4 ERGEBNISSE

4.1 Die Lokalisation und Entwicklung der Kv1-α-Untereinheiten in der Retina der Ratte

Die regionale und subzelluläre Verteilung der spannungsabhängigen Kaliumkanal-Untereinheiten Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6 in situ wurde an Vibratomschnitten postnataler und adulter Rattenretinae mit Hilfe immunzytochemischer Methoden untersucht. Das Wissen um die in den einzelnen Regionen vorherrschenden Zellen, Neurone bzw. deren Zellfortsätze lässt Rückschlüsse vom Färbeverhalten der Schnitte auf die Lokalisation der Kv1-α-Untereinheiten in subzellulären Strukturen zu.

4.1.1 Die Lokalisation und Entwicklung von Kv1.1

Lichtmikroskopische Untersuchung

Eine immunpositive Reaktion auf den mit Anti-Kv1.1 Antikörpern behandelten Retinaschnitten ist bereits bei P8 zu verzeichnen. Besonders die Ganglienzellschicht zeigt eine intensive Immunfärbung (Abb. 4, P8).

Innerhalb der inneren plexiformen Schicht, in welcher die synaptischen Verbindungen von Ganglienzellen und Amakrinzellen und auch der Bipolarzellen lokalisiert sind, zeigt sich eine immunpositive Reaktion im Stadium P8. Auch die innere Körnerschicht, welche in diesem Stadium noch nicht klar abzugrenzen ist, weist eine Immunfärbung auf. Die äußere plexiforme Schicht stellt sich im Stadium P8 stark immungefärbt als deutliches dunkles Band dar. Auch im Bereich der äußeren Körnerschicht ist eine Immunfärbung zu verzeichnen, diese ist am unteren Rand am deutlichsten. Der Bereich der Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren zeigt eine starke Immunreaktivität für Kv1.1.

Im Entwicklungsstadium P15 sind alle Schichten immungefärbt. Die innere plexiforme Schicht stellt sich nun in Form von zwei, klar abzugrenzenden, stark immunpositiven Streifen dar (Abb. 4, P15). Der Bereich der äußeren Körnerschicht ist schwach angefärbt. Im Stadium P15 zeigt sich die Verteilung von Kv1.1 in den verschiedenen Schichten differenzierter, so daß der Schichtaufbau der Retina sehr deutlich zu erkennen ist. Die Immunfärbung im Bereich der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren ist homogen. Bei der adulten Retina ist die Immunreaktivität für Kv1.1 in allen Schichten, mit Ausnahme von der äußeren Körnerschicht, zu verzeichnen (Abb. 4, Adult). Insbesondere die Ganglienzellschicht und die innere plexiforme Schicht stellen sich intensiv immungefärbt dar. Der Bereich der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren zeigt eine gleichmäßige immunpositive Reaktion für Kv1.1. Bei P15 und auch bei den Schnitten adulter Retinae stellt sich der äußere Bereich der inneren Körnerschicht besonders intensiv immungefärbt dar, was aufgrund der Lage den Horizontalzellen zugeordnet werden kann.

Tabelle 3 Regionale Verteilung von Kv1.1 in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in situ.

GCL:	Ganglier	nzellschicht,	IPL: inr	nere pl	exiforme	Schicht,	INL:	innere l	Körnersch	nicht,
OPL:	äußere	plexiforme	Schicht,	ONL:	äußere	Körnerso	chicht,	OS/IS:	Außen-	und
Innensegmente der Photorezeptoren										

	GCL	IPL	INL	OPL	ONL	IS/OS
Kv1.1 P8	+	+	+	+	-	+
Kv1.1 P15	+	+	+	+	-	+
Kv1.1 adult	+	+	+	+	-	+



Abbildung 4 Immunzytochemische Darstellung von Kv1.1 in den Retinae von Ratten der Entwicklungsstadien P8, P15 und adulter Tiere.

Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 µm.

GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren

4.1.2 Die Lokalisation und Entwicklung von Kv1.2

Lichtmikroskopische Untersuchung

Eine Immunreaktivität für Kv1.2 ist bereits im Stadium P8 nachweisbar. Es zeigt sich zu diesem Zeitpunkt bereits eine klare Trennung zwischen der Kv1.2 exprimierenden Ganglienzellschicht und der ebenfalls Kv1.2 positiven inneren Körnerschicht durch eine ungeordnete innere plexiforme Schicht (Abb. 5, P8). Die Zellkörper der Horizontalzellen weisen auf den äußeren Rand der inneren Körnerschicht hin, sie zeigen eine stark immunpositive Reaktion auf Anti-Kv1.2.

Im Stadium P15 sind die Kaliumkanäle Kv1.2 auch in der inneren plexiformen Schicht nachweisbar, sie bilden dort zwei deutlich zu erkennende schmale Streifen, diese zeigen sich bei der Retina im adulten Stadium auch, aber aufgrund der Schnittrichtung, etwas verschwommen (Abb. 5, Adult).

Auch in der äußeren Körnerschicht zeigt sich Immunreaktivität gegen Anti-Kv1.2, woraus das fleckige Zellmuster im Stadium P15 resultiert (Abb. 5, P15).

In den Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren wird ebenfalls Kv1.2 exprimiert. Es zeigt sich, daß sowohl im Entwicklungsstadium P15, als auch in der adulten Retina der Kaliumkanal Kv1.2 in allen Schichten nachweisbar ist.

Tabelle 4 Regionale Verteilung von Kv1.2 in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in situ.

	GCL	IPL	INL	OPL	ONL	IS/OS
Kv1.2 P8	+	-	+	-	-	-
Kv1.2 P15	+	+	+	+	+	+
Kv1.2 adult	+	+	+	+	+	+



Abbildung 5 Immunzytochemische Darstellung von Kv1.2 in den Retinae von Ratten der Entwicklungsstadien P8, P15 und adulter Tiere, die Pfeile in Abb. P8 weisen auf die Horizontalzellen am unteren Rand der inneren Körnerschicht hin.

Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 µm.

GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren, HC: Horizontalzellen

4.1.3 Die Lokalisation und Entwicklung von Kv1.3

Lichtmikroskopische Untersuchung

Im Entwicklungsstadium P8 zeigt sich eine Immunreaktivität für Kv1.3 in der Ganglienzellschicht, direkt darunter ist eine starke Immunfärbung zu erkennen, welche aufgrund der Lokalisation den amakrinen Zellen zugeordnet werden könnte. Auch in der inneren Körnerschicht ist eine immunpositive Reaktion auf Anti-Kv1.3 zu verzeichnen, die Zellkörper der Horizontalzellen sind am unteren Rand dieser Schicht zu erkennen (Abb. 6, P8).

In der äußeren Körnerschicht und den Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren ist lichtmikroskopisch ebenfalls eine Immunfärbung nachweisbar. Im Stadium P15 ist in allen Schichten der Retina eine Immunreaktion zu erkennen, wobei die äußere plexiforme Schicht die stärkste Immunfärbung zeigt. Die verschiedenen Schichten der Retina stellen sich klar gegliedert dar (Abb. 6, P15). Im Bereich der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren zeigt sich ein fleckiges Muster.

In der adulten Retina ist eine Immunreaktivität für Kv1.3 in allen Schichten zu verzeichnen. Bei der adulten Retina imponiert der Bereich der Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren noch deutlicher als bei P15 durch sein fleckiges Muster (Abb. 6, Adult). In den Ausschnittsvergrößerungen der Außen- und Innensegmente der adulten Retina ist zu erkennen, daß Kv1.3 lediglich von den Zapfen exprimiert wird (Abb. 7).

Tabelle 5 Regionale Verteilung von Kv1.3 in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in situ.

	GCL	IPL	INL	OPL	ONL	IS/OS
Kv1.3 P8	+	+	+	-	+	+
Kv1.3 P15	+	+	+	+	+	+
Kv1.3 adult	+	+	+	+	+	+



Abbildung 6 Immunzytochemische Darstellung von Kv1.3 in den Retinae von Ratten in den Entwicklungsstadien P8, P15 und adulter Tiere, die Pfeile in Abb. P8 weisen auf die Horizontalzellen am unteren Rand der inneren Körnerschicht hin. Die Pfeile in Abb. P15 und Adult weisen auf die Bereiche OS/IS hin. Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 μm.

GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren, HC: Horizontalzellen



Abbildung 7 Ausschnittsvergrößerungen adulter Retinae. Immunzytochemische Darstellung von Kv1.3 der gesamten Zapfen, mit Außen- und Innensegmenten, Maßstab 30 µm.

4.1.4 Lokalisation und Entwicklung von Kv1.4

Lichtmikroskopische Untersuchung

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Retinaschnitte, welche mit Anti-Kv1.4 behandelt wurden, ist eine Immunreaktion im Stadium P8 in allen Schichten zu erkennen. Besonders in der Ganglienzellschicht, in der äußeren plexiformen Schicht, aber auch am unteren Rand der äußeren Körnerschicht kann der schnell inaktivierende Kaliumkanal Kv1.4, aufgrund einer intensiven Immunfärbung, nachgewiesen werden (Abb. 8, P8).

Die innere Körnerschicht und der innere Bereich der äußeren Körnerschicht zeigen eine schwache immunpositive Reaktion auf Anti-Kv1.4.

Auffällig ist im Entwicklungsstadium P15 ein breiter immungefärbter Streifen innerhalb der inneren plexiformen Schicht. Dieser ist im adulten Stadium, aufgrund der entwicklungsbedingt noch intensiver werdenden Immunfärbung, nicht mehr so ausgeprägt zu erkennen. Auch im Stadium P15 ist in allen Retinaschichten eine Immunfärbung zu sehen. Die einzelnen Retinaschichten stellen sich klar abgrenzbar dar (Abb. 8, P15).

In den Schnitten der adulten Retina ist der Schichtaufbau wiederum weniger deutlich als bei P15, was mit dem Auftreten vertikaler Fasern aus den verschiedenen Schichten zu erklären ist. In der äußeren Körnerschicht ist keine Immunreaktivität für Kv1.4 zu verzeichnen.

Im adulten Stadium fällt ein schmaler, durchgehender Streifen innerhalb der Schicht der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren als Besonderheit auf (Abb. 8, Adult). Eine eindeutige Zuordnung dieser Kv1.4 exprimierenden Struktur gelang lichtmikroskopisch nicht, woraufhin diese Region elektronenmikroskopisch untersucht wurde.

Elektronenmikroskopische Untersuchung

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist die subzelluläre Lokalisation des schnell inaktivierenden Kaliumkanals Kv1.4, im Bereich der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren, dargestellt.

Auf elektronenmikroskopischem Level ist das Innensegment der Stäbchen, aufgrund der Vielzahl von Mitochondrien, und das Außensegment, wegen seiner zytoplasmatischen Membranscheiben, zu erkennen (Abb. 9). Es zeigen sich elektronendichte Ansammlungen im Innensegment, nahe dem Kinoziliensegment (Pfeil Abb. 9). In diesem Bereich liegt die äußere Grenzschicht. Sie stellt ein Schlußleistennetz aus Zonula adherentes dar, die an dieser Stelle Photorezeptoren mit MÜLLER-Zellen verbindet.

Tabelle 6 Regionale Verteilung von Kv1.4 in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in situ.

	GCL	IPL	INL	OPL	ONL	IS/OS
Kv1.4 P8	+	+	+	+	+	+
Kv1.4 P15	+	+	+	+	+	+
Kv1.4 adult	+	+	+	+	-	+



Abbildung 8 Immunzytochemische Darstellung von Kv1.4 in den Retinae von Ratten der Entwicklungsstadien P8, P15 und adulter Tiere. Der Pfeil in Abb. Adult weist auf das Band innerhalb der Innen- und Außensegmente hin, woraus auch die elektronenmikroskopische Aufnahme stammt.

Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 µm.

GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren

33



Abbildung 9 Ultrastrukturelle Lokalisation von Kv1.4 in der adulten Rattenretina. Außen- und Innensegmente der Stäbchen, dazwischen ist das verbindende Cilium zu sehen, elektronenmikroskopisch dargestellt. Der Pfeil weist auf das elektronendichte Material am unteren Ende des Innensegments hin.

RIS: Innensegment des Stäbchens, ROS: Außensegment des Stäbchens

4.1.5 Lokalisation und Entwicklung von Kv1.5

Lichtmikroskopische Untersuchung

Eine immunpositive Reaktion auf den mit Anti-Kv1.5 Antikörpern behandelten Retinaschnitten ist bereits bei P8 zu verzeichnen (Abb. 10, P8). In allen Schichten, außer dem Bereich der Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren, ist eine Immunfärbung zu verzeichnen. Besonders die Ganglienzellschicht und die äußere plexiforme Schicht sowie der untere Rand der äußeren Körnerschicht stellen sich intensiv immungefärbt dar. Die äußere plexiforme Schicht ist als deutliches dunkles Band zu erkennen.

Im Entwicklungsstadium P15 (Abb. 10, P15) ist keine Immunreaktion mehr im Bereich der äußeren Körnerschicht zu erkennen, wohingegen sich eine Immunfärbung im Bereich der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren gebildet hat. Im adulten Stadium ist, wie auch bei P15, eine immunpositive Reaktion auf Anti-Kv1.5 in allen Schichten, außer der äußeren Körnerschicht, zu verzeichnen. Im Gegensatz zu P15, ist im adulten Stadium die Immunfärbung im Bereich der Außen- und Innenglieder der Photorezeptoren nur sehr schwach. Da dieser Bereich lichtmikroskopisch nicht eindeutig als immunpositiv zu beurteilen ist, wurde diese Region elektronenmikroskopisch dargestellt (Abb. 10, Adult).

Zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung erscheint eine strichförmige Zwischenschicht innerhalb der inneren plexiformen Schicht, etwa wie bei Kv1.1 oder Kv1.2.

Elektronenmikroskopische Untersuchung

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist die subzelluläre Lokalisation des Kaliumkanals Kv1.5, im Bereich der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren, dargestellt (Abb. 11).

Auf elektronenmikroskopischem Level ist das Innensegment der Stäbchen, aufgrund der Vielzahl von Mitochondrien, und das Außensegment, wegen seiner zytoplasmatischen Membranscheiben, zu erkennen. Es zeigen sich elektronendichte Ansammlungen in den Außensegmenten der Photorezeptoren. Diese sind sowohl in den Außensegmenten von Stäbchen, als auch in den Außensegmenten der Zapfen zu erkennen. Die Innensegmente weisen keine Immunreaktivität gegen Kv1.5 auf. **Tabelle 7** Regionale Verteilung von Kv1.5 in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in situ.

	GCL	IPL	INL	OPL	ONL	IS/OS
Kv1.5 P8	+	+	+	+	+	-
Kv1.5 P15	+	+	+	+	-	+
Kv1.5 adult	+	+	+	+	-	-/+



Abbildung 10 *Immunzytochemische Darstellung von Kv1.5 in den Retinae von Ratten der Entwicklungsstadien P8, P15 und adulter Tiere.* Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 μm.

GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren



Abbildung 11 Ultrastrukturelle Lokalisation von Kv1.5 in der adulten Rattenretina. Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren elektronenmikroskopisch dargestellt. Der Pfeil weist auf das elektronendichte Material im Bereich der Außensegmente der Stäbchen hin. Maßstab 1 μm.

RIS: Innensegment des Stäbchens, ROS: Außensegment des Stäbchens

4.1.6 Lokalisation und Entwicklung von Kv1.6

Lichtmikroskopische Untersuchung

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Retinaschnitte im Stadium P8 ist bereits eine intensive Immunfärbung zu erkennen. Die Ganglienzellschicht stellt sich tief dunkel gefärbt dar. Es zeigt sich auch eine klar abzugrenzende äußere plexiforme Schicht, welche durch eine intensive Immunfärbung imponiert (Abb. 12, P8). Auch die innere plexiforme Schicht, sowie die innere Körnerschicht zeigen eine Immunreaktion auf Anti-Kv1.6.

Der Bereich der äußeren Körnerschicht zeigt sich, wenn auch deutlich schwächer, immunpositiv. Die Region der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren stellt sich noch etwas diffus, aber immungefärbt, dar.

Bei den P15 Retinaschnitten ist die Ganglienzellschicht weniger intensiv immungefärbt, dafür imponiert die innere plexiforme Schicht durch mehrere deutliche, Bild aufhellende, immunpositive Streifen (Abb. 12, P15). In der inneren Körnerschicht und in der äußeren plexiformen Schicht ist eine Immunreaktion erkennbar. Die einzelnen Schichten sind klar voneinander abgrenzbar. Die äußere Körnerschicht zeigt sich bei P15 immunnegativ, aber der Bereich der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren stellt sich nun als ein immungefärbtes Band dar.

In der adulten Rattenretina sind die Bereiche der Ganglienzellschicht, die innere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht, sowie auch die äußere plexiforme Schicht deutlich immungefärbt (Abb. 12, Adult). Die Streifenbildung der einzelnen Schichten zeigt sich allerdings verschwommen. Die äußere Körnerschicht zeigt keine Immunreaktion auf Anti-Kv1.6, aber die inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren lassen sich als deutliches, immungefärbtes Band abgrenzen.

Tabelle 8 *Regionale Verteilung von Kv1.6 in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien in situ.*

	GCL	IPL	INL	OPL	ONL	IS/OS
Kv1.6 P8	+	+	+	+	+	+
Kv1.6 P15	+	+	+	+	-	+
Kv1.6 adult	+	+	+	+	-	+





Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 µm.

GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren

4.2 Die Lokalisation und Entwicklung der MAGUK-Proteine SAP90/PSD 95 und SAP97 in der Retina der Ratte

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Retinaschnitte, welche mit Anti-SAP97 behandelt wurden, ist eine Immunreaktion im Stadium P8 in der Ganglienzellschicht, in der inneren plexiformen Schicht, aber auch in der inneren Körnerschicht nachweisbar. In der äußeren plexiformen Schicht ist eine sehr schwache Immunfärbung zu erkennen. Im Stadium P15 ist in allen Retinaschichten eine Immunfärbung zu sehen (Abb. 13, P8). In den Schnitten der adulten Retina ist der Schichtaufbau wiederum weniger deutlich als bei P15, was mit dem Auftreten vertikaler Fasern aus den verschiedenen Schichten zu erklären ist (Abb. 13, Adult). In der äußeren Körnerschicht ist keine Immunreaktivität für SAP97 zu verzeichnen.

Im adulten Stadium fällt ein schmaler, durchgehender Streifen innerhalb der Schicht der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren als Besonderheit auf. Es fällt auf, dass die Verteilung von SAP97, auch mit dem charakteristischen durchgehenden Streifen zwischen Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren,

mit der Verteilung von Kv1.4 im adulten Stadium konform geht. Im Vergleich dazu, stellt sich die Verteilung des synapsenassozierten Proteins SAP90/PSD95 in der adulten Retina anders dar. Wie in Abbildung 14 zu erkennen, ist eine diffuse, aber spezifische Immunfärbung in der Ganglienzellschicht, sowie in der inneren plexiformen Schicht zu verzeichnen. Besonders intensiv stellt sich die Immunreaktivität für SAP90/PSD95 in der äußeren plexiformen Schicht dar. In den mit Anti-SAP90 behandelten Schnitten ist kein durchgehender Streifen innerhalb der Schicht der Photorezeptoren zu erkennen, wie es bei SAP97 und Kv1.4 zu beobachten ist.

Tabelle	9	Regionale	Verteilung	von	SAP97	in	den	unterschiedlichen
Entwickl	ungs	stadien, sowie	SAP90 in de	r adulte	en Retina il	n situ		
Beschrift	tunge	en siehe Tabel	le 3					

	GCL	IPL	INL	OPL	ONL	IS/OS
SAP97 P8	+	+	+	-	-	-
SAP97 P15	+	+	+	+	+	+
SAP97 adult	+	+	+	+	+	+
SAP90 adult	+	+	-	+	-	-



Abbildung 13 *Immunzytochemische Darstellung von SAP97 in den Retinae von Ratten der Entwicklungsstadien P8, P15 und adulter Tiere. Der Pfeil in Abb. Adult weist auf das Band innerhalb der Innen- und Außensegmente hin.*

Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 μm. GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren



Abbildung 14 *Immunzytochemische Darstellung von SAP90/PSD95 in der Retina einer adulten Ratte. Übersichtsaufnahmen, Maßstab 50 μm.*

GCL: Ganglienzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, INL: innere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ONL: äußere Körnerschicht, OS/IS: Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren