

Arbeitsbericht Teilprojekt BI.1

Untersuchungen zur Entstehung der Druckerhöhung bei primär chronischen, juvenilen und steroid-induzierten Glaukomen (Teilprojekt BI.1)

Beteiligte Wissenschaftler: **Elke Lütjen-Drecoll** U. Welge-Lüssen, J. Gottanka

Im vergangenen Förderabschnitt konnte ein Großteil der beantragten Projekte erfolgreich abgeschlossen werden.

I. Vergleich morphologischer Veränderungen im Trabekelwerk und Sehnerven bei verschiedenen Glaukomformen.

Ein Ziel unserer Untersuchungen war es, die morphologischen Veränderungen verschiedener Glaukomformen an Spenderaugen von Glaukopatienten mit ultrastrukturellen Methoden qualitativ und quantitativ systematisch zu untersuchen. Diese Untersuchungen konnten früher nur an Trabekulektomiematerial oder an Material von Patienten mit absolutem Glaukom, deren Augen enukleiert werden mußten, vorgenommen werden. Erst durch die Einrichtung der Glaukom-Augenbanken in USA ist es uns jetzt möglich geworden, glaukomatöse Veränderungen in verschiedenen Stadien der Erkrankung zu untersuchen.

I 1. Korrelation zwischen Sehnervenfaserverlust und Veränderungen im Trabekelwerk bei Patienten mit POAG.

An 26 Spenderaugen von Patienten mit primär chronischem Offenwinkelglaukom wurde die klinische Diagnose des Schweregrades der Erkrankung durch Auszählen der Optikusnervenfasern erweitert. Um Aussagen darüber zu erhalten, ob die Ablagerungen extrazellulären Materials unter der Innenwand des Schlemm Kanals (SK) mit der Ausprägung der glaukomatösen Veränderungen im hinteren Augenabschnitt korreliert ist, wurden zusätzlich die verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix unter der Innenwand des SK quantitativ an Ultradünnschnitten evaluiert. Eine Korrelation der quantitativen Daten zur Fläche des sog. "Plaque-materials" in der subendothelialen Region des SK mit der Anzahl der Sehnervenfasern, die in einem Querschnitt durch den retrobulbären Abschnitt des Sehnerven gezählt wurden, ergab eine hochsignifikante negative Korrelation der Daten (Gottanka et al., 1997).

I 2. Korrelation zwischen Sehnervenfaserverlust und PEX-Material im Trabekelwerk.

Eine entsprechende Studie wurde auch an 19 Spenderaugen von Patienten mit Pseudoexfoliationsglaukom durchgeführt. Auch bei diesem Patientengut ergab sich eine negative Korrelation zwischen der Menge an Pseudoexfoliationsmaterial in der subendothelialen oder cribriformen Region des Trabekelwerkes und der Anzahl von Optikusnervenfasern (Gottanka et al., 1977). Diese Untersuchungen unterstützten zusätzlich die Arbeiten von Frau Schlötzer-Schrehardt, die schon 1995 eine Korrelation zwischen Schweregrad der IOP-Erhöhung und der Menge an PEX Material in der subendothelialen Region des Trabekelwerkes gefunden hatte. An diesem Material wurde auch das Vorkommen von Pigmentgranula in Trabekelzellen mit der Morphologie des Trabekelwerkes der entsprechenden Region verglichen. Unsere Untersuchungen weisen daraufhin, daß Pigment, welches bei Patienten mit PEX-Glaukom gehäuft vorkommt, die Kammerwasserabflußwege nicht blockiert, sondern vielleicht im Gegenteil sogar ein Hinweis darauf ist, daß diese Region des Trabekelwerkes besonders gut durchströmt ist und nur wenig extrazelluläres Material in der subendothelialen Region aufweist. Die statistische Auswertung der Daten wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Martus durchgeführt.

Arbeitsbericht Teilprojekt Bl.1

I 3. Ultrastrukturelle Veränderungen des Trabekelwerkes nach Behandlung menschlicher Augen mit Corticosteroiden.

Von Patienten mit Steroid-induziertem Glaukom und von Patienten mit juvenilem Glaukom hatten wir nicht genügend Bulbi, um Korrelationen zwischen Veränderungen im vorderen und hinteren Augenabschnitt durchzuführen. Wir konnten aber an Trabekulektomiestückchen und an vorderen Augenabschnitten von 5 Spenderaugen mit Steroidglaukom und 6 Spenderaugen mit POAG, die über lange Jahre mit Steroiden behandelt worden waren, die Morphologie des Trabekelwerkes mit qualitativen und quantitativen Methoden beschreiben (Johnson et al., 1997). Es zeigte sich, daß beim Steroidglaukom Ablagerungen von fibrillärem Material zwischen dem cribriformen elastischen Netz und der Innenwand des SK auftreten, die sich von denen des PEX-Materials sowie von den "SD-Plaques" des POAG deutlich unterscheiden und wahrscheinlich für die Widerstandserhöhung im Trabekelwerk verantwortlich sind.

