

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

Teilprojekt A.3

Rezeptormechanismen der Degeneration retinaler Ganglienzellen

Dr. Matthias Herkert und Prof. Dr. Cord-Michael Becker
Institut für Biochemie – Universität Erlangen-Nürnberg

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

Störungen der Mikrozirkulation und ein erhöhter intraokulärer Druck werden derzeit als die wichtigsten Risikofaktoren eingestuft, die zur Entstehung von Glaukomen führen. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung kommt es dabei primär zum Verlust retinaler Ganglienzellen. Schon 1982 hatten Olney und Mitarbeiter gezeigt, daß es in der pathologischen Situation einer Ischämie oder eines erhöhten Augeninnendrucks zur vermehrten Freisetzung von Glutamat kommt, die nach übermäßiger Aktivierung vor allem von NMDA-Rezeptoren zur langfristigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und schließlich zum neuronalen Zelltod führt (Olney, 1982). Später konnte auch im Kammerwasser von Affen mit experimentell induziertem Glaukom ein erhöhter Glutamatspiegel nachgewiesen werden (Dreyer *et al.*, 1996). Es war jedoch unklar, ob es bei Glaukomen neben Glutamat auch zur Anreicherung anderer rezeptorwirksamer Metaboliten kommt, die über eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren neurotoxisch wirken. Um die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren bei exzitotoxischen oder hypoxischen Schädigungen zu untersuchen, hatte sich die Kultivierung retinaler Ganglienzellen als ein geeignetes *in vitro*-System erwiesen (Kitano *et al.*, 1996, Caprioli *et al.*, 1996). Aus diesem Grund sollte in der ersten Antragsperiode eine retinale Ganglienzellkultur im Labor etabliert und zu Toxizitätsstudien verwendet werden.

Während die glutamaterge Signalübertragung in der Retina schon gut beschrieben war, beschränkte sich zu Beginn der Antragsperiode der Nachweis entsprechender Glutamatrezeptoren im wesentlichen auf Untersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung (Brandstätter *et al.* 1994, Hartveit *et al.*, 1994). Deshalb sollte im Teilprojekt A.3 die Verteilung der für die Funktion von NMDA-Rezeptoren essentiellen Untereinheit NR1 in der Retina der Ratte auf Proteinebene untersucht werden.

Zu Beginn des Projektes gab es keine Daten zur entwicklungsregulierten Expression von NMDA-Rezeptoren in der Retina. Da jedoch bekannt war, daß die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors in anderen ZNS-Regionen einer sowohl zeitlich als auch räumlich genau regulierten Expression unterliegen (Sheng *et al.*, 1994; Monyer *et al.*, 1994; Dunah *et al.*, 1996), sollte geklärt werden, ob diese Befunde auch für die Retina zutreffen. Da die pharmakologischen Eigenschaften des NMDA-Rezeptors auch durch die Zusammensetzung der Untereinheiten definiert werden, waren diese Untersuchungen auch im Hinblick auf neuroprotektive Maßnahmen von besonderem Interesse.

Die Validierung mechanistischer Ansätze in der Glaukomforschung wurde zu Beginn der Antragsperiode durch das Fehlen eines adäquaten Tiermodells wesentlich erschwert. Der prinzipielle Wert solcher Modelle wird vor allem bei Mauslinien mit Spontanmutationen erkennbar. Wie das Beispiel der *spastischen* Maus zeigt, führen Mutationen des Glycinrezeptors zur Reduktion auch retinaler Glycinrezeptoren und in der Folge zu funktionellen Defiziten von Ganglienzellen (Pinto *et al.*, 1994). Im Kontext der Rezeptormechanismen retinaler Degeneration erschien deshalb auch die genaue Charakterisierung der spastischen Maus sinnvoll.

