

Y. Cao¹ · M. W. Pfaffl² · B. Da¹ · H. Wei¹

¹ Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

² Institut für Physiologie, TU-München, Freising-Weihenstephan

Insulinartige Wachstumsfaktor-1- (IGF-1-)mRNA und IGF-1-Protein

Expression in den Zellen des Trabekelwerks im Rinderauge

Zusammenfassung

Hintergrund. Gegenstand der Untersuchungen waren die Bestimmungen, ob insulinartige Wachstumsfaktor-1- (IGF-1-)mRNA und das IGF-1-Protein in kultivierten Zellen und in Ex-vivo-Zellen des Trabekelwerks exprimiert werden.

Methoden. Zum Nachweis der IGF-1-mRNA wurde ein spezifisches, sensitives und zuverlässiges Verfahren angewandt, die reverse Transkription mit folgender Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Das IGF-1-Protein wurde mittels immunhistochemischer Färbung detektiert.

Ergebnisse. Die RT-PCR lieferte ein spezifisches 240 bp IGF-1-Produkt, dessen Sequenz absolut homolog der bekannten bovinen Sequenz ist. Das IGF-1-Protein wurde mit einer spezifischen immunhistochemischen Färbung im Zytoplasma der kultivierten Zellen nachgewiesen.

Schlussfolgerung. Zusammenfassend ist zu sagen, das die Zellen des Trabekelwerks IGF-1-mRNA sowie das mature IGF-1-Protein exprimieren und in die umliegende Mikroumgebung und in das Augenkammerwasser sekretieren. Das Trabekelwerk wird somit nicht nur durch parakrine, sondern auch durch autokrine Effekte beeinflusst. Ob die Regulation der IGF-1-Produktion zum Krankheitsbild des Weitwinkelglaukoms beiträgt und ob die Förderung der autokrinen IGF-1-Effekte in den Zellen des Trabekelwerks zur Behandlung des grünen Stars beiträgt, ist in weiteren Untersuchungen zu klären.

Schlüsselwörter

Trabekelwerk · Insulinartiger Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) · Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) · Immunhistochemie · Weitwinkelglaukom

Der grüne Star bzw. das primäre Weitwinkelglaukom ist die häufigste vermeidbare Erblindungsursache neben der Zuckererkrankung und unfallbedingten Schädigungen des Auges. Ursache für das primäre Weitwinkelglaukom ist in der Regel eine Hemmung der Abflusswege des Kammerwassers über das Trabekelwerk [10] und den Schlemm-Kanal. Der dadurch erhöhte Augeninnendruck führt bei langfristigem Bestehen oder starker Ausprägung zu einer Schädigung von Netzhaut und Sehnerv mit folgenden Sehverschlechterungen, die schließlich bis zur Erblindung führen können. Die Pathophysiologie des Weitwinkelglaukoms wird durch einen Anstieg der extrazellulären Matrixkomponenten und eine Abnahme der Trabekelwerkszellen charakterisiert [6]. Inwieweit autokrine und/oder parakrine exprimierte Wachstumsfaktoren diesen Zellauf- bzw. Zellabbau regulieren, ist fraglich. Wachstumsfaktoren modulieren diese Zellfunktionen und können die Proliferation, Beweglichkeit, Differenzierung, Phagozytose sowie die Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix kontrollieren. Untersuchungen zur Sekretion von funktionellen Wachstumsfaktoren, die speziell auf die Proliferation und den Metabolismus der extrazellulären Matrix wirken, sind kritisch für das Verständnis des Weitwinkelglaukoms und die Entwicklung neuer Antiglaukomtherapien zu betrachten [15]. IGF-1 wurde im Kammerwasser von Menschen und Rindern nachgewiesen [2, 12]. Als exogene und endogene Hauptquellen für das IGF-1 im Kammerwasser gelten Blutserum und Glaskörper [2, 14, 17]. Die IGF-1-Rezeptor-mRNA konnte in humanen ex vivo kultivierten Trabekelwerks-

zellen [20] und das native Protein in kultiviertem porcinen Trabekelwerk nachgewiesen werden [15]. Zusätzliche IGF-1-Gaben stimulierten die Zellproliferation, und auch die Produktion von Metallproteinasen konnte in einer humanen Trabekelwerkkultur moderat gesteigert werden [19, 20].

