

Aus der Klinik für Neonatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

### **Die Wirkung von Inflammation auf die Hyperoxie-induzierte Schädigung des unreifen Gehirns**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
MSc., Dipl.-Ing. (FH) Felix Brehmer  
aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Methodik .....</b>	<b>5</b>
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>6</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>8</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>12</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>16</b>

## 1. Abstract

Sehr unreife Frühgeborene sind nicht selten von psychomotorischen Entwicklungsdefiziten betroffen, deren Ausmaß und Schweregrad linear mit der Unreife zunehmen. Kritisch sind dabei u.a. diffuse Schädigungen der weißen Substanz. Für den dabei zu beobachtenden Untergang von Oligodendroglia-Vorläuferzellen werden intrauterine Infektionen, die zu den häufigsten Ursachen von Frühgeburt zählen, und relative Hyperoxien als Pathomechanismen diskutiert, da es nach der Geburt unvermeidlicherweise zu einem dramatischen Anstieg der Sauerstoffspannung im Gewebe kommt. In der hier vorgelegten Arbeit wurde die sensible Phase für eine Hyperoxie-induzierte Schädigung der weißen Substanz im Rattenmodell definiert und die Abhängigkeit der Vulnerabilität vom Reifestatus primärer Ratten-Oligodendrozyten nachgewiesen. Darauf aufbauend wurden entsprechende Zellkultur- und Tierversuche um einen zeitlich-definierten inflammatorischen Trigger erweitert und mit der Hyperoxie während der zuvor definierten sensiblen Phase kombiniert.

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* resultiert die Inflammation in einer partiellen Protektion vor Hyperoxie-induziertem Zelluntergang. Die protektiven Eigenschaften der Inflammation beruhen vermutlich auf einer verstärkten Expression von Interleukin-10 und der Superoxid-Dismutase. Neben diesen vorteilhaften Eigenschaften bewirkt die Inflammation jedoch eine verminderte Reifung der Oligodendrozyten. Bemerkenswert dabei ist, dass sowohl Myelinisierungsprozesse sowie die Mikrostruktur der weißen Substanz nach der Inflammations-bedingten Reifeverminderung ebenso nachhaltig gestört sind, wie durch den Hyperoxie-induzierten Zelltod. Inflammation, Hyperoxie und die Kombination aus beiden Noxen schädigen das unreife Gehirn in gleichem Maße, wobei sich die zugrundeliegenden Mechanismen maßgeblich unterscheiden.

## 2. Einleitung

Weltweit werden jährlich 12 - 13 Millionen Kinder zu früh geboren, für Industrienationen ergibt sich somit ein Anteil von 8 – 10 % [1,2]. Als kausale Ursachen für die hohe Inzidenz der Frühgeburtlichkeit wird der intrauterinen Infektion eine maßgebliche Rolle zu gesprochen [3,4]. Mit dem ersten Atemzug ändert sich die Sauerstoffversorgung des Neugeborenen und geht mit einem dramatischen Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks einher [5]. Die eventuell notwendige Behandlung eines respiratorischen Distresssyndroms eines Frühgeborenen mit der Gabe von nicht physiologischen Sauerstoffkonzentrationen kann den arteriellen Sauerstoffpartialdruck weiter steigern [6]. Bei einem Frühgeborenen trifft diese relative Hyperoxie, die auch ohne Sauerstofftherapie vorhanden ist, auf einen unreifen Organismus. Das Gehirn ist zu diesem Zeitpunkt in der Phase des rapiden Gehirnwachstums [7,8], was es besonders sensibel für eine ganze Reihe von Noxen macht [9]. Klinische und experimentelle Daten zeigen, dass sowohl inflammatorische Prozesse [10–12] als auch eine erhöhte Sauerstoffkonzentration [6,13–15] eine frühkindliche Hirnschädigung induzieren können. Die doppelte Schädigung des Gehirns durch Inflammation gefolgt von einer Hyperoxie beschreibt die klinische Situation von vielen Frühgeborenen sehr gut. Dennoch gab es bisher keine publizierten Untersuchungen zu der Wechselwirkung beider Noxen im Hinblick auf die Hirnentwicklung von Frühgeborenen.

In dieser Arbeit soll die Wirkung von Inflammation auf die Hyperoxie-induzierte Schädigung des unreifen Gehirns untersucht werden. Aus anderen Arbeiten ist bereits bekannt, dass der Hyperoxie-induzierte Zelltod altersabhängig ist [13] und die Oligodendrozyten in der frühkindlichen Hirnschädigung eine prominente Rolle einnehmen [16]. Daher sollte zunächst die Abhängigkeit der Sensibilität gegenüber Sauerstoff vom Reifestaus der Oligodendrozyten *in vitro* demonstriert werden. Daran anknüpfend sollte in einem Oligodendrozyten-Mikroglia-Ko-Kultur-Modell die Wirkung der Inflammation auf den Hyperoxie-induzierten Zelltod der Oligodendrozyten im entsprechenden Reifestadium untersucht werden. Des Weiteren sollte die Altersabhängigkeit bzw. die sensible Phase der durch Hyperoxie gestörten Entwicklung der Oligodendrozyten *in vivo* anhand der Expression des basischen Myelin Proteins (MBP) ermittelt werden. Darauf aufbauend sollten im modifizierten Tiermodell die Parameter Zelltod, Reifung der Oligodendrozyten, Myelinisierung und

Mikrostruktur der weißen Substanz nach Schädigung durch Inflammation, Hyperoxie und der Kombination beider Noxen charakterisiert werden.