2 Angewandte Methoden

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

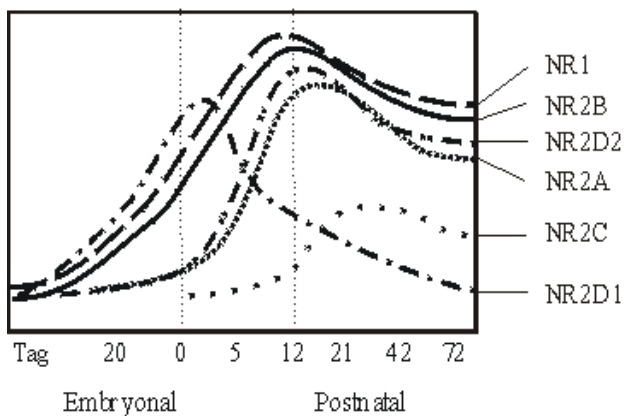
- Herstellung mono- und polyklonaler Antikörper gegen trägergekoppelte Peptidantigene, die Teilsequenzen von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten darstellen.
- Isolierung biologisch aktiver Substanzen unter Einsatz verschiedenster chromatographischer Verfahren und Überprüfung der toxischen Wirksamkeit in einem Zellkulturtest.
- Zellkultur: Primärkultur retinaler Ganglienzellen und rekombinante Rezeptorexpression in der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293 (HEK-293).
- Proteom-Analyse durch zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Elektrophorese) in Kombination mit Massenspektrometrie (MALDI-TOF-Einheit) zur Identifizierung von Proteinen, deren Expressionsmuster sich unter glaukomrelevanten Streßbedingungen in der Zellkultur verändert.
- Immunocytochemische und -histologische Techniken mit Auswertung durch fluoreszenzmikroskopische Methoden zur Erfassung der subzellulären Verteilung von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten, zum Nachweis zelltypspezifischer Markerproteine sowie zur Darstellung von oxidativem Streß und dem apoptotischen/nekrotischen Zelltod.

3. Ergebnisse und ihre Bedeutung

Unsere Arbeiten haben sich überwiegend mit der Expression von Glutamat-Rezeptoren während der Retina-Entwicklung und der Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung exzitotoxischer Mechanismen in der Retina befaßt. Ergänzt wurden diese Arbeiten durch Studien zur Expression, Lokalisierung und Pathologie des inhibitorischen Glycinrezeptors.

Ontogenetische Expression von retinalen Glutamat-Rezeptoren

In grundlegenden Arbeiten wurden Antikörper gegen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors generiert und in kortikalem Gewebe, Hippocampus-Kulturen sowie transfizierten HEK-293 Zellen auf ihre Spezifität hin überprüft. In der Retina der Ratte konnten wir anschließend in Western-blot-Analysen eine entwicklungsregulierte Expression der Untereinheiten verschiedener Glutamat-Rezeptoren nachweisen. Es wurde deutlich, daß sowohl die NMDA-Rezeptor-Untereinheiten NR1, NR2B und NR2D1 (kleine Isoform), das Ankerprotein PSD-95 sowie Untereinheiten des AMPA-Rezeptors (GluR 1, 2, 4) und des Kainatrezeptors (GluR 5, 6, 7) schon perinatal in der Retina exprimiert werden, nach zwei Wochen ein transientes Maximum erreichen und im adulten Tier auf einem niedrigeren Expressionsniveau verbleiben. Im Gegensatz



dazu konnten wir die Untereinheiten NR2A, NR2C und NR2D2 (große Isoform) erst 1-2 Wochen nach der Geburt detektieren.

Abb. 1: Schematische Darstellung der entwicklungsregulierten Expression von Untereinheiten des NMDA-Rezeptors.

In der Retina wurden weiterhin zwei Formen der Untereinheit NR2D detektiert, deren Molekulargewichte sich um 20 Kilodalton unterschieden. Die kleinere, bisher nicht beschriebene Untereinheit von 130 kD (NR2D1) dominierte in der perinatalen Phase und wurde im

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

adulten Tier durch die größere, bereits bekannte Untereinheit von 150 kD (NR2D2) ersetzt. Zur Zeit untersuchen wir genauer, ob es sich bei der kleineren Variante (NR2D1) um eine proteolytische posttranslationale Verkürzung des C-Terminus der normalen Untereinheit (NR2D2) handelt. C-terminale Bereiche von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten sind wesentlich an der Verankerung des Rezeptorkomplexes beteiligt und können nach Phosphorylierung dessen elektrophysiologischen Eigenschaften nachhaltig beeinflussen.

