

# Die Schädigung des unreifen Kleinhirns durch Hyperoxie in Ratten als Modell der Hirnschädigung bei Frühgeborenen

vorgelegt von:

Diplom-Ingenieur Biotechnologie Till Scheuer

geb. in Berlin

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachter: Prof. Dr. Juri Rappsilber

Gutachter: PD Dr. Thomas Schmitz

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19. Oktober 2017

Berlin 2017



# Inhalt

1 Abstract .....	6
2 Zusammenfassung.....	7
3 Einleitung.....	9
3.1 Das Kleinhirn.....	9
3.2 Der Aufbau des Kleinhirns .....	10
3.3 Die Entwicklung des Kleinhirns.....	12
3.3.1 Exponentielles Wachstum des Kleinhirns im letzten Trimenon der Schwangerschaft .....	12
3.3.2 Die Entwicklung von Oligodendrozyten .....	13
3.3.3 Die Entwicklung von Astrozyten.....	15
3.3.4 Die Entwicklung von Körnerzellen.....	16
3.3.5 Die Entwicklung von Purkinjezellen .....	17
3.4 Der Sonic-hedgehog-Signalweg.....	18
3.5 Frühgeburt.....	20
3.6 Folgen der Frühgeburt.....	20
3.8 Das Tiermodell.....	22
4 Zielsetzung .....	24
5 Material .....	25
5.1 Geräte.....	25
5.2 Softwareprogramme .....	26
5.3 Verbrauchsmaterialien .....	26
5.4 Chemikalien .....	27
5.5 Puffer und Lösungen .....	28
5.6 Enzyme .....	29
5.7 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide .....	29
5.7.1 Oligonukleotide für die quantitative Real Time PCR.....	29
5.7.2 Oligonukleotide für die Standard-PCR.....	30
5.8 Antikörper.....	30
5.8.1 Primäre Antikörper .....	30
5.8.2 Sekundäre Antikörper .....	31
5.9 Reaktionssysteme.....	32
5.10 Zellkulturmedien .....	32
6 Methoden .....	33
6.1 Tiere und Organentnahme .....	33
6.2 Molekularbiologische Methoden .....	33
6.2.1 Isolation von RNA .....	33

6.2.2 Amplifizierung von DNA mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	33
6.2.3 Agarosegelelektrophorese .....	34
6.2.4 cDNA Synthese .....	34
6.2.5 Quantitative Real Time PCR (qPCR).....	34
6.2.6 Proteinisolation .....	35
6.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) und Western Blot.....	35
6.2.7.1 SDS PAGE .....	35
6.2.7.2 Western Blot.....	35
6.2.7.3 Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper .....	35
6.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	36
6.2.9 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) .....	36
6.3 Zellbiologische Methoden .....	36
6.3.1 Isolation und Kultivierung von primären Astrozyten .....	36
6.4 Histologische Methoden .....	37
6.4.1 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten.....	37
6.4.2 Anfertigung von Kryoschnitten.....	38
6.4.3 Immunhistochemie.....	38
6.4.4 Golgi Färbung .....	38
6.4.5 Sholl- Analyse .....	38
6.5 Mikroskopie.....	38
6.5.1 Fluoreszenzmikroskopie .....	38
6.5.1.1 Zeiss LSM 510 .....	38
6.5.1.2 Leica DM 2000 .....	39
6.5.1.3 Keyence Kompakt BZ 9000 .....	39
6.5.2 Elektronenmikroskopie .....	39
6.6 Magnetresonanztomographie (MRT).....	40
6.7 Statistik.....	40
7 Ergebnisse.....	41
7.1 Hyperoxie induzierte Volumenveränderung des Kleinhirns .....	41
7.2 Hyperoxie verursacht oxidativen Stress im unreifen Kleinhirn.....	41
7.3 Gliazellschädigung .....	42
7.3.1 Oligodendrozyten .....	42
7.3.1.1 Erhöhter Zelltod von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Kleinhirn nach Hyperoxie 42	
7.3.1.2 Verminderte Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	43
7.3.1.3 Hyperoxie stört die Reifung von Oligodendrozyten im Kleinhirn .....	44

7.3.1.4 Myelinisierungsdefizit nach erhöhter Sauerstoffexposition im Kleinhirn.....	45
7.3.2 Astrozyten .....	48
7.3.2.1 Hyperoxie hat keinen direkten Einfluss auf die Morphologie von Astrozyten im Kleinhirn .....	48
7.3.2.2 Veränderte Expression von astrozytären Wachstumsfaktoren nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	49
7.3.3 Mikroglia.....	51
7.3.3.1 Keine direkte Aktivierung von Mikroglia durch Hyperoxie im unreifen Kleinhirn .....	51
7.4 Neuronale Schädigung.....	54
7.4.1 Körnerzellen .....	54
7.4.1.1 Erhöhter Zelltod von unreifen Körnerzellen im IGL nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	54
7.4.1.2 Verminderte Proliferation von Körnerzell-Vorläuferzellen im EGL nach Hyperoxie.....	56
7.4.1.3 Fehlgesteuerte Regulierung der Proliferation von Körnerzell-Vorläuferzellen im EGL nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	56
7.4.1.4 Eine erhöhte Sauerstoffexposition hat keinen Einfluss auf die Migration von unreifen Körnerzellen des EGLs in den IGL .....	58
7.4.1.5 Hyperoxie induzierte eine anhaltende Schädigung der Körnerzellen im Kleinhirn .....	59
7.4.2 Purkinjellen .....	60
7.4.2.1 Verminderte Expression von SHH in Purkinjellen des Kleinhirns nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	60
7.4.2.2 Hyperoxie hat keinen Einfluss auf die Anzahl von Purkinjellen im Kleinhirn .....	61
7.4.2.3 Erhöhte Sauerstoffexposition stört die Reifung von Purkinjellen im Kleinhirn .....	63
7.4.2.4 Hyperoxie vermindert die GABA-Synthese im neonatalen Kleinhirn.....	65
8 Diskussion .....	67
8.1 Vermindertes Kleinhirnvolumen und Hyperoxie.....	67
8.2 Fehlerhafte Myelinisierung nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	68
8.3 Gestörte Glia-Glia-Interaktion und fehlerhafte Myelinisierung des Kleinhirns .....	69
8.4 Gestörte neuronale Interaktion und fehlerhafte Neurogenese des Kleinhirns .....	72
8.5 Gestörte Glia-Neuronen-Interaktion des Kleinhirns .....	75
8.6 Die Purkinjelle als zentraler Regulator der postnatalen Kleinhirnentwicklung.....	78
8.7 Ausblick.....	79
9 Erklärung.....	82
10 Danksagung .....	83
11 Literatur .....	84
12 Anhang.....	107
Abbildungsverzeichnis.....	107
Tabellenverzeichnis.....	107

Abkürzungsverzeichnis .....	108
Publikationsliste .....	110
Posterbeiträge .....	110

## 1 Abstract

Former preterm infants often suffer from impaired postnatal brain development. In general, brain injury is reported to be caused by hypoxia/ischemia, infection/inflammation and hyperoxia. Due to recent insights, pathologies of the cerebellum can often be found, too. Preterm birth seems to be associated with a reduction of the cerebellar volume and decreased cell density in the cerebellar cortex. However, the mechanisms of cerebellar injuries are poorly understood. Directly after human birth, the arterial oxygen tension of the newborn increases by three- to fourfold. In preterm infants, the rise of oxygen concentration caused by premature birth into room air hits the immature cerebellum at a vulnerable phase of dynamic growth nearly unparalleled elsewhere in the brain with highly increased precursor proliferation. In this study, it was analyzed whether postnatal hyperoxia perturbs cerebellar growth and affects white matter and neuronal development.

Newborn rats were exposed to 24 hours 80% O<sub>2</sub> from postnatal day 6 (P6) to postnatal day 7 (P7) to mimic the sharp increase of oxygen tension. Cerebellar injury was analyzed by Magnetic Resonance Imaging, quantitative Real-time PCR, Western blot, ELISA and immunohistochemistry at the ages P7, P11 and P30.

Hyperoxia resulted in a reduction of cerebellar volume together with long term white matter damage and impaired neuronal development. Decreased proliferation and increased cell death of oligodendroglial precursor cells led to a myelination deficit. A lack in granule cell survival and impaired granule cell precursor proliferation resulted in a long-term injury of cerebellar granule cells. Cerebellar injury was triggered by impaired astrocytic growth factor supply, as indicated by results of cell culture experiments and *ex vivo* analysis with a reduction of PDGFA and BDNF as important regulating factors. The affection of the cerebellar Purkinje cells by hyperoxia resulted in delayed development including impairment of dendrite growth and neuronal branching. Moreover, Purkinje cell SHH expression and GABA secretion were reduced by postnatal hyperoxia. In the cerebellum postnatal precursor proliferation is regulated by SHH. These results indicate that reduction of SHH expression contributed at least partially to the impaired precursor proliferation and that cerebellar morphogenesis is altered by the lower GABA level.

Neonatal injury induced by hyperoxia alters the regulatory program of the postnatal cerebellar development by the inhibition of Purkinje cell function and the impairment of glial and neuronal crosstalk. As a conclusion, the maldevelopment of the cerebellum found in preterm infants can be caused by postnatal oxygen toxicity.

## 2 Zusammenfassung

Frühgeborene Kinder leiden im Laufe ihrer Entwicklung häufig an einer Störung der funktionellen und strukturellen Reifung des Gehirns. Diese Defizite werden im Allgemeinen durch Hypoxie/Ischämie, Infektionen und Endzündungen, aber auch durch Hyperoxie verursacht.

Bei vielen unreif geborenen Kindern kommt es dabei auch zu einer Beeinträchtigung des Kleinhirns in Form einer Volumenreduktion und einer veränderten Zelldichte in der Kleinhirnrinde. Die Ursachen für diese Entwicklungsstörung sind kaum beschrieben.

Als eine mögliche Ursache kommt eine Toxizität oder Dysregulation durch den zu früh eintreffenden Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks direkt nach der Geburt infrage. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das unreife Kleinhirn des Fötus bzw. von extrem frühgeborenen Kindern in einer Wachstumsphase, die in keiner anderen Hirnregion zu finden ist. Eine hohe Anzahl unreifer Vorläuferzellen zeigt eine hohe Proliferationsaktivität, unreife Vorläuferzellen sind gegenüber drastischen Umweltveränderungen sehr vulnerabel.

Um den starken Anstieg des Sauerstoffangebots, der im Fötus bei Frühgeburt unter Raumluft auftreten kann, im experimentellen Modell zu imitieren, wurden neugeborene Ratten von Tag sechs bis Tag sieben nach der Geburt (P6 bis P7) mit 80% Sauerstoff inkubiert. Der sehr unreife Zustand des Gehirns wird in diesem Alter der Tiere oftmals verglichen mit der Unreife der Gehirne von extrem Frühgeborenen. In der aktuellen Studie im Hyperoxiemodell wurde eine Beeinträchtigung der Kleinhirnentwicklung mittels Magnetresonanztomographie, quantitativer Real Time PCR, Western Blot, ELISA und Immunhistochemie zu den Entwicklungszeitpunkten P7, P11 und P30 analysiert. Der Hauptfokus lag hierbei zum einen auf der Entwicklung der weißen Substanz und zum anderen auf der neuronalen Entwicklung der Kleinhirnrinde.

Die neonatale Hyperoxie induzierte bei den Ratten eine Verminderung des Kleinhirnvolumens, die von einer andauernden Schädigung der weißen Substanz und einer gestörten Entwicklung der Kleinhirnneurone begleitet wurde. Durch eine verminderte Proliferationsrate und einem erhöhten Zelltod von Vorläuferzellen der für die Myelinisierung verantwortlichen Oligodendrozyten kam es zu einem signifikanten Myelinisierungsdefizit. Die erhöhte Apoptose von unreifen Körnerzellen sowie die verminderte Proliferation der Vorläufer der Körnerzellen führten zu einer dauerhaften Schädigung dieser neuronalen Population.

Die gestörte Entwicklung des Kleinhirns wurde durch eine verminderte Expression von astrozytären Wachstumsfaktoren mit induziert. Die *in vivo* detektierte Reduktion von PDGFA und BDNF konnte *in vitro*, sowie *ex vivo* in Astrozyten bestätigt werden.

Die zusätzlich verzögerte Reifung der Purkinjezellen, mit einer gestörten neuronalen Verzweigung und einem verzögerten Auswuchs der Dendriten, führte zu einer verminderten Expression von SHH sowie

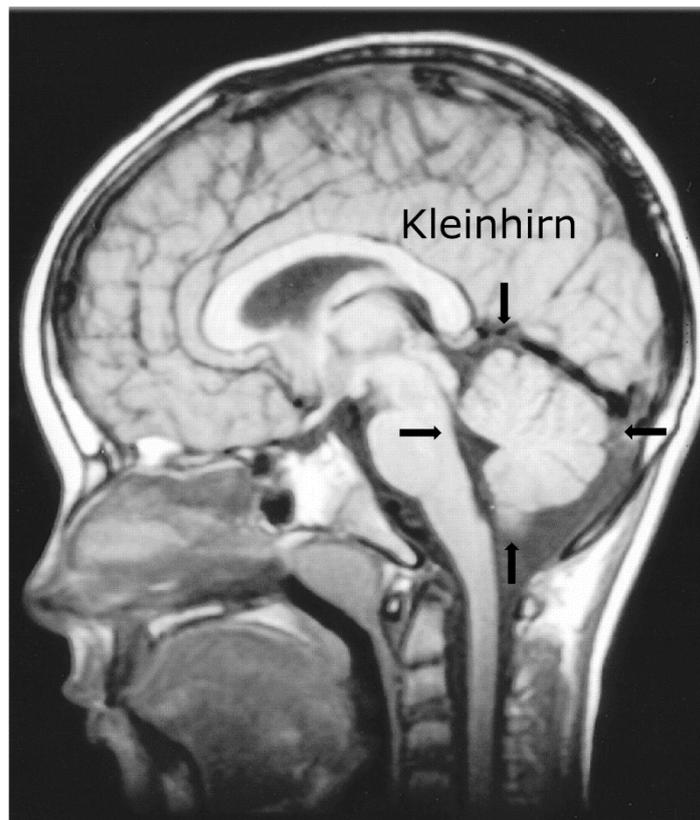
einer reduzierten Sekretion von GABA. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wird die Proliferation von Vorläuferzellen im Kleinhirn von SHH stimuliert. Die verminderte Expression von SHH konnte demnach mit der gestörten Proliferation der Vorläuferzellen in Verbindung gebracht werden. Zusätzlich kann die allgemeine Entwicklung des Kleinhirns durch die reduzierte GABA-Konzentration beeinträchtigt worden sein.

Die durch Hyperoxie induzierte Schädigung hemmt die Funktion der Purkinjezellen und stört die Interaktion von Gliazellen und Neuronen. Sauerstoff kann demnach eine Ursache der gestörten Kleinhirnentwicklung bei sehr unreifen Frühgeborenen sein.

## 3 Einleitung

### 3.1 Das Kleinhirn

Das Kleinhirn oder Cerebellum ist eine Hirnstruktur, die sich an der Rückseite des Gehirns befindet. Direkt unterhalb des Occipitallappens und des Temporallappens ist es in der hinteren Schädelgrube gelagert (Abb. 1) (DUVERNOY, 1995). Obwohl es nur 10% des Gesamtvolumens des Gehirns ausmacht, enthält es ca. 80% aller Neuronen des Gehirns (HERCULANO-HOUZEL, 2010; RÖSSERT u. a., 2015). Artübergreifend kommen durchschnittlich 3,6 Neurone im Kleinhirn auf 1 Neuron im Großhirn (HERCULANO-HOUZEL, 2010). Dies ist insbesondere auf die immense Anzahl an Körnerzellen zurückzuführen (RÖSSERT u. a., 2015) und wird durch die spezielle Struktur des Kleinhirns ermöglicht. Durch eine kompakte Faltung der Folia kommt es zu einer, gemessen am Volumen des Kleinhirns, überproportional großen Oberfläche (SUDAROV & JOYNER, 2007; WELKER, 1990).



**Abbildung 1: MRT Aufnahme eines Gehirns**

MRT Aufnahme des Gehirns eines gesunden 8-jährigen Jungen mit der Hervorhebung des Kleinhirns (modifiziert nach VAN DER KNAAP u. a., 2002).

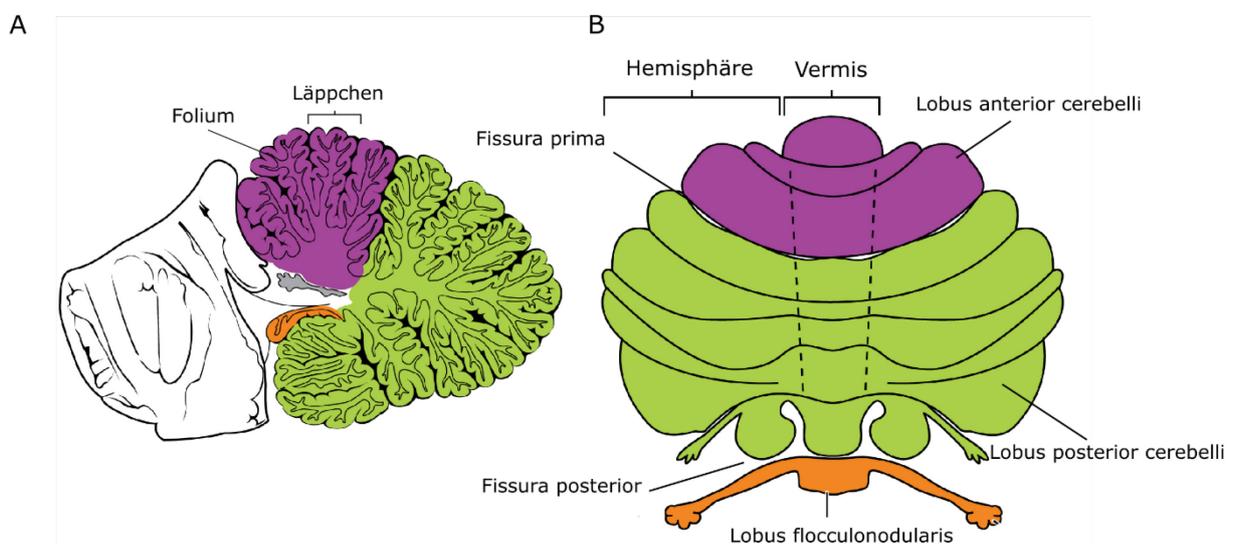
Das Kleinhirn spielt eine essenzielle Rolle bei der Kontrolle der Motorik. Darüber hinaus ist das Kleinhirn nicht nur eine Prozessoreinheit, die verschiedene Signale verarbeitet um Bewegungsabläufe zu koordinieren (WANG u. a., 2014), sondern es ist auch an kognitiven Funktionen wie Aufmerksamkeit, Lernverhalten und Sprache beteiligt (LAMETTI u. a., 2016; STEINLIN, 2008; STOODLEY u. a., 2012). Neuste

Studien gehen davon aus, dass das Kleinhirn sogar an Emotionen wie Freude und Angst beteiligt ist (ADAMASZEK u. a., 2016).

### 3.2 Der Aufbau des Kleinhirns

Strukturell lässt sich das Kleinhirn in mehrere Regionen unterteilen. Es besteht aus einem Mittelteil, der Vermis, die links und rechts jeweils von einer Hemisphäre des Kleinhirns flankiert wird (Abb. 2B). Die Kleinhirnrinde, die das Kleinhirn bedeckt, ist eng gefaltet. Eine einzelne Faltung wird Folium genannt. Mehrere Folia bilden ein Läppchen (Abb. 2A). Die Läppchen werden durch die Fissuren getrennt.

Jedes Läppchen hat eine mediane Region in der Vermis und eine laterale Region in den Hemisphären. Das Kleinhirn von Säugetieren und Vögeln wird üblicherweise in drei Lobi unterteilt, die weiter in 10 Läppchen (I-X) untergliedert werden. Die Läppchen laufen in den Lobus anterior cerebelli, den Lobus posterior cerebelli und den Lobus flocculonodularis zusammen. Lobus anterior cerebelli und Lobus posterior cerebelli werden durch die Fissura prima getrennt, Lobus posterior cerebelli und Lobus flocculonodularis durch die Fissura posterior (Abb. 2B) (DUVERNOY, 1995; MARZBAN u. a., 2014).



**Abbildung 2: Aufbau des Kleinhirns**

A) Sagittale Ansicht auf das Zentrum des Kleinhirns mit der Kennzeichnung eines Foliums und eines Läppchens  
 B) Draufsicht auf das Kleinhirn mit der Unterteilung in Hemisphäre und Vermis sowie die Bezeichnungen der Lobuli und der wichtigsten Fissuren (modifiziert nach B.C. Open Textbook, Anatomy and Physiology, OpenStax).

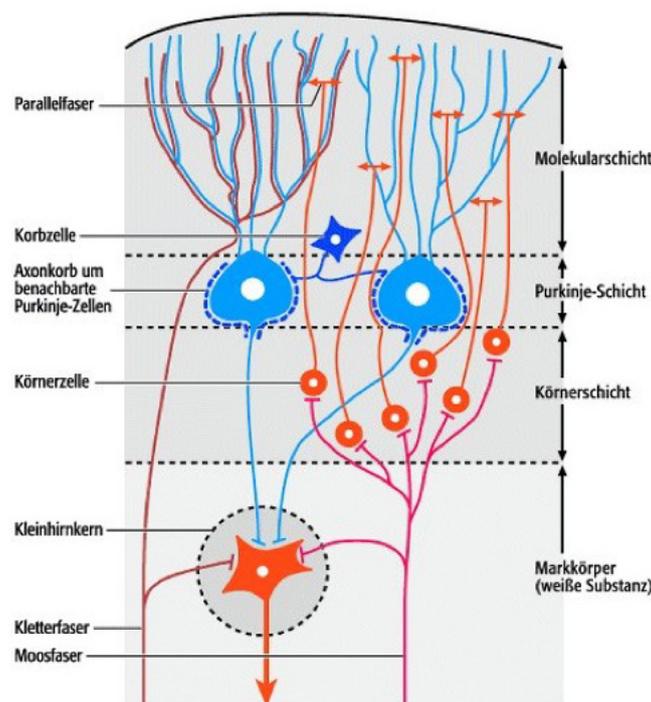
Funktionell wird das Kleinhirn in drei Untereinheiten eingeteilt. Das Spinocerebellum umfasst anatomisch die Vermis und angrenzende Bereiche (KOPPEN u. a., 2016; NEDELESCU u. a., 2016). Hauptaufgabe des Spinocerebellums ist die Regulierung der Bewegungen und des Gleichgewichts (NEDELESCU u. a., 2016). Das Cerebrocerebellum bildet die beiden Hemisphären (KOPPEN u. a., 2016). Es ist die größte funktionelle Untereinheit des Kleinhirns. Neben der Planung von Bewegungen und der Planung der zeitlichen Abfolge von Bewegungen ist das Cerebrocerebellum auch an kognitiven

Funktionen beteiligt (NEDELESCU u. a., 2016; RODRIGUES u. a., 2016; KANDEL, 2013). Das Vestibulocerebellum umfasst anatomisch den Lobus flocculonodularis (KOPPEN u. a., 2016). Neben der Verarbeitung der Informationen über die Körperlage ist das Vestibulocerebellum essenziell an der Steuerung der Augenbewegung beteiligt (SHELIGA u. a., 1999; STRAKA u. a., 2006; KANDEL, 2013).

Die Kleinhirnrinde (Kleinhirncortex) ist die zentrale Untereinheit des Kleinhirns. Unterhalb der Kleinhirnrinde befindet sich die weiße Substanz des Kleinhirns. In dieser befinden sich die Neurone der Kleinhirnkerne (GLICKSTEIN u. a., 2011). Beim Menschen unterscheidet man vier Kleinhirnkerne (DIMITROVA u. a., 2002).

Die Kleinhirnrinde ist in ihrem Aufbau die wahrscheinlich am besten beschriebene Region des zentralen Nervensystems (Abb. 3) (HARVEY & NAPPER, 1988). Sie ist strukturell in drei Untereinheiten unterteilt. Die **molekulare Schicht** (Molecular Layer, der ML) enthält die ML-spezifischen GABAergen Interneurone (Korb- und Sternzellen). Der ML befindet sich oberhalb der **Purkinjezell-Schicht** und wird von den Dendriten der Purkinjezellen durchzogen. Unterhalb der Purkinjezell-Schicht befindet sich die **Körnerzellschicht**. In der Körnerzellschicht sind Körnerzellen die dominante Zellpopulation. Sie erhalten hier, genauso wie die Golgi-Zellen, ihre afferenten Signale von den Moosfasern. Im unreifen Kleinhirn wird die Körnerzellschicht in die *innere* und die *äußere Körnerzellschicht* unterteilt. In der äußeren Körnerzellschicht proliferieren im unreifen Kleinhirn die Körnerzell-Vorläuferzellen. Die äußere Körnerzellschicht ist oberhalb des ML angesiedelt. Sie verschwindet allerdings im reifen Kleinhirn. Die innere Körnerzellschicht bildet in adulten Tieren die Körnerzellschicht. (CHANG u. a., 2015; D'ANGELO u. a., 2011; GLICKSTEIN u. a., 2011; GOLDOWITZ & HAMRE, 1998; VOOGD & GLICKSTEIN, 1998; WHITE & SILLITOE, 2013).

Neben den Neuronen, die an der elektrischen Übertragung und der Informationsverarbeitung direkt beteiligt sind, stellen die Gliazellen eine weitere, sehr große Zellpopulation im zentralen Nervensystem (ZNS) dar. Die am weitesten verbreiteten Gliazellen sind Astrozyten und Oligodendrozyten (auch: Astroglia und Oligodendroglia) (JESSEN, 2004). Spezifisch für das Kleinhirn sind die Bergmann-Glia, ein Subtyp der Astrozyten, der sehr stark mit den Purkinjezellen assoziiert ist (BUFFO & ROSSI, 2013). Ein weiterer Subtyp der Gliazellen sind die Mikroglia. Dabei handelt es sich um Makrophagen-ähnliche Zellen des Immunsystems, die aus Monozyten des Bluts entstammen und mit der beginnenden Vaskularisierung des ZNS in das Gehirn einwandern (HARRY & KRAFT, 2012; JESSEN, 2004; KETTENMANN u. a., 2011).



**Abbildung 3: Querschnitt durch die reife Kleinhirnrinde und durch die weiße Substanz des Kleinhirns**

Querschnitt durch die Kleinhirnrinde und durch die weiße Substanz des Kleinhirns mit den anregenden (rot) und hemmenden (blau) neuronalen Verschaltungen. (Quelle: Lexikon der Neurowissenschaft - Spektrum der Wissenschaft)

### 3.3 Die Entwicklung des Kleinhirns

#### 3.3.1 Exponentielles Wachstum des Kleinhirns im letzten Trimenon der Schwangerschaft

Die Entwicklung des menschlichen Gehirns beginnt in der dritten Schwangerschaftswoche mit der Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen und erstreckt sich zumindest bis ins späte Erwachsenenalter, wenn nicht sogar über die gesamte Lebensdauer (STILES & JERNIGAN, 2010). Während des ersten Monats der Schwangerschaft kommt es zur Anlage des Kleinhirns (TEN DONKELAAR u. a., 2003; VOLPE, 2009a).

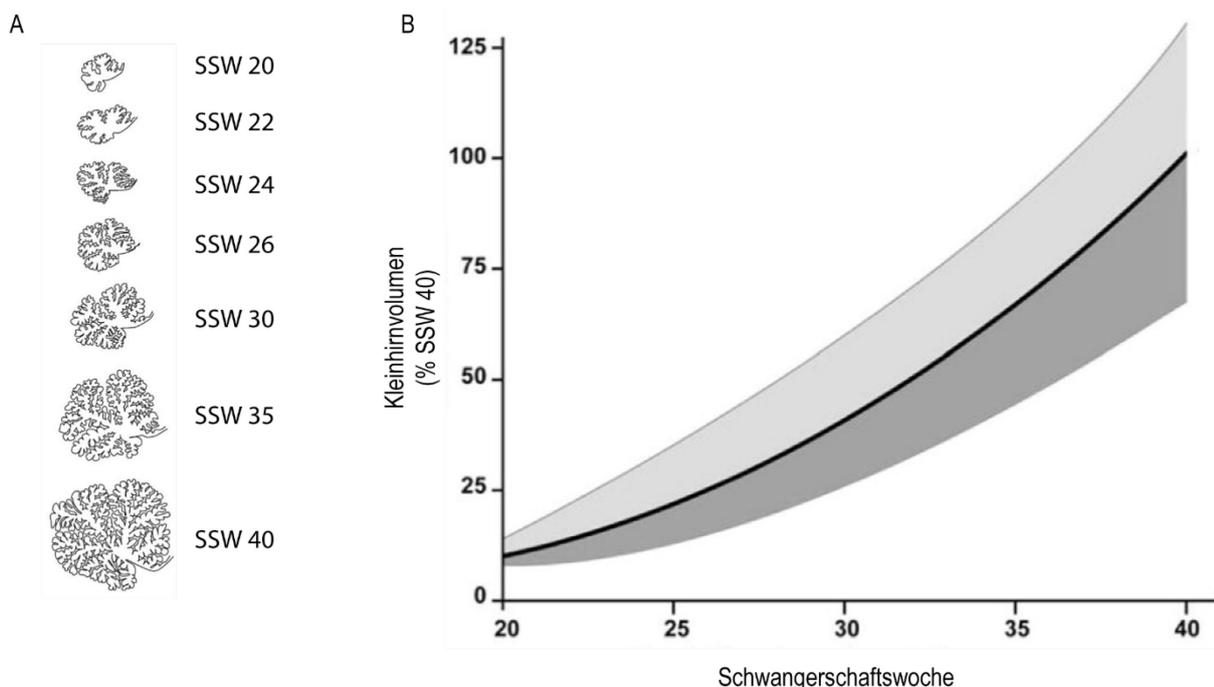
Für die Entwicklung des Kleinhirns ist die Ausbildung von zwei unterschiedlichen proliferativen Zonen wichtig (TEN DONKELAAR u. a., 2003; VOLPE, 2009a). Die dorsomediale ventrikuläre Zone bildet den Ursprung der Purkinjezellen, der Interneurone, der Kleinhirnkern, der Golgizellen sowie der Korb- und Sternzellen. Alle Neurone, die der ventrikulären Zone (VZ) entstammen, sind GABAerge Neurone. Die zweite proliferative Zone, die rhombische Lippe, ist Ursprung aller glutamatergen Neurone des Kleinhirns. Der rhombischen Lippe entstammen Neurone der Kleinhirnkern und die Vorläufer der Körnerzellen. Die Vorläufer der Körnerzellen bilden die äußere Körnerzellschicht (external granular layer, der EGL). Reifende neuronale Vorläuferzellen des EGLs bilden mit fortlaufender Entwicklung die innere Körnerzellschicht (internal granular layer, der IGL) (CARLETTI & ROSSI, 2008; FINK u. a., 2006; VOLPE, 2009a). Vorläuferzellen der Oligodendrozyten migrieren während der frühen embryonalen Entwicklung aus dem ventralen Mittelhirn in das sich entwickelnde Kleinhirn (MECKLENBURG u. a., 2011).

Ein geringer Anteil, etwa 6% aller Oligodendrozyten, entstammt der ventrikulären Zone des Kleinhirns (HASHIMOTO u. a., 2016).

Astrozyten haben ihren Ursprung im ventrikulären Neuroepithelium des embryonalen Kleinhirns (BUFFO & ROSSI, 2013).

Nach der Beendigung der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) beschleunigt sich das Wachstum des Kleinhirns (Abb. 4A, B) (VOLPE, 2009a). Die neuronalen Vorläuferzellen im EGL sind hochproliferativ. Der EGL erreicht seinen maximalen Durchmesser bis SSW 25 (CARLETTI & ROSSI, 2008).

Im letzten Trimenon der Schwangerschaft, von SSW 24 bis SSW 40, erreicht das Kleinhirn eine Wachstumsrate, die in keiner anderen Gehirnregion zu finden ist (VOLPE, 2009a). In dieser Entwicklungsphase des exponentiellen Wachstums verfünffacht sich das Volumen des Kleinhirns (CHANG u. a., 2000). Die Oberfläche nimmt aufgrund der voranschreitenden Faltung der Folia um mehr als das 30-fache zu (VOLPE, 2009a) (Abb. 4A, B).



**Abbildung 4: Wachstum des Kleinhirns ab der 20. Schwangerschaftswoche**

A) Die Zunahme der Oberfläche des unreifen Kleinhirns von der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) bis zum Ende der Schwangerschaft (SSW 40).

B) Die Zunahme des Kleinhirnvolumens von SSW 20 bis SSW 40. Die mittlere Kurve zeigt das durchschnittliche Wachstum des Kleinhirns, die obere das Wachstum der oberen 5% und die untere Kurve das der unteren 5% (modifiziert nach VOLPE, 2009a).

### 3.3.2 Die Entwicklung von Oligodendrozyten

Während der embryonalen und fetalen Gehirnentwicklung migrieren Vorläuferzellen von Oligodendrozyten (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) aus verschiedenen Germinal-Regionen in das Hirngewebe (MITEW u. a., 2014). Ein Großteil der Oligodendrozyten des Kleinhirns stammt aus dem ventralen Mittelhirn. OPCs wandern über das Marksegel (Velum medullare) in das Kleinhirn ein (MECKLENBURG u. a., 2011). Nur ein sehr geringer Anteil der Oligodendrozyten entstammt der

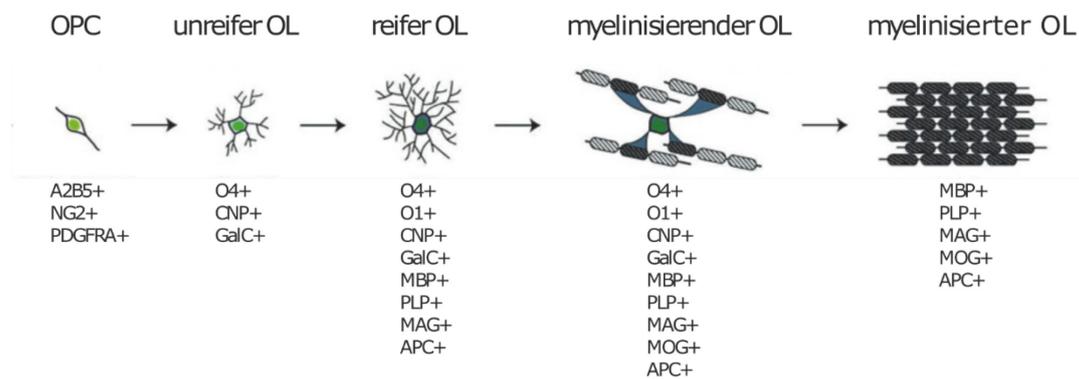
ventrikulären Zone des Kleinhirns (HASHIMOTO u. a., 2016). Während der Entwicklung sind die OPCs hoch proliferativ. Die Proliferation von OPCs wird durch extrazelluläre Signale gesteuert, die zum größten Teil die Differenzierung unterbinden (CUI u. a., 2010; WANG u. a., 2007). Das wahrscheinlich wichtigste Mitogen für das Überleben von OPCs ist der Platelet-derived growth factor A (PDGFA) (FRUTTIGER u. a., 1999; MITEW u. a., 2014). Die Expression des PDGFA-Rezeptors (PDGFRA) ist spezifisch für OPCs (PRINGLE u. a., 1992). Die Proliferationsrate von OPCs ist ebenfalls PDGFA-abhängig (CALVER u. a., 1998; FRUTTIGER u. a., 1999; MITEW u. a., 2014). Auch das Mitogen Sonic hedgehog (SHH) ist essenziell für die Proliferation von OPCs und spielt auch in der adulten Genese von Oligodendrozyten eine wichtige Rolle (BOUSLAMA-OUEGLANI u. a., 2003, , 2012; FERENT u. a., 2013).