### 3. Methodik

Die herangezogenen Arbeitsmethoden sind in den jeweiligen Publikationen im Detail beschrieben [17,18]. Hier folgt eine kurze Beschreibung der genutzten Versuchsmodelle.

Für alle Zellkulturexperimente wurden aus Gehirnen neugeborener Ratten gemischte Glia-Kulturen hergestellt. Aus diesen lassen sich über ein definiertes Schüttel-Protokoll Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen separieren. Über die Kultivierungsdauer sowie die Zugabe von Wachstumsfaktoren lässt sich der Reifegrad der Oligodendrozyten (unreif: O4<sup>+</sup>, O1<sup>-</sup>, MBP<sup>-</sup>; reif: O4<sup>+</sup>, O1<sup>+</sup>, MBP<sup>+</sup>) kontrollieren. In Oligodendrozyten-Kulturen wurde die Reifeabhängigkeit der Hyperoxie-induzierten Schädigung ermittelt und eine mögliche Protektion durch den pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, die Überexpression des *bcl2*-Gens und die Substitution mit den anti-oxidativen Enzymen Katalase, Superoxid-Dismutase und Ebselen untersucht. In Ko-Kulturen aus Mikroglia-Zellen und Oligodendrozyten wurde die Interaktion von einer durch Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Inflammation und Hyperoxie untersucht, wobei die LPS-Stimulation entweder zeitgleich mit dem Beginn der Hyperoxie oder 24 h vor Beginn der Hyperoxie erfolgte.

Im Tiermodell wurden Ratten am 3., 6. oder 10. Lebenstag einer Hyperoxie ausgesetzt, um die sensible Phase der Hyperoxie-induzierten Schädigung der weißen Substanz zu ermitteln. In einer zweiten Versuchsreihe wurde den Ratten am 3. Lebenstag 0,25 mg/kg LPS i.p. appliziert und am 6. Lebenstag wurden diese einer Atmosphäre mit 80 % Sauerstoff ausgesetzt. Analog zu den *in vitro* Experimenten wurde auch hier die zeitgleiche Exposition von LPS und Hyperoxie am 6. Lebenstag untersucht. An Hand der Parameter Zelltod, Reifung der Oligodendrozyten, Myelinisierung und Mikrostruktur der weißen Substanz wurde die Schädigung des Gehirns durch Inflammation, Hyperoxie und der Kombination beider Noxen charakterisiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Hyperoxie induziert apoptotischen Zelltod in unreifen, aber nicht in reifen Oligodendrozyten-Kulturen (Gerstner et al., 2008).

Bereits nach einer Hyperoxie-Dauer von 6 h (80 % Sauerstoff) ist die Zytotoxizität in primären unreifen ( $O4^+$ ,  $O1^-$ ,  $MBP^-$ ) Oligodendrozyten-Kulturen signifikant erhöht bis nach 24 h lediglich noch wenige lebende Zellen nachweisbar sind (Gerstner et al., 2008, Abb. 1). Im Vergleich dazu zeigen sich reife ( $O4^+$ ,  $O1^+$ ,  $MBP^+$ ) Oligodendrozyten resistent gegenüber hohen Sauerstoff-Konzentrationen (Gerstner et al., 2008, Abb. 2). Sowohl die exergone Administration des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk als auch die Überexpression des *bcl2*-Gens erhöhen die Überlebensrate unreifer Oligodendrozyten-Kulturen, was auf Apoptose als vorliegende Form des Zelltodes deutet (Gerstner et al., 2008, Abb. 3 und 4). Des Weiteren bewirken antioxidative Enzyme (Katalase, Superoxiddismutase und Ebselen) eine Protektion gegenüber Hyperoxie-induziertem Zelltod (Gerstner et al., 2008, Abb. 6).

### 4.2 Inflammatorische Bedingungen erhöhen die Überlebensrate von unreifen Oligodendrozyten nach Hyperoxie-Exposition, verzögern jedoch deren Differenzierung (Brehmer et al., 2012).

