluss der MEK-Inhibition auf α -SMA. U0126 erhöhte die Basisexpression von α -SMA in HTM (vgl. Abb. 3.18 und 3.19 sowie Abb. 3.20 B,C,G,H und

3.20 L,M,Q,R). Der TGF- β 2-Effekt auf das glattmuskuläre Aktin wurde dabei nicht aufgehoben. Die Inhibition von ERK zeigte sowohl auf β -Catenin und Cadherin als auch auf α -SMA deutlich schwächere Auswirkungen als MEK1/2-Blockade. Interessanterweise kam es nach Inhibition der Kinaseaktivität von ERK zu einer Erhöhung der p-ERK-Spiegel (Abbildung 3.19).

4 Diskussion

TGF- β 2 wird in erhöhter Konzentration im Kammerwasser von an primärem Offenwinkelglaukom erkrankten Patienten gefunden^[79,137,181]. Über den Einfluss dieses Wachstumsfaktors auf die Qualität und Quantität der EZM im Trabekelmaschenwerk liegen bereits Ergebnisse vor^[2,59,184]. Veränderungen der Trabekelmaschenwerkszellen selbst auf TGF- β wurden jedoch bisher weniger intensiv untersucht. Die weitere Erforschung der TGF- β -Effekte auf Trabekelmaschenwerkszellen für Hinweise zur Veränderung der Zelladhäsion und des Zellskeletts als wichtige Determinanten vielfältiger Zellfunktionen erscheinen daher sinnvoll.

4.1 TGF- β 2-induzierte Proteinexpression und -phosphorylierung

TGF- β 2 induzierte Änderungen der Proteinexpression von Strukturproteinen wie β -Catenin und Cadherinen und aktivierte mehrere Signalwege teils sequentiell, teils parallel. Bisher gibt es keine Publikationen zur Aktivierung von non-Smad-Signalwegen und Expressionssteigerung von β -Catenin und Cadherinen durch TGF- β 2 in Trabekelmaschenwerkszellen. Unter TGF- β -Stimulation kam es zu einer frühen Phosphorylierung von Smads, während ERK und AKT erst mit einigen Stunden Latenz aktiviert wurden (vgl. Abb. 3.2). β -Catenin, das Aufgaben von Struktur- und Signalproteinen übernimmt (vgl. Kapitel 1.6), wurde durch TGF- β 2-Stimulation ebenfalls verstärkt exprimiert. Cadherine zeigten in HTM nach Inkubation mit TGF- β 2 Änderungen des Proteinexpressionsmusters (Abnahme der E-Cadherin- und Zunahme der N- und OB-Cadherin-Expression; vgl. Abb. 3.2) wie sie mit myofibroblastären Transdifferenzierungsvorgängen (beispielsweise von kornealen Fibroblasten) in Verbindung gebracht werden^[117]. Der Wechsel von E-Cadherin zu N-Cadherin ist ein Grundsatzphänomen der EMT^[186]. Weiterhin ist TGF- β als potenter Induktor dieses Prozesses bekannt^[169]. Die beobachteten Veränderungen des Expressionsmusters der Cadherine in HTM unter TGF- β 2-Stimulation stehen daher wahrscheinlich mit Transdifferenzierungsvorgängen im Zusammenhang.

Die Stimulation von HTM mit TGF- β 2 führte zur raschen Aktivierung des Smad-Signalweges, die nach sechs Stunden wieder abklang. Zeitlich versetzt folgte die Aktivierung von AKT und ERK, die bis zu 24 Stunden anhielt und Veränderungen der Proteinexpression vorausging (vgl. Abb. 3.2). Diese sekundäre Aktivierung nicht-klassischer TGF- β -induzierter Signalwege wurde bereits für andere Zelltypen beschrieben^[123,201]. Sie deutet auf die Wirkung zwischengeschalteter Signalmoleküle wie z.B. CTGF hin, von dem für Chondrozyten bekannt ist, dass seine Genaktivität durch TGF- β gesteigert wird^[161].

24 Stunden nach Beginn der TGF- β 2-Stimulation begann auch die Konzentration des kontraktionsvermittelnden Proteins α -SMA zu steigen (vgl. Abb. 3.2). Dieser Einfluss des Zytokins auf HTM ist für TGF- β -1 bereits beschrieben und wurde von Tamm und Mitarbeitern als Anhaltspunkt für eine Transdifferenzierung der HTM zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Zellphänotyp gewertet^[164].

Zusammenfassend zeigte sich in der Versuchsreihe neben dem bekannten Effekt des SMA-Anstieges in HTM nach TGF- β -Stimulation die bisher nicht beschriebenen Veränderungen der Proteinexpression von Cadherin und β -Catenin und Aktivierung nicht-klassischer TGF- β -Signalwege.

4.2 Fraktionierung von Trabekelmaschenwerkzellen zur Bestimmung der Lokalisation von β -Catenin

β -Catenin nimmt in der Zelle eine duale Rolle ein. Auf der einen Seite dient es als Signalprotein im Rahmen der Wnt-Signalgebung, auf der anderen Seite vermittelt es die Verbindung von Cadherinen an das Aktin-Zellskelett. Daher kann eine Vermehrung von β -Catenin im WB durch eine Verstärkung der Zell-Zell-Verbindungen oder eine Zunahme der β -Catenin-vermittelten Transkription im Rahmen der Wnt-Signalgebung verursacht sein (vgl. Kapitel 1.6). Um die Lokalisation des vermehrt nachgewiesenen β -Catenin zu untersuchen wurden biochemische Fraktionierungsexperimente durchgeführt.

Durch die Verbindung von intrazellulärer Lokalisation und Aufgabe des β -Catenin (vgl. Kapitel 1.6), gibt die Verteilung des Proteins Hinweise auf seine Verwendung durch die Zelle. Somit lässt die Kenntnis der Proteinlokalisierung Rückschlüsse zu, zugunsten welcher funktioneller Untergruppe der TGF- β -induzierte β -Catenin-Anstieg geht.

In der unstimulierten Kontrolle war β -Catenin sowohl im Zellkern, als auch im zytoplasmatischen Anteil deutlich nachweisbar und zeigte eine Tendenz zur Distribution in das intranukleäre Zellkompartiment ¹.

TGF- β 2 führte zu einer leichten Abnahme des nukleären β -Catenins (vgl. Abb. 3.4), was in der quantitativen Auswertung des Western Blots ebenfalls deutlich wurde (vgl. Abb. 3.5). Demgegenüber kam es in der zytosolischen Fraktion nach TGF- β -Stimulation zu einer Zunahme des β -Catenin auf über 190% im Vergleich zur Kontrolle.

Ein Reporter Gene Assay konnte aufgrund der schlechten Transfizierbarkeit von HTM nicht durchgeführt werden. Definitive Aussagen zum Aktivitätsgrad des Wnt- β -Catenin-Signalweges in den TGF- β 2-stimulierten Zellen sind daher nicht möglich. Die Herstellung eines direkten Zusammenhanges zwischen der (nukleären) β -Catenin-Menge und der Aktivität des Wnt-Signalweges ist unzulässig. Allerdings ist bekannt, dass Cadherine die intranukleäre Translokation von β -Catenin behindern und damit zu einer Depletion des Wnt-Signalweges führen können, da es einen gemeinsamen β -Catenin-Pool gibt, um den die verschiedenen Bindungspartner konkurrieren^[130]. Dass in HTM unter TGF- β Stimulation auch eine Cadherin-Expression beobachtet werden kann, könnte damit ein Hinweis auf eine Abschwächung des Wnt-Signalweges durch TGF- β sein. Wang und Mitarbeiter zeigten, dass der Wnt-Antagonist sFRP-1² zu erhöhten Augeninnendruckwerten bei Mäusen führt^[183]. Über den Wnt-inhibierenden Effekt der Cadherine könnte sich damit eine weitere Einflussmöglichkeit von TGF- β auf den IOD ergeben.

Daher kann die beobachtete Zunahme der cytosolischen Fraktion in Verbindung mit der Abnahme der nukleären Fraktion trotz der potentiellen Ungenauigkeit der verwendeten Fraktionierungs- und Quantifizierungsmethoden im Sinne einer TGF- β -induzierten Umverteilung des β -Catenin bewertet werden. Die Fraktionierungsexperimente sprechen zusammen mit den Immunfluoreszenzaufnahmen (vgl. Abb. 3.6, 3.8, 3.17 und 3.20) dafür, dass TGF- β in HTM zu einem Anstieg des Zytoskelett-gebundenen β -Catenin führt.

¹FCS, welches dem Zellkulturmedium zugesetzt wurde, enthält TGF- β und weitere Wachstumsfaktoren. Verbindliche Angaben des Herstellers zur TGF- β -Menge in FCS liegen nicht vor. FCS wurde in allen vorgestellten Versuchen in gleicher Konzentration (3%) zum Zellkulturmedium gegeben (vgl. p-Smad-Basisaktivität in 3.2). Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse herstellen zu können, wurde weiterhin in allen Experimenten nur FCS eines Herstellers und mit identischer Chargennummer verwendet, so dass die (angenommene) FCS-induzierte Grundaktivierung des TGF- β - und Wnt- β -Catenin-Signalweges in allen Versuchen gleich hoch ist.

²secreted frizzled-related protein-1 (sFRP-1)

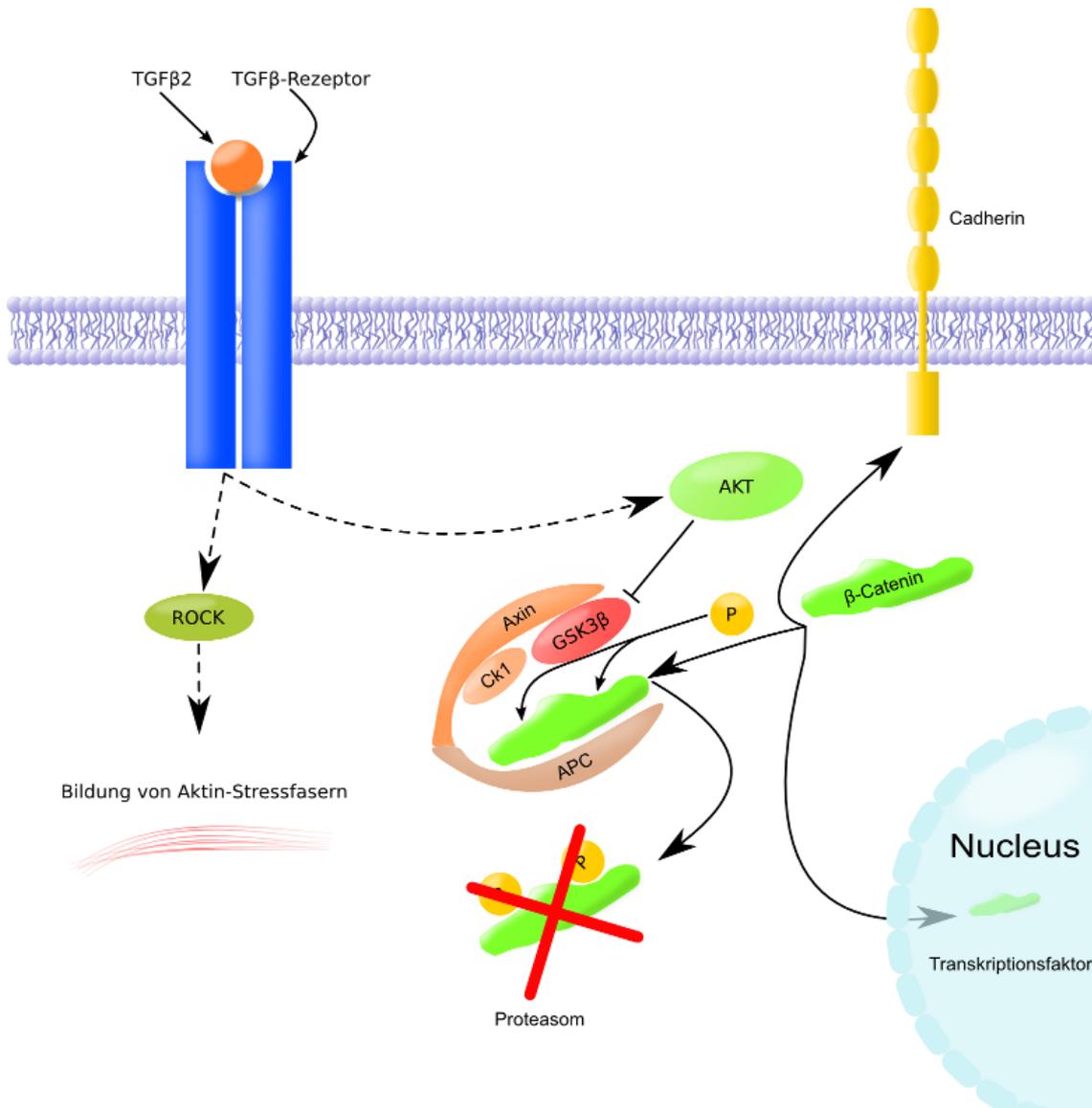


Abbildung 4.1

Vereinfachte Übersicht über zentrale Punkte der β -Catenin-Aufgaben und der β -Catenin-Regulation im Zellhaushalt

4.3 Lokalisation von β -Catenin und Zytoskelettproteinen

Immunhistochemische Verfahren erlauben die selektive Färbung einzelner Proteine (siehe Kapitel 2.4.2). Die konfokalmikroskopische Untersuchung solchermaßen gefärbter Zellen ermöglicht neben der Identifikation von Proteinen auch eingeschränkte Aussagen zu deren Lokalisation.

TGF- β -stimulierte Trabekelmaschenwerkszellen zeigten eine kräftigere β -Catenin-Fär-

bung der Zell-Zell-Grenzen im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abb. 3.6). Die Überlappungsbereiche zwischen benachbarten Zellen nahmen ebenso zu.

α -SMA zeigte unter TGF- β 2-Einfluss den bereits (vgl. Abb. 3.2) beobachteten Konzentrationsanstieg (Abb. 3.6 B,F). Das glattmuskuläre Aktin ist typisch für Myofibroblasten. Dieser Zelltyp zeigt eine erhöhte α -SMA-vermittelte Kontraktionsfähigkeit und spielt unter anderem bei Wundheilungsvorgängen eine entscheidende Rolle^[76,117,136]. Änderungen des Phänotypes der betrachteten Zellen in Richtung Myofibroblasten wären denkbar und wurden in der Literatur bereits hypothetisch erwähnt^[164].

Unter TGF- β 2 bildeten die F-Aktin-Fasern an diversen Stellen knotenförmige Strukturen (Pfeile in Abb. 3.6 G und H) und schienen die Zell-Zell-Grenzen z.T. zu überspannen. Aktincluster (cross-linked actin networks, CLANS) werden im Trabekelmaschenwerk von Patienten mit Glaukom verstärkt gefunden^[77,144]. Dass eine Verstärkung des Zytoskeletts und der Zell-Zell-Bindungen zu einem geringeren Kammerwasserabfluss führen könnte, wird in der Literatur diskutiert^[87,165,173].

Die Zunahme von F-Aktin und α -SMA unter TGF- β 2-Stimulation wäre gut vereinbar mit einer Erhöhung der Eigenkontraktilität des TM, die eine Rolle in der Regulation des IOD spielt^[189]. In vivo fand man hingegen einen (unabhängig vom Glaukom) mit steigendem Alter abnehmenden α -SMA-Gehalt des Trabekelmaschenwerks^[53].

Eine Arbeitsgruppe um Ted Acott entwickelte die Hypothese, die Zellen des TM fungierten selbst als Mechanosensor. Schwankende IOD-Werte würden zu Zugkräften im TM führen, welche die Zellen vor allem über ihre Verbindung mit der EZM detektierten, um regulierend eingreifen zu können.^[15] Die beobachteten TGF- β -abhängigen Zytoskelettveränderungen könnten im Rahmen dieser Hypothese über eine geänderte Gewebestruktur zu anderen Funktionseigenschaften des Mechanosensors führen. Durch die Änderungen der Kontraktilität und des Zytoskeletts könnte sich die Dynamik des TM ändern und damit auch die IOD-Regulation beeinflusst werden.

4.4 Einfluss der Zellkontraktilität auf die TGF- β 2-Wirkung und den β -Catenin-Anstieg

Da TGF- β –wie bereits erwähnt– die Kontraktionsfähigkeit von HTM erhöht^[126] und Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-Verbindungen einer spannungsabhängigen Regulation un-

terliegen^[7,100] war eine Abklärung des Zusammenhanges zwischen β -Catenin-Erhöhung und Zellkontraktilität notwendig.

Um den Zusammenhang zwischen der Zellkontraktilität und β -Catenin zu untersuchen, wurde in einer Versuchsreihe über den ROCK-Inhibitor H-1152 die Zellkontraktilität gehemmt. H-1152 ist ein selektiver ROCK-Inhibitor, für den bereits eine IOD-Absenkung in enukleierten Schweineaugen gezeigt wurde^[142].

ROCK ist ein Schlüsselprotein für die endogene Kontraktionsfähigkeit zahlreicher Zelltypen. Offenbar spielt es auch bei einer der klassischen TGF- β -Wirkungen, der EMT, eine wichtige Rolle^[168].

Tian et al. zeigten an Affen für den Serin-Threonin-Kinasen-Inhibitor H-7³ eine Abnahme des Augeninnendruckes bei topischer Applikation, die von den Autoren auf eine Abnahme der Zell-Zell-Adhäsion und Zellkontraktilität zurückgeführt wird. Der IOD sank dabei unabhängig vom Vorhandensein eines funktionsfähigen Ziliarmuskels^[172,175]. Epstein und Mitarbeiter fanden für den gleichen Inhibitor eine Erhöhung des Kammerwasserabflusses in perfundierten Schweineaugen^[44]. Weiterhin ist bekannt, dass die spezifische Inhibition von ROCK zu einer deutlichen Änderung der Zellform, einer Reduktion von Aktin und Stressfasern und zu einem Verlust von Zell-Zell-Bindungen bei steigenden Abflusskapazitäten für Kammerwasser führt^[141,174].

Die erwähnten Beobachtungen sprechen für einen Einfluss von Rho-GTPasen auf die Zellkontraktilität auch in HTM.

Als Markerprotein für eine gesteigerte endogene Kontraktilität von Zellen wird häufig α -SMA herangezogen. Das Protein ist charakteristisch für die glatten Muskelzellen der Gefäße sowie für Myofibroblasten. Es wird typischerweise bei einer erhöhten intrazellulären Spannung vermehrt in die Aktinfibrillen des Zytoskeletts eingelagert, kann aber vermutlich auch selbst für eine Erhöhung der Zellkontraktilität sorgen^[147,182].

Die für fokale Adhäsionen typische *focal adhesion kinase* (Y397FAK) diene als Positivkontrolle für die Funktionsfähigkeit des Blockers H-1152^[24,121]. Das Ausbleiben des α -SMA-Anstiegs unter H-1152 (vgl. Abb. 3.7) zeigte, dass die TGF- β 2-abhängige α -SMA-Expression in HTM von der Zellkontraktilität bzw. mechanischen Belastungen der Adhäsionen abhängt.

Die verstärkte Expression von β -Catenin und Cadherin unter TGF- β -Stimulation wurde durch ROCK-Inhibition allenfalls leicht eingeschränkt (vgl. Abb. 3.7). Diese Fest-

³H-7 blockiert eine große Anzahl intrazellulärer Kinasen, darunter auch ROCK^[25,171]

stellung macht einen indirekt, über die verstärkte Kontraktilität des Zytoskeletts vermittelten Effekt von TGF- β 2 als ausschlaggebenden Faktor für die TGF- β -vermittelten Konzentrationsschwankungen der beiden Proteine unwahrscheinlich.

Die konfokalmikroskopischen Bilder zu diesem Experiment ließen erneut die stark zunehmende Menge an F-Aktin nach TGF- β -Stimulation in der Kontrolle erkennen, die unter ROCK-Inhibition ausblieb (vgl. Abb. 3.8). Die Gewebemorphologie änderte sich unter Aufhebung der Zellkontraktilität ebenfalls: die beiden mit H-1152 inkubierten Zellkulturen zeigten Retraktionsphänomene. Die Zell-Zell-Bindungen waren bei weitem nicht so dicht wie in der unbehandelt gebliebenen Kontrolle oder bei den TGF- β -stimulierten Zellen. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die IOD-Senkung durch ROCK-Inhibitoren vermutlich auf einer Lockerung des Zytoskeletts durch Auflösung belastungsabhängiger fokaler Adhäsionen beruht und nicht auf der Hemmung von N-Cadherin und β -Catenin.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die TGF- β 2-induzierte β -Catenin-Überexpression nur wenig abhängig ist von der mechanischen Belastung der Zell-Zell-Bindungen.

4.5 ALK-5-Rezeptorabhängigkeit

Zur Untersuchung der Spezifität der Effekte von TGF- β in Trabekelmaschenwerkszellen wurde der einer der Rezeptor mit SB431542 blockiert. SB431542 bindet selektiv an einen TGF- β -Rezeptor I (ALK-5) und macht dessen Aktivierung durch TGF- β unmöglich^[122]. Direkt und ausschließlich über den TGF- β -Rezeptor II induzierte Signalkaskaden wären jedoch weiterhin auslösbar.

Erwartungsgemäß konnte SB431542 die Phosphorylierung von Smad2/3 konzentrationsabhängig unterdrücken (vgl. Abb. 3.9). Daneben variierten auch die Proteinkonzentrationen von α -SMA, Cadherin und β -Catenin in Relation zur Dosis an ALK-5-Inhibitor. Bei 10 μ M dosiertem SB431542 (einer Konzentration bei der keine Smad2/3-Phosphorylierung mehr nachweisbar war), blieb auch der Anstieg von β -Catenin und Cadherinen unter TGF- β -Stimulation aus (vgl. Abb. 3.9).

Bei niedriger konzentriertem T β R-I-Inhibitor lies sich kein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von Cadherin und β -Catenin und dem Phosphorylierungszustand von Smad2/3 erkennen. Diese Daten sprechen dafür, dass der Smad-Signalweg

nicht grundsätzlich abgestuft reagiert, d.h. es sind bereits sehr geringe Mengen an phosphoryliertem Smad2/3 ausreichend, um einen annähernd maximalen Effekt auf einige Zielproteine auszulösen.

Der Einsatz von SB431542 konnte zeigen, dass der TGF- β -induzierte Anstieg von β -Catenin in humanen Trabekelmaschenwerkszellen grundsätzlich über den TGF- β -Rezeptor vermittelt wird.

4.6 Smad3-Inhibition

Smad2/3 sind Bestandteil des klassischen TGF- β -Pfades und werden direkt durch den aktivierten T β RI-Komplex phosphoryliert^[40,201]. Die meisten transkriptionsmodulierenden Effekte von TGF- β werden über Smad3 vermittelt^[39].

Für die Inhibitionsversuche wurde ein hochselektiver Smad3-Inhibitor verwendet: SiS3 (specific inhibitor of Smad3) blockiert die TGF- β -abhängige Phosphorylierung von Smad3, nicht jedoch diejenige von Smad2. Ebenso bleiben andere TGF- β -induzierte Signalwege (p38, ERK) unbeeinträchtigt^[83].

SiS3 zeigte bei einer Konzentration von 10 μ M eine Einschränkung des TGF- β -induzierten β -Catenin- und Cadherin-Anstieges. Bei niedrigeren Inhibitorkonzentrationen ließ sich kaum ein Effekt auf die TGF- β -abhängigen Expressionsschwankungen der beiden Proteine feststellen (vgl. Abb. 3.11 und Abb. 3.12).

Die zellulären p-AKT-Spiegel zeigten eine Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors im Sinne einer negativen Korrelation: der p-AKT-Spiegel in den unstimulierten Kontrollen sank mit steigender SiS3-Konzentration (vgl. Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Dennoch blieb AKT durch TGF- β aktivierbar.

Ein Zusammenhang zwischen AKT-Phosphorylierung und TGF- β -Rezeptoraktivierung ist in der Literatur beschrieben^[6]. In Fibroblasten-Kulturen konnte gezeigt werden, dass Smad2/3 und PI3K/AKT unabhängig voneinander durch den TGF- β -Rezeptor aktiviert werden^[191]. Weiterhin ist bekannt, dass AKT die Phosphorylierung von Smad3 durch den T β R-Komplex inhibieren kann^[201]. Umgekehrt ist auch ein hemmender Einfluss von Smad auf AKT beschrieben^[123]. Für eine Erhöhung der p-AKT-Spiegel durch aktiviertes Smad3, wie in HTM beobachtet, finden sich in der Literatur bisher jedoch keine Hinweise.

Unter der Voraussetzung, dass der Si3-Inhibitor Smad3 spezifisch inhibiert ohne die AKT-Phosphorylierung zu beeinflussen, lassen sich die Ergebnisse der Smad-Inhibition in HTM mit der zitierten Literatur nicht schlüssig erklären.

Zusammenfassend zeigte sich, dass auch der Smad-Schenkel der T β R-I-induzierten Signale notwendig ist zur Vermittlung der TGF- β -Effekte auf Cadherine und β -Catenin. Die Smad-Aktivierung geht der AKT-Aktivierung nach TGF- β -Stimulation voraus, wie bereits die zeitliche Abfolge der Phosphorylierung nahe legt (vgl. Abb. 3.2).

4.7 Inhibition von p38

Es gibt deutliche Hinweise, dass zumindest für einige der TGF- β -Effekte neben dem Smad-Signalweg auch die Informationsweitergabe über p38MAPK bedeutsam ist^[69]. So publizierten Edlund und Mitarbeiter über epitheliale Zellen⁴, dass für Langzeit-TGF- β -Effekte auf das Zytoskelett, wie die Induktion von Stressfasern, sowohl Smads als auch der p38-Signalweg essentiell sind^[42].

Für den Effekt von TGF- β 2 auf HTM hinsichtlich der β -Catenin- und Cadherin-Expression zeigte sich jedoch nur eine begrenzte Bedeutung von p38MAPK (vgl. Abb. 3.13 und 3.14).

Auch die Ergebnisse für α -SMA waren ähnlich: bei 10 μ M Konzentration von SB203580 war der TGF- β 2-induzierte Proteinanstieg etwas eingeschränkt, während die TGF- β -freie Kontrolle mit Inhibitor keine erkennbaren Unterschiede zu der vollständig unbehandelten Kontrolle aufwies.

Die bisher diskutierten Versuchsergebnisse scheinen einer relevanten Beteiligung von p38MAP-Kinasen an den untersuchten TGF- β -induzierten Proteinexpressionsänderungen in HTM zu widersprechen. Der eingesetzten Inhibitors interagiert aufgrund struktureller Besonderheiten nur mit der ATP-Bindungstasche der p38-Subtypen p38 α und p38 β ^[47]. p38 γ und p38 δ hingegen bleiben durch SB203580 in ihrer Funktionsfähigkeit unbeeinflusst. Denkbar wäre, dass der TGF- β 2-Effekt auf HTM über die beiden letztgenannten p38-Subtypen vermittelt wird und daher durch Blockade von p38 α und p38 β nicht unterdrückt werden kann. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen wäre der Einsatz eines Blockers aller p38-Subtypen wie BIRB0796 überlegenswert^[99].

⁴PC-3U;S menschliche Prostatakarzinomzellen

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Daten den Schluss zu, dass die beiden häufigen Subtypen p38 α und p38 β keine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der TGF- β -abhängigen Expressionszunahme von β -Catenin und Cadherinen spielen.

4.8 AKT-Inhibitor

AKT, auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet, ist eine ubiquitär exprimierte Serin-/Threoninkinase, die in insgesamt drei Subtypen (AKT1-3) vorkommt. Das Enzym nimmt zahlreiche Aufgaben in der Zelle wahr, unter anderem ist es bei der Regulation von Zellwachstum, -proliferation und -überleben involviert und spielt eine wichtige Rolle in der Feineinstellung des zellulären Glukosemetabolismus^[56]. AKT ist als Signalprotein des PI3K-Pfades bekannt^[57]. PI3K hat eine wichtige Bedeutung u.a. in Zellmigration, Zytoskelettorganisation und Metabolismus^[95,108] (vgl. Abb. 4.2).

Eines der Substrate der Proteinkinase ist GSK3 β , welches durch AKT an einem Serinrest des N-terminalen Endes (Ser 9) *phosphoryliert* und damit *inaktiviert* wird^[31,55].

Die GSK3 β -Inaktivierung hat einen verminderten Abbau von β -Catenin zur Folge, da β -Catenin durch einen Komplex aus GSK3 β (in seiner unphosphorylierten Form), Axin, Ck1 und APC phosphoryliert und damit für die Ubiquitinylierung und den proteasomalen Abbau vorbereitet wird^[21,55,86] (siehe Abb. 4.1).

Die Inhibition von AKT zog eine stärkere GSK3 β -Aktivität nach sich und führte über eine Zunahme der β -Catenin-Phosphorylierung zu einer Abnahme dieses Proteins (vgl. Abb. 3.15 und 3.16).

Die Phosphorylierung von AKT wurde durch den Inhibitor verhindert^[170]. Daher blieb bereits bei 1 μ M Konzentration des Blockers im Medium die Phosphorylierung von AKT nahezu aus. Entsprechend der verzögerten AKT-Aktivierung nach TGF- β -Stimulation (vgl. Abb. 3.2) wurde auch das Maximum der AKT-Inhibition erst nach einigen Stunden Inkubation erreicht. p-GSK3 β sank erwartungsgemäß im Sinne einer negativen Korrelation mit steigenden Inhibitor dosierungen ab (vgl. Abb. 3.15).

Cadherin und β -Catenin zeigten nach zwölf-stündiger Stimulation in Zellkulturmedium mit einem AKT-Inhibitor-Gehalt von 10 μ M Limitationen der TGF- β -induzierten Proteinmengen zunahme (vgl. auch Abb. 3.16). Bei längerer Inkubation wurde dieser Effekt deutlicher und zeigte sich auch bereits bei geringerer Dosierung des Blockers.

Die TGF- β 2-stimulierte β -Catenin-Zunahme in HTM kann jedoch nicht alleine über den AKT-Signalweg vermittelt werden: Auch bei sehr starker p-GSK3 β -Suppression sank der β -Catenin (und Cadherin)-Spiegel nur in eingeschränktem Maß (vgl. Abb. 3.15).

AKT-Inhibition führte auch zu morphologischen Umstrukturierungen in HTM (siehe Abb. 3.17). Ähnlich wie bei Kontraktionshemmung mit H1152 (Abb. 3.8) führte auch der AKT-Inhibitor zu einer Abnahme der Zell-Zell-Verbindungen. Die Zellen zeigten ein Retraktionsphänomen, wodurch der Zellverband aufgelockert erschien. Unter AKT-Inhibition lagen die Zellen nicht flächig eng aneinander an, sondern hatten nur noch einzelne fokale Verbindungen aufzuweisen.

Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass AKT eine Rolle bei der β -Catenin- und Cadherin-Expression unter TGF- β 2 in HTM spielt. Offensichtlich wird der β -Catenin-Spiegel in diesem Gewebetyp nach TGF- β -Stimulation (auch) auf Proteinebene (nämlich über den GSK3 β -regulierten Abbau) gesteuert. Deutlich wurde auch, dass AKT eine Rolle in der Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsionen einnimmt.

4.9 MEK/ERK

Die extracellular-signal regulated kinase (ERK) ist Bestandteil des Ras/Raf/MEK/ERK Signalweges^[119]. Die Aktivierung von ERK1/2 durch TGF- β über diesen Pfad ist für einige Zelltypen bereits beschrieben^[40,58,75,124,198]. Der Inhibitor U0126 blockiert spezifisch die beiden MEK-Subtypen MEK1/2^[48].

