

### 3.2.8. Immunhistologische Untersuchungen zur Verteilung von mNTRA nach entorhinaler Kortexläsion

Die partielle Deafferenzierung des Hippokampus durch unilaterale Läsion des entorhinalen Kortex ist ein weit verbreitetes und etabliertes Modell zur Untersuchung degenerativer und regenerativer Prozesse im ZNS (Matthews et al., 1976; Frotscher et al., 1997; Kelley und Steward, 1997; Savaskan und Nitsch, 2001). Diese Läsion führt zur Degeneration des entorhino-hippokampalen Fasertrakts (Tractus perforans), der in die mittlere und äußere Molekularschicht (oml) des ipsilateralen Gyrus dentatus (DG), sowie ins Stratum lacunosum-moleculare (sml) projiziert (Amaral und Witter; 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von mNTRA nach Läsion zu verschiedenen Zeitpunkten mittels immunhistologischer Färbungen mit Antikörpern gegen mNTRA untersucht. Weiterhin wurde eine Quantifizierung der Regulation mittels Western Blot durchgeführt.

Im Hippokampus von P11 Mäusen wird mNTRA in den CA1 – CA3 Regionen exprimiert, jedoch nicht im Gyrus dentatus (s. Abb. 19). Hier wurde zunächst die Verteilung von mNTRA im adulten Hippokampus mit Antikörpern gegen mNTRA untersucht. Eine Expression von mNTRA wurde in den Regionen CA3 und CA2 beobachtet. Dagegen wird nur eine sehr schwache bzw. keine Expression in der CA1-Region und dem Gyrus dentatus (DG) festgestellt (Abb. 28).

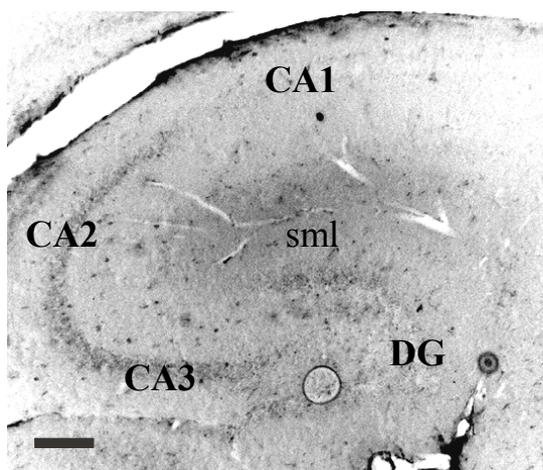


Abbildung 28: Expression von mNTRA im Hippokampus der adulten Maus. Kryostatenschnitte wurden mit Antikörpern gegen mNTRA gefärbt. Die Expression von mNTRA wird vorrangig in den Regionen CA3 und CA2 beobachtet. Der Balken entspricht 50 µm.

Als nächstes wurden Mäuse untersucht, bei denen der Tractus perforans einseitig durchtrennt wurde. Hierzu wurden die Tiere zwei Tage nach der Läsion (2 dal), 5 dal und 16 dal perfundiert, dekaptiert und die Gehirne präpariert. Nach Anfertigung von Kryostatschnitten wurden diese mit Antikörpern gegen mNTRA gefärbt. Im ipsilateral zur Läsion gelegenen Hippokampus wurde 2 dal keine Veränderung der Verteilung von mNTRA im Vergleich zu unlädierten Kontrolltieren festgestellt (Abb. 28 + 29A). Dagegen wird 5 dal eine deutliche Regulation der Expression von mNTRA im ipsilateralen zur Läsion gelegenen Hippokampus beobachtet. Neben einer Zunahme in den Regionen CA1 - CA3, wird eine Expression von mNTRA im Gyrus dentatus, im Hilus, im Stratum lacunosum moleculare (sml) und im entorhinalen Kortex festgestellt. Dabei fällt insbesondere die schichtenspezifische Expression in der äußeren Molekularschicht (oml) im Gyrus dentatus auf (Abb. 29C, Pfeil). Vergleicht man hierzu die Färbung des kontralateral zur Läsion liegenden Hippokampus, wird dort ebenfalls eine verstärkte Expression in Körnerzellen des Gyrus dentatus beobachtet. Es werden aber keine Zellen in den Molekularschichten angefärbt (Abb. 29E, Pfeil). Die anderen Regionen, die auf der ipsilateral zur Läsion gelegenen Seite eine Expression von mNTRA aufwiesen, zeigten keine Veränderung auf der kontralateralen Seite. 16 dal nimmt die Expression von mNTRA wieder ab, es wird aber immer noch in Regionen detektiert, die im kontralateralen Hippokampus und in Kontrolltieren keine Färbung aufweisen (Abb. 29F). Diese Ergebnisse belegen eine Hochregulation von mNTRA in verschiedenen hippokampalen Regionen nach unilateraler Kortexläsion.

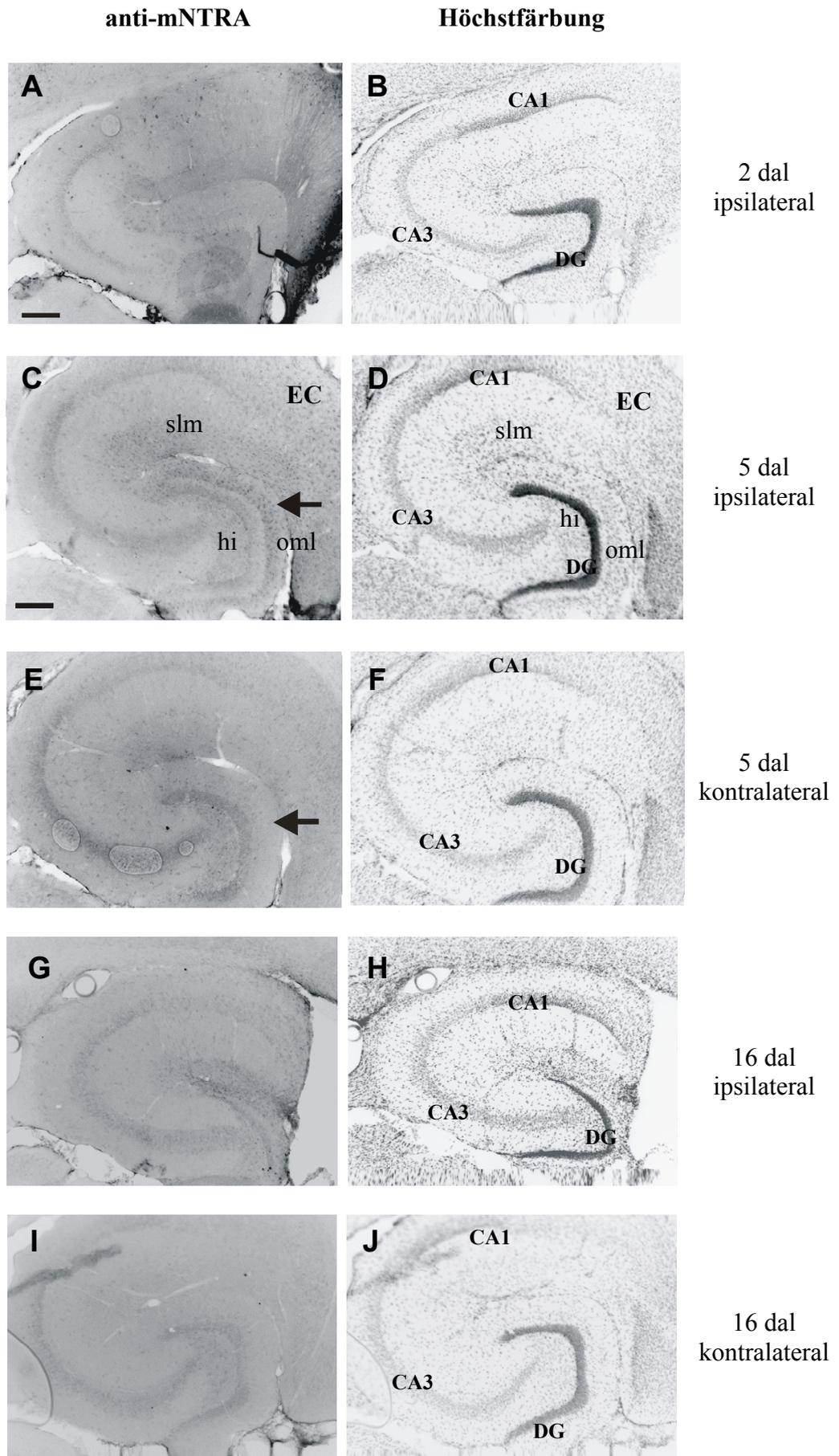
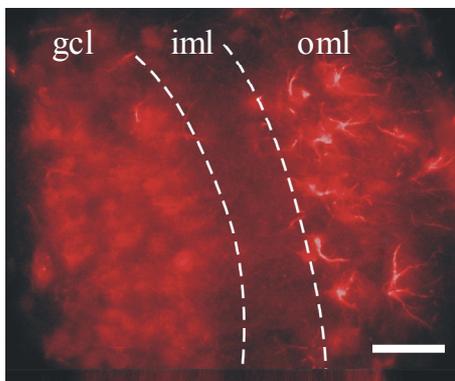


