

2. Material und Methoden:

2.1 Emx2-Tiere:

Emx2-Knockout Mäuse wurden von Prof. Dr. Gruss (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und von Dr. Bräuer (Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité, Berlin) wie bei Pellegrini et al. (1996) beschrieben genotypisiert.

2.1.1 Organotypische Schnittkulturen

In Anlehnung an vorhergehende Beschreibungen von Stoppini et al. (1991) sowie Heimrich und Frotscher (1994) wurde das statische Kulturprotokoll angewandt. Komplex-Schnittkulturen von EC und anliegendem Hippocampus wurden von E18 Mäusen hergestellt. Dazu wurden trächtige heterozygote Muttertiere mit Äther (Merck) narkotisiert und die Embryos per Sectio caesarea entnommen und dekapitiert. Unter nachfolgend sterilen Bedingungen wurde das Gehirn freigelegt, herausgenommen und in eine Zellkulturschale mit Präparationsmedium, bestehend aus 50% HEPES-gepuffertem MEM (Gibco, Life Technologies) und 50% Aqua bidest. mit dem pH 7,3 überführt. Dort erfolgten nach Entfernung des Frontalhirns und des Cerebellums, die Trennung beider Hemisphären und das Herauslösen beider Hippocampi mit EC. Mittels eines McIlwain tissue choppers wurden Scheiben von 350µm Dicke entlang der longitudinalen Achse angefertigt. Insgesamt wurden vier Schnitte auf eine feuchte Millipore-Membran platziert und diese in eine 6-Loch-Platte, gefüllt mit 1,2ml Nährmedium, überführt. Dieses Nährmedium bestand aus 50% HEPES-gepuffertem MEM (Gibco, Life Technologies), 25% HBSS (Hanks' balanced salt solution) und 25% hitzeinaktiviertem Pferdeserum. Es wurde angereichert mit Glutamax (2mM Glutamin, Gibco Life Technologies) und der pH-Wert auf 7,3 eingestellt. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. In diesem Versuchsaufbau wurden die Schnittkulturen bei 37°C in befeuchteter CO₂-angereicherter Atmosphäre bis zu zwei Wochen inkubiert.

2.1.2 Biocytintracing

Für das anterograde Biocytin-Tracing wurden mindestens zehn Tage alte (DIV10=10 days *in vitro*) Schnittkulturen verwendet.

In einem Teil der Kulturen sollten die dentatus Körnerzellen mit dem MF-Trakt markiert werden. Unter visueller Kontrolle wurden kleine Biocytinkristalle auf den mutmaßlichen DG von *Emx2*^{-/-}Mäusen oder dem sich abzeichnendem Körnerzellband von Wildtyp Wurfgeschwistern platziert. Die Kulturen blieben dann für den anterograden Transport des Tracers (Biocytin) für weitere 36 bis 48 Stunden im Inkubator. Anschließend wurden die Kulturen in 4% PFA und 0,1% Glutaraldehyd fixiert. Nach mehrmaligem Spülen und Schneiden am Vibratom in 50µm dicke Schnitte, erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex (1:50, ABC-Elite) über Nacht. Am nächsten Tag wurde dann die Cobald-Nickel-intensivierte DAB-Reaktion (wie unten, Schwab et al., 2000) durchgeführt. Die Schnitte wurden dann mit Cresylviolett gegengefärbt, dehydriert und eingedeckelt.

Andere DIV10-Kulturen wurden für das Tracing des sich *in vitro* entwickelnden entorhino-hippocampalen Pfades ausgewählt. Hier wurden die Biocytinkristalle auf die oberflächliche Schichten des Entorhinalen Kortex platziert und der anterograde Transport, wie auch die weitere Aufarbeitung des Gewebes, wurde wie unten beschrieben durchgeführt.

2.1.3 Immunfluoreszenz

Calbindin- und Calretininimmunfluoreszenz diente zur Visualisierung der DG Körnerzellen und der hilären Mooszellen. Nach 10 bis 14 DIV wurden die Kulturen in 4% PFA in 0,1M PB für zwei Stunden fixiert, 50µm vibratomgeschnitten, mit 5% Ziegenserum (NGS=normal goat serum) enthaltender Blockierlösung für 30 Minuten inkubiert und für 30 Minuten mit 0,1% Triton X permeabilisiert, bevor der Erstantikörper (anti-Calretinin, 1:2500; anti-Calbindin, 1:6000, Swant, Bellizona, Schweiz) bei 4°C über Nacht appliziert wurde. Mit dem Zweitantikörper (Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG; 1:800) wurden die Schnitte dann für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dem folgte eine Hoechst-Kernfärbung (1:10000) für 20 Minuten. Nach gründlichem Spülen für drei Stunden wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) eingedeckelt, mit Epifluoreszenz-Mikroskopie untersucht und digital fotografiert.

2.1.4 Silberimprägnation nach Golgi-Collonier

Die Silberimprägnation wurde nach Golgi-Collonier durchgeführt. Zusammengefasst wurden die Kulturen mit einem Fixativ, bestehend aus 1% Paraformaldehyd 0,002% Calciumchlorid und 1% Glutaraldehyd in 0,1M Natrium-Kalium-Phosphatpuffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert, in 0,1M PB überführt, von den Membranen gelöst, mit einer Zwischenschicht Parafilm übereinander gestapelt und dann als Päckchen in warmen Agar gegossen. Die Kaliumimprägnierung erfolgte dann in einer 3% Kaliumdichromatlösung mit 5% Glutaraldehyd (pH 4,0-5,0) für 5-7 Tage bei 4°C im Dunkeln.

Anschließend wurde das Päckchen in 0,75% Silbernitratlösung überführt und dort für 1,5-2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Päckchen in einer aufsteigenden Glycerin-Kaliumdichromatreihe zu 20, 40, 60 und 80% für jeweils 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln dehydriert, von der Agarhülle befreit und die nun freigelegten Kulturen auf Objektträger mit 100% Glycerin aufgezogen und eingedeckelt.

2.2 Modifikation der Polysialylierung

Der physiologische Vorläufer der Neuraminsäure *N*-Acetyl-Mannosamin (ManNAc) war erhältlich von Sigma. Die anderen synthetischen Derivate der Neuraminsäurevorläufer mit den verlängerten *N*-Acetyl-Seitenketten sind bisher nicht käuflich erhältlich, wurden wie bei Keppler et al. (1995) beschrieben hergestellt und von Prof. Horstkorte (Institut für Biochemie und molekulare Biologie, Charité, Berlin) freundlicherweise zu Verfügung gestellt.

2.2.1 Messung der PSA- und PropPSA-Inkorporation

Zell-Pellets aus Schnittkulturen wurden bei 4°C und pH 7,4 für eine Stunde in einem 150mM NaCl, 10mM Tris, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1% Triton und einem Protease-Inhibitions-Cocktail (P 8340, Sigma) enthaltendem Puffer gelöst. Das Lysat wurde bei 30.000g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand für den Westernblot gewonnen. Die Proben wurden auf SDS-Polyacrylamid-Gelen (Biorad) separiert und auf Nitrocellulose Filter überführt. Die Blots wurden mit 4% fettfreiem Trockenmilchpulver in PBS blockiert, mit dem entsprechendem Erstantikörper oder mit einer Streptavidin gekoppelten Peroxidase inkubiert, mit PBS gewaschen und nachfolgend mit dem passenden Zweitantikörper inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Proteine mittels verstärkter Chemieluminescence (Amersham Buchler) entsprechend der Herstellerangaben detektiert und durch Exposition der Blots im Fuji-Bildgebungssystem (LAS) für 10 bis 120 Sekunden visualisiert. Als Primärantikörper wurden von Prof. Horstekorte zur Verfügung gestellter monoklonaler anti-PSA (Frosch et al., 1985) und monoklonaler anti-*N*-Propanoyl-Neuraminsäure 13D9 (Pon et al., 1997) genutzt. Verwendete Antikörper gegen Aktin waren von Sigma und Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Maus-Immunglobulin von Dianova erhältlich.

2.2.2 Komplexkulturen zur Untersuchung des Auswachsen mit und ohne Läsion

Komplexe Schnittkulturen, bestehend aus entorhinalem Kortex und Hippocampus zur Auswachs-Untersuchung nach 4 bzw. 7 Tagen *in vitro* und nach Läsion, wurden von P0 C57Bl6 Mäusen wie oben beschrieben angefertigt (Savaskan et al., 2002). Während der Inkubationszeit wurden normale und mit physiologischen bzw. synthetischen Vorläufern der Neuraminsäure angereicherte Medien alle zwei Tage erneuert. In den unterschiedlichen Ansätzen erhielten die Kulturen 8mM ManNAc (Sigma), 8mM ManNProp (zu Verfügung gestellt von Prof. Horstkorte)

oder blieben als Kontrollen unbehandelt. Zur Aufrechterhaltung einer gleich bleibenden Osmolarität wurde die Glukosekonzentration der Inkubationsmedien entsprechend der Zugabe von Sialinsäure angepasst.

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Regenerationskapazität wurde der MF-Trakt an DIV7 mit einer Rasierklinge durchtrennt (lädiert). Das Tracing der MF erfolgte 14 Tage später durch Applikation von kleinen Biocytinkristallen auf das Körnerzellband des DG. Dem folgte eine Nachinkubation von 24h bevor die Kulturen mit 4% PFA (Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer) fixiert und wie unten beschrieben weiterverarbeitet wurden.

