

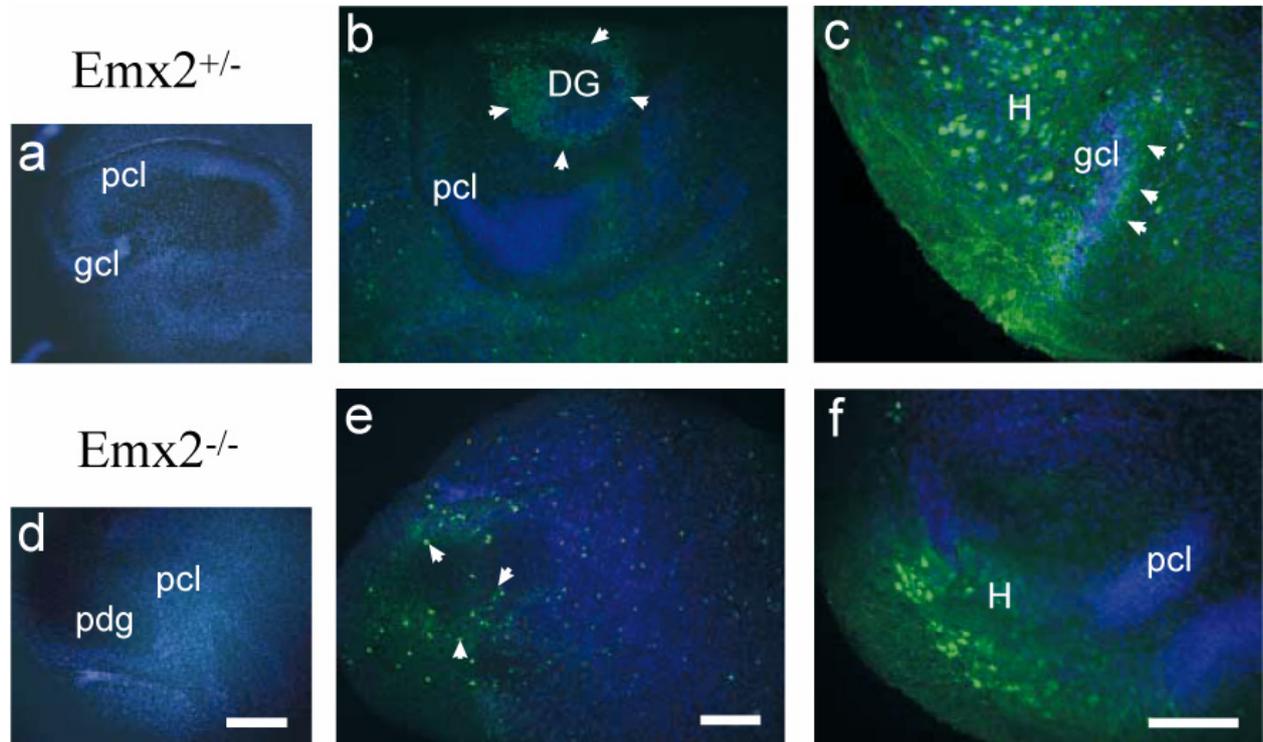
### **3. Ergebnisse:**

#### **3.1.1 Veränderungen in Lang-Zeit organotypischen Schnittkulturen von Emx2-Knockout Mäusen**

Zunächst stellte sich die Frage, ob die in der Literatur beschriebenen und in unserer Arbeitsgruppe bestätigten Befunde in der gestörten Entwicklung im Emx2 defizienten Hippocampus vorübergehende, eventuell im Verlaufe durch spätere Mechanismen kompensierte Defekte darstellten oder vielleicht in einer möglichen generellen Entwicklungsverzögerung begründet seien. Deshalb wurden entorhino-hippocampale organotypische Schnittkulturen erstellt und somit das Problem der perinatalen Letalität, verursacht durch Nierenfehlbildung, umgangen. In diesem Kultursystem blieb bei jedem Genotyp die Zellarchitektur der CA1 Pyramidenzellschicht erhalten. Im Gegensatz dazu entwickelte sich nur in Kulturen von Wildtyp- und heterozygoter Maus eine jeweils klar abgrenzbare CA3- und Körnerzellschicht, während dies auch nach längerer Inkubationszeit nie bei Abwesenheit von Emx2 der Fall war (Abb. 1). In Emx2<sup>+/-</sup> Schnittkulturen entwickelte sich während der Inkubation ein C-förmiges Körnerzellband. Hiläre Mooszellen, die auch Calretinin immunmarkiert werden, fanden sich sowohl in Kulturen von heterozygoten als auch homozygoten Emx2-Mutanten (Abb. 1c, f). Eine charakteristische Projektion dieser Zellen in die innere Molekularschicht des DG konnte nur in Schnittkulturen von Emx2<sup>+/-</sup> Mäusen gefunden werden (Pfeile in Abb. 1c). Calbindin-Immunmarkierung zur Identifizierung differenzierter DG Körnerzellen als auch hippocampaler Interneurone erbrachte eine normale Verteilung innerhalb der Körnerzellschicht (Abb. 1b). Eine ähnliche Anordnung von Calbindin-positiven Neuronen in Schnittkulturen von Emx2 Knockout-Mäusen (n=8) konnte nicht beobachtet werden. In diesen Kulturen zeigten die Calbindin enthaltenen Neurone eine eher verstreute Verteilung (Abb. 1e). Ergo bleiben die histogenetischen Veränderungen im Emx2-defizienten Hippocampus auch nach längerer Inkubationszeit von zu E18,5 entnommenen Schnittkulturen, die einem (theoretischen) Entwicklungsstand von einigen postnatalen Tagen entsprechen, bestehen.

**Abb. 1:**

Entwicklung der Schnittkulturen von EC und Hippocampus von heterozygoter und  $Emx2^{-/-}$  Maus nach 14 Tagen *in vitro*.



a) + d) Beobachtung der mit Kernfärbung Hoechst sichtbar gemachten Zytoarchitektur in  $Emx2^{+/-}$  a) und  $Emx2^{-/-}$  d) Schnittkultur. Das Pyramidenzellband entwickelte sich in Kulturen von heterozygoter Maus a) und homozygoter Maus d), während ein Körnerzellband nur in Kulturen von heterozygoter Maus zu detektieren ist.

b) + e) Calbindin Immunfluoreszenz erbringt eine typische C-förmige Anhäufung von differenzierten Körnerzellen in der Schnittkultur einer  $Emx2^{+/-}$  Maus (b, markiert durch Pfeile). Dieses Muster von Calbindin-positiven Zellen fand sich in keiner  $Emx2^{-/-}$  Schnittkultur.

e) In dieser  $Emx2$ -defizienten Schnittkultur liegen Calbindin-positiv verstreut; keine C-förmige Körnerzellschicht ist zu beobachten.

c) + f) Hiläre Mooszellen sind in beiden Genotypen Calretinin-markiert. Nur in Schnittkulturen von  $Emx2^{+/-}$  Mäusen ist die typische Verteilung der Calretinin-positiven Mooszellaxonen (Pfeile) oberhalb der Körnerzellschicht (gcl) erhalten c).

