

Aus der Augenklinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss von  $\alpha$ 1-Adrenozeptorsubtypen auf das Überleben retinaler Ganglienzellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Felix Rossipal  
aus Paderborn

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

10. April 2025

Meinen lieben Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Bildverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	9
2 Literaturdiskussion.....	12
2.1 Retinale Ganglienzellen .....	12
2.2 Verlust retinaler Ganglienzellen.....	12
2.3 Rolle des Intraokular drucks bei der Glaukomentstehung .....	13
2.4 Wirkung des Intraokular drucks auf neuronales Augengewebe .....	13
2.5 Wirkung des Intraokular drucks auf retinale Ganglienzellen.....	13
2.6 Physiologie des Intraokular drucks.....	14
2.7 Einfluss des adrener gen Nervensystems auf den Intraokular druck.....	16
2.8 Adrenozeptoren.....	17
2.8.1 $\alpha_1$ -Adrenozeptoren .....	17
2.8.2 Einfluss der okulären Durchblutung auf retinale Ganglienzellen .....	21
2.8.3 Signalweg bei Vasokonstriktion.....	23
2.8.4 $\alpha_1$ -Adrenozeptoren im zentralen Nervensystem.....	24
3 Material und Methoden.....	32
3.1 Materialien.....	32
3.2 Tiere .....	34
3.3 Messung des Intraokular drucks.....	34
3.4 Immunhistochemie .....	35
3.4.1 Entnahme der Augen .....	35
3.4.2 Isolation des Retina-Ganzpräparats.....	35
3.4.3 Flatmounting der Retina .....	36
3.4.4 Immunhistochemische Färbung von retinalen Ganglienzellen .....	38
3.4.5 Quantitative Netzhautanalyse .....	39
3.5 Quantitative Echtzeit PCR-Analyse .....	41
3.6 Statistische Analyse .....	42

4	Ergebnisse .....	42
4.1	Augeninnendruckmessung .....	42
4.2	Anzahl der Ganglienzellen in der retinalen Ganglienzellschicht .....	43
4.3	Expression von $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtyp-mRNA in der Retina .....	44
5	Diskussion .....	45
5.1	Quantifizierung retinaler Ganglienzellen.....	45
5.2	Diskussion der Ergebnisse der Brn3a-Färbung.....	49
5.2.1	Topographische Verteilung von RGC.....	50
5.3	Rolle des Endothels bei der retinalen Durchblutung.....	51
5.4	Zusammenhang zwischen $\alpha_1$ -AR und Intraokulardruck.....	52
5.5	Zusammenhang zwischen der Expression von $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen in der Retina und der Anzahl retinaler Ganglienzellen .....	54
5.6	Ausblick.....	55
6	Zusammenfassung .....	56
7	Literaturverzeichnis .....	58
8	Danksagung .....	77
9	Tabellarischer Lebenslauf .....	78

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_{1A}$ -AR <sup>-/-</sup>	Knockout-Maus, bei der das Gen für den $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor gezielt ausgeschaltet wurde
$\alpha_{1B}$ -AR <sup>-/-</sup>	Knockout-Maus, bei der das Gen für den $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptor gezielt ausgeschaltet wurde
$\alpha_{1D}$ -AR <sup>-/-</sup>	Knockout-Maus, bei der das Gen für den $\alpha_{1D}$ -Adrenozeptor gezielt ausgeschaltet wurde
AR	Adrenozeptor
ARST	Adrenozeptor-Subtyp
BDNF	Brain-derived-neurotrophic-factor
Brn3a	Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A
Bex 1/2	Brain-expressed X-linked protein
CA	Cornu Ammonis
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
PFA	Paraformaldehyd
EGFP	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein
FKS	Fetales Kälberserum
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G <sub>q/11</sub>	G-Protein of the G <sub>q/11</sub> family
DAG	Diacylglycerol
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
IOD	Intraoculardruck
Ig	Immunoglobulin
IGF-1	insulin like growth factor-1
IgG	Immunoglobulin der Klasse G
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
KO	Knockout
ml	Mililiter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure

μl	Mikroliter
NeuN	Neuronal-spezifisches Nuklearprotein
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
o.	oben
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Rab	Ras-like proteins in brain
RGC	Retinale Ganglienzellen
Rho	Ras-Homolog Genfamilie
RhoK	Rho-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
TKB	Tyrosinkinase B
TrkB	Tyrosin-Rezeptor-Kinase B (TrkB)
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien bei den Versuchen .....	32
---	----

## Bildverzeichnis

Abbildung 1: Foto von einem Mausauge in mit PBS gefüllter Petrischale. ....	36
Abbildung 2: Isolierte Retina mit vier radialen, gegenüberliegenden Schnitten .....	37
Abbildung 3: Platzierung der Retina als Flatmount auf dem Objektträger .....	38
Abbildung 4: TRITC-Filter Foto von RGC, die mit Brn3a markiert wurden.....	40
Abbildung 5: DAPI-Filter Foto von Zellkernen, die mit DAPI markiert wurden .....	40
Abbildung 6: Vergleich des Intraokular drucks zwischen den Gruppen .....	42
Abbildung 7: Vergleich der Anzahl DAPI-positiver Zellen zwischen den Gruppen....	43
Abbildung 8: Vergleich der Anzahl Brn3a-positiver Zellen zwischen den Gruppen. .	44
Abbildung 9: Expression von $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen-mRNA in der Retina.....	45

## 1 Einleitung

Die Retina gehört zum zentralen Nervensystem und ermöglicht mit ihren in unterschiedlichen Schichten angeordneten Neuronen die Erfassung und Vorverarbeitung visueller Informationen und deren Übermittlung an das Gehirn (Amini et al., 2018). Von allen Geweben im Körper hat die Retina den höchsten metabolischen Bedarf (Wong-Riley, 2010, Country, 2017). Dieser wird durch die Blutversorgung, bestehend aus retinaler und choroidaler Zirkulation, gefördert und die Retina so mit den notwendigen Nährstoffen und Sauerstoff versorgt (Kur et al., 2012). Die Beeinträchtigung von vaskulär-hämodynamischen Faktoren in der Retina ist relevant bei der Pathogenese von Augenerkrankungen, unter anderem dem Glaukom (Flammer et al., 2002, Toda and Nakanishi-Toda, 2007, Harris et al., 2013). Es gibt Hinweise darauf, dass Adrenozeptoren (AR), insbesondere die  $\alpha_1$ -AR, mit ihrer vaskulären Expression und Funktion einen Einfluss auf die Regulation der retinalen Durchblutung haben und daher ein Ziel bei der Behandlung von vaskulär-assoziierten Augenerkrankungen darstellen könnten (Bohmer et al., 2014, Ruan et al., 2020).

$\alpha_1$ -AR sind eine Gruppe von Rezeptoren, die in verschiedenen Geweben und Organen des menschlichen Körpers vorkommen und eine wichtige Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse spielen (Graham et al., 1996, Garcia-Sainz et al., 1999, Zhong and Minneman, 1999).

Die Familie der  $\alpha_1$ -AR setzt sich aus drei verschiedenen Adrenozeptorsubtypen zusammen:  $\alpha_{1A}$ -AR,  $\alpha_{1B}$ -AR und  $\alpha_{1D}$ -AR (Hieble et al., 1995). Diese Rezeptoren haben eine wichtige Bedeutung für die Durchblutung von Organen und die Regulation des Blutdrucks, da ihre Katecholamin-vermittelte Aktivierung zur Vasokonstriktion führt (Hrometz et al., 1999, Guimaraes and Moura, 2001, Piascik and Perez, 2001, Gericke et al., 2007). Auf diese Weise wird der Gefäßwiderstand beeinflusst, was wiederum Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung eines stabilen arteriellen Blutdrucks sowie die Durchblutung von Organen haben kann, auch in Bezug auf die Retina (Ruan et al., 2020). In mehreren Studien konnten  $\alpha_1$ -AR in retinalen Gefäßen festgestellt werden, und der  $\alpha_{1B}$ -AR scheint in retinalen Arteriolen mit geschädigtem Endothel hauptsächlich für die Vasokonstriktion verantwortlich zu sein (Forster et al., 1987, Bohmer et al., 2014). Daher könnten  $\alpha_1$ -AR einen therapeutischen Ansatz darstellen, um die retinale Durchblutung und den

Gefäßtonus zu beeinflussen. Dies wiederum könnte Auswirkungen auf die Versorgung der Retina und somit auf das Überleben retinaler Ganglienzellen (RGC) haben.

Neben einem erhöhten Intraokulardruck können auch vaskulär-hämodynamische Faktoren bei der Entstehung von Augenerkrankungen einen wichtigen Einfluss haben, denn typischerweise kann es beim Glaukom, das mitunter durch einen erhöhten Augeninnendruck charakterisiert ist, zum progressiven Verlust von RGC und einer Sehnervdegeneration kommen, was zur Erblindung führen kann (Sommer, 1989, Quigley, 1999). Es wird angenommen, dass eine Reduktion des IOD zu einem geringeren Risiko für das Fortschreiten des Glaukoms führt (Leske et al., 2003).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass  $\alpha_1$ -AR an der Regulation des IOD beteiligt sind. So konnte durch Stimulation der  $\alpha_1$ -AR einerseits der IOD erhöht werden (Innemeer et al., 1981, Wang et al., 1997, Okada and Gregory, 2001). Andererseits konnte durch die topische Anwendung eines  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten der IOD gesenkt werden (Nishimura et al., 1993, Zhan et al., 1998, Akaishi et al., 2004).

Wahrscheinlich ist dies zurückzuführen auf die geänderte Kammerwasserdynamik, da durch die Relaxation des Ziliarmuskels der uveosklerale Ausfluss gesteigert wird (Akaishi et al., 2004).

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die  $\alpha_1$ -AR an neurodegenerativen Prozessen im zentralen Nervensystem beteiligt sind (Zuscik et al., 2000). Dies könnte aufgrund der embryonalen Verwandtschaft zwischen Retina und Gehirn auch relevant sein für das Überleben retinaler Nervenzellen, wie den RGC.

Die nachgewiesene Präsenz von adrenergen Rezeptoren im Augengewebe bestätigt die Empfindlichkeit des Augengewebes gegenüber trophischen neuronalen Einflüssen (Lasparis et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass neuronale Faktoren eine wichtige Rolle bei der Regulation und Aufrechterhaltung der Augenphysiologie spielen könnten, insbesondere in Bezug auf die für die Funktion des Auges wichtige Retina. Durch das Vorhandensein von  $\alpha_1$ -AR könnten adrenerge Signale einen Einfluss auf okuläre Prozesse haben, einschließlich potenzieller Auswirkungen auf retinale Strukturen wie RGC. Um Erkenntnisse über die möglicherweise unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der einzelnen  $\alpha_1$ -AR zu gewinnen, ist es wichtig, den spezifischen Einfluss der  $\alpha_1$ -AR auf die funktionellen und morphologischen Eigenschaften der Retina zu untersuchen.

Das Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der einzelnen  $\alpha_1$ -AR könnte wiederum der Entwicklung von Medikamenten dienen, die auf einen Rezeptorsubtypen abzielen und daher möglichst wenig Nebenwirkungen verursachen. Andernfalls könnten nicht-subtypselektive Liganden zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Die Erforschung wird jedoch erschwert, weil es bisher keine hochspezifischen Agonisten und Antagonisten für alle  $\alpha_1$ -AR gibt (Jensen et al., 2009b, Böhmer et al., 2014, Ruan et al., 2020). Aus diesem Grund haben wir in unserer Studie Knock-Out (KO)-Mäuse verwendet, denen jeweils ein  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtyp (ARST) fehlt.

Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die unterschiedlichen  $\alpha_1$ -ARST einen Einfluss auf das Überleben von RGC und auf den IOD von Mäusen haben, bei denen jeweils ein  $\alpha_1$ -ARST durch genetische Modifizierung fehlt. Zudem zielte diese Studie darauf ab, die Expression der drei spezifischen  $\alpha_1$ -ARST in der Retina von Wildtyp (WT)-Mäusen festzustellen.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Retinale Ganglienzellen**

RGC sind maßgeblich an der Verarbeitung visueller Information beteiligt, da sie die finale Verbindung zwischen retinaler und höherer cerebraler Signalverarbeitung herstellen. So empfangen die RGC - in der retinalen Ganglienzellschicht lokalisiert - die visuelle Information, nachdem durch Photorezeptoren Licht in elektrische Signale umgewandelt, und über Interneurone an die RGC weitergeleitet wurde. Die Axone der RGC bilden den Sehnerv und ziehen weiter zu den retinorezipienten Arealen des Gehirns (Masland, 2012). Es lassen sich mehr als 30 verschiedene Ganglienzelltypen unterscheiden (Roska and Meister, 2014, Sanes and Masland, 2015). Im Gegensatz zur Maus mit einer Gesamtanzahl von mehr als 50.000 RGC, besitzt der Mensch über eine Million. Dass die Ganglienzellen bzw. der Sehnerv von Wirbeltieren dem zentralen Nervensystem angehören, liegt in ihrer embryonalen Entwicklung begründet. Beide entstammen dem embryonalen Diencephalon als Auswüchse (Graw, 2010).

### **2.2 Verlust retinaler Ganglienzellen**

Sobald ein Verlust und/oder eine Dysfunktion von RGC vorliegt, ist die Weiterleitung visueller Information an das Gehirn beeinträchtigt, was in einem Sehverlust resultiert. Eine verringerte Anzahl von RGC ist signifikant für das Glaukom, da die RGC maßgeblich durch die Krankheit geschädigt werden. Das Glaukom stellt eine Gruppe von okulären Erkrankungen dar, bei denen der charakteristische Verlust an RGC zu Gesichtsfeldverlusten und Degeneration des Sehnervs bis hin zur Blindheit führen kann (Schwartz, 2005, Pang and Clark, 2007, Almasieh et al., 2012). Mit weltweit mehr als 60 Millionen erkrankten Menschen gilt das Glaukom als eine der häufigsten Ursachen für Erblindung, und es wurde angenommen, dass 11.1 Millionen Menschen im Jahre 2020 eine auf das Glaukom zurückzuführende bilaterale Blindheit erlitten haben (Quigley and Broman, 2006). Die Anzahl weltweit am Glaukom erkrankter Menschen wird im Jahre 2040 voraussichtlich auf 111.8 Millionen ansteigen (Tham et al., 2014).

### **2.3 Rolle des Intraokulardrucks bei der Glaukomentstehung**

Das individuelle Risiko für die Entwicklung oder das Fortschreiten eines Glaukoms wird mit verschiedenen Risikofaktoren wie Alter (Gupta and Chen, 2016), positive Familienanamnese (Tielsch et al., 1994), dünnere Korneadicke (Medeiros et al., 2003), Myopie (Marcus et al., 2011) und vaskuläre Dysregulation (Flammer et al., 2013) in Zusammenhang gebracht. Daneben stellt ein erhöhter IOD einen wichtigen Hauptrisikofaktor dar, wobei die Reduktion des veränderbaren IOD ein Kernbereich der Glaukomtherapie ist (Le et al., 2003, Schwartz, 2005, Ho and Wong, 2019). Trotzdem muss das Vorkommen eines Risikofaktors nicht zwangsläufig zur Glaukomentstehung führen. So entwickeln beispielsweise nicht alle Patienten mit erhöhtem IOD ein Glaukom (Friedman et al., 2004). Außerdem kann das Glaukom trotz Reduktion des IOD fortbestehen, auch wenn eine Verlangsamung des Fortschreitens erzielt wird (Heijl et al., 2002, Schwartz, 2005). Bei Patienten mit normalem IOD und dennoch existenten degenerativen Veränderungen können andere neuroprotektive und vom IOD unabhängige Therapien erforderlich sein (Adeghate et al., 2019).

### **2.4 Wirkung des Intraokulardrucks auf neuronales Augengewebe**

Eine Erhöhung des IOD führt neben einer Papillenexkavation auch zu axonaler Degeneration des Sehnervs, Defekten in der retinalen Nervenfaserschicht, Verlust von großen RGC und Degeneration des Somas von RGC (Nickells, 1996).

### **2.5 Wirkung des Intraokulardrucks auf retinale Ganglienzellen**

RGC entlassen ihre Axone durch Poren in der Lamina cribrosa, einen perforierten Abschnitt der Sklera, der eine Schwachstelle darstellt, weil die Lamina durch erhöhten IOD komprimiert und deformiert werden kann und insofern die Axone der RGC mechanisch geschädigt und ihr axonaler Transport gestört werden können (Fechtner and Weinreb, 1994, Burgoyne et al., 2005). So konnte in einer Studie an Ratten festgestellt werden, dass der retrograde Transport des mit den Nervenwachstumsfaktoren verwandten Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) von den Colliculi superiores als zentrales Zielgebiet der RGC durch einen erhöhten IOD gehemmt wurde und der Mangel an BDNF zum Verlust von RGC beitragen kann

(Quigley et al., 2000). Auch weitere Studien an Ratten haben ergeben, dass eine Beeinträchtigung des retrograden Transports in Axonen von RGC durch Erhöhung des IOD zu fortschreitender Degeneration der RGC (Salinas-Navarro et al., 2010) und deren apoptotischen Tod führt (Kim et al., 2004). Zudem wird eine durch erhöhten IOD ausgelöste mitochondriale Dysfunktion mit dem Verlust von RGC in Zusammenhang gebracht (Ju et al., 2008).

## 2.6 Physiologie des Intraokulardrucks

Durchschnittlich beläuft sich beim Menschen der normale Innendruck gesunder Augen auf  $15,5 \pm 2,75$  mmHg in der Bevölkerung, wobei von der Tageszeit abhängige Schwankungen bis 4 mmHg auftreten können (Grehn, 2019). Der IOD folgt einem zirkadianen Muster und ist nachts erhöht, was teilweise auf eine liegende Schlafposition zurückzuführen ist (Liu et al., 1998, Liu et al., 1999). Ursächlich für den erhöhten nächtlichen IOD könnte der Druck in den episkleralen Venen sein, der im Liegen ansteigt (Friberg et al., 1987).

Der IOD wird vom Mengenverhältnis zwischen dem im Ziliarkörper neugebildeten Kammerwasser und dem bei dessen Abfluss wirkenden Widerstand beeinflusst (Costagliola et al., 2009). Durch die Pupille in die vordere Kammer geleitet, ermöglichen zwei unterschiedliche Wege den Abfluss des Kammerwassers. Der konventionelle Weg beschreibt die Passage des großen Anteils des Kammerwassers, der durch das Trabekelwerk in den Schlemmkanal und danach in episklerale Venen geleitet wird. Hier beeinflussen das Trabekelwerk und der episklerale Venendruck den IOD. Über den unkonventionellen uveoskleralen Weg erreicht der kleinere Anteil des Kammerwassers nach Passieren interstitieller Räume des Ziliarmuskels den Suprachoroidalraum und Supraziliarraum und wird dann durch die Sklera geleitet (Bill, 1965, Bill, 1975). Der Anteil des uveoskleralen Abflusses ist verglichen mit dem trabekulären Abfluss zwar weniger druckabhängig, aber nicht vollständig: Studien an Affen haben ergeben, dass lediglich eine geringfügige Änderung des uveoskleralen Abflussanteils bei normalem bis hohem IOD erfolgt, andere Studien am Affen ergaben jedoch, dass der uveosklerale Abfluss vermindert wird, wenn ein verringerter IOD von nur 4 mmHg herrscht (Bill, 1966, Toris and Pederson, 1985).

In manchen Studien wird auch ein uveo-vortex-Weg mit dem Abfluss des Kammerwassers auf unkonventionelle Weise in Zusammenhang gebracht, wobei Kammerwasser das Auge nach Eintritt in die Choroidea intravaskulär durch Weiterleitung in die Vortexvenen verlässt (Pederson et al., 1977, Sherman et al., 1978). Ein uveolymphatischer Weg, der offenbar zum Kammerwasserabfluss mittels lymphatischer Kanäle im Ziliarkörper beitragen soll, ist umstritten, da es fraglich ist, ob unter physiologischen Bedingungen Lymphgefäße im Auge existent sind (Yucel et al., 2009, Schroedl et al., 2014).

Das Kammerwasser sorgt für die Entfernung von metabolischen Abfallstoffen, den Transport von Neurotransmittern, die Stabilisierung der Bulbusform und die avaskuläre Ernährung der Linse, der Kornea und des Trabekelwerks (Toris, 2010). Auch die Kammerwasserproduktion unterliegt tagesrhythmischen Schwankungen. Die Sekretionsleistung ist nachts beim Schlafen mit durchschnittlich 1,6  $\mu\text{l}/\text{min}$  am geringsten und ca. 45% geringer als während der frühen Morgenstunden, wo sie mit 3.1  $\mu\text{l}/\text{min}$  am höchsten ist (Reiss et al., 1984). Mit zunehmendem Alter erfolgt sowohl bezüglich der Neubildung als auch des Abflusses von Kammerwasser eine Verminderung (Becker, 1958).

Zum größten Abflusswiderstand des Kammerwassers tragen maßgeblich juxtakanalikuläre Anteile des Trabekelwerks und im Schlemmkanal dessen innere Wand bei (Ethier, 2002, Johnson, 2006, Overby et al., 2009). Der Abflusswiderstand kann durch Kontraktion des Ziliarmuskels reduziert werden, da er durch bandartige Strukturen mit dem Trabekelwerk verbunden ist und bei der Kontraktion die Struktur des trabekulären Abflussweges verändert wird (Rohen et al., 1967, Tamm et al., 2015). Eine wichtige Bedeutung für die Steuerung des Kammerwasserabflusses wird auch dem Aktomyosin-System in trabekulären Zellen beigemessen, weil dessen Kontraktilität die Regulation des Abflusswiderstands beeinflussen kann. So kann durch Änderung der Zellform, -größe und Adhärenz der betroffenen Zellen die Richtung oder das Ausmaß des Abflussweges verändert werden (Tian et al., 2009). Es wird auch davon ausgegangen, dass die Extrazellulärmatrix des Trabekelwerks wichtig bei der Regulation des Kammerwasserabflusses ist (Acott and Kelley, 2008). Denn beim Glaukom sind vermehrte Ablagerungen diversen Extrazellulärmaterials vorzufinden, das den Abflusswiderstand erhöht (Lütjen-Drecoll et al., 1981, Lütjen-Drecoll, 1999). Ein erhöhter Abflusswiderstand wird auch mit einer erhöhten Steifheit

des Zytoskeletts von endothelialen Zellen des Schlemmkanals assoziiert, was bei Augen mit Glaukomleiden festgestellt werden konnte (Overby et al., 2014).

## 2.7 Einfluss des adrenergen Nervensystems auf den Intraokulardruck

Die Reduktion des IOD ist ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung des Glaukoms. Dass Adrenozeptoren eine wichtige Funktion bei der Regulation des IOD haben, zeigte sich bereits früh bei der Anwendung von Epinephrin und Norepinephrin, mit denen der IOD bei der Behandlung des Glaukoms gesenkt werden konnte (Becker and Morton, 1966, Pollack and Rossi, 1975). Dabei sollen die Adrenozeptoren bei der Senkung des IOD beteiligt sein, indem der Kammerwasserabfluss sowohl über den uveoskleralen Weg als auch durch das Trabekelmaschenwerk verstärkt wird (Townsend and Brubaker, 1980). Dass der uveosklerale Abfluss durch Epinephrin gesteigert wird, ist jedoch umstritten, da Epinephrin direkter Agonist von  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren ist, und daher ist es fraglich, auf welchen AR Epinephrin die größte Wirkung beim Abfluss entfaltet (Wang et al., 2002b). Die Wirkung des  $\alpha_1$ -AR auf den IOD wurde in verschiedenen Tierversuchsstudien untersucht. Dabei zeigte die Stimulation von  $\alpha_1$ -AR durch den Agonisten Phenylephrin bei Kaninchen einen Anstieg des IOD (Innemeer et al., 1981). Eine weitere Studie an Hasen bewies, dass die Stimulation von  $\alpha_1$ -AR durch Phenylephrin eine Abnahme des Kammerwasserabflusses bewirkt (Chiou, 1983). Die augeninnendrucksenkende Wirkung des selektiven  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten Bunazosin mittels topischer Applikation konnte bei Katzen (Nishimura et al., 1991), Kaninchen (Sugiyama, 1991, Takagi et al., 1991) und Menschen (Oshika and Araie, 1990, Oshika et al., 1991, Takagi et al., 1991, Trew et al., 1991, Zhan et al., 1998) festgestellt werden. Bei Kaninchen erfolgt die Senkung des IOD mittels Bunazosin durch einen gesteigerten uveoskleralen Kammerwasserabfluss (Zhan et al., 1998). Neuere Erkenntnisse geben an, dass über die Aktivierung von  $\alpha_1$ -AR eine Vasokonstriktion glatter Muskelzellen verursacht wird, wodurch die Blutversorgung des glatten Ziliarmuskels eingeschränkt wird. Es wird angenommen, dass dies in einer Verminderung der Kammerwasserproduktion resultiert und somit zur intraokularen Druckabnahme führen kann (Docherty, 2010). Somit stellen  $\alpha_1$ -AR ein potenziell wichtiges Ziel in der Reduktion des IOD dar. Das Verwenden von KO-

Mäusen in dieser Studie hat es ermöglicht, den Einfluss der unterschiedlichen  $\alpha_1$ -AR auf den IOD zu untersuchen.

