

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **Tiere**

Die verwendeten Tiere, Ratten der Wistar-Zucht und black-six P57-Mäuse, wurden in sämtlichen Versuchen gemäß den Vorschriften des Tierschutzgesetzes behandelt und keinen unnötigen Leiden ausgesetzt. Projektnummern: T 0055/00 für die entorhinale Cortexläsion und G 0155/00 für die Lebendentnahme von Gewebe (verantwortlich: Prof. Dr. med. I. Bechmann).

### **Antikörper**

Die Antikörper wurden von der Migragen AG, Tübingen, geliefert und dort hergestellt wie beschrieben (Monnier et al., 2000). Im Folgenden werden die Versuche und Ergebnisse der Immunhistochemie unter Verwendung von drei Antikörpern beschrieben. Es handelt sich hierbei um den Antikörper C2 (Nomenklatur je nach rabbit und Peptididentität) gegen Peptid EPO11333, identisch mit Maus-RGM Peptiden 256 – 271, A1 gegen Maus-RGM Peptide 45 – 59, sowie F1 gegen chick-RGM Peptide 319 – 332. Für die Funktionsverlustexperimente wurde ein funktioneller Antikörper P1, der gegen die chick-RGM-Peptide 195-349 gerichtet war, gebraucht.

Sämtlichen Antikörpern wurde ihre Spezifität mittels western blot nachgewiesen. Alle Antikörper wurden einer Purifikation mittels Protein-G-Agarosesäule unterzogen und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

### **2.1 Immunhistochemie**

P57-Mäuse und Ratten der Wistar Zucht wurden im postnatalen Stadium E16.5, E18.5, P1 und P7 mit einem Gemisch aus 25mg/ml Ketamin und 1,2 mg/ml Rompun gewichtsadaptiert anästhesiert und mit 4%iger Paraformaldehydlösung bei pH 7,4 transkardial perfundiert. In derselben Lösung wurden die Hirne über Nacht nachfixiert und mittels Vibratom (Series 1000, Technical Products Int.) coronale Schnitte von 70µm Dicke angefertigt und in 0,1M Phosphatpuffer (PB) gewaschen. Darauf wurden die Schnitte 5 Minuten mit 0,02%iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um die endogenen Peroxidasen zu blockieren und 30 Minuten mit 0,2%igem Triton X-100 in PB behandelt, sowie unspezifische Bindungen mit 10% normal goat serum (NGS, Linaris, Wertheim) blockiert.

Danach wurden die Schnitte über mindestens 12 Stunden mit dem Anti-RGMA Antikörper C2 im Verhältnis 1:500 in PB, 0,1% Triton X-100 und 1% NGS bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PB wurde der sekundäre Antikörper, biotinyliertes Anti-rabbit IgG (Linaris, Wertheim), 1:250 verdünnt, zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden nach erneutem Waschen in ABC-Lösung (Elite ABC Kit, Linaris, Wertheim) für 2 Stunden überführt, anschließend gewaschen und mit 0,7%iger Diaminobenzidin (3',4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid)-Lösung (DAB, Sigma, Deisenhofen) in PBS und 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter optischer Kontrolle gefärbt. Anschließend wurde die Färbereaktion durch Waschungen gestoppt und die Schnitte auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen. Nach Dehydration mittels aufsteigender Alkoholkonzentrationsreihe (60%, 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol) und Equilibrierung in Xylol wurden die Präparate mit Entellan (Merck) bedeckelt. Für die digitale Photographie wurde eine Magnafire Digitalkamera (Intas, Göttingen) verwendet.

## **2.2 Zellkultur**

Für die Zellkulturexperimente wurden zum einen stabile Zellreihen sowie frisch hergestellte Astrozytenkulturen (Herstellung siehe unten) aus P0 Maushirnen verwendet. Bei den Zellreihen handelte es sich um hippocampale Neurone HT-22 (Schubert et al., 1974) und Mikrogliazellen BV-2 (Blasi et al., 1990; Bocchini et al., 1992). Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in Labors der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

Herstellung der Astrozytenkulturen: Die primären Astrozyten wurden aus P57 black-six Mäusen (Züchtung im Tierstall des Instituts für Anatomie, CCM, Berlin) unter Verwendung eines abgewandelten Protokolls nach Drejer gewonnen (Drejer et al., 1982). Zunächst wurden neugeborene Mäuse dekapitiert und die Hirne in gekühltem HBSS-Medium (Seromed/Biochrome, Berlin) aufbewahrt. Stammhirn und Cerebellum wurde abgetrennt, sowie möglichst vollständig die gesamten Hirnhäute entfernt. Das Dissoziieren der Einzelzellen erfolgte zunächst mechanisch, indem das Gewebe durch G21-Kanülen geschoben wurde, und anschliessend enzymatisch, indem das Gewebe 5 Minuten mit 1% Trypsin (Boehringer, Mannheim) und 0,05% DNase (Worthington, Lakewood, USA) inkubiert wurde. Nach Zugabe von Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM,

Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) wurde die Suspension 10 Minuten bei 4°C mit 960 Umdrehungen pro Minute (rpm, rotations per minute) zentrifugiert, das Pellet in neuem Medium resuspendiert und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Die Pellets wurden danach in 5 ml Kulturmedium (DMEM mit 50U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin (beides Seromed/Biochrome, Berlin) und 0,1 ml/ml FCS (Fetal Calf Serum, Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) aufgenommen und in Microtiterplatten mit Poly-L-Lysin (PLL, Sigma, Deisenhofen) beschichteten Kunststoffplättchen oder Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) unter Standardbedingungen (37°C, 10% CO<sub>2</sub>) kultiviert. An jedem 2. Tag wurden für eine Woche die Mikrogliazellen durch sehr leichtes Schütteln abgelöst und konnten mit dem Medium beim Wechsel entfernt werden, so dass die Astrozyten, die auf dem Boden der Flaschen und Plättchen wachsen und sich nicht ablösen lassen, selektiert wurden. Nach ca. 7 Tagen entstanden so primäre Astrozytenkulturen, die dann wie die Zellreihen immunhistochemisch gefärbt wurden.

Fluoreszenzfärbungen: Die Zellreihen wurden kultiviert, bis sie eine konfluierende Schicht bildeten, dann mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und immunhistologisch wie oben beschrieben mit RGMA-Antikörper in verschiedenen Verdünnungen (1:250, 1:500 und 1:1000) und jeweils einem Antikörper, der spezifisch die kultivierten Zellen anfärbt, inkubiert. Für Astrozyten war das ein anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein)-Antikörper aus Maus (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) im Verhältnis 1:500 in PBS, für Neurone ein anti-Neurofilament-Antikörper (Boehringer, Mannheim) 1:500 verdünnt, für die mikrogliale Zellreihe der anti-Mikroglia-Ak IB-4 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Die Präparate wurden auf einem Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie drei Mal gewaschen und mit sekundärem, fluoreszierendem Antikörper anti-rabbit-TRITC und anti-mouse-FITC (beide Linaris Biologische Produkte, Wertheim) für mindestens 2 Stunden auf einem Schüttler inkubiert und nach drei Waschungen in Immunomount eingedeckelt. Die Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot, Oberkochen), das mit Filtereinsätzen zur Detektion von Fluoreszein-iso-thiocyanat (FITC) und TRITC ausgerüstet war, mit einer Magnafire Digitalkamera (Intas, Göttingen) photographiert.

## 2.3 In situ Hybridisierung

Mittels in-situ-Hybridisierung kann die Expression von mRNA in der Zelle nachgewiesen werden, indem spezifische Sonden gebraucht werden, die das Gegenstück zur Aminosäuresequenz des gesuchten Moleküls darstellen. Nach der Inkubation auf einem Gewebeschnitt kann die Sonde dann durch eine Farbreaktion oder durch Markierung mit einem Radionuklid sichtbar gemacht werden. In diesem Fall wurden Digoxigenin-markierte Sonden eingesetzt, die dann in einer Reaktion mit alkalischer Phosphatase durch eine violett-bläuliche Färbung zu erkennen sind.

Herstellung der Sonden: Für die Hybridisation wurden Digoxigenin (Dig)-markierte antisense-Sonden verwendet, die mit den Nukleotiden 245 bis 629 der RGMa cDNA korrespondieren, sowie zur Kontrolle eine sense-Sonde. Zur Herstellung der Sonde für RGMa wurde Lokus Link (244058) sowie das Fragment HincII (1158) - Pvu (1783) in ein Plasmid kloniert und verwendet.

Präparation der Schnitte und Hybridisierung: Die Hirne von Tieren im pränatalen Entwicklungsstadium E16.5, E18.5, P0 und P7 wurden nach den Entnahmen direkt in O.C.T. (Tissue Tek) gefroren und Gefrierschnitte von 20µm angefertigt. Die einzelnen Schritte der in-situ-Hybridisation wurden mittels eines automatisierten Verfahrens unter Verwendung eines Roboters (Tecan®, Gene Paint, Hannover, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte hierbei einer Andauungsreaktion mit Proteinase K unterzogen, woraufhin sie mit Paraformaldehyd fixiert wurden. Nach einem Schritt der Prähybridisierung wurde die Hybridisierung mit den wie oben beschrieben hergestellten Sonden durchgeführt. Darauf folgende Waschungen gingen einer Inkubation mit dem an Peroxidase gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper voraus. Einer Amplifizierungsreaktion mit einem Tyramin-Biotin-Reagenz folgte schliesslich die Detektion des Biotins durch alkalische Phosphatase. Die colorimetrische Detektion der Phosphatase ist durch Verwendung eines BCIP/NBT-Reagenz möglich. Die detaillierte Beschreibung der Entwicklung und Durchführung dieses Verfahrens ist 2001 von Herzig erfolgt (Herzig et al., 2001). Diese Versuchsreihe wurde durch die freundliche Unterstützung von Frau Judith Oldekamp, MPI für experimentelle Endokrinologie, Hannover, erstellt.

## 2.4 Bindungsstudien

Die Affinität von Gewebe zu RGMa-Protein wurde anhand eines Fusionsprodukts aus an RGMa gekoppelter alkalischer Phosphatase sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck wurde die extrazelluläre Domäne von RGMa mit hitzestabiler humaner placentarer alkalischer Phosphatase (Genhunter, Nashville, USA) fusioniert. Die Expression von Bindungspartnern wurde auf gefriereschnittenen, 20µm dicken Schnitten von postnatalen Maushirnen im Stadium P1 detektiert. Diese wurden 5 Minuten in -80°C kaltem Methanol fixiert, anschließend in PBS rehydriert und in HBSS-Medium (Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> Zusatz 5 Minuten equilibriert, wonach sie noch 2 Stunden in HBSS inkubiert wurden, welches mit 20% FCS (Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) angereichert worden war. Anschließend wurden die Schnitte mit dem gleichen Medium, jedoch unter Zusatz des Fusionsproteins im Verhältnis 1:500, für 90 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Nach einer Waschung in HBSS wurden drei Waschschrte mit TBS-Puffer (20mM Tris-HCl, 125mM NaCl, pH 7,5) jeweils 5 Minuten durchgeführt und die Schnitte danach erneut in PBS equilibriert. Die Fixierung wurde 5 Minuten mit 3,7%igem Paraformaldehyd durchgeführt, wonach mit PBS gewaschen und die endogenen Phosphatasen über 50 Minuten bei 65°C im Wasserbad hitzeinaktiviert wurden. Erneutes equilibrieren in AP-Puffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) ermöglicht ein Visualisieren des gebundenen Fusionsproteins mittels einer Färbelösung, die 34mg/ml Nitro-blau-Tetrazolin und 18mg/ml 5-bromo-4-chloro-Indolylphosphat enthält (Boehringer, Mannheim). Die Spezifität der Färbung wurde durch Kontrollen, denen ein Überschuss an unfusioniertem RGMa-Protein zugefügt worden war, überprüft. Durch diesen Zusatz konnte jegliche Färbung aufgehoben werden. Die Versuche und Ergebnisse sind in Kollaboration mit Dr. Lutz Deitinghoff, Migragen AG, Tübingen entstanden.

## 2.5 Streifenassay

Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ana Sierra, Migragen AG, Tübingen, nach einem leicht modifizierten Protokoll, wie von der Arbeitsgruppe von Prof. T. Bonhoeffer, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen, beschrieben, durchgeführt (Walter et al., 1987, 1990).

Präparation der Explantate: Zur Gewinnung von hippocampalen und entorhinalen

Explantaten im Entwicklungsstadium E18 wurden tragende Wistar Ratten mit Ketamin/Rompun-Gemisch anästhesiert und die Embryos jeweils zur Präparation einzeln entnommen und dekapitiert. Aus den Hirnen wurden in 4°C kalten HBSS-Medium (Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) unter einem Durchsicht-Mikroskop bei 4-facher Vergrößerung die Hippocampi mit entorhinalen Cortex herauspräpariert. Anschließend wurden mit Tungsten-Nadeln und 20mm Skalpellklingen die Hippocampusformation vom entorhinalen Cortex getrennt und pro Hirnhälfte jeweils etwa 10 Explantate gewonnen, die dann auf den Membranen für die Streifenassays plaziert wurden (Abb.5).

Präparation der Zellmembranen: Die Zellwandsuspensionen wurden unter sterilen Bedingungen aus stabil mit RGMA transfizierten human embryonic kidney(HEK 293)-Zellen (dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Migragen AG, Tübingen) gewonnen, sowie aus "mock"-transfizierten HEK 293-Zellen, die nur das Vektorplasmid enthielten. Alle verwendeten Medien wurden mit Proteaseinhibitoren (Protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) versetzt und bei 4°C und pH 7,4 verwendet. Die Zellen wurden in Trispuffer (10mM Tris-HCl, 1,5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM Spermidine, pH 7,4) homogenisiert, indem die Zellen über 10 Mal durch 27G Injektionsnadeln gepresst wurden. Anschließend wurde das Homogenat abzentrifugiert und in Zentrifugationstubes (Beckman-Coulter Ultra-clear tubes) über einem Stufengradienten aus 50% und 5% Sucrose plaziert. Nach zehnteiliger Zentrifugation mit 28000 rpm (100.000 g) bei 4°C in einem schwingenden Rotor (TLS 55, Beckman Instruments, Fullerton, USA) finden sich nur die Membranfragmente in der Interphase zwischen der 5%igen und 50%igen Sucrose, während die restlichen Zelltrümmer als Pellet am Boden der tubes lagen. Nach mehrfachem Waschen mit Trispuffer wurden die Membransuspensionen auf eine optische Dichte von 0,1 bei 220 nm Lichtwellenlänge verdünnt und jeweils eine Hälfte mit rot fluoreszierendem Farbstoff (red-fluorescent beads, Molecular Probes, USA) markiert.

Anfertigung der Streifen: PVP-Membranen (Nucleoporefilter #113605, Coster, Göttingen) wurden zuerst mit 20µg Laminin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) pro ml HBSS-Medium (Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) beschichtet und darauf abwechselnd Streifen von mit roten "beads" markierter RGMA- und nicht-markierter "mock"-transfizierter Zellmembransuspension mittels Unterdruck

festgesaugt. Hierzu wurden die Membranen auf speziell hergestellte Streifenmatrizen (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) gelegt, mit fluoreszenzmarkierter Zellmembransuspension beträufelt und über zwei Minuten einem kontinuierlichen Unterdruck von 800mbar ausgesetzt, wonach die überschüssige Suspension mehrfach mit PBS abgewaschen wurde. Derselbe Vorgang wurde dann mit der gleichen PVP-Membran, aber unter Verwendung einer Matrize ohne Streifen wiederholt, wobei diesmal nicht markierte Zellmembransuspension verwendet wurde, sodaß ein Rasen aus abwechselnd markierten Streifen entstand, die entweder nebeneinander RGM- und mock-transfizierte Zellmembranen enthielten oder als Kontrollen markierte mock-transfizierte Streifen neben nicht-markierten mock-transfizierten Zellmembranen. Zur Bebrütung wurden die Membranen in Zellkultureinsätze mit 0,4µm grossen Poren (Millicell-CM, Millipore, USA) gelegt und auf 2ml Nährmedium plaziert. Als Nährlösung wurde Neurobasalmedium (Invitrogen) verwendet und 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 10% hitzeinaktiviertes Kälberserum und 4% B27 supplement (Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) zugegeben. Alle zwei Tage fand ein Mediumwechsel statt, bei dem auch das Wachstum der Neuriten evaluiert wurde. Entsprechend wurden am Tag 5 bis 7 der Bebrütung die Explantate mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert.

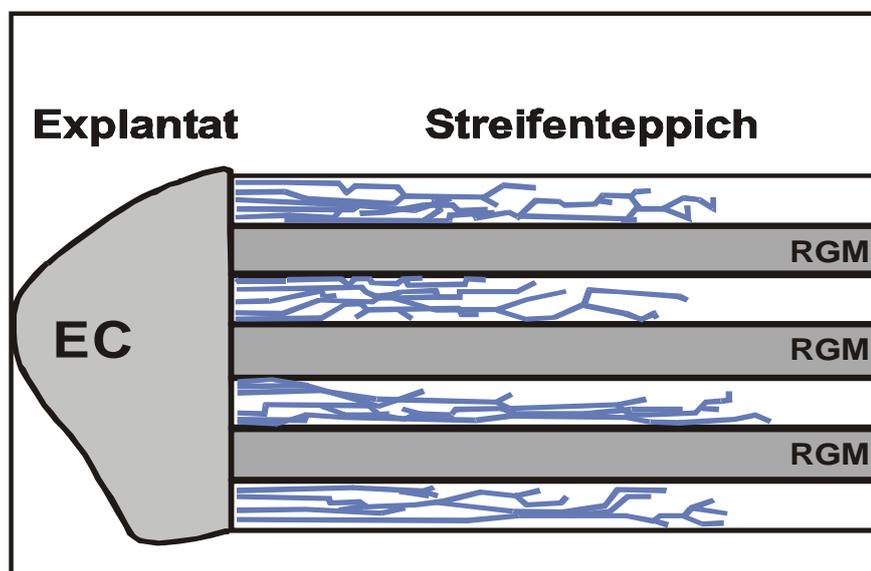


Abb. 5: Schematische Darstellung des Streifenassays. EC: Explantat aus entorhinalen Cortex, RGM: mit RGMA-Protein beschichteter Streifen.

Analyse des Auswachsverhaltens: Die von den Explantaten ausgehenden Neuriten wurden mittels Immunhistochemie, wie oben beschrieben, unter

Verwendung eines Neurofilament-Antikörpers (Boehringer Mannheim) sichtbar gemacht. Die Streifenteppiche wurden auf Objektträgern plaziert, in Immunomount eingedeckelt und konnten dann mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot) ausgewertet und mit einer Magnafire Digitalkamera (Intas, Göttingen) fotografiert werden.

Das Auswachsverhalten wurde in ein Drei-Klassen-System eingeteilt und von unabhängigen Untersuchern verblindet evaluiert: Die Neuriten zeigten entweder klare Präferenz (1), und wuchsen somit auf nur einer Art von Streifen, oder teilweise Präferenz (2), wobei einige Neuriten Präferenz zeigten, andere jedoch nicht. Die Neuriten, die keine Präferenz (3) zeigten, wuchsen ohne Zeichen der Beeinflussung quer über die Streifen hinweg.

## **2.6 Auswachsassay**

Auf einem "monolayer" von HEK293-Zellen (bereitgestellt von Migragen AG, Tübingen), die entweder stabil mit RGMa oder nur mit dem Vektor transfiziert worden waren, wurden entorhinale Explantate (Präparation wie unter 2.5) kultiviert. Hierzu wurden die Zellen in Multiwellplatten bis zu einem konfluenten Wachstum kultiviert und anschließend die Explantate daraufgegeben. Eine Gruppe von Explantaten wurde als Kontrolle nicht behandelt. Die restlichen Versuchsansätze wurden in zwei Gruppen eingeteilt, von denen die eine mit PI-PLC (Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) behandelt wurde, die GPI-Anker spaltet, um RGMa aus den Zellmembranen herauszulösen und die Wirkung zu unterbinden. Die zweite Gruppe wurde mit dem funktionell RGMa-blockierenden Antikörper P1 (3µg/ml Medium) behandelt. Die Kulturen wurden in Neurobasalmedium (Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein) mit Zusätzen wie unter 2.5 beschrieben unter Standardbedingungen 5 bis 7 Tage im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5,5% inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen fixiert (Fixativ wie unter 2.1 beschrieben) und die ausgewachsenen Neuriten mit einem β-Tubulin III-Antikörper (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) markiert, sowie mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper, anti-Rabbit-TRITC (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), sichtbar gemacht (Immunfärbung wie unter 2.2 beschrieben). Die Zellunterlage wurde mittels Sytox-green (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gegengefärbt. Das Auswachsverhalten wurde semiquantitativ von drei unabhängigen Untersuchern ausgewertet, wobei das

Kriterium die Dichte, Länge und Morphologie der auswachsenden Neuriten war. Die Auswertung und Fotografie der Präparate erfolgte mittels Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) inklusive Filtereinsätzen für die Fluoreszenzmikroskopie (U-MNIBA bzw. U-MWIG) und einer digitalen Fotokamera (Intas, Göttingen). Die Ergebnisse sind durch freundliche Unterstützung von Frau Sabine Conrad entstanden.

## **2.7 Entorhino-hippocampale Co-Kulturen**

Protokoll, Versuchsaufbau und Auswertung in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Bernd Heimrich, Institut für Anatomie, Universität Freiburg.

Präparation der organotypischen Schnitte: Hippocampus und entorhinaler Cortex wurden aus Hirnen von P57 black six-Mäusen im Stadium P0 präpariert, von den Hirnhäuten befreit und mit einem tissue chopper in 350µm dünne, sagittale "slices" geschnitten. Diese wurden auf porösen Membranen (Millicell, Millipore Corporation, Bedford, USA) sieben Tage lang über Neurobasalmedium (Zusätze wie unter 2.5 beschrieben), bei 37°C, im Brutschrank inkubiert.

Co-Kulturassay: Während der gesamten Bebrütungszeit wurden die Co-Kulturen entweder mit einem funktionellen RGMa-Antikörper (1µg/ml) oder mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC, Sigma-Aldrich) in zwei verschiedenen Konzentrationen, entweder 5 oder 10 Units pro Milliliter, behandelt. Der blockierende Antikörper wurde in Kaninchen gegen die RGMa Peptidsequenz 195 bis 349 generiert und durch eine Protein G-Agarosesäule purifiziert (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Behandlung der Explantate beinhaltete den zweitägigen Wechsel des Mediums, sowie das Beträufeln der Kulturen mit den jeweiligen Substanzen und intermittierend langsames Schwenken. Die Kontrollen wurden mit Medium ohne Zusatz behandelt. Nach Zugabe des tracers Biocytin am Tag 7 wurden die Kulturen noch 24 bis 36 Stunden inkubiert um den anterograden Transport des Tracers zu gewährleisten, und dann fixiert. Hierzu wurde ein Fixativ mit 4% Paraformaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd und 15% gesättigter Picrinsäure in PBS bei pH 7,4 verwendet.

Analyse der entorhino-hippocampalen Projektion: Die Co-Kulturen wurden in Gelatine eingegossen und mittels Vibratom 50µm dünn geschnitten und zunächst

der Biocytin-tracer immunhistologisch unter Verwendung des ABC-Systems (ABC-Elite Complex, Vector Laboratories) sichtbar gemacht. Hierbei wurde eine Nickel-Cobalt intensivierte DAB-Färbung durchgeführt (Schwab et al., 2000). Die Schnitte wurden danach mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt und in aufsteigender Alkoholkonzentrationsreihe dehydriert und in Einbettmedium (Entellan, Merck, Deutschland) eingedeckelt. Es wurde eine verblindete semiquantitative Analyse von drei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, die die entorhino-hippocampale Projektion auf Intaktheit der Schichtenspezifität untersuchten. Kriterium war die Terminierung des Tractus perforans in der äußeren Molekularschicht, die entweder vollständig spezifisch war (+ +), einige aberrante Fasern (- +) oder einen vollständigen Verlust der schichtenspezifischen Terminierung (- -) zeigte.

## **2.8 Entorhinale Cortexläsion**

Stereotaktische Operation: Es wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ungefähr 300 Gramm verwendet. Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus 20% Ketamin (CuraMed GmbH, Karlsruhe) und 8% Rompun (Bayer Vital GmbH, Frankfurt, Deutschland) in 0,9% NaCl anästhesiert und in den stereotaktischen Apparat (Kopf Instruments, Tujunga, USA) eingespannt. Nach einer Längsinzision der Kopfhaut und Freipräparieren der Kalotte wurde ein 2mm breites Messer lotrecht auf den Punkt  $\lambda$  eingestellt und von dort ausgehend die Koordinaten 1,2mm nach rostral und 0,3mm nach links lateral aufgesucht. An dieser Stelle wurde ein längliches Loch in die Kalotte gebohrt und die Läsion mit einer 2mm breiten Klinge bis zum Felsenbein durchgehend gesetzt. Die dadurch entstehende Läsion durchtrennt den Tractus perforans knapp unterhalb der Fissura hippocampi. Anschließend wurde nach kurzer Blutstillung die Kopfhaut vernäht und die Tiere bis zum Ende der Narkose überwacht.

Die Tiere wurden 2, 4, 10, 30 und 90 Tage nach Läsion (dpl, days post lesion) erneut anästhesiert und transkardial mit 4% Paraformaldehyd perfundiert. Als Kontrollen dienten scheinoperierte Tiere, bei denen bis auf die eigentliche Läsion die Operation in gleicher Weise durchgeführt wurde sowie gänzlich unversehrte Tiere. Die im Ganzen entnommenen Hirne wurden noch 24 Stunden postfixiert. Die Immunhistologie wurde mit den Antikörpern C2 und A1 wie unter 2.1 beschrieben durchgeführt.