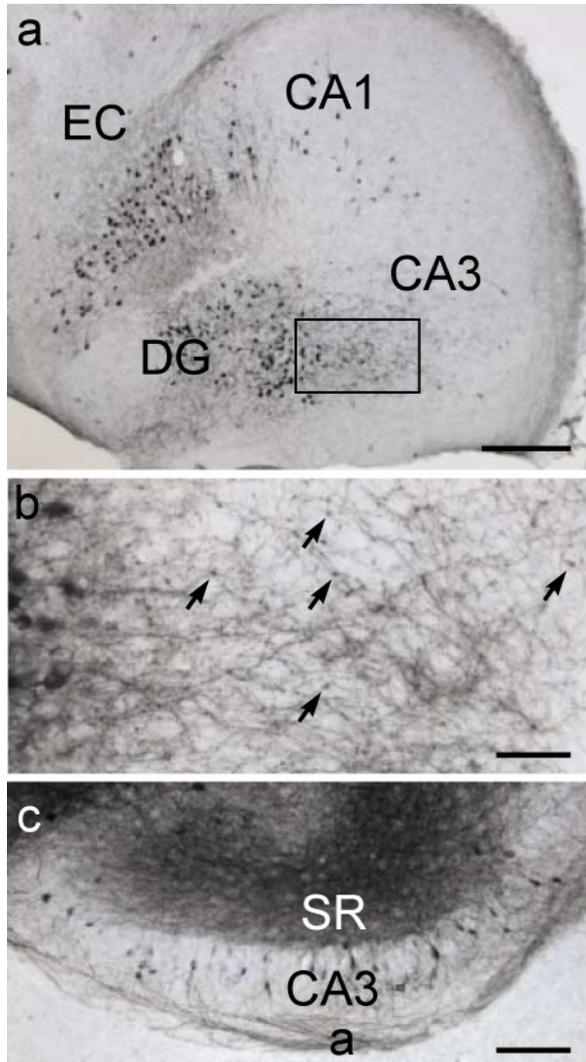
pcl: pyramidal cell layer = Pyramidenzellband; DG: dentate gyrus = Gyrus dentatus; h.: hilus; pdg: presumed dentate gyrus = prospektiver Gyrus dentatus. Maßbalken 800 $\mu$ m (a + d), 300 $\mu$ m (b + e), 300 $\mu$ m (c + f).

### **3.1.2 Emx2 ist für die Generierung und Differenzierung von hippocampalen Körnerzellen wesentlich**

Das Biocytin-Tracing in Schnittkulturen erbrachte zahlreiche markierte Neurone (Abb. 2a). Während in Schnittkulturen von heterozygoten Mäusen sowohl Schaffer Kollateralen als auch Giant en passant boutons in der CA3 Region (Abb. 2b, c; charakteristisch für differenzierte Körnerzellaxone) gesehen wurden, fanden sich diese Projektionen nicht in Schnittkulturen von Emx2-Knockout-Mäusen. Diese Abwesenheit der typischen Körnerzellprojektionen in den knockout Hippocampi führte zu einer genaueren strukturell-morphologischen Untersuchung der neuronalen Differenzierung. Dazu führten wir eine Golgi-Färbung der Schnittkulturen von heterozygoter und knockout Maus durch. In keinem Emx2<sup>-/-</sup> Schnitt konnte eine ausdifferenzierte Körnerzelle detektiert werden (Abb. 3). Da aber einige ausgereifte, d.h. mit Spines ausgestattete hiläre Neurone in Emx2<sup>-/-</sup> zu beobachten waren, deutet dies darauf hin, dass es sich bei den Knockout-Mäusen nicht um einen generellen Differenzierungsdefekt handelt (Abb. 3b). In Emx2<sup>+/-</sup> Schnitten konnten demgegenüber dentatus Körnerzellen nach 14 Tagen Inkubationszeit als ausgereift identifiziert werden (Abb. 3c, d). Diese Neurone besaßen die für sie charakteristischen ein bis zwei sich im Verlauf baumartig aufzweigenden Stammdendriten, dicht übersät mit Spines unterschiedlicher Form, was als Indiz für Differenzierung und Maturation zu werten war. Demzufolge schient Emx2 wesentlich für die Generierung und Differenzierung von hippocampalen Körnerzellen zu sein.

**Abb. 2**

Biocytintracing von heterozygoten entorhino-hippocampalen Komplexkulturen nach 12 Tagen *in vitro*.



a) Übersicht einer Kokultur nach Tracerapplikation in den Gyrus dentatus / Subiculum. Zahlreiche schwarz gefärbte Zellen haben den Tracer aufgenommen.

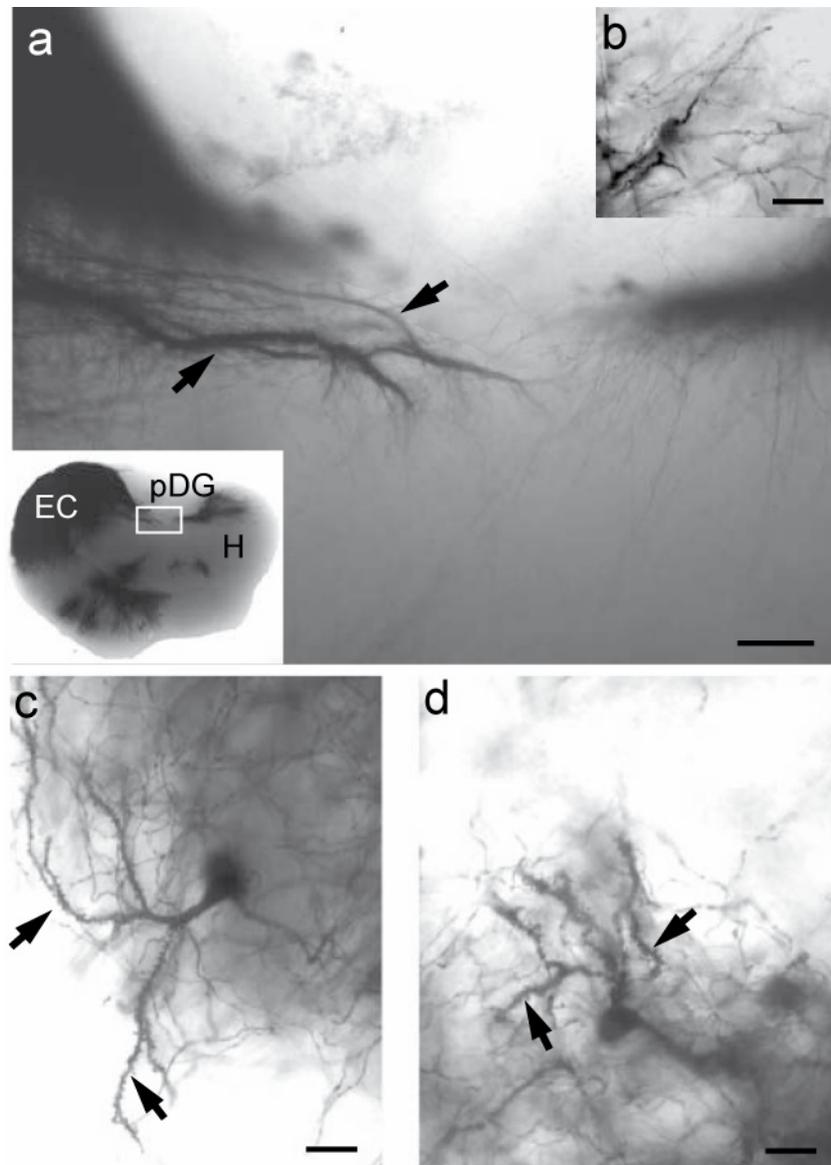
b) In der Vergrößerung ist in der CA3-Region ein Geflecht von anterograd markierten Fasern sichtbar. Viele der markierten Axone zeigen als Nachweis einer ausgebildeten Körnerzellprojektion große MF-typische Boutons en passant (Pfeile).

c) Hier zahlreiche Biocytin-markierte Neurone der CA1-Region mit der Morphologie von Pyramidenzellen, die ihren apikalen Dendriten in das Stratum radiatum (SR) hinein erstrecken. Im Stratum radiatum ist eine stark markierte, aus CA3 entspringende Schaffer-Kollateral-Projektion zu beobachten. Gekennzeichnete Faserbündel verlaufen entlang des Alveus.

EC: Entorhinal Cortex; DG: dentate gyrus = Gyrus dentatus; CA3: Cornum ammonis, regio inferior; CA1: Cornum ammonis, regio superior; SR: Stratum radiatum; a: Alveus. Meßbalken 150µm (a), 40µm (b), 200µm (c).

**Abb. 3:**

Golgi-Färbung Langzeit-inkubierter entorhino-hippocampaler Komplexkulturen.



a) In dieser  $Emx2^{-/-}$  Schnittkultur finden sich Golgi-gefärbte entorhinale Axone im Stratum lacunosum moleculare des Hippocampus. Die Axone neigen zu ungewöhnlicher Bündelung (Pfeile). Der Einsatz zeigt eine komplexe Schnittkultur mit einer betonten Golgi-Färbung im Entorhinalen Cortex (EC). Bemerkenswert ist das Fehlen der Markierung im prospektivem Gyrus dentatus (pDG). Das umrandete Gebiet ist in a) vergrößert dargestellt.

b) Ein mit Spines ausgestattest hiläres Neuron in einer  $Emx2^{-/-}$  Schnittkultur.

c) + d) Zwei Beispiele von identifizierten Golgi-gefärbten Gyrus dentatus Körnerzellen in Komplexkulturen von heterozygoten Tieren. Die differenzierte Körnerzelle zeigt einen verzweigten Dendritenbaum, an dem die einzelnen Dendriten dicht mit Spines besetzt sind (Pfeile).

H: Hippocampus. Meßbalken 50µm (a), 15µm (b), 10µm (c), 8µm (d).

### 3.2.1 ManProp hemmt die Polysialylierung in organotypischer hippocampaler Schnittkultur

Als ersten Schritt der Untersuchung, um festzustellen, ob Nervenzellen in Schnittkulturen den künstlichen PSA-Vorläufer nutzen und metabolisieren können, wurde die Expression von PSA und *N*-Propanoylpolysialinsäure aus Membranbestandteilen analysiert. Die Menge an PSA in mit 8mM ManNProp behandelten Kulturen war im Vergleich zu den Kontrollen und den Kulturen, die den natürlichen PSA-Vorläufer ManNAc erhalten haben, vermindert (Abb. 4 links). Weiterhin wurden die Kulturen auf die Inkorporation von PropPSA hin analysiert. Abb. 4 rechts demonstriert, dass PropPSA in den behandelten Kulturen präsent ist, ManNProp also von den Neuronen aufgenommen, zu PropPSA metabolisiert und dieses dann an die extrazelluläre Domäne von NCAM angefügt wurde. An Membranen von mit dem natürlich vorkommenden Sialinsäurevorläufer ManNAc behandelten Schnitten konnte kein PropPSA detektiert werden. Diese Befunde weisen also auf eine Inhibition der NCAM Polysialylierung durch die neuronale Aufnahme von ManNProp hin.

Abb. 4:

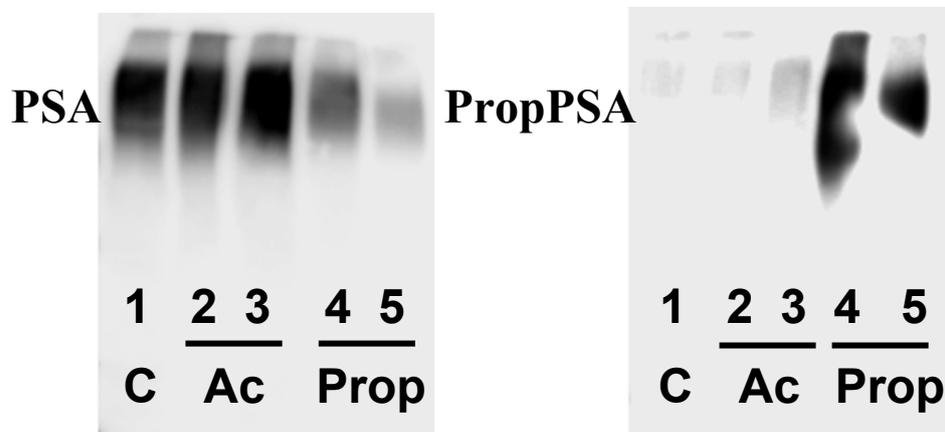


Abb. 4: Westernblot von Zellmembranbestandteilen aus Kontrollschnitten (C) und aus mit dem natürlichen Vorläufer der Sialinsäure (Ac) behandelten Schnitten zeigt große Mengen an PSA aber kein PropPSA. Umgekehrt ist PropPSA auf Zellmembranen der ManNProp-behandelten Kulturen aber nicht in Kontroll- oder ManNAc-behandelten Kulturen exprimiert.

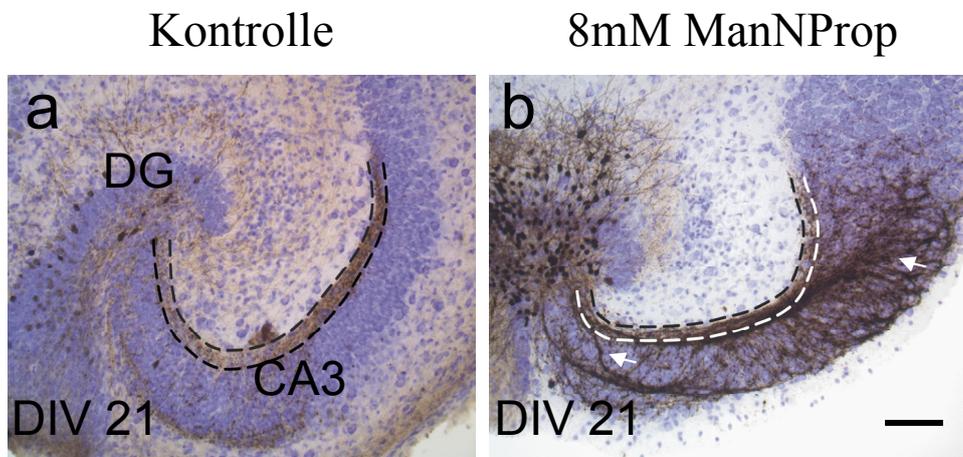
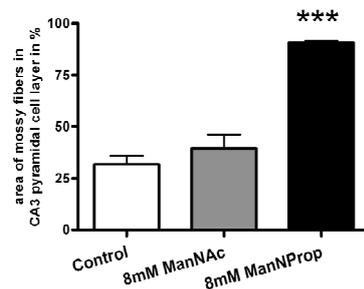
### **3.2.2 Hemmung von PSA beeinträchtigt die Faszikulation (Bündelung) und die Zielfindung der Moosfasern *in vitro* und *in vivo***

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Ausbildung von neuronalen Schaltkreisen durch Hemmung der Polysialylierung beeinflusst wird. Hippocampale Schnittkulturen von neugeborenen Mäusen wurden dazu 21 Tage entweder mit 8mM ManProp-, 8mM ManNAc-angereichertem oder mit normalem Medium inkubiert. In allen Kulturen blieb die Zytoarchitektur erhalten, lediglich der MF-Trakt wurde durch die inhibierte Polysialylierung durch ManNProp stark verändert (Abb. 5b).

