

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

DISSERTATION

Einfluss von GABA-Rezeptor-Antagonisten auf die
hippocampale Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn der
Ratte

Effects of GABA-receptor antagonists on postnatal
neurogenesis in the rodent hippocampus

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Charlotte Katharina Gustorff

Datum der Promotion:
30. November 2023

Inhaltsverzeichnis

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | ii |
| Tabellen und Abbildungen..... | iii |
| Abkürzungsverzeichnis..... | iv |
| Zusammenfassung..... | 1 |
| 1 Einleitung..... | 4 |
| 1.1 Frühgeburt und Erkrankungen durch gestörte GABAerge Transmission..... | 4 |
| 1.2 Hippocampus: postnatal vulnerable Hirnregion..... | 4 |
| 1.3 Forschungsstand zur Rolle von GABA in der hippocampalen Neurogenese..... | 6 |
| 1.4 GABA-Rezeptoren..... | 7 |
| 1.5 Fragestellung und Zielsetzung..... | 8 |
| 2 Methodik..... | 10 |
| 2.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau..... | 10 |
| 2.2 Gewebepräparation..... | 12 |
| 2.3 RNA-Extraktion und quantitative PCR..... | 12 |
| 2.4 Immunhistochemische Färbung..... | 14 |
| 2.5 Statistik..... | 16 |
| 3. Ergebnisse..... | 17 |
| 3.1 GABA _B -Rezeptorblockade beeinflusst neuronale Stammzellen..... | 17 |
| 3.2 GABA _B -Rezeptor-Antagonisierung vermindert intermediäre Vorläuferzellen..... | 19 |
| 3.3 Postmitotische Neurone weniger von GABA-Rezeptorblockade betroffen..... | 22 |
| 3.4 Hippocampale Proliferationskapazität verändert..... | 24 |
| 3.5 Anzahl postmitotischer Neurone anhaltend nicht verändert..... | 24 |
| 3.6 Neurotrophine nach GABA _B -Rezeptorblockade vermindert exprimiert..... | 25 |
| 3.7 Marker für Inflammation unter GABA-Rezeptorblockade..... | 26 |
| 3.8 Kein Hinweis für Apoptose durch GABA-Rezeptorblockade..... | 26 |
| 4. Diskussion..... | 28 |
| Literaturverzeichnis..... | 35 |
| Eidesstattliche Versicherung..... | 40 |
| Anteilsklärung an der erfolgten Publikation..... | 41 |
| Auszug aus der Journal Summary List..... | 42 |
| Lebenslauf..... | 61 |
| Komplette Publikationsliste..... | 63 |
| Danksagung..... | 64 |

Tabellen und Abbildungen

| | | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab. 1 | Oligonukleotid-Sequenzen der analysierten Zielgene..... | 13 |
| Abb. 1 | Überblick über den Versuchsaufbau..... | 11 |
| Abb. 2 | Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte Nestin/PCNA/DAPI (P11) | 18 |
| Abb. 3 | Quantifizierung Nestin- und Nestin/PCNA-positiver Zellen P11 | 18 |
| Abb. 4 | Relative mRNA-Expression <i>Sox2</i> und <i>Hes5</i> | 19 |
| Abb. 5 | Relative mRNA-Expression <i>Pax6</i> , <i>GFAP</i> und <i>Sc1a3</i> | 19 |
| Abb. 6 | Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte NeuroD1/PCNA/DAPI (P11). | 20 |
| Abb. 7 | Quantifizierung NeuroD1- und NeuroD1/PCNA-positive Zellen P11 | 21 |
| Abb. 8 | Relative mRNA-Expression <i>NeuroD1</i> und <i>Ascl1</i> | 21 |
| Abb. 9 | Relative mRNA-Expression <i>Tbr2</i> und <i>Ngn2</i> | 22 |
| Abb. 10 | Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte NeuN/PCNA/DAPI (P11) | 23 |
| Abb. 11 | Quantifizierung NeuN- und PCNA-positiver Zellen P11 | 23 |
| Abb. 12 | Relative mRNA-Expression <i>Tbr1</i> , <i>NeuroD2</i> und <i>CycD2</i> | 24 |
| Abb. 13 | Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte und Quantifizierung NeuN/DAPI-positiver Zellen (P15) | 25 |
| Abb. 14 | Relative mRNA-Expression <i>BDNF</i> , <i>NGF</i> und <i>NT-3</i> | 25 |
| Abb. 15 | Relative mRNA-Expression <i>IL-1α</i> und <i>IL-1β</i> | 26 |
| Abb. 16 | Relative mRNA-Expression <i>AIF</i> und <i>Casp3</i> | 27 |
| Abb. 17 | Quantifizierung Zellkernfärbung P11. | 27 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| ADHS | Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom |
| one way ANOVA | <i>one way analysis of variance</i> , Einweg-Varianzanalyse |
| ASD | <i>autism spectrum disorder</i> , Autismus-Spektrum-Erkrankungen |
| Ascl1 | <i>achaete-scute family bHLH transcription factor 1</i> |
| BDNF | <i>brain-derived neurotrophic factor</i> |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin |
| CycD2 | Cyclin D2 |
| CA3-Region | Cornu ammonis Region 3 |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CGP | <i>(3-Aminopropyl)(diethoxymethyl)phosphinic acid</i> , CGP 35348 |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-Phenylidol |
| DG | <i>dentate gyrus</i> , Gyrus dentatus |
| DMCM | 4-Ethyl-6,7-dimethoxy-9H-pyrido[3,4-b]inol-3-Carboxylsäure-Methylester-Hydrochlorid |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| E | embryonaler Tag |
| FAM | 6-Carboxyfluorescein |
| GABA | <i>gamma-aminobutyric acid</i> , Gamma-Aminobuttersäure |
| GDP | <i>giant depolarizing potential</i> |
| GFAP | <i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein |
| Hes5 | <i>hairy-enhancer-of-split 5</i> |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase |
| IL-1 α | Interleukin 1 α |
| IL-1 β | Interleukin 1 β |
| i.p. | intraperitoneal |
| KCC2 | Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 |
| μ g | Mikrogramm |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NeuN | <i>neuronal nuclei antigen</i> , neuronales Zellkernantigen |
| NeuroD1 | <i>neurogenic differentiation 1</i> , neurogene Differenzierung 1 |
| NeuroD2 | <i>neurogenic differentiation 2</i> , neurogene Differenzierung 2 |

| | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Ngn2 | <i>neurogenin 2</i> , Neurogenin 2 |
| NGF | <i>nerve growth factor</i> , Nervenwachstumsfaktor |
| NKCC1 | Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter 1 |
| NT-3 | <i>neurotrophin 3</i> , Neurotrophin-3 |
| NSCs | <i>neural stem cells</i> , neuronale Stammzellen |
| NPCs | <i>neural progenitor cells</i> , neuronale Vorläuferzellen |
| Pax6 | <i>paired box 6</i> |
| PCNA | <i>proliferating cell nuclear antigen</i> , Antigen proliferierender Zellkerne |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| Prox1 | <i>prospero homeobox 1</i> |
| qPCR | <i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| RGB | Rot-Grün-Blau |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure |
| mRNA | <i>messenger-RNA</i> |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler |
| Sox2 | <i>SRY-box transcription factor 2</i> |
| Scl1a3 | <i>solute carrier family 1 member 3</i> |
| TAMRA | 5-Carboxytetramethylrhodamin |
| Tbr1 | <i>T-box brain transcription factor 1</i> |
| Tbr2 | <i>T-box brain transcription factor 2</i> |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| OR | Odds-Ratio |
| P | postnataler Tag |
| SGZ | subgranuläre Zellschicht |

Zusammenfassung

In das letzte Trimenon der Schwangerschaft fallen vulnerable Schritte der neuronalen Entwicklung. Frühgeborene kommen in dieser Phase mit exogenen und teilweise toxischen Einflüssen in Berührung. Der Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) wechselt während der Zeit des schnellsten Hirnwachstums seine Funktion vom depolarisierenden zum zunehmend hyperpolarisierenden Neurotransmitter. Störungen der GABAergen Transmission, während dieses „*GABAergic shifts*“, wurden in Verbindung gebracht mit im späteren Leben Frühgeborener gehäuft auftretenden neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen.

Diese in-vivo-Studie untersucht Auswirkungen einer temporären GABA-Rezeptorblockade auf die Neurogenese im Gyrus dentatus (DG) des sich entwickelnden Hippocampus. Neugeborenen Wistar-Ratten wurde ab dem sechsten bis zum 11. Lebensstag (P6-P11) täglich der reverse GABA_A-Rezeptoragonist DMCM, der GABA_B-Rezeptorantagonist CGP 35348 oder NaCl 0,9% als Kontrollsubstanz intraperitoneal appliziert. Nach Tötung zum Zeitpunkt P11 wurden mittels immunhistochemischer Färbung neuronale Vorläuferzellen, mitotische und postmitotische Neurone untersucht. Postmitotische Neurone wurden zusätzlich zum Zeitpunkt P15 quantifiziert. Mittels quantitativer PCR wurde die Expression neuronaler Transkriptionsfaktoren, Neurotrophine sowie Mediatoren für Apoptose und oxidativen Stress analysiert.

Die immunhistochemische Analyse zeigte nach GABA_B-Rezeptorblockade eine deutliche Reduktion der NeuroD1-positiven intermediären Vorläuferzellen, sowie proliferierender Nestin-positiver neuronaler Vorläuferzellen. Assoziiert dazu wurden Marker dieser Entwicklungsstufen der neuronalen Differenzierung, wie die Transkriptionsfaktoren *Pax6*, *Ascl1* und *NeuroD1*, signifikant vermindert exprimiert. Eine GABA_A-Rezeptorblockade führte zu keinen Veränderungen auf zellulärer Ebene. Postmitotische NeuN-positive Neurone waren zu den Zeitpunkten P11 und P15 unbeeinflusst. Allerdings zeigte die Expressionsanalyse an P11 nach GABA_B-Rezeptorblockade eine Verminderung spezifischer Marker postmitotischer Neurone, wie *Tbr1*, *Prox1* und *NeuroD2*, als auch von Neurotrophinen. Die Analyse der pro-inflammatorischen Zytokinantwort zeigte eine Induktion von *TNF α* nach Applikation sowohl GABA_A- als auch GABA_B-Rezeptorantagonisten. Erhöhte neurodegenerative Effekte waren nicht nachweisbar.

Die Blockade von GABA_B-Rezeptoren zur Zeit des schnellsten Hirnwachstums beeinflusste somit wesentlich die hippocampale Differenzierung neuronaler Zellen im

Gehirn der neugeborenen Ratte und lässt auf eine Vulnerabilität der hippocampalen Neurogenese für postnatale Störungen in der GABAergen Transmission insbesondere über den metabotropen Rezeptor schließen. In der Forschung und Klinik sollten zukünftig bei pharmakologischen Interventionen an metabotropen GABA-Rezeptoren mögliche negative Einflüsse auf die neurologische Entwicklung Frühgeborener berücksichtigt werden.

Abstract

The last trimester of human pregnancy contains critical steps of neurological development. During this vulnerable phase, premature children are exposed to exogenous influences and possibly also disturbances in GABAergic transmission. The neurotransmitter GABA changes its main function during the rapid brain growth spurt. While it functions as a depolarizing neurotransmitter pre- and perinatally, GABA increasingly evolves a hyperpolarizing character postnatally. Disturbances in this so-called "GABAergic shift" have been implicated to play a role in the pathogenesis of several neurological and psychiatric disorders that are more prevalent in the later lives of preterm born children.

This in-vivo study in newborn Wistar rats investigates consequences of a temporary pharmacological blockade of GABA-receptors on the ongoing neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus (DG). Newborn rats were intraperitoneally injected with either a reverse GABA_A-receptor agonist (DMCM), a GABA_B-receptor antagonist (CGP 35348) or solely NaCl in the control group on six consecutive days, from postnatal day P6 to P11. Immunohistochemical analysis on P11 revealed a clear reduction of NeuroD1-positive intermediate progenitor cells and actively proliferating Nestin-positive neural stem cells after application of GABA_B-receptor antagonists. Quantitative PCR supported this by finding reduced expressions of markers for these stages in neuronal differentiation, the transcription factors *Pax6*, *Ascl1* and *NeuroD1*.

Application of GABA_A-receptor antagonists did not cause significant changes detected in immunohistochemical analysis. There were no changes in the number of postmitotic NeuN-positive cells after application of the GABA-receptor antagonist at P11 and P15. Nevertheless, we found significantly reduced expressions of *Tbr1*, *Prox1* and *NeuroD2* in CGP-treated animals, so specific markers for postmitotic neurons were affected at a subcellular level.

Furthermore, expressions of all tested neurotrophins decreased after GABA_B-receptor blockade. Analysis of pro-inflammatory cytokines showed the induction of *TNF α* expression after application of GABA-receptor antagonists. There were no neurodegenerative effects detectable.

This in-vivo study indicates that GABAergic transmission via the metabotropic GABA_B-receptor inhibits a critical role in differentiation of neural cells in the hippocampus of neonatal rats. Data of our study show the vulnerability of hippocampal neurogenesis at the time of rapid brain growth spurt. Future research on pharmacological interventions, acting on metabotropic GABA-receptors, should therefore consider a possible negative impact on neurological development in preterm born infants.

1 Einleitung

1.1 Frühgeburt und Erkrankungen durch gestörte GABAerge Transmission

Frühgeburt ist weltweit die häufigste Ursache für Todesfälle in den ersten fünf Lebensjahren (Ream und Lehwald, 2018). Jedes zehnte Kind kommt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche zur Welt (Ream und Lehwald, 2018). Durch medizinische Fortschritte hat sich die Mortalität durch Frühgeburt senken lassen, allerdings bleibt bei überlebenden Frühgeborenen das erhöhte Risiko für eine Reihe von Folgeerkrankungen (Humberg et al., 2020). Die Ursachen für Morbidität nach Frühgeburt sind multifaktoriell, wobei die Unreife von Organen, Inflammation und Sepsis, oxidativer Stress sowie die Applikation von Medikamenten und anderen Therapien bekannte Ursachen sind (Brill et al., 2017; Andropoulos, 2018; Humberg et al., 2020).

Neurologische Entwicklungsstörungen wie das Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS), Autismus-Spektrum-Erkrankungen (ASD) und Angststörungen (Rogers et al., 2018) gehören zu den gehäuft im späteren Leben von Frühgeborenen auftretenden Erkrankungen. Eine Metaanalyse bestimmte das erhöhte Risiko für ADHS bei sehr kleinen Frühgeborenen (geboren vor Vollendung der 32. Schwangerschaftswoche) und konnte zeigen, dass die Schwere der Frühgeburtlichkeit mit einem Anstieg des Risikos verbunden ist (Franz et al., 2018). Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und bislang ungeklärt, allerdings werden Veränderungen in Signalwegen des Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in der Entwicklung sowohl von ASD (Cellot und Cherubini, 2014; Gaetz et al., 2014; Tanifuji et al., 2017) als auch von ADHS (Naaijen et al., 2017) diskutiert.

Bildgebende Studien sahen in Magnetresonanztomographien (MRT) von Frühgeborenen Hinweise auf eine veränderte GABAerge Transmission mit alterierten regionalen GABA-Konzentrationen (Kwon et al., 2014; Basu et al., 2021). Auch neuroanatomisch zeigten sich bei ehemaligen Frühgeborenen Auffälligkeiten, wie ein vermindertes Gehirnvolumen insbesondere im Hippocampus (Ream und Lehwald, 2018).

1.2 Hippocampus: postnatal vulnerable Hirnregion

Der Hippocampus ist als Hirnregion funktionell wesentlich verantwortlich für die Bildung des episodischen Gedächtnisses, sowie für die Verarbeitung sensorischen Inputs (Catavero et al., 2018; Kesner, 2018). Neuronale Erregung gelangt über die wichtigste

afferente Bahn des Hippocampus, den Tractus perforans, aus dem entorhinalen Kortex in den Gyrus dentatus (*dentate gyrus*, DG), der wiederum exzitatorisch die Cornu ammonis Region (CA3-Region) erregt (Schünke, 2015). Der DG kontrolliert somit im Schaltkreis des Hippocampus den Informationsfluss aus dem Kortex in den Hippocampus und generiert dessen Output an die CA3-Region (Catavero et al., 2018).

Die subgranuläre Schicht (SGZ) des DG zeichnet sich durch die Fähigkeit zur Neubildung von Neuronen bis ins hohe Alter aus (Nicola et al., 2015). Die dort ansässigen neuronalen Stammzellen (*neural stem cells*, NSC), auch Typ 1-Zellen genannt, proliferieren und fügen dem hippocampalen Netzwerk durch Differenzierung der entstehenden Tochterzellen laufend neue Neurone hinzu (Vieira et al., 2018). Es entstehen neuronale Vorläuferzellen (*neural progenitor cells*, NPCs), die intermediäre Vorläuferzellen vom Typ-2a- und Typ-2b (Vieira et al., 2018). Ausgehend von diesen Zellen können sich neuronale sowie astrozytäre Zelllinien des Hippocampus bilden (Nicola et al., 2015). Im Laufe weiterer Differenzierung und der Entwicklung hin zum Neuron verlieren NSC Eigenschaften der astrozytären Zelllinie und Astrozytenmarker werden nicht mehr exprimiert (Lugert et al., 2010; DeCarolis et al., 2013; Berg et al., 2018). Bei weiterer Differenzierung entwickeln sich intermediäre Vorläuferzellen vom Typ-3 und schließlich postmitotische Neurone (Nicola et al., 2015). Etliche Arbeiten konnten zeigen, dass die im Laufe des Lebens entstehenden Neurone in vorhandene neuronale Netzwerke integriert werden und wesentlich an Funktionen wie Gedächtnisbildung, Lernen, Stressverarbeitung und Emotionen, beteiligt sind (Catavero et al., 2018).

Der Übergang von fetaler und früher postnataler Neurogenese zu adulter Neurogenese im Hippocampus ist fließend und nicht exakt definiert (Nicola et al., 2015). Nicola et al. beschreiben in ihrer detaillierten immunhistochemischen Analyse am Mausmodell, dass die für die spätere adulte Neurogenese wesentliche neurogene Nische in der SGZ bereits perinatal etabliert ist (Nicola et al., 2015). Morphologisch entspricht in Säugern die SGZ zum Zeitpunkt P14 dem Bild in adulten Tieren (Berg et al., 2018). Korrespondierende Zeitpunkte in der zerebralen Entwicklung im Menschen und in der Ratte konnten festgestellt werden (Rice und Barone, 2000; Semple et al., 2013). Der Hippocampus entwickelt sich in beiden Spezies perinatal. Bei der Ratte findet die Entwicklung des Hippocampus zwischen E19 und P16 statt und erreicht ihren Höhepunkt während der Zeit des schnellsten Hirnwachstums (Rice und Barone, 2000). Das schnellste Hirnwachstum wird in der Ratte am siebten postnatalen Tag erreicht, beim Menschen zum Zeitpunkt der Geburt (Semple et al., 2013). Das neuronale Entwicklungsstadium der

Ratte zum Zeitpunkt P6-P11 ist als in-vivo Modell für die menschliche Entwicklung dritten Schwangerschaftstrimenon etabliert (Rice und Barone, 2000; Semple et al., 2013).

Schädigende Einflüsse während der Zeit des größten Hirnwachstums könnten Auswirkungen auf das spätere Funktionieren der Neurogenese in der SGZ haben. Für Frühgeborene relevant sind beispielsweise die besonders hohe Exposition zu oxidativem Stress (Endesfelder et al., 2017). Eine erhöhte Sauerstoffexposition führt im Tiermodell unter anderem zu einer gestörten Homöostase des Neurotransmitters GABA und kortikaler Synapsenbildung (Scheuer et al., 2022). Außerdem sind schädigende Einflüsse von vielfach über GABAerge Signalwege wirkenden Medikamenten aus der Gruppe der Sedativa und Antikonvulsiva auf die neurologische Entwicklung Frühgeborener gezeigt (Stefovska et al., 2008; Andropoulos, 2018).

1.3 Forschungsstand zur Rolle von GABA in der hippocampalen Neurogenese

GABA zählt mit Glutamat zu den wichtigsten Neurotransmittern im zentralen Nervensystem (Wu und Sun, 2015). Anders als reife Neurone reagieren unreife, neugeborene Neurone aufgrund hoher intrazellulärer Chloridkonzentrationen durch ihre noch hohe Expression des Transporters Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter 1 (NKCC1) auf GABAerge Erregung mit Depolarisation (Catavero et al., 2018). Im Unterschied zum adulten Gehirn erfüllt GABA somit im sich entwickelnden Gehirn überwiegend die Rolle eines exzitatorischen Neurotransmitters (Semple et al., 2013).

GABA beeinflusst im sich entwickelnden Gehirn die Aussprossung von Neuriten, sowie die Bildung von Synapsen (Cellot und Cherubini, 2013; Peerboom und Wierenga, 2021). In kultivierten hippocampalen Schnitten führt die Blockade depolarisierender GABAerger Transmission zu einer erhöhten Zahl exzitatorischer Synapsen (Salmon et al., 2020). Im sich entwickelnden Kortex sind sowohl einer Steigerung der Proliferation von NSCs durch GABA in der subventrikulären Zone, als auch die Hemmung der Proliferation intermediärer Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone beschrieben (Peerboom und Wierenga, 2021). In der weiteren neuronalen Entwicklung wird durch einen Anstieg in der Expression von Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (KCC2-Kanäle) der Wechsel von einer depolarisierenden Wirkung hin zur Funktion als vornehmlich hyperpolarisierender Neurotransmitter in den Zellen ausgelöst (Semple et al., 2013; Schulte et al., 2018). Störungen im beschriebenen Wechsel von exzitatorischer zu inhibitorischer Wirkung GABAerger Transmission wurden in Verbindung mit der Pathogenese zahlreicher

neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen gebracht, darunter ASD, das Rett-Syndrom und Epilepsie (Schulte et al., 2018; Peerboom und Wierenga, 2021).

Zusätzlich zu ihrer Rolle als exzitatorischer Neurotransmitter in der postnatalen Neurogenese sind für GABA in der adulten hippocampalen Neurogenese regulatorische Funktionen bei der Differenzierung NSCs zu NPCs, bei der Reifung der Vorläuferzellen sowie der Integration reifender Neurone in bestehende neuronale Netzwerke des Hippocampus beschrieben (Catavero et al., 2018). Für die adulte hippocampale Neurogenese konnte gezeigt werden, dass tonische, nicht-synaptische GABAerge Transmission NSCs in einem ruhenden, nicht proliferierenden Zustand hält und GABA über synaptische Aktivierung in NPCs eine neuronale Differenzierung auslöst (Catavero et al., 2018).

1.4 GABA-Rezeptoren

Seine Wirkungen entfaltet GABA über GABA-Rezeptoren, die in zwei Gruppen eingeteilt werden. Während es sich bei GABA_A-Rezeptoren um Ionen-Kanäle für Chlorid und Bicarbonat handelt, die abhängig vom elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran bei Öffnung zur De- bzw. Hyperpolarisation führen, sind GABA_B-Rezeptoren metabotrope Rezeptoren aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Ghose et al., 2011; Pontes et al., 2013). Eine Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren führt somit zu diversen intrazellulären Reaktionen, abhängig von den nachgeschalteten Signalwegen der jeweiligen Zelle (Ghose et al., 2011).

Die depolarisierende GABAerge Transmission über GABA_A-Rezeptoren in der neuronalen Entwicklung wurde umfassend untersucht. Es zeigten sich multiple Funktionen in der Migration von neuronalen Stammzellen, Synapsenbildung und der Regulation von Proliferation. Diese Erkenntnisse sind in einem aktuellen Review von Peerboom und Wierenga zusammengefasst (Peerboom und Wierenga, 2021). Salmon et al. zeigten an einem Modell mit kultivierten hippocampalen Schnitten aus Mäusen im Alter von P5, dass die Blockade von GABA_A-Rezeptoren zur verstärkten Bildung von glutamatergen Synapsen führte. Die Autoren folgerten hieraus, dass die Transmission über den GABA_A-Rezeptor in diesem Alter die Synapsenbildung hemmt. Neurogenese und Effekte des GABA_B-Rezeptors wurden in der Arbeit nicht untersucht (Salmon et al., 2020). Khalilov et al. konnten im Hippocampus neugeborener Ratten im Entwicklungsalter P4 bis P8 zeigen, dass die Aktivierung von postsynaptisch lokalisierten GABA_B-Rezeptoren zur Beendigung von Giant Depolarizing Potentials (GDPs), typische

Aktivitätsmuster für das neonatale neuronale Netzwerk im Hippocampus, beiträgt (Khalilov et al., 2017). Die Transmission über den GABA_A-Rezeptor hat zu Beginn der GDPs eine zunächst verstärkende, depolarisierende Wirkung (Khalilov et al., 2015). In Experimenten mit kultivierten hippocampalen Schnitten beeinflusst GABAerge Transmission somit über beide GABA-Rezeptoren für den neonatalen Hippocampus typische Aktivitätsmuster, wobei sich die ausgelöste Reaktion je nach aktiviertem Rezeptor unterscheidet (Khalilov et al., 2015; Khalilov et al., 2017; Peerboom und Wierenga, 2021).

Zusammenfassend gibt es Evidenz für wesentliche Funktionen GABAerger Transmission über beide GABA-Rezeptoren für die neuronale hippocampale Entwicklung. Insgesamt ist die Funktion des metabotropen Rezeptors in der postnatalen hippocampalen Neurogenese deutlich schlechter verstanden und wird in etlichen Experimenten nicht berücksichtigt (Peerboom und Wierenga, 2021).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

In das letzte Trimenon der menschlichen Schwangerschaft fallen wichtige neuronale Entwicklungsschritte, wie die Phase des schnellsten Hirnwachstums, sowie die Entwicklung des Neurotransmitters GABA vom zunächst vornehmlich depolarisierenden hin zum wichtigsten hyperpolarisierenden Transmitter. Frühgeborene könnten während dieser vulnerablen Phase neben anderen toxischen Einflüssen auch Störungen in neuronalen Prozessen ausgesetzt sein, die über GABA vermittelt werden. Es gibt Hinweise, dass eine gestörte GABAerge Transmission mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen assoziiert ist, die gehäuft im späteren Leben Frühgeborener auftreten.

Es ist bislang ungeklärt, welche Schritte in der Proliferation, Differenzierung und Reifung neuronaler Vorläuferzellen im postnatalen Hippocampus von funktionierender GABAerger Transmission abhängig sind und somit für mögliche toxische Einflüsse vulnerabel sind. Zur experimentellen Untersuchung der Auswirkungen einer gestörten GABAergen Transmission auf die postnatale hippocampale Neurogenese, wird ein Tiermodell der neugeborenen Ratte gewählt. Der Zeitpunkt der Intervention entspricht in diesem Modell der humanen Entwicklung im letzten Trimenon der Schwangerschaft. GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren werden pharmakologisch antagonisiert und die hippocampale Neurogenese hinsichtlich der Differenzierung und der Proliferationskapazität untersucht. Wir stellen die Hypothese auf, dass eine GABA-Rezeptorblockade die regulären neurogenen Prozesse beeinflusst. Durch

Quantifizierung neuronaler Vorläuferzellen, intermediärer Vorläuferzellen sowie postmitotischer Neurone sollen Auswirkungen auf verschiedene Entwicklungsstadien in der Differenzierung neuronaler Zellen detektiert werden. Mit Hilfe von Expressionsanalysen werden von GABA-Rezeptorblockade abhängige neuronale Transkriptionsfaktoren identifiziert, und die Beeinflussung der Expression von Neurotrophinen sowie von Markern für Apoptose und Inflammation untersucht.

2 Methodik

Die im Folgenden beschriebene Methodik entspricht dem von uns in Gustorff et al. (2021) publizierten Vorgehen.

2.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden sechs Tage alte Wistar Ratten eingesetzt, die aus Würfen von terminiert verpaarten Muttertieren (FEM, Charité-Universitätsmedizin Berlin) stammten. Die Zuteilung der neugeborenen Jungtiere in experimentelle Gruppen erfolgte zufällig und abwechselnd nach Geschlecht innerhalb der ersten zwei Lebensstage. Die Jungtiere wurden mit dem Muttertier bei freiem Zugang zu Futter und Wasser, kontrollierter Luftfeuchtigkeit und Temperatur, sowie einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h/12 h gehalten. Alle Tierversuche waren durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales bewilligt (Tierversuchsnummer G-0075/18) und befolgten die internen Richtlinien der Charité sowie die ARRIVE guidelines (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (Percie du Sert et al., 2020).

Die Kontrollgruppe erhielt 0,9% Kochsalzlösung, die sechs Verumgruppen entweder den inversen GABA_A-Rezeptoragonisten 4-Ethyl-6,7-dimethoxy-9H-pyrido[3,4-b]inol-3-Carboxylsäure-Methylester-Hydrochlorid (DMCM) in den Dosierungen 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg Körpergewicht (Tocris, Kat.-Nr. 3083, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland), oder den GABA_B-Rezeptorantagonisten (*3-Aminopropyl*)(*diethoxymethyl*)*phosphinic acid* (CGP 35348) in den Dosierungen 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg Körpergewicht (Tocris, Kat.-Nr. 1245). An sechs aufeinanderfolgenden Tagen beginnend mit dem postnatalen Tag 6 (P6) wurde je nach Versuchsgruppe Kochsalzlösung, DMCM oder CGP 35348 intraperitoneal (i.p.) injiziert. Dabei wurde das injizierte Volumen gewichtsadaptiert mit 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht bemessen. Zum Ausschluss von Krämpfen und Verhaltensänderungen wurden die Tiere für 30 min nach der Gabe beobachtet. Es traten keine Krämpfe auf, kein Jungtier starb. 12 h nach der letzten Gabe wurden die Tiere zum Zeitpunkt P11 durch transkardiale Perfusion entblutet und das Gehirn entnommen (siehe 2.2 Gewebepräparation).

Die Versuchsgruppen bestanden für die immunhistochemische Analyse aus 10 Tieren pro Verumgruppe und Kontrolle. Die Genexpressionsanalyse wurden an neun bis zehn Tieren durchgeführt, die mit den höchsten Dosen der GABA-Rezeptorantagonisten behandelt worden waren (DMCM-Hydrochlorid 50 µg/kg und CGP 35348 10 mg/kg

Körpergewicht i.p.). Im Folgenden werden die Abkürzungen DMCM und CGP für die zwei eingesetzten Substanzen verwendet.

Für weitere Analysen an P15 wurden nach dem gleichen Schema geborene Ratten in drei Versuchsgruppen randomisiert. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9% Kochsalzlösung, die Verumgruppen entweder den inversen DMCM in der Dosierung 50 µg/kg Körpergewicht (Tocris, Kat.-Nr. 3083, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland), oder CGP in der Dosierung 10 mg/kg Körpergewicht (Tocris, Kat.-Nr. 1245). An sechs aufeinanderfolgenden Tagen beginnend mit dem postnatalen Tag 6 (P6) wurde je nach Versuchsgruppe Kochsalzlösung, DMCM oder CGP i.p. injiziert. Das injizierte Volumen wurde gewichtsadaptiert mit 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht bemessen. Die Tiere wurden für 30 min nach der Gabe beobachtet. Es traten keine Krämpfe auf, kein Jungtier starb. 12 h nach der letzten Gabe wurden die Tiere zum Zeitpunkt P11 durch transkardiale Perfusion entblutet und das Gehirn entnommen (siehe 2.2 Gewebepräparation). Abbildung 1 (siehe Abb. 1) gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau.

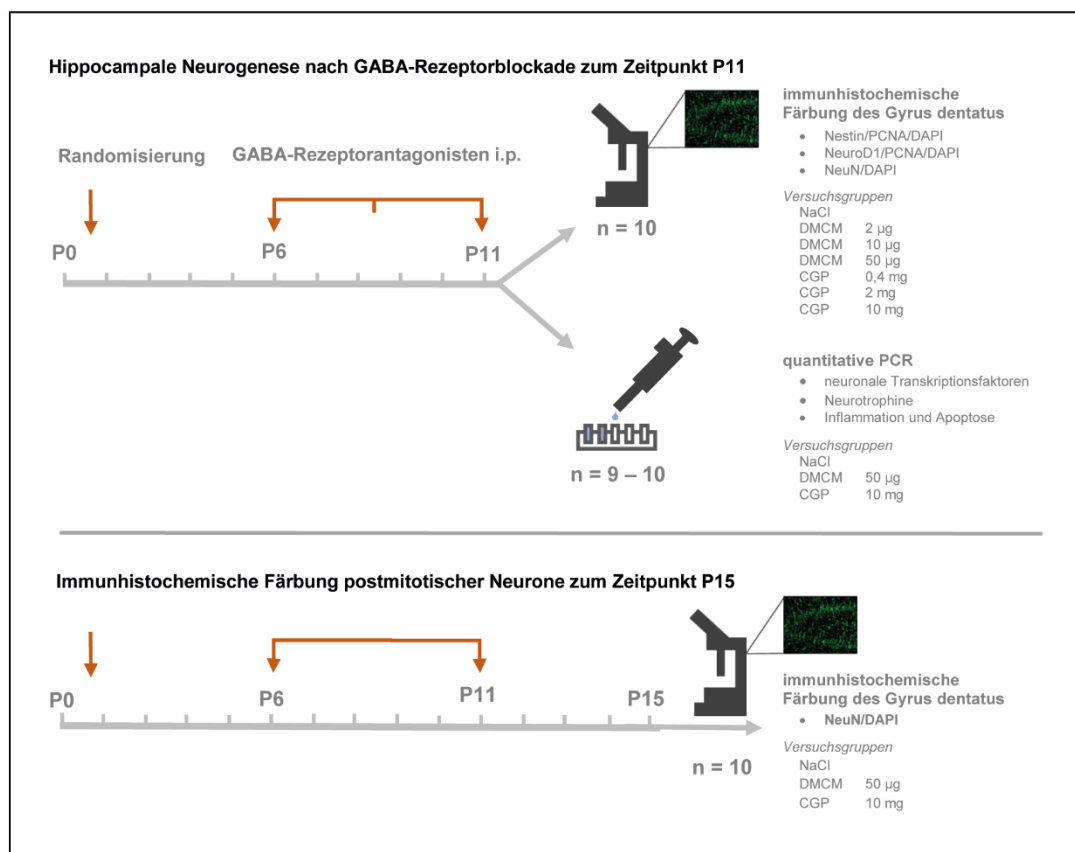


Abb. 1 Überblick über den Versuchsaufbau. Neugeborenen Wistar-Ratten wurde von P6 bis P11 GABA-Rezeptorantagonisten intraperitoneal appliziert. Es wurden immunohistochemische Färbung für die Marker Nestin, PCNA, NeuroD1, NeuN sowie DAPI an P11, sowie für NeuN P15 durchgeführt. An P11 wurden die Expression neuronaler Transkriptionsfaktoren, Neurotrophine sowie Marker für Inflammation und Apoptose mittels qPCR bestimmt. Abkürzungen: i.p. – intraperitoneal; P – postnataler Tag. Eigene Abbildung.

2.2 Gewebepräparation

Zur Gewinnung von Gehirnschnitten für die immunhistologische Analyse wurde, wie von Endesfelder et al. (2018) und Gustorff et al. (2021) beschrieben, vorgegangen. Die Tiere wurden an P11 mit Ketamin (100 mg/kg; Dechra Veterinary Products, Northwich, Großbritannien), Xylazin (20 mg/kg; cp Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland) und Acepromazin (3 mg/kg; Covetrus GmbH, Hamburg, Deutschland) tief narkotisiert und transkardial mit eiskaltem Phosphat-Puffer (PBS, pH 7,4) gefolgt von 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS perfundiert. Das daraufhin entnommene Gehirn wurde in vierprozentigem PFA bei 4°C für 24 h fixiert. Dann wurde das Gewebe in PBS (pH 7,4) bei 4 °C bis zur Einbettung in Paraffin gelagert. Hierfür wurde das Gewebe zunächst für 4h unter laufendem Wasser gewaschen, sowie zur Dehydratation in Lösungen mit ansteigender Ethanol-Konzentration inkubiert (70% für 4 h und 80% über Nacht bei Raumtemperatur, 96% und zweimal 100% für je 1 h bei 40 °C). Dann wurde das Gewebe in Chloroform (100%-iges Ethanol/Chloroform 1:1 unter zweimaligem Austausch des Chloroforms für je 1 h bei 40 °C) inkubiert, dann zweifach in Paraffin vorfixiert (1 h und über Nacht bei 60 °C), abgekühlt und dann final in frischem Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert.

Die zur Genexpressionsanalyse genutzten Tiere wurden transkardial mit eiskaltem PBS (pH 7,4) perfundiert. Nach Dekapitation wurden der Bulbus olfactorius sowie das Cerebellum entfernt und die verbliebenen Großhirnhemisphären in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Nutzung der Proben bei -80 °C gelagert.

2.3 RNA-Extraktion und quantitative PCR

Für die Analyse der Genexpression mittels quantitativer PCR (qPCR) wurde ein standardisiertes Protokoll verwendet (Gustorff et al., 2021). Dazu wurde das, wie oben beschrieben, gewonnene Gewebe der Großhirnhemisphären zur Isolation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) mittels saurer Phenol-Chloroform-Extraktion (peqGOLD RNAPure™; PEQLAB Biotechnologie, Kat.-Nr. 30-1010, Erlangen, Deutschland) verwendet. Nach Behandlung mit Desoxyribonuklease (DNase) wurde eine reverse Transkription von 2 µg der gewonnenen Gesamt-RNA durchgeführt und an der hergestellten komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) mittels qPCR die Expression folgender Gene quantifiziert: Achaete-scute family bHLH transcription factor 1

(*Ascl1*), brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*), Cyclin D2 (*CycD2*), glial fibrillary acidic protein (*GFAP*), hairy-enhancer-of-split 5 (*Hes5*), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*HPRT*), Interleukin 1 α (*IL-1 α*), Interleukin 1 β (*IL-1 β*), neurogenic differentiation 1 (*NeuroD1*), neurogenic differentiation 2 (*NeuroD2*), neurogenin 2 (*Ngn2*), nerve growth factor (*NGF*), Neurotrophin 3 (*NT-3*), paired box 6 (*Pax6*), prospero homeobox 1 (*Prox1*), SRY-box transcription factor 2 (*Sox2*), solute carrier family 1 member 3 (*Slc1a3*), T-box brain transcription factor 1 (*Tbr1*), T-box brain transcription factor 2 (*Tbr2*) und Tumornekrosefaktor α (*TNF α*) (siehe Tab. 1) zeigt die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen der Primer sowie der fluorogenen Sonden, welche 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) gelabelt sind (BioTez Berlin GmbH, Berlin, Deutschland). Die qPCR erfolgte unter Verwendung des Mastermixes qPCR BIO Mix Hi-ROX (NIPPON Genetics Europe, Kat.-Nr. PB20.22-51, Düren, Deutschland), wobei HPRT als interne Referenz verwendet wurde. Die Expression der Zielgene wurde nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode mit dem StepOnePlus PCR-System (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) analysiert.

Tab. 1 Oligonukleotid-Sequenzen der analysierten Zielgene mit Gendatenbank-Nr., adaptiert nach (Gustorff et al., 2021).

| | Oligonukleotid-Sequenz 5'-3' | Gendatenbank-Nr. | | Oligonukleotid-Sequenz 5'-3' | Gendatenbank-Nr. |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------|
| AIF | vorwärts rückwärts Sonde | NM_031356.1 | NeuroD2 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_019326.1 |
| | CACAAAGACACTGCAGTTCAGACA AGGTCTGAGCAGACATAGAAAAG AGAAGCATCTATTCCAGCC | | | TCTGGTGTCTCTACGTGCAGA CCTGCTCCGTGAGGAAGTTA TGCCTGCAGCTGAACTCTC | |
| Ascl1 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_022384.1 | Ngn2 | vorwärts rückwärts Sonde | XM_008775262.2 |
| | AACTTCAGTGGCTTCGGGCTA GCCCAGGTTAACTCACTTGA AGCCTTCCACAGCAGCAG | | | AGGCTCAAAGCCAACAACC GATGTAATTGTGGGCGAAGC CTCACGAAGATCGAGACGCT | |
| BDNF | vorwärts rückwärts Sonde | NM_012513.4 | NGF | vorwärts rückwärts Sonde | NM_001277055.1 |
| | TCAGCAGTCAAGTGCCTTTGG CGCCGAAACCTCATAGACATG CCTCCTCTGCTCTTTCTGCTGGAGGAATACAA | | | ACCCAAGCTCACCTCAGTGTCT GACATTACGCTATGCACCTCAGAGT CAATAAAGGCTTTGCCAAGG | |
| Casp3 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_012922.2 | NT-3 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_031073.3 |
| | ACAGTGGAACTGACGATGATATGG AATAGTAACCGGTGCGGTAGA ATGCCAGAAGATACCAGTGG | | | AGAACATCACACGGAGGAAA GGTCACCCACAGGCTCTCA AGAGCATAAGAGTACCAGG | |
| CycD2 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_199501.1 | Pax-6 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_013001.2 |
| | CGTACATGCCAGGATGGT AATTCATGGCAGAGGAAAGAC TGGATGCTAGAGGCTGTGA | | | TCCCTATCAGCAGCAGTTTTCAGT GTCTGTGCGGCCCAACAT CTCCTCCTTACATCGGGTT | |
| GFAP | vorwärts rückwärts Sonde | NM_017009.2 | Prox1 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_001107201.1 |
| | TCTGGACCAGCTTACTACCAACAG TGGTTTCATCTTGGAGCTTCTG AGAGGGACAATCTCACACAG | | | TGCCTTTCCAGGAGCAACTAT CCGCTGGCTTGAAAACCTG ACATGAACAAAAACGGTGGC | |
| Hes5 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_024383.1 | Sox2 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_001109181.1 |
| | ATGCTCAGTCCCAAGGAGAA TAGTCTGGTGCAGGCTCTT CCCAACTCCAACTGGAGAA | | | ACAGATGCAGCCGATGCA GGTGCCCTGCTGCGAGTA CAGTACAACTCCATGACCAG | |
| HPRT | vorwärts rückwärts Sonde | NM_012583.2 | Slc1a3 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_001289942.1 |
| | GGAAAGAACGCTTGTATTGTGAA CCAACACTTCGAGAGGTCCTTTT CTTCTCTGGTCAAGCAGTACAGCCCC | | | CCCTGCCATCACTTTCAAG GCGGTCCCATCCATGTTAA CTGGAAGAAAACAATGGTGTGG | |
| IL-1α | vorwärts rückwärts Sonde | NM_017019.1 | Tbr1 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_001191070.1 |
| | GAAGATGACCTGGAGGCCATAG TCCTGCTTGACGATCCTTATCA AAGAGACCATCCAACCCAGA | | | TCCCAATCACTGGAGTTTCA GGATGCATATAGACCCGGTTTC AAATGGGTTCTTGTGGCAA | |
| IL-1β | vorwärts rückwärts Sonde | NM_031512.2 | Tbr2 | vorwärts rückwärts Sonde | XM_006226608.2 |
| | CTCCACCTCAATGGACAGAACA CACAGGGATTTTGTCTGTGCT CTCCATGAGCTTTGTACAAG | | | ACGCAGATGATAGTGTTCAGTCT ATTCAAGTCTCCACACCATCCT CACAAATACCAACCTCGACT | |
| NeuroD1 | vorwärts rückwärts Sonde | NM_019218.2 | TNFα | vorwärts rückwärts Sonde | NM_012675.3 |
| | TCAGCATCAATGGCAACTTC AAGATTGATCCGTGGCTTTG TTACCATGCACTACCCTGCA | | | CCCCAATCTGTGCTTCTAAC CGTCTCGTGTGTTTCTGAGCAT TAGAAAGGAATTGTGGCTC | |

2.4 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Marker genutzt: 4'-6-Diamidino-2-Phenylidol (DAPI), Nestin, neurogene Differenzierung 1 (NeuroD1), neuronales Zellkern-Antigen (*neuronal nuclei antigen*, NeuN) und *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) (Gustorff et al., 2021).

Die in Paraffin eingebetteten Gehirne wurden seriell in 5 µm dicke koronare Schnitte geschnitten und auf Super-Frost-Plus-beschichtete Objektträger gebettet (Menzel, Braunschweig, Deutschland). Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Roti-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) getaucht. Danach wurden die Paraffin-fixierten Gewebsschnitte in wässriger Lösung mit absteigender Ethanolkonzentration rehydriert (je 3 min bei 100%, 100%, 90%, 80%, 70%). Die Schnitte wurden in Citratpuffer (pH 6,0) für 10 min bei 600 W in der Mikrowelle fixiert. Ziel dieses Schrittes war die Demaskierung von intrazellulär gelegenen Epitopen. Nach dreißigminütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte dreifach für die NeuN/DAPI- sowie Nestin/PCNA/DAPI-Färbung in PBS für die NeuroD1/PCNA/DAPI-Färbung in Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) getaucht. Dann wurde für 1 h Blockierungslösung auf die Objektträger aufgetragen. Für die NeuN/DAPI- sowie Nestin/PCNA/DAPI-Färbung wurde 3% Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA), 0,2% TX-100 in PBS, für die NeuroD1/PCNA/DAPI-Färbung 5% BSA, 0,5% Tx-100 in TBS verwendet. Nach nochmaligem Waschen mit PBS bzw. TBS wurde der primäre Antikörper aufgetragen und über Nacht bei 4 °C belassen.

Die primären Antikörper waren monoklonales Maus-anti-Ratten-NeuN IgG (Merck Millipore, Kat.-Nr. MAB377, Darmstadt, Deutschland) verdünnt 1:200 in Antikörperträger (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA), polyklonales Ziegen-anti-Ratten-Nestin IgG (R&D, AF2736, Minneapolis, USA) verdünnt 1:20 in Antikörperträger sowie monoklonales Maus-anti-Ratten-PCNA IgG (abcam, ab29, Cambridge, UK) verdünnt 1:1000 in Antikörperträger, oder monoklonales Maus-anti-Ratte-NeuroD1 IgG (abcam, ab60704) verdünnt in 1:200 Antikörperträger und polyklonales Kaninchen-anti-Ratte-PCNA IgG (abcam, ab152112) verdünnt 1:50 in Antikörperträger.

Vor Auftragen des sekundären Antikörpers wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Für die NeuN/DAPI-Färbung wurde als sekundären Antikörper Ziegen-anti-Mause-IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Walham, MA, USA, 11029,

Rockford, IL, USA) verdünnt 1:200 in Antikörperträger appliziert und für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Für die Nestin/PCNA/DAPI-Färbung wurde Esel-anti-Ziege Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, Scientific, Walham, MA, USA, A11055) verdünnt 1:200 in Antikörperträger für 4 h aufgetragen, sowie nach dreimaligem Waschen mit PBS Ziegen-Anti-Maus Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, Walham, MA, USA, A11032) verdünnt 1:200 in Antikörperträger für 1 h.

Für die NeuroD1/PCNA/DAPI-Färbung wurde statt mit PBS zunächst dreimal mit TBS gewaschen und dann als sekundären Antikörper Ziege-Anti-Maus Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A11029) verdünnt 1:200 in Antikörperträger für 2 h aufgetragen. Danach wurden die Schnitte dreimal mit TBS gewaschen, bevor Ziege-Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A11037) verdünnt 1:200 in Antikörperträger für 1 h appliziert wurde. DAPI (Sigma-Aldrich, #32670, Taufkirchen, Deutschland) verdünnt 1:1000 in PBS wurde für 10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für NeuN/DAPI-Färbung und Nestin/PCNA/DAPI-Färbung, bzw. TBS für NeuroD1/PCNA/DAPI-Färbung wurden die Schnitte in Shandon Immu-Mount (Thermo-Fisher Scientific, Walham MA, USA) eingebettet und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Zur Mikroskopie der Schnitte wurden das Keyence compact Fluoreszenzmikroskop BZ 9000 und die BZ-II Viewer Software (Keyence, Osaka, Japan) verwendet. Mit 10x Objektiven wurde aufgenommen und automatisch Aufnahmen für jede Rot-Grün-Blau-Farbe (RGB) erstellt. Belichtungszeit sowie Parameter für Kontrast und Helligkeit wurden konstant gehalten. Mittels Adobe Photoshop Software (Adobe Photoshop CS3 Extended) wurden die Bilder analysiert. Die untersuchte Region bestehend aus Hilus, GCL und SGZ des DG wurde in der DAPI-Aufnahme bei zehnfacher Vergrößerung in Adobe Photoshop identifiziert, ein imaginärer Schnitt am Beginn der CA3-Region gesetzt und in der 40-fachen Vergrößerung manuell die Zahl fluoreszierender Zellen ausgewertet. Dies wurde an bis zu vier Schnitten pro Tier für jede Färbung ausgewertet. Um die doppelt- bzw. dreifachgefärbten Schnitte übereinander zu sehen, wurde die „Merge Channel“-Funktion des Programms verwendet (in Abbildungen mit „merge“ gekennzeichnet). Doppeltgefärbte Zellen wurden in dieser Darstellung übereinandergelegter Abbildungen identifiziert. Die Analyse erfolgte zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit durch zwei unabhängige Mitarbeiter. Es wurde der Mittelwert für alle Schnitte desselben Tieres gebildet und zum Vergleich der Versuchsgruppen aus mit GABA-Rezeptorantagonisten

behandelten Tieren versus Kontrollen herangezogen. Es wurden repräsentative Bilder für jede Versuchsgruppe ausgewählt und an diesen eine Hintergrundminimierung mittels Black Balance mit gleicher Einstellung für alle Bilder durchgeführt.

2.5 Statistik

Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurde eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA), basierend auf einer nicht Gauß'schen Verteilung mit Kruskal-Wallis Test oder basierend auf der Annahme ungleicher Varianzen in den Gruppen mit dem Brown-Forsythe Test durchgeführt. Abhängig von der gewählten ANOVA wurden daraufhin die multiplen Vergleiche von Mittelwerten mittels Bonferroni, Dunn oder Dunnett T3 *post hoc* Test durchgeführt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen und Grafiken wurden mit der Software GraphPad Prism 8.0 durchgeführt und erstellt (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) (Gustorff et al., 2021).

3. Ergebnisse

3.1 GABA_B-Rezeptorblockade beeinflusst neuronale Stammzellen

Mittels Nestin-Färbung und der Ko-Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA (siehe Abb. 2) wurden frühe Vorläuferzellen und die bei weiterer Differenzierung entstehenden intermediären Vorläuferzellen vom Typ-2a- und Typ-2b quantifiziert.

Die Gabe des GABA_B-Rezeptorantagonisten CGP führte in der mittleren Dosierung (2 mg/kg) zu einer signifikanten Verminderung Nestin-positiver Zellen (siehe Abb. 3b). Durch Gabe des GABA_A-Rezeptorantagonisten DMCM kam es zu keiner signifikanten Änderung der Nestin-positiven Vorläuferzellen. Außerdem zeigten sich mit der deutlich verminderten Expression von proliferierenden Nestin/PCNA-doppelt positiven Zellen in der höchsten Dosierung von CGP (10 mg/kg) (siehe Abb. 3b) Hinweise auf eine von GABA_B-Rezeptorblockade besonders betroffenen Subpopulation proliferierender Nestin-positiver Zellen. Die Neurogenese ist somit auf Ebene der frühen Vorläuferzellen durch fehlende GABAerge Transmission über den metabotropen Rezeptor gestört worden. Passend dazu zeigte sich eine Verminderung der Expression des neuronalen Stammzellmarkers *Pax6* (siehe Abb. 5a). Dieser Transkriptionsfaktor wird von NSCs und einigen intermediären Vorläuferzellen exprimiert (Hevner, 2019). Typ-1-Zellen in der SGZ exprimieren die Transkriptionsfaktoren *Sox2* und *Hes5* (Lugert et al., 2010). Die Expression beider Marker blieb durch GABA-Rezeptorblockade unverändert (siehe Abb. 4)

GABA_B-Rezeptorblockade ließ die Expression der astrozytären Marker *GFAP* und *Sc11a3* unbeeinflusst (siehe Abb. 5b und c). Es zeigt sich somit primär eine Reaktion insbesondere der Vorläuferzellen neuronaler, und nicht astrozytärer, Zellen auf eine GABA_B-Rezeptorblockade.

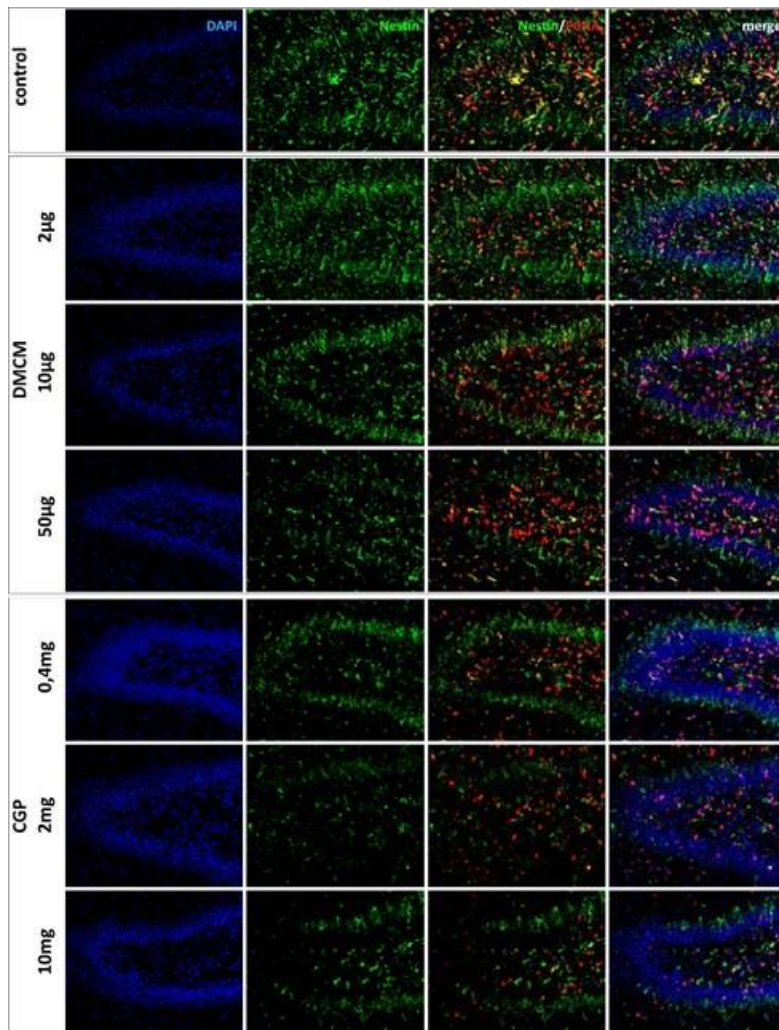


Abb. 2 Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte von Ratten (P11) der Kontrollgruppe (control, NaCl 0,9%), nach DMCM-Applikation mit Dosierungen von je 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg, oder nach CGP-Applikation mit Dosierungen von je 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg gefärbt mit DAPI, Nestin, Ko-Färbung Nestin/PCNA und Fusionsaufnahme der Färbungen (merge). Aus (Gustorff et al., 2021).

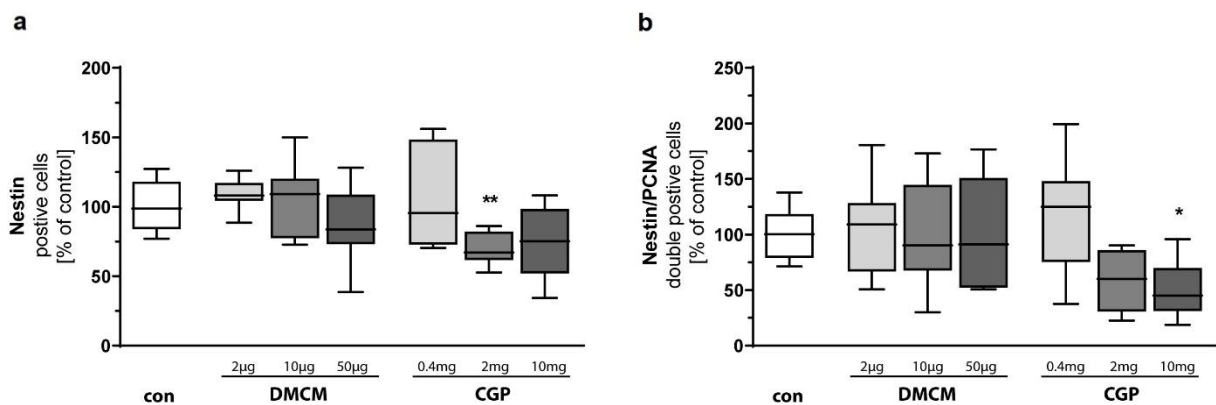


Abb. 3 Nestin-positive neuronale Stammzellen (NSCs) sind nach Applikation von 2 mg CGP und proliferierende Nestin/PCNA-doppelt positive Zellen sind nach 10 mg CGP signifikant vermindert. Quantifizierung **a**) Nestin-positiver NSCs und **b**) Nestin/PCNA doppelt positive Zellen zum Zeitpunkt P11, mit DMCM in den Dosierungen 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg behandelte Tiere und mit CGP in den Dosierungen 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg behandelte Tiere wurden mit den Kontrollgruppen (100%, weiß) verglichen. Gezeigt sind Mediane \pm SEM, n=10 pro Gruppe. Absolute Zellzahlen sind für 100% Nestin positive Zellen 83,5 Zellen und für 100% Nestin/PCNA positive Zellen 13,3 Zellen. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. Kontrollen (one-way ANOVA). Aus (Gustorff et al., 2021).

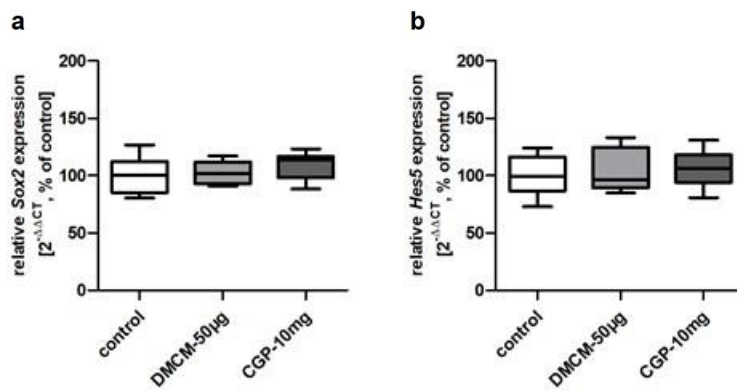


Abb. 4 Die Expression der Transkriptionsfaktoren a) *Sox2*, b) *Hes5* ist nicht durch GABA-Rezeptorblockade beeinflusst. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression nach Behandlung mit DMCM 50 µg/kg oder CGP 10 mg/kg mit Kontrolltieren (weiß, 100%). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane \pm SEM, n=9-10. one-way ANOVA. Adaptiert aus (Gustorff et al., 2021).

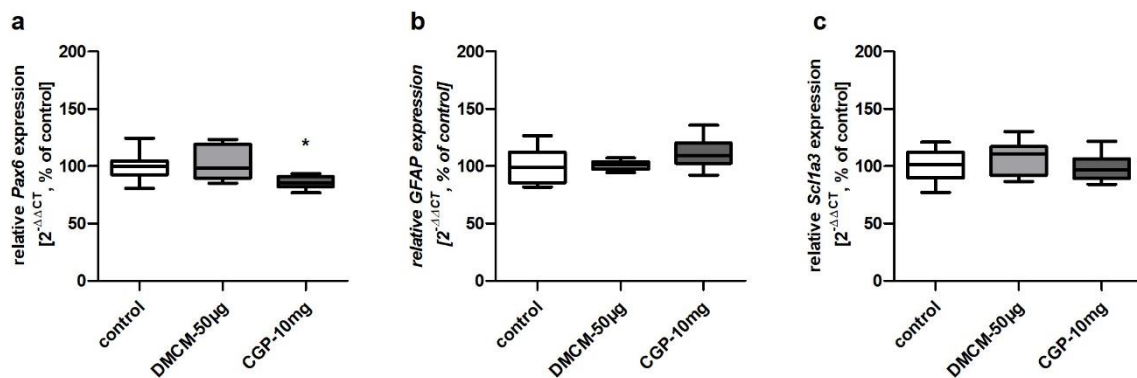


Abb. 5 Die Expression a) des Transkriptionsfaktoren *Pax6* ist durch GABA_B-Rezeptorblockade vermindert und die astrozytären Transkriptionsfaktoren b) *GFAP* und c) *Scf/a3* sind nicht durch GABA-Rezeptorblockade beeinflusst. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression nach Behandlung mit DMCM 50 µg/kg oder CGP 10 mg/kg mit Kontrolltieren (control, 0,9% NaCl). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane \pm SEM, n=9-10. *p<0,05 vs. Kontrollen (Brown-Forsythe Test für GFAP, one-way ANOVA für Pax6 und Scf/a3). Adaptiert aus (Gustorff et al., 2021).

3.2 GABA_B-Rezeptor-Antagonisierung vermindert intermediäre Vorläuferzellen

Intermediäre Vorläuferzellen vom Typ-3 zeichnen sich durch die steigende Expression und damit immunhistochemische Identifikation mittels Färbung von NeuroD1 aus (Roybon et al., 2009; Perez-Dominguez et al., 2018). Typ-3-Zellen sind weniger proliferativ als Typ-2-Zellen und in der Lage sich zu unreifen, postmitotischen Neuronen weiterzuentwickeln (Nicola et al., 2015). Für das Überleben postmitotischer Neurone und ihre weitere Differenzierung zu reifen Neuronen ist *NeuroD1* nötig (Perez-Dominguez et al., 2018).

Es zeigten sich deutliche Effekte einer GABA_B-Rezeptorblockade in der Quantifizierung der Intermediären Vorläuferzellen mittels NeuroD1-Färbung (siehe Abb. 6). In allen mit CGP behandelten Versuchsgruppen waren NeuroD1-positiver Zellen signifikant

vermindert (siehe Abb. 7a). Die Zahl proliferierender, NeuroD1/PCNA-doppeltpositiver Zellen war nach Applikation der höchsten Dosis CGP signifikant vermindert (siehe Abb. 7b). DMCM hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zellzahl NeuroD1-positiver Zellen (siehe Abb. 7). Die gleichzeitig verminderte Expression von NeuroD1 und *Ascl1* unterstützt dieses Ergebnis auf Ebene der RNA-Expression (siehe Abb. 8).

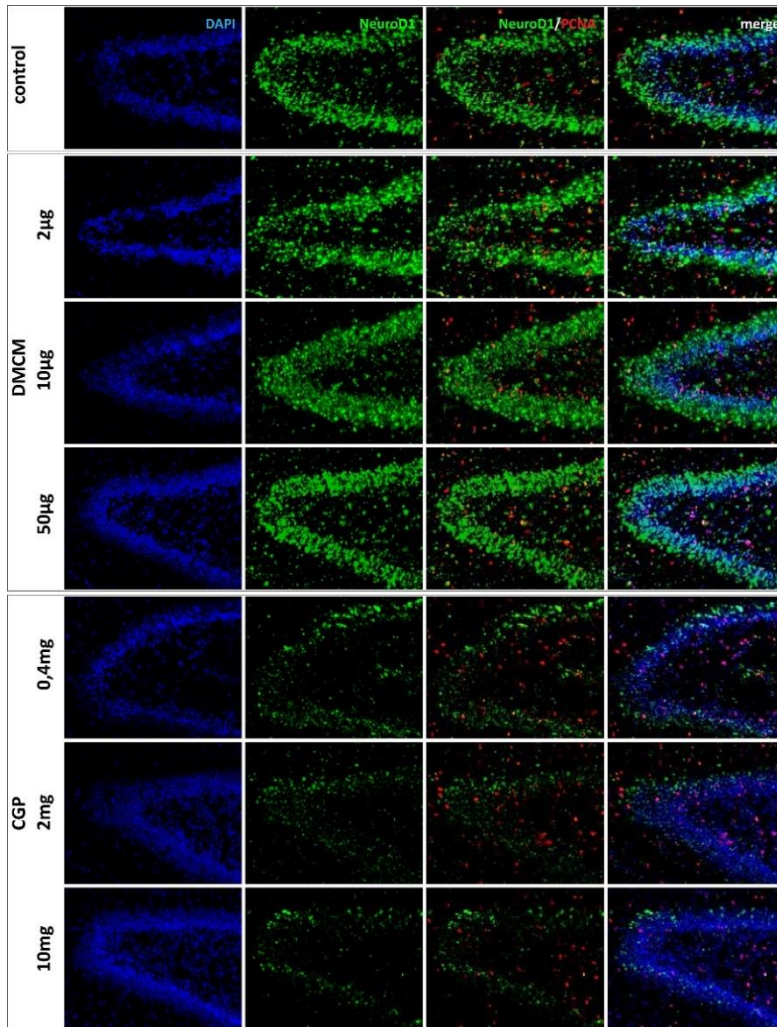


Abb. 6 Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte von Ratten (P11) entweder der Kontrollgruppe (control, NaCl 0,9%) nach DMCM-Applikation mit Dosierungen von je 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg, oder nach CGP-Applikation mit Dosierungen von je 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg gefärbt mit DAPI, NeuroD1, Ko-Färbung NeuroD1/PCNA und Fusionsaufnahme der Färbungen (merge). Aus (Gustorff et al., 2021).

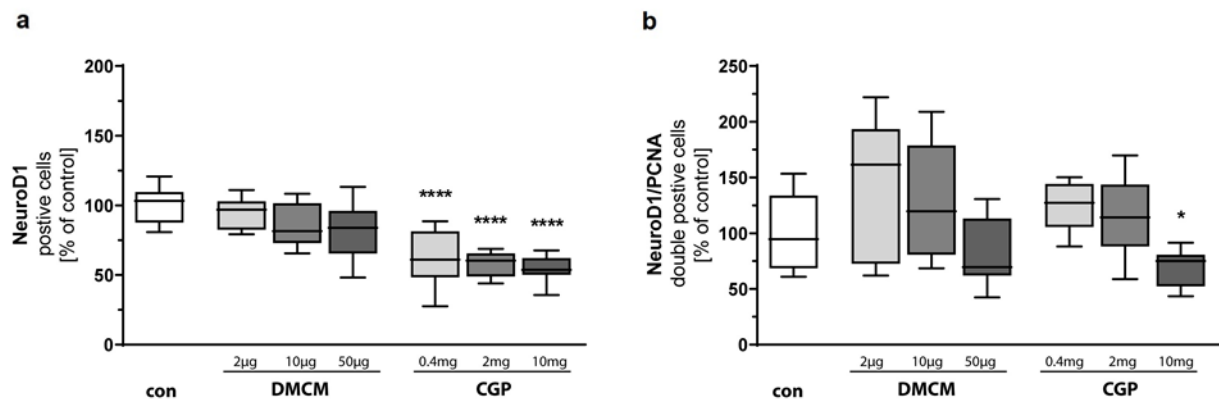


Abb. 7 NeuroD1-positive Zellen sind nach CGP-Applikation vermindert und proliferierende Subpopulation bei höchster Dosis reduziert. Quantifizierung a) NeuroD1-positiver Zellen und b) NeuroD1/PCNA doppelt positiver Zellen zum Zeitpunkt P11, mit DMCM in den Dosierungen 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg behandelte Tiere und mit CGP in den Dosierungen 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg behandelte Tiere wurden mit den Kontrollgruppen (100%, weiß) verglichen. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=10 pro Gruppe. Absolute Zellzahlen sind für 100% NeuroD1-positiver Zellen 308,9 Zellen und für 100% NeuroD1/PCNA-positiver Zellen 7,7 Zellen. *p<0,05 und ****p<0.0001 vs. Kontrollen (one-way ANOVA für NeuroD1, Brown-Forsythe-Test für NeuroD1/PCNA). Aus (Gustorff et al., 2021).

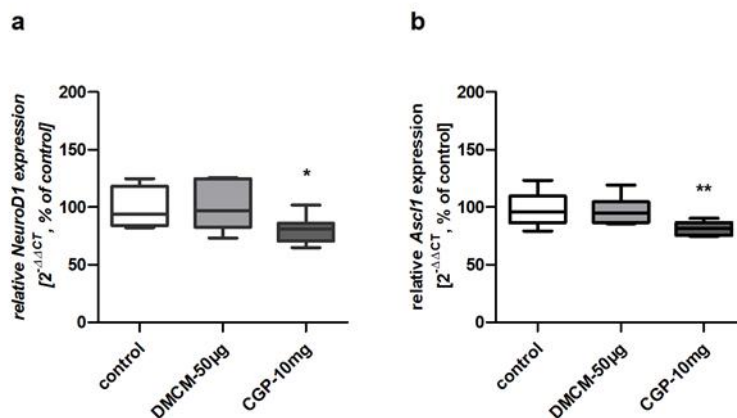


Abb. 8 Expression der Transkriptionsfaktoren a) *NeuroD1* und b) *Ascl1* ist durch GABA_B-Rezeptorblockade vermindert exprimiert. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression nach Behandlung mit DMCM 50 µg/kg (grau) oder CGP 10 mg/kg (schwarz) mit Kontrolltieren (weiß). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=9-10. *p<0,05 und **p<0,01 vs. Kontrollen (Kruskal-Wallis Test für NeuroD1, one-way ANOVA für Ascl1). Adaptiert aus (Gustorff et al., 2021).

Weitere Marker für intermediäre Vorläuferzellen, *Tbr2*, ein Marker für Typ-2-Zellen (Hevner, 2019) sowie *Ngn2*, besonders exprimiert in Typ-2a-Zellen (Perez-Dominguez et al., 2018), waren durch Applikation des GABA_B-Rezeptorantagonisten in ihren Expressionsniveaus nicht signifikant verändert (siehe Abb. 9). Eine GABA_A-Rezeptorblockade führte zu keinen Veränderungen in der Expression von *NeuroD1*, *Ascl1* und *Ngn2* (siehe Abb. 8 und Abb. 9). Mit DMCM behandelte Tiere zeigten eine signifikante Überexpression von *Tbr2* (siehe Abb. 9).

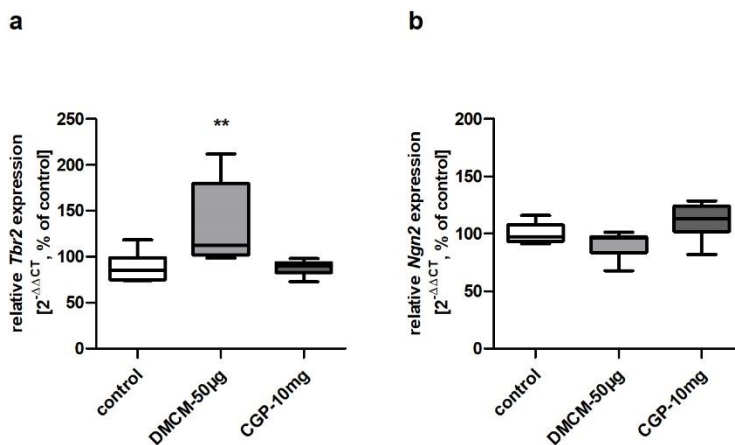


Abb. 9 Die Expression der Transkriptionsfaktoren **a)** *Tbr2* und **b)** *Ngn2* ist durch GABA_B-Rezeptorblockade unverändert. GABA_A-Rezeptorantagonist DMCM führt zu vermehrter *Tbr2*-Expression. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression im Hirngewebe von Ratten nach Behandlung mit DMCM 50 µg/kg oder CGP 10 mg/kg mit Kontrolltieren (weiß). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=9-10. **p<0,01 vs. Kontrollen (one-way ANOVA für *Tbr2*, Brown-Forsythe Test für *Ngn2*). Adaptiert aus (Gustorff et al., 2021).

3.3 Postmitotische Neurone weniger von GABA-Rezeptorblockade betroffen

Die Zahl postmitotischer Neurone, die mittels NeuN-Färbung quantifiziert wurde (Vieira et al., 2018), zeigte keine Veränderung durch GABA-Rezeptorblockade zum untersuchten Zeitpunkt mit Versuchstieren im Alter von P11 (siehe Abb. 10 und Abb. 11a). Auf Genexpressionsebene konnten bei mit CGP behandelten Tieren in der verminderten Expression zweier Marker für postmitotische Neurone, *Tbr1* und *NeuroD2* (Hevner, 2019), Hinweise auf einen Einfluss der GABA_B-Rezeptorblockade auch auf postmitotische Neurone gesehen werden. Nach GABA_A-Rezeptorhemmung zeigte sich eine Überexpression von *Tbr1* und keine Änderung im *NeuroD2*-Expressionsniveau (siehe Abb. 12a und b).

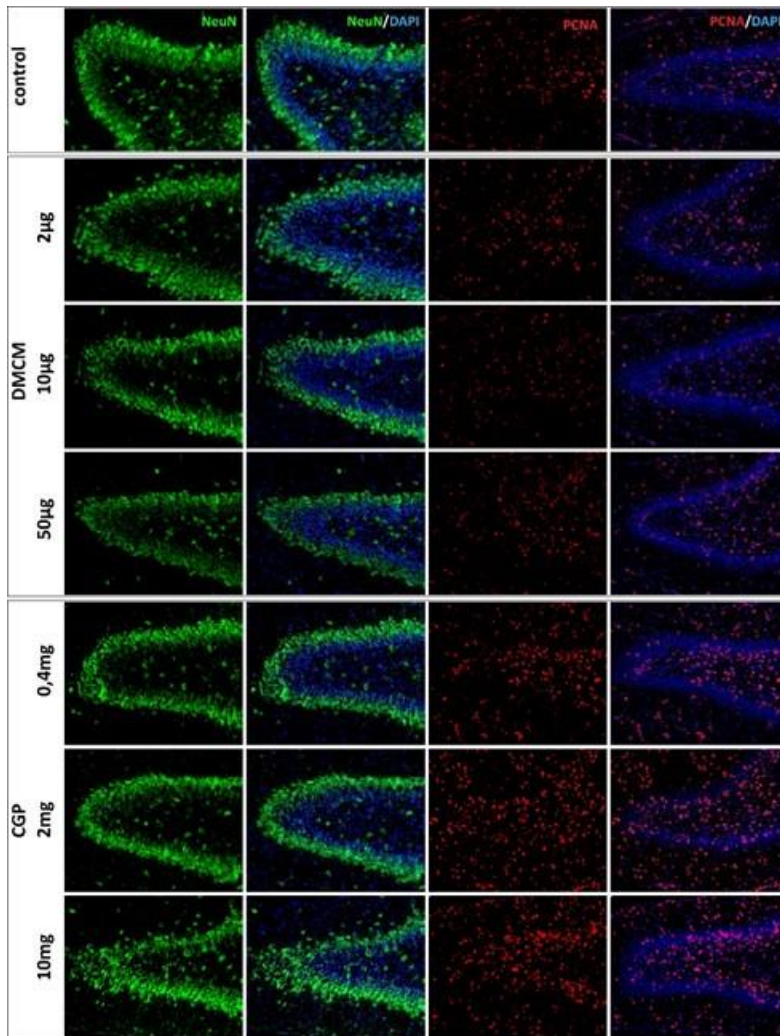


Abb. 10 Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte von Ratten (P11) entweder der Kontrollgruppe (control, NaCl 0,9%), nach DMCM-Applikation mit Dosierungen von je 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg, oder nach CGP-Applikation mit Dosierungen von je 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg gefärbt mit NeuN, Ko-Färbung NeuN/DAPI, PCNA und Ko-Färbung PCNA/DAPI. Aus (Gustorff et al., 2021).

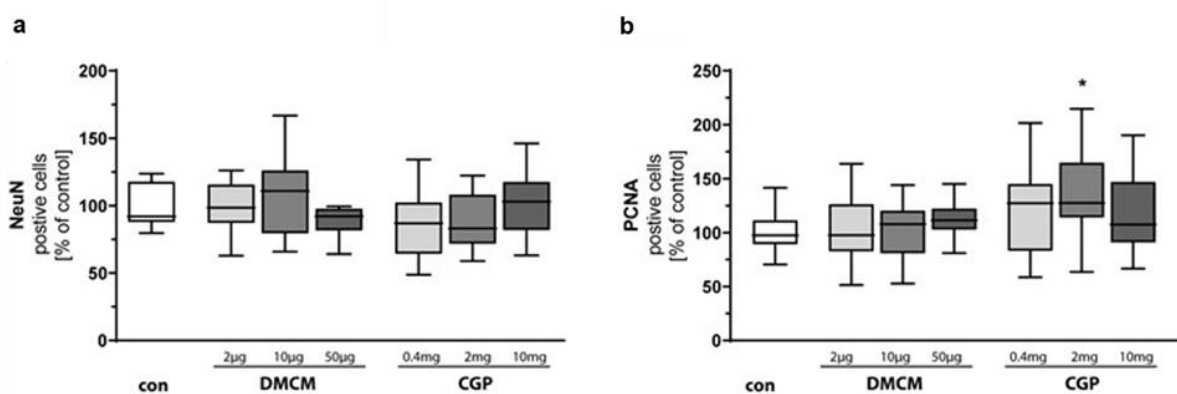


Abb. 11 NeuN-positive postmitotische Neurone nicht durch GABA-Rezeptorblockade beeinflusst. Proliferation nach 2 mg CGP gesteigert. Quantifizierung **a**) NeuN-positiver Zellen und **b**) PCNA-positiver Zellen zum Zeitpunkt P11. Mit DMCM in den Dosierungen 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg behandelte Tiere und mit CGP in den Dosierungen 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg behandelte Tiere wurden mit den Kontrollgruppen (100%, weiß) verglichen. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=10 pro Gruppe. Absolute Zellzahl ist für 100% NeuN-positive Zellen 143,0 Zellen, für 100% PCNA-positive Zellen 81,8 Zellen. *p<0,05 vs. Kontrollen (Brown-Forsythe-Test). Aus (Gustorff et al., 2021).

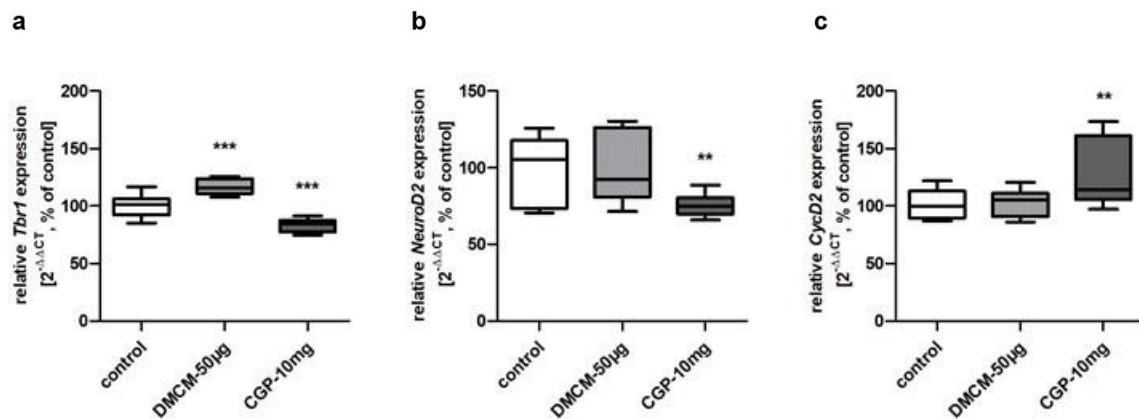


Abb. 12 Expression der Transkriptionsfaktoren **a) *Tbr1***, **b) *NeuroD2*** und **c) *CycD2***. *Tbr1* wird nach GABA_A-Rezeptorblockade mittels DMCM vermehrt, durch GABA_B-Rezeptorblockade mittels CGP vermindert exprimiert. DMCM führt zu unveränderter *Tbr1*-Expression, CGP zu verminderter *Tbr1*-Expression. *CycD2* wird nach GABA_B-Rezeptorblockade vermehrt exprimiert. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels quantitativer qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression im Hirngewebe von Ratten nach Behandlung mit DMCM 50 µg/kg oder CGP 10 mg/kg mit Kontrolltieren (weiß). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=9-10. *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0.001 vs. Kontrollen (one-way ANOVA für *Tbr1*, Brown-Forsythe Test für *NeuroD2* und *CycD2*). Adaptiert aus (Gustorff et al., 2021).

3.4 Hippocampale Proliferationskapazität verändert

Die strenge Regulation der Proliferation von Vorläuferzellen ist essenziell für ein Funktionieren lebenslanger hippocampaler Neurogenese (Berg et al., 2018). Mit Hilfe des endogenen Proliferationsmarkers PCNA wurden die Auswirkungen von GABA-Rezeptorblockade auf die im Hippocampus stattfindende Proliferation quantifiziert (siehe Abb. 10 und Abb. 11b). Die Gabe von 2 mg/kg CGP führte zu einer signifikanten Steigerung der PCNA-positiven Zellen (siehe Abb. 11b). In anderen Dosierungen führte der GABA_B-Rezeptor-Antagonist zwar zu keiner signifikanten Änderung, doch war eine hohe Varianz der Ergebnisse in diesen Gruppen auffällig. DMCM führte zu keiner Änderung der Proliferationskapazität. Allerdings zeigte sich ein Anstieg der Expression des Cyclins *CycD2* in mit CGP behandelten Tieren (siehe Abb. 12c).

3.5 Anzahl postmitotischer Neurone anhaltend nicht verändert

Zum Ausschluss einer erst mit größerer Verzögerung nach GABA-Rezeptorblockade auftretenden Veränderung der Zahl reifer Neurone, wurde eine zusätzliche Quantifizierung der NeuN-positiven Zellen zum Zeitpunkt P15, vier Tage nach letzter Applikation der Antagonisten durchgeführt. Postmitotische Neurone waren auch zum späteren Zeitpunkt, mit Versuchstieren im Alter von P15, nicht durch Gabe eines GABA-Rezeptorantagonisten verändert (siehe Abb. 13).

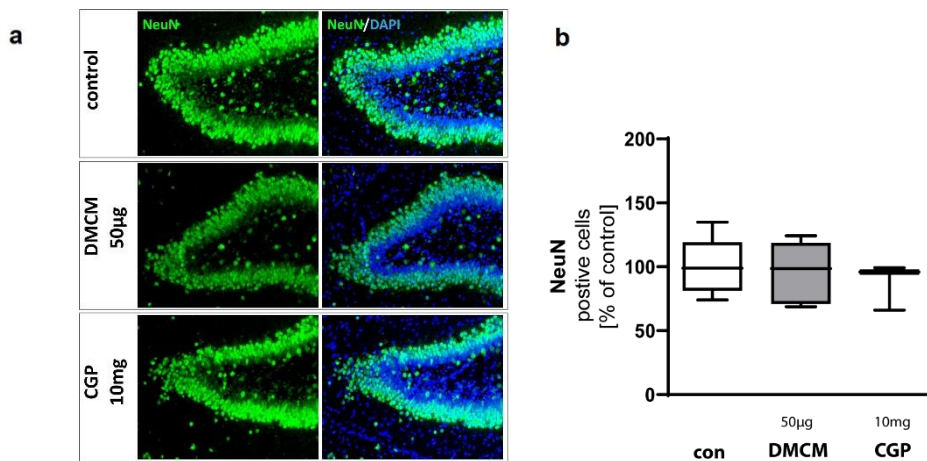


Abb. 13 Postmitotische Neurone sind zum Zeitpunkt P15 nicht signifikant durch GABA-Rezeptorblockade verändert. **a)** Repräsentative hippocampale Paraffinschnitte von neugeborenen Ratten P15 entweder der Kontrollgruppe (control, NaCl 0,9%), nach DMCM-Applikation in der Dosierung 50 µg/kg, oder nach CGP-Applikation in der Dosierung von 10 mg/kg gefärbt mit NeuN, Ko-Färbung NeuN/DAPI. **b)** Quantifizierung NeuN-positiver Zellen zum Zeitpunkt P15, mit DMCM-50 µg behandelte Tiere und mit CGP-10 mg behandelte Tiere wurden mit Kontrollgruppe (100%, con, weiß) verglichen. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=10 pro Gruppe. Absolute Zellzahl für die 100% NeuN positive Zellen ist 187,3. one-way ANOVA. Aus (Gustorff et al., 2021).

3.6 Neurotrophine nach GABA_B-Rezeptorblockade vermindert exprimiert

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) beeinflusst Dendritenwachstum und neuronale Plastizität (Gonçalves et al., 2016). BDNF ist außerdem an der Regulation hippocampaler synaptischer Plastizität beteiligt (Leal et al., 2015). Auch *nerve growth factor* (NGF) und Neurotrophin-3 (NT-3) tragen zur Regulation der hippocampalen Nische bei (Shimazu et al., 2006; Frielingsdorf et al., 2007). Alle drei getesteten Neurotrophine zeigten eine signifikant verminderte Expression in mit GABA_B-Rezeptor-Antagonist behandelten Tieren. GABA_A-Rezeptorblockade führte zu keiner Änderung der Neurotrophin-Expression (siehe Abb. 14).

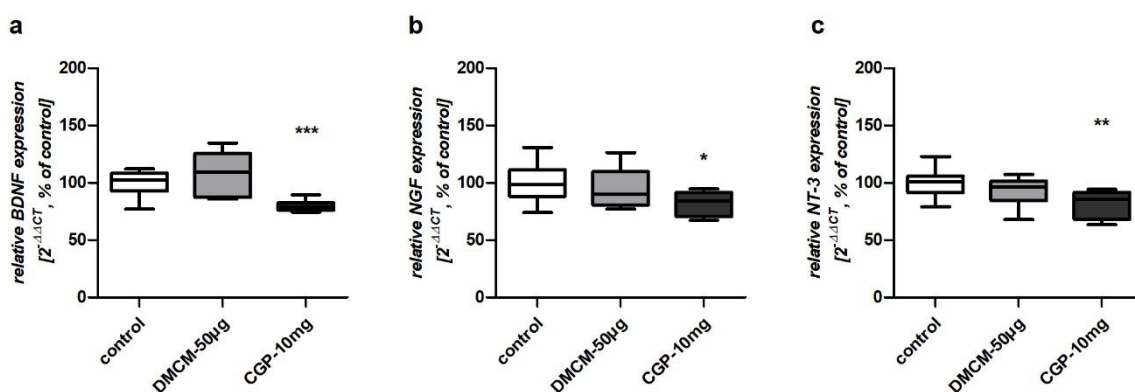


Abb. 14 Die Neurotrophine **a)** *BDNF*, **b)** *NGF* und **c)** *NT-3* sind nach GABA_B-Rezeptorblockade vermindert exprimiert. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression nach Behandlung mit DMCM 50 µg/kg (grau) oder CGP 10 mg/kg (schwarz) mit Kontrolltieren (control, NaCl 0,9%). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=9-10. *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 vs. Kontrollen (Brown-Forsythe Test für *BDNF*, one-way ANOVA für *NGF* und *NT-3*). Aus (Gustorff et al., 2021).

3.7 Marker für Inflammation unter GABA-Rezeptorblockade

GABA-Rezeptorblockade führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expression der Interleukine *IL-1 α* oder *IL-1 β* (siehe Abb. 15a und b). Das proinflammatorische Zytokin *TNF- α* hingegen zeigte eine signifikant gesteigerte Expression in mit GABA-Rezeptor-Antagonisten behandelten Tieren (siehe Abb. 15c). Somit ergab sich kein eindeutiger Hinweis auf eine durch diese Interleukine vermittelte Entzündungsreaktion, die durch die Intervention ausgelöst wurde.

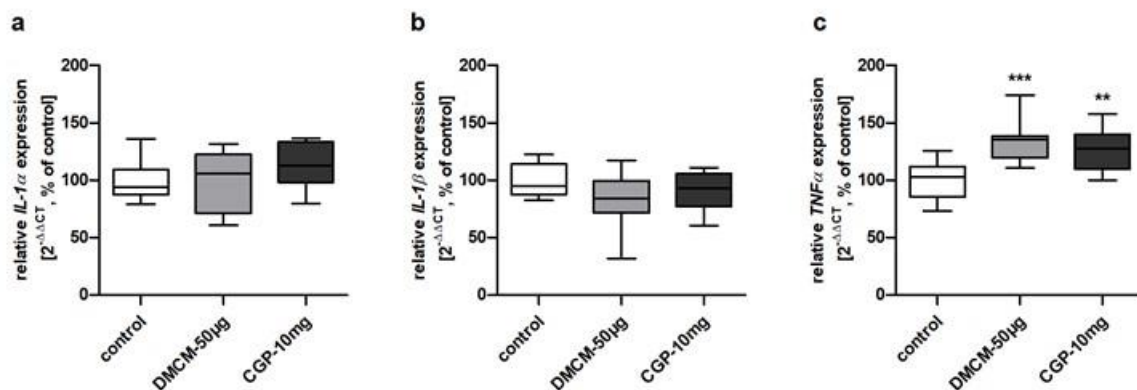


Abb. 15 Die Expression der Interleukine a) *IL-1 α* und b) *IL-1 β* ist durch GABA-Rezeptorblockade unverändert, c) *TNF α* vermehrt exprimiert. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression nach Behandlung mit DMCM 50 μ g/kg oder CGP 10 mg/kg mit Kontrolltieren (control, NaCl 0,9%). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane \pm SEM, n=8-10. **p<0,01 und ***p<0.001 vs. Kontrollen (one-way ANOVA). Eigene Darstellung.

3.8 Kein Hinweis für Apoptose durch GABA-Rezeptorblockade

Die Gabe von GABA-Rezeptorantagonisten führte zu keinem Anstieg der Expression von Apoptosemarkern gemessen in der qPCR. Die Expression der Apoptosemarker *AIF* (Sun et al., 2012) sowie *Casp3* (Park et al., 2010) war unbeeinflusst (siehe Abb. 16a und b). Die Intervention durch eine GABA-Rezeptorblockade lösten somit keine Apoptose aus.

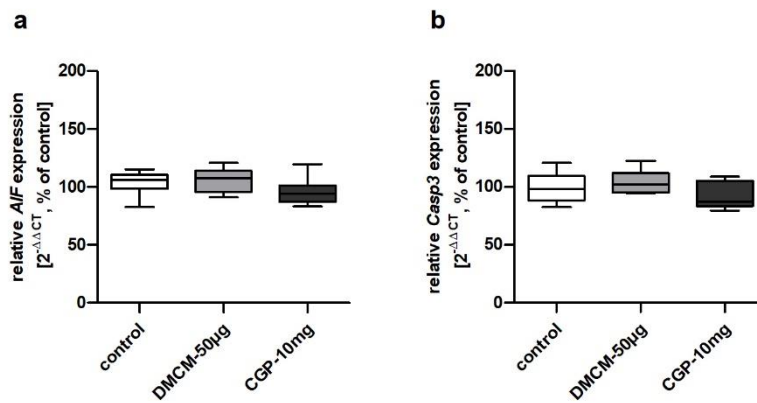


Abb. 16 Das Expressionsniveau der Apoptosemarker a) *AIF* und b) *Casp3* ist durch GABA-Rezeptorblockade unverändert. Die relative mRNA-Expression der Marker wurde mittels qPCR bestimmt. Verglichen wurde die Expression nach Behandlung mit DMCM 50 µg/kg (grau) oder CGP 10 mg/kg (schwarz) mit Kontrolltieren (control, NaCl 0,9%). Balken zeigen die relative mRNA-Quantifizierung basierend auf dem internen Standard HPRT. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=7-10. one-way ANOVA. Adaptiert aus (Gustorff et al., 2021).

In der immunhistochemischen Färbung der Zellkerne mittels DAPI zeigte sich kein Hinweis auf eine Verminderung der Zellzahl im Gyrus dentatus nach der pharmakologischen Intervention (siehe Abb. 17). Die Quantifizierung DAPI-positiver Zellen wich zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander ab.

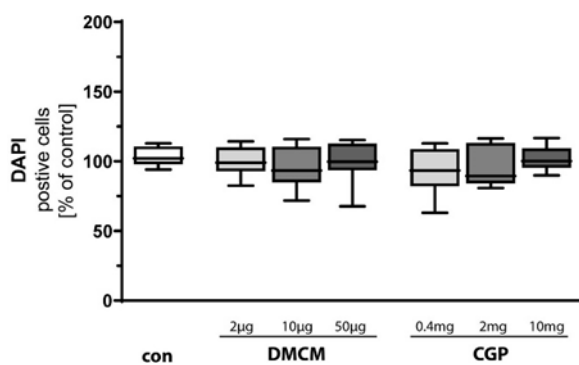


Abb. 17 Zellkernfärbung zeigt unveränderte Zellzahlen nach GABA-Rezeptorblockade. Quantifizierung DAPI-positiver Zellen im DG zum Zeitpunkt P11, mit DMCM in den Dosierungen 2 µg/kg, 10 µg/kg oder 50 µg/kg behandelte Tiere und mit CGP in den Dosierungen 0,4 mg/kg, 2 mg/kg oder 10 mg/kg behandelte Tiere wurden mit Kontrollgruppe (100%, con, weiß) verglichen. Gezeigt sind Mediane ±SEM, n=10 pro Gruppe. Absolute Zellzahl für 100% DAPI-positiver Zellen ist 594,1 Zellen. Brown-Forsythe Test. Adaptiert aus (Gustorff et al., 2021).

4. Diskussion

Mittels der hier vorliegenden in-vivo Experimente wurde am Rattenmodell die Auswirkungen einer pharmakologischen Blockade der GABAergen Transmission zum Zeitpunkt des schnellsten Hirnwachstums auf die Neurogenese im postnatalen Hippocampus untersucht. Hippocampale Neurogenese beschreibt die Prozesse, durch die ausgehend von proliferierenden Stammzellen in der SGZ und der Differenzierung der entstehenden Tochterzellen dem Hippocampus laufend neue Neuronen hinzugefügt werden (Nicola et al., 2015). Zusammenfassend zeigten unsere Daten eine durch GABA_B-Rezeptorblockade mittels CGP ausgelöste Störung in der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu mitotischen unreifen Neuronen, den intermediären Vorläuferzellen. Besonders auffällig war die drastisch verminderte Expression aller getesteten Neurotrophine nach GABA_B-Rezeptorblockade. Außerdem führte die Applikation des GABA_B-Rezeptorantagonisten zu einer veränderten Proliferationskapazität im Hippocampus. Insbesondere die proliferierende Subpopulation intermediärer Vorläuferzellen scheint von GABAerger Transmission über den metabotropen GABA_B-Rezeptor abzuhängen. Die Antagonisierung des ionotropen GABA_A-Rezeptors mittels DMCM führte zu keinen Veränderungen auf zellulärer Ebene. In der Expressionsanalyse war einzig die Expression von *Tbr2* und *Tbr1* nach GABA_A-Rezeptorblockade gesteigert.

Um über einen langen Zeitraum die Proliferationskapazität der NSC im Hippocampus aufrecht erhalten zu können, wird Aktivierung und Proliferation von Stammzellen streng reguliert (Nicola et al., 2015). Bei genauerer Betrachtung der im Hippocampus ansässigen Stammzellen, zeigte sich eine Verminderung Nestin-positiver Zellen nach Applikation des GABA_B-Rezeptorantagonisten in mittlerer Dosierung. Außerdem war bei höchster Dosierung von CGP proliferierende Subpopulation Nestin-positiver Zellen signifikant vermindert. Nestin-positive NSCs vom Typ-1 stellen nicht nur den Ursprung neuronaler Zelllinien dar, auch astrozytäre Zelllinien entspringen Nestin-positiven Vorläuferzellen (Berg et al., 2018) und exprimieren sowohl neuronale als auch astrozytäre Marker (Lugert et al., 2010; DeCarolis et al., 2013; Berg et al., 2018). Die von uns getesteten Marker *GFAP* und *Sc1a3* waren durch GABA-Rezeptorblockade nicht in ihrer Expression verändert. Es kann deshalb bei den in Nestin-positiven Zellen gemessenen Veränderungen von einer Beeinflussung der Vorläufer neuronaler Zelllinien ausgegangen werden.

Die Transkriptionsfaktoren *Hes5* und *Sox2* werden von NSC exprimiert und sind zur Erhaltung der Multipotenz dieser Stammzellen wesentlich (Perez-Dominguez et al., 2018). *Sox2* bewirkt die Aufrechterhaltung der Proliferationskapazität von Typ-1-Zellen (Perez-Dominguez et al., 2018). *Hes5* ist direkt von *Sox2* abhängig und selbst in der Lage neuronale Differenzierung zu hemmen (Perez-Dominguez et al., 2018). Beide Transkriptionsfaktoren, *Sox2* und *Hes5*, waren von der GABA-Rezeptorblockade unbeeinflusst. Diese Beobachtung passt zu der These, dass Nestin-positive Vorläuferzellen nicht insgesamt durch GABA-Rezeptorblockade beeinträchtigt waren. Möglicherweise ist nur die stark proliferierende Subpopulation aktivierter Typ-1-Zellen unter GABA_B-Rezeptorblockade verändert.

Im Laufe weiterer neuronaler Differenzierung exprimieren die entstehenden intermediären Vorläuferzellen vermehrt *NeuroD1* (Hevner, 2019). Die Färbung *NeuroD1*-positiver Zellen zeigte nach Applikation von GCP in allen Gruppen signifikant verminderte Zellzahlen. Auch die proliferierende Subpopulation *NeuroD1/PCNA*-doppelt positiver Zellen war betroffen. Die temporäre Blockade GABAerger Transmission über metabotrope Rezeptoren scheint somit auf Ebene der intermediären Vorläuferzellen einen Reifungsstopp ausgelöst und die weitere Differenzierung gehemmt zu haben.

Die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen wird durch die kontrollierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in, teils noch ungeklärten Kaskaden, bestimmt. Hevner et al. beschreiben in ihrem Review die für die Differenzierung von NSC über intermediäre Vorläuferzellen zu postmitotischen Neuronen beteiligten Transmitterkaskaden. Dabei wird demnach aufeinander aufbauend und voneinander abhängig *Pax6*, *Tbr2* und *Tbr1*, sowie *NeuroD1* und *Prox1* vermehrt exprimiert (Hevner, 2019). Als wesentlich in der Differenzierung von intermediären Vorläuferzellen zu postmitotischen Neuronen ist für die adulte Neurogenese im Hippocampus eine sequenzielle Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *Pax6*, *Ngn2*, *Tbr2*, *NeuroD1*, *Prox1* bereits beschrieben worden (Perez-Dominguez et al., 2018). Die von uns durchgeführte Expressionsanalyse im postnatalen Gehirn zeigte eine verminderte Expression der Transkriptionsfaktoren *Pax6*, *Tbr1*, sowie *NeuroD1* und *Prox1* nach Hemmung der GABAergen Transmission über den GABA_B-Rezeptor. Passend zu den zellulären Daten scheinen somit auch auf Ebene der Expression von Transkriptionsfaktoren wesentliche Schritte in der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen im Stadium der intermediären Vorläuferzellen durch GABA_B-Rezeptorblockade gestört.

Auf Ebene der postmitotischen Neurone zu den Zeitpunkten P11 und P15 wurde keine Veränderung gemessen. Dennoch gaben die Ergebnisse der Expressionsanalyse Hinweise auf eine Beeinträchtigung auch dieser Neurone nach GABA_B-Rezeptorblockade. Reifende postmitotische Neurone zeichnen sich durch die verminderte Expression von *Tbr2* und die Hochregulation von *Tbr1*, *Prox1* und *NeuroD2* aus (Gonçalves et al., 2016). *Tbr1* ist als spezifischer Marker für postmitotische kortikale Projektionsneurone bekannt (Hevner, 2019) und war nach GABA_B-Rezeptorblockade signifikant vermindert. Genauso betroffen waren *Prox1* und *NeuroD2*, die am Ende der Kaskade von Transkriptionsfaktoren zur Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen stehen und postmitotische reifende Neurone entstehen lassen (Gonçalves et al., 2016; Hevner, 2019). Die Daten dieser Arbeit zeigten passend zu Veränderungen auch auf Ebene der postmitotischen Neurone eine verminderte Expression von *Tbr1* und *NeuroD2* nach GABA_B-Rezeptorblockade.

Die gestörte Proliferation Nestin- und NeuroD1-positiver Vorläuferzellen könnte Ausdruck einer verzögerten Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen nach GABA_B-Rezeptorblockade sein. Die Gesamtzahl der PCNA-positiven Zellen war allerdings nicht betroffen. Die gesamte Proliferationskapazität im Hippocampus ist nicht automatisch gleichzeitig zur verminderten Proliferation von Subpopulationen verändert. Im Gegenteil, es zeigte sich eine signifikante Induktion der Proliferationskapazität im DG nach Applikation von CGP in mittlerer Dosierung und eine auffallend große Streuung der Ergebnisse in den beiden weiteren Versuchsgruppen mit CGP-Applikation. Die Induktion der Expression des Cyclins *CycD2* trat passend zur vermehrten Proliferation unter GABA_B-Rezeptorblockade auf.

In einem Tiermodell zur Erforschung der akuten zerebralen Ischämie konnten Song et al. eine durch GABA_B-Rezeptorantagonisten ausgelöste gesteigerte hippocampale Proliferation und neuronale Differenzierung zeigen (Song et al., 2021). Auch Giachino et al. berichten in einem Tiermodell mit adulten Mäusen einen Anstieg des Anteils aktivierter Stammzellen nach GABA_B-Rezeptorblockade bei gleichbleibend großer Stammzellpopulation (Giachino et al., 2014).

Gleichzeitig zur gesteigerten Proliferation war die Expression von *Ascl*, einem in der Aktivierung von NSCs beteiligten Transkriptionsfaktor, herunterreguliert. *Ascl* erfüllt in der Regulation der Differenzierung NSCs eine duale Funktion. Arbeiten im adulten Hippocampus zeigten, dass die Expression von *Ascl* Voraussetzung für die Aktivierung ruhender NSCs ist (Andersen et al., 2014). Gleichzeitig ist der Transkriptionsfaktor für

den Ausstieg von Tochterzellen aus dem Zellzyklus und die Förderung der Differenzierung durch Aktivierung proneuronaler Transkriptionsfaktoren, wie *NeuroD1*, verantwortlich (Vasconcelos und Castro, 2014). Die zwei entgegengesetzten Funktionen von *Ascl* sind nach dem Modell von Vasconcelos et al. abhängig von dem periodisch ansteigenden und abfallenden Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors. Knock-out-Experimente, die im Gegensatz zu unseren Daten eine Verminderung der *CyclinD2*-Expression durch vermindertes bzw. fehlendes *Ascl* sahen (Andersen et al., 2014), erfassen diese duale Funktion nicht. Genauso sind unsere Daten durch die Messung der *Ascl*-Expression zu einem einzigen Zeitpunkt limitiert. Die verminderte Expression von *Ascl* sowie von *Pax6* ist allerdings trotz dieser Limitation aufschlussreich. *GABA_B*-Rezeptorblockade war in der Lage mit *Ascl* und *Pax6*, sowie dem von ihnen direkt abhängigen *NeuroD1* (Hevner, 2019), wesentliche Transkriptionsfaktoren in der neuronalen Differenzierung von NPCs zu intermediären Vorläuferzellen zu hemmen.

Es zeigten sich für alle analysierten Neurotrophine verminderte Expressionsniveaus nach Blockade des *GABA_B*-Rezeptors. Neurotrophine konnten bereits als wichtige Modulatoren der hippocampalen Neurogenese und Plastizität identifiziert werden (Frielingsdorf et al., 2007; Gonçalves et al., 2016). In Arbeiten an kultivierten hippocampalen Schnitten postnataler Mäuse führte die Gabe von GABA zur gesteigerten NGF-Sekretion, wobei dieser Effekt nicht vom ionotropen *GABA_A*-Rezeptor abhing (Ben-Yaakov und Golan, 2003). Möglicherweise deutet bereits diese Arbeit von Ben-Yaakov et al., genauso wie die von uns hier in-vivo beobachtete Verminderung der *NGF*-Expression nach CGP-Gabe auf eine Abhängigkeit des Neurotrophins von *GABA*erger Transmission über metabotrope Rezeptoren im postnatalen Gehirn.

Die Ergebnisse stehen im Kontrast zu vorliegenden Daten aus adulten 12-16 Wochen alten Wistar-Ratten von Heese et al., wonach CGP zu einem Anstieg der Neurotrophine, NGF, NT-3 und BDNF im Hippocampus führte (Heese et al., 2000). Möglicherweise handelt es sich bei der unterschiedlichen Reaktion der Neurotrophin-Expression auf *GABA_B*-Rezeptorblockade um einen wesentlichen Unterschied zwischen Prozessen im postnatalen und denen im adulten Gehirn.

In kultivierten hippocampalen Schnitten postnataler Mäuse zum Zeitpunkt P5 konnten Salmon et al. bei Blockade depolarisierender *GABA*erger Transmission mittels *GABA_A*-Rezeptorantagonisten eine signifikant erhöhte Expression von BDNF feststellen (Salmon et al., 2020). Dieses Ergebnis konnte für die Ratte zum Zeitpunkt P11 nicht reproduziert

werden. Die Daten zeigen keinen Hinweis auf eine Abhängigkeit der *BDNF*-Expression von GABA_A-Rezeptorblockade in dem hier verwendeten Tiermodell.

BDNF scheint den Wechsel von GABA_As depolarisierender Wirkung hin zur Rolle als hauptsächlich hyperpolarisierender Neurotransmitter zu beschleunigen (Peerboom und Wierenga, 2021). So sind bereits mehrere Interaktionen von *BDNF* mit der Expression von für die im sich entwickelnden Gehirn depolarisierende Wirkung von GABA verantwortlichen KCC2-Kanälen bekannt (Schulte et al., 2018). Die hier beobachtete verminderte *BDNF*-Expression unter GABA_B-Rezeptorblockade eröffnet Fragen in Hinblick auf die genaue wechselseitige Beeinflussung und Abhängigkeit zwischen GABA_Aerger Transmission und der Wirkung des Neurotrophins. Die Daten deuten auf eine Interaktion, die möglicherweise primär über den metabotropen GABA-Rezeptor erfolgt. Zum besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen einer gestörten GABA_Aerger Transmission und veränderter Neurotrophin-Ausschüttung im postnatalen Gehirn sind weitere Untersuchungen nötig.

In-vivo Experimente zur Auswirkung systemischer Inflammation auf NSC zeigen die Fähigkeit des bei entzündlichen Prozessen ausgeschütteten Zytokins TNF α NSC zu beeinflussen (Belenguer et al., 2021). Die Daten zeigen eine vermehrte Expression von TNF α nach der Applikation von GABA-Rezeptorblockern. Für das Zytokin TNF α sind bei Applikation auf Zellkulturen die Neurogenese hemmende Effekte beschrieben (Perez-Dominguez et al., 2018). Bei Schädigung von Gewebe, Nekrosen oder Hypoxie ist IL-1 α für eine schnelle Aktivierung von inflammatorischen Kaskaden verantwortlich (Rider et al., 2013). Überexpression von IL-1 β ausgelöst durch neuroinflammative Prozesse kann die Differenzierung neugeborener Zellen weg vom neuronalen Zelllinien hin zu einer astroglialen Differenzierung bewirken, auch ist eine verminderte Zellproliferation durch IL-1 β beschrieben (Perez-Dominguez et al., 2018). Die Expression der Interleukine *IL-1 α* und *IL-1 β* , als ein weiterer Hinweis auf eine ausgelöste Entzündungsreaktion, waren nicht erhöht. Es wurden durch die pharmakologische Intervention keine Neurodegeneration und über das physiologische Maß hinausgehende Apoptose ausgelöst. Die beobachteten Veränderungen in der Reifung hippocampaler Neurone lassen sich somit nicht ausschließlich über eine Störung durch inflammatorische oder apoptotische Prozesse ausgelöst durch die pharmakologische Intervention erklären.

Limitierend ist bei der Interpretation der Genexpressionsanalyse ist zu beachten, dass die qPCR an Gewebe des gesamten Großhirns der Versuchstiere durchgeführt wurde. Cerebellum und Bulbus olfactorius wurden entfernt. Die in der qPCR gemessenen

Transkriptionsfaktoren werden auch in anderen Hirnregionen als dem Hippocampus exprimiert (Perez-Dominguez et al., 2018; Vieira et al., 2018; Hevner, 2019). GABA-Rezeptoren werden weit verbreitet im Gehirn exprimiert, nicht nur von Zellen in der neurogenen Nische des Hippocampus (Behuet et al., 2019). Die systemische Applikation der GABA-Rezeptorantagonisten kann auf weitere Regionen des postnatalen Gehirns gewirkt haben. Allerdings konnten Stefovská et al. zeigen, dass die postnatale Proliferation altersabhängig ist und vor allem im Cerebellum und der SGZ des DG stattfindet (Stefovská et al., 2008). Zur Zeit des schnellsten Hirnwachstums ist der DG die für die Proliferationskapazität relevante Region des Gehirns (Stefovská et al., 2008). Dass Veränderungen der Transkription von mit Neurogenese assoziierten Genen auch im gesamten Großhirn nachweisbar waren, spricht umso mehr für eine relevante Beeinflussung dieser Gene durch eine Störung der GABAergen Transmission.

Die in unserem Modell durchgeführte Blockade des GABA_A-Rezeptors mit DMCM-Applikationen im Zeitraum von P6 bis P11 führte auf zellulärer Ebene zu keinen Veränderungen der postnatalen hippocampalen Neurogenese. Einzig die Expression von *Tbr2* und *Tbr1* war durch GABA_A-Rezeptorblockade signifikant erhöht, alle anderen neuronalen Transkriptionsfaktoren blieben unverändert. Der verwendete GABA_A-Rezeptorblocker ist als potenter Modulator von GABA_A-Kanälen in Tiermodellen mit postnatalen Ratten auch in den von uns genutzten, nicht konvulsiven, Dosierungen etabliert (Kulick et al., 2014). Behuet et al. konnten die Dichte von GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren im Hippocampus von Wistar-Ratten im zeitlichen Verlauf darstellen. Beide GABA-Rezeptoren wurden bereits zum Zeitpunkt P0 in der SGZ nachgewiesen (Sibbe und Kulik, 2017; Behuet et al., 2019). Behuet et al. zeigten einen signifikanten Anstieg in der Dichte der GABA_B-Rezeptoren mit einem Peak zwischen P0 und P10. Die Dichte der GABA_A-Rezeptoren nahm erst in einem etwas späteren Entwicklungsalter, zwischen P10 und P20, signifikant zu und erreichte ihr Maximum zum Zeitpunkt P90 (Behuet et al., 2019). Das hier genutzte Versuchsdesign soll mit einer Applikation der GABA-Rezeptorantagonisten zwischen P6 und P11 die Situation der kindlichen Entwicklung im dritten Trimenon modellieren. Für Fragestellungen zu möglicherweise später in der Entwicklung stattfindender Funktionen GABAerger Transmission dann in höherer Dichte exprimierte ionotrope GABA_A-Rezeptoren bedarf es weiterer Experimente.

Das hier genutzte in-vivo Modell für die neuronale Entwicklung Frühgeborener im dritten Trimenon der Schwangerschaft zeigt, dass in diesem Alter GABAerge Transmission vermittelt über den metabotropen GABA_B-Rezeptor für die hippocampale Neurogenese

von Bedeutung ist. Insbesondere die Differenzierung intermediärer Vorläuferzellen scheint von GABAerger Transmission abzuhängen. Die hippocampale Neurogenese ist somit vulnerabel für Störungen in der GABAergen Transmission über metabotrope Rezeptoren. In der Neonatologie eingesetzte Antikonvulsiva und Sedativa, die in der GABAergen Transmission eingreifen, bergen somit im Entwicklungsalter des schnellsten Hirnwachstums die Gefahr Störungen in der hippocampalen Neurogenese auszulösen. Hinweise auf eine gestörte GABAerge Transmission in der Pathogenese von bei ehemaligen Frühgeborenen häufiger auftretenden Erkrankungen wie ADHS und ASD sind Gegenstand aktueller Forschung (Cellot und Cherubini, 2014). Zukünftige Arbeiten sollten in ihren Modellen Funktionen des metabotropen GABA-Rezeptors berücksichtigen und dessen Rolle in der neurologischen Entwicklung untersuchen.

Literaturverzeichnis

- Andersen, J., Urbán, N., Achimastou, A., Ito, A., Simic, M., Ullom, K., Martynoga, B., Lebel, M., Göritz, C., Frisén, J., Nakafuku, M., und Guillemot, F. (2014). A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells. *Neuron* 83(5), 1085-1097. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.004.
- Andropoulos, D.B. (2018). Effect of Anesthesia on the Developing Brain: Infant and Fetus. *Fetal Diagn Ther* 43(1), 1-11. doi: 10.1159/000475928.
- Basu, S.K., Pradhan, S., du Plessis, A.J., Ben-Ari, Y., und Limperopoulos, C. (2021). GABA and glutamate in the preterm neonatal brain: In-vivo measurement by magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage* 238, 1-29. doi: 10.1016/j.neuroimage.2021.118215.
- Behuet, S., Cremer, J.N., Cremer, M., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., und Amunts, K. (2019). Developmental Changes of Glutamate and GABA Receptor Densities in Wistar Rats. *Front Neuroanat* 13(100), 1-14. doi: 10.3389/fnana.2019.00100.
- Belenguer, G., Duart-Abadia, P., Jordán-Pla, A., Domingo-Muelas, A., Blasco-Chamarro, L., Ferrón, S.R., Morante-Redolat, J.M., und Fariñas, I. (2021). Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- α Receptor Signaling. *Cell Stem Cell* 28(2), 285-299.e289. doi: 10.1016/j.stem.2020.10.016.
- Ben-Yaakov, G., und Golan, H. (2003). Cell proliferation in response to GABA in postnatal hippocampal slice culture. *Int J Dev Neurosci* 21(3), 153-157. doi: 10.1016/s0736-5748(03)00027-3.
- Berg, D.A., Bond, A.M., Ming, G.L., und Song, H. (2018). Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from? *F1000Res* 7(277), 1-12. doi: 10.12688/f1000research.12684.1.
- Brill, C., Scheuer, T., Bührer, C., Endesfelder, S., und Schmitz, T. (2017). Oxygen impairs oligodendroglial development via oxidative stress and reduced expression of HIF-1 α . *Sci Rep* 7, 43000. doi: 10.1038/srep43000.
- Catavero, C., Bao, H., und Song, J. (2018). Neural mechanisms underlying GABAergic regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Cell Tissue Res* 371(1), 33-46. doi: 10.1007/s00441-017-2668-y.
- Cellot, G., und Cherubini, E. (2013). Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Frontiers in Neural Circuits* 7. doi: 10.3389/fncir.2013.00136.
- Cellot, G., und Cherubini, E. (2014). GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. *Front Pediatr* 2(70), 1-11. doi: 10.3389/fped.2014.00070.
- DeCarolis, N.A., Mechanic, M., Petrik, D., Carlton, A., Ables, J.L., Malhotra, S., Bachoo, R., Götz, M., Lagace, D.C., und Eisch, A.J. (2013). In vivo contribution of nestin- and GLAST-lineage cells to adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 23(8), 708-719. doi: 10.1002/hipo.22130.
- Endesfelder, S., Makki, H., von Haefen, C., Spies, C.D., Bührer, C., und Sifringer, M. (2017). Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain. *PLoS One* 12(2), e0171498. doi: 10.1371/journal.pone.0171498.
- Endesfelder, S., Weichelt, U., Schiller, C., Winter, K., von Haefen, C., und Bührer, C. (2018). Caffeine Protects Against Anticonvulsant-Induced Impaired Neurogenesis in the Developing Rat Brain. *Neurotox Res*. doi: 10.1007/s12640-018-9872-8.
- Franz, A.P., Bolat, G.U., Bolat, H., Matijasevich, A., Santos, I.S., Silveira, R.C., Procianoy, R.S., Rohde, L.A., und Moreira-Maia, C.R. (2018). Attention-Deficit/Hyperactivity

- Disorder and Very Preterm/Very Low Birth Weight: A Meta-analysis. *Pediatrics* 141(1). doi: 10.1542/peds.2017-1645.
- Frielingsdorf, H., Simpson, D.R., Thal, L.J., und Pizzo, D.P. (2007). Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis* 26(1), 47-55. doi: 10.1016/j.nbd.2006.11.015.
- Gaetz, W., Bloy, L., Wang, D.J., Port, R.G., Blaskey, L., Levy, S.E., und Roberts, T.P. (2014). GABA estimation in the brains of children on the autism spectrum: measurement precision and regional cortical variation. *Neuroimage* 86, 1-9. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.068.
- Ghose, S., Winter, M.K., McC Carson, K.E., Tamminga, C.A., und Enna, S.J. (2011). The GABAB receptor as a target for antidepressant drug action. *Br J Pharmacol* 162(1), 1-17. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01004.x.
- Giachino, C., Barz, M., Tchorz, J.S., Tome, M., Gassmann, M., Bischofberger, J., Bettler, B., und Taylor, V. (2014). GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development* 141(1), 83-90. doi: 10.1242/dev.102608.
- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., und Gage, F.H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167(4), 897-914. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.021.
- Gustorff, C., Scheuer, T., Schmitz, T., Bühner, C., und Endesfelder, S. (2021). GABAB Receptor-Mediated Impairment of Intermediate Progenitor Maturation During Postnatal Hippocampal Neurogenesis of Newborn Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15(295). doi: 10.3389/fncel.2021.651072.
- Heese, K., Otten, U., Mathivet, P., Raiteri, M., Marescaux, C., und Bernasconi, R. (2000). GABA(B) receptor antagonists elevate both mRNA and protein levels of the neurotrophins nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not neurotrophin-3 (NT-3) in brain and spinal cord of rats. *Neuropharmacology* 39(3), 449-462. doi: 10.1016/s0028-3908(99)00166-5.
- Hevner, R.F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *J Anat* 235(3), 616-625. doi: 10.1111/joa.12939.
- Humberg, A., Fortmann, I., Siller, B., Kopp, M.V., Herting, E., Göpel, W., und Härtel, C. (2020). Preterm birth and sustained inflammation: consequences for the neonate. *Semin Immunopathol* 42(4), 451-468. doi: 10.1007/s00281-020-00803-2.
- Kesner, R.P. (2018). An analysis of dentate gyrus function (an update). *Behav Brain Res* 354, 84-91. doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.033.
- Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., Juzekaeva, E., und Khazipov, R. (2017). Postsynaptic GABA(B) Receptors Contribute to the Termination of Giant Depolarizing Potentials in CA3 Neonatal Rat Hippocampus. *Front Cell Neurosci* 11(179), 1-11. doi: 10.3389/fncel.2017.00179.
- Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., und Khazipov, R. (2015). Dynamic Changes from Depolarizing to Hyperpolarizing GABAergic Actions during Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus. *J Neurosci* 35(37), 12635-12642. doi: 10.1523/jneurosci.1922-15.2015.
- Kulick, C., Gutherz, S., Kondratyev, A., und Forcelli, P.A. (2014). Ontogenic profile of seizures evoked by the beta-carboline DMCM (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carboline-3-carboxylate) in rats. *Eur J Pharmacol* 740, 662-668. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.06.012.
- Kwon, S.H., Scheinost, D., Lacadie, C., Benjamin, J., Myers, E.H., Qiu, M., Schneider, K.C., Rothman, D.L., Constable, R.T., und Ment, L.R. (2014). GABA, resting-state

- connectivity and the developing brain. *Neonatology* 106(2), 149-155. doi: 10.1159/000362433.
- Leal, G., Afonso, P.M., Salazar, I.L., und Duarte, C.B. (2015). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res* 1621, 82-101. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.019.
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., Haas, C.A., Kempermann, G., Taylor, V., und Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6(5), 445-456. doi: 10.1016/j.stem.2010.03.017.
- Naaijen, J., Bralten, J., Poelmans, G., Glennon, J.C., Franke, B., und Buitelaar, J.K. (2017). Glutamatergic and GABAergic gene sets in attention-deficit/hyperactivity disorder: association to overlapping traits in ADHD and autism. *Transl Psychiatry* 7(1), e999. doi: 10.1038/tp.2016.273.
- Nicola, Z., Fabel, K., und Kempermann, G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat* 9(53), 1-13. doi: 10.3389/fnana.2015.00053.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.G., Liu, X.M., Shao, Y., Ma, B.F., Lee, J.H., Ha, K.S., Walton, N., und Lahn, B.T. (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28(12), 2162-2171. doi: 10.1002/stem.541.
- Peerboom, C., und Wierenga, C.J. (2021). The postnatal GABA shift: A developmental perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 124, 179-192. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.01.024.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., und Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 18(7), e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
- Perez-Dominguez, M., Tovar, Y.R.L.B., und Zepeda, A. (2018). Neuroinflammation and physical exercise as modulators of adult hippocampal neural precursor cell behavior. *Rev Neurosci* 29(1), 1-20. doi: 10.1515/revneuro-2017-0024.
- Pontes, A., Zhang, Y., und Hu, W. (2013). Novel functions of GABA signaling in adult neurogenesis. *Front Biol (Beijing)* 8(5). doi: 10.1007/s11515-013-1270-2.
- Ream, M.A., und Lehwald, L. (2018). Neurologic Consequences of Preterm Birth. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 18(8), 48. doi: 10.1007/s11910-018-0862-2.
- Rice, D., und Barone, S., Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3(Suppl 3), 511-533. doi: 10.1289/ehp.00108s3511.
- Rider, P., Carmi, Y., Voronov, E., und Apte, R.N. (2013). Interleukin-1 α . *Semin Immunol* 25(6), 430-438. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.005.
- Rogers, C.E., Lean, R.E., Wheelock, M.D., und Smyser, C.D. (2018). Aberrant structural and functional connectivity and neurodevelopmental impairment in preterm children. *J Neurodev Disord* 10(1), 38. doi: 10.1186/s11689-018-9253-x.
- Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J.Y., und Brundin, P. (2009). Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies

- neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 4(3), e4779. doi: 10.1371/journal.pone.0004779.
- Salmon, C.K., Pribiag, H., Gizowski, C., Farmer, W.T., Cameron, S., Jones, E.V., Mahadevan, V., Bourque, C.W., Stellwagen, D., Woodin, M.A., und Murai, K.K. (2020). Depolarizing GABA Transmission Restrains Activity-Dependent Glutamatergic Synapse Formation in the Developing Hippocampal Circuit. *Front Cell Neurosci* 14(36), 1-16. doi: 10.3389/fncel.2020.00036.
- Scheuer, T., Endesfelder, S., Auf dem Brinke, E., Bühner, C., und Schmitz, T. (2022). Neonatal Oxidative Stress Impairs Cortical Synapse Formation and GABA Homeostasis in Parvalbumin-Expressing Interneurons. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2022/8469756.
- Schulte, J.T., Wierenga, C.J., und Bruining, H. (2018). Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 90, 260-271. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.05.001.
- Schünke, S., Schumacher, Voll, Wesker Hrsg. (2015). *Prometheus LernAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie*. Stuttgart: Thieme.
- Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., und Noble-Haeusslein, L.J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in neurobiology* 106-107, 1-16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001.
- Shimazu, K., Zhao, M., Sakata, K., Akbarian, S., Bates, B., Jaenisch, R., und Lu, B. (2006). NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem* 13(3), 307-315. doi: 10.1101/lm.76006.
- Sibbe, M., und Kulik, A. (2017). GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol Neurobiol* 54(7), 5497-5510. doi: 10.1007/s12035-016-0072-3.
- Song, D., Chen, Y., Chen, C., Chen, L., und Cheng, O. (2021). GABA(B) receptor antagonist promotes hippocampal neurogenesis and facilitates cognitive function recovery following acute cerebral ischemia in mice. *Stem Cell Res Ther* 12(1), 22. doi: 10.1186/s13287-020-02059-x.
- Stefovska, V.G., Uckermann, O., Czuczwar, M., Smitka, M., Czuczwar, P., Kis, J., Kaindl, A.M., Turski, L., Turski, W.A., und Ikonomidou, C. (2008). Sedative and anticonvulsant drugs suppress postnatal neurogenesis. *Annals of Neurology* 64(4), 434-445. doi: <https://doi.org/10.1002/ana.21463>.
- Sun, Y., Zhang, Y., Wang, X., Blomgren, K., und Zhu, C. (2012). Apoptosis-inducing factor downregulation increased neuronal progenitor, but not stem cell, survival in the neonatal hippocampus after cerebral hypoxia-ischemia. *Mol Neurodegener* 7, 17. doi: 10.1186/1750-1326-7-17.
- Tanifuji, S., Akasaka, M., Kamei, A., Araya, N., Asami, M., Matsumoto, A., Sotodate, G., Konishi, Y., Shirasawa, S., Toya, Y., Kusano, S., Chida, S., Sasaki, M., und Matsuda, T. (2017). Temporal brain metabolite changes in preterm infants with normal development. *Brain Dev* 39(3), 196-202. doi: 10.1016/j.braindev.2016.10.006.
- Vasconcelos, F.F., und Castro, D.S. (2014). Transcriptional control of vertebrate neurogenesis by the proneural factor *Ascl1*. *Front Cell Neurosci* 8(412), 1-6. doi: 10.3389/fncel.2014.00412.
- Vieira, M.S., Santos, A.K., Vasconcellos, R., Goulart, V.A.M., Parreira, R.C., Kihara, A.H., Ulrich, H., und Resende, R.R. (2018). Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 36(7), 1946-1970. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.08.002.

Wu, C., und Sun, D. (2015). GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab Brain Dis* 30(2), 367-379. doi: 10.1007/s11011-014-9560-1.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Charlotte Katharina Gustorff, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einfluss von GABA-Rezeptor-Antagonisten auf die hippocampale Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn der Ratte, Effects of GABA-receptor antagonists on postnatal neurogenesis in the rodent hippocampus 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 der Erstbetreuerin, 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

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Charlotte Katharina Gustorff hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Gustorff, C.**, Scheuer, T., Schmitz, T., Bühner, C., und Endesfelder, S. GABAB Receptor-Mediated Impairment of Intermediate Progenitor Maturation During Postnatal Hippocampal Neurogenesis of Newborn Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15(295). 2021 (IF 6.147)

Beitrag im Einzelnen:

Beitrag im Einzelnen:

Charlotte Gustorff führte die immunhistochemischen Färbungen der Paraffin-gebetteten Schnitte durch (Nestin-, NeuroD1-, NeuN-, PCNA-, sowie DAPI-Färbung). Sie führte anschließend die Mikroskopie der Schnitte sowie die Auswertung durch Zählung der Zellzahl durch. Eine Requantifizierung der immunhistochemischen Färbungen zur Verifizierung erfolgte durch Stefanie Endesfelder. Die statistische Auswertung erfolgte gemeinsam mit Stefanie Endesfelder. Charlotte Gustorff erstellte zur Darstellung der Ergebnisse aus der immunhistochemischen Analyse die Graphiken. Die Auswahl repräsentativer Bilder aus immunhistochemischen Färbungen erfolgte gemeinsam mit Stefanie Endesfelder. Charlotte Gustorff führte die qPCR und deren Auswertung über relative Quantifizierung durch. Die statistische Auswertung der qPCR erfolgte zusammen mit Stefanie Endesfelder. Zur graphischen Darstellungen der statistischen Ergebnisse erstellte Charlotte Gustorff alle assoziierten Abbildungen. Charlotte Gustorff schrieb den ersten Manuskriptentwurf für die Publikation. Sie überarbeitete den Entwurf gemeinsam mit Stefanie Endesfelder im Prozess der Einreichung des Manuskriptes beim Verlag und setzte Korrekturen der Koautoren und Gutachter im überarbeiteten Manuskript um.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Journal Data Filtered By: Selected Categories: **NEUROSCIENCES** Selected
Editions: SCIE Selected JCR Year: **2021**
Gesamtanzahl Journale: 274

| Journal name | Total Citations | 2021 JIF | 2021 JCI | JIF Rank |
|-----------------------------------------------|-----------------|----------|----------|----------|
| NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE | 54,312 | 38.755 | 4.29 | 1/274 |
| NATURE NEUROSCIENCE | 82,161 | 28.771 | 5.82 | 2/274 |
| TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES | 36,688 | 24.482 | 2.23 | 3/274 |
| Nature Human Behaviour | 11,204 | 24.252 | 4.75 | 4/274 |
| BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES | 12,872 | 21.357 | 3.36 | 5/274 |
| BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY | 31,770 | 19.227 | 2.77 | 6/274 |
| Molecular Neurodegeneration | 8,377 | 18.879 | 2.68 | 7/274 |
| NEURON | 121,714 | 18.688 | 3.58 | 8/274 |
| TRENDS IN NEUROSCIENCES | 24,595 | 16.978 | 1.64 | 9/274 |
| ACTA NEUROPATHOLOGICA | 30,046 | 15.887 | 3.65 | 10/274 |
| Annual Review of Neuroscience | 15,839 | 15.553 | 1.57 | 11/274 |
| BRAIN | 69,241 | 15.255 | 3.40 | 12/274 |
| MOLECULAR PSYCHIATRY | 33,324 | 13.437 | 2.81 | 13/274 |
| BIOLOGICAL PSYCHIATRY | 51,087 | 12.810 | 2.66 | 14/274 |
| NEUROPSYCHOBIOLOGY | 3,757 | 12.329 | 1.56 | 15/274 |
| PSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCES | 6,445 | 12.145 | 1.01 | 16/274 |
| JOURNAL OF PINEAL RESEARCH | 13,422 | 12.081 | 2.79 | 17/274 |
| SLEEP MEDICINE REVIEWS | 12,620 | 11.401 | 1.58 | 18/274 |
| Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation | 5,161 | 11.360 | 2.18 | 19/274 |
| ANNALS OF NEUROLOGY | 45,647 | 11.274 | 2.57 | 20/274 |
| PROGRESS IN NEUROBIOLOGY | 15,980 | 10.885 | 1.40 | 21/274 |
| Translational Neurodegeneration | 2,152 | 9.883 | 1.43 | 22/274 |
| NEURAL NETWORKS | 23,717 | 9.657 | 1.87 | 23/274 |
| Journal of Neuroinflammation | 23,947 | 9.587 | 1.61 | 24/274 |
| npj Parkinsons Disease | 1,792 | 9.304 | 1.82 | 25/274 |
| Brain Stimulation | 10,760 | 9.184 | 1.85 | 26/274 |
| NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS | 40,813 | 9.052 | 1.29 | 27/274 |
| Alzheimers Research & Therapy | 7,513 | 8.823 | 1.70 | 28/274 |
| JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN | 6,592 | 8.588 | 1.56 | 29/274 |
| FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY | 5,624 | 8.333 | 1.10 | 30/274 |
| NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY | 34,562 | 8.294 | 1.79 | 31/274 |
| GLIA | 19,109 | 8.073 | 1.46 | 32/274 |
| PAIN | 46,662 | 7.926 | 1.77 | 33/274 |
| Annual Review of Vision Science | 1,345 | 7.745 | 1.03 | 34/274 |
| Current Neuropharmacology | 7,580 | 7.708 | 0.96 | 35/274 |
| BRAIN PATHOLOGY | 7,083 | 7.611 | 1.83 | 36/274 |
| Acta Neuropathologica Communications | 8,201 | 7.578 | 1.57 | 37/274 |
| NEUROIMAGE | 131,266 | 7.400 | 1.64 | 38/274 |
| Journal of Neuroimmune Pharmacology | 4,036 | 7.285 | 1.26 | 39/274 |
| NEUROSCIENTIST | 6,603 | 7.235 | 1.22 | 40/274 |

Journal Data Filtered By: Selected Categories: **NEUROSCIENCES** Selected
Editions: SCIE Selected JCR Year: **2021**
Gesamtanzahl Journale: 274

| | | | | |
|---------------------------------------------------------------|---------|-------|------|--------|
| Neurobiology of Stress | 2,462 | 7.142 | 1.16 | 41/274 |
| CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY | 18,337 | 7.070 | 1.55 | 42/274 |
| NEUROBIOLOGY OF DISEASE | 23,538 | 7.046 | 1.43 | 43/274 |
| CNS Neuroscience & Therapeutics | 6,186 | 7.035 | 1.23 | 44/274 |
| Fluids and Barriers of the CNS | 2,427 | 6.961 | 1.31 | 45/274 |
| JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM | 24,048 | 6.960 | 1.53 | 46/274 |
| NEUROPSYCHOLOGY REVIEW | 4,428 | 6.940 | 0.87 | 47/274 |
| Translational Stroke Research | 4,125 | 6.800 | 1.63 | 48/274 |
| JOURNAL OF NEUROSCIENCE | 192,643 | 6.709 | 1.48 | 49/274 |
| Molecular Autism | 4,293 | 6.476 | 1.42 | 50/274 |
| SLEEP | 31,283 | 6.313 | 1.33 | 51/274 |
| EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY | 17,087 | 6.288 | 1.29 | 52/274 |
| CURRENT OPINION IN NEUROLOGY | 7,258 | 6.283 | 0.80 | 53/274 |
| Frontiers in Molecular Neuroscience | 12,806 | 6.261 | 0.94 | 54/274 |
| NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY | 5,197 | 6.250 | 1.48 | 55/274 |
| JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON | 59,625 | 6.228 | 1.33 | 56/274 |
| Frontiers in Cellular Neuroscience | 21,318 | 6.147 | 0.95 | 57/274 |
| Neurotherapeutics | 7,998 | 6.088 | 1.28 | 58/274 |
| CEPHALALGIA | 13,467 | 6.075 | 1.26 | 59/274 |
| Neural Regeneration Research | 9,531 | 6.058 | 0.72 | 60/274 |
| Biological Psychiatry-Cognitive Neuroscience and Neuroimaging | 3,343 | 6.050 | 1.29 | 61/274 |
| Current Neurology and Neuroscience Reports | 5,335 | 6.030 | 0.76 | 62/274 |
| Multiple Sclerosis Journal | 15,617 | 5.855 | 1.31 | 63/274 |
| Developmental Cognitive Neuroscience | 6,003 | 5.811 | 1.42 | 64/274 |
| ACS Chemical Neuroscience | 12,168 | 5.780 | 1.01 | 65/274 |
| Frontiers in Aging Neuroscience | 17,276 | 5.702 | 1.00 | 66/274 |
| JOURNAL OF PSYCHIATRY & NEUROSCIENCE | 4,487 | 5.699 | 1.04 | 67/274 |
| MOLECULAR NEUROBIOLOGY | 22,883 | 5.682 | 1.18 | 68/274 |
| INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY | 8,630 | 5.678 | 1.21 | 69/274 |
| CLINICAL AUTONOMIC RESEARCH | 2,484 | 5.625 | 0.83 | 70/274 |
| EXPERIMENTAL NEUROLOGY | 24,373 | 5.620 | 1.16 | 71/274 |
| JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY | 40,901 | 5.546 | 0.86 | 72/274 |
| Journal of Parkinsons Disease | 4,493 | 5.520 | 0.90 | 73/274 |
| npj Science of Learning | 536 | 5.513 | 1.39 | 74/274 |
| Annals of Clinical and Translational Neurology | 5,916 | 5.430 | 1.14 | 75/274 |
| EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY | 9,792 | 5.415 | 1.05 | 76/274 |
| HUMAN BRAIN MAPPING | 29,646 | 5.399 | 1.12 | 77/274 |
| JOURNAL OF PAIN | 13,915 | 5.383 | 1.16 | 78/274 |
| BIPOLAR DISORDERS | 6,472 | 5.345 | 1.11 | 79/274 |
| JOURNAL OF SLEEP RESEARCH | 9,708 | 5.296 | 1.06 | 80/274 |
| NEUROPHARMACOLOGY | 28,216 | 5.273 | 1.21 | 81/274 |



GABA_B Receptor-Mediated Impairment of Intermediate Progenitor Maturation During Postnatal Hippocampal Neurogenesis of Newborn Rats

Charlotte Gustorff, Till Scheuer, Thomas Schmitz, Christoph Bührer and Stefanie Endesfelder*

Department of Neonatology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Francesco Moccia,
University of Pavia, Italy

Reviewed by:

Rebecca Hodge,
Allen Institute for Brain Science,
United States
Eniko Račeková,
Slovak Academy of Sciences,
Slovakia

*Correspondence:

Stefanie Endesfelder
stefanie.endesfelder@charite.de

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Neurophysiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 08 January 2021

Accepted: 12 July 2021

Published: 06 August 2021

Citation:

Gustorff C, Scheuer T, Schmitz T,
Bührer C and Endesfelder S
(2021) GABA_B Receptor-Mediated
Impairment of Intermediate
Progenitor Maturation During
Postnatal Hippocampal
Neurogenesis of Newborn Rats.
Front. Cell. Neurosci. 15:651072.
doi: 10.3389/fncel.2021.651072

The neurotransmitter GABA and its receptors assume essential functions during fetal and postnatal brain development. The last trimester of a human pregnancy and early postnatal life involves a vulnerable period of brain development. In the second half of gestation, there is a developmental shift from depolarizing to hyperpolarizing in the GABAergic system, which might be disturbed by preterm birth. Alterations of the postnatal GABA shift are associated with several neurodevelopmental disorders. In this *in vivo* study, we investigated neurogenesis in the dentate gyrus (DG) in response to daily administration of pharmacological GABA_A (DMCM) and GABA_B (CGP 35348) receptor inhibitors to newborn rats. Six-day-old Wistar rats (P6) were daily injected (i.p.) to postnatal day 11 (P11) with DMCM, CGP 35348, or vehicle to determine the effects of both antagonists on postnatal neurogenesis. Due to GABA_B receptor blockade by CGP 35348, immunohistochemistry revealed a decrease in the number of NeuroD1 positive intermediate progenitor cells and a reduction of proliferative Nestin-positive neuronal stem cells at the DG. The impairment of hippocampal neurogenesis at this stage of differentiation is in line with a significantly decreased RNA expression of the transcription factors *Pax6*, *Ascl1*, and *NeuroD1*. Interestingly, the number of NeuN-positive postmitotic neurons was not affected by GABA_B receptor blockade, although strictly associated transcription factors for postmitotic neurons, *Tbr1*, *Prox1*, and *NeuroD2*, displayed reduced expression levels, suggesting impairment by GABA_B receptor antagonization at this stage of neurogenesis. Antagonization of GABA_B receptors decreased the expression of neurotrophins (*BDNF*, *NT-3*, and *NGF*). In contrast to the GABA_B receptor blockade, the GABA_A receptor antagonization revealed no significant changes in cell counts, but an increased transcriptional expression of *Tbr1* and *Tbr2*. We conclude that GABAergic signaling *via* the metabotropic GABA_B receptor is crucial for hippocampal neurogenesis at the time of rapid brain growth and of the postnatal GABA shift. Differentiation and proliferation of intermediate progenitor

cells are dependent on GABA. These insights become more pertinent in preterm infants whose developing brains are prematurely exposed to postnatal stress and predisposed to poor neurodevelopmental disorders, possibly as sequelae of early disruption in GABAergic signaling.

Keywords: GABA, postnatal neurogenesis, brain development, hippocampus, rat–brain

INTRODUCTION

Very preterm-born children may suffer from significant deficits in executive function, processing speed, and intelligence (Brydges et al., 2018). The risk for neurodevelopmental disorders such as attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder (ASD), and anxiety are increased two to four times in preterm children, as compared to term-born controls (Rogers et al., 2018). Altered GABAergic signaling has been implicated in the pathogenesis of ASD (Gaetz et al., 2014; Tanifuji et al., 2017), ADHD (Naaijen et al., 2017), as well as anxiety (Nuss, 2015). Pharmacological antagonization and agonization of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors in the neonatal animal model of the mouse during postnatal brain development corroborate an important role of GABA and their receptors in programming neurobehavioral phenotypes in adulthood (Salari and Amani, 2017).

While human brain growth reaches its highest velocity at birth (Watson et al., 2006), the so-called “brain growth spurts” in rodents peak at the seventh postnatal day (Semple et al., 2013). Postnatal rat pups may therefore serve as a model for the human stage of brain development, corresponding to the last trimester of pregnancy. Both in humans and rodents, the hippocampus undergoes developmental changes close to birth (Semple et al., 2013). During the formation of the dentate gyrus (DG) neural progenitor cells (NPC) are generated and form a proliferative zone that remains active during postnatal stages, becoming the site of adult hippocampal neurogenesis called the subgranular zone (SGZ; Paridaen and Huttner, 2014). Supplemented new neurons form highly complex neural circuits, supporting a role for hippocampal neurogenesis in memory, learning, and behavior (Deng et al., 2010; Anacker and Hen, 2017).

The last trimester of a human pregnancy and early postnatal life involves a period of brain development with neuronal organization and maturation, such as neurogenesis, migration, dendritogenesis, synaptogenesis, and plasticity of developing neurons. These processes are regulated by neurotransmitters such as GABA and glutamate, which remain at risk of disruption after preterm birth (Malik et al., 2013). In humans, the phase of rapid brain growth starts at gestational week 28, and peaks at the time of birth. In the rat model, this phase occurs from postnatal day (P)4 to P11 and peaks at P7 (Dobbing and Sands, 1979; Semple et al., 2013) which makes early postnatal pups useful as model organisms in studies of human neuronal development, corresponding roughly to the last trimester of pregnancy. These neurodevelopmental processes are highly vulnerable and clinically relevant, as they

can be affected by oxidative stress (hyperoxia, hypoxia) or various necessary medical interventions (Malik et al., 2013; Steinhorn et al., 2015; Duerden et al., 2016; Isokawa, 2016). In addition to neurotransmission and developmentally mediated excitatory-inhibitory transition of GABA action during the perinatal period (Ben-Ari, 2018), GABA and its receptors assume multiple essential functions during fetal and postnatal brain development (Cellot and Cherubini, 2013; Wu and Sun, 2015; Tang et al., 2021). In the rat, the main generation of hippocampal granular cells starts around birth and peaks during the first postnatal week (Altman and Bayer, 1990). In line with this, GABAergic transmission changes from excitatory to inhibitory also during the end of the first postnatal week (Rivera et al., 1999; Khirug et al., 2005). Neurobehavioral disorders, including autism, are more common in survivors of preterm birth and have been associated with decreased GABA concentrations, underscoring the importance of *in vivo* examination of GABA changes during early postnatal life in preterm infants (Ream and Lehwald, 2018; Basu et al., 2021). Peerboom and Wierenga (2021) postulated that the postnatal shift from depolarizing to hyperpolarizing GABA is a pivotal event in brain development and its timing affects brain function throughout life. Altered timing of the postnatal GABA shift is associated with several neurodevelopmental disorders (Schulte et al., 2018). In addition, preterm birth itself, as well as pharmacologic drugs used in the preterm infant, influence GABA receptor associated pathways (Shaw et al., 2015; Steinhorn et al., 2015). Extremely and very preterm infants showed reduced GABA concentrations in the brain measured by magnetic resonance imaging (Kwon et al., 2014; Basu et al., 2020). The developmental timeline of the GABAergic system becomes more relevant in preterm infants whose developing brains are prematurely exposed to extra uterine stress, and predisposed to neurological disorders, perhaps in part as sequela of early derangement in GABAergic systems.

Despite the postnatal developmental differences in GABAergic signaling, there are many similarities in the generalized course of neural maturation in early development and adulthood (Song et al., 2012). A complex interaction of the intrinsic programs of neuronal stem cells (NSCs) and their progressively produced progenitors (NPC) regulates neurogenesis, which is orchestrated by intrinsic pathways and extracellular signaling molecules (Faigle and Song, 2013; Bjornsson et al., 2015). As shown schematically in **Figure 5**, hippocampal neurogenesis originates from NPC and leads to granule cell neurons, which go through different stages leads to granule cell neurons after progressing through the stages of NSC/type-1 cells, NPC/type-2a cells, neuroblast/type-2b cells,

immature-mitotic neuron/type-3 cells as well as postmitotic-immature and mature granular neurons (Kempermann et al., 2004). NSCs are the shared NPC of both neurons and astrocytes and therefore express the astrocytic markers glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Scl1a3 as well as the neuronal marker nestin (DeCarolis et al., 2013; Berg et al., 2018; Vieira et al., 2018). NSCs express Sox2 to maintain their multipotency and proliferation capacity (Mercurio et al., 2019). Sox2 represses the expression of NeuroD1 and therefore prevents the cells' progression in neurogenesis, preserving their self-renewal capacity (Kuwabara et al., 2009). A key regulator of the mainstay of NSCs after their transition to asymmetric neurogenic division is the Notch target gene Hes5 (Lugert et al., 2010). By directly changing the expression of genes associated with self-renewal and differentiation [e.g., Sox2 (Wen et al., 2008), Ngn2, and NeuroD1 (Scardigli et al., 2003; Shimojo et al., 2008)], Pax6 is essential to regulating the NPCs' proliferation (Maekawa et al., 2005). NSCs give rise to intermediate progenitor cells, which express as a specific marker Tbr2. Tbr2 labels type-2 cells, while Tbr1 is expressed by immature granule neurons (Englund et al., 2005; Hodge et al., 2008; Nicola et al., 2015). Additionally, type-2a cells express the proneural markers Ascl1 (also known as Mash1) and Ngn2 (Amador-Arjona et al., 2015; Pérez-Domínguez et al., 2018). At the late stage of typ-2a cells, Ngn2 is downregulated, whilst Tbr2 expression in typ-2b cells persists (Roybon et al., 2009). Type-2b cells start to express NeuroD1, a crucial transcription factor for neurogenesis during hippocampal development that marks the transition from amplifying progenitor to neuroblast (Kuwabara et al., 2009). NeuroD1 is necessary for further survival and maturation of neurons (Pérez-Domínguez et al., 2018). Type-3 cells are less proliferative and may migrate and exit the cell cycle before full maturation into granule neurons (Nicola et al., 2015). NeuroD2 starts to be expressed just after NeuroD1 and continues to be highly expressed in postmitotic mature neurons (Roybon et al., 2009). Postmitotic neurons following further differentiation express as specific markers NeuN, Tbr1 (Englund et al., 2005) and NeuroD2, of which the latter is necessary for cell cycle regulation and survival of neurons (Olson et al., 2001; Wilke et al., 2012). Granule cell maturation necessarily depends on Prox1 expression, which starts with type-2b cells and is maintained further in differentiation (Lavado et al., 2010). Different types of signals, including glutamatergic and GABAergic signals from local neural networks, mediate these complex neurogenic processes.

The neurotransmitter GABA, in tandem with the neurotransmitter glutamate and its receptors, is essential for balancing excitation and inhibition and subject to various changes during pre- and postnatal development (Takesian and Hensch, 2013). The ionotropic GABA_A receptor and the metabotropic GABA_B receptor are two main subtypes of GABA receptors. Berg et al. (2013) postulated that in addition to the progression of neural stem cells into functionally integrated mature neurons, cell cycle regulation and cell differentiation might be part of the functions of neurotransmitters. Various neurotransmitter receptors are expressed on different neuronal

cell types (Pocock and Kettenmann, 2007). The functional roles for GABA during adult neurogenesis are already well described in part (Ge et al., 2006; Giachino et al., 2014; Song et al., 2016; Catavero et al., 2018), but it is poorly understood which steps in hippocampal neurogenesis at the time of brain growth spurts are vulnerable to disturbance of GABAergic signaling. Since the referenced evidence suggests that modulation of the GABA receptors during early life induces behavioral abnormalities in later life, we hypothesized that neonatal pharmacological blockade of GABA_A and GABA_B receptors during excitatory to inhibitory switch of GABA signaling may alter neuronal proliferation, differentiation, and maturation of hippocampal neurons in newborn rat pups.

MATERIALS AND METHODS

Animal Welfare

Time-pregnant Wistar rat dams were obtained from the Department of Experimental Medicine (FEM, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Germany). The rat litters were housed with lactating mother under temperature- and humidity-controlled 12 h/12 h light/dark cycle conditions with *ad libitum* access to food and water. All animal experimental procedures were approved by the local animal welfare authorities (LAGeSo, approval number G-0075/18) and followed institutional guidelines as well as ARRIVE guidelines.

Drug Administration

Rat pups were cross-gender randomly assigned into a control group with 0.9% saline and six verum groups with GABA_A receptor antagonist DMCM (4-Ethyl-6,7-dimethoxy-9H-pyrindo[3,4-b]indole-3-carboxylic acid methyl ester) hydrochloride administered at three dosages (2 µg/kg, 10 µg/kg, or 50 µg/kg body weight; Tocris, cat. no. 3083, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany), and with GABA_B receptor antagonist CPG 35348 at 0.4 mg/kg, 2 mg/kg, or 10 mg/kg body weight (Tocris, cat. no. 1245), respectively. Beginning at postnatal day 6 (P6) the rat pups were intraperitoneally injected (i.p.) with saline, DMCM, or CGP 35348 daily on six consecutive days (P6 to P11) with a weight-adapted volume of 0.1 ml per 10 g of body weight. The dosage of the two GABA receptor antagonists was selected to exclude seizures and shakiness. Behavioral seizure responses were monitored for 30 min after drug administration. No pups died or scored for seizure activity. Animals were sacrificed within 12 h following the last injection. For dose-dependent histological analysis of GABA receptor antagonization, each group entailed 10 animals. Gene expression analyses were done in animals receiving the highest concentration of GABA receptor antagonists (DMCM hydrochloride 50 µg/kg and CGP 35348 10 mg/kg body weight (i.p.), respectively) and included nine to 10 animals. The two substances used are hereinafter referred to as DMCM and CGP.

Tissue Preparation

For histological analysis, as previously described (Endesfelder et al., 2018), at postnatal day 11 (P11) rat pups were transcardially

perfused with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS under anesthesia of ketamine (100 mg/kg), xylazine (20 mg/kg), and acepromazine (3 mg/kg). The removed brain tissues were post-fixed in 4% PFA at 4°C for 24 h. Afterward they were transferred to PBS (pH 7.4) and stored at 4°C until paraffin embedding. In preparation for immunohistochemical analyses, the brains were embedded in paraffin. For this purpose, the tissues were first washed under running water for 4 h. This was followed by various dehydrating incubations of the brain tissue with increasing alcohol (ethanol) concentrations (70% for 4 h and 80% overnight at room temperature, 96% and two changes of 100% for each 1 h at 40°C) and chloroform (100% ethanol/chloroform (1:1) and two changes of chloroform for each 1 h at 40°C). Finally, the tissues were immersed in two changes of paraffin (1 h and overnight) at 60°C, cooled, and stored at room temperature.

For gene expression analysis, animals were transcardially perfused with ice-cold PBS (pH 7.4). After decapitation, the olfactory bulb and cerebellum were removed, and brain hemispheres were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR

The gene expression analysis was performed as previously described (Endesfelder et al., 2020). In short, total RNA was isolated from frozen tissue of the whole hemisphere by acidic phenol/chloroform-extraction (peqGOLD RNAPure™; PEQLAB Biotechnologie, cat. no. 30-1010, Erlangen, Germany). 2 µg of DNase-treated RNA was reverse transcribed. In real time the PCR products of the following genes were quantified: achaete-scute family bHLH transcription factor 1 (*Ascl1*), brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*), cyclin D2 (*CycD2*), GFAP, hairy-enhancer-of-split 5 (*Hes5*), hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (*HPRT*), neurogenic differentiation 1 (*NeuroD1*), neurogenic differentiation 2 (*NeuroD2*), neurogenin 2 (*Ngn2*), nerve growth factor (*NGF*), neurotrophin 3 (*NT-3*), paired box 6 (*Pax6*), prospero homeobox 1 (*Prox1*), SRY-box transcription factor 2 (*Sox2*), solute carrier family 1 member 3 (*Scl1a3*), T-box brain transcription factor 1 (*Tbr1*), and T-box brain transcription factor 2 (*Tbr2*).

Table 1 shows the sequences of dye-labeled fluorogenic reporter oligonucleotides used for real time amplification. Probes were labeled with the fluorescent reporter 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) at the 5' end and the fluorescent quencher carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) at the 3' end. PCR and detection were performed with qPCR BIO Mix Hi-ROX (NIPPON Genetics Europe, cat. no. PB20.22-51, Düren, Germany) with *HPRT* used as an internal reference. The expression of target genes was analyzed according to the 2^{-ΔΔCT} method (Livak and Schmittgen, 2001) with the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded coronal sections of the brains were serially cut into 5 µm sections and mounted onto Super

TABLE 1 | Sequences of oligonucleotides.

| | Oligonucleotide sequence 5'-3' | Accession No. |
|----------------------|----------------------------------|----------------|
| AIF | | |
| forward | CACAAAGACACTGCAGTTCAGACA | NM_031356.1 |
| reverse | AGGTCCTGAGCAGAGACATAGAAAAG | |
| probe | AGAAGCATCTATTCCAGCC | |
| Ascl1 (Mash1) | | |
| forward | AACTTCAGTGGCTTCGGCTA | NM_022384.1 |
| reverse | GCCCAGGTTAACCACTTGA | |
| probe | AGCCTTCCACAGCAGCAG | |
| BDNF | | |
| forward | TCAGCAGTCAAGTGCCTTTGG | NM_012513.4 |
| reverse | CGCCGAACCTCATAGACATG | |
| probe | CCTCCTCTGCTCTTTCTGCTGGAGGAATACAA | |
| Casp3 | | |
| forward | ACAGTGGAACTGACGATGATATGG | NM_012922.2 |
| reverse | AATAGTAACCGGGTGC GGTTAGA | |
| probe | ATGCCAGAAGATACCAGTGG | |
| CycD2 | | |
| forward | CGTACATGCGCAGGATGGT | NM_199501.1 |
| reverse | AATTCATGGCCAGAGAAAGAC | |
| probe | TGATGCTAGAGGTCTGTGA | |
| GFAP | | |
| forward | TCTGGACCAGCTTACTACCAACAG | NM_017009.2 |
| reverse | TGGTTTCATCTTGGAGCTTCTG | |
| probe | AGAGGGACAATCTCACACAG | |
| Hes5 | | |
| forward | ATGCTCAGTCCCAAGGAGAA | NM_024383.1 |
| reverse | TAGTCCTGGTGCAGGCTCTT | |
| probe | CCCAACTCCAACTGGAGAA | |
| HPRT | | |
| forward | GGAAAGAACGTCTTGATTGTTGAA | NM_012583.2 |
| reverse | CCAACACTTCGAGAGTCCCTTTT | |
| probe | CTTTCTTGGTCAAGCAGTACAGCCCC | |
| NeuroD1 | | |
| forward | TCAGCATCAATGGCAACTTC | NM_019218.2 |
| reverse | AAGATTGATCCGTGGCTTTG | |
| probe | TTACCATGCACTACCCTGCA | |
| NeuroD2 | | |
| forward | TCTGGTGTCTACGTGCAGA | NM_019326.1 |
| reverse | CCTGCTCCGTGAGGAAGTTA | |
| probe | TGCTGCAGCTGAACCTCTC | |
| Ngn2 | | |
| forward | AGGCTCAAAGCCAACAACC | XM_008775262.2 |
| reverse | GATGTAATTGTGGCGAAGC | |
| probe | CTCACGAAGATCGAGACGCT | |
| NGF | | |
| forward | ACCCAAGCTCACCTCAGTGTCT | NM_001277055.1 |
| reverse | GACATTACGCTATGCACCTCAGAGT | |
| probe | CAATAAAGGCTTTGCCAAGG | |
| NT-3 | | |
| forward | AGAACATCACCCAGGAGGAAA | NM_031073.3 |
| reverse | GGTCACCCACAGGCTCTCA | |
| probe | AGAGCATAAGAGTACCAGG | |
| Pax6 | | |
| forward | TCCCTATCAGCAGCAGTTTTCAGT | NM_013001.2 |
| reverse | GTCTGTGCGGCCCAACAT | |
| probe | CTCCTCCTTTACATCGGGTT | |
| Prox1 | | |
| forward | TGCCTTTTCCAGGAGCAACTAT | NM_001107201.1 |
| reverse | CCGCTGGCTTGGAACTG | |
| probe | ACATGAACAAAACGGTGGC | |
| Sox2 | | |
| forward | ACAGATGCAGCCGATGCA | NM_001109181.1 |
| reverse | GGTGCCCTGCTGCGAGTA | |
| probe | CAGTACAACCTCCATGACCAG | |

(Continued)

TABLE 1 | Continued

| | Oligonucleotide sequence 5'-3' | Accession No. |
|-----------------------|--------------------------------|----------------|
| Sc11a3 (GLAST) | | |
| forward | CCCTGCCCATCACTTTCAAG | NM_001289942.1 |
| reverse | GCGGTCCCATCCATGTTAA | |
| probe | CTGGAAGAAAACAATGGTGTGG | |
| Tbr1 | | |
| forward | TCCCAATCACTGGAGGTTTCA | NM_001191070.1 |
| reverse | GGATGCATATAGACCCGGTTTC | |
| probe | AAATGGGTTCCTTGTGGCAA | |
| Tbr2 | | |
| forward | ACGCAGATGATAGTGTTCAGTCT | XM_006226608.2 |
| reverse | ATTCAAGTCCTCCACACCATCCT | |
| probe | CACAAATACCAACCTGGACT | |

Frost Plus-coated slides (Menzel, Braunschweig, Germany). The sections were deparaffinized in Roti-Histol twice for 10 min each. The PFA-fixed tissues were dehydrated through incubation in aqueous solutions of decreasing ethanol concentration. The slices were immersed for 3 min each in ethanol (100%, 100%, 90%, 80%, 70%). To demask intracellular epitopes, sections were fixed in citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven for 10 min at 600 W. The sections then were cooled down at room temperature for 30 min and were washed three times afterward in PBS for NeuN/DAPI- and Nestin/PCNA/DAPI-staining and in Tris-buffered saline (TBS) for NeuroD1/PCNA/DAPI-staining. For NeuN/DAPI- and Nestin/PCNA/DAPI-staining blocking solution [3% bovine serum albumin (BSA), 0.2% TX-100 in PBS] was applied to each section for 60 min. For NeuroD1/PCNA/DAPI staining, blocking solution (5%BSA, 0.5% TX-100 in TBS) was applied instead. Sections were washed again in PBS for NeuN/DAPI- and Nestin/PCNA/DAPI-staining, and in TBS for NeuroD1/PCNA-staining before the primary antibody was applied overnight at 4°C.

Primary antibody, monoclonal mouse-anti-rat NeuN IgG (Merck Millipore, cat. no. MAB377, Darmstadt, Germany) diluted 1:200 in antibody diluent (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) or polyclonal goat anti-rat Nestin IgG (R&D, AF2736, Minneapolis, USA) diluted 1:20 in antibody diluent and monoclonal mouse anti-rat PCNA IgG (abcam, ab29, Cambridge, UK) diluted 1:1,000 in antibody diluent, or monoclonal mouse anti-rat NeuroD1 (abcam, ab60704) diluted 1:200 in antibody diluent and polyclonal rabbit anti-rat PCNA (abcam, ab152112) diluted 1:50 in antibody diluent was applied to each slide.

For NeuN/DAPI-staining sections were washed three times in PBS before the fluorescein-conjugated secondary antibody goat anti-mouse-IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A11029, Rockford, IL, USA) diluted 1:200 in carrier solution was applied for 60 min in darkness at room temperature.

For Nestin/PCNA/DAPI-staining sections were washed three times in PBS before donkey anti-goat Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A11055) diluted 1:200 in antibody diluent was applied for 4 h. Sections then were washed three times in PBS and goat anti-mouse Alexa Fluor 594

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A11032) diluted 1:200 in antibody diluent applied for 60 min.

For NeuroD1/PCNA/DAPI-staining sections were washed three times in TBS before goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A11029) diluted 1:200 in antibody diluent was applied for 2 h. The sections were again washed three times in TBS and goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, A11037) diluted 1:200 in antibody diluent was applied for 60 min. Aqueous 4',6-diamidino-2-phenylidole (DAPI; Sigma-Aldrich, #32670, Taufkirchen, Deutschland) 1:1,000 was applied for 10 min. After washing three times in PBS for NeuN/DAPI- and Nestin/PCNA/DAPI-staining, and three times in TBS for NeuroD1/PCNA/DAPI-staining, the sections were mounted and stored overnight at 4°C.

Images were acquired blinded on Keyence compact fluorescent microscope BZ 9000 with BZ-II Viewer software (Keyence, Osaka, Japan) using 10x objective lenses and individual files stitched automatically for each RGB color. Pictures were taken with the same exposure time and contrast/brightness parameters. Imaging files were analyzed and quantified in Adobe Photoshop software (Adobe Photoshop CS3 Extended). Double- (NeuN/DAPI) and triple-labeled (Nestin or NeuroD1/PCNA/DAPI) images in the DG were quantified by first outlining the hilus, GCL, and SGZ as a region of interest (ROI) at 10× magnification in Adobe Photoshop using DAPI to initially identify the cell-dense GCL. The area of the complete hilus, GCL, and SGZ of the DG, with an imaginary cut at the beginning of CA3, was counted manually for each staining up to four sections per animal separately. For multi-channel images, distinct channels were overlaid using the “Merge Channel”-function (overlaid images are indicated as “merge” in figures). To count the co-labeled positive cells, the different RGB channels were used overlapping. For each quantified marker, two different investigators for reproducibility repeated counts. The fluorescence signal for single reactivity and co-localization of immunoreactivity was counted individually using the markers function in the Adobe Photoshop software at 40× magnification. Mean values per sample were calculated by averaging the values of all sections of the same animal and were used to compare the cell counts of neuronal marker of GABA receptor antagonist treated animal vs. or control animals. For the representative imaging of immunohistological stainings, a background minimization with black balance identical for all images was performed.

Statistical Analyses

Box and whisker plots represent the interquartile range (box) with the line representing the median, while whiskers show the data variability outside the upper and lower quartiles. Groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), based on a partially non-Gaussian distribution with the Kruskal-Wallis test or based on the assumption that groups do not have equal variances with the Brown-Forsythe test. Depending on which ANOVA test was used, multiple comparisons of means were carried out using Bonferroni's, Dunn's, or Dunnett's *post hoc* test. A *p* value of <0.05 was

considered significant. All graphics and statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

GABA_B Receptor Antagonist Reduces Intermediate Progenitor Cells

To investigate the effect of GABAergic signaling on early progenitor cells at the beginning of neuronal cell lineage development, we stained for Nestin. This marker is expressed by NSCs (Nicola et al., 2015). The GABA_B receptor antagonist CGP administered in a dose of 2 mg/kg led to a decreased number of Nestin+ cells at the DG. The proliferating Nestin+/PCNA+ double-stained cells were significantly diminished in animals treated with the highest dose of GABA_B receptor antagonist CGP (10 mg/kg). The administration of the GABA_A receptor antagonist DMCM, in contrast, did not significantly alter the number of Nestin+ or Nestin+/PCNA+ double-stained cells (Figures 1A,B). The expression of the NSC marker *Pax6* was

reduced in CGP-treated (10 mg/kg) animals. Multipotent NSCs, besides their neuronal qualities, also have astrocytic properties and thus express GFAP and *Scl1a3* (DeCarolis et al., 2013; Berg et al., 2018). The expression of those astrocytic markers, *GFAP* and *Scl1a3*, was unchanged by either GABA receptor blockade (Figure 1C). By the expression of *Hes5* and *Sox2*, NSCs inhibit neuronal differentiation and maintain their crucial multipotency and proliferation capacity (Pérez-Domínguez et al., 2018). The blockade of GABA receptors did not interfere with the expression of *Hes5* and *Sox2*.

GABA_B Receptor Blockade Weakens Number and Proliferation of Intermediate Progenitor Cells

Ongoing neuronal differentiation of NSCs' progeny leads to intermediate progenitor cells of type 2a. Those still dividing Nestin+ type-2a cells express *Ascl1*, a transcription factor sufficient to induce neuronal differentiation (Vasconcelos and Castro, 2014). We found decreased expression of *Ascl1* in CGP-treated animals. *Ngn2* is another transcription factor

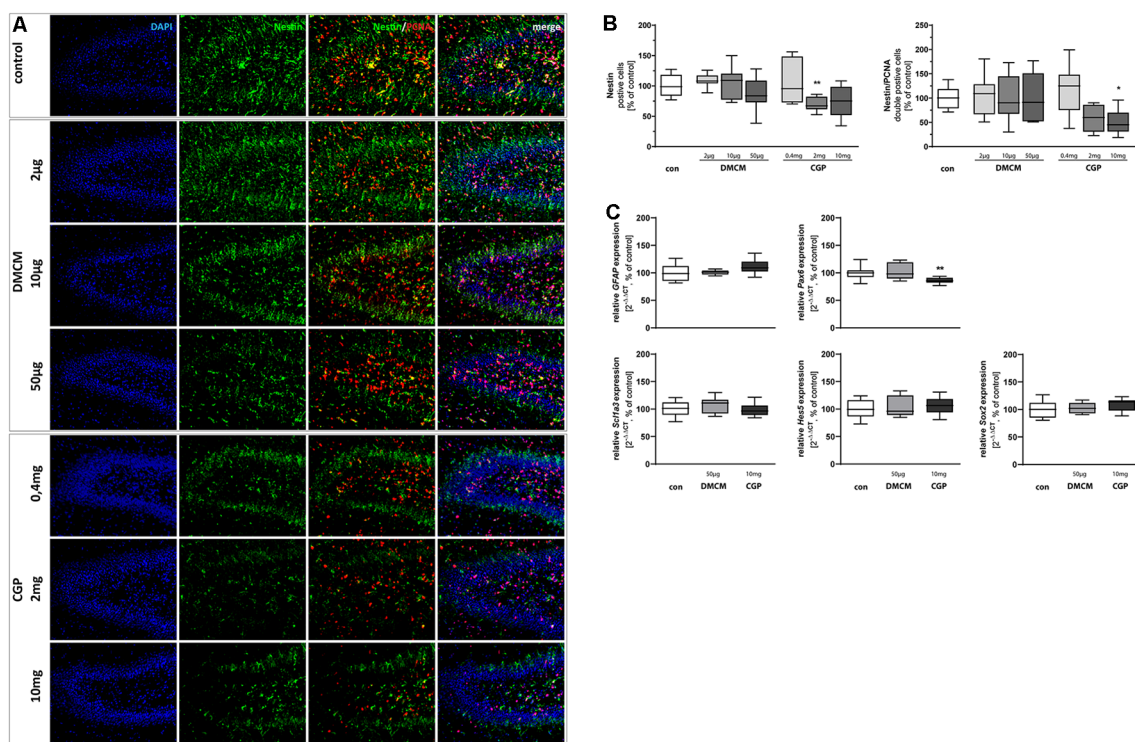


FIGURE 1 | Representative hippocampal paraffin sections (A) of control animals, DMCM hydrochloride (DMCM) in doses of either 2 μg/kg, 10 μg/kg or 50 μg/kg, and CGP 35348 in doses of either 0.4 mg/kg, 2 mg/kg or 10 mg/kg treated rat pups at P11 co-labeled with DAPI, Nestin, and PCNA. Application of GABA_B receptor antagonist CGP 2 mg/kg decreased Nestin positive progenitor cells in the dentate gyrus (DG). Application of CGP 10 mg/kg decreased the number of proliferating Nestin/PCNA double positive cells. Quantification of (B) Nestin and Nestin/PCNA double positive cells in sum of the DG in comparison to control group (100% white bars). Data are expressed relative to the control group as mean ± SEM of $n = 10$ each group. The 100% values are for Nestin+ 83.5 cell counts and for Nestin+PCNA+ 13.3 cell counts. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control (Brown-Forsythe test for Nestin+, Kruskal–Wallis test for Nestin+PCNA+). Expressions of (C) *glial fibrillary acidic protein (GFAP)*, *Scl1a3*, *Hes5*, and *Sox2* are not affected by the application of DMCM or CGP. *Pax6* expression is diminished in CGP treated animals. The relative mRNA expressions of markers were measured by quantitative real-time PCR in rat brain homogenates with DMCM 50 μg/kg (gray bars) or CGP 10 mg/kg (black bars) application relative to control (white bars). Bars represent the relative mRNA quantification based on internal standard *HPRT*. Data shown as mean ± SEM, $n = 9–10$. ** $p < 0.01$ vs. control (Brown-Forsythe test for *GFAP*, one-way analysis of variance (ANOVA) for *Scl1a3*, *Hes5*, *Sox2*, and *Pax6*).

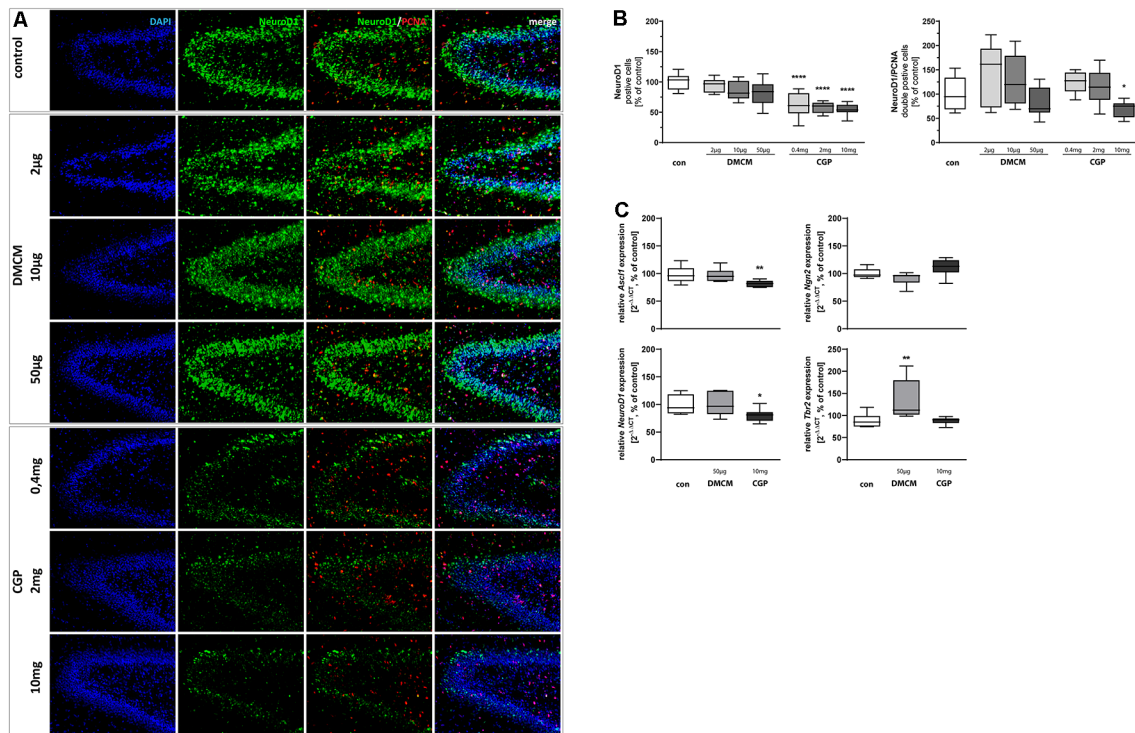


FIGURE 2 | Representative hippocampal paraffin sections (A) of control animals, DMCM hydrochloride (DMCM) in doses of either 2 µg/kg, 10 µg/kg or 50 µg/kg, and CGP 35348 in doses of either 0.4 mg/kg, 2 mg/kg or 10 mg/kg treated rat pups at P11 co-labeled with DAPI, NeuroD1, and PCNA. Application of GABA_B receptor antagonist CGP decreased NeuroD1 positive progenitor cells in the DG and NeuroD1/PCNA double positive cells in the group with the highest dose of 10 mg/kg. Quantification of (B) NeuroD1 and NeuroD1/PCNA double positive cells in sum of the DG in comparison to control group (100% white bars). Data are expressed relative to the control group as mean ± SEM of $n = 10$ each group. The 100% values are for NeuroD1+ 308.9 cell counts and for NeuroD1+PCNA+ 7.7 cell counts. * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$ vs. control (one-way ANOVA for NeuroD1+, Brown-Forsythe test for NeuroD1+PCNA+). Expressions of (C) *Ascl1* and *NeuroD1* are reduced in CGP treated animals and expression of *Tbr2* is increased in DMCM treated animals. *Ngn2* does not get affected by GABA receptor antagonists. The relative mRNA expressions of markers were measured by quantitative real-time PCR in rat brain homogenates with DMCM 50 µg/kg (gray bars) or CGP 10 mg/kg (black bars) application relative to control (white bars). Bars represent the relative mRNA quantification based on internal standard *HPRT*. Data shown as mean ± SEM, $n = 9-10$. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control (one-way ANOVA for *Ascl1* and *Tbr2*, Kruskal-Wallis test for *NeuroD1*, Brown-Forsythe test for *Ngn2*).

up-regulated in type-2a cells (Pérez-Domínguez et al., 2018). *Ngn2* expression was not affected by the administration of GABA receptor antagonists (Figure 2C). The neuronal fate choice of intermediate progenitor cells leads to decreasing expression of Nestin while type-2b cells and neuroblast-like type-3 cells become NeuroD1 positive (Nicola et al., 2015). NeuroD1+ cells were reduced in all groups treated with CGP, indicating that intermediate progenitor cells at the differentiation stages of type-2b cells and neuroblast-like type-3 cells are especially affected by the GABA_B receptor blockade. The highest dose of CGP with 10 mg/kg also led to reduced proliferation of NeuroD1+/PCNA+ double-stained cells (Figures 2A,B). In line with these results, qPCR showed a significant reduction of *NeuroD1* at RNA gene expression level in CGP-treated animals. The expression of *Tbr2*, a broader marker for all type-2 cells, was not altered by CGP. DMCM-treatment on the contrary did not affect the number of NeuroD1+ and NeuroD1+/PCNA+ cells and did not change *Ascl1* or *NeuroD1* expression, but led to an increased *Tbr2* expression.

Postmitotic Neurons Are Less Affected by GABA Receptor Blockade

NeuN staining (Vieira et al., 2018) identified postmitotic neurons. The number of postmitotic neurons in the DG was not significantly affected by the administration of GABA receptor antagonists (Figures 3A,B). The expression of *Tbr1*, however, another marker for postmitotic neurons, was reduced in CGP-treated animals and increased in DMCM-treated ones. *NeuroD2*, a third marker for postmitotic neurons, showed decreased expression after CGP-treatment and was not affected by DMCM. *Prox1*, involved in granule cell maturation (Lavado et al., 2010), was not altered by the administration of GABA receptor antagonists (Figure 3C).

GABA_B Receptor Antagonists Affected Hippocampal Proliferation Capacity

The highly regulated ability of precursor cells to proliferate and self-renew is pivotal for the functioning of hippocampal neurogenesis up to adult age (Berg et al., 2018). In order to investigate the dependency of hippocampal proliferative

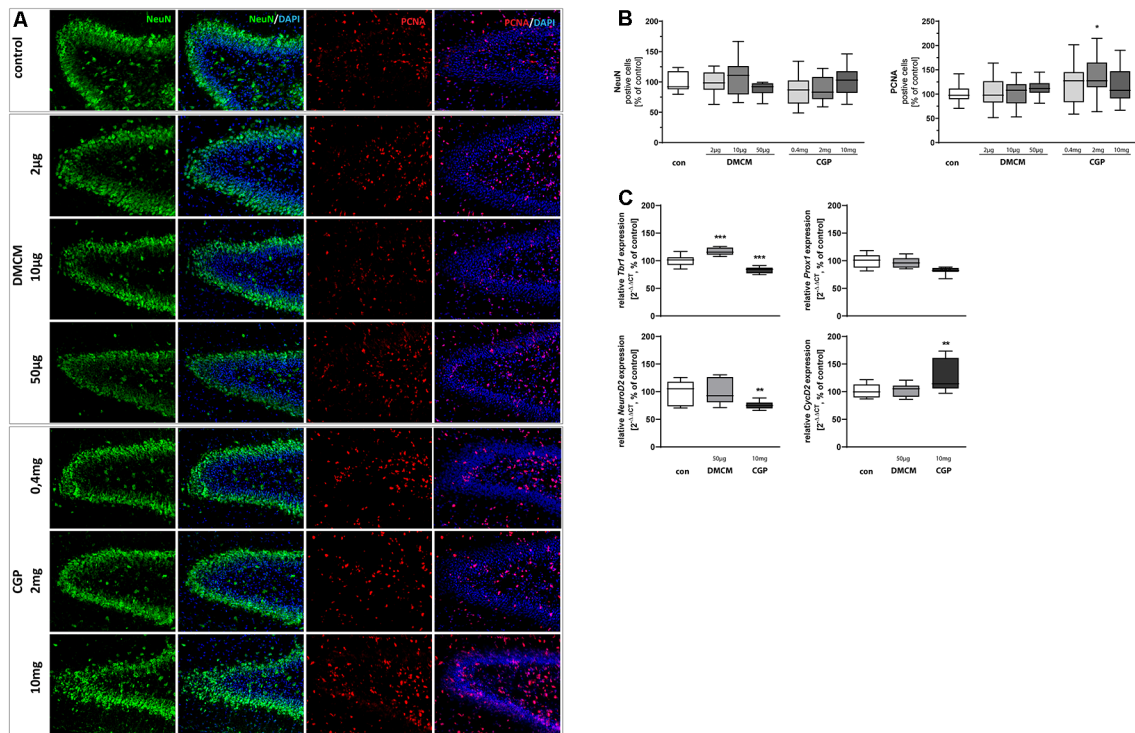


FIGURE 3 | Representative hippocampal paraffin sections (A) of control animals, DMCM hydrochloride (DMCM) in doses of either 2 μ g/kg, 10 μ g/kg or 50 μ g/kg, and CGP 35348 in doses of either 0.4 mg/kg or 2 mg/kg treated rat pups at P11 co-labeled with DAPI, NeuN, and PCNA. Application of GABA receptor antagonists did not affect cell counts for postmitotic NeuN+ neurons at the DG. Application of CGP 2 mg/kg led to an increased number of proliferating PCNA+ cells. Quantification of (B) NeuN and PCNA positive cells in sum of the DG in comparison to control group (100% white bars). Data are expressed relative to the control group as mean \pm SEM of $n = 10$ each group. The 100% values are for NeuN+ 143.0 cell counts and for PCNA+ 81.8 cell counts. * $p < 0.05$ vs. control (Brown-Forsythe test). Expressions of (C) *Tbr1* and *NeuroD2* are reduced and expression of *CycD2* is increased in CGP treated animals. Expression of *Tbr1* is increased in DMCM treated animals. GABA receptor antagonists do not affect the expression of *Prax1*. The relative mRNA expressions of markers were measured by quantitative real-time PCR in rat brain homogenates with DMCM 50 μ g/kg (gray bars) or CGP 10 mg/kg (black bars) application relative to control (white bars). Bars represent the relative mRNA quantification based on internal standard *HPRT*. Data shown as mean \pm SEM, $n = 9$ –10. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control (Brown-Forsythe test for *CycD2* and *NeuroD2*, one-way ANOVA for *Tbr1*).

capacity on GABA receptor blockade, slices were stained for the endogenous proliferation marker PCNA. The number of proliferating and therefore PCNA+ cells increased after treatment with 2 mg/kg CGP, while it was not altered in DMCM-treated groups (Figures 3A,B). It should be noted that despite a significant difference in the CGP-treated animals compared to the control, the variance is very high. Additionally, we observed an increased expression of *CycD2* in CGP-treated animals.

GABA_B Receptor Blockade Reduces Expression of Neurotrophins

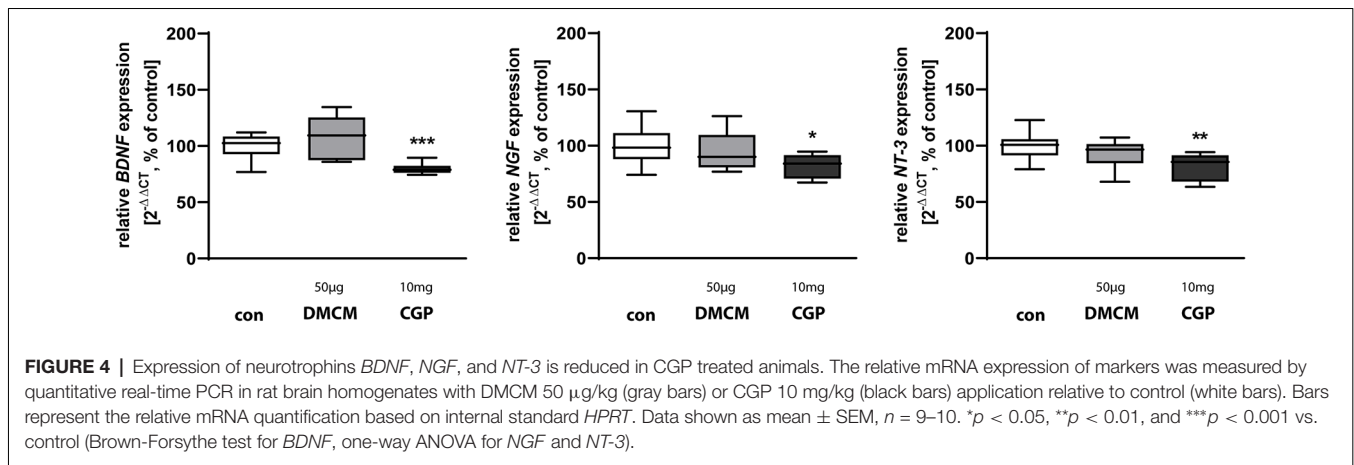
Neurotrophins play important roles in defining the hippocampal neurogenic niche (Faigle and Song, 2013). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) affects structural plasticity, dendritic spine growth, and has long-term effects on LTP and learning (Leal et al., 2015; Gonçalves et al., 2016). Nerve growth factor NGF as well as neurotrophin 3 NT-3 are involved in the regulation of synaptic plasticity (Leal et al., 2015). All tested neurotrophic factors, *BDNF*, *NGF*, and *NT-3*, were

downregulated in rats treated with CGP while DMCM did not alter the expression of any of these neurotrophic factors (Figure 4).

Briefly, we observed a reduction of NPC, especially of type-2b and type-3, caused by GABA_B receptor blockade. In addition, the proliferation of progenitors at these stages in hippocampal neurogenesis was diminished. Gene expression analysis revealed a reduced expression of multiple transcription factors involved in neuronal fate choice (see schematic diagram in Figure 5). After GABA_A receptor blockade, in contrast, there was no significant impairment of neurogenesis observed on a cellular level and changes in RNA-expression affected only *Tbr 1* and *Tbr 2*, leading to an overexpression of these factors.

DISCUSSION

In the present study, we investigated the effects of a GABA_A and GABA_B receptor antagonist on postnatal hippocampal neurogenesis in newborn rats, during the developmental depolarizing-to-hyperpolarizing switch in response to the



neurotransmitter GABA (Ben-Ari, 2018). Our data suggest that antagonizing GABA_B receptor activity impaired the progression of neural progenitors to mitotic immature neurons, reduced the expression of neurotrophins, and increased the proliferation capacity. In contrast, antagonizing GABA_A receptors did not affect postnatal hippocampal neurogenesis at a cellular level.

GABA is one of the most abundant neurotransmitters in the central nervous system. GABAergic neurons are the main source of GABA; additionally, synthesis occurs in glial cells (Angulo et al., 2008; Héja et al., 2012). The subtypes of GABA_B receptors, GABA_{B1a/b} and GABA_{B2}, were shown to be located both pre- and postsynaptically, indicating a more modulatory function in the developing brain (López-Bendito et al., 2004; Evensen et al., 2020). Various experimental models suggest that GABA_B receptor antagonists modulate hippocampal-linked learning, memory, and behavior (Cryan and Kaupmann, 2005; Heaney and Kinney, 2016).

During neuronal lineage development, intermediate progenitor cells have been described to successively express a cascade of transcription factors starting with *Pax6* expression in type-1 and type-2a cells, and further involving *Ngn2*, *Tbr2*, *NeuroD1*, *Tbr1*, and *Prox1*, which is expressed from the stage of type-2b cells onwards (see schematic overview in Figure 5; Gonçalves et al., 2016; Pérez-Domínguez et al., 2018; Hevner, 2019). First, GABA_B receptor blockade reduced the total Nestin+ and proliferating Nestin+ cells in the DG, depending on concentration. Nestin is widely used as a marker for proliferating neuroepithelial and progenitor cells as well as some astrocytes in the hippocampus (Von Bohlen und Halbach, 2011; Wilhelmsson et al., 2019). Further, Nestin is essential for the survival and self-renewal of NSC (Park et al., 2010). Quiescent type-1 NSC and active NSC differ in frequency of proliferation, while both cell types share the characteristic expression of the glial cell marker *GFAP* and neural progenitor marker Nestin (Lugert et al., 2010). Neither *GFAP* nor the astrocytic markers *SCL1a3/GLAST* were impaired in gene expression by the antagonization of the GABA_B receptor. Sox2-expressing cells in the SGZ generate differentiated and identical cells, indicating their multipotent properties and importance for self-renewal (Suh et al., 2007). Similar to Sox2, *Hes5*-positive cells specifically inhabit the SGZ,

with the property of NPC in the neurogenic niche (Lugert et al., 2010). Both transcription factors of type-1 cells, *Sox2* and *Hes5*, were not affected by the blockade of GABA. This is in line with the thesis that type-1 NSCs are not affected as a whole, while the proliferating subpopulation of type-1 NSC depends on GABAergic signaling.

It is interesting that *Pax6*, classifying newly born cells from the differentiation state in SGZ and regulating self-renewal of NSC (Maekawa et al., 2005), was significantly reduced by the performed GABA_B receptor blockade. The impact on Nestin+ NSC and *Pax6* expression suggests that GABA_B receptor-mediated GABA signals may be central in determining the neuronal fate and proliferation of NSCs. NSCs self-renew to generate asymmetrically a new daughter NSC and a daughter NSC with properties of intermediate NPC (type-2 cells; Gonçalves et al., 2016). The maintenance of pluripotency in NPC by Sox2 is well-defined (Favaro et al., 2009). Sox2 binds to the regulatory regions of a number of genes involved in neuronal differentiation (Lodato et al., 2013), including proneural genes such as *Ascl1* (Vasconcelos and Castro, 2014) and *NeuroD1* (Kuwabara et al., 2009). The substitution of Sox2 by neurogenic signals at the regulatory promoter regions is required for activation of proneural genes and therefore downregulation of Sox2 a precondition for further neuronal differentiation (Kuwabara et al., 2009). GABA antagonists did not interfere with the level of Sox2 expression in the postnatal DG.

One step further in neuronal differentiation, changes caused by GABA receptor blockade were detectable. Mediators of intermediate progenitor cells, *Ascl1*, *NeuroD1* as well as proliferating *NeuroD1*+ cells were significantly decreased under GABA_B receptor blockade. *Ascl1* is a proneural transcription factor and is expressed in mitotic NPC (Uda et al., 2007). The transcription factor *NeuroD1*, which may act as a neuronal determination gene, is expressed in the middle and late stages of NPC (Von Bohlen und Halbach, 2011). Interestingly, *Ascl1* is able to play two opposing roles. On the one hand, it promotes proliferation and on the other supports cell-cycle exit and differentiation (Andersen et al., 2014). *Ascl1* enables the transcription of multiple proneuronal target genes (Vasconcelos and Castro, 2014). A decreased expression of *Ascl1* after GABA_B

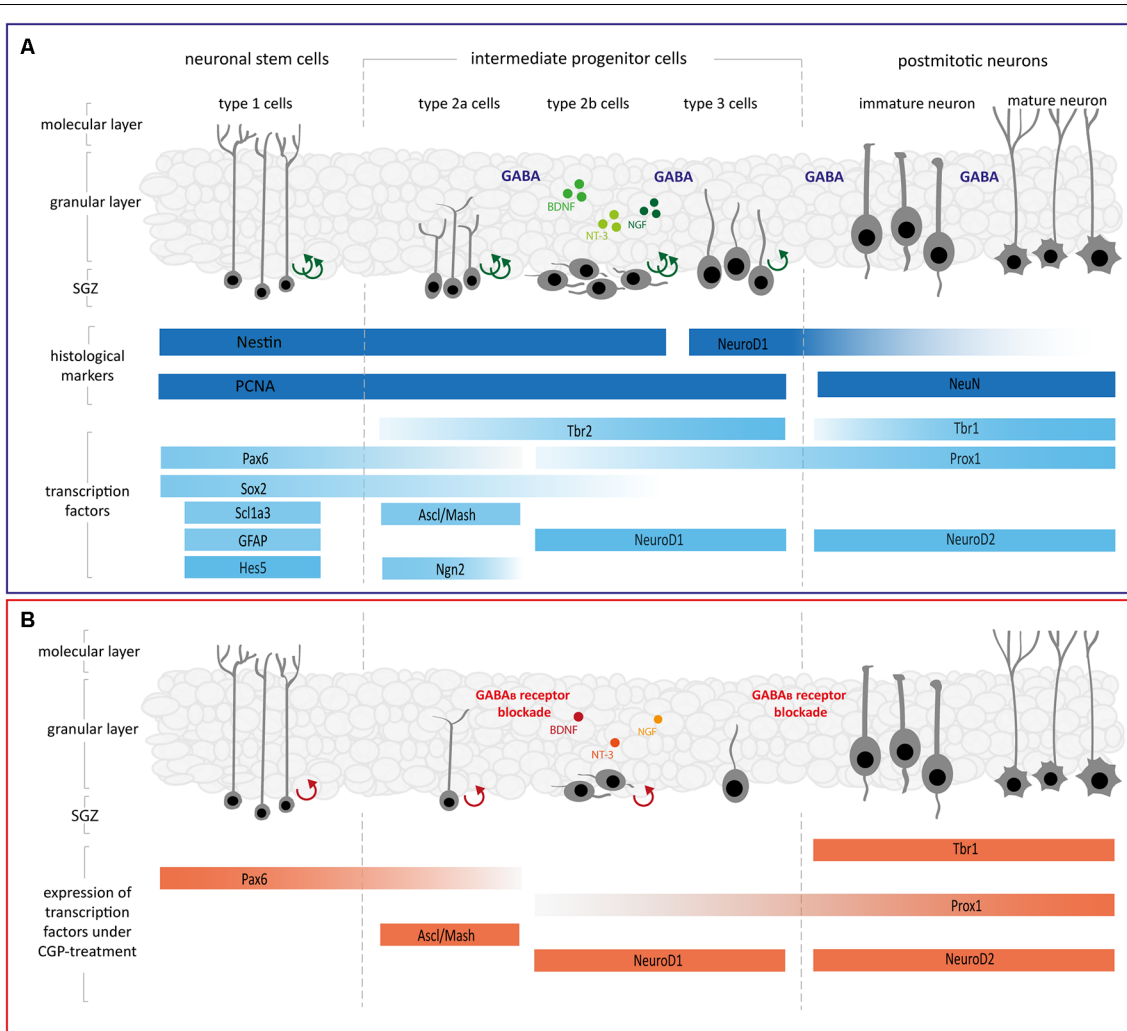


FIGURE 5 | (A) Schematic diagram illustrating the different phases of neurogenesis in the DG. Asymmetrically dividing neuronal stem cells situated at the subgranular zone (SGZ) of the DG give rise to intermediate progenitor cells type-2a, type-2b, and type-3, which are highly proliferative, and their progeny determined for neuronal fate. Following further differentiation, intermediate progenitors extend processes, mature, exit the cell cycle and finally differentiate into mature neurons. Most of the regulators play an important role in self-renewal, proliferation, and fate specification during neurogenesis (see main text for details, modeled after Roybon et al., 2009; Lugert et al., 2010; Berg et al., 2018; Vieira et al., 2018; Hevner, 2019). **(B)** Schematic diagram depicting how the GABA_B receptor blockade changes single steps of hippocampal neurogenesis. GABA_B receptor blockade with CGP led to reductions in proliferating Nestin⁺ as well as NeuroD1⁺ cells, furthermore, expression of *Pax6*, *Ascl1*, *NeuroD1*, *Tbr1*, *Prox1*, and *NeuroD2* was decreased (see main text for details, modeled after Roybon et al., 2009; Lugert et al., 2010; Berg et al., 2018; Vieira et al., 2018; Hevner, 2019). Abbreviations: *Ascl1*, achaete-scute family bHLH transcription factor 1; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; *CycD2*, cyclin D2; GABA, γ -aminobutyric acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; *Hes5*, hairy-enhancer-of-split 5; *NeuroD1/2*, neurogenic differentiation 1/2; *Ngn2*, neurogenin 2; NGF, nerve growth factor; NT-3, neurotrophin 3; *Pax6*, paired box 6; *Prox1*, prospero homeobox 1; *Sox2*, SRY-box transcription factor 2; *Scl1a3*, solute carrier family 1 member 3; SGZ, subgranule zone; *Tbr1/2*, T-box brain transcription factor 1/2.

receptor blockade might explain the observed delay in NPC differentiation. This does not necessarily lead to decreasing proliferation *per se*. Although the proportion of mitotic maturing neurons (NeuroD1⁺/PCNA⁺ cells) was reduced, the overall proliferation capacity (PCNA⁺ cells, *CycD2*) was induced. This could be due to *Ascl1*'s interaction with Notch target genes in neural precursor cells *via* downstream mediators (Andersen et al., 2014), similar to *Hes5* (Lugert et al., 2010). *Hes* proteins activated *via* the Notch signaling pathway act as repressors of proneural transcription factors. Due to their self-regulation and

short half-lives, the cellular expression of *Hes* proteins is not constant and thus leads to fluctuating expression of downstream target genes, such as *Ngn2* and *Ascl1* (Lugert et al., 2010; Vasconcelos and Castro, 2014). Expressions that can be changed in this way could promote proliferation, while steady conditions lead to the progression of differentiation.

Current measurement technology at a certain point is not sufficiently capable of detecting oscillating expressions of these mediators. However, our findings support the hypothesis that *NeuroD1*, which is directly regulated by

Pax6 (Thakurela et al., 2016), and *Ascl1* are significantly reduced in expression, while proliferation is increased. Typically, *NeuroD1* expression peaks in early neuroblasts/type-2b and type-3 cells. Diminished *NeuroD1* expression seems to be partly responsible for the stagnation of differentiation and progression of neurogenesis (Gao et al., 2009).

A possible explanation for the observed general boost in proliferation capacity beyond the transcriptional regulation of hippocampal neurogenesis might be GABAergic signaling itself. GABAergic signals through GABA receptors as well as the loss of GABA_A and GABA_B receptor subtypes were described to increase proliferation of NSC in the adult DG (Song et al., 2012; Giachino et al., 2014). GABA_B receptor function is associated with suppressed proliferation of adult hippocampal neurogenesis (Felice et al., 2012). The impact of GABA_B receptor blockade already in postnatal development with excitatory GABA on NPC associate transcription factors suggests that GABA_B receptor-mediated signals may be important for initiating transcription of proneural mediators and generate mitotic neuroblasts.

Nevertheless, mitotic immature neuroblasts/type-2b cells express *Tbr2* (Hodge et al., 2012). Before the neuroblasts exit the cell cycle to become mature granular neurons, they start expressing *Tbr1*, *Prox1*, and *NeuroD2* (Gonçalves et al., 2016). Downregulation of *Tbr2* is the precondition for NPC to differentiate into postmitotic immature neurons and this coincides with upregulation of *Tbr1*, which is strongly associated with new mature neurons (Hodge et al., 2012). Late neuroblasts/type-3 cells and postmitotic granular neurons express the transcription factor *Prox1* (Li et al., 2009). *NeuroD2* induces a neural phenotype, while its possible involvement in terminal differentiation is still being investigated (Ravanpay et al., 2010). Considering the crucial tasks of these transcription factors for final neurogenic termination, a significant downregulation of gene expression would suggest a reduction in the number of mature neurons. Controversially, GABA_B receptor antagonization sustainably reduced the expression of relevant transcription factors (*Prox1*, *Tbr1*, *NeuroD2*), but did not affect the NeuN+ neurons in DG.

Prox1 was applied as a dentate granule neuron lineage marker (Rubin and Kessaris, 2013). Several studies (Lavado et al., 2010; Iwano et al., 2012) suggested *Prox1* to act pleiotropically and modulate multiple targets as well as signaling pathways possibly through dysregulation of Notch signaling. Postnatal deletion as well as a conditional knockout of *Prox1* in mice results in decreased counts of NPC subtypes (type-2a/b cells) and NSC/type-1 cells (Lavado et al., 2010). Further, overexpression of *NeuroD1*, but not of either *Ngn2* or *NeuroD2*, was able to drive the exclusive production of new neurons in the adult hippocampus (Richetin et al., 2015). A milieu dominated by the differentiation-driving effects of *NeuroD1* might overlay the stage-specific action of *NeuroD2*. Particularly since *NeuroD2* is required for the survival of hippocampal neurons (Olson et al., 2001), one might expect apoptosis-associated mediators to increase; however, in our study neither the expression profiles of apoptosis-associated mediators, effector caspase 3 (*Casp3*), and apoptosis-inducing factor (*AIF*), nor the total DAPI+ cell

counts showed changes after switching off GABA receptor signaling compared to the control animals (see **Supplementary Figures 1A,B**).

The temporal delay in the differentiation of the NPC in our model of GABA_B receptor blockade is in line with a hypothesis formulated by Lugert et al. (2012). Instead of the amplification of type-2a intermediate progenitors as seen previously, though, they proposed that divisions of neural stem cells and early neuroblasts drive DG neurogenesis (Lugert et al., 2012). Mitotic NSCs in the DG provide neuronal progenitor expansion and initiate neurogenic differentiation, a process requiring more than 3 weeks under homeostatic conditions. After the initiation of neurogenesis, cells remain at the immature NPC developing stage for some weeks. In this phase, neuroblasts adapt to physiological or pathophysiological stimuli that may affect their maturation and differentiation. The NPC population reacts to specific noxae and, if required, rapidly initiates the production of many neurons (Dranovsky et al., 2011; Lugert et al., 2012). The hypothesis that NPCs remain in an immature state for a long period and retain their ability to expand neuronal cells and continue neurogenesis in order to quickly provide missing neurons when needed could support our observation of an unchanged population of mature neurons after GABA receptor blockade despite massive impairment of intermediate neurons. A hypothetical subsequent effect on the proportion of mature neurons resulting from a reduced differentiation capacity of maturing intermediary neurons did not occur at time P15 (see **Supplementary Figure 2**).

The described impact of transcription factors associated with mature granular neurons suggests that GABA_B receptor-mediated GABA signals might be important for the maintenance of the NPC cell pool by the initiation of pleiotropic interactions. Since glial markers were not influenced by GABA_A or GABA_B receptor antagonization, only the neural line seems to be affected. Interestingly GABA_A receptor blockade did not lead to any changes similar to those caused by GABA_B receptor blockade. Instead, it resulted in an overexpression of *Tbr2* and *Tbr1*. There seem to be essential differences regarding the influence of GABA and its mediation *via* the respective receptors. Considering the GABA receptor density, a significant increase of GABA_A receptor occurs between P10 and P20, while the GABA_B receptor density peaks between P0 and P10 at P5 (Behuet et al., 2019). Due to the animal model we used, an effect of GABA blockade *via* the GABA_B receptor seems more probable. GABA-mediated effects *via* the GABA_A receptor require further investigation.

Intrinsic factors including neurotransmitters (Catavero et al., 2018), hormones (Triviño-Paredes et al., 2016), and neurotrophic factors (Lee et al., 2002) influence hippocampal neurogenesis. Neurotrophic factors, such as NT-3, NGF, and BDNF, are key players in the stimulation of NSC proliferation and differentiation (Ding et al., 2013). Interestingly, GABA_B receptor peak coincides with the time course of synaptogenesis, which is regulated by neurotrophins such as BDNF (Gaiarsa and Porcher, 2013). Coordinated effects of GABA and neurotrophins are important for the long-term survival of newborn neurons (Vilar and Mira, 2016). Waterhouse et al. (2012) suggested a reciprocal interaction between

neurotransmitters and neurotrophic factors and showed that BDNF promotes progenitor cell differentiation and maturation by enhancing the release of GABA in the SGZ, resulting in increased differentiation and maturation of progenitor cells. Glial cells and GABAergic neurons are not sources for the secretion of neurotrophins themselves. BDNF is provided by pyramidal neurons or mossy fibers of hippocampal granular cells (Danzer and Mcnamara, 2004). BDNF is a crucial regulator of synapse development (Cohen-Cory et al., 2010) and shapes the development of neuronal circuits, as well as the construction of inhibitory connections throughout life (Gottmann et al., 2009). Similar findings were reported for NGF and NT-3, both involved in several critical processes in the developing brain (Shimazu et al., 2006; Frielingsdorf et al., 2007). We found that the inactivation of metabotropic GABA_B receptors downregulates the transcription of *BDNF*, *NGF*, and *NT-3*. Currently, studies on the effects of GABA_B receptor blockade on the neurotrophic response are limited. Overexpression of BDNF in hippocampal cultures results in an earlier maturation of inhibitory synapses by inducing both presynaptic and postsynaptic structural and functional modifications to enhance GABAergic transmission (Vicario-Abejón et al., 1998). Badurek et al. (2020) show that early disruption of *Trkb* signaling, the receptor for BDNF, from immature mouse hippocampal dentate granule cells affects the integration and maturation of newly formed DGCs in the hippocampal circuitry, and drives a premature shift from depolarizing to hyperpolarizing GABAergic actions. Conditional NT-3 knockout in mice goes along with an impairment of neuronal differentiation (Shimazu et al., 2006). Intracerebroventricular treatment with NGF increases hippocampal neurogenesis and enhances the survival of new neurons in young and aged rats (Frielingsdorf et al., 2007). Likewise, following GABA_B receptor activation and regulated secretion of BDNF increases the number of postsynaptic GABA_A receptor subunits (Kuczewski et al., 2011). This implies complex interactions between GABA_B receptor activation and neurotrophins to contribute to the functional and structural maturation of the developing hippocampus. A decreased neurotrophic response following GABA_B receptor antagonization appears to be consistent with the stagnant maturation of NPC. Neurotrophins may have important roles in hippocampal neurogenesis and developmental plasticity (Porcher et al., 2018). Imbalance in neurotransmission seems to lead to the reduction of neurotrophin transcription; therefore, further investigations on the precise mechanisms of the relationship between neurotrophic growth factors and GABAergic transmission are required.

Taken together, GABA influences the development and functioning of the GABAergic network mainly *via* GABA_B receptor during the first 10 postnatal days. As a result of the limited signal transduction of GABA *via* the GABA_B receptor, impairment of neurogenesis advanced, which did not affect the final termination to mature neurons, and diminished neurotrophin signals. This could imply that although antagonization of GABA_B receptors recruited quiescent cells to the active proliferative stem cell pool, progression towards terminal differentiation was not induced. This is in line

with Giachino et al.'s (2014) proposal that GABA_B receptor activity controls the number of proliferating NPC in the adult hippocampus. In sum, GABA and the GABA_B receptors' transmission affect neural stem cell and progenitor cell proliferation in the developing hippocampus.

The involvement of GABA receptors in neurogenesis was linked to the modulation of cognitive processes, like memory formation, executive function, learning, and intelligence. Imbalances during GABAergic transmission in neuronal circuits, such as drugs or oxygen, can affect these vulnerable phases of brain development and disrupt homeostatic control (Vertkin et al., 2015; Friedman and Kahen, 2019). Failure in neuronal homeostasis has been linked to pathophysiological mechanisms of various brain disorders (Marín, 2012; Kim and Yoon, 2017), like autism, hyperactivity, inattention, social and emotional incompetence, which are also associated with preterm birth (Fatemi et al., 2009; Arpino et al., 2010; Hashemi et al., 2017). For a deeper understanding of postnatal brain development and improving the understanding of GABA signaling in correspondence to preterm birth, further analysis will be required to establish which cues regulate the various stages of neurogenesis beyond NSC expansion, NPC proliferation, and maturation as well as the survival of newly formed neurons. These may open new therapeutic strategies to alleviate behavioral impairments and neurological disorders, perhaps in part as sequela of early derangement in GABAergic systems.

Limitations of the Study

Altogether, these observations point to GABA as one of the major players in the early formation of neuronal circuits in the developing brain. Since GABA_B receptors are expressed in hippocampal progenitor cells as well as throughout the adult neurogenic lineage, it is possible that antagonization of GABA receptor signaling affects non-hippocampal neuronal cells. For gene expression analysis, we used the complete hemisphere and removed the olfactory bulb and cerebellum. The data collected cannot be adequately and exclusively associated with the hippocampus and we are aware that the transcriptional markers are also expressed in other brain regions of the developing brain (Rodier, 1980; Rice and Barone, 2000; Lavado and Oliver, 2007; Bedogni et al., 2010; Hsieh, 2012; Miyoshi et al., 2015). The main proliferating niche during the phase of rapid brain growth is the DG (Stefovska et al., 2008). A study by Stefovska et al. (2008) showed in the developing brain (P0 to P15), that the *in vivo* modulation of GABA receptors changes the proliferation capacity in different brain regions, such as cortical sections, thalamus, and in the DG (SGZ and granular cell layer) to the same extent. Not only newly generated neurons in the proliferative neurogenic niches of the immature brain express GABA receptors, so that an impairment after systemic administration of GABA antagonists or agonists can act on different reaction pathways, on different cell types and can affect cells practically in all parts of postnatal brain. Nevertheless, postnatal cell proliferation is age-dependent and most pronounced in the cerebellum and the SGZ of the DG. Outside the cerebellum and DG, proliferating new neurons

become non-neuronal cells, like glia cells. The neurotransmitter GABA constitutes a developmental signal during stages of embryonic neurogenesis, progenitor proliferation, neuronal migration, and neurite outgrowth (Wang and Kriegstein, 2009; Xing and Huttner, 2020). Differences in the transcription of neurogenesis-associated genes and specifically neuronal lineage associated cells are then less expected in the whole brain RNA or protein extract (if removal of olfactory bulb and cerebellum) as all are affected to the same extent. Significant change of transcript levels may prove the influence of GABAergic interruptions in the neonatal brain, including possible already migrated cells, in whole hemisphere homogenate. Further studies could advance our observed data with region-specific transcription analyses in the developing brain.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by LAGeSo, Berlin, Germany, approval number G-0075/18.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TScheuer and SE conceived the ideas. TScheuer designed the experiments. SE, CG, and TScheuer executed the experiments. CG and SE wrote the first draft of the manuscript and approved the final draft. TScheuer and SE performed the animal studies. CG performed and analyzed immunohistological staining and qPCR. TSchmitz and CB revised the manuscript and contributed to the critical discussion. All authors have contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Altman, J., and Bayer, S. A. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301, 365–381. doi: 10.1002/cne.903010304
- Amador-Arjona, A., Cimadamore, F., Huang, C. T., Wright, R., Lewis, S., Gage, F. H., et al. (2015). SOX2 primes the epigenetic landscape in neural precursors enabling proper gene activation during hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, E1936–E1945. doi: 10.1073/pnas.1421480112
- Anacker, C., and Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility—linking memory and mood. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 335–346. doi: 10.1038/nrn.2017.45
- Andersen, J., Urbán, N., Achimastou, A., Ito, A., Simic, M., Ullom, K., et al. (2014). A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells. *Neuron* 83, 1085–1097. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.004
- Angulo, M. C., Le Meur, K., Kozlov, A. S., Charpak, S., and Audinat, E. (2008). GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* 86, 297–303. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.08.002
- Arpino, C., Compagnone, E., Montanaro, M. L., Cacciatore, D., De Luca, A., Cerulli, A., et al. (2010). Preterm birth and neurodevelopmental outcome: a review. *Childs Nerv. Syst.* 26, 1139–1149. doi: 10.1007/s00381-010-1125-y

FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHE 2078/2-1) and received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

ACKNOWLEDGMENTS

Technical support and advice of Evelyn Strauß and Ruth Hermann are gratefully acknowledged.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.651072/full#supplementary-material>.

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 | Quantification of (A) DAPI positive cells in sum of the DG of control animals (100% white bars), DMCM hydrochloride (DMCM) in doses of either 2 µg/kg, 10 µg/kg or 50 µg/kg, and CGP 35348 in doses of either 0.4 mg/kg, 2 mg/kg or 10 mg/kg treated rat pups at P11. Data are expressed relative to the control group as mean ± SEM of *n* = 10 each group. The 100% values are 594.1 cell counts (Brown-Forsythe test). Expressions of (B) *AIF* and *Casp3* are not affected by the application of DMCM or CGP. The relative mRNA expressions of markers were measured by quantitative real-time PCR in rat brain homogenates with DMCM 50 µg/kg (gray bars) or CGP 10 mg/kg (black bars) application relative to control (white bars). Bars represent the relative mRNA quantification based on internal standard *HPRT*. Data shown as mean ± SEM, *n* = 9–10 (one-way ANOVA).

SUPPLEMENTARY FIGURE 2 | Representative hippocampal paraffin sections (A) of control animals, DMCM hydrochloride (DMCM) in dose of 50 µg/kg and CGP 35348 in dose of 10 mg/kg treated rat pups at P15 co-labeled with DAPI and NeuN. Application of GABA receptor antagonists did not affect cell counts for postmitotic NeuN+ neurons at the DG. Quantification of (B) NeuN positive cells in sum of the DG in comparison to control group (100% white bars). Data are expressed relative to the control group as mean ± SEM of *n* = 10 each group. The 100% values are for NeuN+ 187.3 cell counts (one-way ANOVA).

- Badurek, S., Griguoli, M., Asif-Malik, A., Zonta, B., Guo, F., Middei, S., et al. (2020). Immature dentate granule cells require Ntrk2/Trkb for the formation of functional hippocampal circuitry. *iScience* 23:101078. doi: 10.1016/j.isci.2020.101078
- Basu, S. K., Pradhan, S., Du Plessis, A. J., Ben-Ari, Y., and Limperopoulos, C. (2021). GABA and glutamate in the preterm neonatal brain: *in-vivo* measurement by magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage* 238:118215. doi: 10.1016/j.neuroimage.2021.118215
- Basu, S. K., Pradhan, S., Jacobs, M. B., Said, M., Kapse, K., Murnick, J., et al. (2020). Age and sex influences gamma-aminobutyric acid concentrations in the developing brain of very premature infants. *Sci. Rep.* 10:10549. doi: 10.1038/s41598-020-67188-y
- Bedogni, F., Hodge, R. D., Elsen, G. E., Nelson, B. R., Daza, R. A., Beyer, R. P., et al. (2010). Tbr1 regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 13129–13134. doi: 10.1073/pnas.1002285107
- Behuet, S., Cremer, J. N., Cremer, M., Palomero-Gallagher, N., Zilles, K., and Amunts, K. (2019). Developmental changes of glutamate and GABA receptor densities in wistar rats. *Front. Neuroanat.* 13:100. doi: 10.3389/fnana.2019.00100
- Ben-Ari, Y. (2018). Oxytocin and vasopressin, and the GABA developmental shift during labor and birth: friends or foes? *Front. Cell. Neurosci.* 12:254. doi: 10.3389/fncel.2018.00254

- Berg, D. A., Belnoue, L., Song, H., and Simon, A. (2013). Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development* 140, 2548–2561. doi: 10.1242/dev.088005
- Berg, D. A., Bond, A. M., Ming, G. L., and Song, H. (2018). Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from? *Fl1000Res.* 7:277. doi: 10.12688/fl1000research.12684.1
- Bjornsson, C. S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., and Temple, S. (2015). It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Dev. Cell* 32, 435–446. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.010
- Brydges, C. R., Landes, J. K., Reid, C. L., Campbell, C., French, N., and Anderson, M. (2018). Cognitive outcomes in children and adolescents born very preterm: a meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol.* 60, 452–468. doi: 10.1111/dmnc.13685
- Catavero, C., Bao, H., and Song, J. (2018). Neural mechanisms underlying GABAergic regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Cell Tissue Res.* 371, 33–46. doi: 10.1007/s00441-017-2668-y
- Cellot, G., and Cherubini, E. (2013). Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Front. Neural Circuits* 7:136. doi: 10.3389/fncir.2013.00136
- Cohen-Cory, S., Kidane, A. H., Shirkey, N. J., and Marshak, S. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev. Neurobiol.* 70, 271–288. doi: 10.1002/dneu.20774
- Cryan, J. F., and Kaupmann, K. (2005). Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 36–43. doi: 10.1016/j.tips.2004.11.004
- Danzer, S. C., and Mcnamara, J. O. (2004). Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 24, 11346–11355. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3846-04.2004
- DeCarolis, N. A., Mechanic, M., Petrik, D., Carlton, A., Ables, J. L., Malhotra, S., et al. (2013). *In vivo* contribution of nestin- and GLAST-lineage cells to adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 23, 708–719. doi: 10.1002/hipo.22130
- Deng, W., Aimone, J. B., and Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350. doi: 10.1038/nrn2822
- Ding, J., He, Z., Ruan, J., Ma, Z., Liu, Y., Gong, C., et al. (2013). Role of ciliary neurotrophic factor in the proliferation and differentiation of neural stem cells. *J. Alzheimers Dis.* 37, 587–592. doi: 10.3233/JAD-130527
- Dobbing, J., and Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79–83. doi: 10.1016/0378-3782(79)90022-7
- Dranovsky, A., Picchini, A. M., Moadel, T., Sisti, A. C., Yamada, A., Kimura, S., et al. (2011). Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron* 70, 908–923. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.022
- Duerden, E. G., Guo, T., Dodbiba, L., Chakravarty, M. M., Chau, V., Poskitt, K. J., et al. (2016). Midazolam dose correlates with abnormal hippocampal growth and neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Ann. Neurol.* 79, 548–559. doi: 10.1002/ana.24601
- Endesfelder, S., Strauss, E., Bendix, I., Schmitz, T., and Buhner, C. (2020). Prevention of oxygen-induced inflammatory lung injury by caffeine in neonatal rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020:3840124. doi: 10.1155/2020/3840124
- Endesfelder, S., Weichelt, U., Schiller, C., Winter, K., Von Haefen, C., and Buhner, C. (2018). Caffeine protects against anticonvulsant-induced impaired neurogenesis in the developing rat brain. *Neurotox. Res.* 34, 173–187. doi: 10.1007/s12640-018-9872-8
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., et al. (2005). Pax6, Tbr2 and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* 25, 247–251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005
- Evenseth, L. S. M., Gabrielsen, M., and Sylte, I. (2020). The GABA(B) receptor-structure, ligand binding and drug development. *Molecules* 25:3093. doi: 10.3390/molecules25133093
- Faigle, R., and Song, H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2435–2448. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.002
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., and Thuras, P. D. (2009). GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *J. Autism Dev. Disord.* 39, 223–230. doi: 10.1007/s10803-008-0646-7
- Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A. L. M., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., et al. (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of SHH. *Nat. Neurosci.* 12, 1248–1256. doi: 10.1038/nn.2397
- Felice, D., O'Leary, O. F., Pizzo, R. C., and Cryan, J. F. (2012). Blockade of the GABA(B) receptor increases neurogenesis in the ventral but not dorsal adult hippocampus: relevance to antidepressant action. *Neuropharmacology* 63, 1380–1388. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.066
- Friedman, L. K., and Kahen, B. A. (2019). Chronic subconvulsive activity during early postnatal life produces autistic behavior in the absence of neurotoxicity in the juvenile weaning period. *Behav. Brain Res.* 374:112046. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112046
- Frielingsdorf, H., Simpson, D. R., Thal, L. J., and Pizzo, D. P. (2007). Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol. Dis.* 26, 47–55. doi: 10.1016/j.nbd.2006.11.015
- Gaetz, W., Bloy, L., Wang, D. J., Port, R. G., Blaskey, L., Levy, S. E., et al. (2014). GABA estimation in the brains of children on the autism spectrum: measurement precision and regional cortical variation. *NeuroImage* 86, 1–9. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.068
- Gaiarsa, J.-L., and Porcher, C. (2013). Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development. *Front. Cell. Neurosci.* 7:206. doi: 10.3389/fncel.2013.00206
- Gao, Z., Ure, K., Ables, J. L., Lagace, D. C., Nave, K. A., Goebbels, S., et al. (2009). Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* 12, 1090–1092. doi: 10.1038/nn.2385
- Ge, S., Goh, E. L., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–593. doi: 10.1038/nature04404
- Giachino, C., Barz, M., Tchorz, J. S., Tome, M., Gassmann, M., Bischofberger, J., et al. (2014). GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development* 141, 83–90. doi: 10.1242/dev.102608
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., and Gage, F. H. (2016). Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell* 167, 897–914. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.021
- Gottmann, K., Mittmann, T., and Lessmann, V. (2009). BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp. Brain Res.* 199, 203–234. doi: 10.1007/s00221-009-1994-z
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., and Martínez-Cerdeño, V. (2017). The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the prefrontal cortex in autism. *Cereb. Cortex* 27, 1931–1943. doi: 10.1093/cercor/bhw021
- Heaney, C. F., and Kinney, J. W. (2016). Role of GABA(B) receptors in learning and memory and neurological disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 63, 1–28. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.01.007
- Héja, L., Nyitrai, G., Kékesi, O., Dobolyi, A., Szabó, P., Fiáth, R., et al. (2012). Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biol.* 10:26. doi: 10.1186/1741-7007-10-26
- Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *J. Anat.* 235, 616–625. doi: 10.1111/joa.12939
- Hodge, R. D., Kowalczyk, T. D., Wolf, S. A., Encinas, J. M., Rippey, C., Enikolopov, G., et al. (2008). Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J. Neurosci.* 28, 3707–3717. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4280-07.2008
- Hodge, R. D., Nelson, B. R., Kahoud, R. J., Yang, R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., et al. (2012). Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J. Neurosci.* 32, 6275–6287. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0532-12.2012
- Hsieh, J. (2012). Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev.* 26, 1010–1021. doi: 10.1101/gad.187336.112
- Isokawa, M. (2016). Caffeine-induced suppression of gabaergic inhibition and calcium-independent metaplasticity. *Neural Plast.* 2016:1239629. doi: 10.1155/2016/1239629
- Iwano, T., Masuda, A., Kiyonari, H., Enomoto, H., and Matsuzaki, F. (2012). Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. *Development* 139, 3051–3062. doi: 10.1242/dev.080002

- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447–452. doi: 10.1016/j.tins.2004.05.013
- Khirug, S., Huttu, K., Ludwig, A., Smirnov, S., Voipio, J., Rivera, C., et al. (2005). Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *Eur. J. Neurosci.* 21, 899–904. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03886.x
- Kim, Y. S., and Yoon, B.-E. (2017). Altered GABAergic signaling in brain disease at various stages of life. *Exp. Neurobiol.* 26, 122–131. doi: 10.5607/en.2017.26.3.122
- Kuczewski, N., Fuchs, C., Ferrand, N., Jovanovic, J. N., Gaiarsa, J. L., and Porcher, C. (2011). Mechanism of GABAB receptor-induced BDNF secretion and promotion of GABAA receptor membrane expression. *J. Neurochem.* 118, 533–545. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07192.x
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., et al. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 12, 1097–1105. doi: 10.1038/nn.2360
- Kwon, S. H., Scheinost, D., Lacadie, C., Benjamin, J., Myers, E. H., Qiu, M., et al. (2014). GABA, resting-state connectivity and the developing brain. *Neonatology* 106, 149–155. doi: 10.1159/000362433
- Lavado, A., and Oliver, G. (2007). Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain. *Dev. Dyn.* 236, 518–524. doi: 10.1002/dvdy.21024
- Lavado, A., Lagutin, O. V., Chow, L. M. L., Baker, S. J., and Oliver, G. (2010). Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol.* 8:e1000460. doi: 10.1371/journal.pbio.1000460
- Leal, G., Afonso, P. M., Salazar, I. L., and Duarte, C. B. (2015). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res.* 1621, 82–101. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.019
- Lee, J., Duan, W., and Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 82, 1367–1375. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01085.x
- Li, G., Kataoka, H., Coughlin, S. R., and Pleasure, S. J. (2009). Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development* 136, 327–335. doi: 10.1242/dev.025742
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lodato, M. A., Ng, C. W., Wamstad, J. A., Cheng, A. W., Thai, K. K., Fraenkel, E., et al. (2013). SOX2 co-occupies distal enhancer elements with distinct POU factors in ESCs and NPCs to specify cell state. *PLoS Genet.* 9:e1003288. doi: 10.1371/journal.pgen.1003288
- López-Bendito, G., Shigemoto, R., Kulik, A., Vida, I., Fairén, A., and Luján, R. (2004). Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* 14, 836–848. doi: 10.1002/hipo.10221
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., et al. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445–456. doi: 10.1016/j.stem.2010.03.017
- Lugert, S., Vogt, M., Tchorz, J. S., Müller, M., Giachino, C., and Taylor, V. (2012). Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of Ascl1(high) intermediate progenitors. *Nat. Commun.* 3:670. doi: 10.1038/ncomms1670
- Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S., et al. (2005). Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes Cells* 10, 1001–1014. doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00893.x
- Malik, S., Vinukonda, G., Vose, L. R., Diamond, D., Bhimavarapu, B. B., Hu, F., et al. (2013). Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. *J. Neurosci.* 33, 411–423. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4445-12.2013
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 107–120. doi: 10.1038/nrn3155
- Mercurio, S., Serra, L., and Nicolis, S. K. (2019). More than just stem cells: functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *Int. J. Mol. Sci.* 20:4540. doi: 10.3390/ijms20184540
- Miyoshi, G., Young, A., Petros, T., Karayannis, T., McKenzie Chang, M., Lavado, A., et al. (2015). Prox1 regulates the subtype-specific development of caudal ganglionic eminence-derived GABAergic cortical interneurons. *J. Neurosci.* 35, 12869–12889. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1164-15.2015
- Naaijen, J., Bralten, J., Poelmans, G., Glennon, J. C., Franke, B., and Buitelaar, J. K. (2017). Glutamatergic and GABAergic gene sets in attention-deficit/hyperactivity disorder: association to overlapping traits in ADHD and autism. *Transl. Psychiatry* 7:e999. doi: 10.1038/tp.2016.273
- Nicola, Z., Fabel, K., and Kempermann, G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front. Neuroanat.* 9:53. doi: 10.3389/fnana.2015.00053
- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 165–175. doi: 10.2147/NDT.S58841
- Olson, J. M., Asakura, A., Snider, L., Hawkes, R., Strand, A., Stoeck, J., et al. (2001). NeuroD2 is necessary for development and survival of central nervous system neurons. *Dev. Biol.* 234, 174–187. doi: 10.1006/dbio.2001.0245
- Paridaen, J. T., and Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* 15, 351–364. doi: 10.1002/embr.201438447
- Park, D., Xiang, A. P., Mao, F. F., Zhang, L., Di, C. G., Liu, X. M., et al. (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28, 2162–2171. doi: 10.1002/stem.541
- Peerboom, C., and Wierenga, C. J. (2021). The postnatal GABA shift: a developmental perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 124, 179–192. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.01.024
- Pérez-Domínguez, M., Tovar-Y-Romo, L. B., and Zepeda, A. (2018). Neuroinflammation and physical exercise as modulators of adult hippocampal neural precursor cell behavior. *Rev. Neurosci.* 29, 1–20. doi: 10.1515/revneuro-2017-0024
- Pocock, J. M., and Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30, 527–535. doi: 10.1016/j.tins.2007.07.007
- Porcher, C., Medina, I., and Gaiarsa, J. L. (2018). Mechanism of BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy and disease brains. *Front. Cell. Neurosci.* 12:273. doi: 10.3389/fncel.2018.00273
- Ravanpay, A. C., Hansen, S. J., and Olson, J. M. (2010). Transcriptional inhibition of REST by NeuroD2 during neuronal differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 178–189. doi: 10.1016/j.mcn.2010.03.006
- Ream, M. A., and Lehwald, L. (2018). Neurologic consequences of preterm birth. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18:48. doi: 10.1007/s11910-018-0862-2
- Rice, D., and Barone, S. Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108, 511–533. doi: 10.1289/ehp.00108s3511
- Richetin, K., Leclerc, C., Toni, N., Gallopin, T., Pech, S., Roybon, L., et al. (2015). Genetic manipulation of adult-born hippocampal neurons rescues memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain* 138, 440–455. doi: 10.1093/brain/awu354
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvoori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., et al. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255. doi: 10.1038/16697
- Rodier, P. M. (1980). Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev. Med. Child Neurol.* 22, 525–545. doi: 10.1111/j.1469-8749.1980.tb04363.x
- Rogers, C. E., Lean, R. E., Wheelock, M. D., and Smyser, C. D. (2018). Aberrant structural and functional connectivity and neurodevelopmental impairment in preterm children. *J. Neurodev. Disord.* 10:38. doi: 10.1186/s11689-018-9253-x
- Roybon, L., Hjält, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J. Y., and Brundin, P. (2009). Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 4:e4779. doi: 10.1371/journal.pone.0004779
- Rubin, A. N., and Kessaris, N. (2013). PROX1: a lineage tracer for cortical interneurons originating in the lateral/caudal ganglionic eminence and preoptic area. *PLoS One* 8:e77339. doi: 10.1371/journal.pone.0077339
- Salari, A.-A., and Amani, M. (2017). Neonatal blockade of GABA-A receptors alters behavioral and physiological phenotypes in adult mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 57, 62–71. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.01.007

- Scardigli, R., Bäumer, N., Gruss, P., Guillemot, F., and Le Roux, I. (2003). Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development* 130, 3269–3281. doi: 10.1242/dev.00539
- Schulte, J. T., Wierenga, C. J., and Bruining, H. (2018). Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 90, 260–271. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.05.001
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., and Noble-Haesslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 1–16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
- Shaw, J. C., Palliser, H. K., Walker, D. W., and Hirst, J. J. (2015). Preterm birth affects GABAA receptor subunit mRNA levels during the foetal-to-neonatal transition in guinea pigs. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 6, 250–260. doi: 10.1017/S204017441500069
- Shimazu, K., Zhao, M., Sakata, K., Akbarian, S., Bates, B., Jaenisch, R., et al. (2006). NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn. Mem.* 13, 307–315. doi: 10.1101/lm.76006
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52–64. doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.014
- Song, J., Olsen, R. H., Sun, J., Ming, G. L., and Song, H. (2016). Neuronal circuitry mechanisms regulating adult mammalian neurogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8:a018937. doi: 10.1101/cshperspect.a018937
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., et al. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150–154. doi: 10.1038/nature11306
- Stefovska, V. G., Uckermann, O., Czuczwar, M., Smitka, M., Czuczwar, P., Kis, J., et al. (2008). Sedative and anticonvulsant drugs suppress postnatal neurogenesis. *Ann. Neurol.* 64, 434–445. doi: 10.1002/ana.21463
- Steinhorn, R., McPherson, C., Anderson, P. J., Neil, J., Doyle, L. W., and Inder, T. (2015). Neonatal morphine exposure in very preterm infants-cerebral development and outcomes. *J. Pediatr.* 166, 1200.e4–1207.e4. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.02.012
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., and Gage, F. H. (2007). *in vivo* fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1, 515–528. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.002
- Takesian, A. E., and Hensch, T. K. (2013). Balancing plasticity/stability across brain development. *Prog. Brain Res.* 207, 3–34. doi: 10.1016/B978-0-444-63327-9.00001-1
- Tang, X., Jaenisch, R., and Sur, M. (2021). The role of GABAergic signalling in neurodevelopmental disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 22, 290–307. doi: 10.1038/s41583-021-00443-x
- Tanifuji, S., Akasaka, M., Kamei, A., Araya, N., Asami, M., Matsumoto, A., et al. (2017). Temporal brain metabolite changes in preterm infants with normal development. *Brain Dev.* 39, 196–202. doi: 10.1016/j.braindev.2016.10.006
- Thakurela, S., Tiwari, N., Schick, S., Garding, A., Ivanek, R., Berninger, B., et al. (2016). Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis. *Cell Discov.* 2:15045. doi: 10.1038/celldisc.2015.45
- Triviño-Paredes, J., Patten, A. R., Gil-Mohapel, J., and Christie, B. R. (2016). The effects of hormones and physical exercise on hippocampal structural plasticity. *Front. Neuroendocrinol.* 41, 23–43. doi: 10.1177/2048872620935399
- Uda, M., Ishido, M., and Kami, K. (2007). Features and a possible role of Mash1-immunoreactive cells in the dentate gyrus of the hippocampus in the adult rat. *Brain Res.* 1171, 9–17. doi: 10.1016/j.brainres.2007.06.099
- Vasconcelos, F. F., and Castro, D. S. (2014). Transcriptional control of vertebrate neurogenesis by the proneural factor Ascl1. *Front. Cell. Neurosci.* 8:412. doi: 10.3389/fncel.2014.00412
- Vertkin, I., Styr, B., Slomowitz, E., Ofir, N., Shapira, I., Berner, D., et al. (2015). GABA_B receptor deficiency causes failure of neuronal homeostasis in hippocampal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, E3291–E3299. doi: 10.1073/pnas.1424810112
- Vicario-Abejón, C., Collin, C., McKay, R. D., and Segal, M. (1998). Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18, 7256–7271. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-18-07256.1998
- Vieira, M. S., Santos, A. K., Vasconcelos, R., Goulart, V. A. M., Parreira, R. C., Kihara, A. H., et al. (2018). Neural stem cell differentiation into mature neurons: mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 36, 1946–1970. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.08.002
- Vilar, M., and Mira, H. (2016). Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles. *Front. Neurosci.* 10:26. doi: 10.3389/fnins.2016.00026
- Von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 345, 1–19. doi: 10.1007/s00441-011-1196-4
- Wang, D. D., and Kriegstein, A. R. (2009). Defining the role of GABA in cortical development. *J. Physiol.* 587, 1873–1879. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167635
- Waterhouse, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., et al. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J. Neurosci.* 32, 14318–14330. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0709-12.2012
- Watson, R. E., Desesso, J. M., Hurr, M. E., and Cappon, G. D. (2006). Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 77, 471–484. doi: 10.1002/bdrb.20090
- Wen, J., Hu, Q., Li, M., Wang, S., Zhang, L., Chen, Y., et al. (2008). Pax6 directly modulate Sox2 expression in the neural progenitor cells. *Neuroreport* 19, 413–417. doi: 10.1097/WNR.0b013e3282f64377
- Wilhelmsson, U., Lebkuechner, I., Leke, R., Marasek, P., Yang, X., Antfolk, D., et al. (2019). Nestin regulates neurogenesis in mice through notch signaling from astrocytes to neural stem cells. *Cereb. Cortex* 29, 4050–4066. doi: 10.1093/cercor/bhy284
- Wilke, S. A., Hall, B. J., Antonios, J. K., Denardo, L. A., Otto, S., Yuan, B., et al. (2012). NeuroD2 regulates the development of hippocampal mossy fiber synapses. *Neural Dev.* 7:9. doi: 10.1186/1749-8104-7-9
- Wu, C., and Sun, D. (2015). GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab. Brain Dis.* 30, 367–379. doi: 10.1007/s11011-014-9560-1
- Xing, L., and Huttner, W. B. (2020). Neurotransmitters as modulators of neural progenitor cell proliferation during mammalian neocortex development. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:391. doi: 10.3389/fcell.2020.00391

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Gustorff, Scheuer, Schmitz, Bühner and Endesfelder. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

S. Chopra, **C. Gustorff**, C. Denecke, E. Teegen, A. Andreou, J. Pratschke und M. Biebl (2019). Inzidenz und Verlauf von Ösophagus- und Magenkarzinomen nach Lebertransplantation. Klinik für Chirurgie, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin. 136. Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie. Abstract-ID: 915

C. Gustorff, S. Chopra, C. Denecke, E. Teegen, A. Andreou, J. Pratschke, M. Biebl (2019). Incidence and outcome of esophageal and gastric cancer after liver transplantation. Klinik für Chirurgie, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin. 60. österreichischer Chirurgenkongress. Poster-ID: P48

C. Gustorff, T. Scheuer, T. Schmitz, C. Bühner, S. Endesfelder (2021). Einfluss von GABA-Antagonisten auf die hippocampale Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn der Ratte. Klinik für Neonatologie, Charité Universitätsmedizin Berlin. 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin. ISBN: 978-3-948023-15-7

C. Gustorff, T. Scheuer, T. Schmitz., C. Bühner und S. Endesfelder (2021). GABA_B Receptor-Mediated Impairment of Intermediate Progenitor Maturation During Postnatal Hippocampal Neurogenesis of Newborn Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15(295). doi: 10.3389/fncel.2021.651072. **IF: 6.147**

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei meiner Doktormutter, PD Dr. Stefanie Endesfelder. Sie hat mich von Beginn an auf dem Weg zur Promotion unterstützt und gefördert. Ich danke ihr, für ihre Expertise, aus der diese Arbeit hervorgeht, für ihre Verlässlichkeit und ihr besonderes Engagement. Ich danke Stefanie Endesfelder für ihr Vertrauen in mich und dafür, dass sie mir die wunderbare Möglichkeit gab, Teil ihrer Arbeitsgruppe zu werden.

Mein Dank gilt meinem Zweitbetreuer, PD Dr. Thomas Schmitz, auf dessen jahrelange Arbeit, Planung und Erfahrungsschatz ich zurückgreifen durfte. Ich danke ihm, wie dem gesamten Team im Labor der Klinik für Neonatologie. Die Koautor*innen haben großen Beitrag am Gelingen unserer Publikation und ich danke ihnen für ihr Vertrauen in mich.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Evelyn Strauss bedanken. Auf die Präzision ihrer technischen Arbeit konnte ich mich immer verlassen. Ihre Genauigkeit ist mir ein großes Vorbild.

Mit Liebe danke ich meinen Eltern, Isabelle und Burkhard Gustorff, und meiner Schwester Fanny Maria Gustorff.