## 2.8 Adrenozeptoren

Mittels AR, die sich nach Struktur, Signaltransduktion und Pharmakologie in die drei Familien  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta$  unterteilen lassen, werden zentrale und periphere Wirkungen durch die Botenstoffe Adrenalin und Noradrenalin ausgelöst (Bylund et al., 1994). Die AR-Familien umfassen wiederum jeweils drei Subtypen, sodass im Menschen insgesamt neun Adrenozeptoren exprimiert werden, die alle den G-Proteingekoppelten Rezeptoren angehören und aus sieben membrandurchspannenden  $\alpha$ -helikalen Domänen gebildet sind (Fredriksson et al., 2003, Ahles and Engelhardt, 2014).

### 2.8.1 $\alpha_1$ -Adrenozeptoren

Von den heterogenen  $\alpha_1$ -AR existieren drei Subtypen, die geklont werden konnten: der  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - und der  $\alpha_{1D}$ -AR (Hieble et al., 1995). Den  $\alpha_1$ -AR kommt zur Erhaltung der Homöostase eine Beteiligung an wichtigen physiologischen Funktionen in verschiedenen Geweben zu: sympathische Neurotransmission, Kontraktion glatter Muskeln im Urogenitalsystem, Regulation des Elektrolyt- und Wasserstoffwechsels, Modulation des Lebermetabolismus, im Herzen an Chronotropie und Inotropie und Modulation des Gefäßtonus (Garcia-Sainz et al., 1999). Zudem sind sie, wie in Studien mit  $\alpha_{1B}$ -AR<sup>-/-</sup> festgestellt werden konnte, im Gehirn an der Gedächtniskonsolidierung und am angstmotivierten Erkundungsverhalten beteiligt (Knauber and Muller, 2000, Tanoue et al., 2002a, Tanoue et al., 2003). Im Auge wird, ebenfalls an KO-Mäusen getestet, vornehmlich durch  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren eine Kontraktion des Musculus dilatator pupillae bewirkt (Kordasz et al., 2014). Des Weiteren sind  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren maßgeblich an der Blutdruckregulation beteiligt, da ihre Aktivierung über Katecholamine zu Kontraktionen glatter Gefäßmuskulatur führt (Guimaraes and Moura, 2001, Tanoue et al., 2002b).

### 2.8.1.1 $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtyp-vermittelte Vasokonstriktion

Welcher spezifische Subtyp an der Vermittlung von Kontraktionen glatter Muskelzellen und auf diese Weise an vasokonstriktiven Effekten beteiligt ist, wird nicht nur von der Spezies, sondern auch von dem Gefäßbett bedingt (Piascik and Perez, 2001, Hosoda et al., 2005, Martí et al., 2005, Docherty, 2019). So wurde in Studien mithilfe von genmanipulierten Mäusen festgestellt, dass bei Aortenkontraktion und Kontraktion der Arteria carotis, Arteria iliaca und Arteria mesenterica die Vermittlung durch den  $\alpha_{1D}$ -Adrenozeptorsubtyp sehr relevant ist, aber auch wie in der kleineren Arteria femoralis und den Koronararterien (Chalothorn et al., 2003, Deighan et al., 2005, Hosoda et al., 2005, Martí et al., 2005, Zacharia et al., 2005, Methven et al., 2009). Demgegenüber wurde in anderen Studien herausgefunden, dass bei der Vasokonstriktion von kleinen Mesenterialarterien und kaudalen Arterien, die durch den  $\alpha_1$ -AR vermittelt wird, der  $\alpha_{1A}$ -ARST eine wichtige Rolle spielt (Chen et al., 1996, Daly et al., 2002, Hedemann et al., 2004, Martí et al., 2005, Martinez-Salas et al., 2007). Darüber hinaus wurde die Rolle des  $\alpha_{1B}$ -ARST bei der Vermittlung von vasokonstriktiven Effekten zwar in Mesenterial- und kaudalen Mäusarterien nachgewiesen, jedoch als weniger relevant eingestuft (Daly et al., 2002). Andere Studien mit genmanipulierten Mäusen zeigten, dass der  $\alpha_{1B}$ -ARST auch bei der  $\alpha_1$ -agonistischen Vermittlung von Aortenkontraktionen der Maus mitwirkt und insofern an der Blutdruckregulation beteiligt sein könnte, auch wenn sich der basale Blutdruck der verwendeten KO-Mäuse nicht geändert hat (Cavalli et al., 1997). Dagegen kamen andere Studien an KO-Mäusen zu dem Ergebnis, dass nur bei  $\alpha_{1A}$ - und  $\alpha_{1D}$ -AR<sup>-/-</sup> der Blutdruck in Ruhe durch den KO der spezifischen  $\alpha_1$ -ARST gesenkt werden konnte, und man dies auf die vasokonstriktiven Effekte der jeweils ausgeschalteten Subtypen zurückführen kann (Rokosh and Simpson, 2002, Tanoue et al., 2002b).

### 2.8.1.2 Expression der $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen

Studien an entnommener humaner retinaler RNA zeigen, dass die mRNA des  $\alpha_{1B}$ - und des damals noch als „ $\alpha_{1C}$ “- bezeichneten ARST speziell in der menschlichen Retina existiert (Price et al., 1994). Heute gilt der Subtyp „ $\alpha_{1C}$ “ als der  $\alpha_{1A}$ -ARST (Hieble et al., 1995). Das Vorkommen von  $\alpha_1$ -ARST wurde an mehreren Spezies

untersucht: An Schweinen ergaben Radioligand-Bindungsstudien, dass in der Retina hauptsächlich der Subtyp  $\alpha_{1A}$  (ca. 70%) und daneben auch der  $\alpha_{1B}$ -ARST (30%) vorzufinden sind (Wikberg-Matsson et al., 2000). Andere Radioligand-Bindungsstudien zeigten an Kaninchenaugen, dass der  $\alpha_{1A}$ -ARST im Vergleich zu den anderen ARST in der Retina dominant ist (Suzuki et al., 2002). Zuvor wurde schon von Wikberg-Matsson et al. in einer Studie an Kaninchen herausgefunden, dass ca. 70% der  $\alpha_1$ -AR der Retina vom  $\alpha_{1A}$ - und 30% vom  $\alpha_{1B}$ -ARST sind. Wikberg-Matsson et al. betonten in ihrer Studie jedoch, dass bei der Retinapräparation auch retinale Gefäße mit entnommen wurden, auf die ein Teil der identifizierten  $\alpha_1$ -AR zurückzuführen ist (Wikberg-Matsson et al., 2000). An Rindern konnte festgestellt werden, dass nicht nur neuronale Anteile der Retina, sondern auch retinale Blutgefäße  $\alpha_1$ -adrenerge Bindungsstellen aufweisen (Forster et al., 1987). Dass in retinalen Arteriolen  $\alpha_1$ -AR existieren, durch die zudem eine Vermittlung von vasokonstriktiven Effekten erfolgt, haben verschiedene Studien an Augen von Kaninchen und Rindern herausgefunden (Ferrari-Dileo et al., 1990, Ichikawa et al., 2004). Versuche zur Bestimmung der mRNA-Expression an isolierten Arteriolen der Mausretina zeigten, dass die mRNA aller drei  $\alpha_1$ -AR in ähnlichem Ausmaß vorhanden war (Bohmer et al., 2014). Zudem kam dieselbe Studie zu dem Ergebnis, dass die Vermittlung der Vasokonstriktion in retinalen, endothelgeschädigten Arteriolen von den genutzten Mäusen trotz gleichmäßiger mRNA-Anteile, vornehmlich durch den Subtyp  $\alpha_{1B}$  erfolgte und nicht durch den  $\alpha_{1A}$ - und den  $\alpha_{1D}$ -ARST. Allerdings zeigten Versuche an retinalen Rattenarteriolen mit nicht geschädigtem Endothel, dass die Aktivierung des  $\alpha_{1A}$ - und des  $\alpha_{1D}$ -ARST durch Noradrenalin ebenfalls vasokonstriktive Wirkungen erzeugte (Mori et al., 2011). Eine gleichmäßige Verteilung der Subtypen-mRNA wurde zuvor schon in ophthalmischen Arterien der Maus festgestellt, auch wenn der  $\alpha_{1A}$ -ARST in solchen als Hauptauslöser der adrenergen Vasokonstriktion identifiziert werden konnte (Gericke et al., 2011). Trotz konkurrierender Studien wurde daraus geschlossen, dass die Funktion der glatten Muskelzellen in beiden Gefäßabschnitten möglicherweise durch unterschiedliche  $\alpha_1$ -ARST beeinflusst wird, obwohl sich die retinalen Arteriolen den ophthalmischen Arterien der Maus anatomisch direkt anschließen und somit unmittelbar miteinander verbunden sind (Bohmer et al., 2014).

Auf die Diskrepanz zwischen vorhandener Adrenozeptorproteine oder Subtyp-mRNA und qualitativer Relevanz der unterschiedlichen  $\alpha_1$ -ARST in Bezug auf die

Vermittlung einer Vasokonstriktion wurde auch in anderen Studien hingewiesen (Piascik et al., 1995, Piascik et al., 1997, Hrometz et al., 1999). Doch dass das Ausmaß der mRNA-Expression der verschiedenen  $\alpha_1$ -ARST mit deren funktionellem Anteil an der Vasokonstriktion oder deren Proteinlevel durchaus auch übereinstimmen kann, zeigten wiederum andere Studien (Hosoda et al., 2005, Martí et al., 2005, Jensen et al., 2009a).

### **2.8.1.3 Vasoaktive Wirkung von $\alpha_1$ -Adrenozeptoren**

Neben den bereits erwähnten vasoaktiven Wirkungen von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoragonisten konnte zusätzlich in vitro durch den Einsatz von  $\alpha_1$ -AR-Agonisten an isolierten retinalen Arterien von Rinderaugen das Auftreten vasokonstriktiver Effekte gezeigt werden (Hoste et al., 1989, Nielsen and Nyborg, 1989). In einer anderen Studie wurde an frisch enukleierten Rinderaugen die vasokonstriktive Wirkung des  $\alpha_1$ -AR-Agonisten Phenylephrin an retinalen Arterien in situ festgestellt, d.h. ohne eine der Isolierung retinaler Arterien dienenden Präparation, durch die eine vaskuläre Reaktion auf den Agonisten womöglich hätte beeinflusst werden können (Ferrari-Dileo et al., 1990). Auch an Schweinen wurde die Kontraktibilität isolierter retinaler Arterien – kanüliert in einem Mikroperfusionssystem - mittels Anwendung von Adrenalin und Noradrenalin untersucht, wobei im Vergleich zum intraluminalen Einsatz der extraluminale Einsatz von den  $\alpha_1$ -AR-Agonisten zu weniger groß ausgeprägten Kontraktionen geführt hat (Yu et al., 1994). Trotz der Ergebnisse dieser Studien, die für die Vermittlung von vasokonstriktiven Effekten durch  $\alpha_1$ -AR-Agonisten sprechen, liefern Studien an lebenden Menschen und Tieren kontroverse Hinweise darauf, ob der Tonus retinaler Blutgefäße und somit die retinale Durchblutung durch Katecholamine beeinflusst werden kann: einerseits konnte am Menschen festgestellt werden, dass die intravenöse Infusion von Noradrenalin eine Reduktion des Durchmessers retinaler Blutgefäße hervorruft, andererseits zeigte die Infusion von Noradrenalin in einer anderen Studie lediglich die nicht signifikante Senkung des retinalen Gefäßdurchmessers um ca. 3% (Dollery et al., 1963, Jandrasits et al., 2002). Auch die Auswirkung einer intravenösen Infusion von Phenylephrin auf den retinalen Gefäßdurchmesser wurde am Menschen in vivo untersucht, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die retinale Hämodynamik (Polak et al., 2000). An Katzen konnte durch intravaskulär verabreichtes Noradrenalin ebenso

wenig eine Wirkung auf die retinale Durchblutung beobachtet werden (Alm, 1972). Allerdings konnten bei Kaninchen in vivo mittels intravitrealer Injektionen von Phenylephrin Konstriktionen retinaler Arterien hervorgerufen werden, die durch den topischen Einsatz des selektiven  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten Bunazosin beseitigt wurden (Ichikawa et al., 2004). An lebenden Ratten konnte ermittelt werden, dass intravenös eingesetztes Noradrenalin vasokonstriktiv auf retinale Arteriolen durch Vermittlung der  $\alpha_{1A}$ - und  $\alpha_{1D}$ -ARST wirkt (Mori et al., 2011). Diese widersprüchlichen Ergebnisse bei einem exogenen Einsatz von  $\alpha_1$ -AR-Agonisten in vivo können mit der dabei auftretenden Änderung des systemischen Blutdrucks in Verbindung gebracht werden, weil die retinale Durchblutung von diesem beeinflusst werden kann, weshalb es fraglich ist, welche genaue Wirkung die Katecholamine auf die retinale Durchblutung – unabhängig vom systemischen Blutdruck – haben (Jandrasits et al., 2002). Zusätzlich kann eine konstante retinale Durchblutung bei angestiegenem systemischem Blutdruck auf eine in der Retina existierende Autoregulation zurückgeführt werden, die sich nur schwer von den Wirkungen der verwendeten Pharmaka abgrenzen lässt (Robinson et al., 1986, Jandrasits et al., 2002).

Bezüglich der Rolle der unterschiedlichen  $\alpha_1$ -ARST bei der Vermittlung von vasokonstriktiven Effekten in retinalen Gefäßen deutet die Studienlage auf eine wichtige Beteiligung der  $\alpha_{1A}$ - und der  $\alpha_{1D}$ -ARST hin (s.o.). Bei endothelgeschädigten Arteriolen hingegen scheint der  $\alpha_{1B}$ -ARST eine retinale Vasokonstriktion zu vermitteln (Bohmer et al., 2014). Somit lässt sich erschließen, dass  $\alpha_1$ -AR bzw. deren Subtypen einen Einfluss auf die retinale Durchblutung haben könnten, indem sie durch ihre Vermittlung den Vasotonus retinaler Gefäße zu modulieren vermögen.

## **2.8.2 Einfluss der okulären Durchblutung auf retinale Ganglienzellen**

Die Retina besitzt einen hohen Bedarf an Energie und weist, verglichen mit anderen Geweben des zentralen Nervensystems wie dem Hirn, einen höheren Energiemetabolismus auf (Anderson and Saltzman, 1964, Cohen, 1965, Ames Iii, 1992). Der hohe Energiebedarf in der Retina bedingt, dass sie einen ebenfalls sehr hohen Verbrauch an Sauerstoff hat, durch dessen Oxidation Energie erzeugt wird (Anderson, 1968). Die konstante Versorgung mit Sauerstoff ist essentiell für das Überleben von Zellen und für deren Funktion, da im Gewebe kein Speicher des

flüchtigen Sauerstoffs existiert, um die Zellen zu versorgen (Vanderkooi et al., 1991). Dass ein Sauerstoffmangel mit dem Glaukom assoziiert zu sein scheint, konnte in Studien festgestellt werden, bei denen eine erhöhte Immunfärbung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  im Gewebe von Retina und Sehnervenkopf von am Glaukom erkrankten Augen im Gegensatz zu gesunden Augen nachweisbar war und so auf hypoxische Bedingungen hindeutete (Tezel and Wax, 2004). Die Gewebehypoxie steht im Verdacht, einen Schaden an retinalen Ganglienzellen zu verursachen (Kitano et al., 1996, Rosenbaum et al., 1997, Li et al., 2018, Klemm et al., 2019). Es wird zudem angenommen, dass ein hypoxischer Insult die Folge von einer veränderten Blutversorgung des Sehnervenkopfs sein könnte (Osborne et al., 2001)

Die Veränderung der okulären Durchblutung wird auch in einem Zusammenhang mit der Pathogenese des Glaukoms gesehen (Flammer et al., 2002, Grieshaber and Flammer, 2005). So liefern mehrere Studien Hinweise darauf, dass bei Glaukumpatienten eine Reduzierung des Blutflusses in der Retina bzw. am Sehnervenkopf vorliegt (Michelson et al., 1996, Nicoleta et al., 1996, Chung et al., 1999, Sugiyama et al., 2000, Wang et al., 2011). Mithilfe von Studien an Affen, bei denen in vivo eine chronische Ischämie des Sehnervs erzeugt wurde, konnte ohne einen Anstieg des IOD gezeigt werden, dass neuronale Schäden des Sehnervs, gemessen an dem signifikanten Verlust der Axone von RGC, auftraten (Cioffi et al., 2004). Dabei erfolgte die Ischämie durch den verwendeten Vasokonstriktor Endothelin-1, dessen Einsatz auch bei ähnlichen Studien an Ratten scheinbar durch eine Beeinträchtigung des okulären Blutflusses zum Verlust von RGC und deren Axonen geführt hat (Chauhan et al., 2004). Es wird auch angenommen, dass ein Fortschreiten des Glaukoms mit einer veränderten Regulation des okulären Blutflusses verbunden ist (Gherghel et al., 2000). In einer Beobachtungsstudie an Glaukumpatienten konnte festgestellt werden, dass über einen Zeitraum von 18 Monaten hinweg eine fortschreitende Degeneration des Sehnervenkopfes erfolgte und gleichzeitig die Anzahl von nicht durchbluteten Retinaarealen anstieg (Tobe et al., 2015). Obwohl in derselben Studie die Reduktion des retinalen Blutflusses mit fortschreitenden glaukomatösen Degenerationen assoziiert wurde, konnte nicht ermittelt werden, ob die Beeinträchtigung des Blutflusses ursächlich für die Pathogenese der Glaukomerkrankung ist oder ob sie nur einen beitragenden Effekt zur Krankheit hervorruft (Tobe et al., 2015). Dass Veränderungen der okulären Durchblutung aber für das Entstehen einer glaukomatösen Erkrankung verantwortlich

gemacht werden können, konnte durch eine Studie gezeigt werden, in der an Patienten Neuerkrankungen am Glaukom nach 10 Jahren erhoben wurden (Kawasaki et al., 2013). Dabei korrelierte die Verkleinerung retinaler Gefäßdurchmesser mit einem langfristigen Risiko für typische glaukomatöse Schäden wie Gesichtsfeldverlusten bei erhöhtem Cup-to-disk-Verhältnis und Ausdünnung des Papillenrandes (Kawasaki et al., 2013).

Da  $\alpha_1$ -AR die retinale Durchblutung beeinflussen können und eine veränderte retinale Durchblutung zum Glaukom zu führen scheint, stellt sich die Frage, inwiefern  $\alpha_1$ -AR zum Überleben von RGC beitragen. Bisher wurde nicht untersucht, ob der KO von  $\alpha_1$ -AR Auswirkungen auf die Anzahl von RGC hat.

### 2.8.3 Signalweg bei Vasokonstriktion

$\alpha_1$ -AR sind hauptsächlich durch Pertussistoxin insensitive G-Proteine der Familie  $G_{q/11}$  mit dem Signalweg sekundärer Botenstoffe verbunden, was zur Aktivierung der Phospholipase C führt (Minneman, 1988, Wu et al., 1992). Diese Aktivierung führt bei allen Subtypen des  $\alpha_1$ -AR dazu, dass Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) gebildet werden.  $IP_3$  bindet an den  $IP_3$ -Rezeptor, wodurch Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird, während DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C führt (Minneman, 1988, Wu et al., 1992).

Erst nachdem im Zytoplasma die Bindung von Calcium an Calmodulin erfolgt, katalysiert der Calcium-Calmodulin Komplex die Aktivierung der Myosin-leichte-ketten-kinase, welche die Myosin-leichte-Kette in die phosphorylierte Form bringt und daraufhin eine Aktin-Myosin-Interaktion ausgelöst wird, was in der Kontraktion des glatten Gefäßmuskels resultiert (Liu and Khalil, 2018).

Neben der G-Protein vermittelten Signaltransduktion kann, wie Studien an der Ratte festgestellt haben, die Stimulation von  $\alpha_1$ -AR über die Aktivierung der Rho (Ras-Homolog)-Kinase zur Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur der Rattenschwanzarterie führen (Mueed et al., 2004). Weiter konnte an Rattenschwanzarterien bewiesen werden, dass mittels Rho-Kinase-Inhibitoren die durch nervale Stimulation ausgelöste Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur gehemmt wird (Yeoh and Brock, 2005). Am Vas deferens der Ratte konnte festgestellt werden, dass durch

Noradrenalin ausgelöste tonische Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur ebenfalls durch Rho-Kinase Inhibitoren verringert werden (Amobi et al., 2006).

Auch andere Mechanismen führen über die Aktivierung von  $\alpha_1$ -AR zur Auslösung einer Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur: der Eintritt von Calcium durch T- oder L-Typ Calcium-Kanäle aufgrund von Depolarisation oder der Eintritt von Calcium als Folge von direkter Stimulierung der Calcium-Kanäle (Chen and Rembold, 1995). So zeigte beispielsweise der Einsatz von T-Typ und L-Typ Calcium-Kanalblockern beim Vas deferens des Menschen das Auftreten reduzierter Kontraktionen, die durch Noradrenalin ausgelöst wurden (Amobi et al., 2010).

Die Aktivität der  $\alpha_1$ -AR kann durch  $\beta$ -Arrestin beeinflusst werden, indem es den Signalweg G-Protein gekoppelter Rezeptoren desensibilisiert, die Endozytose des Rezeptors bewirkt und den eigenen Signalweg fördert (Cahill et al., 2017). Dabei spielt die Phosphorylierung des Adrenozeptors durch G-Protein gekoppelte Kinasen eine wichtige Rolle, da  $\beta$ -Arrestin den phosphorylierten Rezeptor erkennt und an ihn bindet (Shenoy and Lefkowitz, 2011, Rajagopal and Shenoy, 2018). Bezogen auf die Subtypen des  $\alpha_1$ -AR konnte festgestellt werden, dass der  $\alpha_{1A}$ -ARST am geringsten phosphoryliert wird, und dass die Phosphorylierung des  $\alpha_{1D}$ -ARST in Rattenfibroblasten durch die von Noradrenalin angetriebene Aktivierung der Proteinkinase C und Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren zustande kommt (García-Sáinz et al., 2001). Insofern wird durch die Desensitivierung gewährleistet, dass eine übermäßige Erregung des Rezeptors verhindert wird und bietet dadurch Schutz vor unkontrolliertem Zellwachstum oder potentiellen Zellschäden (Rajagopal and Shenoy, 2018).

Neben der Phosphorylierung werden auch Rab-Proteine mit der Regulation von  $\alpha_1$ -AR in Verbindung gebracht, da diese Proteine den vesikulären Transport modulieren und Einfluss auf die Bewegungen der  $\alpha_1$ -AR bei der Internalisierung und dem Transport zur Plasmamembran nehmen können (Filipeanu et al., 2006, Castillo-Badillo et al., 2015, Alfonzo-Mendez et al., 2017).

