

Arbeits- und Ergebnisbericht:

Teilprojekt A.3 „Rezeptormechanismen der Degeneration retinaler Ganglienzellen“

1. Ausgangsfragestellung

Mit derzeit ca. 70 Millionen Menschen, die weltweit an Glaukomen erkrankt sind, und ca. 7 Millionen, bei denen diese Erkrankung zur vollständigen Erblindung geführt hat, stellen Glaukome die zweithäufigste Ursache der Blindheit dar (Quigley 1998). Auch wenn chronische Glaukome kein einheitliches Krankheitsbild darstellen und in zahlreichen Verlaufsformen auftreten, weisen sie doch als gemeinsames Merkmal einen progredienten Verlust retinaler Ganglienzellen auf. Infolgedessen kommt es zu einer Verringerung der Axone des Sehnerven und somit zu der charakteristischen Exkavation der Papille, der intraokulären Abgangsregion des N. opticus. Das Tragische an der Pathogenese der Glaukome ist die Tatsache, daß die Neurodegeneration bei Glaukomen mit einem langsam fortschreitenden retinalen Zelltod einhergeht, der zunächst keine subjektiven Beeinträchtigungen verursacht und erst mit einer deutlich fortgeschrittenen Krankheit zum klinisch diagnostizierbaren Symptom des Gesichtsfeldverlustes führt. Derzeit werden verschiedene Ursachen und eine große Zahl möglicherweise beteiligter Signalwege als Erklärung für Entstehung und Verläufe dieser Krankheitsgruppe diskutiert. Auch wenn dem glaukomatösen Ganglienzellverlust wahrscheinlich ein apoptotischer Zelltod zugrunde liegt, beschreiben diese Beobachtungen nur den zellulären Mechanismus des Zelltodes und nicht seine pathophysiologischen Ursachen. Die Charakterisierung der Ursachen und molekularen Pathomechanismen chronischer Glaukome stellt daher einen zentralen Punkt der Glaukomforschung dar. Als wahrscheinliche gemeinsame 'Endstrecke' des glaukomatösen Retinaschadens könnte die Degeneration dieser Neurone einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellen, durch den sich der progrediente Verlust des Sehvermögens verlangsamen oder bei bestimmten Glaukomvarianten vielleicht sogar verhindern ließe.

1.1 Mögliche Ursachen der retinalen Neurodegeneration bei Glaukomen

Störungen der Mikrozirkulation und ein erhöhter intraokulärer Druck gelten als die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Glaukomen. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Verminderung des choroidalen Blutflusses, die vor allem bei Normaldruck-Glaukomen auf einer Dysregulation vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1 und Prostacyclinen zu beruhen scheint (Michelson et al. 1995; Dallinger et al. 1998). Es ist aber vor allem die Verminderung des Kammerwasserabflusses, die der in vielen Fällen persistierenden Erhöhung des Augeninnendruckes zugrunde liegt. Ein reduzierter Abfluß des Kammerwassers kann sowohl durch Veränderungen des Trabekelwerks als auch des Ciliarmuskels verursacht werden (Lütjen-Drecoll 1999). Welcher dieser Faktoren jeweils im Vordergrund steht, wird wahrscheinlich durch die genetische Prädisposition des Patienten bestimmt. Soweit hereditäre Glaukome molekular aufgeklärt werden konnten, waren zu Beginn der Förderperiode Mutationen des extrazellulären Matrixprotein TIGR (Trabecular Meshwork Inducible Glucocorticoid Response) oder Myocilin sowie der Monooxygenase CYP1B1 bekannt, die ebenfalls an der Regulation des Kammerwasserabflusses beteiligt ist (Michels-Rautenstrauss et al. 1998). Die Erhöhung des intraokulären Drucks würde wiederum verschiedene pathophysiologische Veränderungen nach sich ziehen, die in neuronalen Zelltod münden:

- Durch Beeinträchtigung der retinalen Mikrozirkulation kommt es zu einer Ischämie der retinalen Ganglienzellen und zu einem postischämischen Zelltod durch Apoptose.

- Die Kompression des Nervus opticus beeinträchtigt sekundär den retrograden axoplasmatischen Fluß und stört damit die trophische Wirkung des cerebralen Zytokins BDNF (brain derived neurotrophic factor).
- Im Bereich der Lamina cribrosa des Auges werden Gliazellen geschädigt und Mikroglia aktiviert, die wiederum neurotoxische Faktoren freisetzt.
- Die direkte Schädigung von Nervenzellen führt zu einer Freisetzung von humoralen Substanzen, die wiederum exzitotoxische Prozesse induzieren.

1.2 Arbeitshypothese

Ausgangspunkt unserer Studien war die Arbeitshypothese, daß die chronische Freisetzung von exzitotoxisch wirkenden Substanzen, insbesondere von Glutamat, zur retinalen Neurodegeneration bei Glaukomen beiträgt. Aus experimentellen Studien war bei Antragstellung bekannt, daß eine exzessive Stimulation vor allem von NMDA-spezifischen Glutamatrezeptoren zur Degeneration derjenigen Neurone führen kann, die solche Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen (Olney 1982; Kitano et al. 1996; Sucher et al. 1997). NMDA-Rezeptoren sind Glutamat-gesteuerte, heteromere Kationenkanäle, die aus einer obligatorischen NR1- und mindestens einer der variablen Untereinheiten NR2A-D/3A-C bestehen. Unterstützung fand die Exzitotoxizitätshypothese durch experimentelle Studien, die gezeigt haben, daß als Rezeptorantagonisten wirkende Substanzen durchaus in der Lage sind, den induzierten retinalen Ganglienzelltod zu verhindern. Alternativ könnte es unter pathologischen Bedingungen jedoch auch zu einer Sensibilisierung der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion gegenüber physiologischen Ligandenkonzentrationen kommen, die ebenso in einen exzitotoxischen Mechanismus münden würde.

Die Hypothese des exzitotoxischen Zellschadens besagt, daß Läsionen zu einer exzessiven Glutamatfreisetzung und damit zu einem Ca^{2+} -vermittelten Zelluntergang führen. Für ischämische Schäden zentralnervöser Neurone ist die Hypothese des exzitotoxischen Zellschadens inzwischen weitgehend belegt. Aus dieser Arbeitshypothese ergeben sich die während der Förderperiode bearbeiteten Fragestellungen:

1. Welche Verteilung zeigen Glutamatrezeptoren und ihre Isoformen in der Retina? Aufbauend auf Vorarbeiten zur immunologischen Charakterisierung von Rezeptorvarianten mit subtypenspezifischen Antikörpern sollten die in der Retina der Ratte und des Menschen exprimierten Glutamatrezeptoren erfaßt werden.
2. Welche zellulären Veränderungen ergeben sich unter glaukomrelevanten Streßbedingungen in neuronaler Zellkultur? Während der NMDA-Rezeptor als wichtigster Vermittler der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität gilt, ist über nachgeschaltete Signalwege der neuronalen Exzitotoxizität nur wenig bekannt. Als entscheidender intrazellulärer Vermittler des exzitotoxischen Zellschadens gilt Ca^{2+} .

1.2.1 Expression von Aminosäure-Rezeptoren in der Retina. Die visuelle Signalübertragung an Synapsen der Retina wird im wesentlichen durch Aminosäuren vermittelt, die auf membranständige Neurotransmitter-Rezeptoren wirken. Dabei werden die beteiligten Neurone vor allem durch die Ausschüttung von Glutamat erregt und durch Glycin oder γ -Aminobuttersäure (GABA) gehemmt. Innerhalb der Retina wird die horizontale Hemmung durch ionotrope Rezeptoren für Glycin und GABA vermittelt, die sich in der inneren plexiformen Schicht vor allem auf dem Dendritenbaum von Ganglienzellen und auf axonalen Fortsätzen der Amakrin- und Bipolarzellen finden (Wässle et al. 1998; Kalloniatis und Tomisich 1999). Für die vertikale Reizweiterleitung von Photorezeptoren über Bipolarzellen zu den

Ganglienzellen spielt Glutamat die entscheidende Rolle, wobei sowohl ionotrope als auch metabotrope Glutamatrezeptoren stimuliert werden. Während G-Protein gekoppelte metabotrope Glutamatrezeptoren zur lichtinduzierten Depolarisierung von ON-Bipolarzellen in der äußeren plexiformen Schicht beitragen (Boycott und Wässle 1999), vermitteln ionotrope Glutamatrezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ die Reizweiterleitung von Photorezeptoren über OFF-Bipolarzellen zu Ganglienzellen und sind deshalb sowohl in der äußeren als auch der inneren plexiformen Schicht zu finden. Ionotrope Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ scheinen dagegen sowohl an der visuellen Signalübertragung als auch an der Organisation der synaptischen Verschaltung in der sich entwickelnden Retina beteiligt zu sein (Brandstätter et al. 1998). Die Transkripte von allen bisher identifizierten Untereinheiten des NMDA-Rezeptors und ihrer Spleißvarianten wurden auch in der Retina nachgewiesen. Aus immunhistochemischen Studien an der Retina der Ratte war bei Antragstellung bekannt, daß vor allem Ganglienzellen sowie bestimmte amakrine Zellen NMDA-Rezeptoren besitzen (Koulen et al. 1998). Daten zur Rezeptorexpression in der menschlichen Retina standen allerdings aus. Die Aufklärung der Rezeptorexpression ist von zentraler Bedeutung für die Stichhaltigkeit der Exzitotoxizitätshypothese: Demzufolge sollte die selektive Vulnerabilität, die für bestimmte Zelltypen in der Retina nach Ischämie oder Axotomie beschrieben ist, mit der Expression von NMDA-Rezeptoren korrelieren.

1.2.2 NMDA-Rezeptoren als Vermittler der exzitotoxischen Neurodegeneration. Bei Ischämie oder erhöhtem Augeninnendruck soll es zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat kommen, die nach exzessiver Aktivierung von NMDA-Rezeptoren über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration schließlich zum neuronalen Zelltod führt (Olney 1982). Zum Zeitpunkt der Antragstellung lagen Berichte der Arbeitsgruppe Dreyer in Boston vor, nach denen im Kammerwasser sowohl von Patienten mit Glaukom (Vorwerk et al. 1999) und bei Affen mit experimentell induziertem Glaukom (Dreyer et al. 1996) erhöhte Glutamat Spiegel zu finden seien. Diese Berichte wurden durch Publikationen gestützt, nach denen der Glutamat Spiegel auch im Glaskörper von Ratten mit druckinduzierter Ischämie erhöht sei (Lagreze et al. 1999). Leider ist die Glaubwürdigkeit der Arbeitsgruppe Dreyer durch den Nachweis gefälschter Daten zur Rolle von Glutamat bei Erkrankungen des Innenohrs erheblich in Zweifel gezogen worden (siehe Abschnitt 4). Außer Glutamat kommen auch Aminosäuremetabolite als Vermittler des exzitotoxischen Zellschadens in Betracht, die bei Erkrankungen des ZNS nachgewiesen werden konnten. So führt Rückenmarkstrauma zu einer bis zu 100-fachen Erhöhung der Konzentration von Quinolinsäure, einem neurotoxischen Metaboliten des Tryptophan-Stoffwechsels (Heyes und Morrison 1997). Zum Zeitpunkt der Antragstellung lagen zudem Beobachtungen vor, denen zufolge es bei Traumatisierung des Sehnerven auch zu strukturellen Änderungen des heteromeren NMDA-Rezeptors selbst kommt. So wurden in Ganglienzellen nach Durchtrennung des Nervus opticus einzelne Spleißvarianten der Untereinheit NR1 des NMDA-Rezeptors verstärkt exprimiert (Kreutz et al. 1998), wodurch sich wahrscheinlich die Vitalität regenerierender Neurone erhöht. Ob die Veränderung der Untereinheitenexpression zu einer veränderten Komplexformation des NMDA-Rezeptors und zu einer veränderten Glutamatsensitivität führt, war jedoch nicht bekannt.

1.2.3 Exzitotoxische Signalwege. Über die intrazelluläre Weiterleitung exzessiver Glutamatimpulse und die dabei beteiligten Signalwege war bei Antragstellung nur wenig bekannt. Die beteiligten Mechanismen wurden überwiegend am Tiermodell als auch im *in vitro*-System isolierter retinaler Ganglienzellen, gemischter retinaler Zellpopulationen und ganzer Retinaexplantate untersucht. Obwohl diese Systeme die langfristigen Prozesse retinaler Degeneration bei Glaukomen nur unzureichend widerspiegeln, erlauben sie dennoch punktuelle Einsichten in definierte Teilaspekte des sekundären Zelltodes. So bestätigten diese Ansät-

ze die toxische Wirkung erhöhter Konzentrationen der Glutamatrezeptor-Agonisten Glutamat, AMPA, Kainat oder Quisqualat bzw. die protektive Wirkung selektiver Antagonisten wie MK-801, AP-5, DNQX, Memantin, Ketamin und Amantidin. In einem *in vivo*-Ansatz zeigte sich nach erhöhtem Druck auch eine vermehrte Expression der Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS-2) mit nachfolgender Ganglienzelldegeneration durch NO-Freisetzung (Neufeld et al. 1999). Allerdings war nicht bekannt, ob es unter diesen experimentellen Ansätzen auch zu strukturellen oder funktionellen Veränderungen des NMDA-Rezeptors kommt.

Literatur:

- Boycott, B. und Wässle, H. (1999). Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 1313-1327
- Brandstätter, J. H., Koulen, P. und Wässle, H. (1998). Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res* **38**, 1385-1397
- Dallinger, S., Findl, O., Strenn, K., Eichler, H. G., Wolzt, M. und Schmetterer, L. (1998). Age dependence of choroidal blood flow. *J Am Geriatr Soc* **46**, 484-487
- Dreyer, E. B., Zurakowski, D., Schumer, R. A., Podos, S. M. und Lipton, S. A. (1996). Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* **114**, 299-305
- Heyes, M. P. und Morrison, P. F. (1997). Quantification of local de novo synthesis versus blood contributions to quinolinic acid concentrations in brain and systemic tissues. *J Neurochem* **68**, 280-268
- Kalloniatis, M. und Tomisich, G. (1999). Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* **18**, 811-866
- Kitano, S., Morgan, J. und Caprioli, J. (1996). Hypoxic and excitotoxic damage to cultured rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* **63**, 105-112
- Koulen, P., Fletcher, E. L., Craven, S. E., Bredt, D. S. und Wässle, H. (1998). Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J Neurosci* **18**, 10136-10149
- Kreutz, M. R., Bockers, T. M., Bockmann, J., Seidenbecher, C. I., Kracht, B., Vorwerk, C. K., Weise, J. und 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
- Lagreze, W. A., Otto, T. und Feuerstein, T. J. (1999). Neuroprotektion im Tiermodell einer Ischämie der Retina. *Ophthalmologie* **96**, 370-374
- Lütjen-Drecoll, E. (1999). Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog Retin Eye Res* **18**, 91-119
- Michels-Rautenstrauss, K. G., Mardin, C. Y., Budde, W. M., Liehr, T., Polansky, J., Nguyen, T., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Naumann, G. O., Pfeiffer, R. A. und Rautenstrauss, B. W. (1998). Juvenile open angle glaucoma: fine mapping of the TIGR gene to 1q24.3- q25.2 and mutation analysis. *Hum Genet* **102**, 103-106
- Michelson, G., Groh, M. J., Groh, M. E. und Grundler, A. (1995). Advanced primary open-angle glaucoma is associated with decreased ophthalmic artery blood-flow velocity. *Ger J Ophthalmol* **4**, 21-24
- Olney, J. W. (1982). The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina* **2**, 341-359
- Quigley, H. A. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* **80**, 389-393
- Sucher, N.J., Lipton, S.A., and Dreyer, E.B. (1997) Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res.* **37**, 3483-3493
- Vorwerk, C. K., Gorla, M. S. und Dreyer, E. B. (1999). An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* **43**, S142-150