I 4. Ultrastrukturelle Veränderungen im Trabekelwerk von Patienten mit juvenilem Glaukom.

Interessant war dann für uns der Befund, daß im Trabekelwerk von 11 Fällen mit juvenilem Glaukom sowohl SD-Plaques wie bei Patienten mit POAG als auch Fibrillen, ähnlich denen beim Steroidglaukom, vorkommen (Furuyoshi et al., 1997). Insgesamt war die Menge an extrazellulärem Material im Trabekelwerk bei Patienten mit juvenilem Glaukom deutlich höher als bei den meisten Patienten mit POAG. Es waren auch deutliche Strukturveränderungen im lamellären Teil des Trabekelwerkes nachzuweisen. Auch zwischen den Lamellen fand sich fibrilläres Material, so daß bei diesen schweren Glaukomformen eventuell auch schon der Kammerwasserabfluß im inneren Trabekelwerk behindert ist.

I 5. Expression von α B-Crystallin und TIGR protein im Trabekelwerk normaler und glaukomatös veränderter Augen.

An speziell fixierten Glaukomsponderaugen, die uns aus den USA von der Majoklinik (D. Johnson) zur Verfügung gestellt worden sind, konnten wir zeigen, daß nicht nur das extrazelluläre Material in der subendothelialen oder cribriformen Region des Trabekelwerkes signifikant stark vermehrt war, sondern daß auch die Trabekelzellen zumindest bei einer Anzahl von Glaukomaugen vermehrt α B-Crystallin und das "Trabecular Meshwork inducible Glucocorticoid response (TIGR)-protein exprimieren (Polansky et al., 1997; Lütjen-Drecoll et al., 1998). α B-Crystallin gehört zur Gruppe der kleinen Streßproteine, die auch als Chaperone die Tertiärstruktur von Proteinen nach Einwirkung von Streßfaktoren aufrecht erhalten können. Die funktionelle Bedeutung des TIGR-Proteins ist noch weitgehend unbekannt. Es kann jedoch, wie Arbeiten von Polanski gezeigt haben, bei in vitro gezüchteten menschlichen Trabekelzellen ebenfalls durch Streßfaktoren induziert werden. Beide Proteine (TIGR- u. α B-Crystallin) kommen, wie wir zeigen konnten, auch im Trabekelwerk von Normalaugen vor, wobei α B-Crystallin ausschließlich in Zellen der cribriformen Region nachzuweisen war.

II. Klassifizierung von Zellen der Kammerwasserabflußregion in vivo und in vitro.

Um der Frage nachzugehen, welche Faktoren die Expression von α B-Crystallin in Trabekelzellen erhöhen können, haben wir Trabekelzellen des inneren korneoskleralen und uvealen Trabekelwerkes von denen der äußeren cribriformen Region und vom Skleralsporn isoliert und getrennt in Zellkulturen gezüchtet. Als bisher einziger Gruppe ist es uns gelungen, von einer Anzahl von Spenderaugen Monolayerkulturen dieser verschiedenen Zellgruppen über mehrere Passagen zu halten und die Zellen mit morphologischen und molekularbiologischen Methoden zu klassifizieren. Auch in vitro ließen sich die cribriformen Zellen von den korneoskleralen- und Skleralspornzellen vor allem dadurch unterscheiden, daß die kribriformen Zellen konstitutiv wesentlich mehr α B-Crystallin exprimieren als die korneoskleralen (Welge-Lüssen et al., 1998).

Arbeitsbericht Teilprojekt Bl.1

III. Bestimmung von TGF β_2 im Kammerwasser von Glaukompatienten.

In Zusammenarbeit mit der Augenklinik Würzburg (Prof. Grehn) konnten wir im Kammerwasser einer großen Zahl von Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom oder juvenilem Glaukom, nicht aber bei Patienten mit Pseudoexfoliationsglaukom oder bei Kataraktpatienten eine Erhöhung des Wachstumsfaktors TGF β_2 nachweisen (Picht et al., 2000).