#### **2.8.4 $\alpha_1$ -Adrenozeptoren im zentralen Nervensystem**

Obwohl in Studien sowohl die Existenz von  $\alpha_1$ -AR im ZNS als auch deren dortige Funktionen bereits untersucht worden sind, liegt ein Mangel an Informationen

bezüglich der Einflüsse von  $\alpha_1$ -AR auf RGC vor, die auch einen Teil des ZNS darstellen.  $\alpha_1$ -AR kommen in vielen Regionen des ZNS vor, und die Verbreitung der unterschiedlichen Subtypen weist auf deren Funktionen hin. Dabei wurde die Erforschung der  $\alpha_1$ -AR insofern erschwert, als es keine subtyp-selektiven Liganden und nur schwache Antikörper gibt, deren Verwendung zur Lokalisierung oder Quantifizierung der  $\alpha_1$ -ARST-Proteine nicht verlässlich ist (Jensen et al., 2009b). Dennoch wurde bereits früh der Einsatz eines Antikörpers an der Ratte zur Unterscheidung zwischen dem  $\alpha_{1A}$ - und dem  $\alpha_{1B}$ -AR in verschiedenen Gehirnregionen verwendet und führte zu der Feststellung, dass beide Subtypen im Cortex vorhanden sind, jedoch im Hippocampus der  $\alpha_{1A}$ , und der  $\alpha_{1B}$  im Thalamus vorherrscht (Wilson and Minneman, 1989). Das Vorhandensein speziell der Expression von  $\alpha_{1A}$ -ARST-mRNA im Rattenhirn wurde mithilfe von in situ Hybridisierung untersucht und lieferte Hinweise darauf, dass in vielen Teilen des Hirns eine hohe Expression der mRNA vom  $\alpha_{1A}$ -ARST vorhanden ist (Domyancic and Morilak, 1997). Zusätzlich zur mRNA des Subtyps  $\alpha_{1A}$ , wurde auch die mRNA-Expression der Subtypen  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$  mittels in situ Hybridisierung in vielen Regionen des ZNS der Ratte erfasst und deutete an, dass die Subtypen aufgrund der festgestellten weiten bzw. unterschiedlichen Verteilung der mRNA, unterschiedliche Funktionen im ZNS zu haben scheinen (Day et al., 1997). Obwohl durch Methoden der in situ Hybridisierung nur die mRNA Expression erfasst wird, und daher durch Methoden zur Proteinanalyse ergänzt werden sollte, liefern Studien, welche die mRNA Expression von AR untersuchen, mehr Hinweise auf deren Verteilung im ZNS (Pupo and Minneman, 2001). In einer Studie zur Quantifizierung der Expression von  $\alpha_1$ -ARST-mRNA in verschiedenen Rattengeweben konnte mithilfe von reverser Transkription und kompetitiver Polymerasekettenreaktion festgestellt werden, dass in vielen Geweben – nicht aber der Großhirnrinde – die Expression der mRNA eines  $\alpha_1$ -ARST überwiegt (Scofield et al., 1995). Somit scheint die Verbreitung von mRNA der  $\alpha_1$ -ARST im Gehirn der Ratte, je nach Region, sehr variabel zu sein. Die Verteilung und Bindungseigenschaften von  $\alpha_1$ -AR im Hirn wurde zwischen mehreren kleinen Säugetieren und Primaten verglichen, und die Ergebnisse deuten an, dass die regionale Verteilung je nach Spezies unterschiedlich ist, jedoch im Gegensatz dazu die  $\alpha_1$ -AR in allen Hirngewebe der Säugetiere und des Menschen hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften eine große Ähnlichkeit haben (Palacios et al., 1987). So war bei Primaten die Dichte an  $\alpha_1$ -AR in Teilen des Hippocampus, vor allem im Gyrus dentatus, CA3 und CA4 deutlich größer, im

Vergleich zu den Nagetieren (Palacios et al., 1987). Im Hippokampus konnte beim Menschen eine unterschiedliche Verteilung der  $\alpha_1$ -AR mittels quantitativer Autoradiographie festgestellt werden, wobei im Stratum lucidum und Hilus des CA3 eine Konzentration des Subtyps  $\alpha_{1A}$  zu sein scheint, und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus eine größere Dichte des Subtyps  $\alpha_{1B}$  (Zilles et al., 1991). Im Widerspruch dazu existieren Studien, die keine nachweisbare Expression von mRNA des  $\alpha_{1B}$ -ARST im menschlichen Hippocampus festgestellt haben und andeuten, dass eine Antikörperbindung nur am  $\alpha_{1A}$ -ARST stattfindet (Szot et al., 2005). Auch bei der versuchten Bindung von  $\alpha_{1D}$ -ARST im Hippocampus mithilfe des Antikörpers  $^3\text{H}$ -Prazosin hat sich dessen Verwendung als problematisch erwiesen, denn obwohl Prazosin bei der verwendeten Konzentration ein nicht-selektiver  $\alpha_1$ -AR-Antagonist ist, konnte er keine der Regionen kenntlich machen, in denen mRNA-Expressionen des  $\alpha_{1D}$ -ARST festgestellt wurden (Szot et al., 2005).

Vielversprechender als der Einsatz von wenig-selektiven Antikörpern und Liganden bei der Untersuchung der Verteilung und Funktionen von  $\alpha_1$ -AR sind genmanipulierte Mäuse. Papay et al. konnten so am Mäusehirn feststellen, wo  $\alpha_1$ -ARST zellulär lokalisiert sind, indem sie transgene Mäuse nutzten, deren überexprimierte  $\alpha_{1B}$ -AR mit verstärktem fluoreszierendem Protein (enhanced fluorescent protein, EGFP) fusioniert wurden (Papay et al., 2004). Neben dem überwiegenden Vorkommen von  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptoren in Neuronen vieler Gehirnregionen, kommen sie auch in NG2 Oligodendrozyten-Vorläuferzellen vor, wie die Ergebnisse zeigten. Auch die zelluläre Lokalisation des  $\alpha_{1A}$ -ARST im Mäusehirn wurde von Papay et al. mit ähnlichen Methoden ermittelt und ergab, dass der  $\alpha_{1A}$ -ARST – wie der Subtyp  $\alpha_{1B}$  – in Neuronen und NG2 Oligodendrozyten-Vorläuferzellen vorzufinden ist (Papay et al., 2006). Zusätzlich zeigte sich, dass der  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor noch in GABAergen Ineruronen existent ist. In keiner der beiden von Papay et al. durchgeführten Studien gab es Beweise dafür, dass die in peripheren Blutgefäßen typischerweise vorkommenden  $\alpha_{1A}$ - und  $\alpha_{1B}$ -ARST, auch in zerebralen Blutgefäßen vorzufinden sind (Papay et al., 2006).

#### **2.8.4.1 Einfluss von $\alpha_1$ -Adrenozeptoren auf die zerebrale Neurogenese**

Mit der weiten Verbreitung von  $\alpha_1$ -AR im Gehirn kommen ihnen dort auch Funktionen zu, deren Erforschung dadurch erschwert wurde, dass keine spezifischen Antikörper und Liganden zur Verfügung stehen. Dennoch ist es mithilfe von genmanipulierten

Mäusen gelungen, neue Erkenntnisse beim Erforschen neuronaler Funktionen der  $\alpha_1$ -AR zu erzielen (Gupta et al., 2009). So konnte festgestellt werden, dass bei neugeborenen Mäusen  $\alpha_1$ -AR die Differenzierung von Vorläufern einer Neurosphäre zu katecholaminergen Interneuronen und Neuronen regulieren und dies abhängig von der Entwicklung zu sein scheint, da bei adulten Mäusen ein Wechsel hin zur Regulation der Gliazellendifferenzierung erfolgt (Gupta et al., 2009). Die Studie stellte heraus, dass bei der Stimulation von  $\alpha_1$ -AR die neuronale Differenzierung durch den Phosphoinositid-3-Kinase Signalweg gesteuert wird, der die Apoptose von Neuronen verhindert. Somit konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_1$ -AR einen Einfluss auf die Regulation der Apoptose von neonatalen neuronalen Vorläufern haben. Daneben konnte in der Studie mittels Echtzeit Polymerasekettenreaktion bewiesen werden, dass  $\alpha_1$ -AR die mRNA von solchen Schlüsseltranskriptionsfaktoren regulieren, die bei der neuronalen Reifung mitwirken. Mithilfe der genmanipulierten Mäuse konnten in der subventrikulären Zone Zellen erfasst werden, die speziell  $\alpha_{1A}$ -ARST exprimierten und eine Koexpression von neuronalen Stammzell- oder Vorgängermarkern aufwiesen. Sowohl in genmanipulierten als auch normalen Mäusen führte die Stimulierung von  $\alpha_{1A}$ -AR zu einer erhöhten Proliferation in neurogenen Bereichen, gemessen an der zunehmenden Anzahl von Zellen, die Bromdesoxyuridin als Marker proliferierender Zellen inkorporierten. Die Ergebnisse deuten daher auf die Expression der  $\alpha_{1A}$ -AR in neuronalen Stammzellen und Vorläufern hin, deren Proliferation der Regulierung durch  $\alpha_{1A}$ -AR unterliegt (Gupta et al., 2009). Im Vergleich zum  $\alpha_{1A}$ -AR konnte keine Expression des  $\alpha_{1B}$ -AR in der subventrikulären Zone adulter Mäuse gefunden werden, dafür aber im rostralen migratorischen Strom. Außerdem scheinen  $\alpha_{1B}$ -AR bei der Neurogenese in späteren Stadien der neuronalen Reifung relevant zu sein, da sie für diese Stadien typische proneurale Transkriptionsfaktoren regulierten, wie Ergebnisse der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion zeigten.

Darüber hinaus lassen Studien indirekt auf eine mögliche Beeinflussung der Neurogenese durch  $\alpha_1$ -AR schließen, da deren Aktivierung zum mRNA-Anstieg des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) führt (Gonzalez-Cabrera et al., 2003), wobei VEGF wiederum eine Zunahme der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen stimuliert (Jin et al., 2002, Gupta et al., 2009).

Der Einfluss von  $\alpha_1$ -AR auf die Neurogenese wurde auch mithilfe des  $\alpha_1$ -AR Antagonisten Tamsulosin untersucht (Kim et al., 2017). Tamsulosin wird eigentlich zur

Behandlung von benigner Prostatahypertrophie eingesetzt, wobei es die Fähigkeit hat, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und an den  $\alpha_1$ -AR des ZNS zu wirken (Sirvio and MacDonald, 1999, Hellstrom and Sikka, 2006). Vor diesem Hintergrund wurde in Studien bei der Untersuchung des zentralen Einflusses von Tamsulosin gezeigt, dass der  $\alpha_1$ -AR-Antagonist hemmend auf die neuronale Aktivierung in neuronalen Entleerungszentren der Ratte wirkt und so die Entleerung fördert (Kim et al., 2012). Zudem wurden dem  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten gedächtnisverbessernde Effekte nachgewiesen (Kim et al., 2015). Die Gedächtnisschädigung hingegen bei Ratten durch das Altern weist einen Zusammenhang mit im Hippocampus gesteigerter Apoptose und verminderter Neurogenese auf (Kim et al., 2010). In der Studie von Kim et al. konnte an gealterten Ratten gezeigt werden, dass Tamsulosin einen positiven Einfluss auf die Neurogenese und die Apoptose hat, und somit das altersbedingt geschädigte Gedächtnis und Lernen der Ratten verbessern kann (Kim et al., 2017). Dabei führte die Behandlung mit Tamsulosin zu erhöhter Expression von BDNF und der Tyrosinkinase B (TKB), durch die die Neurogenese im Hippocampus der gealterten Mäuse gefördert wurde und die Apoptose abnahm (Kim et al., 2017). Schon in einer früheren Studie von Kim et al. wurde ein Zusammenhang hergestellt zwischen der verringerten Neurogenese bei gealterten Mäusen und der reduzierten Expression des BDNF und des TKB in deren Hippocampus (Kim et al., 2010). Der BDNF ist ein Protein der Neurotrophin-Familie und vermittelt verschiedene neuronale Prozesse, wie das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und retinalen Ganglienzellen und ist an der Neurogenese und der synaptischen Plastizität beteiligt (Ohira and Hayashi, 2009, Allen et al., 2013, Numakawa et al., 2018). Somit kann daraus geschlossen werden, dass ein  $\alpha_1$ -Antagonismus, wie er beispielsweise durch Tamsulosin erzeugt wurde, eine Zunahme der BDNF-Expression bewirkt, und dies positive Effekte auf RGC haben könnte. Bereits *in vitro* führte BDNF zum verbesserten Überleben retinaler Ganglienzellen der Ratte (Johnson et al., 1986). Zudem zeigten Studien die Expression des BDNF-Rezeptors Tyrosin-Rezeptor-Kinase B (TrkB) in RGC der Ratte (Jelsma et al., 1993). *In vivo* konnte mithilfe von intravitrealen Injektionen von BDNF das Überleben axotomierter RGC gefördert werden (Mey and Thanos, 1993). Die Blut-Retina-Schranke ist der Blut-Hirn-Schranke im Vergleich ähnlich (Steuer et al., 2005). Die Barriere schränkt die Abgabe von BDNF an die Retina nach periokularer und systemischer Applikation ein, ermöglicht aber gleichzeitig auch das Umgehen

einer nicht erwünschten systemischen Verabreichung, beispielsweise mittels intravitrealer Injektion (Khalin et al., 2015).

#### **2.8.4.2 Einfluss von $\alpha_1$ -Adrenozeptoren auf die Neurodegeneration**

Der neuronale Einfluss von  $\alpha_1$ -AR ist je nach Subtyp unterschiedlich; neben Forschungsergebnissen, die darauf hindeuten, dass der  $\alpha_{1A}$ -ARST der Maus, wegen des Auslösens von Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen, neurogenesefördernde Eigenschaften besitzt (Gupta et al., 2009), existieren Untersuchungen, die eine apoptotische Neurodegeneration - vermittelt durch eine systemische Überstimulierung von  $\alpha_{1B}$ -AR – im Gehirn festgestellt haben (Zuscik et al., 2000). So konnten unter Verwendung transgener Mausmodelle, bei denen eine Überexpression entweder von Wildtyp oder konstitutiv aktiven  $\alpha_{1B}$ -AR in für den Rezeptor typischen Geweben, einschließlich des Hirns, erzeugt wurde, Zusammenhänge zwischen neurodegenerativen Prozessen und der  $\alpha_{1B}$ -AR-Signalisierung aufgedeckt werden (Zuscik et al., 2000). Zusätzlich zu der umfassenden apoptotische Neurodegeneration im Gehirn, die durch die chronische übermäßige Aktivierung der  $\alpha_{1B}$ -AR-Signalisierung herbeigeführt wurde, wiesen die verwendeten transgenen Mäuse Symptome der Multisystematrophie auf; der  $\alpha_1$ -AR-Signalisierung wurde ein möglicherweise direkter Beitrag in der Entstehung der Symptome beigemessen, weil diese durch den selektiven  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten Terazosin teilweise aufgehoben werden konnten (Zuscik et al., 2000). Die zerebrale Neurodegeneration zeigte sich bei 10 Monate alten Mäusen im Cortex und in anderen Bereichen, wo der  $\alpha_{1B}$ -ARST in hoher Dichte exprimiert ist, wie dem Hypothalamus, dem Thalamus und dem Zerebellum, histologisch in Form von granulovakulären Degenerationen (Zuscik et al., 2000). Diese Degenerationen waren bei älteren Mäusen (18 - 21 Monate) ausgeprägter, da sie einschließlich des Locus coeruleus, des ventralen Tegmentums und der Substantia nigra, im gesamten Hirn auftraten (Zuscik et al., 2000). Mittels Prüfung der Tyrosin-Hydroxylase-Immunreaktivität konnte in der Substantia nigra die Auswirkung der übermäßigen Aktivierung der  $\alpha_{1B}$ -AR-Signalisierung histologisch dargestellt werden und ergab, dass die transgenen Mäuse eine Reduktion der Tyrosin-Hydroxylase-Immunreaktivität aufwiesen, und bei einer stärkeren Vergrößerung ersichtlich, weniger axonale Fortsätze und Neuronenzellkörper vorhanden waren (Zuscik et al.,

2000). Da die Tyrosinhydroxylase für die Bildung von Dopamin notwendig ist und dessen Mangel charakteristisch für Parkinson ist, stimmte der festgestellte Mangel an Tyrosinhydroxylase mit den parkinsonähnlichen Symptomen der transgenen Mäuse überein (Haavik and Toska, 1998, Zuscik et al., 2000). Zuscik et al. nehmen an, dass die initiale apoptotische Degeneration  $\alpha_{1B}$ -spezifisch sein muss, da sie ansonsten nicht deren Abhängigkeit von der  $\alpha_1$ -AR-Signalisierung mittels Terazosin festgestellt hätten, und die Degeneration erst im Verlauf mit ihrer Ausbreitung einen nichtspezifischen Charakter erhält (Zuscik et al., 2000).

Des Weiteren kann aufgrund der verursachten Modulation von Rezeptoren anderer Neurotransmitter wie Glutamat durch  $\alpha_1$ -AR, oder GABA und N-Methyl-D-Aspartat durch Noradrenalin eine indirekte Beteiligung der  $\alpha_1$ -AR in Betracht gezogen werden (Beani et al., 1986, Ivanov and Aston-Jones, 1995, Kirkwood et al., 1999).

Die molekularen Mechanismen der zentralen Effekte, die durch die Aktivierung von  $\alpha_{1B}$ -AR vermittelt werden, wurden mittels Oligonukleotid-Mikroarrays analysiert, um Genexpressionsprofile zwischen normalen und  $\alpha_{1B}$ -AR überexprimierenden Mäusen in Relation zu setzen (Yun et al., 2003). Dabei konnten anhand der Ergebnisse Änderungen in der Genexpression bestimmter Gene identifiziert werden, die bei der Apoptose, der Glutamat- und Calciumregulation, der Neurodegeneration, der Neurotransmission, dem Transport synaptischer Vesikel und dem Zellwachstum eine Rolle spielen (Yun et al., 2003). Überdies konnte eine Rezeptor-Dysregulation aufgrund der angestiegenen Expression des exzitatorischen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors und der verringerten Expression des inhibitorischen GABA-Rezeptors festgestellt werden; es wird vermutet, dass diese Dysregulation neben der Genexpression mit Proteinprodukten der Apoptose die Ursache für die Neurodegeneration im Hirn der Mäuse, die den  $\alpha_{1B}$ -AR überexprimierten, gewesen zu sein scheint (Yun et al., 2003). In einer anderen Studie wurde bereits gezeigt, dass der G-Protein gekoppelte Parathormon-Rezeptor eine Apoptose mittels Gq/Phospholipase C verursacht (Turner et al., 2000) und den gleichen Signalweg des  $\alpha_{1B}$ -AR darstellt. Auch am Herzen konnten durch Gq-Überexpression und somit angestiegener Gq-Signalisierung apoptotische Prozesse festgestellt werden (Adams et al., 1998). Bezüglich der von den transgenen Mäusen erlittenen epileptischen Anfälle weisen Yun et al. in ihrer Studie auf ein Glutamatungleichgewicht als Auslöser hin, das bedingt ist von der Kolokalisation des  $\alpha_{1B}$ -AR-Subtyps mit glutamatergen Rezeptoren (Yun et al., 2003).

In einer weiteren Studie, die sich mit der Pathologie der durch Überexpression des  $\alpha_{1B}$ -AR hervorgerufenen Neurodegeneration befasst, deuten die Ergebnisse auf eine Synucleinopathie als mögliche Ursache für die mit der Neurodegeneration assoziierten parkinsonähnlichen Symptome hin (Papay et al., 2002). So konnte mittels immunhistochemischer Methoden bei den transgenen Mäusen, die eine Überexpression des  $\alpha_{1B}$ -AR aufwiesen, eine angestiegene abnorme Akkumulation des Proteins  $\alpha$ -Synuclein in Einschlusskörpern und in Kollokalisierung mit Neuronen und Oligodendrozyten in unterschiedlichen Hirnregionen festgestellt werden (Papay et al., 2002). Auch eine Langzeittherapie mit dem  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten Terazosin wurde an Mäusen getestet und ergab, dass die Langzeittherapie vor Verlust von Neuronen und parkinsonähnlichen Symptomen, sowie Bildung von  $\alpha$ -Synuclein-positiver Einschlusskörper schützt (Papay et al., 2002).

Bemerkenswerterweise konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die chronische Aktivierung von  $\alpha_{1B}$ -AR bei Mäusen zu einer Reduzierung der Lebensdauer führt und eine gesteigerte Neurodegeneration als Ursache dafür vermutet wird (Collette et al., 2014). Dagegen lebten solche transgenen Mäuse länger, die eine Langzeitstimulation von  $\alpha_{1A}$ -AR erfahren haben (Doze et al., 2011).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

Tabelle 1: Verwendete Materialien bei den Versuchen

Name	Hersteller
Alexa Fluor™ 568 donkey anti-goat IgG (H+L)	Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA
Antibody Goat Brn-3a (C-20): sc-31984	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE
Deckgläser	Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig, DE
Einmalkanüle 25G Microlance™	Becton Dickinson, Irland
Filterpapier Whatman™	GE Healthcare, UK
Formaldehydlösung	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Gefrierschrank, -80°C	Heraeus, Hanau, DE
Gibco® PBS pH 7.4	Invitrogen Limited, Paisley, UK
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Homogenisator FastPrep	MP Biomedicals, Frankreich
Icare® TONOLAB Tonometer	Bon Optic, Lübeck, DE
ImageJ 1.52q	Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, USA
Kohlendioxidflasche	Air Liquide Medical, Düsseldorf, DE
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop Vanox-T	Olympus Optical Co., Hamburg, DE
Nikon Camera Head DS-Fi1	Nikon GmbH, Düsseldorf, DE
Nikon Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf, DE
Nikon Intensilight Epi-fluorescence Illuminator C-HGFI	Nikon GmbH, Düsseldorf, DE
Nikon Mikroskop Camera DS-Fi1	Nikon GmbH, Düsseldorf, DE
NIS Elements 4.10	Nikon Laboratory Imaging, Niederlande
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig, DE

Papiertücher professional	Kimberly-Clark®, Surrey, UK
RNeasy Kit	QIAGEN, Hilden, DE
RT-PCR Kit	Promega, Mannheim, DE
Safe-Lock Tubes 2.0 mL	Eppendorf Tubes, Hamburg, DE
SYBR Green master mix	QIAGEN, Hilden, DE
Triton X-100	Sigma®, St. Louis, USA
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, USA
ViiA™ 7 System	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Zellkulturschale	Becton Dickinson, Irland

## 3.2 Tiere

Die Tierversuche wurden vom rheinland-pfälzischen Tierschutzausschuss genehmigt und alle an den experimentellen Verfahren beteiligten Tiere wurden gemäß den Institutsrichtlinien für Tierpflege behandelt. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, um die Anzahl der verwendeten Tiere zu verringern und das Leiden der Tiere zu minimieren.

Die Vervielfältigung von  $\alpha_{1A}\text{-AR}^{-/-}$ ,  $\alpha_{1B}\text{-AR}^{-/-}$  und  $\alpha_{1D}\text{-AR}^{-/-}$  wurde bereits zuvor beschrieben (Cavalli et al., 1997, Rokosh and Simpson, 2002, Tanoue et al., 2002b). Bei jedem Genotyp fand eine Rückkreuzung für neun Generationen mit C57BL/6Slc-Mäusen statt und alle Genotypen waren mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6Slc kongen. Für die Experimente wurden Mäuse mit einem Alter von einem bis sechs Monaten verwendet, denen jeweils einer der drei  $\alpha_1\text{-ARST}$  fehlte und altersangepasste Wildtypmäuse des genetischen Hintergrunds C57BL/6Slc dienten als Kontrolle.

Der Genotyp jeder Maus wurde durch PCR isolierter DNA bestimmt, die bei Schwanzbiopsien gewonnen wurde.

Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen (hell/dunkel-Zyklus 12h, Temperatur  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 10\%$ ) gehalten und hatten freien Zugang zu Leitungswasser und Standard-Mäusefutter.

Insgesamt wurden 32 Mäuse - jeweils 8 pro Gruppe - für die Färbung verwendet.

## 3.3 Messung des Intraokular drucks

Der IOD der untersuchten Mäuse wurde bei deren Bewusstsein und nicht invasiv gemessen. Dazu wurde das Icare® TONOLAB Tonometer (Bon Optic, Lübeck, Deutschland) verwendet, das speziell bei der Untersuchung von Nagetieren wie der Ratte und der Maus ohne Anästhesie zum Einsatz kommt (Morris et al., 2006). Auf diese Weise wurde es möglich, auf eine Anästhesie zu verzichten und deren hypotensive Wirkung zu vermeiden (Johnson et al., 2008). Außerdem entsprechen die per TONOLAB gemessenen IOD-Werte an der Maus den manometrisch gemessenen Werten adäquat (Pease et al., 2006, Saeki et al., 2008). Die Messungen des IOD wurden morgens durchgeführt, um Stress und Beeinflussung des IOD durch den zirkadianen Rhythmus zu verhindern. Bei der Messung wurde

das Tonometer in horizontaler Position an das Auge der Maus herangeführt, bis der Kontakt mit einem zentralen Punkt der Kornea hergestellt wurde. Nachdem sechs Einzelmessungen pro Auge in dieser Position durchgeführt wurden, konnte der Mittelwert der letzten vier Einzelmessungen desselben Auges auf dem Display abgelesen werden.

## **3.4 Immunhistochemie**

### **3.4.1 Entnahme der Augen**

Alle Mäuse wurden durch Kohlenstoffdioxid erstickt und es erfolgte eine sofortige E nukleation. Die Augen wurden nach der Entnahme für 25 Minuten in jeweils einem 2 ml Eppendorfgefäß (engl. Eppendorf Tube®) mit 500 µl PFA (Paraformaldehyd) 4% fixiert und anschließend mit PBS (phosphate-buffered saline) gewaschen. Sie wurden dann in 500 µl PBS belassen, bis die Isolation der Netzhäute maximal zwei Tage nach E nukleation erfolgte.

### **3.4.2 Isolation des Retina-Ganzpräparats**

Zu Beginn der Isolation einer Retina in einer mit PBS gefüllten Petrischale unter dem Mikroskop (Vanox-T, Olympus Optical Co, Hamburg, Germany) wurde das Auge am Nervus opticus mit einer Mikropinzette festgehalten, um danach mit einer spitzen Einmalkanüle durch die Kornea zentral Richtung Pupille zu stechen. Auf diese Weise wurde ein Zugang für eine Mikroschere geschaffen, mit der am Limbus entlang geschnitten, und so die Kornea entfernt werden konnte. Nachdem auch die Iris und die Linse entfernt wurden, wurden Sklera und Choroidea radial eingeschnitten, sodass sie anschließend von der Retina mit einer Mikropinzette getrennt werden konnten. Auch das Pigmentepithel und der Glaskörper wurden mittels Mikropinzette von dem Retina-Ganzpräparat entfernt.



Abbildung 1: Foto von einem Mausauge in mit PBS gefüllter Petrischale. Das Auge wird mithilfe der Mikropinzette an Bindegewebsresten stabilisiert, sodass der dorsale Pol mit der Eintrittsstelle des Sehnervs nach oben, und die Kornea nach unten zeigt.

### 3.4.3 Flatmounting der Retina

Um die Flatmounts vorzubereiten, erfolgten vier radiale Entlastungsschnitte von den Rändern des Retina-Ganzpräparats aus, sodass vier etwa gleich große zusammenhängende Quadranten entstanden. So konnte die Retina mit nach oben gerichteter Ganglienzellschicht flach auf einen Objektträger ausgebreitet und von diesem in ein 2 ml Eppendorfgefäß übertragen werden. In diesem wurde die Retina zweimal für 10 Minuten mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und danach ein weiteres Mal zur Fixierung und zusätzlichen Entfernung des Glaskörpers in 500  $\mu$ l PFA 4% für 20 Minuten belassen.

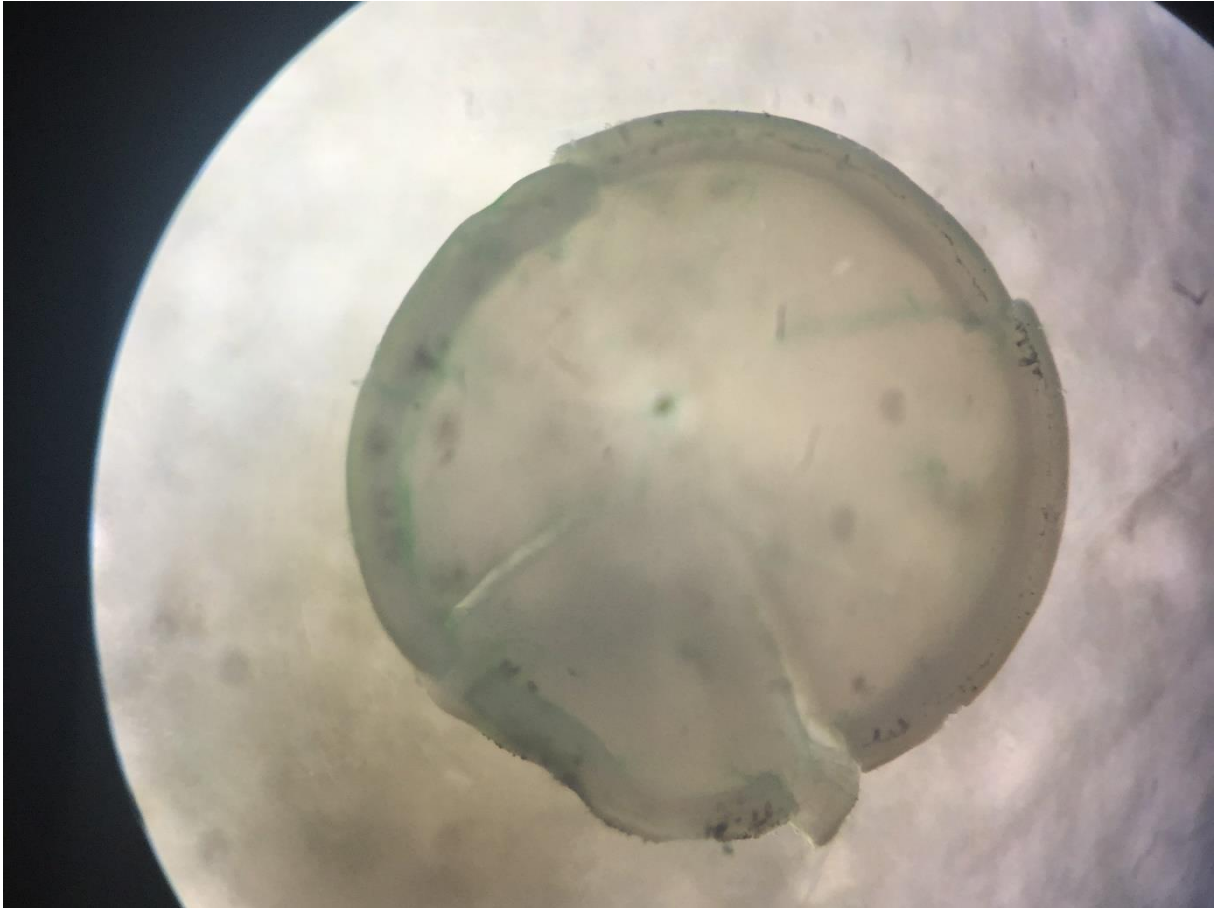


Abbildung 2: Isolierte Retina mit vier radialen, gegenüberliegenden Schnitten  
Die Schnitte dienen der Entlastung und sind notwendig, um die Retina flach als Flatmount auf dem Objektträger zu platzieren.



Abbildung 3: Platzierung der Retina als Flatmount auf dem Objektträger

#### 3.4.4 Immunhistochemische Färbung von retinalen Ganglienzellen

Die Netzhäute wurden in den Eppendorfgefäßen erneut zweimal für 10 Minuten mit PBS (500 µl) gewaschen und danach in 10% FKS (Fetales Kälberserum) in PBS mit 0,3% Triton-X-100 permeabilisiert, indem sie für eine Stunde bei - 80°C gefroren und darauffolgend eine Stunde bei Raumtemperatur belassen wurden. Durch das Einfrieren wurde eine effizientere Wirkung des Tensids Triton-X-100 erzielt. Anschließend erfolgte zweimal 10 Minuten langes Spülen mit jeweils neuem PBS und die Zugabe des primären Antikörpers Brn3a (C-20):sc-31984 (brain-specific homeobox/POU domain protein 3A; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), durch den die RGC identifiziert werden (Nadal-Nicolás et al., 2009). Die Netzhäute wurden mit dem Antikörper in einer Mischung im Verhältnis von 1:250 in 10% FKS in PBS über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Netzhäute zweimal 10 Minuten mit PBS (500 µl) gewaschen und 30 Minuten in 10% FKS in PBS mit 0,3% Triton-X-100 bei

Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss wurde im Dunkeln der sekundäre Antikörper Alexa Fluor™ 568 donkey anti-goat IgG (H+L) (Life Technologies Corporation, USA) im Verhältnis 1:400 in 10% FKS in PBS hinzugegeben und die Netzhäute für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte zweimal eine 10 Minuten lange Waschung der Netzhäute mit neuem PBS, bevor sie in eine Zellkulturschale mit PBS übertragen und mit der Ganglienzellschicht flach nach oben zeigend jeweils auf einen Objektträger ausgebreitet wurden (Ullmann et al., 2012). Nun wurde das PBS auf dem Objektträger um die Retina mit einem Papiertuch entfernt, um das Eindeckmedium (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, USA) inklusive Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zur Anfärbung der Zellkern-DNA auf die Retina zu pipettieren. Schließlich wurde der Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt und vor Licht geschützt.

#### 3.4.5 Quantitative Netzhautanalyse

Als Nächstes wurden die Netzhäute unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS 100, Nikon GmbH, Düsseldorf, DE) untersucht und Fotos angefertigt. Dazu wurden pro Retina 16 vordefinierte Bereiche, acht periphere und acht zentrumsnahe, jeweils mit einer Größe von 320 µm x 430 µm bei einer 20-fachen Objektiv-Vergrößerung und numerischer Apertur von 0,40 abfotografiert. Für jeden der vier Quadranten eines Flatmounts wurden erst zwei periphere und dann zwei zentrumsnahe Bereiche fotografiert, deren Flächen sich nicht überschneiden. Damit ergab sich eine von der Retina fotografierte Fläche von insgesamt 2,2 mm<sup>2</sup>. Es wurden von einer Kameraposition aus immer zwei Fotos von demselben Bereich mit jeweils unterschiedlichem Filter aufgenommen. So diente der TRITC-Filter (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat, Exzitation: 545-565 nm, Emission: 580-620 nm) der Fluoreszenzmarkierung der RGC durch den Marker Brn3a (s. Abbildung 4). Der DAPI-Filter (Exzitation: 385-400 nm, Emission: 450-465 nm) hingegen erfasste alle mit DAPI markierten Zellen (s. Abbildung 5).

Auf jedem Foto wurden die Zellen manuell mithilfe der Software ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) gezählt und die Anzahl auf einen Quadratmillimeter hochgerechnet.

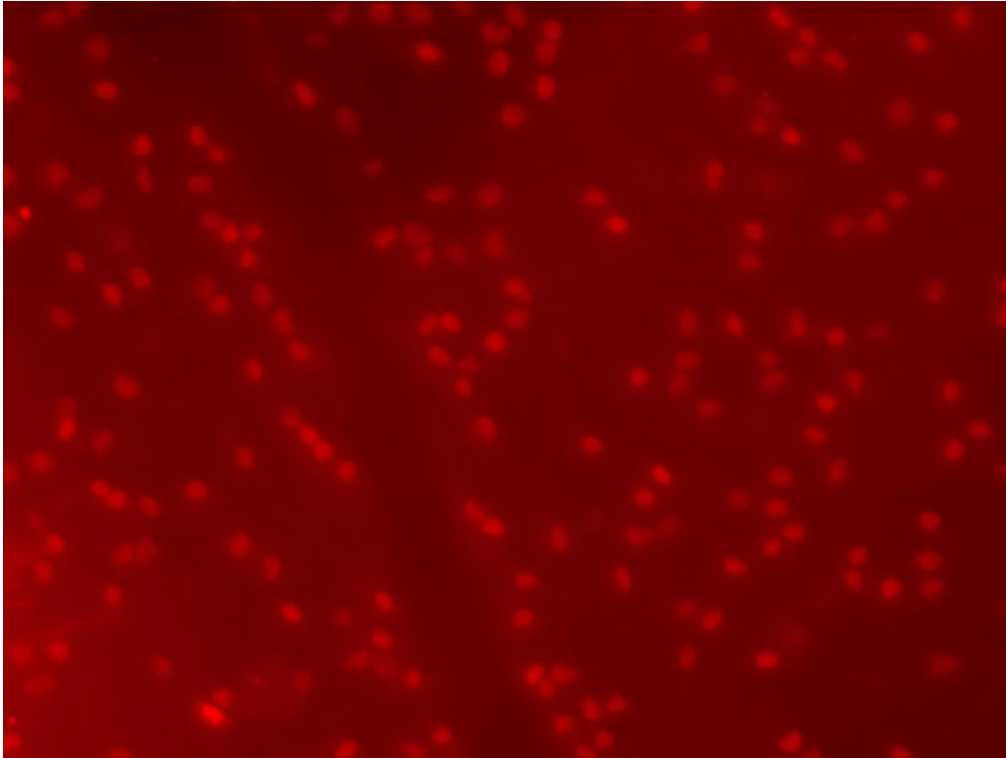


Abbildung 4: TRITC-Filter Foto von RGC, die mit Brn3a markiert wurden

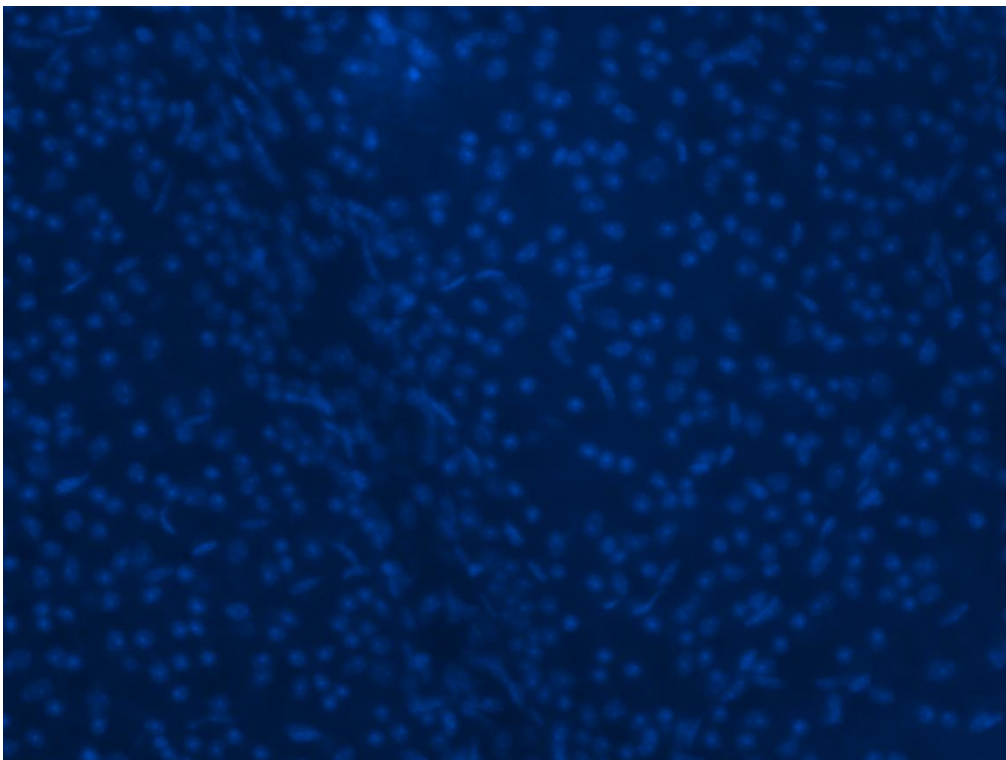


Abbildung 5: DAPI-Filter Foto von Zellkernen, die mit DAPI markiert wurden  
Dargestellt ist derselbe Ausschnitt der Retina wie in Abbildung 4.

### 3.5 Quantitative Echtzeit PCR-Analyse

Nachdem die Mäuse durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid (Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Germany) getötet wurden, erfolgte die Eukleation der Augen und Platzierung in kaltes PBS (PBS; pH 7.4; Gibco®; Invitrogen Limited, Paisley, United Kingdom). Danach wurde die Retina isoliert, in ein 2 ml Eppendorfgefäß übertragen und umgehend schockgefroren. Anschließend wurden Gewebeproben in einem Homogenisator prozessiert (FastPrep; MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich). Nach der Homogenisierung wurde die gesamte RNA der Retina mit einem RNA-Extraktions-Kit (RNeasy Kit, QIAGEN) gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Dann wurde mithilfe eines RT-PCR Kits (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion; Promega, Mannheim, Germany) die reverse Transkription der RNA vorgenommen. Es erfolgte daraufhin der Nachweis von in der PCR hergestellten doppelsträngigen DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Die Durchführung der PCR erfolgte mit insgesamt 10 µL and 2× SYBR Green master mix (QIAGEN). Als Matrize dienten 2 µL komplementärer DNA, was einer RNA von 13 ng entsprach. Die quantitative PCR-Analyse wurde mit dem ViiA™ 7 System (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Um Primer für die PCR-Amplifikation zu konstruieren, wurde von publizierten Sequenzen der Maudadrenozeptoren  $\alpha_{1A}$ - (NM\_013461),  $\alpha_{1B}$ - (NM\_007416) und  $\alpha_{1D}$ -Adrenozeptor (NM\_013460) und vom Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin (NM\_007393.3) Gebrauch gemacht. Die Primersequenz für den  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor war am Nichtmatrizen-Strang 5'-GCG GTG GAC GTC TTA TGC T-3' und am codogenen Strang 5'-TCA CAC CAA TGT ATC GGT CGA-3'. Für den  $\alpha_{1B}$ -AR am Nichtmatrizen-Strang 5'-CCT GGT CAT GTA CTG CCG A-3' und am Matrizenstrang 5'-GAC TCC CGC CTC CAG ATT C-3', während am  $\alpha_{1D}$ -AR Nichtmatrizenstrang 5'-AGT TGG TGA CCG TCT GCA AGT-3' und am Matrizenstrang 5'-CGC TGT GGT GGG AAC CGG CAG-3' vorlag. Bezüglich des  $\beta$ -Aktin-Nichtmatrizenstrangs waren die Sequenzen 5'-CAC CCG CGA GCA CAG CTT CTT T-3' und am Matrizenstrang 5'-AAT ACA GCC CGG GGA GCA TC-3' vorhanden. Zudem wurde in der PCR auch eine Negativkontrolle durchgeführt. Um eine Kontamination der isolierten DNA ausschließen zu können, erfolgte eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase. Auch eine Kontamination der benutzen Chemikalien konnte, durch den Einsatz einer Kontrolle mit Reverser Transkriptase und ohne RNA, ausgeschlossen werden. Als Positivkontrolle diente isolierte RNA

vom Mäusehirn. Für die relative Quantifizierung der mRNA wurde die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) eingesetzt und so eine Normalisierung der Expressionsniveaus der mRNA unterschiedlicher  $\alpha_1$ -ARST erzielt. Dabei dienten  $\beta$ -Aktin Transkripte als Referenz und es lag eine Parallelität der Standardkurven vor.

### 3.6 Statistische Analyse

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler präsentiert und wurden mithilfe einer Einweg-Varianzanalyse und eines Tukeytest für multiple Vergleiche ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Augeninnendruckmessung

Wie zuvor beschrieben, wurden die IOD-Messungen durchgeführt. Die Abbildung 6 stellt die dabei erzielten Ergebnisse dar. So betrug der IOD bei der WT-Gruppe  $13,62 \pm 0,47$  mmHg, bei der  $\alpha_{1A}\text{-AR}^{-/-}$ -Gruppe  $13,18 \pm 0,45$  mmHg, bei der  $\alpha_{1B}\text{-AR}^{-/-}$ -Gruppe  $13,12 \pm 0,39$  mmHg und bei der  $\alpha_{1D}\text{-AR}^{-/-}$ -Gruppe  $13,32 \pm 0,43$  mmHg. Damit zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Genotypen.

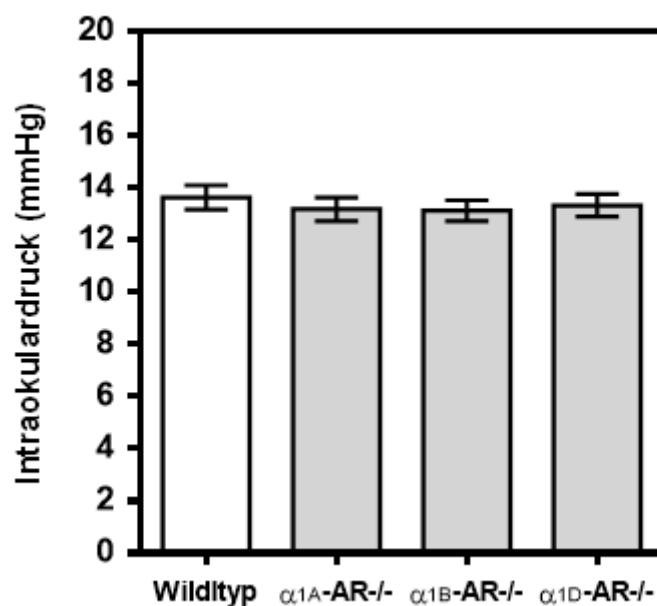


Abbildung 6: Vergleich des Intraokularer Drucks zwischen den Gruppen

## 4.2 Anzahl der Ganglienzellen in der retinalen Ganglienzellschicht

Es wurden alle Brn3a- und DAPI-positiven Zellen aus den entstandenen Bildern ausgezählt. Die folgende Abbildung zeigt vergleichend die Zellanzahl pro mm<sup>2</sup> in der retinalen Ganglienzellschicht von Retina-Ganzpräparaten. Die Anzahl der DAPI-positiven Zellen in der retinalen Ganglienzellschicht unterschied sich zwischen den WT-Mäusen und den  $\alpha_{1A}\text{-AR}^{-/-}$ ,  $\alpha_{1B}\text{-AR}^{-/-}$  und  $\alpha_{1D}\text{-AR}^{-/-}$ -Mäusen nicht signifikant (s. Abbildung 7). Auch in der Anzahl der Brn3a-positiven Zellen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Maus-Genotypen (s. Abbildung 8). Allerdings ist die Anzahl von DAPI- und Brn3a-positiven Zellen unter  $\alpha_{1B}\text{-AR}^{-/-}$ -Mäusen am höchsten.

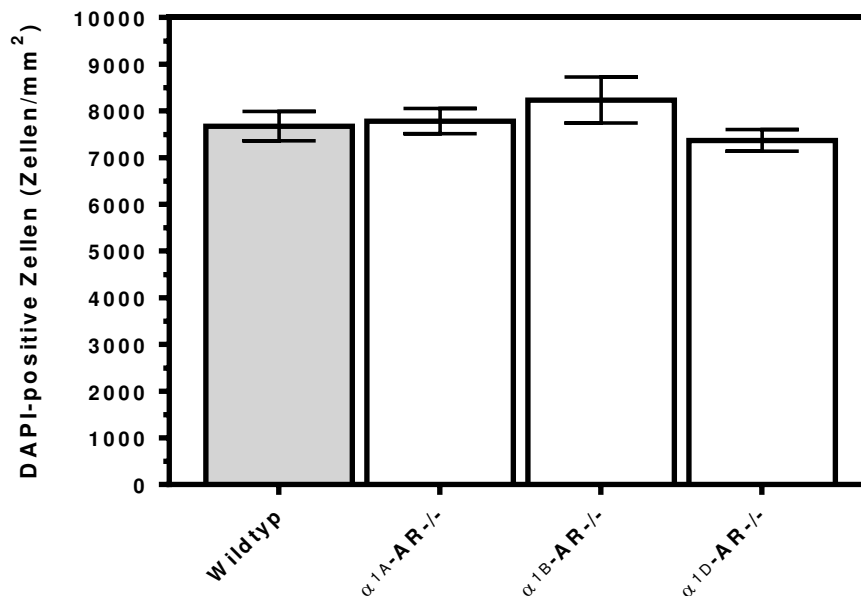


Abbildung 7: Vergleich der Anzahl DAPI-positiver Zellen zwischen den Gruppen. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die größte Anzahl an Zellkernen lag bei  $\alpha_{1B}\text{-AR}^{-/-}$ -Mäusen vor.

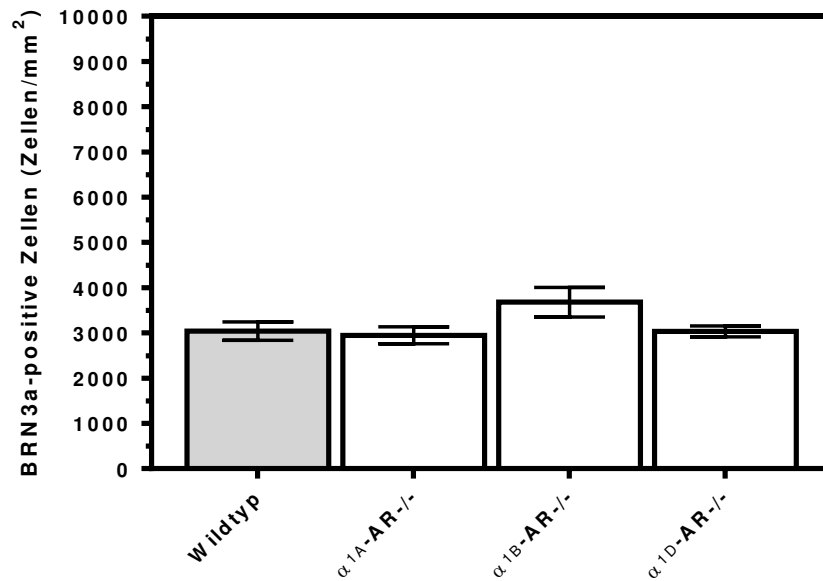


Abbildung 8: Vergleich der Anzahl Brn3a-positiver Zellen zwischen den Gruppen. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die größte Anzahl von RGC lag bei  $\alpha_{1B}\text{-AR}^{-/-}$ -Mäusen vor.

#### 4.3 Expression von $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtyp-mRNA in der Retina

Mittels quantitativer Echtzeit PCR wurde die mRNA-Expression von  $\alpha_1$ -AR in der Retina von Wildtypmäusen in Relation zu  $\beta$ -Aktin bestimmt und quantifiziert. Es konnte mRNA für alle drei  $\alpha_1$ -AR ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$ ) in der Retina von WT-Mäusen festgestellt werden. Während sich die mRNA-Expression der beiden Subtypen  $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{1D}$  auf ähnlichem Niveau befindet, ist die mRNA-Expression des  $\alpha_{1B}$ -AR signifikant erhöht (s. Abbildung 9).

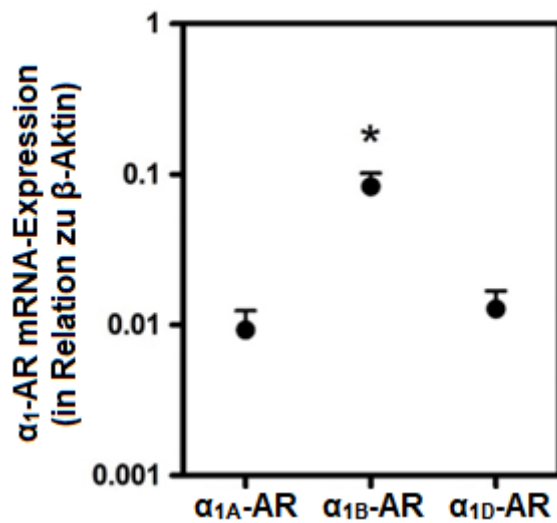


Abbildung 9: Expression von  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen-mRNA in der Retina  
Die mRNA-Expression des  $\alpha_{1B}$ -Subtyps ist im Vergleich zur Expression der beiden Subtypen  $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{1D}$  signifikant in der Retina von Wildtypmäusen erhöht.

## 5 Diskussion

### 5.1 Quantifizierung retinaler Ganglienzellen

Ein Verfahren, das der Identifizierung von RGC anhand der speziell von diesen exprimierten Proteinen dient, ist die Immunodetektion (Dräger and Olsen, 1981, McKerracher et al., 1989, Canola et al., 2007). RGC exprimieren verschiedene Proteine wie Thy-1, Bex 1/2 (Brain-expressed X-linked protein),  $\gamma$ -Synuclein, neuronal-spezifisches Nuklearprotein (NeuN) oder Brn3a (Barnstable and Dräger, 1984, Quina et al., 2005, Weishaupt et al., 2005, Bernstein et al., 2006, Buckingham et al., 2008, Soto et al., 2008, Surgucheva et al., 2008, Nadal-Nicolás et al., 2009). Die Immunoreaktivität von Bex1/2 ermöglicht die Identifizierung von Zellkörpern und Axonen der RGC und erweist sich als nützlich bei der Veranschaulichung von morphologischen Veränderungen der RGC durch Erkrankungen, wie der anterioren ischämischen Optikusneuropathie (Bernstein et al., 2006). Allerdings stellt nach Nadal-Nicolás et al. und Sanchez-Migallon et al. die Expression von Bex 1/2 sowohl in Somata als auch in Axonen der RGC insofern einen Nachteil dar, als dadurch die Quantifizierungsprozedur der Zellen erschwert wird (Nadal-Nicolás et al., 2009, Sánchez-Migallón et al., 2011).

NeuN hat die Eigenschaft DNA zu binden und besitzt verschiedene phosphorylierte Isoformen, die sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma vorkommen (Mullen et al., 1992, Lind et al., 2005). Da NeuN ein Phosphoprotein ist, hängt die Bindung des Antikörpers unter anderem von dem Zustand der Phosphorylierung ab (Lind et al., 2005). NeuN wurde in mehreren Studien zur Identifizierung von RGC in der Ganglienzellschicht als Marker verwendet (Canola et al., 2007, Dijk et al., 2007, Zhong et al., 2007). Bei einer Studie mit Glaukom-Modell wurde das Überleben neuronaler Zellen der Retina mittels NeuN überprüft, wobei die Verwendung von NeuN keine Unterscheidung der verlagerten Amakrinzellen in der retinalen Ganglienzellschicht von den Ganglienzellen ermöglichte (Wang et al., 2000). In einer anderen Studie wurde zur Quantifizierung von NeuN-positiven RGC in der retinalen Ganglienzellschicht eine Korrektur durchgeführt, indem durch zusätzliches Anfärben der NeuN-positiven verlagerten amakrinen Zellen deren Ausschluss von der Population der NeuN-positiven RGC erzielt wurde (Buckingham et al., 2008).

Thy1 ist ein Antigen, das als Glykoprotein auf der Oberfläche verschiedener Zellen im Nervensystem von Nagetieren vorkommt (Barnstable and Dräger, 1984). Es wurde angenommen, dass seine Expression in der Retina nur auf RGC beschränkt ist, obwohl nicht feststellbar war, ob mit Thy1 in der retinalen Ganglienzellschicht verlagerte amakrine Zellen von RGC differenziert werden können (Barnstable and Dräger, 1984). Es gibt Hinweise darauf, dass es auch andere Neuronen außer RGC in der Retina gibt, die eine Expression des Thy1 Antigens aufweisen. (Perry et al., 1984). So wurde Thy1 außerhalb von RGC in dünner Dichte, vornehmlich konzentriert in der inneren plexiformen Schicht, gekennzeichnet, was darauf schließen lässt, dass Thy1 auf Membranen von amakrinen oder bipolaren Zellen vorkommt, die in der inneren plexiformen Schicht mit ihren Membranen aneinander liegen (Perry et al., 1984). Verlagerte amakrine Zellen haben einen beträchtlichen Anteil von bis zu 50% aller Zellen in der Ganglienzellschicht der Ratte (Perry, 1981). In der Ganglienzellschicht der Mäuseretina sind ca. 59% aller Neuronen verlagerte amakrine Zellen (Jeon et al., 1998). Diese könnten, bei der Verwendung von Thy1 zur Kennzeichnung von RGC, unbeabsichtigt markiert werden (Barnstable and Dräger, 1984). Darüber hinaus scheint sich Thy1 nicht als geeigneter Marker von RGC nach deren Verlust zu erweisen, da nach dem Zelltod der Ganglienzellen Thy1 von Müllerzellen exprimiert wird (Dabin and Barnstable, 1995). Es konnte auch festgestellt werden, dass bei einem Zelltod von RGC, beispielsweise ausgelöst durch

Sehnervquetschung, intravitreale Injektionen von N-Methyl-D-Aspartat oder durch erhöhten IOD, die Expression von Thy1 abnimmt (Schlamp et al., 2001). Die Abnahme der Expression fand auch in RGC statt, denen das Bax-Gen fehlte und so widerstandsfähig in Bezug auf eine Sehnervquetschung sind, was eine zelltodunabhängige Abnahme der Thy1-Expression andeutet (Li et al., 2000, Schlamp et al., 2001).

$\gamma$ -Synuclein gehört neben  $\alpha$ - und  $\beta$ -Synuclein zur Proteinfamilie der Synucleine, die bei Wirbeltieren von drei verschiedenen Genen besonders im Nervensystem kodiert werden (Clayton and George, 1998, George, 2002). Die Expression von  $\gamma$ -Synuclein konnte im Sehnerv und in der Retina festgestellt werden, und dort auch in Zellen der retinalen Ganglienzellschicht (Surguchov et al., 2001). In einer weiteren Studie konnte die Expression von  $\gamma$ -Synuclein in RGC nachgewiesen werden, indem mittels Antikörper gegen  $\gamma$ -Synuclein das Zytoplasma aller Zellen angefärbt wurde, deren Zellkerne durch den Ganglienzell-Marker Brn3a gekennzeichnet wurden (Surgucheva et al., 2008). Allerdings ermöglichte die Verwendung der Antikörper keine Unterscheidung in der Expression des  $\gamma$ -Synuclein in RGC und Axonen (Surgucheva et al., 2008).  $\gamma$ -Synuclein wurde in einem DBA/2J Maus Glaukom-Modell unter Verwendung von in situ Hybridisierung eingesetzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass  $\gamma$ -Synuclein-mRNA spezifisch und reichlich in RGC adulter Mäuse exprimiert wird, denn in den  $47 \pm 3\%$  aller Zellen der retinalen Ganglienzellschicht, die mit dem retrograden Markierungsstoff Fluorogold als RGC markiert wurden, konnte die Expression von  $\gamma$ -Synuclein nachgewiesen werden. Nur  $1.0 \pm 0.5\%$  der Zellen der Ganglienzellschicht exprimierten allein  $\gamma$ -Synuclein, ohne dabei durch Fluorogold gekennzeichnet und - aufgrund dieser fehlenden Korrespondenz - als RGC identifiziert worden zu sein (Soto et al., 2008).

Um die RGC darzustellen und so deren Anzahl bestimmen zu können, wurde die immunhistologische Färbung mittels Brn3a unter Verwendung von Mäuseretinae in unseren Versuchen eingesetzt. Brn3a gehört neben Brn3b und Brn3c zur Familie der Brn3 Transkriptionsfaktoren, die von RGC exprimiert werden (Xiang et al., 1993, Xiang et al., 1995). In der Retina von Mäusen sind die Brn3-Transkriptionsfaktoren bei der Differenzierung, bei der Entwicklung und bei dem Überleben von RGC von Bedeutung (Xiang et al., 1997, Gan et al., 1999, Wang et al., 2002a, Isenmann et al., 2003). Weiter konnte an Mäusen festgestellt werden, dass speziell solche RGC Brn3a exprimieren, die Projektionen zum dorsalen Corpus geniculatum laterale und

zu den kontralateralen Colliculi superiores aufweisen (Quina et al., 2005). Der Anteil der Zellkerne, die in der retinalen Ganglienzellschicht der Maus eine Immunreaktion auf Brn3-Proteine zeigten, beläuft sich für Brn3a-Antikörper allein auf 36%, für Brn3b-Antikörper allein auf 35% und für Brn3a- und Brn3b-Antikörper zusammen auf 37%. Dies deutet darauf hin, dass die meisten Brn3b exprimierenden Zellen auch Brn3a exprimieren. Fünfzehn Prozent aller Zellkerne in der retinalen Ganglienzellschicht wurden mit Brn3c-Antikörpern gekennzeichnet, während bei der Kombination von Brn3c-Antikörpern mit entweder Brn3a- oder Brn3b-Antikörpern jeweils 36% aller Zellkerne immunopositiv waren. Da dieser Anteil mit denen der jeweils alleinigen Markierung mittels Brn3a- und Brn3b-Antikörpern von jeweils 36% nahezu übereinstimmt, wurde daraus geschlossen, dass eine Untergruppe der Zellen, die für Brn3a und Brn3b immunopositiv sind, die Expression von Brn3c aufweist (Xiang et al., 1995). In mehreren Studien wurde Brn3a genutzt, um von in vitro kultivierten Netzhäuten von Ratten die Ganglienzellen zu erfassen (Johnson and Martin, 2008, Wax et al., 2008, Joachim et al., 2009). Eine weitere Studie ergab, dass in verschiedenen Ganglienzellpopulationen der Rattenretina eine unterschiedliche Expression der Brn3-Marker vorliegt, und Brn3a von allen Brn3-Markern am häufigsten exprimiert wird, gefolgt von Brn3b und zuletzt Brn3c (Nadal-Nicolás et al., 2012). In einer anderen Studie, die die Expression von Brn3a in RGC von Ratten ermittelte, konnte in 92,2% aller zuvor mit Fluorogold identifizierten RGC eine Expression von Brn3a festgestellt werden (Nadal-Nicolás et al., 2009). Somit wird Brn3a als effizienter ex vivo Marker eingestuft, der bei der Identifizierung und Quantifizierung von RGC, auch nach vorheriger Nervschädigung, erhöhtem IOD oder Degeneration von Fotorezeptoren zuverlässig zum Einsatz kommt (Nadal-Nicolás et al., 2009, García-Ayuso et al., 2010, Salinas-Navarro et al., 2010). Zudem scheint Brn3a an der Regulierung der Dendritenstratifizierung von RGC beteiligt zu sein (Badea et al., 2009). Des Weiteren konnte mittels Immunodetektion von Brn3a der Effekt einer neuroprotektiven Therapie mit BDNF auf das Überleben von RGC nachgewiesen werden (Sánchez-Migallón et al., 2011). Auch der Faktor Brn3b wurde zur Identifizierung von RGC genutzt und kam dafür beispielsweise in Modellen mit optischen Nervschädigungen zum Einsatz (Buckingham et al., 2008, Fernandes et al., 2012). In unseren Versuchen wurde die Zählbarkeit der RGC insofern ermöglicht, als durch die Verwendung von Brn3a deren Zellkerne gekennzeichnet werden (Xiang

et al., 1995). Im Unterschied zu anderen immunhistochemischen Markern wurden Somata und Axone dabei nicht angefärbt, was die Quantifizierung erleichtert hat.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse der Brn3a-Färbung

Bisher liegen noch keine veröffentlichten Studien vor, die den Einfluss von  $\alpha_1$ -AR auf das Überleben von RGC untersucht haben.

Es wurde bereits festgestellt, dass AR verschiedene Funktionen in der Netzhaut vermitteln (Mori et al., 2011, Bohmer et al., 2014). So erfolgt in den Netzhäuten von Kaninchen eine Vasokonstriktion über die Vermittlung durch  $\alpha_1$ -AR (Ichikawa et al., 2004). Es konnte zudem gezeigt werden, dass das als  $\alpha_1$ -AR-Agonist wirkende Phenylephrin im normalen Endothel nur eine vernachlässigbare Vasokonstriktion vermittelt. Im Gegensatz dazu reagierten die retinalen Arteriolen mit geschädigtem Endothel mit einer konzentrationsabhängigen Verengung auf Phenylephrin. Prazosin, ein nicht-selektiver  $\alpha_1$ -AR-Antagonist, hob diese Phenylephrin-Reaktionen auf (Bohmer et al., 2014). Eine andere Studie kam zu unterschiedlichen Ergebnissen, indem sie darauf hinwies, dass Noradrenalin das intakte Endothel retinaler Arteriolen bei Ratten kontrahiert, was durch Adrenozeptoren der Subtypen  $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{1D}$  initiiert wird (Mori et al., 2011).

Böhmer et al. (2014) schlussfolgerten in ihrer Studie, dass in retinalen Arteriolen mit geschädigtem Endothel die Stimulierung des  $\alpha_{1B}$ -ARST zur Vasokonstriktion führt, während keine Vasokonstriktion bei den Subtypen  $\alpha_{1A}$  oder  $\alpha_{1D}$  festgestellt wurde (Bohmer et al., 2014). Dies wird unterstützt durch frühere Studien, die zeigten, dass die Entfernung des Endothels die Kontraktilität durch einen  $\alpha_1$ -AR-Agonisten in der Rattenaorta erhöhte (Carrier and White, 1985).

Unsere Ergebnisse aus der immunhistochemischen Brn3a-Färbung demonstrieren, dass die Anzahl der RGC durch das Fehlen eines  $\alpha_1$ -AR nicht reduziert wird. Die mithilfe der Brn3a-Färbung erhobenen Zelldichten der Mausgruppen, denen jeweils ein  $\alpha_1$ -AR fehlen, ähneln sich mit  $2948 \pm 187,1$  ( $\alpha_{1A}$ -AR<sup>-/-</sup>),  $3679 \pm 329,2$  ( $\alpha_{1B}$ -AR<sup>-/-</sup>) und  $3035 \pm 120,1$  ( $\alpha_{1D}$ -AR<sup>-/-</sup>) RGC pro mm<sup>2</sup> sowohl untereinander als auch in Bezug auf die Kontrollgruppe, die  $3041 \pm 202,8$  RGC pro mm<sup>2</sup> aufweist.

Da kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Gruppen vorliegt, unterstützen die Ergebnisse nicht die Hypothese, dass ein Fehlen von jeweils einem  $\alpha_1$ -AR zum Absterben von RGC führt.

Im Vergleich mit anderen Studienergebnissen zu durchschnittlichen Zelldichten von RGC in der Maus ähneln sich unsere Ergebnisse mit diesen. So kommen unsere Ergebnisse nah an die von Salinas-Navarro et al. ermittelte Zellanzahl für pigmentierte C57BL/6N Mäuse heran (Salinas-Navarro et al., 2009). Dabei ist zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Methoden angewandt wurden. Die von Salinas-Navarro et al. ermittelte Zelldichte wurde erhoben, indem RGC jeweils von den Colliculi superiores (von  $2821 \pm 281$  pro  $\text{mm}^2$ ) und vom Nervus Optikus retrograd ( $2949 \pm 143$  pro  $\text{mm}^2$ ) markiert wurden und nicht, wie bei uns, mithilfe der immunhistochemischen Färbung gegen Brn3a. Dass die Zelldichten trotz der unterschiedlichen Markierungsmethoden nahezu übereinstimmen, könnte dadurch bedingt sein, dass Brn3a-exprimierende RGC mit ihren Axonen maßgeblich die Colliculi superiores innervieren (Quina et al., 2005).

In einer anderen Studie an pigmentierten C57BL/6N Mäusen wurde eine Dichte von retinalen Ganglienzellen, die Brn3a exprimieren, von  $2522 \pm 193$  pro  $\text{mm}^2$  festgestellt (Galindo-Romero et al., 2011).

Neben der Markierungsmethode könnten auch genetische Unterschiede, die Lokalisation der ausgezählten Retinaareale bzw. die topographische Verteilung der RGC für die abweichenden Zelldichten ursächlich sein.

### **5.2.1 Topographische Verteilung von RGC**

Die topographische Verteilung von Ganglienzellen bzw. deren räumliche Dichte innerhalb der gesamten Retina von Maus und Ratte konnte bereits mithilfe von Karten veranschaulicht werden. Danach liegt keine gleichmäßige Verteilung vor, sondern die Dichte nimmt zur Peripherie der Retina hin ab, sodass der größte Anteil von RGC zentrumsnah vorkommt. Dies konnte einerseits in Studien mittels retrograder Markierung, andererseits durch die immunhistochemische Kenntlichmachung mit Brn3a festgestellt werden (Dräger and Olsen, 1981, Nadal-Nicolás et al., 2009, Salinas-Navarro et al., 2009, Galindo-Romero et al., 2011). Insofern könnte die von uns ermittelte leicht erhöhte Dichte daraus resultiert sein, dass die ausgewerteten Areale scheinbar näher zum Zentrum der Retina hin lokalisiert worden sind.

Außerdem könnte das Alter ein Grund für die leicht erhöhte Dichte sein. Die Mäuse hatten ein Alter von einem bis sechs Monaten. Im frühen Erwachsenenalter der Maus

wächst das Auge und es kommen keine neuen Neuronen hinzu und Altersunterschiede können trotz einer Vereinheitlichung des Körpergewichts der Mäuse nicht ausgeglichen werden (Jeon et al., 1998, Salinas-Navarro et al., 2009).

### 5.3 Rolle des Endothels bei der retinalen Durchblutung

Theoretisch wäre bei  $\alpha_{1B}\text{-AR}^{-/-}$  eine reduzierte Anzahl an RGC im Vergleich zu den anderen Mäusen mit Knockout des  $\alpha_{1A}$ - oder  $\alpha_{1D}$ -ARST zu erwarten gewesen, da der  $\alpha_{1B}$ -Subtyp für die retinale Gefäßregulierung bzw. Vasokonstriktion eine wichtige Rolle spielt, wie Böhmer et al. (2014) herausgefunden haben. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Vasokonstriktion durch den  $\alpha_{1B}$ -Subtyp in geschädigtem Endothel vermittelt wurde. Dass es in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der RGC unter den einzelnen Adrenozeptor-Knockout-Mäusegruppen gibt, könnte somit auf das intakte bzw. nicht geschädigte Endothel und anderen Regulationsmechanismen der retinalen Durchblutung zurückzuführen sein.

Intaktes Endothel verfügt über genügend Kompensationsmechanismen und eine frühere Studie hat gezeigt, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor neuroprotektiv wirkt und RGC vor dem Zelltod schützen kann (Shen et al., 2018). Außerdem verhindert das Endothel der Netzhautgefäße, dass hydrophile Verbindungen des Blutes in die glatten Muskelzellen der Gefäße vordringen, und somit stellt das Endothel für Katecholamine eine mechanische Barriere dar (Ehinger, 1966, Hoste et al., 1990, Delaey and Van De Voorde, 2000).

Das aus Endothelzellen freigesetzte Stickstoffmonoxid (NO) nimmt eine wichtige Rolle bei der Regulation des okulären Blutflusses ein (Koss, 1998, Haefliger et al., 2001, Schmetterer and Polak, 2001). NO wird von der NO-Synthase aus L-Arginin gebildet und wirkt vasodilatativ, indem es die Guanylatzyklase glatter Muskelzellen stimuliert und so die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat anregt, was in der Relaxation der glatten Muskelzelle resultiert (Palmer et al., 1988, Warner et al., 1994, Denninger and Marletta, 1999).

NO wird von endothelialen NO-Synthasen retinaler Arteriolen der Maus und auch anderen Spezies produziert (Benedito et al., 1991, Knowles and Moncada, 1994, Meyer et al., 1999, Gericke et al., 2013).

Die wichtige Bedeutung von NO für die retinale Blutflussregulation wurde in mehreren Studien insofern festgestellt, als mit NO-Synthase-Inhibitoren eine Reduktion des retinalen Blutflusses verursacht werden konnte (Donati et al., 1995, Harino et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die intravenöse Verabreichung von L-Arginin eine Zunahme des retinalen und choroidalen Blutfluss erfolgt (Garhöfer et al., 2005) Zudem konnte durch eine in vivo Studie an Kaninchen gezeigt werden, dass der Beeinträchtigung der retinalen Durchblutung und der Einschränkung der retinalen Funktion infolge eines Mangels an endotheliale NO durch die Blockade von  $\alpha_1$ -AR entgegengewirkt werden. Es wurde angenommen, dass der  $\alpha_1$ -AR-Blocker Bunazosin eine relaxierende Wirkung auf den basalen Gefäßtonus hat, während eine Hemmung der NO-Synthase vorliegt (Goto et al., 2003).

Der Verlust von RGC ist typisch für das Glaukom, dessen Entstehung mit endothelialer Dysfunktion in Verbindung gebracht wird (Resch et al., 2009).

Neben NO setzen endotheliale Zellen auch Endothelin 1 frei, das mit seiner vasokonstriktiven Wirkung an der Kontrolle des okulären Blutflusses beteiligt zu sein scheint (Schmetterer et al., 1997, Delaey and Van De Voorde, 2000). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Endothelin 1 Kontraktionen von retinalen Perizyten auslöst und somit einen Einfluss auf die Autoregulation des retinalen Blutflusses haben könnte (Chakravarthy et al., 1992, Ramachandran et al., 1993). Perizyten scheinen von wichtiger Bedeutung für die retinale Mikrozirkulation zu sein, da in der Retina das größte Verhältnis von Perizyten zu endothelialen Zellen herrscht (Shepro and Morel, 1993, Kawamura et al., 2002).

Endotheliale Zellen setzen auch vasoregulatorische Prostaglandine frei, deren Einfluss auf retinale Gefäße insofern komplex zu sein scheint, als er von ihrer relativen vasokonstriktischen oder vasodilatativen Wirkung abhängt (Delaey and Van De Voorde, 2000, Mori et al., 2007).

#### **5.4 Zusammenhang zwischen $\alpha_1$ -AR und Intraokularer Druck**

Die Ergebnisse der IOD-Messungen zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Knockout-Mäusen. Dennoch ist der IOD von KO-Mäusen leicht vermindert. Studien weisen darauf hin, dass  $\alpha_1$ -AR einen Einfluss auf den IOD haben, denn durch topische Applikation von  $\alpha_1$ -AR-

Agonisten zeigte sich ein Anstieg und durch  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten eine Verminderung des IOD oder auch das Unterdrücken der agonistischen Wirkung (Nishimura et al., 1991, Kiuchi et al., 1992, Nishimura et al., 1993, Wang et al., 1997, Zhan et al., 1998). Ihr Einfluss auf die Regulation des IOD kommt dadurch zustande, dass  $\alpha_1$ -AR an der Dynamik des Kammerwassers beteiligt sind. So konnte durch topische Applizierung des selektiven  $\alpha_1$ -AR-Antagonisten Bunazosinhydrochlorid der IOD von Affen reduziert werden, was auf einen erhöhten uveoskleralen Ausfluss durch Relaxation des Ziliarmuskels zurückzuführen ist (Akaishi et al., 2004).

Auf diesen Ergebnissen basierend hatten wir erwartet, dass das Knock-Out der verschiedenen  $\alpha_1$ -AR Hinweise darauf gibt, welcher Subtyp den größten Einfluss auf den IOD hat. Unseren Ergebnissen zufolge scheint keiner der einzelnen Subtypen einen herausragenden Einfluss auf den IOD zu haben. Allerdings zeigten die Messungen bei den Knock-out-Mäusen eine geringfügige Abnahme des IOD. Neben  $\alpha_1$ -AR sind weitere andere adrenerge Rezeptoren an der Regulation des Augeninnendrucks beteiligt. Auch  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR konnten im Ziliarkörper festgestellt werden (Nathanson, 1980, Mittag and Tormay, 1985, Bausher et al., 1987, Wax and Molinoff, 1987, Jin et al., 1994).  $\alpha_2$ -AR und  $\beta_2$ -AR sind auch im Trabekelmaschenwerk vorhanden (Jampel et al., 1987, Stamer et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation des  $\alpha_2$ -AR eine Reduktion der Kammerwasserproduktion erfolgt und der uveosklerale Ausfluss zunimmt, was zur Senkung des IOD führt (Toris et al., 1995, Greenfield et al., 1997, Katsimpris et al., 2003, Reitsamer et al., 2006). Außerdem hat der Einsatz von  $\beta$ -Blockern gezeigt, dass durch Antagonismus am  $\beta_2$ -AR die Kammerwasserbildung unterdrückt wird und somit der IOD gesenkt werden kann (Katz et al., 1976, Coakes and Brubaker, 1978, Gaul et al., 1989, Wayman et al., 1997). Weil die verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR unterschiedliche Funktionen bei der Kammerwasserdynamik haben, ist der IOD von vielen Faktoren abhängig. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Elimination von jeweils einem  $\alpha_1$ -AR zwar der IOD geringfügig reduziert wird, jedoch andere Mechanismen für die Konstanthaltung des IOD eine Bedeutung haben müssen. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass die Subtypen sich nicht in ihrem augeninnendrucksenkenden Effekt unterscheiden. Möglicherweise kompensieren die zwei Subtypen das Fehlen des eliminierten Subtyps bei den entsprechenden Knock-Out-Mäusen.

In der Glaukomforschung wurde die Gq-Kopplung des  $\alpha_{1A}$ -AR in Zusammenhang mit einem erhöhtem IOD durch Untersuchungen am Ziliarkörper in einem Mausmodell gebracht. So wurde herausgefunden, dass das Glaukom mit dem Zerfall von funktionellen Komplexen im Zusammenhang steht, die aus Heteromeren von  $\alpha_{1A}$ -AR und Melatonin-Rezeptoren mit Gs-Kopplung bestehen. Beim Glaukom liegen nur noch wenige Komplexe davon vor. Durch den Komplexzerfall erfolgt ein Shift von der Gs- zur Gq-Kopplung der  $\alpha_{1A}$ -AR und durch deren Aktivierung mittels Phenylephrin wird der IOD negativ über einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration beeinträchtigt. Durch die Blockade der  $\alpha_{1A}$ -AR mit Prazosin konnte der augeninnendrucksenkende Effekt von zusätzlich verabreichten Melatonin verstärkt werden (Hanan Awad et al., 2019).

## **5.5 Zusammenhang zwischen der Expression von $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen in der Retina und der Anzahl retinaler Ganglienzellen**

Anscheinend variiert die Expression der  $\alpha_1$ -AR zwischen verschiedenen Spezies, denn unser Ergebnis, dass der  $\alpha_{1B}$ -AR in der Mausretina vorherrscht, unterscheidet sich zu Untersuchungen am Kaninchen, die eine Dominanz des  $\alpha_{1A}$ -AR in der Retina ergaben (Suzuki et al., 2002). Auch der Stamm, bzw. der Unterstamm der experimentell verwendeten Versuchsmäuse könnte einen Einfluss auf die Anzahl der RGC haben. Es wurde herausgefunden, dass phänotypische Unterschiede, abhängig vom gewählten C57BL/6 Unterstamm, experimentelle Ergebnisse beeinflussen könnten (Bourdi et al., 2011, Mekada and Yoshiki, 2021). Dies könnte eine mögliche Begründung dafür sein, weshalb in einer anderen Studie - bei Forschung am Unterstamm C57BL/6J- der  $\alpha_{1D}$ -AR als am häufigsten vorkommender Subtyp identifiziert wurde. In derselben Studie wurde festgestellt, dass der  $\alpha_{1B}$ -AR beim Menschen am häufigsten in der Retina exprimiert ist (Chen et al., 2013). Obwohl wir gezeigt haben, dass die mRNA-Expression vom  $\alpha_{1B}$ -AR in der Retina signifikant erhöht ist, war die Anzahl der RGC von  $\alpha_{1B}$ -AR<sup>-/-</sup> im Vergleich zu allen anderen Gruppen leicht erhöht. Dies widerspricht der Annahme, dass die Elimination des  $\alpha_{1B}$ -AR zu einer Abnahme der Anzahl von RGC führt. Zuscik et al. haben festgestellt, dass Überexpression von  $\alpha_{1B}$ -AR in neuronalem Gewebe zu apoptotischer Degeneration zu führen scheint (Zuscik et al., 2000). Dies könnte

darauf hindeuten, dass  $\alpha_{1B}$ -AR in der Retina einen negativen Effekt auf das Überleben von RGC haben könnten.

## 5.6 Ausblick

Damit der Zusammenhang zwischen  $\alpha_1$ -AR und RGC ergründet wird, sind weitere Studien notwendig, mithilfe derer das Vorhandensein von  $\alpha_1$ -AR, besonders  $\alpha_{1B}$ -AR, in RGC untersucht wird und mögliche Mechanismen der  $\alpha_1$ -AR offenbart werden könnten, die das Überleben von RGC beeinflussen. Dies könnte mithilfe eines Tiermodells untersucht werden, in dem eine retinale Degeneration durch Ischämie hervorgerufen wird.

In Betracht kommen außerdem Tiermodelle mit retinalen Pathologien, die im Zusammenhang mit geschädigtem Endothel stehen. Denn es gibt Hinweise darauf, dass bei geschädigtem Endothel die Konstriktion von retinalen Arteriolen durch den  $\alpha_{1B}$ -AR vermittelt wird (Bohmer et al., 2014). Weil in unserer Studie keine Endothelschäden hervorgerufen wurden, könnten in vivo-Kompensationsmechanismen des funktionstüchtigen Endothels die Effekte des  $\alpha_{1B}$ -AR auf die RGC kaschiert haben. Außerdem wäre die Entwicklung Subtyp-selektiver Agonisten und Antagonisten vorteilhaft, weil bei der Verwendung von Knock-Out Mäusen die Elimination eines Rezeptors durch mögliche kompensatorische Veränderungen wie Hoch- und Runterregulierung einer anderen Signalwegkomponente ausgeglichen werden könnte (Tanoue et al., 2002a).

## 6 Zusammenfassung

Die Schädigung von retinalen Ganglienzellen steht im Zusammenhang mit der Pathologie vieler Augenerkrankungen. Die Familie der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren setzt sich aus drei verschiedenen Rezeptorsubtypen zusammen:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$ . Diese Rezeptoren haben eine wichtige Bedeutung für die Regulation des Blutdrucks und die Durchblutung von Organen, speziell der Retina. Im Auge sind  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren von entscheidender Bedeutung für die Kontraktion der glatten Muskulatur und somit für die Regulation des Augeninnendrucks. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen an neurodegenerativen Prozessen im zentralen Nervensystem beteiligt zu sein scheinen, was aufgrund der embryonalen Verwandtschaft zwischen Retina und Gehirn auch relevant für das Überleben retinaler Ganglienzellen sein könnte.

In dieser Studie haben wir die Rolle der  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen -  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$  - in der Retina im Mausmodell umfassend untersucht. Unser Ziel war es herauszufinden, ob die unterschiedlichen Rezeptorsubtypen einen Einfluss auf die Anzahl retinaler Ganglienzellen und den Augeninnendruck haben. Zudem sollte die Expression der Subtypen in der Retina der Maus quantifiziert werden.

Das Ausschalten von  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$  wurde durch die Verwendung von genetisch modifizierten Knock-Out-Mäusen erzielt, denen jeweils ein Rezeptorsubtyp fehlte ( $\alpha_{1A}$ -AR<sup>-/-</sup>,  $\alpha_{1B}$ -AR<sup>-/-</sup> und  $\alpha_{1D}$ -AR<sup>-/-</sup>-Mäuse). Die Experimente wurden an den drei unterschiedlichen Knock-Out-Mausgruppen und einer Wildtypmausgruppe durchgeführt, um die Gruppen miteinander zu vergleichen. Retinale Ganglienzellen wurden mithilfe von immunhistochemischen Färbungen identifiziert und deren Anzahl erhoben. Zudem wurde der Augeninnendruck nichtinvasiv mit einem Tonometer gemessen. Zur Quantifizierung der mRNA-Expression der Subtypen in der Retina von Wildtypmäusen wurde Echtzeit quantitative reverse Transkription PCR durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Elimination der einzelnen Subtypen keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der retinalen Ganglienzellen hat. Die  $\alpha_{1B}$ -AR<sup>-/-</sup>-Gruppe hat nur eine geringfügig höhere Anzahl retinaler Ganglienzellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Fehlen des  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptors möglicherweise einen bedingt neuroprotektiven Effekt auf die retinalen Ganglienzellen haben könnte. Die Ganglienzellanzahl der  $\alpha_{1A}$ -AR<sup>-/-</sup>-Gruppe ist geringfügig reduziert, was einen

bedingt negativen Effekt auf das Überleben der retinalen Ganglienzellen bedeuten könnte. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass die spezifischen Subtypen nicht maßgeblich für das Überleben der retinalen Ganglienzellen in vivo verantwortlich sind.

Die Resultate der Augeninnendruckmessungen zeigen zwar einen geringen Unterschied zwischen den verschiedenen Subtypgruppen und der Kontrollgruppe, was darauf hinweist, dass das Fehlen eines spezifischen  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen einen geringen Augeninnendruck senkenden Effekt haben könnte, dieser aber nicht signifikant ist. Dies könnte wichtig sein bei der Beurteilung von Nebenwirkungen bei Behandlungen, die auf einen spezifischen Subtyp abzielen.

Unsere PCR-Analyse ergab, dass der  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptorsubtyp am häufigsten in der Retina exprimiert wird, was seine dominante Präsenz in diesem Gewebe beschreibt. Aber obwohl der  $\alpha_{1B}$ -Subtyp in der Retina am häufigsten vorkommt, hat er nicht zu einer signifikant unterschiedlichen Anzahl retinaler Ganglienzellen geführt, weder im Vergleich mit anderen Knock-Out-Gruppen noch mit der Wildtypgruppe.

Insgesamt tragen die Ergebnisse dieser Studie dazu bei, unser Verständnis von der Funktion der  $\alpha_1$ -Adrenozeptorsubtypen in der Retina zu vertiefen. Unsere Erkenntnisse könnten als Ansatz für zukünftige Forschung im Bereich der Augenheilkunde und der Entwicklung therapeutischer Strategien dienen. Zudem verdeutlicht die Studie die Vielschichtigkeit der Mechanismen, welche die Augenphysiologie regulieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- Acott, T. S. & Kelley, M. J. 2008. Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Experimental eye research*, 86, 543-561.
- Adams, J. W., Sakata, Y., Davis, M. G., Sah, V. P., Wang, Y., Liggett, S. B., Chien, K. R., Brown, J. H. & Dorn, G. W., 2nd 1998. Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10140-10145.
- Adeghate, J., Rahmatnejad, K., Waisbourd, M. & Katz, L. J. 2019. Intraocular pressure-independent management of normal tension glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, 64, 101-110.
- Ahles, A. & Engelhardt, S. 2014. Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease. *Pharmacol Rev*, 66, 598-637.
- Akaishi, T., Takagi, Y., Matsugi, T., Ishida, N., Hara, H. & Kashiwagi, K. 2004. Effects of bunazosin hydrochloride on ciliary muscle constriction and matrix metalloproteinase activities. *J Glaucoma*, 13, 312-8.
- Alfonzo-Mendez, M. A., Hernandez-Espinosa, D. A., Carmona-Rosas, G., Romero-Avila, M. T., Reyes-Cruz, G. & Garcia-Sainz, J. A. 2017. Protein Kinase C Activation Promotes alpha1B-Adrenoceptor Internalization and Late Endosome Trafficking through Rab9 Interaction. Role in Heterologous Desensitization. *Mol Pharmacol*, 91, 296-306.
- Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U. & Patel, N. K. 2013. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics*, 138, 155-175.
- Alm, A. 1972. Effects of norepinephrine, angiotensin, dihydroergotamine, papaverine, isoproterenol, histamine, nicotinic acid, and xanthinol nicotinate on retinal oxygen tension in cats. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 50, 707-19.
- Almasieh, M., Wilson, A. M., Morquette, B., Cueva Vargas, J. L. & Di Polo, A. 2012. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 31, 152-81.
- Ames lli, A. 1992. Energy requirements of CNS cells as related to their function and to their vulnerability to ischemia: a commentary based on studies on retina. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 70, S158-S164.
- Amini, R., Rocha-Martins, M. & Norden, C. 2018. Neuronal Migration and Lamination in the Vertebrate Retina. *Frontiers in Neuroscience*, 11.
- Amobi, N., Guillebaud, J. & Smith, C. H. 2010. Comparative effects of T-type and L-type Ca(2+)-antagonists against noradrenaline-induced contractions of human vas deferens. *BJU Int*, 106, 578-85.
- Amobi, N. I. B., Chung, I.-P. & Smith, I. C. H. 2006. Attenuation of contractility in rat epididymal vas deferens by Rho kinase inhibitors. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, 26, 169-181.
- Anderson, B., Jr. 1968. Ocular effects of changes in oxygen and carbon dioxide tension. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 66, 423-74.
- Anderson, B. & Saltzman, H. A. 1964. Retinal oxygen utilization measured by hyperbaric blackout. *Archives of ophthalmology*, 72, 792-795.
- Badea, T. C., Cahill, H., Ecker, J., Hattar, S. & Nathans, J. 2009. Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron*, 61, 852-64.

- Barnstable, C. J. & Dräger, U. C. 1984. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience*, 11, 847-55.
- Bausher, L. P., Gregory, D. S. & Sears, M. L. 1987. Interaction between alpha 2- and beta 2-adrenergic receptors in rabbit ciliary processes. *Curr Eye Res*, 6, 497-505.
- Beani, L., Tanganelli, S., Antonelli, T. & Bianchi, C. 1986. Noradrenergic modulation of cortical acetylcholine release is both direct and gamma-aminobutyric acid-mediated. *J Pharmacol Exp Ther*, 236, 230-6.
- Becker, B. 1958. The decline in aqueous secretion and outflow facility with age. *Am J Ophthalmol*, 46, 731-6.
- Becker, B. & Morton, W. R. 1966. Topical epinephrine in glaucoma suspects. *Am J Ophthalmol*, 62, 272-7.
- Benedito, S., Prieto, D., Nielsen, P. J. & Nyborg, N. C. 1991. Role of the endothelium in acetylcholine-induced relaxation and spontaneous tone of bovine isolated retinal small arteries. *Exp Eye Res*, 52, 575-9.
- Bernstein, S. L., Koo, J. H., Slater, B. J., Guo, Y. & Margolis, F. L. 2006. Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol Vis*, 12, 147-55.
- Bill, A. 1965. The aqueous humor drainage mechanism in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) with evidence for unconventional routes. *Invest Ophthalmol*, 4, 911-9.
- Bill, A. 1966. Conventional and uveo-scleral drainage of aqueous humour in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) at normal and high intraocular pressures. *Exp Eye Res*, 5, 45-54.
- Bill, A. 1975. Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiol Rev*, 55, 383-417.
- Bohmer, T., Manicam, C., Steege, A., Michel, M. C., Pfeiffer, N. & Gericke, A. 2014. The alpha(1)B -adrenoceptor subtype mediates adrenergic vasoconstriction in mouse retinal arterioles with damaged endothelium. *Br J Pharmacol*, 171, 3858-67.
- Böhmer, T., Pfeiffer, N. & Gericke, A. 2014. Three commercial antibodies against  $\alpha$ 1-adrenergic receptor subtypes lack specificity in paraffin-embedded sections of murine tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387, 703-706.
- Bourdi, M., Davies, J. S. & Pohl, L. R. 2011. Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A liver injury. *Chem Res Toxicol*, 24, 794-6.
- Buckingham, B. P., Inman, D. M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D. J., Steele, M. R., Vetter, M. L., Marsh-Armstrong, N. & Horner, P. J. 2008. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28, 2735-2744.
- Burgoyne, C. F., Downs, J. C., Bellezza, A. J., Suh, J. K. & Hart, R. T. 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res*, 24, 39-73.
- Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, J. P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo, R. R., Jr. & Trendelenburg, U. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 46, 121-36.

- Cahill, T. J., Thomsen, A. R. B., Tarrasch, J. T., Plouffe, B., Nguyen, A. H., Yang, F., Huang, L.-Y., Kahsai, A. W., Bassoni, D. L., Gavino, B. J., Lamerdin, J. E., Triest, S., Shukla, A. K., Berger, B., Little, J., Antar, A., Blanc, A., Qu, C.-X., Chen, X., Kawakami, K., Inoue, A., Aoki, J., Steyaert, J., Sun, J.-P., Bouvier, M., Skiniotis, G. & Lefkowitz, R. J. 2017. Distinct conformations of GPCR- $\beta$ -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 2562-2567.
- Canola, K., Angénioux, B., Tekaya, M., Quiambao, A., Naash, M. I., Munier, F. L., Schorderet, D. F. & Arsenijevic, Y. 2007. Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 446-54.
- Carrier, G. O. & White, R. E. 1985. Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 232, 682-7.
- Castillo-Badillo, J. A., Sánchez-Reyes, O. B., Alfonzo-Méndez, M. A., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G. & García-Sáinz, J. A. 2015.  $\alpha$ 1B-adrenergic receptors differentially associate with Rab proteins during homologous and heterologous desensitization. *PloS one*, 10, e0121165-e0121165.
- Cavalli, A., Lattion, A. L., Hummler, E., Nenniger, M., Pedrazzini, T., Aubert, J. F., Michel, M. C., Yang, M., Lembo, G., Vecchione, C., Mostardini, M., Schmidt, A., Beermann, F. & Cotecchia, S. 1997. Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11589-94.
- Chakravarthy, U., Gardiner, T. A., Anderson, P., Archer, D. B. & Trimble, E. R. 1992. The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvasc Res*, 43, 241-54.
- Chalothorn, D., McCune, D. F., Edelmann, S. E., Tobita, K., Keller, B. B., Lasley, R. D., Perez, D. M., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Post, G. R. & Piascik, M. T. 2003. Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 305, 1045-53.
- Chauhan, B. C., LeVatte, T. L., Jollimore, C. A., Yu, P. K., Reitsamer, H. A., Kelly, M. E. M., Yu, D.-Y., Tremblay, F. o. & Archibald, M. L. 2004. Model of Endothelin-1-Induced Chronic Optic Neuropathy in Rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 144-152.
- Chen, H., Fetscher, C., Schafers, R. F., Wambach, G., Philipp, T. & Michel, M. C. 1996. Effects of noradrenaline and neuropeptide Y on rat mesenteric microvessel contraction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 353, 314-23.
- Chen, X. L. & Rembold, C. M. 1995. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. *Am J Physiol*, 268, H74-81.
- Chen, Y., Palczewska, G., Mustafi, D., Golczak, M., Dong, Z., Sawada, O., Maeda, T., Maeda, A. & Palczewski, K. 2013. Systems pharmacology identifies drug targets for Stargardt disease-associated retinal degeneration. *The Journal of clinical investigation*, 123, 5119-5134.
- Chiou, G. C. Y. 1983. Effects of  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 activation of adrenergic receptors on aqueous humor dynamics. *Life Sciences*, 32, 1699-1704.
- Chung, H. S., Harris, A., Kagemann, L. & Martin, B. 1999. Peripapillary retinal blood flow in normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 83, 466-9.

- Cioffi, G. A., Wang, L., Fortune, B., Cull, G., Dong, J., Bui, B. & Van Buskirk, E. M. 2004. Chronic ischemia induces regional axonal damage in experimental primate optic neuropathy. *Arch Ophthalmol*, 122, 1517-25.
- Clayton, D. F. & George, J. M. 1998. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*, 21, 249-54.
- Coakes, R. L. & Brubaker, R. F. 1978. The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure: in the normal eye. *Archives of ophthalmology*, 96, 2045-2048.
- Cohen, L. 1965. Relationships between visual function and metabolism. *Biochemistry of the Eye*, 36-50.
- Collette, K. M., Zhou, X. D., Amoth, H. M., Lyons, M. J., Papay, R. S., Sens, D. A., Perez, D. M. & Doze, V. A. 2014. Long-term  $\alpha$ 1B-adrenergic receptor activation shortens lifespan, while  $\alpha$ 1A-adrenergic receptor stimulation prolongs lifespan in association with decreased cancer incidence. *Age (Dordr)*, 36, 9675.
- Costagliola, C., dell'Omo, R., Romano, M. R., Rinaldi, M., Zeppa, L. & Parmeggiani, F. 2009. Pharmacotherapy of intraocular pressure: part I. Parasympathomimetic, sympathomimetic and sympatholytics. *Expert Opin Pharmacother*, 10, 2663-77.
- Country, M. W. 2017. Retinal metabolism: a comparative look at energetics in the retina. *Brain Research*, 1672, 50-57.
- Dabin, I. & Barnstable, C. J. 1995. Rat retinal Müller cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia*, 14, 23-32.
- Daly, C. J., Deighan, C., McGee, A., Mennie, D., Ali, Z., McBride, M. & McGrath, J. C. 2002. A knockout approach indicates a minor vasoconstrictor role for vascular  $\alpha$ 1B-adrenoceptors in mouse. *Physiol Genomics*, 9, 85-91.
- Day, H. E., Campeau, S., Watson, S. J., Jr. & Akil, H. 1997. Distribution of  $\alpha$ 1a-,  $\alpha$ 1b- and  $\alpha$ 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat*, 13, 115-39.
- Deighan, C., Methven, L., Naghadeh, M. M., Wokoma, A., Macmillan, J., Daly, C. J., Tanoue, A., Tsujimoto, G. & McGrath, J. C. 2005. Insights into the functional roles of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes in mouse carotid arteries using knockout mice. *British Journal of Pharmacology*, 144, 558-565.
- Delaey, C. & Van De Voorde, J. 2000. Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Res*, 32, 249-56.
- Denninger, J. W. & Marletta, M. A. 1999. Guanylate cyclase and the  $\cdot$ NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411, 334-350.
- Dijk, F., Bergen, A. A. & Kamphuis, W. 2007. GAP-43 expression is upregulated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage. *Exp Eye Res*, 84, 858-67.
- Docherty, J. R. 2010. Subtypes of functional  $\alpha$ 1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci*, 67, 405-17.
- Docherty, J. R. 2019. The pharmacology of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, 855, 305-320.
- Dollery, C. T., Hill, D. W. & Hodge, J. V. 1963. The response of normal retinal blood vessels to angiotensin and noradrenaline. *J Physiol*, 165, 500-7.
- Domyancic, A. V. & Morilak, D. A. 1997. Distribution of  $\alpha$ 1A adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by in situ hybridization. *J Comp Neurol*, 386, 358-78.