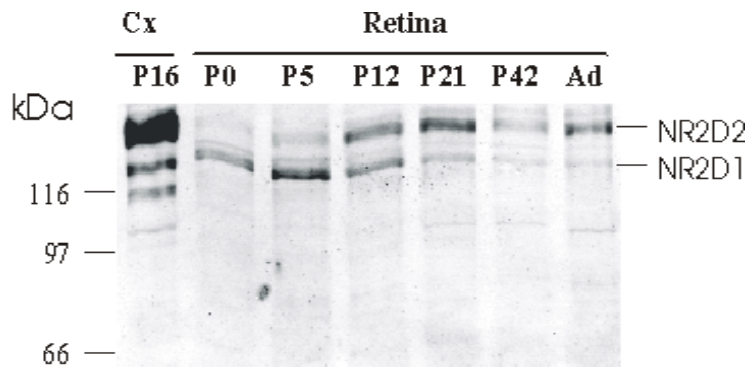


Abb. 2: Westernblot-Analyse der Untereinheit NR2D in Retina und Cortex (Cx). Das Expressionsmaximum der frühen Form (NR2D1) ist 5 Tage nach der Geburt (P5) erreicht, das der späteren Form (NR2D2) bei P21. Angabe des Molekulargewichts in kilodalton (kDa).

Diese Beobachtungen erlauben zwei wichtige Schlußfolgerungen:

1. Die Zusammensetzung der NMDA-Rezeptorkomplexe verändert sich in der Retina entwicklungsabhängig. Dieses spiegelt zum einen die Verhältnisse wider, die auch in anderen ZNS-Regionen gefunden werden, und hat zum anderen weitreichende Konsequenzen für neuroprotektive Maßnahmen, da die pharmakologischen Eigenschaften des NMDA-Rezeptors durch die Zusammensetzung der Untereinheiten definiert werden.
2. Im Lauf der Retinaentwicklung läßt sich in der Phase intensiver Synaptogenese auch der höchste Gehalt an NMDA-Rezeptoren nachweisen. Dieser Rezeptortyp ist daher möglicherweise am Aufbau der retinalen Architektur mit beteiligt.

Speziesspezifische Detektion von Untereinheiten des NMDA-Rezeptors

Die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors konnten auch in der Retina von Maus, Kaninchen und Mensch nachgewiesen werden. Zur Zeit untersuchen wir, ob sich - in Analogie zu den Ergebnissen der Rattenretina - auch beim Menschen eine altersabhängige Reduktion der Expression von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten feststellen läßt. Der Nachweis von NMDA-Rezeptoren in der humanen Retina bietet Grund zur Annahme, daß exzitotoxische Mechanismen im Auge, die am Tiermodell erarbeitet wurden, auch auf den Menschen übertragbar sind.

Immunhistochemische Lokalisierung der Untereinheit NR1

Die für die Funktion des NMDA-Rezeptors essentielle Untereinheit NR1 konnte in immunhistochemischen Untersuchungen in retinalen Ganglienzellen, bestimmten Amakrinzellen sowie in Horizontalzellen lokalisiert werden (Abb. 3). Im Vergleich dazu bleibt die Verteilung des Zellmarkers Calretinin auf Somata von Ganglienzellen und einzelnen Amakrinzellen sowie auf zwei Kontaktzonen in der inneren plexiformen Schicht (IPL) beschränkt. Erstaunlicherweise enthielten auch axonale Bereiche von Amakrinzellen diese Untereinheit. Diese Befunde unterstützen die These, daß beim Glaukom vor allem solche Zelltypen absterben, die auch eine deutliche Expression von NMDA-Rezeptoren zeigen.