Die Reifung von Oligodendrozyten wird durch mehrere Faktoren gesteuert. Neben der Unterbindung von pro-proliferativen Signalwegen (MITEW u. a., 2014) spielen die Schilddrüsenhormone Triiodo-L-thyronin (T3) und Thyroxin (T4) eine essenzielle Rolle (BARRES u. a., 1994; LOURENÇO u. a., 2016).

Die OPCs gehen in eine postmitotische Phase über und differenzieren zu prä-myelinisierenden Oligodendrozyten. Bei der humanen Gehirnentwicklung können unreife Oligodendrozyten in dieser Phase mehrere Monate verweilen (BACK u. a., 2002). Weitere Reifungsschritte werden nach dem Kontakt mit einem Axon eingeleitet (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001). Für die Myelinisierung der Axone bilden Oligodendrozyten mehrere Myelin-Komponenten, unter anderem das Myelin-Basisches Protein (MBP) (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001; BIJLARD u. a., 2015). Mit der Aktivierung der Nonreceptor-Tyrosinkinase Fyn wird die Myelinisierung der Axone eingeleitet (KRÄMER-ALBERS & WHITE, 2011). Ein reifer Oligodendrozyt myelinisiert bis zu 40 Axone (MITEW u. a., 2014).

Während der voranschreitenden Differenzierung exprimieren Oligodendrozyten spezifisch unterschiedliche, membrangebundene und intrazelluläre Marker, die Rückschlüsse auf den Reifegrad zulassen (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001) (Abb. 5).

Neben den beschriebenen Prozessen sind weitere Neuron-Glia-Interaktionen und Glia-Glia-Interaktionen (CLEMENTE u. a., 2013; SIMONS & TRAJKOVIC, 2006) von großer Bedeutung für die Entwicklung von Oligodendrozyten. Speziell im Kleinhirn werden verschiedene Entwicklungsphasen der Oligodendrozyten durch das Ausschütten verschiedener Faktoren durch Purkinjezellen reguliert (BOUSLAMA-OUEGLANI u. a., 2012). Purkinjezellen exprimieren SHH für die Stimulation der Proliferation und später Vitronectin (VTN), um eine Reifung der OPC zu induzieren (BOUSLAMA-OUEGLANI u. a., 2012). Astrozyten exprimieren unter anderem PDGFA, um, wie bereits beschrieben, die Proliferation und das Überleben von OPCs zu stimulieren (CLEMENTE u. a., 2013; FRUTTIGER u. a., 1999; WILSON u. a., 2003).



**Abbildung 5: Die Reifung von Oligodendrozyten**

Die Reifung vom OPC über den unreifen Oligodendrozyt (OL), zum reifen OL, zum myelinisierenden OL und zum myelinisierten OL mit der Expression der unterschiedlichen Reifungsmarker (modifiziert nach CAI u. a., 2010).

### 3.3.3 Die Entwicklung von Astrozyten

Astrozyten weisen in ihrer Funktion und in ihrer Morphologie eine hohe Diversität auf. Astrozyten bilden den Kontakt zu den Blutgefäßen und steuern so die Blut-Hirn-Schranke. Sie haben aber auch Kontakt zu einzelnen Synapsen und modifizieren die synaptische Übertragung durch eigene Signale (JESSEN, 2004). Während der Gehirnentwicklung generieren sie essenzielle Faktoren, wie BDNF, PDGFA und CNTF für die Proliferation und Reifung anderer Gliazellen und neuronaler Zellen (BELLAMY, 2006; BROWN & RANSOM, 2007; CLEMENTE u. a., 2013; XU u. a., 2013).

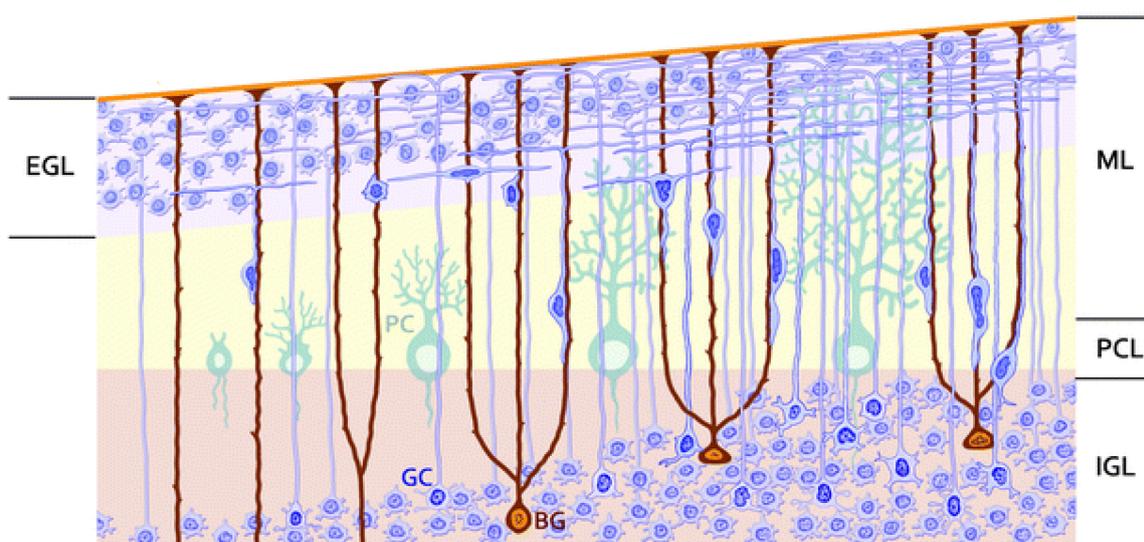
Ein Großteil der Astrozyten des Kleinhirns wird in der späten embryonalen Entwicklung desselben im ventrikulären Neuroepithelium gebildet. Astrozyten migrieren deutlich später als die Vorläufer der GABAergen Neurone aus der ventrikulären Zone in das sich entwickelnde Kleinhirngewebe (BUFFO & ROSSI, 2013). Dass Astrozyten auch einen Ursprung in der zweiten proliferativen Zone des Kleinhirns, der sogenannten rhombische Lippe (RL), haben, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. *In vitro*-Versuche zeigten, dass die Vorläuferzellen der RL das Potential haben zu Astrozyten zu differenzieren, *in vivo* konnte dies allerdings bislang nicht bestätigt werden (BUFFO & ROSSI, 2013).

Die morphologische Reifung der Astrozyten ist eng gebunden an deren Funktionen. Ein Mechanismus, der diesen Prozess reguliert, ist noch weitestgehend unerforscht (FREEMAN, 2010; MOLOFSKY & DENEEN, 2015). Es wird davon ausgegangen, dass die Morphologie und das Antigenprofil von Astrozyten stark abhängig von den Einflüssen der Neurone des Kleinhirns sind (BUFFO & ROSSI, 2013). Morphologisch lassen sich die Astrozyten der Kleinhirnrinde in drei Subtypen unterteilen. Die buschigen protoplasmatischen Astrozyten und die dünnen, langfaserigen protoplasmatischen Astrozyten sind im gesamten Gehirn verbreitet. Spezifisch für das Kleinhirn ist die Ausbildung der Bergmann-Glia (YAMADA & WATANABE, 2002). Die anatomische und funktionelle Entwicklung der Bergmann-Glia ist stark mit den Purkinjezellen assoziiert (BELLAMY, 2006).

### 3.3.4 Die Entwicklung von Körnerzellen

Körnerzellen sind mit durchschnittlich nur vier kurzen Dendriten die kleinsten Neurone des Gehirns (CHADDERTON u. a., 2004). Ihren Ursprung haben die glutamatergen Körnerzellen (granule cells, GCs) in der rhombischen Lippe. Während der embryonalen und fetalen Entwicklung migrieren Körnerzell-Vorläufer (granule cell precursors, GCPs) rostral über die Oberfläche der Kleinhirnanlagen und bilden den EGL (CARLETTI & ROSSI, 2008; FINK u. a., 2006; HATTEN & HEINTZ, 1995). Der EGL wird nur temporär angelegt und verschwindet im Laufe der Entwicklung (Abb. 6). Bei der humanen Entwicklung des Kleinhirns wird der EGL nach der 8. SSW angelegt (MARZBAN u. a., 2014). Die GCPs sind hoch proliferativ (CARLETTI & ROSSI, 2008). Gesteuert wird die Proliferation der GCPs im EGL über die Sekretion von SHH durch Purkinjezellen (WECHSLER-REYA & SCOTT, 1999). SHH hat direkten Einfluss auf die Zellteilung der GCPs. SHH induziert die Expression von N-Myc, Cyclin D1 und Cyclin D2, die wiederum den Zellzyklus aktivieren und die DNA-Replikation initiieren (KENNEY & ROWITCH, 2000; KENNEY u. a., 2003; KNOEPFLER u. a., 2002; OLIVER u. a., 2003). Ein aktiver NOTCH-Signalweg kann die GCPs im Vorläuferstadium halten, um die Differenzierung zu unterbinden und somit die Proliferation zu fördern (SOLECKI u. a., 2001). Die Reifung der GCPs kann durch den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (Fibroblast Growth Factor 2, FGF2) induziert werden. FGF2 blockiert den SHH-Signalweg und unterbindet somit die Proliferation (FOGARTY u. a., 2007; YU u. a., 2011). Auch knochenmorphogenetische Proteine (Bone morphogenetic proteins, BMPs) sind in der Lage die SHH induzierte Proliferation der GCPs zu unterbinden und die Reifung zu induzieren (BEHESTI & MARINO, 2009).

Unreife GCs aus dem EGL migrieren entlang der Fasern der Bergmann-Glia durch den ML und die Purkinjezellschicht und formen den IGL. Im IGL wird die Reifung der GCs beendet (Abb. 6) (VAILLANT & MONARD, 2009).



**Abbildung 6: Reifung und Migration von Körnerzellen in der Kleinhirnrinde**

Die Vorläufer der Körnerzellen proliferieren im EGL. Unreife GCs migrieren aus dem EGL entlang der Fasern der Bergmann-Glia (BG) durch die molekulare Schicht (ML) sowie die Purkinjezell-Schicht (PCL) und bilden den IGL. Mit dem Voranschreiten der Reifung des Kleinhirns verschwindet der EGL (modifiziert nach Xu u. a., 2013).

### 3.3.5 Die Entwicklung von Purkinjezellen

Purkinjezellen (PCs) erhalten ihre Signale aus dem Kleinhirn und von ZNS-Strukturen außerhalb des Kleinhirns. Sie sind die einzigen Zellen der Kleinhirnrinde, die Signale über die tiefen Kleinhirnerne in das ZNS weiterleiten (CHAN-PALAY, 1971; WATT u. a., 2009). Sie sind somit von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Kleinhirns.

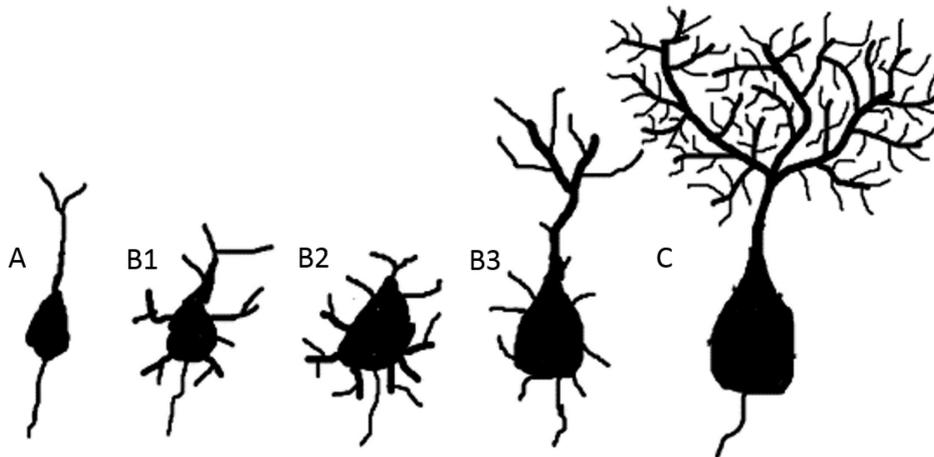
Ihren Ursprung haben die GABAergen PCs in der ventrikulären Zone (VZ) des Kleinhirns (YUASA u. a., 1991). Dort durchlaufen sie ihre terminale Mitose in der embryonalen Entwicklung und migrieren als post-mitotische Zellen als eine der ersten Neuronenfraktionen in das sich entwickelnde Kleinhirn (DASTJERDI u. a., 2012; WATT u. a., 2009). In der Kleinhirnrinde bilden sie eine ein-Zell-dicke Schicht (GOLDOWITZ & HAMRE, 1998). Mit fortschreitender Entwicklung reifen die Purkinjezellen und bilden den für sie typischen dendritischen Baum aus (MCKAY & TURNER, 2005; SIMONS & TRAJKOVIC, 2006).

Die Ausbildung der Dendriten ist sowohl abhängig von intrinsischen genetischen Programmen, als auch von Faktoren (u. a. Neurotrophine und Neurotransmitter), die von anderen Zellen in den ML sekretiert werden, in dem sich die PC-Dendriten verzweigen (KAPFHAMMER, 2004; KAWAGUCHI u. a., 2010; METZGER, 2010). Jede Purkinjezelle steht im Kontakt mit circa acht Bergmann-Glia. Die Interaktion mit den Bergmann-Glia ist essenziell für die Reifung der PCs (BELLAMY, 2006). Das Wachstum und die Auswuchsrichtung der Dendriten wird von den Bergmann-Glia geleitet (LORDKIPANIDZE & DUNAEVSKY, 2005). Neben der Interaktion mit den Bergmann-Glia ist auch die Wechselwirkung der Purkinjezellen mit den Körnerzellen entscheidend für die Reifung der PCs (MORRISON & MASON, 1998).

Auch die Neurotransmitter GABA und Glutamat spielen eine regulierende Rolle in der Entwicklung der PC-Dendriten (KAWAGUCHI u. a., 2010). Wesentlich für den Auswuchs der Dendriten sind Neurotrophine, wie der Gehirn stammende neurotrophe Faktor (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), Neurotrophin 3, Neurotrophin 4 und der Nervenwachstumsfaktor (KAPFHAMMER, 2004; METZGER, 2010). Aber auch andere Wachstumsfaktoren, wie der Ciliary neurotrophic factor und der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1, spielen eine entscheidende Rolle in der Reifung der Purkinjezellen (KAPFHAMMER, 2004).

Die Reifung der PCs und damit verbunden der Auswuchs der Dendriten lässt sich nach Ramon Y Cajal (RAMÓN Y CAJAL, 1909) in verschiedene Phasen einteilen (KAPFHAMMER, 2004). In der Phase der „fusiformen Zelle“ haben die Purkinjezellen nur ein Axon zu den tiefen Kleinhirnerne ausgebildet (Abb. 7A). Am Ende dieser Phase wird die Zellstruktur der PCs etwas komplexer. Es entstehen vereinzelte Verzweigungen an der Zelle (ARMENGOL & SOTELO, 1991; KAPFHAMMER, 2004). In der darauffolgenden Phase sind die PCs „sternförmig mit desorientierten Dendriten“. Dies ist die Phase, in der sich die PCs endgültig in einer ein-Zell-dicken Schicht orientieren. Der Auswuchs der Dendriten in den ML wird langsam beschleunigt (Abb. 7B1-B3) (KAPFHAMMER, 2004). In der „Phase der Orientierung und der Streckung der dendritischen Bäume“ wird der typische dendritische Baum der Purkinjezellen

gebildet. Der Auswuchs und die Verzweigung der Dendriten erreichen in dieser Phase ihre maximale Geschwindigkeit (Abb. 7C) (KAPFHAMMER, 2004). Noch während der Reifung und der Ausbildung der Dendriten fungieren Purkinjezellen als zentrale Regulatoren der Entwicklung des Kleinhirns und sind an sehr wichtigen Schritten der Entwicklung von zum Beispiel Bergmann-Glia (YAMADA & WATANABE, 2002), Körnerzellen (WECHSLER-REYA & SCOTT, 1999) und Oligodendrozyten (BUFFO & ROSSI, 2013) beteiligt.



**Abbildung 7: Die Phasen der dendritischen Entwicklung von Purkinjezellen**

Die Abbildung zeigt die Purkinjezellen des Kleinhirns in den unterschiedlichen Entwicklungsphasen nach Ramon y Cajal:

A) Fusiforme Zelle: Die Ansätze des dendritischen Baums sind nur teilweise ausgebildet.

B1-B3) Sternförmige Purkinjezellen mit desorientierten Dendriten: Es bilden sich vereinzelt Verzweigungen am Soma der Purkinjezelle, der Auswuchs des dendritischen Baumes ist am Ende der Phase zu erkennen.

C) Phase der Orientierung und der Streckung der dendritischen Bäume: Die Geschwindigkeit des Auswuchses der Dendriten und die Verzweigung der Dendriten ist auf ihrem Maximum. Die Struktur des dendritischen Baumes ist eindeutig zu erkennen (modifiziert nach KAPFHAMMER, 2004).

### 3.4 Der Sonic-hedgehog-Signalweg

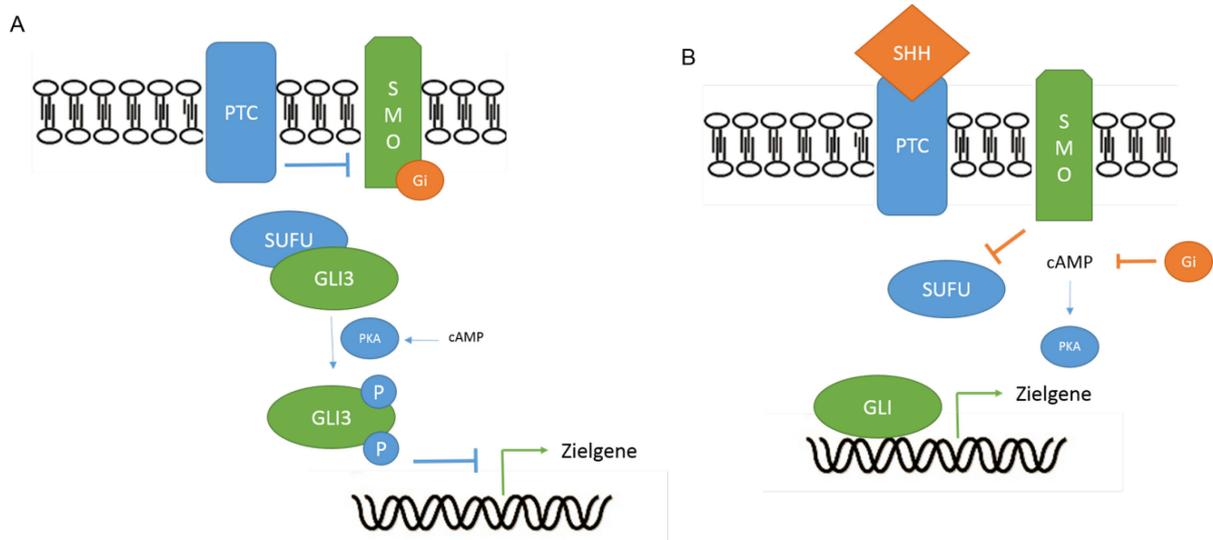
Bei Säugetieren gibt es drei paraloge Hedgehog-Gene: Indian hedgehog (IHH), das in erster Linie an der Knochendifferenzierung beteiligt ist, Desert-Hedgehog (DHH), das unter anderem bei der Differenzierung der Keimdrüsen eine essenzielle Rolle spielt und Sonic-Hedgehog (SHH) (ALMAN, 2015; O'HARA u. a., 2011).

SHH ist an sehr vielen Entwicklungsprozessen beteiligt und ist das am besten beschriebene Hedgehog-Gen (McMAHON u. a., 2003; VARJOSALO & TAIPALE, 2008). SHH spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Organen, Knochen und dem Gehirn (ALMAN, 2015; ÁLVAREZ-BUYLLA & IHRIE, 2014; BOHNENPOLL & KISPERS, 2014; KUGLER u. a., 2015). SHH wird als 45-kDa-Form translatiert und anschließend auto-proteolytisch gespalten. Die 26-kDa-Untereinheit des C-Terminus weist keine weitere Aktivität auf. Die 19-kDa-Untereinheit des N-Terminus fungiert als Signalmolekül. Nach der Addition von Cholesterin und Palmitat an die 19-kDa-Untereinheit wird diese membrangängig und ausgeschüttet (COHEN, 2003; DE LUCA u. a., 2015b; PORTER u. a., 1996).

Aktives SHH induziert die Genexpression der GLI-Transkriptionsfaktoren (GLI1-GLI3). Die GLI-Transkriptionsfaktoren induzieren die Genexpression von Faktoren, die den Zellzyklus aktivieren (DE LUCA u. a., 2015b; VAILLANT & MONARD, 2009).

Bindet aktives SHH an den Rezeptor PATCHED1 (PTC), wird die Inhibierung des Rezeptors SMOOTHENED (SMO) aufgehoben. SMO akkumuliert an der Zelloberfläche und deaktiviert den GLI3-Inhibitor SUFU (Suppressor of fused homolog) (CHOUDHRY u. a., 2014). Einzelne Studien konnten zusätzlich zeigen, dass über die Aktivierung von SMO ein Rezeptor-gekoppeltes inhibitorisches G-Protein aktiviert wird. Das aktive G-Protein ( $G_{\alpha i}$ ) stoppt die Bildung von cAMP und unterbindet somit die Aktivität der Proteinkinase A, wodurch die GLI3-Aktivität nicht mehr unterbunden wird (DECAMP u. a., 2000). GLI3 bildet einen Komplex mit GLI2 und induziert die Genexpression von GLI1. Der GLI-Komplex veranlasst die Expression von wichtigen Faktoren für die Proliferation (FUCCILLO u. a., 2006; HUANGFU & ANDERSON, 2006) (Abb. 8A, B).

Eine Beteiligung des morphogenetischen Faktors SHH bei der Kontrolle und Regulierung der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen wurde als erstes im Kleinhirn dokumentiert (VAILLANT & MONARD, 2009). Neben der Steuerung der Proliferation der Vorläuferzellen im EGL und damit verbunden die Ausbildung der Folia und Läppchen wirkt SHH auch regulierend auf die Proliferation und Reifung der Oligodendrozyten sowie der Bergmann-Glia im Kleinhirn (DE LUCA u. a., 2015b).



**Abbildung 8: SHH-Signalweg**

A) Ohne die Bindung von SHH an den Rezeptor PATCHED1 (PTC) blockiert dieser den Rezeptor SMOOTHENED (SMO). SUFU bindet an GLI3 und leitet somit die Phosphorylierung über die Proteinkinase A (PKA) ein. Phosphoryliertes GLI3 belegt die Promotorregionen der Zielgene des SHH-Signalwegs und unterbindet so die Transkription.

B) SHH bindet an den Rezeptor PTC und unterbindet damit die Blockierung von SMO. Über die Aktivierung von SMO wird ein Rezeptor-gekoppeltes inhibitorisches G-Protein aktiviert, das die Bildung von cAMP unterbindet und somit die Aktivität der PKA blockiert. SMO blockiert SUFU. GLI3 wird nicht mehr phosphoryliert. Der Komplex aus GLI1-GLI3 (GLI) leitet die Transkription der SHH-Zielgene ein.

### 3.5 Frühgeburt

Frühgeburt ist sowohl in den Industrie- als auch in den Entwicklungsländern eines der größten pädiatrischen Gesundheitsprobleme. Laut der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) werden jedes Jahr weltweit rund 15 Millionen Kinder zu früh geboren (KINNEY u. a., 2012; „WHO | Preterm birth“). Als Frühgeburt wird jede Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche bezeichnet. Frühgeburten werden in drei generelle Subtypen unterteilt:

1. extrem frühgeborene Kinder (<28 SSW oder Gewicht unter 1000 Gramm)
2. sehr frühgeborene Kinder (28 bis <32 SSW oder Gewicht unter 1500 Gramm)
3. mäßig bis spät frühgeborene Kinder (32 bis <37 SSW oder Gewicht unter 2500 Gramm)

(TUCKER & MCGUIRE, 2004; „WHO | Preterm birth“).

Aufgrund der weiterentwickelten medizinischen Versorgung konnte die Überlebensrate von frühgeborenen Kindern gesteigert werden. 75% aller Kinder, die zwischen der 22. und 28. SSW in den USA geboren werden, überleben heutzutage (PATEL u. a., 2015).

Die Ursachen einer Frühgeburt sind vielfältig. Neben Infektionen oder Entzündungen, utero-plazentaren Ischämien oder Blutungen, hohem Nikotin- oder Alkoholkonsum und Stress können auch andere immunologische Prozesse zu vorzeitigen Wehen führen (GOLDENBERG u. a., 2008).

### 3.6 Folgen der Frühgeburt

Trotz gesunkener Mortalität ist die Morbidität bei unreif geborenen Kindern deutlich höher als bei reif geborenen Kindern (COSTELOE u. a., 2012). Je unreifer das Kind, desto schwerwiegender können die Folgen sein (MOORE u. a., 2012). Insbesondere die Patienten, die vor Beendigung der 32. SSW geboren werden, leiden wesentlich häufiger unter den Folgen der Frühgeburt (TUCKER & MCGUIRE, 2004). Natürliche Schutzsysteme gegen äußere Stimuli sind bei sehr frühgeborenen Kindern noch nicht ausreichend ausgeprägt. Aufgrund eines wesentlich geringeren Fettgewebes sind sie besonders anfällig für Hyperthermien, aber auch Hypoglykämien (JAIN u. a., 2008; KUMAR u. a., 2009). Sehr frühgeborene Kinder sind anfälliger für Infektionen (HORNIK u. a., 2012; RAND u. a., 2016; STOLL u. a., 2004) und werden in ihrer Entwicklung durch nicht physiologische Sauerstoffkonzentrationen, Hypoxie-Ischämie oder Hyperoxie beeinträchtigt (BACK & MILLER, 2014; DEULOFEUT u. a., 2007; LEVITON u. a., 2010). Neben der negativen Wirkung auf die unreife Lunge ist davon besonders die Gehirnentwicklung beeinträchtigt (BECK u. a., 2010; HOWSON u. a., 2013; O'REILLY u. a., 2013). Funktionelle Störungen der Koordination, der Aufmerksamkeit, der Sprachentwicklung, des Verhaltens, des Sehvermögens und des Hörens können einzeln oder auch in Kombination als Folge der Schädigung des unreifen Gehirns auftreten (MARLOW u. a., 2005; MOORE u. a., 2012). Als Ursache hierfür wird auch die Schädigung der weißen Substanz beschrieben (BACK & MILLER, 2014). Neben der periventrikulären Leukomalazie (PVL) treten Mikrostrukturanomalien der weißen Substanz auf, die

während der voranschreitenden Gehirnentwicklung und bei ehemals sehr Frühgeborenen auch noch im Erwachsenenalter zu beobachten sind (ALLIN u. a., 2011; IWATA u. a., 2012; SKIÖLD u. a., 2012; THOMPSON u. a., 2011). Zusätzlich zu der Schädigung des Großhirns ist oft auch eine Schädigung des Kleinhirns zu beobachten. Eine Veränderung der weißen Substanz im Kleinhirn steht oft mit der Schädigung der weißen Substanz im Großhirn in Verbindung (LIMPEROPOULOS u. a., 2010). Häufig wird ein geringeres Volumen des Kleinhirns und eine geringere Zelldichte in den kortikalen Schichten des Kleinhirns beobachtet (BROSSARD-RACINE u. a., 2015; LIMPEROPOULOS u. a., 2005; VOLPE, 2009a). Eine Volumenreduktion des Kleinhirns kann auch noch im Erwachsenenalter von sehr frühgeborenen Kindern beobachtet und mit eingeschränkten motorischen und kognitiven Fähigkeiten in Verbindung gebracht werden (BROSSARD-RACINE u. a., 2015; KIM u. a., 2016). Traktographische MRT Untersuchungen belegen Störungen in der kognitiven und motorischen Entwicklung (SHANY u. a., 2016). In post-mortem Analysen von Kleinhirn-Gewebe Frühgeborener ist die Expression von SHH vermindert (HALDIPUR u. a., 2011). SHH ist essenziell für das normale Wachstum des unreifen Kleinhirns (DAHMANE & RUIZ | ALTABA, 1999). Die Ursachen für die Schädigung des Kleinhirns sind unzureichend beschrieben. Der Kontakt zu den unphysiologischen *ex utero* Bedingungen trifft das Kleinhirn von sehr unreif geborenen Kindern in einer sehr dynamischen Wachstumsphase. Zelluläre Entwicklungsprozesse sind zu diesem Zeitpunkt gegenüber unnatürlichen Stimuli sehr vulnerabel (HALDIPUR u. a., 2011; VOLPE, 2009a, , 2009b).

### 3.7 Sauerstofftoxizität

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung ist essenziell für das Überleben aller aeroben Organismen. Eine dauerhaft erhöhte Sauerstoffexposition ist wiederum ein Risikofaktor für Gewebeschäden (JENKINSON, 1993).

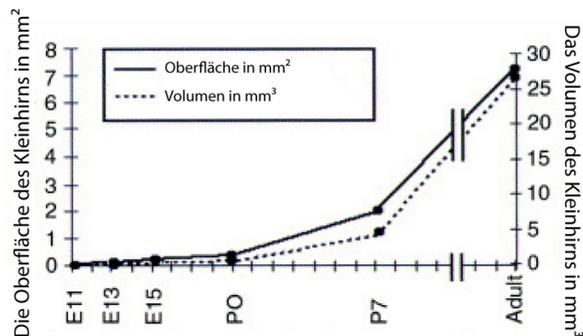
Bei Frühgeborenen steigt der arterielle Sauerstoffpartialdruck kurz nach der Geburt auch ohne künstliche Beatmung auf das fast 3,5-fache von 25mmHg auf 60 bis 85mmHg an (CASTILLO u. a., 2008; RUDOLPH, 2003). Ein solcher Anstieg erzeugt eine relative Hyperoxie bei sehr unreif geborenen Kindern, deren physiologisches Milieu noch der fetale, hypoxische Lebensraum *in utero* sein würde.

Oxidativer Stress, verursacht von vermehrt auftretenden reaktiven Sauerstoffspezies, trifft in dieser Entwicklungsphase auf einen Organismus mit nur geringen Abwehrmöglichkeiten (GEORGESON u. a., 2002). Zum einen ist die Kapazität an antioxidativen Enzymen in Serum und Gewebe nicht ausreichend ausgebildet, zum anderen ist es dem Organismus nicht möglich den erhöhten Bedarf an antioxidativen Enzymen durch eine erhöhte Synthese dieser zu decken (IKONOMIDOU & KAINDL, 2011). Reaktive Sauerstoffspezies können zelluläre Makromoleküle wie DNA, Proteine und Lipide schädigen, was zu einem nekrotischen und apoptotischen Zelltod führen kann (CHEN u. a., 2012). Die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen wird bei einer höheren Sauerstoffkonzentration im Vergleich zu niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen gehemmt (RODRIGUES u. a., 2010).

Bei sehr unreif geborenen Kindern (COLLINS u. a., 2001; HAYNES u. a., 2009; LEVITON u. a., 2010) und auch im Tiermodell (ENDESFELDER u. a., 2014; SCHMITZ u. a., 2014) konnte eine erhöhte Sauerstoffexposition mit neurologischen Folgeerscheinungen in Verbindung gebracht werden.

### 3.8 Das Tiermodell

Die Phase der exponentiellen Expansion der neuronalen Zellen des Kleinhirns findet beim Menschen im letzten Trimenon der Schwangerschaft statt (VOLPE, 2009a). Bei Nagern ist diese Phase postnatal angelegt (DOBBING & SANDS, 1979; GOLDOWITZ & HAMRE, 1998) (Abb. 9). Der Stand der Gehirnentwicklung bei sechs Tage alten Ratten ist vergleichbar mit der Gehirnentwicklung beim Menschen um die 28. SSW. Die Expansion von neuronalen Vorläuferzellen ist auf ihrem Maximum (IKONOMIDOU & KAINDL, 2011).



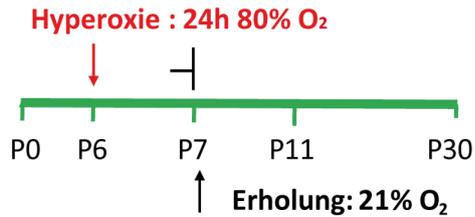
**Abbildung 9: Wachstum des unreifen Kleinhirns bei Nagern**

Grafische Darstellung der Zunahme von Oberfläche und Volumen des unreifen Nagerkleinhirns über die Zeit (modifiziert nach GOLDOWITZ & HAMRE, 1998).

Zum Zeitpunkt der Geburt der Ratten ist die Purkinjellschicht komplett ausgebildet. Bis zum Zeitpunkt P90 (postnataler Tag 90) ist die Reifung der Purkinjellen und der Auswuchs der Dendriten nahezu abgeschlossen (MCKAY & TURNER, 2005). Die Sekretion von SHH durch Purkinjellen ist in der ersten postnatalen Woche auf ihrem Maximum und nimmt danach langsam ab (WECHSLER-REYA & SCOTT, 1999; WECHSLER-REYA, 2003). Die GCPs im EGL sind zu diesem Zeitpunkt hochproliferativ und erreichen ihre maximale Proliferationsrate bis zum Zeitpunkt P8 (BEHESTI & MARINO, 2009; ROUSSEL & HATTEN, 2011). SHH steuert direkt die Expression von CyclinD2 in den GCPs (VAILLANT & MONARD, 2009). Die Proliferation und Reifung von GCPs und GCs findet bis zu einschließlich der dritten postnatalen Woche statt. Mit dem Abschluss dieser Entwicklungsphase ist der EGL im Kleinhirn von Nagern verschwunden (CHANG u. a., 2015).

Astrozytäres PDGFA und SHH der Purkinjellen stimulieren die Proliferation der OPCs (BOUSLAMA-OUEGLANI u. a., 2012; CLEMENTE u. a., 2013). Im Kleinhirn von Nagern ist die Proliferationsrate von OPCs bis zum Zeitpunkt P10 deutlich erhöht (GHOUMARI u. a., 2003; LEVINE u. a., 1993). Die Myelinisierung der Axone wird zwischen P7 und P9 eingeleitet und hat ihren Höhepunkt zwischen P15 und P21 (YUEN u. a., 2014).

Um bei sechs Tage alten Ratten, die evolutionär an 21% Sauerstoff der Raumluft angepasst sind, einen ähnlichen Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks zu induzieren, werden die Tiere gemeinsam mit ihren laktierenden Müttern für 24 Stunden von P6 bis P7 bei 80% Sauerstoff und anschließend bis zu den späteren Analysezeitpunkten P11 und P30 unter Raumluftbedingungen gehalten (Abb. 10). Blutgasanalysen in einem Hyperoxie-Mausmodell konnten eine etwa dreifache Erhöhung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks durch die induzierte Hyperoxie zeigen (SCHMITZ u. a., 2011).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der erhöhten Sauerstoffexposition**

Sechs Tage alte Ratten werden gemeinsam mit ihren laktierenden Muttertieren für 24 Stunden bei 80% Sauerstoff und anschließend unter Raumluftbedingungen bis zu den Zeitstufen P7 (direkt nach der Hyperoxie), P11 und P30 gehalten (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

## 4 Zielsetzung

Die Frühgeburt ist eines der größten pädiatrischen Gesundheitsprobleme. Vor allem sehr frühgeborene Kinder, die vor der Beendigung der 32. Schwangerschaftswoche geboren werden, zeigen im Verlauf häufig neurologische Defizite. Neben der Beeinträchtigung des Großhirns ist das Kleinhirn ebenfalls von einer durch Frühgeburt bedingten verzögerten Entwicklung betroffen. Diese kann, je nach Ausmaß, Folgen bis in das Erwachsenenalter haben. Versuche mit Tiermodellen weisen darauf hin, dass ein erhöhtes Sauerstoffangebot und die damit verbundene Zunahme oxidativen Stresses das sehr unreife Gehirn schädigen kann.