So kann man schließen, dass IGF-1 einen Einfluss auf das Trabekelwerk hat, aber es gibt bis dato noch keinen direkten Hinweis, ob IGF-1 selbst von dem Trabekelwerk exprimiert und produziert wird und dort lokal im Trabekelwerk durch autokrine und/oder parakrine Mechanismen wirkt.

Gegenstand dieser Untersuchungen war die Bestimmung, ob insulinartiger Wachstumsfaktor-1- (IGF-1-)mRNA und das IGF-1-Protein in kultivierten Zellen und auch in Ex-vivo-Zellen des Trabekelwerks im Rinderauge exprimiert werden.

Material und Methoden

Zellkultur und Gewebepräparation

Eine Zellkultur aus bovinen Trabekelwerkszellen wurde innerhalb 2 h nach der Schlachtung der Rinder, wie bereits früher beschrieben [3, 4, 7, 18], angesetzt. Die Augen wurden auf einer sterilen Petrischale 5 mm hinter dem Perikorenalring aufgeschnitten. Unter dem Mikro-

© Springer-Verlag 2002

Dr. Y. Cao
Department of Ophthalmology,
Union Hospital, Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and
Technology, Wuhan, China
E-Mail: ytsao@public.wh.hbcn

Y. Cao · M. W. Pfaffl · B. Da · H. Wei

Bovine trabecular meshwork cells express insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA and protein

Abstract

Background. The purpose of the study was to determine whether cultured bovine trabecular meshwork cells and trabecular tissue *ex vivo* express insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA and protein.

Methods. The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for detection of IGF-1 mRNA. To detect the protein on the cells an IGF-1-specific immunohistochemical stain was used on trabecular meshwork cells.

Results. A single 240 bp RT-PCR product was obtained, the RT-PCR product was verified by sequencing and the derived sequence was homologous to the known bovine sequence. IGF-1 immunostaining was positive in the cytoplasm of trabecular meshwork cells.

Conclusions. We conclude that trabecular meshwork cells produce IGF-1 mRNA and contribute to the presence of IGF-1 protein in the trabecular meshwork microenvironment as well as aqueous humor. Trabecular meshwork cells were affected by IGF-1 not only through paracrine but also through autocrine action. Whether regulations in IGF-1 production may contribute to the pathogenesis of primary open-angle glaucoma and the possibility of promoting the autocrine action of IGF-1 by trabecular meshwork cells to treat the disease is worth further investigation.

Keywords

Trabecular meshwork · Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) · Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) · Immunohistochemistry · Primary open-angle glaucoma

Originalien

skop wurden die Linse, die Iris, der Hauptteil des Ziliarkörpers und die Ligamente der Linsenaufhängung vorsichtig mit Mikroscheren entfernt. Die Zellen des Trabekelwerks wurden mit Mikropinzetten weggehoben, in Stücke geschnitten und dann auf die Oberfläche der Zellkulturschale gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C im Kulturmedium [RPMI-1640 mit 20% fetalem Rinderserum (BRL, Gaithersburg, MD, USA)], 10 mM HEPES Puffer (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Hebei Pharmaceutical Factory, Hebei, China) und 2,5 µg/ml Fungizone (Shanghai Pharmaceutical Factory, Shanghai, China) angezüchtet. Das Medium wurde 2-mal pro Woche gewechselt. Die konfluenten Zellen wurden zum Passagieren mit 0,125% Trypsin (Sigma) und 0,01% EDTA (Sigma) behandelt. Die dritte Passage der Zellkultur wurde zu den unten beschriebenen Untersuchungen herangezogen und die gesamten Zellen bis zur Analyse bei -70°C eingefroren und gelagert.

Gesamt-RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde aus der Zellkultur und den Ex-vivo-Gewebeproben mittels TRIZOL (BRL) wie folgt extrahiert: 100 mg Gewebe und Zellen wurden in 1 ml TRIZOL für 5 min bei 20°C homogenisiert; 200 µl Chloroform wurde addiert und das Homogenat 15 s kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation für 3 min bei 20°C wurde bei 12.000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die gesamte RNA konnte unter Zugabe von 1 Vol. Iso-Propanol-Alkohol für 10 min bei 4°C und nach einer weiteren Zentrifugation bei 12.000 g ausgefällt werden. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 75% Ethanol mehrmals gewaschen und wieder pelletiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in RNA-freiem mit DEPC (Sigma) behandeltem Wasser gelöst. Die gesamte RNA-Konzentrationen und die Nukleinsäure/Protein-Ratio wurden in einem Photometer (Milton Roy Company, Rochester, NY, USA) bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

RT-PCR und Sequenzanalyse

Die IGF-1-spezifischen Primer (Forward Primer: 5'-TCG CAT CTC TTC TAT CTG

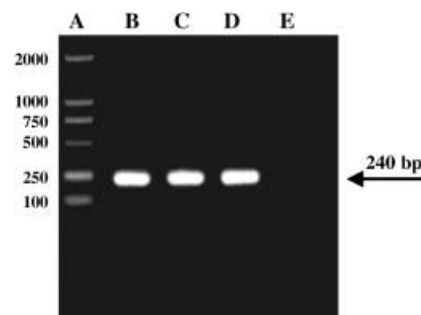


Abb. 1 ▲ Gelelektrophorese der spezifischen 240 bp IGF-1-Produkte: Längenstandard (Spur A); positive Kontrolle (Spur B); RT-PCR-Produkt amplifiziert aus kultivierten bovinen Zellen des Trabekelwerks (Spur C); RT-PCR Produkt amplifiziert aus Ex-vivo-Zellen des Trabekelwerks (Spur D) und negative Kontrolle (Spur E)

GCC CTG T-3' und Reverse Primer 5'-GCA GTA CAT CTC CAG CCT CCT CAG A-3'; synthetisiert von BRL) umschließen einen exonübergreifenden Bereich (von Exon 3 auf Exon 4) mit einem erwarteten RT-PCR-Produkt von 240 bp in dem Bereich, das für das mature IGF-1-Protein codiert [9]. Für jede RNA-Präparation wurden folgende reverse Transkription (RT) angesetzt: 250 ng Gesamt-RNA, RT-Puffer (50 mM Tris pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM DTT und 150 µM je dNTPs (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und 3 Tropfen Chill-out 14™ Liquid Wax (MJ Reaserach, Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland) wurde der Reaktionsansatz für 5 min bei 65°C denaturiert. Bei 42°C wurden die restlichen Komponenten 10 pmol Reverse Primer, 50 U Super script II™ Plus Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (BRL) und 10 U Rnasin™ Rnase Inhibitor addiert und die RT bei 42°C für 60 min durchgeführt sowie die RT bei 95°C für 1 min terminiert. Die erhaltene cDNA wurde vollkommen mit 2,5 U Prime Zyme™ thermostabiler DNA-Polymerase (Biometra Inc., Tampa, FL, USA) 1-mal PCR Puffer, MgCl₂ (1,45 mM MgCl₂ Endkonzentration) und 10 pmol Forward Primer in 50 µl Endvolumen in eine „Hot Start PCR“ eingesetzt. Im DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Tokio, Japan) wurden 30 Zyklen (1 min 94°C, 30 s 62°C, 30 s 72°C) durchgeführt, gefolgt von einem zusätzlichen Temperaturschritt (5 min bei 72°C) für eine vollständige Amplifikation aller IGF-1-PCR-Produkte. In jedem RT-PCR-Durchlauf wurde eine negative Kontrolle ohne gesamte RNA mitgeführt. Die RT-PCR-Pro-

dukte wurden in einer 1,5% Agarosegelelektrophorese in 1-mal TAE (50-mal TAE: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 90 mM EDTA, pH 8,5) überprüft und mit einer Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Das gereinigte 240 bp RT-PCR-Produkt wurde einer Doppelstrangsequenzierung unterzogen (TaKaRa Biotech, Dalian, China).

Immunhistochemie

Von der Zellsuspension der dritten Passage wurden $6 \cdot 10^5$ Zellen in jedes Well einer 6er-Zellkulturplatte direkt auf die Gewebekultureinsätze gegeben und bei 37°C in einer feuchten 5% CO₂ und 95% Luftatmosphäre kultiviert. Die konfluenten Trabekelwerkzellen wurden auf den Gewebekultureinsätzen herausgenommen und 2-mal mit phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen, 30 min auf Petrischalen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, wiederum 3-mal mit PBS gewaschen und schließlich getrocknet. Im Weiteren wurden die Gewebekultureinsätze mit 0,5% H₂O₂ für 30 min behandelt, um endogene Peroxidasen zu blocken, und mit 1% bovinem Serumalbumin (Sigma) für 10 min die freie Bindungsstellen blockiert. Der erste Antikörper (Kaninchen anti-human IGF-I monoklonale Antikörper; Sigma) wurde auf 10 µg/ml verdünnt, und die Zellen wurden über Nacht bei 4°C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Platten mit 6 µg/ml biotinmarkiertem zweiten Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen IgG) bei 37°C für 30 min inkubiert. Wiederum nach dreimaligem Waschen wurde mit 1% Streptavidin Meerrettich-Peroxidase-Komplex (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) hinzugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach viermaligem Spülen konnten die Gewebekul-