Abbildung 29: Zeitliche und räumliche Verteilung von mNTRA nach Läsion des entorhinalen Kortex. Die Expression von mNTRA wurde in adulten Mäusen mittels Immunhistologie mit Antiseren gegen mNTRA untersucht. Dabei wurden mit den Antiseren rb50 (VD 1:200) und rb51 (VD 1:800) die gleichen Resultate erzielt. In der linken Spalte sind invertierte Färbungen gegen mNTRA verschiedener Stadien nach Läsion dargestellt. Die jeweiligen Schnitte wurden zur besseren Orientierung einer Höchstfärbung unterzogen (rechte Spalte). A) 2 dal.: Es wurden keine Unterschiede in der Verteilung von mNTRA im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt. B) 2 dal, Höchstfärbung ipsilateral zur Läsionsseite. C) 5 dal, ipsilateral zur Läsionsseite: Eine deutliche Expression von mNTRA wurde in verschiedenen Regionen des Hippokampus und im entorhinalen Kortex beobachtet. D) 5dal, Höchstfärbung ipsilateral zur Läsionsseite. E) 5 dal, kontralateral zur Läsionsseite: mNTRA wird verstärkt im kontralateralen Gyrus dentatus und den Regionen CA1 – CA3 detektiert. F) 5 dal, Höchstfärbung kontralateral zur Läsionsseite. G) 16 dal, ipsilateral zur Läsionsseite. Die Expression von mNTRA nimmt in allen Regionen des Hippokampus leicht ab. H) 16 dal, Höchstfärbung ipsilateral zur Läsionsseite. I) 16 dal, kontralateral zur Läsionsseite. J) Höchstfärbung 16 dal kontralateral zur Läsionsseite. Die Expression von mNTRA nimmt in allen Regionen des Hippokampus ab. (CA1 - 3 = Cornus ammonis Regionen 1 - 3; DG = Gyrus dentatus; sml = Stratum moleculare Lacunosum; oml = äußere Molekularschicht; hi = hilus; EC = entorhinaler Kortex). Balken 50 µm.

Die immunhistologische Untersuchung zeigt eine läsions-induzierte Expression von mNTRA 5 dal – 16 dal in der äußeren Molekularschicht des ipsilateral zur Läsion liegenden Gyrus dentatus. Diese Schicht ist durch die Läsion am stärksten betroffen, was durch den Verlust von ca. 90 % der Synapsen in dieser Region dokumentiert wurde (Matthews et al., 1976). Eine Folge der degenerativen Prozesse in diesem Tiermodell ist die Aktivierung von Astrozyten, die als sogenannte reaktive Astrozyten in die denervierte Region einwandern (Savaskan und Nitsch, 2001). Die Ausschnittsvergrößerung des Gyrus dentatus in Abbildung 30 zeigt, mNTRA-positive Zellen in der äußeren Molekularschicht (oml), die aufgrund ihrer Morphologie als Astrozyten angesehen wurden.



anti-mNTRA

Abbildung 30: Expression von mNTRA im Gyrus dentatus 5 dal. Kryostatschnitte wurden mit Antikörpern gegen mNTRA gefärbt. Neben einer diffusen Färbung der granulären Zellschicht, werden Zellen der äußeren Molekularschicht angefärbt. (gcl = Körnerzellschicht; iml = innere Molekularschicht; oml = äußere Molekularschicht). Balken 50 µm.

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde eine Zweifachfärbung mit Antikörpern gegen mNTRA und den astrozytären Marker GFAP durchgeführt (Abb. 31A - C). Es zeigt sich eine deutliche Kollokalisierung von mNTRA und GFAP. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Expression von mNTRA nach Läsion des entorhinalen Kortex auf reaktiven Astrozyten in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus induziert wird.