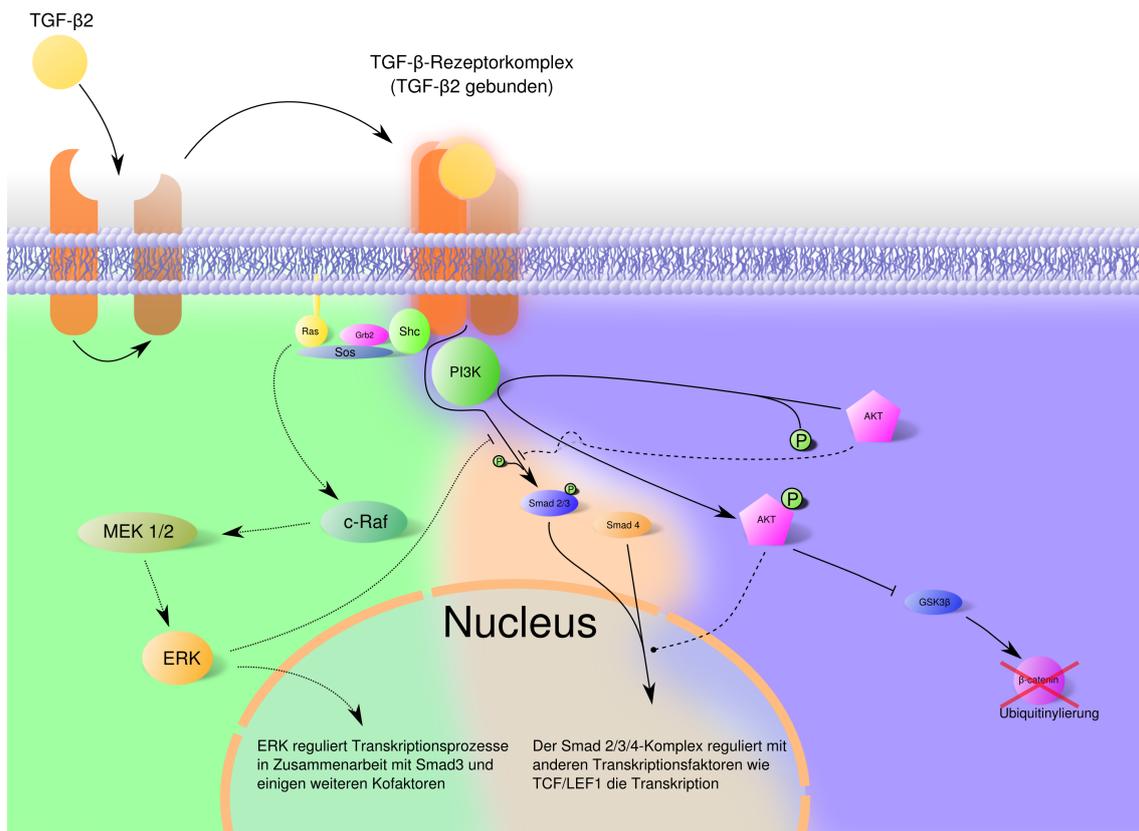


Abbildung 4.2

Vereinfachte Übersicht zu den zentralen in dieser Arbeit diskutierten Signalwegen, die durch TGF- β aktiviert werden können. Klassischer Signalweg: orangefarbener Hintergrund; Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg: grüner Hintergrund; PI3K/AKT-Pfad: blauer Hintergrund.

Die Inhibition der Kinase in HTM hatte nur schwache Auswirkungen auf die TGF- β -abhängige β -Catenin-Expression (vgl. Abb. 3.18). Insbesondere im direkten Vergleich mit der Inhibition von PI3K/AKT und MEK war der Einfluss des ERK1/2-Signalweges auf die TGF- β -induzierte β -Catenin-Expression begrenzt (vgl. Abb. 3.19).

Auffällig ist, dass unter Blockade von MEK1/2 eine streng dosisabhängige Verstärkung des TGF- β -Effektes auf α -SMA erkennbar war (vgl. Abb. 3.18). Auch die Basisexpression von α -SMA ohne TGF- β wurde durch den Inhibitor erhöht. Unter Blockade der Kinaseaktivität von ERK hingegen kam es nicht zu steigenden α -SMA-Spiegeln (vgl. Abb. 3.19). Dagegen zeigte sich eine Zunahme von p-ERK (vgl. Abb. 3.19). Die Dephosphorylierung von p-ERK scheint von seiner Kinaseaktivität abhängig zu sein, so dass es bei Blockade dieser zu einer Anhäufung von p-ERK kommt.

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass p-ERK Funktionen hat, welche unabhän-

gig von seiner Kinaseaktivität sind. Weiterhin scheint die zelluläre α -SMA-Expression von einem Gleichgewicht zwischen p-AKT und p-ERK abzuhängen, wobei hohe p-AKT und niedrige p-ERK-Spiegel ein Maximum der α -SMA-Expression bedeuten (vgl. Abb. 3.15 und Abb. 3.18).

Auch bei diesem Inhibitionsexperiment zeigte sich wieder eine auffällig parallele Beeinflussbarkeit von β -Catenin und Cadherinen, wie sich sich bereits bei der Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges (vgl. Abb. 3.15), von ROCK (vgl. Abb. 3.7) und ALK5 (vgl. Abb. 3.9) gezeigt hatte. Beide Proteine wiesen auch einen vergleichbaren Zeitverlauf der Expressionszunahme nach TGF- β 2-Stimulation (Abb. 3.2) auf. Diese Beobachtungen unterstreichen die Annahme eines funktionellen Zusammenhanges, die auch durch die biochemischen Fraktionierungen erhärtet werden konnte.

4.10 Zusammenfassung

Das Glaukom ist eine mit typischen Gesichtsfeld- und Papillenschäden einhergehende Erkrankung des Auges, die in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Erblindungsursachen zählt. An Glaukom erkrankte Patienten weisen häufig erhöhte Augeninnendruckwerte und gesteigerte TGF- β 2-Spiegel im Kammerwasser auf. Der Augeninnendruck wird im Wesentlichen durch den Abflusswiderstand des Trabekelmaschenwerks verursacht.

Im Rahmen der Ursachenforschung zur Steigerung des IOD beim Glaukom rückte in den vergangenen Jahren zunehmend auch das Zytoskelett von Trabekelmaschenwerkszellen und seine Wechselwirkungen mit der EZM und den Nachbarzellen in den Fokus der Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Wachstumsfaktors TGF- β 2 auf das Zytoskelett von HTM untersucht. Hierbei konnten die bereits bekannten TGF- β -Effekte, nämlich verstärkte Stressfaserbildung und Erhöhung der α -SMA- sowie Aktin-Expression bestätigt werden. Bisher unbekannt war die Zunahme der Expression von N-Cadherin und β -Catenin unter TGF- β , die Veränderungen der Zell-Zell-Adhäsionen nach sich zieht und damit auch Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Trabekelmaschenwerks haben könnte. Die Modifikationen an Zell-Zell-Bindungen und den Proteinen N-Cadherin und β -Catenin waren unabhängig von der Zellkontraktilität.

β -Catenin ist hierbei auch unter TGF- β -Einfluss nur zu einem geringen Anteil im Zellkern lokalisiert. Damit ist es unwahrscheinlich, dass es Aufgaben als Transkriptionsfaktor wahrnimmt. Da vermutlich unter TGF- β -Stimulation sogar eher weniger β -Catenin als Mediator für den Wnt-Signalpfad zur Verfügung steht, könnte ein TGF- β -vermittelter Wnt-Antagonismus eine Rolle in der Entstehung des POWG spielen, da bereits publiziert wurde, dass Wnt-Blockade den IOD erhöht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass an der TGF- β 2-Signalgebung in humanen Trabekelmaschenwerkszellen außer dem klassischen Smad-Weg auch MEK/ERK und PI3K/AKT an der Signalübertragung beteiligt sind. Diese nicht-klassischen TGF- β -Signalpfade zeigten eine Aktivierungskinetik, welche die Beteiligung eines (bisher unbekannt) Mediators annehmen lässt. Hierbei sind die TGF- β -induzierten Änderungen der Zell-Zell-Verbindungen von der Smad- und AKT-Signalgebung abhängig, während die Effekte von TGF- β auf α -SMA über den MEK/ERK-Signalweg vermittelt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einige neu beobachtete TGF- β -Effekte im Trabekelmaschenwerk, von denen insbesondere die Veränderungen des Zellskeletts und der Zell-Zell-Verbindungen sowie die möglicherweise stattfindende Depletion des Wnt-Signalweges Bedeutung für die Entstehung des Offenwinkelglaukoms haben könnten. Die durch TGF- β -induzierten Signalkaskaden könnten dabei einen Angriffspunkt für neu zu entwickelnde Therapieprinzipien darstellen. Diese sind besonders interessant, da TGF- β am Immunprivileg des Auges beteiligt ist und als Neovaskularisationsinhibitor fungiert^[73]. Die primär naheliegenden direkte Inhibition des TGF- β oder TGF- β -Rezeptors in therapeutischer Absicht würde daher unter Umständen zu ausgeprägten unerwünschten Wirkungen führen. Die nähere Identifikation von therapeutisch hemmbaren Signalkaskaden, die mit den beobachteten Veränderungen im Zusammenhang stehen erscheint daher lohnenswert.

5 Anhang

5.1 Verwendete Abkürzungen

Tabelle 5.1

Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ALK-5	activin receptor-like kinase 5
ALT	Argonlasertrabekuloplastie
APC	Adenomatous Polyposis coli-Protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
AV	Atrioventrikular
BMP	bone morphogenetic proteine
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIGTS	Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelio-mesenchymale Transformation
engl.	englisch
Erk	Extracellular-signal Regulated Kinase
et al.	et alii
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	focal adhesion kinase
FCS	Fetal Calf Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Abkürzung	Bedeutung
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	horseradish peroxidase
HRT	Heidelberger Retina Tomographie
HTM	humane Trabekelmaschenwerkzellen
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (revision 10)
IOD	Intraokulardruck
Jnk	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LAP	TGF- β latency associated proteine
lat.	lateinisch
LEF	Lymphoid enhancer binding factor
LTBP	latent TGF- β binding protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
max.	maximal
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase (sic!)
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
Nd:YAG-Laser	Neodym dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NGS	normal goat serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OCT	Optische Kohärenztomografie
OHT	Okuläre Hypertension
PBS	phosphate buffered saline
PDB	Protein Data Bank
PFA	Paraformaldehyd
Pi3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
RTA	Retinal Thickness Analyzer
s.u.	siehe unten

Abkürzung	Bedeutung
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SiS3	specific inhibitor of Smad3
SMA	smooth muscle actin
T β R	TGF- β Rezeptor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS mit Tween 20
TCF	T-cell factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TM	Trabekelmaschenwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U / min.	Umdrehungen pro Minute
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WTM	Würzburger humane Trabekelmaschenwerkzellen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

5.2 Verwendete Antikörper

Tabelle 5.2

Verwendete Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
p-Akt (Ser 473)	#9271	Cell Signaling Technology™(Frankfurt/Main)
β -Catenin	#9562	Cell Signaling Technology™(Frankfurt/Main)
α -B-Crystallin	#SPA-223	Stressgen Bioreagents (Ann Arbor, USA)
Anti-ACTIVE®MAPK Rabbit (pTEpY)	pAb, #V803A	Promega (Madison, USA)