- Wässle, H., Koulen, P., Brandstätter, J. H., Fletcher, E. L. und Becker, C.-M. (1998). Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Res* **38**, 1411-1430
- Yoon, Y. H., Jeong, K. H., Shim, M. J. und Koh, J. Y. (1999). High vulnerability of GABA-immunoreactive neurons to kainate in rat retinal cultures: correlation with the kainate-stimulated cobalt uptake. *Brain Res* **823**, 33-41

2. Angewandte Methoden

Zur Analyse der Proteinstruktur, Lokalisation und Pathobiochemie von Neurotransmitter-Rezeptoren in der Netzhaut ist in unserer Arbeitsgruppe ein Methodenspektrum etabliert, das von der Herstellung hochaffiner Antikörper gegen synthetische Peptide, dem Immunnachweis von Proteinen bis zur chromatographischen und massenspektrometrischen Charakterisierung von Peptiden reicht. Anwendung finden diese Methoden zur Analyse von nativen Geweben des Auges und des ZNS sowie zur Analyse von retinalen und neuronalen Primärkulturen.

2.1 Herstellung von Antikörpern und Ligamentests. Die Aussagekraft immunbiochemischer Verfahren wird durch die Affinität und Selektivität der verwendeten Antikörper bestimmt. Membranproteine, also auch Neurotransmitter-Rezeptoren, sind überwiegend schwierige Antigene, die wiederholte, gut kontrollierte Immunisierungen erfordern und sich daher nur selten für kommerzielle Immunisierungen durch Auftragslabors eignen. Aus den Vorarbeiten zu diesem Projekt liegt bereits ein Spektrum gut charakterisierter mono- und polyklonaler Antikörper gegen Varianten des NMDA-Rezeptors vor, die sowohl für Westernblot-Analysen und Immunpräzipitationen als auch für die Immunhistochemie erfolgreich eingesetzt wurden (Butler et al. 2000; Darstein et al. 2000; Büsselberg et al. 2001; Herkert et al. 2001; Breitingner et al. 2002 b,c; Kalloniatis et al. 2002). Die Methodik zur Herstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper ist etabliert: Nach unseren gegenwärtigen Protokollen können Seren gegen neue Epitope innerhalb von drei Monaten generiert werden. Die erforderlichen trägergekoppelten Peptidantigene werden im eigenen Labor synthetisiert, und die Haltung der für die Immunisierung benötigten Tiere erfolgt in der Versuchstierhaltung unseres Instituts. Radioliganden-Bindungstests und Immunoassays werden routinemäßig zur pharmakologischen Charakterisierung nativer und mutierter Rezeptorkomplexe eingesetzt (Breitingner et al. 2001, 2002 a, c).

2.2 Immunocytochemie und -histologie. Die Verteilung einzelner Rezeptoruntereinheiten in isolierten Zellkulturen und Geweben der Retina und des ZNS wird mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Dazu stehen sowohl ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop zur Darstellung histologischer Schnitte und fixierter Einzelzellen als auch ein inverses Fluoreszenzmikroskop zur Beobachtung lebender Zellen in Kultur zur Verfügung. Mit Hilfe einer computergestützten CCD-Kamera ist auch die Dokumentation dynamischer Veränderungen von lebenden Zellen in Kultur, die wir z.B. nach Zugabe von α -Bungarotoxin und anderer Faktoren beobachten, möglich. Mittels konfokaler Mikroskopie wird die subzelluläre Rezeptorverteilung auf Zellsomata oder neuronalen Fortsätzen hochaufgelöst dargestellt (Zusammenarbeit Prof. M. Wegner, Institut für Biochemie, und Prof. K. Brune, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie). Die quantitative Auswertung einer Gesamtpopulation fixierter Zellen, z.B. die Quantifizierung von Apoptose, NMDA-Rezeptoren oder anderer Markerproteine, ist an einem Laserscan Cytometer (MWG) möglich, das gemeinsam mit Arbeitsgruppen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie genutzt wird. Zur Apoptosebestimmung werden die Zellen nach einer Noxe fixiert und die zu bestimmenden Parameter durch Fluoreszenzmarkierung erfasst. Als Marker der Gesamtzellzahl dient eine Propidiumjodid-Färbung aller Zellkerne, während apoptotische Zellen

durch die TUNEL-Reaktion und Annexin-Färbung sowie Proteine durch spezifische Antikörper markiert werden. Die fluoreszenzmarkierten Parameter werden mit einem Laser auf einer definierten Fläche über ein Fluoreszenzmikroskop simultan erfasst, quantifiziert und bildlich dargestellt (Druschky et al. 2001; Herkert et al. 2000, 2002; Seeber et al. 2000).

2.3 Proteom- und DNA-Analyse. Zur gleichzeitigen Darstellung und Quantifizierung der Proteine einer Gewebepräparation wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Elektrophorese) etabliert, die eine Auflösung von bis zu 1200 Proteinen aus einem Gemisch erlaubt. Nach Fluoreszenzmarkierung der Gele und Proteinblots werden die einzelnen Proteine im Phospho-Imager (Molecular Dynamics) über einen Bereich von 103 Einheiten linear quantifiziert (Seeber et al. 2000). Die anschließende Identifizierung isolierter Proteine erfolgt durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Durch ein Kooperationsprojekt mit der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen) steht in unserem Labor ein hochdurchsatzfähiges MALDI-TOF-Gerät (Autoflex mit Post-Source-Decay) zur Verfügung. Dieses Verfahren hat sich bei der Charakterisierung von Proteinen und der Identifizierung definierter DNA-Polymorphismen hervorragend bewährt (Bonk et al. 2002 a, b; Humeny et al. 2001, 2002 a, b, c; Kislinger et al. 2002 a, b; Schmitt et al. 2002). Die Massenspektrometrie-Einheit wird von PD Dr. Andreas Humeny geleitet. Aktuelle Methoden der DNA-Sequenzierung und rekombinanten Expression sind am Institut für Biochemie etabliert (Lamp et al. 2001; Plappert et al. 2001; Sobetzko et al. 2001).

2.4 Zellkulturen. Neben Primärkulturen für Neurone des Rückenmarks und des Hippokampus ist auch die Kultur von neuronalen Zellen aus der Retina in unserem Labor etabliert. Leider hat sich die Primärkultur retinaler Ganglienzellen als überaus sensitiv und störanfällig herausgestellt, so daß das hohe Hintergrundsignal positiver Zellnoxenmarker zuverlässige Analysen vielfach unmöglich gemacht hat. Für quantitative Aussagen zur Vitalität neuronaler Primärkulturen mussten wir daher vielfach auf Primärkulturen des ZNS zurückgreifen. Zur rekombinanten Expression von Polypeptiden des NMDA-Rezeptors wird die humane embryonale Nierenzell-Linie 293 (HEK-293) genutzt (Butler et al. 2000; Herkert et al. 2001; Breiting et al. 2002 b, c). Obwohl wir über die Möglichkeit verfügen, Primärkulturen definierten physikalischen Noxen auszusetzen (Hypoxiekammer, Barokammer), hat sich die Behandlung von neuronalen Kulturen mit dem Schlangengift α -Bungarotoxin als die beste und am zuverlässigsten reproduzierbare Methode zur Auslösung von Zellnoxen herausgestellt (Herkert et al. 2000, 2002). Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgt durch den MTT-Test, der das mitochondriale Respirationsvermögen kolorimetrisch erfaßt. Die zur Präparation und Kultivierung von Primärkulturen und Zell-Linien erforderlichen Einrichtungen sind vorhanden.

