

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

DISSERTATION

Die Entwicklung kortikaler GABAerger Interneurone im
Mausmodell perinataler Hirnschädigung

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elena Sophia Salome auf dem Brinke

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Abstract	5
English Abstract	7
1 Einleitung	9
1.1 Frühgeburt und ihre Komplikationen	9
1.2 Mechanismen der Schädigung des sich entwickelnden Gehirns	10
1.3 GABAerge Interneurone und ihr Einfluss auf die physiologische Hirnentwicklung	12
1.4 Die Interneuron-Hypothese für psychiatrische Erkrankungen und die Gruppe der ‚Hirnentwicklungsstörungen‘	15
1.5 Veränderungen des GABAergen Systems bei ehemals frühgeborenen Kindern und Jugendlichen	17
1.6 Die Entwicklung kortikaler GABAerger Interneurone nach postnataler Hyperoxie im Mausmodell	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	19
2.1.2 Hergestellte Puffer und Lösungen	20
2.1.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	21
2.1.4 Enzyme, Molekulargewichtsmarker und Reagenzien der Genexpressionsanalyse	22
2.1.5 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Genexpressionsanalyse	23
2.1.6 Geräte und Gebrauchsmaterialien	24
2.1.7 Softwareprogramme	25
2.2 Methoden	25
2.2.1 Tierversuchsmodell und Organentnahme	25
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	27
2.2.3 Histologische Methoden	34

2.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	35
2.2.5	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Erhöhter oxidativer Stress im Mausmodell nach neonataler Hyperoxie	36
3.2	Veränderungen von Subtypen GABAerger Interneurone nach postnataler Hyperoxie	36
3.3	Untersuchung auf gestörte Reifung der Interneurone nach Hyperoxie anhand der Expression von GABA-Rezeptoruntereinheiten	40
3.4	Apoptose GABAerger Interneurone ist nach neonataler Hyperoxie unverändert	41
3.5	Autophagie im Kortex Hyperoxie-exponierter Mäuse nicht erhöht	43
3.6	Hyperoxie hat keinen Einfluss auf die Proliferation GABAerger Interneurone im Kortex	45
3.7	Verminderte Genexpression von <i>Sdf1</i> und <i>Gdnf</i> im Kortex nach Hyperoxie	47
4	Diskussion	49
4.1	Perinatale Hirnschäden durch Hyperoxie	49
4.2	Veränderungen der Ausbildung und Reifung GABAerger Subtypen durch Hyperoxie	50
4.3	Regulation von Proliferation durch Sauerstoff	53
4.4	Fehlende Relevanz von Apoptose und Autophagie für die interneuronale Schädigung im Hyperoxie-Tiermodell	54
4.5	Einfluss von Hyperoxie auf die Migrationsfaktoren SDF1 und GDNF	57
4.6	Limitationen	60
4.7	Ausblick	62
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	66
	Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung	80
	Curriculum vitae	81
	Publikationsliste	84
	Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADHD	<i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i>
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Störung
Atg3 / Atg12	<i>autophagy related gene 3 / 12</i>
Ak	Antikörper
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	<i>copy DNA</i> , komplementäre DNA
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C-motif) receptor 4</i> , CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	<i>desoxyribonuclease</i> , Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektro-Enzephalogramm
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbend assay</i>
ESD	<i>extreme studentized deviate method</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> , γ -Aminobuttersäure
GABRA	<i>GABA receptor subunit alpha</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GE	<i>Ganglionic eminences</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grünfluoreszierendes Protein
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HYP	Hyperoxie
IHC	Immunhistochemie
ILCOR	<i>International Liaison Comittee on Resuscitation</i>
Kap.	Kapitel
LGE	<i>Lateral ganglionic eminences</i>
LHX6	<i>LIM-homeobox protein 6</i>

MDA	Malondialdehyd
MGE	<i>Medial ganglionic eminences</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOR	Normoxie
P	postnataler Tag
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Lösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PV	Parvalbumin
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
P62	<i>nucleoporin P62</i>
RELN	Reelin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	<i>ribonuclease</i> , Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i> , reverse Transkriptase-PCR
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
SDF1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SST	Somatostatin
SSW	Schwangerschaftswoche/n
SVZ	Subventrikuläre Zone
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
VIP	<i>Vasoactive intestinal polypeptide</i>
VZ	Ventrikuläre Zone
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
5HT ₃ AR	Serotoninrezeptor 5HT ₃

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Vereinfachte Darstellung der Subtypeneinteilung kortikaler GABAerger Interneurone
- Abb. 2 Migrationswege der GABAergen Interneurone in der Maus
- Abb. 3 Gewichtszunahme des menschlichen und murinen Gehirns
- Abb. 4 Relative Hyperoxie (80%) der Versuchsgruppe vom postnatalen Tag (P)5 – P7 (48 h) mit anschließender Erholung in Raumluft
- Abb. 5 Erhöhter oxidativer Stress im Kortex der neonatalen Mäuse nach Hyperoxie-Exposition
- Abb. 6 RNA-Expression der Subtypen GABAerger Interneurone im murinen Kortex
- Abb. 7 Anzahl kortikaler PV-positiver (PV+) Interneurone in juvenilen Mäusen nach Hyperoxie
- Abb. 8 RNA-Expression der α -Untereinheiten des GABA-Rezeptors nach neonataler Hyperoxie
- Abb. 9 Kein erhöhter Zelltod in GABAergen Zellen nach Hyperoxie-Exposition
- Abb. 10 Hyperoxie hat keinen direkten Einfluss auf Autophagie im Gehirn neonataler Mäuse
- Abb. 11 Analyse der Proliferation GABAerger Interneurone
- Abb. 12 Auswirkungen von Hyperoxie auf die RNA-Expression kortikaler Migrationsfaktoren

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen
Tab. 2	Hergestellte Puffer und Lösungen
Tab. 3	Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe
Tab. 4	Enzyme, Molekulargewichtsmarker und Reagenzien der Genexpressionsanalyse
Tab. 5	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Genexpressionsanalyse
Tab. 6	Verwendete Geräte und Gebrauchsmaterialien
Tab. 7	Verwendete Softwareprogramme
Tab. 8	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription der RNA
Tab. 9	Reaktionsansatz für den Mastermix für die Reverse Transkription der RNA
Tab. 10	Reaktionsverlauf der Reversen Transkription der RNA
Tab. 11	Reaktionsansatz der <i>β-Aktin</i> Kontroll-PCR
Tab. 12	Reaktionsverlauf der <i>β-Aktin</i> Kontroll-PCR
Tab. 13	Reaktionsansatz der qPCR (Taqman)
Tab. 14	Reaktionsansatz der qPCR (SybrGreen)
Tab. 15	Reaktionsverlauf der qPCR

Abstract

15 Millionen Kinder kommen jedes Jahr weltweit zu früh zur Welt. Frühgeburt ist eine der größten Herausforderungen der pädiatrischen Intensivmedizin und insbesondere eine Geburt unter 1500 g Geburtsgewicht geht mit dem Risiko erhöhter neonataler Mortalität und Morbidität einher. Zu den Komplikationen gehören u. a. neurokognitive Defizite, Aufmerksamkeitsstörungen und Verhaltensauffälligkeiten, die mitunter erst im Laufe der Kindheit erkennbar werden. Zudem treten psychiatrische Krankheitsbilder wie ADHS, Autismus und Schizophrenie bei ehemaligen Frühgeborenen gehäuft auf. Neben infektiös-inflammatorischen Prozessen werden auch hohe postnatale Sauerstoffkonzentrationen als Ursache subtiler organischer Hirnschädigungen angenommen. Hypothetisch könnten spezifische Veränderungen GABAerger Interneurone im zerebralen Kortex eine wesentliche Rolle insbesondere für die Entstehung neuropsychiatrischer Symptome einnehmen. Interneurone vollziehen gegen Ende der Schwangerschaft und unmittelbar postnatal wesentliche Entwicklungsschritte, die sie besonders vulnerabel gegenüber perinatalen Einflüssen machen.

Um im Mausmodell den für das Frühgeborene eintretenden O₂-Anstieg zu simulieren und eine Schädigung des unreifen Gehirns durch Sauerstoff zu untersuchen, erhielten 5 Tage alte Wildtyp- bzw. GAD67-GFP-Knock-In-Mäuse über 48 Stunden 80% O₂ (Hyperoxie) und wurden anschließend bei Raumluft (21% O₂, Normoxie) bis zum postnatalen Tag (P) 7, 9, 11, 14 oder 30 gehalten. Die Ausbildung interneuronaler Subtypen wurde anhand von *LIM-homeobox protein 6 (Lhx6)*, *Reelin (Reln)*, *Somatostatin (Sst)*, *Vasoactive intestinal polypeptide (Vip)* und Parvalbumin (PV) untersucht. Zur weiteren Charakterisierung der Schädigung GABAerger Interneurone untersuchten wir die Apoptoseaktivität (CASP3A) und die Zellproliferation (Ki67) in immunhistochemischen Färbungen. Die Autophagie-Prozesse wurden anhand von *Atg3*, *Atg12* und *p62* (qPCR) sowie LC3 und P62 (Western Blot) analysiert. Die RNA-Expressionen von *Stromal cell-derived factor 1 (Sdf1)* und seinem Rezeptor *C-x-c chemokine receptor type 4 (Cxcr4)* sowie *Glia cell line-derived neurotrophic factor (Gdnf)* dienten zur Einschätzung der Migration.

Im Ergebnis zeigte sich eine Hyperoxie-induzierte Reduktion GABAerger Subtypen anhand *Lhx6* (P9), *Reln* (P9), *Sst* (P9, P11) und *Vip* (P11). In der juvenilen Maus (P14, P30) ließ sich eine verminderte Anzahl PV-exprimierender Interneurone beobachten. Neonatale Hyperoxie hatte keinen Einfluss auf Apoptose, Autophagie oder Proliferation. Die Hyperoxie-Exposition führte zu einer Verminderung der Migrationsmarker *Gdnf* (P11) sowie *Cxcr4* (P9, P11) und *Sdf1* zu allen untersuchten Zeitpunkten (P7 – P11).

Wir konnten zeigen, dass die Exposition des unreifen Gehirns gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen die Entwicklung kortikaler GABAerger Interneurone in der Maus deutlich beeinträchtigt. Eine erhöhte Sauerstoffexposition könnte demnach ursächlich für die Reduktion von GABAergen Interneuronen bei Frühgeborenen sein.

English Abstract

Every year 15 million children worldwide are born too early and premature birth is one of the biggest challenges in pediatric intensive care. Birth under 1500 g is associated with a particularly high risk of neonatal mortality and morbidity. Among the associated complications are neurocognitive deficits as well as attention and behavioral disorders, which may only become apparent later in childhood. Moreover, psychiatric diseases like ADHD, autism, and schizophrenia are more common in infants born preterm. Besides infectious-inflammatory processes, high postnatal oxygen values are assumed to cause subtle forms of preterm brain injury. We hypothesize that specific alterations in cortical GABAergic interneurons might play a role in the pathogenesis of neuropsychiatric symptoms. Interneurons undergo important developmental steps towards the end of pregnancy and around birth, which might render them particularly vulnerable for perinatal stressors.

To simulate the postnatal increase in oxygen tension and study its potentially damaging effects on the developing brain, 5 day old wild type or GAD67-GFP-knock in mice received 80% oxygen over 48 hours (hyperoxia) and were kept in room air (21% oxygen, normoxia) until postnatal days (P) 7, 9, 11, 14 or 30, respectively. Interneuron subtype differentiation was studied using the markers LIM-homeobox protein 6 (*Lhx6*), reelin (*Reln*), somatostatin (*Sst*), vasoactive intestinal polypeptide (*Vip*), or parvalbumin (PV). For further characterization of a potential interneuron damage, activities of apoptosis (CASP3A) and cell proliferation (Ki67) in GFP+ cells were determined. Autophagy was assessed for *Atg3*, *Atg12* and p62 (PCR) as well as LC3 and P62 (western blot). RNA expressions of stromal-cell derived factor 1 (*Sdf1*), its receptor c-x-c chemokine receptor type 4 (*Cxcr4*) and glia cell line-derived neurotrophic factor (*Gdnf*) were used to assess GABAergic interneuron migration.

We found a hyperoxia-induced reduction of GABAergic subtypes with diminished levels of *Lhx6* (P9), *Reln* (P9), *Sst* (P9, P11) and *Vip* (P11) gene expression. In juvenile mice (P14, P30) numbers of PV+ interneurons were decreased. Hyperoxia had no effect on either apoptosis, autophagy or proliferation. Hyperoxia exposure led to reductions in gene expression levels of the migratory factors *Gdnf* (P11) as well as *Cxcr4* (P9, P11) and *Sdf1* at all time points examined (P7 – P11).

We showed that the exposure of the immature brain to high oxygen concentrations can disrupt development of cortical GABAergic interneurons in mice. Hyperoxia could thus account for GABAergic deficits commonly observed in infants born preterm.

1 Einleitung

1.1 Frühgeburt und ihre Komplikationen

Weltweit kommen jährlich etwa 15 Millionen Kinder vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) und damit zu früh zur Welt [1]. Unter den wichtigsten Ursachen von Frühgeburt finden sich neben ethnischen und genetischen Faktoren, Stress und Infektions- bzw. Inflammationsprozesse [2]. Doch bei zwei Dritteln aller Frühgeburten weltweit bleibt die genaue Ursache unklar [3]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert vor der 28. SSW geborene Kinder als „extrem frühgeborene Kinder“, in der 28. bis 32. SSW geborene als „sehr frühgeborene Kinder“ und in der 32. bis zur 37. SSW als „mäßig bis spät frühgeborene Kinder“ [4].

Auch wenn Frühgeburt die häufigste Todesursache von Kindern unter fünf Jahren bleibt [5], sind die Überlebensraten in den letzten Jahren stetig gestiegen: Von einer in den Jahren 2008 bis 2011 geborenen Kohorte der 22. – 24. SSW in den USA überlebten 36%, allerdings erlitten 80% der Überlebenden neurologische Komplikationen [6]. Betrachtet man alle Frühgeborenen bis zur 37. SSW, zeigen etwa ein Viertel der Kinder im weiteren Entwicklungsverlauf neurologische Folgeschäden – im Vergleich zu < 5% der Reifgeborenen [7]. Das Gestationsalter bleibt der wichtigste Prädiktor des neurologischen Outcomes, doch tragen alle Frühgeborenen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Zerebralpareesen, Lernschwierigkeiten und Verhaltensauffälligkeiten, sowie Seh- und Hörstörungen [8, 9]. Hierbei können die Kinder trotz initial unauffälliger Kopf-Ultraschalluntersuchungen später im Leben funktionelle Defizite offenbaren [10]. Auch wurde beispielsweise die Aktivierung anderer Wege für auditive Sprachfunktionen bei ehemaligen Frühgeborenen im Schulkindalter gezeigt, was auf eine veränderte Hirnentwicklung hindeutet [11]. Generell zeigen Frühgeborene in MRT-Studien häufig veränderte Volumina der weißen und grauen Substanz [12-14], von denen man heute weiß, dass sie teilweise bis in das Erwachsenenalter persistieren [15].

Darüber hinaus wurde Frühgeburt in zahlreichen Studien mit einer erhöhten Prävalenz neuropsychiatrischer Krankheitsbilder in Zusammenhang gebracht [8]: Autismus-Spektrum-Störungen sind mit einer Prävalenz von bis zu 8% häufiger bei ehemals extrem Frühgeborenen zu finden, und oft assoziiert mit anderen neurokognitiven

Defiziten [16, 17]. Auch zeigte sich eine erhöhte Prävalenz von Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Störungen (ADHS). Das Risiko eines ehemaligen Frühgeborenen, im Schulkindalter an einer ADHS zu leiden, erhöht sich je nach Grad der Unreife studienabhängig auf das Zwei- bis Vierfache [18-20]. Und auch das Risiko einer Erkrankung an Schizophrenie scheint bei Frühgeborenen erhöht zu sein [21]. Konsistent über viele Studien sehen Johnson und Marlow (2011) charakteristische Verhaltensauffälligkeiten des Frühgeborenen, die sie unter dem Begriff ‚*premature phenotype*‘ zusammenfassen und der durch Aufmerksamkeitsdefizite, Angst und soziale Schwierigkeiten gekennzeichnet ist [22]. Die genannten Erkrankungen werden in der Literatur unter dem Begriff ‚*neurodevelopmental disorders*‘ – „Hirnentwicklungsstörungen“ – zusammengefasst (siehe hierzu Kap. 1.4).

Frühgeburt bleibt eine der größten Herausforderungen der pädiatrischen Intensivmedizin. Bei deutlich gesteigerter Überlebenswahrscheinlichkeit sind neurologische, neurokognitive sowie neuropsychiatrische Folgen im Laufe der Entwicklung zunehmend im Fokus – und die ihnen zugrundeliegenden neurobiologischen Mechanismen.

1.2 Mechanismen der Schädigung des sich entwickelnden Gehirns

Joseph J. Volpe führte 2005 den Begriff „Enzephalopathie des Frühgeborenen“ (*encephalopathy of prematurity*) ein und beschrieb diese mit neuropathologischen Korrelaten der periventrikulären Leukomalazie (PVL) sowie Schädigungen des Thalamus, der Basalganglien, des Kortex, Hirnstamms und Kleinhirns [23, 24].

Verschiedene externe Stimuli können hierzu in unterschiedlichen Anteilen beitragen. Zum einen kann eine maternale Infektion (die evtl. auch zur Frühgeburt geführt hat) mit einer Chorioamnionitis zur Induktion inflammatorischer Signalkaskaden im Fetus führen, die das Gehirn schädigen und kognitive Defizite zur Folge haben [25, 26]. Eine Schädigung des frühen postnatalen Gehirns kann auch durch Hypoxämie und Ischämie entstehen, wie im Falle eines kompromittierten Gasaustauschs über die Plazenta (Plazentainsuffizienz) oder mangelnde pulmonale Reife des Frühgeborenen. Typische Folge der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie ist die PVL, die in den ersten Lebenswochen ohne spezifische Symptome verbleibt und deren späteres klinisches Korrelat die spastische Zerebralparese ist [27].

Ein weiterer wichtiger Faktor für Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn ist die postnatal eintretende relative Hyperoxie. Sauerstoffniveaus im fetalen Leben sind niedrig – und die Entwicklung der meisten Organe findet in hypoxischer Umgebung statt („physiologische Hypoxie“ oder „in-situ-Normoxie“) [28, 29]. Der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) liegt *in utero* zwischen 22 mmHg und 32 mmHg [30]. Durch den vorzeitigen Verlust dieser intrauterinen Bedingungen befindet sich der Fetus als Frühgeborenes bei 21% Sauerstoffgehalt der umgebenden Raumluft in relativer Hyperoxie. Hierbei beträgt der postnatale Sauerstoffpartialdruck mit 50 – 80 mmHg bereits ohne externe Substitution von Sauerstoff ein Mehrfaches des intrauterinen PaO_2 [31]. Viele Frühgeborene bedürfen zudem zeitweise einer O_2 -Therapie, was Sauerstoff zu einem der meist genutzten Medikamente in der neonatalen Intensivmedizin macht [32]. Demgegenüber steht, dass die antioxidativen Enzymsysteme (wie Katalase, Superoxidismutase und Glutathionperoxidase) bei Frühgeborenen noch unreif sind, was eine direkte zelluläre Schädigung durch O_2 -Radikale begünstigt [33, 34].

Die Prinzipien in der Neonatologie zum Umgang mit optimalen unteren und oberen O_2 -Grenzwerten unterlagen dabei in den letzten Jahren einem großen Wandel. Es wurde zunehmend deutlich, dass niedrigere O_2 -Konzentrationen in den ersten Lebenswochen den Schweregrad einer Frühgeborenen-Retinopathie (ROP) mindern [35], pulmonale Komplikationen begrenzen [36] und zu einer niedrigeren Inzidenz von Zerebralpareesen führen [37]. Seit 2006 werden Neugeborene laut offiziellen Leitlinien des *International Liaison Committee on Resuscitation* (ILCOR) initial mit Raumluft (21% O_2) statt wie zuvor mit 100% O_2 reanimiert [38].

Gleichzeitig zeigten extrem Frühgeborene der amerikanischen SUPPORT-Studie unter niedrigeren O_2 -Sättigungen (85 – 89%) erhöhte Mortalitätsraten im Vergleich zur Gruppe mit O_2 -Sättigungen von 91 – 95%, wobei Überlebende weniger schwere Frühgeborenenretinopathien (ROP) aufwiesen [39].

Es ist noch immer nicht abschließend geklärt, welche Sauerstoffsättigungen bzw. Sauerstoffpartialdrücke für welches Kind zu welchem Zeitpunkt optimal sind [31]. Hierfür wird es u. a. wichtig sein, die genauen Interaktionen zwischen Sauerstoff und dem sich entwickelnden Gehirn zu kennen.

Pathologische Faktoren für die Hirnentwicklung des Frühgeborenen werden oftmals den perinatalen Stimuli Infektion/Inflammation, Hypoxie-Ischämie oder Hyperoxie zugeordnet, wobei additive und synergistische Effekte wahrscheinlich sind [40]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind oft weiterhin unklar. Vor allem die zu kognitiven Beeinträchtigungen und psychiatrischen Erkrankungen führenden Prozesse sind nicht im Detail verstanden. Eine Zellpopulation, die in Modellen psychiatrischer Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielt, ist die Gruppe der GABAergen Interneurone. Studien sowohl im Human- als auch im Tiermodell zu verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen deuten auf die Existenz feinsten Veränderungen in der exzitatorisch-inhibitorischen Balance zwischen Neuronen hin. Da GABAerge Interneurone wichtige Entwicklungsschritte aus Migration und Reifung im zweiten und dritten Trimenon der Schwangerschaft durchlaufen, könnten sie für Veränderungen des perinatalen Milieus zum Zeitpunkt einer Frühgeburt besonders empfindlich sein.

1.3 GABAerge Interneurone und ihr Einfluss auf die physiologische Hirnentwicklung

Interneurone sind lokale Netzwerkneurone und beinhalten als Neurotransmitter hauptsächlich Gamma-Aminobuttersäure (GABA) [41]. Sie wirken in allen bisher untersuchten Spezies zunächst exzitatorisch auf die sie umgebenden Pyramidalneurone [42]. Erst im Laufe der Entwicklung entfalten sie ihre für adulte Systeme typische inhibitorische Wirkung auf neuronale Verbindungen (durch die verspätete Expression des Chlorid-Transporters KCC2), im Menschen beginnend etwa ab der 20. SSW [43]. In Mäusen findet dieser *Switch* innerhalb der zweiten postnatalen Woche statt [44].

Für eine klare Übersicht kann die Entwicklung GABAerger Interneurone in fünf Phasen unterteilt werden: (1) die Generierung interneuronaler Vorläuferzellen, (2) ihre Differenzierung in Subtypen (Abb. 1), (3) ihre Migration und Verteilung auf die korrekte kortikale Schicht (Abb. 2), (4) das GABAerge Axonwachstum in Richtung der entsprechenden postsynaptischen Targets und (5) die Formation und Adjustierung der Anzahl GABAerger Synapsen und ihrer Übertragungsstärke [45, 46].

Der Ursprungsort kortikaler Interneurone unterscheidet sich zwischen den Spezies. In der Maus entstehen die unreifen interneuronalen Vorläuferzellen vor allem extrakortikal, in den sog. *Ganglionic eminences* (GE) des ventralen Telencephalons

[47], das sich aus dem vorderen Teil des Neuralrohrs gebildet hat. Humane Interneurone entstehen ebenfalls in den GE, jedoch zudem zu weiteren Anteilen auch in den kortikalen ventrikulären und subventrikulären Zonen (VZ/SVZ) [41, 48]. Die Generierung der Interneuron-Vorläufer im Menschen beginnt in der frühen Embryonalzeit, etwa in der 5. Schwangerschaftswoche (SSW) und erreicht zwischen der 16. und der 35. SSW ihren Höhepunkt [41, 49]. Anschließend bilden sich spezifische Subtypen der GABAergen Interneurone aus (Abb. 1), deren morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften die verschiedenen Funktionen des GABAergen Systems prägen [50].

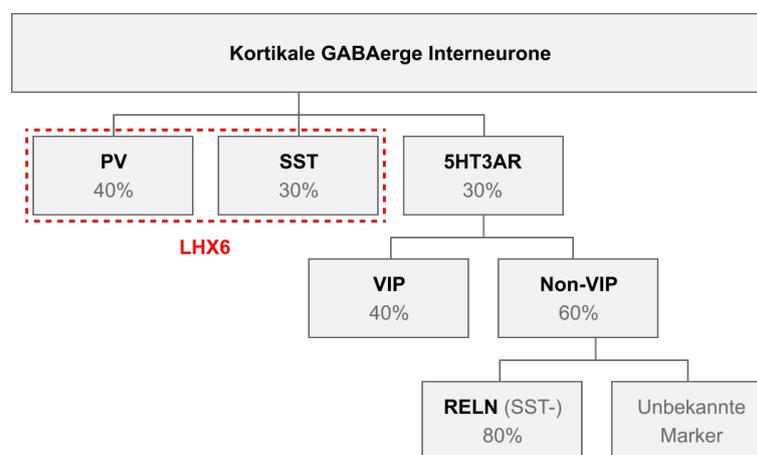


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Subtypeneinteilung kortikaler GABAergen Interneurone. Subtypen und Anteile angegeben in Prozent, modifiziert nach [51]. LHX6 dient als Marker früher Interneurone aus den *Medial ganglionic eminences* (MGE) [52]. LHX6: *LIM-homeobox protein 6*, PV: Parvalbumin, RELN: Reelin, SST: Somatostatin, VIP: *vasoactive intestinal peptide*, 5HT3AR: Serotoninrezeptor 5-HT₃.

Während ihrer Entwicklung migrieren Interneurone entlang verschiedener Bahnen von ihrem Entstehungsort zum Neokortex, wobei sie weitere Reifungsschritte vollziehen [49]. Im Laufe dessen kommt es zu einem Wechsel der zunächst tangentialen Routen entweder unter- oder oberhalb der kortikalen Platte (dem späteren Kortex) hin zu einer vertikal ausgerichteten, radialen Bewegung, um die endgültige kortikale Schichtposition zu finden (Abb. 2). Diese richtet sich nach dem Zeitpunkt der Genese und dem Phänotyp des Interneurons [53, 54].

Nach bisherigem Erkenntnisstand scheinen die Migrationsrouten der interneuronalen Zellen aus den GE bei Mäusen und Menschen sehr ähnlich zu verlaufen.

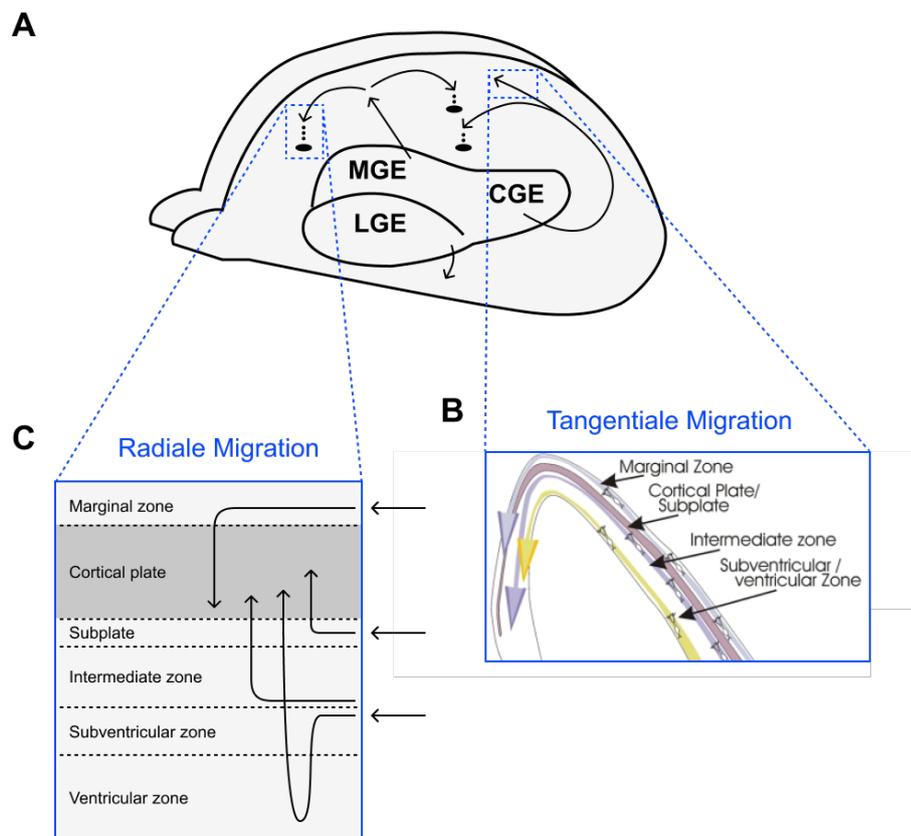


Abb. 2: Migrationswege der GABAergen Interneurone in der Maus. (A) und (B) modifiziert nach [48], (C) modifiziert nach [53]. (A) Kortikale Interneurone aus den *Medial ganglionic eminences* (MGE), *Lateral ganglionic eminences* (LGE) und *Caudal ganglionic eminences* (CGE) im ventralen Telencephalon folgen tangentialen Migrationsrouten in den sich entwickelnden Kortex. (B) Tangentielle Migrationsrouten. (C) Radiale Migration und finale Positionierung des Interneurons in seiner korrekten laminaren Schicht der kortikalen Platte (des zukünftigen Kortex).

Die Migration der humanen Interneurone beginnt während der frühen embryonalen Entwicklung (circa in der sechsten Schwangerschaftswoche) und ist etwa mit dem Erreichen des sechsten postnatalen Lebensmonats abgeschlossen [41, 55]. Weitere Reifungsprozesse reichen jedoch bis in die späte Adoleszenz [56].

Zeiträume vergleichbarer Entwicklungsschritte in der Maus erstrecken sich vom embryonalen Tag E9.5 (Beginn der Generierung von Interneuronen im MGE) über die Geburt und die ersten zwei bis drei postnatalen Wochen (postnatale Migration) [46, 57], bis in die fünfte Woche, wenn adulte elektrophysiologische Eigenschaften der Interneurone erreicht werden [46, 58].

Frühe Veränderungen des GABAergen Systems in der Anzahl von Interneuronen, ihrer Migration oder synaptischen Integration könnten die Strukturierung des sich entwickelnden Gehirns maßgeblich beeinflussen. GABAerge Interneurone spielen eine wesentliche Rolle in der Generierung von Synchronizität und der sich daraus ergebenden aktivitätsabhängigen Selbstorganisation sich entwickelnder neuronaler Netzwerke [59]. Ein einzelnes GABAerges Interneuron ist in der Lage, die Aktivität einer großen Population pyramidalen Neurone zu synchronisieren [60]. Sie sind somit für die Entwicklung kortikaler Netzwerke und die Informationsverarbeitung von elementarer Bedeutung. Fehlentwicklungen dieses Systems werden in verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen relevant.

1.4 Die Interneuron-Hypothese für psychiatrische Erkrankungen und die Gruppe der ‚Hirnentwicklungsstörungen‘

GABAerge Interneurone sind im elektrophysiologischen Gleichgewicht aus exzitatorischen und inhibitorischen Einflüssen für die Kontrolle von Hyperexzitabilität im Gehirn zuständig [61] und schwere GABAerge Defizite verursachen pathologische Hyperexzitabilität, die z. B. zu Epilepsie führen kann [62, 63]. Subtile Veränderungen im Gleichgewicht aus exzitatorischen und inhibitorischen Mechanismen werden in verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie Autismus-Spektrum-Störungen, ADHS und Schizophrenie diskutiert [64, 65]. GABAerge Interneurone spielen in der Pathogenese der sog. *neurodevelopmental disorders* eine entscheidende Rolle [66].

Der Begriff Autismus-Spektrum-Störung der DSM-V-Klassifikation fasst die in ICD-10 als einzelne Diagnosen behandelten Krankheitsbilder des Frühkindlichen Autismus, Atypischen Autismus und Asperger-Syndroms zusammen. Zu den Hauptsymptomen von Autismus-Spektrum-Störungen zählen heute – altersabhängig variierend – stereotypes Verhalten sowie kognitive und soziale Interaktionsdefizite [67]. Als ein starker Hinweis dafür, dass ein defizitäres GABAerges System den Symptomen zugrunde liegen könnte, galt zunächst die Beobachtung, dass Kinder und Jugendliche mit Autismus eine hohe Komorbidität mit Epilepsien und/oder Epilepsie-typischen Potenzialen im EEG aufwiesen [68, 69]. Weiterhin zeigten Kinder mit Autismus in Magnetresonanz-Spektroskopie-Studien im Vergleich zu sich unauffällig

entwickelnden Kindern geringere GABA-Level im sensorischen Kortex, verbunden mit den typischen Defiziten in Verhaltenstests [70]. In einer *post mortem*-Studie von Menschen mit Autismus zeigte sich anhand präfrontalen Kortexmaterials eine Verminderung des Parvalbumin (PV)-Subtyps GABAerger Interneurone [71].

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurden Autismus und Schizophrenie als unterschiedliche Entwicklungsstufen ähnlicher Erkrankungen verstanden, bzw. Autismus als eines von 4 Elementen der Schizophrenie eingeordnet [72]. Während die Diagnose einer Schizophrenie typischerweise in der späten Adoleszenz und dem frühen Erwachsenenalter gestellt wird, geht man heute von einer früher beginnenden Prodromalphase aus und ordnet sie ebenfalls den Hirnentwicklungsstörungen zu. Symptome der kognitiven Dysfunktion, die sich in Problemen von Aufmerksamkeit, Arbeitsgedächtnis und Exekutivfunktionen zeigen, gehören neben den sog. Positiv- (z. B. Wahn) und Negativsymptomen (z. B. sozialer Rückzug) zur Kernsymptomatik der Schizophrenie. Veränderungen des GABAergen Systems in der Pathogenese sind u. a. die Herunterregulierung von GAD65/67 (den zwei Isoformen des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase) sowie die Verminderung PV-exprimierender Interneurone des präfrontalen Kortex [58, 73, 74]. Zentrale Bedeutung wird hierbei der beobachteten Unterfunktion des NMDA-Rezeptors (ionotroper Glutamat-Rezeptor) zugeschrieben, der erst zu relativ späten Zeitpunkten der Hirnentwicklung seine exzitatorische Funktion aufnimmt (in der Maus in der ersten postnatalen Woche, einhergehend mit dem oben erläuterten GABAergen *Switch*) [75]. Im Tiermodell führten NMDA-Rezeptor-Antagonisten zu einer verminderten Expression von PV-positiven Interneuronen [76, 77]. Wie genau GABAerge Interneurone an den Symptomen der Schizophrenie beteiligt sind, erscheint jedoch sehr komplex und ist weiterhin aktueller Gegenstand der Forschung [78].

Eine weitere, für ehemalige Frühgeborene relevante Hirnentwicklungsstörung ist die Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Störung (ADHS). Überschneidungen mit Autismus-Spektrum-Störungen hinsichtlich gemeinsamer Risikofaktoren oder neurophysiologischer Ursprünge werden diskutiert [79]. ADHS, definiert als Entwicklungsstörung mit verminderter Aufmerksamkeitsspanne, motorischer Hyperaktivität und erhöhter Impulsivität [80], wird ebenfalls auf ein inhibitorisches kortikales Defizit zurückgeführt. In Untersuchungen mit transkraniellen Magnetstimulationen zeigten Kinder mit ADHS Defizite intrakortikaler Inhibition in Ruhe [65]. Zudem wurden verminderte GABA-Konzentrationen bei Kindern mit ADHS berichtet [81]. Umgekehrt

zeigten GAD67-Knock-Out-Mäuse, in denen ein Allel des GAD67-Gens fehlt, einen für ADHS typischen Phänotyp [82].

Die Rolle GABAerger Interneurone in der Pathogenese der sog. Hirnentwicklungsstörungen ist evident [83]. Theoretisch könnte somit eine Schädigung der Interneurone bei Frühgeborenen zur Entstehung verschiedener Entwicklungsstörungen beitragen.

1.5 Veränderungen des GABAergen Systems bei ehemals frühgeborenen Kindern und Jugendlichen

Schaut man sich Zusammenhänge zwischen Veränderungen GABAerger Interneurone und Frühgeburt an, gibt es einige wichtige Aspekte, die eine Schädigung von Interneuronen durch die zu frühe Geburt nahe legen: In einer *post mortem*-Studie von Gehirnen ehemaliger in der 25. – 32. SSW geborener Kinder, ließ sich eine verminderte Anzahl GAD67-positiver Interneurone, assoziiert mit Schädigungen der weißen Substanz, feststellen [84]. Auch eine Behinderung des in Kapitel 1.3 beschriebenen GABAergen *Switch* hin zu ihrem inhibitorischen Effekt an den Synapsen durch die Expression von Chloridtransportern durch Frühgeburt wurde gezeigt [43]. Frühgeborene der 26. – 27. SSW, die für weitere vier bis sechs Wochen lebten, zeigten in der korrigierten 33. SSW in Autopsien verminderte Anzahlen kortikaler, und insbesondere PV-positiver Interneurone im Vergleich zu Frühgeborenen, die in der 32. – 33. Woche zur Welt kamen [85].

Umso wichtiger ist es zu verstehen, welche Prozesse genau zu einer veränderten Entwicklung der GABAergen Interneurone führen. Eine mögliche Ursache stellen die oben genannten Veränderungen der Sauerstoffumgebung durch den Verlust der intrauterinen Bedingungen dar. Das eigentlich noch fetale Gehirn ist relativer Hyperoxie ausgesetzt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass postnatale Hyperoxie die Entwicklung der weißen Substanz maßgeblich beeinträchtigen kann [86] und in Verhaltenstest zu ADHS-ähnlichen Symptomen führt [87].

Der Einfluss von Sauerstoff auf GABAerge Interneurone ist bislang kaum erforscht. Es ist hypothetisch anzunehmen, dass die fetalen Mechanismen zur Steuerung der interneuronalen Migration und Ausreifung durch erhöhte O₂-Partialdrücke in Blut und Gewebe ebenfalls verändert werden könnten.

1.6 Die Entwicklung kortikaler GABAerger Interneurone nach postnataler Hyperoxie im Mausmodell

Während die Zeitskala der murinen Hirnentwicklung deutlich von der menschlichen abweicht, ist die Abfolge der Entwicklungsschritte in beiden Spezies weitgehend vergleichbar [88]. Der sog. ‚*brain growth spurt*‘ – die Zeit intensivster Gewichtszunahme und Volumenexpansion – der sich im menschlichen Gehirn im letzten Trimenon der Schwangerschaft und um die Geburt herum vollzieht, findet in murinen Gehirnen um die postnatalen Tage (P)5 – P7 statt [89]. Um diese perinatalen Prozesse zu untersuchen, wurden folglich 5 bis 14 Tage alte Mäuse verwendet [56, 88], wobei 5 Tage alte Mäuse als Modell Frühgeborener um die 28. SSW dienten [30]. Diese Tiere erhielten dementsprechend die Hyperoxie-Exposition des Modells mit 80% Sauerstoff, was in Vorstudien zu einem circa zwei- bis dreifachen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks führte – ähnlich dem in Frühgeborenen beobachteten. Dieses Tiermodell wurde als Modell perinataler Schädigung des Frühgeborenen-gehirns in der Arbeitsgruppe der Klinik für Neonatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin etabliert [86]. Frühe juvenile Prozesse sind im Mausmodell etwa um P30 repräsentiert [56].

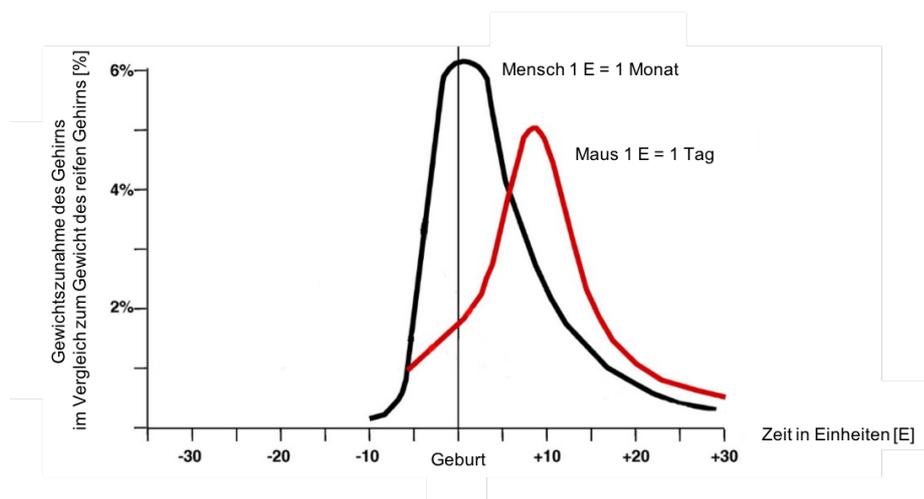


Abb. 3: Gewichtszunahme des menschlichen und murinen Gehirns. Angaben in Prozent der Gewichtszunahme im Vergleich zum Gewicht des adulten Gehirns aufgetragen über die Zeit, modifiziert nach Kaindl und Ikonomidou (2011) [30]. Die größte Gewichtszunahme (*brain growth spurt*) beginnt in der menschlichen Hirnentwicklung im letzten Trimenon der Embryonalzeit und setzt sich bis in das zweite bis dritte Lebensjahr fort [30]. Im murinen Gehirn finden diese Prozesse hauptsächlich postnatal um den postnatalen Tag P7 [89] und in den ersten zwei postnatalen Wochen statt [30].

In Kongruenz zu den im dritten Trimenon stattfindenden dynamischen Entwicklungsschritten aus Differenzierung, Reifung und Migration ist das GABAerge System zu diesen Zeitpunkten mutmaßlich hoch vulnerabel gegenüber externen Stimuli. Fällt eine Geburt in diesen Zeitraum, könnte dies Frühgeborene für tiefgreifende Veränderungen in der Entwicklung GABAerger Interneurone prädisponieren. Funktionelle Abweichungen des GABAergen Systems könnten somit neuropsychiatrische und neurokognitive Störungen der Entwicklung bei ehemaligen Frühgeborenen bewirken. Dies macht eine genaue Erforschung der Mechanismen erforderlich, die als Antwort auf die veränderten postnatalen Bedingungen die Etablierung des GABAergen Netzwerkes in unreifen Gehirnen verändern.

Die Hypothese meiner Arbeit ist, dass die Exposition des unreifen Gehirns gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen die Entwicklung der kortikalen GABAergen Interneurone maßgeblich beeinflusst. In histologischen und molekularbiologischen Analysen untersuche ich, ob es dabei zu einer Veränderung der Subtypenausbildung, Reifung oder Migration der Interneurone kommt. Ebenso gilt es zur weiteren Charakterisierung einer Schädigung der GABAergen Interneurone die Aktivitäten von Apoptose, Autophagie und Proliferation zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Folgende Chemikalien und Lösung fanden Verwendung (Tab. 1):

Tab. 1: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Agarose	Roth, Karlsruhe
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf
BSA Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg

Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel	Bio-Rad Laboratories Gmbh, Feldkirchen
DAKO <i>Antibody Diluent</i>	Dako, Glostrup, Dänemark
DNase	Qiagen, Hilden
Dulbecco Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fluoreshield™ with DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Isopropanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ketamin (10%)	Betapharm, Augsburg
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories Gmbh, Feldkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad Laboratories Gmbh, Feldkirchen
Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf
Paraffin	Medite GmbH, Burgdorf
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
peqGold RNA-Pure™	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories Gmbh, Feldkirchen
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Rompun (2%)	Bayer AG, Leverkusen
Roti®-Histol	Roth, Karlsruhe
Roti®-Blockpuffer	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (HCl)	Merck, Darmstadt
Sucrose	Merck, Darmstadt
Supersignal West Pico	Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf
50x TAE-Elektrophorese Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay (TBARS)</i>	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Triton-X-100	Merck, Darmstadt

2.1.2 Hergestellte Puffer und Lösungen

Nichtgebrauchsfertige Puffer und Lösungen wurden wie in Tabelle 2 aufgeführt hergestellt:

Tab. 2: Hergestellte Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosegel	1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (pH 7,7)
Blockierungslösung (IHC)	3% (w/v) BSA, 0,2 % Triton-X-100 (v/v) in PBS-Puffer
10x Citratpuffer (pH 6,0)	0,21% (v/v) Citronensäure-Monohydrat ad 1L bidest. H ₂ O
Ethanolreihe	100%, 90%, 80%, 70% (v/v) Ethanol
Paraformaldehyd-Lösung (pH 7,4)	4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS

2.1.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Folgende, in Tabelle 3 dargestellte Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe fanden Verwendung:

Tab. 3: Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper	Wirt	Bezugsquelle	Bezugsnummer	Verdünnung (IHC / WB)
AlexaFluor® 488 goat-anti-rabbit IgG	Ziege	Molecular Probes	#A11055	1:200
AlexaFluor® 546 goat-anti-rabbit IgG	Ziege	Molecular Probes	#A11010	1:200
AlexaFluor® 594 goat-anti-chicken pAb	Huhn	Molecular Probes	#A11042	1:200
Anti-βActin Maus	Maus	Sigma-Aldrich	A5316	1:5000
Anti-cleaved Caspase-3 (Asp175) rabbit mAb	Kaninchen	Cell Signaling	#9664	1:200
Anti-GFP goat pAb	Ziege	Abcam	#ab6673	1:200

Anti-IgG HRP goat-anti-mouse	Ziege	Jackson ImmunoResearch	115-035-146	1:3000
Anti-IgG HRP goat-anti-rabbit	Ziege	Cell Signaling	#7074	1:5000
Anti-Ki67 (SP6) rabbit mAb	Kaninchen	Abcam	#ab16667	1:200
Anti-LC3B rabbit pAb	Kaninchen	Abcam	#ab48394	1:1000
Anti-Parvalbumin rabbit pAb	Kaninchen	Abcam	#ab11427	1:1000
Anti-SQSTM1 / p62 rabbit pAb	Kaninchen	Abcam	#ab91526	1:1000

Abcam, Cambridge, UK; Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt am Main; Jackson ImmunoResearch Laboratories; Cambridgeshire, UK; Molecular Probes Applied Biosystems, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München.

2.1.4 Enzyme, Molekulargewichtsmarker und Reagenzien der Genexpressionsanalyse

In der folgenden Tabelle (Tab. 4) sind die Enzyme, Molekulargewichtsmarker und Reagenzien der Genexpressionanalysen aufgelistet.

Tab. 4: Enzyme, Molekulargewichtsmarker und Reagenzien der Genexpressionsanalyse

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNase (2 U/ μ L)	Qiagen, Hilden
dNTPs (10 mM, für Reverse Transkription)	Promega, Mannheim
dNTP-Mix (2 mM, für Kontroll-PCR)	Fermentas, St. Leon-Rot
DreamTaq TM DNA-Polymerase (5 U/ μ L)	Fermentas, St. Leon-Rot
10x DreamTaq TM Green Buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler TM 50 bp DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ L)	Promega, Mannheim
2x pPCRBIO Probe Mix Hi-ROX	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren
2x qPCRBIO Sygreen Mix Hi-ROX	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren
RNasin [®] RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	Promega, Mannheim
Zufallsoligonukleotide (Random-Primer, 500 μ g/mL)	BioTEZ GmbH, Berlin

2.1.5 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Genexpressionsanalyse

Die verwendeten Primer wurden von der BioTez Berlin GmbH synthetisiert und bezogen.

Tab 5: Synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Genexpressionsanalyse.

Gen	Datenbank-ID	Oligonukleotid-Sequenz 5'-3'
<i>Atg3</i>	NM_026402.3	F: TAGTGAAGCCTGCAAAGCTA R: GTGGGAGATGAGGATGGTTTT
<i>Atg12</i>	NM_026217.3	F: GCTGAAGGCTGTAGGAGACACT R: ACCATCACTGCCAAAACACTC
<i>β-Aktin</i>	NM_007393	F: CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAAGATG R: GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG
<i>Cxcr4</i>	NM_009911.3	F: TGGCATAGTCGGCAATGGAT R: GACAGGTGCAGCCGGTACTT
<i>Gabra1</i>	NM_010250.5	F: CAGAAGATGGGTCACGTTTAAACC R: GGAAGTGAGTCGTCATAACCCACAT
<i>Gabra3</i>	NM_008067.4	F: GGGACAGAGATAATCCGGTCTAGTAC R: GGTCTGGATGACAAAGTAGCCAAT
<i>Gabra4</i>	NM_010251.2	F: GAAGTCAGTGGAGGTGCCAAA R: CTGAGGTGGAAGTAAACCGTCAT
<i>Gabra5</i>	NM_176942.4	F: CAGCACCAGCACAGGTGAAT R: GGAAGGTAGGTCTGGATGACAAA
<i>Gdnf</i>	NM_053074.2	F: TTTGAAGACGCCAGGGAAATG R: TGTCCAGAATCAACCACCAAG
<i>Hprt</i>	NM_013556.2	F: TGCTGACCTGCTGGATTACATT R: TCCCCGTTGACTGATCATT S: TCAGACTGAAGAGCTACTG
<i>Lhx6</i>	NM_008500.2	F: AAGGTAGAGCCTCCCCATGT R: AGGTTGTTGACCTTGAGCAGA
<i>p62</i>	NM_053074.2	F: CTGGCTTTTCCTTCTCTGCTT R: AGAAGCCTGTTCCCTCCAGAAG
<i>Reln</i>	NM_011261.2	F: AGTGTGGCACCATCATGCAT R: TGTTGTTGTGTTTCAGGCATGTG
<i>Sdf1</i>	NM_021704.3	F: GCCAACGTCAAGCATCTGAAA R: GGGTCAATGCACACTTGTCTGT

<i>Sst</i>	NM_009215.1	F: CCCAGACTCCGTCAGTTTCTG R: GGGCATCATTCTCTGTCTGGTT
<i>Vip</i>	NM_011702.3	F: CTCTTCAGTGTGCTGTTCTCTCAGT R: AAACGGCATCCTGTCATCCA

F: Vorwärtsprimer (*forward*); **R:** Rückwärtsprimer (*reverse*); **S:** Sonde | **Atg3:** *autophagy related gene 3*; **Atg12:** *autophagy related gene 12*; **Cxcr4:** CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (Sdf-1-Rezeptor); **Gabra1, 3, 4, 5:** *gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit alpha 1, 3-5*; **Gdnf:** *glial cell line-derived neurotrophic factor*; **Hprt:** Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; **Lhx6:** *LIM-homeobox protein 6*; **p62:** *nucleoporin p62*; **Reln:** Reelin; **Sdf1:** *stromal cell-derived factor 1*; **Sst:** Somatostatin; **Vip:** *vasoactive intestinal polypeptide*.

2.1.6 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Tabelle 6 zeigt die während meiner Arbeit im Labor verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien.

Tab. 6: Verwendete Geräte und Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blue Star Flashlight Plus VG1 Filter Glasses Deckgläser	Elektron Microscopy Sciences, Hatfield, UK R. Langenbrinck, Emmendingen
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories Gmbh, Feldkirchen
Fluoreszenzmikroskop Keyence Biorevo BZ-9000 Generation II	Keyence, Neu-Isenburg
Laufkammer	Bio-Rad Laboratories Gmbh, Feldkirchen
iMark Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories Gmbh, Feldkirchen
Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Hanau
MicroAmp® Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikrotom Leica® SM2000 R	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar
miniSpin Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Kisker Biotech, Steinfurt
Objekträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
OxyCycler A-Serie	BioSpherix, Lacona, USA
Paraffinstreckbad	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf, Biozym
PS2A200 High Current Power Supply	Hoefler, Holliston, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Super PAP-Pen Liquid Blocker	Science Services, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Transblot-Turbo-Transfer-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
UVsolo (Agarosegel-Detektor)	Biometra, Göttingen
Vortex Genie 2	VWR, Darmstadt
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.1.7 Softwareprogramme

Folgende Softwareprogramme nutzte ich zur Erhebung, Analyse und Darstellung meiner Daten (Tab. 7).

Tab. 7: Verwendete Softwareprogramme

Software	Hersteller
Adobe® Illustrator CC	Adobe® Systems, San José, USA
Adobe® Photoshop CS6 Extended	Adobe® Systems, San José, USA
BZ-II Viewer (Steuerungssoftware)	Keyence, Neu-Isenburg
BZ-II Analyzer (Analysesoftware) für Keyence	Keyence, Neu-Isenburg
Fluoreszenzmikroskop	
Figma App release, Build 3	Figma Inc., San Francisco, USA
GraphPad PRISM™ Version 5.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2017	Microsoft
StepOne Version 2.1	Applied Biosystems, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuchsmodell und Organentnahme

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach Genehmigung des Landesamts für Gesundheit und Soziales in Berlin (LAGeSo Berlin, Genehmigungsnummer G-0151/14 und G-0084/11) und gemäß den internen Richtlinien der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die Wildtyp-Mäuse (Stamm C75BL/6N) und die transgenen GAD67-GFP-Knock-In Mäuse (C75BL/6N.GAD67eGFP) wurden von

der Forschungseinrichtung der Experimentellen Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin erhalten. 5 Tage alte Tiere wurden geschlechtsunabhängig und randomisiert zwei Versuchsbedingungen unterzogen: (1) Die Interventionsgruppe wurde vom postnatalen Tag (P) 5 bis P7 gemeinsam mit einem Muttertier für 48 h 80% Sauerstoff (relativer Hyperoxie, OxyCycler, Biospherix, Lacona, NY, USA) ausgesetzt. (2) Die Kontrollgruppe erhielt im selben Zeitraum 21% Sauerstoff (Raumluft, Normoxie), gemeinsam in einem Käfig mit einer zweiten, laktierenden Mutter. Jede Versuchsgruppe bestand aus 8 Tieren. Um eine eventuelle Unterversorgung der Jungtiere zu vermeiden, wurden nach 24 h Hyperoxie die Muttertiere gegen Muttertiere der parallel gehaltenen Normoxie-Tiere ausgetauscht. In den heterozygoten GAD67-GFP-Knock-In-Tieren wird das grün fluoreszierende Protein GFP (*green fluorescent protein*) unter Kontrolle des GAD67-Promotors exprimiert, sodass alle GABAergen Interneurone grün gelabelt erscheinen. Mittels Fluoreszenz und Filterbrille (Blue Star Flashlight Plus Vg1 Filter Glasses) konnten diese Tiere zwischen P1 und P3 von den homozygot nicht transgenen Mäusen aufgrund grün leuchtender Gehirne differenziert und später der Weiterverarbeitung für die immunhistochemischen Versuche zugeordnet werden. Die Versuchstiere wurden bei konstanter Temperatur und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h gehalten. Sie erhielten Wasser und Nahrung *ad libitum*. Die Tötung der Tiere erfolgte entweder unmittelbar nach Sauerstoffexposition an P7 oder nach Erholung an Raumluft an P9, P11, P14 und P30. Dazu wurde Ketamin (10%) und Rompun (2%) intraperitoneal verabreicht und transkardial mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, für Molekularbiologie) bzw. PBS / 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (für Immunhistochemie, IHC) perfundiert. Die Organentnahme erfolgte mittels chirurgischer Pinzette und Schere *post mortem* entlang der Sagittalnaht. Die Gehirne wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren molekularbiologischen Verwendung bei – 80 °C aufbewahrt. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Gehirne in 4% PFA für 24 h bei 4 °C vorfixiert und anschließend in 30% Sucrose überführt, bis sie weiterverarbeitet wurden.

In Abbildung 4 ist der experimentelle Ablauf zur Verdeutlichung noch einmal schematisch dargestellt. Das hier angewandte Hyperoxie-Modell ist ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Schädigungsmodell. Es konnte gezeigt werden, dass die angewandte Hyperoxie-Exposition von 80% O₂ über 48 h zu einem circa zwei- bis dreifachen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks im Blut der infantilen Mäuse führt [86].

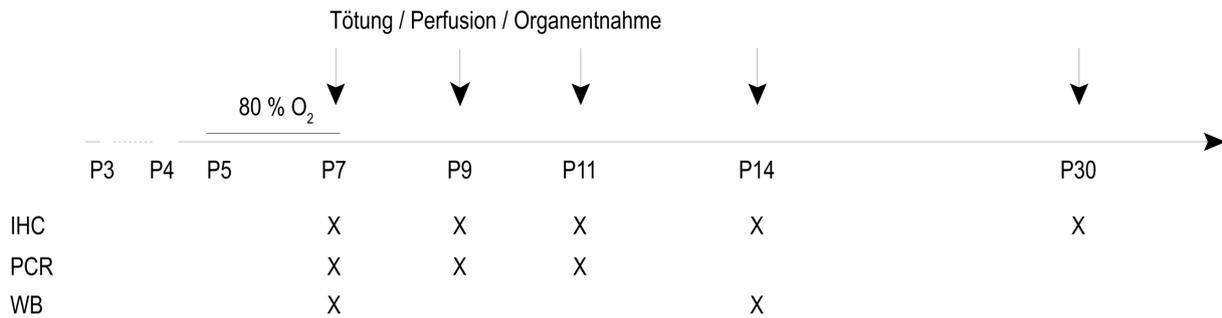


Abb. 4: Relative Hyperoxie (80%) der Versuchsgruppe vom postnatalen Tag (P)5 – P7 (48 h) mit anschließender Erholung in Raumluft. Tötung, transkardiale Perfusion und Organentnahme erfolgten entsprechend an P7, P9, P11, P14 oder P30. Die Kontrollgruppe befand sich über den ganzen Versuch in 21% Sauerstoff (Normoxie). Anschließend erfolgten die immunhistochemischen (IHC) oder molekularbiologischen (PCR, Western Blot) Analysen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von RNA

Die Isolation der murinen kortikalen RNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierfür wurden zu jeder Gewebeprobe 800 μL peqGold RNA-Pure (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) pipettiert und die Gewebeteile homogenisiert. Anschließend wurde jede Probe mit 160 μL Chloroform versetzt, und maximal 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 7 min bei 12000x g und 4 °C. Die sich nach Zentrifugation in der Oberphase befindende RNA wurde vorsichtig abpipettiert. Nach Zugabe von eiskaltem Isopropanol im Verhältnis 1:1 (10 min bei 4 °C) wurde die RNA mittels Zentrifugation (30 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C) gefällt. Es folgten zwei Waschschrte mit eiskaltem, 75%igem Ethanol sowie die Resuspension der gewonnenen RNA-Pellets mit Nuklease-freiem Wasser. Die resultierende RNA-Konzentration und Reinheit wurde mittels Nanodrop (ND 1000 Spectrophotometer, Kisker Biotech) am Folgetag bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei – 80 °C.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte mittels Reverser Transkription und interner DNase-Behandlung des vorhandenen RNA-Templates. Hierfür wurden 2 μg Gesamt-RNA mit 1 μL Zufallsoligonukleotiden (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Random-Hexamer-Primer) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 23,5 μL mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt (Tab. 8).

Tab. 8: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription der RNA

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration [μg]
Total-RNA	x	2
Random Primer	1	0,5
Nuklease-freies Wasser	ad 23,5	-
Σ Gesamtvolumen des Ansatzes	23,5	

Nach initialer Denaturierung der RNA über 10 min bei 70 °C im Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf) erfolgte die Kühlung auf 4 °C für 3 min und, auf Eis gelagert, die Zugabe von je 11,5 μL Mastermix zu jedem Reaktionsansatz (Tab. 9).

Tab. 9: Reaktionsansatz für den Mastermix für die Reverse Transkription der RNA

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	8	1x
dNTPs je 10 mM (Promega)	1	je 0,3 mM
RNasin® RNase-Inhibitor (40 U/ μl)	0,5	20 U
DNase (2 U/ μl)	2	4 U
Σ Gesamtvolumen des Ansatzes	11,5	

Um eine Kontamination der präparierten RNA mit genomischer DNA auszuschließen, erfolgte deren Verdau mittels DNase (2 U/ μL , Qiagen, Hilden) für 30 min bei 37 °C. Zum Schutz der RNA vor RNAsen wurde der Reaktion der RNasin® RNase-Inhibitor (40 U/ μL , Promega Mannheim) zugesetzt. Nach 5 min auf 75 °C zur Inaktivierung der DNase, erfolgte bei 42 °C die Zugabe von je 1 μl MMLV Reverse Transkriptase (+ 0,5 μl RNAsin zur Hemmung der RNase-Aktivität) und die Umschreibung der RNA in cDNA über 1 h bei 42 °C. Die abschließende Inaktivierung der Enzyme erfolgte bei 95 °C in 5 min. Der genaue Reaktionsverlauf im Thermocycler ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Tab. 10: Reaktionsverlauf der Reversen Transkription der RNA

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiale Denaturierung der RNA	70	10
	4	3
Interne DNase-Behandlung	37	30
Inaktivierung der DNase	75	5
Reverse Transkription	42	60
Inaktivierung der Enzyme	95	5

2.2.2.3 β -Aktin-Kontroll-PCR und anschließende Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der vollständigen Umschreibung der RNA in cDNA und zum weiteren Ausschluss einer DNA-Kontamination wurde eine β -Aktin Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 11 dargestellt, wobei sich die Angaben auf einen Reaktionsansatz beziehen. Der genaue Reaktionsverlauf ist in Tabelle 12 ausgeführt.

Tab. 11: Reaktionsansatz der β -Aktin Kontroll-PCR

Komponente	Volumen [μ L]	Endkonzentration
10x DreamTaq™ Puffer	2,5	1x
dNTP-Mix 2mM	2,5	0,2 mM
β -Aktin Primermix (je 10 μ M forward + 10 μ M reverse)	0,5 / 0,5	je 0,2 mM
DreamTaq™ DNA-Polymerase (5 U/ μ L)	0,2	1 U
cDNA	1	54,8 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 25	
Σ Gesamtvolumen des Ansatzes	25	

Tab. 12: Reaktionsverlauf der β -Aktin Kontroll-PCR

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	94	5	1
Zyklische Denaturierung	94	1	
Hybridisierung der Oligonukleotide	70	1	40
Extension der Oligonukleotide	72	1	
Finale Elongation	72	10	1

Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der zuvor amplifizierten PCR-Produkte. Proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts bzw. zu ihrer Produktgröße ordneten sich reine Proben unter Anlegen einer Spannung (70 V) in einem spezifischen Bandenmuster bei einer Bande von 432 Basenpaaren im 1%igen Agarosegel an. Bei Vorliegen einer genomischen DNA-Kontamination wäre aufgrund der gewählten Primersequenzen eine zweite Bande bei 877 Basenpaaren zu erwarten gewesen, da diese Primer ein Intron überspannen. Alle Proben zeigten sich frei von genomischer DNA.

2.2.2.4 Genexpressionsanalyse mittels qPCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) ermöglichte die sequenzspezifische Genexpressionsanalyse der Zielgene *Lhx6*, *Reln*, *Vip*, *Sst*, *Sdf1*, *Cxcr4*, *Atg3*, *Atg12* und *Gabra 1, 3, 4, 5* sowie *Hprt* auf mRNA-Ebene (P7 n = 8 (NOR), n = 8 (HYP); P9 n = 8 (NOR), n = 8 (HYP); P11 n = 7 (NOR), n = 6 (HYP)). Ein Tier der Kontrollgruppe und zwei Tiere der Hyperoxie-Gruppe der P11-Kohorte waren zwar während des Versuches nicht belastet, zeigten aber stark abweichende Analysenwerte und wurden somit aus allen statistischen Analysen ausgeschlossen. Die quantitativen Analysen der Genexpression auf mRNA-Ebene erfolgten mittels der reverse transkribierten cDNA und unter Anwendung des Fluoreszenzstoffes SYBR Green I (Zielgene) bzw. sequenzspezifischer Hydrolysisierungs sonden (*Hprt*, Referenzgen). In der verwendeten Taqman-Sonde ist das 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) und das 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert und mittels Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfers (FRET) bei Erreichen eines spezifischen Schwellenwerts quantifizierbar. Nach demselben Prinzip erfolgte die Quantifizierung mittels des interkalierenden DNA-Fluoreszenzfarbstoffs

SYBR Green I, dessen Fluoreszenzsignal ebenfalls ab Erreichen des Schwellenwerts in Echtzeit registriert wurde. Die zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Anzahl der Amplifikationszyklen wurde als Maßstab für die Ausgangsmenge des Zielgens verwendet, wobei ein zusätzlicher PCR-Zyklus einer Verdopplung der DNA-Menge entsprach. Das zahlenmäßige Verhältnis der Zielsequenz wurde dabei ins Verhältnis zu einer Referenzsequenz eines Haushaltsgens (*Hprt*) gesetzt, das in allen Proben gleich und von den Versuchsbedingungen unabhängig exprimiert sein sollte [90]. So konnten unterschiedliche Effizienzen bei der Reversen Transkription bzw. RNA-Menge ausgeschlossen bzw. sichergestellt werden, dass Änderungen im Transkriptionsmuster eine Folge spezifischer Genregulation und nicht allgemein erhöhter Transkriptionsaktivität darstellen.

Für die qPCR wurde die in der RT-Reaktion synthetisierte cDNA in einem Verhältnis von 1:10 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Auf einer 96-Lochplatte wurden je 8 μL eines Mastermixes in Triplikaten vorgelegt und um je 3 μL der cDNA-Verdünnungsstufe ergänzt. Der Mastermix der Zielgenanalyse enthielt den entsprechenden Primer-Mix sowie qPCRBIO SyGreen Mix Hi-Rox, der Mastermix des Referenzgens *Hprt* den qPCRBIO Probe Mix Hi-Rox und zudem eine Sonde (Tabelle 13 und 14). Pro Ziel- bzw. Referenzgen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die statt cDNA Nuklease-freies Wasser enthielt. Die Analysen erfolgten je Probe in dreifacher Bestimmung.

Tab. 13: Reaktionsansatz der qPCR (Taqman)

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
qPCRBIO Probe Mix Hi-Rox	5	1x
Primer-Mix 10 μM (F-Primer / R-Primer)	2,5	0,3 μM
Sonde 5 μM	0,5	0,2 μM
cDNA	3	16,5 ng
Σ Gesamtvolumen des Ansatzes	11	

Tab. 14: Reaktionsansatz der qPCR (SybrGreen)

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
qPCRBIO SyGreen Mix Hi-Rox	5	1x
Primer-Mix 10 μM (F-Primer / R-Primer)	3	0,3 μM
cDNA	3	16,5 ng
Σ Gesamtvolumen des Ansatzes	11	

Nach zweiminütiger Zentrifugation der Platte bei maximaler Umdrehungszahl wurde die quantitative real-time PCR im StepOnePlusTM RealTimePCR-System nach dem in Tabelle 15 gezeigten Reaktionsverlauf durchgeführt.

Tab. 15: Reaktionsverlauf der qPCR

Reaktion	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [sek]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	95	120	1
Zyklische Denaturierung	95	5	40
Hybridisierung und Extension der Oligonukleotide	62	25	

Die qPCR-Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Till Scheuer. Die Analyse der relativen Expressionsunterschiede erfolgte anhand der $\Delta\Delta\text{C}_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen [91].

2.2.2.5 Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Assay

Um die Induktion oxidativen Stresses nach erhöhter Sauerstoffexposition nachzuweisen, wurde mittels eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) die Konzentration von *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* in beiden Versuchsgruppen (Hyperoxie vs. Normoxie) zum Zeitpunkt P7 bestimmt. Mittels TBARS-Assay lässt sich die Konzentration von Malondialdehyd (MDA) bestimmen. MDA entsteht als Abbauprodukt der Lipidperoxidation und ist demnach ein Maß für oxidativen Stress [92]. Es wurde hierzu das TBARS Assay-Kit verwendet und

entsprechend den Anleitungen des Herstellers (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) durchgeführt und die Gesamtproteinlysate mittels TBARS-Assay analysiert.

2.2.2.6 Proteinisolation

Für die Proteinisolation wurde der Kortex einer Hemisphäre in RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich) gelöst und in einem Ultraschallbad zum Aufbrechen der Zellkerne inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei maximaler Umdrehungszahl. Der Überstand aus gelösten Proteinen aus Zytosol und Kern wurde abpipettiert und der Gesamtproteingehalt mittels dem BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) und einem Mikroplattenleser (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers bestimmt.

2.2.2.7 Western Blot

In Protein-Blotting-Experimenten wurden die Proteine LC3 und P62 als Marker für Autophagie analysiert. Zur Größenauftrennung wurden 20 µg der Proteinlysate auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Anlegen einer Spannung von 20 V erfolgte die Trennung in einer Laufkammer (Bio-Rad) über 1,5 h. Vor dem Auftragen wurden die Proteinlysate in Laemmli-Puffer (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad) für 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur späteren Bestimmung der Proteinbanden wurde ein Proteinmarker (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad) auf eine Spur des Proteingels aufgetragen. Anschließend wurden die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine mittels Semi-Dry-Verfahrens (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) innerhalb von 7 min und unter einer Spannung von 25 V auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Dabei erfolgte der Transfer der getrennten Proteine unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese und senkrecht zur Trennrichtung, um eine exakte Entsprechung beider Muster zu erreichen. Vor Beginn der Nachweisreaktion wurden die Protein-Blots mittels Roti-Blockpuffer (Roth) für 1 h bei RT geblockt, um überschüssige Proteinbindestellen der Membran zu sättigen und unspezifische Bindungen der Nachweisreagenzien zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mittels selektiver, primärer Antikörper über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen (15 min PBS) wurden diese mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper für 1 h bei RT inkubiert (siehe Kap. 2.1.3, Tab. 3). Die Signale der Chemolumineszenz wurden mittels ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories

GmbH, Feldkirchen) detektiert. Als Referenzwert für die Proteinexpression diente die Chemilumineszenz des Haushaltsproteins β -Aktin.

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 Paraffineinbettung und Anfertigung der Paraffin-Gewebeschnitte

Die über Nacht bei 4 °C in 4% PFA/PBS fixierten Großhirne wurden für 2 bis 3 h unter fließendem Leitungswasser bei Raumtemperatur gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (3 bis 4 h in 70% Ethanol Raumtemperatur, über Nacht in 80% Ethanol, 60 min 96% und 40 °C, zweimal 60 min bei 100% und 40 °C, 60 min 100% Ethanol / Chloroform 1:1 bei 40 °C, zweimal in Chloroform für 60 min bei 40 °C). Anschließend erfolgte die Imprägnierung mit Paraffin in 45 bis 60 min im Paraffinschrank bei 60 °C und erneut bei der gleichen Temperatur über Nacht.

Die Einbettung der Schnitte erfolgte abschließend in flüssigem Paraffin. Nach dem Aushärten des Paraffins wurden die Großhirne bei Raumtemperatur gelagert und mittels Mikrotom (Leica® SM2000 R, Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar) seriell geschnitten (Schnittdicke 10 μ m).

2.2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

In immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte (10 μ m) mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte der Nachweis des Zellsubtypmarkers Parvalbumin (PV) in Wildtyp-Mäusen und der Nachweis des Apoptosemarkers Caspase 3a (CASP3A) und des Proliferationsmarkers Ki67 in GFP-Kofärbung. Diese Proteine wurden durch spezifische Antikörper (Primärantikörper) detektiert, die in einem zweiten Schritt mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper (Sekundärantikörper) gelabelt und emissionsspektroskopisch unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden.

Nach Entparaffinierung in Roti®-Histol (zweimal 15 min), wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100% 5 min, anschl. 100% - 90% - 80% - 70% Ethanol, je 3 min) und 7 min in destilliertem Wasser rehydriert und anschließend zur Antigendemaskierung für 10 min in einem Citratpuffer (pH 6,0) auf 600 W in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden sie für 30 min bei Raumtemperatur (RT) zur Abkühlung belassen. Nach einem weiteren Waschvorgang (PBS, 5 min) wurden die Schnitte für 20 min mit 2N HCL (200 μ L je Objektträger) inkubiert. Nach dreimaligem

Spülen wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer mit einer Blockierungslösung (3% BSA, 0,2% Triton-X-100) für 60 min bei RT inkubiert (150 µL je Objektträger). So konnte das durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem verwendeten Antikörper und Makromolekülen der Gewebeschnitte entstehende Hintergrundrauschen reduziert werden. Im Anschluss wurden nach einer weiteren Waschung (PBS, dreimal 5 min) 150 µL des primären Antikörpers aufgetragen (1:200 in Dako) (siehe Kap. 2.1.3, Tab. 3). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am Folgetag erfolgte nach dreimaligem Waschen (PBS, je 5 min) die Inkubation der entsprechenden sekundären Antikörper (1:200 in Dako, 150 µL je Schnitt), und die Eindeckelung mit DAPI (Fluoroshield™ with DAPI, Sigma-Aldrich) zur Markierung der DNA in den Zellkernen. Die PV-Färbungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Till Scheuer.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Koronarschnitte der immunhistochemisch gefärbten Kortexhemisphären wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Keyence Biorevo BZ-9000 Generation II und der dazugehörigen Software BZ-II Viewer und BZ-II Analyzer unter 10facher Vergrößerung analysiert. Die absoluten Zellzahlen wurden je Kortexhälfte unter Verwendung von Adobe® Photoshop CS6 Extended unter dreifachem Zoom bestimmt. Bei zwei vorhandenen intakten Kortexhälften eines Tieres wurde der Mittelwert gebildet.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung von GraphPad PRISM™ 5.0. In einem ersten Schritt wurden die Versuchsergebnisse einer jeden Gruppe und Zeitstufe auf Ausreißer nach der ESD-Methode (*extreme studentized deviate*, *ESD method*, *Grubbs' test*) getestet. Zur anschließenden Beurteilung signifikanter Verteilungsunterschiede zwischen den zwei Versuchsgruppen erfolgte bei vorhandener Normalverteilung der *student's* T-Test (ungepaart, zweiseitig), bei Nicht-Normalverteilung oder $n < 5$ der Mann-Whitney-U-Test, wobei ein P-Wert $< 0,05$ als signifikant gesetzt wurde (*P $< 0,05$, **P $< 0,01$, ***P $< 0,001$). Hierbei wurden jeweils die Hyperoxie- vs. Normoxie-Gruppe einer Zeitstufe miteinander verglichen und graphisch unter Einbezug der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) abgebildet.

3 Ergebnisse

3.1 Erhöhter oxidativer Stress im Mausmodell nach neonataler Hyperoxie

Um die Induktion von oxidativem Stress durch Hyperoxie-Exposition nachzuweisen, wurde die Konzentration von *Thiobarbituric Acid Substances* (TBARS) im ELISA in Gehirnen der neonatalen Mäuse nach Normoxie und Hyperoxie analysiert (Abb. 5). Mithilfe von TBARS können Malondialdehyde als Produkte der Lipidperoxidation nachgewiesen werden. Sie sind somit direkter Marker der Schädigung von zellulären Lipiden durch oxidativen Stress.

Hyperoxie-Exposition (48 Stunden P5 bis P7) führte zu einem signifikanten Anstieg der Lipidperoxidation im Cerebrum der neonatalen Mäuse.

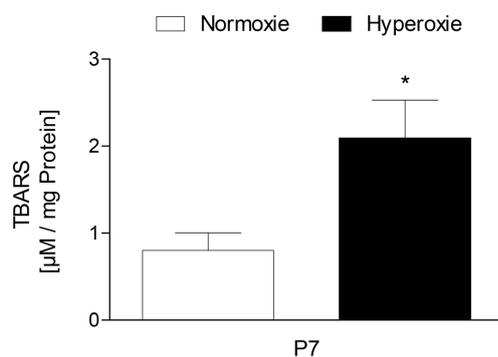


Abb. 5: Erhöhter oxidativer Stress im Kortex der neonatalen Mäuse nach Hyperoxie-Exposition.

48 h Hyperoxie (P5 bis P7) erhöhte die Konzentration von TBARS als Marker der Lipidperoxidation im Cerebrum der neonatalen Mäuse (NOR $0,80 \pm 0,20$; HYP $2,09 \pm 0,44$, * $P < 0,05$; $n = 8$).

3.2 Veränderungen von Subtypen GABAerger Interneurone nach postnataler Hyperoxie

Niedrige Sauerstoffkonzentrationen können die Entwicklung muriner embryonaler Stammzellen aus den MGE fördern und auch die Anzahl aus kortikalen Stammzellen hervorgehender Neurone erhöhen [93, 94]. Im Rattenmodell führte Hyperoxie zur gestörten Differenzierung und Proliferation von Neuronen des Hippocampus [95]. Um

einen möglichen Effekt postnataler Hyperoxie auf die Ausbildung GABAerger Interneurone im Kortex zu untersuchen, führten wir RNA-Expressionsanalysen und immunhistologische Färbungen verschiedener Subtypen durch. Nahezu 100% der GABAergen Interneurone lassen sich einem der drei Subtypen zuteilen, die über die Expression von Parvalbumin (PV), Somatostatin (SST) oder den ionotropen Serotoninrezeptor 5HT3a (5HT3aR) definiert werden, dessen Gruppe wiederum in die Marker *Vasoactive intestinal peptide* (VIP) und Reelin (RELN) unterteilt werden kann (siehe Kap. 1.3, Abb. 1) [51]. *LIM-homeodomain transcription factor 6* (LHX6) gehört zur Familie der *LIM-homeodomain*-Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Zelldifferenzierung spielen. LHX6 diente als Marker unreifer Vorstufen für Interneurone aus den MGE. SST und PV kennzeichnen die reifen Stufen der in den MGE generierten GABAergen Interneurone [47]. Da PV erst ab der zweiten postnatalen Woche exprimiert wird [96], erfolgte die Analyse dieses Markers gesondert. Die meisten in den CGE generierten Interneurone exprimieren entweder Reelin (RELN) oder *Vasoactive intestinal peptide* (VIP) [47, 97]. In isolierten Kortices wurde die *Lhx6*-Genexpression als Marker früher PV+ und SST+ Interneurone mittels qPCR zu den Zeitpunkten P7, P9 und P11 untersucht.

Im Ergebnis zeigte sich die *Lhx6*-Genexpression in der Versuchsgruppe nach 48 h Hyperoxie (HYP) zum Zeitpunkt P9 um 19,88% ($80,12\% \pm 5,02\%$, $n = 7$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Normoxie (NOR) $100\% \pm 7,02\%$, $n = 8$) vermindert (* $P < 0,05$). Die Analyse für *Sst* ergab eine Reduktion der RNA-Expression in der Hyperoxie-Gruppe zum Zeitpunkt P9 um 31,27% (HYP $68,73\% \pm 5,96\%$, $n = 7$, ** $P < 0,01$) und zum Zeitpunkt P11 um 65,78% (HYP $34,22\% \pm 3,66\%$, $n = 6$, ** $P < 0,01$) im Vergleich zu Normoxie-exponierten Tieren (NOR P9: $100\% \pm 7,49\%$, $n = 8$; NOR P11: $100\% \pm 18,68\%$, $n = 7$). Die RNA-Expressionslevel von *Vip* zeigten sich zum Zeitpunkt P11 um über die Hälfte vermindert (NOR $100\% \pm 21,69\%$, $n = 7$, HYP $45,29\% \pm 1,65\%$, $n = 5$; * $P < 0,05$), die von *Reln* zum Zeitpunkt P9 um gut ein Drittel reduziert (NOR $100\% \pm 5,71\%$, $n = 8$; HYP $62,5\% \pm 4,28\%$, $n = 7$; ** $P < 0,01$). Hyperoxie beeinflusste die Ausbildung verschiedener GABAerger Subtypen (Abb. 6).

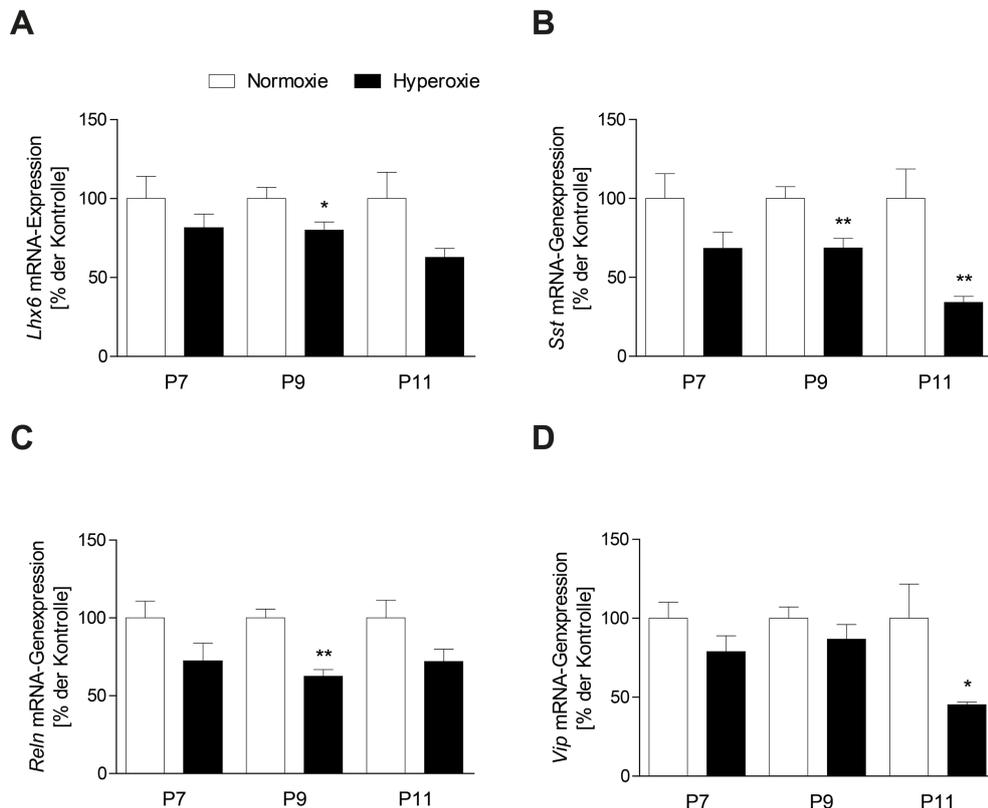
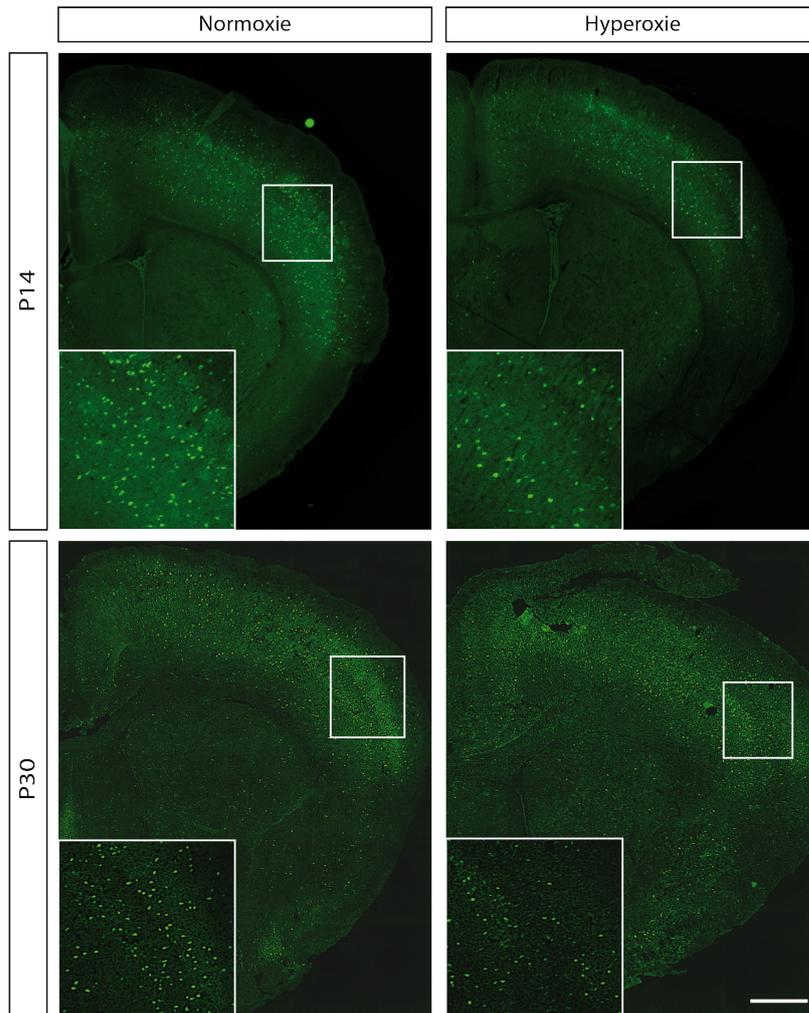


Abb. 6: RNA-Expression der Subtypen GABAerger Interneurone im murinen Kortex.

Kortikale Genexpression der Interneuron-Subtypenmarker *Lhx6* (PV+ und SST+) (A), *Reln* (B), *Sst* (C), *Vip* (D) nach 48 h Hyperoxie (P5 bis P7) zu den Zeitpunkten P7, P9 und P11. Im Ergebnis zeigte sich eine Reduktion in der Genexpression von *Lhx6*, *Reln* und *Sst* zu P9, sowie zusätzlich für *Reln* und *Vip* zum Zeitpunkt P11 (*P < 0,05; **P < 0,01; n = 5 – 8).

Zur Analyse der Anzahl PV-positiver (PV+) Interneurone nach neonataler Hyperoxie-Exposition (P5 bis P7) erfolgten immunhistochemische Färbungen in Kortices juveniler Mäuse zu den Zeitpunkten P14 und P30. PV+ Interneurone entstehen in den MGE [47] und entwickeln sich in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors LHX6 [52], wobei PV erst in der juvenilen Maus exprimiert wird [96]. Die Auszählung der Anzahl PV+ Interneurone (grün) in den Tieren erfolgte in Koronarschnitten der Kortexhemisphären. Hyperoxie verminderte die Anzahl PV-exprimierender Interneurone zum Zeitpunkt P14 um durchschnittlich ein Drittel von 280 (± 14) auf 190 (± 13) Zellen pro Kortexhemisphäre (*P < 0,05; n = 4). Die Reduktion zum Zeitpunkt P30 betrug durchschnittlich 23% von 419 (± 19) auf 322 (± 6) Zellen (*P < 0,05; n = 4). Neonatale Hyperoxie führte somit zu einem ausgeprägten Verlust von PV-exprimierenden Interneuronen in juvenilen Mäusen (Abb. 7).

A



B

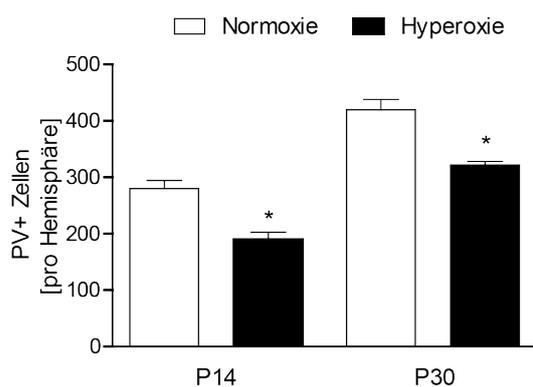


Abb. 7: Anzahl kortikaler PV-positiver (PV+) Interneurone in juvenilen Mäusen nach Hyperoxie. (A) Immunhistochemische Färbungen PV+ Interneurone (grün) in Kortexhemisphären der Wildtyp-Mäuse (Maßstabsleiste 500 μm). (B) PV+ Zellen pro Hemisphäre zu den Zeitpunkten P14 und P30. Neonatale Hyperoxie führte zu einem Verlust PV+ Interneurone in der Hyperoxie-Gruppe im Vergleich zur Normoxie-Gruppe zu den Zeitpunkten P14 und P30 (*P < 0,05; n = 4).

3.3 Untersuchung auf gestörte Reifung der Interneurone nach Hyperoxie anhand der Expression von GABA-Rezeptoruntereinheiten

Die Entwicklung des GABAergen Systems vollzieht sich langsam mit bedeutenden Schritten auch nach der Geburt und mit weiterer Reifung bis in die Adoleszenz. Bei Mäusen erreichen GABAerge Interneurone vermutlich erst nach P35 ihre für adulte Systeme typische Reife [46]. Reife Interneurone verfügen über ein hohes Aktivitätsniveau der zwei Isoformen GAD65 und GAD67 des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase (mit dem Ergebnis erhöhter zerebraler GABA-Konzentrationen) sowie eine erhöhte Aktivität von GABA-Transportern [46]. GABA_A-Rezeptoren sind aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzte Pentamere und schon im Stadium neuronaler Stammzellen vorhanden [46, 56]. Über die spezifische Verteilung der α -Untereinheit lässt sich ihre Reife charakterisieren. Unreifere Interneurone exprimieren zum Ende der Embryonalzeit und in der ersten postnatalen Woche GABRA3 und GABRA5, reifere Formen zeigen eine GABRA1- und GABRA4-Expression [46]. In qPCR-Analysen ermittelten wir die RNA-Expressionsraten der GABA-Rezeptoruntereinheiten *Gabra1*, 3, 4 und 5 zu den Zeitpunkten P7, P9 und P11.

Hyperoxie führte hier zum Zeitpunkt P11 zu einer signifikanten Verminderung der *Gabra5*-Genexpression um 50,62% (NOR 100% \pm 11,21%, n = 7; HYP 49,38% \pm 7,14%, n = 6; **P < 0,01). Alle anderen Rezeptoruntereinheiten zeigten sich durch Hyperoxie nicht verändert.

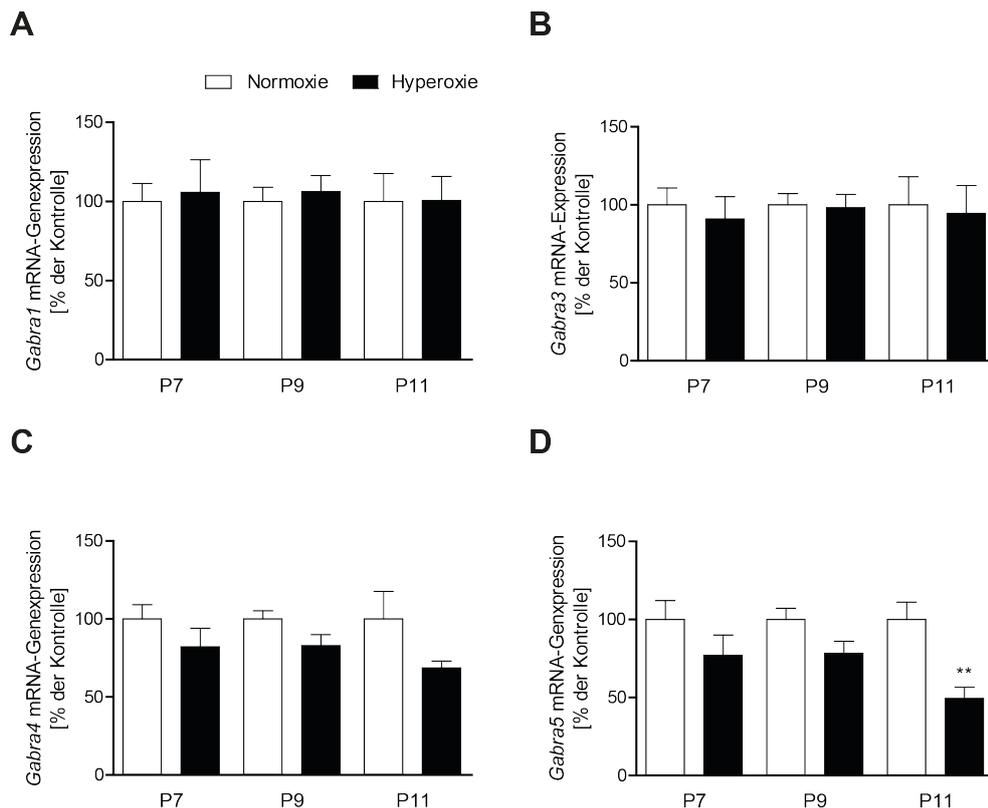


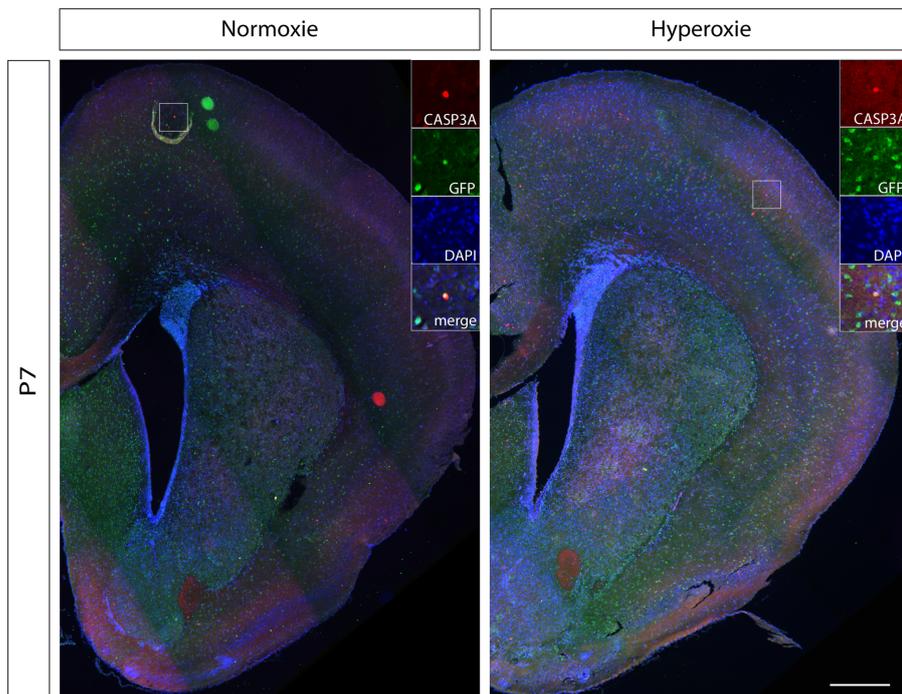
Abb. 8: RNA-Expression der α -Untereinheiten des GABA-Rezeptors nach neonataler Hyperoxie. Bis auf die Reduktion des *Gabra5* zum Zeitpunkt P11 (** $P < 0,01$) zeigten sich keine Unterschiede in der RNA-Expression zwischen Normoxie- und Hyperoxie-Gruppe ($n = 6 - 8$).

3.4 Apoptose GABAerger Interneurone ist nach neonataler Hyperoxie unverändert

Apoptose spielt in der Neurogenese eine große Rolle, nur etwa die Hälfte aller initial gebildeten Neurone überlebt [98]. Während dies für die physiologische Gewebsentwicklung und -homöostase fundamental ist, können Stressoren zu einer pathologischen Aktivierung der apoptotischen Signalkaskaden führen. So führt oxidativer Stress in Neuronen des unreifen Gehirns im Tiermodell zu erhöhtem Zelltod [99]. Um zu untersuchen, ob die beobachtete Verminderung von Interneuronen durch einen vermehrten apoptotischen Zelltod zu erklären ist, wurden Koronarschnitte der Kortexhemisphären von transgenen GAD67-eGFP-Mäusen, in denen GABAerge Interneurone GFP-gelabelt grün fluoreszierend erscheinen, der beiden Versuchsgruppen (Normoxie vs. Hyperoxie) in immunhistochemischen Kofärbungen mit Caspase 3a / GFP (*green fluorescent protein*) analysiert. Caspase 3 ist im

Zytoplasma aller apoptotischen Zellen präsent und die aktivierte Form Caspase 3A (CASP3A) gemeinsamer Effektor verschiedener zu Apoptose führender intrazellulärer Signalkaskaden [100]. Im Ergebnis zeigte sich keine erhöhte Apoptose in GFP-positiven (GFP+) Zellen in der Gruppe der Hyperoxie-exponierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu den untersuchten Zeitpunkten P7, P9, P11 und P14 (Abb. 9). Das generelle Niveau von Apoptose GFP+ GABAerger Interneurone zeigte sich sehr niedrig.

A



B

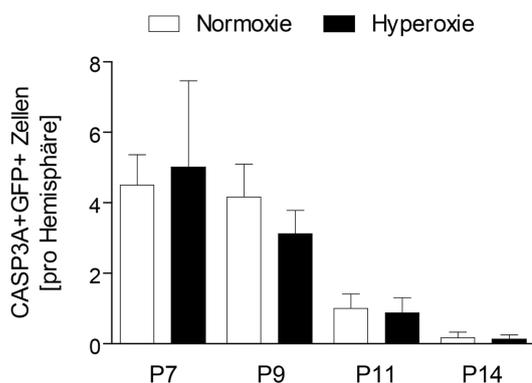


Abb. 9: Kein erhöhter Zelltod in GABAergen Zellen nach Hyperoxie-Exposition. (A – B) Immunhistochemische Färbungen (Maßstabsleiste 500 µm) für CASP3A zeigten keinen vermehrten apoptotischen Zelltod in GFP+ Zellen der GAD67-eGFP-Mäuse nach 48 h Hyperoxie-Exposition zu den Zeitpunkten P7 (hier exemplarisch dargestellt), P9, P11 und P14 (n = 3 – 4).

3.5 Autophagie im Kortex Hyperoxie-exponierter Mäuse nicht erhöht

Autophagie, als zellulärer Prozess der Degradation selektierter Proteine und Zellorganellen, ist für die Energiebalance einer Zelle lebenswichtig. Es ist ein Überlebensmechanismus der Zelle, dessen Deregulierung als Form des nicht-apoptotischen Zelltods aufgefasst werden kann [101]. Hyperoxie induzierte verstärkte Autophagie-Prozesse im Gehirn der neonatalen Ratte und schien hierüber die Hirnentwicklung zu beeinflussen [102]. In unserem Tiermodell neonataler Hirnschädigung untersuchten wir daher wichtige Marker für Autophagie auf RNA- und Proteinebene. Mittels qPCR-Untersuchungen des Kortex bestimmten wir die RNA-Expressionen von *autophagy related protein (Atg) 3* und *Atg12* jeweils der Norm- und Hyperoxie-Gruppe zu den Zeitpunkten P7, P9 und P11 (Abb. 10, A – B). Atg3 und Atg12 spielen für die Initiation und Komplettierung des Autophagosoms eine wichtige Rolle [103]. Die Analyse der *p62*-Konzentration erfolgte auf RNA-Ebene zu den Zeitpunkten P7, P9 und P11 (Abb. 10C) und auf Protein-Ebene im Western Blot zu den Zeitpunkten P7 und P14 (Abb. 10E und G). Die Proteinkonzentration von *Microtubule associated protein light chain 3 II* (LC3 II) wurde mittels Western Blot zu den Zeitpunkten P7 und P14 untersucht und jeweils ins Verhältnis zum zytosolischen LC3 I gesetzt (LC3 II/LC3 I Ratio) (Abb. 10D und F). LC3 II ist eines der wichtigsten Membranproteine des Autophagosoms und ein valider Marker stattfindender Autophagie-Prozesse [104]. Es interagiert mit dem Molekül *p62* auf den polyubiquitinierten Proteinaggregaten für deren selektive Aufnahme [105].

Bis auf eine signifikante Verminderung von 27% der RNA-Expression von *Atg12* zum Zeitpunkt P11 (NOR 100% ± 6,02%, n = 7; HYP 73,02% ± 4,85%, n = 5; **P < 0,01), ließen sich auf RNA- oder Proteinebene keine Unterschiede zwischen Hyperoxie- und Normoxie-Gruppe feststellen (Abb. 10).

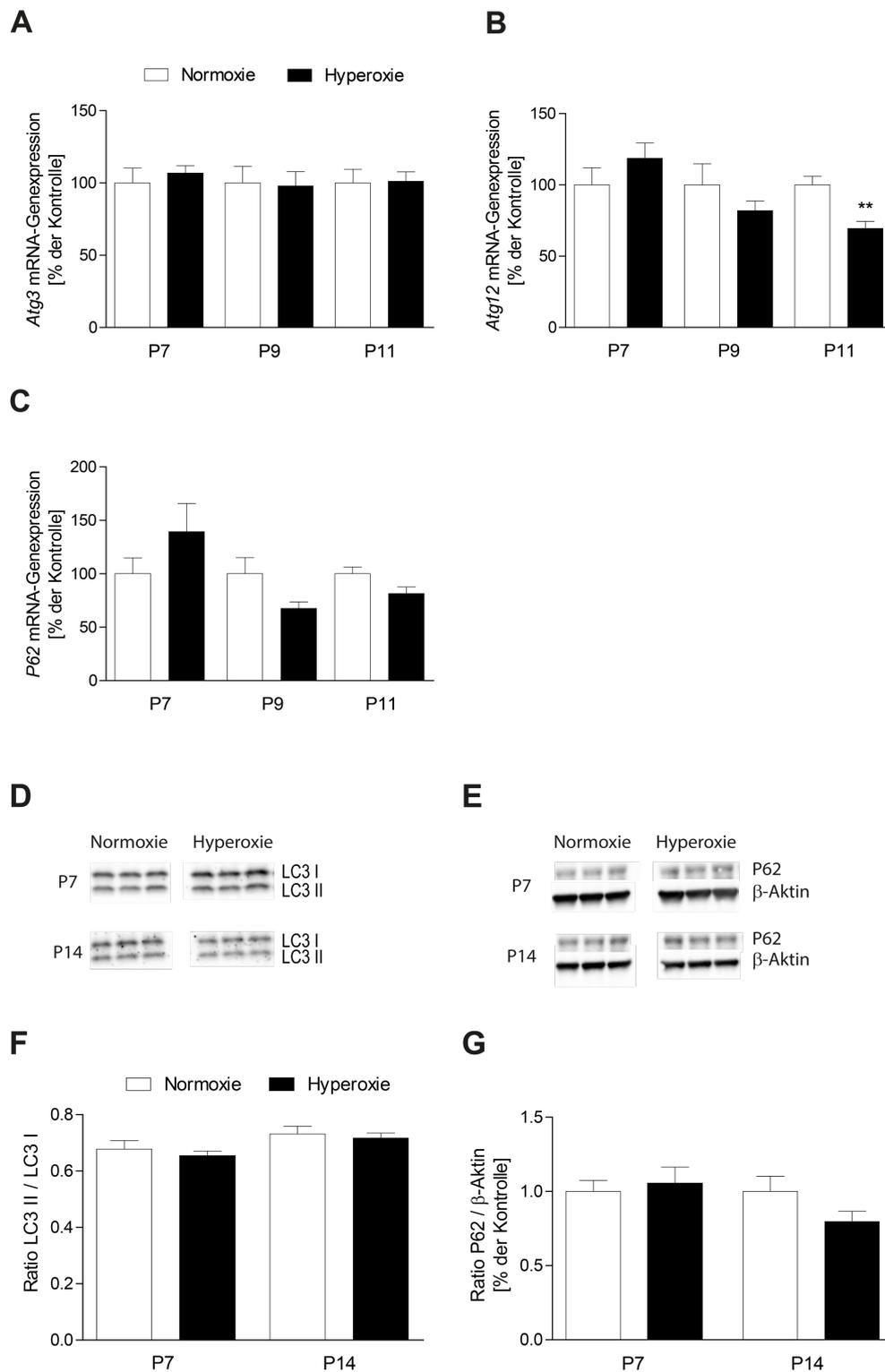


Abb. 10: Hyperoxie hat keinen direkten Einfluss auf Autophagie im Gehirn neonataler Mäuse. (A – C) RNA-Expression von *Atg3* (A), *Atg12* (B) und *P62* (C). Lediglich *Atg12* zeigte sich nach neonataler Hyperoxie-Exposition reduziert zum Zeitpunkt P11 (** $P < 0,01$; $n = 5 - 8$). (D – G): Western Blot-Analyse der Proteinexpression von LC3I und LC3 II (D) und P62 (E und G) zu den Zeitpunkten P7 und P14. Die Proteinexpression von P62 wurde auf die Proteinexpression von β -AKTIN normalisiert. Das Verhältnis der Proteinexpression aus LC3 II / LC3 I (F) ist in beiden Gruppen (Hyperoxie vs. Normoxie) ähnlich ($n = 8$).

3.6 Hyperoxie hat keinen Einfluss auf die Proliferation GABAerger Interneurone im Kortex

Die Frage der Proliferationsfähigkeit bzw. -Aktivität während der postnatalen Entwicklung ist nicht eindeutig beschrieben. Jovanovic et al. zufolge findet die finale Mitose der Interneurone bereits in den GE und vor ihrer Migration in den Kortex statt [53]. Faux et al. führten in ihrem Review verschiedene Studien auf, die proliferierende GABAerge Zellen in den postnatalen SVZ und IZ dokumentierten [48]. Wir untersuchten deshalb in einer immunhistochemischen Kofärbung die Proliferation von GFP+ Interneuronen im postnatalen Kortex zu den Zeitpunkten P7 und P9.

Im Kortex der transgenen GAD67-eGFP-Maus mit Antikörpern gegen Ki67 als Marker für Proliferation zeigte sich eine geringe Anzahl proliferierender Zellen (Abb. 11). Zum Zeitpunkt P7 waren dies durchschnittlich 0,88 Ki67-GFP-positiven (Ki67+GFP+) Zellen in der Normoxie-Gruppe ($\pm 0,43$, $n = 4$) und 1,63 in der Hyperoxie-Gruppe ($\pm 0,38$, $n = 4$). Auszählungen zum Zeitpunkt P9 ergaben durchschnittlich 2,67 Ki67+GFP+Zellen im Kortex der Normoxie-Gruppe ($\pm 1,33$, $n = 4$) bzw. 2,25 in der Hyperoxie-Gruppe ($\pm 1,32$, $n = 3$). Ein signifikanter Unterschied der Anzahl Ki67+ GABAerger Interneurone durch eine Hyperoxie-Exposition ließ sich im Gruppenvergleich nicht feststellen ($P > 0,05$). Der erhöhte Mittelwert der Ki67+ Interneurone zum Zeitpunkt P9 im Vergleich zu P7 war bei hoher Standardabweichung nicht signifikant ($n = 4$).

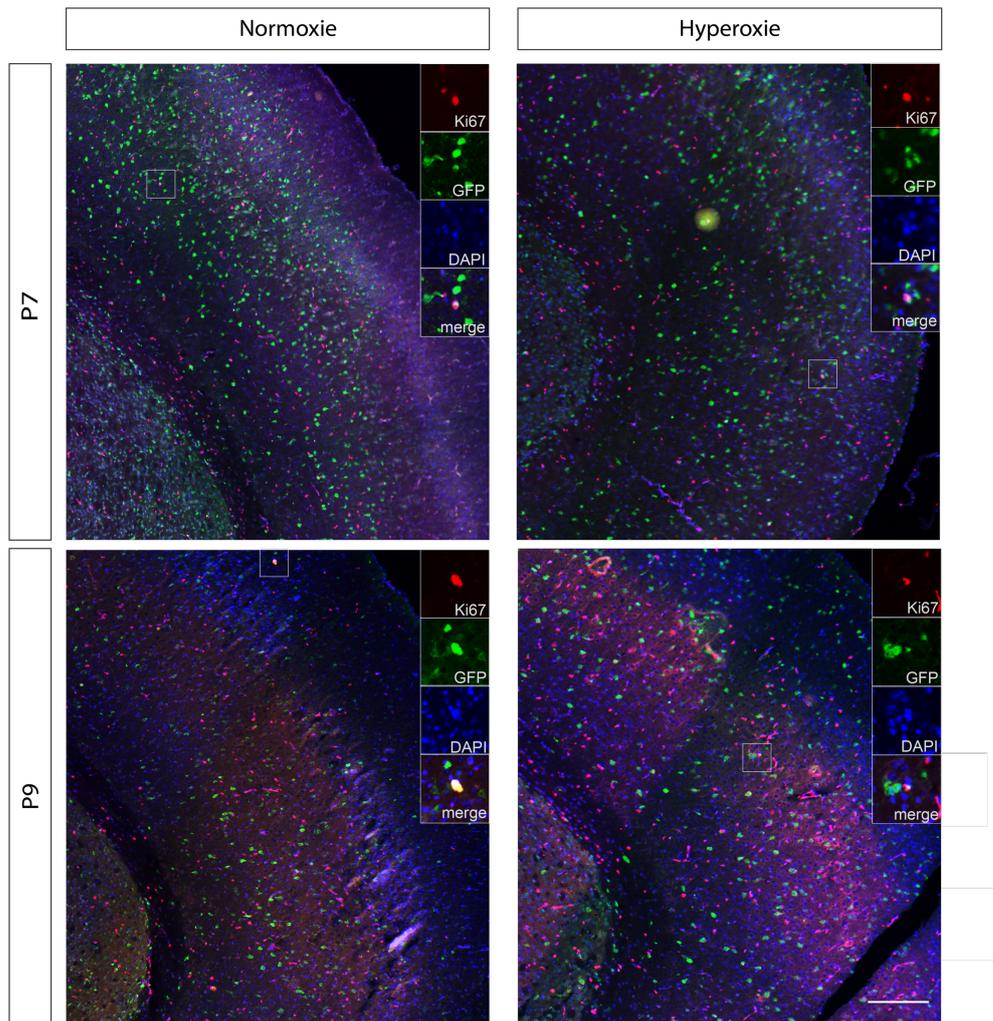
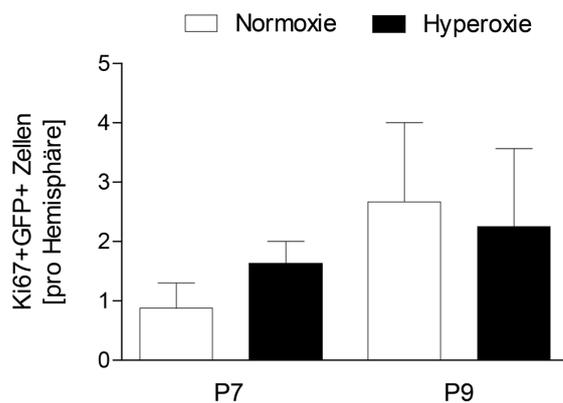
A**B**

Abb. 11: Analyse der Proliferation GABAerger Interneurone. (A – B) Immunhistochemische Färbungen (Maßstabsleiste 150 µm) des Proliferationsmarkers Ki67 (rot) zeigten die Proliferation einer kleinen Anzahl GABAerger Interneurone (grün, GFP) im murinen Kortex zu den Zeitpunkten P7 und P9, jedoch keinen Proliferationsunterschied zwischen den zwei Gruppen Hyperoxie und Normoxie (n = 3 – 4).

3.7 Verminderte Genexpression von *Sdf1* und *Gdnf* im Kortex nach Hyperoxie

GABAerge Interneurone migrieren aus den *Ganglionic Eminences* (GE) tangential entlang der kortikalen marginalen, subventrikulären oder intermediären Zonen und dann radial in die korrekte kortikale Schicht (siehe Kap. 1.3., Abb. 2). Ihr Weg wird über verschiedene motogene, chemoattraktive und chemorepulsive Signale geleitet. Eine wichtige Rolle der Steuerung der tangentialen Migration und Integration des Neurons in die korrekte kortikale Schicht spielt der *stromal cell-derived factor 1* (SDF1), auch *C-X-C motif chemokin 12* (CXCL12) genannt, mit seinem Rezeptor CXCR4 [106, 107]. Wir untersuchten mittels qPCR die RNA-Expression von *Sdf1* und seinem Rezeptor *Cxcr4* in Kortexen zu den Zeitpunkten P7, P9 und P11.

Sdf1 zeigte sich in Kortexen nach 48 Stunden Hyperoxie-Exposition (80% O₂) signifikant vermindert zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe in Normoxie (21% O₂) (Abb. 12A). Werte nach Hyperoxie im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben eine ca. 40%ige Reduktion zum Zeitpunkt P7 (NOR 100% ± 13,99%, n = 8; HYP 60,04% ± 7,82%, n = 7, *P < 0,05), eine Reduktion um etwa ein Drittel zu P9 (NOR 100% ± 6,66%, n = 8; HYP 68,05% ± 8,22%, n = 8, **P < 0,01) und eine Halbierung der *Sdf1*-Expression zu P11 (NOR 100% ± 7,14%, n = 7; HYP 53,70% ± 4,03%, n = 6; ***P < 0,001). Eine Hyperoxie-induzierte Verminderung von *Cxcr4* war zu den Zeitpunkten P9 um 40% (NOR 100% ± 8,12%, n = 8; HYP 60,31% ± 5,73%, n = 7; **P < 0,01) und zu P11 um 60% (NOR 100% ± 12,93%, n = 7; HYP 39,94% ± 6,75%, n = 6; **P < 0,01) zu beobachten (Abb. 12B). Der postnatale Anteil der Migration der Interneurone könnte somit durch die dargelegten verringerten Expressionslevel von *Sdf1* und dessen Rezeptor *Cxcr4* nach Hyperoxie beeinträchtigt werden.

Glia cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) ist ebenfalls in verschiedene Schritte interneuronaler Migration involviert. Im unreifen Kortex wird GDNF von Gliazellen auf den tangentialen Migrationsrouten exprimiert und wirkt motogen und chemoattraktiv auf Interneurone aus den *Medial Ganglionic Eminences* (MGE) [108]. Auch erschien GDNF *in vitro* für die morphologische Reifung dieser Interneurone essentiell [108]. Wir untersuchten die RNA-Expression von *Gdnf* mittels qPCR zu den Zeitpunkten P7, P9 und P11 in Hyperoxie- und Normoxie-Gruppe (Abb. 12C).

Es zeigte sich eine Reduktion kortikaler *Gdnf*-Expression nach Hyperoxie-Exposition (48 Stunden 80% O₂) um mehr als die Hälfte zum Zeitpunkt P11 (NOR 100% ± 11,11%, n = 6; HYP 46,48% ± 12,53%, n = 6; **P < 0,01). Frühere Zeitpunkte waren von diesem Effekt nicht signifikant betroffen. Verminderte GDNF-Level könnten somit zu einem möglichen Migrationsdefizit GABAerger Interneurone nach neonataler Hyperoxie beitragen.

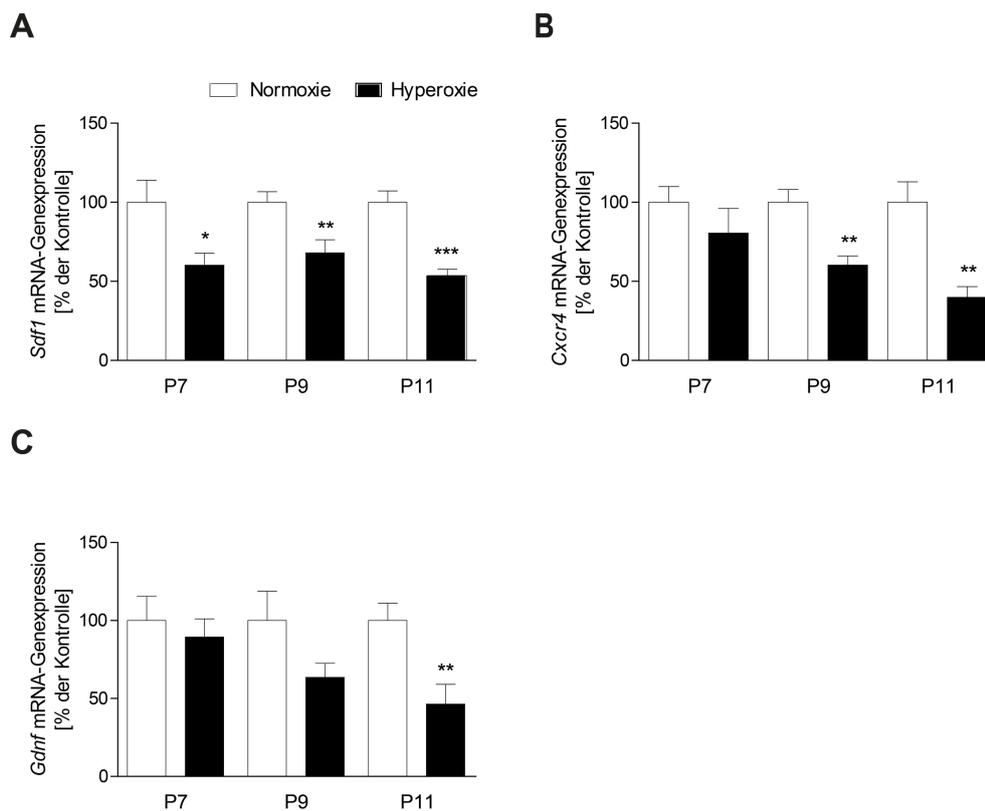


Abb. 12: Auswirkungen von Hyperoxie auf die RNA-Expression kortikaler Migrationsfaktoren.

(A – B) Die Genexpression des Migrationsfaktors *Sdf1* (A) und seines Rezeptors *Cxcr4* (B) zeigte sich im Kortex der neonatalen Mäuse nach 48 h Hyperoxie-Exposition (P5 – P7) zu den Zeitpunkten P7 (*Sdf1*), P9 und P11 (*Sdf1* und *Cxcr4*) signifikant reduziert. (C) Neonatale Hyperoxie (P5 – P7) verminderte die kortikale Genexpression des Migrationsfaktors *Gdnf* signifikant zum Zeitpunkt P11 (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n = 6 – 8).

4 Diskussion

4.1 Perinatale Hirnschäden durch Hyperoxie

Mehr als jedes zehnte Kind dieser Welt wird heutzutage zu früh geboren und die Anzahl von Frühgeburten nimmt in fast allen Ländern zu [109]. Die zu früh erfolgte Geburt setzt dabei das unreife und sich noch entwickelnde Gehirn drastisch veränderten Umgebungsbedingungen aus. Auch in Abwesenheit einer deutlichen parenchymatösen Läsion oder einer Hirnblutung in der Neonatalzeit sind später erkennbare, funktionelle Veränderungen bei ehemaligen Frühgeborenen möglich [10]. Die neuronale Population der GABAergen Interneurone vollzieht wichtige Entwicklungsphasen während der Subtypendifferenzierung, der Migration und der Lamination gegen Ende der Schwangerschaft. Diese komplexen Vorgänge können leicht durch exogene Stimuli gestört werden. Der Fokus dieser Arbeit richtete sich auf die Entwicklung der GABAergen Interneurone und ihre Beeinflussung durch erhöhte Sauerstoffkonzentrationen der postnatalen Umgebung.

Sauerstofftoxische Effekte auf die weiße und graue Hirnsubstanz ließen sich in einem Rattenmodell perinataler Hirnschädigung vor allem innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen nachweisen [99]. Viele weitere Studien lieferten seitdem Evidenz schädigender Auswirkungen erhöhter Sauerstoffkonzentrationen auf die weiße Substanz und beschrieben Veränderungen in Kortex, Basalganglien, Hypothalamus und Hippocampus [110]. In Verhaltensexperimenten führte eine Hyperoxie-Exposition neonataler Mäuse von 48 Stunden zu erhöhter Motoraktivität sowie zu motorischen Koordinationsdefiziten in regulären und komplexen Laufrädern [87]. In einem drastischeren Schädigungsmodell mit längerer Hyperoxie-Exposition neonataler Mäuse von bis zu zwei Wochen 85% O₂ war im juvenilen Alter der Tiere ein schlechteres Abschneiden im *water maze*- und *novel object recognition*-Test zu erkennen, was auf Hyperoxie-induzierte Veränderungen des räumlichen Gedächtnisses und der Aufmerksamkeit deutete [111]. Die in beiden Studien untersuchten Defizite ähneln den häufig beobachteten Verhaltensauffälligkeiten bei ehemals frühgeborenen Schulkindern [22].

Wir untersuchten den Einfluss einer zweitägigen Exposition mit 80% Sauerstoff (P5 bis P7) auf Entwicklungsschritte postnataler GABAerger Interneurone *in vivo*. Das murine Gehirn ist am postnatalen Tag P5 vom Entwicklungsstand her etwa vergleichbar mit dem menschlichen Kortex der 28. SSW [30]. 80% O₂ über 48 Stunden erzeugten in Mäusen einen Anstieg der Blut-O₂-Partialwerte, der dem bei Frühgeborenen beobachteten Anstieg der Sauerstoffpartialwerte nach Geburt ähnelt [86]. Das Modell simuliert in diesem Sinne die postnatalen O₂-Veränderungen durch Verlust der intrauterinen Umgebungsbedingungen des frühgeborenen Kindes.

Unsere Ergebnisse zeigten eine Reduktion spezifischer Subtypen kortikaler Interneurone durch Hyperoxie, die sich nicht durch verstärkte Apoptose, Autophagie oder veränderte Proliferationsraten GABAerger Interneurone erklären ließ. Verminderte RNA-Expressionslevel der Migrationsfaktoren *Sdf1*, *Cxcr4* (SDF1-Rezeptor) und *Gdnf* deuteten auf Migrationsdefizite GABAerger Interneurone als potentielle Ursache ihrer beobachteten Reduktion hin.

4.2 Veränderungen der Ausbildung und Reifung GABAerger Subtypen durch Hyperoxie

Während der Entwicklung bildet das GABAerge System interneuronale Subtypen mit unterschiedlichen morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften aus (siehe Kap. 1.3, Abb. 1). PV+ Interneurone repräsentieren mit einem Anteil von 40% den größten Subtyp der GABAergen Interneurone [51]. Als Calcium-bindendes Protein ist Parvalbumin (PV) ein wichtiges Membranprotein und birgt einen Überlebensvorteil für die Zelle [112]. PV+ Zellen erzeugen γ -Band-Oszillationen, die für kognitive Prozesse, beispielsweise Gedächtnisbildung und Informationsverarbeitung sensorischer Stimuli wichtig sind [113]. Sowohl die Gesamtzahl PV+ Interneurone als auch die Dichte der PV-Expression ist in Individuen mit Schizophrenie vermindert und es wurde gezeigt, dass dies im Ergebnis zu einer Art „Ruhezustand“ des betroffenen Neurons und somit zu einer verringerten Inhibition von Pyramidenzellen führt [112]. Auch in Modellen von Autismus-Spektrum-Störungen spielt PV eine zunehmende Rolle [114]. So zeigten Knock-Out-Mäuse, in denen das PV-Gen selektiv abgeschaltet ist, repetitiv-stereotypes Verhalten, verminderte soziale Interaktion und ein erhöhtes Risiko epileptischer Anfälle [115].

Unsere Ergebnisse zeigten eine Hyperoxie-induzierte Reduktion der Anzahl kortikaler PV+ Interneurone (P14, P30). Da wir sehen, dass PV+ Interneurone in ihrer Anzahl von P14 zu P30 weiter zunehmen, könnten Analysen zu späteren Zeitpunkten dabei helfen, den weiteren Einfluss von neonataler Hyperoxie auf die Proliferation derjenigen Interneurone zu untersuchen, die den Marker PV erst im weiteren Verlauf noch exprimieren. Darüber hinaus zeigte sich in unserem Modell eine Verminderung der *Sst*-RNA-Expression nach Hyperoxie. In einem anderen Mausmodell perinataler Hirnschädigung wurde die Einschränkung morphologischer Komplexität in migrierenden SST-positiven (SST+) Interneuronen beobachtet, was potenziell zu erniedrigten Anzahlen von Interneuronen im Kortex führen könnte [116]. Durch Hyperoxie vermindert zeigte sich in unseren Experimenten zudem der in interneuronalen Vorläufern aus den MGE exprimierte Transkriptionsfaktor *LIM-homeodomain transcription factor 6* (*Lhx6*). LHX6 ist für die Spezifizierung und auch tangentielle Migration der PV+ und SST+ Interneurone unabdingbar [52]. Es wurde gezeigt, dass eine LHX6-Reduktion die Migration der Interneurone verlangsamen und zu verminderten Anzahlen PV+ und SST+ Interneurone im Kortex führen kann [117]. Dass sich LHX6, PV und SST in unseren Experimenten durch Hyperoxie vermindert zeigten, deutet auf eine tiefgreifende Störung des GABAergen Netzwerkes hin – zieht man in Betracht, dass die PV und SST-Subtypen ein dichtes System aus inhibitorischen Synapsen um die Pyramidalneurone bilden [118, 119].

Die Subtypenmarker *Vip* und *Reln* zeigten sich nach der Hyperoxie-Exposition ebenfalls vermindert, wenn auch zu einem geringeren Ausmaß. VIP wurde als molekularer Marker relativ spät geborener Interneurone aus den *Caudal ganglionic eminences* (CGE) in der Maus verwendet [120]. VIP-positive (VIP+) Interneurone sind von besonderer Bedeutung in der postnatalen Ausbildung inhibitorisch-inhibitorischer und inhibitorisch-exzitatorischer Verbindungen [121]. Reelin, das postnatal hauptsächlich von Interneuronen exprimiert wird [122], ist für dendritisches Wachstum sowie für eine korrekte Initiierung als auch Terminierung der interneuronalen Migration wichtig [53, 123]. In Abwesenheit von Reelin schienen spät geborene Interneurone nicht in der Lage zu sein, ihre korrekte Position zu finden, sondern zeigten sich verstreut über den Kortex, während frühe Interneurone eine invertierte Schichtanordnung zeigten [124]. Dass sich die RNA-Expression von *Vip* und *Reln* jeweils vermindert zeigt, könnte somit auf eine gestörte Entwicklung dieser

Interneurone nach Hyperoxie hindeuten und verschiedene Entwicklungsschritte kortikaler Netzwerke beeinflussen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in menschlichem *post mortem*-Gewebe gefunden. Die Studie von Stolp et al. (2019) an humanem Kortexgewebe frühgeborener Neonaten offenbarte Defizite in Subtypen von Interneuronen in oberen Schichten des Kortex, in denen sich Anzahlen und morphologische Komplexität vermindert zeigten [116]. Da andere kortikale Neurone dieser Layer unverändert waren, kann von einer spezifischen Vulnerabilität von Interneuronen durch Frühgeburt ausgegangen werden [116]. Panda et al. (2018) untersuchten ebenfalls Kortices unterschiedlich früh auf die Welt gekommener Frühgeborener und beschrieben *post mortem* eine Verschiebung der diversen Subtypen der Interneurone, mit erniedrigten Anzahlen PV+ und GAD67+ Interneurone und zugleich erhöhten SST+ Interneuronen [85]. In ihrem Modell perinataler Hirnschädigung bei frühgeborenen Kaninchen ließen sich diese Effekte durch 17 β -Östradiol-Gaben aufheben (P14, P21), sodass eine Rolle fehlenden mütterlichen Östrogens für gestörte GABAerge Entwicklung diskutiert wurde [85].

In einer anderen präklinischen Studie in der neonatalen Maus führte chronische Hypoxie zu substantiellen Verminderungen von PV+, SST+ und VIP+ Interneuronen (P15), von denen PV+ und SST+ Subtypen bis in die adulte Maus reduziert blieben, während sich der Subtyp der RELN+ Interneurone hier später erhöht zeigte [125]. In einem Modell IL1 β -induzierter perinataler Hirnschädigung führte der Inflammationsstimulus ebenfalls zu einer Reduktion PV+ Interneurone (P10), die sich zwar im weiteren Verlauf numerisch erholten, jedoch eine persistierende, verminderte morphologische Komplexität ihrer Fortsätze aufwiesen (P40) [116]. Lacaille et al. (2019) etablierten ein neues Modell, das den Einfluss pränataler maternaler Inflammation mit postnataler chronischer Hypoxie verband [126]. In dieser Studie ließen sich durch den kombinierten Stimulus erniedrigte Anzahlen GAD65/67-exprimierender Zellen und aller Interneurone bis auf RELN+ Interneurone im präfrontalen Kortex nachweisen (P30) [126].

In Anbetracht der Ergebnisse aus den diversen präklinischen Modellen ist für die Schädigung des sehr unreifen Gehirnes von einer multifaktoriellen Genese auszugehen, nach der verschiedene Faktoren in unterschiedlichem Ausmaß und zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu den beobachteten GABAergen Defiziten im Kortex

beitragen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals den Einfluss erhöhten Sauerstoffs auf die Expression und Anzahl interneuronaler Subtypenmarker und liefern somit weitere Erklärungen für negative Auswirkungen hoher O₂-Konzentrationen von zu früh auftretender Geburt auf die Entwicklung GABAerger Interneurone. Es bleibt zu ergründen, ob dies eine bleibende Schädigung oder lediglich eine Reifungsverzögerung kortikaler Interneurone darstellt, die sich unter Umständen später ausgleicht. Hierfür könnten in Zukunft beispielsweise spätere Zeiträume in adulten Tieren untersucht werden. Eine Beeinflussung der kortikalen Netzwerk-Entwicklung wäre in beiden Szenarien möglich.

Unsere Ergebnisse hinsichtlich der Reifung GABAerger Interneurone zeigten bis auf die verminderte Expression des *Gabra5* keine Änderung von GABA-Rezeptorsubtypen-Verteilungen durch Hyperoxie. Immunhistochemische Färbungen in der transgenen GAD67-eGFP-Maus für NKCC2 (unreife Neurone) und KCC1 (reife Neurone) würden eine tieferegehende Quantifizierung reifer GABAerger Interneurone ermöglichen, waren jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchung. Die KCC1-Expression beginnt in der Maus ungefähr zum Ende der ersten postnatalen Woche [46]. Eine Rolle veränderter GABA-Rezeptor-Untereinheiten wird zum Beispiel auch für die Pathogenese von Autismus-Spektrum-Störungen diskutiert [127]. Weitere Untersuchungen unterschiedlicher Rezeptoren im Hyperoxie-Modell können für zukünftige Studien nützlich sein.

4.3 Regulation von Proliferation durch Sauerstoff

Der beobachteten Verminderung GABAerger Subtypen durch Hyperoxie könnten mutmaßlich veränderte Proliferationsraten zugrunde liegen. Zellkulturen neuronaler Vorläuferzellen beispielsweise proliferierten stärker in hypoxischen als in normoxischen Bedingungen [94], wodurch ein proliferationshemmender Effekt von Sauerstoff angenommen werden könnte. In der Tat führte eine 24 bis 48 h Hyperoxie-Exposition in einer Studie in Ki67-immunhistochemischen Färbungen zu verminderter Proliferation neuronaler Vorläuferzellen sowie unreifer und reifer Neurone im Hippocampus [128]. Ob und auf welche Weise Interneurone postnatal proliferieren, ist in Studien bisher nicht eindeutig beschrieben. Jovanovic et al. (2011) charakterisierten postnatale Interneurone in der Maus als postmitotisch [53]. Dementsprechend ließen

sich in einem Hypoxie-Modell perinataler Hirnschädigung in einer immunhistochemischen Ki67-Färbung zum Zeitpunkt P15 keine proliferierenden GAD67-positiven Interneurone beobachten [125]. In einer anderen Studie eines hypoxischen Schädigungsmodells zeigten sich in der adulten Ratte in einer retroviralen Markierungsmethode neu gebildete GABAerge Zellen, die funktionell in den Kortex integriert wurden [129]. Wu et al. zeigten mittels BrdU- sowie Ki67-Färbungen und der Beobachtung mitotischer chromosomaler Kondensationen zumindest die Fähigkeit zur Proliferation GABAerger Interneurone in den subventrikulären und intermediären Zonen [130].

Wir untersuchten daher die Proliferationsfähigkeit postnataler GABAerger Interneurone in immunhistochemischen Färbungen und konnten einige wenige proliferierende GABAerge Interneurone (Ki67+GFP+) im Kortex zeigen. Ein signifikanter Unterschied der Proliferationsraten zu den untersuchten Zeitpunkten P7 und P9 zwischen Hyperoxie- und Kontrolltieren ließ sich jedoch nicht feststellen. Möglich wäre eine eingeschränkte Proliferation zu einem früheren oder späteren als dem von uns erfasstem Zeitpunkt. Als Marker für sich teilende Zellen in der Interphase spiegelt Ki67 nur den aktuellen Zeitpunkt wider. Analysen mittels Bromdesoxyuridin (BrdU), das während der DNA-Synthese anstatt Thymin in die DNA eingebaut wird, könnten weitere Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität einer Zelle über einen längeren Zeitraum erlauben. BrdU-Injektionen während bzw. direkt nach neonataler Hyperoxie könnten hier im Mausmodell weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Beeinflussung von Proliferation durch erhöhte O₂-Partialdrücke liefern.

Für die Hyperoxie-Experimente dieser Arbeit lässt sich zusammenfassen, dass eine etwaige Schädigung der GABAergen Interneurone nicht durch veränderte Proliferationsraten zu erklären ist.

4.4 Fehlende Relevanz von Apoptose und Autophagie für die interneuronale Schädigung im Hyperoxie-Tiermodell

Als nächstes untersuchten wir, ob erhöhter Zelltod im Zusammenhang mit Hyperoxie das beobachtete GABAerge Defizit erklären könnte. Apoptose kann grundsätzlich über zwei Wege induziert werden: Während der extrinsische Weg über Oberflächenrezeptoren wie z. B. den TNF α -Rezeptor angestoßen wird, aktivieren Zellstress und DNA-Schäden den intrinsischen Weg [131].

Auch Interneurone unterliegen der physiologisch hohen Rate von Zelltod während der Entwicklung, die die initial gebildeten Anzahlen postnatal weiterhin drastisch reduziert [132]. Da die einzelnen Effektoren der apoptotischen Signalkaskade während der Hirnentwicklung so prominent sind [98], ist eine einfach auszulösende Überstimulation durch relative Hyperoxie denkbar. Dies schien in der Ratte vor allem für die ersten zwei postnatalen Wochen (P0 bis P14) der Fall zu sein, in denen sich Neurone besonders vulnerabel gegenüber Hyperoxie-induziertem Zelltod zeigten [99]. Erhöhter Zelltod kortikaler Neurone in Ratte und Maus nach neonataler Hyperoxie-Exposition ist in verschiedenen Studien beschrieben [133, 134]. Endesfelder et al. (2014) wiesen erhöhten Zelltod mittels TUNEL-Färbung des Kortex nach 24 und 48 Stunden Hyperoxie-Exposition (80% O₂) nach [128]. In unseren immunhistochemischen CASP3A-Färbungen in der transgenen GAD-eGFP-Maus untersuchten wir den spezifischen Einfluss von Hyperoxie-induzierter Apoptose auf GABAerge Interneurone des Kortex. Während TUNEL-Assays Strangbrüche der DNA nachweisen, ist aktivierte Caspase 3 (CASP3A) spezifischer Effektor der apoptotischen Signalkaskade, und damit ein spezifischerer, aber zeitlich begrenzterer Marker.

Zu den untersuchten Zeitpunkten P7, P9, P11 und P14 nach 48 Stunden Hyperoxie (P5 bis P7) ließ sich keine erhöhte Apoptose in kortikalen GABAergen Interneuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Eine zu einem früheren Zeitpunkt als P7 stattfindende verstärkte Apoptose wäre theoretisch denkbar, doch da die Analysen interneuronaler Subtypen zum Zeitpunkt P7 noch keine Auffälligkeiten aufwiesen, fehlen hierauf Hinweise. Es muss am ehesten von einem anderen Mechanismus mit dem Ergebnis der Verminderung von Interneuron-Subtypen ausgegangen werden.

Autophagie, oft als Schutzmechanismus vor Apoptose beschrieben, beschreibt die kontrollierte Selbstverdauung einzelner hierfür ausgewählter Zellbestandteile zur Erneuerung dieser, beispielsweise nach Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [102]. In Zellen neuronalen Ursprungs ist eine hohe Konversionsrate des LC3 I zu LC3 II (LC3 II/LC3 I-Ratio) als Ausdruck eines hohen basalen Flusses durch die Autophagie-Signalkaskade typisch [135]. In unseren Ergebnissen ließen sich jedoch keine Unterschiede der LC3 II/LC3 I-Ratio zwischen den beiden experimentellen Gruppen (Normoxie 21% O₂ und Hyperoxie 48 Stunden 80% O₂) feststellen. Das Protein P62 (auch SQSTM1, *sequestome 1* genannt), das bei Aktivierung von Autophagie erniedrigt vorliegt und somit einen Marker der Induktion von Autophagie

darstellt [136], zeigte sich ebenfalls unverändert. Auch war die RNA-Expression von *Atg3* zu keinem Zeitpunkt, die von *Atg12* lediglich zum Zeitpunkt P11 (**P < 0,01) durch Hyperoxie beeinflusst. Im Kontrast hierzu zeigten Bendix et al. (2012) in einem Hyperoxie-Modell der Ratte (P6 bis P7/P8 80% O₂) die erhöhte Expression von *Atg3*, *Atg12* und *Lc3b II* bereits nach 12 Stunden Hyperoxie und mutmaßten, dass durch Hyperoxie induzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Änderungen der Autophagie-Aktivität induzieren könnten [102]. Nach 24 Stunden Hyperoxie-Exposition zeigte sich in der gleichen Studie die Autophagie-Aktivität jedoch vermindert, während apoptotische Signalkaskaden hochreguliert wurden. Die Prozesse Apoptose und Autophagie scheinen demnach miteinander zu interagieren [102, 137]. Eine enge zeitliche Beobachtung ist nötig, um diese dynamischen Prozesse zu verstehen [135]. Frühere Messungen nach Hyperoxie könnten in unserem Modell vergleichend vorgenommen werden, doch ergaben sich zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf Veränderungen der Apoptose-Raten. Die isolierte Verminderung des Autophagie-Markers *Atg12* zum Zeitpunkt P11 auf RNA-Ebene erscheint als Ausdruck erhöhter Autophagie in der Bewertung nicht ausreichend, da sich auf Protein-Ebene keinerlei Veränderungen durch Hyperoxie zeigten. Yis et al. (2008) berichteten über Ergebnisse erhöhter Apoptose und Autophagie in Gehirnen 5 Tage alter Ratten nach Hyperoxie (80% O₂ im Vergleich zu 21% O₂ Normoxie) – verwendeten hierfür allerdings eine drastischere Hyperoxie-Spanne von Geburt bis einschließlich P5 [133]. Die Dauer der Hyperoxie-Exposition könnte somit für die beobachteten bzw. nicht-beobachteten Effekte eine entscheidende Rolle spielen.

Abschließend deuten unsere Ergebnisse nicht auf Apoptose oder Autophagie als durch erhöhte Sauerstoffniveaus getriggerte Mechanismen interneuronaler Schädigung hin. *Post mortem*-Studien bei ehemaligen Frühgeborenen deuten auf eine ähnlich geringe Rolle von Zelluntergang in der Pathogenese eher subtiler Hirnschädigung hin. Autopsie-Ergebnisse in Kindern nach Frühgeburt offenbarten in einem Drittel der Fälle mit schwerer zystischer periventrikulärer Malazie (PVL) erhöhten Zelluntergang der grauen Substanz, jedoch in keinem der Kinder mit chronischer, nicht-zystischer PVL [138]. Ein ähnliches Ergebnis lieferte eine Studie mit *post mortem* immunhistochemischen TUNEL-Färbungen des Kortex von Individuen mit früher diffuser Schädigung der weißen Substanz (*diffuse white matter injury*). Trotz erhöhter Marker von oxidativem Stress zeigten sich hier nur einige wenige, über den

Kortex verstreute apoptotische Zellen [139]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass weitere Mechanismen als einfacher Zelluntergang in der grauen Substanz nach Frühgeburt eine Rolle spielen. Feine Beeinträchtigungen stattfindender Reifungsprozesse könnten die Konnektivität des Gehirns verändern und zu den beobachteten neurologischen Langzeitfolgen führen [140].

4.5 Einfluss von Hyperoxie auf die Migrationsfaktoren SDF1 und GDNF

Als nächstes untersuchten wir Hinweise auf eine Hyperoxie-induzierte veränderte Migration der GABAergen Interneurone mittels Analysen wichtiger Migrationsmarker (SDF1, CXCR4, GDNF). Ist eine Kohorte GABAerger Interneurone auf den kortikalen Migrationswegen angelangt, wirkt SDF1 chemoattraktiv auf den tangentialen Bewegungskorridoren, und reguliert u. a. über Proteinstabilisation im Zytoskelett und Kontrolle der sich vortastenden Äste des Neurons dessen Migrationsrichtung [107, 141]. Die Interneurone verweilen für 48 Stunden in der Marginalzone [142], bevor sie radial in ihre kortikale Schicht migrieren, was als notwendiger ‚*delay en route*‘ für die Synchronisierung mit der zweiten großen Klasse von Neuronen, den Projektionsneuronen, eingeordnet wurde [53]. Vorläufer der Projektionsneurone sezernieren SDF1, wodurch sie mit den GABAergen Interneuronen in Kontakt stehen [143]. Ein Verlust des Rezeptors CXCR4 führt zu einer gestörten tangentialen Verteilung und verfrühter radialer Integration von Interneuronen [142].

Der Einfluss von Hyperoxie auf diese Prozesse ist kaum untersucht. In unserer Studie zeigten sich sowohl *Sdf1*- (P7, P9, P11) als auch *Cxcr4*- (P9, P11) Genexpressionslevel in Kortex nach neonataler Hyperoxie erniedrigt. Die Hyperoxie-induzierte Verminderung des SDF1-CXCR4-Signalweges fällt in die Zeit der finalen Migration und Positionierung der Interneurone in Mäusen [46], in der kortikale SDF1-Level physiologisch zunehmend sind [144]. Eine Störung der zu diesen postnatalen Zeitpunkten stattfindenden Prozesse könnte weitreichende Folgen für die Organisation interneuronaler Inhibition im Kortex haben.

Neben Vorläufern der Projektionsneurone wird SDF1 nach aktuellem Kenntnisstand von Meningealzellen, Astrozyten und Mikroglia exprimiert [143, 145-147]. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass Hyperoxie *in vivo* zu einer phänotypischen Veränderung von Astrozyten führt [86]. Auch eine verminderte Anzahl von Mikroglia nach Hyperoxie ist beschrieben [148].

Astrozyten- und Mikroglia-Schädigung könnte somit möglicherweise zu den beobachteten SDF1-Defiziten beitragen.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete SDF1-Verminderung könnte sein, dass die Expression von SDF1 und seinem Rezeptor CXCR4 abhängig von *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF1 α) ist [149, 150]. Durch die Funktionsweise von HIF1 α ist die genetische Expression wichtiger zellulärer Proteine unmittelbar von dem uns umgebenden O₂-Angebot abhängig [151]. Sauerstoff könnte somit als ein morphogenes Molekül der frühen postnatalen Hirnentwicklung betrachtet werden, dessen Effekte im Falle der pathologischen Hyperoxie zu einer Dysregulation der interneuronalen Migration beitragen.

In der Studie von Volk et al. (2014) wurden *post mortem* RNA-Expressionsanalysen für *Cxcr4* und *Cxcr7*, einem weiteren Rezeptor von SDF1, in Präfrontalkortices Schizophrenie-Erkrankter durchgeführt. Während in dieser Gruppe ebenfalls erniedrigte RNA-Level von *Gad67*, *Pv*, *Sst* und *Lhx6* gemessen wurden, zeigten sich *Cxcr4*- und *Cxcr7*-RNA-Expressionen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht [152]. Die in jener Studie beobachtete inverse Korrelation zwischen *Cxcr4/Cxcr7* und GABAergen Subtypenmarkern wurde als möglicher Kompensationsmechanismus verbliebener Interneurone diskutiert. Ob in unseren Hyperoxie-Experimenten mit größerem zeitlichem Abstand kompensatorisch erhöhte RNA-Level für *Cxcr4* messbar werden, kann in unserem Studiendesign nicht beantwortet werden. Hierüber könnten Analysen zu späteren, adulten Entwicklungszeitpunkten Aufschluss geben.

Die zellulären Effekte des Neurotrophins *glia cell-line derived neurotrophic factor* (GDNF) wurden zunächst vor allem im nigrostriatalen System erforscht, bevor dessen Involvierung in GABAerge Differenzierungs- und Migrationsprozesse in den Fokus rückten [153]. Unsere Ergebnisse zeigten einen Trend zur Verminderung von *Gdnf* in RNA-Expressionsanalysen nach Hyperoxie-Exposition zum Zeitpunkt P9 (P = 0,08) die zum Zeitpunkt P11 deutlicher ausgeprägt und statistisch signifikant wurde (P < 0,01). Eine Beteiligung beeinträchtigter GDNF-Signalwege für das beobachtete GABAerge Defizit käme somit infrage.

In vitro Zellkulturen aus den MGE wiesen nach GDNF-Gabe erhöhte Prozentsätze GABAerger Interneurone auf, was den Einfluss von GDNF auf die Differenzierung von Interneuronen unterstreicht [154]. Neben der GABAergen Differenzierung und

Migration wird GDNF auch für Neuroregeneration benötigt und durch Gliazellen sezerniert. So wird GDNF nach hypoxisch-ischämischem Insult von aktivierten Astrozyten verstärkt exprimiert [155, 156]. Eine Komponente der Neuroprotektion durch das von Astrozyten sezernierte GDNF scheint die Inhibition der durch Mikroglia initiierten Neuroinflammation zu sein [153]. Der Phänotyp und die Funktion von Astrozyten zeigte sich durch Hyperoxie im Mausmodell beeinflusst [86], was die GDNF-Expression beeinträchtigen könnte. Ebenso sind Oligodendrozyten (OL) in der Lage, GDNF zu produzieren [157]. Das speziell von OL exprimierte GDNF ist an der Synapsenbildung und an axonalem Wachstum beteiligt [157]. In der weißen Substanz, durch die GABAerge Interneurone migrieren, führte neonatale Hyperoxie zu erhöhter Apoptose und verminderter Proliferation von Oligodendroglia-Vorläufern und unreifen Oligodendroglia [86, 158, 159], was somit Auswirkungen auf die Sekretion von GDNF und die Migration von Interneuronen haben könnte. Auch die beobachteten SDF1-Defizite könnten zu einer Beeinträchtigung der OL führen, denn SDF1 fördert die Ausreifung von Oligodendrozyten-Vorläufern [160].

Hyperoxie-induzierte Gliazellschädigung und verminderte *Sdf1*- und *Gdnf*-Expressionen könnten vor diesem Hintergrund zu Veränderungen interneuronaler Migrationsprozesse führen.

Expressionsanalysen des GDNF-Rezeptors $GFR\alpha$ oder anderer transmembraner Signalpartner von GDNF wie beispielsweise MET [154], könnten weitere Erkenntnisse hinsichtlich einer Hyperoxie-induzierten Beeinflussung des GDNF-Signalweges liefern. In einem anderen Hyperoxie-Modell perinataler Hirnschädigung führte eine Hyperoxie-Exposition neonataler Mäuse von P7 bis P12 zu erhöhter *Gdnf*-RNA-Expression, und wurde – bei erhöhter Anzahl GFAP-positiver Zellen – ursächlich auf verstärkte Astroglieose zurückgeführt [148]. Dies ließ sich so in unserem Modell nicht beobachten. Vermutet werden könnte, dass eine längere Hyperoxie-Exposition zu größeren Verletzungen des Kortex führt – und andere neuroregenerative Prozesse angestoßen werden als die in unserem Modell subtiler perinataler Hirnschädigung beobachteten.

Zusammengefasst wiesen verminderte *Sdf1*-, *Cxcr4*- und *Gdnf*-Expressionen auf mögliche Beeinträchtigungen der postnatalen Migration von Interneuronen hin. Diese könnten zu den beobachteten Defiziten GABAerger Interneurone beitragen.

4.6 Limitationen

GABAerge Interneurone wurden in ganzen Kortexhemisphären anhand immunhistochemischer Färbungen ausgezählt. Zudem wurden RNA-Expressionsanalysen sowie Western Blots aus dem Gewebe von präparierten Kortices quantifiziert. Die Analyse einer größeren Anzahl von Kortexschnitten der immunhistochemischen Färbungen war aufgrund qualitativer Unterschiede der angefertigten Gewebeschnitte begrenzt. Eine zweite Auszählung der immunhistochemischen Färbungen durch einen weiteren unabhängigen Untersucher ist darüber hinaus nicht erfolgt. Weitere, die Betrachtung späterer Zeitpunkte miteinschließende Experimente könnten beispielsweise für PV-positive Interneurone Erkenntnisse darüber liefern, ob die beobachteten Defizite persistieren oder zu einem späteren Zeitpunkt kompensiert werden können. Ebenso könnte die interneuronale Expression des NKCC1-Chloridtransporters (hoch exprimiert während unreifer Phasen der Hirnentwicklung) und des KCC2-Transporters (kennzeichnend für reife Interneurone) ergänzend untersucht werden, um Reifungsdefizite genauer zu charakterisieren. Die KCC2-Expression nimmt in der Maus zum Ende der zweiten postnatalen Woche und beim Menschen im letzten Trimenon der Schwangerschaft deutlich zu und eine Beeinträchtigung dieser Rezeptoren in der weißen Substanz durch Frühgeburt wurde in *post mortem*-Schnitten bereits gezeigt [43, 88].

Die Versuchstiere wurden nicht abhängig von ihrem Geschlecht untersucht. In dem inflammatorischen Modell perinataler Hirnschädigung von Favrais et al. (2011) zeigten sich Unterschiede zwischen den Geschlechtern, die zum Ausschluss weiblicher Tiere in darauffolgenden Experimenten führten [116, 161]. Männliches Geschlecht ist ein bekannter Risikofaktor für Mortalität und Morbidität nach Frühgeburt, und neurologische Spätfolgen scheinen bei ehemals frühgeborenen Jungen gravierender als bei ehemals frühgeborenen Mädchen zu sein [162]. Eine größere Anzahl von Versuchstieren wäre erforderlich, um mögliche Geschlechtsunterschiede der beobachteten Veränderungen beschreiben oder ausschließen zu können.

Das in dieser Arbeit verwendete Hyperoxie-Modell perinataler Hirnschädigung dient der Untersuchung der Hirnentwicklung unter erhöhtem O₂ – wie durch den erheblich zu früh eintretenden Wechsel der fetalen Lebensbedingungen von *in utero* in die

postnatale Umgebung *ex utero*, wobei das Frühgeborene weiterhin fetale Bedürfnisse zur Entwicklung in sich trägt. Da zum fetalen Leben *in utero* als Ergebnis der Plazentaversorgung auch ein natürlicherweise hypoxisches Milieu gehört, stellt die Geburt in Raumluft für das Frühgeborene eine relative Hyperoxie dar. Hinzu kommen in der klinischen Praxis Sauerstofftherapien, die zum Teil unumgänglich sind, da der O₂-Bedarf des *ex utero* Lebens durch erstmals eintretende Atem- und Muskelarbeit, Verdauung, Temperaturregulation u. a. m., deutlich höher ist als *in utero*. Zielkonzentrationen für O₂ müssen daher postnatal höher und über den pränatalen O₂-Werten liegen. Die Unterschiede in Zeitpunkt, Dauer und Schweregrad der Hyperoxie-Exposition und die möglichen im Frühgeborenen bestehenden Komorbiditäten (Organunreife, Infektionen etc.) führen daher während der Behandlung in der Klinik zu einer sehr komplexen Situation. Die Anwendung von 80% O₂ im Tiermodell ist einerseits relativ drastisch, andererseits ist die Expositionsdauer von 48 Stunden relativ kurz im Vergleich zur Situation von Frühgeborenen in Raumluft-Umgebung nach der Geburt. Insgesamt bietet das Mausmodell jedoch die Möglichkeit, den Einfluss von Sauerstoff als exogenem Faktor auf die Hirnentwicklung isoliert zu untersuchen.

Die komplexen Verhältnisse eines zu früh auf die Welt gekommenen Kindes sind dabei nicht nachzuahmen.

In zahlreichen Aspekten ähneln sich Entwicklungsschritte und regionale Vulnerabilitäten des Gehirns in Maus und Mensch, und auch Verhaltensmuster lassen sich teilweise reproduzieren [88]. Das humane Gehirn weist im Ergebnis im Vergleich zum murinen Gehirn jedoch komplexere Strukturen auf, die mit den höheren kognitiven Fähigkeiten (Sprache, abstraktes Denken etc.) verbunden sind und letztlich auch in andere mögliche Pathologien münden könnten [41]. Konkret für GABAerge Interneurone deuten Studien aus humanen fetalen Gehirnen auf weitere, neokortikale Entstehungsorte als die extrakortikalen *Ganglionic Eminences* (GE) hin. Hierzu zählen vor allem die ventrikulären und subventrikulären Zonen (VZ/SVZ), in denen vermutlich die Mehrheit der menschlichen kortikalen GABAergen Interneurone entsteht [163]. Die in der Evolution vollzogene Ausdehnung der kortikalen SVZ in Primaten ist vermutlich auch für die größere Diversität von Interneuron-Vorläuferzellen im Menschen verantwortlich [41]. Die im Menschen und Affen kortikal entstandenen Interneurone, für die es kein direktes Korrelat in murinen Gehirnen gibt, könnten eine besondere Bedeutung für die in Primaten erworbenen höheren neurokognitiven Funktionen einnehmen [41]. Es ist demzufolge anzunehmen, dass diese Interspezies-

Unterschiede für neurokognitive Entwicklungsstörungen und psychiatrische Erkrankungen besonders relevant sind. Die Tierstudien können dennoch Aufschluss über die interneuronalen Entwicklungsschritte geben, die bei beiden Spezies vorhanden sind und somit gleichermaßen geschädigt werden könnten.

4.7 Ausblick

Die erhöhte Prävalenz neuropsychiatrischer Erkrankungen wie ADHS, Autismus und Schizophrenie bei ehemaligen Frühgeborenen weist auf komplexe Veränderungen in der Hirnentwicklung durch Frühgeburt hin. GABAerge Interneurone befinden sich zum Zeitpunkt von Frühgeburt in einem vulnerablen Zeitfenster, da hier wichtige Schritte ihrer Entwicklung vollzogen werden. Beeinträchtigungen dieser durch hohe O₂-Konzentrationen könnten weitreichende Folgen für die Etablierung der kortikalen Netzwerke haben. Gelingt es, die durch Frühgeburt veränderten Mechanismen zu identifizieren, könnten Therapien entwickelt werden, die das neugeborene, unreife Gehirn schützen.

Die in unseren Experimenten offenbarten Defizite in der Expression der an Migration beteiligten Signalwege von SDF1 und GDNF könnten hierfür relevant sein. Migrationsfaktoren als Ansatzpunkte neonataler Neuroprotektion sind noch nicht erforscht. Um die beobachtete Verminderung von SDF1 und GDNF ursächlich zu untersuchen, könnten in isolierten Zellkulturen nach Hyperoxie die individuellen Sekretionsleistungen der beiden beteiligten Zellreihen untersucht werden. Konditionelle Knock-Out-Experimente, in denen das *Sdf1*-Gen beispielsweise in Astrozyten abgeschaltet wird, könnten in einem zweiten Schritt den direkten Effekt des Ausfalls auf die GABAergen Interneurone untersuchen. Gleichzeitig ist zu beachten, dass SDF1 und CXCR4 in ihrem Gen ein Sauerstoff-responsibles Element tragen [149, 150] – wodurch relative Hyperoxie nach Frühgeburt über HIF die Expression dieser Gene herunterregulieren könnte. Dabei könnte die Bestimmung von HIF-Aktivitäten oder dessen pharmakologische Inhibition helfen, HIF als einen Regulator der astro- oder mikroglialen *Sdf1*-Expression zu identifizieren.

Kommt es als Folge der erhöhten O₂-Level zu einer Dysregulation der Hirnentwicklung durch gedrosselte HIF1 α -Aktivität, könnte therapeutische HIF-Stabilisierung in einem nächsten Schritt dazu beitragen, physiologische Entwicklungsbedingungen für die Neurone zu schaffen.

Medikamentöse Ansätze von Neuroprotektion des Frühgeborenen im Zusammenhang mit postnataler Hyperoxie werden bereits intensiv erforscht. Erythropoietin (EPO, rEPO in seiner substituierten Form), zugelassen für die Behandlung der Anämie des Frühgeborenen, scheint protektive Wirkungen für das sich entwickelnde Gehirn im Zusammenhang mit oxidativem Stress und sauerstoffinduzierter Apoptose, Autophagie oder Verminderung von Neurotrophinen zu haben [110, 164] und befindet sich bereits in klinischer Erprobung [165]. Bezogen auf Interneurone konnte in einem Mausmodell extremer Frühgeburt unter anderem die Expression des (für die inhibitorische Wirkung wichtigen) KCC2-Transporters GABAerger Interneurone im Hippocampus durch rEPO gefördert werden [166]. Weitere Effekte auf die Entwicklung der Interneurone sind noch nicht bekannt. Für Koffein, das für die atemanaleptische Therapie von Neugeborenen zugelassen ist, sind neuroprotektive Eigenschaften beschrieben worden [167]. In einem ähnlichen Hyperoxie-Modell wie dem hier verwendeten reduzierten Koffein-Injektionen die Lipidperoxidation (TBARS) im Cerebrum von neonatalen Ratten nach 24 Stunden Hyperoxie und offenbarten starke antiapoptotische Effekte [168]. In einer anderen Studie allerdings beeinträchtigte Koffein während der Schwangerschaft – neben anderem – die Etablierung GABAerger Netzwerke im Mausmodell [169]. Weitere präklinische Studien könnten dazu beitragen, die genauen Effekte von Koffein auf die frühe Entwicklung des GABAergen Systems zu untersuchen.

In einer anderen Untersuchung wurden unmittelbar postnatal mittels Versuchsbedingungen eines frühen ‚*enriched environment*‘ (EE, stimulierende Umgebung [Übersetzung der Autorin]) eine Beschleunigung von Reifungsprozessen GABAerger Interneurone erzielt [170], was Optionen auch für nicht-medikamentöse Therapien eröffnet.

Ein besseres Verständnis darüber, wie sich postnatal erhöhte Sauerstoffkonzentrationen auf die sich entwickelnden GABAergen Interneurone auswirken, ist notwendig und ein wichtiger Schritt hin zum idealen Umgang mit O₂-Monitoring nach Frühgeburt und Sauerstoff als Medikament auf neonatalen Intensivstationen.

Angesichts einer unvermeidbaren relativen Hyperoxie des zu früh Geborenen sind letztlich verbesserte präventive und therapeutische neuroprotektive Strategien erforderlich, um eine ungestörte neurologische Entwicklung zu gewährleisten.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, in Wildtyp-Mäusen und transgenen GAD67-eGFP-Mäusen Mechanismen aufzuzeigen und zu charakterisieren, die für eine Hyperoxie-bedingte Beeinträchtigung der Entwicklung GABAerger Interneurone von Bedeutung sind. Relative Hyperoxie ist ein wichtiger Faktor des Lebens *ex utero*, durch den das Gehirn mit noch fetalen Bedürfnissen ungewohnt hohen O₂-Konzentrationen ausgesetzt wird. Hierfür ist es wichtig, die genauen Auswirkungen von Sauerstoff auf das unreife Gehirn zu verstehen. GABAerge Interneurone spielen eine zentrale Rolle in der Organisation kortikaler Netzwerke und sind in der perinatalen Entwicklungsphase hoch vulnerabel gegenüber externen Einflussfaktoren. Pathologische Veränderungen des GABAergen Systems werden als Ursachen neuropsychiatrischer Erkrankungen diskutiert, unter anderem für ADHS, Autismus-Spektrum-Störungen und Schizophrenie. Die Prävalenzen dieser Hirnentwicklungsstörungen sind in ehemaligen Frühgeborenen erhöht.

Im Mausmodell wird aktuell versucht, die unterschiedlichen zu perinataler Hirnschädigung beitragenden Faktoren wie Hyperoxie und Hypoxie-Ischämie, Inflammation und Infektion, einzeln oder auch kombiniert zu erfassen. Die Betrachtung der postnatalen Tage P5 bis P7 dient hierbei als Modell des menschlichen Gehirns etwa der 28. Schwangerschaftswoche [30]. Somit vollziehen sich die im Frühgeborenen im letzten Schwangerschaftstrimenon und perinatal stattfindenden Entwicklungsschritte der GABAergen Interneurone in den ersten postnatalen Tagen und Wochen der reifgeborenen Maus.

Die vorgelegte Arbeit liefert neue Erkenntnisse darüber, auf welche Weise hyperoxische Umgebungsbedingungen diese Reifungsschritte beeinflussen. Die Hyperoxie-Exposition des Modells (48 Stunden 80% O₂ von P5 bis P7) führte im Ergebnis zu einer Reduktion von Subtypen GABAerger Interneurone, ähnlich der in Frühgeborenen beobachteten Veränderung [85]. Die reduzierte RNA-Expression der Marker *Reln*, *Sst* und *Vip* und die verminderte Anzahl PV-positiver Interneurone in den immunhistochemischen Färbungen, ließen sich dabei nicht durch verstärkte Apoptose GABAerger Interneurone erklären. Auch zeigten Kortices nach Hyperoxie keine erhöhte Autophagie-Aktivität. Einige GABAerge Interneurone schienen postnatal

weiterhin zu proliferieren, allerdings ließen sich keine Proliferationsunterschiede in den beiden Versuchsgruppen (Normoxie vs. Hyperoxie) beobachten. Genexpressionsanalysen wichtiger Migrationsfaktoren lieferten erste Hinweise auf eine Hyperoxie-induzierte Beeinträchtigung der postnatalen Migration von Interneuronen.

Die Ergebnisse zeigten, dass erhöhtes O₂ die Entwicklung GABAerger Interneurone beeinflussen kann, wenngleich weitere Einflussfaktoren anzunehmen sind. Die relative Hyperoxie bei Frühgeborenen könnte somit für die beobachteten neurokognitiven Veränderungen nach Frühgeburt eine Rolle spielen. Weitere Studien im Tiermodell wie auch im Menschen sind notwendig, die genauen Mechanismen perinataler Beeinträchtigung der Hirnentwicklung durch hohe Sauerstoffkonzentrationen zu verstehen, um zukünftig neuroprotektive Therapien für Frühgeborene zu entwickeln und neurologische Spätfolgen zu verhindern.

6 Literaturverzeichnis

1. Blencowe, H., S. Cousens, D. Chou, M. Oestergaard, L. Say, A.B. Moller, M. Kinney, J. Lawn, and G. Born Too Soon Preterm Birth Action, *Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births*. *Reprod Health*, 2013. 10 Suppl 1: p. S2.
2. Muglia, L.J. and M. Katz, *The enigma of spontaneous preterm birth*. *N Engl J Med*, 2010. 362(6): p. 529-35.
3. Vogel, J.P., S. Chawanpaiboon, A.B. Moller, K. Watananirun, M. Bonet, and P. Lumbiganon, *The global epidemiology of preterm birth*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2018. 52: p. 3-12.
4. Tucker, J. and W. McGuire, *Epidemiology of preterm birth*. *BMJ*, 2004. 329(7467): p. 675-8.
5. Liu, L., S. Oza, D. Hogan, Y. Chu, J. Perin, J. Zhu, J.E. Lawn, S. Cousens, C. Mathers, and R.E. Black, *Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals*. *Lancet*, 2016. 388(10063): p. 3027-3035.
6. Younge, N., R.F. Goldstein, et al., *Survival and Neurodevelopmental Outcomes among Periviable Infants*. *N Engl J Med*, 2017. 376(7): p. 617-628.
7. Saigal, S. and L.W. Doyle, *An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood*. *Lancet*, 2008. 371(9608): p. 261-9.
8. Marret, S., L. Marchand-Martin, J.C. Picaud, J.M. Hascoet, C. Arnaud, J.C. Roze, P. Truffert, B. Larroque, M. Kaminski, P.Y. Ancel, and E.S. Group, *Brain injury in very preterm children and neurosensory and cognitive disabilities during childhood: the EPIPAGE cohort study*. *PLoS One*, 2013. 8(5): p. e62683.
9. Larroque, B., P.Y. Ancel, L. Marchand-Martin, G. Cambonie, J. Fresson, V. Pierrat, J.C. Roze, L. Marpeau, G. Thiriez, C. Alberge, G. Breart, M. Kaminski, S. Marret, and g. Epipage Study, *Special care and school difficulties in 8-year-old very preterm children: the Epipage cohort study*. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e21361.
10. Mullen, K.M., B.R. Vohr, K.H. Katz, K.C. Schneider, C. Lacadie, M. Hampson, R.W. Makuch, A.L. Reiss, R.T. Constable, and L.R. Ment, *Preterm birth results in alterations in neural connectivity at age 16 years*. *Neuroimage*, 2011. 54(4): p. 2563-70.
11. Gozzo, Y., B. Vohr, C. Lacadie, M. Hampson, K.H. Katz, J. Maller-Kesselman, K.C. Schneider, B.S. Peterson, N. Rajeevan, R.W. Makuch, R.T. Constable, and L.R. Ment, *Alterations in neural connectivity in preterm children at school age*. *Neuroimage*, 2009. 48(2): p. 458-63.

12. Nosarti, C., M.H. Al-Asady, S. Frangou, A.L. Stewart, L. Rifkin, and R.M. Murray, *Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes*. *Brain*, 2002. 125(Pt 7): p. 1616-23.
13. Kesler, S.R., L.R. Ment, B. Vohr, S.K. Pajot, K.C. Schneider, K.H. Katz, T.B. Ebbitt, C.C. Duncan, R.W. Makuch, and A.L. Reiss, *Volumetric analysis of regional cerebral development in preterm children*. *Pediatr Neurol*, 2004. 31(5): p. 318-25.
14. Mathur, A. and T. Inder, *Magnetic resonance imaging--insights into brain injury and outcomes in premature infants*. *J Commun Disord*, 2009. 42(4): p. 248-55.
15. Karolis, V.R., S. Froudust-Walsh, J. Kroll, P.J. Brittain, C.J. Tseng, K.W. Nam, A. Reinders, R.M. Murray, S.C.R. Williams, P.M. Thompson, and C. Nosarti, *Volumetric grey matter alterations in adolescents and adults born very preterm suggest accelerated brain maturation*. *Neuroimage*, 2017. 163: p. 379-389.
16. Schendel, D. and T.K. Bhasin, *Birth weight and gestational age characteristics of children with autism, including a comparison with other developmental disabilities*. *Pediatrics*, 2008. 121(6): p. 1155-64.
17. Johnson, S., C. Hollis, P. Kochhar, E. Hennessy, D. Wolke, and N. Marlow, *Autism spectrum disorders in extremely preterm children*. *J Pediatr*, 2010. 156(4): p. 525-31 e2.
18. Johnson, S., C. Hollis, P. Kochhar, E. Hennessy, D. Wolke, and N. Marlow, *Psychiatric disorders in extremely preterm children: longitudinal finding at age 11 years in the EPICure study*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2010. 49(5): p. 453-63 e1.
19. Lindstrom, K., F. Lindblad, and A. Hjern, *Preterm birth and attention-deficit/hyperactivity disorder in schoolchildren*. *Pediatrics*, 2011. 127(5): p. 858-65.
20. Murray, E., R. Pearson, M. Fernandes, I.S. Santos, F.C. Barros, C.G. Victora, A. Stein, and A. Matijasevich, *Are fetal growth impairment and preterm birth causally related to child attention problems and ADHD? Evidence from a comparison between high-income and middle-income cohorts*. *J Epidemiol Community Health*, 2016. 70(7): p. 704-9.
21. Nosarti, C., A. Reichenberg, R.M. Murray, S. Cnattingius, M.P. Lambe, L. Yin, J. MacCabe, L. Rifkin, and C.M. Hultman, *Preterm birth and psychiatric disorders in young adult life*. *Arch Gen Psychiatry*, 2012. 69(6): p. E1-8.
22. Johnson, S. and N. Marlow, *Preterm birth and childhood psychiatric disorders*. *Pediatr Res*, 2011. 69(5 Pt 2): p. 11R-8R.
23. Volpe, J.J., *Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances*. *Lancet Neurol*, 2009. 8(1): p. 110-24.
24. Volpe, J.J., *Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities*. *Pediatrics*, 2005. 116(1): p. 221-5.

25. Dammann, O. and A. Leviton, *Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant*. *Semin Pediatr Neurol*, 1998. 5(3): p. 190-201.
26. Leviton, A., E.N. Allred, R.N. Fichorova, K.C. Kuban, T. Michael O'Shea, O. Dammann, and E.s. investigators, *Systemic inflammation on postnatal days 21 and 28 and indicators of brain dysfunction 2years later among children born before the 28th week of gestation*. *Early Hum Dev*, 2016. 93: p. 25-32.
27. Maier, R.F. and M. Obladen, *Neugeborenenintensivmedizin. Evidenz und Erfahrung*. 9 ed. 2017: Springer Verlag Berlin-Heidelberg. 515.
28. Zhang, K., L. Zhu, and M. Fan, *Oxygen, a Key Factor Regulating Cell Behavior during Neurogenesis and Cerebral Diseases*. *Front Mol Neurosci*, 2011. 4: p. 5.
29. Ivanovic, Z., *Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm*. *J Cell Physiol*, 2009. 219(2): p. 271-5.
30. Ikonomidou, C. and A.M. Kaindl, *Neuronal death and oxidative stress in the developing brain*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. 14(8): p. 1535-50.
31. Castillo, A., A. Sola, H. Baquero, F. Neira, R. Alvis, R. Deulofeut, and A. Critz, *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*, 2008. 121(5): p. 882-9.
32. Maltepe, E. and O.D. Saugstad, *Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis--clinical implications*. *Pediatr Res*, 2009. 65(3): p. 261-8.
33. Georgeson, G.D., B.J. Szony, K. Streitman, I.S. Varga, A. Kovacs, L. Kovacs, and A. Laszlo, *Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002. 103(2): p. 136-9.
34. Chen, X., C. Guo, and J. Kong, *Oxidative stress in neurodegenerative diseases*. *Neural Regen Res*, 2012. 7(5): p. 376-85.
35. Vanderveen, D.K., T.A. Mansfield, and E.C. Eichenwald, *Lower oxygen saturation alarm limits decrease the severity of retinopathy of prematurity*. *J AAPOS*, 2006. 10(5): p. 445-8.
36. Deulofeut, R., A. Critz, I. Adams-Chapman, and A. Sola, *Avoiding hyperoxia in infants < or = 1250 g is associated with improved short- and long-term outcomes*. *J Perinatol*, 2006. 26(11): p. 700-5.
37. Collins, M.P., J.M. Lorenz, J.R. Jetton, and N. Paneth, *Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants*. *Pediatr Res*, 2001. 50(6): p. 712-9.
38. International Liaison Committee on, R., *The International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) consensus on science with treatment recommendations for pediatric and neonatal patients: neonatal resuscitation*. *Pediatrics*, 2006. 117(5): p. e978-88.

39. Network, S.S.G.o.t.E.K.S.N.N.R., W.A. Carlo, et al., *Target ranges of oxygen saturation in extremely preterm infants*. N Engl J Med, 2010. 362(21): p. 1959-69.
40. Felderhoff-Mueser, U., M. Sifringer, O. Polley, M. Dzierko, B. Leineweber, L. Mahler, M. Baier, P. Bittigau, M. Obladen, C. Ikonomidou, and C. Bührer, *Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain*. Ann Neurol, 2005. 57(1): p. 50-9.
41. Zecevic, N., F. Hu, and I. Jakovcevski, *Interneurons in the developing human neocortex*. Dev Neurobiol, 2011. 71(1): p. 18-33.
42. Ben-Ari, Y., *Oxytocin and Vasopressin, and the GABA Developmental Shift During Labor and Birth: Friends or Foes?* Front Cell Neurosci, 2018. 12: p. 254.
43. Robinson, S., I. Mikolaenko, I. Thompson, M.L. Cohen, and M. Goyal, *Loss of cation-chloride cotransporter expression in preterm infants with white matter lesions: implications for the pathogenesis of epilepsy*. J Neuropathol Exp Neurol, 2010. 69(6): p. 565-72.
44. Ben-Ari, Y., *Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture*. Nat Rev Neurosci, 2002. 3(9): p. 728-39.
45. Di Cristo, G., *Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders*. Clin Genet, 2007. 72(1): p. 1-8.
46. Le Magueresse, C. and H. Monyer, *GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex*. Neuron, 2013. 77(3): p. 388-405.
47. Wonders, C.P. and S.A. Anderson, *The origin and specification of cortical interneurons*. Nat Rev Neurosci, 2006. 7(9): p. 687-96.
48. Faux, C., S. Rakic, W. Andrews, and J.M. Britto, *Neurons on the move: migration and lamination of cortical interneurons*. Neurosignals, 2012. 20(3): p. 168-89.
49. Arshad, A., L.R. Vose, G. Vinukonda, F. Hu, K. Yoshikawa, A. Csiszar, J.C. Brumberg, and P. Ballabh, *Extended Production of Cortical Interneurons into the Third Trimester of Human Gestation*. Cereb Cortex, 2016. 26(5): p. 2242-2256.
50. Huang, Z.J., G. Di Cristo, and F. Ango, *Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices*. Nat Rev Neurosci, 2007. 8(9): p. 673-86.
51. Rudy, B., G. Fishell, S. Lee, and J. Hjerling-Leffler, *Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons*. Dev Neurobiol, 2011. 71(1): p. 45-61.
52. Liodis, P., M. Denaxa, M. Grigoriou, C. Akufo-Addo, Y. Yanagawa, and V. Pachnis, *Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes*. J Neurosci, 2007. 27(12): p. 3078-89.
53. Jovanovic, J.N. and A.M. Thomson, *Development of cortical GABAergic innervation*. Front Cell Neurosci, 2011. 5: p. 14.

54. Rymar, V.V. and A.F. Sadikot, *Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype*. J Comp Neurol, 2007. 501(3): p. 369-80.
55. Xu, G., K.G. Broadbelt, R.L. Haynes, R.D. Folkerth, N.S. Borenstein, R.A. Belliveau, F.L. Trachtenberg, J.J. Volpe, and H.C. Kinney, *Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter*. J Neuropathol Exp Neurol, 2011. 70(10): p. 841-58.
56. Kilb, W., *Development of the GABAergic system from birth to adolescence*. Neuroscientist, 2012. 18(6): p. 613-30.
57. Miyoshi, G. and G. Fishell, *GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development*. Cereb Cortex, 2011. 21(4): p. 845-52.
58. Miyoshi, G., S.J. Butt, H. Takebayashi, and G. Fishell, *Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors*. J Neurosci, 2007. 27(29): p. 7786-98.
59. Uhlhaas, P.J., F. Roux, E. Rodriguez, A. Rotarska-Jagiela, and W. Singer, *Neural synchrony and the development of cortical networks*. Trends Cogn Sci, 2010. 14(2): p. 72-80.
60. Cobb, S.R., E.H. Buhl, K. Halasy, O. Paulsen, and P. Somogyi, *Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons*. Nature, 1995. 378(6552): p. 75-8.
61. Dichter, M.A. and G.F. Ayala, *Cellular mechanisms of epilepsy: a status report*. Science, 1987. 237(4811): p. 157-64.
62. Galanopoulou, A.S., *Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy*. Pflugers Arch, 2010. 460(2): p. 505-23.
63. Poduri, A. and D. Lowenstein, *Epilepsy genetics--past, present, and future*. Curr Opin Genet Dev, 2011. 21(3): p. 325-32.
64. Gao, R. and P. Penzes, *Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders*. Curr Mol Med, 2015. 15(2): p. 146-67.
65. Hoegl, T., S. Bender, J. Buchmann, O. Kratz, G.H. Moll, and H. Heinrich, *[Transcranial magnetic stimulation (TMS), inhibition processes and attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) - an overview]*. Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother, 2014. 42(6): p. 415-28; quiz 428-9.
66. Rossignol, E., *Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders*. Neural Plast, 2011. 2011: p. 649325.
67. Bhat, S., U.R. Acharya, H. Adeli, G.M. Bairy, and A. Adeli, *Autism: cause factors, early diagnosis and therapies*. Rev Neurosci, 2014. 25(6): p. 841-50.
68. Buckley, A.W. and G.L. Holmes, *Epilepsy and Autism*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. 6(4): p. a022749.

69. Pacheva, I., I. Ivanov, R. Yordanova, K. Gaberova, F. Galabova, M. Panova, A. Petkova, E. Timova, and I. Sotkova, *Epilepsy in Children with Autistic Spectrum Disorder*. Children (Basel), 2019. 6(2).
70. Puts, N.A.J., E.L. Wodka, A.D. Harris, D. Crocetti, M. Tommerdahl, S.H. Mostofsky, and R.A.E. Edden, *Reduced GABA and altered somatosensory function in children with autism spectrum disorder*. Autism Res, 2017. 10(4): p. 608-619.
71. Hashemi, E., J. Ariza, H. Rogers, S.C. Noctor, and V. Martinez-Cerdeno, *The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism*. Cereb Cortex, 2017. 27(3): p. 1931-1943.
72. de Lacy, N. and B.H. King, *Revisiting the relationship between autism and schizophrenia: toward an integrated neurobiology*. Annu Rev Clin Psychol, 2013. 9: p. 555-87.
73. Beasley, C.L. and G.P. Reynolds, *Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics*. Schizophr Res, 1997. 24(3): p. 349-55.
74. de Jonge, J.C., C.H. Vinkers, H.E. Hulshoff Pol, and A. Marsman, *GABAergic Mechanisms in Schizophrenia: Linking Postmortem and In Vivo Studies*. Front Psychiatry, 2017. 8: p. 118.
75. Ben-Ari, Y., R. Khazipov, X. Leinekugel, O. Caillard, and J.L. Gaiarsa, *GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'*. Trends Neurosci, 1997. 20(11): p. 523-9.
76. Morrow, B.A., J.D. Elsworth, and R.H. Roth, *Repeated phencyclidine in monkeys results in loss of parvalbumin-containing axo-axonic projections in the prefrontal cortex*. Psychopharmacology (Berl), 2007. 192(2): p. 283-90.
77. Cochran, S.M., M. Kennedy, C.E. McKerchar, L.J. Steward, J.A. Pratt, and B.J. Morris, *Induction of metabolic hypofunction and neurochemical deficits after chronic intermittent exposure to phencyclidine: differential modulation by antipsychotic drugs*. Neuropsychopharmacology, 2003. 28(2): p. 265-75.
78. Nakazawa, K., V. Zsiros, Z. Jiang, K. Nakao, S. Kolata, S. Zhang, and J.E. Belforte, *GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology*. Neuropharmacology, 2012. 62(3): p. 1574-83.
79. Taurines, R., C. Schwenck, E. Westerwald, M. Sachse, M. Siniatchkin, and C. Freitag, *ADHD and autism: differential diagnosis or overlapping traits? A selective review*. Atten Defic Hyperact Disord, 2012. 4(3): p. 115-39.
80. Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity, D., I. Steering Committee on Quality, et al., *ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents*. Pediatrics, 2011. 128(5): p. 1007-22.

81. Edden, R.A., D. Crocetti, H. Zhu, D.L. Gilbert, and S.H. Mostofsky, *Reduced GABA concentration in attention-deficit/hyperactivity disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2012. 69(7): p. 750-3.
82. Smith, K.M., *Hyperactivity in mice lacking one allele of the glutamic acid decarboxylase 67 gene*. Atten Defic Hyperact Disord, 2018. 10(4): p. 267-271.
83. Chattopadhyaya, B. and G.D. Cristo, *GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders*. Front Psychiatry, 2012. 3: p. 51.
84. Robinson, S., Q. Li, A. Dechant, and M.L. Cohen, *Neonatal loss of gamma-aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury*. J Neurosurg, 2006. 104(6 Suppl): p. 396-408.
85. Panda, S., P. Dohare, S. Jain, N. Parikh, P. Singla, R. Mehdizadeh, D.W. Klebe, G.M. Kleinman, B. Cheng, and P. Ballabh, *Estrogen Treatment Reverses Prematurity-Induced Disruption in Cortical Interneuron Population*. J Neurosci, 2018. 38(34): p. 7378-7391.
86. Schmitz, T., J. Ritter, S. Mueller, U. Felderhoff-Mueser, L.J. Chew, and V. Gallo, *Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development*. J Neurosci, 2011. 31(11): p. 4327-44.
87. Schmitz, T., S. Endesfelder, M.C. Reinert, F. Klinker, S. Muller, C. Buhrer, and D. Liebetanz, *Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia*. Exp Neurol, 2012. 235(1): p. 374-9.
88. Semple, B.D., K. Blomgren, K. Gimlin, D.M. Ferriero, and L.J. Noble-Haeusslein, *Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species*. Prog Neurobiol, 2013. 106-107: p. 1-16.
89. Dobbing, J. and J. Sands, *Comparative aspects of the brain growth spurt*. Early Hum Dev, 1979. 3(1): p. 79-83.
90. Chervoneva, I., Y. Li, S. Schulz, S. Croker, C. Wilson, S.A. Waldman, and T. Hyslop, *Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR*. BMC Bioinformatics, 2010. 11: p. 253.
91. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
92. Frankel, E.N. and W.E. Neff, *Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1983. 754(3): p. 264-270.
93. Horie, N., K. So, T. Moriya, N. Kitagawa, K. Tsutsumi, I. Nagata, and K. Shinohara, *Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells in vitro*. Cell Mol Neurobiol, 2008. 28(6): p. 833-45.

94. Rodrigues, C.A., M.M. Diogo, C.L. da Silva, and J.M. Cabral, *Hypoxia enhances proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells*. *Biotechnol Bioeng*, 2010. 106(2): p. 260-70.
95. Endesfelder, S., H. Makki, C. von Haefen, C.D. Spies, C. Buhner, and M. Sifringer, *Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain*. *PLoS One*, 2017. 12(2): p. e0171498.
96. Mukhopadhyay, A., T. McGuire, C.Y. Peng, and J.A. Kessler, *Differential effects of BMP signaling on parvalbumin and somatostatin interneuron differentiation*. *Development*, 2009. 136(15): p. 2633-42.
97. Miyoshi, G., J. Hjerling-Leffler, T. Karayannis, V.H. Sousa, S.J. Butt, J. Battiste, J.E. Johnson, R.P. Machold, and G. Fishell, *Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons*. *J Neurosci*, 2010. 30(5): p. 1582-94.
98. Blomgren, K., M. Leist, and L. Groc, *Pathological apoptosis in the developing brain*. *Apoptosis*, 2007. 12(5): p. 993-1010.
99. Felderhoff-Mueser, U., P. Bittigau, M. Sifringer, B. Jarosz, E. Korobowicz, L. Mahler, T. Piening, A. Moysich, T. Grune, F. Thor, R. Heumann, C. Buhner, and C. Ikonomidou, *Oxygen causes cell death in the developing brain*. *Neurobiol Dis*, 2004. 17(2): p. 273-82.
100. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. 35(4): p. 495-516.
101. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. *J Pathol*, 2010. 221(1): p. 3-12.
102. Bendix, I., C. Schulze, C. Haefen, A. Gellhaus, S. Endesfelder, R. Heumann, U. Felderhoff-Mueser, and M. Sifringer, *Erythropoietin modulates autophagy signaling in the developing rat brain in an in vivo model of oxygen-toxicity*. *Int J Mol Sci*, 2012. 13(10): p. 12939-51.
103. Chen, Y. and D.J. Klionsky, *The regulation of autophagy - unanswered questions*. *J Cell Sci*, 2011. 124(Pt 2): p. 161-70.
104. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *LC3 conjugation system in mammalian autophagy*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(12): p. 2503-18.
105. Pankiv, S., T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, and T. Johansen, *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. *J Biol Chem*, 2007. 282(33): p. 24131-45.
106. Stumm, R.K., C. Zhou, T. Ara, F. Lazarini, M. Dubois-Dalcq, T. Nagasawa, V. Holtt, and S. Schulz, *CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex*. *J Neurosci*, 2003. 23(12): p. 5123-30.
107. Lysko, D.E., M. Putt, and J.A. Golden, *SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons*. *J Neurosci*, 2011. 31(5): p. 1739-45.

108. Pozas, E. and C.F. Ibanez, *GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons*. *Neuron*, 2005. 45(5): p. 701-13.
109. Blencowe, H., S. Cousens, M.Z. Oestergaard, D. Chou, A.B. Moller, R. Narwal, A. Adler, C. Vera Garcia, S. Rohde, L. Say, and J.E. Lawn, *National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications*. *Lancet*, 2012. 379(9832): p. 2162-72.
110. Reich, B., D. Hoeber, I. Bendix, and U. Felderhoff-Mueser, *Hyperoxia and the Immature Brain*. *Dev Neurosci*, 2016. 38(5): p. 311-330.
111. Ramani, M., T. van Groen, I. Kadish, A. Bulger, and N. Ambalavanan, *Neurodevelopmental impairment following neonatal hyperoxia in the mouse*. *Neurobiol Dis*, 2013. 50: p. 69-75.
112. Eyles, D.W., J.J. McGrath, and G.P. Reynolds, *Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia*. *Schizophr Res*, 2002. 57(1): p. 27-34.
113. Bartos, M., I. Vida, and P. Jonas, *Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. 8(1): p. 45-56.
114. Lauber, E., F. Filice, and B. Schwaller, *Parvalbumin neurons as a hub in autism spectrum disorders*. *J Neurosci Res*, 2018. 96(3): p. 360-361.
115. Wohr, M., D. Orduz, P. Gregory, H. Moreno, U. Khan, K.J. Vorckel, D.P. Wolfer, H. Welzl, D. Gall, S.N. Schiffmann, and B. Schwaller, *Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities*. *Transl Psychiatry*, 2015. 5: p. e525.
116. Stolp, H.B., B. Fleiss, Y. Arai, V. Supramaniam, R. Vontell, S. Birtles, A.G. Yates, A.A. Baburamani, C. Thornton, M. Rutherford, A.D. Edwards, and P. Gressens, *Interneuron Development Is Disrupted in Preterm Brains With Diffuse White Matter Injury: Observations in Mouse and Human*. *Front Physiol*, 2019. 10: p. 955.
117. Neves, G., M.M. Shah, P. Liodis, A. Achimastou, M. Denaxa, G. Roalfe, A. Sesay, M.C. Walker, and V. Pachnis, *The LIM homeodomain protein Lhx6 regulates maturation of interneurons and network excitability in the mammalian cortex*. *Cereb Cortex*, 2013. 23(8): p. 1811-23.
118. Fino, E. and R. Yuste, *Dense inhibitory connectivity in neocortex*. *Neuron*, 2011. 69(6): p. 1188-203.
119. Packer, A.M. and R. Yuste, *Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition?* *J Neurosci*, 2011. 31(37): p. 13260-71.
120. Gelman, D.M. and O. Marin, *Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex*. *Eur J Neurosci*, 2010. 31(12): p. 2136-41.

121. Batista-Brito, R., M. Vinck, K.A. Ferguson, J.T. Chang, D. Laubender, G. Lur, J.M. Mossner, V.G. Hernandez, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, M.J. Higley, and J.A. Cardin, *Developmental Dysfunction of VIP Interneurons Impairs Cortical Circuits*. *Neuron*, 2017. 95(4): p. 884-895 e9.
122. Alcantara, S., M. Ruiz, G. D'Arcangelo, F. Ezan, L. de Lecea, T. Curran, C. Sotelo, and E. Soriano, *Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse*. *J Neurosci*, 1998. 18(19): p. 7779-99.
123. Schaefer, A., S. Poluch, and S. Juliano, *Reelin is essential for neuronal migration but not for radial glial elongation in neonatal ferret cortex*. *Dev Neurobiol*, 2008. 68(5): p. 590-604.
124. Hammond, V., E. So, J. Gunnarsen, H. Valcanis, M. Kalloniatis, and S.S. Tan, *Layer positioning of late-born cortical interneurons is dependent on Reelin but not p35 signaling*. *J Neurosci*, 2006. 26(5): p. 1646-55.
125. Komitova, M., D. Xenos, N. Salmaso, K.M. Tran, T. Brand, M.L. Schwartz, L. Ment, and F.M. Vaccarino, *Hypoxia-induced developmental delays of inhibitory interneurons are reversed by environmental enrichment in the postnatal mouse forebrain*. *J Neurosci*, 2013. 33(33): p. 13375-87.
126. Lacaille, H., C.M. Vacher, D. Bakalar, J.J. O'Reilly, J. Salzbank, and A.A. Penn, *Impaired Interneuron Development in a Novel Model of Neonatal Brain Injury*. *eNeuro*, 2019. 6(1).
127. Menold, M.M., Y. Shao, C.M. Wolpert, S.L. Donnelly, K.L. Raiford, E.R. Martin, S.A. Ravan, R.K. Abramson, H.H. Wright, G.R. Delong, M.L. Cuccaro, M.A. Pericak-Vance, and J.R. Gilbert, *Association analysis of chromosome 15 gaba_A receptor subunit genes in autistic disorder*. *J Neurogenet*, 2001. 15(3-4): p. 245-59.
128. Endesfelder, S., I. Zaak, U. Weichelt, C. Buhner, and T. Schmitz, *Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain*. *Free Radic Biol Med*, 2014. 67: p. 221-34.
129. Ohira, K., T. Furuta, H. Hioki, K.C. Nakamura, E. Kuramoto, Y. Tanaka, N. Funatsu, K. Shimizu, T. Oishi, M. Hayashi, T. Miyakawa, T. Kaneko, and S. Nakamura, *Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells*. *Nat Neurosci*, 2010. 13(2): p. 173-9.
130. Wu, S., S. Esumi, K. Watanabe, J. Chen, K.C. Nakamura, K. Nakamura, K. Kometani, N. Minato, Y. Yanagawa, K. Akashi, K. Sakimura, T. Kaneko, and N. Tamamaki, *Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon*. *Development*, 2011. 138(12): p. 2499-509.
131. Kiraz, Y., A. Adan, M. Kartal Yandim, and Y. Baran, *Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis*. *Tumour Biol*, 2016. 37(7): p. 8471-86.

132. Southwell, D.G., M.F. Paredes, R.P. Galvao, D.L. Jones, R.C. Froemke, J.Y. Sebe, C. Alfaro-Cervello, Y. Tang, J.M. Garcia-Verdugo, J.L. Rubenstein, S.C. Baraban, and A. Alvarez-Buylla, *Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons*. *Nature*, 2012. 491(7422): p. 109-13.
133. Yis, U., S.H. Kurul, A. Kumral, S. Cilaker, K. Tugyan, S. Genc, and O. Yilmaz, *Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain*. *Brain Dev*, 2008. 30(9): p. 556-62.
134. Kaindl, A.M., M. Sifringer, A. Koppelstaetter, K. Genz, R. Loeber, C. Boerner, J. Stuwe, J. Klose, and U. Felderhoff-Mueser, *Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes*. *Ann Neurol*, 2008. 64(5): p. 523-34.
135. Klionsky, D.J., K. Abdelmohsen, et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. *Autophagy*, 2016. 12(1): p. 1-222.
136. Bjorkoy, G., T. Lamark, S. Pankiv, A. Overvatn, A. Brech, and T. Johansen, *Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1*. *Methods Enzymol*, 2009. 452: p. 181-97.
137. Maiuri, M.C., E. Zalckvar, A. Kimchi, and G. Kroemer, *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(9): p. 741-52.
138. Pierson, C.R., R.D. Folkerth, S.S. Billiards, F.L. Trachtenberg, M.E. Drinkwater, J.J. Volpe, and H.C. Kinney, *Gray matter injury associated with periventricular leukomalacia in the premature infant*. *Acta Neuropathol*, 2007. 114(6): p. 619-31.
139. Back, S.A., N.L. Luo, R.A. Mallinson, J.P. O'Malley, L.D. Wallen, B. Frei, J.D. Morrow, C.K. Petito, C.T. Roberts, Jr., G.H. Murdoch, and T.J. Montine, *Selective vulnerability of preterm white matter to oxidative damage defined by F2-isoprostanes*. *Ann Neurol*, 2005. 58(1): p. 108-20.
140. Dean, J.M., L. Bennet, S.A. Back, E. McClendon, A. Riddle, and A.J. Gunn, *What brakes the preterm brain? An arresting story*. *Pediatr Res*, 2014. 75(1-2): p. 227-33.
141. Lysko, D.E., M. Putt, and J.A. Golden, *SDF1 reduces interneuron leading process branching through dual regulation of actin and microtubules*. *J Neurosci*, 2014. 34(14): p. 4941-62.
142. Lopez-Bendito, G., J.A. Sanchez-Alcaniz, R. Pla, V. Borrell, E. Pico, M. Valdeolmillos, and O. Marin, *Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons*. *J Neurosci*, 2008. 28(7): p. 1613-24.
143. Tiveron, M.C., M. Rossel, B. Moepps, Y.L. Zhang, R. Seidenfaden, J. Favor, N. Konig, and H. Cremer, *Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1*

- (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci*, 2006. 26(51): p. 13273-8.
144. Tham, T.N., F. Lazarini, I.A. Franceschini, F. Lachapelle, A. Amara, and M. Dubois-Dalcq, *Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system*. *Eur J Neurosci*, 2001. 13(5): p. 845-56.
145. Kaur, C., V. Sivakumar, G.W. Yip, and E.A. Ling, *Expression of syndecan-2 in the amoeboid microglial cells and its involvement in inflammation in the hypoxic developing brain*. *Glia*, 2009. 57(3): p. 336-49.
146. Miller, J.T., J.H. Bartley, H.J. Wimborne, A.L. Walker, D.C. Hess, W.D. Hill, and J.E. Carroll, *The neuroblast and angioblast chemotactic factor SDF-1 (CXCL12) expression is briefly up regulated by reactive astrocytes in brain following neonatal hypoxic-ischemic injury*. *BMC Neurosci*, 2005. 6: p. 63.
147. Tissir, F., C.E. Wang, and A.M. Goffinet, *Expression of the chemokine receptor Cxcr4 mRNA during mouse brain development*. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004. 149(1): p. 63-71.
148. Sengoku, T., K.M. Murray, and M.E. Wilson, *Neonatal hyperoxia induces alterations in neurotrophin gene expression*. *Int J Dev Neurosci*, 2016. 48: p. 31-7.
149. Ceradini, D.J., A.R. Kulkarni, M.J. Callaghan, O.M. Tepper, N. Bastidas, M.E. Kleinman, J.M. Capla, R.D. Galiano, J.P. Levine, and G.C. Gurtner, *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. *Nat Med*, 2004. 10(8): p. 858-64.
150. Schioppa, T., B. Uranchimeg, A. Sacconi, S.K. Biswas, A. Doni, A. Rapisarda, S. Bernasconi, S. Sacconi, M. Nebuloni, L. Vago, A. Mantovani, G. Melillo, and A. Sica, *Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia*. *J Exp Med*, 2003. 198(9): p. 1391-402.
151. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(9): p. 4304-8.
152. Volk, D.W., A. Chitrapu, J.R. Edelson, and D.A. Lewis, *Chemokine receptors and cortical interneuron dysfunction in schizophrenia*. *Schizophr Res*, 2015. 167(1-3): p. 12-7.
153. Rocha, S.M., A.C. Cristovao, F.L. Campos, C.P. Fonseca, and G. Baltazar, *Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation*. *Neurobiol Dis*, 2012. 47(3): p. 407-15.
154. Perrinjaquet, M., D. Sjostrand, A. Moliner, S. Zechel, F. Lamballe, F. Maina, and C.F. Ibanez, *MET signaling in GABAergic neuronal precursors of the medial ganglionic eminence restricts GDNF activity in cells that express GFRalpha1 and a new transmembrane receptor partner*. *J Cell Sci*, 2011. 124(Pt 16): p. 2797-805.

155. Miyazaki, H., K. Nagashima, Y. Okuma, and Y. Nomura, *Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats*. Brain Res, 2001. 922(2): p. 165-72.
156. Ikeda, T., H. Koo, Y.X. Xia, T. Ikenoue, and B.H. Choi, *Bimodal upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the neonatal rat brain following ischemic/hypoxic injury*. Int J Dev Neurosci, 2002. 20(7): p. 555-62.
157. Wilkins, A., H. Majed, R. Layfield, A. Compston, and S. Chandran, *Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor*. J Neurosci, 2003. 23(12): p. 4967-74.
158. Gerstner, B., T.M. DeSilva, K. Genz, A. Armstrong, F. Brehmer, R.L. Neve, U. Felderhoff-Mueser, J.J. Volpe, and P.A. Rosenberg, *Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter*. J Neurosci, 2008. 28(5): p. 1236-45.
159. Gerstner, B., C. Buhner, C. Rheinlander, O. Polley, A. Schuller, M. Berns, M. Obladen, and U. Felderhoff-Mueser, *Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia*. J Neurosci Res, 2006. 84(2): p. 306-15.
160. Maysami, S., D. Nguyen, F. Zobel, C. Pitz, S. Heine, M. Hopfner, and M. Stangel, *Modulation of rat oligodendrocyte precursor cells by the chemokine CXCL12*. Neuroreport, 2006. 17(11): p. 1187-90.
161. Favrais, G., Y. van de Looij, B. Fleiss, N. Ramanantsoa, P. Bonnin, G. Stoltenburg-Didinger, A. Lacaud, E. Saliba, O. Dammann, J. Gallego, S. Sizonenko, H. Hagberg, V. Lelievre, and P. Gressens, *Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter*. Ann Neurol, 2011. 70(4): p. 550-65.
162. Marlow, N., D. Wolke, M.A. Bracewell, M. Samara, and E.P.S. Group, *Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth*. N Engl J Med, 2005. 352(1): p. 9-19.
163. Letinic, K., R. Zoncu, and P. Rakic, *Origin of GABAergic neurons in the human neocortex*. Nature, 2002. 417(6889): p. 645-9.
164. Messier, A.M. and R.K. Ohls, *Neuroprotective effects of erythropoiesis-stimulating agents in term and preterm neonates*. Curr Opin Pediatr, 2014. 26(2): p. 139-45.
165. Natalucci, G., B. Latal, B. Koller, C. Ruegger, B. Sick, L. Held, H.U. Bucher, J.C. Fauchere, and E.P.O.N.T.G. Swiss, *Effect of Early Prophylactic High-Dose Recombinant Human Erythropoietin in Very Preterm Infants on Neurodevelopmental Outcome at 2 Years: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2016. 315(19): p. 2079-85.
166. Jantzie, L.L., P.M. Getsy, D.J. Firl, C.G. Wilson, R.H. Miller, and S. Robinson, *Erythropoietin attenuates loss of potassium chloride co-transporters following prenatal brain injury*. Mol Cell Neurosci, 2014. 61: p. 152-62.

-
167. Lodha, A., R. Entz, A. Synnes, D. Creighton, K. Yusuf, A. Lapointe, J. Yang, P.S. Shah, N. investigators of the Canadian Neonatal, and N. the Canadian Neonatal Follow-up, *Early Caffeine Administration and Neurodevelopmental Outcomes in Preterm Infants*. *Pediatrics*, 2019. 143(1).
 168. Endesfelder, S., U. Weichelt, E. Strauss, A. Schlor, M. Sifringer, T. Scheuer, C. Buhner, and T. Schmitz, *Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury*. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(1).
 169. Fazeli, W., S. Zappettini, S.L. Marguet, J. Grendel, M. Esclapez, C. Bernard, and D. Isbrandt, *Early-life exposure to caffeine affects the construction and activity of cortical networks in mice*. *Exp Neurol*, 2017. 295: p. 88-103.
 170. He, S., J. Ma, N. Liu, and X. Yu, *Early enriched environment promotes neonatal GABAergic neurotransmission and accelerates synapse maturation*. *J Neurosci*, 2010. 30(23): p. 7910-6.

Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung

Ich, Elena auf dem Brinke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Entwicklung kortikaler GABAerger Interneurone im Mausmodell perinataler Hirnschädigung / The Development of Cortical GABAergic Interneurons in a Mouse Model of Perinatal Brain Injury“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

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

Publikationsliste

Posterbeitrag

114. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ), 12. – 15.09.2018, Leipzig

Die veränderte Entwicklung GABAerger Interneurone im Hyperoxie-Modell perinataler Hirnschädigung.

Auf dem Brinke, E., Scheuer, T., Endesfelder, S., Bühner, C., Schmitz, T.

Abstract erschienen in

Abstracts des Kongresses für Kinder- und Jugendmedizin 2018. *Monatsschr Kinderheilkd* 166, 95-173 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00112-018-0557-4>

Abgerufen am 11.02.2020

Danksagung

Mein erster Dank gilt PD Dr. Thomas Schmitz für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die kontinuierliche Begleitung bis zum Ende dieser Arbeit. Besonders danke ich auch Dr. rer. nat. Till Scheuer für die tägliche Heranführung an die Thematik und die geduldige Einarbeitung in die labortechnischen Methoden. Eure Begeisterung für diese Arbeit, Eure Kenntnis der Höhen und Tiefen der wissenschaftlichen Grundlagenforschung und Eure ruhige, zuversichtliche Art, haben die letzten Jahre für mich zu einer wunderschönen Erfahrung gemacht!

Mein Dank gilt darüber hinaus PD Dr. Stefanie Endesfelder, die mir als Führung des Labors zu jeder Zeit mit Rat und Tat beiseite stand. Steffi, Du bist mir hinsichtlich Deiner großartigen Arbeit als Wissenschaftlerin ein Vorbild. Ohne dein Engagement wäre das Labor nicht dieser schöne Ort, der er für mich und viele andere ist.

Euch Dreien danke ich für Eure Unterstützung, die vorgelebte Freude an der Arbeit und nicht zuletzt Eure ermutigende Anwesenheit zu meinem ersten wissenschaftlichen Konferenzbeitrag.

Dieser wäre nicht möglich geworden ohne Ruth Herrmann und Evelyn Strauß. Ob Hilfe bei Western Blots, kniffligen Kortexschnitten oder dem Neuansetzen der von mir munter verbrauchten Reagenzien – ihr wart immer für mich da. Eure ehrliche, herzliche Art und Eure langjährige Erfahrung sind das Rückgrat des Labors für alle neu Ankommenden!

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. Christoph Bühner und dem Team der Klinik für Neonatologie für kritische und inspirierende Gespräche in der Auseinandersetzung mit dem Thema. Auf diese Weise die Nähe zwischen Grundlagenwissenschaft und klinischer Arbeit kennenzulernen, betrachte ich für mich als ein großes Privileg.

Ich möchte mich zum Abschluss bei all meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mit mir Tage des Schreibens teilten oder mich abends zu einem Essen aus meiner Schreibwerkstatt holten. Colin, I am so grateful to have someone so inspiring around me. Without your introduction into graphic design there would be no figures, and without the new espresso machine during the last stretch I would probably still be sleeping ...