

## 5 DISKUSSION

Seit 1843 existiert die Idee von Membranporen (Brücke, 1843). Aber noch bis Anfang der 50er Jahre unseres Jahrhunderts waren Ionenkanäle rein hypothetisch. Erst mit den patch clamp Untersuchungen von Hodgkin und Huxley 1952 und dem Nachweis des axonalen Aktionspotentials begann die Erforschung von Ionenkanälen (Hodgkin und Huxley, 1952). In den 70er Jahren gewannen neben elektrophysiologischen auch pharmakologische Untersuchungen an Bedeutung: Durch Medikamenten- und Toxinbindung wurden Membranporen isoliert, darunter einige Ionenkanäle (Hille, 1992). In den 80er Jahren konnten elektronenmikroskopische Analysen die ultrastrukturelle Verteilung der Proteine aufklären (McCarthy et al., 1996). Später brachten Isolierungen und Klonen von genomischer DNA Informationen über die zugrundeliegenden Aminosäuresequenzen. Das erste Kaliumkanalgen in Säugetieren wurde in Mäusehirnen (Tempel et al., 1988) und Rattenhirnen (Baumann et al., 1988) isoliert. Sequenzanalysen ließen Rückschlüsse auf die Kaliumkanalstruktur zu (Guy, 1990; Guy und Conti, 1990). Immunhistochemische Untersuchungen wurden mit der Herstellung von Antikörpern möglich. Antikörper gegen Kv1-Proteine wurden ab 1991 erfolgreich zur Charakterisierung der Verteilung von Kaliumkanaluntereinheiten eingesetzt (Trimmer, 1991). Heute stellen schon viele Firmen und Labore Antikörper gegen Kaliumkanalproteine her.

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, Aufschlüsse über die Entwicklung und Verteilung von sechs Mitgliedern der Kv1-Subfamilie in situ zu erhalten. Die Expressionen von Kv1.1-Kv1.6 wurden in situ analysiert und verglichen. Zusätzlich wurde die Expression der MAGUK-Proteine SAP90/PSD95, sowie SAP97 untersucht.

Die Nagetierretina stellt ein komplexes neuronales Netzwerk dar, dessen funktionelle Entwicklung nachgeburtlich abläuft. Um Informationen bezüglich der neuronalen Reifung zu erhalten, wurde die Expression der Kv1-Unterfamilie in der Retina der Ratte während der postnatalen Entwicklung untersucht. Für den licht- und elektronenmikroskopischen Nachweis der unterschiedlichen Kv1-Kanäle, als auch der SAP Proteine, wurden immunzytochemische Methoden genutzt.

Bereits bei P8 konnten alle  $\alpha$ -Untereinheiten von Kv1.1-Kv1.6 sowohl in der Ganglienzellschicht, als auch in der inneren Körnerschicht nachgewiesen werden. In der weiteren postnatalen Entwicklung nimmt ihr Auftreten insgesamt weiter zu, und das Verteilungsmuster unterscheidet sich dann subfamilienspezifisch. Weiterhin konnten alle hier untersuchten Kaliumkanäle in der inneren und äußeren plexiformen Schicht zu unterschiedlichen Entwicklungszeiten nachgewiesen werden. Erstmals konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß Kv1.3 in den Innen- und Außengliedern der Zapfen lokalisiert ist.

Erstmals wird gezeigt, dass Kv1.4 in der adulten Retina in den Innensegmenten der Stäbchen, nahe dem Kinoziliensegment, auftaucht, zudem ist Kv1.4 dort mit dem synapsenassoziierten Protein SAP97 kolokalisiert.

## **5.2 Die unterschiedliche Verteilung der Kaliumkanal- $\alpha$ -Untereinheiten in situ**

Die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren die unterschiedliche Verteilung von Kv1-Untereinheiten in der Retina der Ratte und ihre Veränderung im Laufe der postnatalen Entwicklung. Die durchgängig hohe Dichte von einigen Kv1-Kanälen in spezifischen Retinaschichten während unterschiedlicher Entwicklungsstufen deuten darauf hin, daß die jeweiligen Neurone einen bemerkenswerten Wandel, bezüglich ihrer neuronalen Aktivität und ihrer funktionellen Eigenschaften durchmachen, bevor sie das adulte Stadium erreichen. Störungen in der korrekten Expression und Verteilung zum dafür erforderlichen Zeitpunkt könnten die Funktion im adulten neuronalen Netzwerk beeinträchtigen.

Die Verteilung von einigen Kv1-Kanälen (Kv1.1-Kv1.4) in adulten Mäuse- (Klumpp et al., 1995a; Klumpp et al., 1995b; Pinto und Klumpp, 1998) und Ratten- (Tian et al., 2003) Retinae sind schon zuvor untersucht worden. Jedoch fehlte eine umfassende Analyse der Lokalisation und der Entwicklung, sowie der Veränderungen während der Entwicklung bis hin zum adulten Stadium von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Deswegen hat diese Arbeit das Ziel, die Verteilungsmuster sowie die Entwicklung der zur shaker-Subfamilie zählenden Kaliumkanäle Kv1.1- Kv1.6 in der Retina der Ratte aufzuzeigen.

Ein gemeinsames charakteristisches Merkmal, welches bei allen hier untersuchten Kv1-Untereinheiten festgestellt werden kann, ist die sehr frühe Expression in der

Ganglienzellschicht, sowie in der inneren Körnerschicht. Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß die Ganglienzellschicht sogar schon zwischen P1 und P3 die Kaliumkanäle Kv1.1-Kv1.6 exprimiert (Höltje et al., 2006).

Die innere Körnerschicht zeigte in diesen Untersuchungen, daß Kv1.2-Kv1.6 bereits zwischen P3 und P5 ganz deutlich in den Horizontalzellen am unteren Rand dieser Schicht, später dann auch im weiter proximalen Bereich der inneren Körnerschicht nachweisbar ist (Höltje et al., 2006).

Die Expression von Kv1.1 in der inneren Körnerschicht ist nicht nur einzelnen Horizontalzellen zuzuschreiben. Dies entspricht den von Pinto und Klumpp erhobenen Daten von 1998, wonach Kv1.1 mRNA und Kv1.2 mRNA in der Ganglienzellschicht, sowie der proximalen inneren Körnerschicht, bei in situ Hybridisation nachgewiesen werden konnte.

Bei der Expression innerhalb der inneren plexiformen Schicht und der äußeren plexiformen Schicht, in welchen die meisten synaptischen Verbindungen liegen, unterscheiden sich die Kaliumkanalsubtypen.

Die Expression von Kv1.2 und Kv1.3 in der äußeren plexiformen Schicht bleibt hinter dem anatomischen Auftreten dieser Schicht, was etwa um P4 stattfindet, zurück (Dhingra et al., 1997). Weitere Untersuchungen von Höltje et al. zeigten, daß dies auch für Kv1.4-Kv1.6 gilt, dort war um P5 lediglich Kv1.1 nachweisbar (2006). Vielmehr passt das zeitliche Auftreten von Kv1.2-Kv1.6 zwischen P8 und P15 zum Zeitpunkt des Öffnens der Augen und einer damit verbundenen lichtevozierten Reaktion.

Eine weitere damit übereinstimmende Beobachtung ist die, im Vergleich zu den inneren Retinaschichten, verzögerte Expression von Kv1.1-Kv1.6 im Bereich der Photorezeptoren. Typischerweise zeigen sich die untersuchten Kaliumkanäle bei P8 zunächst im Bereich der Innensegmente der Photorezeptoren, bis sie dann bei P15 eindeutig den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptoren zugeordnet werden können.

Das insgesamt beobachtete Phänomen, daß die Kv-Kaliumkanäle schon sehr viel früher in der Retina exprimiert werden, insbesondere in der Ganglienzellschicht, könnte eine Grundlage für die bekannten spontanen Aktivitäten von Ganglienzellen und amakrinen Zellen in der frühen, postnatalen Retina sein. Schon bevor visuelle Reize Reaktionen hervorrufen, tauchen spontane Depolarisierungen, sogenannte retinale Wellen auf, welche die Retina passieren (Galli und Maffei, 1988; Feller et al., 1996; Firth et al., 2005). Diese retinalen Wellen bestehen aus korrelierenden aufspringenden

Aktionspotentialen welche von benachbarten Ganglienzellen generiert werden (Wong et al., 1993). Während sich die Augen öffnen, können verschiedene Stufen von retinalen Wellen unterschieden werden. Die frühesten beobachteten synchronisierten Depolarisationen sind von sogenannten gap junctions abhängig, die späteren basieren dann auf cholinerg, und die letzten dann auf glutamaterger synaptischer Signalübermittlung (Torborg und Feller, 2005). Diesbezüglich handelt es sich bei den hier untersuchten, langsam inaktivierenden Kaliumkanälen um sehr wahrscheinliche Kandidaten, welche die neuronale Erregbarkeit von Ganglienzellen und cholinergen amakrinen Zellen innerhalb der Ganglienzellschicht ermöglichen. Die glutamatergen Bipolarzellen werden später, während der Organisation der Retina, sowohl für die Einrichtung und Verfeinerung von synaptischen Verbindungen, als auch für die retinale Projektion benötigt (Hubermann et al., 2002).

Bei Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 und Kv1.6 stellte sich der Bereich der inneren plexiformen Schicht gestreift dar. Vorhergehende Studien konnten zeigen, indem sie mit spezifischen Cholin-Acetyl-Transferase (Chat) Antikörpern den Bereich der inneren plexiformen Schicht anfärbten, daß zu beiden Seiten dieser Schicht Zellkörper zu finden sind, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt (Hayden et al., 1980).

Weiterführende Studien, welche von Höltje et al. 2006 durchgeführt wurden, konnten mithilfe der konfokalen Laserskanmikroskopie und spezifischer Antikörper gegen Cholin-Acetyl-Transferase (Chat), Protein Kinase C- $\alpha$  (PKC $\alpha$ ), sowie die jeweiligen Kaliumkanäle Kv1.1-Kv1.6 das genauere Equipment dieser Zellpopulationen enthüllen. Amakrine Zellen ließen sich bei dieser Untersuchung mit Chat, Bipolarzellen mit PKC $\alpha$  anfärben. Es konnte gezeigt werden, daß Kv1.2, Kv1.3 und Kv1.5 an den Perikarien der cholinergen amakrinen Zellen lokalisiert sind. Die gestreifte Darstellung von Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 und Kv1.6 in der inneren plexiformen Schicht wird bei Höltje et al. genauso wie in der hier vorliegenden Studie beschrieben. Wobei Höltje (2006) lediglich für Kv1.2 eine komplette Kolo-kalisation der Streifen mit Chat nachweisen konnte.

Zuvor ist schon beschrieben worden, daß Kv1.3-Untereinheiten mit ribbon-Synapsen assoziiert sind. Dies wurde mit spezifischen ribbon-Synapsen-Antikörpern, B16 genannt, verifiziert (Balkema, 1991; Klumpp et al., 1995a). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, daß Kv1.3 im gesamten Bereich der Zapfen vertreten ist. Die Studien zuvor zeigten lediglich, daß Kv1.3 im Bereich der Außensegmente auftritt, jedoch war keine Kv1.3 mRNA in fraktionierten Zapfen nachweisbar, was zu der Annahme führte, daß Kv1.3 in den apikalen Bereichen von retinalen

Pigmentepithelzellen vertreten sein müsse (Klumpp et al., 1995b; Pinto und Klumpp, 1998). In den Retinae adulter Tiere konnten auch Zellen im Bereich des unteren Randes der äußeren Körnerschicht, der Bereich in welchem sich auch die Zellkörper der Zapfen finden, nachgewiesen werden (Carter-Dawson und La Vail, 1979; Wässle und Boycott, 1991). Das Auftreten von Kv1.3 im gesamten Bereich der Zapfen, angefangen von Zellkörper über Innen- und auch Außensegment, deuten auf eine mögliche Rolle beim Farbsehen hin. Die hier beschriebene Verteilung von Kv1.3 stimmt mit der vorhergehenden Studie überein, in welcher Kv1.3 mRNA in der Ganglienzellschicht sowie in der inneren und äußeren Körnerschicht nachgewiesen wurde (Pinto und Klump, 1998).

Bei der Untersuchung von Kv1.4 fiel folgende Besonderheit auf: In der Retina adulter Ratten zeigte der Bereich zwischen dem Innensegment und dem Kinoziliensegment der Photorezeptoren einen klaren, immungefärbten Streifen. Diesem Streifen kann vor folgendem Hintergrund eventuell eine spezielle Funktion zugeordnet werden: In den Stäbchen zirkuliert bei Dunkelheit ein permanenter Strom. Es handelt sich dabei um Ströme durch cGMP vermittelte Natrium/Kalzium Kanäle ins Außensegment und durch Kaliumkanäle aus dem Innensegment (Jindrová, 1998). Die Verbindung zwischen Innensegment und Außensegment wird durch das Kinoziliensegment bewerkstelligt. Die Konzentration von Kv1.4 an dieser speziellen Mikrodomäne, legt die Vermutung nahe, daß Kv1.4 an der Regulation von elektrischer Signalübermittlung in den Stäbchen maßgeblich beteiligt ist, weil das Öffnen oder Schließen dieser Kanäle die Reizweiterleitung vom Außensegment ins Innensegment modellieren könnte.

Die Expression von Kv1.4 und SAP97 in der adulten Retina ist identisch. Beide sind im Innensegment, nahe dem Kinoziliensegment lokalisiert. SAP90/PSD95 zeigte ein ganz anderes Verteilungsmuster. SAP97 und SAP90/PSD95 sind Mitglieder der MAGUK-Familie (membran-associated guanylate kinase proteins). Diese Proteine sind sehr wichtig für die molekulare Organisation von Synapsen, insbesondere für die Lokalisation und Funktion von Glutamat-Rezeptoren und Kaliumkanälen (Horio et al., 1997; Fujita und Kurachi, 2000; Wong und Schlichter, 2004). Von den MAGUK-Proteinen ist bekannt, daß sie direkt an Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.4 binden. Die Koexpression von Kv1.4 und SAP90 führt zu einer Clusterung der Kanäle an der Plasmamembran, wohingegen die Koexpression mit SAP97 zu einer Ansammlung intrazellulärer Aggregate in den großen ER-hergeleiteten, intrazellulären Membranvesikeln führt (Kim und Sheng, 1996; Topinka und Bredt, 1998; Burke et al.,

1999; Tiffany et al., 2000). Bei SAP90 wird angenommen, daß es die Kv1-Kanäle an den für sie vorgesehenen Stellen an der Membran verankert, während SAP97 ein Inhibitor der Kv1-Kanal-Oberflächenexpression ist. Die Ähnlichkeit der SAP97 und der Kv1.4 Verteilungsmuster läßt vermuten, daß Kv1.4 intrazellulär im Bereich des Kinoziliensegments angesammelt wird. Wenn benötigt, könnte Kv1.4 dann zur Plasmamembran transportiert werden. Wahrscheinlich ermöglicht die Expression, sowie die hochgradig regulierte Verteilung von Kv1.4 nahe dem Kinoziliensegment die Modulation des oben beschriebenen Dunkelstroms, da das Öffnen oder Schließen dieser Kanäle den Strom vom Außen- ins Innensegment modulieren könnte. In vorangegangenen Studien konnte festgestellt werden, daß die bevorzugte Lokalisation von Kv1.4-Untereinheiten an verschiedenen Bereichen von Plasmamembranen, vor allem an Dendriten, in hippocampalen Neuronen, sowie in Neuronen des Nucleus cochlearis dorsalis, darauf hinweisen, daß sie die Transmitterfreisetzung mit modulieren (Cooper et al., 1998; Juiz et al., 2000).

Das hier vorliegenden Ergebnis zum Verteilungsmuster von SAP90/PSD95 in der Retina der Ratte stimmt mit vorangegangenen Studien überein, welche in der adulten Retina dieses Protein in der inneren und äußeren plexiformen Schicht nachweisen konnten (Koulen, 1999).

### **5.3 Abschließende Überlegungen**

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier vorliegenden Ergebnisse die Idee stützen, daß neuronale Subpopulationen die verschiedenen Kv-Untereinheiten mit einem individuellen subzellulären Verteilungsmuster exprimieren. Das Verteilungsmuster verändert sich im Laufe der postnatalen Entwicklung. Wahrscheinlich dienen sie der funktionellen Variabilität und helfen beim Aufbau und der Reifung der retinalen Verschaltung, sowie der retinalen Feinabstimmung und Projektion.

Mutationen in Genen von Ionenkanälen verursachen eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen. Heute sind Hunderte von Genmutationen bekannt, die für eine Vielzahl von Nerven- und Muskelkrankheiten verantwortlich sind. Dazu gehören Formen von Epilepsie (Singh et al., 1998, Charlier et al., 1998, Biervert et al., 1998), Migräne (Ophoff et al., 1996) und Taubheit (Kubisch et al., 1999), um nur einige Beispiele zu nennen.

Veränderungen dieser Gene, bzw. deren Genprodukte, beeinträchtigen das Membranpotential und die Erregbarkeit der Zelle. Mutationen, die die Aktivität von Kaliumkanälen in Nervenfasern vermindern, führen zur verzögerten Repolarisation. Gleichzeitig vermindern sie die Erregbarkeit und die Anzahl der Aktionspotentiale. Fortschritte in der Elektrophysiologie, Biologie, Neuroanatomie und Genetik erweitern unser Wissen über die Funktion von Ionenkanälen auf molekularer und zellulärer Ebene. Diese Erkenntnisse sollen helfen zu verstehen, wie Mutationen von Ionenkanalgenen bestimmte neurologische Symptome verursachen, was wiederum einen Ansatz zur Therapie bieten kann.

Die Erforschung der Funktion von Ionenkanälen und der Auswirkung von Genmutationen stellt eine Herausforderung für zukünftige wissenschaftliche Arbeiten dar.