1 3. Ergebnisse

Neurotransmitter-Rezeptoren, insbesondere Varianten des NMDA-Rezeptors (siehe 1.2.2), gelten als mögliche Zielstrukturen von Glaukom-assoziierten Pathomechanismen. Da Untersuchungen zur Rolle von Rezeptoren bei der Entstehung von Glaukomen ein eingehendes Verständnis der retinalen Rezeptorexpression voraussetzen, haben wir uns zunächst der Analyse der retinalen Rezeptorexpression zugewandt. NMDA-Rezeptoren sind eine heterogene Familie Glutamat-gesteuerter, heteromerer Kationenkanäle, die als Tetramere mindestens eine obligatorische NR1- und mindestens eine der variablen Untereinheiten NR2A-D oder NR3A-C enthalten (Petrides und Becker, 2002; Rose et al. 2002). Neben der aus unterschiedlichen Untereinheitenzusammensetzungen resultierenden Proteinheterogenität von NMDA-Rezeptoren entsteht eine weitere Variabilität durch posttranslationale Modifikationen, insbesondere limitierte Proteolyse, die sich möglicherweise auf die Glutaminsensitivität retinaler Neurone auswirkt.

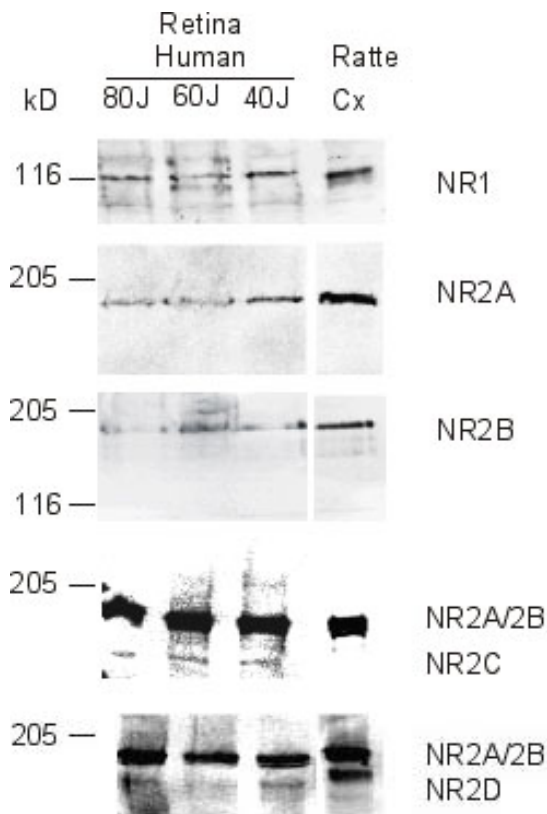


Abbildung 1:

NMDA-Rezeptoren in humaner Retina von Spendern in drei Altersgruppen (40 / 60 / 80 Lebensjahre).

In Kooperation mit Dr. Anselm Jühnemann (Teilprojekt A.1, Universitäts-Augenklinik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) wurden humane Retinae von Spendern verschiedenen Alters untersucht. Die Retinagewebe wurden in Altersgruppen eingeteilt und Membranfraktionen der Neuroretina präpariert. Als Positivkontrolle diente Membranprotein aus Cortex cerebri der Ratte (Ratte Cx).

3.1 NMDA-Rezeptoren der Retina

Zu Beginn dieser Arbeiten lagen zwar Publikationen zur retinalen RNA-Expression von Glutamatrezeptoruntereinheiten, aber keine Studien zur Proteinexpression vor. Gegenstand unserer Analysen zur retinalen Rezeptorexpression war zunächst die Untereinheitenfamilie der NR2A-D, da die Rezeptorvarianten NR3A-C offenbar schwach exprimiert sind. Mit Hilfe unserer hochaffinen Peptidantikörper und, falls verfügbar, auch kommerzieller Antikörper gegen subtypenspezifische Epitope des NMDA-Rezeptors wurde die Unter-

einheitenexpression in Retinae der Ratte und des Menschen mittels Westernblot untersucht. Nachdem es uns gelungen war, die hochgradige Proteaseanfälligkeit retinaler Rezeptorpräparationen durch Optimierung der Proteaseinhibitoren zu reduzieren, ließen sich in der Retina der adulten Ratte neben der obligatorischen Untereinheit NR1 tatsächlich alle Untereinheitenvarianten der Familie NR2A-D ohne wesentliche Degradationsprodukte darstellen (siehe Abbildungen 1 und 2). In einer elektronenmikroskopischen Studie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Heinz Wässle (Frankfurt/M.) konnten die immunologisch darstellbaren NMDA-Rezeptoren den postsynaptischen Membranabschnitten zugeordnet werden (Kalloniatis et al. 2002). Da Glaukome überwiegend im fortgeschrittenen Lebensalter auftreten, wurde die Expression der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors in der humanen Retina vor allem bei älteren Gewebespendern untersucht (Abbildung 1). Mittels einer Westernblotanalyse konnten die Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B in der menschlichen Retina bis ins hohe Alter gesichert nachgewiesen werden. Bei Färbungen für die Untereinheiten NR2C und D ergaben sich demgegenüber schwächere Immunsignale. Bei der als Antigenkontrolle mitgeführten Membranfraktion aus Cortex der Ratte fehlte die schwache NR2C-Bande des NMDA-Rezeptors, da sich die ZNS-Expression der Untereinheit NR2C bei der Ratte auf das Cerebellum beschränkt. Demgegenüber ließ sich die Untereinheit NR2C auch in der Retina der Ratte nachweisen (Abbildung 2). In der Retina des Menschen fand sich eine schwache Expression von der Untereinheit NR2D. Auch wenn das zur Verfügung stehende Material eine zuverlässige quantitative Analyse nicht erlaubte, ergab sich doch die Tendenz einer Abnahme des spezifischen NMDA-Rezeptorgehaltes der Retina im hohen Lebensalter.

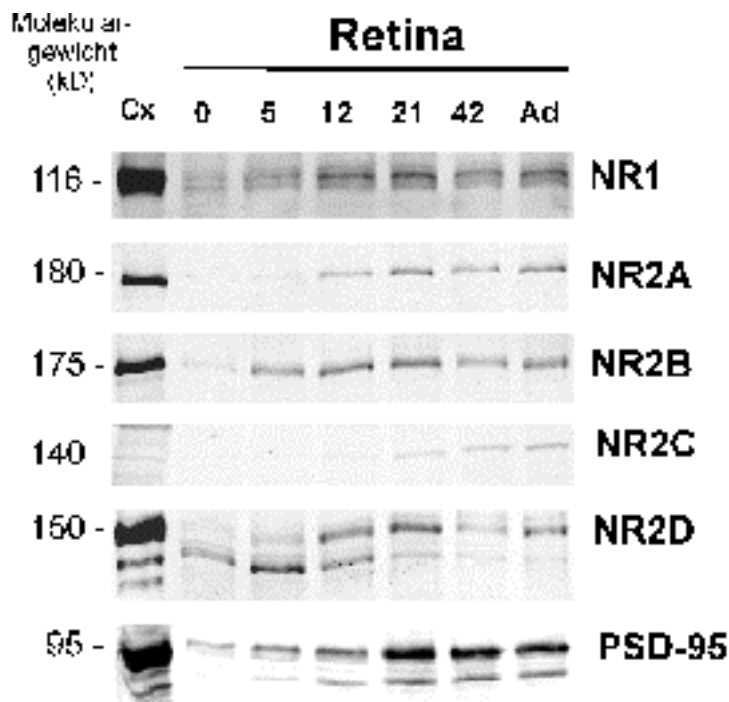


Abbildung 2:

Ontogenese von Untereinheitenvarianten des NMDA-Rezeptors in der Rattenretina.

Retinamembranen von Ratten verschiedenen Alters (P0 / 5 / 9 / 12 / 21 / 42 / adult) wurden mit subtypenspezifischen Antikörpern untersucht. Für die Rezeptorvariante NR2D lassen sich zwei Proteinisoformen nachweisen. Ergänzend wurde die Ontogenese des postsynaptischen Ankerproteins PSD-95 erfaßt.

Um das Expressionsmuster der Untereinheitenvarianten des retinalen NMDA-Rezeptors auch in früheren Entwicklungsstadien zu charakterisieren, wurde eine Ontogenesestudie an der Retina der Ratte durchgeführt (Abbildung 2). Die Expression der Untereinheitenvarianten NR1 und NR2A-D des NMDA-Rezeptors sowie des postsynaptischen Ankerproteins PSD-95 wurde an Membranpräparationen aus Rattenretinae verschiedenen Alters mittels Westernblot untersucht. Als Kontrollgewebe dienten wiederum Membranpräparationen aus Cortex der Ratte. Dabei zeigte sich ein postnataler Anstieg für alle untersuchten Rezeptorvarianten mit einem Expressionsmaximum je nach Untereinheit um den 5. bis 21. Lebensstag sowie ein Absinken der Rezeptorkonzentration in älteren Entwicklungsstadien. Für die Untereinheiten-

variante NR2D lassen sich zwei Proteinisoformen mit unterschiedlicher Molekularmasse nachweisen, wobei die höhermolekulare Variante das leichtere Polypeptid gegen Ende der zweiten Lebenswoche ablöst. Eine vergleichbare Entwicklung fand sich auch für den retinalen Gehalt an PSD-95, der ebenfalls nach der Adoleszenz wieder leicht abfiel. In immunhistochemischen Studien wurde die Schichtenverteilung von Glutamatrezeptor-Untereinheiten in verschiedenen Entwicklungsstadien der Rattenretina untersucht (Kalloniatis et al., eingereicht). Auch wenn sich eine Expression aller Untereinheiten vom Tag E21 an nachweisen ließ, fand sich doch ein für jede Entwicklungsstufe charakteristisches Verteilungsmuster. Ein Vergleich der Entwicklung von retinalen NMDA-Rezeptoren mit der von AMPA/Kainat-Rezeptoren im Westernblot zeigte, daß AMPA-Rezeptoren bereits zum frühesten Untersuchungszeitpunkt am embryonalen Entwicklungstag E21 hochgradig exprimiert sind. So sind AMPA-Rezeptoren schon in der unreifen Retina präsent, wenn noch keine effektiv funktionsfähigen Synapsen vorhanden sind. Sie scheinen damit möglicherweise nicht nur für die schnelle exzitatorische Signalübertragung eine Rolle zu spielen, sondern auch für die Entwicklung der Zell-Zell-Kommunikation durch Synapsen essentiell zu sein. Die zeitlichen Expressionsmuster von Glutamatrezeptoren von NMDA- und AMPA-Typ sind demnach in Retina und ZNS sehr ähnlich. Prinzipiell sollten damit Ansätze zur pharmakologischen Neuroprotektion aus dem ZNS auch auf die Retina übertragbar sein.

3.2 Rezeptormodifikation durch limitierte Proteolyse

Da die bei der Proteinanalyse der Retina beobachtete Bandenheterogenität der NR2D-Untereinheit im Bereich von 70 kD bis 150 kD nicht mit entsprechenden Spleißvarianten korreliert werden konnte, postulierten wir eine posttranslationale Modifikation dieser Untereinheit durch limitierte Proteolyse. Weil die aus Retinapräparationen zu gewinnende Proteinmenge für diese Studien leider nicht ausreichte, mussten wir für die Folgestudien Thalamusgewebe verwenden, da die NR2D-Untereinheit in dieser Hirnregion ebenfalls stärker exprimiert wird. Tatsächlich ließ sich ein vergleichbares Fragmentierungsmuster der NR2D-Untereinheit auch für Thalamus nachweisen. Da das Muster der NR2D-Fragmentierung nicht durch eine kontrollierte Verwendung von Proteinase-Inhibitoren beeinflusst wurde, erschien eine intrinsische Proteolyse des Membranproteins wahrscheinlich. Eine computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz der NR2D-Untereinheit deckte außerhalb des Signalpeptids drei potentielle Schnittstellen für die Protease Thrombin mit der Konsensussequenz -Pro-Arg-Gly- auf, die interessanterweise in den homologen Untereinheiten NR2A-C fehlen. Tatsächlich konnte die Lage der Schnittstellen die in der Westernblotanalyse beobachteten Fragmentgrößen der NR2D-Untereinheit erklären. Durch einen Verdau von Thalamusmembranen mit Thrombin konnten wir wiederum die nativen Fragmentgrößen der NR2D-Untereinheit erzeugen. Diese Beobachtung zeigt, daß die in der Strukturvorhersage gefundenen Schnittstellen offenbar für eine proteolytische Modifikation zugänglich und nutzbar sind.

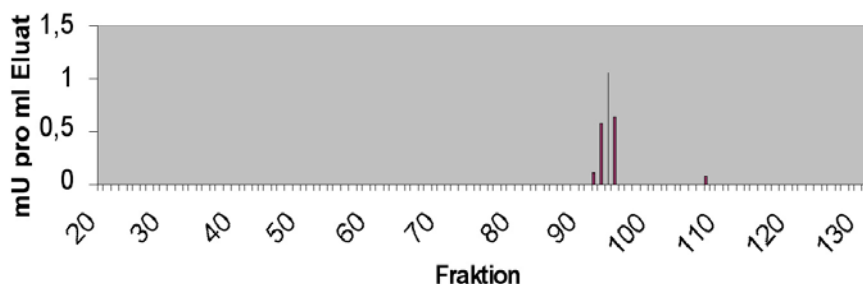


Abbildung 3.
Aufreinigung einer Thrombin-ähnlichen Protease aus Thalamus der Ratte.

Tatsächlich ließ sich eine entsprechende thrombinähnliche Proteaseaktivität im Thalamus der Ratte nachweisen und durch Gelfiltrationschromatographie aufreinigen (Abbildung 3).

Darüberhinaus lieferte die Inkubation von Thalamusgewebe mit der proteolytisch aktivsten Fraktion der Gelfiltrationschromatographie das auch an nativen Membranen beobachtete Fragment der NR2D-Untereinheit von 110 kDa. Die ontogenetische Bandenheterogenität der NR2D-Untereinheit in Thalamus und Retina ist somit durch eine limitierte posttranslationale Proteolyse durch eine thrombinähnliche Protease erklärbar. Bisher ist nicht bekannt, welche Bedeutung diese Proteolyse für die Funktion und den Umsatz von NR2D-tragenden NMDA-Rezeptoren in Retina und Thalamus besitzt. Dennoch zeigt diese Studie, daß gewebeständige Rezeptoren Gegenstand von Modifikationen sind, durch die die Chemosensitivität der rezeptortragenden Neurone verändert wird. Denkbar wäre, daß diese NR2D-Rezeptoren durch Angriff auf die ansonsten nur embryonal genutzte Thrombinschnittstelle posttranslational sensitisiert werden. Neben der gut dokumentierten Rolle genetisch und immunologisch bedingter Rezeptorstörungen bei Erkrankungen der neuronalen Signalübertragung (Butler et al. 2000; Darstein et al. 2000; Büsselberg et al. 2001; Plappert et al. 2001; Sobetzko et al. 2001; Schmitt et al. 2002; Breitingner et al. 2002 c) stellen posttranslationale Veränderungen damit einen weiteren Angriffspunkt möglicher Pathomechanismen dar.