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

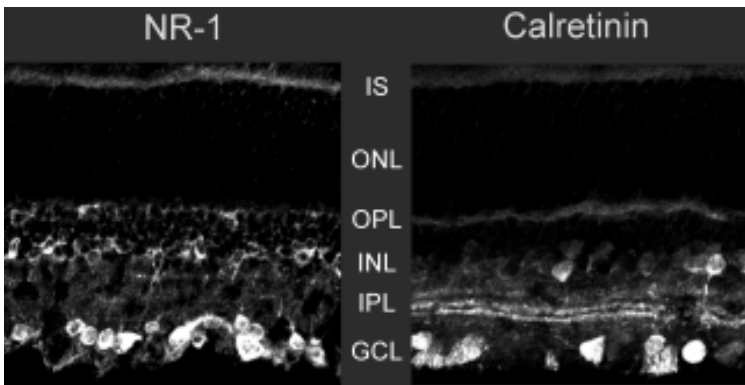


Abb. 3: Immunhistochemische Lokalisierung von NR1 in der Retina der Ratte im Vergleich zu Calretinin. IS, inneres Segment; ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.

Retinale Zellkulturen: Rezeptor-Verteilung und Cytotoxizität

Die Kultivierung retinaler Ganglienzellen wurde in unserem Labor als Routinemethode etabliert und erlaubte in der Folge sowohl immunocytochemische Untersuchungen als auch Toxizitätsstudien. So zeigte die Untereinheit NR2B auf neuronalen Fortsätzen putativer Ganglienzellen eine punktförmige Verteilung, die zum Teil mit Synaptophysin, einem Marker synaptischer Bereiche, kolokalisierte (Abb. 4 A,B). Zur Zeit erfolgt die Charakterisierung der retinalen Mischkulturen mit Hilfe von Antikörpern, die selektiv unterschiedliche retinale Zelltypen erkennen. So lassen sich z.B. durch Kernfärbung mit Propidiumiodid alle vorhandenen Zellen erfassen, während nur etwa 30 % der Zellen mit einem Antikörper gegen Proteinkinase C- α als Bipolarzellen identifiziert werden können (Abb. 4 C,D). Auf der Basis dieser Zelltyp-Erkennung erfolgen nun Studien zur Kolokalisation mit Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, die nach quantitativer Auswertung mittels Laserscanning Mikroskop Aufschluß darüber geben sollen, ob die Expression dieses Rezeptortyps tatsächlich eine notwendige Voraussetzung für den Zelltod unter glaukomrelevanten Streßbedingungen darstellt.

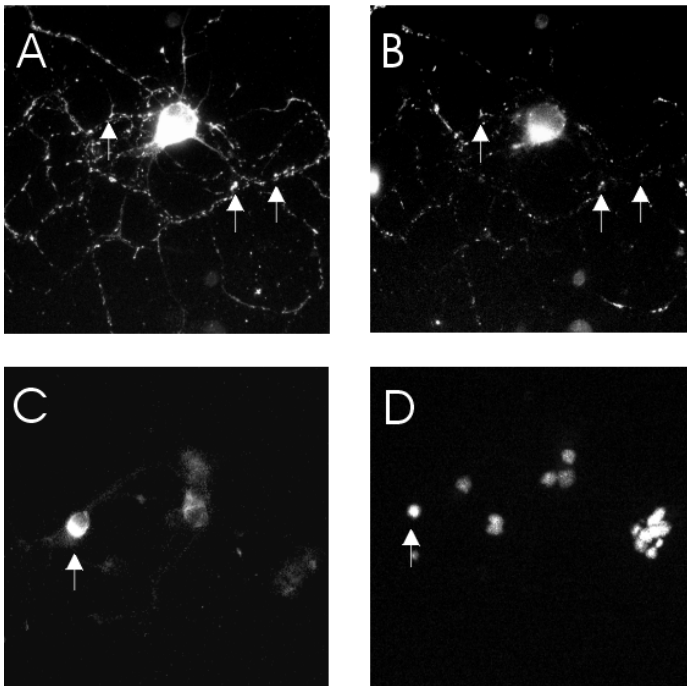


Abb. 4 A,B: Doppelfärbung einer retinalen Ganglienzelle für NR2B (A) und Synaptophysin (B). Pfeile markieren Kolokalisierung.