In einer Ko-Kultur aus unreifen Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen reduziert die Stimulation mit LPS den Hyperoxie-induzierten Zelluntergang der Oligodendrozyten. Dieser Effekt tritt sowohl bei gleichzeitiger Applikation von LPS und Hyperoxie als auch bei einer 24 h prä-Inkubation mit LPS auf (Brehmer et al., 2012, Abb. 5A und S2). Potentielle Schlüsselmoleküle für diese partielle Protektion sind Interleukin-10 und die Superoxid-Dismutase, welche inflammations-vermittelt verstärkt exprimiert werden (Brehmer et al., 2012, Abb. 6). Oligodendrozyten in einer mit LPS-stimulierten Ko-Kultur zeigen eine defizitäre Entwicklung an Hand der reduzierten Anzahl an Fortsätzen (Brehmer et al., Abb. 5B und C). Auf Genebene werden die Entwicklungs- und Reife-Marker *SOX9*, *SOX10*, *CNP* und *MBP* nach LPS-Stimulation vermindert detektiert (Brehmer et al., 2012, Abb. 7).

### 4.3 Die sensible Phase der Hyperoxie-induzierten Hypomyelinisierung ist bei Ratten auf die erste Lebenswoche beschränkt (Gerstner et al., 2008).

Die Untersuchung der beginnenden Myelinisierung des Gehirns stellt ein prominentes Charakteristikum bei der Determination einer Schädigung der

Oligodendrozyten *in vivo* dar. Daher wurde die Myelinisierung von jungen Ratten am 11. Lebenstag untersucht, die am 3., 6. oder 10. Lebenstag einer Hyperoxie ausgesetzt wurden. Es zeigte sich, dass bei Ratten, die am 3. oder 6. Lebenstag für 24 h einer Atmosphäre mit 80 % Sauerstoff ausgesetzt wurden, ein deutlicher Verlust an MBP nachzuweisen war, wohingegen diese Hypomyelinisierung bei Tieren, die am 10. Tag mit einer Hyperoxie behandelt wurden, nicht detektiert wurde (Gerstner et al., 2008, Abb. 9).

*4.4 Die Hyperoxie führt bei Oligodendrozyten zu Zelltod, wohingegen eine Inflammation die Reifung der Oligodendrozyten verzögert (Brehmer et al., 2012).*

Die Analyse des Zelltodes von Oligodendrozyten mittels einer Ko-Färbung von Hirnschnitten mit Olig2 und terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) ergab, dass eine Hyperoxie am 6. Lebenstag zum Absterben von Oligodendrozyten im Cortex, Thalamus und der weißen Substanz führt. Bei Tieren, denen am 3. Lebenstag systemisch LPS appliziert wurde, konnte hingegen kein signifikant erhöhtes Absterben der Oligodendrozyten festgestellt werden. Analog der *in vitro* Daten war eine partielle Protektion vor Hyperoxie-induziertem Zelltod nach LPS-Applikation in allen untersuchten Hirnregionen zu verzeichnen (Brehmer et al., 2012, Abb. 4B). Aus der durchgeführten Reifeanalyse geht hervor, dass die Anzahl an unreifen (O4<sup>+</sup>) Oligodendrozyten durch eine systemische Inflammation nicht beeinflusst wird, jedoch die Zahl der reifen (APC-CC1<sup>+</sup>) Oligodendrozyten drastisch reduziert ist. In der Hyperoxie-Gruppe ist ein Verlust an unreifen und reifen Oligodendrozyten zu verzeichnen (Brehmer et al., 2012, Abb. 4C und D).

*4.5 Inflammation, Hyperoxie und die Kombination aus beiden Noxen schädigen das unreife Gehirn in gleichem Maße (Brehmer et al., 2012).*

Als Marker für die Schädigung des Gehirns wurden in dieser Studie die Myelinisierung (MBP-Expression) und die Mikrostruktur (fraktionelle Anisotropie in der diffusionsgewichteten Magnetresonanztomografie) der weißen Substanz am 11. und 21. Lebenstag gewählt. Die MBP-Expression ist am 11. Lebenstag nach LPS Applikation, Hyperoxie und dem kombinierten Schädigungsmodell beider Noxen deutlich reduziert, es sind aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den

einzelnen Schädigungsmodellen vorhanden. Am 21. Lebenstag näherte sich die MBP-Expression der behandelten Tiere wieder dem Niveau der Kontrolltiere an (Brehmer et al., 2012, Abb. 2 und S1). Die Werte der fraktionellen Anisotropie sind zu diesem Zeitpunkt unter allen Schädigungsparametern reduziert. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Schädigungsmodellen sind auch hier nicht vorhanden (Brehmer et al., 2012, Abb. 3).

## 5. Diskussion

Mit einem Anteil von 8-10 % der Lebendgeburten, stellen Frühgeborene die größte Patientenkohorte innerhalb der Pädiatrie dar. Es ist bekannt, dass inflammatorische Bedingungen eine Frühgeburt induzieren können und an der Hirnschädigung betroffener Neonaten beteiligt sind [19]. Seitdem klinische und experimentelle Arbeiten darauf hinweisen, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen ebenfalls zur frühkindlichen Hirnschädigung beitragen [13,14,20,21], stellte sich die grundlegende Frage in wie fern beide Noxen miteinander interagieren.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Oligodendrozyten *in vivo* und *in vitro* in einer definierten Phase ihrer Entwicklung, durch apoptotischen Zelltod sterben, wenn sie hohen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt werden. Eine LPS-induzierte systemische Inflammation bewirkt hingegen keinen Zelltod, sondern blockiert entscheidende Differenzierungsprozesse der Oligodendrozyten. In beiden Fällen ist die Anzahl an reifen Oligodendrozyten reduziert, was zu einer defizitären Myelinisierung und damit einhergehend zu einer nachhaltig gestörten Mikrostruktur der weißen Substanz führt. Interessanterweise bieten Prozesse, die die Inflammation begleiten, eine Protektion der Oligodendrozyten vor Hyperoxie-induziertem Zelltod, ohne dabei die Myelinisierung positiv zu beeinflussen.

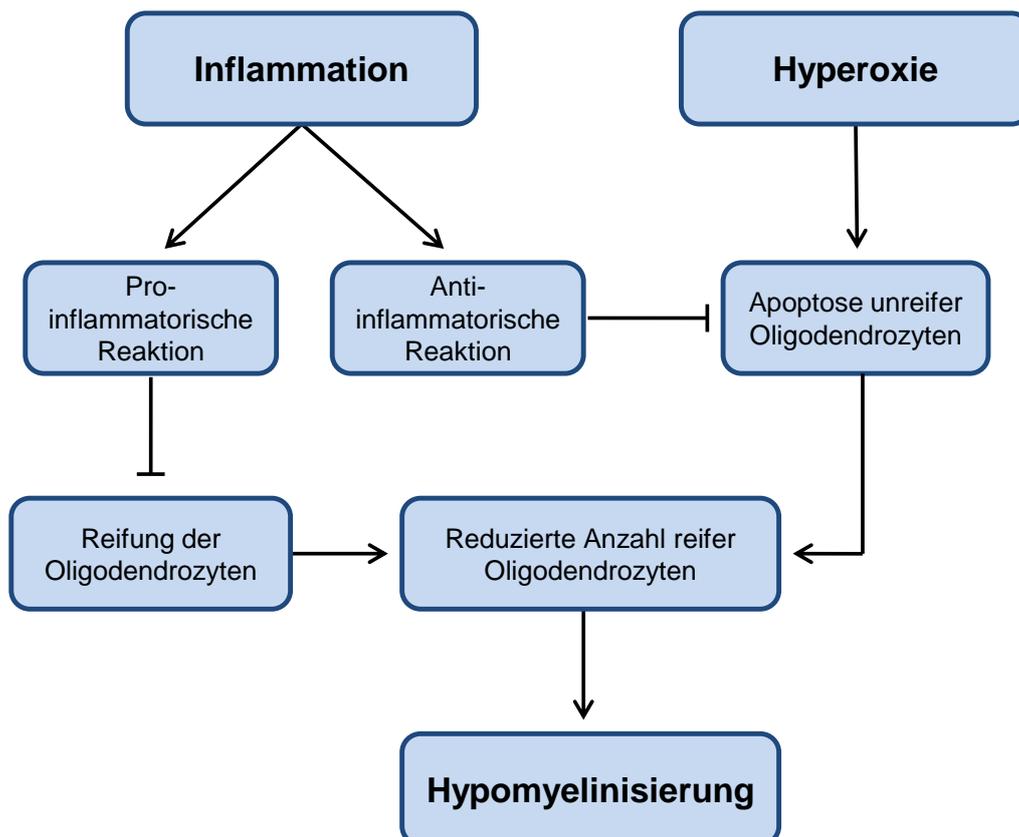
In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in einem anderen Modell der systemischen Inflammation, in dem gering dosiertes IL-1 $\beta$  appliziert wurde, kein Zelltod nachgewiesen, sondern ein Ungleichgewicht der Transkriptionsfaktoren, die die Reifung der Oligodendrozyten steuern, festgestellt. Auch hier kam es zu einer anormalen Myelinisierung und einer veränderten Mikrostruktur der weißen Substanz [22]. Eine veränderte Mikrostruktur der weißen Substanz, detektiert durch eine reduzierte fraktionelle Anisotropie, ist ein Zeichen einer gestörten Oligodendrozyten-Axon-Interaktion, die für eine adäquate Myelinisierung notwendig ist [23]. Die langfristigen Konsequenzen dieser unzureichenden Myelinisierung sind

Veränderungen des psychomotorischen Verhaltens sowie der zeitlichen und räumlichen Gedächtnisfunktion [22].

Im Gegensatz dazu ist nach einer Hyperoxie apoptotischer Zelltod die dominante Form der Schädigung. Die Anzahl TUNEL-positiver Oligodendrozyten ist nach der Hyperoxie stark erhöht, was zu einer dezimierten Anzahl an reifen und unreifen Oligodendrozyten führt. Reife Oligodendrozyten sind nicht sensibel gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen. Es ist daher anzunehmen, dass die verminderte Anzahl an reifen Oligodendrozyten aus der Schädigung ihrer unreifen Vorläuferzellen resultiert. Kürzlich wurde bereits der apoptotische Zelluntergang von unreifen Oligodendrozyten nach Hyperoxie-Exposition von Mäusen beschrieben [14]. Dabei waren Veränderungen der Mikrostruktur der weißen Substanz bis zum 60. Lebensstag nachweisbar. Die Folgen der Hyperoxie-Exposition auf das Verhalten der Tiere sind Hyperaktivität und eine verminderte motorische Koordination [24]. Ebenso wurde ein Verlust an unreifen Oligodendrozyten und daraus resultierend eine dezimierte Anzahl reifer Oligodendrozyten und eine gestörte Myelinisierung nach einer Hyperoxie mit 60 % Sauerstoff von E21 bis P7 beschrieben [25]. Obwohl Hinweise vorliegen, dass eine Hyperoxie zu Imbalancen im ohnehin noch unreifen Redoxstatus führt [26,21], inflammatorische Komponenten involviert sind [20,21,27] und sowohl der intrinsische als auch extrinsische Apoptoseweg unter Hyperoxie signalisierend wirken [28,29], sind die Mechanismen dieser Sauerstofftoxizität noch nicht vollständig verstanden.

Der Grad der Schädigung der weißen Substanz, bezogen auf Myelinisierung und Mikrostruktur, ist in dem untersuchten Tiermodell bei Inflammation und Hyperoxie identisch. Nach Kombination beider Noxen ist die Anzahl TUNEL-positiver Oligodendrozyten verglichen mit der Hyperoxie-Gruppe reduziert. Diese partielle Protektion bewirkt allerdings weder einen Vorteil hinsichtlich der Myelinisierung noch der Mikrostruktur der weißen Substanz. In Zellkultur-Experimenten konnten wir ebenfalls einen protektiven Effekt der inflammatorischen Komponenten aufzeigen. Da Mikroglia-Zellen, nicht aber Oligodendrozyten, den Toll-Like-Rezeptor 4 exprimieren [30], wurde eine Ko-Kultur aus Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen etabliert. Der Toll-Like Rezeptor 4 ist essentiell für die LPS-induzierte Hirnschädigung [31]. Stimuliert man diese Ko-Kulturen mit LPS sind die Oligodendrozyten vor Hyperoxie-induziertem Zelltod geschützt, zeigen aber eine deutliche Reifeverminderung. Mikroskopisch ist die Reifeverminderung an einer reduzierten Anzahl an Fortsätzen pro Zelle detektierbar während sich auf Genebene verminderte

Transkripte der Entwicklungs- und Reife-Marker *Sox9*, *Sox10*, *CNP* und *MBP* zeigten. In den ersten Stunden nach LPS-Stimulation sind die Zytokine *TNF $\alpha$*  und *IL-1 $\beta$*  hochreguliert, die Expression nimmt aber im weiteren Verlauf der inflammatorischen Reaktion ab. Von beiden Zytokinen ist bekannt, dass sie die Reifung von Oligodendrozyten negativ beeinflussen [32,33]. Die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins *IL-10* und des reaktiven Sauerstoff Spezies Scavanger *SOD2* steigt stetig innerhalb der ersten 24 h an. *IL-10* werden protektive Eigenschaften bei der inflammatorischen Schädigung der weißen Substanz zugesprochen [34,35]. Aus eigenen Daten ist eine Protektion der Oligodendrozyten gegenüber Hyperoxie durch exogene SOD-Administration bekannt [17]. Das temporäre Genexpressionsprofil lässt auf eine Kompensation der pro-inflammatorischen Reaktion schließen, während die anti-inflammtorischen Mechanismen für den *in vivo* und *in vitro* detektierten protektiven Effekt verantwortlich sein könnten.



**Abb.1 Interaktion von Inflammation und Hyperoxie im unreifen Gehirn.**

Inflammatorische Bedingungen verzögern die Reifung der Oligodendrozyten, wohingegen eine Hyperoxie Apoptose induziert. Die anti-inflammatorische Komponente bietet eine Protektion vor Hyperoxie-induziertem Zelltod. Inflammation, Hyperoxie und die Kombination beider Noxen führen zur Hypomyelinisierung.

Der Effekt einer inflammatorischen Reaktion vor einem zweiten Insult steht auch in anderen Modellen der frühkindlichen Hirnschädigung im Fokus der Wissenschaft. Die Applikation von LPS 4 – 72 h vor einem hypoxisch-ischämischen Insult reduziert beispielsweise das Infarkt-Volumen [36–38]. Diese Prä-Konditionierung existiert auch in adulten Modellen des Schlaganfalls [39,40] und Traumas [41]. Konträr dazu sind Sensibilisierungs-Effekte durch LPS im Hypoxie-Ischämie-Model beschrieben worden [42–44]. Diese Studien legen nahe, dass die Art des Effektes von der LPS-Dosis und dem temporären Abstand zwischen LPS-Applikation und zweitem Insult abhängt [45,46]. In unseren Experimenten führte die zeitgleiche und zeitlich versetzte Anwendung von LPS und Hyperoxie zu nahezu identischen Ergebnissen, einer verminderten Sensibilität gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen. Somit scheint die LPS-Dosis eine entscheidendere Rolle als der zeitliche Ablauf der Noxen zu haben.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Inflammation und Hyperoxie zu zellulären Veränderungen, explizit einer defizitären Entwicklung und apoptotischen Zelltod bei unreifen Oligodendrozyten, führen. Beides hat eine gestörte Myelinisierung und eine veränderte Mikrostruktur der weißen Substanz zur Folge. Aus pharmakologischer Sicht bieten Strategien zur Förderung der Oligodendrozyten-Reifung sowie anti-apoptotisch wirkende Medikamente einen möglichen Schutz vor schweren Schädigungen der weißen Substanz. Die Rolle anderer wahrscheinlich beteiligter Zellarten, wie Astrozyten und infiltrierende Immunzellen, sollte weiter untersucht werden. Auch eventuell auftretende Unterschiede hinsichtlich der Remyelinisierung nach Inflammation und Hyperoxie, sowie Tierverhaltensstudien sind notwendig, um die Interaktion von Inflammation und Hyperoxie weiter zu charakterisieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, et al. (2010) The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 88: 31–38. doi:10.2471/BLT.08.062554.
2. Mathews TJ, Miniño AM, Osterman MJK, Strobino DM, Guyer B (2011) Annual summary of vital statistics: 2008. *Pediatrics* 127: 146–157. doi:10.1542/peds.2010-3175.
3. Andrews WW, Goldenberg RL, Hauth JC (1995) Preterm labor: emerging role of genital tract infections. *Infect Agents Dis* 4: 196–211.
4. Randis TM (2010) Progress toward improved understanding of infection-related preterm birth. *Clin Perinatol* 37: 677–688. doi:10.1016/j.clp.2010.06.001.
5. Castillo A, Sola A, Baquero H, Neira F, Alvis R, et al. (2008) Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics* 121: 882–889. doi:10.1542/peds.2007-0117.
6. Collins MP, Lorenz JM, Jetton JR, Paneth N (2001) Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatr Res* 50: 712–719. doi:11726729.
7. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105: 7–17.
8. Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3: 79–83. doi:118862.
9. Volpe JJ (2009) Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology* 8: 110–124. doi:16/S1474-4422(08)70294-1.
10. Mallard C, Wang X (2012) Infection-induced vulnerability of perinatal brain injury. *Neurol Res Int* 2012: 102153. doi:10.1155/2012/102153.
11. Schlapbach LJ, Aebischer M, Adams M, Natalucci G, Bonhoeffer J, et al. (2011) Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants. *Pediatrics* 128: e348–357. doi:10.1542/peds.2010-3338.
12. Boksa P (2010) Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 24: 881–897. doi:10.1016/j.bbi.2010.03.005.
13. Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, Jarosz B, Korobowicz E, et al. (2004) Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis* 17: 273–282. doi:S0969-9961(04)00172-X.

14. Schmitz T, Ritter J, Mueller S, Felderhoff-Mueser U, Chew L-J, et al. (2011) Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *J Neurosci* 31: 4327–4344. doi:10.1523/JNEUROSCI.3942-10.2011.
15. Deulofeut R, Critz A, Adams-Chapman I, Sola A (2006) Avoiding hyperoxia in infants < or = 1250 g is associated with improved short- and long-term outcomes. *J Perinatol* 26: 700–705. doi:10.1038/sj.jp.7211608.
16. Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA (2011) The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *Int J Dev Neurosci* 29: 423–440. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.02.012.
17. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, et al. (2008) Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *J Neurosci* 28: 1236–1245. doi:10.1523/JNEUROSCI.3213-07.2008.
18. Brehmer F, Bendix I, Prager S, Van de Looij Y, Reinboth BS, et al. (2012) Interaction of Inflammation and Hyperoxia in a Rat Model of Neonatal White Matter Damage. *PLoS One* 7: e49023. doi:10.1371/journal.pone.0049023.
19. Bashiri A, Burstein E, Mazor M (2006) Cerebral palsy and fetal inflammatory response syndrome: a review. *J Perinat Med* 34: 5–12. doi:10.1515/JPM.2006.001.
20. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Polley O, Dzierko M, Leineweber B, et al. (2005) Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Ann Neurol* 57: 50–59. doi:10.1002/ana.20322.
21. Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K, Stadelmann C, Sifringer M, et al. (2003) Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatr Res* 54: 179–184. doi:12761356.
22. Favrais G, Van de Looij Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, et al. (2011) Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol* 70: 550–565. doi:10.1002/ana.22489.
23. Hüppi PS, Dubois J (2006) Diffusion tensor imaging of brain development. *Semin Fetal Neonatal Med* 11: 489–497. doi:10.1016/j.siny.2006.07.006.
24. Schmitz T, Endesfelder S, Reinert M-C, Klinker F, Müller S, et al. (2012) Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. *Exp Neurol* 235: 374–379. doi:10.1016/j.expneurol.2012.03.002.
25. Vottier G, Pham H, Pansiot J, Biran V, Gressens P, et al. (2011) Deleterious effect of hyperoxia at birth on white matter damage in the newborn rat. *Dev Neurosci* 33: 261–269. doi:10.1159/000327245.
26. Sifringer M, Brait D, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, et al. (2010) Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain Behav Immun* 24: 792–799. doi:10.1016/j.bbi.2009.08.010.

27. Sifringer M, Genz K, Brait D, Brehmer F, Löber R, et al. (2009) Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Dev Neurosci* 31: 394–402. doi:10.1159/000232557.
28. Sifringer M, Bendix I, Börner C, Endesfelder S, Von Haefen C, et al. (2012) Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. *Cell Death Dis* 3: e250. doi:10.1038/cddis.2011.133.
29. Dzierko M, Boos V, Sifringer M, Polley O, Gerstner B, et al. (2008) A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. *Ann Neurol* 64: 664–673. doi:10.1002/ana.21516.
30. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, et al. (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22: 2478–2486. doi:20026268.
31. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, et al. (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8514–8519. doi:12824464.
32. Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG (2003) Differential roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1  $\beta$  in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Research* 975: 37–47. doi:10.1016/S0006-8993(03)02545-9.
33. Pang Y, Campbell L, Zheng B, Fan L, Cai Z, et al. (2010) Lipopolysaccharide-activated microglia induce death of oligodendrocyte progenitor cells and impede their development. *Neuroscience* 166: 464–475. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.040.
34. Rodts-Palenik S, Wyatt-Ashmead J, Pang Y, Thigpen B, Cai Z, et al. (2004) Maternal infection-induced white matter injury is reduced by treatment with interleukin-10. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1387–1392. doi:10.1016/j.ajog.2004.06.093.
35. Pang Y, Rodts-Palenik S, Cai Z, Bennett WA, Rhodes PG (2005) Suppression of glial activation is involved in the protection of IL-10 on maternal E. coli induced neonatal white matter injury. *Brain Res Dev Brain Res* 157: 141–149. doi:10.1016/j.devbrainres.2005.03.015.
36. Eklind S, Mallard C, Arvidsson P, Hagberg H (2005) Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. *Pediatr Res* 58: 112–116. doi:01.PDR.0000163513.03619.8D.
37. Lin H-Y, Huang C-C, Chang K-F (2009) Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat. *Pediatr Res* 66: 254–259. doi:10.1203/PDR.0b013e3181b0d336.
38. Hickey E, Shi H, Van Arsdell G, Askalan R (2011) Lipopolysaccharide-induced preconditioning against ischemic injury is associated with changes in toll-like

receptor 4 expression in the rat developing brain. *Pediatr Res* 70: 10–14. doi:10.1203/PDR.0b013e31821d02aa.

39. Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, et al. (1997) Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 748: 267–270.
40. Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, et al. (2007) Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1663–1674. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600464.
41. Longhi L, Gesuete R, Perego C, Ortolano F, Sacchi N, et al. (2011) Long-lasting protection in brain trauma by endotoxin preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468087>. Accessed 7 June 2011.
42. Wang X, Hagberg H, Nie C, Zhu C, Ikeda T, et al. (2007) Dual role of intrauterine immune challenge on neonatal and adult brain vulnerability to hypoxia-ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 552–561. doi:10.1097/01.jnen.0000263870.91811.6f.
43. Eklind S, Mallard C, Leverin AL, Gilland E, Blomgren K, et al. (2001) Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury. *Eur J Neurosci* 13: 1101–1106. doi:11285007.
44. Yang L, Sameshima H, Ikeda T, Ikenoue T (2004) Lipopolysaccharide administration enhances hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *J Obstet Gynaecol Res* 30: 142–147.
45. Mallard C, Hagberg H (2007) Inflammation-induced preconditioning in the immature brain. *Semin Fetal Neonatal Med* 12: 280–286. doi:10.1016/j.siny.2007.01.014.
46. Durukan A, Tatlisumak T (2010) Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection. *Exp Transl Stroke Med* 2: 2. doi:10.1186/2040-7378-2-2.

## 7. Anhang

### Ausgewählte Publikationen

Die folgenden Publikationen liegen dieser Promotion zugrunde.