tureinsätze mit 500 mg/l farbigem Meerrettich-Peroxidase-Substrat DAB (Vector Lab) über einen Zeitraum von 30 min reagieren. Zum Färben der Zellen wurden sie mit 0,7% Hematoxylin nachgefärbt, optisch überprüft und unter einem Mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) fotografiert. Als negative Kontrolle wurden die Zellen mit PBS anstelle des ersten Antikörpers inkubiert.

Ergebnisse

Extraktion der Gesamt-RNA

Von 10^6 Zellen aus der Trabekelwerkzellkultur wurden 18 µg Gesamt-RNA extrahiert. Aus den Ex-vivo-Geweben konnten 14 µg gesamt RNA pro 100 mg Trabekelwerksgewebe extrahiert werden. Alle RNA-Präparationen zeigten ein durchschnittliches Ratio A_{260/280} von 1,91 und waren frei von DNA- und Proteinverunreinigungen.

RT-PCR und Sequenzanalyse

Die RT-PCR ergab eine einzige IGF-1-spezifische 240-bp-Bande aus der Zellkultur RNA, aus der Ex-vivo-RNA und aus der positiven Kontrolle (Abb. 1). Die negative Kontrolle zeigte keine Banden. Die exakte Größe des RT-PCR-Produktes wurde über eine Regressionsanalyse mittels PCR-Marker (SABC Biotech, Peking, China) ermittelt. Die Sequenzierung des RT-PCR-Produktes ergab eine 100%-Homologie der 240 bp zu der bekannten bovinen IGF-1-Sequenz [5].

Immunhistochemie

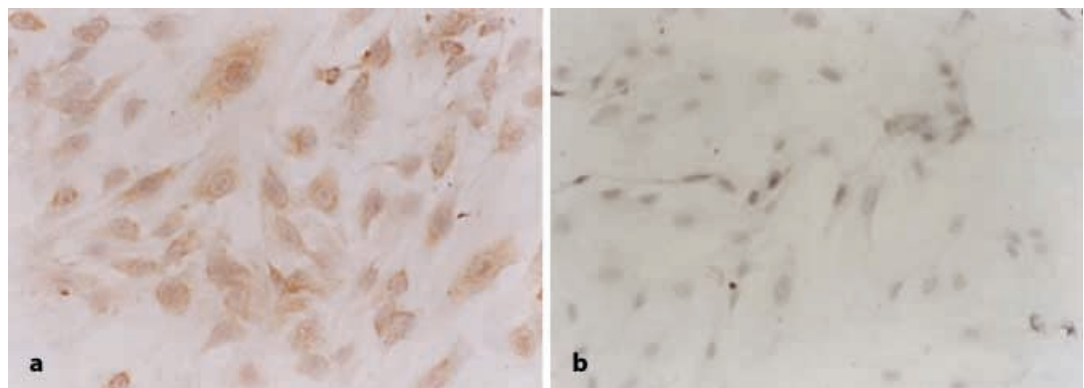
Auch die Expression des IGF-1-Proteins in den Zellen des Trabekelwerks konnte bestätigt werden. Das Protein konnte in

signifikanten Konzentrationen im Zytoplasma der Trabekelwerkzellen nachgewiesen werden (Abb. 2a). In der negativen Kontrolle wurde PBS-Puffer anstelle des ersten Antikörpers verwendet, und es konnte keine Färbung erkannt werden (s. Abb. 2b).

Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte das erste Mal mit molekularbiologischen und immunhistochemischen Methoden der Beweis erbracht werden, dass kultivierte Zellen und Ex-vivo-Zellen des Trabekelwerks sowohl IGF-1-mRNA als auch das native Protein exprimieren. Die Ergebnisse zeigen dass IGF-1 im Kammerwasser und in der Mikroumgebung vorhanden ist, zum Teil lokal von den Zellen des Trabekelwerks stammt und autokrine und/oder parakrine Effekte im Zellsystem des Trabekelwerks zeigt. Dennoch erscheint es relativ unwahrscheinlich, dass die Wachstumsfaktoren für das Kammerwasser im Trabekelwerk exprimiert und sezerniert werden, da es stromaufwärts der vorderen Kammer liegt und weil das Kammerwasser samt Wachstumsfaktoren durch den Schlemm-Kanal abfließen. Bei Patienten mit primärem Weitwinkelglaukom stellen die Zellen des Trabekelwerks einen erhöhten Widerstand der Abflusswege des Kammerwassers dar [10]. Dies resultiert im menschlichen Auge in einem erhöhten Augeninnendruck und führt zu Beeinträchtigungen der Augenstruktur und physiologischen Funktionen. Die krankhaften Veränderungen durch das Glaukom führen im Trabekelwerk zu einer abnormalen Akkumulation von extrazellulären Matrixkomponenten und zu einer Reduktion der Zellen im Trabekelwerk [1, 8].

Abb. 2a,b ► Immunhistochemische Färbung der kultivierten bovinen Zellen des Trabekelwerks. a IGF-1-spezifische Färbung (braun) und Lokalisierung des IGF-1-Proteins im Zytoplasma der Zellen. b Keine Färbung auf der negativen Kontrolle



IGF-1 ist strukturell und funktionell dem Insulin sehr ähnlich und unterstützt die Proliferation der Zellen und stimuliert sie dazu, Metallproteinasen zu produzieren, die die extrazelluläre Matrix im Trabekelwerk degradieren können. Es ist anzunehmen, dass eine Abnahme der IGF-1-Synthese und -Sekretion auch zu einer Abnahme der Trabekelwerkzellen und zu einer Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine führen kann. Somit kann es direkt mit der Pathogenese des primäre Weitwinkelglaukoms in Verbindung gebracht werden. Die biologischen Effekte, die vom IGF-1 ausgehen, sind unterschiedlich und beeinflussen die Mitogenese, die Zelldifferenzierung und die Regeneration vieler Zelltypen, darunter auch Endothelzellen im gesunden Gewebe und nach einer Verletzung [11]. Dieser biologische Respons wird durch den IGF-1-Rezeptor Typ 1 vermittelt, der mit dem Insulinrezeptor nahe verwandt ist und auch eine Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzt [16]. Messbare IGF-1-Proteinkonzentrationen konnten in humanem ($1,36 \pm 0,38$ ng/ml) und bovinem ($0,62$ nM) Kammerwasser nachgewiesen werden [2, 12]. Die Herkunft des IGF-1-Proteins sowie das Gewebe, in dem es exprimiert und in das Kammerwasser sekretiert wurde, sind noch unbekannt. Das Serum erscheint als hauptsächliche exogene IGF-1-Quelle [14] für das Kammerwasser, aber auch der Glaskörper liefert teilweise IGF-1 als endogene IGF-1-Quelle [2, 17]. In Radioligand-Bindungsstudien, gefolgt von Scatchard-Plots der Bindungsdaten, konnte eine einzige Klasse von hoch affinen IGF-1-Rezeptoren ($K_d = 0,37$ nM) in kultivierten porcinen Trabekelwerkzellen identifiziert werden, in Konzentrationen von 17.000 Rezeptoren pro Zelle [15]. Auch kultivierte humane Trabekelzellen und Ex-vivo-Trabekelzellen exprimierten IGF-1-Rezeptor-mRNA, und eine Behandlung der Zellen mit exogenem IGF-1 in physiologischen Konzentrationen stimulierte die Zellproliferation des Trabekelwerks signifikant [20]. In weiteren Untersuchungen konnte in kultivierten porcinen Zellen des Trabekelwerks nach einer IGF-1-Induktion ein moderater Anstieg von Stromelysin und Gelatinase B [19] gezeigt werden. Beide Proteine sind Metallproteinasen und katalysieren die Degradation von Proteoglykanen, Fibronectin und diversen Kollagentypen (Typ 3, 4, 5 und 9).

Schlussfolgerung

Bis dato existierte kein Hinweis ob IGF-1 in den Zellen des Trabekelwerks produziert und sekretiert wird und lokal durch parakrine und/oder autokrine Mechanismen im Trabekelwerk wirkt. Wachstumsfaktoren, darunter auch IGF-1, die in der Mikroumgebung des Trabekelwerks existieren, können eine signifikante Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Gegebenheiten im Gewebeverband spielen.