2.2.3 *In vivo* Untersuchung

Neugeborene Wistar-Ratten desselben Wurfes erhielten für vier Wochen täglich subkutan 200mg pro kg Körpergewicht synthetischen Sialinsäurevorläufer gelöst in 0,1M salinem Phosphatpuffer (PBS) oder PBS allein injiziert. Anschließend wurden die ManNProp behandelten (n=4) und die Kontrollwurfgeschwister (n=4) mit einer Mischung aus 25 mg/ml Ketamin, 1,2 mg/ml Xylazin und 0,35 mg/ml Azepromazin in 0,9% NaCl (2,5 ml/kg Körpergewicht) tief anästhesiert, zunächst mit 40-60 ml 0,9% NaCl gefolgt von 100-200ml 4% PFA langsam transkardial perfundiert, die Hirne aus der Schädelkalotte freipräpariert und diese über Nacht im gleichen Fixativ bei 4°C nachfixiert.

Horizontalschnitte von fixierten Hirnen wurden mit einem Vibratom (Series 1000, Technical Products Int., Inc.) in 50µm Dicke angefertigt und in 0,1M PBS für Immunhistochemie (siehe unten) gesammelt.

2.2.4 Timm-Imprägnation

Für die Timm-Imprägnation erfolgte die Perfusion zunächst mit 50-70ml Natriumsulfidlösung, bestehend aus 1,17% Natriumsulfid und 1,2% Natriumdihydrogenphosphat, dann mit ca. 150ml 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M PBS. Für die Nachfixierung kamen die herauspräparierten Gehirne für etwa 20 Stunden bei 4°C in 70% Ethanol. Anschließend wurden die Hirne zur Kryoprotektion in 30% Saccharose überführt, über Trockeneis eingefroren, am Kyrostaten (Leica Frigocut 2800H) mit einer Dicke von 40µm geschnitten, auf gelatinierte Objektträger aufgezogen und bei Zimmertemperatur getrocknet. Vor der Timm-Imprägnation kamen die Objektträger über Nacht bei 58°C in den Wärmeschrank, um ein Ablösen der Schnitte bei der folgenden Prozedur zu vermeiden. Zur Silber-Imprägnierung wurden aus 60ml 50%igen

GumArabic-Lösung (Sigma), Citratpuffer, bestehend aus 2,55g Zitronensäure-monohydrat und 2,35g Natriumcitrat in 39,5ml Aqua bidest., 1,7g Hydrochinon und 0,085g Silbernitrat 100ml Entwicklerlösung hergestellt. Die Inkubation der Schnitte mit der Entwicklerlösung erfolgte bei 28°C für ca. 1-2 Stunden (unter 10 minütiger Sichtkontrolle) im Dunkeln.

2.2.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Die Schnittkulturen wurden mit 4% PFA in 0,1M Phosphatpuffer (PB) für 3 Stunden fixiert. Die aus der Membran ausgeschnittenen Kulturen wurden dann auf einen planen Agarblock (5%) geklebt und mit einem Vibratom in 50µm dicke Horizontalschnitte geschnitten.

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte der Schnittkulturen und des *in vivo* Experimentes mit 0,2% Triton X-100 für 30min permeabilisiert. Dem folgte das Blockieren der unspezifischen Bindungen mit 10% NGS.

Der Erstantikörper gegen Calbindin (1:5000, Swant) wurde in Blockierlösung (5% NGS in PB) über Nacht bei 4°C appliziert. Als Zweitantikörper dienten fluoreszenzmarkierte IgG gegen die Spezies des Primärantikörpers (anti-Maus ALEXA 568, 1:800), mit denen die Schnitte nach gründlichem dreimaligem Waschen mit PB für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Getracte MF wurden durch Konjugation mit dem Avindin-Biotin-Peroxidase-Komplex (1:50 in PB für 3h bei Raumtemperatur, ABC-Elite Standart, Vector Laboratories) und folgender DAB-Entwicklung (siehe unten) visualisiert. Zur Darstellung der zellulären Organisation wurden einige Schnitte mit Hoechst-33258 Kernfärbung (1:12000, Sigma) für 20 Minuten inkubiert, gefolgt von mindestens drei Waschschritten für jeweils 10 Minuten mit PB. Die Schnitte wurden auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Calif. USA) eingedeckelt und an einem computer-unterstützten Bildverarbeitungssystem (INTAS) angeschlossenen Epifluoreszenzmikroskop dokumentiert.

Bei der DAB-Entwicklung wurde die Immunreaktivität mittels 0,07% 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochlorid (DAB) in 0,1M PB und 0,02% $(\text{NH}_4)_2(\text{NiSO}_4)_2$ und 0,024% CoCl_2 zur Signalverstärkung (Sigma) dargestellt. Schnitte wurden durch Zugabe von 0,001% H_2O_2 entwickelt, auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, Nissl gefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Entellan (Merck) eingedeckelt. Digitalaufnahmen der Schnitte wurden mit einer Olympus BX-50 erstellt.

2.2.6 Quantifizierung und statistische Auswertung

Die Flächenbestimmung der MF in der CA3-Region und Volumenmessungen des suprapyramidalen, des infrapyramidalen MF-Bündels und der CA3-Region von ManNProp behandelten (n=4) und Kontroll-Tieren (n=4) erfolgte an einem Stereologie-Arbeitsplatz, ausgestattet mit einem modifizierten Durchlichtmikroskop (Zeiss Axioplan mit PlanNeofluar Objektiven: 20fache Vergrößerung zur Umrandung des zu untersuchenden Gebietes), motorisiertem Objektträgertisch, CCD-Videokamera und Stereologieprogramm (Stereoinvestigator, Microbrightfield, Williston, VT, USA). Das Volumen wurde nach Cavalieries Prinzipien (Gundersen und Jensen, 1987) eingeschätzt.

Zur Analyse des axonalen Auswachsens wurden die Calbindin-markierten ManNProp behandelten (n=11) und Kontroll-Kulturen (n=11) mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, BX 50), ausgerüstet mit einer Cool SNAP ES Digitalkamera (Roper Scientific), aufgenommen und mit Metamorph Image Analysis Software (Universal Imaging Corporation) morphometrisch ausgemessen. Die Erhebung und Analyse der Daten wurde durch für die experimentellen Bedingungen geblindete Untersucher vorgenommen. In der statistischen Auswertung wurden die P-Werte mittels zweiseitigem T-Test ermittelt. Der Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen wurde als Varianzanalyse für unabhängige Messwerte (ANOVA) mit post-hoc Bonferronitest für den paarweisen Vergleich durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei $P < 0,05$ definiert. Für alle Berechnungen wurde GraphPad Software (San Diego, CA, USA) genutzt. Die Längsbalken in den Graphen stellen den Mittelwert der Standardabweichung und Sterne die statistische Signifikanz mit * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ dar.

2.3 Organotypische Kokulturen mit β -Aktin-GFP transgenen Mäusen

Zur Etablierung des Kokultursystems mit β -Aktin-GFP transgenen Mäusen wurden neugeborene (P0) bis fünf Tage alte (5. postnataler Tag, P5) Wildtyp (genetischer Hintergrund C57BL/6) und C57BL/6 TgN (act-EGFP) Osb 1 transgene Mäuse (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Okabe, Genome Information Research Center, Osaka University, Japan) genutzt. Die transgenen Mäuse tragen die für das grün fluoreszierende Protein (=GFP) codierende cDNA unter der Kontrolle des ubiquitären β -Aktin Promoters. Insgesamt wurden fünf neugeborene Mäuse (Wildtyp sowie β -Aktin-GFP transgen) dekapitiert und wie oben beschrieben der Hippocampus-EC-Komplex präpariert. Je nach Fragestellung wurden dann aus dem Hippocampus-EC-Komplex unter mikroskopischer Sichtkontrolle die entsprechenden Subfelder ausgeschnitten und jeweils eine Scheibe vom transgenen GFP-Tier mit einer vom Wildtyp auf einem Zellkultureinsatz (Millicell, Millipore) kokultiviert. So wurden zur Untersuchung der entorhinalen Projektion ein GFP-positiver EC mit einem wildtyp Hippocampus (n=15), der kommissuralen Projektion ein GFP-positiver Hippocampus mit einem wildtyp Hippocampus (n=15) und zur Untersuchung der Schaffer-Kollateralen eine GFP-positive CA3-Region und eine wildtyp CA1-Region (n=27) aneinander gelegt. Diese Kokulturen wurden bei 37°C in befeuchteter CO₂-angereicherter Atmosphäre unter den oben beschriebenen Bedingungen bis zu vier Wochen inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Kulturen für zwei Stunden in 4%PFA fixiert, mit dem Vibratom in 50µm dicke Schnitte geschnitten und in 0,1M PB überführt. Zur Visualisierung der Zytoarchitektur und morphologische Beurteilung des Überlebens erfolgte eine Hoechst-33258 Kernfärbung (1:12000; Sigma) für 20 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte aufgezogen, mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) eingedeckelt, mit Epifluoreszenz-Mikroskopie (Olympus, BX 50) untersucht und digital photographiert.