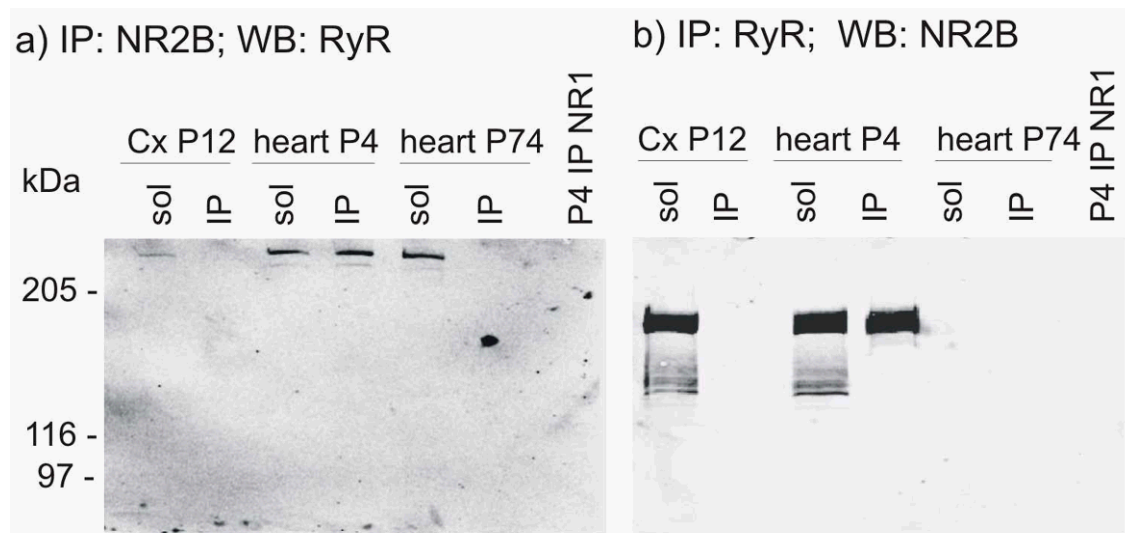


Abbildung 4: Molekulare Komplexbildung der Untereinheitenvarianten NR2B des NMDA-Rezeptors und des Ryanodinrezeptors: Gegenseitige Kopräzipitation. a): Solubilisierte Membranproteine aus juvenilem (P4) und adultem (P74) Herzgewebe sowie Cortex der Ratte wurden mit NR2B-Antiserum immunopräzipitiert. Als Negativkontrolle wurde Solubilisat aus juvenilem Herzen mit einem Antiserum gegen NR1 immunopräzipitiert (P4 IP NR1). Präzipitate und Solubilisate wurden in einer Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen den Ryanodinrezeptor gefärbt. Während sich signifikante Immunsignale für den Ryanodinrezeptor in allen Solubilisaten fanden, zeigte nur das NR2B-Präzipitat aus juvenilen Herzen (P4) ein Ryanodin-Signal. b) Immunpräzipitation mit Antiserum gegen den Ryanodinrezeptor und Darstellung mit NR2B Antikörper. Nur das RyR-Präzipitat aus juvenilem Herzen führt zu einem NR2B-Signal.

3.3 Interaktion des NMDA-Rezeptors mit Proteinen des Ca²⁺-Haushalts

Durch Vergleiche mit Kontrollgeweben war uns aufgefallen, daß die Untereinheitenvariante NR2B des NMDA-Rezeptors nicht nur in Retina und ZNS, sondern auch transient im Herzen juveniler Ratten exprimiert wird (Seeber et al. 2000). Histologische Untersuchungen zur subzellulären Verteilung des kardialen NR2B-Proteins zeigten sowohl im Gewebeverband als auch in kurzzeitig kultivierten Herzmuskelzellen ein quergestreiftes Färbemuster auf Höhe der Z-Banden und belegten damit die Expression in Kardiomyozyten, obwohl diese Zellen keine Synapsen ausbilden. Da der NMDA-Rezeptor zur Ausbildung seiner Funktion als Neurotransmitter-Rezeptor mindestens eine NR1-Untereinheit besitzen muß und an der Synapse durch das postsynaptische Dichte-Protein PSD-95 verankert wird, wurden

Westernblotanalysen mit Antikörpern gegen NR1 und PSD-95 durchgeführt. Eine Expression dieser Proteine im Herzen konnte jedoch in keiner der untersuchten Entwicklungsstadien zwischen Embryonaltag 14 und dem dritten Lebensmonat nachgewiesen werden. Unter der Annahme, daß der fehlende Komplexpartner NR1 möglicherweise durch ein anderes Membranprotein ersetzt wird, suchten wir daher mittels Immunpräzipitationen aus Herzpräparationen nach einem Interaktionspartner für das kardiale NR2B-Antigen. Tatsächlich ließ sich auf diesem Wege die Komplexbildung mit einem sehr großen Protein nachweisen, das sich durch ein Molekulargewicht von über 500 kD auszeichnete.

Nach Aufreinigung und partiellem Verdau konnte dieses Protein über seine Peptidsignatur in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Bonk et al. 2002 a, b; Humeny et al. 2002b; Kislinger et al. 2002 a, b) als Ryanodin-Rezeptor RyR2 identifiziert werden. Durch kreuzweise Kopräzipitation beider Antigene und den Nachweis der intrazellulären Kolo-kalisation in kultivierten Kardiomyozyten ließ sich die molekulare Komplexbildung von Ryanodin-Rezeptor und der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors bestätigen. Die funktionelle Bedeutung der intrazellulären Fraktionen des NMDA-Rezeptors, die sich auch in Neuronen nachweisen lassen, ist weitgehend ungeklärt. Nach gängigen Auffassungen handelt es sich bei intrazellulärem Rezeptorprotein überwiegend um neu synthetisiertes Protein in den Membrananteilen des ER und des Golgi-Apparates (Breitinger et al. 2001, 2002 a, b; Humeny et al. 2002 a). Nach unseren Befunden wäre aber auch eine Beteiligung des NMDA-Rezeptors an der Regulation des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes, z.B. ein möglicher Einfluß auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern möglich.

3.4 *In vitro*-Modell zur Untersuchung exzitotoxischer Mechanismen

Die essentielle Rolle des NMDA-Rezeptors als Vermittler des exzitotoxischen Zellschadens sollte dadurch deutlich werden, daß nach einer Noxe tatsächlich nur solche Zelltypen einer Retinakultur zugrunde gehen, die NMDA-Rezeptoren auf der Zelloberfläche tragen. An Membranpräparationen von Retinazellen wurden an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 21 in Kultur Immunnachweise mit Antikörpern gegen die Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B durchgeführt. Die Rezeptorantigene NR1 und NR2B (180 kDa) ließen sich an allen untersuchten Kulturtagen zuverlässig nachweisen. Die NR2A-Untereinheit war dagegen erst nach zwei Wochen in Kultur nachweisbar. Die subzellulären Verteilungsstudien zeigen eine Kolo-kalisation der beiden NR2-Untereinheiten mit der NR1-Untereinheit.

Über den Einfluß exzitotoxischer Läsionen auf die für das weitere Schicksal eines Neurons entscheidenden Determinanten der Chemosensitivität ist nur wenig bekannt. Immerhin zeigt sich, daß degenerierende Neurone überwiegend die Merkmale des apoptotischen Zellunterganges aufweisen (Druschky et al. 2001) - auch wenn diese Befunde nicht unumstritten sind. Die durch Trauma aktivierten Signalketten des apoptotischen Zellunterganges wurden an einem Zellkulturmodell charakterisiert, wobei geprüft werden sollte, ob neuronale Vulnerabilität mit der Expression bestimmter Rezeptorvarianten korreliert. Unabhängig von der primären Noxe (z.B. Druckschädigung, Ischämie, Epilepsie, genetische Defekte wie Mutationen der Superoxiddismutase) weisen degenerierende Neurone morphologisch ähnliche, stadienhaft in einen nekrotischen oder apoptotischen Zelluntergang mündende Zellschäden auf. Ausgangspunkt unserer weiteren Studien war daher die Hypothese, daß bei Glaukom und toxisch induzierten Zellschäden vergleichbare Schadenskaskaden aktiviert werden. Zur Charakterisierung der proapoptotischen Signalketten, die wahrscheinlich auch bei Glaukom aktiviert werden, haben wir daher die Behandlung von kultivierten Nervenzellen mit dem Schlangengift α -Bungarotoxin, einer Phospholipase A₂ aus dem Toxin der taiwanesischen Grubenotter *Bungarus multicinctus*, als toxikologisches Modell für neuronalen Zelltod

entwickelt (Herkert et al. 2001). Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurde ein Bioassay etabliert, der eine zuverlässige Quantifizierung der neurotoxischer Aktivität gegenüber kultivierten Neuronen erlaubt. Am Modell des durch α -Bungarotoxin ausgelösten neuronalen Zelltods haben wir zunächst die in den verschiedenen Stadien der neuronalen Zellschädigung wirksamen Mediatoren charakterisiert (Herkert et al. 2002). Nach Zugabe zur Nervenzellkultur wird α -Bungarotoxin durch Rezeptorbindung innerhalb weniger Minuten in das Neuron inkorporiert und in lysosomale Fraktionen transportiert. Die Aktivierung intrazellulärer Phospholipasen scheint ein entscheidendes Ereignis posttraumatischer Defekte zu sein. Analog dazu konnten wir die Phospholipase A₂-Aktivität des Toxins als entscheidendes Signal für den apoptotischen Untergang der geschädigten Neurone identifizieren. Durch die Freisetzung und Oxidation von Fettsäuren wird die Bildung von Sauerstoffradikalen induziert. Damit sollte sich das α -Bungarotoxin-Modell sehr gut zur Analyse von Sauerstoffradikalvermittelten Noxen beim posttraumatischen Zelltod von Neuronen eignen. Diese Radikalbildung führt zur Bildung von Peroxidationsprodukten von Fettsäuren. Zu unserer großen Überraschung gelang es uns, den apoptotischen Zelltod durch Radikalfänger nahezu vollständig zu blockieren und die geschädigten Nervenzellen damit äußerst effizient vor dem Untergang zu schützen. Die Überflutung der geschädigten Nervenzelle mit Sauerstoffradikalen und Fettsäuremetaboliten legt den Verdacht nahe, daß eine Zellnoxe auch posttranslationale Modifikationen (z.B. Proteinoxidation) nach sich ziehen kann, die ihrerseits mit vitalen Zellfunktionen interferieren. Zunächst an Modellproteinen haben wir daher nicht-enzymatische Modifikationen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht, um entsprechende Veränderungen später auch auf Zell- oder Gewebeniveau nachweisen zu können. Ob die sich abzeichnenden Protektionsmöglichkeiten auf Glaukome übertragbar sind, wird in Folgestudien zu überprüfen sein.

Zunehmend wird deutlich, daß einzelne Schritte der beteiligten Signalkaskaden des apoptotischen Zelluntergangs durch toxikologische Induktion modellhaft imitiert werden können. Das Schlangengift α -Bungarotoxin induziert intrazelluläre apoptotische Mechanismen, die 'downstream' des Membranrezeptors liegen und stadienhaft ablaufen. Blockade von Ca^{2+} -Anstieg und der Entwicklung von Sauerstoffradikalen schützt die betroffenen Neurone vor dem Untergang.

4. Vergleich mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereiches

Die exzitotoxische Hypothese des glaukomatösen Zelltodes fand zu Beginn der Förderung vor allem durch die Berichte von Dreyer und Kollegen Unterstützung, nach denen bei künstlich induziertem Glaukom im Tiermodell, aber auch bei Patienten mit diagnostiziertem Glaukom eine Erhöhung des intraokulären Glutamat-Spiegels vorlag (Dreyer et al. 1996, 1998; Brooks et al. 1997; Vorwerk et al. 1999). Allerdings behaupteten mehrere Arbeitsgruppen, daß sie zumindest nicht alle der publizierten Ergebnisse reproduzieren konnten. Inzwischen ist Dr. Evan Dreyer wegen falscher Angaben gegenüber der Förderorganisation NIH in einem anderen Forschungsvorhaben zur Otoxizität von Glutamat durch das Office of Research Integrity formell abgemahnt worden (Office of Research Integrity 2000). Auch wenn die Daten über erhöhte intraokulären Glutamat Spiegel bei Glaukomen dadurch ebenfalls in Mißkredit geraten sind, ist die Hypothese der rezeptorvermittelten Exzitotoxizität bei Glaukom dadurch keineswegs widerlegt. So können auch dann, wenn der Auslöser des glaukomatösen Zelltodes nicht in der Erhöhung des intraokulären Glutamat Spiegels liegt, zelluläre Vorgänge wie eine Sensibilisierung der NMDA-Rezeptoren oder ihre Assoziation mit intrazellulären Calciumspeichern eine Rolle bei der Weiterleitung zytotoxischer Signale spielen.

Detaillierte Studien zur Expression von NMDA-Rezeptoren in der RCS (Royal College of Surgeons) Ratte, einem Tiermodell der Retinitis pigmentosa, wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. E. Günther (Tübingen) publiziert (Grunder et al. 2001). Demnach kommt es bei Retinadegeneration infolge Retinitis pigmentosa zu einer sekundären Umverteilung von NMDA-Rezeptoren, wobei insbesondere Müller-Zellen eine starke Immunreaktivität für die Rezeptorvariante NR1 entwickeln. Diese Beobachtungen zeigen, daß NMDA-Rezeptoren offenbar nicht nur an primären Schadensmechanismen der Neurodegeneration, sondern auch sekundären Störungen der retinalen Signaltransduktion beteiligt sein können. Die von uns charakterisierten Mechanismen der Apoptoseinduktion mittels α -Bungarotoxin sind noch nicht von anderen Arbeitsgruppen bearbeitet worden, zumal die zugrundeliegenden Beobachtungen erst jüngeren Datums sind (Herkert et al. 2001). Demgegenüber wurde die Expression von NMDA-Rezeptoren in extraneuronalen, insbesondere in kardiovaskulären Geweben von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Leung et al. 2002; Shin et al. 2002). Der Nachweis einer Komplexbildung von NMDA-Rezeptoren mit dem Ryanodin-Rezeptor oder anderen intrazellulären Kanälen ist allerdings bisher von keiner weiteren Arbeitsgruppe geführt worden.

Literatur:

- Dreyer, E.B., Zurakowski, D., Schumer, R.A., Podos, S.M., und Lipton, S.A. (1996) Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 114, 299-305.
- Brooks, D.E., Garcia, G.A., Dreyer, E.B., Zurakowski, D., und Franco-Bourland, R.E. (1997) Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am. J. Vet. Res.* 58, 864-867.
- Dreyer, E.B. (1998) A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J. Glaucoma* 7, 62-67.
- Grunder, T., Kohler, K., Guenther, E. (2001) Alterations in NMDA receptor expression during retinal degeneration in the RCS rat. *Vis. Neurosci.* 18, 781-781.
- Leung, J.C., Travis, B.R., Verlander, J.W., Sandhu, S.K., Yang, S.G., Zea, A.H., Weiner, I.D., und Silverstein, D.M. (2002) Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. *Am. J. Physiol.* 283, R964-971.
- Office of Research Integrity. Federal Register: November 28, 2000 (Vol. 65, Nr. 229) 70915-70916.
- Shin, C.Y., Lee, N.I., Je, H.D., Kim, J.S., Sung, J.H., Kim, D.S., Lee, D.W., Bae, K.L., und Sohn, U.D. (2002) Cardiovascular responses and nitric oxide production in cerebral ischemic rats. *Arch. Pharm. Res.* 25, 697-703.
- Vorwerk, C.K., Naskar, R., und Dreyer, E.B. (1999) The excitotoxicity theory of glaucoma. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 214, 2-11.

5 Literatur der letzten 3 Jahre

Originalarbeiten

- Bonk, T., Humeny, A., Sutter, C., Gebert, J., von Knebel Doeberitz, M., und Becker, C.-M. (2002a) Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis (FAP): Genotyping of adenomatous polyposis coli (*APC*) alleles by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 35, 87-92.
- Bonk, T., Humeny, A., Gebert, J., Sutter, C., von Knebel Doeberitz, M., und Becker, C.-M. (2002b) MALDI-TOF-MS based detection of microsatellite instability in coding DNA

- sequences: A novel approach to identify DNA mismatch repair deficient cancer cells. *Clin. Chem. (im Druck)*.
- Breitinger, H.-G., Villmann, C., Becker, K., und Becker, C.-M. (2001) Opposing effects of molecular volume and charge at the hyperekplexia site $\alpha 1$ (P250) govern glycine receptor activation and desensitization. *J. Biol. Chem.* **276**, 29657-29663.
- Breitinger, H.-G., und Becker, C.-M. (2002a) Statistical coassembly of glycine receptor $\alpha 1$ wildtype and the hyperekplexia mutant $\alpha 1$ (P250T): Impaired channel function is not dominant in the recombinant system. *Neurosci. Lett.* **331**, 21-24.
- Breitinger, H.-G., Villmann, C., Rennert, J., Ballhausen, D., und Becker, C.-M. (2002b) Hydroxylated residues influence desensitisation behaviour of recombinant $\alpha 3$ glycine receptor channels. *J. Neurochem.* **83**, 30-36.
- Büsselberg, D., Bischoff, A.M., Becker, K., Becker, C.-M., und Richter D.W. (2001) The respiratory rhythm in mutant oscillator mice. *Neurosci Lett.* **316**, 99-102.
- Butler, M. H., Hayashi, A., Ohkoshi, N., Villmann, C., Becker, C.-M., Feng, G., de Camilli, P., und Solimena, M. (2000) Autoimmunity against gephyrin in stiff man syndrome. *Neuron* **26**, 307-312.
- Darstein, M., Landwehrmeyer, G.B., Kling, C., Becker, C.-M. und Feuerstein, T.J. (2000) Strychnine-sensitive glycine receptors in rat caudatoputamen are expressed by cholinergic interneurons. *Neuroscience* **96**, 33-39.
- Druschky, A., Herkert, M., Radespiel-Tröger, M., Druschky, K., Hund, E., Becker, C.-M., Hilz, M.J., Erbguth, F., und Neundörfer, B. (2001) Critical illness polyneuropathy: clinical findings and cell culture assay of neurotoxicity assessed by a prospective study. *Intensive Care Med.* **27**, 686-693.
- Herkert, M., Shakhman, O., Schweins, E., und Becker, C.-M. (2001) α -Bungarotoxin is a potent inducer of apoptosis in cultured rat neurons by receptor-mediated endocytosis. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 821-828.
- Humeny, A., Bonk, T., Berkholz, A., Wildt, L., und Becker, C.-M. (2001) Genotyping of thrombotic risk factors by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **34**, 531-566.
- Humeny, A., Bonk, T., Becker, K., Jafari-Boroujerdi, M., Stefani, U., Reuter, K., und Becker, C.-M. (2002a) A novel recessive hyperekplexia allele *GLRA1*^{S231R}: Genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry and functional characterization as a determinant of cellular glycine receptor trafficking. *Eur. J. Hum. Gen.* **10**, 188-196.
- Humeny, A., Kislinger, T., Becker, C.-M., und Pischetsrieder, M. (2002b) Qualitative determination of specific protein glycation products by matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry peptide mapping. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2153-2160.
- Humeny, A., Schiebel, K., Seeber, S., und Becker, C.-M. (2002c) Identification of DNA polymorphisms within the bovine prion protein gene (*Prnp*) by DNA sequencing and genotyping by MALDI-TOF-MS. *Neurogenetics* **4**, 59-60.
- Kislinger, T., Humeny, A., Seeber, S., Becker, C.-M., und Pischetsrieder, M. (2002a) Qualitative determination of early Maillard-products by MALDI-TOF mass spectrometry peptide mapping. *Eur. Food. Res. Technol.* **215**, 65-71.
- Kislinger, T., Humeny, A., Peich, C., Xiaohang, Z., Toshimitsu, N., Pischetsrieder, M. und Becker, C.-M. (2002b) Relative quantification of N α -(carboxymethyl)lysine, imidazolone A and the Amadori product in glycated lysozyme by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem. (im Druck)*.
- Lamp, K., Humeny, A., Nikolic, Z., Imai, K., Adamski, A., Schiebel, K., und Becker, C.-M. (2001) The murine GABA β receptor 1: cDNA cloning, tissue distribution, structure of the *Gabbr1* gene, and mapping to chromosome 17. *Cytogenet. Cell Genet.* **92**, 116-121.
- Plappert, C.F., Pilz, P.K.D., Becker, K., Becker, C.-M., und Schnitzler, H.-U. (2001) Increased sensitization of acoustic startle response in spasmodic mice with a mutation of the glycine receptor $\alpha 1$ -subunit gene. *Behav. Brain Res.* **121**, 57-67.

- Schmitt, C., Humeny, A., Becker, C.-M., Brune, K., und Pahl, A. (2002) Polymorphisms of TLR4: Rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin. Chem.* **48**, 1661-1667.
- Seeber, S., Becker, K., Rau, T., Eschenhagen, T., Becker, C.-M., und Herkert, M. (2000) Transient expression of NMDA receptor subunit NR2B in the developing rat heart. *J. Neurochem.* **75**, 2472-2477.
- Sobetzko, D., Sander, T., und Becker, C.-M. (2001) Genetic variation of the human glycine receptor subunit genes *GLRA3* and *GLRB* and susceptibility to idiopathic generalized epilepsies. *Am. J. Med. Genet.* **105**, 534-538.

Eingereichte Originalarbeiten

- Breitinger, H.-G., Grewer, C., und Becker, C.-M. (2002c) Rapid chemical kinetics of the glycine receptor mutant $\alpha 1$ (P250T): Effects of an intracellular domain on ligand affinity and conductance but not gating (*eingereicht*).
- Herkert, M., Shakhman, O., Humeny, A., und Becker, C.-M. (2002) Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators of α -bungarotoxin-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons (*eingereicht*).
- Kalloniatis, M., Sun, D., Foster, L., Haverkamp, S., Herkert, M., und Wässle, H. (2002) Quantitative localization of NMDA receptor subunits and mapping NMDA drive within the inner plexiform layer of the vertebrate retina (*eingereicht*).

Übersichtsartikel und Buchbeiträge

- Becker, K., Breitinger, H.-G., Becker, C.-M. (2000) The inhibitory glycine receptor as a model of hereditary channelopathies. *In: Channelopathies* (Herausg.: Lehmann-Horn, F.) Elsevier: Amsterdam, S. 199-222.
- Becker, C.-M. (2002a) Hyperekplexie (Startle Disease / Stiff Baby Syndrome): Molekulare Pathologie des inhibitorischen Glycinrezeptors. *In: Neurogenetik* (Herausg.: Rieß, O., und Schöls, L.) Kohlhammer: Stuttgart, S. 272-277.
- Breitinger, H.-G., und Becker, C.-M. (2002d) The inhibitory glycine receptor – Simple views of a complicated channel. *ChemBioChem.* **4**, 1042-1052.
- Neumann, S.B., und Becker, C.-M. (2002) Therapeutische Perspektiven der Molekularen Medizin. *Klinikerarzt (im Druck)*.
- Petrides, P.E., und Becker, C.-M. (2002) Gehirn und Nervengewebe. *In: Biochemie und Pathobiochemie* (Herausg.: Löffler, G., und Petrides, P.E.) Springer: Berlin/Heidelberg, S. 1053-1076.
- Rose, C.R., Konnerth, A., und Becker, C.-M. (2002) Die Synapse. *In: Lehrbuch der vorklinischen Medizin* (Herausg.: Unsicker, K., und Schmidt, R.F.) Deutscher Ärzteverlag: Köln (*im Druck*).