Abb. 4 C,D: Identifizierung von Bipolarzellen (Pfeil) durch Doppelfärbung mit PKC- α (C) und Propidium-Iodid (D).

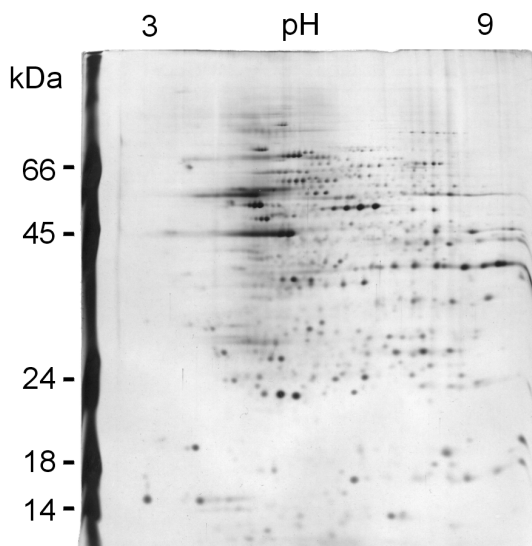
Zudem wurde ein Bioassay etabliert, der eine zuverlässige Quantifizierung der Aktivität neurotoxischer Substanzen gegenüber kultivierten Neuronen erlaubt. Dieser Bioassay wurde bisher unter anderem an Studien zur Toxizität des Schlangengiftes β -Bungarotoxin validiert. Der Kaliumkanal-Ligand β -Bungarotoxin konnte dabei als ein hocheffi-

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

zienter Induktor der neuronalen Apoptose charakterisiert werden, der seine zytotoxischen Effekte über reaktive Sauerstoffradikale (ROS) vermittelt. Die Toxizität von β -Bungarotoxin konnte in diesem Zellkulturmodell durch Radikalfänger vollständig blockiert werden. Wie sich bei Untersuchungen zur Signalkaskade eines toxischen Serumfaktors von Patienten mit Intensivpolyneuropathie zeigte, geht auch die durch NMDA-Rezeptoren vermittelte Exzitotoxizität mit einer erhöhten Radikalbildung einher. Zur Aufklärung retinaler Degenerationsmechanismen sind daher auch neuroprotektive Ansätze auf der Ebene der ROS geplant.

Proteom-Analyse

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Elektrophorese) erlaubt die gleichzeitige Darstellung und Quantifizierung von bis zu 1200 Proteinen und wurde als Methode in unserem Labor etabliert. Mit Hilfe dieser Technik konnte erstmals die Gesamtheit aller Proteine einer Ganglienzellkultur und eines Retinaexplantates dargestellt werden. Momentan wird die Reproduzierbarkeit der Signalstärke für einzelne Proteinspots überprüft, da dies für die Beurteilung von Veränderungen unter exzitotoxischen Bedingungen von entscheidender Bedeutung ist.



In Kombination mit der massenspektrometrischen Analyse (MALD-TOF) derjenigen Proteine, deren Expression sich unter glaukomrelevanten Streßbedingungen verändert, sollen nun weitere Komponenten der zytotoxischen Signalkaskade erfaßt werden. Dies erfolgt in Zusammenarbeit mit A. Humeny und T. Bonk in unserem Labor.

Abb. 5: 2D-Gelelektrophorese der Proteinpräparation retinaler Neurone nach 14-tägiger Kultivierung unter Standardbedingungen.

NMDA-Rezeptoren in cardialen Myozyten

In Westernblot-Analysen zur ontogenetischen Expression von NMDA-Rezeptoren in der Retina setzten wir embryonales und juveniles Herzgewebe als vermeintliche Negativkontrolle ein. Überraschenderweise zeigte sich aber auch im Herzgewebe eine Expression der NR2B-Untereinheit vor allem in der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklungsphase, die sich in Folge durch RT-PCR-Analyse bestätigen ließ. Immunocytochemisch konnte NR2B in perinukleären Strukturen von Kardiomyocyten nachgewiesen werden. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den bisherigen Vorstellungen über neuronale Ionenkanal-Rezeptoren. Erste elektrophysiologische Untersuchungen in unserem Labor ergaben bisher keine klaren Hinweise auf die Funktion von NMDA-Rezeptoren im embryonalen Herzen.

Der inhibitorische Glycinrezeptor

Mutationen von Glycinrezeptor-Genen führen sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell zu neurologischen Defekten mit einer hypertonen Bewegungsstörungen und einer Enthemmung der akustischen Startle-Reaktion (Kling et al., 1997; Becker und Isenmann, 1998; Saul et al., 1999). Obwohl deutlich geworden ist, daß glycinerge Defekte auch einen Verlust retinaler Glycinre-

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

zeptoren nach sich ziehen (Pinto et al., 1994), ist über die funktionellen Auswirkungen dieser Defekte nur wenig bekannt. Da es nach Neurotrauma zu einer Umkehrung der Chlorid-abhängigen neuronalen Inhibition in eine Aktivierung kommen kann, sind auch die glycinergen und GABAergen Systeme als potentielle Modulatoren exzitotoxischer Noxen bei Glaukomen zu berücksichtigen. Entsprechende Untersuchungen zur Lokalisierung von Glycin- und GABA-Rezeptoren in der Retina wurden von H. Wässle und Mitarbeitern am MPI für Hirnforschung in Frankfurt durchgeführt (Wässle et al., 1998).

4. Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß Glutamat-Rezeptoren unter ischämischen Bedingungen eine entscheidende Rolle bei degenerativen Prozessen der Netzhaut spielen. Dabei führt vor allem die chronische Übererregung retinaler Neurone unter Vermittlung NMDA-sensitiver Glutamat-Rezeptoren zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die schließlich zum neuronalen Zelltod führen (Exzitotoxizität). Wir haben darauf hingewiesen, daß neben Ganglienzellen und Amakrinzellen auch Horizontalzellen die Untereinheit NR1 exprimieren und deshalb wahrscheinlich funktionelle NMDA-Rezeptoren besitzen. Dies wurde durch immunhistochemische Arbeiten (Lo et al., 1998; Wong-Riley et al., 1998; Koulen et al., 1998) bestätigt. Die Daten zur entwicklungsregulierten Expression von NMDA-Rezeptoren in der Retina mit einem transienten Maximum des Proteingehaltes zwei Wochen nach der Geburt stimmen gut mit den Ergebnissen aus *in-situ* Hybridisierungen (Brandstätter et al., 1994) überein. Untersuchungen nach Opticusläsion (Kreutz et al., 1998) unterstreichen die Bedeutung bestimmter splice-Varianten von NR1 im Hinblick auf regenerative Prozesse. Der Hinweis von P.R. Hof und Mitarbeitern (Hof et al., 1998), daß die Expression bestimmter Glutamatrezeptor-Untereinheiten im Glaukomaugauge möglicherweise keine notwendige Voraussetzung für den neuronalen Zelltod darstellt, bestärkt uns in dem Bemühen, über einen Proteom-Ansatz weitere Kandidatenproteine zu identifizieren, die an der exzitotoxischen Signalkaskade mitwirken. Bei einem vom SFB 539 organisierten Workshop zum Thema „Neuroprotektion im Auge“ in Erlangen fanden die Ergebnisse unseres Teilprojektes reges Interesse und führten zu Kooperationen mit Arbeitsgruppen außerhalb des SFB.

5. Offene Fragen

Die Untersuchungen der letzten Jahre vermitteln ein inzwischen recht genaues Bild über das Vorkommen von Glutamatrezeptoren in der sich entwickelnden Retina. Es stellt sich nun die Frage, in wieweit sich diese Verteilungsmuster bei Glaukompatienten verändern und somit Rückschlüsse auf neue funktionelle Aspekte von Glutamatrezeptoren erlauben. Noch immer kontrovers diskutiert wird auch, ob die Expression von NMDA-Rezeptoren allein ausreicht, um retinale Neurone durch glaukomrelevante Streßfaktoren wie Druck oder Hypoxie zu schädigen. In einem *in vitro*-System retinaler Neurone wollen wir deshalb untersuchen, ob es eine eindeutige Korrelation von NMDA-Rezeptoren und Zelltod gibt. Weiterhin ist unklar, ob es bei Glaukomen neben Glutamat auch zur Anreicherung anderer toxischer Faktoren kommt. Möglicherweise sind neben exzitotoxischen Mechanismen auch andere, bisher unbekannte Faktoren an der retinalen Degeneration im Glaukom beteiligt. Wir wollen uns dieser Fragestellung durch eine Proteom-Analyse retinaler Ganglienzellkulturen nähern, um Veränderungen im Expressionsmuster bestimmter Proteine unter glaukomrelevanten Streßbedingungen zu erfassen.

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

Zitierte Literatur:

1. Brandstätter, J. H., Hartveit, E., Sassoe-Pognetto, M. & Wässle, H. (1994). Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* 6, 1100-1112.
2. Caprioli, J., Kitano, S. & Morgan, J. E. (1996). Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2376-2381.
3. Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M. & Lipton, S. A. (1996). Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 114, 299-305.
4. Dunah, A. W., Yasuda, R. P., Wang, Y. H., Luo, J., Davila-Garcia, M., Gbadegesin, M., Vicini, S. & Wolfe, B. B. (1996). Regional and ontogenic expression of the NMDA receptor subunit NR2D protein in rat brain using a subunit-specific antibody. *J Neurochem* 67, 2335-2345.
5. Hartveit, E., Brandstatter, J.H., Sassoe-Pognetto, M., Laurie, D.J., Seeburg, P.H. & Wässle, H. (1994) Localization and developmental expression of the NMDA receptor subunit NR2A in the mammalian retina. *J Comp Neurol*, 348, 570-582.
6. Hof, P.R., Lee, P.Y., Yeung, G., Wang, R.F., Podos, S.M. & Morrison, J.H. (1998) Glutamate receptor subunit GluR2 and NMDAR1 immunoreactivity in the retina of macaque monkeys with experimental glaucoma does not identify vulnerable neurons. *Exp Neurol* 153, 234-241.
7. Kitano, S., Morgan, J. & Caprioli, J. (1996). Hypoxic and excitotoxic damage to cultured rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 63, 105-112.
8. Koulen, P., Garner, C.C. & Wässle, H. (1998) Immunocytochemical localization of the synapse-associated protein SAP102 in the rat retina. *J Com Neurol*, 397, 326-336.
9. Kreutz, M.R. Bockers, T.M., Bockmann, J., Seidenbecher, C.I., Kracht, B., Vorwerk, C.K., Weise, J. & Sabel, B.A. (1998) Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival. *J Neurosci* 18, 8278-8291.
10. Lo, W., Molloy, R & Hughes TE (1998) Ionotropic glutamate receptors in the retina: Moving from molecules to circuits. *Vision Research*, 38, 1399-1410.
11. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
12. Olney, J. W. (1982). The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina* 2, 341-359.
13. Pinto, L. H., Grunert, U., Studholme, K., Yazulla, S., Kirsch, J. & Becker, C. M. (1994). Glycine receptors in the retinas of normal and spastic mutant mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3633-3639.
14. Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144-147.
15. Wong-Riley, M.T., Huang, Z., Liebl, W., Nie, F., Xu, H. & Zhang, C. (1998) Neurochemical organization of the macaque retina: effect of TTX on levels and gene expression of cytochrome oxidase and nitric oxide synthase and on the immunoreactivity of Na⁺ K⁺ ATPase and NMDA receptor subunit I. *Vision Res*, 38, 1455-1477.

Eigene Veröffentlichungen der letzten drei Jahre:

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

1. Kling, C., Koch, M., Saul, B. & Becker, C.-M. (1997) The frameshift mutation *oscillator* (*Gla1^{spd-ot}*) produces a complete loss of glycine receptor $\alpha 1$ polypeptide in mouse central nervous system. *Neuroscience* 78, 411-417.
2. Herkert, M., Röttger, S. & Becker, C.-M. (1998) The NMDA receptor subunit NR2B of neonatal rat brain: complex formation and enrichment in axonal growth cones. *Eur J Neurosci* 10, 1553-1562.
3. Wässle, H., Koulen, P., Brandstätter, J.H., Fletcher, E.L. & Becker, C.-M. (1998) Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vis. Res.* 38, 1411-1430.
4. Becker, C.-M., Isenmann, S. (1998) Neurological Diseases: Models, Molecules and Mechanisms. *The Neuroscientist* 4, 335-344.
5. Becker, C.-M. & Langosch, D. (1998) The inhibitory glycine receptor. *In: Amino acid neurotransmission* (Herausg.: Stephenson, F.A., Turner, A.J.), Portland: London, S. 93-112.
6. Nikolic, Z., Laube, B., Weber, R.G., Lichter, P., Kioschis, P., Poustka, A., Mülhardt, C. & Becker, C.-M. (1998) The human glycine receptor subunit $\alpha 3$: *GLRA3* gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *J Biol Chem* 273, 19708-19714.
7. Becker, C.-M. (1999) Neurotransmitter receptors as potential targets of glaucoma pathogens. *In: Pathogenesis and Risk Factors of Glaucoma* (Herausg.: Gramer, E., Grehn, F.) Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg.
8. Charton, J. P., Herkert, M., Becker, C.-M. & Schröder, H. (1999) Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon. *Brain Res* 816, 609-617.
9. Breiting, H.G. & Becker, C.-M. (1999) The inhibitory glycine receptor: Prospects for a therapeutic orphan? *Curr. Pharm. Des.* 4, 315-334.
10. Huff, T., Ballweber, E., Humeny, A., Bonk, T., Becker, C.-M., Müller C.S.G., Mannherz, H.G., & Ewald Hannappel, E. (1999) Thymosin beta4 serves as a glutaminyl substrate of transglutaminase. Labeling with fluorescent dansylcadaverine does not abolish interaction with G-actin. *FEBS Lett* 464, 14-20.
11. Saul, B., Kuner, T., Sobetzko, D., Brune, W., Hanefeld, F., Meinck, H.-M. & Becker, C.-M. (1999) Novel *GLRA1* missense mutation (P250T) in dominant hyperekplexia defines an intracellular determinant of glycine receptor channel gating. *J. Neurosci.* 19, 869-877.

Arbeitsbericht Teilprojekt A.3

Eingereicht:

1. Herkert, M., Rudolph, T., Selbach, M., Seeber, S. & Becker, C.-M. (2000) Developmental expression of NMDA receptor subunits in the rat retina. *Eur J Neurosci*
2. Seeber, S., Becker, K., Rau, T., Eschenhagen, T., Becker, C.-M. & Herkert, M. (2000) Transient expression of NMDA receptor subunit NR2B in the rat heart. *J Neurochem*

In Vorbereitung:

1. Herkert, M., Hund, E., Hacke, W. & Becker, C.-M. Identification of a neurotoxic factor in sera of patients with critical illness polyneuropathy.
2. Herkert, M. Shakhman, O., Schweins, E. & Becker, C.-M. β -Bungarotoxin-induced apoptosis in hippocampal neurons is mediated by reactive oxygen species.