In den Kontrollschnitten bildeten die MF ihre charakteristische schichtenspezifische suprapyramidale Projektion im Stratum lucidum der CA3 Region aus (Abb. 5a). Nach Hemmung der Polysialylierung fanden sich Biocytin-markierte Fasern, die nicht nur das Stratum lucidum verlassen hatten, sondern sich weit innerhalb des CA3-Pyramidenzellbandes ausbreiteten (Abb. 5b, Pfeile). Morphometrische Flächenmessungen der Faserbündel, die entgegen ihres normalen Verlaufes das Stratum lucidum verließen und in das CA3-Pyramidenzellband eindrangen und deren statistische Auswertung, erbrachte im Vergleich zu den Kontrollen und den mit dem natürlichen Vorläufer ManNAc behandelten Kulturen eine signifikante Aberranz und Ektopie des MF-Verlaufes in ManProp behandelten Schnitten (Abb. 5d). Im Gegensatz dazu konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass pränatal ausgebildete axonale Projektionen, wie der entorhinale Tractus perforans sein normales Terminationsmuster in der äußeren Molekularschicht des DG behält (Vogt et al., *zur Veröffentlichung eingereicht*). Dies weist darauf hin, dass die Hemmung der PSA-Synthese die spezifische Zielfindung sich entwickelnder Projektionen stört, während dadurch zuvor gebildete Fasertrakte nicht beeinträchtigt werden.

**Abb. 5:**

Moosfasern mit PSA-Mangel zielen aberrant auf CA3-Pyramidenzellen.

**C**

a) Suprapyramidale MF verlaufen im Stratum lucidum (gestrichelte Linie);

b) Nach Hemmung der PSA-Synthese defaszikulieren die MF (Pfeile) und verteilen sich im nahezu gesamten CA3-Pyramidenzellband.

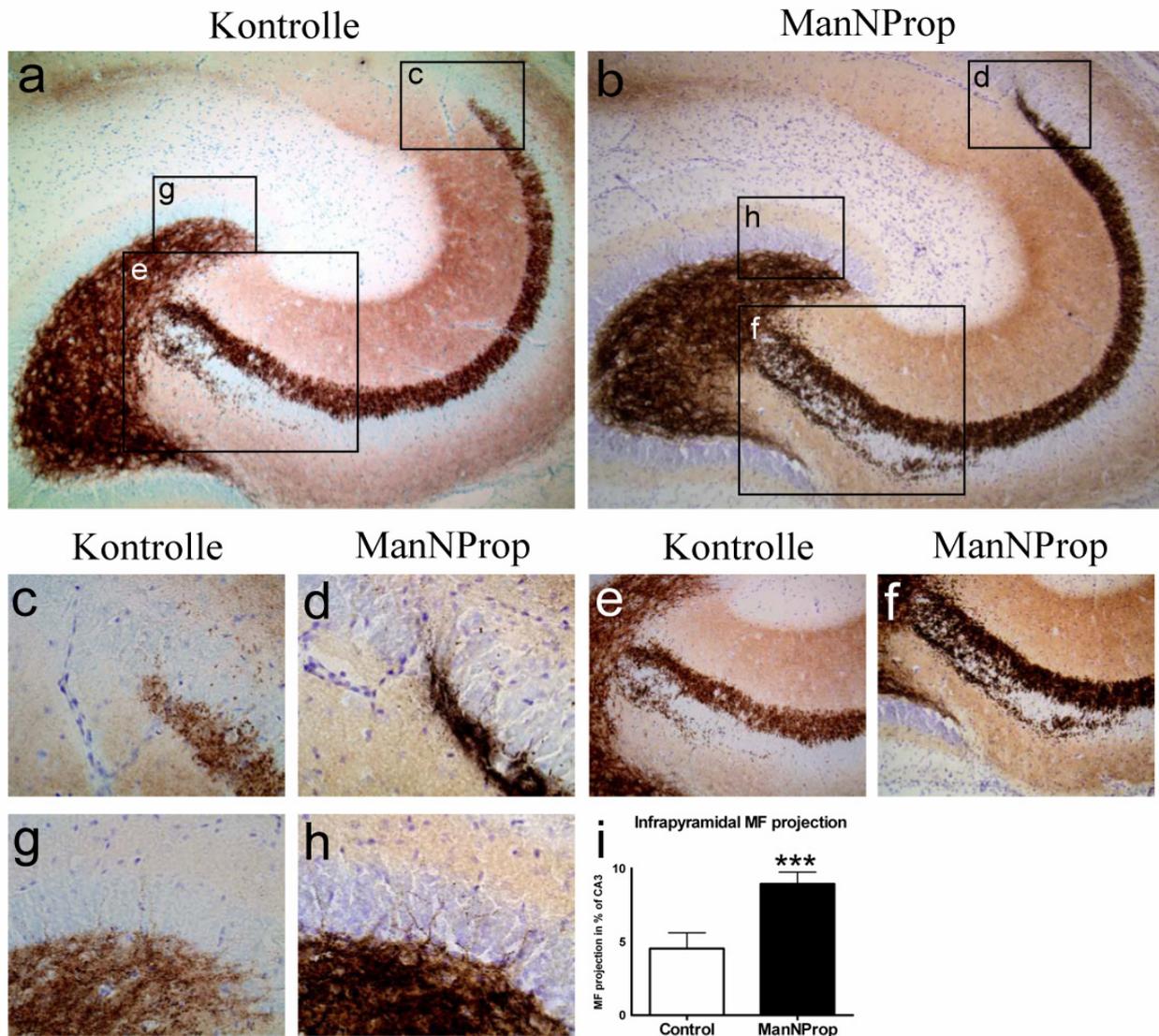
Messbalken: 100µm.

c) Die Flächenmessung der immunmarkierten MF ergibt eine stark erhöhten prozentualen Anteil an der Fläche der CA3-Region in ManNProp (schwarz) behandelten Kulturen und zeigt somit eine nahezu komplette Invasion des CA3-Pyramidenzellbandes durch aberrante MF-Axone im Vergleich zu den Kontrollen (weiß) und den mit dem natürlichen Vorläufer ManNAc (grau) behandelten Kulturen.

Um festzustellen, ob PSA genauso die Zielfindung *in vivo* beeinflusst, wurden Ratten mit 200mg ManNProp pro kg Körpergewicht behandelt. Die Verabreichung erfolgte subkutan, begann am ersten postnatalen Tag (P1) und wurde täglich bis vier Wochen nach der Geburt weitergeführt. Die MF-Projektion auf angefertigten Hirnschnitten wurde mittels der Timm-Silbersulfid-Methode visualisiert. Die suprapyramidale MF-Projektion von Tieren mit PSA-Mangel ignorierte die natürliche CA3/CA2-Grenze und drang in die CA1-Region ein (Abb. 6b, d). Die verminderte PSA-Expression hatte außerdem einen Einfluss auf die infrapyramidale MF-Projektion, die im Vergleich zu Kontrollen deutlich verlängert ausgeprägt war. Zusätzlich überquerten in behandelten Tieren rekurrente MF die Körnerzellschicht und verteilten sich innerhalb der inneren Molekularschicht (Abb. 6b, h). Zusammengefasst zeigt die Hemmung der Polysialylierung während der Ausbildung neuronaler Fasertrakte *in vitro* und *in vivo* einen entscheidenden Einfluss von PSA auf die Zielerkennung des MF.

**Abb. 6:**

Hemmung der PSA-Synthese beeinflusst die Zielfindung der MF *in vivo*.



a) zeigt ein normales Timm-Muster im Hippocampus einer 4 Wochen alten Ratte.

b) Gleichaltes ManNProp-behandeltes Tier mit bedeutsamen Veränderungen:

1. Der suprapyramidale MF-Trakt hält nicht an der CA3/CA2-Grenze, sondern dringt in die CA1-Region vor [umrandetes Gebiet vergrößert in c) + d)].
2. Der infrapyramidale MF-Trakt ist im Vergleich zu den Kontrollen länger [umrandetes Gebiet vergrößert in e) und f)].
3. Rekurrente MF überschreiten die Körnerzellschicht und verteilen sich in der inneren Molekularschicht des DG [umrandetes Gebiet vergrößert in g) und h)].

i) Volumenmessung belegt mit dem höheren prozentualen Anteil infrapyramidalen MF in der CA3-Region den signifikant längeren infrapyramidalen MF-Trakt nach PSA-Inhibition durch die Behandlung mit ManProp (schwarz) im Vergleich zu den Kontrolltieren (weiß) (\*\*\*) ( $P < 0,001$ ).

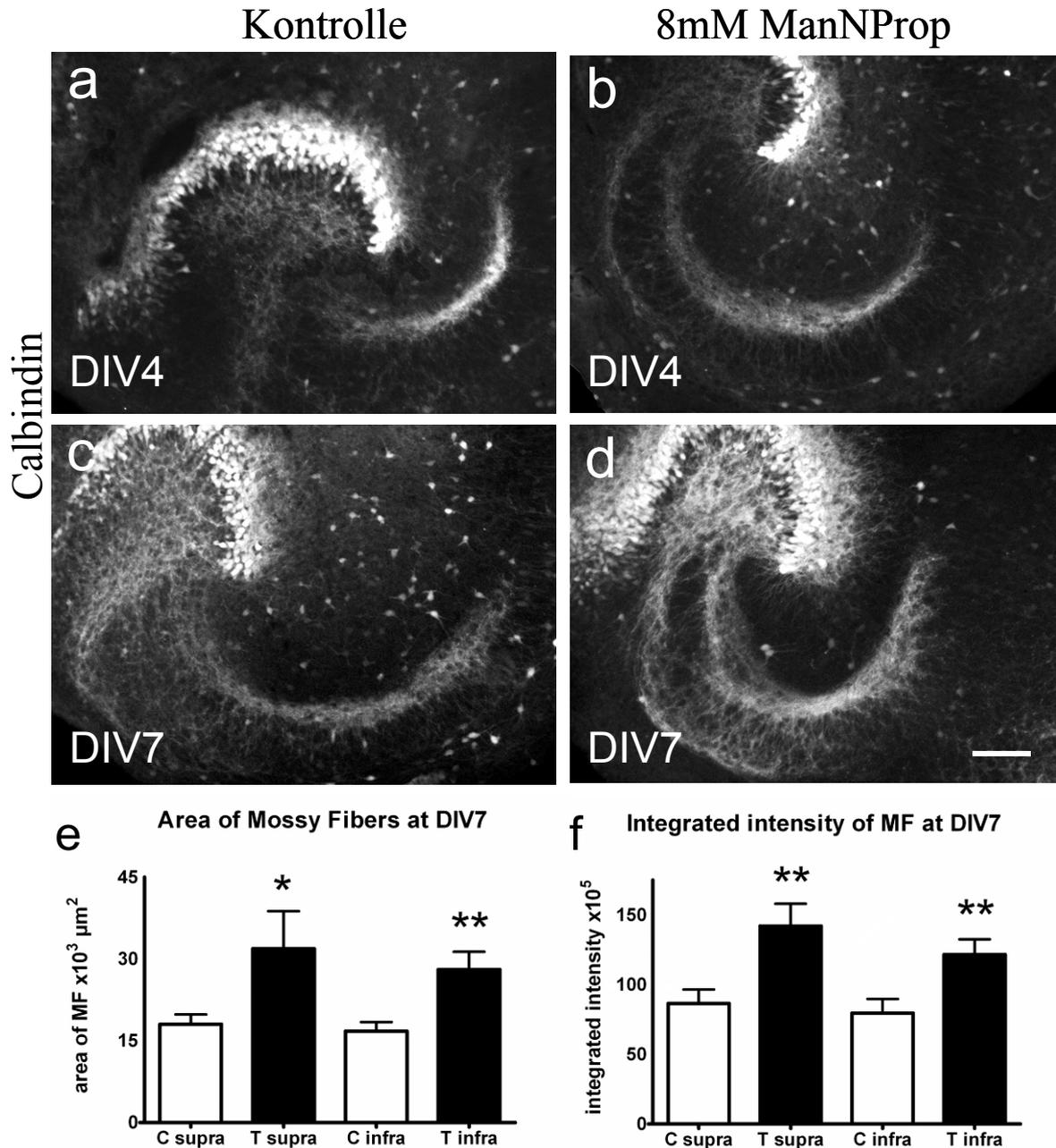
Weiterhin wurde in unserer Arbeitsgruppe die Auswirkung der Hemmung von ST8SiaII auf die NCAM- und PSA-Expression *in vitro* und *in vivo* untersucht (Vogt et al., zur *Veröffentlichung eingereicht*). Dort konnte mittels Immunfluoreszenz für NCAM und PSA gezeigt werden, dass durch den Mangel von PSA die NCAM-Expression in aberranten MF nicht verändert ist, aber auch kein PSA auf den Fasern exprimiert wird, sondern lediglich in geringem Maß auf korrekt endigenden MF detektiert werden kann.

### **3.2.3 Inhibition der PSA-Synthese fördert axonales Auswachsen *in vitro***

Organotypische Schnittkulturen vom Hippocampus wurden mit 8mM ManNProp behandelt und mit Kontrollkulturen gleichen Alters auf das Auswachsen von MF verglichen. Dazu wurden unter standardisierten Bedingungen die Intensität und die Gesamtfläche der Calbindin-Immunfluoreszenz der MF-Projektion gemessen. Die Kontrollschnitte hatten ab DIV4 eine klar abgrenzbare suprapyramidale (Abb. 7a) und ab DIV7 eine sich entwickelnde infrapyramidale MF-Projektion (Abb. 7c). In PSA mangelnden Kulturen schien das axonale Auswachsen beschleunigt zu sein: Sie zeigten an DIV4 einen längeren und stärker betonten suprapyramidalen MF-Trakt. Auch konnte bereits zu diesem Zeitpunkt ein entstehendes infrapyramidales Bündel detektiert werden (Abb. 7b). Zu DIV7 ist die Bildung des infrapyramidalen MF-Traktes im Vergleich zu Kontrollschnitten offensichtlich voran geschritten (Abb. 7d). Fortlaufende Hemmung der Polysialylierung mit 8mM ManNProp bewirkt also eine bedeutsame Förderung des axonalen Auswachsens der MF (Abb. 7e), die auch über Inkubationszeiten von 14 Tagen *in vitro* erhalten blieb.