IV. In vitro-Untersuchungen zum Einfluß von TGF β auf Zellen der Kammerwasserabflußregion.

IV 1. α B-Crystallin

Um zu untersuchen, ob TGF β_2 in Trabekelzellen im Trabekelwerk die α B-Crystallin-Expression erhöhen kann, haben wir kribriforme und korneosklerale Zellen, sowie auch Ziliarmuskelzellen in vitro mit TGF β_2 in Konzentrationen wie sie beim Glaukom im Kammerwasser vorkommen, in jeweils verschiedenen Zeitabschnitten behandelt und die Wirkung auf die Expression von α B-Crystallin untersucht. Wir konnten nachweisen, daß dieser Wachstumsfaktor tatsächlich in vitro bei Trabekelzellen und Ziliarmuskelzellen nicht aber bei Fibroblasten die Expression von α B-Crystallin erhöht (Welge-Lüssen et al., 1999; Welge-Lüssen, Bloemendal, Lütjen-Drecoll, 2000).

IV 2. Transglutaminasen.

Es stellte sich jetzt natürlich die Frage, ob erhöhte TGF β_2 -Werte im Kammerwasser direkt oder indirekt an der Vermehrung von extrazellulärem Material in der subendothelialen Region des Trabekelwerkes und damit an der Erhöhung des Kammerwasserabflußwiderstandes beteiligt sein könnten. Die beim POAG vermehrt auftretenden "Plaques" enthalten morphologisch das sog. "long spacing" oder Gitterkollagen, das wahrscheinlich eine vernetzte Form von Typ VI Kollagen darstellt. Frühere enzymhistochemische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, daß die vermehrten Fibrillen der "Plaques" nicht durch Kollagenasen oder verschiedene Peptidasen abgebaut werden können. Eine Gruppe von Enzymen, die extrazelluläre Matrixproteine so vernetzen können, daß sie durch Proteasen nicht weiter verdaut werden können, sind die Transglutaminasen. Wir konnten zeigen, daß Transglutaminasen im Trabekelwerk menschlicher Augen sowohl in vivo als auch in vitro vorkommen, und daß TGF β_2 in vitro die Expression von Transglutaminasen erhöht (Welge-Lüssen, May, Lütjen-Drecoll, 2000). Diese Befunde könnten darauf hinweisen, daß die Erhöhung des Kammerwasserabflußwiderstandes beim Glaukom nicht nur durch Vermehrung von extrazellulärem Material oder Verminderung der Metalloproteinasen verursacht wird (wie es häufig angenommen wird), sondern auch durch Entstehung enzymatisch nicht mehr degradierbarer Verbindungen der extrazellulären Matrix selbst.

V. Vorversuche zur Organkultur und Perfusion vorderer Augenabschnitt.

Es ist uns inzwischen mit Hilfe unseres Humboldtstipendiaten R. Ethier auch gelungen, vordere Augenabschnitte in Organkultur über mehrere Wochen zu halten und den Kammerwasserabflußwiderstand an diesen Augen zu messen. Die Vorversuche wurden an Schweineaugen vorgenommen, die in ihrer Größe etwa dem menschlichen Auge entsprechen und leicht erhältlich sind. Der vordere Augenabschnitt einschließlich des Trabekelwerkes und des Skleralsporns wurden in die Perfusionskammer eingespannt und die Augen über einen Zeitraum von 6 bis 10 Tagen mit TGF β_2 in Konzentration von 3,0 ng/ml (etwas mehr als bei Glaukompatienten im Kammerwasser gemessen wurde) perfundiert. Erste Ergebnisse nach Perfusion der Augenvorderkammer werden beim diesjährigen ARVO-Meeting vorgestellt (Ethier et al.). Diese Arbeiten sollen fortgesetzt werden.

Arbeitsbericht Teilprojekt Bl.1

VI. Vorversuche zur Transfektion von Trabekelzellen mit α B-Crystallin.

Um zu untersuchen, ob eine Vermehrung von Streßproteinen in Trabekelzellen die Syntheseleistung der Zellen beeinflußt, haben wir den Versuch unternommen, im Trabekelwerk α B-Crystallin vermehrt zu exprimieren. Die Versuche wurden in Nijmegen in Zusammenarbeit mit Prof. Bloemendal vorgenommen. Als Vektor wurde Lipofectin, ein kationisches Liposom, verwendet. Während solche Transfektionen in Fibroblasten leicht möglich sind, ist es uns in den sich nur sehr langsam teilenden Trabekelzellen bisher nicht gelungen, eine Transfektion mit Lipofectin erfolgreich durchzuführen. Inzwischen sind aber in Zusammenarbeit mit dem Virologischen Institut (Dr. A. Enser) Versuche mit Herpesviren begonnen worden. Es konnte mit Hilfe eines Reportergens schon gezeigt werden, daß Trabekelzellen mit Herpesviren transfiziert werden können. Diese Untersuchungen sollen weitergeführt werden.

Die unter I-IV dargestellten Befunde wurden in Übersichtsartikeln zusammengefaßt (Lütjen-Drecoll, 1997, 1997, 1998) und auf verschiedenen Kongressen vorgestellt (1-5).

Originalarbeiten:

1. Gottanka J, Johnson DH, Martus P, Lütjen-Drecoll E (1997)
Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork
Journal of Glaucoma 6: 123-132
2. Gottanka J, Flügel-Koch C, Martus P, Johnson D.H., Lütjen-Drecoll E (1997)
Correlation of pseudoexfoliative material and optic nerve damage in pseudoexfoliation syndrome
Invest Ophthalmol Vis Sci, Vol. 38 No. 12: 2435-2446
3. Johnson D, Gottanka J, Flügel C, Hoffmann F, Futa F, Lütjen-Drecoll E (1997)
Ultrastructural changes in the trabecular meshwork of human eyes treated with corticosteroids
Arch Ophthalmol, Vol 115: 375-383
4. Furuyoshi N, Furuyoshi M, Futa R, Gottanka J, Lütjen-Drecoll E (1997)
Ultrastructural changes in the trabecular meshwork of juvenile glaucoma.
Ophthalmologica, Vol. 211: 140-146
5. Polansky JR, Fauss DJ, Chen P, Chen H, Lütjen-Drecoll E, Johnson D, Kurtz RM, Ma Z-D, Bloom E, Nguyen TD (1997)
Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product.
Ophthalmologica 211/3: 126-139
6. Lütjen-Drecoll E, May CA, Polansky JR, Johnson DH, Bloemendal H, Nguyen TD (1998)
Localization of the stress protein α B-crystallin and trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein in normal and glaucomatous trabecular meshwork
Invest Ophthalmol Vis Sci, Vol 39, No. 3: 517-525
7. Welge-Lüssen U, Eichhorn M, Bloemendal H, Lütjen-Drecoll E (1998)
Classification of human scleral spur cells in monolayer culture

Arbeitsbericht Teilprojekt Bl.1

European Journal of Cell Biology 75: 78-84

8. Picht G, Welge-Luessen U, Grehn F, Lütjen-Drecoll E (2000)

TGF- β 2 Levels in the Aqueous Humor in Different Types of Glaucoma and the Relation to Filtering Bleb Development

Journal of Glaucoma (in press)

9. Welge-Lüßen U, May CA, Eichhorn M, Bloemendal H, Lütjen-Drecoll E (1999)

α B-crystallin in the trabecular meshwork is inducible by transforming growth factor- β

Invest Ophthalmol & Vis Sci, Vol 40, No 10: 2235-2241

10. Welge-Lüßen U, Bloemendal H, Lütjen-Drecoll E (2000)

TGF-2: a growth factor inducing α B-crystallin expression in ciliary muscle cells

Graefes Archive of Ophthalmology, accepted

11. Welge-Lüßen, May, Lütjen-Drecoll (2000)

Tissue Transglutaminase in the Trabecular Meshwork is Inducible by TGF- β 1 and TGF- β 2

IOVS, accepted

Übersichtsartikel:

12. Lütjen-Drecoll E (1997)

Pathomorphologie der Kammerwinkelregion beim Glaukom

Brosch Glaukom - eine Standortbestimmung

13. Lütjen-Drecoll E (1998)

Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes

Progress in Retinal and Eye Research, Vol18, No1: 91-119

14. Lütjen-Drecoll E (1998)

Normal morphology of the uveoscleral outflow pathways

In: Uveoscleral Outflow: 7-24. Alm A., Weinreb R.N. (eds.), Mosby-Wolfe, London.

Gedruckte Abstracts:

1. Gottanka J, Flügel-Koch C, Martus P, Johnson DH, Lütjen-Drecoll E (1997)

Correlation of severity of optic nerve damage with changes in the trabecular meshwork in different forms of glaucoma

IOVS Vol 38 No 4, Suppl.

2. Welge-Lüßen U, May CA, Polansky JR, Nguyen TD, Bloemendal H, Johnson DH, Lütjen-Drecoll E (1998)

Stress proteins and TIGR in normal and glaucomatous trabecular meshwork

XIII ICER, Paris, July, 1998, Suppl.

3. Eichhorn M, Wiendl H, Lütjen-Drecoll E (1998)

Species differences in contractile cells of the outflow system

XIII ICER, Paris, July, 1998, Suppl.

4. Lütjen-Drecoll E, Welge-Lüßen U (1999)

Arbeitsbericht Teilprojekt BI.1

Effect of TGF β 2 on trabecular meshwork cells.
European Glaucoma Society, September 99, Abstract

5. Ethier CR, Tamm ER, Chan D, Lütjen-Drecoll E (2000)
Effects of TGF- β 2 on outflow facility.
ARVO Abstract