

Arbeitsbericht Teilprojekt BI.1

Arbeits- und Ergebnisbericht:

Teilprojekt BI.1 „Untersuchungen zur Entstehung der Druckerhöhung bei chronischen Glaukomen“

Beteiligte Wissenschaftler: E.Lütjen-Drecoll, R. Fuchshofer, T. Knörnschild, M. Richter

Ein Großteil der für die vergangene Förderperiode geplanten Projekte konnte durchgeführt und zum Abschluss gebracht werden.

2. I. Untersuchungen an Spenderaugen

I.1. Auch in der vergangenen Förderperiode ist uns von der Majo Clinic in Rochester, Minnesota/USA Augenmaterial von Glaukomspenderaugen zur Verfügung gestellt und ausgewertet worden. Die Ergebnisse der Arbeiten wurden in zwei Übersichten zusammengefasst (1,2).

Wir hatten die Gelegenheit, 35 Augen mit der Diagnose des primären Offenwinkelglaukoms zu untersuchen, die alle mit dem β -Blocker Timolol behandelt worden waren. Da die Sekretionsrate durch diese Medikation deutlich herabgesetzt wird, wollten wir untersuchen, ob im Trabekelwerk (TW) der Patienten Veränderungen auftreten, die auf eine Unterperfusion des Trabekelwerkes hinweisen. Bei Affenaugen, die für 6 Monate mit Timolol behandelt worden waren, hatten wir deutliche Veränderungen beschrieben. Die qualitative und quantitative morphologische Analyse des Trabekelwerkes an elektronenmikroskopischen Schnitten der mit β -Blockern behandelten menschlichen Glaukomaugen zeigten keine Unterschiede in der Morphologie des TW zu Augen, die eine Standardmedikation aber ohne β -Blocker hatten und auch nicht zu solchen, die keine Medikation erhalten hatten (3).

Es ist uns jetzt gelungen, 5 Glaukomspenderaugen von Patienten mit Pigmentglaukom von der Augenbank der Mayoklinik in Rochester/Minnesota (USA) sowie 7 Trabekulektomiestückchen von Operationen an Patienten mit Pigmentglaukom, die wir von der Universitätsaugenklinik Würzburg erhalten, ultrastrukturell zu untersuchen. Auch wenn die Anzahl dieser erstmalig untersuchten Augen noch gering ist, so ist es doch die größte Anzahl an untersuchten Augen, die bisher beschrieben wurde. Wir fanden bei keinem der Patienten eine Blockade der Kammerwasserabflusswege durch Pigmentgranula oder durch Zellen, die Pigment phagozytiert hatten. Die quantitative Auswertung des extrazellulären Materials (EZM) unter der Innenwand des Schlemm Kanals (SK) ergab, dass weder eine signifikante Vermehrung von Plaques, noch eine Vermehrung von fibrillärem Material nachzuweisen war. Ein signifikanter Befund war jedoch die Verkürzung des anterior-posterioren Durchmessers des SK. Das Lumen des Kanals war stellenweise dadurch kollabiert, dass das Innenwandendothel von den Verbindungsfibrillen des elastischen kribriformen Netzes bzw. von der subendothelialen Zelllage abgelöst war. Ob diese Verkürzung des Schlemm Kanals ausreicht, um die Druckerhöhung beim Pigmentglaukom zu erklären, ist noch unklar. Auch die Ursache der Ablösung der Trabekelzellen ist nicht bekannt. In der Iris der Patienten fanden sich im Epithel und im M. dilatator Abschnitte, in denen die Pigmentepithelzellen vollständig oder teilweise fehlten. Das Pigment dieser Zellen oder ein Teil des Pigmentes ist wahrscheinlich von den Trabekelzellen (TZ) phagozytiert worden. Aus unseren Befunden schließen wir, dass Zellen, die viel Pigment phagozytiert haben, lytische Enzyme freisetzen, die die Ablösung der Innenwand verursachen könnten. Die bisherigen Ergebnisse wurden bei der ARVO-Tagung in Fort Lauderdale/Fl.,USA 2002 vorgetragen und diskutiert.

Arbeitsbericht Teilprojekt BI.1

3. II. In vitro-Untersuchungen an Zellkulturen des menschlichen Trabekelwerks

Es konnten zunächst die Befunde von Tripathi et al. bestätigt werden, dass der Wachstumsfaktor TGF β 2 im Kammerwasser (KaWa) bei etwa 50% der Patienten mit POAG und juvenilem Glaukom erhöht ist (4). Es wurde deshalb an Zellkulturen untersucht, ob TGF β 2 für die Vermehrung von EZM im Trabekelwerk (TW) und damit für die Druckerhöhung im Auge eine Rolle spielen könnte.

II.1. In vitro führt Behandlung mit TGF β 2 zu einer vermehrten Expression von Fibronektin und Transglutaminasen - Enzymen, die EZM so vernetzen, dass sie durch keine proteolytischen Enzyme degradierbar sind (5). In der Arbeit wurde mit immunhistochemischen Methoden sowie mit Western blot und Funktionstests der Nachweis erbracht, dass TGF β 2-Behandlung von TZ in vitro zur Vermehrung von EZM nicht nur durch Hemmung des Abbaues, sondern auch durch vermehrte Syntheseleistung der Zellen und durch Vernetzung von EZM-Material zu unlöslichen Komplexen führt:

4. II.2. Einfluss von TGF β 2 auf den Degradationsweg der EZM

Die Degradation von EZM erfolgt über Metalloproteinasen (MMPS), die über Plasmin oder MTMMP als ihrer Proform aktiviert werden. Zur Aktivierung von Proplasmin zu Plasmin wird tPA und nPA benötigt, die irreversibel durch den Plasminaktivatorinhibitor PAI gehemmt werden können. Wir haben mit PCR und Northern blot – Methoden zunächst die RNA für die oben aufgeführten Enzyme in TZ nachgewiesen, mit Western blot die Proteine und im Zymogram die Aktivität der Enzyme untersucht. Es zeigte sich, dass die mRNA's für alle untersuchten Enzymsysteme vorhanden waren, während auf der Proteinebene MMP9 und PAI nicht detektiert werden konnte. Behandlung mit TGF β 2 induzierte signifikant die Expression von PAI, das über die irreversible Bindung der Plasminaktivatoren zur Hemmung der Aktivierung aller Metalloproteinasen führt. Reagieren TZ in vivo wie in vitro, so führt bei Patienten mit Langzeiterhöhung von TGF β 2 im KaWa diese Stimulation zu einer Ansammlung von EZM durch Behinderung des Abbaues durch die proteolytischen Enzyme (6, D1).

5. II.3. Klassifikation der kribriformen und korneoskleralen Trabekelzellen

In der vorangegangenen Förderperiode war es uns gelungen, Zellen der kribriformen und lamellären Portion des TW in Zellkulturen getrennt zu züchten. Wir hielten diese Trennung für nötig, da nur die kribriforme Region für die Bildung des Hauptwiderstandes gegenüber dem Kammerwasserabfluß verantwortlich ist. Wir fanden tatsächlich, dass sich kribriforme und korneosklerale Zellen durch die Expression des kleinen Stressproteins α B-Crystallin unterscheiden. Andererseits fanden wir keinen Unterschied in der Expression von Fibronektin und Transglutaminase (5). Auch die Reaktion auf TGF β 2 war bei beiden Zellpopulationen gleich. Interessanterweise war nach Behandlung mit TGF β auch die α B-Crystallin-Expression bei beiden Populationen gleich. Wir haben deshalb zunächst noch einmal die Frage aufgeworfen, ob kribriforme und korneosklerale Zellen tatsächlich zwei verschiedene Zellpopulationen darstellen, oder ob sie eine einheitliche Zellform bilden. Da morphologisch der Hauptunterschied zwischen beiden Regionen darin besteht, dass im korneoskleralen TW die Zellen auf einer die Lamelle vollständig umschließenden Basalmembran ruhen, während

Arbeitsbericht Teilprojekt BI.1

die kribriformen Zellen „frei“ in einer EZM liegen, haben wir untersucht, ob sich die Zellen in ihrem Expressionsmuster für eine große Zahl von Basalmembran- (BM) Komponenten unterscheiden und eventuell auch unterschiedlich in Bezug auf diese Komponenten auf Behandlung mit TGF β 2 reagieren. Zusätzlich wurde mit immunohistochemischen Verfahren auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene die Morphologie des Trabekelwerkes in verschiedenen Schnittrichtungen neu analysiert. Wir fanden keinerlei Unterschiede in der Expression der verschiedenen BM-Komponenten und ihrer Reaktion auf TGF β 2 zwischen beiden Zellpopulationen. Wir fanden aber auch morphologisch mit den neu angewandten Methoden wesentlich mehr Ähnlichkeiten zwischen den Zellen in vivo als bisher beschrieben worden sind. Die kribriformen Zellen exprimieren BM-Komponenten, an denen Verbindungsfibrillen des elastischen Netzes ansetzen, ganz ähnlich wie die Zellen des lamellären Teiles des TW. Bei älteren Menschen formiert sich das EZM zu unvollständigen Lamellen. Der Befund, dass die kribriformen Zellen direkt in das elastische System eingebunden sind und damit dem Ansatz des Ziliarmuskels dienen, könnte auch erklären, warum diese Zellen konstitutiv mehr Stressproteine ausbilden, als die korneoskleralen Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Dissertation in der Naturwissenschaftlichen Fakultät publiziert, sowie bei der EVER-Tagung 2001 und auf dem Anatomenkongress in Halle 2001 vorgetragen und diskutiert (7, D1).

II.4. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wiederholt wurden die TZ klassifiziert, an denen die zyrosinkinaseabhängige Regulation von Maxi-K-Kanälen in verschiedenen Zellkulturen aus Geweben oder menschlichen Kammerwasserabflusswege untersucht werden (8).

III. Untersuchungen an Organkulturen des TW

Um der Frage nach dem Verhalten der TZ in vivo näher zu kommen, haben wir versucht, TZ längere Zeit in Organkulturen, d.h. in situ in ihrem normalen Gewebsverband zu halten und mit verschiedenen Substanzen zu behandeln.

III.1. Untersuchungen an menschlichen Organkulturen

In Zusammenarbeit mit dem Bioingenieur Prof. Ross Ethier, Toronto/Kanada, der als Humboldtstipendient für 1 Jahr in unserem Institut gearbeitet hat, ist es uns gelungen, vordere Augenabschnitte, bei denen die Uvea entfernt, das Trabekelwerk aber in situ erhalten war, bis zu 3 Wochen in Kultur zu halten, die Morphologie der Trabekelzellen zu untersuchen und den Abflusswiderstand des TW zu messen.

Nach einer Vorperfusion mit serumfreiem Medium für 3 Tage wurden die Präparate mit 1 ng/ml TGF β 2 1-2 Wochen lang behandelt. Diese Behandlung führte zu einem Anstieg des Abflusswiderstandes. Morphologisch war eine Verkürzung des SK sowie eine vermehrte Ablagerung von fibrillärem Material in TW nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden bei der ARVO-Tagung 2002 vorgestellt.

III.2. Organkulturen von Schweineaugen

Organkulturen von Schweineaugen wurden deshalb etabliert, weil Untersuchungen an menschlichen Augen aus mehreren Gründen schwierig und zeitaufwendig sind. 1. ist die Anzahl menschlicher Augen, die für solche Untersuchungen zur Verfügung stehen, äußerst begrenzt. 2. wachsen nur von einem Teil dieser Augen Trabekelzellen aus oder überleben in Organkulturen und 3. wachsen menschliche TZ in Kultur in der Regel nur sehr langsam aus, so dass die notwendigen Passagen nur schwer zu gewinnen sind.

Arbeitsbericht Teilprojekt Bl.1

Aus früheren Arbeiten wissen wir, dass TW aus Rinderaugen gut auswächst und TZ relativ gut in Kultur gehalten werden können. Rinderaugen sind aber inzwischen wegen der BSE-Krise vom Schlachthof nicht mehr erhältlich. Wir haben deshalb die Untersuchungen an Schweineaugen vorgenommen. Leider (oder für den Vergleich mit menschlichen Augen vielleicht sogar ein Vorteil) lassen sich TZ aus Schweineaugen ebenso schwer züchten, wie die aus menschlichen Augen, so dass in unseren Versuchsserien in der Regel nur bei etwa 50% der Organkulturen Trabekelzellen erhalten geblieben sind. Wir haben in langwierigen Vorversuchen die Form der Präparation und die Art der Medien so lange geändert, bis wir dann die relativ hohe 50%-Rate erreicht hatten.

Inzwischen konnten wir an Schweineaugen in Organkultur den Einfluss von TGF β 2 nach 3-tägiger Vorperfusion bis zu 5 Tagen untersuchen. Wir fanden ultrastrukturell eine Vergrößerung von TZ sowie eine Vermehrung und Erweiterung von rER. Der Abflusswiderstand des TW war erhöht und α B-Crystallin, das bei Zellen in vivo ohne Behandlung nicht exprimiert wird, war nach Behandlung mit TGF β 2 nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einer weiteren Dissertation publiziert (D2). Die englische Fassung dieser Arbeit ist zur Publikation eingereicht.

