

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

## **DISSERTATION**

Auswirkungen einer GABA-Rezeptor-Antagonisierung auf die  
oligodendrogläre Entwicklung und Myelinisierung am Modell des  
neonatalen Rattencortex

Effects of GABA receptor antagonization on oligodendroglial  
development and myelination of the neonatal rat cortex

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Samipa Pudasaini  
aus Kathmandu, Nepal

Datum der Promotion: 23. März 2024

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung	1
Abstract	3
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Gehirnentwicklung bei Neu- und Frühgeborenen	5
1.2. Exogene Schädigungsmechanismen der Gehirnentwicklung bei Neu- und Frühgeborenen	6
1.3. Oligodendroglia und Myelinisierung	7
1.3.1. Entwicklung und Funktion der Oligodendroglia	7
1.3.2. Myelinisierung	8
1.3.3. GABA-Rezeptoren bei oligodendroglären Zellen	9
1.4. Unklarer Einfluss von GABA-Rezeptoren auf Oligodendroglia und Myelinisierung	10
1.5. Forschungsfrage	11
<b>2. Methodik</b>	
2.1. Tierversuchsmodell	12
2.1.1. Tiere und Antagonisierung	12
2.1.2. Zeitlicher Ablauf der Behandlung	13
2.2. Immunhistochemische Methoden	14
2.2.1. Aufbereitung der Gehirnschnitte	14
2.2.2. Immunhistochemische Färbung	15
2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie	17
2.3. Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1. Proteinisolation	18
2.3.2. Western Blot	18
2.3.3. RNA-Isolation und quantitative Polymerasekettenreaktion	19
2.4. Statistik	20

### **3. Ergebnisse**

3.1. Myelinisierung im Rattencortex nach GABA <sub>A</sub> - und GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung	21
3.2. Oligodendrogläre Proliferation im Rattencortex nach GABA <sub>A</sub> - und GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung	24
3.3. Oligodendrogläre Reifung im Rattencortex nach GABA <sub>A</sub> - und GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung	27
3.4. Oligodendrogläre und gesamtzelluläre Apoptose im Rattencortex nach GABA <sub>A</sub> - und GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung	30

### **4. Diskussion**

4.1. Auswirkungen der GABA-Rezeptor-Antagonisierung auf die Myelinisierung	32
4.2. Auswirkungen der GABA-Rezeptor-Antagonisierung auf die oligodendrogläre Entwicklung	34
4.3. Zusammenfassung der Studienerkenntnisse	36
4.4. Limitationen	38

Literaturverzeichnis	39
Eidesstattliche Versicherung	47
Anteilerklärung an der erfolgten Publikation	48
Auszug aus der Journal Summary List (2019)	49
Druckexemplar der Publikation	50
Lebenslauf	63
Komplette Publikationsliste	66
Danksagung	68

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Seite</b>	<b>Quelle</b>	<b>Beschriftung</b>
Tab. 1.	16	Eigene	Genutzte primäre und sekundäre Antikörper für die Darstellung immunhistochemische Analyse.
Tab. 2.	19	Eigene	Genutzte primäre und sekundäre Antikörper für die Darstellung molekularbiologische Analyse mittels Western Blot.
Tab. 3.	20	Modifiziert aus (1)	Sequenzen der Oligonukleotide und Genloci, Sonden markiert mit FAM/TAMRA.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite	Quelle	Beschriftung
Abb. 1.	7	Eigene Darstellung mit Daten aus (2-6)	Mögliche Kaskade interner und externer Ursachen von (diffuser) Schädigung weißer Substanz bei Frühgeborenen mit nachfolgendem Risiko der Entwicklung neuropsychiatrischer Störungen.
Abb. 2.	9	Modifiziert aus (7-10)	Oligodendrogläre Entwicklung und Myelinisierung im ZNS.
Abb. 3.	14	Modifiziert aus (1)	(A) Zeitlicher Ablauf der Behandlung von Kontroll- und Versuchsgruppen. (B) Markierung der in immunhistochemischen Analysen ausgewerteten Cingulumregion im Koronarschnitt.
Abb. 4.	22-23	Modifiziert aus (1)	GABA-Rezeptor-Antagonisierung reduziert die MBP-Expression <i>in vivo</i> in der immunhistochemischen Analyse.
Abb. 5.	23	Modifiziert aus (1)	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung reduziert die MBP-Expression <i>in vivo</i> in der Western Blot-Analyse.
Abb. 6.	24-25	Modifiziert aus (1)	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung steigert die Proliferation oligodendroglärer Zellen <i>in vivo</i> in der immunhistochemischen Analyse.
Abb. 7.	26	Modifiziert aus (1)	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung erhöht die Population der OPCs <i>in vivo</i> in der immunhistochemischen Analyse.
Abb. 8.	27	Modifiziert aus (1)	GABA-Rezeptor-Antagonisierung zieht keine Auswirkungen auf die <i>Pdgfra</i> -Genexpression <i>in vivo</i> in der qPCR-Analyse mit sich.
Abb. 9.	28	Modifiziert aus (1)	GABA-Rezeptor-Antagonisierung zeigt keine Änderungen in der Reifung von CC1 <sup>+</sup> Oligodendrozyten <i>in vivo</i> in der immunhistochemischen Analyse.

Abb. 10.	29	Modifiziert aus (1)	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung reduziert die CNP-Expression <i>in vivo</i> in der Western Blot-Analyse.
Abb. 11.	30	Modifiziert aus (1)	GABA <sub>B</sub> -Rezeptor-Antagonisierung reduziert die Reifung von CNP <sup>+</sup> Oligodendrozyten <i>in vivo</i> in der immunhistochemischen Analyse.
Abb. 12.	31-32	Modifiziert aus (1)	GABA-Rezeptor-Antagonisierung zieht keine Auswirkungen auf die Apoptose oligodendroglärer Zellen sowie auf die Gesamtzellzahl <i>in vivo</i> in immunhistochemischer Analyse mit sich.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APC	<i>Adenomatous polyposis coli clone</i>
ARRIVE	<i>Animal research: reporting of in vivo experiments</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CASP3	<i>Cleaved caspase 3</i> , gespaltene Caspase 3
CC1	<i>Anti-Adenomatous polyposis coli clone</i>
CGP	CGP35348
CNP	<i>2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i> , 2', 3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMCM (Hydrochlorid)	<i>Methyl 6,7-dimethoxy-4-ethyl-β-carboline-3-carboxylate (hydrochloride)</i> , Methyl-6,7-Dimethoxy-4-ethyl-β-Carbolin-3-Carboxylat (Hydrochlorid)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FAM	6-Carboxyfluorescein
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> , γ-Aminobuttersäure
g/μg	Gramm/Mikrogramm
<i>Hprt</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> , Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
ICMJE	<i>International Committee of Medical Journal Editors</i>
i.p.	Intraperitoneal
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> , leukämiehemmender Faktor
LINGO-1	<i>Leucine rich repeat and Ig domain containing 1</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i> , basisches Myelinprotein
M-MLV RT	<i>Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase</i> , Moloney-murines-Leukämievirus reverse Transkriptase

NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
nm	Nanometer
OLIG, OL	<i>Oligodendrocyte, Oligodendrozyt</i>
OPC	<i>Oligodendrocyte progenitor cell, oligodendrogläre Vorläuferzelle</i>
P	Postnataler Tag
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction, quantitative Polymerasekettenreaktion</i>
PD	Privatdozent*in
PDGFR $\alpha$ / <i>Pdgfra</i>	<i>Platelet-derived growth factor receptor alpha, Thrombozyten- Wachstumsfaktor-Rezeptor alpha</i>
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
PSA-NCAM	<i>Polysialylated-neural cell adhesion molecule</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure</i>
SEM	<i>Standard error of the mean, Standardfehler</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
WHO	<i>World health organization, Weltgesundheitsorganisation</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZUS.	Zusammengeführt



## Zusammenfassung

Die (intensiv)medizinischen Behandlungsmöglichkeiten von Früh- und Neugeborenen haben sich in den letzten Dekaden drastisch verbessert. Kommt ein Säugling frühzeitig auf die Welt, ist jedoch seine Gehirnentwicklung nicht vollends abgeschlossen und zudem postnatal externen Einflüssen ausgesetzt. Spezifisch gehen damit Myelinisierungsdefizite, Schädigungen von  $\gamma$ -Aminobuttersäure-(GABAergen) Interneuronen und Veränderungen in der oligodendroglären Entwicklung einher. Inwieweit diese Prozesse sich gegenseitig bedingen, bleibt weitestgehend ungeklärt. Vorherige Daten zeigten auf, dass Myelin-bildende oligodendrogläre Zellen GABA-Rezeptoren exprimieren. Ein Einfluss von GABA über diese Rezeptoren auf Oligodendroglia und die Myelinisierung scheint somit denkbar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Myelinproduktion und die GABA-induzierte Reifung, Proliferation und Apoptose von Oligodendroglia im Gehirn der neonatalen Ratte nach pharmakologischer Blockade der GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren zu untersuchen.

Vom postnatalen Tag (P) 6 bis P11 wurde der reverse GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonist DMCM oder der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonist CGP täglich intraperitoneal injiziert. Die Analysen folgten zu P11 und P15. Western Blots und Immunhistochemie dienten zur Messung der MBP Expression. Weiterhin bestimmten wir mittels immunhistochemischer Färbung zur Evaluation der oligodendroglären Reifung die Rate der CC1<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> und CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> Zellen sowie zur Auswertung der Proliferation die Rate der PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> Oligodendroglia. Oligodendrogläre Vorläuferzellen wurden mit PDGFR $\alpha$ -Antikörpern gefärbt. Ebenso wurde eine Analyse der oligodendroglären Apoptose (CASP3<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>) und aller apoptotischen Zellen (CASP3<sup>+</sup>DAPI<sup>+</sup>) vorgenommen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der *Pdgfra* Genexpression mittels qPCR und der CNP Proteinexpression via Western Blot.

Die MBP-Expression wies eine signifikante Reduktion, insbesondere nach CGP-Behandlung, zum Zeitpunkt P15 auf. Ebenso ergab sich in jener Tiergruppe eine temporäre Absenkung von reifen CNP<sup>+</sup> Oligodendrozyten sowie der CNP Proteinexpression im Alter P11. Zu P15 war ein Anstieg der Proliferation von Oligodendroglia (PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>), und spezifisch der oligodendroglären Vorläuferzellen (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>), nach GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung erkennbar. Die *Pdgfra*

Genexpressionen zeigte sich nach Behandlung unverändert. Gleiches gilt für den apoptotischen Zelltod sowie für Proliferations- und Reifungsuntersuchungen nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade.

Unsere *in vivo* Studie an neugeborenen Ratten deutet darauf hin, dass besonders die GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Aktivität eine modulierende Funktion in der Oligodendroglia-Entwicklung sowie in der adäquaten Myelinisierung innehält. Daraus schlussfolgernd, spielen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren eine zentrale Rolle im Verständnis von auf Myelindefiziten basierenden Pathologien und könnten künftig einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Regulierung der Gehirnentwicklung Frühgeborener über die Myelinbildung bieten.

## Abstract

Through (intensive) medical care, treatment possibilities of premature and newborn children have improved drastically during the last decades. However, when a child is born preterm, its brain development is not fully completed yet and is furthermore exposed to postnatal external influences. The specific consequences range from myelination deficits up to impairments of  $\gamma$ -aminobutyric acid-(GABAergic) interneurons and changes in oligodendroglial development. To what extent these processes are mutually dependent, is largely unknown. Prior data has shown that myelin forming oligodendroglial cells express GABA receptors. An impact of GABA via these receptors on oligodendroglia and myelination appears conceivable. In this study, we aimed to examine the myelin production as well as the GABA-induced maturation, proliferation, and apoptosis of oligodendroglia in the brain of neonatal rats after pharmacologically blocking GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors.

From postnatal day 6 (P6) to P11, the reverse GABA<sub>A</sub> receptor agonist (DMCM) or the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP were injected intraperitoneally on a daily basis. This was followed by analysis at P11 and P15. Western blots and immunohistochemistry were performed to determine the expression of MBP. Furthermore, via immunohistochemical stainings, we assessed the rates of CC1<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> and CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> cells to evaluate maturation and analyzed the rate of PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> oligodendrocytes for proliferation. Oligodendrocyte precursor cells were stained with antibodies to PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>. An analysis of the oligodendroglial apoptosis (CASP3<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>) and of apoptotic cells in total (CASP3<sup>+</sup>DAPI<sup>+</sup>) was performed. Additionally, we assessed the *Pdgfra* gene expression through qPCR and the protein expression of CNP via Western blot.

MBP expression showed a significant reduction, especially after treatment with CGP, at P15. Also, the number of mature CNP<sup>+</sup> oligodendrocytes and the CNP protein expression and decreased temporarily at P11 in the same animal group. At P15, the proliferation of oligodendroglia (PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>), and especially of oligodendrocyte precursor cells (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>), increased after antagonization of GABA<sub>B</sub> receptors. *Pdgfra* gene expression remained unaffected after treatment. The same accounts for apoptotic cell death and all examinations of proliferation and maturation after GABA<sub>A</sub> receptor blockade.

Our *in vivo* study in neonatal rats indicates that especially GABA<sub>B</sub> receptor activity fulfills a modulating role concerning oligodendroglial development and adequate myelination. As a conclusion, GABA<sub>B</sub> receptors play a key role in the understanding of pathologies caused by myelin deficits and could offer a promising approach in the regulation of the brain development among preterm children via their myelin synthesis.

## 1. Einleitung

### 1.1. Gehirnentwicklung bei Neu- und Frühgeborenen

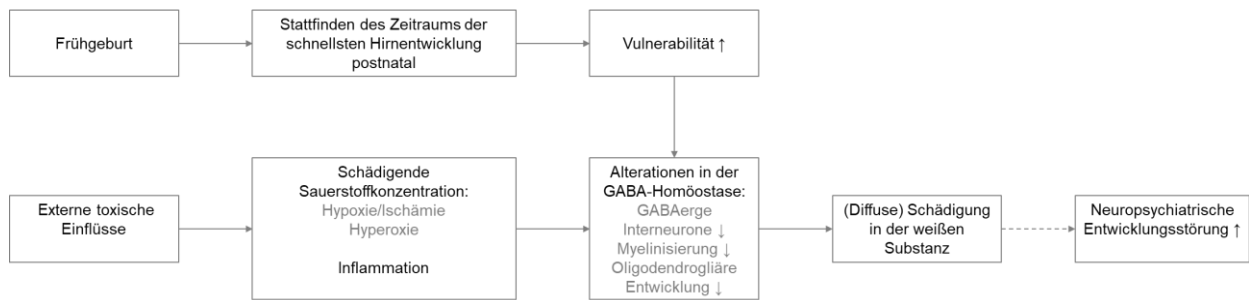
Wird ein Säugling vor vollendeter 37. Schwangerschaftswoche (SSW) geboren, ist dies als Frühgeburt definiert. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) beginnen nach dieser Definition pro Jahr 15 Millionen Kinder weltweit frühzeitig ihr Leben; mit steigender Tendenz in fast allen Ländern (11). Differenziert wird dabei zwischen extrem frühgeborenen Kindern (bei <28 SSW oder <1000 Gramm (g) Körpergewicht), sehr frühgeborenen Kindern (bei 28 bis <32 SSW oder 1000g bis <1500 g) und mäßig bis spät Frühgeborenen (32 bis <37 SSW oder 1500g bis <2500 g) (12). Insbesondere im globalen Westen hat sich die Überlebensquote jener Frühgeborenen sowie auch von termingerechten Neugeborenen in den letzten Dekaden rapide verbessert (13-15). Zu verdanken haben wir dies den hochqualitativen medizinischen Behandlungsmöglichkeiten. Diese beinhalten Methoden wie die Reifeinduktion bei nicht vollends ausgebildeten Lungen. So wird bei komplizierten Frühgeburten eine zügige Adaptation an die neue Umwelt erleichtert (16). Durch die intensive Betreuung ist ein Überleben außerhalb des mütterlichen Leibs heute bereits ab der 22. SSW möglich, mit Besserung der Prognose bei steigendem Gestationsalter (17). Jedoch ist zu einem solch frühen Zeitpunkt die Organentwicklung des Fötus noch nicht vollends abgeschlossen. Insbesondere die Gehirnentwicklung erlebt primär im letzten Schwangerschaftstrimenon sowie in den ersten Wochen postnatal einen rapiden Aufschwung in der sogenannten Phase des schnellsten Hirnwachstums (5, 18). Auch die Myelinisierung neuronaler Axone durch reife oligodendrogläre Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) geht in jenem Zeitraum vonstatten (19-21). Dies schafft eine Vulnerabilität, welche, vor allem bei zusätzlichen toxischen Einflüssen, Grundlage für potenziell lebenslange neurologisch-psychiatrische Beeinträchtigungen darstellen kann. Hierzu zählen Erkrankungen wie die Schizophrenie oder die Autismus-Spektrum-Störung (5, 22). Insbesondere Frühgeborene weisen dabei ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung solcher neurologisch-psychiatrischen Beeinträchtigungen auf, primär als Folge (diffuser) Schäden in der weißen Substanz. Dies wurde in bisherigen Studien am Tiermodell und humanen Gewebeproben offengelegt. Als wichtigster ursächlicher Mediator auf molekularer und zellulärer Ebene wird die Abnahme von  $\gamma$ -Aminobuttersäure- (GABAergen) Interneuronen

und die damit einhergehende Alteration in der GABA-Transmission diskutiert (23-25). Dieser Zusammenhang ist in der Abbildung (Abb.) 1 verbildlicht.

### *1.2. Exogene Schädigungsmechanismen der Gehirnentwicklung bei Neu- und Frühgeborenen*

Zur noch nicht vollendeten Hirnentwicklung kommt bei der frühzeitigen Geburt zusätzlich eine unerwartete Umgebungsalteration hinzu. Jene exogenen Einflüsse können potenzielle Schädigungen oder Störungen in der neurologisch-psychiatrischen Entwicklung verstärken. Zu diesen relevanten Einflussfaktoren gehören beispielsweise die Hyperoxie, welche postnatal sowohl physiologisch durch die höhere Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft im Vergleich zum Uterus als auch im Rahmen einer durch extern zugeführten Sauerstoffgabe zustande kommen kann (26-30). Anhand von neonatalen Tiermodellen wurde als Folge der Hyperoxie eine Schädigung kortikaler GABAerger Parvalbulmin-exprimierender Interneurone und ein verzögernder Einfluss auf die Progression der oligodendroglären Zellen (OLs) sowie Entwicklungsstörungen des kortikalen Myelins nachgewiesen (3, 31). Ein ähnlicher Pathomechanismus wird durch pro-inflammatorische Zustände/Infektionen diskutiert. Auch hier wird eine Assoziation zwischen Veränderungen im GABA-Signalweg und neuronalen Entwicklungsalterationen vermutet (4). Vergleichbare Ergebnisse einer Reduzierung der Myelinformation sowie des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Inputs und Verzögerungen der oligodendroglären Progression stellten bisherige Studien ebenso in hypoxischen Tiermodellen dar (2).

Inwieweit eine veränderte GABA-Transmission in diesen Fällen direkt ursächlich für Alterationen in der Myelinbildung und der Oligodendroglia-Entwicklung ist, beispielsweise über oligodendrogläre GABA-Rezeptoren, und somit die Grundlage für (diffuse) Schädigungen in der weißen Substanz darstellt, bleibt Gegenstand derzeitiger Forschung.



**Abb. 1. Mögliche Kaskade interner und externer Ursachen von (diffuser) Schädigung weißer Substanz bei Frühgeborenen mit nachfolgendem Risiko der Entwicklung neuropsychiatrischer Störungen.** Der insbesondere im letzten Schwangerschaftstrimenon und den ersten postnatalen Wochen stattfindende Zeitraum des schnellsten Hirnwachstums stellt eine vulnerable Wachstumsphase des Gehirns dar. Bei Frühgeborenen können auf diese sensible Periode postnatal externe toxische Einflüsse wie die Inflammation oder hyperoxische und hypoxisch-ischämische Zustände einwirken. Nachfolgend können Alterationen in der Homöostase von GABA entstehen, die (diffuse) Schädigungen der weißen Substanz zur Folge haben. Langfristig kann sich dies in neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen manifestieren. *Quelle:* Eigene Darstellung mit Daten aus (2-6).

### 1.3. Oligodendroglia und Myelinisierung

Um jene noch ablaufenden Stadien der Gehirnentwicklung bei Frühgeburtlichkeit sowie die potenziellen Mechanismen hinter den Schädigungen in der weißen Substanz in ihren molekularen und zellulären Prozessen nachvollziehen zu können, gilt es die Entwicklung und Funktionen oligodendroglärer Zellen sowie den Myelinisierungsvorgang in ihren Grundsätzen zu eruieren.

#### 1.3.1. Entwicklung und Funktion der Oligodendroglia

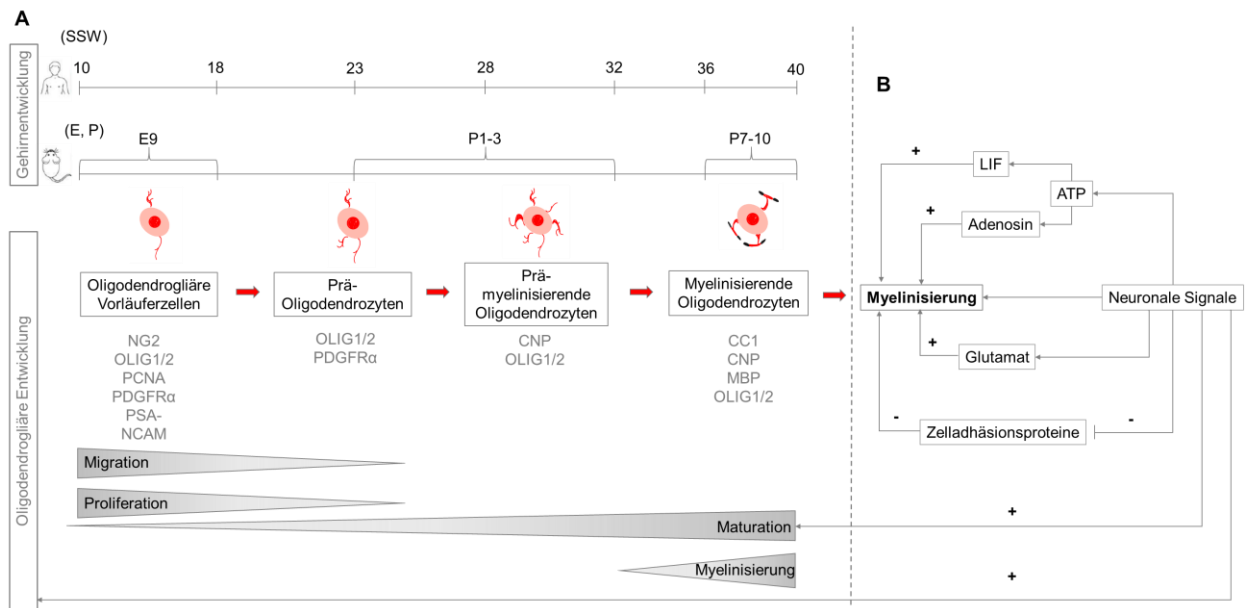
OLs gehören zur Gruppe der Gliazellen und bergen im ZNS, neben der Aufgabe der Myelinisierung, ebenso Stütz- und Ernährungsfunktionen (32). Dabei myelinisiert ein OL über seine Ausläufer mehrere Axone. Ihre funktionellen Eigenschaften sind denen der Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) gleichzusetzen (21). Damit funktionstüchtige OLs entstehen, ist eine ungestörte Entwicklung aus den Vorläuferzellen notwendig. Diese beginnt bei den oligodendroglären Vorläuferzellen (OPCs), die sich zu Prä-OLs weiterentwickeln. Dabei sind oligodendrogläre Vorstufen durch ihre Expression

des Proteinmarkers *platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFR $\alpha$ ) gekennzeichnet. Die Differenzierung führt sich fort in unreife/Prä-myelinisierende OLs, welche beginnen *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase* (CNP) zu exprimieren und endet bei den reifen/myelinisierenden OLs. Die letzte Zellstufe ist, ihrem Namen entsprechend, für die Bildung der Myelinscheide zuständig und produziert das *myelin basic protein* (MBP) (21, 33). Jene zelluläre Progression ist geprägt durch einen Wechsel vom Proliferations- zum Reifungszustand sowie durch balancierende Apoptoseprozesse. Dass diese zelluläre Entwicklung unter anderem über Rezeptoren der OLs mit reguliert werden kann, ist besonders am Beispiel der Glutamatrezeptoren, über die sie verfügen, beschrieben worden (34). Auch die Präsenz von GABA-Rezeptoren an oligodendroglären Zellen wurde bereits nachgewiesen, ihre konkreten Funktionen und Expressionsmuster sind jedoch vergleichsweise wenig erforscht (35).

### 1.3.2. Myelinisierung

Die Myelinisierung von Axonen ist Aufgabe reifer oligodendroglärer Zellen und erfolgt mit dem Ziel, durch die Isolation der Axone eine optimale Fortleitung elektrischer Impulse zu garantieren (21). Ihr erfolgreicher Ablauf ist wesentlich von Anreizen der Neurone selbst abhängig, die damit sowohl die oligodendrogläre Entwicklung als auch die Myelinisierung weiter vorantreiben. Zudem regulieren neuronale Signale die Bildung von Myelin-inhibierenden Adhäsionsproteinen herunter, darunter das *polysialylated-neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM), das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 und das *leucine rich repeat and Ig domain containing 1* (LINGO-1). Ebenso sorgt Neuronenaktivität für eine Transmission von Glutamat sowie für die Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP), welches über Adenosin und dem *Leukemia inhibitory factor* (LIF) die Myelinisierung zusätzlich stimuliert (s. Abb. 2) (36, 37).





**Abb. 2. Oligodendrogläre Entwicklung und Myelinisierung im ZNS.** (A) Zeitstufen der Gehirnentwicklung von Menschen sowie von Nagetieren und die damit zeitlich verbundene oligodendrogläre Entwicklung. (B) Regulationsfaktoren der Myelinisierung über neuronale Signale. **Abkürzungen:** E: embryonaler Tag, P: postnataler Tag, OLIG1/2: Oligodendrozyt 1/2, PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*, CC1: *Anti-adenomatous polyposis coli clone*. **Quelle:** Modifiziert aus (7-10), für (7) mit freundlicher Genehmigung vom Elsevier-Verlag.

### 1.3.3. GABA-Rezeptoren bei oligodendroglären Zellen

GABA ist bekannt als der wichtigste zentral hemmende Neurotransmitter beim Erwachsenen. In der pränatalen Periode verfügt GABA jedoch über erregende Funktionen (38-41). Der sogenannte *GABA-Switch*, der Wechsel von erregender zu inhibierender Eigenschaft, findet graduell statt und erstreckt sich über die Perinatalzeit und dabei insbesondere über die ersten zwei Wochen nach der Geburt (42). Die genaue Dynamik des *GABA-Switchs* variiert je nach Geschlecht, Hirnregion und Zelltyp (43-45).

Die Rezeptortypen von GABA zeichnen sich durch ihre hohe Heterogenität aus (46). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren funktionieren als Liganden-gesteuerte Chlorid-Ionenkanäle (47), während GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind (48, 49). Expression und Funktion variieren ebenfalls je nach Gehirnregion und Entwicklungsstufe (46, 50, 51). Dies gilt ebenso für GABA-Rezeptoren auf Oligodendroglia. Während GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren in allen oligodendroglären Zellstufen

präsent sind, nimmt die Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit Voranschreiten der oligodendroglären Entwicklung ab (40, 52-54). Details über die Funktion der GABA-Rezeptoren von OLs werden derzeit noch laufend erforscht. Es wird dabei eine modulierende Wirkung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf OPCs hinsichtlich ihrer Population, ihrer Progression in der Differenzierung und der Vorbereitung auf die anstehende Myelinisierung diskutiert, während den GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren eine potenziell relevante Rolle in der Förderung der eigentlichen Myelinisierung durch reife OLs zugesprochen wird (50).

Aus präklinischer Perspektive haben Salari et al. und Naderipoor et al. im neonatalen Tiermodell bereits regulierende Effekte einer Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf die psychologische Entwicklung, unter anderem hinsichtlich der Angst- und Stresssymptomatik sowie der kognitiven Funktion, im Erwachsenenalter nachweisen können (55, 56). Dass in dieser Interaktion ebenso spezifisch oligodendrogläre GABA-Rezeptoren eine tragende Rolle spielen, ist denkbar, wenn auch bislang unerforscht. Alterationen durch diese GABA-Rezeptoren in der Entwicklung von Oligodendroglia und der Myelinbildung könnten somit ebenso als ursächliche Kaskade in der Entstehung jener psychiatrischen Erkrankungen und Verhaltensänderungen diskutiert werden.

#### *1.4. Unklarer Einfluss von GABA-Rezeptoren auf Oligodendroglia und Myelinisierung*

Ein Zusammenhang zwischen der Schädigung von GABA-Interneuronen und Alterationen in der weißen Substanz wurde bereits aufgestellt (4). Aus jener Interaktion könnte weitergehend eine reduzierte GABA-Transmission und Stimulation resultieren. Ein Einfluss dieser veränderten GABA-Homöostase über die oligodendroglären GABA-Rezeptoren auf die OLs selbst sowie auf ihre Myelin-bildende Funktion erscheint möglich. Bisherige Forschungsergebnisse zu dieser Hypothese sind spärlich und in ihren Resultaten teils widersprüchlich (57, 58). In einer Arbeit von Hamilton et al. wurde eine GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade im Großhirncortex der Maus durchgeführt, welche eine Abnahme der oligodendroglären Apoptose sowie eine Zunahme der oligodendroglären Reifung, Proliferation und Myelinisierung zur Folge hatte (59). Abweichend hiervon präsentierten sich die Studienergebnisse von Zonouzi et al., die im Mauskleinhirn nach

GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Hemmung mit Bicucullin eine OPC Proliferationszunahme, aber eine Verzögerung der oligodendroglären Reifung nachwies (2). Eine weitere Arbeit führte *in vitro* eine GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonisierung, mittels GABA-Applikation, durch. Diese zeigte keine Alterationen in der OPC Proliferation, stimulierte jedoch die oligodendrogläre Differenzierung und die Expression von MBP (35).

Die Notwendigkeit jene Unstimmigkeiten wissenschaftlich zu ergründen, ist damit gegeben. Die komplexe Interaktion zwischen Oligodendroglia, neuronalen Stimuli, Neurotransmittern und Adhäsionsproteinen als Grundlage für eine funktionierende Myelinisierung, legt dabei eine Erforschung am *in vivo* Modell nahe. In einer Studie von Jakovcevski et al. wurde bereits vermutet, dass in oligodendroglären Kulturen, im Vergleich zu Tiermodellen, eine reduzierte Menge an den oben genannten Myelin-inhibierenden Faktoren vorliegt (60). Zudem belegten Arellano et al. die Relevanz von neuronalen Verbindungen für die Wahrung der oligodendroglären GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Stabilität. Auch dies ist einzig in einem Tiermodell gegeben, was die Notwendigkeit von *in vivo* Studien bei der Untersuchung der Funktion von oligodendroglären GABA-Rezeptoren weiter bestätigt (53).

### 1.5. Forschungsfrage

Konkrete Hypothese der vorliegenden Studie war die Erwartung, dass oligodendrogläre GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren die Proliferation, Reifung und Apoptose von Oligodendroglia maßgeblich beeinflussen und somit ebenso Alterationen hinsichtlich der Fähigkeit reifer Oligodendrozyten zur adäquaten Myelinisierung mit sich ziehen. Dies untersuchten wir anhand der pharmakologischen Inhibierung der GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren im neonatalen Gehirn der Ratte. Dabei wurde zudem ein Augenmerk auf Gemeinsamkeiten oder Differenzen in der Auswertung der GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Interventionsgruppe gelegt. Die angewandten Untersuchungen fanden zum Zeitpunkt P11, direkt nach Beendigung der pharmakologischen Behandlung, und nach vier Tagen weiterer Entwicklung zu P15, statt. Es wurden Entwicklungsunterschiede zu den beiden Analysezeitpunkten vergleichend betrachtet.

Ein besseres Verständnis von Auswirkungen der GABA-Rezeptor-Aktivität auf die oligodendrogläre Entwicklung und Myelinisierung könnte perspektivisch neue

Behandlungsansätze bei Früh- und Neugeborenen offenlegen, um einer inadäquaten oligodendroglären Entwicklung und Myelinisierungsstörungen mit potenziell lebenslänglichen Folgen, insbesondere neurologisch-psychiatrischer Art, entgegenwirken zu können.

## 2. Methodik

### 2.1. Tierversuchsmodell

#### 2.1.1. Tiere und Antagonisierung

Alle tierexperimentellen Versuche wurden auf Basis der internen Richtlinien der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) in Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer G-0075/18). Zur Standardisierung der *in vivo* Versuche wurden zudem die ARRIVE Richtlinien (*Animal Research: Reporting of in vivo Experiments*) eingehalten (61).

Das Tierversuchsmodell sowie die im Folgenden beschriebenen immunhistochemischen und molekularbiologischen Analysen entsprechen der von Pudasaini et al. beschriebenen Methodik (1).

Als Tiermodell fungierten neugeborene Wistar-Ratten, die geschlechterübergreifend randomisiert einer Kontroll- oder zwei Interventionsgruppen zugeordnet wurden. In der ersten Versuchsgruppe wurde der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor mithilfe des GABA<sub>A</sub> inversen Agonisten *Methyl 6,7-dimethoxy-4-ethyl-β-carboline-3-carboxylate* (DMCM, Tocris, Katalognummer 3083, Wiesbaden-Nordenstadt, Hessen, Deutschland) blockiert. Im Nachfolgenden wird dabei zur Vereinfachung von einer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisierung berichtet, da dies mit der Funktion eines inversen Agonisten gleichzusetzen ist. Konkret wurde hier das wasserlösliche DMCM Hydrochlorid verwendet, welches identische Eigenschaften aufweist wie das reguläre DMCM, jedoch mit einer einfacheren Handhabung einhergeht, da keine saure (0,1 Mol Chlorwasserstoff) oder ethanolhaltige Trägerlösung notwendig ist. Zur optimalen Konzentrationsfindung wurden die Studienergebnisse von Kulick et al. herangezogen. Diese hatten am Modell der neonatalen Ratte die konvulsiven Effekte einer DMCM-Gabe dosisabhängig

untersucht und kamen hierbei zu dem Erkenntnis, dass bei den zwei niedrigsten Dosierungen von 50 und 100 µg/kg krampfinduzierende Effekte vermieden werden können (62). Darauf aufbauend wurde eine eigene Dosisoptimierungsreihe durchgeführt, in deren Rahmen wir drei Tiergruppen Konzentrationen von 2, 10 oder 50 µg/kg DMCM täglich von P6 bis P11 intraperitoneal (i.p.) applizierten. Abschließend wurden immunhistochemische Färbungen für OLIG2 und PCNA durchgeführt, um am Beispiel der Proliferation die Konzentrationsgruppe mit dem stärksten Effekt nach Behandlung beurteilen zu können.

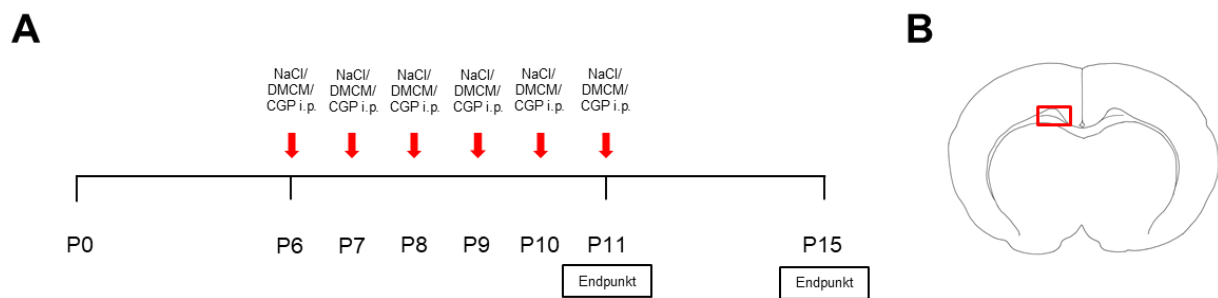
Die Behandlung der zweiten Interventionsgruppe erfolgte mittels GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonist CGP35348 (Tocris, Katalognummer 1245). Dieser wird im Nachfolgenden vereinfacht als CGP bezeichnet. Laut Bittiger et al. ergaben sich bei Konzentrationen rund um 100 mg/kg keine krampfinduzierenden Wirkungen (63). Eine Dosisapplikation von 10 mg/kg zeigte normale motorische Aktivitäten (64). Auch für die Optimierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Blockade wurden drei Versuchsgruppen mit je 0,4 mg/kg, 2 mg/kg und 10 mg/kg gelöstem CGP behandelt und wie in der DMCM-Gruppe ausgewertet.

Die oben beschriebenen Versuchsreihen ergaben in der Auswertung ein Dosisoptimum von 50 µg/kg für DMCM-behandelte Tiere und von 10 mg/kg für CGP-behandelte Tiere. Die Kontrollgruppe hingegen erfuhr eine Behandlung mit dem Vehikel Natriumchlorid (100 µl 0,9% NaCl/10 g Körpergewicht). Alle nachfolgenden Experimente (s. 2.1.2. bis 2.3.3.) wurden hierauf aufbauend durchgeführt.

### *2.1.2. Zeitlicher Ablauf der Behandlung*

Beide Interventionsgruppen sowie die Kontrollgruppe wurden von P6 bis P11 täglich (i.p.) behandelt (s. Abb. 3 A). Die Auswahl dieses Zeitraums ist darin zu begründen, dass Nagetiere insbesondere in den ersten zehn postnatalen Tagen die Höchstphase im Hirnwachstum erleben (18). Während der Behandlung waren sie dauerhaft, gemeinsam mit ihrer laktierenden Mutter, einem Tag-Nacht-Zyklus von je 12 Stunden unter Raumluft ausgesetzt. Die Ratten verblieben dabei ohne wesentliche Morbiditäten und/oder Mortalitäten. Es wurden keine weiteren In- oder Exklusionskriterien angewandt. Die Tötung der Ratten erfolgte zum Zeitpunkt P11, direkt nach Beendigung der Applikation, sowie zum Zeitpunkt P15, vier Tage nach der letzten Behandlung. Dafür wurden die Tiere mittels i.p. Gabe von Ketamin (100 mg/kg, Dechra Veterinary Products,

Northwich, UK), Xylazin (20 mg/kg, CP-Pharma, Burgdorf, Niedersachsen, Deutschland) und Acepromazin (3 mg/kg, Covetrus, Hamburg, Deutschland) narkotisiert und transkardial mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) perfundiert. Für histologische Untersuchungen erfolgte eine zusätzliche Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA). An die Gehirnentnahme schloss sich die Aufbereitung für histologische und molekularbiologische Analysen an. Für die histologischen Untersuchungen standen uns für das Alter P11 je zehn Tiere pro Gruppe zur Verfügung. Zu P15 waren es hingegen sechs Ratten in der Kontrollgruppe, sieben in der GABA<sub>A</sub>-Antagonisierungsgruppe und sechs in der GABA<sub>B</sub>-Antagonisierungsgruppe. Für die molekularbiologischen Analysen lagen zum Zeitpunkt P11 je zehn Tiere pro Gruppe zur Untersuchung vor und für P15 in der NaCl-Gruppe sechs sowie in der DMCM- und CGP-Gruppe je sieben Tiere.



**Abb. 3. (A) Zeitlicher Ablauf der Behandlung von Kontroll- und Versuchsgruppen.** Die tägliche i.p. Injektion von NaCl, DMCM oder CGP erfolgte von P6 bis P10 (für Tiere, die zum Endpunkt P11 analysiert wurden) sowie bis P11 (für Tiere, die zum Endpunkt P15 untersucht wurden). Es folgten, zu beiden Zeitpunkten P11 und P15, Analysen molekularbiologischer sowie immunhistochemischer Art. **(B) Markierung der in immunhistochemischen Analysen ausgewerteten Cingulumregion im Koronarschnitt.** *Quelle:* Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

## 2.2. Immunhistochemische Methoden

### 2.2.1. Aufbereitung der Gehirnschnitte

Zur immunhistochemischen Analyse erfolgte die Fixierung der entnommenen Gehirne in einer 4% PFA/PBS-Lösung über Nacht bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C. Daran schloss sich eine Dehydratation der Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe an, beginnend bei 70%-iger Ethanollösung für vier Stunden unter Raumtemperatur mit nachfolgender

Inkubation in 80%-iger Ethanollösung über Nacht sowie in einer 96%-igen und zwei 100%-igen Ethanollösungen für je eine Stunde bei 40 °C. Es erfolgte daraufhin eine Behandlung mit Chloroform (100% Ethanol/Chloroform 1:1) bei 40°C, unter zweimaligem Austausch des Chloroforms, für je eine Stunde. Die zweifache Einbettung in Paraffin wurde für eine Stunde bei 60 °C sowie bei gleicher Temperatur über Nacht durchgeführt.

Nach der Imprägnierung wurden die Gehirnproben auf eine Dicke von 6 µm geschnitten und bei Raumtemperatur gelagert. Im Rahmen der immunhistochemischen Aufarbeitung wurde der Fokus auf den neonatalen Cortex, und dabei im Besonderen auf das Cingulum (s. Abb. 3 B) gelegt, einer Region, die durch ihre hohe Vulnerabilität geprägt ist (65).

### *2.2.2. Immunhistochemische Färbung*

Zur Entparaffinierung der Schnitte wurden diese zwei Mal für je zehn Minuten in Roti-Histol-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland) inkubiert. Daraufhin erfolgte die schrittweise Rehydrierung für je zwei Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend bei zwei 100%-igen, einer 90%-igen, 80%-igen und 70%-igen Ethanollösung(en). Abschließend wurden die Schnitte drei Minuten lang in bidestilliertem Wasser belassen und in Citratpufferlösung (pH 6,0) für zehn Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Dies diente zur Antigendemaskierung und war gefolgt von einem Waschvorgang in PBS für fünf Minuten. Es schloss sich eine Behandlung bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung (3% bovines Serumalbumin, 0,2% Triton X-100 in PBS), für den Zeitraum von einer Stunde, und erneut eine Waschung mit PBS für fünf Minuten an. Mit Primärantikörpern, die in der Tabelle (Tab.) 1 gelistet sind, und gelöst in Antikörperverdünner (Zymed Laboratories, San Francisco, California, USA), wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation folgten drei Waschvorgänge (PBS) für je drei Minuten und eine Behandlung mit dem passenden Sekundärantikörper (s. Tab.1). Alle Schnitte wurden schlussendlich mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt, um die Desoxyribonukleinsäure (DNS) in den Zellkernen zu markieren. Die Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte, je nach Antikörper, für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur, gefolgt von weiteren dreiminütigen Waschvorgängen mit PBS, je drei Mal, und dem Eindecken mittels Eindeckmedium (Shandon Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific, Walham, MA, USA).

Tab. 1. Genutzte primäre und sekundäre Antikörper für die immunhistochemische Analyse.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
<b>Beurteilung der Oligodendroglia</b>		
Polyklonaler Ziegen-Antikörper zu OLIG2	1:2000	R&D Systems, AF2418
<b>Beurteilung der oligodendroglären Proliferation</b>		
Polyklonaler Maus-Antikörper zu PCNA	1:500	Abcam, #ab29
Monoklonaler Kaninchen-Antikörper zu PDGFR $\alpha$	1:500	Cell Signaling Technology, #3174
<b>Beurteilung der oligodendroglären Reifung</b>		
Monoklonaler Maus-Antikörper zu APC (CC1)	1:250	Calbiochem, #OP80
Monoklonaler Maus-Antikörper zu CNP	1:400	Sigma-Aldrich, MAB326
<b>Beurteilung der oligodendroglären und zellulären Apoptose</b>		
Monoklonaler Kaninchen-Antikörper zu CASP3	1:200	Cell Signaling Technology, #9664
<b>Beurteilung der Myelinisierung</b>		
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper zu MBP	1:500	Abcam, #40390
<b>Färbung aller Zellkerne</b>		
DAPI	1:2000	Sigma-Aldrich, #32670
<b>Sekundärantikörper</b>		
<b>Verdünnung</b>		
<b>Hersteller</b>		
Polyklonaler Ziegen-Antikörper zu Maus, Cyanin 5	1:100	Jackson, ImmunoResearch Laboratories, AB_2338714
Polyklonaler Ziege-Antikörper zu Kaninchen, Alexa Fluor 546	1:200	Molecular Probes, #A11010
Polyklonaler Ziegen-Antikörper zu Maus, Alexa Fluor 546	1:200	Molecular Probes, #A11003
Polyklonaler Ziegen-Antikörper zu Maus, Alexa Fluor 594	1:200	Molecular Probes, #A11032
Polyklonaler Esel-Antikörper zu Ziege, Alexa Fluor 488	1:200	Life Technologies, #A11055

**Abkürzungen:** cleaved caspase 3 (CASP3). **Herkunft der Antikörper:** R&D Systems: Minneapolis, MN, USA; Abcam: Cambridge, UK; Cell Signaling Technology (Europe): Frankfurt am Main, Hessen, Deutschland; Calbiochem: San Diego, CA, USA; Sigma-Aldrich: Taufkirchen, Bayern, Deutschland; Jackson, ImmunoResearch Laboratories: Cambridgeshire, UK; Molecular Probes/ Applied Biosystems: Darmstadt, Hessen, Deutschland; Life Technologies/Applied Biosystems: Carlsbad, CA, USA. **Quelle:** Eigene Darstellung.



### *2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie*

Die Untersuchung der immunhistochemischen Färbung erfolgte verblindet mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops des Typs Keyence compact BZ 9000 (Osaka, Japan). Verwendet wurden dabei Objektive mit x10 und x20 Vergrößerung. Ausgewertet wurden die fluoreszierenden Eigenschaften und die Fluoreszenzintensität von DAPI, MBP, CC1, CASP3, PCNA, PDGFR $\alpha$  und CNP im Cingulum des Rattencortex (s. Abb. 3 B). Ziel war die Analyse der oligodendroglären Reifung, Proliferation und Apoptose mittels einer OLIG2-Co-Färbung. Durchschnittlich wurden zwei Bilder von zwei bis vier Schnitten eines Tieres aufgenommen. Hierfür wurde die BZ-II-Viewer Software (Keyence) sowie darauffolgend die BZ-II-Analyzer Software (Keyence) zum Zusammenführen der Bilder verwendet. Die Zellzahlen der CC1<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, CASP3<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> und CASP3<sup>+</sup>DAPI<sup>+</sup> Färbungen wurden nach einer Anpassung der Helligkeit und des Kontrasts mittels Adobe Photoshop<sup>®</sup> CS6 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA) händisch und blind gezählt. Färbungen mit MBP und CNP wurden unter Nutzung der ImageJ Software Version 1.48v (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) in Hinblick auf die Pixelintensität und die Fläche (pro Feld) ausgewertet.

### *2.3. Molekularbiologische Methoden*

Für molekularbiologische Analysen wurden die Ratten transkardial mit PBS perfundiert. Daraufhin wurden die Gehirne entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Nutzung wurden sie bei - 80 °C zwischengelagert.

### 2.3.1. Proteinisolation

Die Homogenisierung des Gehirngewebes zur Proteinisolierung erfolgte in einem 4 °C Radioimmunoprecipitationsassaypuffer (Thermo Fisher Scientific). Zur Messung der Proteinkonzentration wurde vom Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Rockford, Illinois, USA/Thermo Fisher Scientific) Gebrauch gemacht und eine photometrische Messung mittels iMark™ Microplate Absorbance Reader (BioRad Laboratories, Feldkirchen, Bayern, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 570 Nanometer (nm) durchgeführt.

### 2.3.2. Western Blot

Aliquote der isolierten Proteine wurden mit einer Menge von 20 µg pro Laufbahn gleichmäßig auf ein 4-20 % Criterion™ TGX™ Precast Gel (BioRad Laboratories) aufgetragen. Die Auftrennung nach molekularem Gewicht erfolgte durch das Anlegen einer Spannung (PowerPac HC, BioRad, 180 V, 0,10 A, 300 W). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels Trans-Blot Turbo System (BioRad Laboratories) auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 Mikrometer Pore, BioRad Laboratories) übertragen. Unspezifische Bindungen der primären Antikörper wurden durch eine Inkubation mit Roti Block (Carl Roth) für eine Stunde blockiert. Nach Inkubation der Membranen mit primärem Antikörper bei 4 °C Umgebungstemperatur über Nacht, folgten drei Waschvorgänge für je fünf Minuten in PBS und die Behandlung mit einem *Horseradish peroxidase*-konjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde (s. Tab. 2). Die Verdünnung aller Antikörper erfolgte dabei in einfach konzentrierter Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit einem pH von 7,6 (Abcam). Nach weiteren drei Waschprozessen, wie oben beschrieben, und Behandlung mit Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad Laboratories) oder dem Supersignal West Pico Kit (Pierce), wurde die Auswertung durchgeführt.

**Tab. 2. Genutzte primäre und sekundäre Antikörper für die molekularbiologische Analyse mittels Western Blot.**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Beurteilung der Myelinisierung</b>		
Monoklonaler Maus-Antikörper zu MBP	1:1000	Covance, #SMI-99P
<b>Beurteilung der oligodendroglären Reifung</b>		
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper zu CNP	1:1000	Thermo Fisher, #PA5-27972
<b>Normalisierung</b>		
Monoklonaler Maus-Antikörper zu $\beta$ -AKTIN	1:5000	Sigma Aldrich, #A5316
<b>Sekundärantikörper</b>		
Polyklonaler Ziegen-Antikörper zu Kaninchen	1:2000	Agilent, P0448
Polyklonaler Ziegen-Antikörper zu Maus	1:2000	Agilent, P0447

**Herkunft der Antikörper:** Covance: Princeton, NJ, USA; Agilent Technologies: Santa Clara, CA, USA.

**Quelle:** Eigene Darstellung.

Die Banden wurden mithilfe des ChemiDoc™ XRS+ System (BioRad) gemessen und über die Software Image Lab™ (BioRad) quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte über die  $\beta$ -AKTIN-Expressionslevel. Aufgrund ähnlicher Molekulargewichte wurde bei der Quantifizierung der Proteinexpression von CNP vor Auftragen von  $\beta$ -AKTIN die jeweilige Membran mit Roti® Free Stripping-Puffer (Carl Roth) für 30 Minuten bei 56 °C gestrippt.

### 2.3.3. RNA-Isolation und quantitative Polymerasekettenreaktion

Die Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation des Gehirngewebes erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (peqGOLD RNAPure™; PEQLAB Biotechnology, Erlangen, Bayern, Deutschland). 2  $\mu$ g der Gesamt-RNA wurden mit *Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase* (M-MLV RT, Promega, Mannheim, Baden-Württemberg, Deutschland) zu komplementärer DNS umgeschrieben. Vorab wurden alle Proben mit einer Desoxyribonuklease (Qiagen, Hilden, Nordrhein-Westfalen, Deutschland) behandelt, um eine Kontamination mit genomischer DNS zu verhindern. Die Genexpression von *Pdgfra* wurde gemessen mithilfe des StepOnePlus™ Real-Time

PCR System (Life Technologies/Applied Biosystems), entsprechend der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (66). *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hprt)* fand dabei als Referenzgen Verwendung. Die quantitativen Analysen erfolgten stets in dreifacher Bestimmung. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in der Tab. 3 (A) aufgeführt. Synthetisiert wurden die Zufallsoligonukleotide von der Firma BioTeZ Berlin-Buch (Berlin, Deutschland).

Tab. 3. Sequenzen der Oligonukleotide und Genloci, Sonden markiert mit FAM/TAMRA.

Gene	Oligonukleotidsequenz	Gendatenbanknummer (NCBI)
<b><i>Hprt</i></b>		
Vorwärtsprimer	GGAAAGAACGTCTTGATTGTTGAA	NM_012583.2
Rückwärtsprimer	CCAACACTTCGAGAGGTCCTTTT	
Sonde	CTTTCCTTGGTCAAGCAGTACAGCCCC	
<b><i>Pdgfra</i></b>		
Vorwärtsprimer	CCTGCGCCGTCTTTAACAAT	NM_012802.1
Rückwärtsprimer	TCTCCTCCAGCATGGTGATG	
Sonde	TTACCCTGGAGAGGTGAGAA	

**Abkürzungen:** FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin, NCBI: *National technology for biotechnology information*. **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

## 2.4. Statistik

Für die statistische Analyse sowie die grafische Darstellung kam die Software Graph Pad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) zum Einsatz. Die Anzahl an analysierten Ratten in den jeweiligen Kontroll- und Versuchsgruppen wird dabei im Folgenden mit „n“ gekennzeichnet.

Zum Vergleich der Kontroll- mit den DMCM- und CGP-Gruppen erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA). Bei fehlender Normalverteilung nach Gauß wurde dabei konkret der Kruskal-Wallis ANOVA Test genutzt, bei ungleichen Varianzen hingegen die Welch ANOVA mit Dunnett's T3 *post hoc* Test. Stichproben, die normalverteilt waren

und homogene Varianzen aufwiesen, wurden anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni *post hoc* Test untersucht.

Bei Versuchen, bei denen neben der Kontrollgruppe nur eine Interventionsgruppe zur Auswertung vorlag (s. Abb. 7 und 11), wurde von einem ungepaarten, zweiseitigen *student's* t-Test Gebrauch gemacht. Es wurde bei allen Ergebnissen stets der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Eine statistische Signifikanz war durch die Differenz der Mittelwerte mit  $p < 0,05$  definiert. Signifikante Ausreißer wurden aus der statistischen Berechnung durch Anwendung des Ausreißertests nach Grubbs exkludiert. Sank im Rahmen des Auswertungsprozesses die Fallzahl aufgrund eines Ausschlusses von Ausreißern oder nicht auswertbaren Gehirnschnitten, ist dies in den Abbildungslegenden wie folgt dargestellt:  $n = n_{\text{nachher}}$  (statistisch ausgewertete Tierzahl) bis  $n_{\text{vorher}}$  (ursprüngliche Versuchszahl).

### 3. Ergebnisse

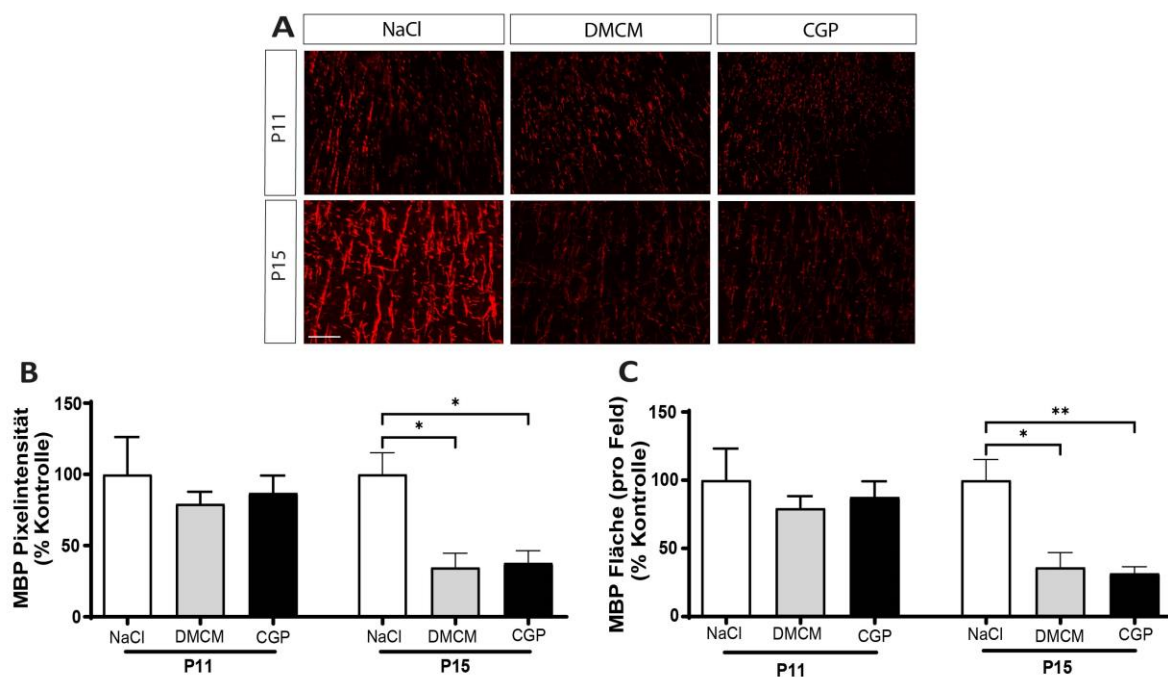
#### 3.1. Myelinisierung im Rattencortex nach GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung

Zur Analyse der Myelinisierung im Cingulum des Rattengroßhirns wurde immunhistochemisch MBP zu den Zeitpunkten P11 und P15 angefärbt (s. Abb. 4.). Mit ungefähr 30% Proteinanteil spielt MBP für die Bildung der Myelinscheide im ZNS die relevanteste Rolle (67), indem es die neuronalen Axone durch den Aufbau multilamellärer Schichten umgibt und damit eine schnelle elektrische Transmission ermöglicht (32). Das MBP beherbergt zudem weitere Unterfunktionen (68), wozu beispielsweise Interaktionen mit dem Zytoskelett (69, 70) sowie die Regulation von anderen Myelinproteinen gehören (71).

Wie in Abb. 4. ersichtlich, wurde die MBP-Pixelintensität (4 B) sowie die MBP-Fläche (pro Feld) (4 C) berechnet. Alle Werte wurden als % zur Kontrolle dargestellt, wobei die Kontrolle als 100% festgelegt ist. Als Ergebnis lag der durchschnittliche MBP-Pixelintensitätswert der Kontrollgruppe bei 30,7% (P11) und 24,3% (P15). Bei der Berechnung der MBP-Fläche (pro Feld), ergaben sich Mittelwerte in der Kontrollgruppe

von 36,6% (P11) und 24,6% (P15). In der statistischen Auswertung zeigte sich bei der MBP-Pixelintensität in keinem Fall eine signifikante Änderung zum Zeitpunkt P11, verglichen mit der Kontrollgruppe. Zu P15 ließ sich eine signifikante Minderung der Pixelintensität, sowohl nach Behandlung mit DMCM ( $35\% \pm 10$ ;  $p = 0,01$ ;  $n = 6$ ) als auch in der CGP-Tiergruppe ( $38\% \pm 9$ ;  $p = 0,01$ ;  $n = 6$ ), im Vergleich zu mit NaCl behandelten Tieren erkennen. Ähnliches zeigte sich bei der Auswertung der MBP-positiven Fläche (pro Feld). Eine signifikante Senkung von MBP ergab sich auch hier zum Zeitpunkt P15. Diese fiel in der CGP-Versuchsgruppe ( $30\% \pm 6$ ;  $p = 0,007$ ;  $n = 6$ ), im Vergleich zur Kontrollgruppe, stärker aus als nach DMCM-Behandlung ( $36\% \pm 11$ ;  $p = 0,01$ ;  $n = 6$ ).

Beispielhaft sind immunhistochemische Bilder des Rattencingulums nach MBP-Färbung in den jeweiligen Gruppen beider Zeitpunkte in der Abb. 4 (A) repräsentativ dargestellt.

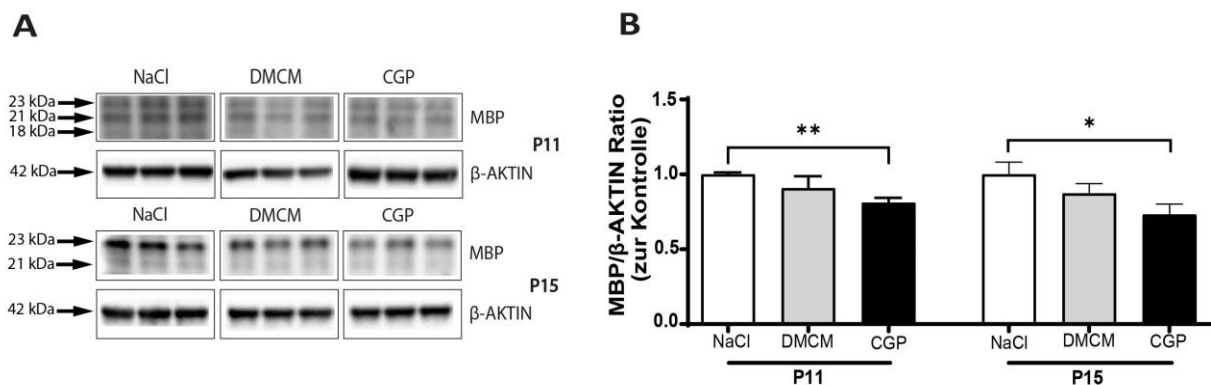


**Abb. 4. GABA-Rezeptor-Antagonisierung reduziert zu P15 die MBP-Expression in vivo in der immunhistochemischen Analyse.** (A) Die immunhistochemische Analyse der 6 µm Schnitte der Cingulumregion wurden mit Antikörpern spezifisch gegen MBP durchgeführt. (B, C) Zum Zeitpunkt P11 zeigen sich keine signifikanten Alterationen der MBP-Pixelintensität sowie der MBP-Fläche (pro Feld) nach erfolgter GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung. Zu P15 ergibt sich eine signifikante Reduktion der MBP-Fluoreszenz, gemessen in Pixelintensität und Fläche (pro Feld) in beiden Antagonisierungsgruppen. Alle Ergebnisse wurden als % zur Kontrolle (100%) dargestellt (100%-Kontrollwerte für MBP-Pixelintensität: 30,7% (P11) und 24,3% (P15); 100%-Kontrollwerte für MBP-Fläche:

36,6% (P11) und 24,6% (P15)). Eine x10 Vergrößerung wurde für P11 und eine x20 Vergrößerung für P15-Bildaufnahmen verwendet. Maßstab = 50  $\mu\text{m}$  (P11: n = 4-6 (NaCl), 6 (DMCM), 6 (CGP); P15: n = 6 (NaCl), 6 (DMCM), 5-6 (CGP); Einweg-Varianzanalyse Bonferroni *post hoc* Test (B und C: P11), Welch Varianzanalyse mit Dunnett's T3 *post hoc* Test (B und C: P15), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  versus Kontrollgruppe mit Vehikelbehandlung). **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

Zusätzlich erfolgte die molekularbiologische Analyse der MBP-Expression mittels Western Blot, ebenfalls im Alter P11 und P15 (s. Abb. 5 A, B). Nach Nutzung von  $\beta$ -AKTIN als Referenzprotein, wurde das Verhältnis der MBP/ $\beta$ -AKTIN-Konzentration berechnet und ist in der Abb. 5, im Bezug zum Mittelwert der Kontrolltiere (0,07 für P11; 1,62 für P15), dargestellt. Hier ergab sich einzig in der Gruppe der CGP-behandelten Tiere eine statistisch signifikante Reduktion zu P11 ( $0,8 \pm 0,03$ ;  $p = 0,001$ ;  $n = 7$ ) und P15 ( $0,7 \pm 0,06$ ;  $p = 0,03$ ;  $n = 6$ ).

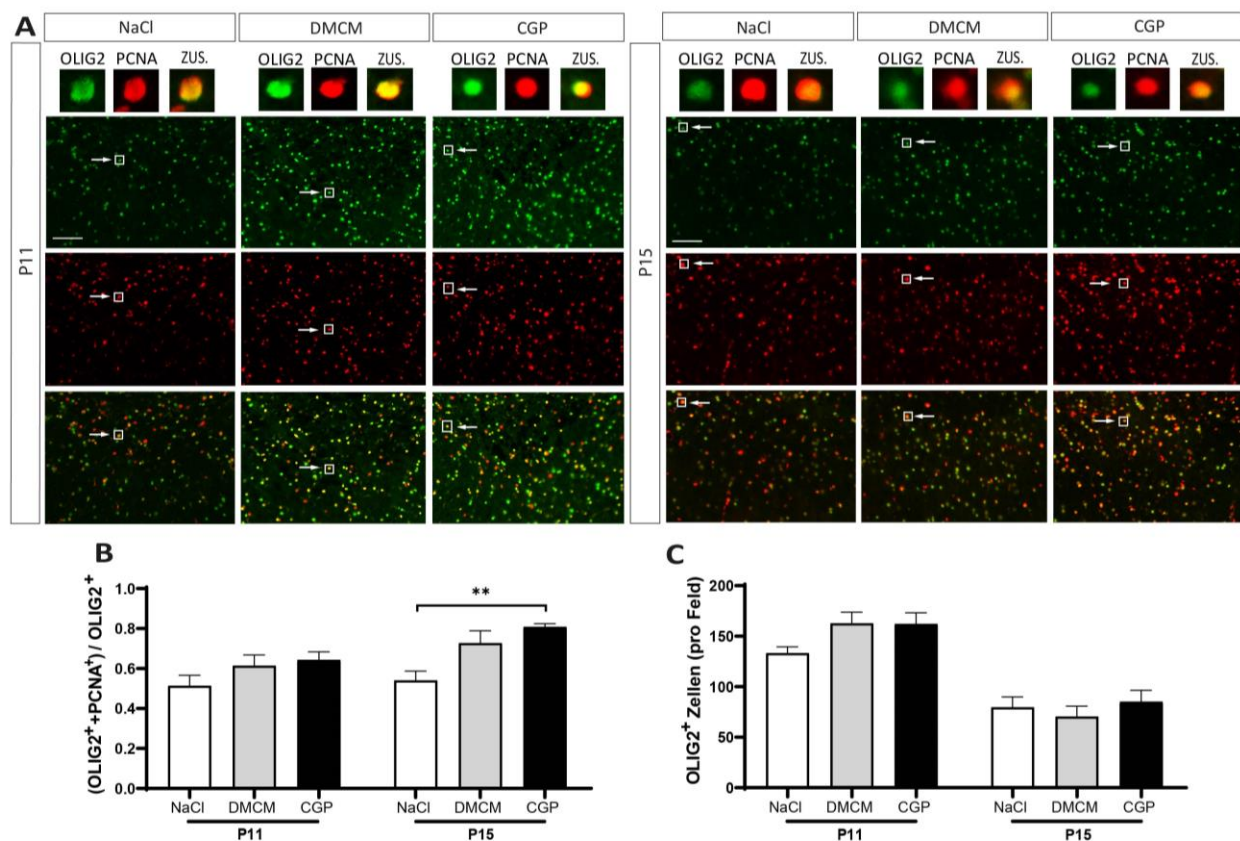
Exemplarische Banden der ausgewerteten MBP-Isotypen und des  $\beta$ -AKTIN sind in der Abb. 5 (A) hinterlegt.



**Abb. 5. GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung reduziert die MBP-Expression in vivo in der Western Blot-Analyse. (A)** Die Quantifizierung der MBP-Expression mittels Western Blot Analyse wurde mit  $\beta$ -AKTIN als Referenzprotein durchgeführt. **(B)** Die Ratio MBP/ $\beta$ -AKTIN wurde bestimmt und die Werte im Verhältnis zur Kontrollgruppe angegeben (Mittelwerte der Kontrolltiere: 0,07 (P11) und 1,62 (P15)). Es ist eine signifikante Abnahme nach Behandlung mit CGP zu den Zeitpunkten P11 und P15 erkennbar (P11: n = 6-7 (NaCl), n = 7 (DMCM), n = 7 (CGP); P15: n = 6 (NaCl), n = 6 (DMCM), n = 6 (CGP); Welch Varianzanalyse mit Dunnett's T3 *post hoc* Test (B: P11), Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni *post hoc* Test (B: P15), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  versus Kontrollgruppe mit Vehikelbehandlung). **Quelle:** Modifiziert aus (1), mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

### 3.2. Oligodendrogläre Proliferation im Rattencortex nach GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung

Zur Analyse der oligodendroglären Proliferation im Alter P11 und P15 wurde der Marker PCNA herangezogen. Dieser wird von Zellen in der DNS-Replikationsphase exprimiert und erlaubt bei Co-Färbung mit OLIG2 eine Beurteilung aller proliferierenden oligodendroglären Zellen (72). Dabei wurde das Verhältnis (OLIG2<sup>+</sup>+PCNA<sup>+</sup>)/OLIG2<sup>+</sup> berechnet. Die Auswertung hiervon sowie exemplarische immunhistochemische Bilder sind in der Abb. 6 dargestellt. Es zeigte sich eine Zunahme der PCNA-Expression zu beiden Zeitpunkten. Ein signifikanter Unterschied ließ sich nur im Alter P15 beobachten ( $0,8 \pm 0,01$ ;  $p = 0,002$ ;  $n = 6$ ), wie aus der Abb. 6 (B) ersichtlich. Berechnet wurde zusätzlich die OLIG2<sup>+</sup>-Zellzahl (pro Feld), welche zu beiden Zeitpunkten keine Änderungen in der Versuchsgruppe, im Vergleich zu Kontrolltieren, vorwies (s. Abb. 6 C).



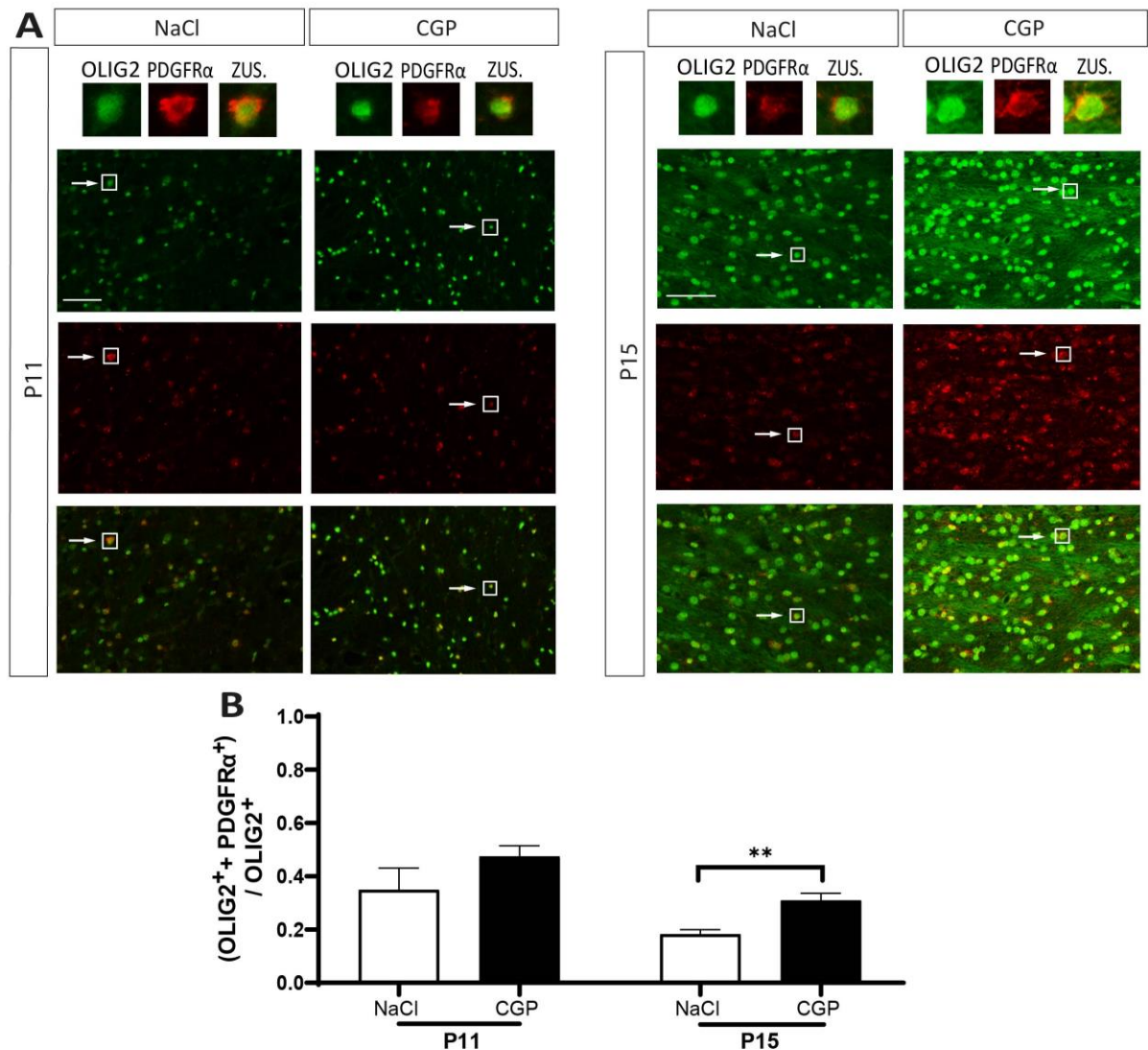
**Abb. 6. GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung steigert die Proliferation oligodendroglärer Zellen in vivo in der immunhistochemischen Analyse.** (A) Die immunhistochemische Analyse der 6 μm Schnitte der Cingulumregion wurden mit Antikörpern spezifisch gegen PCNA und OLIG2 durchgeführt. (B)



Die Ratio der proliferierenden oligodendroglären Zellen zeigt keine Alterationen zu P11 und eine signifikante Steigerung in der CGP-Gruppe zum Zeitpunkt P15. **(C)** Die Zahl der OLIG2<sup>+</sup> Zellen (pro Feld) weist keine signifikante Änderung in beiden Versuchsgruppen zu P11 und P15 auf. Es wurde eine x20 Vergrößerung zur Darstellung verwendet. Maßstab = 50 µm (P11 und P15: n = 6 (NaCl), n = 6 (DMCM), n = 6 (CGP); Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni *post hoc* Test (B: P11, C: P11, P15), Welch-Varianzanalyse mit Dunnett's T3 *post hoc* Test (für B: P15), \*\*p < 0,01 versus Kontrollgruppe mit Vehikelbehandlung). **Abkürzungen:** ZUS.: zusammengeführt. **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

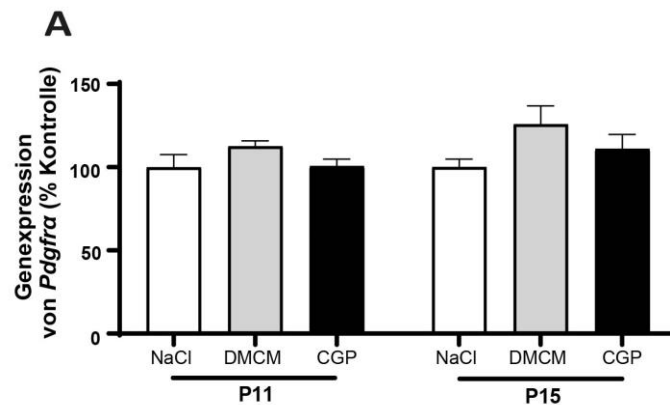
Da sich in der PCNA-Färbung vor allem nach CGP-Behandlung sichtbare Alterationen ergaben, analysierten wir jene Versuchsgruppe weiter unter Verwendung des etablierten Markers für oligodendrogläre Vorläuferzellen, PDGFR $\alpha$ . Dies ist darin zu begründen, dass die oligodendrogläre Proliferation insbesondere in den Vorstufen der Oligodendroglia vonstattengeht (s. Abb. 2) (7-9). Hier zeigte eine Analyse der immunhistochemischen Färbung eine signifikante Zunahme der (OLIG2<sup>+</sup>+PDGFR $\alpha$ )/OLIG2<sup>+</sup> Ratio bei P15 ( $0,3 \pm 0,02$ ; p = 0,007; n = 5), also in der Anzahl von PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> OPCs. Im Alter P11 war dies nur in der Tendenz zu erkennen.

Bilder der immunhistochemischen PCNA- und PDGFR $\alpha$ -Färbungen sind exemplarisch in den Abb. 6 (A) und Abb. 7 (A) präsentiert.



**Abb. 7. GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung erhöht die Population der OPCs in vivo in der immunhistochemischen Analyse.** (A) Die immunhistochemische Analyse der 6  $\mu$ m Schnitte der Cingulumregion wurde mit Antikörpern spezifisch gegen PDGFR $\alpha$  und OLIG2 für CGP-behandelte Tiere durchgeführt. (B) Die Ratio der PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> oligodendroglären Zellen zeigte direkt nach der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung zum Zeitpunkt P11 keine Änderungen, während im Alter P15, vier Tage nach Erholung, eine signifikante Erhöhung gemessen werden konnte. Es wurde eine x20 Vergrößerung zur Darstellung genutzt. Maßstab = 50  $\mu$ m (P11: n = 4 (NaCl), n = 5 (CGP); P15: n = 4-5 (NaCl), n = 5 (CGP); ungepaarter, zweiseitiger *student's* t-Test, \*\*p < 0,01 versus Kontrollgruppe mit Vehikelbehandlung). **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

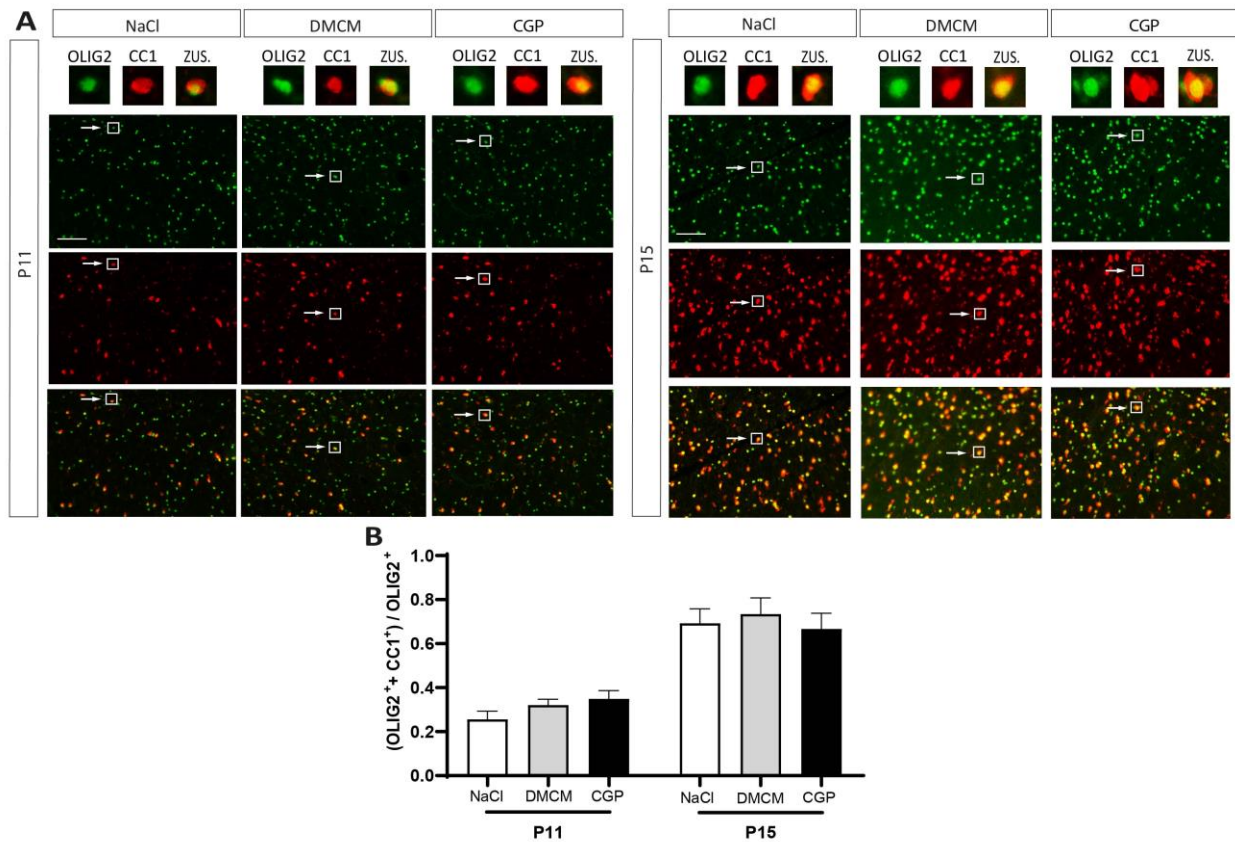
Zusätzlich führten wir eine Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) durch, welche keine erkennbaren Änderungen der *Pdgfra*-Expression im Alter P11 und P15 unter den CGP-behandelten Tieren sowie nach DMCM-Applikation aufzeigte (s. Abb. 8).



**Abb. 8. GABA-Rezeptor-Antagonisierung zieht keine Auswirkungen auf die *Pdgfra*-Genexpression *in vivo* in der qPCR-Analyse mit sich. (A)** Eine qPCR zur Bestimmung der Genexpression von *Pdgfra* ergab zu beiden Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied. Alle Ergebnisse wurden als % zur Kontrolle (100%) berechnet (P11: n = 10 (NaCl), n = 9 (DMCM), n = 10 (CGP); P15: n = 5-6 (NaCl), n = 7 (DMCM), n = 7 (CGP); Welch-Varianzanalyse mit Dunnett's T3 *post hoc* Test (P11), Kruskal-Wallis Test (P15)).  
**Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

### 3.3. Oligodendrogläre Reifung im Rattencortex nach GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung

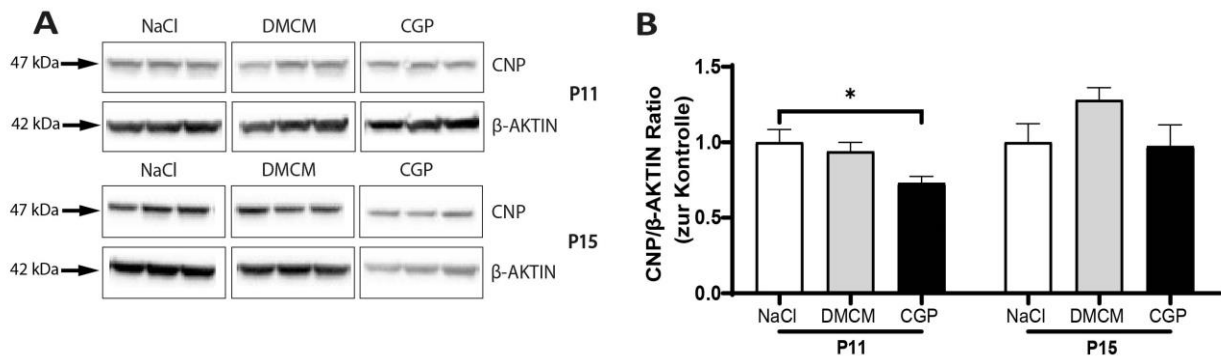
Die Reifung oligodendroglärer Zellen läuft besonders in späteren Entwicklungsstadien, nach Vollendung der Proliferationsphase, ab (s. Abb. 2) (7, 8). Immunhistochemisch analysierten wir die oligodendrogläre Reifung durch Färbung mit CC1. Diese zeigten nach GABA<sub>A</sub>- sowie nach GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung keine signifikanten Alterationen zu beiden Zeitpunkten (s. Abb. 9 B).



**Abb. 9. GABA-Rezeptor-Antagonisierung zeigt keine Änderungen in der Reifung von CC1+ Oligodendrozyten in vivo in der immunhistochemischen Analyse. (A)** Die immunhistochemische Analyse der 6 µm Schnitte der Cingulumregion wurde spezifisch mit CC1- und OLIG2-Antikörpern durchgeführt. **(B)** Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Änderungen in der Zahl von reifen CC1+ Oligodendrozyten nach GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung, im Vergleich zu Kontrolltieren, detektiert werden. Es wurde eine x20 Vergrößerung zur Darstellung genutzt. Maßstab = 50 µm (P11 und P15: n = 6 (NaCl), n = 6 (DMCM), n = 6 (CGP); Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni *post hoc* Test (B P11, P15)). **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

Bei Verwendung des Reifemarkers CNP ergab die molekularbiologische Proteinexpressionsbestimmung eine signifikante Reduktion im Alter P11 unter den CGP-behandelten Ratten ( $0,7 \pm 0,04$ ;  $p = 0,02$ ;  $n = 7$ ), im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese regenerierte sich und war somit zu P15 nicht mehr nachweisbar. Nach DMCM-Gabe folgten diesbezüglich keine nennenswerten Alterationen (s. Abb. 10). Die Berechnungen basieren auf dem Verhältnis der CNP/ $\beta$ -AKTIN-Konzentration und sind in der Abb. 10, im Bezug zum Mittelwert der Kontrolltiere ( $0,37$  für P11;  $0,28$  für P15), dargestellt.

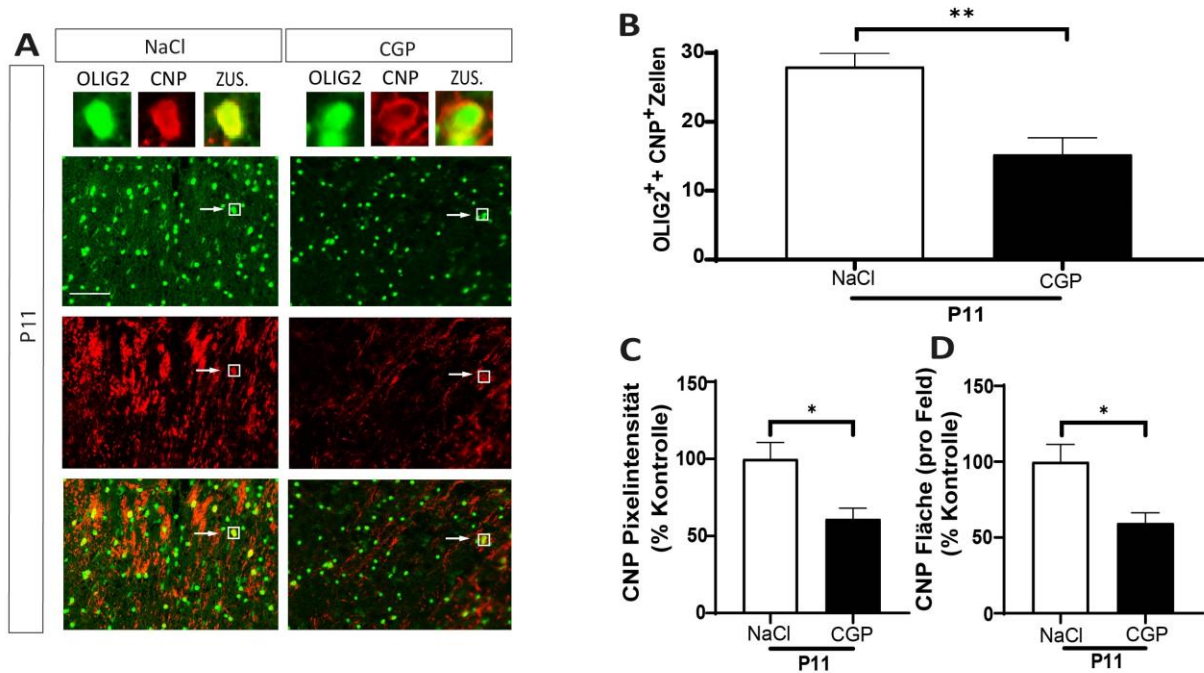
Die Banden der Western Blot-Analyse sind exemplarisch in der Abb. 10 (A) aufgeführt.



**Abb. 10. GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung reduziert die CNP-Expression in vivo in der Western Blot-Analyse. (A)** Die Quantifizierung der CNP-Expression mittels Western Blot Analyse wurde mit  $\beta$ -AKTIN als Referenzprotein durchgeführt. **(B)** Die Ratio CNP/ $\beta$ -AKTIN wurde bestimmt und die Werte im Verhältnis zur Kontrollgruppe angegeben (Mittelwerte der Kontrolltiere: 0,37 (P11) und 0,28 (P15)). Nach Behandlung mit DMCM ergaben sich keine signifikanten Alterationen im Alter P11 und P15. Nach CGP-Behandlung zeigte sich hingegen eine signifikante Senkung der CNP-Expression zum Zeitpunkt P11, die sich zu P15 wieder normalisierte (P11: n = 7 (Kontrolle), n = 7 (DMCM), n = 6-7 (CGP); P15: n = 6 (Kontrolle), n = 6 (DMCM), n = 6 (CGP); Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni *post hoc* Test (B: P11, P15), \*p < 0,05, versus Kontrollgruppe mit Vehikelbehandlung). **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

Für eine detaillierte Betrachtung der Reifungsprozesse innerhalb der CGP-Gruppe wurde, nach der Western Blot Untersuchung, zusätzlich eine immunhistochemische Analyse durch Färbung mit CNP vorgenommen (s. Abb. 11). Diese zeigte eine signifikante Abnahme der reifen OLIG2<sup>+</sup>CNP<sup>+</sup> Zellen pro Sichtfeld zum Zeitpunkt P11 auf (15 ± 2; p = 0,002; n = 6). Gleiches zeigte sich bei Auswertung der CNP-Pixelintensität (61% ± 7; p = 0,015; n = 6) und der CNP-Fläche (pro Feld) (60% ± 7; p = 0,015; n = 6). Die Berechnungen sind in % zur Kontrolle angegeben, wobei die Kontrolle als 100% gesetzt wurde. Dabei lagen die Mittelwerte der Kontrolltiere hinsichtlich der CNP-Pixelintensität bei 14,8% und hinsichtlich der CNP-Fläche (pro Feld) bei 13,0%.

Immunhistochemische Bilder der Reifungsauswertung von CC1<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> Zellen sowie CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> Zellen sind exemplarisch in den Abb. 9 (A) und Abb. 11 (C) dargestellt.

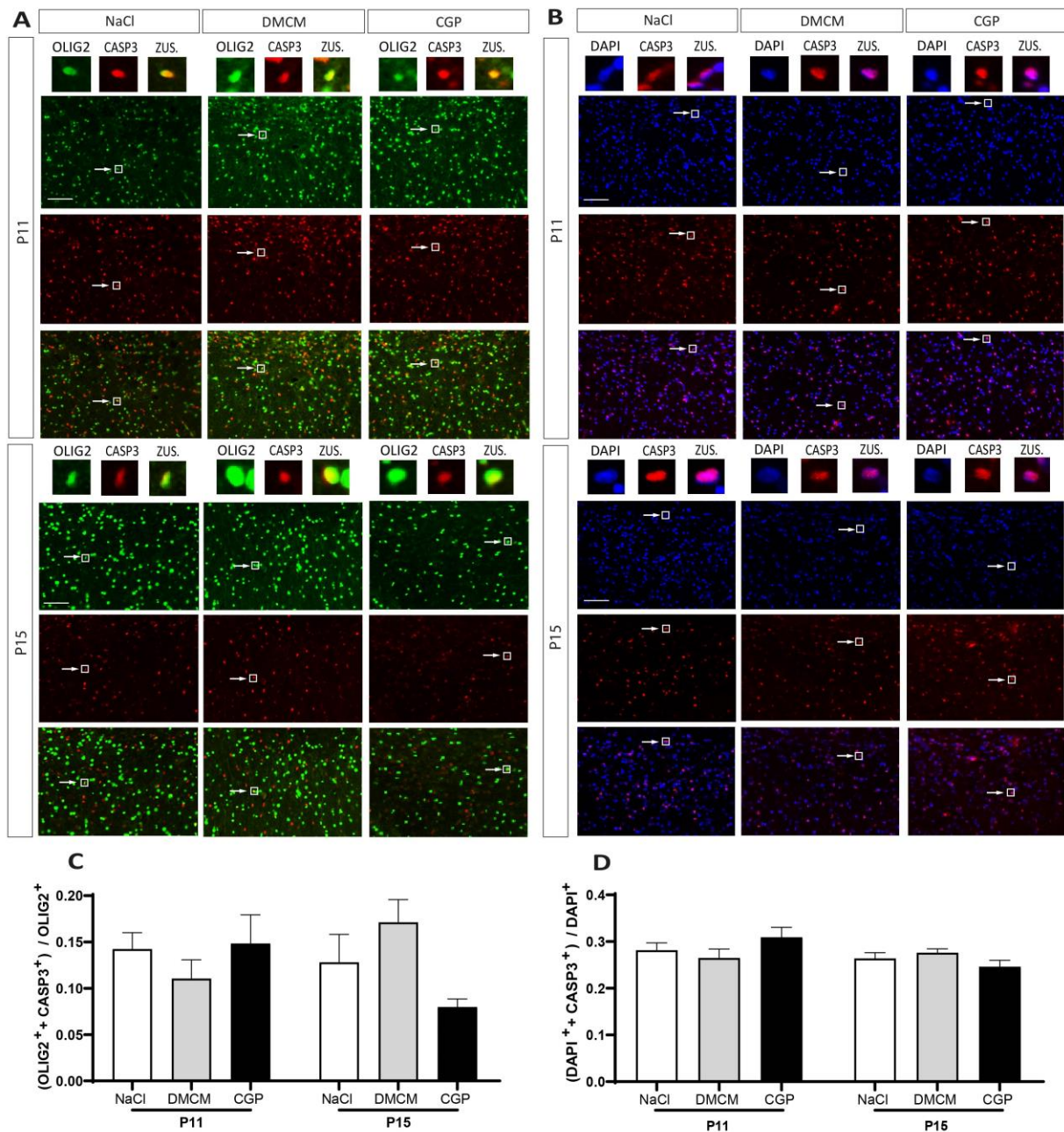


**Abb. 11. GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung reduziert die Reifung von CNP<sup>+</sup> Oligodendrozyten *in vivo* in der immunhistochemischen Analyse. (A)** Die immunhistochemische Analyse der 6 µm Schnitte der Cingulumregion wurde mit Antikörpern spezifisch gegen CNP und OLIG2 für CGP-behandelte Tiere durchgeführt. **(B)** Die Zahl der CNP<sup>+</sup> Oligodendrozyten zeigte eine signifikante Reduktion nach GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung zu P11. **(C, D)** Ebenso ließ sich eine signifikante Abnahme der CNP-Pixelintensität und der CNP-Fläche (pro Feld) messen. Diese Berechnungen wurden als % zur Kontrolle (100%) dargestellt (100%-Kontrollwert für CNP-Pixelintensität: 14,8% (P11); CNP-Fläche: 13,0% (P11)). Es wurde eine x20 Vergrößerung zur Darstellung genutzt. Maßstab = 50 µm (P11: n = 5-6 (NaCl), n = 5-6 (CGP); ungepaarter, zweiseitiger *student's t*-Test, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 versus Kontrollgruppe mit Vehikelbehandlung). **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

### 3.4. Oligodendrogläre und gesamtzelluläre Apoptose im Rattencortex nach GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung

Apoptotische Prozesse dienen zur Regulation des oligodendroglären Zellpools, mit dem Ziel, die verschiedenen Oligodendroglia-Zellstufen optimal zu balancieren (73, 74). Um die Apoptose im Cingulum nach GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung beurteilen zu können, erfolgte eine immunhistochemische Färbung von Oligodendrozyten sowie von allen DAPI<sup>+</sup> Zellen mit dem Apoptosemarker CASP3. Bilder der

immunhistochemischen Analyse sind dabei exemplarisch in Abb. 12 (A, B) bereitgestellt. Berechnet wurde je die Ratio  $(\text{OLIG2}^{++}\text{CASP3}^{+})/\text{OLIG2}^{+}$  und  $(\text{DAPI}^{++}\text{CASP3}^{+})/\text{DAPI}^{+}$ . Es konnten nach  $\text{GABA}_A$ - und  $\text{GABA}_B$ -Rezeptor-Blockade keine statistisch signifikanten Änderungen im Alter von P11 und P15 nachgewiesen werden (s. Abb. 12 C, D).



**Abb. 12.** *GABA*-Rezeptor-Antagonisierung zieht keine Auswirkungen auf die Apoptose oligodendroglärer Zellen sowie auf die Gesamtzellzahl *in vivo* in immunhistochemischer Analyse mit sich. (A, B) Die immunhistochemische Analyse der 6  $\mu\text{m}$  Schnitte der Cingulumregion wurde mit

Antikörpern spezifisch gegen CASP3<sup>+</sup> und OLIG2<sup>+</sup> durchgeführt. **(C, D)** Dabei zeigte die Zahl der apoptotischen Oligodendrozyten sowie die gesamtzelluläre Apoptose keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe nach DMCM- oder CGP-Gabe. Es wurde eine x20 Vergrößerung zur Darstellung genutzt. Maßstab = 50  $\mu\text{m}$  (P11: n = 5 (NaCl), n = 6 (DMCM), n = 6 (CGP); P15: n = 6 (NaCl), n = 6 (DMCM), n = 6 (CGP); Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni *post hoc* Test (C, D: P11 und P15)). **Quelle:** Modifiziert aus (1) mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-Verlag.

## 4. Diskussion

Unsere Studie beschäftigt sich mit den Auswirkungen von GABA-Rezeptor-Antagonisierung auf die Myelinisierung sowie die Oligodendroglia in Hinblick auf ihre Proliferation, Reifung und Apoptose am *in vivo* Modell der neonatalen Ratte. Die Ergebnisse unserer Arbeit offenbaren verstärkte Einflüsse insbesondere über den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor. Die Antagonisierung mittels CGP ging mit einer signifikanten Reduktion der MBP-Expression zum Zeitpunkt P15, vier Tage nach Behandlungsende, einher. Weiterhin ließ sich eine transiente Verzögerung der frühen Reifung, gemessen an der Zahl der CNP<sup>+</sup> Oligodendrozyten im Alter P11, erkennen, die sich bei P15 wieder regenerierte. Vier Tage nach Beendigung der CGP-Gabe war zudem ein Anstieg an proliferierenden PCNA<sup>+</sup> oligodendroglialen Zellen zu vermerken sowie konkret eine Zunahme der PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> OPC-Population. Die apoptotischen Prozesse blieben hingegen in der Cingulumregion von der GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung unberührt.

### 4.1. Auswirkungen der GABA-Rezeptor-Antagonisierung auf die Myelinisierung

Eine Reduktion der Proteinexpression von MBP war gleichartig durch Serrano-Regal et al. nach CGP-Applikation beobachtet worden. Passend hierzu beschrieben sie bei Anwendung eines Agonisierungsmodells, nach Gabe von exogenem GABA und Baclofen, eine Zunahme der MBP-Expression (35). In unserer Versuchsreihe zeigte sich eine relevante Reduktion der MBP-Expression nach DMCM-Behandlung einzig in der immunhistochemischen Analyse, bestätigte sich jedoch nicht nach Untersuchung im Western Blot. Hiermit weitestgehend in Konkordanz sahen Serrano-Regal et al. keine signifikanten Alterationen nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisation mit Muscimol (35).



Arellano et al. hatten bereits beschrieben, dass die oligodendroglären GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Verlauf der OL Progression abnehmen (53). Unter Berücksichtigung dieser Dynamik, scheint es möglich, dass die Auswirkungen einer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisierung/Agonisierung auf die Myelinisierung, entsprechend unseren Studienresultaten, geringer ausfällt als bei einer GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Blockade. Serrano-Regal et al. diskutieren in einem jüngsten Review-Artikel über mögliche Signalwege, die die Zusammenhänge zwischen GABA-Input und der damit einhergehenden MBP-Expressionszunahme auf zellulärer Ebene erklären könnten. Hierzu gehören Phospholipase C  $\beta$ /*focal adhesion kinase*/Proteinkinase C und *mitogen-activated protein kinase* Transduktionswege sowie die Tyrosinkinase Src-Phosphorylierung. Ob sich dieser Zusammenhang vollends bewahrheitet, bleibt noch Gegenstand aktueller Forschung (50). Sie könnten jedoch einen möglichen Erklärungsansatz unserer Resultate über die Interaktion zwischen GABA-Transmission und MBP-Expression bieten.

Im Kontrast zu unserer Arbeit stehen Erkenntnisse, die Hamilton et al. nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade mit Gabazin an Großhirnschnitten von Mäusen gewannen. Hier zeichnete sich eine Zunahme der Myelinisierung ab (59). Zu diskutieren ist dabei, ob jene Unterschiede auf die abweichenden neuronalen Strukturen im Maus- versus Rattenmodell zurückzuführen sind oder durch Umsetzung *in vitro* versus *in vivo* entstehen. In einer Arbeit von Jakovcevski et al. wurde von einer Zunahme an MBP<sup>+</sup> Oligodendrozyten in Kulturen des humanen fetalen Vorderhirns, im Vergleich zu gefrorenen Schnitten, berichtet. Hierfür wurden zwei mögliche Ursachen ausgearbeitet: Einerseits sind Myelin-inhibierende Proteine in Kulturen nicht mehr vorhanden, wozu beispielsweise PSA-NCAM zugehörig ist. Andererseits wird auch eine stimulierende Wirkung des Kulturmediums auf die Myelinisierungsprozesse vermutet (60). Dies könnte als Erklärungsgrundlage für die von Hamilton et al. präsentierte Myelinzunahme dienen (59) und für die Differenzen, im Vergleich zu unseren Ergebnissen im *in vivo* Rattenmodell, sprechen.

Prinzipiell gilt es festzuhalten, dass Effekte auf die Myelinisierung unterschiedlichen Ursprungs sein können. Im *in vivo* Tiermodell müssen insbesondere die erreichten Auswirkungen der Antagonisierung auf die interneuronale-oligodendrogläre Wechselwirkung mit einkalkuliert werden. Relevant ist dabei, dass neuronale Signale im gesunden Organismus eine funktionierende Myelinisierung ihrer eigenen Axone mit

stimulieren (36, 37). Bedenkt man nun, dass unsere DMCM- und CGP-Behandlung während des *GABA-Switchs* vonstattenging, (43) erscheint es möglich, dass die GABA-Rezeptor-Antagonisierung die depolarisierende Wirkung von GABA auf Neurone herabsenkte und so eine Abnahme der Myelinbildung mit sich zog. Auch die von uns aufgezeigte oligodendrogläre Reifungsverzögerung nach GABA-Rezeptor-Antagonisierung kann über eine verminderte Expression des *glial cell-derived neurotrophic factor* Defizite in der neuronalen Entwicklung verursacht haben. Dies könnte sich wiederum ebenfalls in der Expressionsreduktion von Myelinproteinen sichtbar gemacht haben. Ähnliche Zusammenhänge wurden bereits an einem Hyperoxie-Mausmodell gesehen (31).

#### *4.2. Auswirkungen der GABA-Rezeptor-Antagonisierung auf die oligodendrogläre Entwicklung*

Die Analyse der Oligodendroglia zeigte nach GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate im Alter von P15, gemessen an der Zahl der PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> Zellen, wohingegen die Gesamtanzahl der OLIG2<sup>+</sup> Zellen sich nicht als verändert präsentierte. Daraus schlussfolgernd wäre anzunehmen, dass die beobachtete Zunahme der Proliferation nicht die oligodendrogläre Gesamtheit in der Zellzahl betrifft, sondern vermutlich nur Subgruppen jener Reihe. Eine Identifikation der primär proliferierenden OPCs (7, 8), anhand des spezifischen Markers PDGFR $\alpha$ , zeigte in dem Zuge eine signifikante Zunahme von oligodendroglären Vorläuferzellen im Alter P15 nach CGP-Behandlung auf. Es erscheint somit möglich, dass in unserem Antagonisierungsmodell zunächst keine unmittelbaren Auswirkungen der oligodendroglären Proliferation mit nachfolgender Zunahme des gesamten oligodendroglären Zellpools auftreten, sondern die verstärkte OPC-Proliferation als kompensatorische Antwort auf die beginnenden Myelindefizite bei P11 zu werten ist, dessen Folgeprozesse gegebenenfalls zu späteren Zeitpunkten sichtbar geworden wären. Generell ergaben unsere Proliferationsanalysen keinerlei markante Alterationen in der mit DMCM behandelten Tiergruppe. Abweichend von unseren Resultaten, präsentierte sich nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade mit Gabazin durch Hamilton et al. eine Proliferationszunahme oligodendroglärer Vorläuferzellen in Großhirnschnitten von Mäusen (59). Zonouzi et al. berichteten in einer weiteren Studie von einer OPC-

Proliferation nach Antagonisierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors mit Bicucullin im Mauskleinhirn (2). Beide genannten Alterationen ließen sich bei uns ausschließlich in der CGP-behandelten Versuchsgruppe signifikant nachweisen, in der DMCM-Gruppe hingegen nur in der Tendenz. Für jene Unterschiede in der Auswertung kommen als Erklärungsansatz insbesondere unterschiedliche Dynamiken in der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Besetzung im Groß- versus Kleinhirn infrage. Konkret wäre eine stärkere GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Expression im Kleinhirnmodell von Zonouzi et al. denkbar.

Unsere Versuchsreihe zur Evaluierung der oligodendroglären Reifung nach DMCM- und CGP-Gabe zeigte eine transiente Reduktion der CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> Zellen im Alter P11 nach GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Blockade auf, die sich zum Zeitpunkt P15 wieder regenerierte. Eine immunhistochemische Analyse mit dem Marker CC1 ergab in der oligodendroglären Population hingegen keine nennenswerten Veränderungen in beiden Versuchsgruppen. Aus bisherigen Studien ist uns bekannt, dass CNP bereits in unreiferen Zellstadien der oligodendroglären Entwicklung exprimiert wird, der Marker CC1 hingegen erst zu späteren Zeitpunkten (s. Abb. 2) (75). Daher wäre eine Einschränkung der frühen Reifung nach GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Inhibition denkbar, beispielsweise im Übergang der Entwicklung vom OPC hin zum unreifen Oligodendrozyten. So wie auch MBP, gehört CNP außerdem zu den Myelin-bildenden Proteinen und hat eine tragende Funktion bei der Initiierung der Myelinsynthese inne (76). Daraus schlussfolgernd könnte eine transiente Expressionsreduktion von CNP ebenfalls Ausdruck einer Initiierungsstörung in der Myelinformation sein und Ursache der von uns beobachteten Expressionsreduktion von MBP. In Kontrast zu unserer Arbeit berichteten Zonouzi et al. von signifikanten Reduktionen der CC1<sup>+</sup> Zellen nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisierung (2). Hamilton et al. konnten bei einer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade mittels Gabazin-Applikation eine Zunahme von reifen Oligodendrozyten vermerken (59). Ähnliche Erklärungsansätze wie bei den Auswirkungen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade auf die oligodendrogläre Proliferation sind auch hier anwendbar.

Apoptotische Prozesse wurden sowohl im gesamten Zellverbund der Cingulumregion als auch in der Untergruppe der oligodendroglären Zellen analysiert. Hamilton et al. konnten in Kulturversuchen eine Abnahme des oligodendroglären Zelltods nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Inhibierung vermerken (59). In unserer Arbeit waren hingegen keine Alterationen der Apoptose zu den beiden Zeitpunkten P11 und P15 erkennbar. Nach

beobachteter Proliferationszunahme oligodendroglärer Zellen zu P15, wäre eine spätere kompensatorische Apoptosesteigerung zur Balancierung des Gesamtzellpools möglich.

Hinsichtlich der oligodendroglären Entwicklung zeigt sich somit der verzögerte Übergang von Vorläuferzellen zu noch unreifen Oligodendroglia sowie die Zunahme an proliferierenden OPCs als Hauptmerkmal der beobachteten Alteration. Dabei ist zu diskutieren, welche Prozesse nach GABA-Rezeptor-Antagonisierung konkret ursächlich sind für jene aufgeführten oligodendroglären Entwicklungsveränderungen. Einerseits ist ein direkter Effekt über die oligodendroglären GABA-Rezeptoren selbst möglich. Andererseits gehört zu den weitreichenden Funktionen von MBP ebenfalls die Stabilisierung von Mikrotubuli der Oligodendrozyten (70). Hierdurch ist ein wechselseitiger Einfluss auf die Morphogenese jener Zellen zu erwarten. Ob somit die in P15 sichtbare MBP-Expressionsreduktion weitere oligodendrogläre Effekte zu späteren Zeitpunkten mit sich gezogen hätte, erscheint möglich und bleibt künftig zu erforschen. Dabei scheint stets eine Differenzierung in der Beurteilung der GABA<sub>A</sub>- versus GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sowie eine konkrete Analyse von möglichen Expressionsunterschieden jener oligodendroglärer Rezeptoren in verschiedenen Hirnregionen relevant. Die allgemeine Abnahme der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, während der oligodendroglären Progression, bietet bereits eine Erklärungsgrundlage für die geringer ausfallende Wirkung der DMCM-Gabe, im Kontrast zur CGP-Behandlung. Weswegen die MBP-Reduktion in der immunhistochemischen Analyse der vulnerablen Cingulum-Region bei DMCM-behandelten Tieren tendenziell stärker ausfällt, im Vergleich zum gesamten Großhirn bei der Western Blot-Analyse, bleibt hingegen offen und wäre durch unterschiedliche Expressionsprofile der GABA-Rezeptoren und deren Untereinheiten erklärbar. Gleiches gilt hinsichtlich der sichtbaren Zunahme an PDGFR $\alpha^+$  OPCs, trotz des Ausbleibens einer damit korrespondierenden gesamtcerebralen Erhöhung der *Pdgfra*-Genexpression.

#### 4.3. Zusammenfassung der Studienerkenntnisse

Im Hinblick auf die zu Beginn formulierten Forschungsfragen, lässt sich aus unseren Studienergebnissen schließen, dass die GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisierung eine Herabsenkung der Myelinisierung von Axonen im Großhirn der Ratte, gemessen an der Expression von MBP, hervorruft. Besonders markant fällt diese nach CGP-Gabe

aus. Hinsichtlich der oligodendroglären Entwicklung ließ sich in unserer Arbeit eine Zunahme der Proliferation nach GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Inhibition erkennen sowie eine transiente Reifungsverzögerung unreifer oligodendroglärer CNP<sup>+</sup> Zellstufen, jedoch keine apoptotischen Veränderungen in der oligodendroglären und gesamtzellulären Population. Alterationen, sowohl in der Myelinisierung als auch in der Oligodendrozyten-Entwicklung, zeigten sich somit insbesondere nach CGP-Applikation, wohingegen aus der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Hemmung keine relevanten Änderungen resultierten. Einzig eine Reduktion der MBP-Expression, bei spezifischer Analyse der Cingulumregion, war nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Inhibition erkennbar. Bei einem direkten Vergleich der beiden analysierten Zeitpunkte wurde ersichtlich, dass sich die Myelinisierungsdefizite bei CGP-Gabe insbesondere nach einer kurzen Erholungszeit, im Alter P15, präsentierten. Gleiches gilt für Proliferationszunahmen in der Gruppe oligodendroglärer Gesamtzellen sowie spezifisch in der Subgruppe der Vorläuferzellen. Eine kurzzeitige Reifungsverzögerung war hingegen zum Zeitpunkt P11 erkennbar.

Eine mögliche Relevanz der auf den oligodendroglären Zellen befindlichen GABA-Rezeptoren im Hinblick auf die oligodendrogläre Entwicklung sowie die nachfolgende Myelinisierung, war bereits in vorangegangenen Studien diskutiert worden. Jedoch warfen bisherige Ergebnisse heterogene Thesen auf und beruhten zu größten Teilen auf Zellkulturversuchen (2, 50, 59). Mit unserer Arbeit schafften wir anhand einer Analyse am *in vivo* Modell eine gesamtorganische Betrachtung und bestätigten damit einige der bisherig aufgestellten Thesen. Künftige Studien, beispielsweise anhand von Knockout-Mäusen mit Deaktivierung verschiedener GABA-Rezeptor-Subtypen, könnten hierauf aufbauend bei Analyse der oligodendroglären Proliferation, Reifung und Myelinisierung ein weiterführendes Verständnis der Thematik bieten.

Im Hinblick auf die Förderung der Gehirnentwicklung von Neu- und Frühgeborenen, ließe sich, basierend auf unseren Resultaten, ein neurotoxischer Effekt der verminderten GABA-Transmission auf das Myelin vermuten, den die Oligodendroglia zu kompensieren versuchen. Zusammenhänge zwischen einer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisierung und daraus resultierenden Verbesserung in der Myelinbildung und im Verhaltensmuster wurden beispielsweise an Meerschweinchen aufgezeigt. Diese hätten durch ihre Frühgeburt per se, als Folge des reduzierten GABAergen Einflusses, Myelindefizite erfahren und Verhaltensauffälligkeiten aufgezeigt. Dies konnte durch die pharmakologische GABA<sub>A</sub>-

Rezeptor-Agonisierung im Tiermodell kompensiert werden (77, 78). Ob GABA-Input, beispielsweise ebenso über GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, im klinischen Umfeld bei der Ausbildung von Schäden in der weißen Substanz und der sekundären Entstehung neurologisch-psychiatrischer Erkrankungen entgegenwirkt, bleibt weiter zu erforschen.

#### 4.4. Limitationen

Limitierend für unsere Studie ist eine fehlende Subgruppen-spezifische Analyse bezüglich möglicher Unterschiede in den Auswirkungen der GABA-Rezeptor-Antagonisierung. Es ist bekannt, dass weibliche Neu- und Frühgeborene eine bessere Adaptationsfähigkeit und höhere Überlebenschancen vorweisen (79-81). Ob unsere Antagonisierungsreihe somit in der weiblichen Population beispielsweise mit einer geringeren MBP-Reduktion einhergegangen wäre, bleibt ungeklärt. Ebenso liegen Studien vor, die beschreiben, dass der *GABA-Switch* in der männlichen Population später vorstättengeht als in der weiblichen (45). Inwieweit dies nach GABA-Rezeptor-Blockade abweichende Auswirkungen auf die Gehirnentwicklung je nach Geschlecht mit sich zieht, ist unklar. Bei einer länger andauernden exzitatorischen Wirkung von GABA auf die Neuronen unter männlichen Neugeborenen wäre zu vermuten, dass eine Antagonisierung jener Rezeptoren mit verminderter neuronaler Aktivität einhergegangen und daraus folgernd Störungen in der Myelinbildung resultiert hätten.

Auch wurden in unserer Arbeit, neben P11 und P15, keine späteren Beobachtungszeitpunkte herangezogen. Zonouzi et al. hingegen untersuchten Langzeiteffekte einer anfänglichen Hypoxie in ihrem neonatalen Kleinhirnmodell der Maus und beobachteten eine partielle Myelinregeneration zu P30. Sie stellten gleichzeitig Parallelen der Effekte einer Hypoxie zur GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisierung auf (2). Ob sich auch in unserem Tiermodell die Myelindefizite und oligodendrogläre Entwicklungsveränderungen nach GABA-Rezeptor-Blockade langfristig dynamisch geändert hätten, bleibt künftig zu erforschen. Besonders im klinischen Kontext sind Langzeiteffekte von neuroprotektiven beziehungsweise neurotoxischen Prozessen von Relevanz. Da sich der Zeitraum des schnellsten Hirnwachstums bis ins die ersten Lebensjahre eines Menschen ziehen kann (5), erscheint eine Kompensation anfänglicher Schädigungen in gewissem Maße möglich.

## Literaturverzeichnis

1. Pudasaini S, Friedrich V, Buehrer C, Endesfelder S, Scheuer T, Schmitz T. Postnatal myelination of the immature rat cingulum is regulated by GABAB receptor activity. *Developmental Neurobiology*. 2021.
2. Zonouzi M, Scafidi J, Li P, McEllin B, Edwards J, Dupree JL, Harvey L, Sun D, Huebner C, Cull-Candy SG, Farrant M, Gallo V. GABAergic regulation of cerebellar NG2-cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nature Neuroscience*. 2015;18(5):674-82.
3. Schmitz T, Ritter J, Mueller S, Felderhoff-Mueser U, Chew LJ, Gallo V. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *The journal of Neuroscience*. 2011;31(11):4327-44.
4. Stolp HB, Fleiss B, Arai Y, Supramaniam V, Vontell R, Birtles S, Yates AG, Baburamani AA, Thornton C, Rutherford M, Edwards AD, Gressens P. Interneuron Development Is Disrupted in Preterm Brains With Diffuse White Matter Injury: Observations in Mouse and Human. *Frontiers in Physiology*. 2019;10:955.
5. Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics*. 1974;53(1):2-6.
6. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*. 2013;106-107:1-16.
7. Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1843(9):1917-29.
8. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 2019;8(11).
9. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(7):517-30.
10. Craig A, Ling Luo N, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, Hohimer AR, Back SA. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Experimental Neurology*. 2003;181(2):231-40.
11. World Health Organization. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. 2012. <https://www.marchofdimess.org/materials/born-too-soon-the-global-action-report-on-preterm-.pdf>. Letzter Zugriff: 09.05.2022, 13:19 Uhr.

12. Tucker J, McGuire W. Epidemiology of preterm birth. *BMJ*. 2004;329(7467):675-8.
13. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, Laptook AR, Sánchez PJ, Van Meurs KP, Wyckoff M, Das A, Hale EC, Ball MB, Newman NS, Schilber K, Poindexter BB, Kennedy KA, Cotton CM, Watterberg KL, D'Angio CT, DeMauro SB, Truog WE, Devaskar U, Higgins RD. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA*. 2015;314(10):1039-51.
14. Patel RM, Kandefer S, Walsh MC, Bell EF, Carlo WA, Laptook AR, Sánchez PJ, Shankaran S, Van Meurs KP, Ball MB, Hale EC, Newman NS, Das A, Higgins RD, Stoll BJ, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(4):331-40.
15. Kusuda S, Fujimura M, Uchiyama A, Totsu S, Matsunami K, Neonatal Research Network J. Trends in morbidity and mortality among very-low-birth-weight infants from 2003 to 2008 in Japan. *Pediatric Research*. 2012;72(5):531-8.
16. Battin MR, Knight DB, Kuschel CA, Howie RN. Improvement in mortality of very low birthweight infants and the changing pattern of neonatal mortality: the 50-year experience of one perinatal centre. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2012;48(7):596-9.
17. Patel RM. Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *American Journal of Perinatology*. 2016;33(3):318-28.
18. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*. 1979;3(1):79-83.
19. Hasegawa M, Houdou S, Mito T, Takashima S, Asanuma K, Ohno T. Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: a myelin basic protein immunohistochemical study. *Brain & Development*. 1992;14(1):1-6.
20. Huppi PS, Warfield S, Kikinis R, Barnes PD, Zientara GP, Jolesz FA, Tsuji MK, Volpe JJ. Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns. *Annals of Neurology*. 1998;43(2):224-35.
21. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*. 2001;81(2):871-927.
22. Bonthuis DJ, West JR. Permanent neuronal deficits in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Teratology*. 1991;44(2):147-63.
23. Marin O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012;13(2):107-20.



24. Lacaille H, Vacher CM, Bakalar D, O'Reilly JJ, Salzbank J, Penn AA. Impaired Interneuron Development in a Novel Model of Neonatal Brain Injury. *eNeuro*. 2019;6(1).
25. Johnson S, Marlow N. Preterm birth and childhood psychiatric disorders. *Pediatric Research*. 2011;69(5 Pt 2):11R-8R.
26. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, Neve RL, Felderhoff-Mueser U, Volpe JJ, Rosenberg PA. Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *The Journal of Neuroscience*. 2008;28(5):1236-45.
27. Sedowofia K, Giles D, Wade J, Cunningham S, McColm JR, Minns R, McIntosh N. Myelin expression is altered in the brains of neonatal rats reared in a fluctuating oxygen atmosphere. *Neonatology*. 2008;94(2):113-22.
28. Castillo A, Sola A, Baquero H, Neira F, Alvis R, Deulofeut R, Critz A. Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics*. 2008;121(5):882-9.
29. Weber A, Dzierko M, Berns M, Felderhoff-Mueser U, Heinemann U, Maier RF, Obladen M, Ikonomidou C, Buehrer C. Neuronal damage after moderate hypoxia and erythropoietin. *Neurobiology of Disease*. 2005;20(2):594-600.
30. Reich B, Hoeber D, Bendix I, Felderhoff-Mueser U. Hyperoxia and the Immature Brain. *Developmental Neuroscience*. 2016;38(5):311-30.
31. Scheuer T, dem Brinke EA, Grosser S, Wolf SA, Mattei D, Sharkovska Y, Barthel PC, Endesfelder S, Friedrich V, Bühner C, Vida I, Schmitz T. Reduction of cortical parvalbumin-expressing GABAergic interneurons in a rodent hyperoxia model of preterm birth brain injury with deficits in social behavior and cognition. *Development*. 2021;148(20).
32. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological Reviews*. 2019;99(3):1381-431.
33. Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends in Cell Biology*. 1993;3(6):191-7.
34. Habermacher C, Angulo MC, Benamer N. Glutamate versus GABA in neuron-oligodendroglia communication. *Glia*. 2019;67(11):2092-106.
35. Serrano-Regal MP, Luengas-Escuza I, Bayon-Cordero L, Ibarra-Aizpurua N, Alberdi E, Pérez-Samartín A, Matute C, Sánchez-Gómez MV. Oligodendrocyte

Differentiation and Myelination Is Potentiated via GABAB Receptor Activation. *Neuroscience*. 2020;439:163-80.

36. Barateiro A, Brites D, Fernandes A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22(6):656-79.

37. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 2010;119(1):37-53.

38. Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2002;3(9):728-39.

39. Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*. 2001;105(4):521-32.

40. Kirchhoff F, Kettenmann H. GABA Triggers a  $[Ca^{2+}]_i$  Increase in Murine Precursor Cells of the Oligodendrocyte Lineage. *The European Journal of Neuroscience*. 1992;4(11):1049-58.

41. Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Advances in Neurology*. 1999;79:189-201.

42. Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological Reviews*. 2007;87(4):1215-84.

43. Tyzio R, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R. Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5:96-105.

44. Galanopoulou AS. Dissociated gender-specific effects of recurrent seizures on GABA signaling in CA1 pyramidal neurons: role of GABA(A) receptors. *The Journal of Neuroscience*. 2008;28(7):1557-67.

45. Kyrozis A, Chudomel O, Moshe SL, Galanopoulou AS. Sex-dependent maturation of GABAA receptor-mediated synaptic events in rat substantia nigra reticulata. *Neuroscience Letters*. 2006;398(1-2):1-5.

46. Balia M, Velez-Fort M, Passlick S, Schafer C, Audinat E, Steinhäuser C, Seifert G, Angulo MC. Postnatal down-regulation of the GABAA receptor gamma2 subunit in

neocortical NG2 cells accompanies synaptic-to-extrasynaptic switch in the GABAergic transmission mode. *Cerebral Cortex*. 2015;25(4):1114-23.

47. Macdonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annual Review of Neuroscience*. 1994;17:569-602.

48. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiological Reviews*. 2004;84(3):835-67.

49. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacological Reviews*. 2002;54(2):247-64.

50. Serrano-Regal MP, Bayon-Cordero L, Ordaz RP, Garay E, Limon A, Arellano RO, Matute C, Sánchez-Gómez MV. Expression and Function of GABA Receptors in Myelinating Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020;14:256.

51. Vogt K. Diversity in GABAergic signaling. *Advances in Pharmacology*. 2015;73:203-22.

52. Von Blankenfeld G, Trotter J, Kettenmann H. Expression and Developmental Regulation of a GABAA Receptor in Cultured Murine Cells of the Oligodendrocyte Lineage. *The European Journal of Neuroscience*. 1991;3(4):310-6.

53. Arellano RO, Sanchez-Gomez MV, Alberdi E, Canedo-Antelo M, Chara JC, Palomino A, Pérez-Samartín A, Matute C. Axon-to-Glia Interaction Regulates GABAA Receptor Expression in Oligodendrocytes. *Molecular Pharmacology*. 2016;89(1):63-74.

54. Berger T, Walz W, Schnitzer J, Kettenmann H. GABA- and glutamate-activated currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *Journal of Neuroscience Research*. 1992;31(1):21-7.

55. Salari AA, Amani M. Neonatal blockade of GABA-A receptors alters behavioral and physiological phenotypes in adult mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2017;57:62-71.

56. Naderipoor P, Amani M, Abedi A, Sakhaie N, Sadegzadeh F, Saadati H. Alterations in the behavior, cognitive function, and BDNF level in adult male rats following neonatal blockade of GABA-A receptors. *Brain Research Bulletin*. 2021;169:35-42.

57. Balia M, Benamer N, Angulo MC. A specific GABAergic synapse onto oligodendrocyte precursors does not regulate cortical oligodendrogenesis. *Glia*. 2017;65(11):1821-32.

58. Luyt K, Slade TP, Dorward JJ, Durant CF, Wu Y, Shigemoto R, Mundell SJ, Váradi A, Molnár E. Developing oligodendrocytes express functional GABA(B) receptors that stimulate cell proliferation and migration. *Journal of Neurochemistry*. 2007;100(3):822-40.
59. Hamilton NB, Clarke LE, Arancibia-Carcamo IL, Kougioumtzidou E, Matthey M, Káradóttir R, Whiteley L, Bergersen LH, Richardson WD, Attwell D. Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia*. 2017;65(2):309-21.
60. Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2009;3:5.
61. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*. 2020;18(7):e3000410.
62. Kulick C, Gutherz S, Kondratyev A, Forcelli PA. Ontogenic profile of seizures evoked by the beta-carboline DMCM (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate) in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2014;740:662-8.
63. Bittiger H, Froestl W, Mickel S, Olpe HR. GABAB receptor antagonists: from synthesis to therapeutic applications. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1993;14(11):391-4.
64. Tyagi RK, Bisht R, Pant J, Kumar P, Majeed AB, Prakash A. Possible role of GABA-B receptor modulation in MPTP induced Parkinson's disease in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2015;67(2):211-7.
65. Schmitz T, Krabbe G, Weikert G, Scheuer T, Matheus F, Wang Y, Mueller S, Kettenmann H, Matyash V, Bühner C, Endesfelder S.. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Experimental Neurology*. 2014;254:153-65.
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
67. Martenson RE, Myelin basic protein isoform. In: Martenson RE, ed. *Myelin: Biology and Chemistry*: 1st ed., New York, CRC Press; 1992. pp. 387- 413.

68. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(17):1945-61.
69. Richter-Landsberg C. The oligodendroglia cytoskeleton in health and disease. *Journal of Neuroscience Research.* 2000;59(1):11-8.
70. Galiano MR, Andrieux A, Deloulme JC, Bosc C, Schweitzer A, Job D, Hallak ME. Myelin basic protein functions as a microtubule stabilizing protein in differentiated oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research.* 2006;84(3):534-41.
71. Carre JL, Goetz BD, O'Connor LT, Bremer Q, Duncan ID. Mutations in the rat myelin basic protein gene are associated with specific alterations in other myelin gene expression. *Neuroscience Letters.* 2002;330(1):17-20.
72. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997;14(6):629-40.
73. Kessar N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience.* 2006;9(2):173-9.
74. Sun LO, Mulinyawe SB, Collins HY, Ibrahim A, Li Q, Simon DJ, Tessier-Lavigne M, Barres BA. Spatiotemporal Control of CNS Myelination by Oligodendrocyte Programmed Cell Death through the TFEB-PUMA Axis. *Cell.* 2018;175(7):1811-26 e21.
75. Cai J, Zhu Q, Zheng K, Li H, Qi Y, Cao Q, Qiu M. Co-localization of Nkx6.2 and Nkx2.2 homeodomain proteins in differentiated myelinating oligodendrocytes. *Glia.* 2010;58(4):458-68.
76. Gravel M, Peterson J, Yong VW, Kottis V, Trapp B, Braun PE. Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Molecular and Cellular Neurosciences.* 1996;7(6):453-66.
77. Shaw JC, Dyson RM, Palliser HK, Gray C, Berry MJ, Hirst JJ. Neurosteroid replacement therapy using the allopregnanolone-analogue ganaxolone following preterm birth in male guinea pigs. *Pediatric Research.* 2019;85(1):86-96.
78. Shaw JC, Crombie GK, Palliser HK, Hirst JJ. Impaired Oligodendrocyte Development Following Preterm Birth: Promoting GABAergic Action to Improve Outcomes. *Frontiers in Pediatrics.* 2021;9:618052.
79. Peacock JL, Marston L, Marlow N, Calvert SA, Greenough A. Neonatal and infant outcome in boys and girls born very prematurely. *Pediatric Research.* 2012;71(3):305-10.

80. Naeye RL, Burt LS, Wright DL, Blanc WA, Tatter D. Neonatal mortality, the male disadvantage. *Pediatrics*. 1971;48(6):902-6.
81. Waldron I. Sex differences in human mortality: the role of genetic factors. *Social Science & Medicine*. 1983;17(6):321-33.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Samipa Pudasaini, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Auswirkungen einer GABA-Rezeptor-Antagonisierung auf die oligodendrogläre Entwicklung und Myelinisierung am Modell des neonatalen Rattencortex“ („Effects of GABA receptor antagonization on oligodendroglial development and myelination of the neonatal rat cortex“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://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.“

Berlin, den

Datum

Unterschrift

## **Anteilsklärung an der erfolgten Publikation**

Publikation: Samipa Pudasaini, Vivien Friedrich, Christoph Bühner, Stefanie Endesfelder, Till Scheuer, Thomas Schmitz, Postnatal myelination of the immature rat cingulum is regulated by GABA<sub>B</sub> receptor activity, *Developmental Neurobiology*, 2021.

Prozentualer Anteil: 75%

### Beitrag im Einzelnen:

Samipa Pudasaini hat als Erstautorin folgende Beiträge zu der oben genannten Publikation geleistet:

- Planung, Durchführung und Protokollierung und statistische Auswertung aller immunhistochemischen und molekularbiologischen Versuche
- Erstellung aller Tabellen (1-3) sowie aller Abbildungen (1-8)
- Literaturrecherche, Verfassung und Einreichung des Manuskripts sowie Überarbeitung nach Review

Die Konzeptualisierung der Arbeit erfolgte durch PD (Privatdozent) Dr. med. Thomas Schmitz. Gemeinsam mit Samipa Pudasaini wurde die Umsetzung fortwährend kritisch diskutiert und angepasst. Der Tierversuchsantrag wurde von PD Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder verfasst und eingereicht. Die GABA-Rezeptor-Behandlung der Kontroll- und Versuchstiere erfolgte durch PD Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder und Dr. rer. nat. Till Scheuer. Samipa Pudasaini erhielt eine erste Anleitung für molekularbiologische und immunhistochemische Versuche durch Dr. rer. nat. Till Scheuer und Ruth Herrmann sowie Evelyn Strauss. PD Dr. med. Thomas Schmitz, Dr. rer. nat. Till Scheuer, PD Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder und Prof. Dr. med. Christoph Bühner unterstützten bei der Überarbeitung und Optimierung des Manuskripts.

Unterschrift Samipa Pudasaini

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden  
Hochschullehrers



## Auszug aus der Journal Summary List (2019)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"DEVELOPMENT BIOLOGY"** Selected Category  
 Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 41 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Annual Review of Cell and Developmental Biology	10,057	14.667	0.016730
2	DEVELOPMENTAL CELL	29,444	10.092	0.065560
3	GENES & DEVELOPMENT	55,192	9.527	0.063070
4	SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY	11,081	6.691	0.025510
5	DEVELOPMENT	53,471	5.611	0.071180
6	Frontiers in Cell and Developmental Biology	3,161	5.201	0.011400
7	Current Topics in Developmental Biology	3,325	4.035	0.007330
8	Developmental Neurobiology	3,049	3.935	0.006120
9	Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology	1,375	3.883	0.004400
10	MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION	5,204	3.636	0.004970
11	DEVELOPMENTAL DYNAMICS	9,742	3.275	0.006650
12	REPRODUCTION	9,538	3.206	0.009880
13	PLACENTA	8,812	3.177	0.010480
14	DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE	2,190	3.041	0.002050
15	DEVELOPMENTAL BIOLOGY	27,830	2.895	0.023230
16	MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT	5,496	2.823	0.004810
17	Neural Development	969	2.630	0.001610
18	DIFFERENTIATION	2,657	2.392	0.001700
19	Organogenesis	1,045	2.321	0.001160

## Druckexemplar der Publikation



Received: 19 February 2021 | Revised: 26 July 2021 | Accepted: 20 September 2021

DOI: 10.1002/dneu.22853

## RESEARCH ARTICLE

WILEY

## Postnatal myelination of the immature rat cingulum is regulated by GABA<sub>B</sub> receptor activity

Samipa Pudasaini<sup>1</sup> | Vivien Friedrich<sup>1,2</sup> | Christoph Bührer<sup>1</sup> | Stefanie Endesfelder<sup>1</sup> | Till Scheuer<sup>1</sup> | Thomas Schmitz<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Neonatology, Charité University Hospital Berlin, Augustenburger Platz 1, Berlin 13353, Germany<sup>2</sup> Berlin Institute of Health (BIH), Anna-Louisa-Karsch-Straße 2, Berlin 10178, Germany**Correspondence**Thomas Schmitz, Klinik für Neonatologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany.  
Email: [Thomas.Schmitz@charite.de](mailto:Thomas.Schmitz@charite.de)**Funding information**

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: Sche 2078/2-1; Förderverein für frühgeborene Kinder an der Charité e. V.; Lydia Rabinowitsch Foundation

**Abstract**

Myelination of axons in the neonatal brain is a highly complex process primarily achieved by oligodendroglial cells (OLs). OLs express receptors for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) which is released from cortical interneurons on a basal level, while glial cells can be a source of GABA, too. We investigated GABA-induced oligodendroglial maturation, proliferation, apoptosis, and myelin production after pharmacological inhibition of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> in the neonatal rat brain. Daily injections of the reverse GABA<sub>A</sub> receptor agonist (DMCM) and the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist (CGP35348) were performed from postnatal day 6 (P6) to P11. MBP expression was examined by Western blots and immunohistochemistry. Furthermore, we determined the number of CC1<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> and CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> cells to assess maturation, the number of PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> oligodendrocytes to assess proliferation, the number of oligodendrocyte precursor cells (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>), and apoptosis of OLs (CASP3A<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>) as well as apoptotic cells in total (CASP3A<sup>+</sup>DAPI<sup>+</sup>) at P11 and P15. In addition, we analyzed the expression *Pdgfra* and CNP. MBP expression was significantly reduced after CGP treatment at P15. In the same animal group, CNP expression and CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> cells decreased temporarily at P11. At P15, the proliferation of PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> cells and the number of PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> cells increased after GABA<sub>B</sub> receptor antagonization whereas no significant differences were visible in the *Pdgfra* gene expression. No changes in apoptotic cell death were observed. CGP treatment induced a transient maturational delay at P11 and deficits in myelin expression at P15 with increased oligodendroglial proliferation. Our in vivo study indicates GABA<sub>B</sub> receptor activity as a potential modulator of oligodendroglial development.

**KEYWORDS** $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), neonatal brain, oligodendroglia, myelination, proliferation

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2021 The Authors. *Developmental Neurobiology* published by Wiley Periodicals LLC.

## 1 | INTRODUCTION

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is well-known as the main inhibitory neurotransmitter in the adult brain. Prenatally, however, it carries the potential to trigger excitatory currents (Ben-Ari, 2002; Ganguly et al., 2001; Kirchhoff & Kettenmann, 1992; Leinekugel et al., 1999). Its ionotropic and metabotropic receptors are characterized by a high heterogeneity as their function and the composition of their subunits can vary immensely depending on the brain region and the developmental stage (Balía et al., 2015; Serrano-Regal et al., 2020; Vogt, 2015).

In contrast to neuronal GABA receptors, the functional expression of GABA receptors in oligodendroglial lineage cells has not been investigated in great detail (Gilbert et al., 1984; Serrano-Regal et al., 2020; Steinhauser et al., 1994). Recent studies assessed the expression of GABA<sub>A</sub> receptors and GABA<sub>B</sub> receptors in oligodendrocytes and discovered their presence as being more pronounced in oligodendrocyte precursor cells (OPCs) compared to mature oligodendrocytes (Arellano et al., 2016; Káradóttir & Attwell, 2007; Serrano-Regal et al., 2020). Myelinating oligodendrocytes, which evolve from OPCs, are responsible for a proper myelination of neuronal axons in the central nervous system (CNS) to guarantee a high transmission speed of electric impulses (Baumann & Pham-Dinh, 2001). GABA can be assumed to influence myelin sheath development by activating oligodendroglial GABA receptors. However, results concerning this matter have so far shown inconsistency and heterogeneity (Balía et al., 2017; Luyt et al., 2007; Tong et al., 2009). Hamilton et al. described a decrease in oligodendroglial cell death as well as an enhanced oligodendroglial maturation, proliferation and myelination resulting from blocking GABA<sub>A</sub> receptor activity in cerebral cortex slices of mice (Hamilton et al., 2017). The research by Zonouzi et al., in contrast, indicated an increase in OPC proliferation and a delay of oligodendroglial maturation in the cerebellar white matter after injection of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline in mice (Zonouzi et al., 2015). In a recent study, Serrano-Regal et al. showed that GABA stimulates oligodendroglial differentiation and myelin basic protein (MBP) expression in oligodendrocyte cultures via GABA<sub>B</sub> receptors *in vitro*, while there was no effect on the proliferation of OPCs (Serrano-Regal et al., 2020). To further define the effects that GABA receptor activation exerts on oligodendrocytes, additional experiments will be needed to elucidate interactions between GABAergic interneurons and immature oligodendroglia cells during brain development.

Developmental myelination has been described as a vulnerable process which is influenced by oligodendrocytes themselves (Baumann & Pham-Dinh, 2001), neuronal stimuli (Gibson et al., 2014), soluble growth factors and neu-

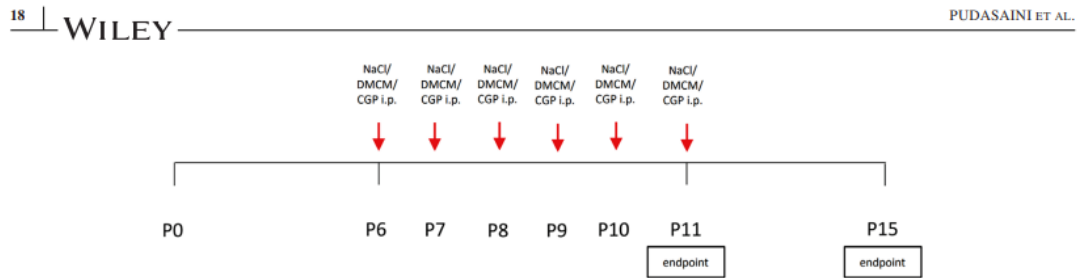
rotransmitters (Barateiro et al., 2016), as well as the absence of axonal inhibitors such as Leucine rich repeat and Immunoglobulin-like domain-containing protein 1 (LINGO-1) or LICAM (L1) (Barbin et al., 2004; Mi et al., 2005). It is estimated that the lack of these axonal inhibitors in oligodendroglial cultures (Jakovcevski et al., 2009), may affect *in vitro* results as compared to experiments in *in vivo* models. Also, Arellano et al. demonstrated in their *in vitro* studies the relevance of neuronal crosstalk for a long-lasting GABA<sub>A</sub> receptor stability (Arellano et al., 2016). This and the general complexity of the interaction between GABA, oligodendroglia, neurons, and myelin sheaths further underline the need for new studies based on *in vivo* models. Therefore, we used *in vivo* rat experiments to analyze the effects of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor inactivation on oligodendroglial proliferation, maturation, apoptotic cell death, and myelination in the cingulum.

In our study, we demonstrate in an *in vivo* rat model that pharmacological inhibition of GABA<sub>B</sub> receptors with CGP causes a reduction of MBP levels as well as an increase in the proliferation rate of oligodendroglial cells in the cingulum. Both effects are not present after application of the GABA<sub>A</sub> reverse agonist DMCM. Further, we detected a temporary maturational delay among the CGP treated animals. No changes in apoptosis were present after DMCM and CGP application in oligodendrocytes and cells of the cingulum in total. Taken together, our results support the idea that GABA<sub>B</sub> receptors are highly relevant for developmental myelination.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Animals and antagonization

All animal experiments were performed based on the institutional guidelines for good laboratory practice, as well as the ARRIVE guidelines, and were approved by the animal welfare committees of Berlin, Germany (LAGeSo, approval number G-0075/18). Six days old Wistar rats (P6) were divided into three experimental groups and received a daily intraperitoneal (*i.p.*) application of either (1) a vehicle (100  $\mu$ l 0.9% NaCl/10 g bodyweight), (2) the GABA<sub>A</sub> inverse agonist methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate (DMCM) hydrochloride with a concentration of 50  $\mu$ g/kg or (3) the GABA<sub>B</sub> antagonist 3-Aminopropyl-diethoxymethyl-phosphinic acid (CGP35348) with a concentration of 10 mg/kg (Figure 1). These concentrations were chosen because of their convulsion-avoiding effects (Kulick et al., 2014; Tyagi et al., 2015) and are based on preliminary experiments on dose optimization. Rats were housed under 12:12h light:dark cycle together with their lactating mothers until analyses at P11 and P15 (Figure 1). No



**FIGURE 1** Schematic illustration of the experimental antagonization of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors via i.p. application of DMCM or CGP. Vehicle treatment or GABA antagonization was performed on a daily basis between P6 and P11. Two endpoints, P11, directly after the final injection, and P15, four days afterwards, were analyzed

major weight losses and no other morbidities were recognized in all pups during and after the treatment.

## 2.2 | Immunohistochemistry

### 2.2.1 | Immunofluorescence

The rats were anesthetized according to the guidelines of the animal welfare committee at the experimental endpoints P11 or P15 with an i.p. injection of ketamine (100 mg/kg), xylazine (20 mg/kg) and acepromazine (3 mg/kg). They were transcardially perfused with phosphate buffered saline (PBS), followed by 4 % paraformaldehyde (PFA). After dissection, the brains were fixed in 4 % PFA/PBS at 4°C overnight. Brains were paraffin-embedded and processed for histological staining. Tissue sections were cut at 6 μm and stored at room temperature until usage.

Paraffinized sections were deparaffinized by a treatment with Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and rehydrated in solutions of falling ethanol concentration. Heat mediated antigen retrieval was performed in the microwave at 600 Watt (citrate buffer, pH 6.0) for 10 minutes. Afterwards, sections were left for at least one hour in blocking solution [3% Bovine Serum Albumin, 0.2% Triton X-100 in PBS] at room temperature. Following primary antibodies were diluted in an antibody diluent (Zymed Laboratories, San Francisco, California, USA): polyclonal rabbit antibody to myelin basic protein (MBP, Abcam, #40390, 1:500), polyclonal mouse antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA, Abcam, #ab29, 1:500), monoclonal mouse antibody to APC (CC1, Calbiochem, #OP80, 1:250), monoclonal rabbit antibody to cleaved caspase 3 (CellSignaling, #9664, 1:2000), monoclonal rabbit antibody to platelet derived growth factor receptor α (PDGFRα, Cell Signaling, #3174, 1:500), monoclonal mouse antibody to 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase, Sigma-Aldrich, MAB326, 1:400) and polyclonal goat antibody to oligodendrocyte 2 (OLIG2, R&D systems, AF2418, 1:2000). The incubation was performed at 4°C overnight. Following secondary

antibodies were afterwards diluted and applied to the brain sections: goat-anti-mouse Cyanine 5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:100), goat-anti-rabbit Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, #A11010, 1:200), goat-anti-mouse Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, #A11003, 1:200) and 594 (Molecular Probes, #A11032, 1:200) and donkey-anti-goat Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A11055, 1:200). All sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, #32670, 1:2000). The incubation lasted for one or two hours, depending on the antibody, at room temperature. Mounting was performed with mounting media (Shandon Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific).

### 2.2.2 | Microscopy and cell density measurements

Immunohistochemically stained cerebral sections were viewed blindly using a Keyence compact fluorescent microscope BZ 9000 (Keyence, Osaka, Japan) with a 10x or 20x objective lens. The fluorescent properties of DAPI, MBP as well as CC1, CASP3A, PCNA, PDGFRα and CNP were visualized at the cingulum region.

For analysis of oligodendroglial maturation, proliferation, and apoptosis, CC1, CNP, PCNA, PDGFRα and CASP3A stainings were co-labelled with OLIG2. In average, two images out of two to four sections from one animal were obtained with help of the BZ-II Viewer software (Keyence). The merging process was performed by the BZ-II Analyzer software (Keyence). In order to analyze cell numbers in CC1<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, PCNA<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, PDGFRα<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup>, CASP3A<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> and CASP3A<sup>+</sup>DAPI<sup>+</sup> co-stainings, brightness and contrast were adapted with minimal manipulation and cells were counted manually and blindly via Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated). MBP and CNP stainings were analyzed using the ImageJ software (National Institute of Health) by measuring the pixel intensity as well as the area (per field).

### 2.3 | Molecular analysis

For molecular analysis, the brains of the rats were perfused with PBS, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until protein and ribonucleic acid (RNA) extraction were performed.

#### 2.3.1 | Protein extraction

Brain tissue was homogenized in a  $4^{\circ}\text{C}$  radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer solution (Thermo Fisher Scientific) in order to extract proteins. For measurement of protein concentration, the Pierce BCA kit (Pierce/Thermo Fisher Scientific) was used. Spectrophotometry was performed with the iMark™ Microplate Absorbance Reader (BioRad, Life Science Research, Munich, Germany) at a wavelength of 570 nm.

#### 2.3.2 | Western blotting

Aliquots of proteins were equally loaded ( $20\ \mu\text{g}$  per lane) on 4–20 % Criterion™ TGX™ Precast Gels (BioRad) and separated according to their molecular weight by using PowerPac HC BioRad (180 V, 0.10 A, 300 W). The gels were transferred onto Trans-Blot Turbo nitrocellulose membrane ( $0.2\ \mu\text{m}$  pore, BioRad) via Trans-Blot Turbo Transfer System and afterwards blocked in Roti Block (Carl Roth) for one hour. Following primary antibodies were diluted in Tris-buffered saline (TBS): monoclonal mouse antibody to MBP (Covance, #SMI-99P0, 1:1000), polyclonal rabbit antibody to 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) (Thermo Fisher, #PAS-27972, 1:1000) and, for normalization, monoclonal mouse antibody to  $\beta$ -ACTIN (Sigma, #A5316, 1:5000). Membranes were incubated in primary antibodies at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Afterwards, they were treated with horseradish-peroxidase-conjugated (HRP) secondary antibodies (polyclonal goat-anti-rabbit, Dako, P0448 and goat-anti-mouse, Dako, P0447) which were diluted to 1:2000 in TBS, for one hour. Chemiluminescent detection was performed using Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad) or Supersignal West Pico (Pierce, Rockford, Illinois, USA) kits according to manufacturers' directions. The bands were measured using ChemiDoc™ XRS+ system (BioRad) and quantified with Image Lab™ (BioRad). All protein levels were normalized to  $\beta$ -ACTIN expression level. Due to similar molecular weights of CNP and  $\beta$ -ACTIN, membranes were stripped, in this particular case, between analyses with Restore™ Western blot stripping buffer (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturers' instructions.

#### 2.3.3 | RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from snap frozen brain tissue by acidic phenol/chloroform extraction (peqGOLD RNAPure™;

PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Germany).  $2\ \mu\text{g}$  of RNA were treated with DNase and reverse transcribed. The RNA expression of Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt*) and platelet derived growth factor receptor alpha (*Pdgfra*) were quantified in triplicate with the sequences summarized in Table 1A. PCR and detection were performed with qPCR BIO Mix Hi-ROX (NIPPON Genetics Europe, Düren, Germany). *Hprt* was used as an internal reference. The expression of target genes was analyzed with the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, California, USA) according to the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -method (Livak & Schmittgen, 2001).

### 2.4 | Statistics

For statistical analysis, the mean value  $\pm$  Standard Error of Mean (SEM) of two images out of two to four sections from one animal were obtained. Here,  $n$  reflects the number of rats per control as well as per experimental group included into the statistical analyses. The analysis as well as the creation of graphs were performed via Graph Pad Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc tests were used when comparing the control animals with both experimental groups. An unpaired  $t$ -test (two-tailed) was applied in case of a one-to-one comparison between a control and a test group. If a significant difference appeared among means ( $p < 0.05$ ), Brown-Forsythe and Welch ANOVA with Dunnett's T3 multiple comparisons test was applied. Additionally, a Shapiro-Wilk test was used to examine the distribution. If values were not normally distributed, a Kruskal-Wallis test was performed. Results were defined as significant in case of a  $p$ -value  $< 0.05$ .

## 3 | RESULTS

### 3.1 | GABA<sub>B</sub> receptor antagonization reduces MBP levels in vivo

To analyze the function of GABA on oligodendroglial cells, we antagonized GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors in the brains of neonatal rats by daily injection of GABA<sub>A</sub> inverse agonist DMCM and GABA<sub>B</sub> antagonist CGP, respectively, from P6 to P11. We investigated cellular effects with regards to oligodendroglial proliferation, maturation, and apoptosis rate via immunohistological labelling of specific markers. Also, since oligodendrocytes carry the major role in myelinating neuronal axons (Back, 2006; Baumann & Pham-Dinh, 2001), possible impairments on myelin production resulting from DMCM and CGP treatment were examined by Western blot and immunohistochemistry via MBP analysis at ages P11,

**TABLE 1** (A) Sequences of oligonucleotides and gene locus labelled with FAM/TAMRA. *Hprt*: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. *Pdgfra*: Platelet derived growth factor receptor alpha

A Gene	Oligonucleotide sequence 5'-3'	Accession number (NCBI)
<b><i>Hprt</i> :</b>		
Forward Primer	GGAAAGAACGTCTTGATTGTTGAA	NM_012583.2
Reverse Primer	CCAACACTTCGAGAGGTCCTTTT	
Probe	CTTTCCTGGTCAAGCAGTACAGCCCC	
<b><i>Pdgfra</i> :</b>		
Forward Primer	CCTGCGCGTCTTTAACAAT	NM_012802.1
Reverse Primer	TCTCCTCCAGCATGGTGATG	
Probe	TTACCCTGGAGAGGTGAGAA	

immediately after antagonization, and P15, after further 4 days without treatment. As shown in Figure 2a–c, antagonization of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors did not significantly alter MBP immunostaining intensity of the white matter at P11 but caused a significant reduction of MBP protein levels, normalized to  $\beta$ -ACTIN, in CGP treated animals at the same time point (CGP: 0.8;  $\pm$  0.03;  $p$  = 0.001;  $n$  = 7) (Figure 2d and e). At P15, in contrast, there was a significant reduction of MBP pixel intensity for both treatment groups compared to controls (DMCM: 35  $\pm$  10;  $p$  = 0.01; CGP: 38  $\pm$  9;  $p$  = 0.01;  $n$  = 6) (Figure 2b). The same applies to the measurement of MBP area (per field) (DMCM: 33.3  $\pm$  10;  $p$  = 0.01; CGP: 27.31  $\pm$  5;  $p$  = 0.007,  $n$  = 6) (Figure 2c). The findings for MBP reduction in CGP treated animals at P15 were confirmed by our Western blot results as shown in Figure 2e (CGP: 0.7  $\pm$  0.06;  $p$  = 0.03;  $n$  = 6), however not for the DMCM group. In total, CGP treatment caused a consistent decrease, predominantly at P15, in MBP production.

### 3.2 | GABA<sub>B</sub> receptor antagonization increases proliferation of oligodendroglia in vivo

The oligodendroglial lineage is characterized by its progression from oligodendroglial precursor cells, pre-oligodendrocytes, immature/premyelinating to mature/myelinating oligodendrocytes (Barateiro et al., 2016; Jakovcevski et al., 2009; Miron et al., 2011). A high proliferation rate is seen in progenitor and immature stages, while proliferation is downregulated at more mature stages in favor of initiating myelin production (Barateiro et al., 2016). Immunohistochemistry was performed to assess the effects of DMCM and CGP treatment on proliferation of oligodendroglial lineage cells at P11 and P15. Rates of PCNA<sup>+</sup> (i.e. proliferating) cells were examined for all oligodendroglial cells by co-staining for OLIG2. The results indicate no significant elevation of (OLIG2<sup>+</sup> + PCNA<sup>+</sup>)/OLIG2<sup>+</sup> rates at P11 in both animal groups receiving GABA<sub>A</sub> or GABA<sub>B</sub> receptor

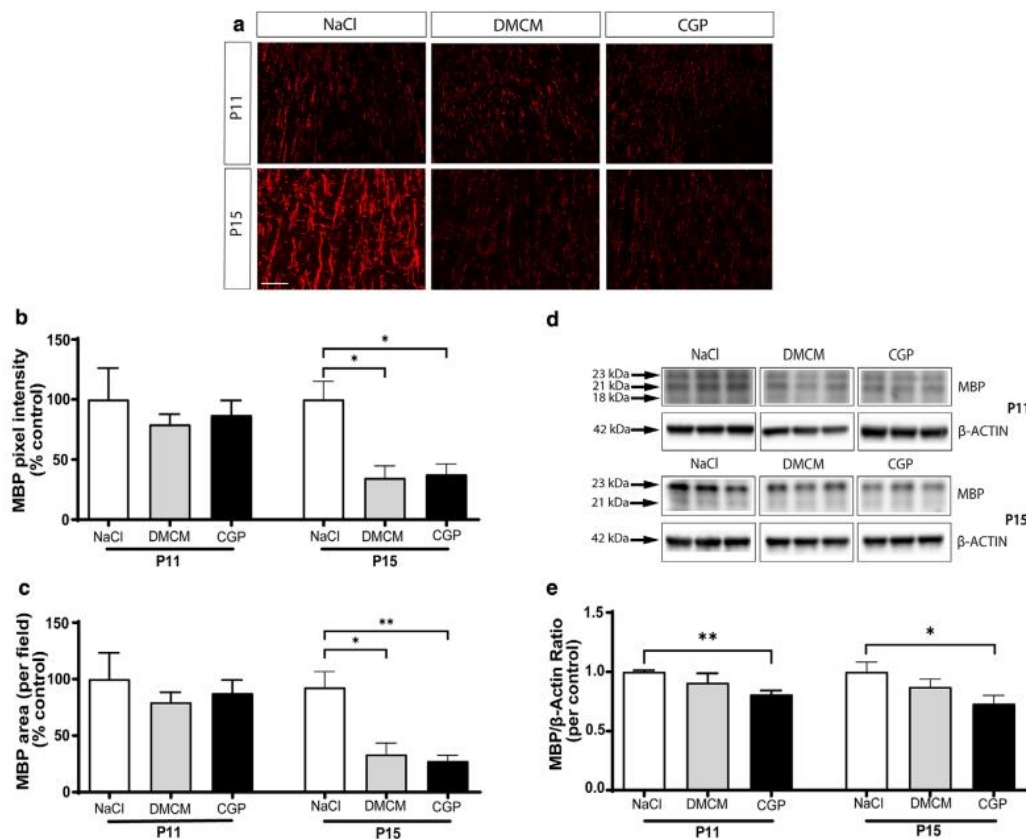
antagonist injections (Figure 3a and b). A significant increase was detected at P15 after CGP treatment in comparison to age matched controls (CGP: 0.8  $\pm$  0.01;  $p$  = 0.002;  $n$  = 6) (Figure 3b). After antagonization with DMCM, no significant rise was observed at P15 (DMCM: 0.7  $\pm$  0.06;  $p$  = 0.06;  $n$  = 6) (Figure 3b). However, as shown in Figure 3c, a change of total OLIG2<sup>+</sup> cell number was not detected at any time point.

### 3.3 | GABA<sub>B</sub> receptor antagonization increases OPC population of oligodendroglia in vivo

For further analysis of effects on cell proliferation, we performed real-time PCR for *Pdgfra* gene expression quantification as a marker for OPCs. The results did not show expression changes of the investigated OPC marker (Figure 4c). To investigate possible effects of GABA<sub>B</sub> receptor antagonization on the OPC population, specifically, we performed immunohistochemical stainings of PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> OLIG2<sup>+</sup> cells at P11 and at P15 (Figure 4a and b). As a result, there was a significant increase in the (OLIG2<sup>+</sup> + PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>)/OLIG2<sup>+</sup> ratio in CGP treated animals at age P15 (CGP: 0.3  $\pm$  0.02;  $p$  = 0.007;  $n$  = 6) (Figure 4b). No significant changes in the proportion of OPCs over total OLIG2<sup>+</sup> cells were found at P11 (CGP: 0.5  $\pm$  0.03;  $p$  = 0.18;  $n$  = 6) (Figure 4b).

### 3.4 | GABA<sub>B</sub> receptor antagonization shows a delay in early maturation of oligodendrocytes in vivo

Proper oligodendroglial lineage progression is essential for developmental myelination (Barateiro et al., 2016; Jakovcevski et al., 2009). To examine effects of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> antagonization on oligodendroglial maturation, we performed immunostainings with CC1 as a maturation marker in these cells. Analysis of the ratio of (OLIG2<sup>+</sup> +



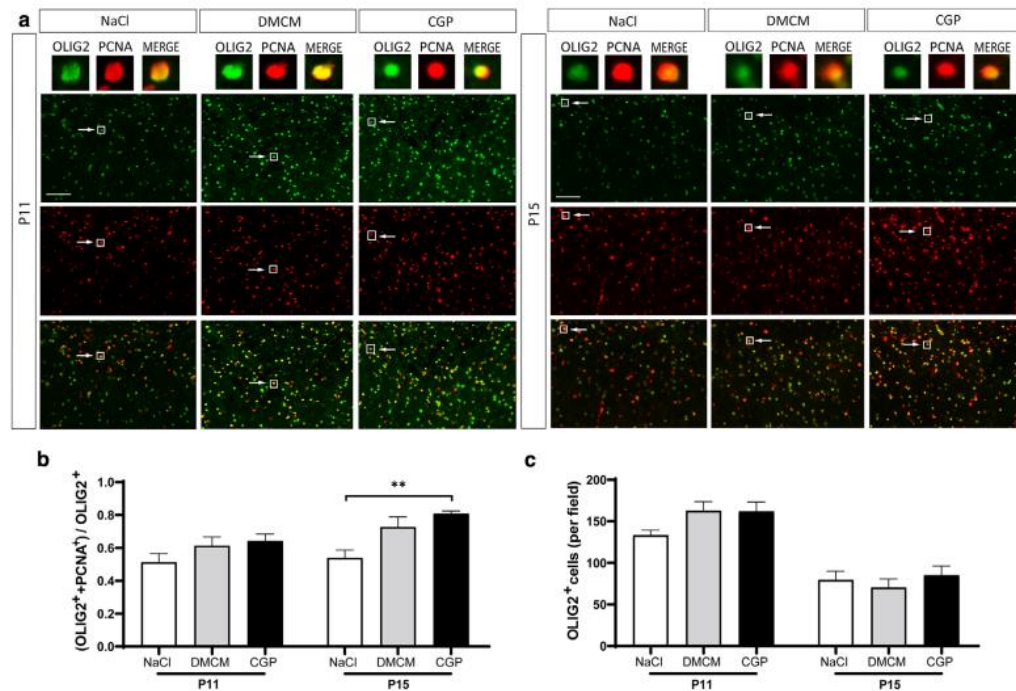
**FIGURE 2** GABA<sub>B</sub> receptor antagonization reduces MBP levels in vivo. (a–c) Immunohistochemical analysis of the cingulum region shows no significant change in MBP fluorescence intensity and in area (per field), caused by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor antagonization at P11. At P15, however, a significant reduction of MBP intensity and area (per field) was measured in both experimental groups. (d, e) The MBP expression was quantified by Western blot analysis. A ratio of MBP and β-ACTIN was determined. After DMCM treatment, MBP expression was not significantly reduced at P11 and P15. MBP expression after CGP treatment showed a significant decrease at P11 and P15. A x10 objective lens was used for P11 and a x20 objective for P15. Scale bar = 50 μm (n = 4–7 (control), 6–7 (DMCM), 6–7 (CGP); post-hoc ANOVA test \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 versus control group with vehicle application)

CC1<sup>+</sup>/OLIG2<sup>+</sup> cells at the ages P11 and P15 did not reveal effects of GABA<sub>A</sub> or GABA<sub>B</sub> receptor antagonization with DMCM or CGP, respectively (Figure 5a and b). For further analysis of maturation towards premyelinating and myelinating oligodendroglial stages, CNP production was quantified from brain tissue samples via Western blot analysis at both time points. As demonstrated in Figure 6a and b, the ratio of CNP and β-ACTIN protein levels showed a significant reduction ( $0.7 \pm 0.04$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 7$ ) at P11 after treatment with CGP for GABA<sub>B</sub> receptor antagonization. Treatment with DMCM did not show similar effects. At P15, no significant difference was found in any treatment group (Figure 6b). Our immunohistochemical stainings for analysis of CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> cells ( $15.2 \pm 2.4$ ;  $p = 0.002$ ;  $n = 6$ ) (Figure 6c and d), and for measurement of CNP pixel intensity ( $61.0 \pm 7$ ;

$p = 0.015$ ;  $n = 6$ ) (Figure 6c and e) and area (per field) ( $59.5 \pm 6$ ;  $p = 0.015$ ;  $n = 6$ ) (Figure 6c and f) confirmed the findings of CNP reduction after CGP application at age P11. Taken together, there was a decrease of CNP protein production in oligodendrocytes at age P11 after GABA<sub>B</sub> receptor antagonization without changes in the ratio of CC1<sup>+</sup> oligodendrocytes.

### 3.5 | GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> antagonization does not cause apoptosis in oligodendrocytes and total cells in vivo

Stainings with cleaved caspase 3 (CASP3A) antibodies were performed at both endpoints to determine possible



**FIGURE 3** GABA<sub>B</sub> receptor antagonization increases proliferation of oligodendroglia in vivo. (a, b) Immunohistochemical analysis of the 6  $\mu\text{m}$  sections of the cingulum region to label proliferating PCNA<sup>+</sup> oligodendrocytes at P11 and P15. The ratio of PCNA<sup>+</sup> oligodendrocytes showed no changes in the cingulum of rats after GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> antagonization at P11. A significant increase of proliferating oligodendrocytes was measured at P15, after CGP treatment, while in DMCM treated animals, no significant rise was detectable. (c) OLIG2<sup>+</sup> cells (per field) showed no significant differences compared to the control group at stage P11 and P15. A  $\times 20$  objective lens was used. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$  (n = 6 (control), 6 (DMCM), 6 (CGP); post-hoc ANOVA test \*\*P < 0.01 versus control group with vehicle application)

alterations through GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> antagonization on apoptotic cell death of oligodendroglial cells as well as of all DAPI<sup>+</sup> cells in total. The results in Figure 7a and b present that there are no differences when comparing (OLIG2<sup>+</sup> + CASP3A<sup>+</sup>)/OLIG2<sup>+</sup> cells of animals of both experimental groups to control rats. Similar results can be seen when looking at (DAPI<sup>+</sup> CASP3A<sup>+</sup>)/DAPI<sup>+</sup> cells at P11 and P15, indicating no altered apoptosis activity amongst all cells after a treatment with DMCM and CGP (data not shown).

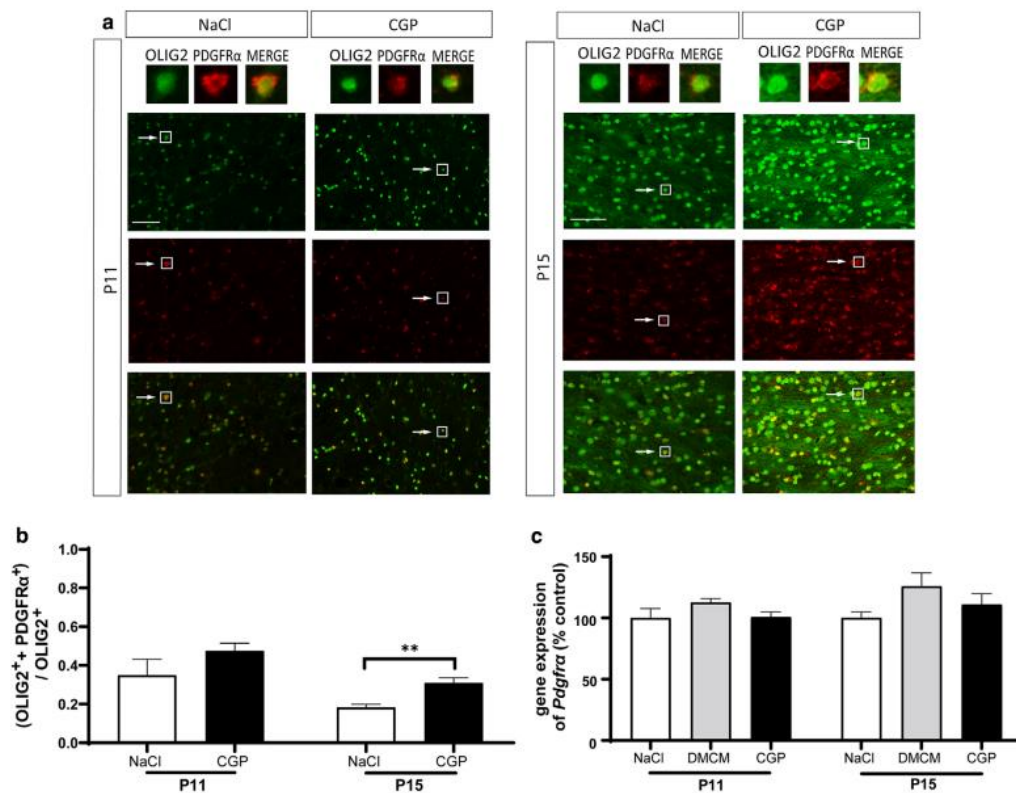
#### 4 | DISCUSSION

In this study, we demonstrate that GABA<sub>B</sub> receptor antagonization in newborn rats by daily systemic injections (P6-P11) of DMCM and CGP, followed by analysis at the endpoints P11 and P15, respectively, caused a significant reduction of MBP production during brain development. In addition, our experiments revealed a significant increase of proliferating oligo-

dendroglial cells in CGP treated rats. Remarkably, both events were most pronounced during further development until P15. Our treatment with DMCM and CGP did not influence the numbers of mature CC1<sup>+</sup> oligodendroglia. However, solely after CGP application, a maturational delay in early stages of oligodendrogenesis was observed by a decrease in CNP<sup>+</sup> oligodendrocytes (P11) and at P15, an increased number of PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> oligodendrocyte progenitor cells. Antagonization of GABA receptors did not lead to changes in oligodendroglial apoptosis or total cell numbers of oligodendroglial lineage cells of the cingulum.

These findings expand our view on the role of GABA receptors on oligodendroglial proliferation, and maturation, as well as on myelination of the immature brain. In our rat experiments, the impact of GABA<sub>B</sub> receptor antagonization on myelination are in accordance with the findings presented by Serrano-Regal et al. (Serrano-Regal et al., 2020). The same applies to results of GABA<sub>A</sub> receptor antagonization, which showed no significant changes in myelin sheath development (Serrano-Regal et al., 2020). These results,

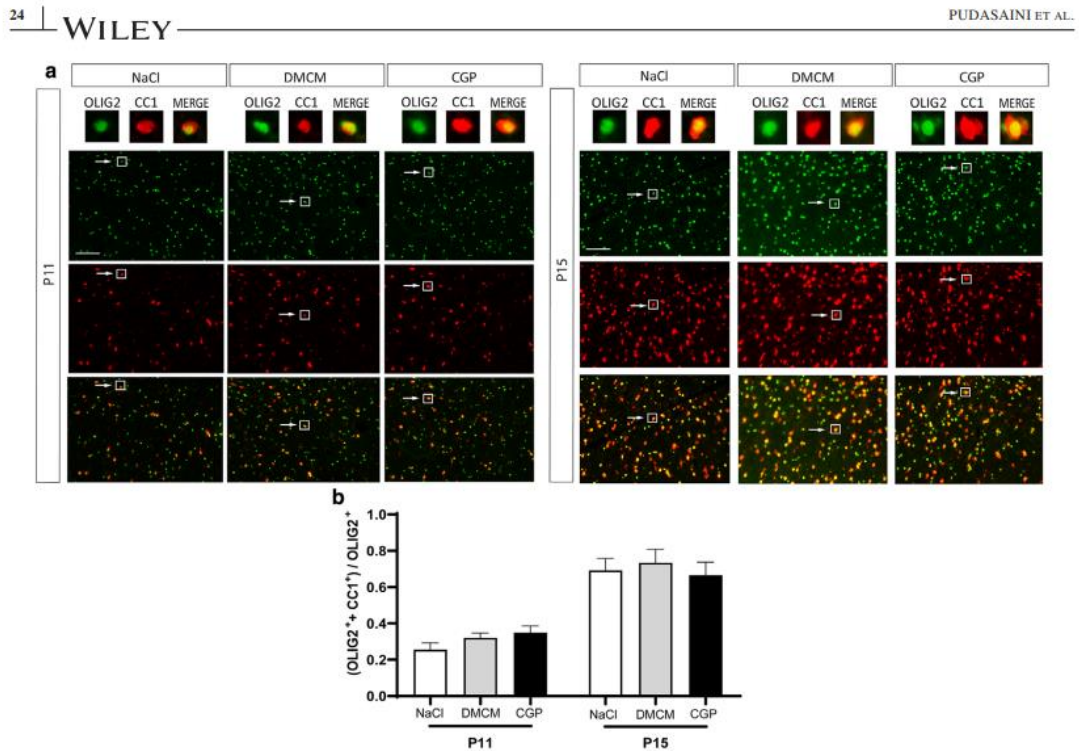




**FIGURE 4** GABA<sub>B</sub> receptor antagonization increases OPC population of oligodendroglia in vivo. (a, b) Immunohistochemical analysis of the 6  $\mu$ m sections of the cingulum region to label PDGFR $\alpha^+$  oligodendrocytes of CGP treated animals at P11 and P15. The ratio of PDGFR $\alpha^+$  oligodendroglial cells showed no changes after GABA<sub>B</sub> antagonization with CGP treatment at age P11, while at age P15, after four days recovery, a significant increase was measured. (c) Real-time PCR to measure the gene expression of *Pdgfra* at both time points. No significant differences were found in the experimental groups at any time. A x20 objective lens was used. Scale bar = 50  $\mu$ m (n = 6 (control), 6 (DMCM), 6 (CGP); unpaired t-test for (b), post-hoc ANOVA test for (c), \*\*P < 0.01 versus control group with vehicle application)

after inhibition of GABA<sub>A</sub> receptors, are incoherent with observations made by Hamilton et al., who presented an increase of myelination of rodent brain slice cultures after treatment with the antagonist GABA<sub>B</sub> (Hamilton et al., 2017). A possible explanation for this inconsistency is delivered by Jakovcevski et al. (Jakovcevski et al., 2009), who in their study described an increase in the number of MBP<sup>+</sup> oligodendrocytes in human fetal slice cultures of the fore-brain, in comparison to frozen sections, and explained it, on the one hand, with the possible absence of myelin inhibitors, such as polysialylated neuronal cell adhesion molecule (PSA-NCAM), and, on the other hand, with the stimulation of myelination caused by the culture medium itself (Jakovcevski & Zecevic, 2005; Jakovcevski et al., 2009; Jakovcevski et al., 2007).

Our data show that the proliferation rate of overall OLIG2<sup>+</sup> oligodendroglial cells is increased after GABA<sub>B</sub> antagonization at P15, i.e., four days of recovery time after final pharmacological treatment at P11. However, numbers of overall OLIG2<sup>+</sup> cells did not differ after GABA<sub>B</sub> receptor antagonization. Apparently, the effect of higher proliferation accounts for a subset of oligodendroglial lineage cells but does not enhance the number of the whole OLIG2<sup>+</sup> cell population in a statistically relevant manner. To specify cell numbers for progenitor stages, we further determined PDGFR $\alpha^+$  OPC numbers in animals after GABA<sub>B</sub> receptor antagonization which demonstrated a significant increase in the defined OPC population at age P15 in comparison to controls without antagonist treatment. In contrast to these results after GABA<sub>B</sub> receptor antagonization, no changes in the proliferation of

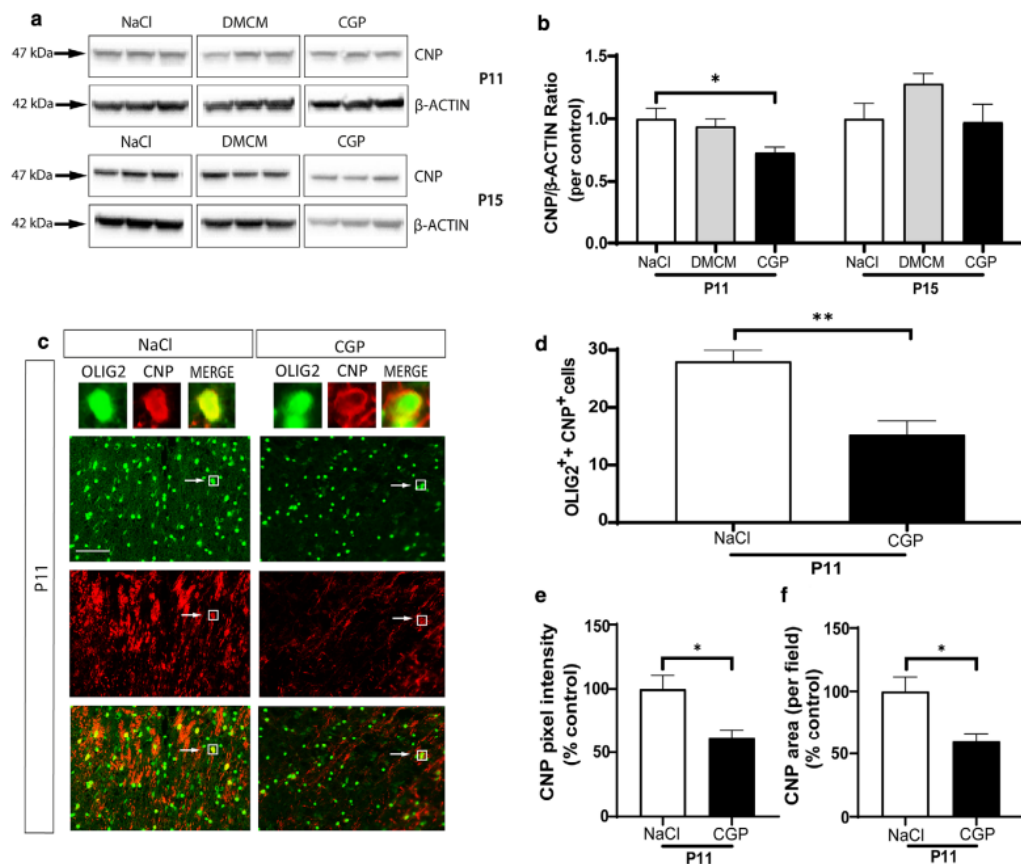


**FIGURE 5** GABA<sub>B</sub> receptor antagonization shows no changes in maturation of CC1<sup>+</sup> oligodendrocytes in vivo. (a,b) Immunohistochemical analysis of the 6 $\mu$ m sections of the cingulum region to label mature CC1<sup>+</sup> oligodendrocytes at P11 and P15. No significant differences in the number of mature CC1<sup>+</sup> oligodendrocytes were observed in the cingulum of rats after GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> antagonization at P11 and P15 in comparison to the control pups. A x20 objective lens was used. Scale bar = 50  $\mu$ m (n = 6 (control), 6 (DMCM), 6 (CGP); post-hoc ANOVA test \*P < 0.05 versus control group with vehicle application)

oligodendroglial lineage cells and no alterations of *Pdgfra* expression were found in our analysis after GABA<sub>A</sub> receptor antagonization. Hence, our findings after GABA<sub>A</sub> receptor antagonization differ to those from Zonouzi et al. who found an increased proliferation in OPCs in the mouse cerebellum after application of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline (Zonouzi et al., 2015). Interestingly, the different subregions of the brain, i.e., cerebellum in the Zonouzi study versus cerebrum in our study, seem to coincide with different cellular responses to the blocking of GABA<sub>A</sub> receptor. It cannot be excluded, however, that the variation may be caused by the different species of rats and mice. Hamilton et al. likewise discovered an increase in proliferation after GABA<sub>A</sub> receptor blockade in cerebral mouse cortex slices (Hamilton et al., 2017). In theory, the absence of proliferative changes at P11, together with the clear enhancement of proliferation activity in OPCs at P15, suggests that GABA receptor antagonization may not have a direct effect on the proliferation of oligodendroglial lineage cells. Instead, the increased proliferation may occur as a late compensative response to the earlier myelin deficits at P11 after administration of the

final injection. Since GABA receptor inhibition also applies to interneuronal GABA receptors, it has to be discussed that GABA receptor antagonization may exert effects on interneurons that impair interneuronal-oligodendroglial interactions relevant for oligodendroglial maturation and myelin production.

The altered maturation of oligodendroglial cells after CGP application at P11 documented by the temporary reduction of CNP levels in Western blots as well as by the decrease of CNP<sup>+</sup>OLIG2<sup>+</sup> cells in the immunohistochemical stainings, seems to recover thereafter as indicated by CNP protein expression returning to control levels at P15. In contrast, GABA<sub>A</sub> receptor antagonization caused no effects on oligodendroglial maturation. The numbers of mature CC1<sup>+</sup> oligodendrocytes were not altered by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> antagonization at any given time point. Since the expression of CNP is initiated in earlier stages of oligodendrogenesis than in the case of CC1 expression (Cai et al., 2010), our data could indicate that maturation is affected mainly in early oligodendroglial stages, i.e. during transition from OPCs to immature oligodendroglial stages. It has to be considered that CNP

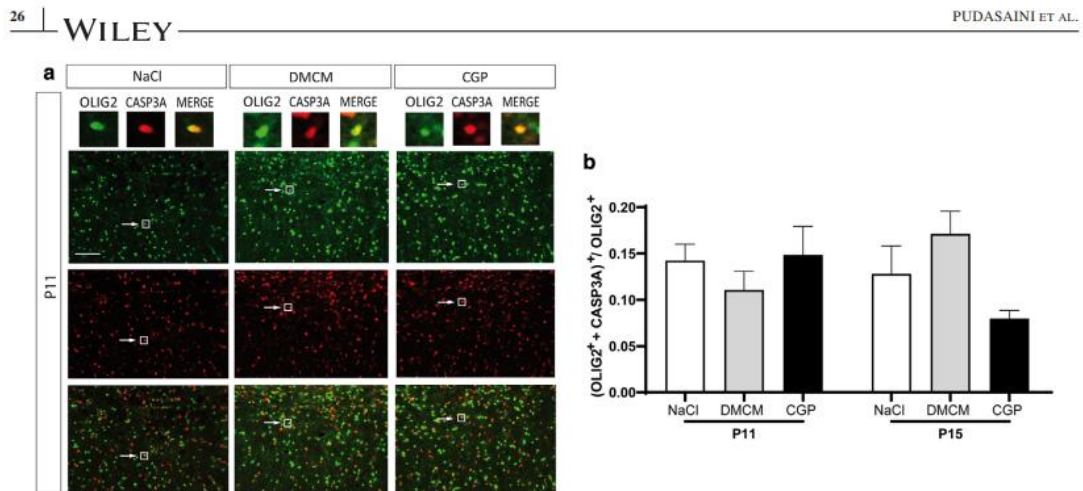


**FIGURE 6** GABA<sub>B</sub> receptor antagonization shows a delay in early maturation of CNP<sup>+</sup> oligodendrocytes in vivo. (a, b) The CNP expression was quantified by Western blot analysis. A ratio of CNP and  $\beta$ -ACTIN was determined. After DMCM treatment, no significant difference could be measured at both time points. After CGP treatment, however, CNP showed a decrease at P11 and normalized again at P15. (c–f) Immunohistochemical analysis of the 6 $\mu$ m sections of the cingulum region to label mature CNP<sup>+</sup> oligodendrocytes of CGP treated animals at P11. The number of CNP<sup>+</sup> oligodendroglial cells shows a significant decrease after GABA<sub>B</sub> receptor antagonization at P11. Likewise, a significant reduction of CNP fluorescence intensity (in % control) and CNP area (per field) was measured. A x20 objective lens was used. Scale bar = 50  $\mu$ m (n = 6–7 (control), 6–7 (DMCM), 6–7 (CGP); post-hoc ANOVA test (b), unpaired t-test for (d,e,f) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 versus control group with vehicle application)

belongs to the group of myelin associated proteins and plays a major function in processes that lead up to the formation of myelin sheaths (Gravel et al., 1996). Its altered protein expression after CGP treatment could therefore implicate a damage in the initiation of myelination. In contrast to our findings, Zonouzi et al. reported a reduction of CC1<sup>+</sup> cells after bicuculline application (Zonouzi et al., 2015) while Hamilton et al. described GABA as a neurotransmitter that causes a decrease in mature oligodendrocytes via its GABA<sub>A</sub> receptors, based on experiments with GABAzine (Hamilton et al., 2017). This discrepancy remains to be explained but may result from the use of different GABA<sub>A</sub> receptor antagonists as well

as the varying experimental focus on either cerebrum or cerebellum.

As stated by Kessaris et al. and Sun et al., apoptotic cell death is an important regulator of the oligodendroglia cell pool and can be regarded as a tool of homeostasis between the different cell stages (Habermacher et al., 2019; Kessaris et al., 2006; Sun et al., 2018). Hamilton et al., for example, described GABA<sub>A</sub> receptor signaling as a stimulator of oligodendroglial lineage cell death (Hamilton et al., 2017). In our experiments, however, apoptosis was not regulated in response to altered GABA receptor activity. Generally, it needs to be pointed out that the results of our in vivo GABA receptor antagonization



**FIGURE 7** GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor antagonization does not cause apoptosis of oligodendrocytes and total cells in vivo. (a, b) Immunohistochemical analysis of the 6  $\mu\text{m}$  sections of the cingulum region to label CASP3A<sup>+</sup> oligodendrocytes at P11 and P15. Cell numbers of apoptotic oligodendrocytes showed no significant changes in the cingulum of rats after GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> antagonization at P11 and P15. A x20 objective lens was used. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$  (n = 6 (control), 6 (DMCM), 6 (CGP); post-hoc ANOVA test versus control group with vehicle application)

may be attributable to neuronal and/or glial receptors. Also when considering that the excitatory to inhibitory shift of GABA in the cortex of rats takes place in the first two post-natal weeks (Ben-Ari et al., 2007), the downregulated myelination, after our antagonization, may be a result of impaired neuronal stimuli and axon-glia-connection (Barateiro et al., 2016; Gibson et al., 2014). Therefore, changes in neuronal-oligodendroglial interplay are relevant for the cortical myelination process and are worth to be studied in the future.

In conclusion, our data in an in vivo rat model demonstrate that GABA and its type B receptors are of high relevance for oligodendroglial maturation and myelin production in the cingulum of the developing brain. In addition to the knowledge we have about GABA agonists, this study can lay the ground for a treatment with GABA in the field of neonatology to foster an adequate oligodendrogenesis and proper early myelination.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number: Sche 2078/2-1), the *Förderverein für frühgeborene Kinder an der Charité e.V.* and the *Lydia Rabinowitsch Foundation*.

Also, we thank Mrs. Evelyn Strauss and Mrs. Ruth Herrmann for their support with paraffin sections and Western blots.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### ORCID

Samipa Pudasaini <https://orcid.org/0000-0001-9123-5080>  
Till Scheuer <https://orcid.org/0000-0002-9465-7200>

#### REFERENCES

- Arellano, R. O., Sanchez-Gomez, M. V., Alberdi, E., Canedo-Antelo, M., Chara, J. C., Palomino, A., Pérez-Samartín, A., & Matute, C. (2016). Axon-to-glia interaction regulates GABA<sub>A</sub> receptor expression in oligodendrocytes. *Molecular Pharmacology*, 89(1), 63–74. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100594>
- Back, S. A. (2006). Perinatal white matter injury: The changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 12(2), 129–140. <https://doi.org/10.1002/mrdd.20107>
- Balia, M., Benamer, N., & Angulo, M. C. (2017). A specific GABAergic synapse onto oligodendrocyte precursors does not regulate cortical oligodendrogenesis. *Glia*, 65(11), 1821–1832. <https://doi.org/10.1002/glia.23197>
- Balia, M., Velez-Fort, M., Passlick, S., Schafer, C., Audinat, E., Steinhäuser, C., Seifert, G., & Angulo, M. C. (2015). Postnatal downregulation of the GABA<sub>A</sub> receptor gamma2 subunit in neocortical NG2 cells accompanies synaptic-to-extrasynaptic switch in the GABAergic transmission mode. *Cerebral Cortex*, 25(4), 1114–1123. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht309>
- Barateiro, A., Brites, D., & Fernandes, A. (2016). Oligodendrocyte development and myelination in neurodevelopment: Molecular

- mechanisms in health and disease. *Current Pharmaceutical Design*, 22(6), 656–679. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151204000636>
- Barbin, G., Aigrot, M. S., Charles, P., Foucher, A., Grumet, M., Schachner, M., Zalc, B., & Lubetzki, C. (2004). Axonal cell-adhesion molecule L1 in CNS myelination. *Neuron Glia Biology*, 1(1), 65–72. <https://doi.org/10.1017/S1740925%D7;04000092>
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, 81(2), 871–927. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871>
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 728–739. <https://doi.org/10.1038/nrn920>
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R., & Khazipov, R. (2007). GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological Reviews*, 87(4), 1215–1284. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006>
- Cai, J., Zhu, Q., Zheng, K., Li, H., Qi, Y., Cao, Q., & Qiu, M. (2010). Co-localization of Nkx6.2 and Nkx2.2 homeodomain proteins in differentiated myelinating oligodendrocytes. *Glia*, 58(4), 458–468. <https://doi.org/10.1002/glia.20937>
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T., & Poo, M. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, 105(4), 521–532. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00341-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00341-5)
- Gibson, E. M., Purger, D., Mount, C. W., Goldstein, A. K., Lin, G. L., Wood, L. S., Inema, I., Miller, S. E., Bieri, G., Zuchero, J. B., Barres, B. A., Woo, P. J., Vogel, H., & Monje, M. (2014). Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, 344(6183), 1252304. <https://doi.org/10.1126/science.1252304>
- Gilbert, P., Kettenmann, H., & Schachner, M. (1984). gamma-Aminobutyric acid directly polarizes cultured oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, 4(2), 561–569. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6366154>
- Gravel, M., Peterson, J., Yong, V. W., Kottis, V., Trapp, B., & Braun, P. E. (1996). Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 7(6), 453–466. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0033>
- Habermacher, C., Angulo, M. C., & Benamer, N. (2019). Glutamate versus GABA in neuron-oligodendroglia communication. *Glia*, 67(11), 2092–2106. <https://doi.org/10.1002/glia.23618>
- Hamilton, N. B., Clarke, L. E., Arancibia-Carcamo, I. L., Kougioumtzidou, E., Matthey, M., Káradóttir, R., & ... Attwell, D. (2017). Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia*, 65(2), 309–321. <https://doi.org/10.1002/glia.23093>
- Jakovcevski, I., Filipovic, R., Mo, Z., Rakic, S., & Zecevic, N. (2009). Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3, 5. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.005.2009>
- Jakovcevski, I., Mo, Z., & Zecevic, N. (2007). Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain. *Neuroscience*, 149(2), 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.044>
- Jakovcevski, I., & Zecevic, N. (2005). Sequence of oligodendrocyte development in the human fetal telencephalon. *Glia*, 49(4), 480–491. <https://doi.org/10.1002/glia.20134>
- Káradóttir, R., & Attwell, D. (2007). Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience*, 145(4–5), 1426–1438. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.070>
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, 9(2), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nn1620>
- Kirchhoff, F., & Kettenmann, H. (1992). GABA triggers a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in murine precursor cells of the oligodendrocyte lineage. *European Journal of Neuroscience*, 4(11), 1049–1058. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00131.x>
- Kulick, C., Guthertz, S., Kondratyev, A., & Forcelli, P. A. (2014). Ontogenic profile of seizures evoked by the beta-carboline DMCM (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate) in rats. *European Journal of Pharmacology*, 740, 662–668. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.012>
- Leinekugel, X., Khalilov, I., McLean, H., Caillard, O., Gaiarsa, J. L., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1999). GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Advances in Neurology*, 79, 189–201. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514814>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luyt, K., Slade, T. P., Dorward, J. J., Durant, C. F., Wu, Y., Shigemoto, R., Mundell, S. J., Váradi, A., & Molnar, E. (2007). Developing oligodendrocytes express functional GABA(B) receptors that stimulate cell proliferation and migration. *Journal of Neurochemistry*, 100(3), 822–840. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04255.x>
- Mi, S., Miller, R. H., Lee, X., Scott, M. L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., Hession, C., Sah, D., Trapp, B., He, Z., Jung, V., McCoy, J. M., & Pepinsky, R. B. (2005). LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nature Neuroscience*, 8(6), 745–751. <https://doi.org/10.1038/nn1460>
- Miron, V. E., Kuhlmann, T., & Antel, J. P. (2011). Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1812(2), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.09.010>
- Serrano-Regal, M. P., Bayon-Cordero, L., Ordaz, R. P., Garay, E., Limon, A., Arellano, R. O., Matute, C., & Sanchez-Gomez, M. V. (2020). Expression and function of GABA receptors in myelinating cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 256. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00256>
- Serrano-Regal, M. P., Luengas-Escuza, I., Bayon-Cordero, L., Ibarra-Aizpurua, N., Alberdi, E., Perez-Samartin, A., Matute, C., & Sanchez-Gomez, M. V. (2020). Oligodendrocyte differentiation and myelination is potentiated via GABAB receptor activation. *Neuroscience*, 439, 163–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.014>
- Steinhauser, C., Jabs, R., & Kettenmann, H. (1994). Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus*, 4(1), 19–35. <https://doi.org/10.1002/hipo.450040105>

- Sun, L. O., Mulinyawe, S. B., Collins, H. Y., Ibrahim, A., Li, Q., Simon, D. J., Tessier-Lavigne, M., & Barres, B. A. (2018). Spatiotemporal control of CNS myelination by oligodendrocyte programmed cell death through the TFEB-PUMA axis. *Cell*, *175*(7), 1811–1826.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.044>
- Tong, X. P., Li, X. Y., Zhou, B., Shen, W., Zhang, Z. J., Xu, T. L., & Duan, S. (2009). Ca(2+) signaling evoked by activation of Na(+) channels and Na(+)/Ca(2+) exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration. *Journal of Cell Biology*, *186*(1), 113–128. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811071>
- Tyagi, R. K., Bisht, R., Pant, J., Kumar, P., Majeed, A. B., & Prakash, A. (2015). Possible role of GABA-B receptor modulation in MPTP induced Parkinson's disease in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *67*(2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.12.001>
- Vogt, K. (2015). Diversity in GABAergic signaling. *Advances in Pharmacology*, *73*, 203–222. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.11.009>
- Zonouzi, M., Scafidi, J., Li, P., McEllin, B., Edwards, J., Dupree, J. L., Harvey, L., Sun, D., Hübner, C. A., Cull-Candy, S. G., Farrant, M., Gallo, V., & Gallo, V. (2015). GABAergic regulation of cerebellar NG2-cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nature Neuroscience*, *18*(5), 674–682. <https://doi.org/10.1038/nn.3990>

**How to cite this article:** Pudasaini, S., Friedrich, V., Bühner, C., Endesfelder, S., Scheuer, T., & Schmitz, T. (2022). Postnatal myelination of the immature rat cingulum is regulated by GABA<sub>B</sub> receptor activity. *Developmental Neurobiology*, *82*, 16–28. <https://doi.org/10.1002/dneu.22853>

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







## Komplette Publikationsliste

### Publikationen

1. Victor Suárez, Felix C. Koehler, Matthias J. Hackl, Martin Möckel, Anna Slagman, Samipa Pudasaini, Joachim Risse, Domagoj Schunk, Sabine Blaschke, Philipp Kümpers, Volker Burst. Universitäre Notaufnahmen in der Coronapandemie– Ergebnisse des ReCovER-Registers [University emergency departments in the corona pandemic – Results from the ReCovER registry]. Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin. 2021 Sep 1;1-8. doi: 10.1007/s00063-021-00859-4.

Impact factor: 0,850

2. Samipa Pudasaini, Vivien Friedrich, Christoph Bühner, Stefanie Endesfelder, Till Scheuer, Thomas Schmitz. Postnatal myelination of the immature rat cingulum is regulated by GABA<sub>B</sub> receptor activity. Developmental Neurobiology. 2021 October 3. doi: 10.1002/dneu.22853.

Impact factor: 3,935

3. Samipa Pudasaini, Kira Louisa Boldt, Jennifer Hitzek, Linus Möckel, Anna Slagman, Stefanie Theuring, Frank Mockenhaupt und Martin Möckel. Durchführbarkeit schulischer Musikfahrten mit sicheren Kohorten während der COVID-19 Pandemie. [ The feasibility of school music trips with safe cohorts during the COVID-19 pandemic]. Deutsches Ärzteblatt International 2022; 119. DOI: 10.3238/arztebl.m2022.0201.

Impact factor: 5,594

### Kongressvorträge

1. Samipa Pudasaini, Vivien Friedrich, Christoph Bühner, Stefanie Endesfelder, Till Scheuer, Thomas Schmitz. Postnatale Myelinisierung des unreifen Rattencortex ist durch oligodendroglärer GABA Rezeptor Aktivität reguliert. 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin. Vortragssektion: freie Vorträge – Neurologie. 2021.

2. Samipa Pudasaini, Liane Schenk, Martin Möckel, Anna Schneider. 3. Charité-Versorgungsforschungskongress. Vereinbarkeit von Arbeits- und Privatleben bei Ärzt\*innen in zwei Notaufnahmen einer Universitätsklinik: Ergebnisse einer qualitativen Fokusgruppen-Studie Vortragssektion: Perspektiven und Bedürfnisse im Versorgungsalltag – neue Einblicke. 2022.

3. Samipa Pudasaini, Kira Louisa Boldt, Jennifer Hitzek, Linus Möckel, Anna Slagman, Stefanie Theuring, Frank Mockenhaupt und Martin Möckel. Ergebnisse einer Longitudinalstudie an einer Berliner Schule zur Durchführbarkeit von schulischen Musikfahrten mit sicheren Kohorten während der COVID-19 Pandemie. 3. Charité-Versorgungsforschungskongress. Vortragssektion: Berliner Impulse zur Verbesserung der Versorgung. 2022.

### **Posterbeiträge**

1. Samipa Pudasaini, Tara Maria Hoffmann, Monika Berns, Christoph Bühner, Susanne Römer. Studierende Werden Pat:innen: Ein praxisorientiertes Lehrmodell in der Neonatologie zur Steigerung der Empathie zukünftiger Pädiater:innen. 48. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin/29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie. 2022.

## Danksagung

Zu Beginn möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Thomas Schmitz einen großen Dank aussprechen für die immerwährende Unterstützung bei der Findung und Realisierung meiner Dissertation sowie dem Vertrauen, welches er mir von Beginn an, an in die Hand legte. Des Weiteren stand mir Dr. rer. nat. Till Scheuer erschöpfungslos während meiner Experimente stets beiseite. Ich danke somit auch ihm für die Hilfe bei der Überwindung jeder alltäglichen Hürde, die im Laufe der jahrelangen wissenschaftlichen Arbeit zustande kamen. Bei Prof. Dr. med. Christoph Bühner bedanke ich mich herzlich für viele wertvolle Ratschläge und Impulse, die es mir erleichterten, meine Arbeit in den klinischen Gesamtkontext zu stellen. Ebenso spreche ich Ruth Herrmann und Evelyn Strauss meinen Dank aus für ihre Unterstützung bei meinen ersten Experimenten sowie PD Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder für die Möglichkeit mit ihr, rund um die Uhr, jede meiner Unklarheiten und Ideen besprochen haben zu dürfen. Mein gesamtes Laborteam bat mir fortwährend das bestmögliche Umfeld an. So war es mir erst möglich, mich unter den optimalsten Konditionen dieser wissenschaftlichen Herausforderung zu stellen. Lea Fast, Konrad Froböse, Kira Boldt, Tamara Dietrich und Dominik Werz möchte ich für ihr ständiges offenes Ohr und die jahrelange emotionale Unterstützung danken. Mit euch an meiner Seite war jeder kleine Erfolg auf dem Weg eine doppelte Freude! Von ganzem Herzen möchte ich mich zudem bei meiner Schwester Pragya Pudasaini bedanken, die mich unermüdlich mit ihrem Glauben und ihrem Vertrauen in mich ermutigte und mir als wichtigster Stützpfeiler beiseite stand. Einen großen Dank auch an meine Schwester Samixa Pudasaini, die mich durch alle Hoch- und Tiefphasen meiner Dissertation begleitete und dabei immer ein motivierendes Wort überhatte. Den größten Dank spreche ich meinem Vater Dr. rer. nat. Shiva Prasad Pudasaini und meiner Mutter Sabina Rijal-Pudasaini aus, die meine Schwestern und mich ihr Leben lang mit aller Kraft unterstützten, immer mit dem Ziel uns die beste Bildung zu ermöglichen. Dabei bewältigten sie in einem ihnen damals fremden Land unvorstellbare Hürden. Mein Vater arbeitete sich hoch zu einem beeindruckenden Forscher, den ich heute als mein größtes wissenschaftliches Vorbild bezeichnen darf.

In dem Sinne: Danke für eure Liebe, die vielen Chancen, euer unermüdliches Vertrauen und die wissenschaftliche Neugier, die ihr mir Tag für Tag vermittelt habt. Dies widme ich euch...