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Anti-phospho-Smad2 (Ser 465/Ser 467)	#40-0800	Zymed Laboratories Inc. (South San Francisco, USA)
Anti-Smad2/3	#07-408	upstate cell signaling solutions (Lake Placid, USA)
Axin-2 (76G6)	#2151	Cell Signaling Technology™(Frankfurt/Main)
ECL Anti-mouse IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep)	#NA931	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
ECL Anti-rabbit IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody (from donkey)	#NA934	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
Erk1 (K-23)	sc-94	Santa Cruz Biotechnology Inc.
FITC-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG	#705-095-147	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
FITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	#115-095-062	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
FITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	#115-095-144	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
GSK3β (27C10)	#9315	Cell Signaling Technology™(Frankfurt/Main)
Monoclonal Anti-α-Smooth Muscle Actin clone 114	#A2547	Sigma
Mouse Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Monoclonal Antibody (GAPDH)	#MAB374	Millipore
p-β-Catenin (Ser 33/37/Thr 41)	#9561	Cell Signaling Technology™(Frankfurt/Main)
pan-Akt (C67E7)	#4691	Cell Signaling Technology™(Frankfurt/Main)
pan-Cadherin clone CH-19	#C1821	Sigma
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG	#111-035-147	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Peroxidase-conjugated Affini- Pure Goat Anti-Mouse IgG	#115-035-166	Jackson ImmunoResearch La- boratories Inc.
Phalloidin-TRITC	#P1951	Sigma
Phospho-GSK3 β (Ser9)	#9336	Cell Signaling Technolo- gy™(Frankfurt/Main)
Rabbit (polyclonal) Anti-FAK (pY397)	#44-624G	Biosource (Nivelles, Belgien)

5.3 Verwendete Inhibitoren, Wachstumsfaktoren und Zellkulturmedien

Tabelle 5.3

Verwendete Inhibitoren, Wachstumsfaktoren und Zellkulturmedien

Bezeichnung	Bezeichnung des Her- stellers	Hersteller
TGF- β 2	Recombinant human TGF- β 2 #100-35	PeptoTech GmbH Ham- burg
TGF- β 2-Inhibitor	SB 431542 hydrate #S4317	Sigma München
Akt-Inhibitor	InSolution™ Akt Inhibi- tor VIII, Isozyme Selecti- ve, Akti-1/2 #124017	Calbiochem Darmstadt
BSA	Albumin bovine serum #A8806	Sigma München
DMEM	DMEM High Glu- cose (4,5 g/l) with L-Glutamine #E15-810	PAA Paching (Österreich)
ECL-Reagenzien	Western blotting detecti- on reagents 1 & 2	GE Healthcare Wien (Ös- terreich)
Einbett-Medium	Vectashield® Hard Set™ Mounting Medium with DAPI #H-1500	Vector Laboratories Burlingame, California (USA)
ERK Inhibitor	ERK Inhibitor II #328007	Calbiochem Darmstadt
FCS	Fetal bovine serum #S0115	Biochrom AG Berlin

Bezeichnung	Bezeichnung des Herstellers	Hersteller
Glutardialdehyd	Glutardialdehyd #4157	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe
Hank's BSS	Hank's BSS (1x) without Ca & Mg without Phenol Red #H15-009	PAA Paching (Österreich)
Jnk Inhibitor	Jnk Inhibitor II #420119	Calbiochem Darmstadt
MEK-Inhibitor	U0126 #662005	Calbiochem Darmstadt
PBS	Dulbecco's PBS (1x) with Ca & Mg #H15-001	PAA Paching (Österreich)
Penicillin & Streptomycin	Penicillin & Streptomycin complete Mini, EDTA-free Proteasen-Inhibitor-Cocktail #1836170	PAA Paching (Österreich) Roche Diagnostics GmbH Penzberg
PVDF-Membranen	Amersham Hybond™-P	GE Healthcare Wien (Österreich)
Rho-Kinase Inhibitor	Rho-Kinase Inhibitor #555550	Calbiochem Darmstadt
Röntgenfilme	Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Wien (Österreich)
WB-Detektion	Western blotting detection reagents 1 & 2 #1059243 (1) & 1059250 (2)	GE Healthcare Wien (Österreich)
WB-Gele	Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1) #T802.1	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe
Western Blot Marker	BechMark™ Prestained Protein Ladder 10748-010	Invitrogen
Wnt-1	Recombinant Human Wnt-1 #120-17	PepröTech GmbH Hamburg

5.4 Verwendete Pufferlösungen

Transferpuffer

200 ml 10x Transferpuffer
1400 ml Aqua dest.
400 ml Methanol

Transferpuffer (10x)

30,3 g Tris
144,0 g Glycin

ad 1000 ml Aqua dest.

Lower Tris (4x)

36,34 g Tris
0,8 g Natriumdodecylsulfat

ad 200 ml Aqua dest.; pH-Einstellung auf pH 8,8

Upper Tris (4x)

12,11 g Tris
0,8 g Natriumdodecylsulfat

ad 200 ml Aqua dest.; pH-Einstellung auf pH 6,8

TBS (10x)

12,11 g Tris
87,66 g Natriumchlorid

ad 1000 ml Aqua dest.; pH-Einstellung auf pH 7,4
für TBST: 100 ml TBS (10x) und
1 ml Tween ad 1000 ml Aqua dest.

PBS (10x)

7,3 g Na_2HPO_4
2,3 g NaH_2PO_4
90,0 g Natriumchlorid

ad 1000 ml Aqua dest.; pH-Einstellung auf pH 6,8

TAE (10x)

242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8

ad 1000 ml Aqua dest.

Laufpuffer (10x)

30,3 g Tris
144 g Glycin
10 g Natriumdodecylsulfat

ad 1000 ml Aqua dest.

5.5 Pufferlösungen für die Zellfraktionierung

Modifiziert nach Danilkovitch et al.^[32].

RIPA

Tris pH7.4	310 mM
EGTA	0,1 mM
Triton X-100	1%
Natriumdeoxycholat	1%
SDS	0,1%
Natriumfluorid	10 mM

Puffer A

HEPES (pH 8,0) 10 mM

KCl 10 mM

EDTA 0,1 mM

EGTA 0,1 mM

kurz vor Verwendung Zugabe von Proteaseinhibitoren

6 Literaturverzeichnis

- [1] T. S. Acott und M. J. Kelley (2008). Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res*, 86 (4): 543–561.
- [2] J. P. Alexander, J. R. Samples und T. S. Acott (1998). Growth factor and cytokine modulation of trabecular meshwork matrix metalloproteinase and TIMP expression. *Curr Eye Res*, 17 (3): 276–285.
- [3] J. P. Alexander, J. R. Samples, E. M. V. Buskirk und T. S. Acott (1991). Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32 (1): 172–180.
- [4] D. O. G. e. Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. (2006). Detektion des primären Offenwinkelglaukoms (POWG): Glaukom-Screening von Risikogruppen, Glaukomverdacht, Glaukomdiagnose. *Leitlinie Nr. 15 c*, -: –.
- [5] A. V. Bakin, C. Rinehart, A. K. Tomlinson und C. L. Arteaga (2002). p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci*, 115 (Pt 15): 3193–3206.
- [6] A. V. Bakin, A. K. Tomlinson, N. A. Bhowmick, H. L. Moses und C. L. Arteaga (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, 275 (47): 36.803–36.810.
- [7] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Rivelino, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Saffran, A. Bershadsky, L. Addadi und B. Geiger (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3 (5): 466–472.
- [8] E. H. Barany (1962). The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate (*Cercopithecus ethiops*). *Invest Ophthalmol*, 1: 712–727.
- [9] R. Bathija, N. Gupta, L. Zangwill und R. N. Weinreb (1998). Changing definition of glaucoma. *J Glaucoma*, 7 (3): 165–169.
- [10] B. Becker, A. E. Kolker und F. D. Roth (1960). Glaucoma family study. *Am J Ophthalmol*, 50: 557–567.
- [11] J. Behrens, J. P. von Kries, M. Kühl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl und W. Birchmeier (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382 (6592): 638–642.

- [12] N. A. Bhowmick, M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga und H. L. Moses (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, 12 (1): 27–36.
- [13] A. Bill (1993). Some aspects of aqueous humour drainage. *Eye*, 7 (Pt 1): 14–19.
- [14] L. Bonomi, G. Marchini, M. Marraffa, P. Bernardi, I. D. Franco, S. Perfetti, A. Varotto und V. Tenna (1998). Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology*, 105 (2): 209–215.
- [15] J. M. Bradley, M. J. Kelley, X. Zhu, A. M. Anderssohn, J. P. Alexander und T. S. Acott (2001). Effects of mechanical stretching on trabecular matrix metalloproteinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 (7): 1505–1513.
- [16] J. M. Bradley, J. Vranka, C. M. Colvis, D. M. Conger, J. P. Alexander, A. S. Fisk, J. R. Samples und T. S. Acott (1998). Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39 (13): 2649–2658.
- [17] F. H. Brembeck, M. Rosário und W. Birchmeier (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, 16 (1): 51–59.
- [18] J. D. Brown und R. F. Brubaker (1989). A study of the relation between intraocular pressure and aqueous humor flow in the pigment dispersion syndrome. *Ophthalmology*, 96 (10): 1468–1470.
- [19] R. F. Brubaker (1991). Flow of aqueous humor in humans [The Friedenwald Lecture]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32 (13): 3145–3166.
- [20] W. M. Budde und J. B. Jonas (1999). Family history of glaucoma in the primary and secondary open-angle glaucomas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237 (7): 554–557.
- [21] K. M. Cadigan und Y. I. Liu (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*, 119 (Pt 3): 395–402.
- [22] S. Cheifetz, J. A. Weatherbee, M. L. Tsang, J. K. Anderson, J. E. Mole, R. Lucas und J. Massagué (1987). The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*, 48 (3): 409–415. Erstbeschreibung TGF beta 2.
- [23] S. S. Cheon, Q. Wei, A. Gurung, A. Youn, T. Bright, R. Poon, H. Whetstone, A. Guha und B. A. Alman (2006). Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *FASEB J*, 20 (6): 692–701.
- [24] M. Chrzanowska-Wodnicka und K. Burridge (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, 133 (6): 1403–1415.
- [25] S. Citi, T. Volberg, A. D. Bershadsky, N. Denisenko und B. Geiger (1994). Cytoskeletal involvement in the modulation of cell-cell junctions by the protein kinase inhibitor H-7. *J Cell Sci*, 107 (Pt 3): 683–692.

- [26] A. F. Clark, H. T. Steely, J. E. Dickerson, S. English-Wright, K. Stropki, M. D. McCartney, N. Jacobson, A. R. Shepard, J. I. Clark, H. Matsushima, E. R. Peskind, J. B. Leverenz, C. W. Wilkinson, R. E. Swiderski, J. H. Fingert, V. C. Sheffield und E. M. Stone (2001). Glucocorticoid induction of the glaucoma gene MYOC in human and monkey trabecular meshwork cells and tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 (8): 1769–1780.
- [27] D. A. Clark und R. Coker (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*, 30 (3): 293–298.
- [28] R. Coakes (1992). Laser trabeculoplasty. *Br J Ophthalmol*, 76 (10): 624–626.
- [29] U. Consortium (2008). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, 36 (Database issue): D190–D195.
- [30] M. T. Coroneo, C. Korbmacher, C. Flügel, B. Stiemer, E. Lütjen-Drecoll und M. Wiederholt (1991). Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*, 52 (4): 375–388.
- [31] D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich und B. A. Hemmings (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378 (6559): 785–789.
- [32] A. Danilkovitch, S. Donley, A. Skeel und E. J. Leonard (2000). Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells. *Mol Cell Biol*, 20 (6): 2218–2227.
- [33] J. G. Daubs und R. P. Crick (1981). Effect of refractive error on the risk of ocular hypertension and open angle glaucoma. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 101 (1): 121–126.
- [34] W. L. DeLano (2008). The PyMOL Molecular Graphics System. Technischer Bericht, DeLano Scientific, Palo Alto, California, USA. <http://www.pymol.org>.
- [35] P. Denis, J. P. Nordmann, P. P. Elena, H. Saraux und P. Lapalus (1994). Central nervous system control of intraocular pressure. *Fundam Clin Pharmacol*, 8 (3): 230–237.
- [36] S. Deokule und R. N. Weinreb (2008). Relationships among systemic blood pressure, intraocular pressure, and open-angle glaucoma. *Can J Ophthalmol*, 43 (3): 302–307.
- [37] L. D. M. Derycke und M. E. Bracke (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*, 48 (5-6): 463–476.
- [38] R. Derynck und X. H. Feng (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1333 (2): F105–F150.
- [39] R. Derynck, Y. Zhang und X. H. Feng (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, 95 (6): 737–740.
- [40] R. Derynck und Y. E. Zhang (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425 (6958): 577–584.

- [41] D. E. Discher, P. Janmey und Y.-L. Wang (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310 (5751): 1139–1143.
- [42] S. Edlund, M. Landström, C.-H. Heldin und P. Aspenström (2002). Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell*, 13 (3): 902–914.
- [43] M. E. Engel, M. A. McDonnell, B. K. Law und H. L. Moses (1999). Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem*, 274 (52): 37.413–37.420.
- [44] D. L. Epstein, L. L. Rowlette und B. C. Roberts (1999). Acto-myosin drug effects and aqueous outflow function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (1): 74–81.
- [45] C. R. Ethier (2002). The inner wall of Schlemm's canal. *Exp Eye Res*, 74 (2): 161–172.
- [46] C. R. Ethier, M. Johnson und J. Ruberti (2004). Ocular biomechanics and biotransport. *Annu Rev Biomed Eng*, 6: 249–273.
- [47] P. A. Eyers, M. Craxton, N. Morrice, P. Cohen und M. Goedert (1998). Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol*, 5 (6): 321–328.
- [48] M. F. Favata, K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. V. Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle und J. M. Trzaskos (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 273 (29): 18.623–18.632.
- [49] E. Ferrer (2006). Trabecular meshwork as a new target for the treatment of glaucoma. *Drug News Perspect*, 19 (3): 151–158.
- [50] J. Flammer und S. Orgül (1998). Optic nerve blood-flow abnormalities in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 17 (2): 267–289.
- [51] D. L. Fleenor, A. R. Shepard, P. E. Hellberg, N. Jacobson, I.-H. Pang und A. F. Clark (2006). TGFbeta2-induced changes in human trabecular meshwork: implications for intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47 (1): 226–234.
- [52] C. Flügel, E. Tamm und E. Lütjen-Drecoll (1991). Different cell populations in bovine trabecular meshwork: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Exp Eye Res*, 52 (6): 681–690.
- [53] C. Flügel, E. Tamm, E. Lütjen-Drecoll und F. H. Stefani (1992). Age-Related Loss of [alpha]-Smooth Muscle Actin in Normal and Glaucomatous Human Trabecular Mesh work of Different Age Groups. *Journal of Glaucoma*, 1 (3): 165–173.
- [54] P. J. Foster, R. Buhrmann, H. A. Quigley und G. J. Johnson (2002). The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br J Ophthalmol*, 86 (2): 238–242.

- [55] S. Frame und P. Cohen (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*, 359 (Pt 1): 1–16.
- [56] T. F. Franke (2008). Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Sci Signal*, 1 (24): pe29.
- [57] T. F. Franke (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*, 27 (50): 6473–6488.
- [58] R. S. Frey und K. M. Mulder (1997). Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res*, 57 (4): 628–633.
- [59] R. Fuchshofer, U. Welge-Lussen und E. Lütjen-Drecoll (2003). The effect of TGF-beta2 on human trabecular meshwork extracellular proteolytic system. *Exp Eye Res*, 77 (6): 757–765.
- [60] M. Funaba, C. M. Zimmerman und L. S. Mathews (2002). Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*, 277 (44): 41.361–41.368.
- [61] B. T. Gabelt und P. L. Kaufman (2005). Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 24 (5): 612–637.
- [62] J. Z. Gasiorowski und P. Russell (2009). Biological properties of trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*, 88 (4): 671–675.
- [63] J. Gottanka, D. Chan, M. Eichhorn, E. Lütjen-Drecoll und C. R. Ethier (2004). Effects of TGF-beta2 in perfused human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (1): 153–158.
- [64] D. B. Gould, R. S. Smith und S. W. M. John (2004). Anterior segment development relevant to glaucoma. *Int J Dev Biol*, 48 (8-9): 1015–1029.
- [65] W. Grant (1963). Experimental aqueous perfusion in enucleated human eyes. *Arch Ophthalmol*, 69: 783–801.
- [66] G. B. Grunwald, R. S. Pratt und J. Lilien (1982). Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms. III. Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells. *J Cell Sci*, 55: 69–83.
- [67] M. Grüb und J. Mielke (2004). [Aqueous humor dynamics]. *Ophthalmologe*, 101 (4): 357–365.
- [68] M. Grüb und J. M. Rohrbach (2006). [On the socio-economic relevance of glaucoma]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 223 (10): 793–795.
- [69] H. Hanafusa, J. Ninomiya-Tsuji, N. Masuyama, M. Nishita, J. Fujisawa, H. Shibuya, K. Matsumoto und E. Nishida (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, 274 (38): 27.161–27.167.
- [70] W. Hart und F. Adler (Herausgeber) (1992). Adler's physiology of the eye. Mosby, St. Louis (MO).
- [71] K. Hatta und M. Takeichi (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature*, 320 (6061): 447–449.

- [72] M. Hatzfeld (1999). The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol*, 186: 179–224.
- [73] K. Hayasaka, S. Oikawa, E. Hashizume, H. Kotake, H. Midorikawa, A. Sekikawa, K. Hoshi, S. Hara, Y. Ishigaki und T. Toyota (1998). Anti-angiogenic effect of TGFbeta in aqueous humor. *Life Sci*, 63 (13): 1089–1096.
- [74] H. Helbig, K. L. Kittredge, M. Coca-Prados, J. Davis, A. G. Palestine und R. B. Nussenblatt (1991). Mammalian ciliary-body epithelial cells in culture produce transforming growth factor-beta. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 229 (1): 84–87.
- [75] C. H. Heldin, K. Miyazono und P. ten Dijke (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390 (6659): 465–471.
- [76] B. Hinz, P. Pittet, J. Smith-Clerc, C. Chaponnier und J.-J. Meister (2004). Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell*, 15 (9): 4310–4320.
- [77] M.-J. Hoare, I. Grierson, D. Brotchie, N. Pollock, K. Cracknell und A. F. Clark (2009). Cross-linked actin networks (CLANs) in the trabecular meshwork of the normal and glaucomatous human eye in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50 (3): 1255–1263.
- [78] O. Huber, R. Korn, J. McLaughlin, M. Ohsugi, B. G. Herrmann und R. Kemler (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*, 59 (1): 3–10.
- [79] M. Inatani, H. Tanihara, H. Katsuta, M. Honjo, N. Kido und Y. Honda (2001). Transforming growth factor-beta 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 239 (2): 109–113.
- [80] A. G. I. S. Investigators (2000). The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol*, 130 (4): 429–440.
- [81] A. G. I. S. Investigators (2002). The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 12. Baseline risk factors for sustained loss of visual field and visual acuity in patients with advanced glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 134 (4): 499–512.
- [82] Y. Iwamoto und M. Tamura (1988). Immunocytochemical study of intermediate filaments in cultured human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29 (2): 244–250.
- [83] M. Jinnin, H. Ihn und K. Tamaki (2006). Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol*, 69 (2): 597–607.
- [84] M. Johnson (2006). 'What controls aqueous humour outflow resistance?'. *Exp Eye Res*, 82 (4): 545–557.
- [85] A. Karali, P. Russell, F. H. Stefani und E. R. Tamm (2000). Localization of myocilin/trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (3): 729–740.

- [86] R. Karim, G. Tse, T. Putti, R. Scolyer und S. Lee (2004). The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology*, 36 (2): 120–128.
- [87] P. L. Kaufman (1992). Pharmacologic trabeculocanalotomy. Facilitating aqueous outflow by assaulting the meshwork cytoskeleton, junctional complexes, and extracellular matrix. *Arch Ophthalmol*, 110 (1): 34–36.
- [88] R. Kemler (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet*, 9 (9): 317–321.
- [89] Y. Kimura, H. Matsunami, T. Inoue, K. Shimamura, N. Uchida, T. Ueno, T. Miyazaki und M. Takeichi (1995). Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev Biol*, 169 (1): 347–358.
- [90] C. Knauer und N. Pfeiffer (2006). [Blindness in Germany–today and in 2030]. *Ophthalmologe*, 103 (9): 735–741.
- [91] P. A. Knepper, W. Goossens, M. Hvizd und P. F. Palmberg (1996). Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37 (7): 1360–1367.
- [92] T. L. Knisely, P. A. Bleicher, C. A. Vibbard und R. D. Granstein (1991). Production of latent transforming growth factor-beta and other inhibitory factors by cultured murine iris and ciliary body cells. *Curr Eye Res*, 10 (8): 761–771.
- [93] K. Koli, J. Saharinen, M. Hyytiäinen, C. Penttinen und J. Keski-Oja (2001). Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech*, 52 (4): 354–362.
- [94] T. Koskela und R. F. Brubaker (1991). The nocturnal suppression of aqueous humor flow in humans is not blocked by bright light. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32 (9): 2504–2506.
- [95] M. A. Krasilnikov (2000). Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)*, 65 (1): 59–67.
- [96] M. Kretzschmar und J. Massagué (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8 (1): 103–111.
- [97] M. Kroese und H. Burton (2003). Primary open angle glaucoma. The need for a consensus case definition. *J Epidemiol Community Health*, 57 (9): 752–754.
- [98] H. G. Krumpaszky und V. Klauss (1992). [Cause of blindness in Bavaria. Evaluation of a representative sample from blindness compensation records of Upper Bavaria]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 200 (2): 142–146.
- [99] Y. Kuma, G. Sabio, J. Bain, N. Shpiro, R. Márquez und A. Cuenda (2005). BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 280 (20): 19.472–19.479.
- [100] B. Ladoux, E. Anon, M. Lambert, A. Rabodzey, P. Hersen, A. Buguin, P. Silberzan und R.-M. Mège (2010). Strength dependence of cadherin-mediated adhesions. *Biophys J*, 98 (4): 534–542.

- [101] U. K. Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680–685.
- [102] J. E. de Larco und G. J. Todaro (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 (8): 4001–4005.
- [103] L. I. Larsson, E. S. Rettig und R. F. Brubaker (1995). Aqueous flow in open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 113 (3): 283–286.
- [104] T. C. G. von Leber (1873). Studien über den Flüssigkeitswechsel im Auge. *Albrecht Graefes Archiv der Ophthalmologie*, 19: 87–185.
- [105] A. Lepple-Wienhues, F. Stahl und M. Wiederholt (1991). Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res*, 53 (1): 33–38.
- [106] M. C. Leske, A. Heijl, M. Hussein, B. Bengtsson, L. Hyman, E. Komaroff und E. M. G. T. Group (2003). Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol*, 121 (1): 48–56.
- [107] W. Leydhecker, K. Akiyama und H. G. Neumann (1958). [Intraocular pressure in normal human eyes.]. *Klin Monatsblätter Augenheilkd Augenarztl Fortbild*, 133 (5): 662–670.
- [108] J. Liang und J. M. Slingerland (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2 (4): 339–345.
- [109] E. Lütjen-Drecoll (1999). Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog Retin Eye Res*, 18 (1): 91–119.
- [110] E. Lütjen-Drecoll (2005). Morphological changes in glaucomatous eyes and the role of TGFbeta2 for the pathogenesis of the disease. *Exp Eye Res*, 81 (1): 1–4.
- [111] M. Mafwiri, R. J. C. Bowman, M. Wood und J. Kabiru (2005). Primary open-angle glaucoma presentation at a tertiary unit in Africa: intraocular pressure levels and visual status. *Ophthalmic Epidemiol*, 12 (5): 299–302.
- [112] P. C. Maier, J. Funk, G. Schwarzer, G. Antes und Y. T. Falck-Ytter (2005). Treatment of ocular hypertension and open angle glaucoma: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, 331 (7509): 134.
- [113] C. Martínez-Belló, B. C. Chauhan, M. T. Nicolela, T. A. McCormick und R. P. LeBlanc (2000). Intraocular pressure and progression of glaucomatous visual field loss. *Am J Ophthalmol*, 129 (3): 302–308.
- [114] R. P. Mason, O. Kosoko, M. R. Wilson, J. F. Martone, C. L. Cowan, J. C. Gear und D. Ross-Degnan (1989). National survey of the prevalence and risk factors of glaucoma in St. Lucia, West Indies. Part I. Prevalence findings. *Ophthalmology*, 96 (9): 1363–1368.
- [115] J. Massagué (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67: 753–791.

- [116] J. Massagué und Y. G. Chen (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*, 14 (6): 627–644.
- [117] S. K. Masur, R. J. Conors, J. K. Cheung und S. Antohi (1999). Matrix adhesion characteristics of corneal myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (5): 904–910.
- [118] J. L. Mazzola und M. A. Sirover (2003). Subcellular localization of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is independent of its glycolytic function. *Biochim Biophys Acta*, 1622 (1): 50–56.
- [119] J. A. McCubrey, L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. T. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli und R. A. Franklin (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773 (8): 1263–1284.
- [120] W. McEwen (1958). Application of Poiseuille's law to aqueous outflow. *AMA Arch Ophthalmol*, 60 (2): 290–294.
- [121] S. K. Mitra, D. A. Hanson und D. D. Schlaepfer (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (1): 56–68.
- [122] Y. Mori, W. Ishida, S. Bhattacharyya, Y. Li, L. C. Platanius und J. Varga (2004). Selective inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling blocks profibrotic transforming growth factor beta responses in skin fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 50 (12): 4008–4021.
- [123] A. Moustakas und C.-H. Heldin (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*, 118 (Pt 16): 3573–3584.
- [124] K. M. Mulder und S. L. Morris (1992). Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem*, 267 (8): 5029–5031.
- [125] C. G. Murphy, M. Johnson und J. A. Alvarado (1992). Juxtacanalicular tissue in pigmentary and primary open angle glaucoma. The hydrodynamic role of pigment and other constituents. *Arch Ophthalmol*, 110 (12): 1779–1785.
- [126] Y. Nakamura, S. Hirano, K. Suzuki, K. Seki, T. Sagara und T. Nishida (2002). Signaling mechanism of TGF-beta1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (11): 3465–3472.
- [127] K. Nishida, S. Kinoshita, N. Yokoi, M. Kaneda, K. Hashimoto und S. Yamamoto (1994). Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 latency-associated peptide in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35 (8): 3289–3294.
- [128] K. Ogata, M. Arakawa, T. Kasahara, K. Shioiri-Nakano und K. Hiraoka (1983). Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J Immunol Methods*, 65 (1-2): 75–82.

- [129] M. Okazaki, S. Takeshita, S. Kawai, R. Kikuno, A. Tsujimura, A. Kudo und E. Amann (1994). Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J Biol Chem*, 269 (16): 12.092–12.098.
- [130] S. Orsulic, O. Huber, H. Aberle, S. Arnold und R. Kemler (1999). E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci*, 112 (Pt 8): 1237–1245.
- [131] D. R. Overby, W. D. Stamer und M. Johnson (2009). The changing paradigm of outflow resistance generation: towards synergistic models of the JCT and inner wall endothelium. *Exp Eye Res*, 88 (4): 656–670.
- [132] M. Ozawa, H. Baribault und R. Kemler (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*, 8 (6): 1711–1717.
- [133] M. Pache und J. Funk (2006). [High tech in the diagnosis of glaucoma]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 223 (6): 503–508.
- [134] L. R. Pasquale, M. E. Dorman-Pease, G. A. Luty, H. A. Quigley und H. D. Jampel (1993). Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34 (1): 23–30.
- [135] C. O. Peckar und N. Körber (2008). Canaloplasty for open angle glaucoma: a three years critical evaluation and comparison with viscocanalostomy. *Spektrum der Augenheilkunde*, 22 (4): 240–246.
- [136] T. Peters, A. Sindrilaru, B. Hinz, R. Hinrichs, A. Menke, E. A. D. Al-Azzeh, K. Holzwarth, T. Oreshkova, H. Wang, D. Kess, B. Walzog, S. Sulyok, C. Sunderkötter, W. Friedrich, M. Wlasek, T. Krieg und K. Scharffetter-Kochanek (2005). Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. *EMBO J*, 24 (19): 3400–3410.
- [137] G. Picht, U. Welge-Luessen, F. Grehn und E. Lütjen-Drecoll (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.
- [138] J. R. Polansky, R. N. Weinreb, J. D. Baxter und J. Alvarado (1979). Human trabecular cells. I. Establishment in tissue culture and growth characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 18 (10): 1043–1049.
- [139] H. A. Quigley (1993). Open-angle glaucoma. *N Engl J Med*, 328 (15): 1097–1106.
- [140] H. A. Quigley (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol*, 80 (5): 389–393.
- [141] P. V. Rao, P. Deng, R. Maddala, D. L. Epstein, C.-Y. Li und H. Shimokawa (2005). Expression of dominant negative Rho-binding domain of Rho-kinase in organ cultured human eye anterior segments increases aqueous humor outflow. *Mol Vis*, 11: 288–297.

- [142] P. V. Rao, P. Deng, Y. Sasaki und D. L. Epstein (2005). Regulation of myosin light chain phosphorylation in the trabecular meshwork: role in aqueous humour outflow facility. *Exp Eye Res*, 80 (2): 197–206.
- [143] P. V. Rao, P. F. Deng, J. Kumar und D. L. Epstein (2001). Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 (5): 1029–1037.
- [144] A. T. Read, D. W.-H. Chan und C. R. Ethier (2007). Actin structure in the outflow tract of normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res*, 84 (1): 214–226.
- [145] E. Resnik (1997). beta-Catenin—one player, two games. *Nat Genet*, 16 (1): 9–11.
- [146] D. J. Rhee, E. R. Tamm und P. Russell (2003). Donor corneoscleral buttons: a new source of trabecular meshwork for research. *Exp Eye Res*, 77 (6): 749–756.
- [147] A. J. Ridley und A. Hall (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70 (3): 389–399.
- [148] J. V. Robertson, E. Goleisic, J. Gaultie und J. A. West-Mays (2010). Ocular gene transfer of active TGF-beta induces changes in anterior segment morphology and elevated IOP in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51 (1): 308–318.
- [149] J. W. Rohen (1983). Why is intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma? Anatomical considerations. *Ophthalmology*, 90 (7): 758–765.
- [150] J. W. Rohen, E. Lütjen und E. Bárány (1967). The relation between the ciliary muscle and the trabecular meshwork and its importance for the effect of miotics on aqueous outflow resistance. A study in two contrasting monkey species, *Macaca irus* and *Cercopithecus aethiops*. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 172 (1): 23–47.
- [151] J. W. Rohen und R. Witmer (1972). Electron microscopic studies on the trabecular meshwork in glaucoma simplex. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 183 (4): 251–266.
- [152] K. Rohrschneider und S. Greim (2004). [Epidemiology of blindness in Baden, Germany]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 221 (2): 116–121.
- [153] J. R. Samples, J. P. Alexander und T. S. Acott (1993). Regulation of the levels of human trabecular matrix metalloproteinases and inhibitor by interleukin-1 and dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34 (12): 3386–3395.
- [154] G. Schlunck, H. Han, T. Wecker, D. Kampik, T. Meyer-Ter-Vehn und F. Grehn (2008). Substrate rigidity modulates cell matrix interactions and protein expression in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (1): 262–269.
- [155] J. M. Selbach, J. Gottanka, M. Wittmann und E. Lütjen-Drecoll (2000). Efferent and afferent innervation of primate trabecular meshwork and scleral spur. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (8): 2184–2191.