So können wir schlussfolgern, dass IGF-1 durch parakrine Mechanismen in den Zellen des Trabekelwerks funktionieren kann. Es wird angenommen, dass Zytokine [13], darunter auch IGF-1, eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des Glaukoms spielen. Wegen der multifunktionalen Effekte von IGF-1 und dem Bezug zu physiologischen und pathologischen Prozessen im Trabekelwerk, könnte der Schlüssel in der Glaukomtherapie in der Aufregulierung der lokalen IGF-1-Produktion und somit in einer Funktionsverbesserung der Trabekelwerkzellen liegen.

Danksagung. Diese Studie wurde durch ein Stipendium (Nr. 38970758) des „National Natural Science Foundation of China“ unterstützt. Im Weiteren sei Dr. A. Wegner von der Augenklinik und Dipl.-Biol. M. Schönfelder von der TU-München für ihre hilfreiche Unterstützung gedankt.

Literatur

- Alvarado J, Murphy C, Juster R (1984) Trabecular meshwork cellularity in primary open angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 91:564–579
- Arnold DR, Moshavedi P, Schoen TJ (1993) Distribution of IGF-I and -II, IGF-BPs and IGF-BP mRNA in ocular fluids and tissues: potential sites of synthesis of IGF-BPs in aqueous and vitreous. *Exp Eye Res* 56:555–565
- Cao Y, Wei H, Fu M et al. (2000) Expression of TGF- β and TGF- β receptors protein in cultured bovine trabecular meshwork cells. *Chin Ophthalmic Res* 18:235–237
- Crean EV, Sherwood ME, Casey R, Miller MW, Richardson TM (1986) Establishment of calf trabecular meshwork cell cultures. *Exp Eye Res* 43:503–517
- Fotsis T, Murphy C, Gannon F (1990) Nucleotide sequence of the bovine insulin-like growth factor (IGF-I) and its IGF-IA precursor. *Nucleic Acids Res* 18:676
- Grierson I, Hogg R (1995) The proliferative and migratory activities of trabecular meshwork cell. *Retinal Cell Res* 15:33–67

- Jiang F, Wei H, Lu Y (1997) The effect of pressure on cultured bovine trabecular meshwork cells. *Chin J Ophthalmol* 33:410–412
- Lutjen-Drecoll E, Shimizu T, Rohrbach M, Rothen JW (1986) Quantitative analysis of „plaque material“ in the inner and outer walls of Schlemm's canal in normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 42:443–454
- Pfaffl M, Meyer H, Sauerwein H (1998) Quantification of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA: development and validation of an internally standardised competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:506–513
- Quigley HA (1996) Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 80:389–393
- Rechler MM, Nissley SP (1990) Insulin-like growth factors. In: Sporn MB, Roberts AB (eds) *Peptide growth factors and their receptors: handbook of experimental pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York Tokyo, 7,1–7,2
- Tripathi RC (1994) Growth factors in the aqueous humor and their clinical significance. *J Glaucoma* 3:248–259
- Tripathi RC, Borisuth NSC, Tripathi BJ (1991) Growth factors in the aqueous humor and their therapeutic implications in glaucoma and anterior segment disorders of the human eye. *Drug Dev Res* 22:1–23
- Tripathi RC, Tripathi BJ, Raja SC (1989) Prospects for growth factors therapy of cataracts. *Sci Res J* 1:131–147
- Tripathi RC, Yang C, Tripathi BJ (1992) Role of receptors in the trabecular meshwork of the eye as targeted to the development of anti-glaucoma therapy. *Drug Dev Res* 27:191–228
- Ullrich A, Gray A, Tam AW et al. (1986) Insulin-like growth factor-I receptor primary structure: comparison with insulin receptor structural determinants that define function specificity. *EMBO J* 5:2503–2514
- Waldbillig RJ, Schoen T, de Juan E, Chader GJ (1990) Characterization of insulin-like growth factor binding proteins in vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 [Suppl]:227
- Wang Q, Wei H, Fan Z, Lu Y (1994) Effect of norfloxacin and clonidine on human trabecular meshwork cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232:566–571
- Wirtz MK, Xu H, Rust K (1998) Insulin-like growth factor binding protein-5 expression by human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:45–53
- Wordinger RJ, Clark AF, Agarwal R (1998) Cultured human trabecular meshwork cells express functional growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1575–1589