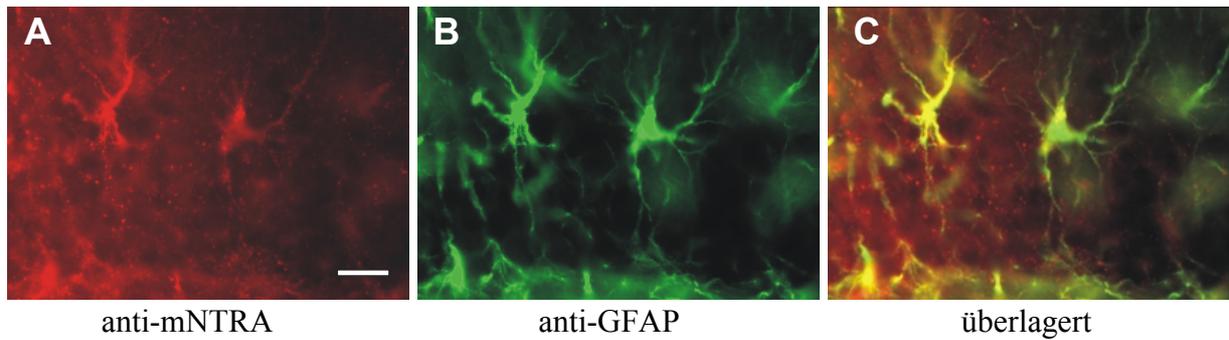


Abbildung 31: Kolokalisation von mNTRA und GFAP in Astrozyten. Es wurden Kryostatschnitte von Mäusehirn 5 dal angefertigt und mit polyklonalen Antikörpern gegen mNTRA und monoklonalen Antikörpern gegen GFAP, sowie Cy3- bzw. TRITC-markierten sekundären Antikörpern gefärbt. A) Immunfärbung von mNTRA auf reaktiven Astrozyten . B) Immunfärbung von GFAP in reaktiven Astrozyten. Der Balken entspricht 20 µm.

### 3.2.8.1. Quantifizierung der Regulation von mNTRA nach entorhinaler Kortexläsion

Im folgenden Experiment wurden Hippokampi von Mäusen 5 dal präpariert und homogenisiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit verschiedenen Antikörpern im Western Blot detektiert. Hierzu wurden Antikörper gegen mNTRA, Contactin-1,  $\beta$ -Actin und MAP2 verwendet. Dadurch sollte abgeschätzt werden, in welchem Ausmaß die Expression von mNTRA im deafferenzierten Hippokampus hochreguliert wird (Abb. 32).

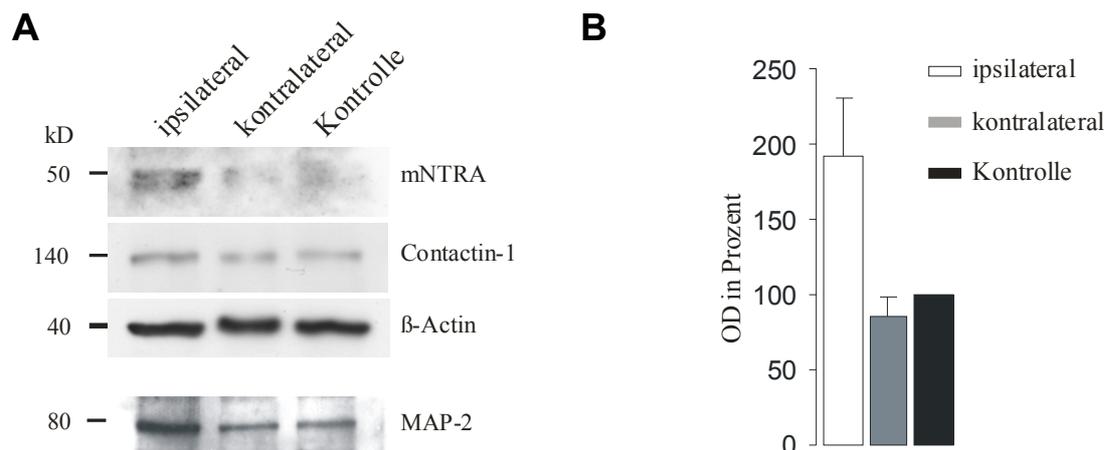


Abbildung 32: Analyse der Expression von mNTRA 5 dal. A) Hippokampus-Homogenisate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Western Blot auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden in Streifen geschnitten und mit Antikörpern gegen mNTRA, Contactin-1, bzw.  $\beta$ -Actin detektiert. Als interne Positiv-Kontrolle wurden Membranstreifen mit Antikörpern gegen MAP2 detektiert. Es zeigt sich für mNTRA und MAP2 eine deutlich verstärktes Signal im ipsilateral zur Läsion gelegenen Hippokampus im Vergleich zur kontralateralen Seite und zu Hippokampus-Homogenisat von Mäusen, die keiner Läsion unterzogen wurden (Kontrolle). B) Balkendiagramm der durchschnittlichen optischen Dichte vermessener Banden, die mit Antikörpern gegen mNTRA detektiert wurden. Dabei wurden die ermittelten Werte in Relation zur Kontrolle in Prozent angegeben. Es wurden insgesamt drei unabhängige Versuche mit Hirnhomogenisaten mit insgesamt drei verschiedenen Tieren durchgeführt und quantifiziert. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung (SEM). Die Bestimmung der optischen Dichte der Proteinbanden wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt (NIH-Image).

Zusammenfassend belegen die gezeigten Ergebnisse eine zeitlich und räumlich abhängige Regulation von mNTRA nach entorhinaler Kortexläsion. Dabei wird eine neuronale Hochregulation in bestimmten Regionen des ipsilateral zur Läsion gelegenen Hippokampus und des entorhinalen Kortex beobachtet. Darüber hinaus zeigt sich eine Induktion von mNTRA auf reaktiven Astrozyten in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus.