

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

DISSERTATION

**„Entwicklung der weißen Substanz des unreifen Kleinhirns im Schädigungsmodell der
Maus durch postnatale pro-inflammatorische Stimulation mit Interleukin-1 β “**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Luisa Sophie Klein

aus Bonn

Datum der Promotion: 26. Juni 2022

Vorwort

Unvollständige Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Abstracts 2017 der GNPI und DGPI. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 165, 1–111 (2017) *)
- Abstracts des Kongresses für Kinder- und Jugendmedizin 2017. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 165, 181–300 (2017) +)

Die Daten wurden erweitert und in Folgeversuchen verändert und stimmen nicht mehr mit den hier veröffentlichten Ergebnissen überein.

*) Bei der 43. Jahrestagung der *Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin* 2017 in Dresden wurden Teile der zugrundeliegenden Daten der immunhistochemischen Färbungen von Oligodendroglia (Proliferation und Zelltod, siehe Abb. 9, 11), Myelinisierung (siehe Abb. 12) sowie Mikroglia (Anzahl und Proliferation, siehe Abb. 14, 15) präsentiert. Das Konferenzabstract wurde in Form eines Abstractbandes aller Konferenzbeiträge als Supplement der *Monatsschrift Kinderheilkunde* im Mai 2017¹ veröffentlicht.

+) Bei dem *Kongress für Kinder- und Jugendmedizin* 2017 in Köln wurden Teile der zugrundeliegenden Daten der immunhistochemischen Färbungen von Oligodendroglia (Proliferation, siehe Abb. 9), Myelinisierung (siehe Abb. 12) und Mikroglia (Anzahl, siehe Abb. 14) präsentiert. Darüber hinaus wurden die Daten der Expressionsanalyse von Genen, die mit Mikrogliaaktivierung zusammenhängen, gezeigt (siehe Abb. 18). Es wurde weiterhin der Western-Blot des Myelinbestandteiles Myelin-assoziiertes Glykoprotein (siehe Abb. 12) präsentiert. Das Konferenzabstract wurde auch hier in Form eines Abstractbandes in der *Monatsschrift Kinderheilkunde* im September 2017² veröffentlicht.

Des Weiteren wurden Teilergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Mikroglia (Anzahl und Proliferation, siehe Abb. 14, 15), Bergmann-Glia (Färbeintensitäten, siehe Abb. 19) und Oligodendroglia (Proliferation und Reifung, siehe Abb. 9, 10) beim *XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease* 2019 in Porto, Portugal vorgestellt. Die Abstracts der Posterpräsentationen wurden hier nicht veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	10
Abstract	11
English Abstract	12
1 Einleitung	13
1.1 Frühgeburt und neurologische Entwicklungsstörungen	13
1.2 Perinatale, subklinische Entzündungsmechanismen	15
1.3 Das Kleinhirn und dessen Schädigung bei ehemals frühgeborenen Kindern	16
1.4 Gliazellen im Kleinhirn und deren Funktion in der Entwicklung.....	21
1.5 Mausmodell perinataler Inflammation durch systemische Administration von Interleukin-1 β	23
1.6 Fragestellung	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Verbrauchsmaterial	25
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	25
2.1.3 Antikörper und Farbstoffe.....	27
2.1.4 Reagenzien der Genexpressionsanalyse.....	29
2.1.5 Geräte und Softwareprogramme.....	31
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Tierversuchsmodell	32

2.2.2 Gewebeaufbereitung	34
2.2.3 Western-Blotting.....	35
2.2.4 Histologische Färbungen und Fluoreszenzmikroskopie	36
2.2.5 RNA-Isolation und Reverse Transkription	38
2.2.6 Polymerasekettenreaktion.....	39
2.2.7 Statistik.....	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Oligodendrogliale Proliferation und Reifung durch Inflammation inhibiert.....	42
3.1.1 Proliferationsdefizite von Oligodendrozyten	42
3.1.2 Reifung der Oligodendroglia des Kleinhirns verzögert	45
3.1.3 Kein vermehrter Zelltod von Oligodendroglia nach Inflammation	46
3.2 Myelinisierungsdefizite nach systemischer perinataler Inflammation.....	47
3.2.1 Proteine der weißen Substanz transient reduziert mit sichtbaren Strukturdefiziten	47
3.2.2 Genexpression der Myelinisierungsmarker unverändert	49
3.3 Mikrogliale Veränderungen.....	50
3.3.1 Persistierende mikrogliale Antwort im unreifen Kleinhirn	50
3.3.2 Keine Einwanderung von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke	53
3.3.3 Morphologie: mehr aktivierte Mikroglia nach Inflammation.....	54
3.3.4 Genexpressionsunterschiede inflammatorischer Marker.....	56
3.4 Astrozytäre Reaktivität nach Applikation inflammatorischer Stimuli.....	58
3.4.1 Inflammation bedingt langfristige Reaktivität der Bergmann-Glia	58
4 Diskussion	60
4.1 Kleinhirnschädigung nach perinataler subklinischer Inflammation.....	60
4.2 Die neugeborene Maus als Modell für Frühgeburt.....	60
4.3 Oligodendrogliale Proliferations- und Reifungsstörungen.....	61

4.4 Myelinisierungsdefizite.....	63
4.5 Mikrogliaaktivierung und inflammatorischer Stress.....	64
4.6 Bergmann-Glia.....	66
4.7 Limitationen	67
4.8 Ausblick	69
5 Zusammenfassung.....	71
6 Literaturverzeichnis	74
Eidesstattliche Versicherung	90
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	92
Lebenslauf.....	94
Publikationsliste.....	95
Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> (vom Gehirn stammender neurotropher Faktor)
BrdU	Bromo-Desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
B7	Protein der Immunglobulin-Superfamilie
Casp3	Gespaltene Caspase 3
CCAS	<i>cerebellar cognitive affective syndrome</i> (zerebelläres kognitives Affektionssyndrom)
Ccnd2	Zyclin D2
CC1	Klon des adenomatösen Polyposis Coli Protein 1
cDNA	<i>copy DNA</i> (komplementäre DNA)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CNP	2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCN	<i>deep cerebellar nuclei</i> (tiefe Kleinhirnkerne)
DM-20	Proteolipidprotein vom Typ DM-20
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin
EM	Elektronenmikroskopie
GABA	gamma-Aminobuttersäure
Gclc	Glutamat-Cystein-Ligase katalytische Untereinheit
GD3	Disialogangliosid 3
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i> (gliäres fibrilläres saures Protein)
GS	Glutaminsynthase
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Iba1	Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1
Icam-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1)
Igf1	<i>insulin-like growth factor 1</i> (insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1)
IHC	Immunhistochemie
IQ	Intelligenzquotient
IL-1 β	Interleukin-1 β
Inos	<i>inducible nitric oxide synthase</i> (induzierbare Stickoxidsynthase)
INSERM	<i>Institut national de la santé et de la recherche médicale</i>
IZ	Inkubationszeit
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	<i>myelin basic protein</i> (basisches Myelinprotein)
MHC-II	<i>main histocompatibility complex II</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex II)
min	Minute(n)
M-MLV	<i>modified murine leukemia virus</i> (modifizierte Variante der reversen Transkriptase aus murinen Leukämieviren)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NGS	<i>normal goat serum</i> (normales Ziegenserum)
NG2	<i>neuron-glia antigen 2</i> (Neuron-Glia-Antigen 2)
Olig1	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 1
Olig2	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2
O4	Oligodendrozytenmarker 4
OPC	<i>oligodendroglial progenitor cell</i> (oligodendrogliale Progenitorzelle)
P	Postnataler Tag

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung)
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PDGFR α	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i> (Wachstumsfaktor aus Thrombozyten)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PLP	Proteolipid-Protein
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RIPA Puffer	Radioimmunopräzipitationsassaypuffer
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler
Sod2	Superoxid-Dismutase 2
SyMRI	<i>synthetic MRI</i> (MRT-Technik, u.a. zur Myelinquantifizierung)
TA	Technische Assistenz
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	<i>terminal-deoxynucleotidyl-transferase mediated deoxy-uridinetri-phosphate-biotin nick end labeling</i>
WB	Western-Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zerebelläre Schleifenstrukturen	17
Abbildung 2: Unterabschnitte des Kleinhirns	18
Abbildung 3: Funktionelle Kompartimentierung des menschlichen Kleinhirns	18
Abbildung 4: Zerebelläres Volumen- und Oberflächenwachstum im zweiten Teil der Schwangerschaft	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien der oligodendroglialen Zelllinie	21
Abbildung 6: Tierversuchsmodell	34
Abbildung 7: Untersuchte Areale in den immunhistochemischen Färbungen	37
Abbildung 8: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	41
Abbildung 9: Proliferation von Oligodendroglia	44
Abbildung 10: Reifung von Oligodendroglia	45
Abbildung 11: Zelltod von Oligodendroglia	46
Abbildung 12: Myelinisierung nach systemischer Inflammation	48
Abbildung 13: Genexpression von Myelinisierungsmarkern	49
Abbildung 14: Anzahl von Mikroglia	51
Abbildung 15: Proliferation von Mikroglia	52
Abbildung 16: CD3+ Immunzellen im Kleinhirn	53
Abbildung 17: Morphologie von Mikroglia	55
Abbildung 18: Genexpression von Mikroglia	57
Abbildung 19: Reaktivität der Bergmann-Glia	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien der Experimente	25
Tabelle 2: Gebrauchsfertige Chemikalien und Lösungen	25
Tabelle 3: Selbst hergestellte Lösungen und Puffer	27
Tabelle 4: Primärantikörper für Western-Blotting	27
Tabelle 5: Sekundärantikörper für Western-Blotting	28
Tabelle 6: Primärantikörper für Immunhistochemie	28
Tabelle 7: Sekundärantikörper für Immunhistochemie	29
Tabelle 8: Enzyme und Reagenzien der Genexpressionsanalyse	29
Tabelle 9: Sequenzen der synthetisch hergestellten Oligonukleotide	30
Tabelle 10: Geräte und Softwareprogramme	31

Abstract

Nach aktuellem Forschungsstand zeigen ehemals frühgeborene Kinder häufig subtile pathologische Veränderungen des Kleinhirnes, die sowohl mit motorischen Entwicklungsstörungen als auch geringerem Intelligenzquotienten (IQ) und reduzierten sprachlichen Fähigkeiten im Schulalter einhergehen. Es ist bekannt, dass das unreife Kleinhirn besonders vulnerabel auf externe Störfaktoren reagiert, die genauen Ursachen und Mechanismen der Schädigung bei Frühgeborenen gilt es noch herauszufinden. Inflammatorische Stimuli spielen eine Schlüsselrolle bei Hirnschädigungen bei frühgeborenen Kindern.

Für diese Arbeit wurde ein Mausmodell perinataler Neuroinflammation genutzt, in dem mittels Verabreichung des pro-inflammatorischen Zytokines Interleukin-1 β (IL-1 β) in den ersten fünf Lebenstagen eine subklinische Entzündung simuliert wird. Hiermit lassen sich akute als auch langfristige Folgen auf die Hirnentwicklung, die Proliferation und Differenzierung von Zellen und die Genexpression im unreifen Kleinhirn nachvollziehen.

Mittels immunhistochemischer Färbungen konnten Reduktionen der proliferierenden und reifenden Oligodendroglia sowohl während der inflammatorischen Phase als auch nach Erholung festgestellt werden. Western-Blots und Immunhistochemie zeigten dement-sprechende Defizite der Myelinsynthese. Die Dichte und proliferative Aktivität von ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1-positiven (Iba1+) Mikroglia war in der Versuchsgruppe signifikant erhöht und persistierte bis zum 45. Lebenstag. Die Aktivierung von Bergmann-Glia zeigte sich anhand einer erhöhten Färbeintensität von gliärem fibrillärem saurem Protein (*glial fibrillary acid protein*, GFAP) und Glutaminsynthase (GS) in der Purkinjezellschicht.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass perinatale systemische Inflammation im Mausmodell akute und langfristige zerebelläre Veränderungen der weißen Substanz verursacht, die potenziell relevant für neurologische Konsequenzen zu früher Geburt sind. Pro-tekative Strategien in der Versorgung Frühgeborener sollten künftig chronische zerebelläre Inflammation als wichtiges Therapieziel beinhalten.

English Abstract

According to current research, children born prematurely often show subtle pathological changes in the cerebellum, which are associated with motor development disorders as well as lower intelligence quotients (IQ) and reduced linguistic abilities at school age. It is well known that the immature cerebellum is particularly vulnerable to external disruptive factors, but the exact causes and mechanisms of damage in premature infants remain to be elucidated. Inflammatory stimuli play a key role in brain damage in premature infants. For this study, a mouse model of perinatal neuroinflammation was used, in which a sub-clinical inflammation is simulated by administering the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) in the first five days of life. This allows to examine acute as well as long-term consequences on brain development, proliferation and differentiation of cells and gene expression in the immature cerebellum.

Immunohistochemical stainings revealed reductions in proliferating and maturing oligodendroglia both during the inflammatory phase and after recovery. Western blots and immunohistochemistry showed corresponding deficits in myelin synthesis. The density and proliferative activity of ionized calcium-binding adapter molecule 1 positive (Iba1+) microglia were significantly increased in the treatment group and persisted until day 45 of life. Activation of Bergmann glia was demonstrated by increased staining intensity of glial fibrillary acid protein (GFAP) and glutamine synthase (GS) in the Purkinje cell layer.

These results show for the first time that perinatal systemic inflammation causes acute and long-term cerebellar white matter changes in a mouse model, which are potentially relevant for neurological consequences of preterm birth. Protective strategies in the care of preterm infants should include chronic cerebellar inflammation as an important therapeutic target in the future.

1 Einleitung

1.1 Frühgeburt und neurologische Entwicklungsstörungen

Etwa 11% der Neugeborenen kommen zu früh auf die Welt, definiert als Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche^{3,4}, dies entspricht jährlich circa 15 Millionen Kindern weltweit⁵. Frühgeburt kann durch diverse sowohl maternale wie fetale Risikofaktoren ausgelöst werden, in den meisten Fällen bleibt die Ursache aber unbekannt. Mütterlicherseits spielen Stress, Traumata, Lebensalter (sowohl sehr hohes als auch sehr niedriges Alter) und Infektionen mit Chorioamnionitis eine große Rolle. Kindliche Ursachen sind vor allem Mehrlingsschwangerschaften und Infektionen⁶.

Unter den typischen Komplikationen von Frühgeburtlichkeit finden sich Erkrankungen des Darmes – wie die nekrotisierende Enterokolitis –, der Lunge – wie die bronchopulmonale Dysplasie – oder des Nervensystems wie zum Beispiel intraventrikuläre Hirnblutungen, periventrikuläre Leukomalazien oder die Frühgeborenenretinopathie⁷. Bedingt durch diese Komplikationen und das hohe Risiko für Neugeboreneninfektionen ist Frühgeburtlichkeit die zweithäufigste Todesursache von Kindern vor dem fünften Lebensjahr und die häufigste direkte Todesursache von Kindern bis zum 28. Lebensjahr. Insgesamt sterben somit etwa eine Million Kinder jährlich weltweit an den Folgen von zu früher Geburt³.

Mit den dennoch insgesamt steigenden Überlebensraten treten die langfristigen Einschränkungen der Kinder in den Vordergrund – meist bedingt durch Hirnschädigungen⁸. Alle Schritte der neurologischen Entwicklung können durch Frühgeburt gestört werden, und neurologische Schäden sind eine typische Ursache für langfristige Behinderungen⁹, insbesondere Schäden der weißen Hirnsubstanz. Selbst sonst gesunde Frühgeborene ohne extreme Unreife (Gestationsalter > 28 Wochen) zeigen im Schulalter signifikant verminderte Volumina von Kleinhirn, Corpus Callosum und Hippocampus in Verbindung mit niedrigeren IQ-Scores, Aufmerksamkeitsdefiziten und weniger ausgebildeten kognitiven Exekutivfunktionen im Vergleich zu gleichaltrigen ehemals reifgeborenen Kindern¹⁰.

Diese sogenannte „Enzephalopathie des Frühgeborenen“, ein von Joseph Volpe geprägter Begriff¹¹, scheint das Ergebnis von sowohl destruktiven Ereignissen durch Komplikationen der Frühgeburt als auch von Entwicklungsstörungen bedingt durch die Unreife des Gehirns von Kindern, die 16-20 Wochen zu früh zur Welt kommen, zu sein.

Als wichtigste Prädiktoren für die neurologische Entwicklung frühgeborener Kinder gelten geringes Gestationsalter und geringes Geburtsgewicht¹². Typische direkte Ursachen von perinataler Hirnschädigung sind Hypoxie, Hyperoxie und Inflammation. Besonders systemische Inflammation scheint ein Hauptrisikofaktor für Störungen der Hirnentwicklung sowohl in Tiermodellen als auch klinischen Studien darzustellen¹³⁻¹⁵. Außerdem spielen komplexere Faktoren wie beispielsweise männliches Geschlecht und nachteiliger sozioökonomischer Status eine Rolle¹². Bis heute sind die Schädigungen nur geringfügig auf zellulärer und molekularer Ebene pathophysiologisch untersucht. Das führt dazu, dass betroffene Kinder mitunter nicht rechtzeitig diagnostiziert werden, beziehungsweise keine Präventionsmaßnahmen erhalten, und die Forschung an effektiveren neuroprotektiven Strategien nur langsam voranschreitet¹⁶. Aktuell werden zur Neuroprotektion Koffein und Magnesiumsulfate mit begrenzter Wirksamkeit eingesetzt, wobei die Applikationsschemata variieren und der Einsatz nicht flächendeckend geschieht¹⁷.

1.2 Perinatale, subklinische Entzündungsmechanismen

Nachdem lange davon ausgegangen wurde, dass neurologische Entwicklungsstörungen bei Frühgeborenen vor allem auf perinatale hypoxische und ischämische Ereignisse zurückzuführen sind, wird inzwischen eine multifaktorielle Genese angenommen, in der Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle einnehmen^{18–20}. Möglicherweise sorgt systemische Entzündung für eine Prädisposition bzw. eine Sensibilisierung gegenüber hypoxischen, ischämischen und exzitotoxischen Einflüssen^{21,22}. Die Auswirkungen von Sepsis auf die Hirnentwicklung wurde in vielfältiger Art und Weise in Tierversuchen untersucht, wie beispielsweise das Entstehen von Myelinisierungsdefiziten beim Nachwuchs von Ratten, denen während der Schwangerschaft bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) injiziert wurden²³ oder beim Nachwuchs von Mäusen, denen während der Schwangerschaft das Bakterium *Ureaplasma parvum* injiziert wurde²⁴. Chorioamnionitis und damit oft einhergehende Neugeborenenensepsis, wie oben beschrieben eine typische Ursache von Frühgeburtlichkeit, ist zudem ein unabhängiger Risikofaktor für verminderte kognitive Entwicklung²⁵, infantile Zerebralparese^{26,27} und Autismusspektrumstörungen bis ins Schulalter²⁸.

Im Kontrast dazu kann subklinische systemische Inflammation durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Als Reaktion auf maschinelle Beatmung^{29–31} und schmerzhafte medizinische Interventionen^{32,33} werden bei Frühgeborenen bereits Entzündungsmediatoren freigesetzt, die einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Entwicklung der unreifen Organe nehmen können. Hier kommt es explizit zu keiner klinisch deutlichen Reaktion im Sinne von Fieber, Infektion oder Organdysfunktion. Es ist jedoch bereits bekannt, dass auch leicht erhöhte Werte für inflammatorische Marker ausreichen, um im Großhirn Veränderungen hervorzurufen³¹. Im Gehirn kommt insbesondere den Mikroglia durch Zell-Zell-Interaktionen eine Schlüsselrolle bei inflammatorischen Geschehen zu. In präklini-

schen Modellen wurde dargelegt, dass sie verschiedene Facetten der Frühgeborenenenzephalopathie hervorrufen können^{34,35}. Zudem wurde in Postmortem-Studien an Frühgeborenen eine Aktivierung von Mikroglia belegt^{36,37}.

1.3 Das Kleinhirn und dessen Schädigung bei ehemals frühgeborenen Kindern

Das Kleinhirn als Teil des Mesencephalons funktioniert in erster Linie als Abstimmungszentrum der Feinmotorik^{38,39}, es wird aber inzwischen auch als Steuer- und Koordinationsorgan kognitiver Prozesse beschrieben⁴⁰. Mit der Theorie der „Dysmetria of thought“⁴¹ (dt: Dysmetrie der Denkprozesse) wird erklärt, wie das Kleinhirn auch Kognition und Affekt unbewusst reguliert, in Analogie zu Bewegungen und Gleichgewicht. Wie vielfach zuvor beschrieben⁴², treten bei motorischen Funktionsdefiziten mit Dysmetrie klassischerweise häufig sogenannte überschießende (overshoot, Hypermetrie) und zu kurz dimensionierte (undershoot, Hypometrie) Willkürbewegungen auf, die zum Beispiel den Versuch, einen Gegenstand zu greifen, unmöglich machen können. In ähnlicher Art und Weise können bei Kleinhirnläsionen auch „übertriebene“ oder „untertriebene“ kognitive Reaktionen entstehen, wie beispielsweise das Zeichnen einer detailgetreuen Abbildung zweier verschiedener Uhren mit Umgebung im klassischen Uhrentest^{43,44}. Das zerebelläre kognitive Affektionssyndrom (CCAS) kann allerdings auch Schwierigkeiten in der räumlichen Wahrnehmung⁴⁵ und linguistische⁴⁶ Auffälligkeiten sowie Schwierigkeiten in der Emotions- und Impulskontrolle umfassen^{47,48}. Das Kleinhirn ist hierbei ein Feinsteuerungsorgan aus neuronalen Netzwerken für höhere Zentren im Großhirn und besitzt gleichartige Schleifenstrukturen für alle kortiko-zerebello-kortikalen Verbindungen durch gleichartige Zellstrukturen im gesamten zerebellären Kortex (universal cerebellar transform⁴⁹). Abbildung 1 veranschaulicht diese zerebellären Schleifenstrukturen.

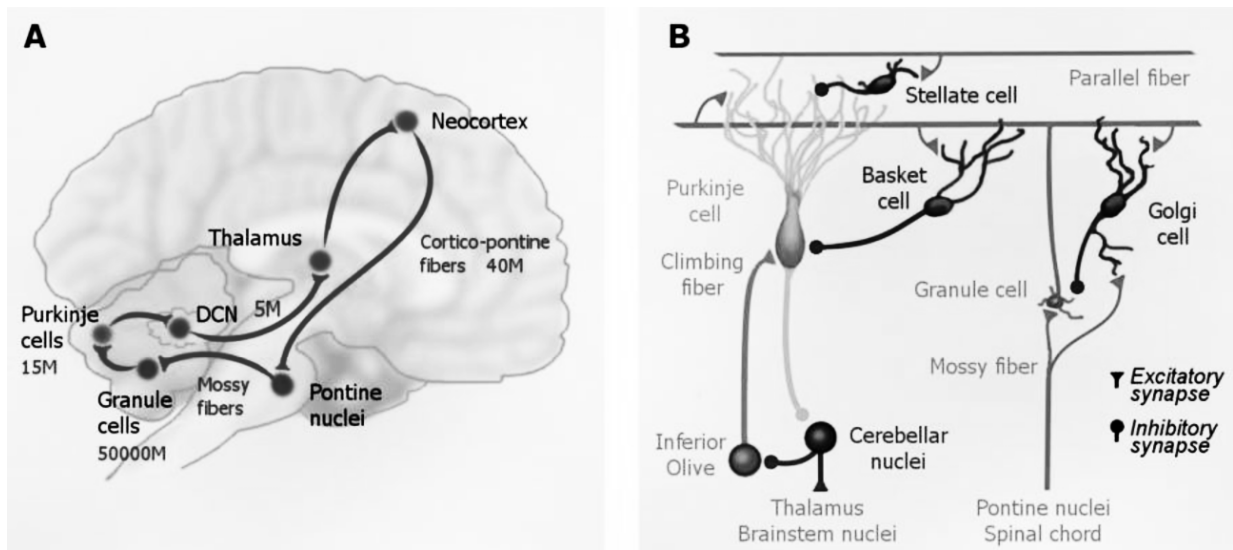


Abbildung 1: Zerebelläre Schleifenstrukturen

A: Kortiko-zerebello-kortikale Schleife. Die Zahlen stellen grobe Schätzungen der Anzahl der Projektionsfasern bzw. Zellen in Millionen (M) dar. Informationen aus dem Neocortex des Großhirns gelangen über kortiko-pontine Fasern in Kerne des Pons und anschließend über Moosfasern ins Kleinhirn. Nach Durchlaufen der Kleinhirnschleife bestehen synaptische Verbindungen von den tiefen Kleinhirnkernen (DCN) zum Thalamus und wieder zum Neokortex.

B: Lokale zerebelläre Kortexschleife. Jede Körnerzelle erhält Input aus 4-5 Moosfasern aus dem Pons oder dem Rückenmark und gibt Output durch eine Parallelfaser aus. Jede Purkinjezelle erhält Input aus ca. 175.000 Parallelfasern sowie einer glutamatergen Kletterfaser aus der inferioren Olive. Purkinjezellen senden GABAerge inhibitorische Projektionen zu den Kleinhirnkernen. Außerdem finden sich inhibitorische Neurone (Golgizellen, Sternzellen, Korbzellen) in den Kleinhirnschleifen. | Adaptiert mit Erlaubnis von Elsevier aus Neuron; „Universal Transform or Multiple Functionality? Understanding the Contribution of the Human Cerebellum across Task Domains“ von Jörn Diedrichsen, Maedbh King, Carlos Hernandez-Castillo, Marty Sereno und Richard B. Ivry; 2019; DOI: 10.1016/j.neuron.2019.04.021⁵⁰ mit der Lizenznummer: 5025370016306. Copyright © 2001 Elsevier.

Funktionelles Neuroimaging konnte schon im 20. Jahrhundert zeigen, dass es bei Denkaufgaben, visuellen und auditiven Inputs zu fokalen Aktivierungen im Kleinhirn kommt⁴¹. Aktuell geht man von einer topographischen Aufteilung des Kleinhirns in einen sensomotorischen Teil (anteriore Lobuli, Lobulus VIII), der in die motorischen kortikalen Areale projiziert, und einen kognitiv-affektiven Teil (posteriore Lobuli, Vermis), der in die höheren kortikalen und limbischen Assoziationszentren projiziert, aus⁵¹.