- Donati, G., Pournaras, C. J., Munoz, J. L., Poitry, S., Poitry-Yamate, C. L. & Tsacopoulos, M. 1995. Nitric oxide controls arteriolar tone in the retina of the miniature pig. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, 2228-37.
- Doze, V. A., Papay, R. S., Goldenstein, B. L., Gupta, M. K., Collette, K. M., Nelson, B. W., Lyons, M. J., Davis, B. A., Luger, E. J., Wood, S. G., Haselton, J. R., Simpson, P. C. & Perez, D. M. 2011. Long-term  $\alpha$ 1A-adrenergic receptor stimulation improves synaptic plasticity, cognitive function, mood, and longevity. *Molecular pharmacology*, 80, 747-758.
- Dräger, U. C. & Olsen, J. F. 1981. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 20, 285-93.
- Ehinger, B. 1966. Distribution of adrenergic nerves in the eye and some related structures in the cat. *Acta Physiol Scand*, 66, 123-8.
- Ethier, C. R. 2002. The inner wall of Schlemm's canal. *Exp Eye Res*, 74, 161-72.
- Fechtner, R. D. & Weinreb, R. N. 1994. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, 39, 23-42.
- Fernandes, K. A., Harder, J. M., Fornarola, L. B., Freeman, R. S., Clark, A. F., Pang, I.-H., John, S. W. M. & Libby, R. T. 2012. JNK2 and JNK3 are major regulators of axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *Neurobiology of disease*, 46, 393-401.
- Ferrari-Dileo, G., Davis, E. B. & Anderson, D. R. 1990. Response of retinal vasculature to phenylephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 31, 1181-2.
- Filipeanu, C. M., Zhou, F., Fugetta, E. K. & Wu, G. 2006. Differential regulation of the cell-surface targeting and function of beta- and alpha1-adrenergic receptors by Rab1 GTPase in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol*, 69, 1571-8.
- Flammer, J., Konieczka, K. & Flammer, A. J. 2013. The primary vascular dysregulation syndrome: implications for eye diseases. *EPMA Journal*, 4, 14.
- Flammer, J., Orgül, S., Costa, V. P., Orzalesi, N., Kriegelstein, G. K., Serra, L. M., Renard, J.-P. & Stefánsson, E. 2002. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 21, 359-393.
- Forster, B. A., Ferrari-Dileo, G. & Anderson, D. R. 1987. Adrenergic alpha 1 and alpha 2 binding sites are present in bovine retinal blood vessels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28, 1741-1746.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. & Schiöth, H. B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63, 1256-72.
- Friberg, T. R., Sanborn, G. & Weinreb, R. N. 1987. Intraocular and episcleral venous pressure increase during inverted posture. *American journal of ophthalmology*, 103, 523-526.
- Friedman, D. S., Wilson, M. R., Liebmann, J. M., Fechtner, R. D. & Weinreb, R. N. 2004. An evidence-based assessment of risk factors for the progression of ocular hypertension and glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 138, 19-31.
- Galindo-Romero, C., Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M. & Agudo-Barriuso, M. 2011. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res*, 92, 377-87.
- Gan, L., Wang, S. W., Huang, Z. & Klein, W. H. 1999. POU domain factor Brn-3b is essential for retinal ganglion cell differentiation and survival but not for initial cell fate specification. *Dev Biol*, 210, 469-80.

- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Agudo, M., Cuenca, N., Pinilla, I., Vidal-Sanz, M. & Villegas-Pérez, M. P. 2010. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res*, 91, 800-10.
- García-Sáinz, J. A., Vázquez-Cuevas, F. G. & Romero-Avila, M. T. 2001. Phosphorylation and desensitization of alpha1d-adrenergic receptors. *The Biochemical journal*, 353, 603-610.
- García-Sainz, J. A., Vazquez-Prado, J. & Villalobos-Molina, R. 1999. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res*, 30, 449-58.
- Garhöfer, G., Resch, H., Lung, S., Weigert, G. & Schmetterer, L. 2005. Intravenous administration of L-arginine increases retinal and choroidal blood flow. *Am J Ophthalmol*, 140, 69-76.
- Gaul, G. R., Will, N. J. & Brubaker, R. F. 1989. Comparison of a noncardioselective  $\beta$ -adrenoceptor blocker and a cardioselective blocker in reducing aqueous flow in humans. *Archives of ophthalmology*, 107, 1308-1311.
- George, J. M. 2002. The synucleins. *Genome biology*, 3, REVIEWS3002-REVIEWS3002.
- Gericke, A., Goloborodko, E., Sniatecki, J. J., Steege, A., Wojnowski, L. & Pfeiffer, N. 2013. Contribution of nitric oxide synthase isoforms to cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Exp Eye Res*, 109, 60-6.
- Gericke, A., Kordasz, M. L., Steege, A., Sanbe, A., Goloborodko, E., Vetter, J. M., Patzak, A. & Pfeiffer, N. 2011. Functional role of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes in murine ophthalmic arteries. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52, 4795-4799.
- Gericke, A., Martinka, P., Nazarenko, I., Persson, P. B. & Patzak, A. 2007. Impact of alpha1-adrenoceptor expression on contractile properties of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, R1215-21.
- Gherghel, D., Orgul, S., Gugleta, K., Gekkieva, M. & Flammer, J. 2000. Relationship between ocular perfusion pressure and retrobulbar blood flow in patients with glaucoma with progressive damage. *Am J Ophthalmol*, 130, 597-605.
- Gonzalez-Cabrera, P. J., Gaivin, R. J., Yun, J., Ross, S. A., Papay, R. S., McCune, D. F., Rorabaugh, B. R. & Perez, D. M. 2003. Genetic profiling of alpha 1-adrenergic receptor subtypes by oligonucleotide microarrays: coupling to interleukin-6 secretion but differences in STAT3 phosphorylation and gp-130. *Mol Pharmacol*, 63, 1104-16.
- Goto, W., Oku, H., Okuno, T., Sugiyama, T. & Ikeda, T. 2003. Amelioration by topical bunazosin hydrochloride of the impairment in ocular blood flow caused by nitric oxide synthase inhibition in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther*, 19, 63-73.
- Graham, R. M., Perez, D. M., Hwa, J. & Piascik, M. T. 1996. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res*, 78, 737-49.
- Graw, J. 2010. Eye development. *Curr Top Dev Biol*, 90, 343-86.
- Greenfield, D. S., Liebmann, J. M. & Ritch, R. 1997. Brimonidine: a new alpha2-adrenoreceptor agonist for glaucoma treatment. *J Glaucoma*, 6, 250-8.
- Grehn, F. 2019. Glaukom. *Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Grieshaber, M. C. & Flammer, J. 2005. Blood flow in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*, 16, 79-83.
- Guimaraes, S. & Moura, D. 2001. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*, 53, 319-56.
- Gupta, D. & Chen, P. P. 2016. Glaucoma. *Am Fam Physician*, 93, 668-74.

- Gupta, M. K., Papay, R. S., Jurgens, C. W., Gaivin, R. J., Shi, T., Doze, V. A. & Perez, D. M. 2009. alpha1-Adrenergic receptors regulate neurogenesis and gliogenesis. *Mol Pharmacol*, 76, 314-26.
- Haavik, J. & Toska, K. 1998. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 16, 285-309.
- Haefliger, I. O., Flammer, J., Bény, J.-L. & Lüscher, T. F. 2001. Endothelium-dependent Vasoactive Modulation in the Ophthalmic Circulation. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20, 209-225.
- Hanan Awad, A., Gemma, N., David, A., Irene, R.-R., Juan, S.-N., Maria, J. P. d. L., Rafael, F. & Jesus, P. 2019. Adrenergic-melatonin heteroreceptor complexes are key in controlling ion homeostasis and intraocular eye pressure and their disruption contributes to hypertensive glaucoma. *bioRxiv*, 636688.
- Harino, S., Nishimura, K., Kitanishi, K., Suzuki, M. & Reinach, P. 1999. Role of nitric oxide in mediating retinal blood flow regulation in cats. *J Ocul Pharmacol Ther*, 15, 295-303.
- Harris, A., Guidoboni, G., Arciero, J. C., Amireskandari, A., Tobe, L. A. & Siesky, B. A. 2013. Ocular hemodynamics and glaucoma: the role of mathematical modeling. *Eur J Ophthalmol*, 23, 139-46.
- Hedemann, J., Fetscher, C. & Michel, M. C. 2004. Comparison of noradrenaline and lysosphingolipid-induced vasoconstriction in mouse and rat small mesenteric arteries. *Auton Autacoid Pharmacol*, 24, 77-85.
- Heijl, A., Leske, M. C., Bengtsson, B., Hyman, L., Bengtsson, B. & Hussein, M. 2002. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Archives of ophthalmology*, 120, 1268-1279.
- Hellstrom, W. J. & Sikka, S. C. 2006. Effects of acute treatment with tamsulosin versus alfuzosin on ejaculatory function in normal volunteers. *J Urol*, 176, 1529-33.
- Hieble, J. P., Bylund, D. B., Clarke, D. E., Eikenburg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P. & Ruffolo, R. R., Jr. 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev*, 47, 267-70.
- Ho, C. H. & Wong, J. K. W. 2019. Role of 24-Hour Intraocular Pressure Monitoring in Glaucoma Management. *Journal of ophthalmology*, 2019, 3632197-3632197.
- Hosoda, C., Tanoue, A., Shibano, M., Tanaka, Y., Hiroyama, M., Koshimizu, T. A., Cotecchia, S., Kitamura, T., Tsujimoto, G. & Koike, K. 2005. Correlation between vasoconstrictor roles and mRNA expression of alpha1-adrenoceptor subtypes in blood vessels of genetically engineered mice. *Br J Pharmacol*, 146, 456-66.
- Hoste, A. M., Boels, P. J., Andries, L. J., Brutsaert, D. L. & De Laey, J. J. 1990. Effects of beta-antagonists on contraction of bovine retinal microarteries in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 31, 1231-7.
- Hoste, A. M., Boels, P. J., Brutsaert, D. L. & De Laey, J. J. 1989. Effect of alpha-1 and beta agonists on contraction of bovine retinal resistance arteries in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 30, 44-50.
- Hrometz, S. L., Edelmann, S. E., McCune, D. F., Olges, J. R., Hadley, R. W., Perez, D. M. & Piascik, M. T. 1999. Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *J Pharmacol Exp Ther*, 290, 452-63.
- Ichikawa, M., Okada, Y., Asai, Y., Hara, H., Ishii, K. & Araie, M. 2004. Effects of topically instilled bunazosin, an alpha1-adrenoceptor antagonist, on

- constrictions induced by phenylephrine and ET-1 in rabbit retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 4041-8.
- Innemeer, H. C., de Jonge, A., van Meel, J. C., Timmermans, P. B. & van Zwieten, P. A. 1981. The effect of selective alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor stimulation on intraocular pressure in the conscious rabbit. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 316, 294-8.
- Isenmann, S., Kretz, A. & Cellierino, A. 2003. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res*, 22, 483-543.
- Ivanov, A. & Aston-Jones, G. 1995. Extranuclear dendrites of locus coeruleus neurons: activation by glutamate and modulation of activity by alpha adrenoceptors. *J Neurophysiol*, 74, 2427-36.
- Jampel, H. D., Lynch, M. G., Brown, R. H., Kuhar, M. J. & De Souza, E. B. 1987. Beta-adrenergic receptors in human trabecular meshwork. Identification and autoradiographic localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28, 772-9.
- Jandrasits, K., Luksch, A., Söregi, G., Dorner, G. T., Polak, K. & Schmetterer, L. 2002. Effect of noradrenaline on retinal blood flow in healthy subjects. *Ophthalmology*, 109, 291-295.
- Jelsma, T. N., Friedman, H. H., Berkelaar, M., Bray, G. M. & Aguayo, A. J. 1993. Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J Neurobiol*, 24, 1207-14.
- Jensen, B. C., Swigart, P. M., Laden, M.-E., DeMarco, T., Hoopes, C. & Simpson, P. C. 2009a. The alpha-1D is the predominant alpha-1-adrenergic receptor subtype in human epicardial coronary arteries. *Journal of the American College of Cardiology*, 54, 1137-1145.
- Jensen, B. C., Swigart, P. M. & Simpson, P. C. 2009b. Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 379, 409-12.
- Jeon, C. J., Strettoi, E. & Masland, R. H. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18, 8936-8946.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L. & Greenberg, D. A. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11946-50.
- Jin, Y., Verstappen, A. & Yorio, T. 1994. Characterization of alpha 2-adrenoceptor binding sites in rabbit ciliary body membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 2500-8.
- Joachim, S. C., Grus, F. H., Kraft, D., White-Farrar, K., Barnes, G., Barbeck, M., Ghanaati, S., Cao, S., Li, B. & Wax, M. B. 2009. Complex Antibody Profile Changes in an Experimental Autoimmune Glaucoma Animal Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 4734-4742.
- Johnson, J. E., Barde, Y. A., Schwab, M. & Thoenen, H. 1986. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 6, 3031-3038.
- Johnson, M. 2006. 'What controls aqueous humour outflow resistance?'. *Experimental eye research*, 82, 545-557.
- Johnson, T. V., Fan, S. & Toris, C. B. 2008. Rebound tonometry in conscious, conditioned mice avoids the acute and profound effects of anesthesia on intraocular pressure. *J Ocul Pharmacol Ther*, 24, 175-85.

- Johnson, T. V. & Martin, K. R. 2008. Development and Characterization of an Adult Retinal Explant Organotypic Tissue Culture System as an In Vitro Intraocular Stem Cell Transplantation Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 3503-3512.
- Ju, W.-K., Kim, K.-Y., Lindsey, J. D., Angert, M., Duong-Polk, K. X., Scott, R. T., Kim, J. J., Kukhmazov, I., Ellisman, M. H., Perkins, G. A. & Weinreb, R. N. 2008. Intraocular pressure elevation induces mitochondrial fission and triggers OPA1 release in glaucomatous optic nerve. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49, 4903-4911.
- Katsimpris, J. M., Siganos, D., Konstas, A. G., Kozobolis, V. & Georgiadis, N. 2003. Efficacy of brimonidine 0.2% in controlling acute postoperative intraocular pressure elevation after phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg*, 29, 2288-94.
- Katz, I. M., Hubbard, W. A., Getson, A. J. & Gould, A. L. 1976. Intraocular pressure decrease in normal volunteers following timolol ophthalmic solution. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 15, 489-492.
- Kawamura, H., Oku, H., Li, Q., Sakagami, K. & Puro, D. G. 2002. Endothelin-Induced Changes in the Physiology of Retinal Pericytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 882-888.
- Kawasaki, R., Wang, J. J., Rochtchina, E., Lee, A. J., Wong, T. Y. & Mitchell, P. 2013. Retinal vessel caliber is associated with the 10-year incidence of glaucoma: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, 120, 84-90.
- Khalin, I., Alyautdin, R., Kocherga, G. & Bakar, M. A. 2015. Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness. *International journal of nanomedicine*, 10, 3245-3267.
- Kim, C. H., Ko, I. G., Kim, S. E., Shin, M. S., Kang, Y. H., Cho, J. W., Shin, K. M., Kim, C. J., Lim, B. V. & Kim, K. H. 2015. Alpha1-Adrenoceptor Antagonists Improve Memory by Activating N-methyl-D-Aspartate-Induced Ion Currents in the Rat Hippocampus. *Int Neurol J*, 19, 228-36.
- Kim, D. H., Kim, H. S., Ahn, M. D. & Chun, M. H. 2004. Ganglion cell death in rat retina by persistent intraocular pressure elevation. *Korean J Ophthalmol*, 18, 15-22.
- Kim, S.-E., Han, J.-H., Ko, I.-G., Kim, C.-J. & Kim, K. H. 2017. Alpha1-adrenergic receptor antagonist tamsulosin ameliorates aging-induced memory impairment by enhancing neurogenesis and suppressing apoptosis in the hippocampus of old-aged rats. *Animal Cells and Systems*, 21, 404-411.
- Kim, S. E., Ko, I. G., Kim, B. K., Shin, M. S., Cho, S., Kim, C. J., Kim, S. H., Baek, S. S., Lee, E. K. & Jee, Y. S. 2010. Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Exp Gerontol*, 45, 357-65.
- Kim, S. E., Shin, M. S., Kim, C. J., Park, J. H., Chung, K. J., Jung, H., Kim, K. H., Lee, J. H. & Ko, I. G. 2012. Effects of Tamsulosin on Urinary Bladder Function and Neuronal Activity in the Voiding Centers of Rats with Cyclophosphamide-induced Overactive Bladder. *Int Neurol J*, 16, 13-22.
- Kirkwood, A., Rozas, C., Kirkwood, J., Perez, F. & Bear, M. F. 1999. Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *J Neurosci*, 19, 1599-609.
- Kitano, S., Morgan, J. & Caprioli, J. 1996. Hypoxic and Excitotoxic Damage to Cultured Rat Retinal Ganglion Cells. *Experimental Eye Research*, 63, 105-112.

- Kiuchi, Y., Yoshitomi, T. & Gregory, D. S. 1992. Do alpha-adrenergic receptors participate in control of the circadian rhythm of IOP? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33, 3186-94.
- Klemm, P., Hurst, J., Dias Blak, M., Herrmann, T., Melchinger, M., Bartz-Schmidt, K. U., Zeck, G., Schultheiss, M., Spitzer, M. S. & Schnichels, S. 2019. Hypothermia protects retinal ganglion cells against hypoxia-induced cell death in a retina organ culture model. *Clin Exp Ophthalmol*, 47, 1043-1054.
- Knauber, J. & Muller, W. E. 2000. Decreased exploratory activity and impaired passive avoidance behaviour in mice deficient for the alpha(1b)-adrenoceptor. *Eur Neuropsychopharmacol*, 10, 423-7.
- Knowles, R. G. & Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 ( Pt 2), 249-58.
- Kordasz, M. L., Manicam, C., Steege, A., Goloborodko, E., Amato, C., Laspas, P., Brochhausen, C., Pfeiffer, N. & Gericke, A. 2014. Role of alpha(1)-adrenoceptor subtypes in pupil dilation studied with gene-targeted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55, 8295-301.
- Koss, M. C. 1998. Role of nitric oxide in maintenance of basal anterior choroidal blood flow in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 559-64.
- Kur, J., Newman, E. A. & Chan-Ling, T. 2012. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in retinal and eye research*, 31, 377-406.
- Laspas, P., Sniatecki, J. J., Brochhausen, C., Steege, A., Goloborodko, E., Kordasz, M. L., Grus, F. H., Pfeiffer, N. & Gericke, A. 2015. Effect of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor on Retinal Neuron Number Studied with Gene-Targeted Mice. *J Mol Neurosci*, 56, 472-9.
- Le, A., Mukesh, B. N., McCarty, C. A. & Taylor, H. R. 2003. Risk Factors Associated with the Incidence of Open-Angle Glaucoma: The Visual Impairment Project. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 3783-3789.
- Leske, M. C., Heijl, A., Hussein, M., Bengtsson, B., Hyman, L. & Komaroff, E. 2003. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol*, 121, 48-56.
- Li, H., Zhu, Z., Liu, J., Wang, J. & Qu, C. 2018. MicroRNA-137 regulates hypoxia-induced retinal ganglion cell apoptosis through Notch1. *Int J Mol Med*, 41, 1774-1782.
- Li, Y., Schlamp, C. L., Poulsen, K. P. & Nickells, R. W. 2000. Bax-dependent and independent pathways of retinal ganglion cell death induced by different damaging stimuli. *Exp Eye Res*, 71, 209-13.
- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J. & Schilling, K. 2005. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res*, 79, 295-302.
- Liu, J. H., Kripke, D. F., Hoffman, R. E., Twa, M. D., Loving, R. T., Rex, K. M., Gupta, N. & Weinreb, R. N. 1998. Nocturnal elevation of intraocular pressure in young adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 2707-12.
- Liu, J. H. K., Kripke, D. F., Twa, M. D., Hoffman, R. E., Mansberger, S. L., Rex, K. M., Girkin, C. A. & Weinreb, R. N. 1999. Twenty-Four-Hour Pattern of Intraocular Pressure in the Aging Population. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 2912-2917.
- Liu, Z. & Khalil, R. A. 2018. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem Pharmacol*, 153, 91-122.

- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- Lutjen-Drecoll, E. 1999. Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog Retin Eye Res*, 18, 91-119.
- Lütjen-Drecoll, E., Futa, R. & Rohen, J. W. 1981. Ultrahistochemical studies on tangential sections of the trabecular meshwork in normal and glaucomatous eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 21, 563-573.
- Marcus, M. W., de Vries, M. M., Montolio, F. G. J. & Jansonius, N. M. 2011. Myopia as a Risk Factor for Open-Angle Glaucoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmology*, 118, 1989-1994.e2.
- Martí, D., Miquel, R., Ziani, K., Gisbert, R., Ivorra, M. D., Anselmi, E., Moreno, L., Villagrasa, V., Barettino, D. & D'Ocon, P. 2005. Correlation between mRNA levels and functional role of  $\alpha$ 1-adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of  $\alpha$ 1L as a functional isoform of the  $\alpha$ 1A-adrenoceptor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289, H1923-H1932.
- Martinez-Salas, S. G., Campos-Peralta, J. M., Pares-Hipolito, J., Gallardo-Ortiz, I. A., Ibarra, M. & Villalobos-Molina, R. 2007. Alpha1A-adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. *Auton Autacoid Pharmacol*, 27, 137-42.
- Masland, R. H. 2012. The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76, 266-280.
- McKerracher, L., Vallee, R. B. & Aguayo, A. J. 1989. Microtubule-associated protein 1A (MAP 1A) is a ganglion cell marker in adult rat retina. *Vis Neurosci*, 2, 349-56.
- Medeiros, F. A., Sample, P. A., Zangwill, L. M., Bowd, C., Aihara, M. & Weinreb, R. N. 2003. Corneal thickness as a risk factor for visual field loss in patients with preperimetric glaucomatous optic neuropathy. *American Journal of Ophthalmology*, 136, 805-813.
- Mekada, K. & Yoshiki, A. 2021. Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. *Exp Anim*, 70, 145-160.
- Methven, L., Simpson, P. C. & McGrath, J. C. 2009. Alpha1A/B-knockout mice explain the native alpha1D-adrenoceptor's role in vasoconstriction and show that its location is independent of the other alpha1-subtypes. *Br J Pharmacol*, 158, 1663-75.
- Mey, J. & Thanos, S. 1993. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res*, 602, 304-17.
- Meyer, P., Champion, C., Schlötzer-Schrehardt, U., Flammer, J. & Haefliger, I. O. 1999. Localization of nitric oxide synthase isoforms in porcine ocular tissues. *Curr Eye Res*, 18, 375-80.
- Michelson, G., Langhans, M. J. & Groh, M. J. 1996. Perfusion of the juxtapapillary retina and the neuroretinal rim area in primary open angle glaucoma. *J Glaucoma*, 5, 91-8.
- Minneman, K. P. 1988. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell  $Ca^{2+}$ . *Pharmacol Rev*, 40, 87-119.
- Mittag, T. W. & Tormay, A. 1985. Adrenergic receptor subtypes in rabbit iris-ciliary body membranes: classification by radioligand studies. *Exp Eye Res*, 40, 239-49.
- Mori, A., Hanada, M., Sakamoto, K., Nakahara, T. & Ishii, K. 2011. Noradrenaline contracts rat retinal arterioles via stimulation of  $\alpha$ 1A- and  $\alpha$ 1D-adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*, 673, 65-69.

- Mori, A., Saito, M., Sakamoto, K., Narita, M., Nakahara, T. & Ishii, K. 2007. Stimulation of prostanoid IP and EP(2) receptors dilates retinal arterioles and increases retinal and choroidal blood flow in rats. *Eur J Pharmacol*, 570, 135-41.
- Morris, C. A., Crowston, J. G., Lindsey, J. D., Danias, J. & Weinreb, R. N. 2006. Comparison of invasive and non-invasive tonometry in the mouse. *Exp Eye Res*, 82, 1094-9.
- Mueed, I., Bains, P., Zhang, L. & Macleod, K. M. 2004. Differential participation of protein kinase C and Rho kinase in alpha 1-adrenoceptor mediated contraction in rat arteries. *Can J Physiol Pharmacol*, 82, 895-902.
- Mullen, R. J., Buck, C. R. & Smith, A. M. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116, 201-11.
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Alburquerque-Béjar, J. J., Vidal-Sanz, M. & Agudo-Barriuso, M. 2012. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PloS one*, 7, e49830-e49830.
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M. & Agudo, M. 2009. Brn3a as a Marker of Retinal Ganglion Cells: Qualitative and Quantitative Time Course Studies in Naïve and Optic Nerve–Injured Retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 3860-3868.
- Nathanson, J. A. 1980. Adrenergic regulation of intraocular pressure: identification of beta 2-adrenergic-stimulated adenylate cyclase in ciliary process epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7420-4.
- Nickells, R. W. 1996. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. *J Glaucoma*, 5, 345-56.
- Nicolela, M. T., Hnik, P. & Drance, S. M. 1996. Scanning laser Doppler flowmeter study of retinal and optic disk blood flow in glaucomatous patients. *Am J Ophthalmol*, 122, 775-83.
- Nielsen, P. J. & Nyborg, N. C. 1989. Adrenergic responses in isolated bovine retinal resistance arteries. *Int Ophthalmol*, 13, 103-7.
- Nishimura, K., Kuwayama, Y., Matsugi, T., Sun, N. & Shirasawa, E. 1993. Selective suppression by bunazosin of alpha-adrenergic agonist evoked elevation of intraocular pressure in sympathectomized rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 1761-6.
- Nishimura, K., Shirasawa, E., Kinoshita, M., Hikida, M. & Kuwayama, Y. 1991. [Ocular hypotensive effects of topically applied bunazosin, an alpha 1-adrenoceptor blocker, in rabbits and cats]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 95, 746-51.
- Numakawa, T., Odaka, H. & Adachi, N. 2018. Actions of Brain-Derived Neurotrophin Factor in the Neurogenesis and Neuronal Function, and Its Involvement in the Pathophysiology of Brain Diseases. *International journal of molecular sciences*, 19, 3650.
- Ohira, K. & Hayashi, M. 2009. A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Current neuropharmacology*, 7, 276-285.
- Okada, K. & Gregory, D. S. 2001. Hydroxyamphetamine increases intraocular pressure in rabbits. *Arch Ophthalmol*, 119, 235-9.
- Osborne, N. N., Melena, J., Chidlow, G. & Wood, J. P. 2001. A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head:

- possible implication for the treatment of glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 85, 1252-9.
- Oshika, T. & Araie, M. 1990. [Changes in intraocular pressure and aqueous humor dynamics of normal human eyes after topical application of bunazosin hydrochloride]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 94, 762-8.
- Oshika, T., Araie, M., Sugiyama, T., Nakajima, M. & Azuma, I. 1991. Effect of bunazosin hydrochloride on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in normotensive human eyes. *Arch Ophthalmol*, 109, 1569-74.
- Overby, D. R., Stamer, W. D. & Johnson, M. 2009. The changing paradigm of outflow resistance generation: Towards synergistic models of the JCT and inner wall endothelium. *Experimental Eye Research*, 88, 656-670.
- Overby, D. R., Zhou, E. H., Vargas-Pinto, R., Pedrigi, R. M., Fuchshofer, R., Braakman, S. T., Gupta, R., Perkumas, K. M., Sherwood, J. M., Vahabikashi, A., Dang, Q., Kim, J. H., Ethier, C. R., Stamer, W. D., Fredberg, J. J. & Johnson, M. 2014. Altered mechanobiology of Schlemm's canal endothelial cells in glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 13876-13881.
- Palacios, J. M., Hoyer, D. & Cortes, R. 1987. alpha 1-Adrenoceptors in the mammalian brain: similar pharmacology but different distribution in rodents and primates. *Brain Res*, 419, 65-75.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S. & Moncada, S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664-6.
- Pang, I. H. & Clark, A. F. 2007. Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma*, 16, 483-505.
- Papay, R., Gaivin, R., Jha, A., McCune, D. F., McGrath, J. C., Rodrigo, M. C., Simpson, P. C., Doze, V. A. & Perez, D. M. 2006. Localization of the mouse alpha1A-adrenergic receptor (AR) in the brain: alpha1AAR is expressed in neurons, GABAergic interneurons, and NG2 oligodendrocyte progenitors. *J Comp Neurol*, 497, 209-22.
- Papay, R., Gaivin, R., McCune, D. F., Rorabaugh, B. R., Macklin, W. B., McGrath, J. C. & Perez, D. M. 2004. Mouse alpha1B-adrenergic receptor is expressed in neurons and NG2 oligodendrocytes. *J Comp Neurol*, 478, 1-10.
- Papay, R., Zuscik, M. J., Ross, S. A., Yun, J., McCune, D. F., Gonzalez-Cabrera, P., Gaivin, R., Drazba, J. & Perez, D. M. 2002. Mice expressing the alpha1B-adrenergic receptor induces a synucleinopathy with excessive tyrosine nitration but decreased phosphorylation. *Journal of Neurochemistry*, 83, 623-634.
- Pease, M. E., Hammond, J. C. & Quigley, H. A. 2006. Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice. *J Glaucoma*, 15, 512-9.
- Pederson, J. E., Gaasterland, D. E. & MacLellan, H. M. 1977. Uveoscleral aqueous outflow in the rhesus monkey: importance of uveal reabsorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16, 1008-7.
- Perry, V. H. 1981. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience*, 6, 931-944.
- Perry, V. H., Morris, R. J. & Raisman, G. 1984. Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve? *J Neurocytol*, 13, 809-24.
- Piasek, M. T., Guarino, R. D., Smith, M. S., Soltis, E. E., Saussy, D. L., Jr. & Perez, D. M. 1995. The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 275, 1583-9.

- Piasecik, M. T., Hrometz, S. L., Edelmann, S. E., Guarino, R. D., Hadley, R. W. & Brown, R. D. 1997. Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther*, 283, 854-68.
- Piasecik, M. T. & Perez, D. M. 2001. Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther*, 298, 403-10.
- Polak, K., Dorner, G., Kiss, B., Polska, E., Findl, O., Rainer, G., Eichler, H. G. & Schmetterer, L. 2000. Evaluation of the Zeiss retinal vessel analyser. *Br J Ophthalmol*, 84, 1285-90.
- Pollack, I. P. & Rossi, H. 1975. Norepinephrine in Treatment of Ocular Hypertension and Glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 93, 173-177.
- Price, D. T., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., Berkowitz, D. & Schwinn, D. A. 1994. Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol Pharmacol*, 45, 171-5.
- Pupo, A. S. & Minneman, K. P. 2001. Adrenergic pharmacology: focus on the central nervous system. *CNS Spectr*, 6, 656-62.
- Quigley, H. A. 1999. Neuronal death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18, 39-57.
- Quigley, H. A. & Broman, A. T. 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*, 90, 262-7.
- Quigley, H. A., McKinnon, S. J., Zack, D. J., Pease, M. E., Kerrigan-Baumrind, L. A., Kerrigan, D. F. & Mitchell, R. S. 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 3460-6.
- Quina, L. A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., Velasquez, T., O'Leary, D. D. M., Goulding, M. & Turner, E. E. 2005. Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 11595-11604.
- Rajagopal, S. & Shenoy, S. K. 2018. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cellular signalling*, 41, 9-16.
- Ramachandran, E., Frank, R. N. & Kennedy, A. 1993. Effects of endothelin on cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 586-95.
- Reiss, G. R., Lee, D. A., Topper, J. E. & Brubaker, R. F. 1984. Aqueous humor flow during sleep. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25, 776-8.
- Reitsamer, H. A., Posey, M. & Kiel, J. W. 2006. Effects of a topical alpha2 adrenergic agonist on ciliary blood flow and aqueous production in rabbits. *Exp Eye Res*, 82, 405-15.
- Resch, H., Garhofer, G., Fuchsjager-Mayrl, G., Hommer, A. & Schmetterer, L. 2009. Endothelial dysfunction in glaucoma. *Acta Ophthalmol*, 87, 4-12.
- Robinson, F., Riva, C. E., Grunwald, J. E., Petrig, B. L. & Sinclair, S. H. 1986. Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. *Investigative ophthalmology & visual science*, 27, 722-726.
- Rohen, J. W., Lutjen, E. & Barany, E. 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, 23-47.

- Rokosh, D. G. & Simpson, P. C. 2002. Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9474-9.
- Rosenbaum, D. M., Rosenbaum, P. S., Gupta, A., Michaelson, M. D., Hall, D. H. & Kessler, J. A. 1997. Retinal ischemia leads to apoptosis which is ameliorated by aurintricarboxylic acid. *Vision Research*, 37, 3445-3451.
- Roska, M. & Meister, M. 2014. The Retina Dissects the Visual Scene into Distinct Features. *Werner JS, Chalupa LM, editors. The New Visual Neurosciences. Cambridge, MA: MIT Press;*, pp. 163–182.
- Ruan, Y., Böhmer, T., Jiang, S. & Gericke, A. 2020. The Role of Adrenoceptors in the Retina. *Cells* [Online], 9.
- Saeki, T., Aihara, M., Ohashi, M. & Araie, M. 2008. The Efficacy of TonoLab in Detecting Physiological and Pharmacological Changes of Mouse Intraocular Pressure—Comparison with TonoPen and Microneedle Manometry. *Current Eye Research*, 33, 247-252.
- Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F. J., Jimenez-Lopez, M., Mayor-Torroglosa, S., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M. P. & Vidal-Sanz, M. 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res*, 90, 168-83.
- Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., Mayor, S., Holmes, T., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P. & Vidal-Sanz, M. 2009. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Research*, 49, 637-647.
- Sánchez-Migallón, M. C., Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M. & Agudo-Barriuso, M. 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res*, 92, 260-7.
- Sanes, J. R. & Masland, R. H. 2015. The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annu Rev Neurosci*, 38, 221-46.
- Schlamp, C. L., Johnson, E. C., Li, Y., Morrison, J. C. & Nickells, R. W. 2001. Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis*, 7, 192-201.
- Schmetterer, L., Findl, O., Strenn, K., Jilma, B., Graselli, U., Eichler, H. G. & Wolzt, M. 1997. Effects of endothelin-1 (ET-1) on ocular hemodynamics. *Curr Eye Res*, 16, 687-92.
- Schmetterer, L. & Polak, K. 2001. Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res*, 20, 823-47.
- Schroedl, F., Kaser-Eichberger, A., Schlereth, S. L., Bock, F., Regenfuss, B., Reitsamer, H. A., Lütty, G. A., Maruyama, K., Chen, L., Lutjen-Drecoll, E., Dana, R., Kerjaschki, D., Alitalo, K., De Stefano, M. E., Junghans, B. M., Heindl, L. M. & Cursiefen, C. 2014. Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55, 6440-2.
- Schwartz, M. 2005. Lessons for glaucoma from other neurodegenerative diseases: can one treatment suit them all? *J Glaucoma*, 14, 321-3.
- Scofield, M. A., Liu, F., Abel, P. W. & Jeffries, W. B. 1995. Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using

- reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther*, 275, 1035-42.
- Shen, J., Xiao, R., Bair, J., Wang, F., Vandenberghe, L. H., Dartt, D., Baranov, P. & Ng, Y. S. E. 2018. Novel engineered, membrane-localized variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) protect retinal ganglion cells: a proof-of-concept study. *Cell Death Dis*, 9, 1018.
- Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. 2011.  $\beta$ -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in pharmacological sciences*, 32, 521-533.
- Shepro, D. & Morel, N. M. 1993. Pericyte physiology. *Faseb j*, 7, 1031-8.
- Sherman, S. H., Green, K. & Laties, A. M. 1978. The fate of anterior chamber fluorescein in the monkey eye. 1. The anterior chamber outflow pathways. *Exp Eye Res*, 27, 159-73.
- Sirvio, J. & MacDonald, E. 1999. Central alpha1-adrenoceptors: their role in the modulation of attention and memory formation. *Pharmacol Ther*, 83, 49-65.
- Sommer, A. 1989. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 107, 186-8.
- Soto, I., Oglesby, E., Buckingham, B. P., Son, J. L., Roberson, E. D., Steele, M. R., Inman, D. M., Vetter, M. L., Horner, P. J. & Marsh-Armstrong, N. 2008. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci*, 28, 548-61.
- Stamer, W. D., Huang, Y., Seftor, R. E., Svensson, S. S., Snyder, R. W. & Regan, J. W. 1996. Cultured human trabecular meshwork cells express functional alpha 2A adrenergic receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37, 2426-33.
- Steuer, H., Jaworski, A., Elger, B., Kaussmann, M., Keldenich, J., Schneider, H., Stoll, D. & Schlosshauer, B. 2005. Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 1047-53.
- Sugiyama, T. 1991. [Effects of topically applied bunazosin hydrochloride on choroidal capillary blood flow and intraocular pressure of rabbit eye]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 95, 449-54.
- Sugiyama, T., Schwartz, B., Takamoto, T. & Azuma, I. 2000. Evaluation of the circulation in the retina, peripapillary choroid and optic disk in normal-tension glaucoma. *Ophthalmic Res*, 32, 79-86.
- Surgucheva, I., Weisman, A. D., Goldberg, J. L., Shnyra, A. & Surguchov, A. 2008. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis*, 14, 1540-8.
- Surguchov, A., McMahan, B., Masliah, E. & Surgucheva, I. 2001. Synucleins in ocular tissues. *J Neurosci Res*, 65, 68-77.
- Suzuki, F., Taniguchi, T., Nakamura, S., Akagi, Y., Kubota, C., Satoh, M. & Muramatsu, I. 2002. Distribution of alpha-1 adrenoceptor subtypes in RNA and protein in rabbit eyes. *British Journal of Pharmacology*, 135, 600-608.
- Szot, P., White, S. S., Greenup, J. L., Leverenz, J. B., Peskind, E. R. & Raskind, M. A. 2005. Alpha1-adrenoreceptor in human hippocampus: binding and receptor subtype mRNA expression. *Brain Res Mol Brain Res*, 139, 367-71.
- Takagi, T., Sun, N., Kuwayama, Y., Yamamoto, R., Tanaka, M., Kusunoki, T., Shimizu, Y. & Manabe, R. 1991. [The effect of bunazosin hydrochloride on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in human]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 95, 273-8.
- Tamm, E. R., Braunger, B. M. & Fuchshofer, R. 2015. Intraocular Pressure and the Mechanisms Involved in Resistance of the Aqueous Humor Flow in the Trabecular Meshwork Outflow Pathways. *Progress in molecular biology and translational science*, 134, 301-314.

- Tanoue, A., Koshimizu, T. A., Shibata, K., Nasa, Y., Takeo, S. & Tsujimoto, G. 2003. Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab*, 14, 107-13.
- Tanoue, A., Koshimizu, T. A. & Tsujimoto, G. 2002a. Transgenic studies of alpha(1)-adrenergic receptor subtype function. *Life Sci*, 71, 2207-15.
- Tanoue, A., Nasa, Y., Koshimizu, T., Shinoura, H., Oshikawa, S., Kawai, T., Sunada, S., Takeo, S. & Tsujimoto, G. 2002b. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest*, 109, 765-75.
- Tezel, G. & Wax, M. B. 2004. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  in the Glaucomatous Retina and OpticNerve Head. *Archives of Ophthalmology*, 122, 1348-1356.
- Tham, Y. C., Li, X., Wong, T. Y., Quigley, H. A., Aung, T. & Cheng, C. Y. 2014. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 121, 2081-90.
- Tian, B., Gabelt, B. A. T., Geiger, B. & Kaufman, P. L. 2009. The role of the actomyosin system in regulating trabecular fluid outflow. *Experimental eye research*, 88, 713-717.
- Tielsch, J. M., Katz, J., Sommer, A., Quigley, H. A. & Javitt, J. C. 1994. Family History and Risk of Primary Open Angle Glaucoma: The Baltimore Eye Survey. *Archives of Ophthalmology*, 112, 69-73.
- Tobe, L. A., Harris, A., Hussain, R. M., Eckert, G., Huck, A., Park, J., Egan, P., Kim, N. J. & Siesky, B. 2015. The role of retrobulbar and retinal circulation on optic nerve head and retinal nerve fibre layer structure in patients with open-angle glaucoma over an 18-month period. *British Journal of Ophthalmology*, 99, 609-612.
- Toda, N. & Nakanishi-Toda, M. 2007. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 26, 205-38.
- Toris, C. B. 2010. Pharmacotherapies for glaucoma. *Curr Mol Med*, 10, 824-40.
- Toris, C. B., Gleason, M. L., Camras, C. B. & Yablonski, M. E. 1995. Effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Arch Ophthalmol*, 113, 1514-7.
- Toris, C. B. & Pederson, J. E. 1985. Effect of intraocular pressure on uveoscleral outflow following cyclodialysis in the monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26, 1745-9.
- Townsend, D. J. & Brubaker, R. F. 1980. Immediate effect of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye as measured by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 19, 256-66.
- Trew, D. R., Wright, L. A. & Smith, S. E. 1991. Ocular responses in healthy subjects to topical bunazosin 0.3%--an alpha 1-adrenoceptor antagonist. *Br J Ophthalmol*, 75, 411-3.
- Turner, P. R., Mefford, S., Christakos, S. & Nissenson, R. A. 2000. Apoptosis mediated by activation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP). *Mol Endocrinol*, 14, 241-54.
- Ullmann, J. F. P., Moore, B. A., Temple, S. E., Fernández-Juricic, E. & Collin, S. P. 2012. The Retinal Wholemount Technique: A Window to Understanding the Brain and Behaviour. *Brain, Behavior and Evolution*, 79, 26-44.
- Vanderkooi, J. M., Erecinska, M. & Silver, I. A. 1991. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 260, C1131-C1150.
- Wang, R. F., Lee, P. Y., Mittag, T. W., Podos, S. M. & Serle, J. B. 1997. Effect of 5-methylurapidil, an alpha 1a-adrenergic antagonist and 5-hydroxytryptamine1a

- agonist, on aqueous humor dynamics in monkeys and rabbits. *Curr Eye Res*, 16, 769-75.
- Wang, S. W., Mu, X., Bowers, W. J., Kim, D. S., Plas, D. J., Crair, M. C., Federoff, H. J., Gan, L. & Klein, W. H. 2002a. Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development*, 129, 467-77.
- Wang, X., Tay, S. S. & Ng, Y. K. 2000. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res*, 132, 476-84.
- Wang, Y., Fawzi, A. A., Varma, R., Sadun, A. A., Zhang, X., Tan, O., Izatt, J. A. & Huang, D. 2011. Pilot study of optical coherence tomography measurement of retinal blood flow in retinal and optic nerve diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 840-5.
- Wang, Y. L., Hayashi, M., Yablonski, M. E. & Toris, C. B. 2002b. Effects of multiple dosing of epinephrine on aqueous humor dynamics in human eyes. *J Ocul Pharmacol Ther*, 18, 53-63.
- Warner, T. D., Mitchell, J. A., Sheng, H. & Murad, F. 1994. Effects of Cyclic GMP on Smooth Muscle Relaxation. In: MURAD, F. (ed.) *Advances in Pharmacology*. Academic Press.
- Wax, M. B. & Molinoff, P. B. 1987. Distribution and properties of beta-adrenergic receptors in human iris-ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28, 420-30.
- Wax, M. B., Tezel, G., Yang, J., Peng, G., Patil, R. V., Agarwal, N., Sappington, R. M. & Calkins, D. J. 2008. Induced Autoimmunity to Heat Shock Proteins Elicits Glaucomatous Loss of Retinal Ganglion Cell Neurons via Activated T-Cell-Derived Fas-Ligand. *The Journal of Neuroscience*, 28, 12085-12096.
- Wayman, L., Larsson, L.-I., Maus, T., Alm, A. & Brubaker, R. 1997. Comparison of dorzolamide and timolol as suppressors of aqueous humor flow in humans. *Archives of Ophthalmology*, 115, 1368-1371.
- Weishaupt, J. H., Klöcker, N. & Bähr, M. 2005. Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 26, 17-26.
- Wikberg-Matsson, A., UHLÉN, S. & Wikberg, J. E. S. 2000. Characterization of  $\alpha$ 1-Adrenoceptor Subtypes in the Eye. *Experimental Eye Research*, 70, 51-60.
- Wilson, K. M. & Minneman, K. P. 1989. Regional variations in alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain. *J Neurochem*, 53, 1782-6.
- Wong-Riley, M. T. 2010. Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain*, 2, 99-116.
- Wu, D., Katz, A., Lee, C. H. & Simon, M. I. 1992. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem*, 267, 25798-802.
- Xiang, M., Gan, L., Li, D., Zhou, L., Chen, Z. Y., Wagner, D., O'Malley, B. W., Jr., Klein, W. & Nathans, J. 1997. Role of the Brn-3 family of POU-domain genes in the development of the auditory/vestibular, somatosensory, and visual systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 62, 325-36.
- Xiang, M., Zhou, L., Macke, J. P., Yoshioka, T., Hendry, S. H., Eddy, R. L., Shows, T. B. & Nathans, J. 1995. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci*, 15, 4762-85.
- Xiang, M., Zhou, L., Peng, Y. W., Eddy, R. L., Shows, T. B. & Nathans, J. 1993. Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells. *Neuron*, 11, 689-701.

- Yeoh, M. & Brock, J. A. 2005. Rho kinase inhibitors reduce neurally evoked contraction of the rat tail artery in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 146, 854-861.
- Yu, D. Y., Alder, V. A., Cringle, S. J., Su, E. N. & Yu, P. K. 1994. Vasoactivity of intraluminal and extraluminal agonists in perfused retinal arteries. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35, 4087-4099.
- Yucel, Y. H., Johnston, M. G., Ly, T., Patel, M., Drake, B., Gumus, E., Fraenkl, S. A., Moore, S., Tobbia, D., Armstrong, D., Horvath, E. & Gupta, N. 2009. Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: a novel "uveolymphatic" outflow pathway. *Exp Eye Res*, 89, 810-9.
- Yun, J., Gaivin, R. J., McCune, D. F., Boongird, A., Papay, R. S., Ying, Z., Gonzalez-Cabrera, P. J., Najm, I. & Perez, D. M. 2003. Gene expression profile of neurodegeneration induced by  $\alpha 1B$ -adrenergic receptor overactivity: NMDA/GABAA dysregulation and apoptosis. *Brain*, 126, 2667-2681.
- Zacharia, J., Hillier, C., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Daly, C. J., McGrath, J. C. & MacDonald, A. 2005. Evidence for involvement of alpha1D-adrenoceptors in contraction of femoral resistance arteries using knockout mice. *Br J Pharmacol*, 146, 942-51.
- Zhan, G. L., Toris, C. B., Camras, C. B., Wang, Y. L. & Yablonski, M. E. 1998. Bunazosin reduces intraocular pressure in rabbits by increasing uveoscleral outflow. *J Ocul Pharmacol Ther*, 14, 217-28.
- Zhong, H. & Minneman, K. P. 1999. Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, 375, 261-76.
- Zhong, L., Bradley, J., Schubert, W., Ahmed, E., Adamis, A. P., Shima, D. T., Robinson, G. S. & Ng, Y. S. 2007. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 1212-8.
- Zilles, K., Gross, G., Schleicher, A., Schildgen, S., Bauer, A., Bahro, M., Schwendemann, G., Zech, K. & Kolassa, N. 1991. Regional and laminar distributions of alpha 1-adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. *Neuroscience*, 40, 307-20.
- Zuscik, M. J., Sands, S., Ross, S. A., Waugh, D. J., Gaivin, R. J., Morilak, D. & Perez, D. M. 2000. Overexpression of the alpha1B-adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. *Nat Med*, 6, 1388-94.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei den folgenden Personen bedanken, durch deren Mitwirken die Dissertation möglich wurde:

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater für die Vergabe des Dissertationsthemas, wodurch mein Promotionsvorhaben in der experimentellen Ophthalmologie ermöglicht worden ist. Seine fachliche Expertise, wegweisende Unterstützung und konstruktive Anleitung während des Promotionszeitraumes haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön geht auch an das gesamte Team innerhalb der experimentellen Ophthalmologie, das mich mit den benötigten Versuchstieren versorgte und bei der experimentellen Datenerhebung stets unterstützt hat.

Von ganzem Herzen danke ich meinen lieben Eltern, die mich immer mit herausragender Unterstützung und unter eigenen Entbehrungen gefördert haben. Ohne deren Hilfe wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Abschließend danke ich meiner Familie, meinen Freunden und allen Wegbegleitern, die mich auf meinem bisherigen Weg unterstützt haben.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf