

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

DISSERTATION

„Schädigung der weißen Substanz des unreifen Kleinhirns
durch neonatale Hyperoxie und deren Vermeidung durch
Minozyklin“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vivien Leonie Friedrich
(geb. Brockmüller)

aus Berlin

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhalt

1. Zusammenfassung	2
2. Abstract	4
3. Eidesstattliche Versicherung	5
4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	7
5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation	8
6. Lebenslauf.....	23
7. Komplette Publikationsliste.....	25
8. Danksagung	26

1. Zusammenfassung

Neue Studien zeigen, dass neurologische Schädigungen nach Frühgeburt neben dem Großhirn oft auch das Kleinhirn betreffen. Das Kleinhirn sehr unreifer Frühgeborener ist in der Phase des stärksten Wachstums besonders vulnerabel. Als Zeichen der Schädigung findet sich häufig eine verminderte Volumenzunahme des Kleinhirns. Die zugrundeliegenden Ursachen sind bislang wenig verstanden. Neben Hypoxie-Ischämie, Infektion und Inflammation wird Hyperoxie diskutiert. Ziel unserer Studie war es, den Einfluss von Hyperoxie auf die Entwicklung der Weißen Substanz des Kleinhirns im Rattenmodell zu analysieren. Eine mögliche Protektion der Weißen Substanz untersuchten wir durch Gabe von Minozyklin.

Sechs Tag alte Wistar-Ratten (P6) wurden für 24h bis P7 unter 80% O₂ gehalten, gefolgt von einer Erholungsphase an Raumluft. Minozyklin Injektionen erfolgten zu Beginn und nach 12h Sauerstoffexposition.

Mittels Nitrotyrosin Western-Blot konnte erhöhter oxidativer Stress nach Hyperoxie in P7 Kleinhirnen nachgewiesen werden. Immunhistochemische Färbungen zeigen in Kleinhirnen nach Hyperoxiebehandlung neben einer Reduktion proliferativer, Ki67+NG2+ OVZ eine Erhöhung apoptotischer, (TUNEL+) OVZ. Die Verringerung reifer, CC1+ Oligodendrozyten bestätigte eine Reifungsverzögerung nach Hyperoxie. Langzeitfolgen der Sauerstofftoxizität zeigten sich im MRT in einer signifikanten Volumenabnahme des Kleinhirns juveniler P30 und P60 Ratten nach Hyperoxie. Die für die Myelinisierung essentielle MBP-Expression war nach Hyperoxie bis P30 verringert. Im EM zeigte sich eine Hyperoxie-bedingte Hypomyelinisierung des Kleinhirns. In den Iba1 Färbungen zeigte sich kein Hinweis auf eine Mikroglia Aktivierung nach Hyperoxie. Eine Hyperoxie-induzierte Verminderung der astrozytären PDGF-A Sekretion im Kleinhirn *in vivo* und primären Astrozytenkulturen *in vitro* bestätigte eine mögliche gestörte Glia-Glia Interaktion.

Der Einsatz von Minozyklin während der erhöhten Sauerstoffexposition ergab eine signifikant verbesserte Kleinhirnentwicklung. Neben einer Verringerung des oxidativen Stresses und verminderten Apoptoseraten der OVZ, konnte auch eine verbesserte Proliferation der OVZ beobachtet werden. Minozyklin verbesserte die oligodendrogläre Reifung und die Volumenzunahme des Kleinhirns, unterband die Reduktion der MBP-Expression zu allen Zeitpunkten und verhinderte die Hypomyelinisierung nach Hyperoxie. Die Hyperoxie induzierte Reduktion der PDGF-A-Expression konnte mittels Minozyklingabe im Kleinhirn und auch in primären Astrozyten unterbunden werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das unreife Kleinhirn eine ausgeprägte Vulnerabilität gegenüber hohen Sauerstoff-Konzentrationen aufweist, die sowohl in einer akuten

Schädigung von Oligodendroglia als auch in Langzeitfolgen für die weiße Substanz zu finden sind. Der erfolgreiche experimentelle Einsatz von Minozyklin deutet auf Möglichkeiten der pharmakologischen Prävention mittels anti-oxidativer Substanzen.

2. Abstract

Due to resending insides, brain injury after preterm birth often includes reduced cerebellar volume. During a phase of exponential growth, the neonatal cerebellum shows a high vulnerability to external stimuli. Underlying causes of cerebellar injury remain unclear. In general brain injury is caused by hypoxia-ischemia, infection and inflammation.

In this study we analyzed whether postnatal hyperoxia perturbs white matter development in the cerebellum, and whether glial damage can be prevented by minocycline.

For our experiments we used a well-established hyperoxia model. Six days old neonatal Wistar-rats (P6) were incubated with 80% oxygen for 24h until P7, followed by recovery in room air. Injections with minocycline were performed at the beginning and 12h during hyperoxia exposure.

Hyperoxia induced oxidative stress in the cerebellum indicated by high nitrotyrosine levels. Higher numbers of TUNEL+ oligodendroglial precursor cells (OPC) showed increased apoptosis after high oxygen exposure. Hyperoxia affected OPC proliferation. The number of Ki67+NG2+ OPCs was reduced after exposure to hyperoxia at P7 and after recovering in room air until P11. Hyperoxia resulted in a decreased number of mature CC1+ oligodendroglia, indicating a perturbed maturation. Exposure to hyperoxia reduced the expression of MBP until P30. P30 and P60 MRI measurements and electron microscopy analyses of myelinated fibers at P30 exhibited a reduction of the cerebellar volume and a reduced thickness of the myelin sheath after exposure to hyperoxia from P6 to P7.

Immunohistochemical stainings of Iba1 revealed no morphological activation of microglia after hyperoxia exposure. Increased expressions of PDGF-A in cerebellar tissue and cultured astrocytes indicated an impaired glia-glia-crosstalk caused by hyperoxia.

The treatment with minocycline during hyperoxia exposure protected the immature cerebellum against white matter damage. We found attenuation of oxidative stress, reduced apoptosis, and improved oligodendroglial proliferation and maturation. MBP expression was improved, cerebellar volume reduction and hypomyelination was diminished by minocycline. Impaired glial crosstalk was improved by minocycline. The reduction of PDGF-A gene expression in the cerebellum and in primary astrocytes in cell culture was diminished by minocycline.

In conclusion, oxidative stress caused by hyperoxia induces persistent white matter damage in the cerebellum. Treatment with minocycline attenuated the impairment and indicates possibilities of pharmacological prevention with anti-oxidative substances.

3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vivien Leonie Brockmüller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Schädigung der weißen Substanz des unreifen Kleinhirns durch neonatale Hyperoxie und deren Vermeidung durch Minozyklin“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Berlin, den 19.01.2017

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Scheuer, Till¹; Brockmüller, Vivien¹; Blanco Knowlton, Marissa; Weitkamp, Jörn-Hendrik; Ruhwedel, Torben; Mueller, Susanne; Endesfelder, Stefanie; Bühner, Christoph; Schmitz, Thomas

„Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline.“

Glia, 2015, Oct; 63(10), 1825-39.

Epub 2015 May 12

Beitrag zu der Studie

¹ Geteilte Erstautorenschaft

In dem Labor der Klinik für Neonatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin wird seit rund 13 Jahren der Einfluss von Sauerstofftoxizität mittels des etablierten Hyperoxie-Schädigungsmodells an Ratten untersucht. Die aktuelle Forschung der Arbeitsgruppe, unter Leitung von Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder, fokussiert sich auf die Untersuchung Hyperoxie-bedingter Schädigungen der pulmonalen, cerebralen und cerebellären Gewebe. Mein Forschungsbeitrag konzentriert sich auf Folgen der Hyperoxiebehandlung auf das unreife Kleinhirn der Ratte und eine mögliche Protektion durch Minozyklin.

Unter Anleitung von S. Endesfelder, PD Thomas Schmitz und cand. rer. nat. Till Scheuer habe ich an den Tierversuchen mitgearbeitet. Die Probenaufbereitung, Verarbeitung und das Schneiden der Kleinhirne mittels Kryotom, die immunhistochemischen Färbungen der Schnitte (Ki67-Ng2, TUNEL, CC1, MBP) sowie deren Untersuchung mittels Fluoreszenz- und Lasermikroskopie führte ich selbstständig durch. Die Analyse der Bilder, die statistische Auswertung, sowie die Erstellung von Abbildungen für das Manuskript führte ich nach Anleitung durch T. Schmitz selbstständig durch. Eine Mitarbeit an der Ausarbeitung sowie Diskussion des Manuskriptes der Publikation war mir möglich.

Mit T. Schmitz, S. Endesfelder und T. Scheuer habe ich im stetigen Dialog die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und interpretiert. Inhaltlich hat sich mein Teil der Arbeit auf die Protektion der cerebellären Substanz nach Hyperoxieexposition durch Minozyklin konzentriert. Teilergebnisse der Arbeit habe ich in Zusammenarbeit mit T. Scheuer generiert. Herr Scheuer nutzt Teile der gewonnenen Daten im Rahmen seiner Promotion zum Dr. rer. nat. an der TU Berlin.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Summary List [Journal Title Changes](#)
 Journals from: **subject categories NEUROSCIENCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)
 Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 256) Page 1 of 13
 MARK ALL UPDATE MARKED LIST
 Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ^j						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	NAT REV NEUROSCI	1471-003X	33792	29.298	35.142	5.603	58	8.0	0.07244	16.183
<input type="checkbox"/>	2	BEHAV BRAIN SCI	0140-525X	7873	20.415	23.842	1.700	10	>10.0	0.01286	11.186
<input type="checkbox"/>	3	TRENDS COGN SCI	1364-6613	21382	17.850	23.872	2.444	72	8.6	0.04719	10.507
<input type="checkbox"/>	4	NAT NEUROSCI	1097-6256	51112	16.724	16.874	4.100	221	7.8	0.15468	9.141
<input type="checkbox"/>	5	ANNU REV NEUROSCI	0147-006X	13125	14.265	22.563	3.000	21	>10.0	0.02068	11.493
<input type="checkbox"/>	6	NEURON	0896-6273	78507	13.974	16.092	2.927	385	8.3	0.22223	8.421
<input type="checkbox"/>	7	MOL PSYCHIATR	1359-4184	15797	13.314	13.274	2.892	167	5.6	0.04440	4.877
<input type="checkbox"/>	8	PROG NEUROBIOL	0301-0082	11877	13.177	11.181	1.318	44	9.7	0.02031	3.730
<input type="checkbox"/>	9	TRENDS NEUROSCI	0166-2236	18656	12.504	13.470	2.464	69	>10.0	0.03012	5.928
<input type="checkbox"/>	10	ACTA NEUROPATHOL	0001-6322	14701	11.360	10.616	2.743	109	6.7	0.03692	4.062
<input type="checkbox"/>	11	BIOL PSYCHIAT	0006-3223	42289	11.212	10.799	3.653	190	8.1	0.07406	3.724
<input type="checkbox"/>	12	BRAIN	0006-8950	46207	10.103	10.545	2.320	259	8.9	0.08378	4.110
<input type="checkbox"/>	13	ANN NEUROL	0364-5134	32995	9.638	10.880	2.277	177	>10.0	0.05944	4.357
<input type="checkbox"/>	14	J PINEAL RES	0742-3098	6914	9.314	7.140	2.391	87	6.1	0.00779	1.142
<input type="checkbox"/>	15	FRONT NEUROENDOCRIN	0091-3022	3407	8.852	9.045	1.297	37	6.5	0.00725	3.054
<input type="checkbox"/>	16	NEUROSCI BIOBEHAV R	0149-7634	18522	8.580	10.504	1.498	233	6.2	0.04521	3.615
<input type="checkbox"/>	17	CEREB CORTEX	1047-3211	26911	8.285	7.881	1.423	409	7.1	0.06806	3.376
<input type="checkbox"/>	18	SLEEP MED REV	1087-0792	4392	7.341	9.636	2.375	48	6.6	0.01033	3.450
<input type="checkbox"/>	19	NEUROSCIENTIST	1073-8584	4096	7.295	7.609	1.977	44	6.9	0.01008	2.899
<input type="checkbox"/>	20	MOL NEURODEGENER	1750-1326	2312	6.510	5.599	0.523	65	4.1	0.00933	1.966

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journal Summary List [Journal Title Changes](#)
 Journals from: **subject categories NEUROSCIENCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)
 Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 21 - 40 (of 256) Page 2 of 13
 MARK ALL UPDATE MARKED LIST
 Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ^j						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	21	NEUROPSYCHOPHARMACOL	0893-133X	22869	6.399	7.825	1.794	291	6.7	0.04998	2.648
<input type="checkbox"/>	22	CURR OPIN NEUROBIOL	0959-4388	13090	6.373	6.958	1.671	152	8.5	0.03549	3.503
<input type="checkbox"/>	23	NEUROPSYCHOL REV	1040-7308	2314	6.061	7.594	0.440	25	6.6	0.00476	2.461
<input type="checkbox"/>	24	CEREBAL ALCTA	0222-1024	7006	6.052	4.262	1.222	122	7.8	0.01187	1.140
<input type="checkbox"/>	25	GLIA	0894-1491	11548	5.997	5.411	1.285	158	7.7	0.02050	1.688
<input type="checkbox"/>	26	J NEUROSCI	0270-6474	172201	5.924	6.780	1.148	1342	8.5	0.35220	2.779
<input type="checkbox"/>	27	BRAIN BEHAV IMMUN	0889-1591	9464	5.874	6.020	1.462	238	4.9	0.02397	1.791
<input type="checkbox"/>	28	BRAIN STRUCT FUNCT	1863-2653	3534	5.811	6.803	1.307	244	3.0	0.01503	2.510
<input type="checkbox"/>	29	J PSYCHIATR NEUROSCI	1180-4882	2690	5.570	6.207	1.136	44	6.5	0.00551	2.034
<input type="checkbox"/>	30	PAIN	0304-3959	32930	5.557	6.244	1.119	269	>10.0	0.04647	2.053
<input type="checkbox"/>	31	NEUROIMAGE	1053-8119	79475	5.463	6.797	1.160	770	6.7	0.17977	2.321
<input type="checkbox"/>	32	MOL NEUROBIOL	0893-7648	5142	5.397	5.392	1.155	283	3.4	0.01331	1.480
<input type="checkbox"/>	33	BRAIN PATHOL	1015-6305	4403	5.256	4.485	1.026	77	7.5	0.00877	1.547
<input type="checkbox"/>	34	ALZHEIMERS RES THER	1758-9193	1164	5.197	5.126	0.921	76	2.5	0.00537	1.725
<input type="checkbox"/>	35	FRONT MOL NEUROSCI	1662-5099	1592	5.154		0.329	79	3.2	0.00782	
<input type="checkbox"/>	36	NEUROBIOL AGING	0197-4580	19205	5.153	5.193	1.261	429	5.7	0.04573	1.662
<input type="checkbox"/>	37	SOC COGN AFFECT NEUR	1749-5016	4695	5.101	5.532	0.848	210	3.4	0.01834	2.069
<input type="checkbox"/>	38	HUM BRAIN MAPP	1065-9471	17184	4.962	5.638	0.931	378	6.5	0.04035	2.084
<input type="checkbox"/>	39	MOL AUTISM	2040-2392	847	4.961	5.184	0.921	63	2.5	0.00450	1.956
<input type="checkbox"/>	40	NEUROPHARMACOLOGY	0028-3908	17341	4.936	4.709	1.288	365	5.8	0.03930	1.457

5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Scheuer, Till; **Brockmöller, Vivien**; Blanco Knowlton, Marissa; Weitkamp, Jorn-Hendrik; Ruhwedel, Torben; Mueller, Susanne et al. (2015): *Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline*. In *Glia* 63 (10), pp. 1825–1839. DOI: [10.1002/glia.22847](https://doi.org/10.1002/glia.22847)

6. Lebenslauf

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

7. Komplette Publikationsliste

Scheuer, T., **Brockmöller, V.**, Blanco Knowlton, M., Weitkamp J.H., Ruhwedel, T., Mueller, S., Endesfelder, S., Bühner, C., Schmitz T. (2015). „*Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline.*“ *Glia*, 63(10), 1825-39. Epub 2015 May 12. (Impact Factor 5.9)

Scheuer T., Sharkovska Y., Tarabykin V., Marggraf K., **Brockmöller V.**, Bühner C., Endesfelder S., Schmitz T. (2017). „*Neonatal Hyperoxia Perturbs Neuronal Development in the Cerebellum.*“ *Mol. Neurobiology*, 1-15.

Poster

41. Tagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Stuttgart, Mai 2015,

Titel: „*Sauerstoff schädigt die weiße Substanz des unreifen Kleinhirns ohne Signifikante Aktivierung von Mikroglia*“

110. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Leipzig,

September 2014, Titel: „*Schädigung der weißen Substanz des unreifen Kleinhirns durch Sauerstofftoxizität*“

8. Danksagung

Meine Promotion habe ich von April 2011 bis Januar 2017 in dem Forschungslabor der Klinik für Neonatologie an der Charité-Universitätsmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med. Christoph Bühner durchgeführt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. med. Christoph Bühner und PD Dr. med. Thomas Schmitz für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung meiner Promotion bedanken.

Sehr herzlich möchte ich PD Dr. med. Thomas Schmitz für die stetige Unterstützung in den letzten sechs Jahren danken. Die sehr gute Anleitung, der stetige Dialog, die kritische Auseinandersetzung und das Vertrauen in meine Person haben meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich positiv beeinflusst. Ich möchte mich an dieser Stelle auch sehr herzlich bei cand. rer. nat. Till Scheuer für die hervorragende Zusammenarbeit und mannigfaltige Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder möchte ich sehr herzlich für ihre fachliche Unterstützung, den stetigen Dialog und ihren Zuspruch bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Ruth Herrmann und Evelyn Strauss, für ihre praktische Unterstützung, die stete Ansprechbarkeit und das freundliche Miteinander. Dem gesamten Team des Labors der Klinik für Neonatologie der Charité gilt mein herzlicher Dank für das positive Arbeitsklima und die kollegiale Zusammenarbeit. Die Arbeit in dem Team hat mir stets viel Freude bereitet und ich bin dankbar für die vielen positiven Erfahrungen, die ich im Laufe der letzten Jahre sammeln durfte.

Darüber hinaus möchte ich besonders meinen Eltern, Karin Wagnitz-Brockmüller und Dr. Andreas Brockmüller, von ganzen Herzen für die fortwährende menschliche, moralische und finanzielle Unterstützung danken. Mein Dank gilt ebenfalls meiner Schwester Scarlet Brockmüller, die mich über die Jahre unterstützt und begleitet hat. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner Jan Friedrich für die unermüdliche Unterstützung in allen Lebensbereichen, die Geduld und das große Vertrauen in meine Person.