- [1] **Brehmer F\***, Bendix I\*, Prager S, van de Looij Y, Reinboth BS, Zimmermanns J, Schlager GW, Brait D, Sifringer M, Endesfelder S, Sizonenko S, Mallard C, Bühler C, Felderhoff-Mueser U, Gerstner B (2012) *Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage*. Plos One 7(11):e49023
  
- [2] Sifringer M\*, Brait D\*, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, **Brehmer F**, von Haefen C, Friedman A, Soreq H, Bendix I, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. (2010) *Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain*. Brain Behav Immun 24(5):792-9
  
- [3] Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, **Brehmer F**, Neve RL, Felderhoff-Mueser U, Volpe JJ, Rosenberg PA (2008) *Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter*. J Neurosci 28:1236-45

\* Geteilte Autorenschaft

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Felix Brehmer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Wirkung von Inflammation auf die Hyperoxie-induzierte Schädigung des unreifen Gehirns“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

## **Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation**

**Publikation I:** The Journal of Neuroscience, 2008, 28(5):1236-1245

(Impact Faktor 7.115).

**Titel:** Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter

**Autoren:** Bettina Gerstner, Tara M. DeSilva, Kerstin Genz, Amy Armstrong, Felix Brehmer, Rachael L. Neve, Ursula Felderhoff-Mueser, Joseph J. Volpe und Paul A. Rosenberg.

15 % eigener Anteil:

Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für diese Publikation ist mit 15 % anzugeben. Neben den Untersuchungen zur Reifeabhängigkeit des Hyperoxie-induzierten Zelltodes primärer Oligodendrozyten wurde auch die histologische Untersuchung der Myelinisierung zu diesem Artikel vom Promovenden durchgeführt.

**Publikation II:** Brain, Behavior, and Immunity, 2010, 24(5):792-9

(Impact Faktor 4.946).

**Titel:** Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain

**Autoren:** Marco Sifringer, Daniela Brait, Ulrike Weichelt, Gabriel Zimmerman, Stefanie Endesfelder, Felix Brehmer, Clarissa von Haefen, Alon Friedman, Hermona Soreq, Ivo Bendix, Bettina Gerstner und Ursula Felderhoff-Mueser.

10 % eigener Anteil:

Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für diese Publikation ist mit 10 % anzugeben. Der Promovend war an der Durchführung der Tierversuche beteiligt und hat aus dem gewonnenen Gewebe RNA bzw. Protein isoliert. Desweiteren hat er die Expressionsanalyse von HO-1 auf Gen- und Proteinebene durchgeführt.

**Publikation III:** PLoS One, 2012, 7(11):e49023

(Impact Faktor 4.411).

**Titel:** Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage.

**Autoren:** Felix Brehmer, Ivo Bendix, Sebastian Prager, Yohan van de Looij, Barbara S. Reinboth, Julia Zimmermanns, Gerald W. Schlager, Daniela Brait, Marco Sifringer, Stefanie Endesfelder, Stéphane Sizonenko, Carina Mallard, Christoph Bühler, Ursula Felderhoff-Mueser und Bettina Gerstner

45 % eigener Anteil:

Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für diese Publikation ist mit 45 % anzugeben. Es wurden alle Zellkultur-Experimente vom Promovenden geplant, durchgeführt und analysiert. Er war an allen Tierversuchen beteiligt und hat die *in vivo* Reifeanalyse sowie die Untersuchung des basischen Myelin Proteins durchgeführt. Das Manuskript ist von Ihm erstellt worden.

---

Felix Brehmer

---

Prof. Dr. Christoph Bühler

## Liste eigener Publikationen

- [1] **Brehmer F**, Bendix I, Prager S, van de Looij Y, Reinboth BS, Zimmermanns J, Schlager GW, Brait D, Sifringer M, Endesfelder S, Sizonenko S, Mallard C, Bühner C, Felderhoff-Mueser U, Gerstner B (2012) *Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage*. Plos One 7(11):e49023
  
- [2] Sifringer M, Brait D, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, **Brehmer F**, von Haefen C, Friedman A, Soreq H, Bendix I, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. (2010) *Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain*. Brain Behav Immun 24(5):792-9
  
- [3] Sifringer M, Genz K, Brait D, **Brehmer F**, Löber R, Weichelt U, Kaindl AM, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U (2009) *Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases*. Dev Neurosci 31(5):394-402
  
- [4] Stark S, Schüller A, Sifringer M, Gerstner B, **Brehmer F**, Weber S, Altmann R, Obladen M, Bühner C, Felderhoff-Mueser U (2008) *Suramin induces and enhances apoptosis in a model of hyperoxia-induced oligodendrocyte injury*. Neurotox Res 13(3-4):197-207
  
- [5] Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, **Brehmer F**, Neve RL, Felderhoff-Mueser U, Volpe JJ, Rosenberg PA (2008) *Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter*. J Neurosci 28:1236-45

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei den Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion betreut, unterstützt und gefördert haben: Dr. Ivo Bendix, Dr. Marco Sifringer, Dr. Josephine Herz, Dr. Bettina Gerstner, Prof. Dr. Christoph Bühler, Dr. Stefanie Endesfelder und Prof. Dr. Ursula Felderhoff-Mueser.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.