**Abb. 7:**

PSA-Hemmung fördert axonales Auswachsen.



a) + c) In Kontrollschnitten sind die suprapyramidalen MF an DIV4 normal entwickelt, während die infrapyramidalen MF erst ab DIV7 klar abzugrenzen sind.

b) + d) Bei Hemmung der PSA-Synthese erscheinen suprapyramidale und infrapyramidale MF zu den gleichen Zeitpunkten DIV4 und DIV7 deutlich fortgeschritten entwickelt als in den Kontrollschnitten.

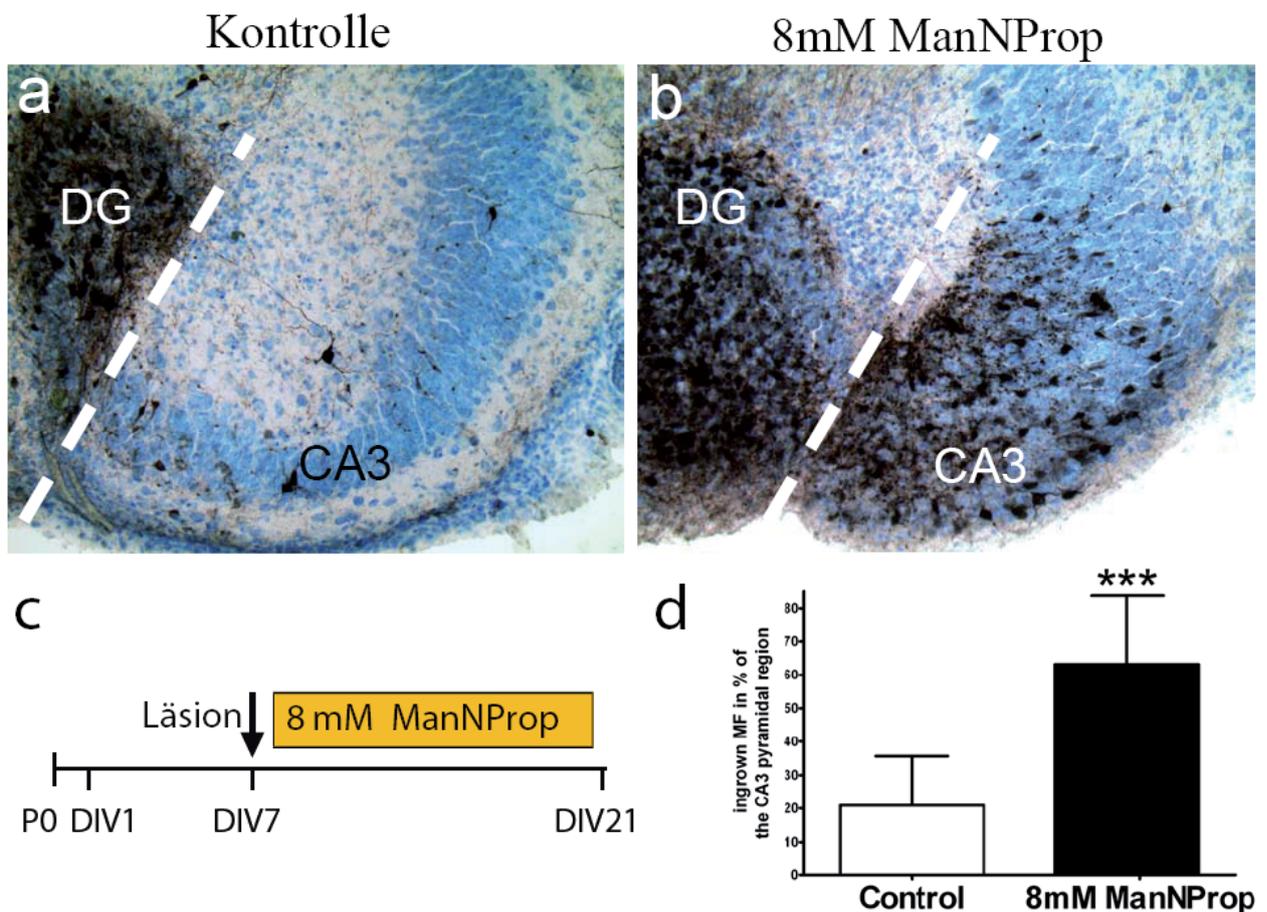
e) + f) Messung der Fläche der ausgewachsenen suprapyramidalen (supra) infrapyramidalen (infra) MF in Kontrollen (C: Control, weiß) im Vergleich zu den ManNProp-behandelten (T: treated, schwarz) und Bestimmung der integrierten Signalintensität bestätigt einen signifikanten Effekt des axonalen Auswachsens (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ). Maßbalken 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.4 PSA-Mangel begünstigt die Regeneration der Moosfasern nach Läsion

Der beobachtete trophische Effekt während der Entwicklung, warf die Frage nach Einfluss der Polysialylierung auf die Regeneration von Neuriten nach Läsion auf. Dazu wurden MF in hippocampalen Schnittkulturen zum Zeitpunkt DIV7 lädiert und anschließend für 14 Tage mit 8mM ManNProp behandelt (Abb. 8c). Reinnervierende MF wurden mittels Biocytin-Tracing sichtbar gemacht. In Kontrollschnitten traten nur einzelne Fasern in die CA3-Region ein, während in ManNProp behandelten Kulturen eine signifikante Zunahme der Reinnervation der MF gefunden wurde (Abb. 8b) und einige von diesen Fasern sogar typische Giant boutons en passant aufwiesen.

#### Abb. 8:

Hemmung der PSA-Synthese fördert die MF-Reinnervation der CA3-Region nach Läsion.



a) + b) 14 Tage nach Läsion wurden wieder ausgewachsene MF-Axone mit dem anterograden Tracer Biocytin markiert und mittels DAB visualisiert. Die Kontrollkultur in a) zeigt eine spärliche Reinnervation während die Hemmung der PSA-Synthese zu einer verstärkten Reinnervation der CA3-Region führt [b)].

c) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung mit Zeitpunkt der Explantation und Läsion