III.3. Um die Vergleichbarkeit des Schweine-TWs mit dem menschlichen TW nachzuweisen, wurde die Morphologie des Schweinetrabekelwerks mit immunhistochemischen und ultrastrukturellen Methoden neu untersucht. Es zeigte sich, dass gerade das äußere TW des Schweineauges einen mit dem menschlichen Auge nahezu identischen Aufbau besitzt. Diese Region enthält ein elastisches Netz, das über Verbindungsfibrillen mit den TZ und mit dem Endothel der „loops“, durch die der Abfluß erfolgt, verbunden ist. In der nasalen Hälfte der Zirkumferenz des Auges ist das TW zwischen dem breiten Skleralsporn und der Kornea verspannt, in der anderen Hälfte geht das elastische Netz des TW direkt in ein elastisches Netz der Uvea über, an dem die glatten Muskelzellen des Ziliarmuskels ansetzen. Im TW findet man zahlreiche NOS und SP-Nervenendigungen, wobei die SP-Endigungen wie bei den Primaten Verbindungen zum elastischen Netz aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einer weiteren Dissertation publiziert. Die englische Version wurde zur Publikation eingereicht (9, D3).

IV. α B-crystallin

IV.1. Um die Funktion des kleinen Stressproteins α B-crystallin, das bei einem Großteil der Glaukompatienten in Trabekelzellen vermehrt ist, weiter zu analysieren, wurde untersucht, ob dieses Protein im Alter vermehrt exprimiert wird (10). Es wurde außerdem der Frage nachgegangen, ob das Protein auch sezerniert werden kann, um in der extrazellulären Matrix als Chaperon wirksam zu werden. Wir fanden, dass es zwar Speziesunterschiede in der Verteilung von α B-crystallin gibt, aber innerhalb einer Spezies keine deutlichen Altersunterschiede. Die Speziesunterschiede weisen daraufhin, dass eventuell die absolute Lebensdauer der Spezies einen Einfluss auf die Expression von α B-crystallin hat.

Wir konnten α B-crystallin in der menschlichen Tränenflüssigkeit nachweisen, d.h. dass das Molekül wahrscheinlich sezerniert wird. Ob das Molekül eine Funktion im Tränenfilm hat, ist bisher nicht bekannt (11).

IV.2. Einfluss von TGF β 2

Bei einem Großteil der Augen mit POAG, aber auch bei PEX-Glaukomen, ist die Expression von α B-crystallin im Trabekelwerk erhöht. In einer vorangegangenen Arbeiten hatten wir gezeigt, dass Behandlung von Trabekelzellen die Expression von α B-crystallin induziert. Wir

Arbeitsbericht Teilprojekt Bl.1

sind in einem weiteren Versuchsansatz der Frage nachgegangen, ob auch andere Zellen der Abflusswege auf Behandlung mit TGF β 2 reagieren und fanden, dass auch Ziliarmuskelzellen in Kultur auf Behandlung mit TGF β 2 mit einer erhöhten Expression von α B-crystallin reagieren (12)

IV.3. Transfektion von TZ

In aufwendigen Versuchen wurde eine Transfektion von TZ mit α B-Crystallin versucht. Zur Herstellung rekombinanter Herpesviren (Herpesvirus Saimiri von A. Ensser) wurde in einem ersten Schritt cDNA aus der RNA menschlicher Ziliarmuskelzellen gewonnen. Diese cDNA diente als Template (Vorlage) zur Amplifikation von α B-Crystallin mittels PCR, das wiederum in ein Topo-TA Plasmid (pCR-II-Topo von Invitrogen) subkloniert wurde. Im Anschluss wurde die korrekte Basenfolge per Sequenzierung in einem Kapillarsequencer verifiziert. Im nächsten Schritt erfolgte dann die Umklonierung in ein Expressionsplasmid (pcDNA3) hinter den starken konstitutiven CMV-Promotor (Cytomegalie-Virus). Als Kontrolle wurde die α B-Crystallin cDNA in Antisense-Orientierung in oben genanntes Plasmid kloniert.

Parallel wurden erste Transfektionsexperimente in Vorderabschnitte von Schweineaugen mit Herpesviren durchgeführt, die das enhanced GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors tragen. Zwar konnte eine gewisse Expression des EGFP nachgewiesen werden, allerdings wurde durch die Herpesviren die Morphologie des Trabekelwerkes nachhaltig verändert! Langzeitversuche mit Organkulturen aus Schweineaugen führten ebenso zu Veränderungen der Trabekelzellen. Bisher ist es daher noch nicht möglich, Versuche an transformierten Zellen durchzuführen.

V. Untersuchungen an Mäusen mit knock out der Gluthathionperoxidase

Es wurde begonnen, die Morphologie der Mäuse mit knock out des Radikalfängerenzym Gluthathionperoxidase zu untersuchen. Bei den Mäusen ließ sich altersabhängig ein signifikanter Unterschied zu den genetischen Kontrollen nachweisen (13). So trat signifikant gehäufte Katarakte auf. Aber nicht nur in der Linse traten durch Radikalwirkung hervorgerufene Veränderungen auf. Auch im übrigen Auge ließen sich morphologische Veränderungen nachweisen, die Ähnlichkeiten mit den bei Glaukom auftretenden zeigten. So war im Trabekelwerk das EZM vermehrt, der Schlemm Kanal verkürzt und die Elastika verändert (D4). Im hinteren Augenabschnitt waren die Veränderungen weniger deutlich ausgeprägt als im vorderen Augenabschnitt. Stellenweise war die Basalmembran des retinalen Pigmentepithels (RPE) etwas verbreitert und im RPE waren die Lysosomen vermehrt (D5).

Publikationen

1. Lütjen-Drecoll E (2000). Importance of trabecular meshwork changes in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma *Journal of Glaucoma* 9 (6): 417-418
2. Lütjen-Drecoll E, Gabelt B'AT, Tian B, Kaufman PL (2001). Outflow of aqueous humor. *Journal of Glaucoma* 10: 42-44
3. Gottanka J, Johnson DH, Martus P, Lütjen-Drecoll E (2001). Beta-adrenergic blocker therapy and the trabecular meshwork. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:138-144
4. Picht G, Welge-Lüssen U, Grehn F, Lütjen-Drecoll E. (2001). Transforming growth factor β 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:199-207
5. Welge-Lüssen U, May A, Lütjen-Drecoll E (2000). Induction of tissue transglutaminase in the trabecular meshwork by TGF- β 1 and TGF- β 2. *Invest Ophthalmol & Vis Sci*, Vol 41, No 8: 2229 – 2238
6. Fuchshofer R, Welge-Lüssen U, May CA, Lütjen-Drecoll E (2002). TGF- β 2 increases PAI-1 expression in human trabecular meshwork cells. submitted

Arbeitsbericht Teilprojekt BI.1

7. Fuchshofer R, Welge-Lüssen U, Lütjen-Drecoll E (2002). Comparison between expression of basement membrane components between cribiform and corneoscleral trabecular cells. submitted
8. Stumpff F, Yang Q, Boxberger M, Strauß O, Welge-Lüssen U, Lütjen-Drecoll E, Wiederholt M (2000). Tyrosine kinase dependent regulation of Maxi-K channels in different cells of the human outflow pathway. *Ophthalmologica* 2000; 214, No.1
9. Skorsky L, May AC, Lütjen-Drecoll E (2002). Functional morphology of the porcine anterior eye segment. submitted
10. Oertel MF, May CA, Bloemendal H, Lütjen-Drecoll E (2000). Alpha-B-crystallin expression in tissues derived from different species in different age groups. *Ophthalmologica* 2000; 214:13-23
11. May CA, Welge-Lüssen U, Jünemann A, Bloemendal H, Lütjen-Drecoll E (2000). α B-Crystallin in lacrimal gland duct and tears. *Current Eye Research* Vol 21 No 1:588-594
12. Welge-Lüssen U, Bloemendal H, Lütjen-Drecoll E (2000). Transforming growth factor- β : a growth factor inducing α B-crystallin expression in ciliary muscle cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 993-997
13. Reddy VN, Giblin FJ, Lin LR, Dang L, Unakar NJ, Musch DC, Boyle DL, Takemoto LJ, Ho Y-S, Knörschild T, Jünemann A, Lütjen-Drecoll E. (2001). Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, Vol 42, No 13: 3247-3255

Dissertationen

D1. Fuchshofer R (2002)

Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms

D2. Kook D (2002)

Morphologische und physiologische Untersuchungen der Kammerabflusswege nach Langzeitbehandlung mit TGF α 2

D3. Skorsky L (2002)

Funktionelle Morphologie des vorderen Augenabschnittes des Schweineauges

Diplomarbeiten

D4. Fuchshofer R (2000)

Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen am vorderen Augenabschnitt von Glutathion-Peroxidase-1-Knockout-Mäusen

D5. Knörschild T (2000)

Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen am hinteren Augenabschnitt von Glutathion-Peroxidase-1-Knockout-Mäusen