Ziel dieser Arbeit ist es in einem etablierten Hyperoxiemodell die Entwicklung des Kleinhirns in neonatalen Ratten zu untersuchen und diese mit der bereits bekannten eingeschränkten Entwicklung bei sehr frühgeborenen Kindern zu vergleichen.

Hauptaugenmerk liegt hierbei auf:

- (1) der Entwicklung der Gliazellen und der weißen Substanz mit
  - Oligodendrozyten,
  - Astrozyten,
  - Mikroglia,
- (2) der neuronale Entwicklung mit
  - Purkinjezellen,
  - Körnerzellen,
- (3) der Interaktion der einzelnen Zellpopulation im Kleinhirn mit
  - Der Identifizierung gestörter Signalwege.

## 5 Material

### 5.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Binokular	BMS 74956	Breukhoven
Eismaschine	Ice Flaker	Brema
Elektronenmikroskop	LEO EM 906 E	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM 2000	Leica
Fluoreszenzmikroskop	BZ 9000	Keyence
Gefrierschrank (-20°C)	RV 1.03	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	C660	New Brunswick Scientific
Geldokumentationssystem	UV Solo	Biometra
Gelelektrophorese-Zubehör	Schlitten, Kammern, Kämmen	PeqLab
Imager	Universal Hood II	BioRad
Kleintier MRT	7 Tesla rodent scanner	Pharmascan 70/16, Bruker BioSpin
Kryotom	Microm HM400	Microm
Kühlschrank	KS 1340	Liebherr
Laborwaage	Scout II	Ohaus
Laborzentrifuge	5417 R	Eppendorf
Magnetrührer	MR 3003	Heidolph
Mikroplattenleser	iMark Microplate Absorbance Reader	BioRad
Mikrotom	SM 2000 R Sliding Microtome	Leica
Mikrowelle	NN-A880W	Panasonic
Nanodrop	ND-1000	Thermo Scientific
Netzteil	EPS 2A200	GE Healthcare Life Sciences
OctoMACS	OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec
QuadroMACS	QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec
OxyCycler	OxyCycler BioSpherix	Lacona
PCR Cycler	Eppendorf 6325 Mastercycler	Eppendorf
pH-Meter	Lab850	Schott
Pipetten	2.5, 10, 20, 100, 200, 1000µl	Eppendorf/Gilson
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann
Präparierbesteck	Augenschere, Pinzette, Schere, Spatel	Dumont
Präzisionswaage	Kern 770	Kern
qPCR Cycler	Realtime PCR system StepOnePlus	Applied Biosystems
Schüttler	IKA Vibrax VXR	IKA
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad
Sterilbank	Laminair HBB 2448	Heraeus
Stoppuhr		Roth

Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	IKA mini G	IKA
Ultraschallbad	Transsonic 460	Elma
Vortex	Vortex Genie 2	VWR
Wasserbad		GFL
Zellkulturinkubator	CBI 150	Binder
Zellzählkammer	Neubauer	Brand
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf

## 5.2 Softwareprogramme

Tabelle 2: Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe
Adobe Photoshop Elements 14	Adobe
BZ Analyzer	Keyence
BZ Viewer	Keyence
GraphPad PRISM 5.0	GraphPad Software
Image J	National Institutes of Health
Image Lab	Biorad
Leica Application Suite	Leica
MS Office	Microsoft
Primer3 (online tool)	SourceForge
Quantity One	Biorad
StepOne 2.1	Applied Biosystems

## 5.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
12-Well-Platten	Falcon
6-Well-Platten	Falcon
96 Well-Platten (ELISA)	Nunc
96 Well-Platten (qPCR)	Applied Biosystems
Autoklavierband	3M
Cell Strainer (70µm)	Falcon
Deckgläser	R. Langenbrinck
Disposable Cell Lifter	Fisherbrand
Einbettförmchen	Polysciences
Einmalhandschuhe	VWR
Falcon-Röhrchen: 15 ml; 50 ml	BD

Kanülen: 20g; 21g; 22g; 23g; 24g	Braun
Klingen	Microm
MS Columns	Miltenyi Biotec
Nitrocellulosemembran	Roth
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
PCR 8er-SoftStrips 0,2ml	Biozym
Petrischalen	Falcon
Pipetten: 1ml; 2ml, 5ml; 10ml; 25ml	Falcon
Pipettenspitzen: 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Eppendorf, Biozym
Rasierklingen	ASR
Reaktionsgefäße: 0,5ml-; 1,5ml-; 2ml-; 5ml-tubes	Sarstedt
Spritzen: 1ml, 2ml, 15ml	Braun
Sterilfilter	Whatman
Super Frost Plus Objektträger	R. Langenbrinck
Zellkulturflaschen: 25cm <sup>2</sup> ; 75cm <sup>2</sup> ; 150cm <sup>2</sup>	Falcon

## 5.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
Acrylamid-Rotiphorese	Roth
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfat	Serva
BSA	Serva
Chloroform	Merck
Citric Acid	Sigma
Complete mini Proteaseinhibitor Tabl.	Roche
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
FKS	Merck (Biochrom)
Isopropanol	Merck
Magermilch (Pulver)	Roth
Mercaptoethanol	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natronlauge	Merck
Nonidet P40	ICN Biomedicals
MEDITE PURE Paraffin	MEDITE
PBS (Pulver)	Merck
PDL	Sigma
PFA	Merck
Saccharose	Roth

Salzsäure	Merck
Sodiumdodecylsulfat	Roth
Tetramethylethyldiamin	Serva
Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X 100	Merck
Tween 20	Serva
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck

## 5.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	Fermentas
Hanks' Balanced Salt Solution	Roth
RIPA	Sigma-Aldrich
MACS-Puffer	0,5% BSA, PBS
Agarosegel	1% Agarose in 1xTAE-Puffer
10x TBS-Puffer	300ml 5 M NaCl, 100ml 1 M Tris pH 7,5, add 1 l mit A.bidest
TBS-T-Puffer	1xTBS, 0,1% (w/v) Tween 20
4x Trenngelpuffer	0,4% SDS (w/v) 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
4x Sammelgelpuffer	0,4% SDS (w/v) 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
10x dreamTag Green Buffer	Fermentas
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	Promega
PBS	Merck (Biochrom)
Lämmli-Probenpuffer	Biorad
10x Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer	Biorad
5x Trans-Blot Turbo-Transferpuffer	Biorad
Roti - Immuno Block	Roth
Roti Histol	Roth
Citrat Puffer	10mM Citric Acid 0.05% (w/v) Tween 20, pH 6,0
peqGold RNA-Pure	PeqLab
RNAsin	Promega
dNTP-Mix 10mM	Promega
dNTP Mix 2mM	Fermentas
Zufallsoligonukleotide	BioTEZ
Nuklease-freies Wasser	Qiagen
Ketamin (10%)	Bela-Pharm GmbH
Rompun (2%)	Bayer
Antibody Diluent	Dako
Fluoroshield with DAPI	Sigma-Aldrich
Rnase-Zap	Sigma-Aldrich

## 5.6 Enzyme

Tabelle 6: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
DNase I	Qiagen
DreamTag DNA-Polymerase	Fermentas
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Proteinase K	Sigma-Aldrich
qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX	PCR Biosystems
RNase A	Sigma-Aldrich
Trypsin	Merck (Biochrom)

## 5.7 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

### 5.7.1 Oligonukleotide für die quantitative Real Time PCR

Tabelle 7: Primer und Sonden für die quantitative Real Time PCR

Gen		Forward Primer	Reverse Primer	Sonde
<i>Bdnf</i>	Brain-derived neurotrophic factor	TCAGCAGTCAAGTGC CTTTGG	CGCCGAACCCTCATA GACATG	CCTCCTCTGCTCTTTCTGC TGGAGGAATACAA
<i>Calb1</i>	Calbindin 1	CTGACCACAGTGGCT TCATAGAA	TCGTATCATCCACGGT CTTGTT	Detektiert mit SYBR Green
<i>Ccnd2</i>	Cyclin D2	CGTACATGCGCAGGA TGGT	AATTCATGGCCAGAG GAAAGAC	TGGATGCTAGAGGTCTGT GA
<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2	CGTCAAACACTACAGCTC CAAGC	CCATCTTCCTTCATAG CCAGGTA	AAGAGAGAGGAGTTGTG TCC
<i>Gfap</i>	Glial fibrillary acidic protein	TCTGGACCAGCTTACT ACCAACAG	TGGTTTCATCTTGGAG CTTCTG	AGAGGGACAATCTCACAC AG
<i>Glast</i>	Glutamate aspartate transporter	CCCTGCCCATCACTTT CAAG	GCGGTCCCATCCATGT TAAT	CTGGAAGAAAACAATGG TGTGG
<i>Gs</i>	Glutamine synthetase	TGGACCCCAAGGACC CTATT	TACAAGCAGGCCCGG TAGTG	TTATGGCCGAGATATCGT GGA
<i>Hes1</i>	Hes family bHLH transcription factor 1	GCCGGGCAAGAATAA ATGAA	GAATGTCTGCCTTCTC CAGCTT	Detektiert mit SYBR Green
<i>Hprt</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	GGAAAGAACGTCTTG ATTGTTGAA	CCAACACTTCGAGAG GTCCTTTT	CTTTCCTTGGTCAAGCAG TACAGCCCC
<i>Il-1β</i>	Interleukin 1 beta	CTCCACCTCAATGGAC AGAACA	CACAGGGATTTTGTG GTTGCT	CTCCATGAGCTTTGTACA AG
<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	CGGACCAGAGACCTT TTGC	GCCTGTGGGCTTGTT GAAGT	Detektiert mit SYBR Green
<i>Ngf</i>	Nerve growth factor	ACCCAAGCTCACCTCA GTGTCT	GACATTACGCTATGC ACCTCAGAGT	CAATAAAGGCTTTGCCAA GG
<i>Notch2</i>	Notch 2	GATGAGCAGGAACAG GAGATAATAGG	CTTGAAGCACTGGTCT GAGTCTTG	Detektiert mit SYBR Green
<i>Nt-3</i>	Neurotrophin 3	AGAACATCACCACGG AGGAAA	GGTCACCCACAGGCT CTCA	AGAGCATAAGAGTCACC GAG

<i>Pax6</i>	Paired box 6	TCCCTATCAGCAGCA GTTTCAGT	GTCTGTGCGGCCAA CAT	CTCCTCCTTTACATCGGGT T
<i>Pdgfa</i>	Platelet-derived growth factor subunit A	TACCCCGGGAGTTGA TCGA	CCCCTACGGAGTCTAT CTCCAA	CTCGAAGTCAGATCCACA GC
<i>Pcp2</i>	Purkinje cell protein 2	GCATGGATGACCAGC GTGTA	GTGTCCCAGGTCGTT TCTG	Detektiert mit SYBR Green
<i>Pcp4</i>	Purkinje cell protein 4	CCACCCGAAGACACC AAGTT	AGGTTAGCAGCGGAG TGTGTACT	Detektiert mit SYBR Green
<i>Prox1</i>	Prospero homeobox 1	TGCCTTTTCCAGGAGC AACTAT	CCGCTGGCTTGAAAA CTG	ACATGAACAAAAACGGT GGC
<i>Sdf1</i>	Stromal cell-derived factor 1	CCCCTGCCGATTCTTT GAG	CAACAATCTGAAGGG CACAGTTT	Detektiert mit SYBR Green
<i>Shh</i>	Sonic hedgehog	GCTGATGACTCAGAG GTGCAAA	CCTCAGTCACTCGAA GCTTCACT	CAAGTTAAATGCCTTGGC CA
<i>Slc1a6</i>	Solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6	GGAACCCCTTCCCTT CATC	GGAAAGTGATAGGCA GAGTTGCA	Detektiert mit SYBR Green
<i>Tbr2</i>	T-box brain protein 2 (Eomes)	ACGCAGATGATAGTG TTGCAGTCT	ATTCAAGTCTCCACA CCATCCT	CACAAATACCAACCTCGA CT
<i>Tnfa</i>	Tumor necrosis factor alpha	CCCCAATCTGTGTCC TTCTAAC	CGTCTCGTGTGTTTCT GAGCAT	TAGAAAGGGAATTGTGG CTC
<i>Vtn</i>	Vitronectin	TGCCTTCACTGCATC AACT	TGCGTCAACGTTGTCT GGTA	Detektiert mit SYBR Green

### 5.7.2 Oligonukleotide für die Standard-PCR

Tabelle 8: Primer der Standard-PCR

Gen		Forward Primer	Reverse Primer
<i>Actb</i>	Beta-actin	CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAAGATG	GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG

## 5.8 Antikörper

### 5.8.1 Primäre Antikörper

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Antikörper	Protein	Wirt	Firma	IHC	Western Blot
A5316	β-ACTIN	Maus	Sigma		1:5000
OP80	APC	Maus	EMD Millipore	1:200	
ab75524	CALB1	Maus	Abcam	1:500	
AB1778	CALB1	Kaninchen	Millipore	1:1000	

#9664	cleaved Caspase 3	Kaninchen	Cell Signaling	1:200	
sc-8066	Doublecortin	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:100	
ab86186	GABA	Maus	Abcam	1:100	
sc-25778	GAPDH	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology		1:1000
G3893	GFAP	Maus	Sigma	1:500	
019-19741	IBA1	Kaninchen	Wako	1:750	
ab16667	Ki67	Kaninchen	Abcam	1:200	
SMI-99	MBP	Maus	Covance	1:500	1:1000
MAB377	NeuN	Maus	Millipore		1:1000
MAB5384	NG2	Maus	Millipore	1:100	
06-284	Nitrotyrosin	Kaninchen	Millipore		1:1000
MAB5552	PAX6	Maus	Millipore	1:200	
LS-C179903	PAX6	Kaninchen	LifeSpan Biosciences	1:200	
ab29	PCNA	Maus	Abcam	1:500	
sc-9024	SHH	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:20	1:500

### 5.8.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

Antikörper		Wirt	Firma	IHC	Western Blot
#7074	goat-anti-rabbit IgG HRP	Ziege	Cell Signaling		1:5000
115-035-146	goat-anti-mouse IgG HRP	Ziege	Jackson Immuno Research		1:3000
A-11034	Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit IgG	Ziege	Thermo Fisher Scientific	1:200	
A-11029	Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse IgG	Ziege	Thermo Fisher Scientific	1:200	
A-11055	Alexa Fluor 488 donkey-anti-goat IgG	Esel	Thermo Fisher Scientific	1:200	
A-11037	Alexa Fluor 594 goat-anti-rabbit IgG	Ziege	Thermo Fisher Scientific	1:200	
A-11032	Alexa Fluor 594 goat-anti-mouse IgG	Ziege	Thermo Fisher Scientific	1:200	
A-10040	Alexa Fluor 546 donkey-anti-rabbit IgG	Esel	Thermo Fisher Scientific	1:200	
111-175-146	goat-anti-mouse Cy5	Ziege	Dianova	1:100	

## 5.9 Reaktionssysteme

Tabella 11: Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche
BCA Protein Assay	Thermo Scientific
FD Rapid GolgiStain kit	FD Neuro Technologies
Anti GABA ELISA	LifeSpan BioScience

## 5.10 Zellkulturmedien

Primäre Astrozyten: DMEM + 10% FKS

Primäre Astrozyten im Sauerstoffversuch: DMEM + 1% FKS

## 6 Methoden

### 6.1 Tiere und Organentnahme

Sechs Tage alte Wistar-Ratten wurden gemeinsam mit ihren laktierenden Müttern für 24 Stunden bei 80% Sauerstoff beziehungsweise bei Raumluftbedingungen (21% Sauerstoff) gehalten. Die kontrolliert erhöhte Sauerstoffexposition erfolgte in einem OxyCycler (BioSpherix). Anschließend wurden die Hyperoxietiere gemeinsam mit den Kontrolltieren bis zu den Untersuchungszeitpunkten P7, P11 und P30 gehalten. Für die Organentnahme mit anschließender RNA- und Proteinisolation wurden die Tiere sediert (Ketamin und Rompun) und transcardial mit PBS perfundiert. Entnommene Kleinhirne wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Dienten die Organentnahmen für folgende histologische Färbungen, wurden die Tiere noch zusätzlich mit 4% PFA in PBS perfundiert, die Kleinhirne über Nacht in 4%er PFA/PBS-Lösung bei 4°C fixiert und anschließend weiter prozessiert.

### 6.2 Molekularbiologische Methoden

#### 6.2.1 Isolation von RNA

RNA aus Kleinhirnhemisphären und primären Astrozyten wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Hierfür wurden die Hemisphären bzw. die Zellen in peqGold RNA-Pure komplett gelöst und anschließend mit Chloroform versetzt. Nach intensivem Vortexen und anschließender Zentrifugation befindet sich die RNA in der obigen, wässrigen Phase. Diese wurde abgenommen und die RNA mit Isopropanol präzipitiert. Nach zwei folgenden Waschschrritten wurde die isolierte RNA in ein entsprechendes Volumen RNase freien Wassers aufgenommen und bei -80°C gelagert. Am Folgetag wurde die RNA-Konzentration mittels Nanodrop (Thermo Scientific) bestimmt.

#### 6.2.2 Amplifizierung von DNA mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels PCR lassen sich spezifische DNA-Abschnitte selektiv vervielfältigen (MULLIS, 1990). Analytische PCRs wurden mit der DreamTaq-Polymerase wie folgt durchgeführt:

*Tabelle 12: Pipettierschema der Standard-PCR*

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$
10x DreamTaq™ Puffer	2,5
dNTP-Mix 2 mM	2,5
Primer fw 10 $\mu\text{M}$	0,5

Primer rev 10 µM	0,5
DreamTaq™ DNA-Polymerase 5 U/µL	0,2
cDNA	1
RNase-freies Wasser	ad 25
Gesamtvolumen	25

Tabelle 13: Standard-PCR

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

### 6.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Hier wurde eine 1% Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer mit 0,3µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 10V/cm für ca. 30 Minuten. Als Größenstandard diente der Gene Ruler 50 bp DNA ladder (Fermentas).

### 6.2.4 cDNA Synthese

Ein bis zwei µg Gesamt-RNA wurden mittels MMLV Reverse Transkriptase zu cDNA synthetisiert. Vorab wurden alle Proben DNase behandelt, um eine mögliche Kontamination der synthetisierten cDNA durch genomische DNA zu unterbinden. Um den Erfolg der cDNA Synthese zu überprüfen, wurde mittels PCR eine Teilsequenz des *Actb* Gens amplifiziert. Die Auswahl der Primer erfolgte so, dass sie in zwei unterschiedlichen, aufeinanderfolgenden Exons binden. Anhand der Größe des amplifizierten Fragments, die abschließend mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt wurde, ließ sich so abermals eine Kontamination durch genomische DNA ausschließen.

Synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 6.2.5 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Die qPCR erlaubt den Vergleich der Expressionsstärke von Genen in verschiedenen Proben. Ihr Prinzip beruht auf einer exponentiellen Amplifizierung von DNA Teilsequenzen. Erreicht die Konzentration eines Konstrukts einen bestimmten Schwellenwert, dient der Zyklus der Amplifikation als Maßstab für die Ausgangsmenge des eingesetzten Zielgens. Um eine möglichst hohe PCR-Effizienz und damit eine

hohe Genauigkeit der Quantifizierung zu erreichen, wurden kurze Amplikons von 50-150bp Länge gewählt.

Zur Detektion der Amplikons wurde der interkalierende Farbstoff SYBR Green bzw. sequenzspezifische Taqman-Sonden verwendet. Als Bezugswert diente die Genexpression eines Haushaltsgens (HPRT), dessen Expression in allen Proben gleich war. Ausgewertet wurden die Expressionsdaten nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

#### 6.2.6 Proteinisolation

Für die Isolation von zytoplasmatischen Proteinen und Kernproteinen wurde eine Hemisphäre eines Kleinhirns in RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich) gelöst und anschließend zum Aufschluss der Kerne in einem Ultraschallbad inkubiert. Um Zellbruchstücke zu entfernen, wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im Überstand befand sich ein Gemisch aus zytoplasmatischen Proteinen und Kernproteinen.

Anschließend wurde der Gesamtproteingehalt mittels dem BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific) und einem Mikroplattenleser (Biorad) nach der Anleitung des Herstellers bestimmt.

#### 6.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) und Western Blot

##### 6.2.7.1 SDS PAGE

Zur Größenauftrennung wurden ca. 20µg der Proteinlysate auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einer Laufkammer (Biorad) nach dem Anlegen einer Spannung. Die Proteinlysate wurde vor dem Auftragen mit reduzierendem Ladepuffer versetzt und für 10min bei 95°C denaturiert. Zur späteren Größendetektierung wurde ein Proteinmarker (Precision Plus Protein, Biorad) auf eine Spur des Proteingels aufgetragen.

##### 6.2.7.2 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels des semi-dry Blot-Verfahrens (Trans-Blot Turbo, Biorad) auf eine Nitrocellulose Membran übertragen.

##### 6.2.7.3 Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper

Zum Nachweis von spezifischen Proteinen wurden die Membranen mit selektiven, primären Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine detektierte Chemilumineszenz, die von einem HRP konjugierten Zweitantikörper nach Substratzugabe (Supersignal West Pico, Pierce) vermittelt wurde. Detektiert wurde die Lumineszenz mittels Digital Imager (Biorad). Um unspezifische Bindungen

der Antikörper zu minimieren, wurden alle Membranen in Roti-Block Puffer (Roth) inkubiert. Als Referenzwert für die Proteinexpression diente die Chemilumineszenz eines Haushaltsproteins.

#### 6.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration von GABA wurde mittels kompetitivem ELISA bestimmt. Hierbei binden GABA-Moleküle an spezifische Antikörper, die an den Untergrund einer Mikrotiterplatte gebunden sind. Freibleibende Bindungsstellen der Antikörper werden anschließend mit Biotin gekoppeltem GABA gesättigt. Nach einer folgenden Inkubation mit einem HRP konjugierten anti-Biotin Antikörper und einem Farbumschlag nach Substratzugabe, kann die GABA-Konzentration der Proben mittels Mikroplattenleser (Biorad) bestimmt werden. Die Signalstärke ist hier umgekehrt proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens.

Die GABA-Konzentration im Kleinhirn wurde mittels ELISA Kit der Firma LifeSpan BioScience nach den Angaben des Herstellers ermittelt.

#### 6.2.9 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Aus dem Kleinhirn sieben Tage alter Ratten wurden mittels magnetisch markierter Antikörper Astrozyten isoliert. Hierfür wurden die frisch präparierten Kleinhirne mit Trypsin und DNase inkubiert und mittels Zellsieb (70µm, Falcon) in eine Ein-Zell-Suspension überführt.  $10^7$  Zellen wurden in 80µl MACS-Puffer überführt und nach den Angaben des Herstellers mit anti-Glast1-Microbeads inkubiert (Miltenyi Biotec). Magnetisch markierte Astrozyten wurden mittels MS Säulen (Miltenyi Biotec) und Octomacs (Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Mittels MACS isolierte Astrozyten wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### 6.3 Zellbiologische Methoden

#### 6.3.1 Isolation und Kultivierung von primären Astrozyten

Während des Entwicklungszeitpunktes E20 bis P1 wurden den Ratten die Kleinhirne entnommen, in eine Ein-Zell-Suspension überführt und in Medium (DMEM + 10% FKS) aufgenommen (ARMSTRONG u. a., 1990). Nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen wachsen Mikroglia und OPCs auf einem konfluenten Astrozyten-Zellrasen. Durch permanentes Schütteln wurden die Mikroglia nach zwei Stunden gelöst und entfernt. OPCs wurden durch permanentes Schütteln bis zum Folgetag gelöst und entfernt (MCCARTHY & DE VELLIS, 1980).  $2 \times 10^6$  Astrozyten wurden in eine Poly-D-Lysin (PDL) beschichtete Zellkulturflasche überführt. Durch täglichen Wechsel des Mediums an den Folgetagen konnte eine Kontamination durch andere Gliazellen ausgeschlossen werden.

Für die Versuche bei 80% Sauerstoff wurden  $1,8 \times 10^5$  Astrozyten pro Well in eine PDL beschichtete 12-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 Stunden bei 80% Sauerstoff bzw. 21% Sauerstoff kultiviert. Abschließend wurden alle Zellen in peqGold RNA-Pure aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Versuche mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen wurden Astrozyten in DMEM mit 1% FKS kultiviert.

## 6.4 Histologische Methoden

### 6.4.1 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Die über Nacht in 4% PFA/PBS fixierten Kleinhirne wurden wie folgt prozessiert:

- 2-3h mit fließendem Leitungswasser waschen (Raumtemperatur, RT)
- Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe
  - 70% EtOH, 3-4h, RT
  - 80% EtOH, ün, RT
  - 96% EtOH, 60min,  $40^\circ\text{C}$
  - 100% EtOH, 60min,  $40^\circ\text{C}$
  - 100% EtOH, 60min,  $40^\circ\text{C}$
  - 100% EtOH/ Chloroform 1:1, 60min,  $40^\circ\text{C}$
- Chloroform, 60min,  $40^\circ\text{C}$
- Chloroform, 60min,  $40^\circ\text{C}$
- Imprägnierung mit reinem Paraffin
  - Paraffin I, 45min-60min bei  $60^\circ\text{C}$  (Paraffinschrank)
  - Paraffin II, ün bei  $60^\circ\text{C}$

Abschließend wurden die Kleinhirne in flüssigem Paraffin eingebettet.

Nach dem Aushärten des Paraffins wurden die Kleinhirne bei Raumtemperatur gelagert bis sie mittels Mikrotom geschnitten wurden (ENDESFELDER u. a., 2014).

#### 6.4.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Die über Nacht in 4% PFA/PBS fixierten Kleinhirne wurden zur Kryoprotektion in 30% Saccharose überführt und bis zum Schneiden mit dem Kryotom bei 4°C gelagert (SCHEUER u. a., 2015; SCHMITZ u. a., 2014).

#### 6.4.3 Immunhistochemie

Mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie (IHC) wurden in Paraffinschnitten und Kryoschnitten spezifische Proliferations-, Reifungs- und Zellmarker nachgewiesen. Die Paraffinschnitte wurden vorab mit Roti-Histol (Roth) entparaffiniert. Anschließend wurden die Paraffinschnitte nach einer abfallenden Ethanol Reihe (100%, 90%, 80%, 70%, 0%) zur Antigendemaskierung in Citrat-Puffer für 10min (Mikrowelle, 600W) gekocht.

Initial wurden Paraffin- und Kryoschnitte 15min mit 0,2% Triton X 100 permeabilisiert. Um unspezifische Signale zu unterbinden, erfolgte die Blockierung der Gewebeschnitte mit 3% BSA/PBS. Nach dem Blockierschritt wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte mit einem Fluochrom markierten, sekundären Antikörper inkubiert und abschließend mit DAPI enthaltendes Fluoroshield eingedeckelt.

Die immunhistochemischen Färbungen mit NG2 + Tunel, NG2 + Ki67, APC und IBA1 sowie deren Auswertung und Interpretation wurden in Zusammenarbeit mit Vivien Brockmöller durchgeführt.

#### 6.4.4 Golgi Färbung

Purkinjezellen im Kleinhirn wurden nach der Angabe des Herstellers mit dem FD Rapid GolgiStain kit (FD Neuro Technologies) und der Modifizierung nach Zaqout und Kaindl (ZAQOUT & KAINDL, 2016) in Zusammenarbeit mit Dr. Yuliya Sharkovska angefärbt.

#### 6.4.5 Sholl- Analyse

Die Analyse nach Sholl (SHOLL, 1953) wurde von Dr. Yuliya Sharkovska am Institut für Zell- und Neurobiologie durchgeführt.

### 6.5 Mikroskopie

#### 6.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

##### 6.5.1.1 Zeiss LSM 510

Mit dem Zeiss LSM 510 Confocal Laser Scanning Mikroskop System wurden die NG2 und Tunel sowie die NG2 und Ki67 immunhistochemisch gefärbten Kleinhirnschnitte analysiert. Die Intensität der Immunfluoreszenz wurde in einem 225 × 225 × 10µm großen Areal bestimmt (X-, Y-, Z-Ebenen). Der

Mittelwert von der Intensität von drei Bildern pro Tier wurde für die statistische Auswertung verwendet. Zur Analyse und Aufbereitung der Bilder wurden die Programme Confocal Assistant 4.02, Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) und Photoshop CSM verwendet. Analysen mit dem Zeiss LSM 510 wurden mit der Hilfe von Vivien Brockmöller durchgeführt.

#### 6.5.1.2 Leica DM 2000

MBP, APC, IBA1 und GFAP immunhistochemische gefärbte Kleinhirnschnitte wurden unter Verwendung des Leica DM 2000-Mikroskops mit einem 10x und 20x Objektiv und der Leica Application Suite-LAS-Software analysiert. Zur statistischen Auswertung wurde der Mittelwert der Pixel-Intensität von 3 Bildern von jedem Tier mit Image J analysiert.

#### 6.5.1.3 Keyence Kompakt BZ 9000

PAX6, DCX, CASP3, PCNA, SHH, GABA und CALB1 immunhistochemische gefärbte Kleinhirnschnitte wurden unter Verwendung des Keyence Kompakt-Fluoreszenzmikroskops BZ 9000 sowie der dazugehörigen Software, BZ-II Viewer und BZ-II Analyzer, analysiert. Zur statistischen Auswertung wurde der Mittelwert der Pixel-Intensität von 3 Bildern von jedem Tier mit Image J analysiert bzw. die absolute Zellzahl mittels Photoshop CSM bestimmt.

#### 6.5.2 Elektronenmikroskopie

Anästhesierte Ratten wurden mit PBS und anschließend zur Vorabfixierung mit 4% Formaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd und 0,5% NaCl in PBS mittels Perfusionspumpe (Flussgeschwindigkeit 5ml/h) transkardial perfundiert (KARLSSON & SCHULTZ, 1965). Anschließend wurden die entnommenen Kleinhirne für 48 Stunden bei 4°C fixiert (4% Formaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd und 0,5% NaCl in PBS). 200µm dicke Vibratomschnitte wurden erneut in 2% OsO<sub>4</sub> in PBS fixiert und nach der Entwässerung mit Ethanol und Propylenoxid in EPON eingebettet (MÖBIUS u. a., 2010). Mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbte 50nm Schnitte wurden unter Verwendung eines Transmissions-ZEISS-Elektronenmikroskops ("Leo 906", Jena, Deutschland) analysiert. Pro Tier wurden 500 bis 600 Kleinhiranaxone ausgemessen, wobei Axone von <0,2µm von der Analyse ausgeschlossen wurden. Ermittelt wurden der gesamte Faserdurchmesser (Axon mit Myelin), der innere Axondurchmesser, der Durchmesser der Myelinscheide und die G-Ratio als Ergebnis des inneren Axondurchmessers über dem Außendurchmesser. Die Analysen und Auswertungen wurden mit der Hilfe von PD Dr. Thomas Schmitz sowie der AG Bachmann am Institut für vegetative Anatomie durchgeführt.

### 6.6 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Bestimmung des Kleinhirnvolumens 30 Tage alter Ratten wurde am Zentrum für Schlaganfallforschung Berlin von Susanne Müller durchgeführt.

Die mittels 3% Isofluran anästhesierten Ratten wurden auf einer Heizdecke (37,8°C) gelagert. Über eine Atemmaske wurde die Narkose mit einem konstanten Luftstrom (0,5L/min 100% O<sub>2</sub>) mit 1,5%-2% Isofluran aufrecht gehalten. Das Volumen des Kleinhirns wurde mittels eines T2w MRTs bestimmt. Verwendet wurde der 7 Tesla rodent scanner (Pharmascan 70/16, Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland). Die Berechnung des Volumens erfolgte mit der Analyze 5.0 Software (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa, USA).

### 6.7 Statistik

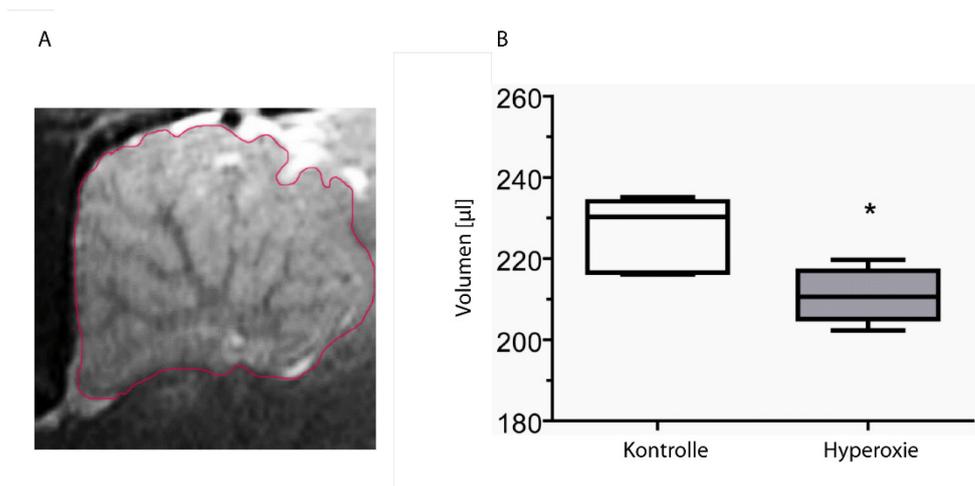
Die Ergebnisse werden im Allgemeinen als Mittelwert +/- Standardfehler dargestellt.

Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurde der t-Test verwendet (two-tailed, unpaired). Alle statistischen Analysen wurden mit der Graph Pad Prism 5.0-Software durchgeführt (Signifikanz bei \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Hyperoxie induzierte Volumenveränderung des Kleinhirns

Um den Einfluss einer erhöhten Sauerstoffexposition auf das Wachstum des Kleinhirns zu ermitteln, wurden sechs Tage alte Ratten mit ihren laktierenden Muttertieren für 24 Stunden bei 80% Sauerstoff gehalten. Anschließend wurden die neugeborenen Hyperoxietiere gemeinsam mit gleichaltrigen Kontrolltieren, ohne erhöhte Sauerstoffexposition, bis zu der Altersstufe P30 bei Raumlufbedingungen gehalten. Bei 30 Tage alten Hyperoxie- und Kontrolltieren wurde mittels Kleintier-MRT das Volumen des Kleinhirns bestimmt. Die Tiere der Hyperoxiegruppe hatten ein signifikant vermindertes Volumen des Kleinhirns (im Durchschnitt 208.4 mm<sup>3</sup>) im Vergleich zu den Kontrolltieren (im Durchschnitt 230.3 mm<sup>3</sup>) (Abb. 11A, B).

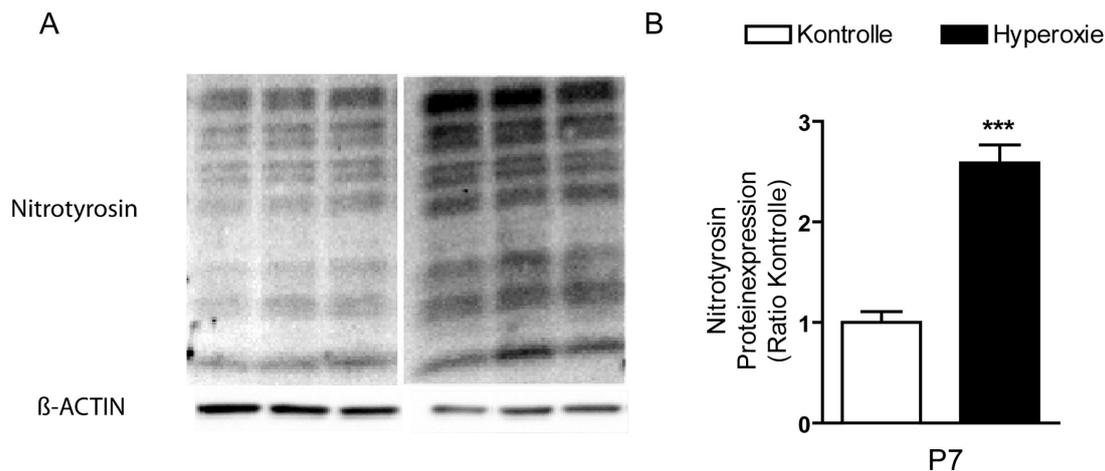


**Abbildung 11: Volumenbestimmung des Kleinhirns mittels MRT**

Messung des Kleinhirnvolumens mittels MRT bei 30 Tage alten Ratten (A). Das Volumen des Kleinhirns ist nach Hyperoxie vermindert (B) (\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=8$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

### 7.2 Hyperoxie verursacht oxidativen Stress im unreifen Kleinhirn

Sechs Tage alte Ratten wurden, wie bereits beschrieben, für 24 Stunden bei 80% Sauerstoff gehalten. Anschließend wurden die Kleinhirne entnommen und aus einer der Hemisphären ein Gesamtproteinlysate erstellt. Mittels Western Blot wurde der Nitrotyrosingehalt im Proteinlysate bestimmt. Nitrotyrosin entsteht bei einer radikal bedingten Nitrierung von Tyrosin (ISCHIROPOULOS, 1998) und ist somit ein Nachweis für oxidativen Stress. Der Nitrotyrosingehalt in Kleinhirnproteinlysaten war bei den Tieren der Hyperoxiegruppe im Vergleich zu den Kontrolltierlysaten deutlich erhöht (Abb. 12A, B). Hyperoxie erzeugt demnach oxidativen Stress im neonatalen Kleinhirn.



**Abbildung 12: Oxidativer Stress im Kleinhirn nach Hyperoxie**

Nitrotyrosin Western Blot Analyse (A) von Kontroll- und Hyperoxietieren mit  $\beta$ -ACTIN als Ladekontrolle. Der Nitrotyrosingehalt war im Kleinhirn nach Hyperoxie bei 7 Tage alten Tieren erhöht (B) (\*\*\*)  $p < 0,001$ , t-Test,  $n=6$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

## 7.3 Gliazellschädigung

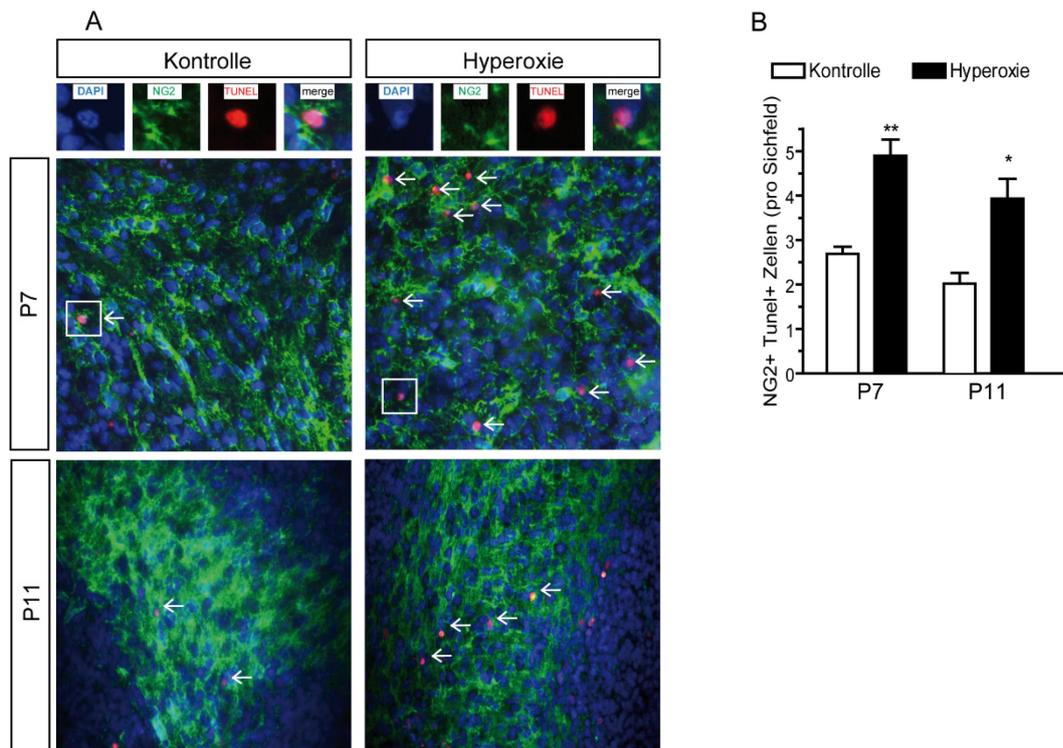
### 7.3.1 Oligodendrozyten

#### 7.3.1.1 Erhöhter Zelltod von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Kleinhirn nach Hyperoxie

Oligodendrozyten (OLs) sind die dominante Zellart in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems (ZNS) (JIANG u. a., 2011a). Ein Großteil der OLs ist zum Zeitpunkt der Geburt noch sehr unreif und sensitiv gegenüber oxidativem Stress (BAUD u. a., 2004; BAUMANN & PHAM-DINH, 2001; SCHMITZ u. a., 2012a; VOLPE, 2009a). Oligodendrozyten leiten sich von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) ab, die die Fähigkeit besitzen, sich zu vermehren, zu migrieren und in myelinisierende Oligodendrozyten zu differenzieren (DOMINGUES u. a., 2016). OPCs exprimieren das NG2 Proteoglycan (NG2) (POLITO & REYNOLDS, 2005).

Um den Einfluss von Hyperoxie auf den Fortbestand von OPCs zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung von NG2+ OPCs mit einer TUNEL Färbung für apoptotische Zellen in Kleinhirngewebeschnitten von sieben und elf Tage alten Ratten kombiniert. Dabei konnte eine erhöhte Co-Lokalisation von NG2+ und TUNEL+ OPCs in der weißen Substanz des Kleinhirns direkt nach der Hyperoxie beobachtet werden (Abb. 13A, B). Auch nach 4 Tagen Erholung an Raumluft war die Anzahl von NG2+ und TUNEL+ OPCs in der weißen Substanz des Kleinhirns bei Ratten der Hyperoxiegruppe im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 13A, B).

Zu beiden Zeitpunkten konnte somit eine erhöhte Apoptose von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach Hyperoxie beobachtet werden.



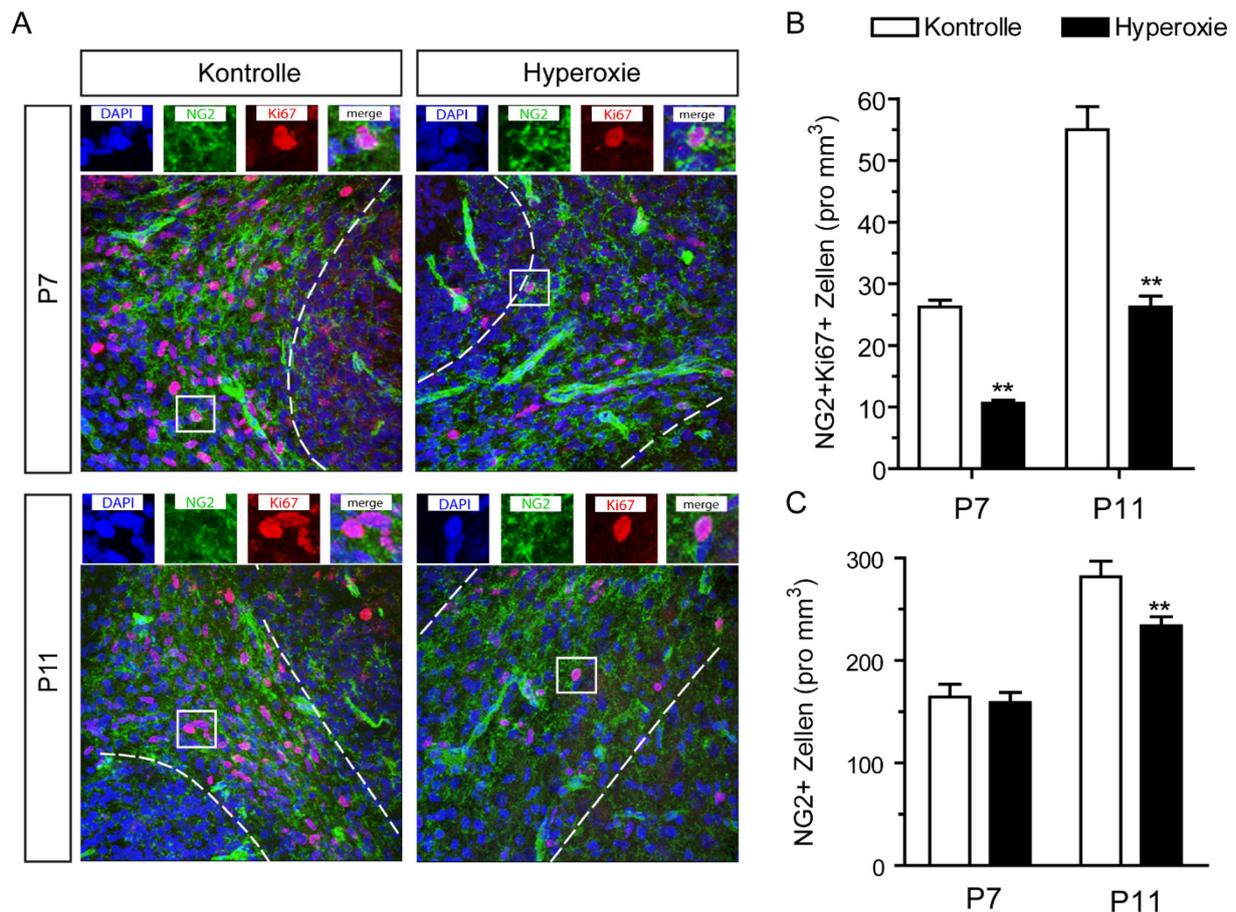
**Abbildung 13: Erhöhter Zelltod von OPCs nach Hyperoxie.**

10µm dicke Kryoschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von NG2+ OPCs und TUNEL+ apoptotischen Zellen (A). Zu beiden Zeitpunkten (P7 und P11) ist die Apoptose in NG2+ OPCs nach Hyperoxie erhöht (B) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=4$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

### 7.3.1.2 Verminderte Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nach erhöhter Sauerstoffexposition

Der Einfluss von Hyperoxie auf die Proliferation von OPCs im Kleinhirn wurde mittels einer immunhistochemischen Co-Färbung von NG2 und dem Proliferationsmarker Ki67 in sieben und elf Tage alten Ratten untersucht.

Direkt nach der erhöhten Sauerstoffexposition war die Anzahl von NG2+ und Ki67+ OPCs signifikant reduziert (Abb. 14A, B). Auch bei elf Tage alten Ratten war die Proliferation von NG2+ und Ki67+ OPCs bei Tieren aus der Hyperoxiegruppe signifikant vermindert (Abb. 14A, B). Zusätzlich konnte in elf Tage alten Ratten eine verminderte Anzahl an NG2+ OPCs im Kleinhirn nach Hyperoxie beobachtet werden (Abb. 14C). Eine erhöhte Sauerstoffexposition unterbindet demnach die Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und führt zu einer Reduktion dieser.



**Abbildung 14: Hyperoxie vermindert die Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.**

10µm dicke Kryoschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von NG2+ OPCs und Ki67+ proliferierenden Zellen (A). Zu Beiden Zeitpunkten (P7 und P11) ist die Proliferation der NG2+ OPCs nach Hyperoxie vermindert (B). Zum Zeitpunkt P11 ist die Anzahl der NG2+ OPCs nach Hyperoxie vermindert (C) (\*\*p < 0,01, t-Test, n=4) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

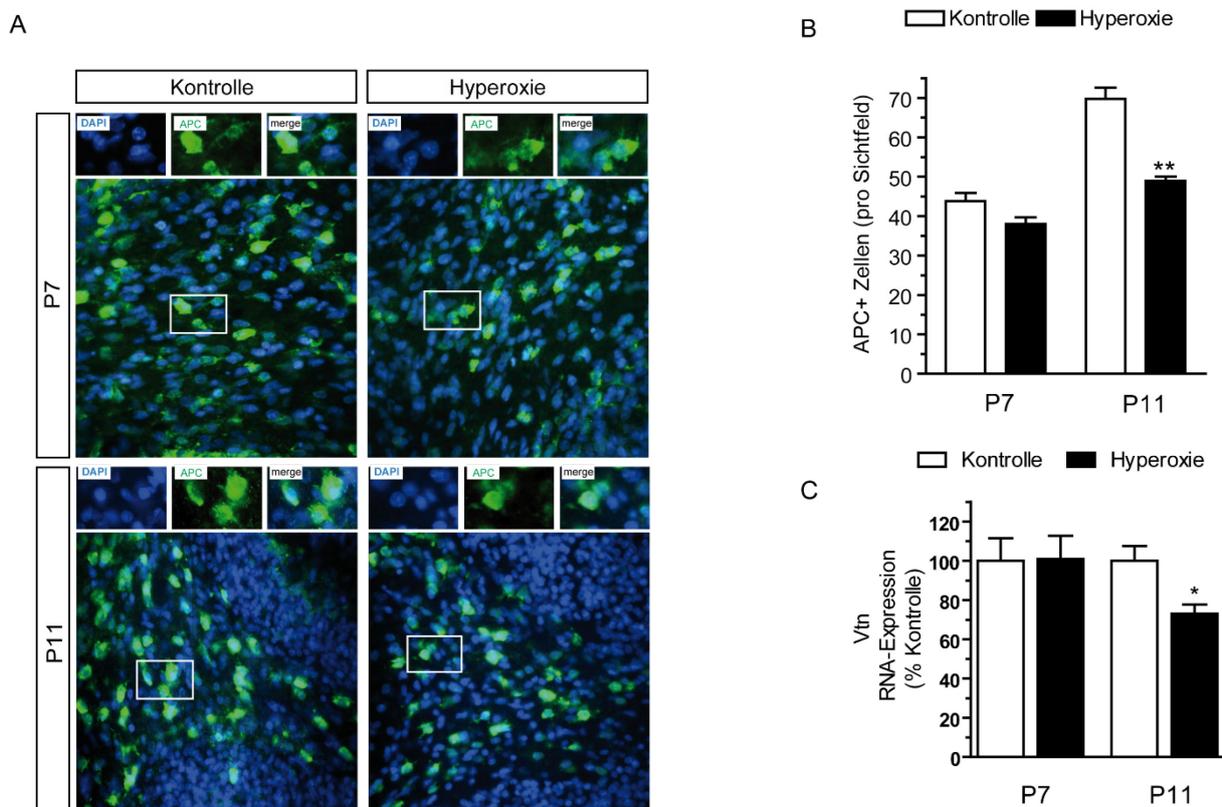
### 7.3.1.3 Hyperoxie stört die Reifung von Oligodendrozyten im Kleinhirn

Reife Oligodendrozyten (OLs) exprimieren das Adenomatous-polyposis-coli-Protein (APC) (TEJEDOR u. a., 2015). Wichtig für die Reifung von OPCs zu Oligodendrozyten im Kleinhirn ist unter anderem die Expression von Vitronectin (VTN) (BUFFO & ROSSI, 2013).

Um den Einfluss einer erhöhten Sauerstoffexposition auf die Reifung von OLs zu beobachten, wurde eine immunhistochemische Färbung von APC+ OLs bei sieben und elf Tage alten Tieren nach Hyperoxie durchgeführt sowie die RNA-Expression von *Vtn* mittels qPCR bestimmt.

Direkt nach der Hyperoxie war die Anzahl der APC+ OLs im Kleinhirn der Hyperoxietiere im Vergleich zu Kontrolltieren nicht verändert. Bei elf Tage alten Ratten, vier Tage nach Beendigung der Sauerstoffexposition, war die Anzahl der APC+ OLs im Kleinhirn in Tieren der Hyperoxiegruppe signifikant reduziert (Abb. 15A, B). Auch die Genexpression von *Vtn* war bei sieben Tage alten Tieren in beiden Gruppen identisch. Zum Zeitpunkt P11 war die RNA-Expression von *Vtn* in den Kleinhirnen der Ratten aus der Hyperoxiegruppe signifikant reduziert (Abb. 15C). Eine erhöhte

Sauerstoffexposition minderte demnach die Reifung von OPCs zu OLs. Dieses Reifungsdefizit könnte durch eine verminderte Expression von *Vtn* verursacht worden sein.

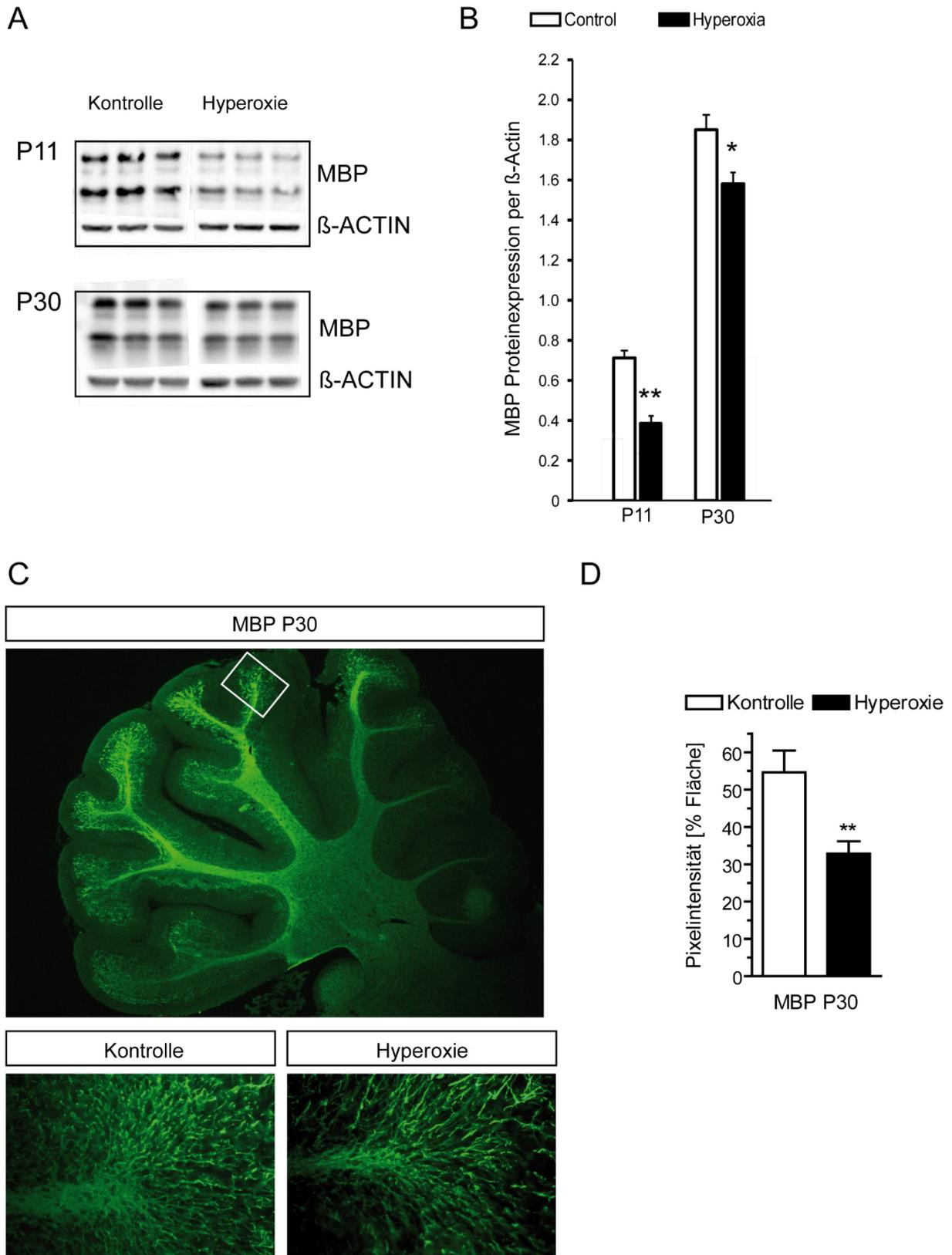


**Abbildung 15: Verminderte Reifung von Oligodendrozyten nach erhöhter Sauerstoffexposition**

10µm dicke Paraffinschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von APC+ reifen OLs (A). Zum Zeitpunkt P7 ist die Anzahl der APC+ OLs in beiden Gruppen identisch. Zum Zeitpunkt P11 ist die Anzahl der APC+ reifen OLs nach Hyperoxie reduziert (\*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=4$ ). Die Genexpression des für die Reifung von OPCs zu reifen Oligodendrozyten wichtigen Faktors *Vtn* zu den Zeitpunkten P7 und P11 (C). Die RNA-Expression von *Vtn* war zum Zeitpunkt P11 in der (\* $p < 0,05$ , t-Test, P7  $n=8$ , P11  $n=6$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015)

#### 7.3.1.4 Myelinisierungsdefizit nach erhöhter Sauerstoffexposition im Kleinhirn

Hauptaufgabe von reifen Oligodendrozyten ist die Myelinisierung von Axonen, um somit eine optimale Reizweiterleitung zu gewährleisten. Das Myelin-Basische Protein (MBP) ist essenziell für die Myelinisierung von Nervenfasern (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001; BIJLARD u. a., 2015). Um den Einfluss von Hyperoxie auf die Myelinisierung zu beobachten, wurde die Proteinexpression von MBP mittels Western Blot in elf und 30 Tage alten Tieren bestimmt. Zu beiden Zeitpunkten war die Expression von MBP in Ratten der Hyperoxiegruppe im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant vermindert (Abb. 16A, B). Um die verminderte Expression von MBP zu bestätigen, wurde zusätzlich in Gewebeschnitten von 30 Tage alten Tieren MBP immunhistochemisch gefärbt. Auch hier konnte eine signifikant geringere Expression von MBP in der weißen Substanz des Kleinhirns bei Hyperoxietieren beobachtet werden. Die MBP+ Pixelintensität war zu diesem Zeitpunkt in den Gewebeschnitten im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert. (Abb. 16C, D).



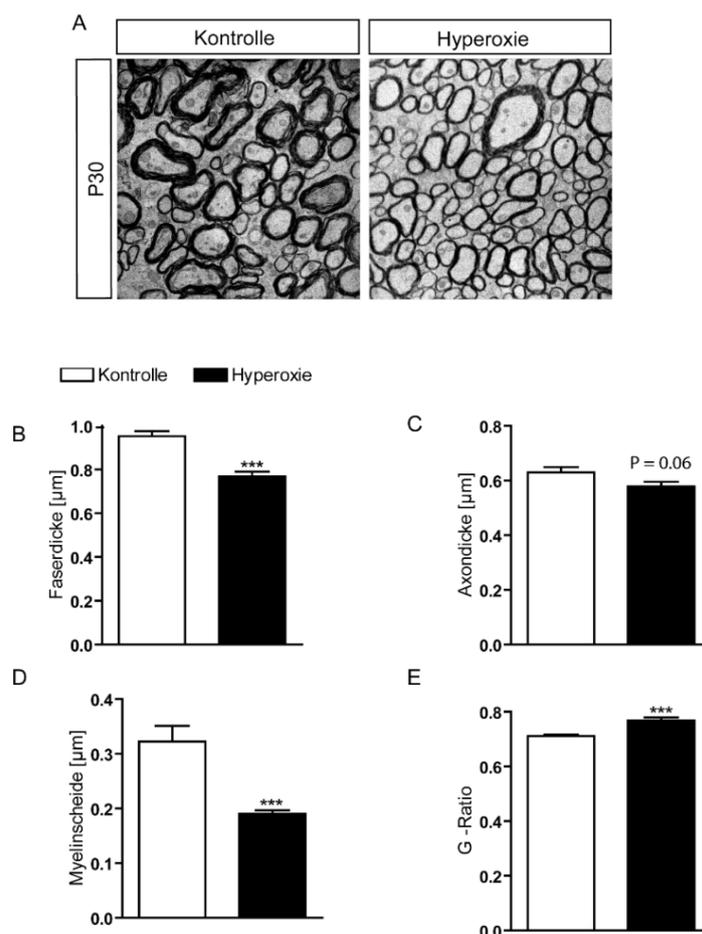
**Abbildung 16: Hyperoxie hemmt die Expression von MBP**

MBP Western Blot Analyse (A) von Kleinhirnslysaten aus Kontroll- und Hyperoxietieren zu den Zeitpunkten P11 und P30 mit  $\beta$ -ACTIN als Ladekontrolle. Die MBP Proteinexpression ist zu beiden Zeitpunkten nach Hyperoxie reduziert (B) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=6$ ).

10 $\mu$ m dicke Paraffinschnitte von 30 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von MBP (C). Die MBP+ Pixelintensität ist in 30 Tage alten Tieren nach Hyperoxie reduziert (D) (\*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=6$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

Zur genaueren Strukturanalyse der Myelinschicht im Kleinhirn nach erhöhter Sauerstoffexposition wurde diese in 30 Tage alten Tieren elektronenmikroskopisch dargestellt und mittels der Software Image J ausgewertet (Abb. 17A). Es wurden die Faserdicke, der Durchmesser des Axons und die Breite der Myelinschicht gemessen sowie die G-Ratio bestimmt. Die durchschnittliche Faserdicke und die durchschnittliche Breite der Myelinschicht waren in 30 Tage alten Tieren der Hyperoxiegruppe im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant vermindert (Abb. 17B, D). Der geringere durchschnittliche Durchmesser der Axone in den Hyperoxietieren war bei  $P = 0,06$  trotz eines deutlichen Trends nicht statistisch signifikant (Abb. 17C). Die G-Ratio ( $d/D$ ) bezieht sich auf das Verhältnis zwischen Axondurchmesser ( $d$ ) und dem Faserdurchmesser ( $D$ ) (PAUS & TORO, 2009). Die G-Ratio war aufgrund der geringeren Faserdicke in den Tieren aus der Hyperoxiegruppe höher als in den Kontrolltieren (Abb. 17E).

Eine erhöhte Sauerstoffexposition von P6 bis P7 hatte eine geringere MBP-Expression zur Folge und führte zu einem anhaltenden Myelinisierungsdefizit im Kleinhirn.



**Abbildung 17: Gestörte Myelinisierung nach erhöhter Sauerstoffexposition**

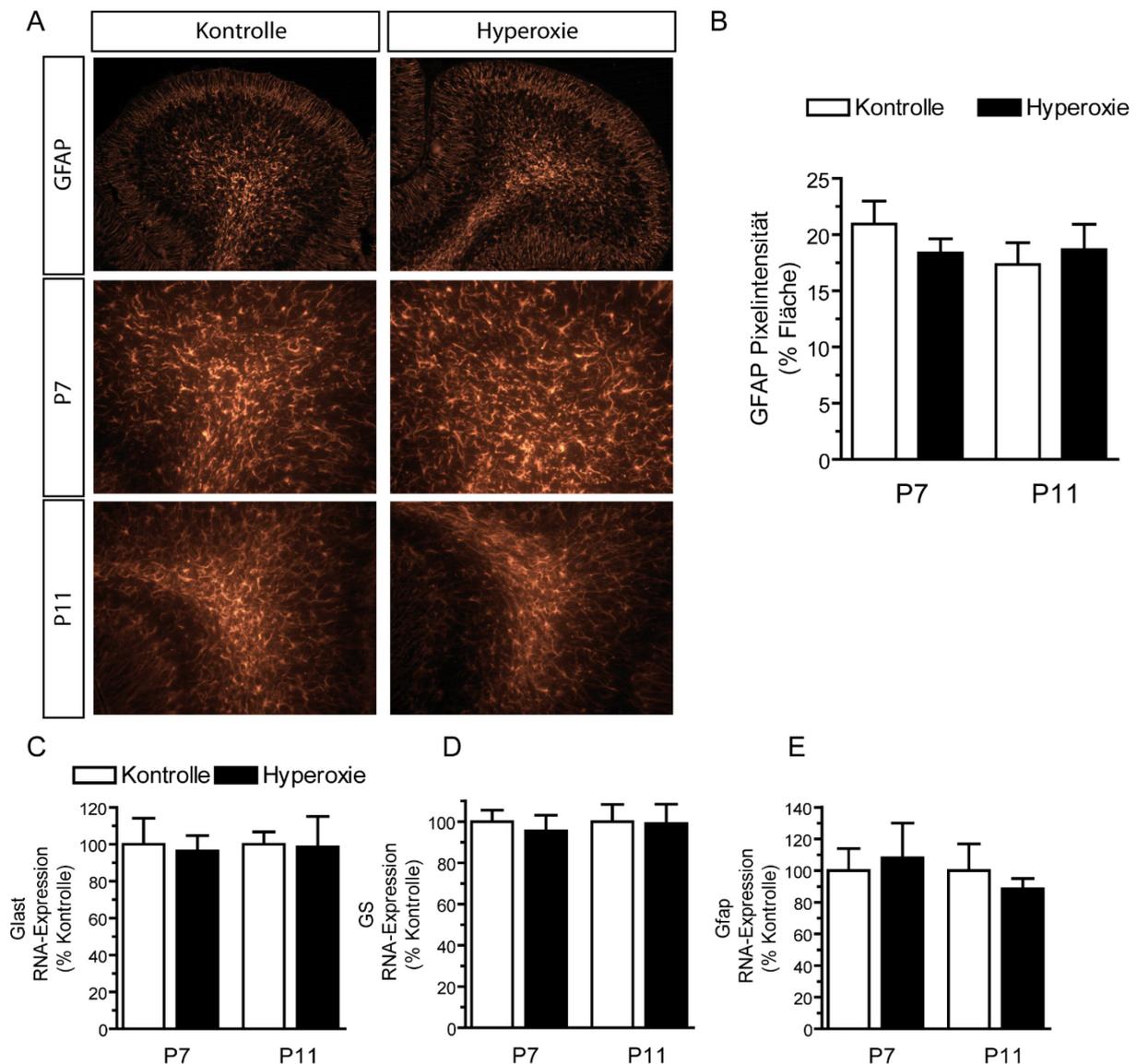
Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Axonquerschnitten im Kleinhirn aus Kontroll- und Hyperoxietieren zum Zeitpunkt P30 (A). Die Faserdicke (B) und der Durchmesser der Myelinscheide (D) sind in Hyperoxietieren vermindert. Die G-Ratio ist dem entsprechend erhöht (E). Der Axondurchmesser (C) ist nicht signifikant nach Hyperoxie reduziert (\*\*\*)  $p < 0,001$ , t-Test,  $n=3$  pro Gruppe, 500 Axone pro Tier) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

### 7.3.2 Astrozyten

#### 7.3.2.1 Hyperoxie hat keinen direkten Einfluss auf die Morphologie von Astrozyten im Kleinhirn

Astrozyten sind die weitest verbreiteten Zellen im Gehirn. In ihrer Funktion und Morphologie weisen sie eine sehr hohe Heterogenität auf (MOLOFSKY u. a., 2012). Neben essenziellen „Housekeeping-Funktionen“, wie der Regulierung der extrazellulären Homöostase und der Stabilisierung von Zell-Zell-Kommunikationen, haben sie auch einen großen Anteil an der neuronalen Aktivität (MARAGAKIS & ROTHSTEIN, 2006). Neueren Erkenntnissen zufolge spielen Astrozyten bei neurophysiologischen und neuropsychologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle (MOLOFSKY u. a., 2012).

Um den Einfluss der erhöhten Sauerstoffexposition auf die Anzahl und die Morphologie von Astrozyten zu untersuchen, wurde bei sieben und elf Tage alten Ratten die RNA-Expression der astrozytären Marker Glutamat-Aspartattransporter (*Glast*), Glutamin-Synthetase (*Gs*) und saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, *Gfap*) mittels quantitativer Real Time PCR (qPCR) ermittelt. Um weitere Rückschlüsse auf die Quantität und auf mögliche morphologische Anomalien ziehen zu können, wurden Kleinhirngewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt. Hierbei wurden die Intensität und die Struktur der GFAP+ Zellen analysiert. Auf RNA-Ebene konnte kein Unterschied in der Expression der drei Marker zu den Zeitpunkten P7 und P11 ermittelt werden (Abb. 18C, D, E). Auch die mittels IHC durchgeführte Färbung der GFAP+ Astrozyten zeigte keine Veränderung in der Pixelintensität sowie keine Strukturveränderungen zu beiden Zeitpunkten (Abb. 18A, B). Eine erhöhte Sauerstoffexposition hatte demnach keinen Einfluss auf die Anzahl oder auf die Morphologie von Astrozyten im Kleinhirn.



**Abbildung 18: Die Expression von astrozytären Markern nach erhöhter Sauerstoffexposition**

10µm dicke Paraffinschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von GFAP(A) (n=4).

Zu keinem der beiden Zeitpunkte ist die GFAP+ Pixelintensität in Hyperoxietieren verändert (B). Die RNA-Expression der astrozytären Marker *Glast* (C), *Gs* (D) und *Gfap* (E) ist zu den Zeitpunkten P7 und P11 nach Hyperoxie im Vergleich zu Kontrolltieren nicht verändert (P7 n=8, P11 n=6) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

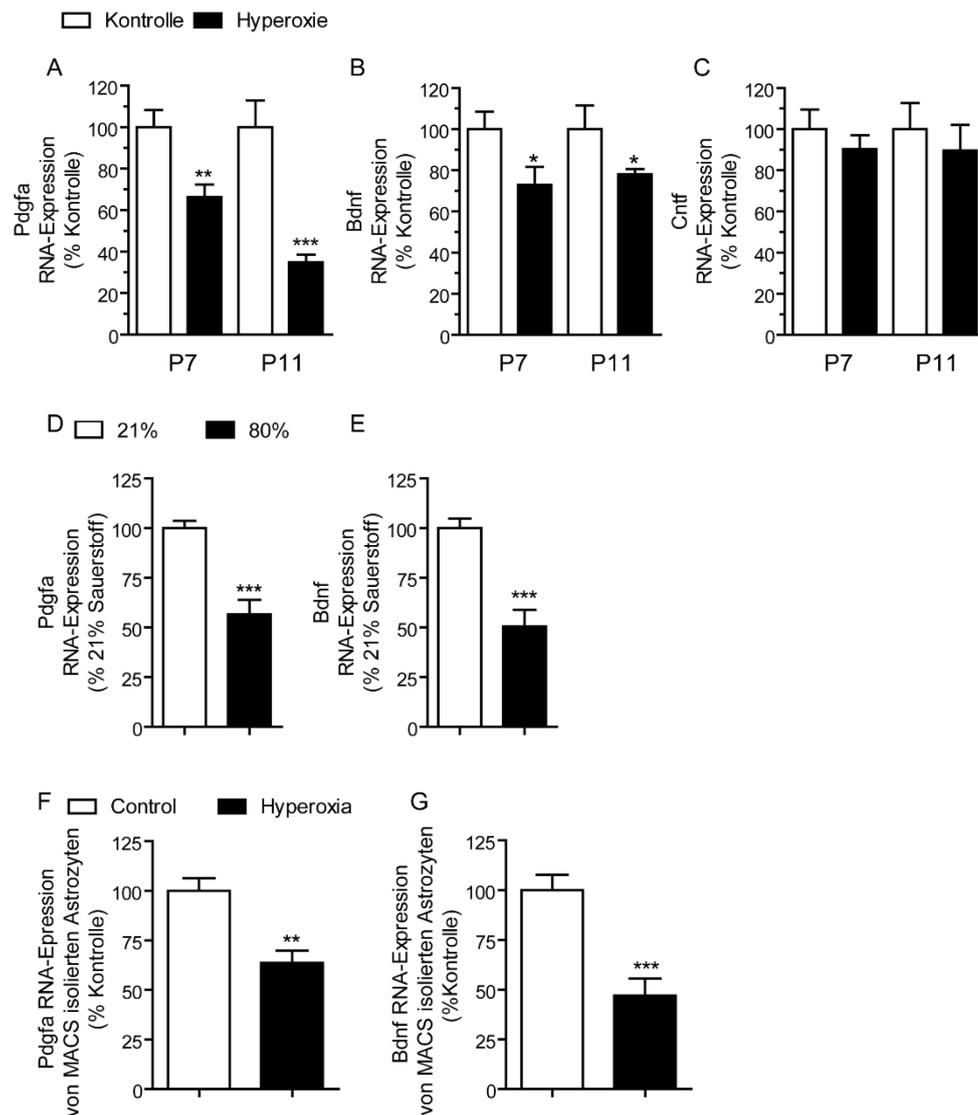
### 7.3.2.2 Veränderte Expression von astrozytären Wachstumsfaktoren nach erhöhter

#### Sauerstoffexposition

Astrozyten exprimieren funktionell verschiedene Wachstumsfaktoren und haben eine regulierende Wirkung auf die Entwicklung des ZNS (CABEZAS u. a., 2016; LI u. a., 2016). Der Platelet-derived growth factor A (PDGFA), BDNF und der Ciliary neurotrophic factor (CNTF) werden unter anderem auch von Astrozyten exprimiert. (CABEZAS u. a., 2016; CLEMENTE u. a., 2013; FULMER u. a., 2014; LI u. a., 2016; MOLOFSKY u. a., 2012; WILSON u. a., 2003). Mittels qPCR wurde die RNA-Expression von *Pdgfa*, *Bdnf* und *Cntf* im Kleinhirn zu den Zeitpunkten P7 und P11 ermittelt. Die Genexpression von *Pdgfa* und *Bdnf* war zu beiden Zeitpunkten in Kleinhirnen aus Tieren der Hyperoxiegruppe signifikant reduziert (Abb. 19A,

B). Die Genexpression von *Cntf* war zu keinem der beiden Zeitpunkte durch die erhöhte Sauerstoffexposition verändert (Abb. 19C). Um die verminderte astrozytäre Expression von *Pdgfra* und *Bdnf* zu bestätigen, wurde die RNA-Expression dieser beiden Faktoren in Astrozytenkulturen *in vitro* mittels qPCR bestimmt. Hierfür wurden primäre purifizierte Kleinhirnastrozyten für 24 Stunden bei 21% O<sub>2</sub>- und bei 80% O<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert. Die Genexpression von *Pdgfra* und *Bdnf* war in den Kulturen, die bei 80% O<sub>2</sub> inkubiert wurden, signifikant geringer als in Zellen, die bei 21% O<sub>2</sub> inkubiert wurden (Abb. 19D, E). Um die sauerstoffabhängige Reduktion der Genexpression von *Pdgfra* und *Bdnf* in Astrozyten *in vivo* zu verifizieren, wurden mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) die GLAST+ Zellen aus dem Kleinhirn sieben Tage alter Tiere nach der Hyperoxie und bei Kontrolltieren isoliert. Der Glutamat-Aspartat-Transporter GLAST wird spezifisch von Astrozyten exprimiert (ROTHSTEIN u. a., 1994). Auch hier konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression von *Pdgfra* und *Bdnf* in *ex vivo* Astrozyten der Hyperoxiegruppe mittels qPCR ermittelt werden (Abb. 19F, G). Die hier gezeigten Daten aus Kleinhirnllysaten, aus spezifisch isolierten zerebellären GLAST+ Astrozyten und aus astrozytären Mono-Kulturen zeigen, dass eine hohe Sauerstoffexposition zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *Pdgfra* und *Bdnf* in Astrozyten führt. Faktoren, die für die Entwicklung von Oligodendrozyten und Neuronen erforderlich sind.

Eine erhöhte Aktivierung der Astrozyten oder eine Astrogliose, ein reaktiver Zustand der Astrozyten, konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 19: Hyperoxie vermindert die Expression von Wachstumsfaktoren in Astrozyten**

Die RNA-Expression der beiden Wachstumsfaktoren *Pdgfra* (A) und *Bdnf* (B) ist im Kleinhirn von Hyperoxietieren zu den Zeitpunkten P7 und P11 reduziert. Die RNA-Expression von *Cntf* (C) wird nicht durch die Hyperoxie beeinflusst (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test, P7  $n=8$ , P11  $n=6$ ).

In Zellkulturversuchen mit primären Astrozyten, die für 24h bei 80% und 21% Sauerstoff kultiviert wurden, ist die RNA-Expression von *Pdgfra* (D) und *Bdnf* (E) in den Astrozyten nach einer erhöhten Sauerstoffexposition vermindert (\*\* $p < 0,001$ , t-Test,  $n=9$ ).

*Ex vivo* Analysen zeigen ebenfalls eine Reduktion der RNA Expression von *Pdgfra* (F) und *Bdnf* (G) nach Hyperoxie in mittels MACS isolierten Astrozyten zum Zeitpunkt P7 (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , t-Test,  $n=6$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

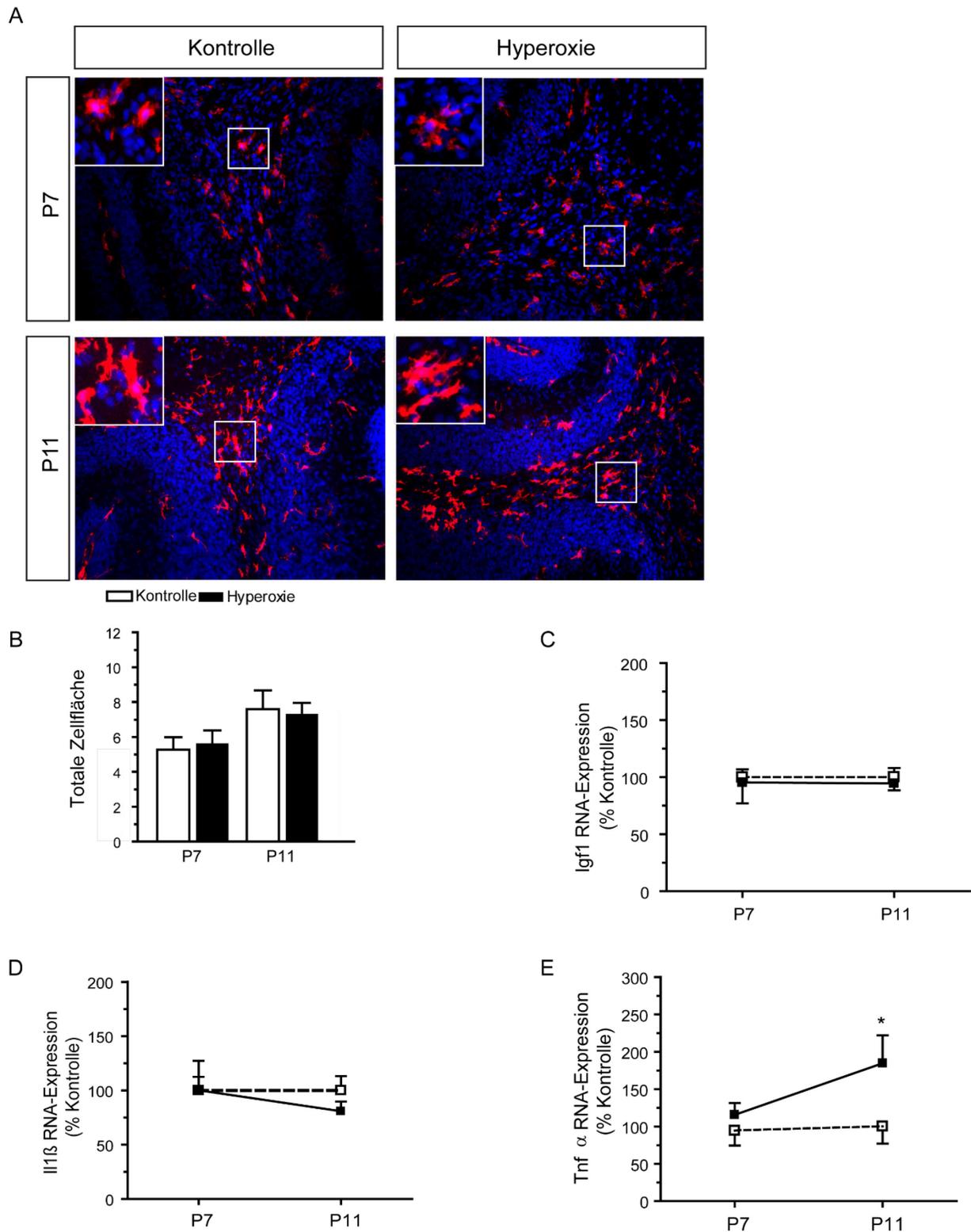
### 7.3.3 Mikroglia

#### 7.3.3.1 Keine direkte Aktivierung von Mikroglia durch Hyperoxie im unreifen Kleinhirn

Mikroglia sind Zellen des Immunsystems in Klein- und Großhirn (KETTENMANN u. a., 2011). Neben ihrer Funktion als Immunzelle haben sie auch einen großen Einfluss auf die Entwicklung von anderen Gliazellen und Neuronen (BENN u. a., 2001; EYO & DAILEY, 2013). Neonatale Hyperoxie induziert eine partielle Aktivierung der Mikroglia im Großhirn (SCHMITZ u. a., 2014). Um eine mögliche Aktivierung der Mikroglia durch Hyperoxie im Kleinhirn zu untersuchen, wurden diese in Kleinhirngewebschnitten zu

den Zeitpunkten P7 und P11 immunhistochemisch gefärbt. Die Struktur der IBA1+ Mikroglia gibt Rückschlüsse auf deren Aktivität. Des Weiteren wurde die Genexpression der beiden Entzündungsmarker Interleukin-1 $\beta$  (*Il1 $\beta$* ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (*Tnfa*) sowie die Genexpression des von Mikroglia produzierten Wachstumsfaktors, insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (Insulin-like growth factors, *Igf1*), mittels qPCR ermittelt.

Zu beiden Zeitpunkten war die Morphologie der IBA1+ Mikroglia in Hyperoxie- und Kontrolltieren ähnlich. In sieben Tage alten Ratten war in beiden Gruppen eine amöboide Struktur der Mikroglia zu erkennen (Abb. 20A, B). In den elf Tage alten Ratten waren die Mikroglia vorrangig in einem Intermediärzustand, d. h. ihre Form war verglichen mit dem früheren Zeitpunkt bereits wesentlich verzweigter (Abb. 20A, B). Die Genexpression von *Il1 $\beta$*  und *Tnfa* war bei beiden Gruppen zum Zeitpunkt P7 vergleichbar (Abb. 20D, E). Bei elf Tage alten Ratten gab es keinen Unterschied bei der Genexpression von *Il1 $\beta$*  (Abb. 20D). Die Genexpression von *Tnfa* war zu diesem Zeitpunkt allerdings in den Hyperoxietieren leicht erhöht (Abb. 20E). Keine Unterschiede konnten bei der Genexpression von *Igf1* beobachtet werden (Abb. 20C). Mikroglia zeigen somit allenfalls eine geringe Reaktion auf die erhöhte Sauerstoffexposition.



**Abbildung 20: Aktivität von Mikroglia nach erhöhter Sauerstoffexposition**

10µm dicke Paraffinschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von IBA1 (A). Zu keinem der beiden Zeitpunkte konnte ein deutlicher Unterschied in der Struktur und damit verbunden in der Aktivität der Mikroglia beobachtet werden (B) (n=4).

Die RNA-Expression von *Igf1* (C) und *Il1β* (D) war zu den Zeitpunkten P7 und P11 im Kleinhirn von Kontroll- und Hyperoxietieren nicht unterschiedlich. Zum Zeitpunkt P7 konnte auch kein Unterschied in der RNA-Expression von *Tnfα* beobachtet werden. Zum Zeitpunkt P11 war die RNA-Expression von *Tnfα* in Hyperoxietieren erhöht (E) (\*p < 0,05, t-Test, P7 n=8, P11 n=6) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2015).

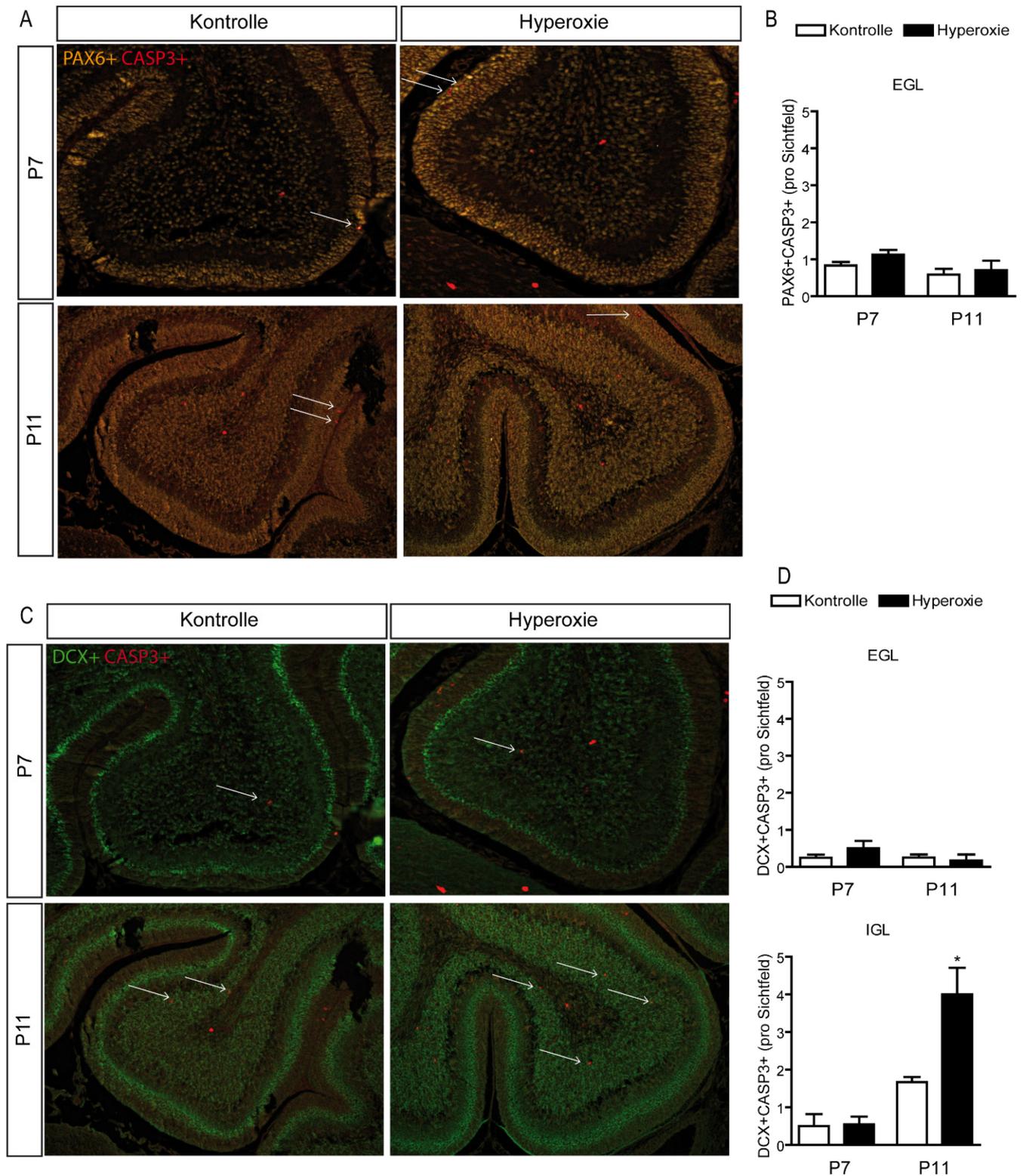
## 7.4 Neuronale Schädigung

### 7.4.1 Körnerzellen

#### 7.4.1.1 Erhöhter Zelltod von unreifen Körnerzellen im IGL nach erhöhter Sauerstoffexposition

Im Kleinhirn sind Körnerzellen die größte neuronale Zellpopulation (CONTESTABILE, 2002). Während der fetalen und frühen postnatalen Entwicklung proliferieren Körnerzell-Vorläuferzellen (granule cell precursors, GCPs) in der äußeren Körnerzellschicht (external granular layer, der EGL). Mit voranschreitender Entwicklung migrieren unreife Körnerzellen aus dem EGL und bilden die innere Körnerzellschicht (internal granular layer, der IGL) (CHANG u. a., 2015; GOLDOWITZ & HAMRE, 1998; WHITE & SILLITOE, 2013). Oxidativer Stress kann in neuronalen Zellen zu einer erhöhten Apoptose führen (KLEIN & ACKERMAN, 2003; KONYALIOGLU u. a., 2013). Um den Einfluss neonataler Hyperoxie auf das Überleben von GCPs zu untersuchen, wurden diese im EGL mit dem Marker Paired box protein Pax-6 (PAX6) sowie dem Apoptosemarker aktive Caspase 3 (CASP3) immunhistochemisch zu den Zeitpunkten P7 und P11 gefärbt. Ebenfalls wurde der Einfluss von erhöhter Sauerstoffexposition auf das Überleben von unreifen Körnerzellen (Granule cells, GCs) beobachtet. Hierfür wurden diese ebenfalls im EGL wie auch im IGL mittels IHC Doublecortin+ (DCX) und CASP3+ zu den Zeitpunkten P7 und P11 gefärbt.

In der Hyperoxiegruppe war die Anzahl der PAX6+ und CASP3+ GCPs im EGL zu keinem der beiden Zeitpunkte erhöht (Abb. 21A, B). Auch die Anzahl der DCX+ und CASP3+ unreifen GCs im EGL war in beiden Gruppen zu beiden Zeitpunkten identisch (Abb. 21C, D). Bei sieben Tage alten Tieren konnte auch kein Unterschied in der Anzahl der DCX+ und CASP3+ unreifer GCs im IGL festgestellt werden (Abb. 21C, D). Interessanterweise war die Anzahl der DCX+ und CASP3+ unreifer GCs im IGL zum Zeitpunkt P11 in der Hyperoxiegruppe erhöht (Abb. 21C, D), somit konnte eine erhöhte Apoptose neuronaler Zellen vier Tage nach Erholung unter Raumluftbedingungen in der Hyperoxiegruppe beobachtet werden.



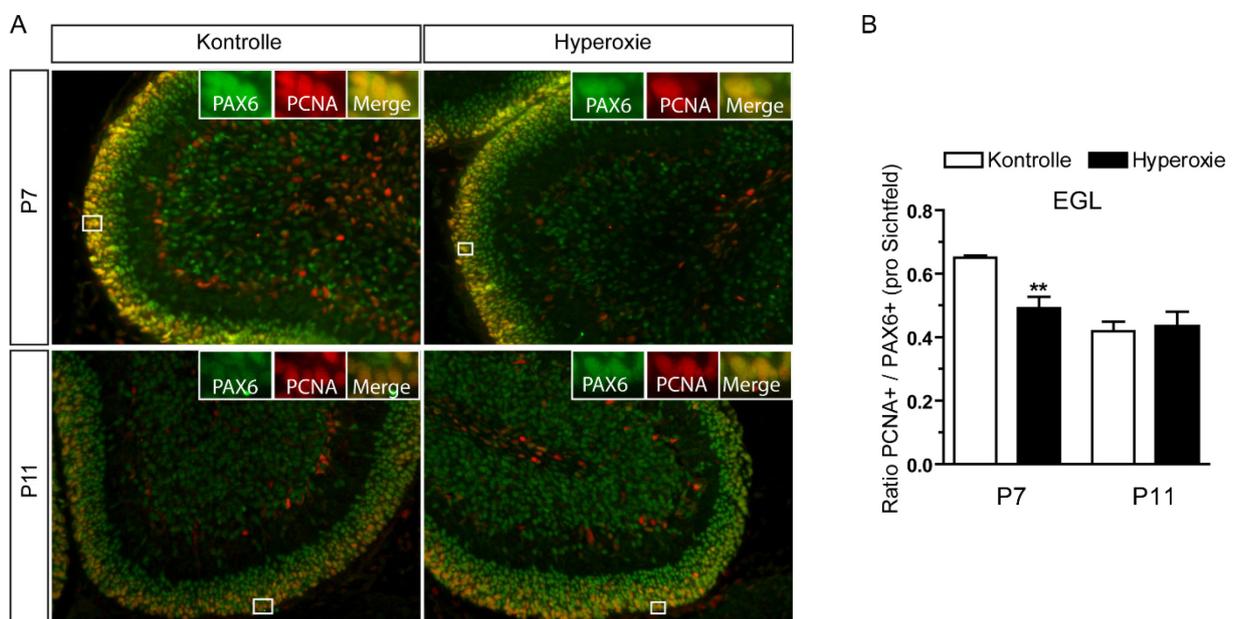
**Abbildung 21: Erhöhter Zelltod von unreifen Neuronen nach Hyperoxie**

10µm dicke Paraffinschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von PAX6 und CASP3 (A). Zu keinem der beiden Zeitpunkte war die Anzahl der PAX6+ und CASP3+ doppelpositiver GCPs im EGL des Kleinhirns nach erhöhter Sauerstoffexposition erhöht (B).

10µm dicke Paraffinschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von DCX (unreife GCs) und CASP3 (C). Zum Zeitpunkt P7 konnte kein Unterschied in der Anzahl der DCX+ und CASP3+ unreifer GCs im EGL oder IGL beobachtet werden (D). Zum Zeitpunkt P11 war die Anzahl der DCX+ und CASP3+ unreifen GCs im EGL identisch in beiden Gruppen (D). Die Anzahl der DCX+ CASP3+ unreifen GCs im IGL war zum Zeitpunkt P11 in der Hyperoxiegruppe im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht (D) (\*p < 0,05, t-Test, n=4) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

#### 7.4.1.2 Verminderte Proliferation von Körnerzell-Vorläuferzellen im EGL nach Hyperoxie

In Nagern proliferieren GCPs im EGL des Kleinhirns bis zur einschließlich dritten Woche nach der Geburt (CHANG u. a., 2015). Um den Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Proliferationsrate von GCPs zu untersuchen, wurden GCPs in Kleinhirngewebeschnitten mit dem GCP-Marker PAX6 und dem Proliferationsmarker Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) zu den Zeitpunkten P7 und P11 immunhistochemisch gefärbt. Direkt nach der Hyperoxie zum Zeitpunkt P7 war die Rate der proliferierenden PAX6+ und PCNA+ GCPs im Kleinhirn in der Hyperoxietiere vermindert (Abb. 22A, B). Bei elf Tage alten Tieren konnte kein Unterschied in der Proliferationsrate beobachtet werden (Abb. 22A, B).



**Abbildung 22: Hyperoxie stört die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen**

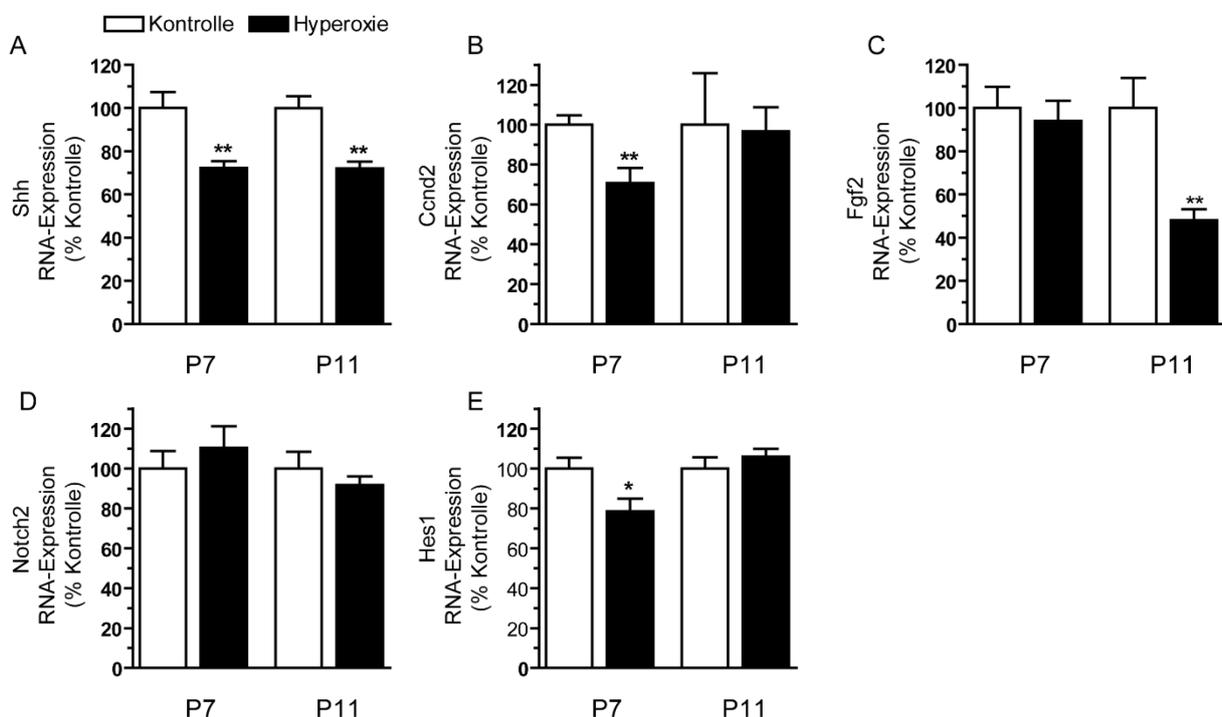
10µm dicke Paraffinschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von PAX6 und PCNA (A). Die Ratio der PCNA+PAX6+ GCPs pro PAX6+ GCs war im EGL des Kleinhirns nach Hyperoxie zum Zeitpunkt P7 reduziert (B). Zum Zeitpunkt P11 konnte dieser Unterschied nicht mehr beobachtet werden (B) (\*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=4$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

#### 7.4.1.3 Fehlgesteuerte Regulierung der Proliferation von Körnerzell-Vorläuferzellen im EGL nach erhöhter Sauerstoffexposition

Die Proliferation der GCPs im EGL des Kleinhirns wird vom Mitogen Sonic hedgehog (SHH) reguliert (HALDIPUR u. a., 2011; LEE u. a., 2010). SHH stimuliert die Aktivität des Zellteilungsgens CyclinD2 (CCND2) (VAILLANT & MONARD, 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass SHH über die Aktivierung des NOTCH-Signalwegs Vorläuferzellen im Vorläuferstatus halten und somit die Proliferation begünstigen kann (SOLECKI u. a., 2001). Eine Unterbindung des SHH-Signalwegs durch den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (Fibroblast growth factor 2, FGF2), um die Reifung und Differenzierung von Vorläuferzellen zu fördern, ist ebenfalls beschrieben (FOGARTY u. a., 2007; YU u. a., 2011). Um aufgrund

der gestörten Proliferation auch den Einfluss von Hyperoxie auf die Regulierung der Proliferation von GCPs im Kleinhirn zu untersuchen, wurde die Genexpression von *Shh*, *Ccnd2*, *Fgf2*, *Notch2* und einem Zielgen des Notch-Signalwegs, Hairy und Enhancer von split-1 (*Hes1*), mittels qPCR zu den Zeitpunkten P7 und P11 ermittelt.

Zu beiden Zeitpunkten war die Genexpression von *Shh* im Kleinhirn von Tieren der Hyperoxiegruppe signifikant vermindert (Abb. 23A). Direkt nach der erhöhten Sauerstoffexposition zum Zeitpunkt P7 war auch die Genexpression von *Ccnd2* im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Im Kleinhirn elf Tage alter Tiere war die Genexpression von *Ccnd2* bei Hyperoxietieren und bei Kontrolltieren identisch (Abb. 23B). Die Genexpression von *Notch2* war zu keinem der beiden Zeitpunkte verändert (Abb. 23D). Allerdings war zum Zeitpunkt P7 die Genexpression von *Hes1* in der Hyperoxiegruppe reduziert. Zum Zeitpunkt P11 war die Genexpression von *Hes1* in Kontroll- und Hyperoxiegruppe vergleichbar (Abb. 23E). Direkt nach der erhöhten Sauerstoffexposition (P7) war die Genexpression von *Fgf2* in beiden Gruppen vergleichbar. Nach vier Tagen Erholung unter Raumluftbedingungen (P11) war die Genexpression des möglichen Inhibitors des SHH-Signalwegs, *Fgf2*, im Kleinhirn bei Tieren der Hyperoxiegruppe reduziert (Abb. 23C). Hyperoxie führt demnach zu einer Dysregulation der Proliferation der GCPs im neonatalen Kleinhirn.

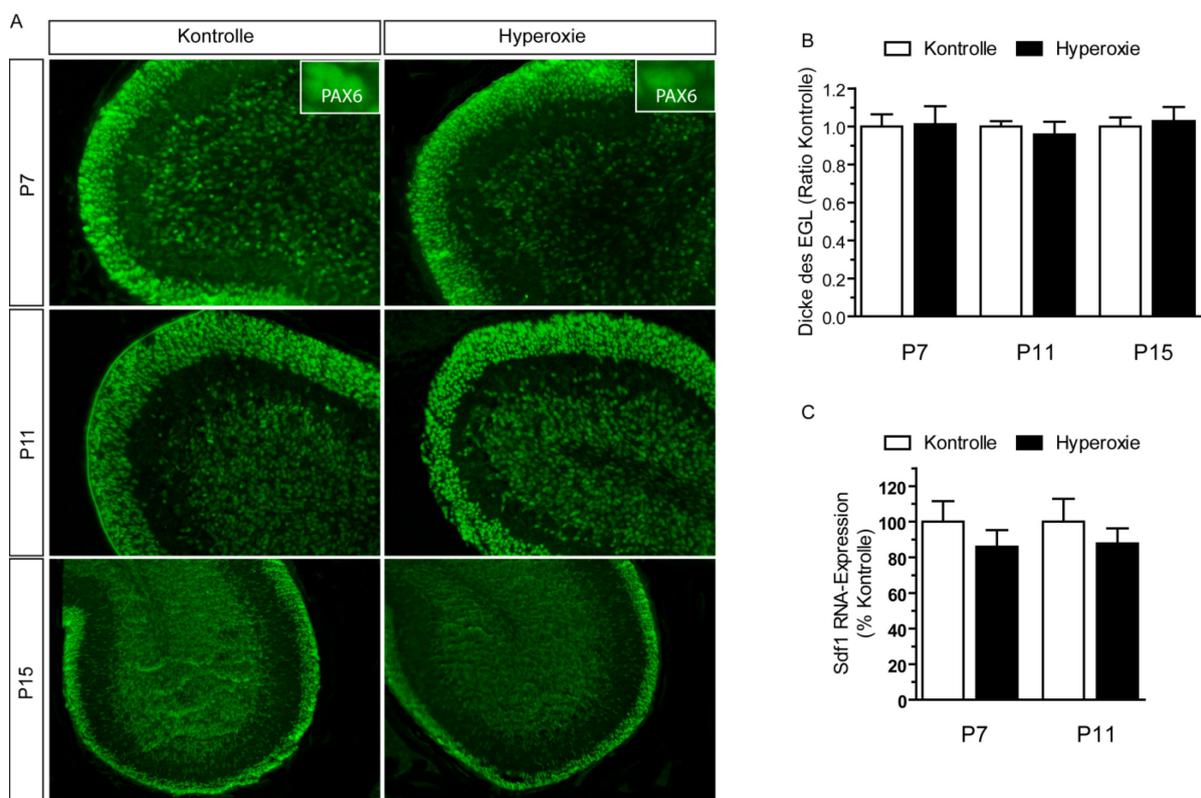


**Abbildung 23: Fehlsteuerung der neuronalen Proliferation nach erhöhter Sauerstoffexposition**

Die RNA-Expression von *Shh* war im Kleinhirn nach Hyperoxie zu den Zeitpunkten P7 und P11 reduziert (A). Die RNA-Expression von *Ccnd2* (*Cyc2D*) war im Kleinhirn nach Hyperoxie zum Zeitpunkt P7 reduziert. Zum Zeitpunkt P11 konnte kein Unterschied beobachtet werden (B). Zum Zeitpunkt P7 konnte kein Unterschied in der RNA-Expression von *Fgf2* beobachtet werden. Zum Zeitpunkt P11 war die RNA-Expression von *Fgf2* im Kleinhirn nach Hyperoxie reduziert (C). Die RNA-Expression von *Notch2* war zu keinem Zeitpunkt (P7 und P11) im Kleinhirn nach Hyperoxie reduziert (D). Die RNA-Expression von *Hes1* war im Kleinhirn nach Hyperoxie zum Zeitpunkt P7 reduziert. Zum Zeitpunkt P11 konnte kein Unterschied in der Expression von *Hes1* beobachtet werden (E) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test, P7 n=8, P11 n=6) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

#### 7.4.1.4 Eine erhöhte Sauerstoffexposition hat keinen Einfluss auf die Migration von unreifen Körnerzellen des EGLs in den IGL

GCPs im EGL des Kleinhirns werden durch SDF1 zur Migration angeregt (HAGIHARA u. a., 2009). Unreife Körnerzellen migrieren entlang der Fasern der Bergmann-Glia und unter der Kontrolle von BDNF in den IGL (BORGHESANI u. a., 2002; XU u. a., 2013). Defizite in der Migration von Körnerzellen führen zu einer Zunahme der Zellschichten im EGL (BORGHESANI u. a., 2002; HAGIHARA u. a., 2009). Um aufgrund einer beobachteten Reduktion der RNA-Expression von *Bdnf* (Abb. 19B) eine potentielle Beeinträchtigung der Migration der unreifen GCs nach der Hyperoxie zu untersuchen, wurde die RNA-Expression von *Sdf1* zu den Zeitpunkten P7 und P11 mittels qPCR ermittelt sowie die Schichtdicke des PAX6+ EGLs immunohistochemisch zu den Zeitpunkten P7, P11 und P15 bestimmt. Zu keinem der Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied in der RNA-Expression von *Sdf1* in den Kleinhirnen der Hyperoxiegruppe ermittelt werden (Abb. 24C). Eine erhöhte Sauerstoffexposition von P6 bis P7 hatte auch keinen Einfluss auf den Durchmesser des EGL. Zu allen Zeitpunkten war die Schicht der PAX6+ GCPs im EGL in den Kleinhirnen der Hyperoxiegruppe und in den Kleinhirnen der Kontrollgruppe vergleichbar (Abb. 24A, B). Die durch die Hyperoxie verursachte Reduktion von *Bdnf* hat demnach keinen entscheidenden Einfluss auf die Migration von unreifen GCs.



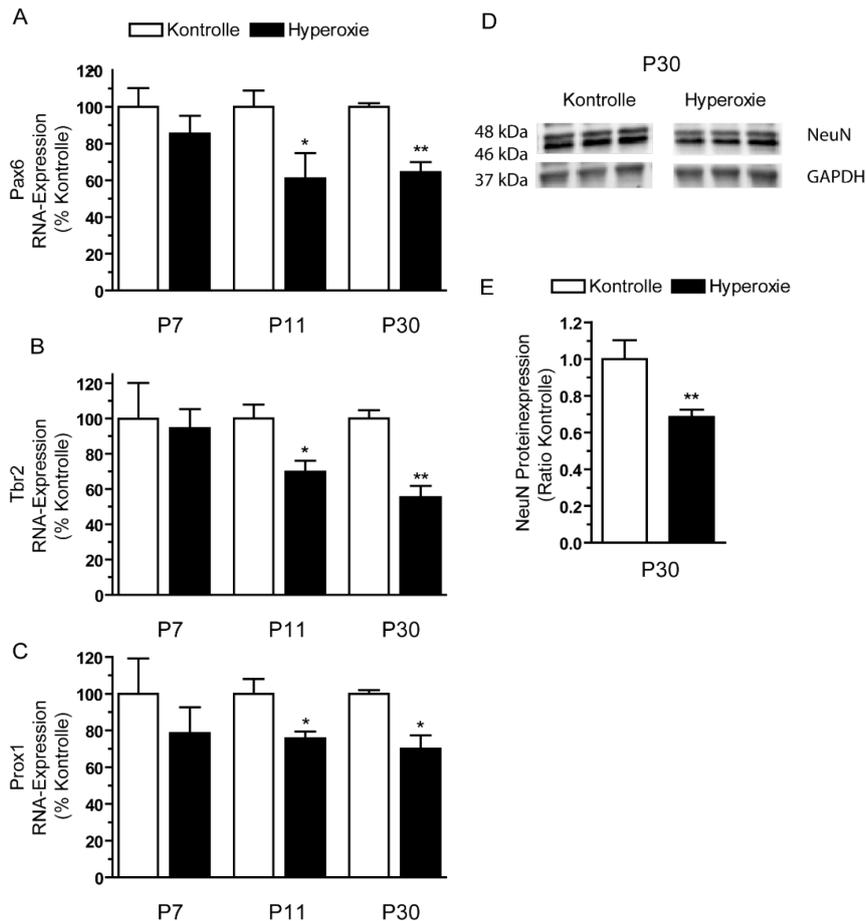
**Abbildung 24: Postnatale Hyperoxie hat keinen Einfluss auf die Migration von Körnerzellen**

10µm dicke Paraffinschnitte von 7, 11 und 15 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von PAX6 (A). Zu allen drei Zeitpunkten ist der Durchmesser des EGLs in beiden Gruppen vergleichbar (B) (n=4).

Die RNA-Expression von *Sdf1* (C) war zu den Zeitpunkten P7 und P11 in den Kleinhirnen von Kontroll- und Hyperoxiegruppe vergleichbar (P7 n=8, P11 n=6) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

#### 7.4.1.5 Hyperoxie induzierte eine anhaltende Schädigung der Körnerzellen im Kleinhirn

Während der postnatalen Entwicklung im Kleinhirn reifen GCPs im EGL zu unreifen GCs. Diese migrieren in den IGL und differenzieren zu reifen Körnerzellen (GCs). GCPs und GCs exprimieren je nach Reifegrad unterschiedliche Marker. GCPs exprimieren PAX6. Unreife GCs exprimieren unter anderem das T-box Brain Protein 2 (TBR2). Reife GCs exprimieren das Prospero Homeobox Protein 1 (PROX1) und den Marker Neuronal Nuclei (NeuN) (CHANG u. a., 2015; ENDESFELDER u. a., 2014; GOLDOWITZ & HAMRE, 1998; WHITE & SILLITOE, 2013). Um zu untersuchen, ob die beobachtete Beeinträchtigung der Entwicklung der Körnerzellen, wie verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose, dauerhafte Auswirkungen auf die GCPs, die unreifen GCs und die reifen GCs hat, wurde mittels qPCR die Genexpression von *Pax6*, *Tbr2* und *Prox1* zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30 im Kleinhirn von Kontrolltieren sowie nach Hyperoxie ermittelt. Darüber hinaus wurde bei 30 Tage alten Ratten die Proteinexpression von NeuN mittels Western Blot bestimmt. Die Genexpression der drei neuronalen Marker war direkt nach der Hyperoxie zum Zeitpunkt P7 nicht verändert (Abb. 25A, B, C). Bei elf Tage alten Tieren konnte eine Reduktion der Genexpression von *Pax6*, *Tbr2* und *Prox1* in den Hyperoxietieren beobachtet werden (Abb. 25A, B, C). Die Genexpression der drei neuronalen Marker *Pax6*, *Tbr2* und *Prox1* war auch noch zum Zeitpunkt P30 vermindert (Abb. 25A, B, C). Mittels NeuN Western Blot konnte die dauerhafte Schädigung der Körnerzellen im Kleinhirn nach Hyperoxie von P6 bis P7 in 30 Tage alten Tieren bestätigt werden. Die Proteinexpression von NeuN war zu diesem Zeitpunkt signifikant geringer im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 25D, E). Die Reduktion der neuronalen Marker auf RNA- und auf Proteinebene entspricht einer langfristigen Schädigung der Körnerzellen im Kleinhirn nach neonataler Hyperoxie von P6 bis P7.



**Abbildung 25: Verminderte Expression von neuronalen Markern nach Hyperoxie**

A) Die RNA-Expression von Pax6 im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30. Ab P11 war die RNA-Expression von Pax6 in den Kleinhirnen von Hyperoxietieren reduziert.

B) Die RNA-Expression von Tbr2 im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30. Ab P11 war die RNA-Expression von Tbr2 in den Kleinhirnen von Hyperoxietieren reduziert.

C) Die RNA-Expression von Prox1 im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30. Ab P11 war die RNA-Expression von Prox1 in den Kleinhirnen von Hyperoxietieren reduziert (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test, P7  $n=8$ , P11  $n=6$ , P30  $n=5$ ).

D) Zum Zeitpunkt P30 wurde die Proteinexpression von NeuN mittels Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle in Kleinhirnllysaten von Hyperoxie und Kontrolltieren bestimmt.

E) Die Proteinexpression von NeuN war im Kleinhirn von Hyperoxietieren im Vergleich zu Kontrollen reduziert (\*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=6$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

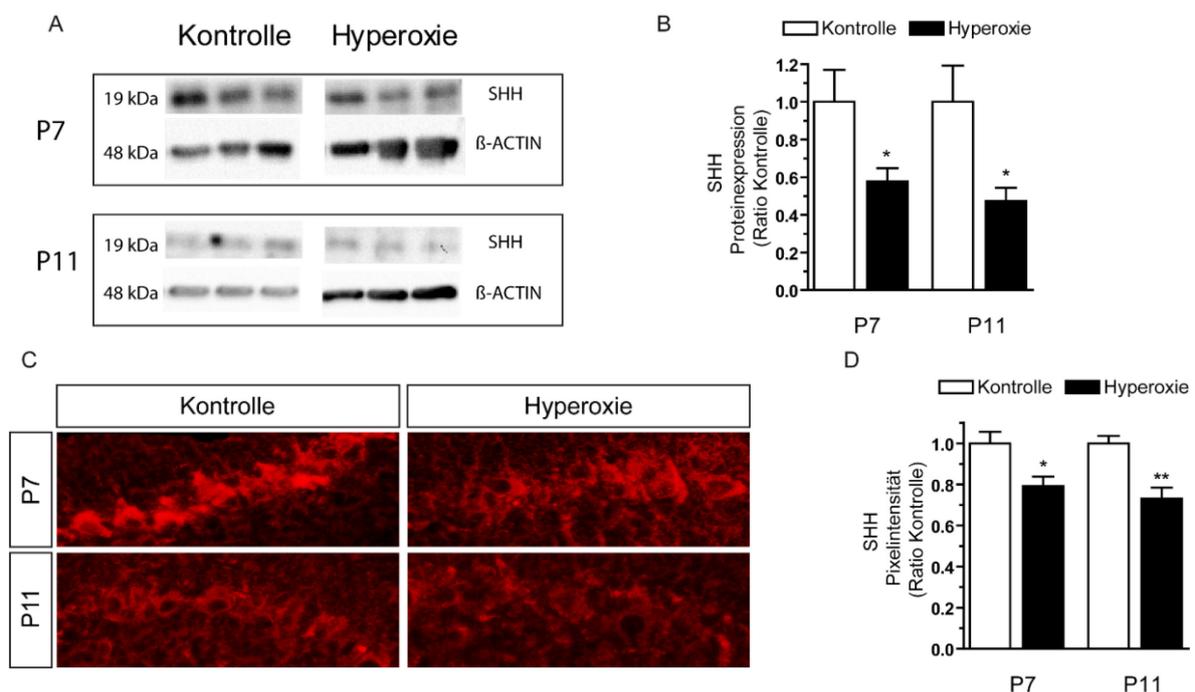
## 7.4.2 Purkinjezellen

### 7.4.2.1 Verminderte Expression von SHH in Purkinjezellen des Kleinhirns nach erhöhter Sauerstoffexposition

Purkinjezellen (Purkinje cells, PCs) sind die größten Neurone im Kleinhirn und gehören zu den größten Neuronen überhaupt. Sie liegen in einer Schicht mit dem Durchmesser einer Zellreihe, der Purkinjezellschicht (GOLDOWITZ & HAMRE, 1998). Purkinjezellen fungieren als einer der Hauptregulatoren der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns. PCs sind im Kleinhirn die einzige Zellpopulation, die SHH zur Stimulation der Zellproliferation von Vorläuferzellen exprimiert (FLEMING u. a., 2013; SILLITOE & JOYNER, 2007). Um die im Kleinhirn generell beobachtete Reduktion der *Shh*-Genexpression auf Proteinebene zu bestätigen, wurde die Proteinexpression von SHH im Kleinhirn nach Hyperoxie und in Kontrollen

mittels Western Blot zu den Zeitpunkten P7 und P11 ermittelt. Um im Speziellen die verminderte Proteinexpression von SHH in PCs zu bestätigen, wurden Kleinhirngewebeschnitte immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen SHH zu den Zeitpunkten P7 und P11 gefärbt.

Direkt nach der Hyperoxie zum Zeitpunkt P7 und auch noch nach vier darauffolgenden Tagen unter Raumluftbedingungen zum Zeitpunkt P11 war die Proteinexpression von SHH im Kleinhirn von Tieren der Hyperoxiegruppe signifikant reduziert (Abb. 26A, B). Auch bei der immunhistochemischen Färbung konnte eine signifikante Reduktion der SHH-Expression beobachtet werden. Die Pixelintensität für SHH war in der Purkinjzellschicht der Hyperoxietiere zu den Zeitpunkten P7 und P11 geringer (Abb. 26C, D).



**Abbildung 26: Hyperoxie reduziert die Expression von SHH in Purkinjzellen**

A) Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von SHH zu den Zeitpunkten P7 und P11 bestimmt. Es wurde nur die aktive 19kDa Variante analysiert.  $\beta$ -ACTIN diente als Ladekontrolle.

B) Die Proteinexpression von SHH war zu den Zeitpunkten P7 und P11 im Kleinhirn von Hyperoxietieren vermindert (\* $p < 0,05$ , t-Test,  $n=6$ ).

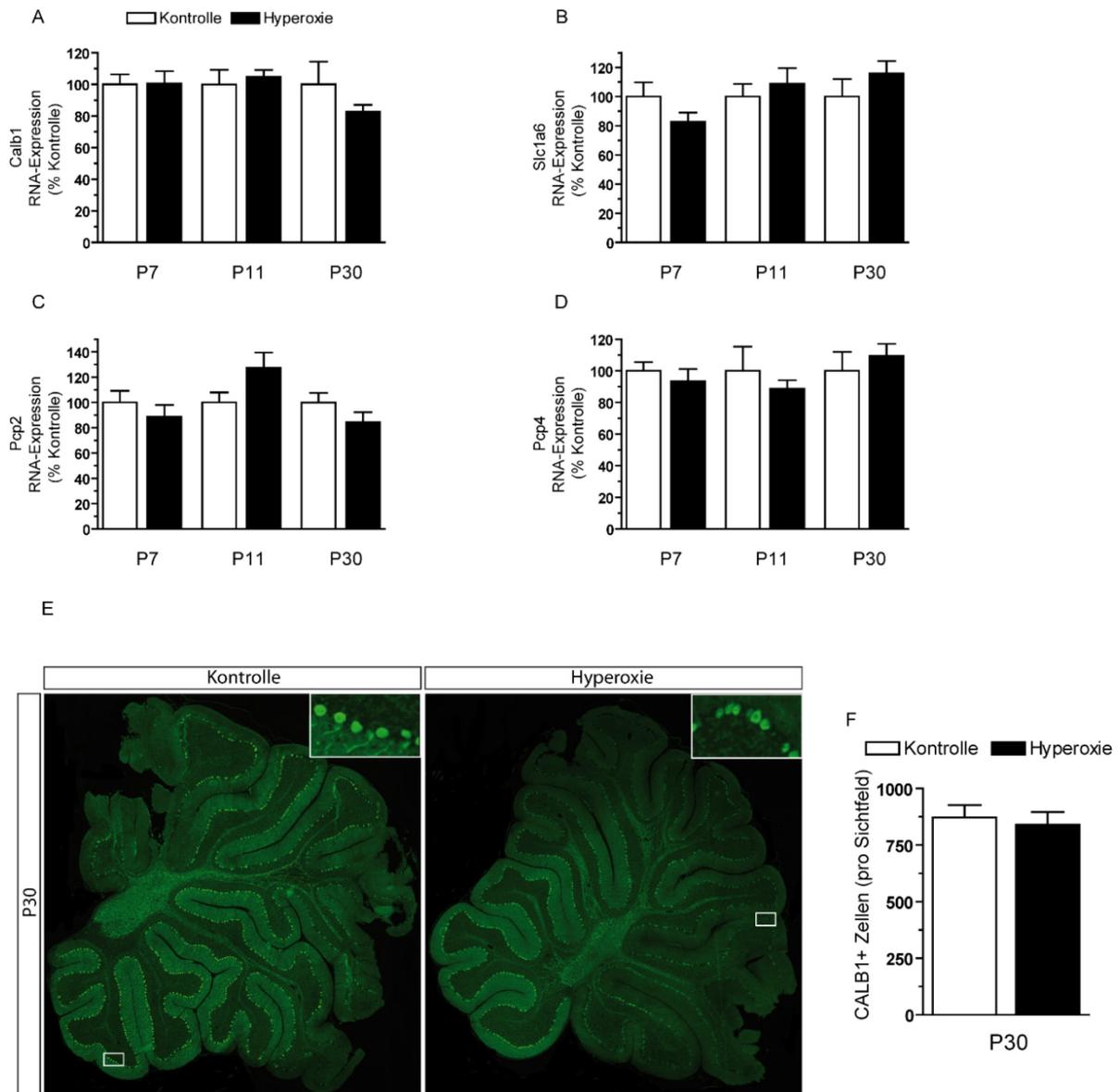
C) 10 $\mu$ m dicke Paraffinschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von SHH.

D) Die SHH-Pixelintensität war in der Purkinjzellschicht im Kleinhirn von Hyperoxietieren zu beiden Zeitpunkten reduziert (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=4$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

#### 7.4.2.2 Hyperoxie hat keinen Einfluss auf die Anzahl von Purkinjzellen im Kleinhirn

Um nach einer verminderten SHH-Expression in den Purkinjzellen durch postnatale Hyperoxie eine weitere Schädigung der Purkinjzellen zu untersuchen, wurde die Genexpression der PC-Marker Calbindin 1 (*Calb1*), SLC-Transporter 1 Mitglied 6 (Solute Carrier Family 1 Member 6, *Slc1a6*), Purkinjzell-Protein 2 (Purkinje cell protein 2, *Pcp2*) und Purkinjzell-Protein 4 (Purkinje cell protein 4, *Pcp4*) zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30 mittels qPCR bestimmt. Des Weiteren wurde mittels IHC die Anzahl der CALB1+ PCs in 30 Tage alten Tieren im Kleinhirn der Hyperoxie- und Kontrollgruppe

bestimmt. Zwischen Kontroll- und Hyperoxiegruppe gab es zu allen drei Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression der vier Marker *Calb1*, *Slc1a6*, *Pcp2* und *Pcp4* (Abb. 27A, B, C, D). Auch die Anzahl der CALB1+ PCs war bei 30 Tage alten Tieren beider Gruppen identisch (Abb. 27E, F).



**Abbildung 27: Kein Unterschied in der Anzahl von Purkinjezellen nach Hyperoxie**

A) Mittels qPCR konnte kein Unterschied in der RNA-Expression von *Calb1* im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30 ermittelt werden.

B) Mittels qPCR konnte kein Unterschied in der RNA-Expression von *Slc1a6* im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30 ermittelt werden.

C) Mittels qPCR konnte kein Unterschied in der RNA-Expression von *Pcp2* im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30 ermittelt werden.

D) Mittels qPCR konnte kein Unterschied in der RNA-Expression von *Pcp4* im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7, P11 und P30 ermittelt werden. (P7 n=8, P11 n=6, P30 n=5)

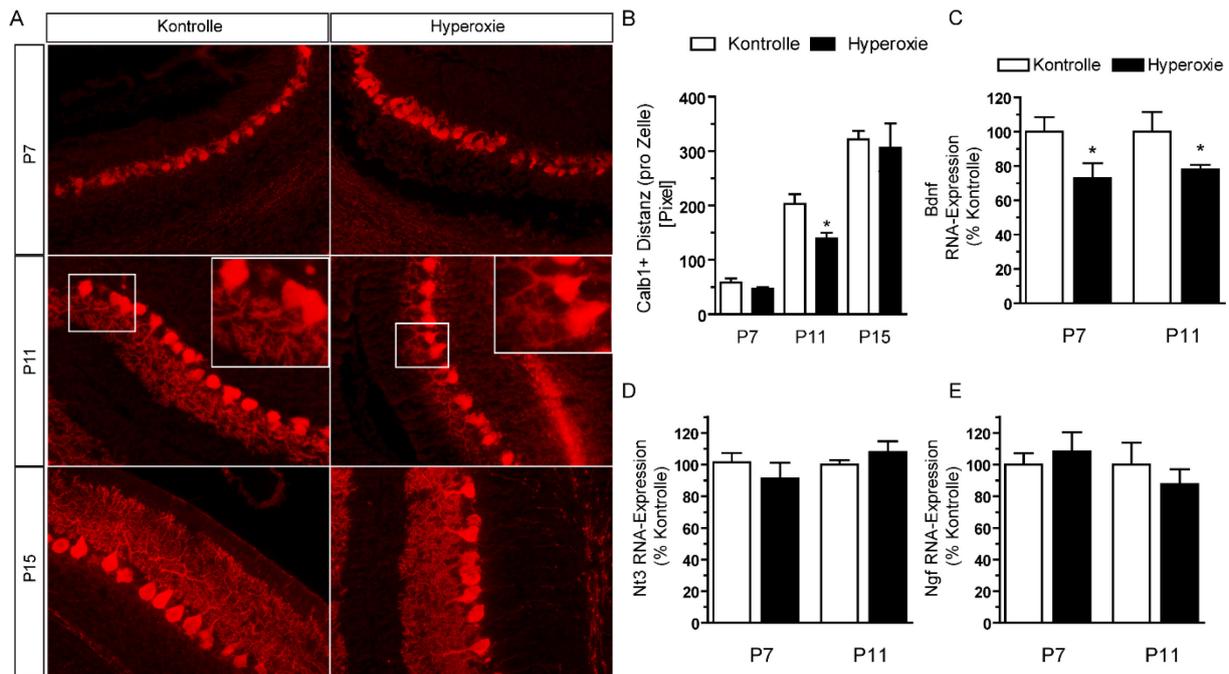
E) 10µm dicke Paraffinschnitte von Kleinhirnen 30 Tage alter Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunhistochemischen Nachweis von CALB1.

F) Die Anzahl der CALB1+ positiven Purkinjezellen war im Kleinhirn von Hyperoxie- und Kontrolltieren zum Zeitpunkt P30 identisch (n=4) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

#### 7.4.2.3 Erhöhte Sauerstoffexposition stört die Reifung von Purkinjezellen im Kleinhirn

Charakteristisch für Purkinjezellen ist die Ausbildung eines weit verzweigten Dendritenbaums. Der Auswuchs der Dendriten beginnt zum Zeitpunkt P0. Komplett ausgereift sind die Dendriten zum Zeitpunkt P90. Die Phase des größten Wachstums und der intensivsten Reifung endet in etwa zum Zeitpunkt P18 (KANEKO u. a., 2011; MCKAY & TURNER, 2005). Um einen Einfluss postnataler Hyperoxie auf die Ausbildung der Dendriten von Purkinjezellen zu untersuchen, wurden CALB1+ Purkinjezellen und deren Dendriten mittels IHC in Kleinhirngewebeschnitten angefärbt und der Auswuchs der CALB1+ Dendriten zu den Zeitpunkten P7, P11 und P15 gemessen. Einfluss auf den Auswuchs der Dendriten haben unter anderem die drei Neurotrophine: BDNF, Neurotrophin 3 (NT-3) und der Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF) (KAPFHAMMER, 2004; METZGER, 2010). Die Genexpression von *Bdnf*, *Nt-3* und *Ngf* wurde zu den Zeitpunkten P7 und P11 mittels qPCR ermittelt. Zum Zeitpunkt P7 war der Auswuchs der CALB1+ Dendriten in beiden Gruppen relativ gering. Die PCs wiesen häufig noch eine „fusiforme“ (RAMÓN Y CAJAL, 1909) Struktur auf. Es konnte kein Unterschied in der Länge beobachtet werden (Abb. 28A, B). Im Kleinhirn elf Tage alter Tiere war der Auswuchs der Dendriten weiter vorangeschritten. Die Länge der Purkinjezell-Dendriten war zu diesem Zeitpunkt bei Tieren der Hyperoxiegruppe signifikant vermindert (Abb. 28A, B). Die PCs der Hyperoxiegruppe befanden sich zum größten Teil noch in der Entwicklungsphase: „sternförmig mit desorientierten Dendriten“ (RAMÓN Y CAJAL, 1909). Im Gegensatz dazu waren die PCs der Kontrollgruppe bereits in die letzte Entwicklungsphase übergegangen, die „Phase der Orientierung und der Streckung der dendritischen Bäume“ (RAMÓN Y CAJAL, 1909). Nach wiederum fortschreitendem Auswuchs der Dendriten konnte zum Zeitpunkt P15 kein Unterschied in der Länge der Purkinjezeldendriten beobachtet werden (Abb. 28A, B).

Die Genexpression von *Nt-3* und *Ngf* war zu keinem der beiden Zeitpunkte verändert (Abb. 28D, E). Die *Bdnf*-Genexpression war in Tieren der Hyperoxiegruppe zu beiden Zeitpunkten P7 und P11 signifikant reduziert (Abb. 28C).



**Abbildung 28: Verzögerter Auswuchs von Dendriten nach erhöhter Sauerstoffexposition**

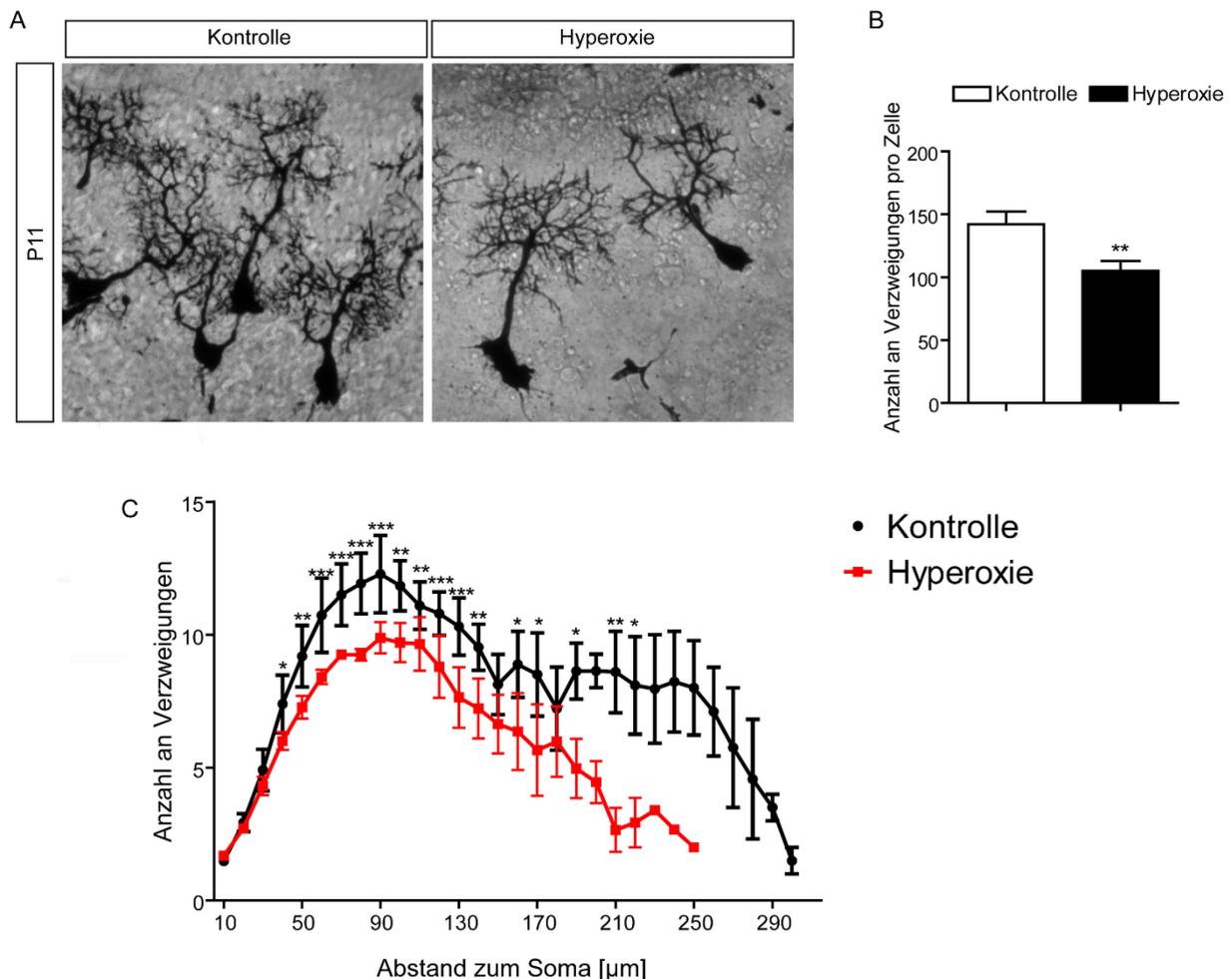
Die Purkinjezellendendriten in Kleinhirnen von 7, 11 und 15 Tage alten Kontroll- und Hyperoxietieren wurden in 10µm dicken Paraffinschnitten immunhistochemisch gegen CALB1 gefärbt (A). Die Länge der Dendriten wurde mittels der Software Image J ausgemessen. Zum Zeitpunkt P7 war kein Unterschied im Auswuchs der Dendriten erkennbar. Zum Zeitpunkt P11 war der Auswuchs der Purkinjezellendendriten in Kleinhirnen der Hyperoxiegruppe verzögert. Zum Zeitpunkt P15 konnte kein Unterschied in der Länge der Dendriten beobachtet werden (B). (\* $p < 0,05$ , t-Test,  $n=4$ ).

Die RNA-Expression des Neurotrophins *Bdnf* war zu den Zeitpunkten P7 und P11 in Kleinhirnen von Hyperoxietieren vermindert (C). Die RNA-Expression der beiden Neurotrophine *Nt3* und *Ngf* war zu den Zeitpunkten P7 und P11 in Kontroll- und Hyperoxietieren vergleichbar (D, E). (\* $p < 0,05$ , t-Test, P7  $n=8$ , P11  $n=6$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

Um den Einfluss erhöhter Sauerstoffexposition auf die Verästelung von Purkinjezellendendriten zu untersuchen, wurden die PCs mittels Golgi-Färbung in Kleinhirnkryoschnitten zum Zeitpunkt P11 gefärbt und anschließend die Verästelung nach Sholl analysiert.

Die Sholl-Analyse zeigte ein klares Defizit in der Verzweigung der Dendriten nach Hyperoxie (Abb. 29A, B, C). Auch der maximale Abstand der Verzweigungen der Dendriten zum Zellsoma und damit verbunden die maximale Länge der Dendriten waren in den Purkinjezellen der Hyperoxietiere geringer (Abb. 29C).

Demnach verzögert postnatale Hyperoxie den Auswuchs der Purkinjezellendendriten und hat eine verminderte Verzweigung der Dendriten zur Folge.



**Abbildung 29: Hyperoxie stört die Verzweigung von Purkinjezellendriten**

(A) Mittels Golgifärbung gefärbte Purkinjezellen in 200µm dicken Kryoschnitten von Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren zum Zeitpunkt P11.

(B) Mittels Sholl-Analyse konnte eine geringere Anzahl an Verzweigungen der Golgi gefärbten Purkinjezellen in Hyperoxietieren ermittelt werden.

(C) Die Anzahl der Verzweigungen der Purkinjezellendriten sowie die Abstände zum Soma der Purkinjezellen waren in Hyperoxietieren vermindert (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test,  $n=6$ ) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

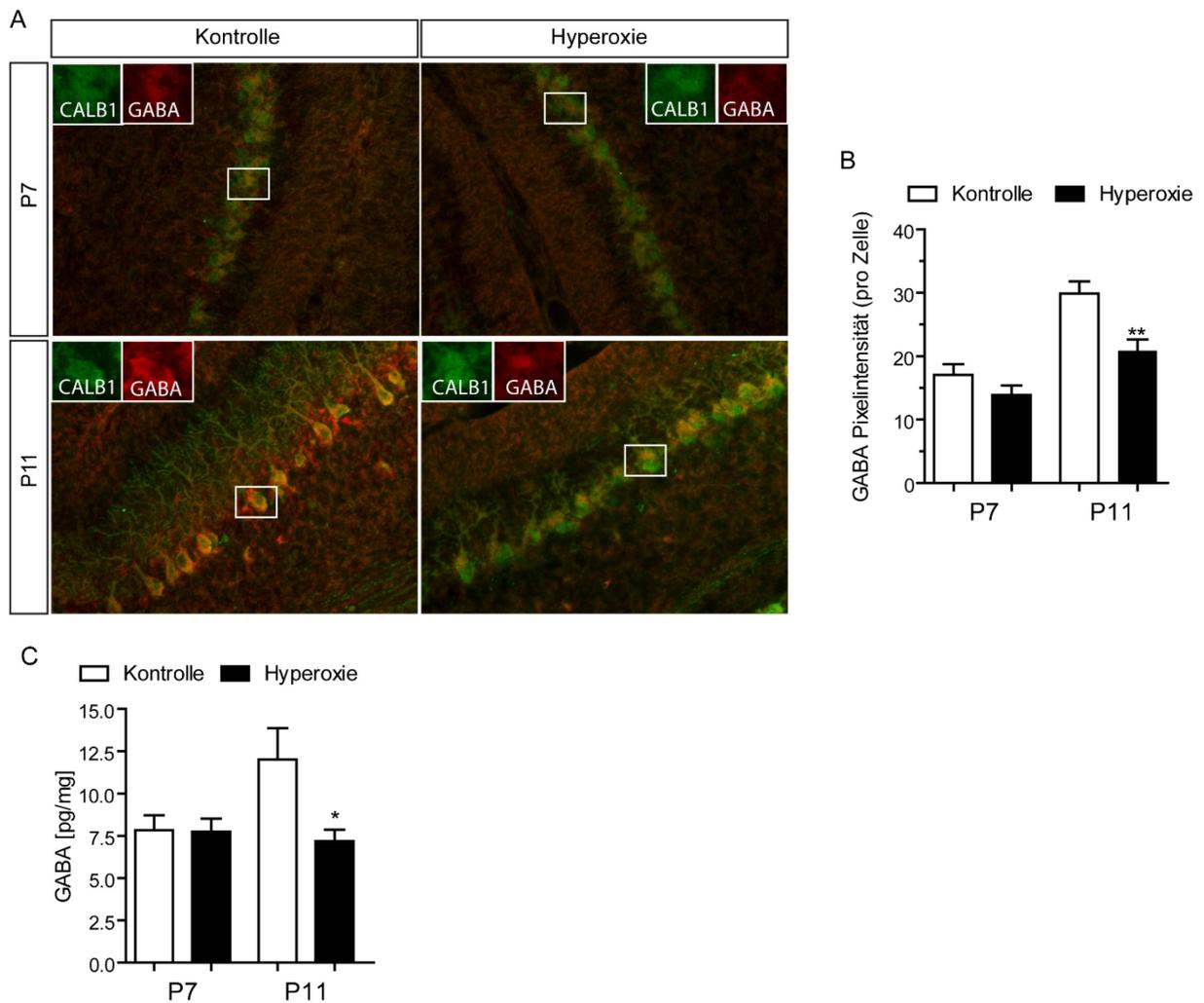
#### 7.4.2.4 Hyperoxie vermindert die GABA-Synthese im neonatalen Kleinhirn

Ein weiteres Merkmal der GABAergen Purkinjezellen ist die Sekretion des Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure (gamma-Aminobutyric acid, GABA) (DE ZEEUW & BERREBI, 1995). Um einen möglichen Einfluss postnataler Hyperoxie auf die GABA-Sekretion zu beobachten, wurde mittels ELISA die GABA-Konzentration in Kleinhirnlysaten zu den Zeitpunkten P7 und P11 bestimmt.

Zum Zeitpunkt P7 war die GABA-Konzentration in beiden Gruppen identisch (Abb. 30C). Zum Zeitpunkt P11 war die Konzentration des Neurotransmitters GABA in den Kleinhirnlysaten der Hyperoxiegruppe signifikant reduziert (Abb. 30C).

Um eine Hyperoxie bedingte Reduktion der GABA-Freisetzung in Purkinjezellen zu bestätigen, wurden Kryoschnitte des Kleinhirns mittels IHC mit Antikörpern gegen GABA und CALB1 zu den Zeitpunkten P7 und P11 gefärbt. Wie bereits mittels ELISA beobachtet, war auch die GABA+ Pixelintensität in CALB1+ Purkinjezellen nach Hyperoxie zum Zeitpunkt P7 im Vergleich zu Kontrolltieren nicht signifikant

verändert (Abb. 30A, B). Zum Zeitpunkt P11 konnte die mittels ELISA detektierte Reduktion von GABA im Kleinhirn in Purkinjezellen bestätigt werden. Die GABA<sup>+</sup> Pixelintensität war zu diesem Zeitpunkt in CALB1<sup>+</sup> Purkinjezellen des Kleinhirns nach Hyperoxie signifikant reduziert (Abb. 30A, B).



**Abbildung 30: Verminderte GABA-Synthese von Purkinjezellen nach Hyperoxie**

A) 10µm dicke Kryoschnitte von 7 und 11 Tage alten Kleinhirnen aus Kontroll- und Hyperoxietieren mit dem immunohistochemischen Nachweis von CALB1 und GABA.

B) Die GABA Pixelintensität war zum Zeitpunkt P11 in den CALB1<sup>+</sup> Purkinjezellen nach Hyperoxie reduziert.

(\*\*p < 0,01, t-Test, n=4)

C) Die mittels ELISA bestimmte GABA-Konzentration per mg eingesetztem Protein in Kleinhirnlysaten von Hyperoxie und Kontrolltieren zu den Zeitpunkten P7 und P11. (\*p < 0,05, t-Test, n=6) (modifiziert nach SCHEUER u. a., 2017).

## 8 Diskussion

### 8.1 Vermindertes Kleinhirnvolumen und Hyperoxie

Die kritischen Entwicklungsprozesse wie zelluläre Migration, Proliferation und Reifung sind im Kleinhirn präzise programmiert (VOLPE, 2009a). Eine hohe Proliferation und Migration von neuronalen Vorläuferzellen im EGL sowie die hohe Proliferation von unreifen Gliazellen sind charakteristisch für die späte fetale und die frühe postnatale Entwicklung des Kleinhirns. All diese Prozesse werden maßgeblich von der Aktivität der Purkinjezellen beeinflusst (CHANG u. a., 2015; FLEMING u. a., 2013; GHOUMARI u. a., 2003; GOLDOWITZ & HAMRE, 1998; WHITE & SILLITOE, 2013).

Eine hohe Sauerstoffkonzentration und im Speziellen oxidativer Stress können einen negativen Einfluss auf die Zellphysiologie haben und die Proliferation von Vorläuferzellen beeinträchtigen (CHEN u. a., 2012; JENKINSON, 1993; RODRIGUES u. a., 2010). Die Störung der frühen postnatalen Entwicklung des Gehirns durch Hyperoxie konnte schon in anderen Studien mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden (ENDESFELDER u. a., 2014; SCHMITZ u. a., 2014).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress die Proliferation von OPCs und von GCPs im neonatalen Kleinhirn von Ratten nach erhöhter Sauerstoffexposition vermindert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress im Kleinhirn eine erhöhte Apoptose dieser Vorläuferzelltypen induziert und die Reifung der PCs vermindert. Die Schädigung des Kleinhirns von Ratten durch Hyperoxie resultiert in einer Volumenreduktion. Als Ursache für das verminderte Volumen des Kleinhirns konnte eine Schädigung der weißen Substanz beschrieben werden. Western Blot- und qPCR-Ergebnisse weisen zusätzlich auf eine Reduktion von reifen und unreifen Neuronen hin. Gleiches ist bei sehr unreif geborenen Kindern zu beobachten. Veränderungen in der weißen Substanz des Kleinhirns und in der Kleinhirnrinde beim Menschen wurden bereits beschrieben (LIMPEROPOULOS u. a., 2010; ROSE u. a., 2015; VOLPE, 2009a). Auch hier weist das Kleinhirn, im Vergleich zu reifgeborenen Kindern, eine geringere Größe im Schulkindalter auf (LIMPEROPOULOS u. a., 2005). Auch die Zelldichte in der Kleinhirnrinde ist bei Kindern, die sehr unreif geboren wurden, vermindert (HALDIPUR u. a., 2011). Die hierfür zugrundeliegenden Mechanismen der gestörten Entwicklung des Kleinhirns sind allerdings wenig erforscht. Neurologische Entwicklungsdefizite beim Menschen und im Tiermodell konnten bereits mit einer erhöhten Sauerstoffexposition in Verbindung gebracht werden (COLLINS u. a., 2001; ENDESFELDER u. a., 2014; HAYNES u. a., 2009; LEVITON u. a., 2010; SCHMITZ u. a., 2014).

Der mit der Geburt sprunghaft ansteigende arterielle Sauerstoffpartialdruck (CASTILLO u. a., 2008; RUDOLPH, 2003) trifft das Kleinhirn bei sehr unreif geborenen Kindern in einer kritischen Entwicklungsphase ohne ausreichende Abwehrmechanismen. Die Synthese von antioxidativen Enzyme kann nur bedingt induziert werden (GEORGESON u. a., 2002; HALDIPUR u. a., 2011; VOLPE, 2009a,

, 2009b). Die bei ehemals sehr unreif geborenen Kindern beobachtete Schädigung des Kleinhirnes bis ins Erwachsenenalter sowie die damit verbundenen motorischen und kognitiven Einschränkungen (BROSSARD-RACINE u. a., 2015; KIM u. a., 2016) könnten daher das Resultat einer nicht physiologischen Sauerstoffexposition sein.

Neben der beschriebenen Entwicklungsstörung des unreifen Kleinhirns durch eine erhöhte Sauerstoffexposition begünstigt auch die nur geringe Ausprägung von Reparaturmechanismen im unreifen Kleinhirn (FAGEL u. a., 2006; GAGE, 2000; GOULD, 2007; RAVI u. a., 2015) eine dauerhafte Schädigung. Der Mangel an Reparaturmechanismen stellt dadurch wahrscheinlich ebenfalls eine Ursache der erhöhten Anfälligkeit für Fehlentwicklungen im Kleinhirn sehr unreif geborener Kinder dar, die durch eine zusätzlich vorkommende Verletzung noch erhöht wird (BROSSARD-RACINE u. a., 2015).

## 8.2 Fehlerhafte Myelinisierung nach erhöhter Sauerstoffexposition

Die Myelinisierung von Axonen ist ein wichtiger evolutionärer Schritt, um den Energieverbrauch der komplexen und schnellen Reizweiterleitung zu minimieren (STIEFEL u. a., 2013). Die gebildete Myelinschicht besteht bis zu 81% aus Lipiden (AGGARWAL u. a., 2011). Proteine haben unter anderem eine stabilisierende Wirkung auf diese isolierende Membran. Die Stabilität und die Struktur der Membran wird auch durch das Myelin-Basische Protein (MBP) reguliert. MBP ist essenziell für die Myelinisierung von Axonen (BILARD u. a., 2015; MIN u. a., 2009).

Im ZNS myelinisieren reife Oligodendrozyten bis zu 40 Axone parallel (MITEW u. a., 2014). Myelinisierungsdefizite bei sehr unreif geborenen Kindern werden häufig auf eine Degenerierung und ausbleibende Reifung von unreifen Oligodendrozyten zurückgeführt (BACK & MILLER, 2014). Oligodendrozyten und speziell OPCs sind sehr vulnerabel gegenüber oxidativem Stress (GERSTNER u. a., 2006, 2007; SCHMITZ u. a., 2014). Die hier aufgrund einer erhöhten Sauerstoffexposition beobachtete Schädigung der Oligodendrozytenentwicklung im neonatalen Kleinhirn hatte ein anhaltendes Myelinisierungsdefizit zur Folge, was anhand der reduzierten Expression von MBP zu erkennen war. Die beobachtete Reduktion des Durchmessers der Myelinschicht der zerebellaren Axone kann demnach ein strukturelles Problem im Aufbau und der Stabilität der Membran sein, aber auch durch eine ausbleibende Myelinisierung durch die Reduktion an reifen Oligodendrozyten hervorgerufen worden sein. Diese Störungen würden einzeln oder kombiniert eine optimale Reizweiterleitung verhindern. Ergebnisse aus elektrophysiologischen Untersuchungen haben bestätigt, dass eine gestörte Myelinisierung der weißen Substanz des Großhirns die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung in den Axonen beeinträchtigt (AGUIRRE u. a., 2007; CRAWFORD u. a., 2009). Auch nach einer Hyperoxie bedingten Schädigung der weißen Substanz des Großhirns bei Mäusen konnte eine verminderte Geschwindigkeit der Reizweiterleitung beobachtet werden (RITTER u. a., 2013). Laufradversuche mit

Mäusen aus dem gleichen Hyperoxiemodell zeigten eine Störung im motorischen Lernverhalten (SCHMITZ u. a., 2012b), was ebenfalls auf eine gestörte Entwicklung des Kleinhirns deutet. Traktographische Analysen mittels MRT bei ehemals sehr unreif geborenen Kindern bestätigten eine veränderte Signalweiterleitung im Kleinhirn (SHANY u. a., 2016).

Die häufig bei sehr unreif geborenen Kindern beobachtete neuronale Inflammation (BACK & MILLER, 2014), die stark mit degenerativen neuronalen Erkrankungen assoziiert ist (LU u. a., 2010) und auch eine Dis- und Demyelinisierung zur Folge hat (PETERSON & FUJINAMI, 2007), konnte in diesen Untersuchungen im Kleinhirn nicht beobachtet werden. Nach einer erhöhten Sauerstoffexposition ist eine inflammatorische Reaktion im ZNS neonataler Ratten allenfalls partiell zu finden (SCHMITZ u. a., 2014) und scheint im Kleinhirn keine wesentliche Rolle zu spielen.

Da die Myelinisierung die Geschwindigkeit der Nervenimpulse beeinflusst (PURVES & WILLIAMS, 2001), ist zu erwarten, dass ein Mangel an Myelinisierung Konsequenzen für die kognitive Entwicklung hat.

Die hier diskutierten Beobachtungen lassen darauf schließen, dass eine Schädigung des unreifen Gehirns bzw. Kleinhirns durch Sauerstofftoxizität die bei sehr unreif geborenen Kindern beobachtete gestörte Entwicklung der Motorik und des Verhaltens sowie die spätfolgende Beeinträchtigung der schulischen und akademischen Leistungen verursachen kann (MOREIRA u. a., 2014).

### 8.3 Gestörte Glia-Glia-Interaktion und fehlerhafte Myelinisierung des Kleinhirns

Wichtig für die Gehirnentwicklung sind indirekte und direkte Interaktionen der einzelnen Zelltypen (STILES & JERNIGAN, 2010). Die Entwicklung von Gliazellen, speziell die der Oligodendrozyten, ist stark abhängig von der Interaktion mit anderen Gliazellentypen (Astrozyten und Mikroglia) (CLEMENTE u. a., 2013).

Wie Neurone sind auch Gliazellen vulnerabel gegenüber nicht physiologischen Glutamatkonzentrationen. Alle drei Gliazellentypen exprimieren unterschiedliche Glutamatrezeptoren und Transporter. Oligodendrozyten reagieren sehr empfindlich auf eine exzessive Aktivität des Glutamat-Signalweges. Mikroglia werden bei einer erhöhten Glutamatkonzentration zur Synthese von inflammatorischen Zytokinen angeregt. Astrozyten sind verantwortlich für die Glutamat-Aufnahme in synaptischen und nicht-synaptischen Bereichen. Sie sind damit die wichtigsten Regulatoren der Glutamat-Homöostase (MATUTE u. a., 2006). Zusätzlich produzieren sie 90% des im Gehirn vorkommenden Laktats (BALTAN, 2015; LI u. a., 2016), welches speziell während der Myelinisierung ein wichtiger Energieträger für Oligodendrozyten ist (RINHOLM u. a., 2011). Da Astrozyten Bestandteil der Bluthirnschranke sind (ABBOTT u. a., 2006), ist davon auszugehen, dass sie auch die Eisenkonzentration im Gehirn regulieren (LI u. a., 2016). Von allen Zelltypen im Gehirn enthalten Oligodendrozyten den höchsten Gehalt an immobilisiertem, proteingebundenem Eisen. Eine unzureichende Versorgung mit

Eisen hat Myelinisierungsdefizite zur Folge (TODORICH u. a., 2009). Astrozyten haben somit eine indirekte Wirkung auf Funktion, Entwicklung und Überleben der anderen Gliazelltypen.

Spezifischer ist die Sekretion einzelner Wachstumsfaktoren, die maßgeblich das Überleben, die Proliferation und die Reifung anderer Gliazelltypen regulieren (CLEMENTE u. a., 2013).

Die Synthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch Astrozyten und Mikroglia hat starke Einflüsse auf die Reifung und Entwicklung der Oligodendrozyten sowie auf die Myelinisierung (BACK & ROSENBERG, 2014; BENN u. a., 2001; WILSON u. a., 2003). Ergebnisse aus Zellkulturversuchen *in vitro* verdeutlichen, dass OL-Kulturen mit Astrozyten-konditioniertem Medium erheblich länger überleben und proliferieren als OL-Kulturen mit Mikroglia-konditioniertem Medium (PANG u. a., 2013). Mikroglia-konditioniertes Medium scheint im Gegensatz dazu die Differenzierung der OLs und die Myelinisierung zu fördern (PANG u. a., 2013). Ausschlaggebend hierfür ist ein unterschiedliches Muster von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in den einzelnen Medien (PANG u. a., 2013). Astrozyten sezernieren auch Zytokine und üben darüber eine modulierende Wirkung auf die Entwicklung von Oligodendrozyten und auf die Myelinisierung aus. In einem Rattenmodell der periventrikulären Leukomalazie, die durch hypoxische Bedingungen verursacht wurde, induziert die Sekretion von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  durch Astrozyten die Apoptose von Oligodendrozyten (DENG u. a., 2014). Wichtiger in der Entwicklung und der Reifung von Oligodendrozyten ist allerdings die Freisetzung bestimmter Wachstumsfaktoren durch Astrozyten. Der Ciliary neurotrophic factor (CNTF) wird im ZNS vornehmlich von Astrozyten produziert (LI u. a., 2016). CNTF ist ein wichtiger Überlebensfaktor für Oligodendrozyten und fördert die Differenzierung von OPC zu reifen Myelin-bildenden OLs. CNTF ist essenziell für die Myelinsynthese durch reife OLs und wirkt protektiv gegen eine Schädigung durch inflammatorische Prozesse (MODI u. a., 2013; STANKOFF u. a., 2002). Da die RNA-Expression von *Cntf* im Kleinhirn von Ratten nach der erhöhten Sauerstoffexposition keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte, scheint die hier beobachtete gestörte Entwicklung der Oligodendrozyten unabhängig von CNTF zu sein.

Ein Mangel an PDGFA in PDGFA-Knockout-Mäusen führt zu einer schweren Beeinträchtigung der Entwicklung von Oligodendrozyten und einer Hypomyelinisierung im Kleinhirn (FRUTTIGER u. a., 1999). PDGFA reguliert direkt die Proliferation und das Überleben von OPCs (CLEMENTE u. a., 2013; FRUTTIGER u. a., 1999; FUNA & SASAHARA, 2014; HILL u. a., 2013). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Astrozyten PDGFA exprimieren, um die Proliferation und das Überleben von OPCs zu stimulieren (CLEMENTE u. a., 2013; GARD u. a., 1995; WILSON u. a., 2003). Die RNA-Expression von *Pdgfa* war in den Kleinhirnen von Ratten direkt nach der Hyperoxie und auch zum Zeitpunkt P11 deutlich reduziert. Die verminderte *Pdgfa*-Expression durch eine erhöhte Sauerstoffkonzentration konnte in Astrozytenkulturen *in vitro* bestätigt werden. Auch in den mittels MACS isolierten Astrozyten aus Kleinhirnen von Ratten nach der erhöhten Sauerstoffexposition konnte *ex vivo* eine verminderte Expression von *Pdgfa* detektiert

werden, was eine gestörte Interaktion von Oligodendrozyten und Astrozyten in der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns nach Hyperoxie unterstreicht. Die verminderte Expression von *Pdgfra* kann demnach eine der Ursachen für den erhöhten Zelltod und die verminderte Proliferation von OPCs nach Hyperoxie sein. Astrozyten produzieren noch weitere Faktoren, wie die knochenmorphogenetischen Proteine (Bone morphogenetic proteins, BMPs) (WANG u. a., 2011), Neureguline (VIEHOVER u. a., 2001) oder auch BDNF (FULMER u. a., 2014), die die Entwicklung von Oligodendrozyten und die Myelinisierung beeinflussen können. BDNF-Knockout-Mäuse zeigen eine reduzierte Anzahl an OPCs und eine Reduktion der Expression von für die Myelinisierung essenziellen Proteinen (VONDRAN u. a., 2010). Zusätzlich spielt BDNF eine wichtige Rolle in Reparaturprozessen nach vorherigem Insult bei Oligodendrozyten (DOUGHERTY u. a., 2000; FULMER u. a., 2014). Auch die Genexpression von *Bdnf* war nach der Hyperoxie im Kleinhirn *in vivo* sowie in Astrozytenkulturen nach einer erhöhten Sauerstoffexposition *in vitro* und in mittels MACS isolierten Astrozyten nach der Hyperoxie *ex vivo*, jeweils im Vergleich zur Kontrolle, signifikant reduziert. Die verminderte Expression von *Bdnf* ist demnach ebenfalls ein deutlicher Hinweis auf eine gestörte Interaktion von Astrozyten und Oligodendrozyten nach erhöhter Sauerstoffexposition im neonatalen Kleinhirn. Neben der Steuerung der Entwicklung von Oligodendrozyten fördern Astrozyten auch den Kontakt zwischen reifen Oligodendrozyten und den zu myelinisierenden Axonen (MEYER-FRANKE u. a., 1999). Bemerkenswerterweise wurden die Morphologie der Astrozyten und die Genexpression von astrozytären Markern im Kleinhirn durch die Hyperoxie nicht beeinflusst.

Mikroglia sind die Zellen des Immunsystems im ZNS, die etwa 10% der gesamten Gliazellen innerhalb des Nervengewebes ausmachen (DOMINGUES u. a., 2016). Im unreifen Gehirn kann eine Mikrogliaaktivierung eine akute Verletzung der weißen Substanz verursachen (BACK & ROSENBERG, 2014) und eine anhaltende Hypomyelinisierung zur Folge haben (FAVRAIS u. a., 2011). Diese Schädigung der weißen Substanz durch Mikroglia wird auch in Modellen für entzündliche neonatale Hirnverletzungen und in Multiple-Sklerose-Modellen beschrieben (BANNERMAN u. a., 2007; PINATO u. a., 2015). Pro-inflammatorische Mikroglia stören die Entwicklung von Oligodendrozyten (MILLER u. a., 2007). Unreife Oligodendrozyten und OPCs sind deutlich vulnerabler gegenüber inflammatorischen Prozessen, die von Mikroglia induziert werden. Das Überleben von unreifen Oligodendroglia und von OPCs wird durch aktivierte Mikroglia verringert. Im Gegensatz dazu wird das Überleben von reifen OLs durch aktivierte Mikroglia verbessert und die Apoptoserate vermindert (MILLER u. a., 2007). Aktivierte Mikroglia induzieren oxidativen Stress, der zu der Apoptose der unreifen Oligodendroglia führen kann (YEO u. a., 2012).

Im Kleinhirn erscheint die Reifung der Mikroglia im Vergleich zu der Reifung im Großhirn verzögert. Ein Großteil der IBA1+ Zellen im Kleinhirn von Ratten wiesen eine amöboide Morphologie sowohl bei Tieren der Hyperoxie-Gruppe als auch bei Kontrolltieren auf. Eine deutliche Aktivierung der Mikroglia

war somit nicht erkennbar. Auch die Expression der inflammatorischen Zytokine *Tnfa* und *Il1b* wiesen auf keine direkte Aktivierung der Mikroglia hin.

Mikroglia können aber wichtige Funktionen für die Reifung und Entwicklung von Oligodendrozyten haben. Sie sezernieren unter anderem IGF1 und unterstützen so die Proliferation und Reifung von OPCs (CLEMENTE u. a., 2013; WILSON u. a., 2003). Zusätzlich schützt eine erhöhte IGF1-Stimulation unreife Oligodendroglia vor einem Schaden durch inflammatorische Prozesse (PANG u. a., 2007). Die Genexpression von *Igf1* im Kleinhirn wurde allerdings nicht durch eine erhöhte Sauerstoffexposition beeinflusst.

Auch wenn eine Aktivierung der Mikroglia aufgrund der auch in Kontrollen vorherrschenden amöboiden Form maskiert sein kann, ist aufgrund der nicht direkt nach der Hyperoxie veränderten Expression von Zytokinen und der gleichbleibenden Expression von *Igf1* im postnatalen Kleinhirn von Ratten eine Beteiligung der Mikroglia an der beobachteten Schädigung des Kleinhirns als gering einzuschätzen.

#### 8.4 Gestörte neuronale Interaktion und fehlerhafte Neurogenese des Kleinhirns

Im Gehirn ist die Ausbildung neuronaler Netzwerke, die Verzweigung von Neuronen und damit verbunden die Interaktionen der einzelnen Neurone, maßgebend für die geistigen Fähigkeiten eines Individuums (KAUFMANN & MOSER, 2000; SPORNS u. a., 2004). Der Prozess der Entwicklung und der Ausbildung dieser Verschaltungen ist genetisch bestimmt. Er wird allerdings stark durch äußere Stimuli beeinflusst (KOLB & GIBB, 2011). Die synaptische Verschaltung von unreifen Neuronen ist anfänglich ungerichtet. Funktionell wichtige Synapsen werden in der weiteren Entwicklung gestärkt, synaptische Verschaltungen ohne Funktion werden abgeschwächt. Ausschlaggebend ist hierbei die neuronale Aktivität. (HASHIMOTO & KANO, 2005).

Auch im Kleinhirn ist die Interaktion der Neurone von wichtiger Bedeutung für eine normale Entwicklung (MORRISON & MASON, 1998). Die Kleinhirnrinde enthält unzählige synaptische Verknüpfungen von Purkinjezellen und Körnerzellen (ISOPE & BARBOUR, 2002). Sie bilden ihren synaptischen Kontakt hauptsächlich über Parallelfasern im ML (SHEPHERD, 2004). Bei Nagern beginnt die synaptische Verschaltung von Purkinjezellen und den Parallelfasern der Körnerzellen um P7 und steigert sich bis zum Ende der zweiten Lebenswoche. Diese synaptische Verschaltung geht mit einer Rückbildung der synaptischen Kontakte zwischen Purkinjezellen und den Kletterfasern einher, die über die Medulla oblongata ins Kleinhirn gelangen (SCELFO & STRATA, 2005). Das beobachtete Reifungsdefizit der Purkinjezellen in Form einer verminderten GABA-Synthese sowie einer Verzögerung im Auswuchs der CALB1+ Dendriten könnte die neuronale Verschaltung beeinflussen. Vor allem der verzögerte Auswuchs der Dendriten der Purkinjezellen in den ML der Hyperoxiegruppe und damit verbunden eine verzögerte Ausbildung von synaptischen Kontakten mit den Körnerzellen könnte hierbei für die

Entwicklung der Dendriten kritische Folgen haben. Einzelne Studien verdeutlichen, dass der synaptische Kontakt zwischen Purkinjezellen und Körnerzellen zumindest indirekten Einfluss auf die weitere Reifung und damit einhergehend die Verzweigung der Dendriten der Purkinjezellen hat (BAPTISTA u. a., 1994; HIRAI & LAUNEY, 2000; MORRISON & MASON, 1998).

Besonders die elektrische Aktivität und Neurotrophine scheinen für die Reifung von Purkinjezellen essenziell zu sein (HIRAI & LAUNEY, 2000). Generell werden der Auswuchs, die Reifung und die Verzweigung von Dendriten durch Neurotrophine wie NGF, NT-3, und BDNF stimuliert (KAPFHAMMER, 2004; METZGER, 2010). Die genaue Funktion von BDNF wird allerdings kontrovers beschrieben (KAPFHAMMER, 2004). BDNF scheint positive Effekte auf die Dichte (MCDOLE u. a., 2015) und auf den Auswuchs der Dendriten zu haben (KAPFHAMMER, 2004). Eine Induktion der BDNF-Expression stimuliert dendritisches Wachstum und die Synaptogenese von PCs (HARAGUCHI u. a., 2012). Zusätzlich hat BDNF einen wichtigen Anteil bei der Ausbildung und Reifung von Synapsen (COHEN-CORY u. a., 2010). Die Verzögerung des Dendritenwachstums nach Hyperoxie kann daher zumindest teilweise auch durch die Reduktion von *Bdnf* zu den Zeitpunkten P7 und P11 erklärt werden.

Vieles weist darauf hin, dass diese synaptischen Verbindungen zwischen Purkinjezellen und Körnerzellen der Speicherort für die Koordination von Bewegungen sind (ISOPE & BARBOUR, 2002). Eine gestörte Ausbildung kann somit auch Grundlage von motorischen Defiziten bei ehemals sehr unreif geborenen Kindern sein.

Auch bei der Entwicklung der Körnerzellen des Kleinhirns, die mehr als die Hälfte aller Neurone des gesamten Gehirns ausmachen, ist eine regulatorische Interaktion mit anderen Neuronen von Bedeutung (LEWIS u. a., 2004; RÖSSERT u. a., 2015). Es wird davon ausgegangen, dass die Entwicklung von Körnerzellen in jeder Phase durch extrinsische und intrinsische Faktoren gesteuert wird (YACUBOVA & KOMURO, 2002). Ab E15 bilden unreife neuronale Vorläufer der Körnerzellen den EGL und proliferieren dort bis einschließlich zur dritten postnatalen Woche (CARLETTI & ROSSI, 2008; CHANG u. a., 2015). Essenziell für die postnatale Entwicklung der Körnerzellen (GCs) ist die Interaktion mit den Purkinjezellen (LEWIS u. a., 2004). Ab dem Zeitpunkt E17,5 exprimieren PCs SHH und stimulieren damit direkt die Proliferation von GCPs im EGL (LEWIS u. a., 2004; WECHSLER-REYA & SCOTT, 1999).

Die verminderte Expression von SHH durch PCs in den Kleinhirnen der Hyperoxiegruppe geht mit einer reduzierten Expression von *Ccnd2* einher und kann zum Zeitpunkt P7 direkt mit der verminderten Proliferationsrate der PAX6+ GCPs im EGL in Verbindung gebracht werden. Migrationsdefiziente, proliferierende GCPs im EGL des Kleinhirns exprimieren NOTCH2. Der NOTCH-Signalweg kann von SHH aktiviert werden. Ein aktiver NOTCH-Signalweg kann die Zellen in einem Vorläuferstadium halten und somit die Differenzierung unterbinden und die Proliferation fördern. Dies wird unter anderem über die Aktivierung von HES1 induziert (SOLECKI u. a., 2001). Auch die verminderte Expression von *Hes1* in den Kleinhirnen der Hyperoxiegruppe bestätigt das SHH bedingte Proliferationsdefizit der GCPs zum

Zeitpunkt P7. Trotz verminderter SHH-Expression zum Zeitpunkt P11 in den Kleinhirnen der Hyperoxiegruppe war die Proliferationsrate der PAX6+ GCs im EGL sowie die RNA-Expression von *Ccnd2* und *Hes1* in beiden Gruppen vergleichbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die geringere *Fgf2*-Expression in der Hyperoxiegruppe. Speziell in der neuronalen Entwicklung kann FGF2 als Differenzierungsinitiator fungieren, die Aktivierung der Zielgene des SHH-Signalwegs unterbinden und somit die Proliferationsrate vermindern (FOGARTY u. a., 2007; YU u. a., 2011).

Neben den Eigenschaften als Differenzierungsinitiator hat FGF2, speziell bei Neuronen, auch anti-apoptotische Eigenschaften (ALZHEIMER & WERNER, 2002; TIMMER u. a., 2007). Interessanterweise war direkt nach der Hyperoxie kein Anstieg von apoptotischen neuronalen Zellen im Kleinhirn zu beobachten, obwohl eine erhöhte Sauerstoffexposition bei Neuronen zu erhöhter Apoptose führen kann (KLEIN & ACKERMAN, 2003; KONYALIOGLU u. a., 2013). Die nach vier Tagen Erholung zum Zeitpunkt P11 erhöhte Apoptose von unreifen Neuronen im Kleinhirn von Ratten aus der Hyperoxiegruppe könnte demnach auch mit der verminderten Expression von *Fgf2* in Verbindung gebracht werden. Neben FGF2 hat auch BDNF neuroprotektive Eigenschaften, die in mehreren Modellen für Gehirnschäden bereits beschrieben sind (ALMEIDA u. a., 2005; VAN KANEGAN u. a., 2014; ZHANG & PARDRIDGE, 2001). Auch die verminderte Expression von *Bdnf* im Kleinhirn von Ratten aus der Hyperoxiegruppe zu den Zeitpunkten P7 und P11 kann Ursache für den erhöhten Zelltod der unreifen Neurone zum Zeitpunkt P11 sein.

Die Ergebnisse von qPCR- und Western-Blot-Analysen von neuronalen Markern weisen zusätzlich auf eine langfristige Schädigung der Körnerzellen im Kleinhirn hin. Die Aktivität der reifen Körnerzellen ist wiederum essenziell für die Reifung der Purkinjellen (MORRISON & MASON, 1998). Eine Reduktion an reifen Körnerzellen kann dementsprechend das beobachtete Reifungsdefizit der Purkinjellen begünstigen.

Postnatale Hyperoxie verursacht eine fehlerhafte Regulierung der Proliferation von GCPs durch Purkinjellen und eine erhöhte Apoptose von unreifen Neuronen. Die Hyperoxie vermittelten neuronalen Entwicklungsdefizite können demnach Ursache für die bei sehr unreif geborenen Kindern beobachtete veränderte Zelldichte (HALDIPUR u. a., 2011) in der Kleinhirnrinde sein.

GABA wird in der frühen postnatalen Entwicklung nicht nur von den PCs sekretiert, sondern auch von den teilweise unreifen GABAergen Interneuronen des Kleinhirns. Die primäre Funktion als Neurotransmitter ist zu diesem Zeitpunkt nicht entscheidend, vielmehr hat GABA auch eine regulierende Wirkung auf die Proliferation und Reifung von Neuronen (TAKAYAMA & INOUE, 2004). Auch die Ausbildung der Dendriten der Purkinjellen wird positiv von GABA beeinflusst (KAWAGUCHI u. a., 2010). Demnach kann die beobachtete Reduktion von GABA im Kleinhirn zusätzlich die beobachtete neuronale Schädigung begünstigen.

### 8.5 Gestörte Glia-Neuronen-Interaktion des Kleinhirns

Für die Gehirnentwicklung ist die Interaktion zwischen Gliazellen und Neuronen essenziell. Hierbei spielen die Sekretion und der Abbau von Neurotransmittern, die Stimulation durch Wachstumsfaktoren und auch der Zell-Zell-Kontakt eine entscheidende Rolle für die Proliferation, die Reifung, die Migration und das Überleben von Gliazellen sowie von Neuronen (BELLAMY, 2006; FLEMING u. a., 2013; KÁRADÓTTIR & ATTWELL, 2007; LUYT u. a., 2007; SHAHAM, 2005; VAILLANT & MONARD, 2009; WEBER & BARROS, 2015; XIAO u. a., 2010). Auch im adulten Gehirn ist diese Interaktion von höchster Bedeutung. Es wird sogar davon ausgegangen, dass die Funktion von Gliazellen das durch neuronale Aktivität gesteuerte Verhalten beeinflussen und regulieren kann (KATO u. a., 2013).

Bei der Entwicklung von Neuronen wird speziell Astrozyten eine wichtige Rolle zugeordnet. Neben der Aufrechterhaltung der Homöostase durch die Aufnahme und den Abbau von Neurotransmittern (MATUTE u. a., 2006) und der Versorgung der Neurone mit Nährstoffen (ABBOTT u. a., 2006), sind sie unter anderem entscheidend bei der Ausbildung und der Reifung von Synapsen beteiligt (MOLOFSKY u. a., 2012). Sie haben aber auch direkten Einfluss auf den Auswuchs von Axonen und Dendriten sowie die Migration von unreifen Neuronen (BOZOYAN u. a., 2012; HUGHES u. a., 2010). Diese wechselseitige Interaktion kann zudem über die Ausschüttung von Neurotransmittern durch Neurone gesteuert werden (LOSI u. a., 2014).

Auch im Kleinhirn ist die Interaktion von Neuronen und Astrozyten unerlässlich für eine normale Entwicklung. Speziell die Interaktion von Bergmann-Glia (spezifische Astrozyten im Kleinhirn), Purkinjezellen (PCs) und Körnerzellen ist entscheidend für die Ausbildung der Kleinhirnrinde. Durchschnittlich acht Bergmann-Glia sind im engen Kontakt mit einer PC und fördern so die Differenzierung, die Ausbildung von Synapsen und die Übertragung von Neurotransmittern (BELLAMY, 2006; YAMADA & WATANABE, 2002). Die Reifung der Bergmann-Glia wird wiederum von den PCs beeinflusst. Die Expression von SHH durch PCs stimuliert die Reifung und die Differenzierung der Bergmann-Glia (DAHMANE & RUIZ I ALTABA, 1999; VAILLANT & MONARD, 2009). SHH hat zusätzlich einen Einfluss auf die Sekretion von Gliotransmittern durch Astrozyten (OKUDA u. a., 2016) und beeinflusst demnach indirekt die Stimulation anderer Zellpopulationen durch Astrozyten.

Die postnatale Ablation von Astrozyten und damit verbunden auch die Ablation von Bergmann-Glia im Kleinhirn führt zu einer Fehlorientierung der PCs mit vermindertem Auswuchs der Dendriten und einer erhöhten Apoptose von Körnerzellen (YAMADA & WATANABE, 2002).

Astrozyten exprimieren BDNF (FULMER u. a., 2014). Die Astrozyten des Kleinhirns produzieren deutlich mehr BDNF als Astrozyten im Großhirn (MIKLIC u. a., 2004). BDNF diffundiert nur schwer über weite Distanzen, somit ist eine lokale Sekretion entscheidend (HORCH & KATZ, 2002). Einzelne Studien konnten zeigen, dass Bergmann-Glia zum einen den BDNF-Rezeptor exprimieren, aber auch selbst BDNF produzieren (POBLETE-NAREDO u. a., 2011). Die im Kleinhirn beobachtete Reduktion der *Bdnf*-

Expression nach Hyperoxie, die in primären Astrozyten *in vitro* nach einer erhöhten Sauerstoffexposition und auch mittels MACS *ex vivo* in Astrozyten nach Hyperoxie bestätigt werden konnte, könnte demnach ein Hinweis auf eine gestörte Interaktion zwischen Astrozyten, im Speziellen Bergmann-Glia, und den Purkinjezellen im Kleinhirn sein. Die verminderte Expression von SHH könnte die Reifung und die Differenzierung der Bergmann-Glia beeinträchtigen. Unreife Bergmann-Glia produzieren dadurch weniger BDNF und sind unter anderem Ursache für einen verzögerten Auswuchs der Purkinjezellendriten nach Hyperoxie. Die verminderte Expression von *Bdnf in vitro* nach erhöhter Sauerstoffexposition könnte auch ein Beleg für eine direkte Schädigung der Astrozyten und Bergmann-Glia im Kleinhirn sein.

Obwohl BDNF und auch Bergmann-Glia direkt an der Migration von unreifen GCs vom EGL in den IGL beteiligt sind (BORGHESANI u. a., 2002; HATTEN, 1999), gab es keinen konkreten Hinweis auf eine gestörte Migration nach Hyperoxie.

Neben Astrozyten exprimieren auch Mikroglia BDNF während der Gehirnentwicklung (FERRINI & DE KONINCK, 2013). Mikroglia des Kleinhirns können über die Sekretion von BDNF die synaptische Verschaltung und die synaptische Aktivität zwischen GCs und PCs modulieren (BESSIS u. a., 2007). Eine Störung dieser Prozesse konnte allerdings in dieser Arbeit weder gezeigt noch widerlegt werden. Vielmehr wiesen die mittels Astrozyten generierten Ergebnisse auf die bereits beschriebene verminderte Expression von BDNF durch Astrozyten hin. Eine direkte Beteiligung der Mikroglia an den hier beobachteten Schäden der Kleinhirnentwicklung scheint eher von geringer Bedeutung zu sein. Aufgrund der geringeren Anzahl der Mikroglia von ca. 10% im Verhältnis zu den anderen Gliazellen kann eine Reaktion der Mikroglia auf die erhöhte Sauerstoffexposition auf RNA- und Proteinebene maskiert bzw. verdünnt worden sein. Eine direkte inflammatorische Antwort der Mikroglia war allerdings nicht zu beobachten. Mögliche neuroprotektive Eigenschaften von Mikroglia gegenüber den GCs im Kleinhirn könnten Ursache für die verzögerte Apoptose der unreifen GCs im IGL sein. Gleichzeitig ist eine Aktivierung der Mikroglia toxisch für unreife und reife Neurone (POLAZZI u. a., 2001). Dementsprechend könnte auch die verzögerte Expression von *Tnfa* in den Kleinhirnen nach Hyperoxie Ursache für den erhöhten Zelltod der unreifen GCs im IGL sein. Der Anstieg der Expression von *Tnfa* zum Zeitpunkt P11 muss nicht direkte Ursache der Hyperoxie sein. Die verzögerte Reifung der PCs in den Kleinhirnen der Hyperoxiegruppe hat eine verminderte GABA-Synthese ab P11 zur Folge. Mikroglia exprimieren den GABA B Rezeptor. GABA wirkt modulierend auf Mikroglia und kann deren Aktivierung vermindern (KUHN u. a., 2004). Somit kann die verzögerte Expression von *Tnfa* durch Mikroglia das Resultat der verminderten GABA-Synthese sein und den erhöhten Zelltod der unreifen GCPs verursachen. Der Anstieg der *Tnfa*-Expression kann auch in Verbindung mit der erhöhten Apoptose der OPCs in Verbindung gebracht werden. Die Mikroglia werden phagozytotisch aktiv und

sekretieren TNF $\alpha$ . Neben den Mikroglia sind allerdings auch weitere Gliazellen in der Lage, inflammatorische Zytokine zu exprimieren (CHOI u. a., 2014).

Eine der wichtigsten Interaktionen im Gehirn ist das Zusammenspiel von Neuronen und Oligodendrozyten. Die Ausbildung einer Myelinschicht und damit verbunden die Isolierung der Nervenfasern durch Oligodendrozyten ist für eine effiziente und energiearme Reizweiterleitung entscheidend (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001). Neben der Myelinisierung haben Oligodendrozyten (OLs) noch weitere Einflüsse auf die Axone der Neurone. Es wird davon ausgegangen, dass die OLs die Neurone über ihre Axone zusätzlich mit Nährstoffen versorgen. Eine Unterbindung des Nährstofftransports durch Oligodendrozyten führt zur Degradation von Axonen und Neuronen (LEE u. a., 2012).