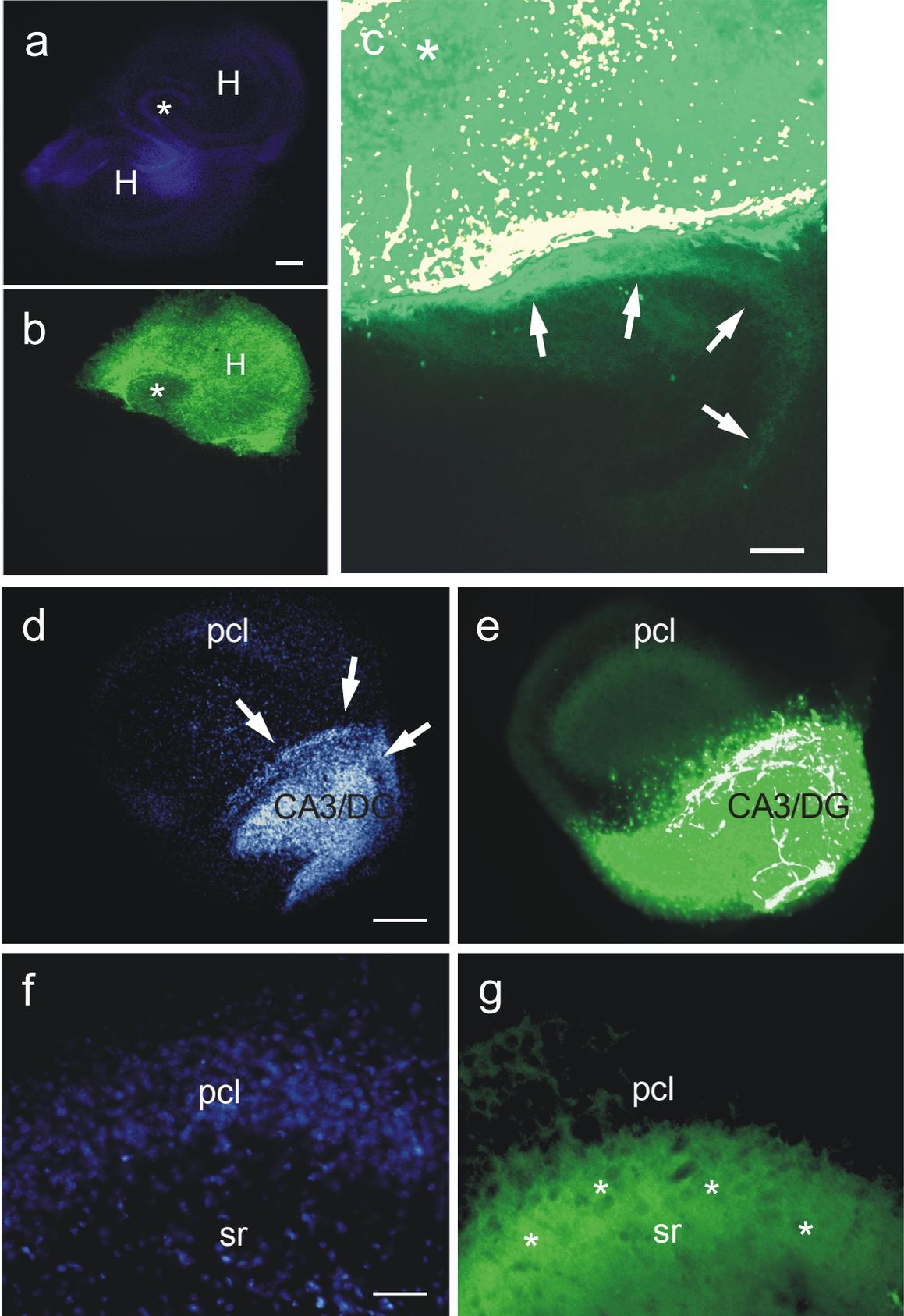
d) Abgebildet ist der prozentuale Anteil, der durch das Einwachsen der MF bedingten Biocytinmarkierung innerhalb der CA3-Region in Kontrollen (Control, weiß) im Vergleich zu den mit 8mM ManNProp behandelten Kulturen. Die quantitative Analyse zeigt eine vermehrte Reinnervation durch Biocytin-markierte MF in der mit ManNProp behandelten Gruppe von Kulturen (\*\*P<0,001).

### 3.3 Organotypische Kokultur mit $\beta$ -Aktin-GFP transgenen Hirnschnitten

Die Kokulturen von GFP-transgenen Schnitten und wildtyp-Gewebe überlebten die Inkubationsperiode und kultivierte Hirnschnitte von transgenen Mäusen konnten durch die intensive grüne Fluoreszenz identifiziert werden. Kernfärbung mit dem blauen Farbstoff Hoechst 33258 erbrachte eine erhaltene Zytoarchitektur in beiden Teilen der Kokultur (Abb. 9a, d, f, 10a). In den kokultivierten Hippocampi waren die Körnerzellschicht des DG und das Pyramidenzellband (pcl) des Hippocampus klar abzugrenzen (Abb. 9d, f). Die Fluoreszenz des GFP hat nicht das morphologische Erscheinungsbild des DG und des Pyramidenzellbandes aus dem Teil der Kokultur, der aus der  $\beta$ -Aktin-GFP transgenen Maus (Abb. 9b) entsprang, beeinträchtigt. In der Vergrößerung konnten die GFP-enthaltenden axonalen Ausläufer bis in den anliegenden hippocampalen Schnitt der wildtyp Maus erfolgt werden. In der Abbildung 9c sind Bündel von GFP-markierten Fasern beim Eintritt in den kokultivierten Hippocampus zu detektieren. Diese Fasern verteilen sich innerhalb der korrekten Terminationszonen, der inneren Molekularschicht des DG und der CA3-Region. In einem Durchgang der Experimente, bei dem ein Schnitt der CA3-Region mit einem Schnitt der CA1-Region kokultiviert wurden, ergab die Hoechst-Markierung eine gut erhaltene Zytoarchitektur des CA1-Anteils und des CA3-Explantats. Nach neun Tagen in vitro (DIV9) war eine Schaffer-Kollateral-Projektion von den GFP-positiven CA3-Pyramidenzellen ausgehend im CA1-Gebiet des wildtyp Gewebes zu beobachten. Die Mehrzahl der  $\beta$ -Aktin-GFP exprimierenden Fasern bildeten einen dichten Plexus oberhalb der Pyramidenzellschicht im Stratum radiatum des CA1-Schnittes, die Zellschicht aussparend (Abb. 9e, g).

**Abb. 9:**

Axonale Projektionen in Schnittkulturen von GFP- $\beta$ -Aktin transgenem Hippocampus und wildtyp Hippocampus.

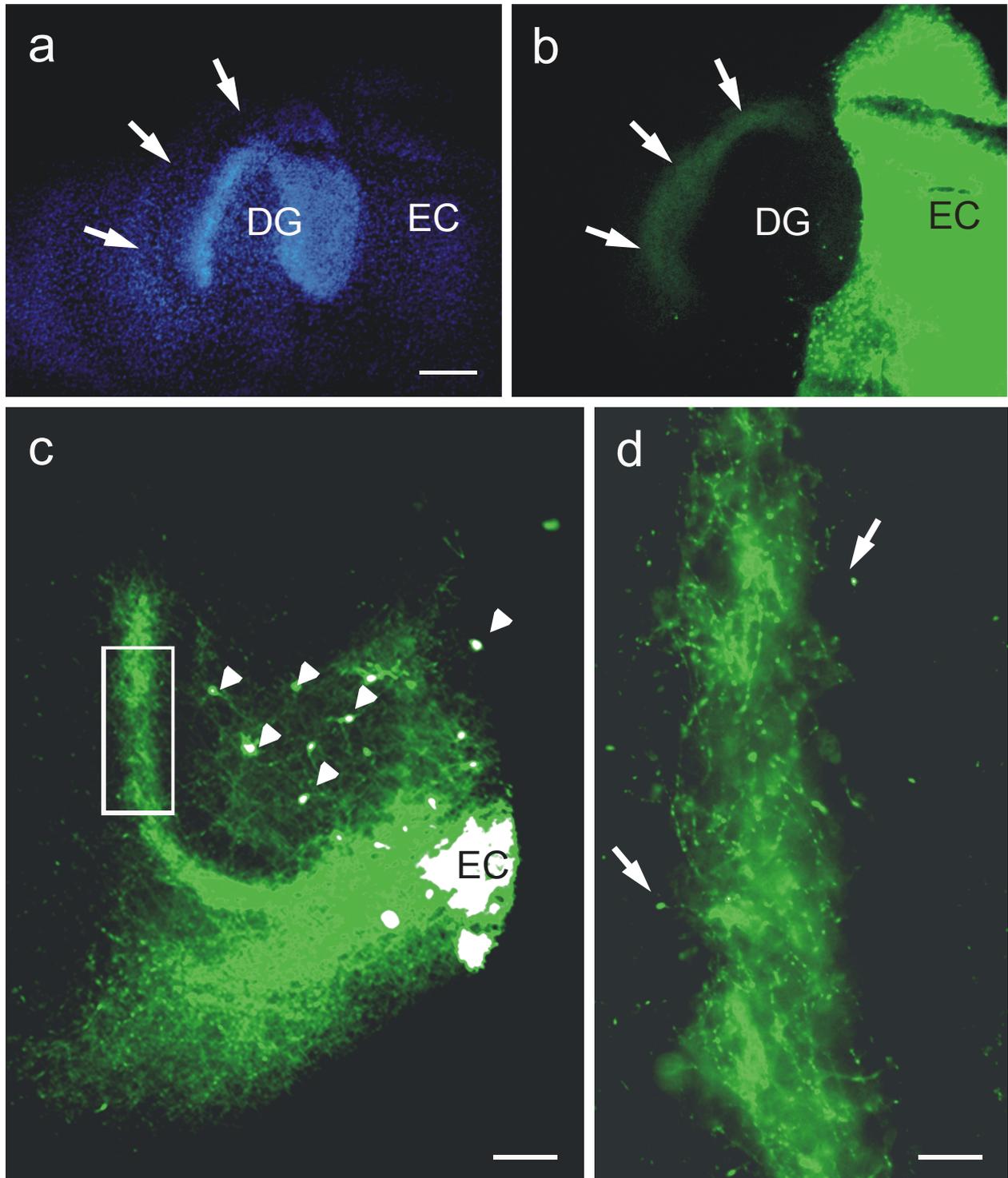


- a) Die Übersicht zweier Hoechst 33258 kerngefärbter kokultivierter hippocampaler Schnitte (DIV8) zeigt, dass die Zytoarchitektur erhalten und die Prinzipalneurone des DG (Stern) und dem Hippocampus (H) in einzelnen Schichten arrangiert sind.
- b) Die gleiche Kultur wie in a) bei gleicher Vergrößerung. GFP ist nur auf der Seite des transgenen Schnittes enthalten.
- c) GFP-enhaltende axonale Fortsätze, die in den wildtyp Hippocampus eingedrungen sind. Die Pfeile markieren das Gebiet, in dem die Fasern innerhalb der inneren Molekularschicht des DG und im Hilus zu finden sind.
- d) – g) Kokultur eines GFP- $\beta$ -Aktin transgenen CA3/DG-Schnittes und eines Schnittes der CA1-Region aus wildtyp Hippocampus zum Zeitpunkt DIV9.
- d) Übersichtsaufnahme dieser kerngefärbten Kokultur. Die Pyramidenzellschicht (engl. pyramidal cell layer: pcl) der CA1-Region auf der einen Seite und die Körnerzellschicht (Pfeile) im anderen Teil der Kokultur können identifiziert werden.
- e) In der korrespondierenden Fluoreszenzaufnahme ist ein GFP-markiertes Fasergeflecht im gesamten Stratum radiatum (sr) des kokultivierten CA1-Schnittes zu finden.
- f) + g) Diese Aufnahmen illustrieren die höchste Intensität von GFP-enhaltenden Schaffer-Kollateralen im Stratum radiatum (sr, hier unterhalb des Pyramidenzellbandes). Das Zellband (pcl) ist fast vollkommen frei von markierten Afferenzen. Nur wenige markierte Fasern verlaufen im Alveus (hier oberhalb des Pyramidenzellbandes). Die Sterne markieren den Verlauf der Schaffer-Kollateralen. Maßbalken 350  $\mu\text{m}$  (a, b), 140  $\mu\text{m}$  (c), 650  $\mu\text{m}$  (d, e), 175  $\mu\text{m}$  (f, g).

Von entorhinalen Afferenzen ist bekannt, dass sie ihre spezifische Termination in der Marginalzone des Hippocampus und des DG entwickeln (Frotscher und Heimrich, 1993, Li, et al., 1993). In Abb. 10 zeigt sich, dass GFP-enhaltende entorhinale Axone eine entorhinale-hippocampale Projektion formen, die in der Epifluoreszenz gut zu beurteilen ist. Wie in situ, bildet diese Projektion ihre schichtenspezifische Verteilung in der äußeren Molekularschicht des DG des wildtyp Schnittes aus (Abb. 10b, c). Bei höherer Vergrößerung konnten zahlreiche perlschnurartige Fasern über lange Strecken hinweg und zusätzlich einige Wachstumskegel beobachtet werden (Abb. 10d). In mit Hoechst 33258 gegen gefärbten Kulturen war sowohl das suprapyramidale als auch das infrapyramidale Blatt des DG (der durch die längere Inkubationsperiode etwas verbreitert erschien) als vollständig entwickelt zu detektieren. In allen Gruppen der Kokulturen (Hippocampus-Hippocampus, CA3-CA1, EC-Hippocampus) waren stellenweise GFP-positive Zellen zu finden, die offensichtlich über größere Entfernungen hinweg in den benachbarten wildtyp-Schnitt migriert sind (Abb. 9e, 10c). Diese Zellen variierten in Größe und Form und einige von ihnen bildeten längere Zellausläufer aus (Abb. 10c).

**Abb. 10:**

Die schichtenspezifische GFP- $\beta$ -Aktin markierte entorhino-hippocampale Projektion hat sich in der organotypischen Kokultur zum Zeitpunkt DIV9 entwickelt.



- a) Beobachtung in der Zellkernmarkierung mit Hoechst 33258 in einer Kokultur. Das infrapyramidale Blatt des DG hat sich während der Inkubationsperiode verbreitert. Die Pfeile markieren die Terminationszone der entorhinalen Afferenzen, die sich in b) darstellen.
- b) GFP-enthaltende Axone (Pfeile) wachsen aus dem entorhinalen Cortex (EC) und terminieren korrekt in der äußeren Molekularschicht des DG.
- c) Diese Aufnahme zeigt einen Schnitt des entorhinalen Cortex und dessen deutliche axonale Projektion in das wildtyp Gewebe hinein. Auffällig die zahlreichen Zellen (Pfeilspitzen), die aus dem EC-Schnitt in den hippocampalen Schnitt migriert sind. Einige Zellen erscheinen multipolar und mit längeren Fortsätzen ausgestattet. Die umrandete Region in höherer Vergrößerung in d).
- d) Viele axonale Querschnitte sind zu beobachten. Einige dieser Axone tragen einen Wachstumskegel an ihrer Spitze. Messbalken 200 $\mu$ m (a, b), 150 $\mu$ m (c), 30 $\mu$ m (d).