- [156] A. R. Shepard, J. C. Millar, I.-H. Pang, N. Jacobson, W.-H. Wang und A. F. Clark (2010). Adenoviral gene transfer of active human transforming growth factor-beta2 elevates intraocular pressure and reduces outflow facility in rodent eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51 (4): 2067–2076.
- [157] R. Sihota, R. Saxena, M. Gogoi, A. Sood, V. Gulati und R. M. Pandey (2005). A comparison of the circadian rhythm of intraocular pressure in primary phronic angle closure glaucoma, primary open angle glaucoma and normal eyes. *Indian J Ophthalmol*, 53 (4): 243–247.
- [158] A. Sommer, J. M. Tielsch, J. Katz, H. A. Quigley, J. D. Gottsch, J. Javitt und K. Singh (1991). Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol*, 109 (8): 1090–1095.
- [159] M. P. Stemmler (2008). Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst*, 4 (8): 835–850.
- [160] Y. Suzuki, S. Shirato, M. Adachi und C. Hamada (1999). Risk factors for the progression of treated primary open-angle glaucoma: a multivariate life-table analysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237 (6): 463–467.
- [161] N. Takahashi, K. Rieneck, P. M. van der Kraan, H. M. van Beuningen, E. L. Vitters, K. Bendtzen und W. B. van den Berg (2005). Elucidation of IL-1/TGF-beta interactions in mouse chondrocyte cell line by genome-wide gene expression. *Osteoarthritis Cartilage*, 13 (5): 426–438.
- [162] E. R. Tamm (2009). The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. *Exp Eye Res*, 88 (4): 648–655.
- [163] E. R. Tamm und R. Fuchshofer (2007). What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Surv Ophthalmol*, 52 Suppl 2: S101–S104.
- [164] E. R. Tamm, A. Siegner, A. Baur und E. Lütjen-Drecoll (1996). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle-actin expression in cultured human and monkey trabecular meshwork. *Exp Eye Res*, 62 (4): 389–397.
- [165] J. C. H. Tan, D. M. Peters und P. L. Kaufman (2006). Recent developments in understanding the pathophysiology of elevated intraocular pressure. *Curr Opin Ophthalmol*, 17 (2): 168–174.
- [166] H. Tanihara, M. Yoshida, M. Matsumoto und N. Yoshimura (1993). Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34 (2): 413–419.
- [167] M. A. Teus, M. A. Castejón, M. A. Calvo, P. Pérez-Salaíces und A. Marcos (1998). Intraocular pressure as a risk factor for visual field loss in pseudoexfoliative and in primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, 105 (12): 2225–9; discussion 2229–30.
- [168] J. P. Thiery (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 15 (6): 740–746.
- [169] J. P. Thiery und J. P. Sleeman (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (2): 131–142.

- [170] K. N. Thimmaiah, J. B. Easton, G. S. Germain, C. L. Morton, S. Kamath, J. K. Buolamwini und P. J. Houghton (2005). Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling. *J Biol Chem*, 280 (36): 31.924–31.935.
- [171] B. Tian, B. T. Gabelt, B. Geiger und P. L. Kaufman (2008). The role of the actomyosin system in regulating trabecular fluid outflow. *Exp Eye Res*.
- [172] B. Tian, B. T. Gabelt, J. A. Peterson, J. A. Kiland und P. L. Kaufman (1999). H-7 increases trabecular facility and facility after ciliary muscle disinsertion in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (1): 239–242.
- [173] B. Tian, B. Geiger, D. L. Epstein und P. L. Kaufman (2000). Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (3): 619–623.
- [174] B. Tian und P. L. Kaufman (2005). Effects of the Rho kinase inhibitor Y-27632 and the phosphatase inhibitor calyculin A on outflow facility in monkeys. *Exp Eye Res*, 80 (2): 215–225.
- [175] B. Tian, P. L. Kaufman, T. Volberg, B. T. Gabelt und B. Geiger (1998). H-7 disrupts the actin cytoskeleton and increases outflow facility. *Arch Ophthalmol*, 116 (5): 633–643.
- [176] J. M. Tielsch, A. Sommer, J. Katz, R. M. Royall, H. A. Quigley und J. Javitt (1991). Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA*, 266 (3): 369–374.
- [177] H. Towbin, T. Staehelin und J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9): 4350–4354.
- [178] C. Trautner, B. Haastert, B. Richter, M. Berger und G. Giani (2003). Incidence of blindness in southern Germany due to glaucoma and degenerative conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44 (3): 1031–1034.
- [179] B. J. Tripathi und R. C. Tripathi (1984). Effect of epinephrine in vitro on the morphology, phagocytosis, and mitotic activity of human trabecular endothelium. *Exp Eye Res*, 39 (6): 731–744.
- [180] R. Tripathi (1974). Tracing the bulk outflow route of cerebrospinal fluid by transmission and scanning electron microscopy. *Brain Res*, 80 (3): 503–506.
- [181] R. C. Tripathi, J. Li, W. F. Chan und B. J. Tripathi (1994). Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2. *Exp Eye Res*, 59 (6): 723–727.
- [182] J. Wang, R. Zohar und C. A. McCulloch (2006). Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 312 (3): 205–214.
- [183] W.-H. Wang, L. G. McNatt, I.-H. Pang, J. C. Millar, P. E. Hellberg, M. H. Hellberg, H. T. Steely, J. S. Rubin, J. H. Fingert, V. C. Sheffield, E. M. Stone und A. F. Clark (2008). Increased expression of the WNT antagonist sFRP-1 in glaucoma elevates intraocular pressure. *J Clin Invest*, 118 (3): 1056–1064.

- [184] U. Welge-Lüssen, C. A. May und E. Lütjen-Drecoll (2000). Induction of tissue transglutaminase in the trabecular meshwork by TGF-beta1 and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (8): 2229–2238.
- [185] U. Welge-Lüssen, C. A. May, A. S. Neubauer und S. Priglinger (2001). Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol*, 12 (2): 94–99.
- [186] A. Wells, C. Yates und C. R. Shepard (2008). E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis*, 25 (6): 621–628.
- [187] M. D. Wensor, C. A. McCarty, Y. L. Stanislavsky, P. M. Livingston und H. R. Taylor (1998). The prevalence of glaucoma in the Melbourne Visual Impairment Project. *Ophthalmology*, 105 (4): 733–739.
- [188] M. Wiederholt (1998). Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow. *Curr Opin Ophthalmol*, 9 (2): 46–49.
- [189] M. Wiederholt, H. Thieme und F. Stumpff (2000). The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog Retin Eye Res*, 19 (3): 271–295.
- [190] B. P. Wijnhoven, W. N. Dinjens und M. Pignatelli (2000). E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*, 87 (8): 992–1005.
- [191] M. C. Wilkes, H. Mitchell, S. G. Penheiter, J. J. Doré, K. Suzuki, M. Edens, D. K. Sharma, R. E. Pagano und E. B. Leof (2005). Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res*, 65 (22): 10.431–10.440.
- [192] J. B. Wise und S. L. Witter (1979). Argon laser therapy for open-angle glaucoma. A pilot study. *Arch Ophthalmol*, 97 (2): 319–322.
- [193] R. J. Wordinger, A. F. Clark, R. Agarwal, W. Lambert, L. McNatt, S. E. Wilson, Z. Qu und B. K. Fung (1998). Cultured human trabecular meshwork cells express functional growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39 (9): 1575–1589.
- [194] R. J. Wordinger, A. F. Clark, R. Agarwal, W. Lambert und S. E. Wilson (1999). Expression of alternatively spliced growth factor receptor isoforms in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (1): 242–247.
- [195] R. J. Wordinger, D. L. Fleenor, P. E. Hellberg, I.-H. Pang, T. O. Tovar, G. S. Zode, J. A. Fuller und A. F. Clark (2007). Effects of TGF-beta2, BMP-4, and gremlin in the trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (3): 1191–1200.
- [196] Y. Xing, K.-I. Takemaru, J. Liu, J. D. Berndt, J. J. Zheng, R. T. Moon und W. Xu (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure*, 16 (3): 478–487.

- [197] J. Xu, S. Lamouille und R. Derynck (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 19 (2): 156–172.
- [198] Z. Yan, S. Winawer und E. Friedman (1994). Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells. *J Biol Chem*, 269 (18): 13.231–13.237.
- [199] Z.-Z. Yang, O. Tschopp, A. Baudry, B. Dümmler, D. Hynx und B. A. Hemmings (2004). Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans*, 32 (Pt 2): 350–354.
- [200] Y. Zhang, X. Feng, R. We und R. Derynck (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature*, 383 (6596): 168–172.
- [201] Y. E. Zhang (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*, 19 (1): 128–139.
- [202] X. Zhao, K. E. Ramsey, D. A. Stephan und P. Russell (2004). Gene and protein expression changes in human trabecular meshwork cells treated with transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45 (11): 4023–4034.

7 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematisches Schnittbild des vorderen Augenabschnittes und Kammerwinkels des menschlichen Auges	14
1.2	Graphische Darstellung des Proteins β -Catenin	21
1.3	Schematische Darstellung von Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Bindungen	22
2.1	Strukturformel von Natriumdodecylsulfat	29
3.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien	35
3.2	Zeitverlauf der Proteinexpression und -aktivierung	36
3.3	Quantitative Auswertung von Abb. 3.2	37
3.4	Biochemische Fraktionierung der Zellen	39
3.5	Quantitative Auswertung von Abb. 3.4	40
3.6	Konfokalmikroskopische Darstellung der subzellulären Proteinlokalisierung	41
3.7	Einfluss der Zellkontraktilität auf die Proteinexpression	42
3.8	Einfluss der Zellkontraktilität auf die Zellmorphologie	43
3.9	Blockade des TGF- β -Rezeptors	44
3.10	Quantitative Auswertung von Abb. 3.9	45
3.11	Smad3-Inhibition	46
3.12	Quantitative Auswertung von Abb. 3.11	46
3.13	p38-Inhibition	47
3.14	Quantitative Auswertung von Abb. 3.13	48
3.15	AKT-Inhibition	49
3.16	Quantitative Auswertung von Abb. 3.15	49
3.17	Zellmorphologie unter AKT-Inhibition	51
3.18	MEK-Inhibition	52
3.19	Vergleich der Wirkung diverser Inhibitoren	52
3.20	Änderungen der Zellmorphologie unter diversen Inhibitoren	53
4.1	Schematische Zeichnung zum zellulären β -Catenin-Pool	58
4.2	Schematische Übersicht zu den Signalwegen	66

8 Tabellenverzeichnis

5.1	Verwendete Abkürzungen	70
5.2	Verwendete Antikörper	72
5.3	Verwendete Inhibitoren, Wachstumsfaktoren und Zellkulturmedien . .	74

Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. Günther Schlunck möchte ich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die Übernahme des Gutachtens herzlich danken. Ohne seine Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente wäre diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Bereichernd waren aber ganz besonders auch die zahlreichen interessanten Diskussionen und Erläuterungen, die häufig über die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit hinausgingen, aber sehr dazu beigetragen haben, mir die Grundlagen einer zellbiologischen Denkweise näher zu bringen.

Frau Dr. Hong Han danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor, die vielen Erklärungen und Tipps zu praktischen Fragen des Laboralltags und die Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente.

Herrn Professor Dr. Heimo Steffen danke ich für die Übernahme des Gutachtens, Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Dipl.-Phys. Thomas Meigen für die Übernahme der mündlichen Prüfung.

Den Arbeitsgruppen des Instituts für Klinische Neurobiologie, des Institutes für Anatomie und Zellbiologie, des Universitätsklinikums für Neurologie, des Universitätsklinikums für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Julius-Maximilians-Universität Würzburg möchte ich für die großzügige Überlassung von Geräten und Materialien danken.

Daniela Wilhelm danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.