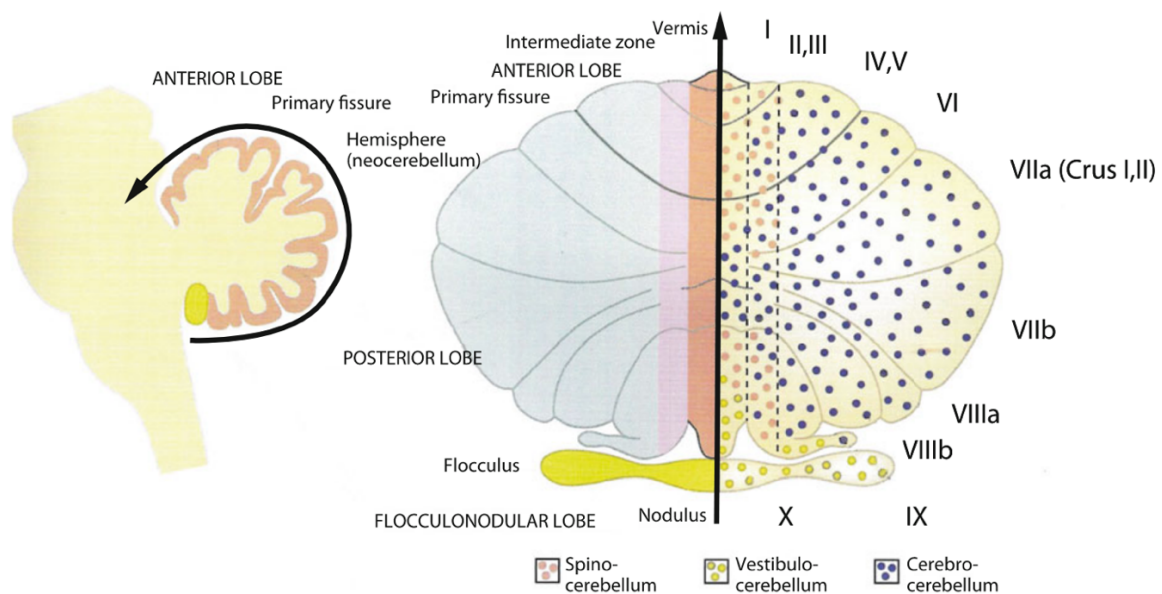


Abbildung 2: Unterabschnitte des Kleinhirns

Links: Sagittaler Schnitt durch das Kleinhirn mit Hirnstamm. **Rechts:** Entfaltetes Kleinhirn (vgl. den schwarzen Pfeil). Der linke Teil zeigt die anatomische Einteilung des Kleinhirns in den Lobus anterior, Lobus posterior und Lobus flocculonodularis. Zusätzlich ist die Einteilung nach den efferenten Verbindungen der Kleinhirnrinde zu den zugehörigen Kleinhirnkernen zu sehen. Der rechte Teil zeigt die Einteilung nach den afferenten Verbindungen des Kleinhirns (Vestibulocerebellum; Spinocerebellum; Cerebro- oder Pontocerebellum). Gleichzeitig ist die Benennung einzelner Lobuli in den Hemisphären angegeben. | Adaptiert mit Erlaubnis von Springer Nature aus Springer eBook „Kleinhirn und exekutive Funktionen“ von Hans-Otto Karnath und Peter Thier, 2012⁵² mit der Lizenznummer: 5025370762860. Copyright © 2012 Springer Nature.

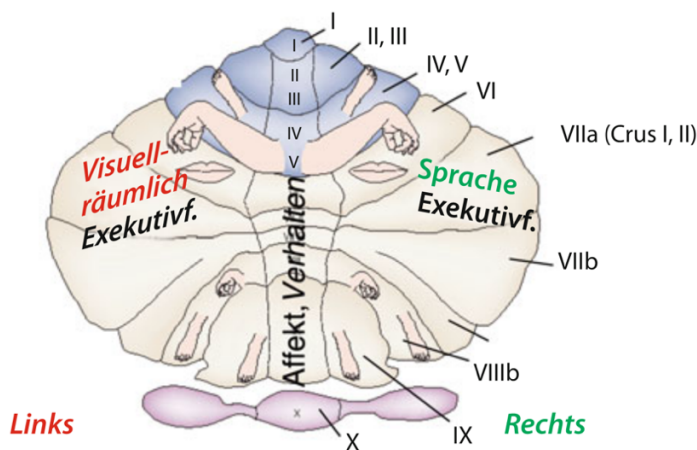


Abbildung 3: Funktionelle Kompartimentierung des menschlichen Kleinhirns

Gezeigt ist zum einen die bekannte zweifache Körperrepräsentation im Kleinhirn des Menschen und zum anderen die angenommene Lokalisation von nicht motorischen Funktionen. Blau: Lobus anterior; grau: Lobus posterior; violett: Lobus flocculonodularis. | Adaptiert mit Erlaubnis von Springer Nature aus Springer eBook „Kleinhirn und exekutive Funktionen“ von Hans-Otto Karnath und Peter Thier, 2012⁵² mit der Lizenznummer: 5025370762860. Copyright © 2012 Springer Nature.

Das Kleinhirn ist von baumartiger Struktur mit multiplen Folia cerebelli, die für eine verhältnismäßig große Oberfläche im Vergleich zum Volumen sorgen. In der Zeit von der 26. Schwangerschaftswoche bis zur Reifgeburt verfünffacht das Kleinhirn sein Volumen⁵³ und verdreißigfach seine Oberfläche durch die Faltung zuletzt genannter Folia⁵⁴.

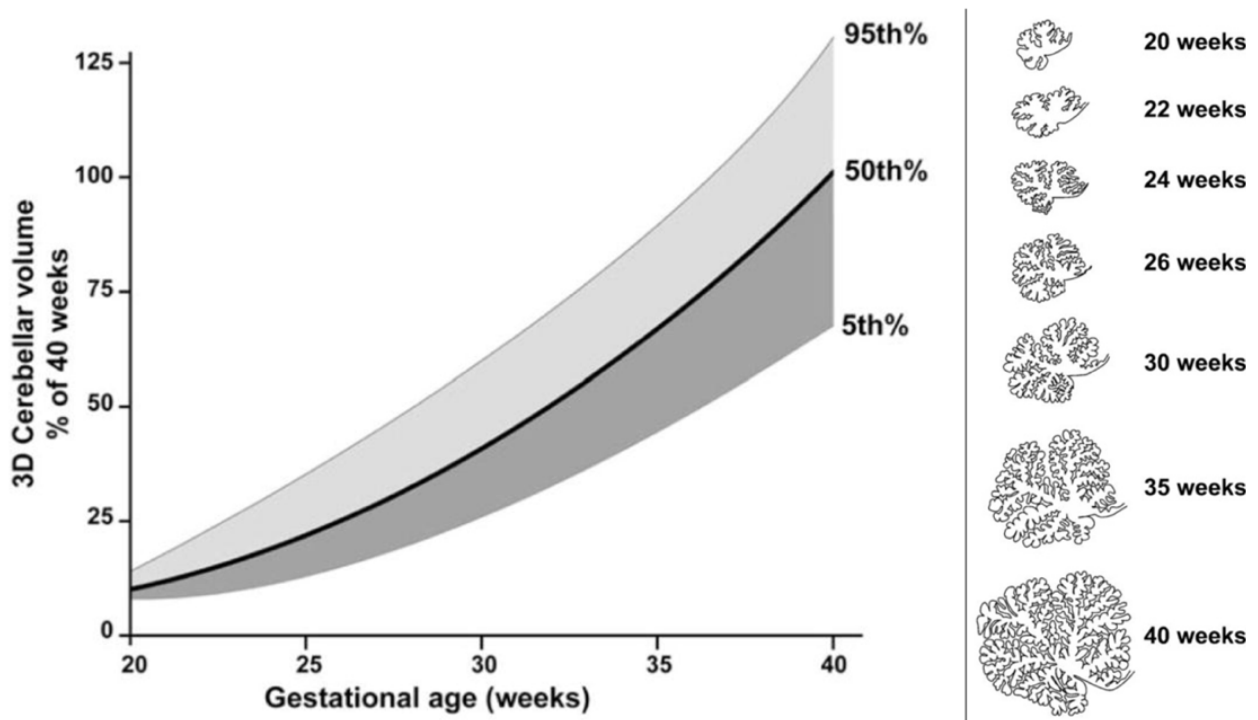


Abbildung 4: Zerebelläres Volumen- und Oberflächenwachstum im zweiten Teil der Schwangerschaft

Links ist das Kleinhirnvolumen in Prozent des durchschnittlichen Volumens bei Reifgeburt auf das Gestationsalter in Wochen aufgetragen. Die Grauschattierungen zeigen eine Wachstumsperzentilleneinordnung. **Rechts** ist eine Darstellung der Faltung der zerebellären Folia über die zweite Schwangerschaftshälfte zu sehen. Verändert nach Volpe, 2009⁵⁴ | Die Nutzung von bis zu drei Grafiken für eine Dissertation erfordert keine Erlaubnis des SAGE Verlags. Copyright © 2009 SAGE Publishing.

Diese rapiden Hirnentwicklungsschritte finden normalerweise in der geschützten Umgebung des Mutterleibs statt, frühgeborene Kinder sind in dieser Zeit multifaktoriellen Störfaktoren wie Hirnblutungen, Medikamentengaben, Ernährungsumstellungen und kardiorespiratorischen Komplikationen⁵⁵ ausgesetzt. Typische zerebelläre Pathologien sind Atrophie, Hypoplasie⁵⁶, Blutungen, Infektionen und Infarkte⁵⁷. Da das Kleinhirn sich noch lange postnatal weiterentwickelt und nach einer Schädigung die Fortentwicklung auf die-

sem Insult aufgebaut werden muss, können Läsionen oder Reifungsstörungen weitreichende Folgen haben, sowohl für die weiße Substanz als auch für neuronale Netzwerkstrukturen.

Nach zu früher Geburt zeigen die Kinder ein signifikant vermindertes Kleinhirnvolumen⁵⁸⁻⁶², teilweise mit noch postnatal progressiver Volumenreduktion⁵⁹. Magnetresonanztomografie(MRT)-gestützte Diffusionsmessungen im Kleinhirn zeigen eine geringere neuronale Integrität und Aktivität bei erhöhter fraktioneller Anisotropie als Marker der Myelinisierungsunreife^{63,64}. Diese Entwicklungsstörungen korrelieren mit einem niedrigen Gestationsalter bei Geburt, einem niedrigen initialen Apgar-Score, kardiorespiratorischen Problemen und Infektionen⁶⁴.

In jüngerer Zeit rückt das geschädigte Kleinhirn als Ursache neurologischer Schäden ehemals Frühgeborener in den Vordergrund, mit assoziierten Auffälligkeiten wie kognitiven Problemen^{65,66}, verminderten Exekutivfunktionen¹⁰, Aufmerksamkeitsdefiziten^{67,68} und Autismusspektrumstörungen⁶⁹. Das verminderte Volumen- und Oberflächenwachstum des Kleinhirns bei zu früh geborenen Kindern sowie die assoziierten Störungen der neurologischen Entwicklung scheinen bis ins Schulkindalter zu persistieren^{61,70}. Die Sprachflüssigkeit ist noch im jugendlichen Alter von 14 bis 15 Lebensjahren signifikant schlechter. Es ist davon auszugehen, dass Störungen der Kleinhirnentwicklung lebenslange Folgen mit sich bringen.

Obwohl die erhöhte zerebelläre Vulnerabilität bekannt ist^{53,54}, werden Kleinhirnpathologien im klinischen Alltag erheblich unterdiagnostiziert⁷¹.

1.4 Gliazellen im Kleinhirn und deren Funktion in der Entwicklung

Neben den oben beschriebenen neuronalen Zellen im Kleinhirn gibt es verschiedene Gliazellen, deren Funktionen und Entwicklungsschritte für den fachlichen Hintergrund der vorliegenden Arbeit von großer Bedeutung sind. Die Regulation der Kleinhirnentwicklung wird durch Neuron-Neuron-, Glia-Neuron- und Glia-Glia-Interaktionen mittels Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Transmittern gesteuert⁷².

Oligodendroglia synthetisieren im Kleinhirn Myelin und bilden Myelinscheiden von Neuronen. Ihre Entwicklung vom Oligodendrozyten-Vorläufer zur reifen Zelle, die typischerweise perinatal geschieht, ist abhängig von Interaktionen mit Mikroglia und Astroglia⁷³.

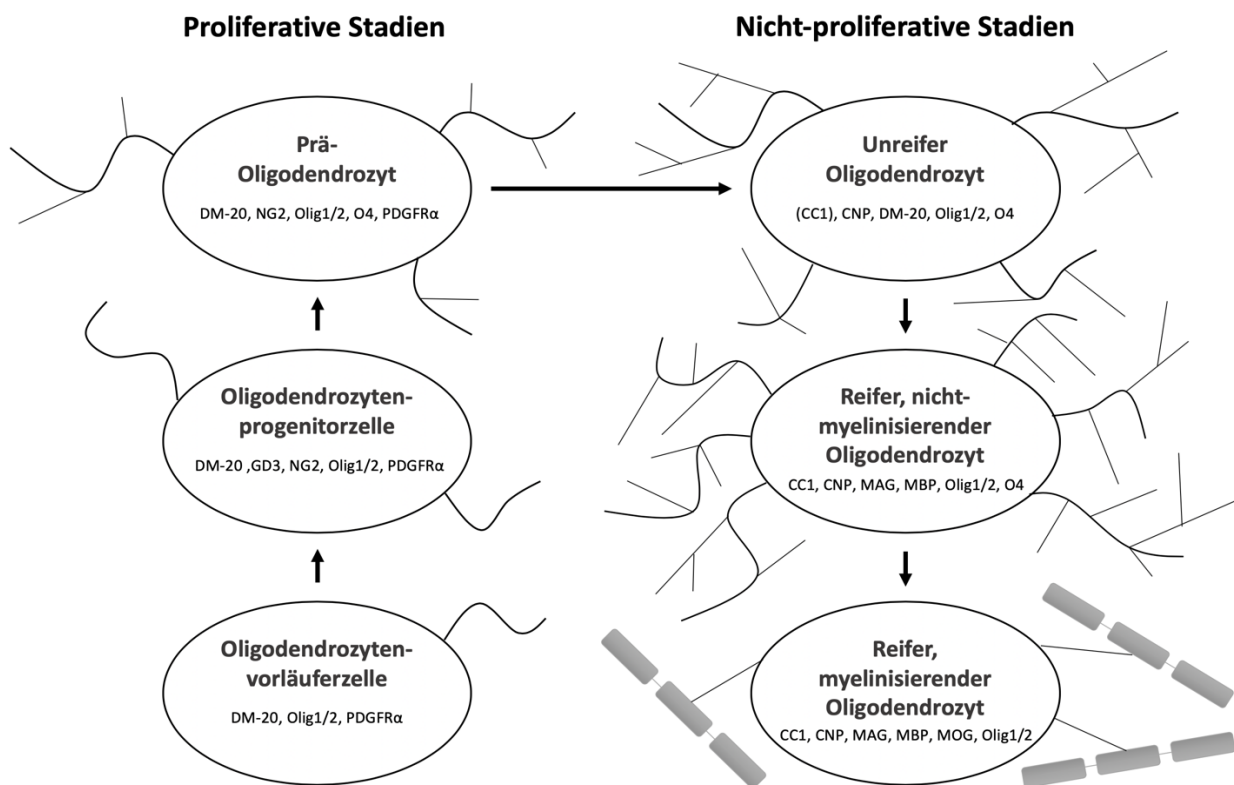


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien der oligodendroglialen Zelllinie

Die stadienspezifischen Oberflächenmarker sind unter den Bezeichnungen der Zellen zu entnehmen. Alle Schritte der Entwicklung werden durch axonale und astrozytische Signale beeinflusst.

CC1 = Klon des adenomatösen Polyposis Coli Protein 1; CNP = 2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase; DM-20 = Proteolipidprotein vom Typ DM-20; GD3 = Disialogangliosid 3; MAG = Myelin-assoziiertes Glykoprotein; MBP = basisches Myelinprotein; MOG = Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; NG2 = Neuron-Glia-Antigen 2; Olig1 = Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 1, Olig2 = Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2; O4 = Oligodendrozytenmarker 4; PDGFR α = Wachstumsfaktor aus Thrombozyten

Nachdem die DM-20+-Oligodendrozytenvorläuferzelle aus der Bodenplatte des Diencephalons ins Kleinhirn migriert ist⁷⁴, wird ihre Proliferation induziert, und es entstehen GD3+-Progenitorzellen⁷⁵. Aus diesem bipotenten Vorläuferstadium können sich noch Astrozyten entwickeln. Im Folgenden entwickelt sich die Progenitorzelle zu einem O4+-Prä-Oligodendrozyten⁷⁶, der nicht mehr migrationsfähig ist. Differenzierte, noch unreife, Oligodendrozyten sind postmitotisch (also nicht mehr proliferationsfähig), bilden Fortsätze aus und synthetisieren zyklische 2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase (CNP). Reife Oligodendrozyten exprimieren klassische Myelinproteine wie basisches Myelinprotein (MBP), Proteolipidprotein (PLP) oder Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG). Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der Oligodendrozytenvorläuferzellen mit ihren stadienspezifischen Oberflächenmarkern, die die Grundlage der Ergebnisinterpretation dieser Arbeit liefern.

Mikroglia sind die Immunzellen des Gehirns und verteilen sich im Kleinhirn in allen Kortexschichten sowie in der weißen Substanz. Sie kolonisieren das Gehirn in der Embryonalphase und bilden während ihrer Reifung (sowohl prä- als auch postnatal) zahlreiche Fortsätze aus⁷⁷. Die Relevanz mikroglialer Aktivierung wird bei Betrachtung ihrer unersetzlichen Funktion in der Entwicklung des zentralen Nervensystems verdeutlicht. Mikroglia produzieren Wachstumsfaktoren und Chemokine, wie zum Beispiel insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF) und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), die die Proliferation und Reifung von unreifen Neuronen und Oligodendroglia verstärken und regulieren^{78,79}. Eine gute mikrogliale Funktion ist essenziell für das Differenzieren oligodendroglialer Vorläuferzellen und die darauffolgende Myelinisierung^{35,80}. Außerdem sind Mikroglia beteiligt an der Elimination ungenutzter Synapsen und regulieren die Balance zwischen Synaptogenese und neuronalem Zelltod während der prä- und postnatalen Hirnentwicklung⁸¹. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Ausdifferenzierung neuronaler Netzwerke im Kleinhirn maßgeblich von der mikroglialen Synthese des koloniestimulierende Faktor 1-Rezeptor (CD115) abhängt⁸². Diese regulativen Mechanismen

scheinen im Kleinhirn eine noch größere Rolle zu spielen als im Großhirn. Mikroglia kommen, grob eingeteilt, in zwei Formen vor: in ihrer ruhenden, regulativen Form und in ihrer aktivierten, pro-inflammatorischen Form. Letztere können unreife Oligodendroglia töten, fördern aber das Überleben von reifen Oligodendrozyten⁸³.

Astroglia, deren Herkunft noch nicht gänzlich verstanden ist⁸⁴, nehmen eine zentrale Rolle in der Versorgung von Oligodendroglia und Neuronen ein und sind verantwortlich für die Homöostase im extrazellulären Milieu. Außerdem schütten sie trophische Faktoren aus, sind in der Lage, ihre Funktion je nach Umweltbedingungen zu verändern und können unter Umständen an Reparaturprozessen beteiligt sein, indem sie die Remyelinisierung fördern⁸⁵. Im Kleinhirn finden sich vier verschiedene Subtypen von Astroglia, die in erster Linie anhand ihrer Morphologie unterschieden werden: Bergmann-Glia (über der Purkinje-Zell-Schicht), faserförmige Astrozyten, sternförmige Astrozyten und protoplasmatische Astrozyten. Während der Entwicklung des Kleinhirns helfen sie außerdem bei der Migration von Neuronen, Synaptogenese, Proliferation und Zelldifferenzierung⁸⁶.

1.5 Mausmodell perinataler Inflammation durch systemische Administration von Interleukin-1 β

In der vorliegenden Arbeit kommt ein etabliertes Mausmodell perinataler Inflammation zur Anwendung^{34,87,88}. Die neugeborene Maus ermöglicht die Untersuchung von ähnlichen Hirnentwicklungsstadien wie bei frühgeborenen Kindern ohne eine induzierte Frühgeburt. Hierbei sind die ersten fünf Lebenstage der Maus in etwa vergleichbar mit einem frühgeborenen Kind (P0 entspricht ca. 22 post-konzeptionellen Schwangerschaftswochen), ab Tag 7 entspricht die Maus von ihrer Hirnentwicklung her einem reifgeborenen Kind. Ab ca. 20 postnatalen Tagen (P20) ist von einem Kleinkind-ähnlichen Stadium auszugehen, ab ca. 35 postnatalen Tagen (P35) von einem jugendlichen Alter und ab dem 50. Lebenstag (P50) entspricht das Hirnentwicklungsstadium der Maus in etwa einem

erwachsenen Menschen⁸⁹. Diese zeitlichen Einschätzungen stützen sich auf eine Datenbank der *University of Central Arkansas* und der *Cornell University*, die einen Algorithmus zum Vergleich der Hirnentwicklung von zehn verschiedenen Säugetierspezies zur Verfügung stellt (www.translatingtime.org).

Als pro-inflammatorischer Stimulus wurde Interleukin 1 β ⁹⁰ (IL-1 β) gewählt, welches intraperitoneal appliziert wurde, um einen systemischen Effekt zu erreichen. IL-1 β ist ein zentraler und potenter Mediator und Initiator von Entzündungskaskaden infektiöser und autoimmuner Natur^{91,92}. Die Dosis wurde auf der Basis dessen bestimmt, was sich als sensibilisierend gegenüber Folgeschädigungen (Exzitotoxizität) als Minimaldosis erwiesen hat²². Die Großhirne der Versuchstiere dieser Arbeit wurden bereits untersucht⁸⁷. Darin zeigten sich mikroskopisch erkennbare Gewebeläsionen und keine Schädigungen der grauen Substanz. In der weißen Substanz hingegen waren Störungen der Oligodendrozytenreifung und der Myelinisierung sowie Axonopathien zu beschreiben. In Verhaltenstestungen wurden Gedächtnisstörungen der Tiere beobachtet⁸⁷.

1.6 Fragestellung

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet somit: Verursacht perinatale, subklinische Inflammation durch IL-1 β im Mausmodell Schädigungen des Kleinhirns auf zellulärer oder molekularer Ebene; und wenn ja – welche?

Diese Fragestellung wird versucht, durch histologische und molekularbiologische Analysen, unter anderem durch Untersuchungen von Proliferations- und Differenzierungsaktivitäten der einzelnen Zelllinien, zu beantworten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Folgendes Verbrauchsmaterial wurde für die Durchführung der Experimente benötigt:

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien der Experimente

Art	Hersteller
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Scientific, Rockford, USA
Deckgläschen	R. Langenbrick, Emmendingen
MicroAmp® Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Mini-PROTEAN TGX™ Precast Midi Protein Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Nitrozellulosemembranen 0.2 μ m Porengröße	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf, Biozym
Super Frost plus™ beschichtete Objektträger	R. Langenbrick, Emmendingen
Super PAP-Pen Liquid Blocker	Science Services, München

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf; Eppendorf, Hamburg; Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Zur Durchführung der Experimente wurden verschiedene Chemikalien und Lösungen benötigt, darunter sowohl gebrauchsfertig erworbene als auch selbst hergestellte. Tabellen 2 und 3 geben eine Übersicht.

Tabelle 2: Gebrauchsfertige Chemikalien und Lösungen

Art	Hersteller
BSA	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt

Citronensäure-Monohydrat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
DAKO Antibody Diluent	Dako, Glostrup, Dänemark
DNase	Qiagen, Hilden
Dulbecco PBS	Biochrom, Berlin
EDTA	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fluoreshield mit DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Mini, EDTA-freie, Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Henningsdorf
NGS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Paraffin	Medite GmbH, Burgdorf
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
peqGold RNA-Pure	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Ponceau S Lösung	Fluka, Buchs, Schweiz
Rekombinantes Maus IL-1 β	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Roti [®] -Histol-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
HCl, rauchend	Merck, Darmstadt
TAE Elektrophorese Puffer	Fementas, St. Leon-Rot
TRIS	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Vectashield HardSet Mounting Media	Vector Laboratories, Burlingame, USA

BSA = Rinderserumalbumin, DNase = Desoxyribonuklease, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, HCl = Salzsäure, NaCl = Natriumchlorid, NGS = normales Ziegenserum, RNA = Ribonukleinsäure, IL-1 β = Interleukin-1 β , RIPA = Radioimmunopräzipitationsassay, TAE-Puffer = TRIS-Acetat-EDTA-Puffer, TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tabelle 3: Selbst hergestellte Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Rezeptur
Blockierungslösung I für IHC	1 % BSA, 10 % NGS, 0.05 % Tween-20 in PBS Puffer
Blockierungslösung II für IHC	3 % BSA, 1 % NGS, 0.05 % Tween-20 in PBS Puffer
Blockierungslösung für WB	5 % BSA, 0.1 % Tween-20 in TRIS-gepufferter Salzlösung
Boratpuffer (pH 8.5)	1 M Borsäure, 1 M TRIS und 20 mM EDTA in bidest. H ₂ O
10-facher Citratpuffer (pH 6.0)	100 mM Citronensäure-Monohydrat in bidest. H ₂ O
Permeabilisierungslösung IHC	0.1 % Triton-X-100 und 0.1 % Tween-20 in PBS Puffer
Tris-gepufferte Salzlösung (pH 9.0)	1.21 g TRIS und 0.37 g EDTA ad 1L bidest. H ₂ O

IHC = Immunhistochemie, BSA = Rinderserumalbumin, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, NGS = normales Ziegenserum, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, WB = Western-Blot

2.1.3 Antikörper und Farbstoffe

Für die Durchführung von Western-Blots zur Proteinanalyse und für die immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils Primär- und Sekundärantikörper für die Markierung von extra- und intrazellulären Zellbestandteilen benötigt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper geben die Tabellen 4-7.

Tabelle 4: Primärantikörper für Western-Blotting

Antigen	Spezifikation	kDA	Firma	Nummer	Verdünnung	IZ
β -actinin	mouse anti β -actinin	42	Sigma Aldrich	A5316	1:5000	24h
CNP	rabbit anti CNP	49	Thermo Fisher	PA-27972	1:1000	24h
MAG	mouse anti MAG	63, 69	Abcam	ab89780	1:500	24h
MBP	mouse anti MBP	18-24	Covance	SMI-99P	1:1000	24h
MOG	rabbit anti MOG	27	Abcam	ab32760	1:1000	24h
PLP	rabbit anti PLP	26, 30	Abcam	ab28486	1:1000	24h

CNP = 2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase; kDA = Kilodalton, MAG = Myelin-assoziiertes Glykoprotein; MBP = basisches Myelinprotein; MOG = Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; PLP = Proteolipidprotein; IZ = Inkubationszeit | Abcam, Cambridge, UK; Covance, Priceton, New Jersey, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München

Tabelle 5: Sekundärantikörper für Western-Blotting

Antigen	Spezifikation	Firma	Nummer	Verdünnung	IZ
mouse	polyclonal rabbit anti-mouse	DAKO	P0260	1:5000	1h
rabbit	horseradish peroxidase-linked polyclonal goat anti-rabbit	DAKO	P0448	1:5000	1h

IZ = Inkubationszeit; DAKO, Glostrup, Dänemark

Tabelle 6: Primärantikörper für Immunhistochemie

Antigen	Spezifikation	Firma	Nummer	Verdünnung	IZ
BrdU	chicken anti BrdU	Abcam	ab92837	1:300	48h
BrdU	rabbit anti BrdU	Bioss	bs-0489R	1:50	24h
Casp3	rabbit anti Casp3	Cell Signaling	9664	1:200	24h
CC1	mouse anti CC1	Calbiochem	OP86	1:250	24h
CD3	anti-mouse CD3, Alexa Fluor® 594	BioLegend	AB_2553427	1:100	24h
Dapi		Sigma Aldrich	32670	1:2000	10'
Iba1	rabbit anti Iba1	Wako Chemicals	019-19741	1:750	48h
MAG	mouse anti MAG	Abcam	ab89780	1:1000	24h
MOG	rabbit anti MOG	Abcam	ab32760	1:1500	24h
Olig1	rabbit anti Olig1	Millipore	AB15620	1:750	24h
Olig2	mouse anti Olig2	Abcam	ab56643	1:500	24h
PCNA	mouse anti PCNA	Abcam	ab29	1:1000	24h
PCNA	rabbit anti PCNA	Abcam	ab15497	1:500	24h

BrdU = Bromo-Desoxyuridin; Casp3 = gespaltene Caspase 3; CC1 = Klon des adenomatösen Polyposis Coli Protein 1; CD3 = *cluster of differentiation* 3; Dapi = 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Iba1 = Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptormolekül 1; MAG = Myelin-assoziiertes Glykoprotein; MOG = Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; Olig1 = Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 1; Olig2 = Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2; PCNA = *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*, IZ = Inkubationszeit

Abcam, Cambridge, UK; BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA; Bioss, Boston, Massachusetts, USA; Calbiochem, Darmstadt; Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt am Main; Millipore, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München; WAKO Chemicals, Neuss

Tabelle 7: Sekundärantikörper für Immunhistochemie

Antigen	Spezifikation	Firma	Nummer	Verdünnung	IZ
chicken	goat anti chicken, Alexa Fluor [®] , 594nm	MP	A11042	1:200	1h
mouse	goat anti mouse, Alexa Fluor [®] , 488nm	MP	A11029	1:200	1h
mouse	goat anti mouse, Alexa Fluor [®] , 594nm	MP	A11032	1:200	1h
rabbit	goat anti rabbit, Alexa Fluor [®] , 488nm	Invitrogen	A11034	1:200	1h
rabbit	goat anti rabbit, Alexa Fluor [®] , 594nm	MP	A11037	1:200	1h
rabbit	donkey anti rabbit, Alexa Fluor [®] , 546nm	MP	A10040	1:200	1h

IZ = Inkubationszeit; Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA; MP = Molecular Probes, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.4 Reagenzien der Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalysen mittels Polymerasekettenreaktion wurden verschiedene Reagenzien und Enzyme benötigt (Tabelle 8). Zudem wurden passende Oligonukleotid-Primer für die zu vervielfältigenden Gensequenzen synthetisch hergestellt, die in Tabelle 9 mit ihrer Genbanksequenznummer dargestellt werden.

Tabelle 8: Enzyme und Reagenzien der Genexpressionsanalyse

Art	Hersteller
DNase (2 U/ μ L)	Qiagen, Hilden
dNTPs (10 mM, für Reverse Transkription)	Promega, Mannheim
dNTP-Mix (2 mM, für Kontroll-PCR)	Fermentas, St. Leon-Rot
DreamTaq DNA-Polymerase (5 U/ μ L)	Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ L)	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase Puffer	Promega, Mannheim
qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren
qPCRBIO SYgreen Mix Hi-ROX	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren
RNasin [®] RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	Promega, Mannheim
Zufallsprimer (500 μ g/mL)	BioTEZ GmbH, Berlin

DNase = Desoxyribonuklease, dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat, M-MLV = modifizierte Variante der reversen Transkriptase aus murinen Leukämieviren, PCR = Polymerasekettenreaktion, qPCR = quantitative Echtzeit-PCR, RNase = Ribonuklease

Tabelle 9: Sequenzen der synthetisch hergestellten Oligonukleotide

Gen		Oligonukleotidsequenz 5'-3'	Genbanksequenz
<i>Cnp</i>	vorwärts	AGCAGGAGGTGGTGAAGAGA	NM_001146318.1
	rückwärts	GATGGCTTGTCCAGATCA	
	Sonde	TTTGTGACACCCAAGACAGC	
<i>Gclc</i>	vorwärts	GTGGAGGCCAATATGAGGAA	NM_010295.2
	rückwärts	CTGGGTGGGTCTGTGTTCT	
	Sonde	AGGCTCTCTGCACCATCACT	
<i>Hprt</i>	vorwärts	TGCTGACCTGCTGGATTACATT	NM_013556.2
	rückwärts	TCCCCGTTGACTGATCATT	
	Sonde	TCAGACTGAAGAGCTACTG	
<i>Igf1</i>	vorwärts	GCTGGTGGATGCTCTTCAGTT	NM_010512.5
	rückwärts	AGGTGCCCTCCGAATGCT	
	Sonde	detektiert mit SYBR™ Green	
<i>Inos</i>	vorwärts	CATCGACCCGTCCACAGTATG	NM_001313922.1
	rückwärts	GAAATCCGATGTGGCCTTGT	
	Sonde	CAGTGGAGAGATTTTGCATG	
<i>Mhc-II</i>	vorwärts	CATCAAGGCCGACCACATG	NM_008206.2
	rückwärts	TCCCCGTCAAATTCGTGTGT	
	Sonde	CTTCTACCAATCTTACGACGCT	
<i>Olig2</i>	vorwärts	ATCTTCCTCCAGCACCTCCT	NM_016967.2
	rückwärts	GGGCTCAGTCATCTGCTTCT	
	Sonde	CCACGTCTTCCACCAAGAAA	
<i>Sod2</i>	vorwärts	CCGAGGAGAAGTACCACGAG	NM_013671.3
	rückwärts	ATATGTCCCCCACCATTGAA	
	Sonde	ACA ACTCAGGTCGCTCTTCAG	

Cnp = 2',3'-zyklische Nukleotid 3' Phosphodiesterase; *Gclc* = Glutamat-Cystein-Ligase katalytische Untereinheit; *Hprt* = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; *Igf1* = Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1; *Inos* = Induzierbare Stickoxidsynthase; *Mhc-II* = Haupthistokompatibilitätskomplex II; *Olig2* = Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2; *Sod2* = Superoxid-Dismutase 2

Alle Primer wurden von der BioTez Berlin GmbH, Berlin, synthetisiert.

2.1.5 Geräte und Softwareprogramme

Für die Datenerhebung und -auswertung wurden verschiedene Geräte und Softwareprogramme eingesetzt, die in Tabelle 10 aufgelistet sind.

Tabelle 10: Geräte und Softwareprogramme

Art / Zweck	Spezifikation	Hersteller
Agarosegel-Detektor	UVsolo	Biometra, Göttingen
Bildbearbeitungssoftware	ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_172	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
	Adobe® Photoshop CS6 Extended Version 13.0	Adobe® Systems Incorporated, San José, USA
Bildverarbeitungssoftware	BZII-Analyzer Software	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Fluoreszenzmikroskop	Keyence Biorevo BZ-9000 Generation II	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Grafikdesign	Adobe® Illustrator CC	Adobe® Systems Incorporated, San José, USA
Magnetrührer	MR3003	Heidolph Instruments, Schwalbach
Mikrowelle		Bosch
Nanodrop	ND 1000 Spectrophotometer	Kisker Biotech, Steinfurt
Office-Anwendungen	Microsoft Office 2016, 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
Paraffinstreckbad		MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
PCR Gerät	StepOnePlus™ real-time PCR System	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
PCR Software	StepOne™/StepOnePlus™ Software v2.1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipetten	Mechanische und elektrische Luftpolsterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Schneidegerät	Mikrotom Leica® SM2000 R	Leica® Microsystems GmbH, Wetzlar

Statistiksoftware	GraphPad PRISM™ Version 5.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Western-Blot Analyse	Image Lab Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Western-Blot Auslesung	ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Western-Blot elektrisches Feld	PS2A200 High Current Power Supply	Hoefer, Holliston, USA
Western-Blot Laufkammer	Laufkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Western-Blot Transfer	Transblot-Turbo-Transfer-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Vortex	Vortex Genie 2	VWR, Darmstadt
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R Zentrifuge 5417R	Heraeus Sepatech, Hanau Eppendorf, Hamburg

PCR = Polymerasekettenreaktion

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuchsmodell

Für die experimentelle Arbeit wurden männliche, neugeborene Mäuse der Mauslinie OF1 von *Charles River* (Charles River, Frankreich) genutzt. Die Tiere wurden nach den Richtlinien der *Home Office Animals (Scientific procedures) Act* (UK, 1986), den Institutions-guidelines des *Institut national de la santé et de la recherche médicale* (INSERM) und den Richtlinien der Europäischen Union 2010/63/EU (#9286-2016090617132750) behandelt. Alle Tierversuche wurden in den Partnerinstitutionen in Paris und London durchgeführt, dementsprechend wurden die Ethikanträge zu den Tierversuchen von der Ethikkommission des INSERM des *Hôpital Debré* in Paris, Frankreich genehmigt (Genehmigungsnummern: 2012-15/676-0079 und 2012-15/676-0083).

In früheren Publikationen zu diesem bereits etablierten Tierversuchsmodell des INSERM in Paris konnte gezeigt werden, dass vor allem die männlichen Tiere nach Behandlung mit IL-1 β im Großhirn unter oligodendrozytären Proliferationsdefiziten sowie Myelinisierungsstörungen litten⁸⁷, dies entspricht der klinischen Beobachtung, dass männliche Frühgeborene ein tendenziell schlechteres neurologisches Outcome haben⁹³. Dementsprechend wurden für diese Studie ebenfalls nur männliche Tiere untersucht.

In diesem experimentellen Setup wurden zwei Versuchsgruppen gebildet, in die die neugeborenen Mäuse randomisiert wurden. Eine Kontrollgruppe erhielt 5 μ l Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS) zweimal täglich für die ersten vier Lebenstage (P1-4) und einmal am fünften Lebenstag (P5) intraperitoneal injiziert. Die beiden Versuchsgruppen erhielten rekombinantes Maus-IL-1 β (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in einer Dosis von 10 μ g/kg/Injektion gelöst in 5 μ l PBS nach demselben Schema wie die Kontrollgruppe. Eine der beiden Versuchsgruppen erhielt zusätzlich Bromo-Desoxyuridin (BrdU, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) in einer Dosis von 10 mg/kg pro Tag an Lebenstag 1 bis 4 sowie 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) in einer Dosis von 50 mg/kg pro Tag an Lebenstag 5 für genauere Proliferationsanalysen der untersuchten Zelllinien.

Die ersten fünf Lebenstage der neugeborenen Maus entsprechen vom neurologischen Entwicklungszustand her, wie bereits in der Einleitung beschrieben, am ehesten einem menschlichen Frühgeborenen von 23-32 Schwangerschaftswochen. Dementsprechend wurde der Injektionszeitraum gewählt.

Während des Tierversuchszeitraums wurden die Vitalparameter der Tiere regelmäßig überprüft. Dies beinhaltete tägliches Wiegen, Messen der Körpertemperatur (interskapulär), Messen der Hirntemperatur, Aufzeichnung der Atemparameter mittels Plethysmographie, Elektrokardiographie sowie Blutgasanalysen.

Abbildung 6 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf. Mit Pfeilen sind die Injektionsstage der verwendeten Substanzen gekennzeichnet. Die Kreuze markieren die Zeitpunkte der Tötungen für immunhistochemische Färbungen, Western-Blots und Genexpressions-Analysen.

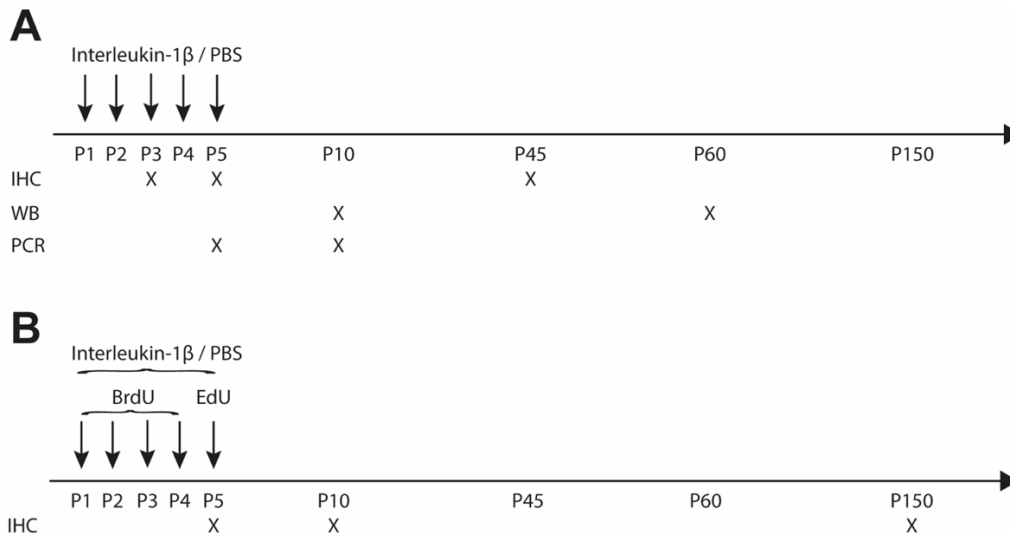


Abbildung 6: Tierversuchsmodell

A: Mäusen wurde IL-1 β zweimal täglich für 4 Tage und einmal täglich an Tag 5 intraperitoneal verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt zu denselben Zeitpunkten PBS. Analysen fanden zu verschiedenen Zeitpunkten statt. **B:** Mäusen wurde wie in A IL-1 β bzw. PBS verabreicht. Zusätzlich wurde BrdU bzw. EdU intraperitoneal injiziert.

BrdU = Bromo-Desoxyuridin, EdU = 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin, IHC = Immunhistochemie, WB = Western-Blot, PCR = Polymerasekettenreaktion, PBS = phosphat-gepufferte Salzlösung, P = Lebenstag

2.2.2 Gewebeaufbereitung

Tötungen der Tiere sowie Entnahmen der Gehirne fanden zu den Zeitpunkten P3, P5, P10, P45, P60 und P150 (siehe Abb. 6) statt. Hierdurch wurden alle Zeitpunkte vom Neugeborenenalter bis zum späten Erwachsenenalter der Maus abgebildet. Für die molekularbiologischen Analysen (Western-Blotting, Polymerasekettenreaktion) wurden die Kleinhirne abgetrennt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Analyse verwahrt. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Tiere nach der Tötung mit 0.1 M PBS und anschließend 4 % Paraformaldehyd transkardial perfundiert, es schloss sich die Organentnahme an. Der Transport nach Berlin erfolgte je nach Folgeanalyse tiefgefroren beziehungsweise in PBS.

2.2.3 Western-Blotting

Schockgefrorene ganze Kleinhirne wurden in Radioimmunpräzipitationsassaypuffer (RIPA Puffer) mit Ethylendiamintetraacetat(EDTA)-freien Protease-Inhibitor-Tabletten homogenisiert. Diese Mischung wurde bei 13.000 G und 4 °C für 20 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* bestimmt. Proteinextraktaliquots (20 μ g pro Tasche) wurden in *Laemmli-Puffer* (Laemmli Sample Puffer, Bio-Rad) denaturiert (jede Probe für 5 min bei 95 °C) und anschließend auf Eis gekühlt. Nach einer elektrophoretischen Proteinauftrennung (Spannung von 120 V, Laufzeit 90 min) nach ihrer Größe auf 12 % *Mini-PROTEAN TGX precast Gels* wurden die Proteine direkt auf Nitrozellulosemembranen (0.2 μ m Porengröße) mittels einer halbtrockenen Elektrotransfereinheit (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) bei 15 V innerhalb von 5 min transferiert. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde mit einer Färbung mittels Ponceau S Lösung überprüft.

Die Membranen wurden mit der beschriebenen Blockierungslösung für Western-Blotting (siehe Tab. 3) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, bevor sie über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden Antikörpern nach Tabelle 4 inkubiert wurden.

Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in PBS wurden als entsprechende Sekundäranantikörper *horseradish peroxidase-linked polyclonal goat anti-rabbit* und *polyclonal rabbit anti-mouse* (siehe Tab. 5) verwendet. Die positiven Signale wurden mittels verstärkter Chemolumineszenz detektiert und mittels *ChemiDoc XRS+ System* sowie der *Image Lab* Software quantifiziert. Alle Expressionswerte wurden auf die Signalstärke des Referenzproteins β -Actin normalisiert, um eine etwaige Ungleichheit der Proteinkonzentrationen zwischen den einzelnen Proben auszugleichen.

Die Western-Blots erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Ruth Herrmann (TA).

2.2.4 Histologische Färbungen und Fluoreszenzmikroskopie

Nach Ankunft im Forschungshaus der Charité Virchow Klinikum wurden die Kleinhirne in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, in Paraffin eingebettet, mittels Mikrotom in sagittale Schnitte von 10 μ m Dicke geschnitten und auf *Super Frost plusTM*-beschichtete Objektträger transferiert. Die Paraffineinbettung und das Schneiden der Kleinhirne erfolgten durch Frau Evelyn Strauß (TA).

Anschließend erfolgten die immunhistochemischen Färbungen zur Detektion zellspezifischer Antigene mittels Primär- und Sekundärantikörper. Die Sekundärantikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die sich unter einem Fluoreszenzmikroskop analysieren lassen.

Die Deparaffinierung vor den immunhistochemischen Färbungen erfolgte mittels *Roti[®]-Histol-Lösung* zweimal hintereinander für 10 Minuten, anschließend erfolgte die Rehydratation der Schnitte mittels absteigender Ethanolreihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 3 min pro Alkoholbad) und zum Schluss destilliertem Wasser (3 min im Wasserbad).

Nach der Deparaffinierung wurden die Schnitte für 10 min bei 600 W in Citratpuffer (pH 6.0) in der Mikrowelle zur Antigendemaskierung erhitzt. Färbungen mit BrdU erforderten eine zusätzliche Denaturierung mittels Salzsäure (2N HCl, 200 μ L pro Objektträger) für 20 min und die anschließende Neutralisierung mittels eines Boratpuffers. Nach dem Abkühlen der Schnitte erfolgte die Waschung mittels PBS (dreimal für je 5 min) und die Blockierung mittels Blockierlösung I (siehe Tab. 3; für die Färbungen Olig2/PCNA, Olig2/Casp3, Olig2/BrdU, Iba1/BrdU, Olig1/CC1 und CD3) oder Blockierlösung II (siehe Tab. 3, für die Färbungen Iba1/Olig2, Iba1/PCNA, MAG und MOG). Primärantikörper (siehe Tab. 6) wurden in *DAKO Antibody Diluent* gelöst und mit je 150 μ L pro Objektträger für 24-48 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurde ein Sekundärantikörper nach Tabelle 7 1:200 verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle der Färbung mit dem CD3-Antikörper war kein Sekundärantikör-

per notwendig, da der Primärantikörper bereits mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert war. Eine Zellkernfärbung mittels DAPI wurde abschließend angeschlossen. Zuletzt wurden die Objektträger mit Einschlussmittel (Vectashield HardSet Mounting Media) eingedeckelt.

Die fluoreszenzgefärbten Schnitte wurden mit dem *Keyence BZ-900* Mikroskop bei 20-40-facher Vergrößerung, je nach Alter und dementsprechend Kleinhirngröße der Versuchstiere, angesehen. Von den einzelnen Ausschnitten wurden konfokale Z-Stacks erstellt und mittels *BZII-Analyzer Software* fusioniert. Pro Versuchstier und untersuchtem Bereich wurden drei Fotos erstellt. Nach minimaler Manipulation von Kontrasten zur Erleichterung der Zellzählung mittels *Adobe® Photoshop CS6 Extended Version 13.0* wurden die angefärbten Zellen im in Abbildung 7 markierten Areal verblindet gezählt. Es wurde standardmäßig der Übergang zwischen Lobuli und Kernbereich des Kleinhirns ausgewählt, nur bei Bergmann-Glia wurde der Kortexrand analysiert (siehe Abb. 7). In der Analyse der CD3-Färbungen wurde das gesamte Präparat beurteilt. Für die statistische Auswertung wurden die Zahlenmittelwerte der drei Fotos pro Versuchstier genutzt. Pixelintensitätsmessungen wurden verblindet an fest größendefinierten Kortexausschnitten ohne Manipulation von Kontrast oder Intensität mit der Software *ImageJ* vorgenommen.

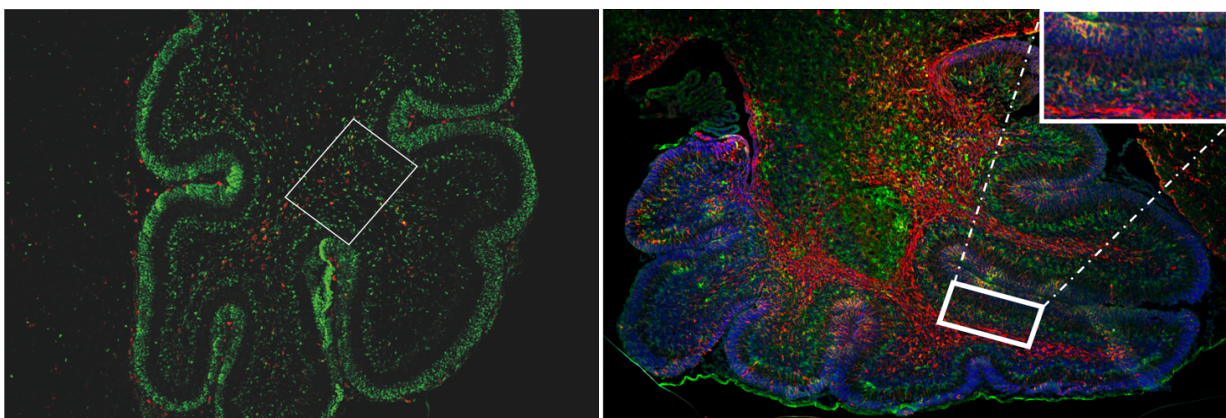


Abbildung 7: Untersuchte Areale in den immunhistochemischen Färbungen

Übersichtsaufnahmen von Kleinhirnen zu den Zeitpunkten P3 (links) und P5 (rechts). **Links:** Standardareal des Lobuli-Kortexüberganges. **Rechts:** Kortexausschnitt der Bergmann-Glia-Färbungen.

2.2.5 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Aus schockgefrorenen ganzen Kleinhirnen wurde mittels saurer Phenol/Chloroform-Extraktion Ribonukleinsäure (RNA) isoliert. Nach Zugabe von 800 μ L *peqGOLD RNAPure* (PEQLAB, Erlangen, Germany), Homogenisierung und Zugabe von 160 μ L Chloroform inkubierten die Kleinhirne für 5 min auf Eis, bevor sie für 7 min bei 12000 G und 4 °C zentrifugiert wurden. Die ausgefallene RNA wurde abpipettiert und gefällt, nachdem Isopropylalcohol im Volumenverhältnis von 1:1 (4 °C, für 10 min) zugegeben wurde, und für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach Waschen in eiskaltem 75 % Ethanol wurden die RNA-Pellets mit Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Mithilfe des *Nanodrop* (ND 1000 Spectrophotometer, Kisker Biotech) wurde anschließend die RNA-Konzentration bestimmt und die RNA bis zur Reversen Transkription bei -80 °C gelagert. 2 μ g der RNA wurden revers transkribiert. Hierzu wurde zu der RNA 1 μ L Zufallsprimer (bestehend aus je sechs Nukleotiden, Konzentration von 500 μ g/mL) gegeben und mit Nuklease-freiem Wasser auf insgesamt 23.5 μ L aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der RNA bei 70 °C für 10 min im *Thermocycler* (Mastercycler, Eppendorf). Nach der Denaturierung lagern sich die hinzugefügten Zufallsprimer an die RNA-Stränge während dem Herunterkühlen auf 4 °C für 3 min an. Anschließend wurde 11.5 μ L Mastermix hinzugefügt. Dieser Mastermix enthielt folgende Bestandteile:

- DNase (Konzentration von 2 U/ μ L, hiervon 2 μ L entsprechend 4 U): verdaut etwaige noch übrige genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) zur Dekontamination der RNA
- RNasin RNase-Inhibitor (Konzentration von 40 U/ μ L, hiervon 0.5 μ L entsprechend 20 U): zum Schutz vor etwaigen vorhandenen RNasen
- M-MLV Reverse Transkriptase Reaktionspuffer (7 μ L): Reaktionspuffer der Reversen Transkriptase

- M-MLV Reverse Transkriptase (Konzentration von 200 U/ μ L, hiervon 1 μ L entsprechend 200 U): modifizierte Variante der Reversen Transkriptase aus murinen Leukämieviren, die an den zugegebenen Primern bindet und den zur RNA komplementären DNA-Strang synthetisiert
- dNTPs (Konzentration von 10 mM, hiervon 1 μ L entsprechend 0.3 mM): Desoxynukleotidtriphosphate, die zur DNA-Synthese nötig sind

Nach der oben beschriebenen Denaturierung und Abkühlung erfolgte die DNase-Behandlung im Thermocycler bei 37 °C für 30 min, diese wurde anschließend bei 75 °C für 5 min deaktiviert. Die Umschreibung der RNA in DNA erfolgte weiterhin im Thermocycler bei 42 °C für eine Stunde. Zuletzt wurden alle Enzyme bei 95 °C für 5 min deaktiviert. Die komplementäre DNA (cDNA) wurde portionsweise bei -20 °C eingefroren und bis zur eigentlichen Polymerasekettenreaktion gelagert.

Die RNA-Isolation und Reverse Transkription erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Ruth Herrmann (TA).

2.2.6 Polymerasekettenreaktion

Zum Ausschluss einer DNA-Kontamination wurde zunächst eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese des Kontrollgens *β -Actin* durchgeführt. Die hierfür gewählten Primer binden in zwei unterschiedlichen Exons. Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte zeigen ein spezifisches Bandenmuster im 1% Agarosegel. Eine Kontamination mit genomischer DNA konnte so ausgeschlossen werden.

Die Echtzeit-Quantifizierung der PCR Produkte von *Olig2*, *Cnp*, *Inos*, *Mhc-II*, *Sod2*, *Gclc* und *Ccnd2* wurde mit fluoreszenzfarbgeprägten Oligonukleotidsonden oder *SYBRTM Green* durchgeführt. Die entsprechenden Gensequenzen können Tabelle 9 entnommen werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe der Sonden (5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein und 3'-Ende mit 6-Carboxytetramethylrhodamin) sind ab einem bestimmten Schwellenwert in

Echtzeit quantifizierbar. *SYBRTM Green* funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip, ist aber keine Sonde, sondern ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der ab einer bestimmten Einbaumenge ein registrierbares Fluoreszenzsignal abgibt. Zu dem Zeitpunkt, zu dem das Fluoreszenzsignal detektiert wurde, wurde die Anzahl der bis dahin durchgeführten Amplifikationszyklen abgelesen und daraus die Ausgangsmenge des untersuchten Gens abgeleitet. Um sicherzustellen, dass die Reverse Transkription oder PCR nicht unterschiedlich effizient durchgeführt wurde oder die RNA-Menge abweichend war, wurden alle Ergebnisse in Referenz zu einem internen Haushaltsgen, in diesem Fall *Hprt*, gesetzt. Alle PCR-Proben wurden dreifach angesetzt und für die Expressionsanalyse der Mittelwert bestimmt.

Der Reaktionsansatz bestand für die sondengesteuerte qPCR aus 5 μ L *qPCRBIO Probe Mix High ROX* (Thermo Fisher Scientific), 2,5 μ L (1,25 μ M) Oligonukleotid Primer-Mix, 0,5 μ L (0,2 μ M) Sonde (BioTeZ, Berlin), und 3 μ L cDNA (1:10 verdünnt) pro Ansatz. Für die *SYBRTM Green* PCR bestand der Ansatz aus 5 μ L *qPCRBIO SYGreen Mix High ROX* (Thermo Fisher Scientific), 2,5 μ L (1,25 μ M) Oligonukleotid Primermix und 3 μ L cDNA (1:10 verdünnt). Insgesamt wurden somit je 8 μ L Mastermix und 3 μ L cDNA in Triplikaten in die Reaktionsplatten pipettiert. 96-well Reaktionsplatten wurden zunächst bei maximaler Umdrehungszahl für 2 min zentrifugiert und anschließend 2 min bei 50 °C erhitzt, in dieser Zeit arbeitet die Uracil-N-Glycosidase und beseitigt Verunreinigungen. Danach wurden die Platten für 3 min bei 95 °C zur initialen Denaturierung und Aktivierung der DNA-Polymerase erhitzt. Schließlich wurden die Proben zur Amplifikation für 40 Zyklen jeweils für 15 Sekunden bei 95 °C erhitzt und dann jeweils für 1 min bei 60 °C erhitzt. Die Analyse der Expressionsprofile erfolgte mittels des *StepOnePlusTM real-time PCR Systemes* unter der Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen⁹⁴.

2.2.7 Statistik

Alle quantitativen Daten sind in den Abbildungen dargestellt als Boxplots mit Median, Minimum, Maximum, oberem und unterem Quartil für jede Interventionsgruppe. Im Text sind die Daten auf zwei Nachkommastellen gerundet als Median \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistischen Daten wurden mittels *GraphPad PRISM™* erhoben. Zunächst wurde für jede Subgruppe ein Ausreißertest nach *Grubb's* durchgeführt und etwaige Ausreißer aus den weiteren Analysen entfernt. Anschließend wurde mittels *Kolmogorov-Smirnov-Tests* überprüft, ob die erhobenen Daten normalverteilt sind und dementsprechend entweder ein *T-Test* (für normalverteilte Stichproben) oder ein nonparametrischer *Mann-Whitney-U Test* (für nicht-normalverteilte Stichproben) angeschlossen. Ein p-Wert von <0.05 wurde als signifikant betrachtet (* = <0.05 ; ** = <0.01 ; *** = <0.001).

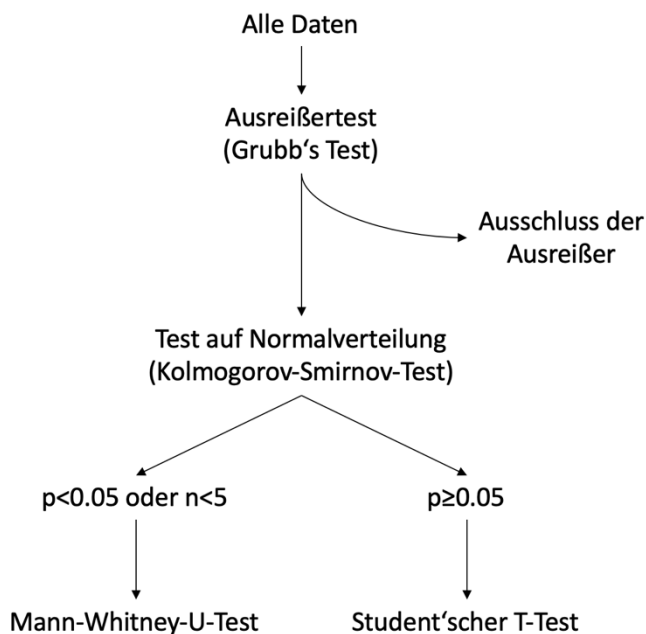


Abbildung 8: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Alle Datensätze wurden auf Ausreißer geprüft. Anschließend wurde auf Normalverteilung getestet. Bei normalverteilten Stichproben wurde ein *T-Test* angewendet, bei nicht-normalverteilten Stichproben ein nonparametrischer *Mann-Whitney U Test*.

3 Ergebnisse

3.1 Oligodendrogliale Proliferation und Reifung durch Inflammation inhibiert

Im unreifen Kleinhirn ist das schnelle Volumenwachstum zu großen Teilen durch die hohe Proliferationsaktivität von oligodendroglialen Progenitorzellen (OPC) bedingt, erst im späteren Verlauf reifen diese Vorläuferzellen, wie in der Einleitung beschrieben, zu Oligodendroglia aus^{75,95,96}.

3.1.1 Proliferationsdefizite von Oligodendrozyten

Um die Anzahl und Proliferationsrate der oligodendroglialen Zelllinie zu bestimmen, wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2 (Olig2) durchgeführt. Olig2 ist ein Transkriptionsfaktor, der zu beinahe allen Stadien der oligodendroglialen Zelllinie exprimiert wird⁹⁷. Zur Messung der Proliferationsaktivität wurde diese Färbung um *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) in der Tierkohorte, die nur IL-1 β erhalten hat, beziehungsweise BrdU in der Tierkohorte, die postnatal BrdU erhalten hat, ergänzt. Als Zellkernmarker wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Bestimmung der Gesamtzellzahlen genutzt.

Zunächst wurde die Reduktion der proliferierenden Olig2+ PCNA+ Oligodendrozytenvorläuferzellen zu den frühen Zeitpunkten Lebenstag 3 und 5 betrachtet. Bereits am dritten Lebenstag zeigte sich eine sichtbare Reduktion der absoluten Zahlen proliferierender OPCs in der Versuchsgruppe, die bedingt durch die hohe Variabilität in der Kontrollgruppe knapp nicht signifikant war (PBS: 42.70 \pm 6.53 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 31.70 \pm 1.76 Zellen / Areal; p=0.0995; n=5; Abb. 9B). Am 5. Lebenstag zeigte sich eine signifikante Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen (PBS: 49.00 \pm 2.64 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 24.50 \pm 2.33 Zellen / Areal; p<0.0001; n=8; Abb. 9B).

Der Anteil der proliferierenden OPCs an allen OPCs war am dritten (PBS: 68.25 \pm 2.49 % vs. IL-1 β : 56.13 \pm 3.92 %; p=0.0442; n=5; Abb. 9C) sowie fünften (PBS: 49.50 \pm 3.07 %

vs. IL-1 β : 31.90 ± 2.98 %; $p=0.0009$; $n=8$; Abb. 9C) Lebenstag statistisch signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der sich über 50% der Oligodendrozytenvorfürer teilten. Die Reduktion der proliferierenden Zellen verstärkte sich von Lebenstag 3 zu Lebenstag 5, möglicherweise als Ausdruck einer Dynamik des antiproliferativen Effektes der IL-1 β -Injektionen.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden weiterhin die Tiere untersucht, die an ihren ersten Lebenstagen BrdU als „falsches Nukleotid“ per intraperitonealer systemischer Injektion erhielten und dieses in proliferierende Zellen eingebaut haben. Diese Tiere wurden an Lebenstag 5 und Lebenstag 10 (nach fünf Tagen Erholungsphase) getötet und immunhistochemisch untersucht mittels Antikörpern gegen Olig2 und gegen BrdU. In absoluten Zellzahlen wurde hier eine geringere, nicht signifikante Reduktion von proliferierenden Oligodendroglia sowohl am fünften (PBS: 51.00 ± 7.63 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 33.50 ± 7.89 Zellen / Areal; $p=0.4127$; $n=4-5$; Abb. 9A, 9D) als auch am zehnten (PBS: 65.00 ± 8.50 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 50.50 ± 7.85 Zellen / Areal; $p=0.5556$; $n=4-5$; Abb. 9A, 9D) Lebenstag im Vergleich zur PCNA-Untersuchung gesehen, was auf die Akkumulation von proliferierenden Zellen vom ersten Lebenstag an zurückzuführen ist, während PCNA nur eine Momentaufnahme am Tag der Tötung bietet. In Relation zu allen Olig2 positiven Zellen bestätigte sich in der BrdU-Untersuchung ein reduzierter Anteil proliferierender Zellen nach perinataler systemischer Inflammation sowohl am Ende der inflammatorischen Phase (P5 PBS: 45.94 ± 1.18 % vs. IL-1 β : 41.35 ± 1.78 %; $p=0.0286$; $n=4$; Abb. 9A, 9E) als auch prolongiert nach fünf Tagen Erholungszeit (P10 PBS: 55.15 ± 2.39 % vs. IL-1 β : 43.98 ± 2.12 %; $p=0.0317$; $n=4-5$; Abb. 9A, 9E).

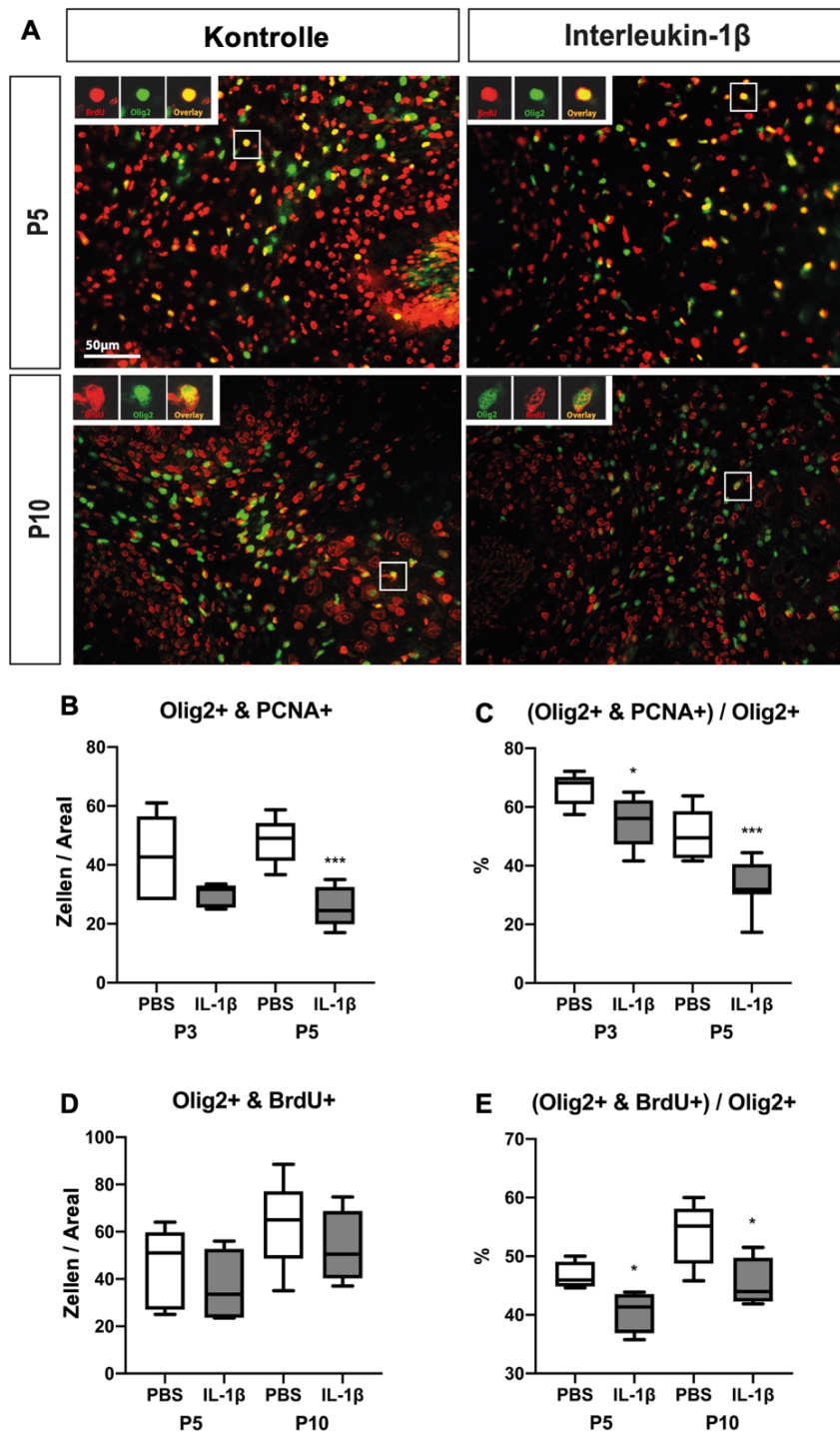


Abbildung 9: Proliferation von Oligodendroglia

A-E: Immunhistochemische Färben von Olig2 und BrdU (**A**, **D**, **E**) und Olig2 und PCNA (**B**, **C**) den Zeitpunkten P3, P5 und P10. **A:** repräsentative Färbung des Kleinhirns zu den Zeitpunkten P5 und P10. Olig2 in grün, BrdU in rot. **B**, **C:** Zellzahlen von Olig2 und PCNA ko-gefärbten Zellen mit hochsignifikanter Reduktion der Zellzahl zum Zeitpunkt P5 ($p < 0.001$). Anteil ko-gefärbter Zellen an allen Olig2+ Zellen war zu den Zeitpunkten P3 ($p = 0.0442$) und P5 ($p = 0.0009$) signifikant reduziert. (P3 $n = 5$; P5 $n = 8$). **D**, **E:** Zellzahlen von Olig2 und BrdU ko-gefärbten Zellen mit signifikanter Reduktion der proliferierenden Olig2 positiven Oligodendroglia zu den Zeitpunkten P5 ($p = 0.0286$) und P10 ($p = 0.0317$) (P5 $n = 5$, P10 $n = 4-5$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

3.1.2 Reifung der Oligodendroglia des Kleinhirns verzögert

Mittels einer Ko-Färbung des Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktors 1 (Olig1) und dem Marker für myelinbildende und prä-myelinbildende Oligodendrozyten, CC1, wurde der Anteil gereifter Oligodendrozyten an allen oligodendrozytären Zellen bestimmt. Während in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt P10 die große Mehrheit der Olig1 positiven Zellen den Reifemarker CC1 exprimierten, war dies in der Gruppe der Mäuse, die IL-1 β ausgesetzt waren nur etwa die Hälfte (PBS: 82.46 ± 2.14 % vs. IL-1 β : 56.67 ± 3.86 %; $p=0.0007$; $n=5$; Abb. 10A, 10B). Diese Beobachtung war statistisch hoch signifikant. In absoluten Zahlen ausgedrückt, exprimierten nur halb so viele Zellen den Reifemarker CC1 in inflammationsgeschädigten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS: 41.00 ± 3.91 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 25.50 ± 3.26 Zellen / Areal; $p=0.0033$; $n=5$; Abb. 10A, 10B). Es wurde ein Verlust oligodendroglialer Reifung und Differenzierung als Reaktion auf perinatale Inflammation geschlussfolgert.

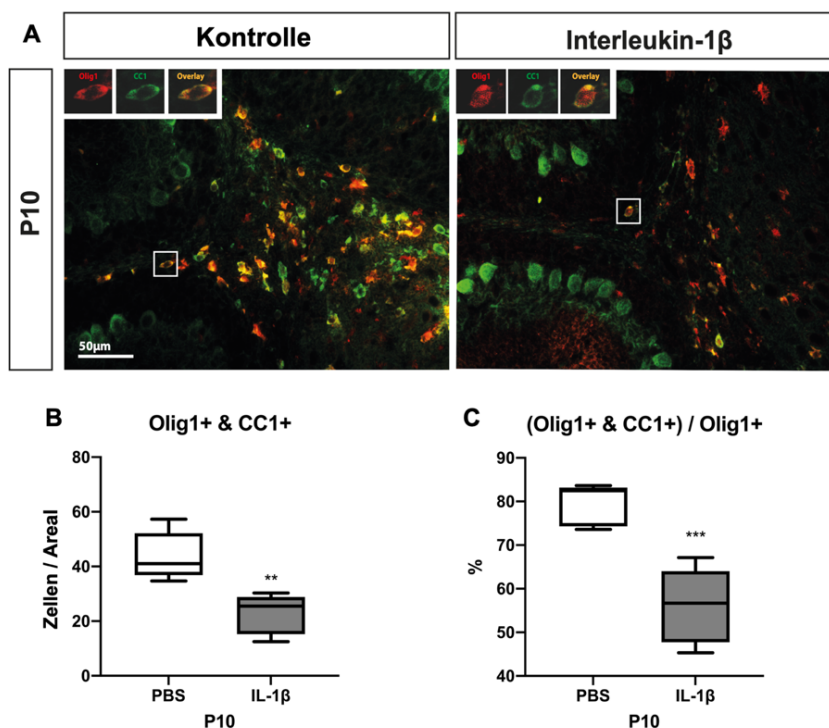


Abbildung 10: Reifung von Oligodendroglia

A: Immunhistochemische Färbungen von Olig1 (rot) und CC1 (grün). Einige kortikale Zellen exprimieren CC1, für die Auswertung wurden nur ko-gefärbte Zellen berücksichtigt. **B:** Signifikant ($p=0.0033$) verminderte Expression von Zellen, die sowohl CC1 als auch Olig1 exprimieren in der Versuchsgruppe. **C:** Hochsignifikant ($p=0.007$) verminderter Anteil von Olig1+ Zellen, die den Reifungsmarker CC1 exprimieren. (P10 $n=4-5$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

3.1.3 Kein vermehrter Zelltod von Oligodendroglia nach Inflammation

Auf der Suche nach apoptotischen Oligodendroglia durch vermehrte Entzündung wurden nur sehr geringe Anzahlen in Kontrolltieren als auch behandelten Mäusen (mittels dem Apoptosemarker Caspase 3, ko-gefärbt mit Olig2; siehe Abbildung 11) detektiert. Zum Zeitpunkt P5 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Da es sich insgesamt aber um sehr wenige Zellen handelt (P3 PBS: 0.30 ± 0.20 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 0.00 ± 0.07 Zellen / Areal; $p=0.4444$; $n=5$ | P5 PBS: 0.70 ± 0.21 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 0.00 ± 0.00 Zellen / Areal; $p=0.0286$; $n=4$ | P10 PBS: 0.00 ± 0.06 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 0.00 ± 0.10 Zellen / Areal; $p=0.9999$; $n=5$ | Abb. 11A, 11B) und sie nur einen Bruchteil der Olig2+ Oligodendroglia ausmachen (P3 PBS: 0.28 ± 0.27 % vs. IL-1 β : 0.00 ± 0.11 %; $p=0.3651$; $n=5$ | P5 PBS: 0.70 ± 0.19 % vs. IL-1 β : 0.00 ± 0.05 %; $p=0.0286$; $n=4$ | P10 PBS: 0.00 ± 0.03 % vs. IL-1 β : 0.00 ± 0.06 %; $p=0.9999$; $n=5$ | Abb. 11A, 11C) ist von keiner biologischen Relevanz auszugehen. Es bleibt die zentrale Aussage festzuhalten, dass die Behandlung mit IL-1 β zu keinem relevanten apoptotischen Zelltod führt.

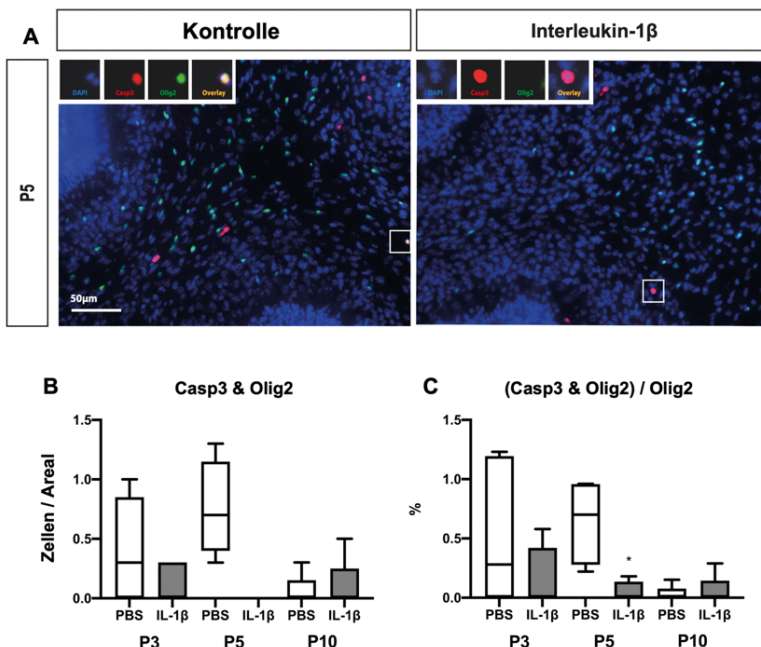


Abbildung 11: Zelltod von Oligodendroglia

A: Immunhistochemische Färbung von Olig2 (grün) und Casp3 (rot) zum exemplarischen Zeitpunkt P5. **B:** Nur wenige ko-gefärbte Zellen konnten insgesamt detektiert werden. **C:** Eine Reduktion der Casp3 und Olig2 ko-gefärbten Zellen konnte bei P5 in der Versuchsgruppe festgestellt werden. (* $P<0.05$, P3 $n=5$, P5 $n=4$, P10 $n=5$)

3.2 Myelinisierungsdefizite nach systemischer perinataler Inflammation

Die Hauptfunktion reifer Oligodendrozyten besteht in der Myelinisierung von Axonen durch die Bildung von mehrlagigen konzentrischen Myelinscheiden⁷⁵. Hierdurch wird eine schnelle, saltatorische Weiterleitung von Aktionspotenzialen entlang der Axone gewährleistet.

Um herauszufinden, ob auch die Funktion der weniger proliferierenden und verzögert reifenden Oligodendrozyten gestört ist, wurden die Mengen der produzierten Myelinproteine mittels Western-Blotting untersucht und die Struktur mittels immunhistochemischer Färbungen beurteilt.

3.2.1 Proteine der weißen Substanz transient reduziert mit sichtbaren Strukturdefiziten

Mittels immunhistochemischer Färbungen und Western-Blotting wurden Myelinproteine zu den Zeitpunkten P10 und P60 untersucht. Zum Zeitpunkt P10 wurde eine signifikant reduzierte Menge des Proteins MAG in den IL-1 β exponierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Zum Zeitpunkt P60 schien sich die Proteinsynthese dieses Myelinbestandteils erholt zu haben und entsprach dem Niveau von Kontrolltieren (P10 PBS: 1.00 ± 0.10 vs. IL-1 β : 0.47 ± 0.08 ; $p=0.0065$; $n=5$ | P60 PBS: 0.88 ± 0.12 vs. IL-1 β : 1.05 ± 0.03 ; $p=0.6635$; $n=5$ | Abb. 12B, 12C). Dennoch wurde in den immunhistochemischen Färbungen eine Veränderung der Gewebsintegrität gesehen, möglicherweise bedingt durch den insgesamt veränderten zeitlichen Ablauf der MAG-Synthese nach dem inflammatorischen Stimulus, die nicht der gleichen Qualität entspricht wie nach physiologischem Ablauf (Abb. 12A).

Die Myelinkomponenten MOG und PLP zeigten sich im Western-Blotting nicht beeinträchtigt (Daten nicht dargestellt).

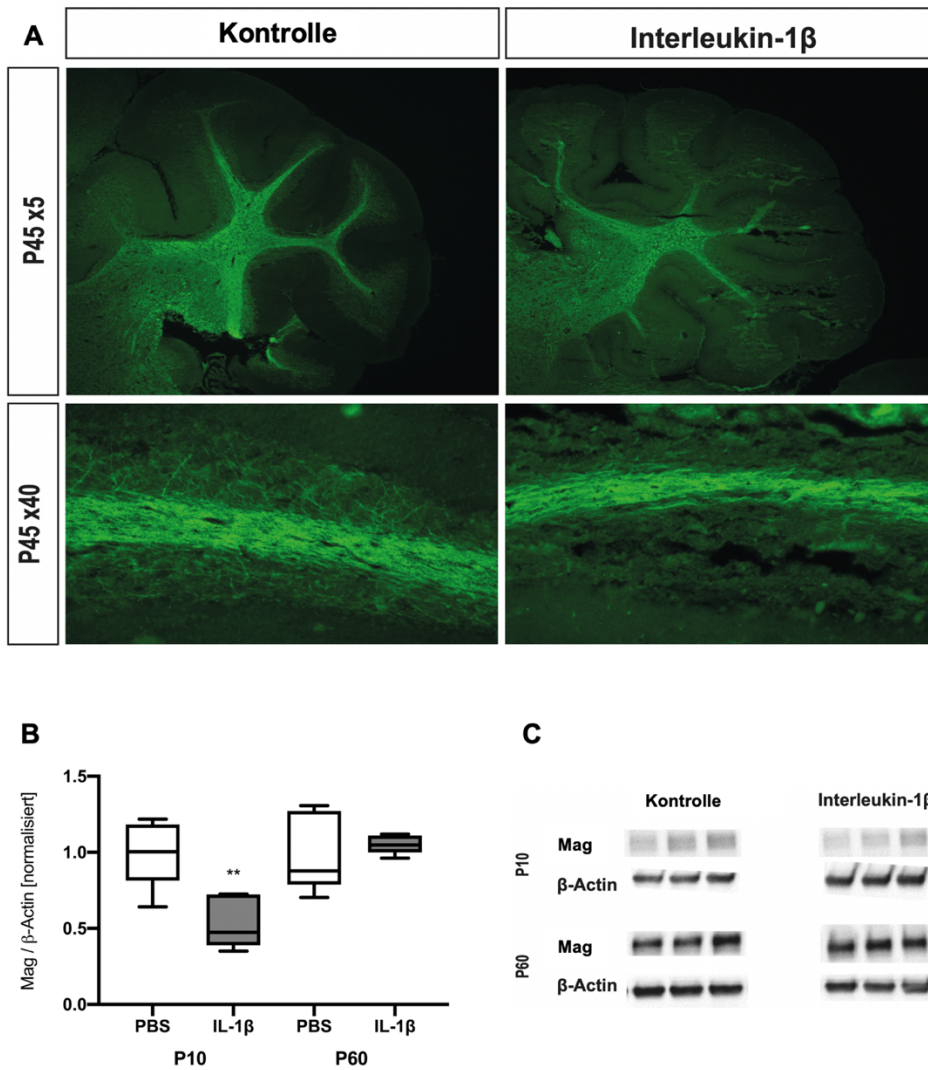


Abbildung 12: Myelinisierung nach systemischer Inflammation

A: Repräsentatives Bild der immunhistochemischen Färbung des Myelin-assoziierten Glykoproteines (MAG). Sichtbare Strukturveränderungen, das Gewebe scheint fragiler nach perinataler Inflammation. **B, C:** Western-Blot von MAG. **B:** MAG/ β -Actin normalisiert auf Kontrolllevel, signifikante ($p=0.0065$) Reduktion von MAG um etwa 50 % in IL-1 β -behandelten Mäusen bei P10 mit Erholung zum Zeitpunkt P60 ($n=6$). **C:** Repräsentative Western-Blot Proteinbanden der Kontroll- sowie Interventionsgruppe. (** $p<0.01$)

3.2.2 Genexpression der Myelinisierungsmarker unverändert

Mittels Polymerasekettenreaktion wurde die Genexpression von *Olig2* und *Cnp* als Marker der myelinisierenden Zellen und spezifischen Myelinbestandteil zu den Zeitpunkten P5 und P10 untersucht. Es ließen sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellen. Sowohl bei *Olig2* zu den Zeitpunkten P5 (PBS: 94.67 ± 13.45 % vs. IL-1 β : 100.90 ± 5.92 %; $p=0.9222$; $n=5-6$; Abb. 13A) und P10 (PBS: 86.52 ± 16.75 % vs. IL-1 β : 91.92 ± 9.17 %; $p=0.9164$ $n=4-5$; Abb. 13A) als auch bei *Cnp* zu den Zeitpunkten P5 (PBS: 100.00 ± 12.53 % vs. IL-1 β : 81.79 ± 21.51 %; $p=0.9895$; $n=6$; Abb. 13B) und P10 (PBS: 107.10 ± 11.29 % vs. IL-1 β : 132.90 ± 18.62 %; $p=0.3871$; $n=4-5$; Abb. 13B) waren jeweils ähnliche Mengen der RNA vorhanden. Abbildung 13 veranschaulicht die Versuchsergebnisse.

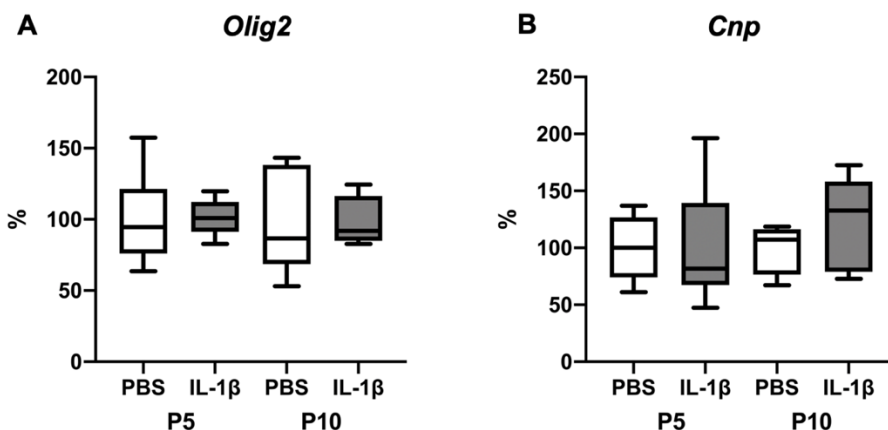


Abbildung 13: Genexpression von Myelinisierungsmarkern

Darstellung in Prozent des Haushaltsgens *Hprt* (siehe Kapitel 2.2.6). **A:** PCR Quantifizierung des Genproduktes von *Olig2*. Keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (P5 $p=0.9222$; P10 $p=0.9164$). **B:** PCR Quantifizierung des Genproduktes von *Cnp*, hier ebenfalls kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (P5 $p=0.9895$, P10 $p=0.3871$). (P5 $n=5-6$; P10 $n=4-5$)

3.3 Mikrogläre Veränderungen

3.3.1 Persistierende mikrogläre Antwort im unreifen Kleinhirn

Auf der Suche nach möglichen Ursachen für die Veränderungen in Proliferation und Reifung von Oligodendroglia wurden Mikroglia untersucht. Mikroglia produzieren Faktoren, die essenziell sind für das Überleben, Ausdifferenzieren und die Proliferation von Oligodendroglia⁹⁸. Verschiedene inflammatorische Antworten und Subtypen von Mikroglia beeinflussen diese Zellen weiterhin⁹⁹.

Es wurden Iba1+ Mikroglia während der Applikation des inflammatorischen Stimulus (P3, P5) als auch danach zum Zeitpunkt P10, im jugendlichen Alter von P45 und Erwachsenenalter von P150 untersucht. In den Kontrolltieren nahm die Dichte von Mikroglia bis zum 10. Lebenstag langsam zu und anschließend stetig ab bis zum Erwachsenenalter. In IL-1 β exponierten Mäusen waren die absoluten Zellzahlen von Mikroglia zu den Zeitpunkten P3, P5 und P45 signifikant höher (P3 PBS: 13.67 ± 3.19 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 20.00 ± 2.46 Zellen / Areal; $p=0.1667$; $n=5$ | P5 PBS: 18.00 ± 1.61 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 27.50 ± 1.88 Zellen / Areal; $p=0.0159$; $n=4-5$ | P10 PBS: 34.00 ± 3.41 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 37.50 ± 2.37 Zellen / Areal; $p=0.0952$; $n=4-5$ | P45 PBS: 14.00 ± 0.95 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 24.00 ± 2.35 Zellen / Areal; $p=0.0048$; $n=5$ | Abb. 14A, 14B). Erst im späten Erwachsenenalter von 150 Lebenstagen normalisierten sich die Zellzahlen wieder auf ein niedriges Niveau in beiden Versuchsgruppen (PBS: 7.00 ± 1.02 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 9.10 ± 1.31 Zellen / Areal; $p=0.4566$; $n=6$ | Abb. 14A, 14B).

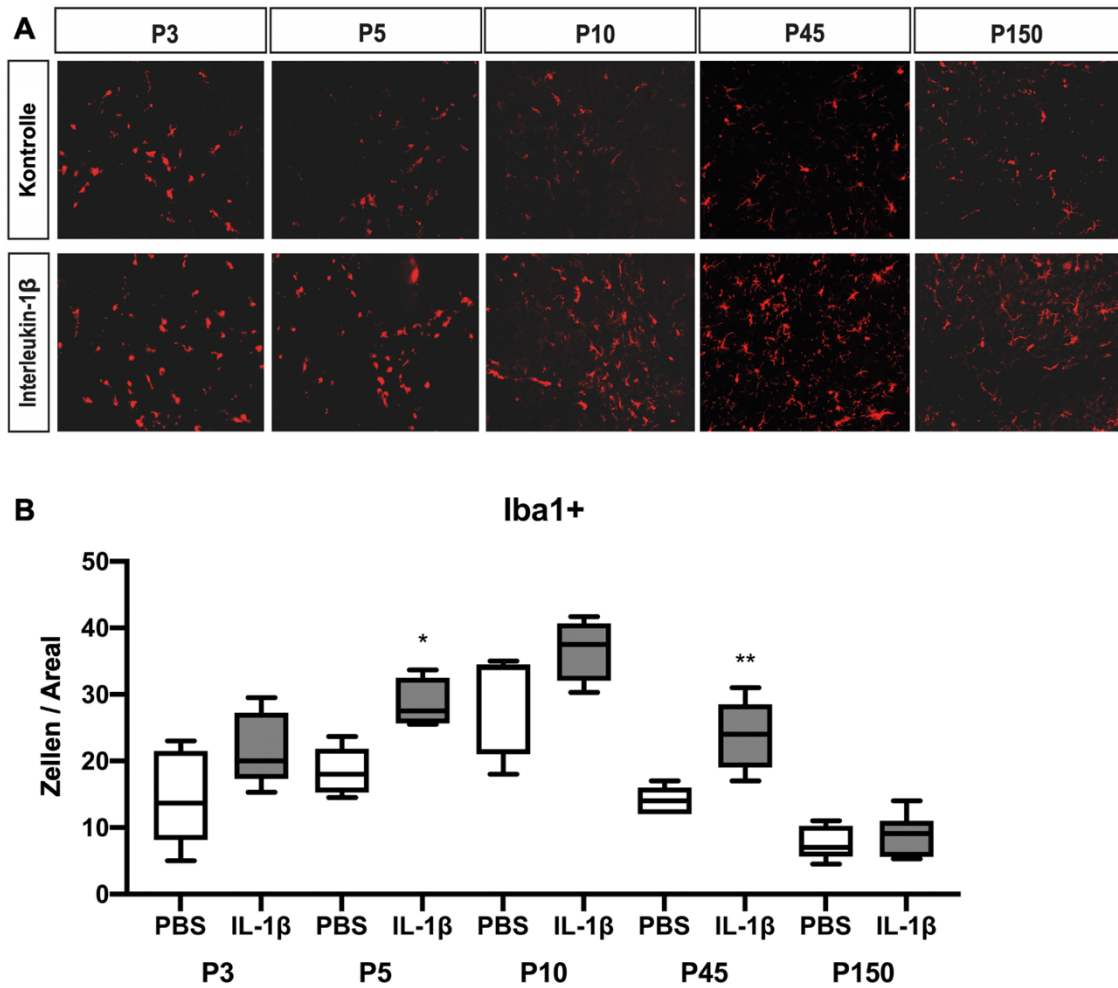


Abbildung 14: Anzahl von Mikroglia

Immunhistochemische Färbung des Mikroglia-Markers Iba1 in rot. **A:** repräsentative Fotos der Färbungen von Iba1 zu den Zeitpunkten P3, P5, P10, P45 und P150 in Kontroll- und Versuchstieren mit persistierender Mikrogliaose zu allen Zeitpunkten. **B:** Zellzählungen der Iba1+ Zellen. Signifikante Reduktionen der Mikrogliazahlen zu den Zeitpunkten P5 ($p=0.0159$) und P45 ($p=0.0048$). (* $p<0.05$, ** $p<0.01$; P3 $n=5$, P5 $n=4-5$, P10 $n=4-5$, P45 $n=5$, P150 $n=6$)

Da inflammatorische Reaktionen von Mikroglia charakteristischerweise mit erhöhter Zellteilungsrate einhergehen, wurde die Anzahl proliferierender Mikroglia mittels immunhistochemischer Färbungen von Iba1 gemeinsam mit BrdU in entsprechend vorbehandelten Mäusen bestimmt. In den mit IL-1 β stimulierten Tieren wurde eine signifikante Zunahme der absoluten Zahlen proliferierender Mikroglia zu den Zeitpunkten P5, am Ende der Behandlungsphase (PBS: 7.70 ± 1.01 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 13.25 ± 2.21 Zellen / Areal; $p=0.0317$; $n=4-5$ | Abb. 15A, 15B), und P10, nach fünf Tagen Erholungszeit (PBS: 16.00 ± 1.89 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 23.35 ± 2.06 Zellen / Areal; $p=0.0159$; $n=4-5$ | Abb. 15A, 15B) mit Normalisierung zum Zeitpunkt P150 beobachtet (PBS:

1.85 \pm 0.90 Zellen / Areal vs. IL-1 β : 1.85 \pm 0.52 Zellen / Areal; $p=0.9125$; $n=6$ | Abb. 15A, 15B). Als Prozentsatz aller gezählten Mikroglia war in der Interventionsgruppe ebenso ein höherer Anteil proliferierender Mikroglia zu den Zeitpunkten P5 und P10 zu sehen, allerdings ohne statistische Signifikanz (P5 PBS: 39.19 \pm 2.77 % vs. IL-1 β : 47.97 \pm 5.18 %; $p=0.2857$; $n=4-5$ | P10 PBS: 47.82 \pm 0.30 % vs. IL-1 β : 59.75 \pm 0.44 %; $p=0.0571$; $n=3-4$ | P150 PBS: 26.00 \pm 10.87 % vs. IL-1 β : 24.33 \pm 4.53 %; $p=0.7726$; $n=6$ | Abb. 15A, 15C).

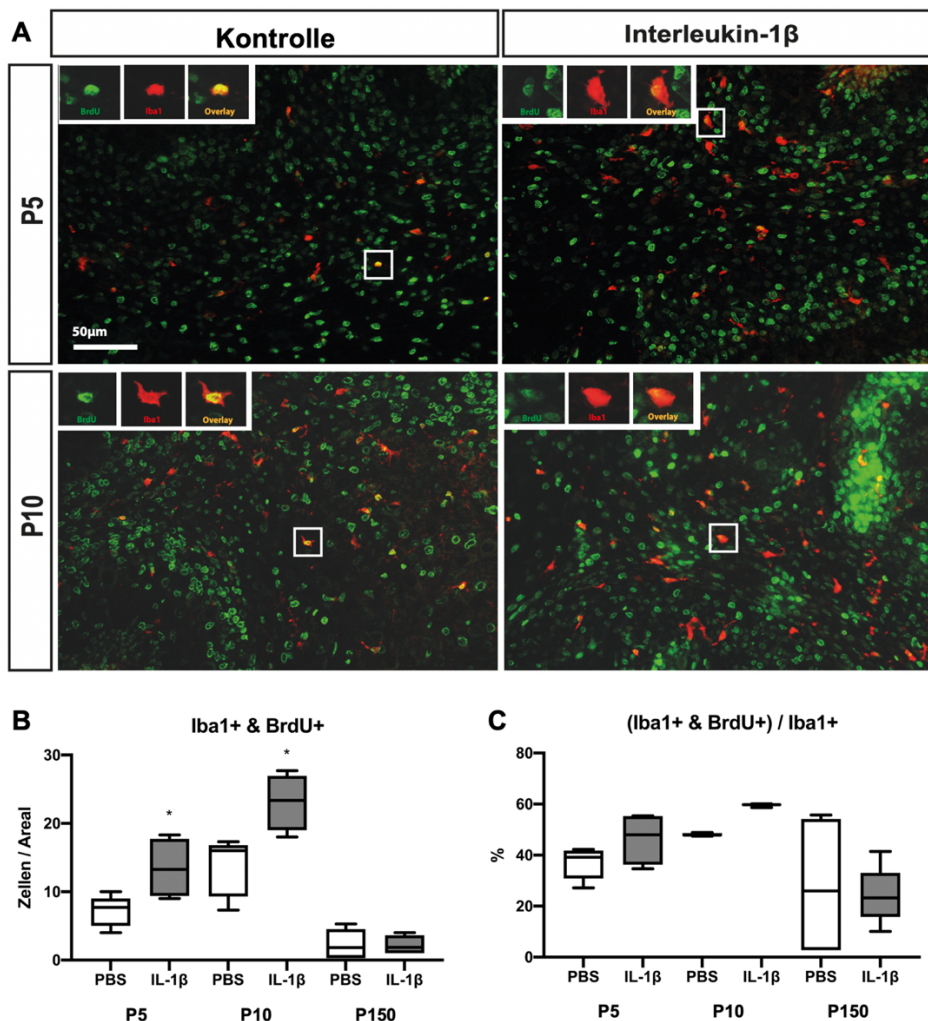


Abbildung 15: Proliferation von Mikroglia

Immunhistochemische Färbung von Iba1 und BrdU für Proliferationsanalysen von Mikroglia. **A:** repräsentative Fotos der Färbungen zu den Zeitpunkten P5 und P10. Iba1 in rot, BrdU in grün. **B:** Zellzahlen Iba1+ und BrdU+ Zellen, signifikant mehr proliferierende Mikroglia zu den Zeitpunkten P5 ($p=0.0317$) und P10 ($p=0.0159$). Normalisierung bei P150. **C:** Anteil der proliferierenden Mikroglia an der Mikrogliagesamtzahl. (* $p<0.05$; P5 $n=4-5$, P10 $n=4-5$, p150 $n=6$)

3.3.2 Keine Einwanderung von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke

Periphere, im Thymus gebildete Immunzellen, wie T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen, tragen auf ihrer Oberfläche den Marker CD3. Dies unterscheidet sie von im Gehirn gebildeten Mikroglia. Wenn also untersucht werden soll, ob periphere Immunzellen im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion über eine potenziell gestörte Blut-Hirn-Schranke ihren Weg ins Gehirn finden und dort fälschlicherweise für Mikroglia gehalten werden, lohnt sich eine Färbung des Oberflächenmarkers CD3. Zu den Zeitpunkten P3, P5 und P10 fanden sich im gesamten Zerebellum nur eine bis zwei CD3+ Zellen (siehe Abb. 16), unabhängig von der Versuchsgruppe. Es scheint also weder zu einer relevanten Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke noch einer vermehrten Einwanderung peripherer Lymphozyten im Rahmen der systemischen Inflammation gekommen zu sein.

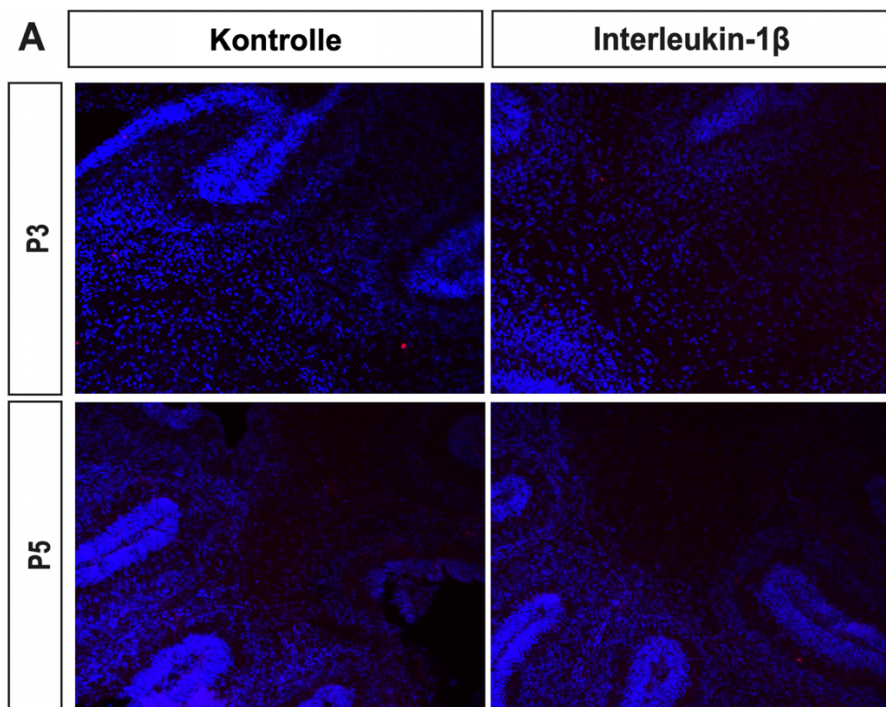


Abbildung 16: CD3+ Immunzellen im Kleinhirn

Immunhistochemische Färbung von CD3 in rot, zur besseren Veranschaulichung mit DAPI als Zellkernfärbung in blau, zu den exemplarischen Zeitpunkten P3 und P5. Es ist nur eine bis zwei CD3+ Zellen pro Kleinhirn zu sehen.

3.3.3 Morphologie: mehr aktivierte Mikroglia nach Inflammation

Mikroglia werden grob in drei verschiedene morphologische Subtypen eingeteilt mit entsprechenden Funktionen: amöboid, verzweigt und einen Übergangstyp. Eine amöboide Form tritt zu zwei völlig verschiedenen Zeitpunkten in Erscheinung – im Frühstadium der Kleinhirndifferenzierung bei hoher Proliferationsrate den Hirnaufbau unterstützend, und während pro-inflammatorischen Immunantworten (auch hier typischerweise stark proliferierend)^{100,101}. Sie sind charakterisiert durch einen runden Zellkörper mit nur kleinen Pseudopodien (Abb. 17C). Ihre Hauptfunktionen im sich entwickelnden Hirn sind Gewebsdifferenzierung, Steuerung der Migration anderer Zellen und Axonwachstum^{102–104}. Zu den Zeitpunkten P3 und P5 waren in der Kontrollgruppe 74.55 % beziehungsweise 95.40 % der Iba1+ Zellen von amöboider Form. In der Gruppe der IL-1 β exponierten Mäuse waren jedoch schon zum Zeitpunkt P3 95.97 % der Iba1+ Mikroglia vom amöboiden Typ (P3 PBS: 71.32 \pm 5.33 % vs. IL-1 β : 95.97 \pm 1.90 %; p=0.0058; n=5 | P5 PBS: 95.40 \pm 1.50 % vs. IL-1 β : 93.33 \pm 1.91 %; p=0.7143; n=3-4 | Abb. 17A).

Die verzweigte Form von Mikroglia – ruhende Immunzellen des Gehirns – ist typischerweise im unverletzten Hirn des Erwachsenen zu finden und ist charakterisiert durch ein kleines, rundes Soma mit vielzähligen, verzweigten Fortsätzen (Abb. 17D). Diese Zellen eliminieren Metabolite und toxische Substanzen¹⁰⁵. Einzelne Studien gehen von einer stammzellartigen Funktion aus, mit der Fähigkeit, sich in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren¹⁰⁶. In der Kontrollgruppe war ein Fünftel (21.14 %) der Mikroglia zum Zeitpunkt P3 verzweigt, während dies in den IL-1 β exponierten Tieren nur etwa ein Fünfundzwanzigstel (4.03 %) der Zellen waren (P3 PBS: 21.14 \pm 5.28 % vs. IL-1 β : 4.03 \pm 1.08 %; p=0.0058; n=4-5 | P5 PBS: 4.60 \pm 1.50 % vs. IL-1 β : 6.68 \pm 1.91 %; p=0.7143; n=3-4 | Abb. 17B).

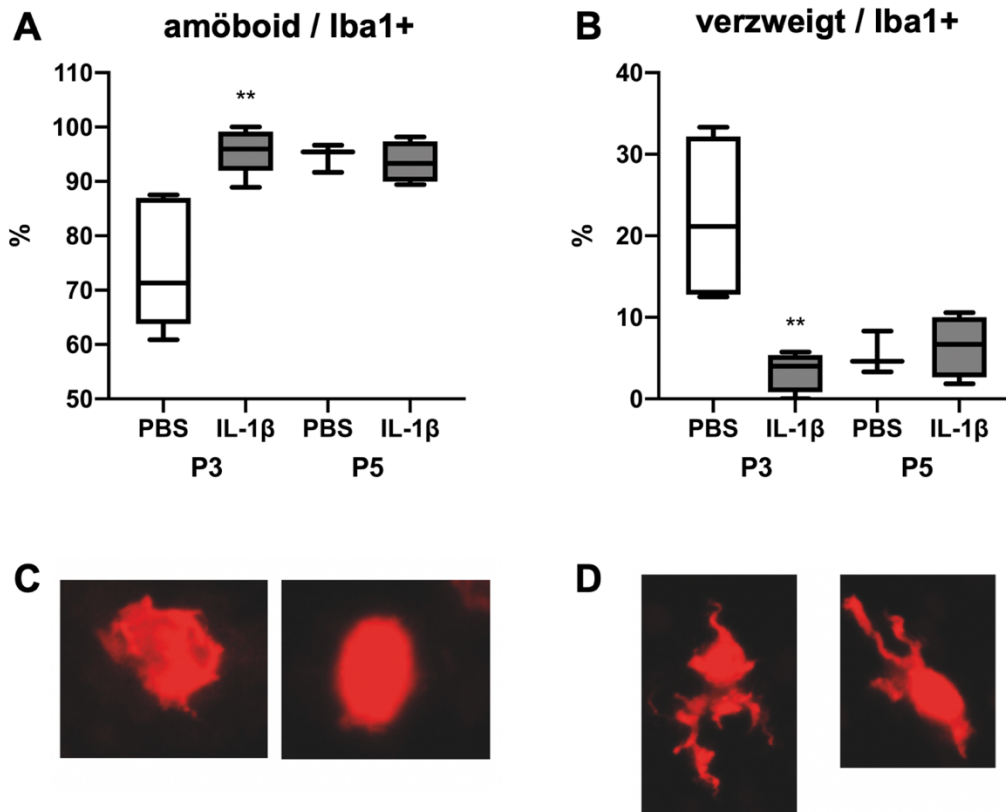


Abbildung 17: Morphologie von Mikroglia

A, B: Anteil amöboider und verzweigter Mikroglia in Prozent aller Iba1+ Mikroglia. Hochsignifikant ($p=0.0058$) mehr amöboide und hochsignifikant ($p=0.0058$) weniger verzweigte Mikroglia nach Stimulation mit IL-1 β zum Zeitpunkt P3. Amöboide Formen (**C**) sind assoziiert mit einem unreifen oder reaktiven Typ, während verzweigte Formen (**D**) mit reifen und ruhenden Mikroglia assoziiert sind. (** $p<0.01$; P3 $n=4-5$, P5 $n=3-4$).

3.3.4 Genexpressionsunterschiede inflammatorischer Marker

Die Reaktivität von Mikroglia kann außerdem anhand ihrer Expression von zellulären und inflammatorischen Markern wie z.B. *Mhc-II*^{107,108}, *Cd40*, *B7*, *Inos* und *Icam-1*¹⁰⁹ charakterisiert werden. Zum Zeitpunkt P5 konnten wir eine höhere Expression der Genprodukte von *Mhc-II* (PBS: 94.10 \pm 24.46 % vs. IL-1 β : 164.90 \pm 20.70 %; p=0.1255; n=6), *Inos* (PBS: 88.05 \pm 21.06 % vs. IL-1 β : 160.20 \pm 32.77 %; p=0.1769; n=6) und *Igf1* (PBS: 92.79 \pm 19.53 % vs. IL-1 β : 99.47 \pm 19.70 %; p=0.9148; n=6) in der inflammations-exponierten Gruppe feststellen. Nach fünf Tagen Erholung – zum Zeitpunkt P10 – zeigte sich deren Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert (*Mhc-II* PBS: 97.59 \pm 27.50 % vs. IL-1 β : 52.14 \pm 11.46 %; p=0.1468; n=5 | *Inos* PBS: 91.35 \pm 28.79 % vs. IL-1 β : 55.62 \pm 4.50 %; p=0.1508; n=5 | *Igf1* PBS: 96.12 \pm 22.93 % vs. IL-1 β : 61.97 \pm 7.12 %; p=0.2681; n=5 | Abb. 18A, 18B). Zu diesem Zeitpunkt war auch die Expression der Gene für anti-oxidative Enzymsysteme wie *Sod2* und *Gclc* reduziert im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Sod2* P5 PBS: 97.16 \pm 16.68 % vs. IL-1 β : 98.42 \pm 24.07 %; p=0.8873; n=6 | *Sod2* P10 PBS: 98.48 \pm 20.59 % vs. IL-1 β : 55.88 \pm 6.00 %; p=0.0690; n=5 | *Gclc* P5 PBS: 86.35 \pm 18.52 % vs. IL-1 β : 110.00 \pm 25.31 %; p=0.4890; n=6 | *Gclc* P10 PBS: 98.06 \pm 20.74 % vs. IL-1 β : 45.67 \pm 3.94 %; p=0.0303; n=5 | Abb. 18D, 18E).

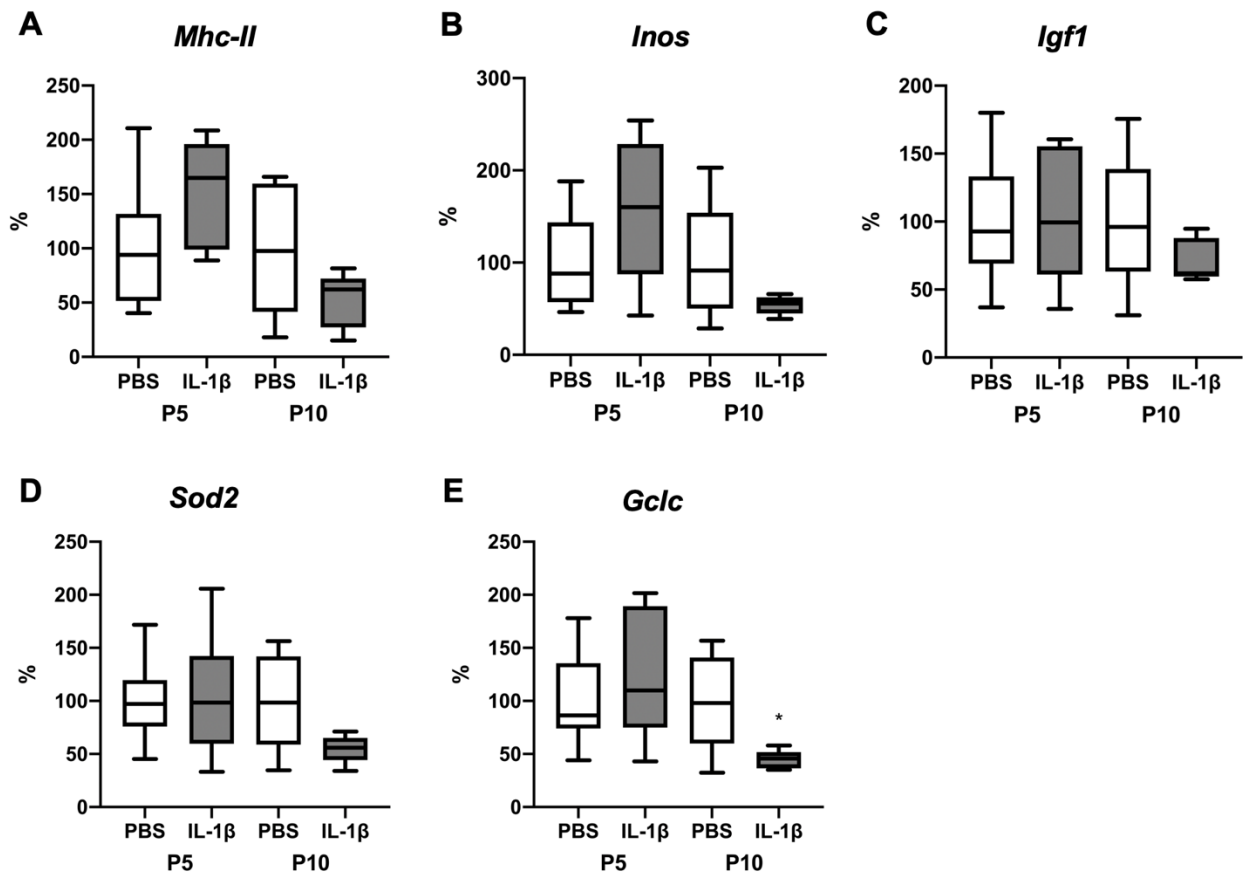


Abbildung 18: Genexpression von Mikroglia

A-C: qPCR-Quantifizierung der mikroglialen Aktivierungsmarker *Mhc-II*, *Inos* und *Igf1*. Sichtbare Zunahme der Expression in den Versuchstieren während des inflammatorischen Stimulus (P5) mit Abnahme nach Stimulation (P10). **D, E:** qPCR-Quantifizierung der anti-oxidativen Enzymsysteme. Sichtbare Abnahme der Expression von *Sod2* bei P10 in der Versuchsgruppe und signifikante ($p=0.0303$) Reduktion von *Gclc* bei P10 in der Versuchsgruppe nach dem inflammatorischen Stimulus (* $p<0.05$; P5 $n=6$, P10 $n=5$).

3.4 Astrozytäre Reaktivität nach Applikation inflammatorischer Stimuli

3.4.1 Inflammation bedingt langfristige Reaktivität der Bergmann-Glia

Astroglia-Mikroglia-Interaktion ist essenziell für die Hirnentwicklung und ihre Pathologien. Im Kleinhirn sind Bergmann-Glia der vorherrschende Astroglia-Typ, typischerweise direkt an der Purkinjezellschicht lokalisiert. Dort sind sie wichtig für die fetale und postnatale Kleinhirnentwicklung, für das Dendritenwachstum und die Transmitterhomöostase in Purkinjezellen¹¹⁰. Reaktivität von Bergmann-Glia kann – unter anderem – über die Hochregulation von Markern wie dem glialen fibrillären sauren Protein (GFAP) und Glutaminsynthase (GS) beurteilt werden.

In diesem experimentellen Setting wurden nur geringe Effekte der systemischen Inflammation auf die Bergmann-Glia-Reaktivität zu den frühen Zeitpunkten P3, P5 und P10 beobachtet. Nur zum Zeitpunkt P5 konnte eine Zunahme der Färbeintensität von GS festgestellt werden (GS P3 PBS: 16.56 ± 0.41 vs. IL-1 β : 17.25 ± 1.62 ; $p=0.5808$; $n=4-5$ | P5 PBS: 18.58 ± 1.73 vs. IL-1 β : 25.98 ± 2.11 ; $p=0.0405$; $n=5$ | P10 PBS: 24.01 ± 4.46 vs. IL-1 β : 27.33 ± 0.79 ; $p=0.3950$; $n=5$ | P45 PBS: 14.35 ± 2.19 vs. IL-1 β : 31.60 ± 1.43 ; $p=0.0002$; $n=5$ | P150 PBS: 25.07 ± 1.62 vs. IL-1 β : 26.30 ± 1.34 ; $p=0.9704$; $n=5$ | Abbildung 19A, 19B). Im juvenilen Alter von P45 konnte allerdings eine signifikant erhöhte Färbeintensität von GS und GFAP (GFAP P3 PBS: 9.71 ± 1.00 vs. IL-1 β : 9.55 ± 0.79 ; $p=0.8358$; $n=5$ | P5 PBS: 19.69 ± 2.37 vs. IL-1 β : 19.36 ± 0.94 ; $p=0.5237$; $n=4-5$ | P10 PBS: 14.82 ± 2.24 vs. IL-1 β : 19.81 ± 1.12 ; $p=0.0884$; $n=5$ | P45 PBS: 10.33 ± 2.49 vs. IL-1 β : 32.64 ± 3.62 ; $p=0.0024$; $n=5$ | P150 PBS: 13.57 ± 1.03 vs. IL-1 β : 12.08 ± 0.91 ; $p=0.2465$; $n=5$ | Abbildung 19C, 19D) in den IL-1 β -exponierten Mäusen gesehen werden. Es ist also davon auszugehen, dass die verstärkte Bergmann-Glia-Aktivität erst zu einem späteren Zeitpunkt im Leben auftritt. Zum späten Erwachsenenalter von P150 konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mehr festgestellt werden.

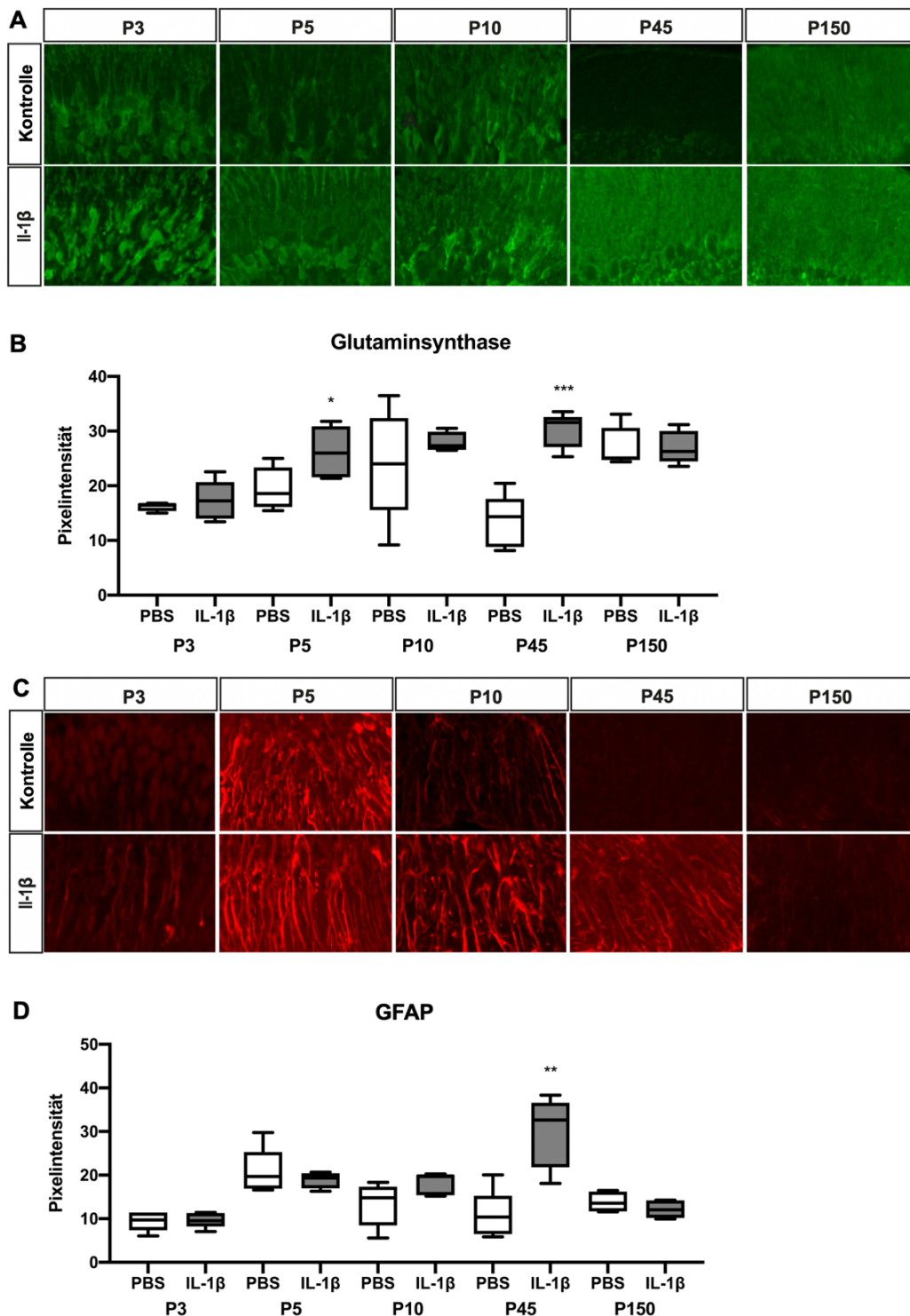


Abbildung 19: Reaktivität der Bergmann-Glia

A-D: Immunhistochemische Färbung der Glutaminsynthase (GS) in grün sowie des gliären fibrillären sauren Proteines (GFAP) in rot. **A:** Kortexausschnitte der GS-Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten aus beiden Gruppen. **B:** Signifikant verstärkte Pixelintensität von GS zu den Zeitpunkten P5 ($p=0.0405$) und P45 ($p=0.0002$) in der Interventionsgruppe. **C:** Kortexausschnitte der GFAP-Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten aus beiden Gruppen. **D:** Hochsignifikant ($p=0.0024$) verstärkte Pixelintensität von GFAP in der Versuchsgruppe zu P45. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; P3 $n=4-5$, P5 $n=5$, P10 $n=5$, P45 $n=5$, P150 $n=5$)

4 Diskussion

4.1 Kleinhirnschädigung nach perinataler subklinischer Inflammation

Frühgeburt und damit einhergehende Hirnschädigungen sind ein relevantes und weltweites Problem in der Kinder- und Jugendmedizin. Das Kleinhirn als sich perinatal rapide entwickelndes Organ ist besonders vulnerabel für äußere Störfaktoren.

In der vorliegenden Studie zeigen sich als Folge einer frühen Exposition gegenüber IL-1 β , als perinataler pro-inflammatorischer Stimulus, eine verminderte Proliferation und Reifung von Oligodendroglia, Myelinisierungsstörungen sowie langfristige mikrogliäre Inflammation im Kleinhirn.

4.2 Die neugeborene Maus als Modell für Frühgeburt

In dieser Arbeit wurde die neugeborene Maus als Tiermodell zur Simulation menschlicher Frühgeburt verwendet. Die Maus als kleines Versuchstier mit verhältnismäßig einfachen Haltungsbedingungen und schnellen Reproduktionszyklen wird zu Forschungszwecken sehr häufig eingesetzt. Mäuse gebären nach circa dreiwöchiger Schwangerschaft in der Regel 4-15 Nachkommen, die ihrerseits nach etwa 6 Wochen reproduktionsfähig werden. Murine Modelle eignen sich auch für weiterführende Forschungsstrategien sehr gut, da es vielfältige Knock-out-Modelle, beispielsweise zur Untersuchung spezieller Pathways, gibt. Außerdem ist eine Haltung unter sterilen Bedingungen, zur Untersuchung von Mikrobiom oder Infektionen^{111,112}, möglich. Als Alternative kommen andere Kleintiermodelle wie Ratten¹¹³⁻¹¹⁵ oder Kaninchen zur Anwendung.

Um die Umgebung eines Frühgeborenen inklusive maschineller Beatmung, medizinischer Interventionen und Medikamentengaben möglichst vollständig nachzubilden, können Großtiermodelle wie zum Beispiel Lämmer^{116,117} oder Primaten^{118,119} eingesetzt werden. Neben den hohen Kosten, den aufwändigen Haltungsbedingungen und langen Versuchszeiträumen sind hier auch weitere ethische Fragen zu bedenken.

Da in dieser Studie zunächst ein Eindruck gewonnen werden sollte, welche möglichen Kleinhirnschädigungen die systemische Applikation von pro-inflammatorischen Zytokinen bedingen kann, war ein einfaches Tiermodell ausreichend. Außerdem sollte aus Tier-schutzgründen bereits vorhandenes Material verwendet werden, da die Großhirne der untersuchten Mäuse bereits von Favrais et al⁸⁷ untersucht wurden und die Kleinhirne bisher aus einem bestehenden Projekt der Arbeitsgruppe um Pierre Gressens, INSERM Paris, zur Verfügung gestellt werden konnten, ohne dass erneute Tiertötungen dazu erforderlich waren.

Prinzipiell können inflammatorische Kaskaden oder die Wirkung einzelner pro-inflammatorischer Stimuli auch *in vitro* an Zellverbänden in Zellkulturen ohne die Nutzung von Tiermodellen untersucht werden. In diesem Experiment wurden aber eine systemische Zirkulation von inflammatorischen Mediatoren *in vivo* benötigt, um körpereigene Schutzmechanismen, wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke, mit zu berücksichtigen.

Dennoch weist die Maus in ihrer Abwehr von inflammatorischen Stimuli einige nicht zu vernachlässigende Unterschiede zum Menschen auf. Beispielsweise können Mäuse als Reaktion auf oxidativen, inflammatorischen Stress selbst anti-oxidative Ascorbinsäure aus Glucose synthetisieren, während Menschen auf eine diätetische Zufuhr angewiesen sind¹²⁰. Bei Menschen funktioniert der antioxidative Zellschutz vor allem über Purinmetabolismusderivate, wie Urat.

4.3 Oligodendrogläre Proliferations- und Reifungsstörungen

In den zukünftig myelinbildenden Olig2 positiven Oligodendroglia des Kleinhirns scheint die Applikation pro-inflammatorischer Stimuli mit einer Reduktion PCNA+ beziehungsweise BrdU+, proliferierender Oligodendroglia einherzugehen. Dieses Proliferationsdefizit zeigte sich sehr früh, schon am dritten Lebenstag der neugeborenen Mäuse, verstärkte sich nochmals zum fünften Lebenstag hin und blieb auch am zehnten Lebenstag, nach fünf Tagen Erholungszeit vom inflammatorischen Stimulus, bestehen. Interessanterweise

zeigte sich im Großhirn der untersuchten Tiere ein erhöhter Anteil unreifer NG2+ Zellen, leider wurden hier keine Proliferationsdaten erhoben⁸⁷. Olig2 kann prinzipiell auch bereits gereifte Oligodendrozyten anfärben, da diese aber typischerweise nicht mehr proliferieren, kann davon ausgegangen werden, dass nur unreife proliferierende Zellen angefärbt wurden. Olig2 kann darüber hinaus auch von aktivierten Astroglia exprimiert werden^{97,121}, es ist also nicht auszuschließen, dass einzelne proliferierende Astroglia die Zellzählungen leicht verfälschen. Eine Ko-Färbung von Olig2 mit NG2 hätte diese Verwechslung unwahrscheinlicher machen¹²², wenn auch nicht gänzlich ausschließen können^{123–125}. Eine weitere Option, dies auszuschließen, wäre eine Ko-Färbung mit beispielsweise GFAP gewesen, um zu überprüfen, ob sich die fluoreszierenden Zellen am selben Ort darstellen.

Die Zellreifung, gemessen an der Expression des Markers für reife Oligodendroglia CC1¹²⁶, scheint nach Stimulation mit IL-1 β verzögert zu sein. Am zehnten Lebenstag, einem etwa kleinkindähnlichen Stadium der Hirnentwicklung, exprimierten in der Kontrollgruppe knapp 80 % der Olig1+ Zellen CC1, in der Interventionsgruppe waren es etwa die Hälfte. An dieser Stelle wurde Olig1 statt Olig2 wegen der Kompatibilität der Primärantikörper untereinander verwendet. Wie in Abbildung 19 zu sehen, wurden einige kortikale Zellen, in diesem Fall hauptsächlich Purkinjezellen, unselektiv durch den CC1-Antikörper angefärbt. Diese Zellen wurden in den Zählungen nicht berücksichtigt. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Zellen, wie zum Beispiel Astroglia¹²⁷, von CC1 unspezifisch mitangefärbt wurden. Auch in den Großhirnen der untersuchten Tiere gab es Hinweise auf Reifungsstörungen der Oligodendroglia in Form von höherer Zelldichte oligodendroglialer Progenitorzellen in Kombination mit einer reduzierten Zelldichte CC1+ myelinisierender Oligodendroglia⁸⁷.

Um die Reifungsstörung der Oligodendroglia noch weiter zu beschreiben, hätte man zusätzlich zu *Olig2*¹²⁸ und *Cnp* noch weitere Genexpressionsdaten erheben können, beispielsweise mittels der Analyse von *Sox8*¹²⁹, *Sox10*¹³⁰, *Tcf4*¹³¹ oder *Nkx2.2*¹³².

In diesem Modell konnten keine deutlichen Hinweise auf vermehrte Apoptose von Oligodendroglia gefunden werden. Es ist theoretisch möglich, dass die untersuchten Zellen sehr schnell auf die Entzündungsmediatoren reagierten und die Apoptose bereits in den ersten beiden Lebenstagen stattfand und somit in einem nicht untersuchten Zeitfenster. Alternativ zur immunhistochemischen Färbung mit Casp3 hätte man mittels der TUNEL-Methode die Zellkerne apoptotischer Zellen darstellen können. Dennoch weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass Apoptose in Oligodendroglia, wenn überhaupt, keine vorrangige Rolle in der Zellschädigung einnimmt.

4.4 Myelinisierungsdefizite

In Kindern nach zu früher Geburt werden häufig Myelinisierungsdefizite beobachtet, diese können verhältnismäßig einfach mit verschiedenen MRT-Techniken wie *synthetic MRI* (SyMRI) detektiert werden¹³³. Die verspätete Myelinreifung im Vergleich zu reifgeborenen Kindern lässt sich nach Frühgeburt auch noch im Vorschulalter nachweisen und korreliert mit kognitiven Defiziten¹³⁴.

Im Rahmen dieser Studie wurde Myelin in der immunhistochemischen Färbung für Myelinmarker optisch beurteilt, zudem wurden verschiedene Myelin-Proteine mittels Western-Blotting quantifiziert. Im Western Blotting zeigte sich eine signifikant geringere Menge des Myelinproteins MAG zum Zeitpunkt P10. Außerdem wurde versucht, die Strukturdefizite des Myelins zu quantifizieren. Möglichkeiten, dies zu tun, sind beispielsweise Intensitätsmessungen von immunhistochemischen Färbungen von Myelinbestandteilen mittels *ImageJ*.

Im Großhirn der untersuchten Mäuse sind Intensitätsmessungen der immunhistochemischen Färbungen für Myelinmarker gelungen. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Dichte der Myelinproteine MBP, PLP und MAG am 30. Lebenstag der Versuchstiere in der Gruppe, die IL-1 β ausgesetzt war⁸⁷. Auch im Großhirn waren auf den ersten Blick Strukturdefizite des Myelins zu erkennen.

Weitere Optionen für die Quantifizierung von Myelinisierungsdefiziten wären theoretisch eine Elektronenmikroskopie (EM) der Ultrastruktur der Myelinscheiden sowie der Dicke der myelinisierten Axondurchmesser. In den Großhirnen der untersuchten Tiere zeigten sich elektronenmikroskopisch insgesamt geringere Axondurchmesser in der Gruppe der mit IL-1 β behandelten Mäuse mit weniger Axonen von über 0.5 μm Durchmesser und einer erhöhten Zahl von Axonen mit Durchmessern zwischen 0.2 und 0.4 μm ⁸⁷. In den mit IL-1 β behandelten Tieren zeigte sich außerdem eine Reduzierung der per diffusionsgewichteten MRT gemessenen fraktionellen Anisotropie im Großhirn, als Zeichen verminderter Konnektivität – möglicherweise bedingt durch Myelinisierungsstörungen⁸⁷. Eine EM-Analyse in den Kleinhirnen war für den Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht vorgesehen.

4.5 Mikrogliaaktivierung und inflammatorischer Stress

Mikroglia als Immunzellen des Gehirns kommen in Entzündungsprozessen eine Schlüsselrolle zu. Mikrogliaaktivierung – unabhängig von ihrer Ursache – trägt zu neurokognitiven und psychiatrischen Auffälligkeiten im Kindes- und Erwachsenenalter bei^{135–137}.

Üblicherweise findet man Mikroglia im Kleinhirn in geringerer Dichte, verglichen mit dem Großhirn¹³⁸. In diesem Mausmodell wurden allerdings hohe Anzahlen von Iba1+ Mikroglia in den behandelten Tieren, die bis ins Erwachsenenalter persistieren, festgestellt. Die beobachtete erhöhte Proliferationsrate liefert eine gute Erklärung für diese Feststellung, eine vermehrte Einwanderung im Rahmen der Entzündungsreaktionen wäre potenziell ebenfalls möglich, erschien aber wenig wahrscheinlich, da sich in der Analyse der CD3-Färbung keine Einwanderung peripherer Immunzellen ins Gehirn darstellen ließ.

Außerdem finden sich in den Tieren nach inflammatorischem Stimulus mehr Mikroglia von amöboider Form. In der Regel verändern sich Mikroglia in ihrem Reifungsprozess bis

zum 10. postnatalen Tag hin zu einer ramifizierten Form¹³⁹. Möglicherweise ist das Überwiegen amöboider Zellen ein Ausdruck der Unreife dieser Mikrogliapopulation oder aber eines höheren Aktivierungsgrades.

In den Genexpressionsdaten zu Mikroglia wurde unter anderem eine geringere Expression anti-oxidativer Enzymsysteme am zehnten Lebenstag in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Es gibt im Wesentlichen zwei verschiedene Erklärungsansätze für diese Beobachtung. Möglicherweise erschöpfen sich die anti-oxidativen Ressourcen der neugeborenen Mäuse nach fünf Tagen der Abwehr von pro-inflammatorischem oxidativen Stress. Andererseits wäre es möglich, dass die Enzymeinheiten in den vorangehenden Tagen massiv synthetisiert wurden und später nicht mehr in höherer Anzahl gebraucht werden.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich nach lang anhaltender Mikrogliaaktivierung die beobachteten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen dann am 150. Lebenstag, also im Erwachsenenalter, auf dem Niveau der Kontrolltiere normalisierten. Im Erwachsenenalter sind erhöhte Anzahlen von aktivierten Mikroglia bei Menschen typischerweise mit auto-inflammatorischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie beispielsweise Multipler Sklerose assoziiert^{140,141}. Bislang konnte nicht beobachtet werden, dass ehemals frühgeborene Menschen ein erhöhtes Risiko für diese Erkrankungen haben, dies passt gut zu den vorliegenden Daten.

Eine Möglichkeit, Mikroglia pharmakologisch zu beeinflussen, bieten Oxytocin-Rezeptor-Agonisten wie Carbetocin, das aktuell vor allem in der Geburtshilfe bei postpartalen Blutungen Einsatz findet. Carbetocin kann nach Interleukin-1 β -Gabe die Aktivierung von Mikroglia abschwächen und einen positiven Einfluss auf Myelinisierung, neuronale Konnektivität und Verhalten ausüben¹⁴².

4.6 Bergmann-Glia

Bergmann-Glia, die Astrozyten des Kleinhirns, zeigten in der vorliegenden Studie zu einem juvenilen Alterszeitpunkt von 45 Lebenstagen eine erhöhte Dichte sowie Reaktivität, beziehungsweise Aktivität, gemessen an den Markern GFAP und GS in den Mäusen, die dem inflammatorischen Stimulus ausgesetzt waren. GFAP ist das Hauptprotein der Intermediärfilamente in differenzierten Astrozyten und eignet sich als Zytoskelettprotein in erster Linie zur Bestimmung der Zelldichte¹⁴³. GS dient in Astroglia dem Abbau des aufgenommenen Glutamats zu Glutamin, das dann wieder abgegeben wird. Die Expressionsmenge der GS wird in erster Linie durch die extrazelluläre Glutamatkonzentration bestimmt¹⁴⁴. In diesem Modell war die Intensität der GS-Färbungen zu den Zeitpunkten P5 (im inflammatorischen Stimulus) und P45 (im juvenilen Alter) signifikant höher in den Versuchstieren, die Interleukin-1 β ausgesetzt waren. Es ist denkbar, dass eine Hochregulation von GS im inflammatorischen Geschehen exzitotoxische Insulte abschwächen oder verhindern könnte.

Purkinjezellen sind in ihrer Entwicklung wesentlich abhängig von Bergmann-Glia-Signalen, sowohl in ihrer Migration als auch in ihrer Ausrichtung und dem Längenwachstum ihrer Dendriten^{145,146}. Bergmann-Glia ummanteln Purkinjezellen regelrecht und koordinieren und organisieren deren Synapsenaufbau mithilfe des L-Glutamat-Aspartat-Transporters¹⁴⁷. Möglicherweise ist eine verspätete Bergmann-Glia-Aktivität Ausdruck eines Umbaus von Synapsen oder weiteren Wachstums von Purkinjezellen in der prolongierten Erholungsphase vom inflammatorischen Stimulus. Möglicherweise verhindern Mikroglia bis zu diesem Zeitpunkt die verstärkte neuronale Plastizität¹⁴⁸.

4.7 Limitationen

Mit dem Mausmodell perinataler, subklinischer Inflammation wird versucht, ein Szenario von körperlichem Stress auf einer neonatologischen Intensivstation nachzuahmen. Interleukine spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse, die Komplexität einer körperlichen Stressreaktion auf Beatmung, Umgebungsgeräusche, schmerzhaftes Prozeduren und Medikamentengaben lässt sich aber mit einem einzelnen pro-inflammatorischen Interleukin nicht nachahmen. Zudem wurde der inflammatorische Stimulus lediglich über die ersten fünf Lebenstage verabreicht, während Frühgeborene diesen Bedingungen oft monatelang ausgesetzt sind.

In unserem experimentellen Tiermodell wurden ausschließlich männliche Versuchstiere untersucht, da diese eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber äußeren Stressoren zeigen. Auch bei menschlichen Frühgeborenen ist das männliche Geschlecht ein unabhängiger Risikofaktor für Morbidität und Mortalität¹⁴⁹, und Jungen zeigen häufiger persistierende neurologische Spätfolgen der zu frühen Geburt^{150,151}. Es ist bereits bekannt, dass die in dieser Studie untersuchten Zellen Geschlechtsdimorphismen aufweisen. Oligodendrozyten beispielsweise sind in männlichen Mäusen dichter angeordnet und Myelinmarker wie MBP und CNP sind in Western-Blots in männlichen Tieren um bis zu 160% erhöht im Vergleich zu weiblichen Tieren¹⁵². Um mögliche Geschlechterunterschiede in der Vulnerabilität des Kleinhirns aufzuzeigen, wäre eine höhere Anzahl von Versuchstieren mit dem Einschluss weiblicher Tiere nötig gewesen.

Die verwendeten Methoden beschränkten sich auf die Analyse von Genexpressionsdaten, Proteinsynthesemengen und die Ausprägung von zellulären Markern mittels Immunhistochemie. Die Untersuchungen erfolgten zu vorher festgelegten Zeitpunkten im Leben der Mäuse, welche lediglich Momentaufnahmen bieten. Mit den beschriebenen Methoden sind dynamische Untersuchungen nicht möglich.

Leider wurden keine eigenen radiologischen Daten zu Wachstum, Volumen und Oberfläche der Kleinhirne erhoben.

Des Weiteren mussten einige Versuchstiere aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden, weil das Gewebe eine mangelhafte Qualität aufwies. Besonders bei den Tieren nach Applikation von Interleukin-1 β gestaltete sich die Verarbeitung der Kleinhirne für die immunhistochemischen Färbungen anspruchsvoll, und in einigen Fällen waren die Schnitte zu durchsetzt mit Bruchlücken, um eine Vergleichbarkeit der Zellzählungen zu gewährleisten. Außerdem erfolgte die Zellzählung lediglich durch eine verblindete Untersucherin, eine zweite unabhängige Auswertung erfolgte nur stichprobenartig.

Es wird davon ausgegangen, dass mit Kleinhirnentwicklungsstörungen kognitive Defizite, Verhaltensstörungen und psycho-emotionale Schwierigkeiten auftreten. Eine relevante Limitation der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass keine Verhaltenstestungen bei den Mäusen durchgeführt wurden. Aus der Arbeit von Favrais et al⁸⁷ ist bekannt, dass die mit Interleukin behandelten Mäuse im *novel object recognition test*¹⁵³ und *object location memory test*¹⁵⁴ signifikant weniger Zeit damit verbringen, unbekannte oder lageveränderte Objekte zu untersuchen. Dies wird als Hinweis auf Aufmerksamkeitsdefizite interpretiert, die nach aktuellen Untersuchungen¹⁵⁵ auch gut zu einer eingeschränkten Kleinhirnfunktion passen. Es fehlen allerdings Testungen zu den klassischen motorischen Defiziten bei Kleinhirnschädigungen.

Die Entwicklung des Kleinhirns läuft bei Maus und Mensch ähnlich ab. In diesem experimentellen Setting wurde die Tatsache genutzt, dass die Maus mit einem unreiferen Kleinhirn als der Mensch auf die Welt kommt und somit keine Frühgeburt bei der trächtigen Maus eingeleitet werden muss. Ex-utero trifft das menschliche Frühgeborene auf zahlreiche unphysiologische Bedingungen von Temperatur, Sauerstoffpartialdrücken und Lärm bis zur verfrühten Aufnahme der Darmtätigkeit und Umstellung des Kreislaufs. All diese Stressoren treten bei der Maus schon physiologisch zu diesem frühen Zeitpunkt der Hirnentwicklung ein, weshalb davon auszugehen ist, dass die Maus besser an diese Bedingungen adaptiert ist. Eventuell werden in diesem Tierversuch also noch schwerere Dysregulationen maskiert.

4.8 Ausblick

Frühgeburt und damit einhergehende neurologische Beeinträchtigungen stellen eine große medizinische Herausforderung dar. Um frühgeborenen Kindern und ihren Familien besser helfen zu können, ist es essenziell, die Schädigungsmechanismen des Frühgeborenengehirns gut zu verstehen.

Wie bereits in den einzelnen Diskussionsabschnitten beschrieben, bergen alle untersuchten Zellreihen noch zahlreiche weitere Analysemöglichkeiten, denen bisher nicht nachgegangen wurde. Des Weiteren wäre es interessant zu verstehen, wie die einzelnen Zellreihen miteinander interagieren und wie die toxischen Signale der Entzündung kommuniziert werden. Hierzu könnte man mittels Genexpressionsdaten Pathways einzeln nachvollziehen. Mittels RNA-Sequenzierung könnte man die einzelnen Zelltypen noch weiter charakterisieren (beispielsweise Mikroglia weiter in ihre funktionellen Gruppen einteilen), um ein tieferes Verständnis für die zellulären Entzündungsmechanismen zu generieren. All diese Daten können zur Entwicklung pharmakologischer neuroprotektiver Strategien verwendet werden.

Um nachvollziehen zu können, ob Mikroglia die Ursache für oligodendrogliale Reifungsstörungen sind, was die Untersuchungen von Mairesse et al¹⁴² nahelegen, könnte man ein Mikroglia-Knock-out Mausmodell generieren. Eine vielversprechende Möglichkeit wäre die selektive Apoptoseinduktion zerebellärer Mikroglia durch intrazerebelläre Injektionen des als MRT-Kontrastmittel bekannten Gadoliniums¹⁵⁶.

Frühgeborene Kinder mit neurologischen Entwicklungsstörungen werden in Deutschland an sozialpädiatrische Zentren langfristig angebunden und die neurologische und psychomotorische Entwicklung regelmäßig dokumentiert. Außerdem werden bei Frühgeborenen in den ersten Lebenswochen standardmäßig Entzündungsparameter bestimmt. Es wäre äußerst interessant, in einer groß angelegten Datenanalyse die Erhebungen von Entzündungsmarkern in den ersten Lebenswochen mit kognitiver Entwicklung, speziell in Bezug auf Kleinhirnentwicklungsstörungen, zu korrelieren. Hierbei könnte weiterhin untersucht

werden, ob es Faktoren gibt, die zu einem besseren Outcome beitragen, um diese dann gezielt präventiv oder therapeutisch einzusetzen.

5 Zusammenfassung

Frühgeburt ist eine große medizinische Herausforderung und betrifft jedes zehnte Kind. Unter den typischen Komplikationen nehmen Hirnschädigungen eine zentrale Rolle ein. Als eine häufige Ursache von Hirnschädigungen finden sich Entzündungsmechanismen. Auch ohne septische Zustände schütten frühgeborene Kinder im Rahmen der regulären Interventionen nach Frühgeburt bereits Entzündungsmediatoren aus, die eine subklinische Entzündung bewirken. Das Kleinhirn als sensibles und sich postnatal noch rapide entwickelndes Organ ist besonders anfällig für derartige Störfaktoren. Im Kleinhirn werden sowohl Motorik als auch Denkprozesse koordiniert und moderiert. Neben klassischen motorischen Auffälligkeiten wie Dysmetrien gehen Schädigungen dieses Organes auch mit kognitiven Einschränkungen und Verhaltensauffälligkeiten einher. Gliazellen haben wichtige Funktionen in der Entwicklung und Reifung des Kleinhirns. In dieser Arbeit wird ein besonderer Fokus auf Oligodendroglia und deren Myelinsynthese, Mikroglia als Immunzellen des Gehirns, und Astroglia als homoöstasebewahrende und viele Entwicklungsvorgänge unterstützende Zellen gelegt. Es wird untersucht, inwieweit die postnatale Applikation von pro-inflammatorischem Interleukin 1 β im Mausmodell, mithilfe dessen eine subklinische Inflammation induziert wird, einen Einfluss auf die Entwicklung der Gliazellen im Kleinhirn hat.

Neugeborenen Mäusen der Mauslinie OF-1 wurde an den ersten fünf Lebenstagen Interleukin 1 β intraperitoneal verabreicht, während eine Kontrollgruppe PBS erhielt. Zudem wurde BrdU für spätere Proliferationsuntersuchungen appliziert. Die Mäuse wurden allzeit überwacht und zeigten keine Zeichen der Inflammation. An festgelegten Lebenstagen wurden die Tiere getötet und die Kleinhirne mittels immunhistochemischer Färbungen, Polymerasekettenreaktionen zur Genexpressionsanalyse sowie Western Blotting untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach Deparaffinierung und Permeabilisierung der Paraffinschnitte mittels Antikörpern erstellt, die entweder selbst

fluoreszierten oder mit fluoreszenzgelabelten Sekundärantikörpern versehen wurden. Die Färbungen wurden mit Fluoreszenzmikroskopie begutachtet und die Zellen mithilfe von Software-Analysen gezählt beziehungsweise die Farbeintensitäten gemessen. Für die Polymerasekettenreaktionen wurde zunächst RNA isoliert und revers transkribiert. Anschließend wurden selektiv verschiedene Genabschnitte amplifiziert und die Amplifikation mithilfe von Sonden beziehungsweise *SYBRTM Green* semiquantitativ erfasst. Für die Western Blots wurden die Proteine des gesamten homogenisierten Kleinhirns elektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen übertragen, anschließend mittels Antikörpern gefärbt und mittels Chemolumineszenz detektiert.

Olig2+ Oligodendroglia proliferierten in den ersten zehn Lebenstagen signifikant weniger in der Gruppe, die Interleukin 1 β ausgesetzt war, verglichen mit der Kontrollgruppe. Zudem war die Reifung, gemessen am Anteil von Olig1+CC1+ Oligodendroglia, am zehnten Lebenstag signifikant verzögert. Zu vermehrtem Zelltod von Olig2+ Oligodendroglia kam es weder in der Interventions- noch in der Kontrollgruppe. Oligodendroglia bilden die Myelinschicht von Neuronen und erhöhen die Konnektivität im Kleinhirn. Das Myelinprotein MAG ist im Western Blot am zehnten Lebenstag signifikant weniger nachzuweisen. Immunhistochemische Färbungen von MAG zeigen Strukturdefizite. Auf Genexpressionebene zeigten sich die Myelinmarker *Olig2* und *Cnp* unverändert. Erhöhte Zahlen von Iba1+ Mikroglia im Kleinhirn nach Inflammation mit signifikanter Mehrzahl zu den Zeitpunkten P3, P5 und P45 weisen auf eine langfristige zerebelläre Inflammation hin. Mikroglia proliferierten zu den Zeitpunkten P5 und P10 in den Versuchstieren signifikant mehr als in den Kontrolltieren. Eine vermehrte Einwanderung von Mikroglia gemessen an CD3+ Zellen im Kleinhirn konnte nicht beobachtet werden. Morphologisch nahmen Mikroglia zum Zeitpunkt P3 signifikant vermehrt eine amöboide, mit Aktivierung assoziierte, Konformation ein. Die Genexpression von mikroglialären Markern zeigte nur wenig

signifikante Unterschiede. In Astroglia konnte eine signifikante Zunahme der Färbeintensitäten der Marker GFAP und GS zu dem juvenilen Zeitpunkt P45 beobachtet werden.

Die neugeborene Maus eignete sich in der vorliegenden Studie mit ihren schnellen Reproduktionszyklen und verhältnismäßig unreifem Kleinhirn bei Geburt sehr gut als Modell für Frühgeburt. Die Beobachtung von oligodendroglären Proliferations- und Reifungsstörungen können erklären, warum frühgeborene Kinder häufig Myelinisierungsdefizite aufweisen. Auch im Großhirn von ehemals Frühgeborenen sowie in den Großhirnen der untersuchten Mäuse finden sich Myelinisierungsdefizite. Besonders hervorzuheben ist die entdeckte langfristige Erhöhung der Mikrogliazahlen sowie deren Aktivierungsniveau, was für das Kleinhirn untypisch ist. Auch in verstorbenen Frühgeborenen finden sich erhöhte Anzahlen von Mikroglia im Gehirn. In diesem Versuch normalisierten sich die Anzahlen auf ein Kontrolllevel bis zum 150. Lebenstag, bei ehemals Frühgeborenen werden ebenso keine vermehrten Raten von inflammatorischen Erkrankungen des Gehirns beobachtet. Die verstärkte Expression von Markern der Bergmannglia kann in erster Linie als Veränderung der Aktivität dieser Zellen gewertet werden. Möglicherweise nehmen sie einen Einfluss auf die weitere Entwicklung des Kleinhirns. Dennoch stehen weitere Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung der Zellen aus, und es ergeben sich vielfältige weitere Forschungsansätze aus dieser Arbeit. Außerdem wäre es hilfreich zu verstehen, inwieweit eine selektive Inaktivierung von Mikroglia die oben beschriebenen beobachteten Prozesse verändern könnte und ob sie somit einen Therapieansatz zur Behandlung von zerebellärer Inflammation darstellen kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Abstracts 2017 der GNPI und DGPI. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 165, 1–111 (2017).
2. Abstracts des Kongresses für Kinder- und Jugendmedizin 2017. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 165, 181–300 (2017).
3. WHO. WHO | Preterm birth. *WHO* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/> (2017). Zuletzt abgerufen am 20.03.2018.
4. Vogel, J. P., Chawanpaiboon, S., Moller, A.-B., Watananirun, K., Bonet, M. & Lumbiganon, P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 52, 3–12 (2018).
5. Kinney, M. V., Lawn, J. E., Howson, C. P. & Belizan, J. 15 Million preterm births annually: what has changed this year? *Reprod. Health* 9, 28 (2012).
6. Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D. & Romero, R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet Lond. Engl.* 371, 75–84 (2008).
7. Ward, R. M. & Beachy, J. C. Neonatal complications following preterm birth. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 110 Suppl 20, 8–16 (2003).
8. Larroque, B., Ancel, P.-Y., Marret, S., Marchand, L., André, M., Arnaud, C., Pierat, V., Rozé, J.-C., Messer, J., Thiriez, G., Burguet, A., Picaud, J.-C., Bréart, G., Kaminski, M., & EPIPAGE Study group. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet Lond. Engl.* 371, 813–820 (2008).
9. Ream, M. A. & Lehwald, L. Neurologic Consequences of Preterm Birth. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18, 48 (2018).
10. Arhan, E., Gücüyener, K., Soysal, Ş., Şalvarlı, Ş., Gürses, M. A., Serdaroğlu, A., Demir, E., Ergenekon, E., Türkyılmaz, C., Önal, E., Koç, E. & Atalay, Y. Regional brain volume reduction and cognitive outcomes in preterm children at low risk at 9 years of age. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* (2017) doi:10.1007/s00381-017-3421-2.
11. Volpe, J. J. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain

- development inextricably intertwined. *Semin. Pediatr. Neurol.* 16, 167–178 (2009).
12. Xiong, T., Gonzalez, F. & Mu, D.-Z. An overview of risk factors for poor neurodevelopmental outcome associated with prematurity. *World J. Pediatr. WJP* 8, 293–300 (2012).
 13. Wu, Y. W. & John M. Colford, J. Chorioamnionitis as a Risk Factor for Cerebral Palsy: A Meta-analysis. *JAMA* 284, 1417–1424 (2000).
 14. Nelson, K. B., Grether, J. K., Dambrosia, J. M., Walsh, E., Kohler, S., Satyanarayana, G., Nelson, P. G., Dickens, B. F. & Phillips, T. M. Neonatal Cytokines and Cerebral Palsy in Very Preterm Infants. *Pediatr. Res.* 53, 600–607 (2003).
 15. Bartha, A. I., Foster-Barber, A., Miller, S. P., Vigneron, D. B., Glidden, D. V., Barkovich, A. J. & Ferriero, D. M. Neonatal Encephalopathy: Association of Cytokines with MR Spectroscopy and Outcome. *Pediatr. Res.* 56, 960–966 (2004).
 16. Jantzie, L. L. & Robinson, S. Preclinical Models of Encephalopathy of Prematurity. *Dev. Neurosci.* 37, 277–288 (2015).
 17. Fleiss, B. & Gressens, P. Neuroprotection of the preterm brain. *Handb. Clin. Neurol.* 162, 315–328 (2019).
 18. Dammann, O. & Leviton, A. Inflammatory brain damage in preterm newborns—dry numbers, wet lab, and causal inferences. *Early Hum. Dev.* 79, 1–15 (2004).
 19. Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S. & Gressens, P. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 192–208 (2015).
 20. Volpe, J. J. Systemic inflammation, oligodendroglial maturation, and the encephalopathy of prematurity. *Ann. Neurol.* 70, 525–529 (2011).
 21. Eklind, S., Mallard, C., Leverin, A.-L., Gilland, E., Blomgren, K., Mattsby-Baltzer, I. & Hagberg, H. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic–ischaemic injury. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1101–1106 (2001).
 22. Dommergues, M. A., Patkai, J., Renaud, J. C., Evrard, P. & Gressens, P. Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann. Neurol.* 47, 54–63 (2000).
 23. Rousset, C. I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P. &

- Saliba, E. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatr. Res.* 59, 428–433 (2006).
24. Normann, E., Lacaze-Masmonteil, T., Eaton, F., Schwendimann, L., Gressens, P. & Thébaud, B. A novel mouse model of Ureaplasma-induced perinatal inflammation: effects on lung and brain injury. *Pediatr. Res.* 65, 430–436 (2009).
25. Bierstone, D., Wagenaar, N., Gano, D. L., Guo, T., Georgio, G., Groenendaal, F., de Vries, L. S., Varghese, J., Glass, H. C., Chung, C., Terry, J., Rijpert, M., Grunau, R. E., Synnes, A., Barkovich, A. J., Ferriero, D. M., Benders, M., Chau, V. & Miller, S. P. Association of Histologic Chorioamnionitis With Perinatal Brain Injury and Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes Among Preterm Neonates. *JAMA Pediatr.* 172, 534–541 (2018).
26. Yanni, D., Korzeniewski, S. J., Allred, E. N., Fichorova, R. N., O’Shea, T. M., Kuban, K., Dammann, O. & Leviton, A. Both antenatal and postnatal inflammation contribute information about the risk of brain damage in extremely preterm newborns. *Pediatr. Res.* 82, 691–696 (2017).
27. Malaeb, S. & Dammann, O. Fetal Inflammatory Response and Brain Injury in the Preterm Newborn. *J. Child Neurol.* 24, 1119–1126 (2009).
28. Limperopoulos, C., Bassan, H., Sullivan, N. R., Soul, J. S., Robertson, R. L., Moore, M., Ringer, S. A., Volpe, J. J. & du Plessis, A. J. Positive screening for autism in ex-preterm infants: prevalence and risk factors. *Pediatrics* 121, 758–765 (2008).
29. Chan, K. Y. Y., Miller, S. L., Schmölzer, G. M., Stojanovska, V. & Polglase, G. R. Respiratory Support of the Preterm Neonate: Lessons About Ventilation-Induced Brain Injury From Large Animal Models. *Front. Neurol.* 11, 862 (2020).
30. Viaroli, F., Cheung, P. Y., O’Reilly, M., Polglase, G. R., Pichler, G. & Schmölzer, G. M. Reducing brain injury of preterm infants in the delivery room. *Front. Pediatr.* 6, 290 (2018).
31. Malhotra, A., Castillo-Melendez, M., Allison, B. J., Sutherland, A. E., Nitsos, I., Pham, Y., Rocha, A. K. A. de A., Fahey, M. C., Polglase, G. R., Jenkin, G. & Miller, S. L. Neuropathology as a consequence of neonatal ventilation in premature

- growth-restricted lambs. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 315, R1183–R1194 (2018).
32. Vinall, J. & Grunau, R. E. Impact of repeated procedural pain-related stress in infants born very preterm. *Pediatr. Res.* 75, 584–587 (2014).
33. Bouza, H. The impact of pain in the immature brain. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* 22, 722–732 (2009).
34. Krishnan, M. L., Van Steenwinckel, J., Schang, A.-L., Yan, J., Arnadottir, J., Le Charpentier, T., Csaba, Z., Dournaud, P., Cipriani, S., Auvynet, C., Titomanlio, L., Pansiot, J., Ball, G., Boardman, J. P., Walley, A. J., Saxena, A., Mirza, G., Fleiss, B., Edwards, A. D., Petretto, E. & Gressens, P. Integrative genomics of microglia implicates DLG4 (PSD95) in the white matter development of preterm infants. *Nat. Commun.* 8, 428 (2017).
35. Van Steenwinckel, J., Schang, A.-L., Krishnan, M. L., Degos, V., Delahaye-Duriez, A., Bokobza, C., Csaba, Z., Verdonk, F., Montané, A., Sigaut, S., Hennebert, O., Lebon, S., Schwendimann, L., Le Charpentier, T., Hassan-Abdi, R., Ball, G., Aljabar, P., Saxena, A., Holloway, R. K., Birchmeier, W., Baud, O., Rowitch, D., Miron, V., Chretien, F., Leconte, C., Besson, V. C., Petretto, E. G., Edwards, A. D., Hagberg, H., Soussi-Yanicostas, N., Fleiss, B. & Gressens, P. Decreased microglial Wnt/ β -catenin signalling drives microglial pro-inflammatory activation in the developing brain. *Brain J. Neurol.* 142, 3806–3833 (2019).
36. Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C. & Gressens, P. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J. Anat.* 217, 436–448 (2010).
37. Verney, C., Pogledic, I., Biran, V., Adle-Biassette, H., Fallet-Bianco, C. & Gressens, P. Microglial reaction in axonal crossroads is a hallmark of noncystic periventricular white matter injury in very preterm infants. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 251–264 (2012).
38. Groiss, S. J. & Ugawa, Y. Cerebellum. *Handb. Clin. Neurol.* 116, 643–653 (2013).
39. Proville, R. D., Spolidoro, M., Guyon, N., Dugué, G. P., Selimi, F., Isope, P.,

- Popa, D. & Léna, C. Cerebellum involvement in cortical sensorimotor circuits for the control of voluntary movements. *Nat. Neurosci.* 17, 1233–1239 (2014).
40. Schmahmann, J. D. & Sherman, J. C. Cerebellar cognitive affective syndrome. *Int. Rev. Neurobiol.* 41, 433–440 (1997).
41. Schmahmann, J. D. Dysmetria of thought: clinical consequences of cerebellar dysfunction on cognition and affect. *Trends Cogn. Sci.* 2, 362–371 (1998).
42. Bodranghien, F., Bastian, A., Casali, C., Hallett, M., Louis, E. D., Manto, M., Mariën, P., Nowak, D. A., Schmahmann, J. D., Serrao, M., Steiner, K. M., Strupp, M., Tilikete, C., Timmann, D. & van Dun, K. Consensus Paper: Revisiting the Symptoms and Signs of Cerebellar Syndrome. *Cerebellum Lond. Engl.* 15, 369–391 (2016).
43. Schmahmann, J. D. & Sherman, J. C. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain J. Neurol.* 121 (Pt 4), 561–579 (1998).
44. Finney, G. R., Minagar, A. & Heilman, K. M. Assessment of Mental Status. *Neurol. Clin.* 34, 1–16 (2016).
45. Van Braeckel, K. N. J. A. & Taylor, H. G. Visuospatial and visuomotor deficits in preterm children: the involvement of cerebellar dysfunctioning. *Dev. Med. Child Neurol.* 55 Suppl 4, 19–22 (2013).
46. Mariën, P. & Borgatti, R. Language and the cerebellum. *Handb. Clin. Neurol.* 154, 181–202 (2018).
47. Schmahmann, J. D. The cerebellum and cognition. *Neurosci. Lett.* 688, 62–75 (2019).
48. Adamaszek, M., D’Agata, F., Ferrucci, R., Habas, C., Keulen, S., Kirkby, K. C., Leggio, M., Mariën, P., Molinari, M., Moulton, E., Orsi, L., Van Overwalle, F., Papadelis, C., Priori, A., Sacchetti, B., Schutter, D. J., Styliadis, C. & Verhoeven, J. Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. *Cerebellum Lond. Engl.* 16, 552–576 (2017).
49. Guell, X., Halko, M., Farzan, F., Stoodley, C., Pascual-Leone, A., Gabrieli, J. & Schmahmann, J. Dysmetria of Thought and the Universal Cerebellar Transform: empirical evidence, future approaches, and relevance for embodied cognition. (S18.007). *Neurology* 88, (2017).

50. Diedrichsen, J., King, M., Hernandez-Castillo, C., Sereno, M. & Ivry, R. Universal Transform or Multiple Functionality? Understanding the Contribution of the Human Cerebellum across Task Domains. *Neuron* 102, 918–928 (2019).
51. Stoodley, C. J. & Schmahmann, J. D. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* 46, 831–844 (2010).
52. Timmann, D. Kleinhirn und exekutive Funktionen, Sprache sowie visuell-räumliche Funktionen. in *Kognitive Neurowissenschaften* (eds. Karnath, H.-O. & Thier, P.) 609–617 (Springer, 2012). doi:10.1007/978-3-642-25527-4_54.
53. Chang, C. H., Chang, F. M., Yu, C. H., Ko, H. C. & Chen, H. Y. Assessment of fetal cerebellar volume using three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 26, 981–988 (2000).
54. Volpe, J. J. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. *J. Child Neurol.* 24, 1085–1104 (2009).
55. Tam, E. W. Y. Cerebellar injury in preterm infants. *Handb. Clin. Neurol.* 155, 49–59 (2018).
56. Gano, D. & Barkovich, A. J. Cerebellar hypoplasia of prematurity: Causes and consequences. *Handb. Clin. Neurol.* 162, 201–216 (2019).
57. Pierson, C. R. & Al Sufiani, F. Preterm birth and cerebellar neuropathology. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 21, 305–311 (2016).
58. Limperopoulos, C., Soul, J. S., Gauvreau, K., Huppi, P. S., Warfield, S. K., Bassan, H., Robertson, R. L., Volpe, J. J. & du Plessis, A. J. Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. *Pediatrics* 115, 688–695 (2005).
59. Messerschmidt, A., Brugger, P. C., Boltshauser, E., Zoder, G., Sterniste, W., Birnbacher, R. & Prayer, D. Disruption of cerebellar development: potential complication of extreme prematurity. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 26, 1659–1667 (2005).
60. Van Kooij, B. J. M., Benders, M. J. N. L., Anbeek, P., Van Haastert, I. C., De Vries, L. S. & Groenendaal, F. Cerebellar volume and proton magnetic resonance spectroscopy at term, and neurodevelopment at 2 years of age in preterm

- infants. *Dev. Med. Child Neurol.* 54, 260–266 (2012).
61. Allin, M., Matsumoto, H., Santhouse, A. M., Nosarti, C., AlAsady, M. H., Stewart, A. L., Rifkin, L. & Murray, R. M. Cognitive and motor function and the size of the cerebellum in adolescents born very pre-term. *Brain J. Neurol.* 124, 60–66 (2001).
 62. Allin, M. P. G., Salaria, S., Nosarti, C., Wyatt, J., Rifkin, L. & Murray, R. M. Vermis and lateral lobes of the cerebellum in adolescents born very preterm. *Neuroreport* 16, 1821–1824 (2005).
 63. Hart, A. R., Whitby, E. H., Clark, S. J., Paley, M. N. J. & Smith, M. F. Diffusion-weighted imaging of cerebral white matter and the cerebellum following preterm birth. *Dev. Med. Child Neurol.* 52, 652–659 (2010).
 64. Brossard-Racine, M., Poretti, A., Murnick, J., Bouyssi-Kobar, M., McCarter, R., du Plessis, A. J. & Limperopoulos, C. Cerebellar Microstructural Organization is Altered by Complications of Premature Birth: A Case-Control Study. *J. Pediatr.* 182, 28-33.e1 (2017).
 65. Baillieux, H., De Smet, H. J., Paquier, P. F., De Deyn, P. P. & Mariën, P. Cerebellar neurocognition: insights into the bottom of the brain. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 110, 763–773 (2008).
 66. Koziol, L. F., Budding, D., Andreasen, N., D'Arrigo, S., Bulgheroni, S., Imamizu, H., Ito, M., Manto, M., Marvel, C., Parker, K., Pezzulo, G., Ramnani, N., Riva, D., Schmahmann, J., Vandervert, L. & Yamazaki, T. Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum Lond. Engl.* 13, 151–177 (2014).
 67. Parker, J., Mitchell, A., Kalpakidou, A., Walshe, M., Jung, H.-Y., Nosarti, C., Santosh, P., Rifkin, L., Wyatt, J., Murray, R. M. & Allin, M. Cerebellar growth and behavioural & neuropsychological outcome in preterm adolescents. *Brain J. Neurol.* 131, 1344–1351 (2008).
 68. Limperopoulos, C., Bassan, H., Gauvreau, K., Robertson, R. L., Sullivan, N. R., Benson, C. B., Avery, L., Stewart, J., Soul, J. S., Ringer, S. A., Volpe, J. J. & du Plessis, A. J. Does cerebellar injury in premature infants contribute to the high prevalence of long-term cognitive, learning, and behavioral disability in survivors?

- Pediatrics* 120, 584–593 (2007).
69. Fatemi, S. H., Aldinger, K. A., Ashwood, P., Bauman, M. L., Blaha, C. D., Blatt, G. J., Chauhan, A., Chauhan, V., Dager, S. R., Dickson, P. E., Estes, A. M., Goldowitz, D., Heck, D. H., Kemper, T. L., King, B. H., Martin, L. A., Millen, K. J., Mittleman, G., Mosconi, M. W., Persico, A. M., Sweeney, J. A., Webb, S. J. & Welsh, J. P. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum Lond. Engl.* 11, 777–807 (2012).
70. Matthews, L. G., Inder, T. E., Pascoe, L., Kapur, K., Lee, K. J., Monson, B. B., Doyle, L. W., Thompson, D. K. & Anderson, P. J. Longitudinal Preterm Cerebellar Volume: Perinatal and Neurodevelopmental Outcome Associations. *Cerebellum Lond. Engl.* (2018) doi:10.1007/s12311-018-0946-1.
71. Hintz, S. R., Barnes, P. D., Bulas, D., Slovis, T. L., Finer, N. N., Wrage, L. A., Das, A., Tyson, J. E., Stevenson, D. K., Carlo, W. A., Walsh, M. C., Lupton, A. R., Yoder, B. A., Meurs, K. P. V., Faix, R. G., Rich, W., Newman, N. S., Cheng, H., Heyne, R. J., Vohr, B. R., Acarregui, M. J., Vaucher, Y. E., Pappas, A., Peralta-Carcelen, M., Wilson-Costello, D. E., Evans, P. W., Goldstein, R. F., Myers, G. J., Poindexter, B. B., McGowan, E. C., Adams-Chapman, I., Fuller, J., Higgins, R. D. & Network, for the S. S. G. of the E. K. S. N. I. of C. H. and H. D. N. R. Neuroimaging and Neurodevelopmental Outcome in Extremely Preterm Infants. *Pediatrics* 135, e32–e42 (2015).
72. Revuelta, M., Scheuer, T., Chew, L.-J. & Schmitz, T. Glial Factors Regulating White Matter Development and Pathologies of the Cerebellum. *Neurochem. Res.* 45, 643–655 (2020).
73. McMorris, F. A. & McKinnon, R. D. Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 6, 313–329 (1996).
74. Miller, R. H. Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci.* 19, 92–96 (1996).
75. Baumann, N. & Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 81, 871–927 (2001).
76. Gard, A. L. & Pfeiffer, S. E. Glial cell mitogens bFGF and PDGF differentially regulate development of O4+GalC- oligodendrocyte progenitors. *Dev. Biol.* 159,

- 618–630 (1993).
77. Ashwell, K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 58, 1–12 (1991).
 78. von Bernhardt, R., Heredia, F., Salgado, N. & Muñoz, P. Microglia Function in the Normal Brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 949, 67–92 (2016).
 79. Peferoen, L., Kipp, M., van der Valk, P., van Noort, J. M. & Amor, S. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology* 141, 302–313 (2014).
 80. Hagemeyer, N., Hanft, K.-M., Akriditou, M.-A., Unger, N., Park, E. S., Stanley, E. R., Staszewski, O., Dimou, L. & Prinz, M. Microglia contribute to normal myelogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 134, 441–458 (2017).
 81. Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D. & Roumier, A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55, 233–238 (2007).
 82. Nakayama, H., Abe, M., Morimoto, C., Iida, T., Okabe, S., Sakimura, K. & Hashimoto, K. Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. *Nat. Commun.* 9, 2830 (2018).
 83. Miller, B. A., Crum, J. M., Tovar, C. A., Ferguson, A. R., Bresnahan, J. C. & Beattie, M. S. Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia in vitro. *J. Neuroinflammation* 4, 28 (2007).
 84. Cai, N., Kurachi, M., Shibasaki, K., Okano-Uchida, T. & Ishizaki, Y. CD44-positive cells are candidates for astrocyte precursor cells in developing mouse cerebellum. *Cerebellum Lond. Engl.* 11, 181–193 (2012).
 85. Li, J., Zhang, L., Chu, Y., Namaka, M., Deng, B., Kong, J. & Bi, X. Astrocytes in Oligodendrocyte Lineage Development and White Matter Pathology. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 119 (2016).
 86. Araujo, A. P. B., Carpi-Santos, R. & Gomes, F. C. A. The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. *Cerebellum Lond. Engl.* 18, 1017–1035 (2019).
 87. Favrais, G., van de Looij, Y., Fleiss, B., Ramanantsoa, N., Bonnin, P., Stoltenburg-Didinger, G., Lacaud, A., Saliba, E., Dammann, O., Gallego, J., Sizonenko,

- S., Hagberg, H., Lelièvre, V. & Gressens, P. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann. Neurol.* 70, 550–565 (2011).
88. Stolp, H. B., Fleiss, B., Arai, Y., Supramaniam, V., Vontell, R., Birtles, S., Yates, A. G., Baburamani, A. A., Thornton, C., Rutherford, M., Edwards, A. D. & Gressens, P. Interneuron Development Is Disrupted in Preterm Brains With Diffuse White Matter Injury: Observations in Mouse and Human. *Front. Physiol.* 10, (2019).
89. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haeusslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 1–16 (2013).
90. Dinarello, C. A. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 253–265 (1997).
91. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720–3732 (2011).
92. Gabay, C., Lamacchia, C. & Palmer, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 232–241 (2010).
93. O’Driscoll, D. N., Greene, C. M. & Molloy, E. J. Immune function? A missing link in the gender disparity in preterm neonatal outcomes. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13, 1061–1071 (2017).
94. Endesfelder, S., Zaak, I., Weichelt, U., Bühner, C. & Schmitz, T. Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radic. Biol. Med.* 67, 221–234 (2014).
95. Emery, B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330, 779–782 (2010).
96. Buffo, A. & Rossi, F. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog. Neurobiol.* 109, 42–63 (2013).
97. Buffo, A., Vosko, M. R., Ertürk, D., Hamann, G. F., Jucker, M., Rowitch, D. & Götz, M. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18183–18188 (2005).
98. Clemente, D., Ortega, M. C., Melero-Jerez, C. & de Castro, F. The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development

- and in demyelinating diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 268 (2013).
99. Pang, Y., Rodts-Palenik, S., Cai, Z., Bennett, W. A. & Rhodes, P. G. Suppression of glial activation is involved in the protection of IL-10 on maternal E. coli induced neonatal white matter injury. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 157, 141–149 (2005).
100. Dalmau, I., Finsen, B., Tønder, N., Zimmer, J., González, B. & Castellano, B. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 377, 70–84 (1997).
101. Ling, E. A. Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J. Anat.* 128, 847–858 (1979).
102. Innocenti, G. M., Clarke, S. & Koppel, H. Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. II. Development and relations with axonal pathways. *Brain Res.* 313, 55–66 (1983).
103. Marín-Teva, J. L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N. & Mallat, M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535–547 (2004).
104. Polazzi, E. & Contestabile, A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev. Neurosci.* 13, 221–242 (2002).
105. Fetler, L. & Amigorena, S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 309, 392–393 (2005).
106. Yokoyama, A., Yang, L., Itoh, S., Mori, K. & Tanaka, J. Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia* 45, 96–104 (2004).
107. Streit, W. J., Graeber, M. B. & Kreutzberg, G. W. Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp. Neurol.* 105, 115–126 (1989).
108. Benveniste, E. N., Nguyen, V. T. & O’Keefe, G. M. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer’s disease. *Neurochem. Int.* 39, 381–391 (2001).
109. Sawada, M., Imamura, K. & Nagatsu, T. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson’s disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 373–381 (2006)
doi:10.1007/978-3-211-45295-0_57.

110. Yamada, K. & Watanabe, M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat. Sci. Int.* 77, 94–108 (2002).
111. Kellermayer, R., Dowd, S. E., Harris, R. A., Balasa, A., Schaible, T. D., Wolcott, R. D., Tatevian, N., Szigeti, R., Li, Z., Versalovic, J. & Smith, C. W. Colonic mucosal DNA methylation, immune response, and microbiome patterns in Toll-like receptor 2-knockout mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 1449–1460 (2011).
112. Ramanantsoa, N., Matrot, B., Vardon, G., Lajard, A.-M., Voituron, N., Dauger, S., Denjean, A., Hilaire, G. & Gallego, J. Impaired Ventilatory and Thermoregulatory Responses to Hypoxic Stress in Newborn Phox2b Heterozygous Knock-Out Mice. *Front. Physiol.* 2, (2011).
113. Lee, H. J., Lee, Y. J., Jo, H. S., Choi, C. W., Kim, E.-K., Kim, H.-S., Kim, B. I. & Choi, J.-H. Double exposure to intra-amniotic lipopolysaccharide and maternal betamethasone induces sustained increase of neutrophils in the lungs and disrupts alveolarization in newborn rats. *J. Perinat. Med.* 41, 711–718 (2013).
114. Celik, H. & Ayar, A. Effects of erythromycin on pregnancy duration and birth weight in lipopolysaccharide-induced preterm labor in pregnant rats. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 103, 22–25 (2002).
115. Garfield, R. E., Gasc, J. M. & Baulieu, E. E. Effects of the antiprogestosterone RU 486 on preterm birth in the rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157, 1281–1285 (1987).
116. Longo, L. D. *The rise of fetal and neonatal physiology.* (Springer, 2013).
117. Grigsby, P. L., Hirst, J. J., Scheerlinck, J.-P., Phillips, D. J. & Jenkin, G. Fetal responses to maternal and intra-amniotic lipopolysaccharide administration in sheep. *Biol. Reprod.* 68, 1695–1702 (2003).
118. Uno, H., Lohmiller, L., Thieme, C., Kemnitz, J. W., Engle, M. J., Roecker, E. B. & Farrell, P. M. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 53, 157–167 (1990).
119. Sadowsky, D. W., Adams, K. M., Gravett, M. G., Witkin, S. S. & Novy, M. J. Pre-term labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 β and tumor

- necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 1578–1589 (2006).
120. Manuel, C. R., Ashby, C. R. & Reznik, S. E. Discrepancies in Animal Models of Preterm Birth. *Curr. Pharm. Des.* 23, 6142–6148 (2017).
121. Chen, Y., Miles, D. K., Hoang, T., Shi, J., Hurlock, E., Kernie, S. G. & Lu, Q. R. The basic helix-loop-helix transcription factor olig2 is critical for reactive astrocyte proliferation after cortical injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10983–10989 (2008).
122. Ligon, K. L., Kesari, S., Kitada, M., Sun, T., Arnett, H. A., Alberta, J. A., Anderson, D. J., Stiles, C. D. & Rowitch, D. H. Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 7853–7858 (2006).
123. Zhu, L., Xiang, P., Guo, K., Wang, A., Lu, J., Tay, S. S. W., Jiang, H. & He, B. P. Microglia/monocytes with NG2 expression have no phagocytic function in the cortex after LPS focal injection into the rat brain. *Glia* 60, 1417–1426 (2012).
124. Zhao, J.-W., Raha-Chowdhury, R., Fawcett, J. W. & Watts, C. Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2+ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1853–1869 (2009).
125. Jones, L. L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W. B. & Tuszynski, M. H. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 2792–2803 (2002).
126. Bhat, R. V., Axt, K. J., Fosnaugh, J. S., Smith, K. J., Johnson, K. A., Hill, D. E., Kinzler, K. W. & Baraban, J. M. Expression of the APC tumor suppressor protein in oligodendroglia. *Glia* 17, 169–174 (1996).
127. Guo, Z., Wang, X., Xiao, J., Wang, Y., Lu, H., Teng, J. & Wang, W. Early postnatal GFAP-expressing cells produce multilineage progeny in cerebrum and astrocytes in cerebellum of adult mice. *Brain Res.* 1532, 14–20 (2013).
128. Liu, Z., Hu, X., Cai, J., Liu, B., Peng, X., Wegner, M. & Qiu, M. Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms. *Dev. Biol.* 302, 683–693 (2007).

129. Stolt, C. C., Lommes, P., Friedrich, R. P. & Wegner, M. Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Dev. Camb. Engl.* 131, 2349–2358 (2004).
130. Wei, Q., Miskimins, W. K. & Miskimins, R. Sox10 acts as a tissue-specific transcription factor enhancing activation of the myelin basic protein gene promoter by p27Kip1 and Sp1. *J. Neurosci. Res.* 78, 796–802 (2004).
131. Fancy, S. P. J., Baranzini, S. E., Zhao, C., Yuk, D.-I., Irvine, K.-A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R. J. M. & Rowitch, D. H. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev.* 23, 1571–1585 (2009).
132. Zhou, Q., Choi, G. & Anderson, D. J. The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* 31, 791–807 (2001).
133. Schmidbauer, V., Geisl, G., Diogo, M., Weber, M., Goeral, K., Klebermass-Schrehof, K., Berger, A., Prayer, D. & Kasprian, G. SyMRI detects delayed myelination in preterm neonates. *Eur. Radiol.* 29, 7063–7072 (2019).
134. Vandewouw, M. M., Young, J. M., Shroff, M. M., Taylor, M. J. & Sled, J. G. Altered myelin maturation in four year old children born very preterm. *NeuroImage Clin.* 21, 101635 (2019).
135. Novais, A. R. B., Pham, H., Looij, Y. V. de, Bernal, M., Mairesse, J., Zana-Taieb, E., Colella, M., Jarreau, P.-H., Pansiot, J., Dumont, F., Sizonenko, S., Gressens, P., Charriaut-Marlangue, C., Tanter, M., Demene, C., Vaiman, D. & Baud, O. Transcriptomic regulations in oligodendroglial and microglial cells related to brain damage following fetal growth restriction. *Glia* 64, 2306–2320 (2016).
136. Rezaie, P. & Dean, A. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 22, 106–132 (2002).
137. Leviton, A., Dammann, O. & Durum, S. K. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. *Ann. Neurol.* 58, 821–828 (2005).
138. Stowell, R. D., Wong, E. L., Batchelor, H. N., Mendes, M. S., Lamantia, C. E., Whitelaw, B. S. & Majewska, A. K. Cerebellar microglia are dynamically unique

- and survey Purkinje neurons in vivo. *Dev. Neurobiol.* 78, 627–644 (2018).
139. Staszewski, O. & Hagemeyer, N. Unique microglia expression profile in developing white matter. *BMC Res. Notes* 12, 367 (2019).
140. Voet, S., Prinz, M. & van Loo, G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol. Med.* 25, 112–123 (2019).
141. Zrzavy, T., Hametner, S., Wimmer, I., Butovsky, O., Weiner, H. L. & Lassmann, H. Loss of ‘homeostatic’ microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 140, 1900–1913 (2017).
142. Mairesse, J., Zinni, M., Pansiot, J., Hassan-Abdi, R., Demene, C., Colella, M., Charriaut-Marlangue, C., Rideau Batista Novais, A., Tanter, M., Maccari, S., Gressens, P., Vaiman, D., Soussi-Yanicostas, N. & Baud, O. Oxytocin receptor agonist reduces perinatal brain damage by targeting microglia. *Glia* 67, 345–359 (2019).
143. Eng, L. F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 8, 203–214 (1985).
144. Tiburcio-Félix, R., Escalante-López, M., López-Bayghen, B., Martínez, D., Hernández-Kelly, L. C., Zinker, S., Hernández-Melchor, D., López-Bayghen, E., Olivares-Bañuelos, T. N. & Ortega, A. Glutamate-Dependent Translational Control of Glutamine Synthetase in Bergmann Glia Cells. *Mol. Neurobiol.* 55, 5202–5209 (2018).
145. Lordkipanidze, T. & Dunaevsky, A. Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. *Glia* 51, 229–234 (2005).
146. Bellamy, T. C. Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *Cerebellum Lond. Engl.* 5, 116–126 (2006).
147. Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Kohda, K., Yuzaki, M., Shimamoto, K., Tanaka, K., Kano, M. & Watanabe, M. Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 7438–7443 (2017).
148. Yamamoto, M., Kim, M., Imai, H., Itakura, Y. & Ohtsuki, G. Microglia-Triggered Plasticity of Intrinsic Excitability Modulates Psychomotor Behaviors in Acute Cerebellar Inflammation. *Cell Rep.* 28, 2923–2938.e8 (2019).

149. O’Driscoll, D. N., McGovern, M., Greene, C. M. & Molloy, E. J. Gender disparities in preterm neonatal outcomes. *Acta Paediatr.* 107, 1494–1499 (2018).
150. Hintz, S. R., Kendrick, D. E., Vohr, B. R., Kenneth Poole, W., Higgins, R. D., & Nichd Neonatal Research Network. Gender differences in neurodevelopmental outcomes among extremely preterm, extremely-low-birthweight infants. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 95, 1239–1248 (2006).
151. Kent, A. L., Wright, I. M. R., Abdel-Latif, M. E., & New South Wales and Australian Capital Territory Neonatal Intensive Care Units Audit Group. Mortality and adverse neurologic outcomes are greater in preterm male infants. *Pediatrics* 129, 124–131 (2012).
152. Cerghet, M., Skoff, R. P., Bessert, D., Zhang, Z., Mullins, C. & Ghandour, M. S. Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1439–1447 (2006).
153. Lueptow, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE* (2017) doi:10.3791/55718.
154. Vogel-Ciernia, A. & Wood, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* 69, 8.31.1-17 (2014).
155. Stoodley, C. J. The Cerebellum and Neurodevelopmental Disorders. *Cerebellum Lond. Engl.* 15, 34–37 (2016).
156. Ohnishi, M., Kai, T., Shimizu, Y., Yano, Y., Urabe, Y., Tasaka, S., Akagi, M., Yamaguchi, Y. & Inoue, A. Gadolinium causes M1 and M2 microglial apoptosis after intracerebral haemorrhage and exerts acute neuroprotective effects. *J. Pharm. Pharmacol.* 72, 709–718 (2020).

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Luisa Sophie Klein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung der weißen Substanz des unreifen Kleinhirns im Schädigungsmodell der Maus durch postnatale pro-inflammatorische Stimulation mit Interleukin-1 β “ / „Development of cerebellar white matter in a mouse model by postnatal pro-inflammatory stimulation with interleukin-1 β “ 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 Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung

der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichtet.

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen sowie Publikationen in laufenden Review-Prozessen

Luisa Sophie Klein hat bzw. hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Klein, L.S., Van Steenwinckel, J., Fleiss, B., Scheuer, T., Bühner, C., Faivre, V., Lemoine, S., Blugeon, C., Schwendimann, L., Csaba, Z., Vousden, D.A., Lerch, J.P., Vernon, A.C., Gressens, P., Schmitz, T. (2022) A unique cerebellar pattern of microglia activation in a mouse model of encephalopathy of prematurity. Under review after resubmission at GLIA. *Konzept in Zusammenarbeit mit BF, JvS, TiS, ACV, PG und ThS, Generierung der Daten der IHC, PCR und WB, statistische Auswertung von IHC, PCR und WB, Schreiben des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit JvS, BF, TiS, ACV, PG und ThS*

Scheuer, T., Klein L.S., Bühner C., Endesfelder, S., Schmitz, T. (2019). Transient improvement of cerebellar oligodendroglial development in a neonatal hyperoxia model by PDGFA treatment. Dev Neurobiology Volume 79, Issue 3. *Konzept in Zusammenarbeit mit TiS, SE und ThS, Mitarbeit bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Schreiben des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit TiS, SE und ThS*

Klein L.S., Fleiss B., van Steenwinckel J., Schwendimann, L., Bühner C., Scheuer T., Vousden, D., Vernon, A.C., Gressens P., Schmitz T. (2019, Juli). Perinatal inflammation perturbs glial network development of the cerebellum. XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease 2019, Porto. *Konzept in Zusammenarbeit mit BF, JvS, TiS, PG und ThS, Generierung der Daten von Abschnitt 2-4, statistische Auswertung von Abschnitt 2-4, Schreiben des Abstracts in Zusammenarbeit mit ACV und ThS, Erstellung des Posters, Postervortrag*

Klein, L.S., Fleiss, B., Scheuer, T., Endesfelder, S., Bühner, C., Gressens, P., Schmitz, T. (2017, September). Myelinisierungsdefizite und mikrogläre Veränderungen des Kleinhirns durch perinatale systemische Inflammation. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin 2017, Köln.

Konzept in Zusammenarbeit mit BF, TiS, PG und ThS, Generierung der Daten, statistische Auswertung, Schreiben des Abstracts in Zusammenarbeit mit ThS, Erstellung des Posters, Postervortrag

Klein, L.S., Fleiss, B., Scheuer, T., Endesfelder, S., Bühner, C., Gressens, P., Schmitz, T. (2017, Juni). Neonatale systemische Inflammation verändert die Myelinisierung und die mikrogläre Besiedlung des Kleinhirns bis ins Erwachsenenalter. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin 2017, Dresden.

Konzept in Zusammenarbeit mit BF, TiS, PG und ThS, Generierung der Daten, statistische Auswertung, Schreiben des Abstracts in Zusammenarbeit mit ThS, Erstellung des Posters, Postervortrag

Fleiss, B., Sigaut, S., Klein, L.S., Schwendimann, L., Van Steenwinckel, J., Vousden, D., Lerch, J.P., Vernon, A.C., Schmitz, T., Gressens, P. (2017, März). Studying the long-term neuropathological consequences of encephalopathy of prematurity in a small animal model. Göttingen Meeting der German Neuroscience Society 2016, Göttingen.

Generierung und statistische Auswertung eines Teiles der Daten für den Ergebnisteil zu Oligodendroglia

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

- Publikationen Klein, L.S., Van Steenwinckel, J., Fleiss, B., Scheuer, T., Bühler, C., Faivre, V., Lemoine, S., Blugeon, C., Schwendimann, L., Csaba, Z., Vousden, D.A., Lerch, J.P., Vernon, A.C., Gressens, P., Schmitz, T. (2022) *A unique cerebellar pattern of microglia activation in a mouse model of encephalopathy of prematurity*. Under review at GLIA.
- Scheuer, T., Klein L.S., Bühler C., Endesfelder, S., Schmitz, T. (2019). *Transient improvement of cerebellar oligodendroglial development in a neonatal hyperoxia model by PDGFA treatment*. Dev Neurobiology Volume 79, Issue 3.
- Kongressbeiträge Klein L.S., Fleiss B., van Steenwinckel J., Schwendimann, L., Bühler C., Scheuer T., Vousden, D., Vernon, A.C., Gressens P., Schmitz T. (2019, Juli). *Perinatal inflammation perturbs glial network development of the cerebellum*. XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease 2019, Porto.
- Klein, L.S., Fleiss, B., Scheuer, T., Endesfelder, S., Bühler, C., Gressens, P., Schmitz, T. (2017, September). *Myelinisierungsdefizite und mikrogliale Veränderungen des Kleinhirns durch perinatale systemische Inflammation*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin 2017, Köln.
- Klein, L.S., Fleiss, B., Scheuer, T., Endesfelder, S., Bühler, C., Gressens, P., Schmitz, T. (2017, Juni). *Neonatale systemische Inflammation verändert die Myelinisierung und die mikrogliale Besiedlung des Kleinhirns bis ins Erwachsenenalter*. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin 2017, Dresden.
- Fleiss, B., Sigaut, S., Klein, L.S., Schwendimann, L., Van Steenwinckel, J., Vousden, D., Lerch, J.P., Vernon, A.C., Schmitz, T., Gressens, P. (2017, März). *Studying the long-term neuropathological consequences of encephalopathy of prematurity in a small animal model*. Göttingen Meeting der German Neuroscience Society 2016, Göttingen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Thomas Schmitz für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und die großartige Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Ich danke dem Team des INSERM um Pierre Gressens für die gute Zusammenarbeit, die Übersendung der Präparate und den regen Austausch.

Außerdem bedanke ich mich bei Till, der mich in alle Labormethoden eingearbeitet hat, mich in der Versuchsdurchführung unterstützt hat und bei jeder Frage mit Rat und Tat zur Seite stand.

Besonders danken möchte ich Steffi, die mir jede Frage zu guter wissenschaftlicher Praxis und statistischer Auswertung beantwortet hat und immer ein offenes Ohr hatte.

Ohne Evy und Ruth, die mich im Labor tatkräftig bei meiner Arbeit unterstützt haben, wäre diese Doktorarbeit undenkbar gewesen.

Für die Stipendienförderung meines Studiums, meiner Forschungszeit und der Kongressbeiträge möchte ich der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V. sowie der Nachwuchskommission der Charité danken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Ermutigungen und Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation. Hier danke ich auch besonders meinen Eltern für ihr akribisches Korrekturlesen dieser Arbeit.

Lieber M., du warst meine Stütze und Motivation zum Schreiben während des Corona-Lockdowns. Danke, dass es dich gibt.