Während der Entwicklung nimmt die Interaktion von Neuronen und Oligodendrozyten sowie deren Vorläufern eine bedeutende Rolle ein. Erst durch den Kontakt mit einem Axon wird die abschließende Reifung der OLs initiiert (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001). Während ihrer Entwicklung exprimieren Oligodendrozyten Rezeptoren für verschiedene Neurotransmitter, wie den AMPA Rezeptor (FRÖHLICH u. a., 2011), den NMDA Rezeptor, (LI u. a., 2013) sowie den GABA A und den GABA B Rezeptor (ARELLANO u. a., 2016; LUYT u. a., 2007). Die Blockade der Ausschüttung der synaptischen Vesikel und damit verbunden eine reduzierte Freisetzung von Neurotransmittern führt zu einer gestörten Myelinisierung (MENSCH u. a., 2015). Besonders die Stimulation mit GABA ist wichtig für die Entwicklung der OLs (KÁRADÓTTIR & ATTWELL, 2007; ZONOUZI u. a., 2015). Die Proliferation, die Reifung und die Migration von unreifen Oligodendrozyten wird auch von GABA reguliert (FRÖHLICH u. a., 2011; LUYT u. a., 2007). In den ersten postnatalen Wochen kann die Stimulation mit GABA entscheidend für die Entwicklung der OLs sein (VÉLEZ-FORT u. a., 2010). Auch im Kleinhirn ist die Entwicklung der Oligodendrozyten abhängig von der neuronalen Reifung (BOUSLAMA-OUEGLANI u. a., 2012). Im Kleinhirn wird GABA u. a. von den Purkinjezellen ausgeschüttet (PURVES & WILLIAMS, 2001). Zusätzlich regulieren die Purkinjezellen die Proliferation von Vorläuferzellen im Kleinhirn über die Synthese von SHH (WALLACE, 1999). Neben der Proliferation der GCPs im Kleinhirn wird auch die Proliferation von OPCs im Kleinhirn durch SHH stimuliert. Mit fortlaufender Entwicklung sekretieren PCs VTN und initiieren so unter anderem die Reifung der proliferierenden OPCs (BOUSLAMA-OUEGLANI u. a., 2012). Die beobachtete Reduktion von SHH zu den Zeitpunkten P7 und P11 sowie die Reduktion von GABA und *Vtn* zum Zeitpunkt P11 nach Hyperoxie bildet eine relevante Grundlage für die verminderte Proliferation von OPCs, für die gestörte Reifung der OPCs zu APC+ OLs und für die verminderte Myelinisierung im Kleinhirn.

Eine verminderte Myelinisierung hat einen großen Einfluss auf die Funktion und die Reifung von Neuronen. In einem Modell für die Ablation von Oligodendrozyten mit ausbleibender Myelinisierung

kommt es im Kleinhirn zu einer gestörten Interaktion zwischen Purkinjezellen und den unreifen Vorläufern der Körnerzellen im EGL. Die dort ebenfalls beobachtete reduzierte Sekretion von SHH hat eine verminderte Proliferation der GCPs zur Folge und führt zu einer Reduktion der Reifen GCs. Zusätzlich ist in diesem Modell die Expression von BDNF reduziert. Die Reduktion geht auch dort mit einer veränderten Reifung und einer veränderten Morphologie der PC-Dendriten einher (COLLIN u. a., 2007).

Die aufgezeigte Dysregulation demonstriert eine komplexe Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen während der Entwicklung des Kleinhirns. Die Beeinträchtigung eines Faktors kann die Fehlsteuerung mehrerer Signalwege zur Folge haben. Es kann nicht genau beurteilt werden, ob eine Zellpopulation des Kleinhirns direkt durch die Sauerstofftoxizität geschädigt wird und den beobachteten Insult zur Folge hat. Vielmehr induziert oxidativer Stress im unreifen Kleinhirn eine Fehlsteuerung des Entwicklungsprogramms, an dem alle hier untersuchten Zellpopulationen in unterschiedlichem Maße beteiligt sind.

### 8.6 Die Purkinjezelle als zentraler Regulator der postnatalen Kleinhirnentwicklung

In der Literatur wird die Zellpopulation der Purkinjezellen als zentraler Fixpunkt in der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns benannt (BOUSLAMA-OUEGLANI u. a., 2012; FLEMING u. a., 2013). Die Ausbildung der GABAergen Purkinjezell-Purkinjezell-Synapsen in der frühen postnatalen Entwicklung des Kleinhirns ist entscheidend für die kortikale Verschaltung im Kleinhirn (WATT u. a., 2009).

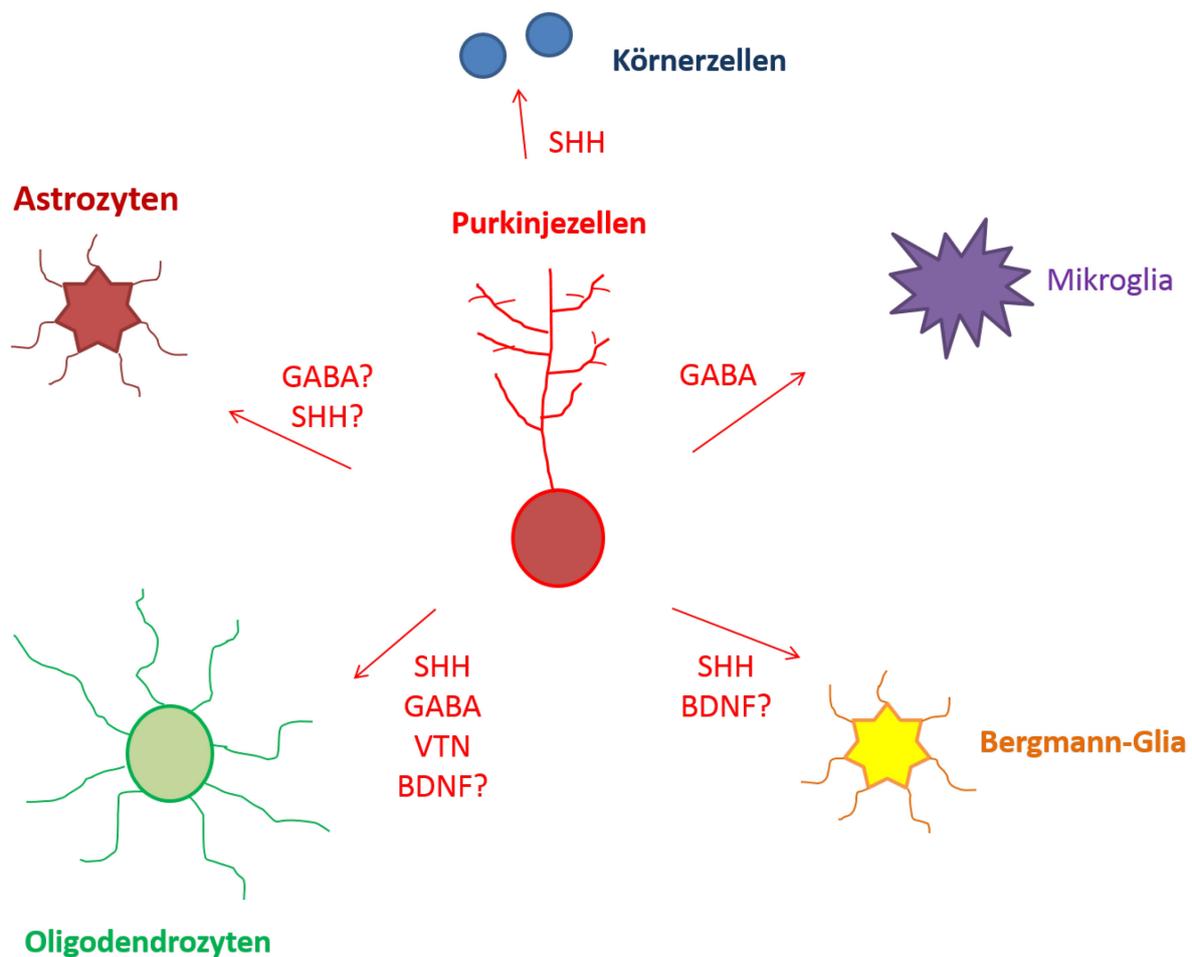
Ein direkter Einfluss der Hyperoxie auf die Anzahl der PCs konnte nicht gezeigt werden. Oxidativer Stress im Kleinhirn hatte aber Einfluss auf die Reifung der Purkinjezellen. Damit verbunden war eine verminderte Sekretion von GABA, SHH und VTN zu beobachten.

Wie bereits ausführlich beschrieben, stimulieren PCs über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Transmittern und anderen Signalmolekülen die Aktivität, die Proliferation, die Reifung und das Überleben neuronaler Zellen und Gliazellen. Die gestörte Interaktion mit anderen Zellpopulationen des Kleinhirns durch Hyperoxie hat einen enormen Einfluss auf die Entwicklung des Kleinhirns (Abb. 31). Neben dem bereits beschriebenen Einfluss von SHH auf die Entwicklung von Körnerzellen und Oligodendrozyten sowie auf die Differenzierung der Bergmann-Glia scheint dieser Faktor im Kleinhirn zusätzlich die Proliferation von astrozytären Stammzellen zu fördern und die Sekretion von astrozytären Gliotransmittern zu stimulieren (FLEMING u. a., 2013; OKUDA u. a., 2016). Möglich wäre daher auch eine Steuerung der astrozytären PDGFA-Sekretion durch PCs.

Die Faltung der Kleinhirnrinde und somit die Ausbildung der charakteristischen Struktur des Kleinhirns wird durch die Sekretion von SHH durch PCs mitgesteuert (CORRALES u. a., 2006). Es wird davon ausgegangen, dass die Verankerung der Kleinhirnrinde in die weiße Substanz des Kleinhirns durch PCs

Grundlage für die Ausbildung der Fissuren und damit ein essenzieller Faktor für die Ausbildung der charakteristischen Struktur des Kleinhirns ist (MARTINEZ u. a., 2013).

Zusätzlich sind PCs die einzigen Zellen, die die Signale der Kleinhirnrinde verarbeiten, diese aus dem Kleinhirn in das ZNS leiten und so in ihrer Funktion eine herausgestellte Rolle haben (CHAN-PALAY, 1971; WATT u. a., 2009). Auch in anderen Schädigungsmodellen führt die Beeinträchtigung von PCs zu einer gestörten Entwicklung des Kleinhirns, verbunden mit einer verminderten Proliferation und zerebellärer Volumenänderung (BELMEGUENAI u. a., 2008; GUO u. a., 2011; MACAULEY u. a., 2008; ZONOUZI u. a., 2015).



**Abbildung 31: Regulatorische Aktivität der Purkinjezellen**

Mögliche gestörte Interaktionswege der Purkinjezelle mit anderen neuronalen Zellen und Gliazellen in der Entwicklung des Kleinhirns nach Hyperoxie.

## 8.7 Ausblick

Die GABAergen Interneurone (IN) des Kleinhirns werden bei Ratten zum größten Teil postnatal angelegt. Die Proliferation der GABAergen IN wird direkt über die Sekretion von SHH durch PCs gesteuert (DE LUCA u. a., 2015a, , 2015b). Im adulten Kleinhirn regulieren sie unter anderem die Aktivität der PCs (DIZON & KHODAKHAH, 2011). Im Großhirn wird eine Beeinträchtigung der GABAergen

IN mit psychologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (BENES & BERRETTA, 2001; NAKAZAWA u. a., 2012). Sehr unreif geborene Kinder haben unter anderem ein höheres Risiko für die Ausbildung von ADHS im Schulkindalter (LINDSTRÖM u. a., 2011). Pathologien des Kleinhirns bei Kindern, die an ADHS leiden, sind bereits dokumentiert (BERQUIN u. a., 1998). Eine mögliche Beeinträchtigung der GABAergen IN im Kleinhirn durch Hyperoxie soll im Anschluss an dieser Arbeit fortlaufend untersucht werden.

Zur Spezifizierung der Schädigung des Kleinhirns durch Sauerstofftoxizität sind weiterführende Versuche geplant. Um eine PDGFA-abhängige Schädigung der OPC Entwicklung weiter zu verifizieren, wird neonatalen Ratten rekombinantes PDGFA während der Hyperoxie und an den Folgetagen nasal appliziert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass kleine Moleküle wie IGF, EGF und BDNF über den intranasalen Weg schnell in das Hirngewebe gelangen (JIANG u. a., 2011b; SCAFIDI u. a., 2014; THORNE u. a., 2004). Erste Vorversuche mit PDGFA zeigten bereits einen positiven Effekt auf die Entwicklung der OPCs.

Um eine GABA-abhängige Fehlentwicklung weiter zu untersuchen, ist eine Applikation der GABA Rezeptor Antagonisten DMCM (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate) und CGP-35348 geplant. DMCM fungiert als Antagonist für den GABA Rezeptor A, CGP-35348 antagonisiert den GABA Rezeptor B. So kann die GABA-abhängige Entwicklung des Kleinhirns auch direkt durch pharmakologische Manipulation mit dem jeweiligen Rezeptor in Verbindung gebracht werden.

Zur Identifizierung weiterer involvierter Mechanismen ist eine RNA-Seq zur Detektion des gesamten Transkriptoms im Kleinhirn nach der Hyperoxie überlegenswert. So könnte auch der Einfluss nichtcodierender RNAs untersucht werden. Micro RNAs (miRNAs) sind an verschiedenen regulatorischen Prozessen beteiligt. Auch die neuronale Differenzierung, die Myelinisierung und die Reifung von Oligodendrozyten wird durch miRNAs streng reguliert (DUGAS u. a., 2010; IYENGAR u. a., 2014; LIN u. a., 2014). So könnte auch die Aktivität des SHH-Signalweges über die Regulierung von nachgestellten Faktoren durch miRNAs (FERRETTI u. a., 2008) beobachtet werden. Hierbei wäre die Vorabisolierung der verschiedenen Zellpopulation mittels MACS und die anschließende Isolierung der RNA und Aufbereitung für die RNA-Seq empfehlenswert, um möglichen Maskierungen durch andere Zellpopulation vorzubeugen. Eine manifestierte Schädigung des Kleinhirns lässt sich auch mittels Verhaltenstests beobachten. Die Durchführung des Rotarod-Performance-Tests (JONES & ROBERTS, 1968) zur Detektion motorischer Defizite und der Einsatz von Miss-step-running-wheels (SCHMITZ u. a., 2012b) zur Überprüfung des motorischen Lernens würden zusätzlich Informationen über den Grad der Beeinträchtigung durch die beobachtete Fehlentwicklung des Kleinhirns geben.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das antiinflammatorische und antiapoptotische Antibiotikum Minozyklin einen positiven Effekt auf die Entwicklung des Kleinhirns sowie der Oligodendrozyten ausübt und zusätzlich eine antioxidative Wirkung aufweist (SCHEUER u. a., 2015; SCHMITZ u. a., 2014). Minozyklin ist allerdings klinisch nicht anwendbar. Es unterbindet die Mikrogliaaktivität und hat

dadurch negative Einflüsse auf die neuronale Entwicklung (UENO u. a., 2013). Vielmehr wäre es interessant, die antioxidative Kapazität in diesem frühen Entwicklungsstadium des Kleinhirns mit eher harmlosen antioxidativen Substanzen wie Acetylcystein und Melatonin (COLARES u. a., 2016; EFTEKHARI u. a., 2016) zu erhöhen. Eine so induzierte Protektion des unreifen Kleinhirns wäre klinisch sehr relevant und könnte womöglich Anwendung in klinischen Studien zur Behandlung von sehr unreif geborenen Kindern finden.

Die neuronale Plastizität und die neuronale Verschaltung wird stark von der neuronalen Aktivität beeinflusst (FRITSCH u. a., 2010). In einem neuronalen Schädigungsmodell kann die beobachtete Beeinträchtigung des Vorderhirns durch gezielte Aktivierung der entsprechenden Areale mit Käfiganreicherungen komplett regeneriert werden (KOMITOVA u. a., 2013). Die neuronale Aktivität hat auch einen positiven Einfluss auf die Genese von Oligodendrozyten und die Myelinisierung (GIBSON u. a., 2014). Eine frühe Förderung der Motorik und des motorischen Lernens durch Käfiganreicherungen wäre eine interessante Maßnahme für therapeutische Intervention und würde die Relevanz unterstützender Maßnahmen der Kleinhirnentwicklung von sehr unreif geborenen Kindern bekräftigen.

## 9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Till Scheuer, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Abbildungen, die aus meinen persönlichen Publikationen stammen, beinhalten einen Verweis auf die Publikation.

Des Weiteren versichere ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Teilergebnisse dieser Arbeit (Die Schädigung der weißen Substanz) wurden in Zusammenarbeit mit Vivien Brockmüller generiert, die diese unter einer anderen Betrachtungsweise zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. verwenden wird. Ihr Hauptfokus lag auf der Protektion der Hyperoxie-induzierten Schädigung durch Minozyklin.

## 10 Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei **PD Dr. Thomas Schmitz** für die Überlassung des Themas, die sehr gute Zusammenarbeit, die Zeit auf den gemeinsamen Konferenzen, das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit, das große Vertrauen und die nie ermüdende Unterstützung. Du hast mir immer das Gefühl gegeben mit Dir, anstatt für Dich zu arbeiten. Vielen Dank dafür!!!

Mein besonderer Dank gilt auch **Prof. Dr. Christoph Bühner** für viele interessante und Ideen bringende Gespräche sowie die finanzielle Unterstützung dieses Projekts.

Seitens der Technischen Universität bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Juri Rappsilber** für die Betreuung dieser Arbeit.

Nun zu meinen drei Damen im Labor: **Dr. Stefanie Endesfelder, Ruth Herrmann** und **Evelyn Strauß**. Durch Eure herzliche und freundschaftliche Art habe ich mich zu Beginn meiner Doktorarbeit sofort aufgenommen gefühlt.

Ich fange mal bei Dir an, liebe Steffi. Christoph hat beim Essen gesagt: „Ohne Steffi würde unser Labor nicht so gut laufen!“ Ich bin der Meinung, ohne Dich würde das Labor gar nicht laufen! Egal in welcher Situation, Du hattest immer ein offenes Ohr und stets einen passenden Rat sowie eine helfende Hand. Nun zu Dir, liebe Ruth, die Königin der Western Blots! Ohne Deine tatkräftige Unterstützung wären meine Ergebnisse nur halb so gut. Es war und ist mir eine große Freude Dein Mittagessenspartner zu sein.

Liebe Evy, „geht nicht“ gibt es nicht bei Dir! Ich kenne niemanden, der die Klinge des Mikrotoms so schnell und elegant schwingt wie Du. Durch Deine nie endende Erziehung wird es für mich schwer, jemals woanders zu arbeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Vivien Brockmüller** für die tolle Zusammenarbeit und das tolle Ergebnis. Auch allen anderen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für eine schöne Zeit danken.

Mein spezieller Dank gilt auch **Dr. Sara Altmeyer** und **Heiko Imiela** für die Korrektur dieser Arbeit.

Für die eifrige Suche nach Fehlern bin ich auch meiner **Steffi** sehr dankbar. Du hast mir in den letzten Jahren mit unserer kleinen **Elisa** zusätzlich mein schönstes Geschenk gemacht.

Danke auch an meine **Eltern** und den Rest der Familie, die uns regelmäßig den Rücken freihalten und für Nächte mit ausreichend Schlaf verantwortlich sind.

## 11 Literatur

- ABBOTT, N. JOAN ; RÖNNBÄCK, LARS ; HANSSON, ELISABETH: Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In: *Nature Reviews. Neuroscience* Bd. 7 (2006), Nr. 1, S. 41–53
- ADAMASZEK, M. ; D'AGATA, F. ; FERRUCCI, R. ; HABAS, C. ; KEULEN, S. ; KIRKBY, K. C. ; LEGGIO, M. ; MARIËN, P. ; MOLINARI, M. ; U. A.: Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. In: *Cerebellum (London, England)* (2016)
- AGGARWAL, SHWETA ; YURLOVA, LARISA ; SIMONS, MIKAEL: Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. In: *Trends in Cell Biology* Bd. 21 (2011), Nr. 10, S. 585–593
- AGUIRRE, ADAN ; DUPREE, JEFF L. ; MANGIN, J. M. ; GALLO, VITTORIO: A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. In: *Nature Neuroscience* Bd. 10 (2007), Nr. 8, S. 990–1002
- ALLIN, MATTHEW P. G. ; KONTIS, DIMITRIS ; WALSHE, MURIEL ; WYATT, JOHN ; BARKER, GARETH J. ; KANAAN, RICHARD A. A. ; MCGUIRE, PHILIP ; RIFKIN, LARRY ; MURRAY, ROBIN M. ; U. A.: White matter and cognition in adults who were born preterm. In: *PloS One* Bd. 6 (2011), Nr. 10, S. e24525
- ALMAN, BENJAMIN A.: The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease. In: *Nature Reviews. Rheumatology* Bd. 11 (2015), Nr. 9, S. 552–560
- ALMEIDA, R. D. ; MANADAS, B. J. ; MELO, C. V. ; GOMES, J. R. ; MENDES, C. S. ; GRÃOS, M. M. ; CARVALHO, R. F. ; CARVALHO, A. P. ; DUARTE, C. B.: Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. In: *Cell Death and Differentiation* Bd. 12 (2005), Nr. 10, S. 1329–1343
- ÁLVAREZ-BUYLLA, ARTURO ; IHRIE, REBECCA A.: Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* Bd. 33 (2014), S. 105–111
- ALZHEIMER, CHRISTIAN ; WERNER, SABINE: Fibroblast growth factors and neuroprotection. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* Bd. 513 (2002), S. 335–351
- ARELLANO, ROGELIO O. ; SÁNCHEZ-GÓMEZ, MARÍA VICTORIA ; ALBERDI, ELENA ; CANEDO-ANTELO, MANUEL ; CHARA, JUAN CARLOS ; PALOMINO, AITOR ; PÉREZ-SAMARTÍN, ALBERTO ; MATUTE, CARLOS: Axon-to-Glia Interaction Regulates GABAA Receptor Expression in Oligodendrocytes. In: *Molecular Pharmacology* Bd. 89 (2016), Nr. 1, S. 63–74
- ARMENGOL, J. A. ; SOTELO, C.: Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in „in vitro“ slices. In: *Brain Research. Developmental Brain Research* Bd. 64 (1991), Nr. 1–2, S. 95–114
- ARMSTRONG, R. ; FRIEDRICH, V. L. ; HOLMES, K. V. ; DUBOIS-DALCQ, M.: In vitro analysis of the oligodendrocyte lineage in mice during demyelination and remyelination. In: *The Journal of Cell Biology* Bd. 111 (1990), Nr. 3, S. 1183–1195
- BACK, STEPHEN A. ; LUO, NING LING ; BORENSTEIN, NATALIA S. ; VOLPE, JOSEPH J. ; KINNEY, HANNAH C.: Arrested oligodendrocyte lineage progression during human cerebral white matter development: dissociation between the timing of progenitor differentiation and myelinogenesis. In: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* Bd. 61 (2002), Nr. 2, S. 197–211
- BACK, STEPHEN A. ; MILLER, STEVEN P.: Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? In: *Ann. Neurol.* Bd. 75 (2014), Nr. 4, S. 469–486. — 00001 PMID: 24615937

- BACK, STEPHEN A. ; ROSENBERG, PAUL A.: Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury. In: *Glia* Bd. 62 (2014), Nr. 11, S. 1790–1815. — 00007
- BALTAN, SELVA: Can lactate serve as an energy substrate for axons in good times and in bad, in sickness and in health? In: *Metabolic Brain Disease* Bd. 30 (2015), Nr. 1, S. 25–30
- BANNERMAN, PETER ; HAHN, ASHLEIGH ; SOULIKA, ATHENA ; GALLO, VITTORIO ; PLEASURE, DAVID: Astrogliosis in EAE spinal cord: derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. In: *Glia* Bd. 55 (2007), Nr. 1, S. 57–64. — 00058 PMID: 17009237
- BAPTISTA, C. A. ; HATTEN, M. E. ; BLAZESKI, R. ; MASON, C. A.: Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. In: *Neuron* Bd. 12 (1994), Nr. 2, S. 243–260
- BARRES, B. A. ; LAZAR, M. A. ; RAFF, M. C.: A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 120 (1994), Nr. 5, S. 1097–1108
- BAUD, OLIVIER ; HAYNES, ROBIN F. ; WANG, HONG ; FOLKERTH, REBECCA D. ; LI, JIANRONG ; VOLPE, JOSEPH J. ; ROSENBERG, PAUL A.: Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. In: *Eur. J. Neurosci.* Bd. 20 (2004), Nr. 1, S. 29–40. — 00055 PMID: 15245476
- BAUMANN, N. ; PHAM-DINH, D.: Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. In: *Physiol. Rev.* Bd. 81 (2001), Nr. 2, S. 871–927. — 00000 PMID: 11274346
- BECK, STACY ; WOJDYLA, DANIEL ; SAY, LALE ; BETRAN, ANA PILAR ; MERALDI, MARIO ; REQUEJO, JENNIFER HARRIS ; RUBENS, CRAIG ; MENON, RAMKUMAR ; VAN LOOK, PAUL F. A.: The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. In: *Bulletin of the World Health Organization* Bd. 88 (2010), Nr. 1, S. 31–38
- BEHESTI, HOURINAZ ; MARINO, SILVIA: Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Bd. 41 (2009), Nr. 3, S. 435–445
- BELLAMY, TOMAS C.: Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. In: *Cerebellum (London, England)* Bd. 5 (2006), Nr. 2, S. 116–126
- BELMEGUENAI, AMOR ; BOTTA, PAOLO ; WEBER, JOHN T. ; CARTA, MARIO ; DE RUITER, MARTIJN ; DE ZEEUW, CHRIS I. ; VALENZUELA, C. FERNANDO ; HANSEL, CHRISTIAN: Alcohol impairs long-term depression at the cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapse. In: *Journal of Neurophysiology* Bd. 100 (2008), Nr. 6, S. 3167–3174
- BENES, F. M. ; BERRETTA, S.: GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. In: *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* Bd. 25 (2001), Nr. 1, S. 1–27
- BENN, T. ; HALFPENNY, C. ; SCOLDING, N.: Glial cells as targets for cytotoxic immune mediators. In: *Glia* Bd. 36 (2001), Nr. 2, S. 200–211. — 00027 PMID: 11596128
- BERQUIN, P. C. ; GIEDD, J. N. ; JACOBSEN, L. K. ; HAMBURGER, S. D. ; KRAIN, A. L. ; RAPOPORT, J. L. ; CASTELLANOS, F. X.: Cerebellum in attention-deficit hyperactivity disorder: a morphometric MRI study. In: *Neurology* Bd. 50 (1998), Nr. 4, S. 1087–1093

- BESSIS, ALAIN ; BÉCHADE, CATHERINE ; BERNARD, DELPHINE ; ROUMIER, ANNE: Microglial control of neuronal death and synaptic properties. In: *Glia* Bd. 55 (2007), Nr. 3, S. 233–238
- BIJLARD, MARJOLEIN ; KLUNDER, BERT ; DE JONGE, JENNY C. ; NOMDEN, ANITA ; TYAGI, SANJAY ; DE VRIES, HANS ; HOEKSTRA, DICK ; BARON, WIA: Transcriptional expression of myelin basic protein in oligodendrocytes depends on functional syntaxin 4: a potential correlation with autocrine signaling. In: *Molecular and Cellular Biology* Bd. 35 (2015), Nr. 4, S. 675–687
- BOHNENPOLL, TOBIAS ; KISPERT, ANDREAS: Ureter growth and differentiation. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* Bd. 36 (2014), S. 21–30
- BORGHESANI, PAUL R. ; PEYRIN, JEAN MICHEL ; KLEIN, ROBYN ; RUBIN, JOSHUA ; CARTER, ALEXANDRE R. ; SCHWARTZ, PHILLIP M. ; LUSTER, ANDREW ; CORFAS, GABRIEL ; SEGAL, ROSALIND A.: BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 129 (2002), Nr. 6, S. 1435–1442
- BOUSLAMA-OUEGHLANI, LAMIA ; WEHRLÉ, ROSINE ; DOULAZMI, MOHAMED ; CHEN, XIAO RU ; JAUDON, FANNY ; LEMAIGRE-DUBREUIL, YOLANDE ; RIVALS, ISABELLE ; SOTELO, CONSTANTINO ; DUSART, ISABELLE: Purkinje cell maturation participates in the control of oligodendrocyte differentiation: role of sonic hedgehog and vitronectin. In: *PLoS One* Bd. 7 (2012), Nr. 11, S. e49015
- BOUSLAMA-OUEGHLANI, LAMIA ; WEHRLÉ, ROSINE ; SOTELO, CONSTANTINO ; DUSART, ISABELLE: The developmental loss of the ability of Purkinje cells to regenerate their axons occurs in the absence of myelin: an in vitro model to prevent myelination. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 23 (2003), Nr. 23, S. 8318–8329
- BOZOYAN, LUSINE ; KHLGHATYAN, JIVAN ; SAGHATELYAN, ARMEN: Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 32 (2012), Nr. 5, S. 1687–1704
- BROSSARD-RACINE, MARIE ; DU PLESSIS, ADRE J. ; LIMPEROPOULOS, CATHERINE: Developmental cerebellar cognitive affective syndrome in ex-preterm survivors following cerebellar injury. In: *Cerebellum (London, England)* Bd. 14 (2015), Nr. 2, S. 151–164
- BROWN, ANGUS M. ; RANSOM, BRUCE R.: Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. In: *Glia* Bd. 55 (2007), Nr. 12, S. 1263–1271
- BUFFO, ANNALISA ; ROSSI, FERDINANDO: Origin, lineage and function of cerebellar glia. In: *Progress in Neurobiology* Bd. 109 (2013), S. 42–63
- CABEZAS, RICARDO ; AVILA-RODRIGUEZ, MARCO ; VEGA-VELA, NELSON E. ; ECHEVERRIA, VALENTINA ; GONZÁLEZ, JANNETH ; HIDALGO, OSCAR A. ; SANTOS, ALTAIR B. ; ALIEV, GJUMRAKCH ; BARRETO, GEORGE E.: Growth Factors and Astrocytes Metabolism: Possible Roles for Platelet Derived Growth Factor. In: *Medicinal Chemistry (Shāriqah (United Arab Emirates))* Bd. 12 (2016), Nr. 3, S. 204–210
- CAI, JUN ; ZHU, QIANG ; ZHENG, KANG ; LI, HONG ; QI, YINGCHUAN ; CAO, QILIN ; QIU, MENGSHENG: Co-localization of Nkx6.2 and Nkx2.2 homeodomain proteins in differentiated myelinating oligodendrocytes. In: *Glia* Bd. 58 (2010), Nr. 4, S. 458–468
- CALVER, A. R. ; HALL, A. C. ; YU, W. P. ; WALSH, F. S. ; HEATH, J. K. ; BETSHOLTZ, C. ; RICHARDSON, W. D.: Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. In: *Neuron* Bd. 20 (1998), Nr. 5, S. 869–882

- CARLETTI, BARBARA ; ROSSI, FERDINANDO: Neurogenesis in the cerebellum. In: *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* Bd. 14 (2008), Nr. 1, S. 91–100
- CASTILLO, ARMANDO ; SOLA, AUGUSTO ; BAQUERO, HERNANDO ; NEIRA, FREDDY ; ALVIS, RAMIRO ; DEULOFEUT, RICHARD ; CRITZ, ANN: Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? In: *Pediatrics* Bd. 121 (2008), Nr. 5, S. 882–889
- CHADDERTON, PAUL ; MARGRIE, TROY W. ; HÄUSSER, MICHAEL: Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. In: *Nature* Bd. 428 (2004), Nr. 6985, S. 856–860
- CHANG, C. H. ; CHANG, F. M. ; YU, C. H. ; KO, H. C. ; CHEN, H. Y.: Assessment of fetal cerebellar volume using three-dimensional ultrasound. In: *Ultrasound in Medicine & Biology* Bd. 26 (2000), Nr. 6, S. 981–988
- CHANG, JOSHUA C. ; LEUNG, MARK ; GOKOZAN, HAMZA NUMAN ; GYGLI, PATRICK EDWIN ; CATACUTAN, FAY PATSY ; CZEISLER, CATHERINE ; OTERO, JOSÉ JAVIER: Mitotic events in cerebellar granule progenitor cells that expand cerebellar surface area are critical for normal cerebellar cortical lamination in mice. In: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* Bd. 74 (2015), Nr. 3, S. 261–272. — 00000
- CHAN-PALAY, V.: The recurrent collaterals of Purkinje cell axons: a correlated study of the rat's cerebellar cortex with electron microscopy and the Golgi method. In: *Zeitschrift Für Anatomie Und Entwicklungsgeschichte* Bd. 134 (1971), Nr. 2, S. 200–234
- CHEN, XUEPING ; GUO, CHUNYAN ; KONG, JIMING: Oxidative stress in neurodegenerative diseases. In: *Neural Regeneration Research* Bd. 7 (2012), Nr. 5, S. 376–385
- CHOI, SUNG S. ; LEE, HONG J. ; LIM, INJA ; SATOH, JUN-ICHI ; KIM, SEUNG U.: Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. In: *PLoS One* Bd. 9 (2014), Nr. 4, S. e92325
- CHOUDHRY, ZIA ; RIKANI, AZADEH A. ; CHOUDHRY, ADNAN MAQSOOD ; TARIQ, SADAF ; ZAKARIA, FOZIA ; ASGHAR, MUHAMMAD WAHEED ; SARFRAZ, MUHAMMAD KHAN ; HAIDER, KAMRAN ; SHAFIQ, AFIA ANSAR ; U. A.: Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. In: *Annals of Neurosciences* Bd. 21 (2014), Nr. 1, S. 28–31
- CLEMENTE, DIEGO ; ORTEGA, MARÍA CRISTINA ; MELERO-JEREZ, CAROLINA ; DE CASTRO, FERNANDO: The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. In: *Front Cell Neurosci* Bd. 7 (2013), S. 268. — 00001 PMID: 24391545
- COHEN, M. MICHAEL: The hedgehog signaling network. In: *American Journal of Medical Genetics. Part A* Bd. 123A (2003), Nr. 1, S. 5–28
- COHEN-CORY, SUSANA ; KIDANE, ADHANET H. ; SHIRKEY, NICOLE J. ; MARSHAK, SONYA: Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. In: *Developmental Neurobiology* Bd. 70 (2010), Nr. 5, S. 271–288
- COLARES, JOSIELI RASKOPF ; SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES ; HARTMANN, RENATA MINUZZO ; LICKS, FRANCIELLI ; SOARES, MARIANA DO COUTO ; BOSCO, ADRIANE DAL ; MARRONI, NORMA POSSA: Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. In: *World Journal of Gastroenterology* Bd. 22 (2016), Nr. 40, S. 8918–8928

- COLLIN, LUDOVIC ; DORETTO, SANDRINE ; MALERBA, MONICA ; RUAT, MARTIAL ; BORRELLI, EMILIANA:  
Oligodendrocyte ablation affects the coordinated interaction between granule and Purkinje neurons during cerebellum development. In: *Experimental Cell Research* Bd. 313 (2007), Nr. 13, S. 2946–2957
- COLLINS, M. P. ; LORENZ, J. M. ; JETTON, J. R. ; PANETH, N.: Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. In: *Pediatric Research* Bd. 50 (2001), Nr. 6, S. 712–719
- CONTESTABILE, ANTONIO: Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. In: *Cerebellum (London, England)* Bd. 1 (2002), Nr. 1, S. 41–55
- CORRALES, JOMICHILLE D. ; BLAESS, SANDRA ; MAHONEY, EAMONN M. ; JOYNER, ALEXANDRA L.: The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 133 (2006), Nr. 9, S. 1811–1821
- COSTELOE, KATE L. ; HENNESSY, ENID M. ; HAIDER, SADIA ; STACEY, FIONA ; MARLOW, NEIL ; DRAPER, ELIZABETH S.: Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). In: *BMJ (Clinical research ed.)* Bd. 345 (2012), S. e7976
- CRAWFORD, D. K. ; MANGIARDI, M. ; XIA, X. ; LÓPEZ-VALDÉS, H. E. ; TIWARI-WOODRUFF, S. K.: Functional recovery of callosal axons following demyelination: a critical window. In: *Neuroscience* Bd. 164 (2009), Nr. 4, S. 1407–1421
- CUI, QIAO LING ; FRAGOSO, GABRIELA ; MIRON, VERONIQUE E. ; DARLINGTON, PETER J. ; MUSHYNSKI, WALTER E. ; ANTEL, JACK ; ALMAZAN, GUILLERMINA: Response of human oligodendrocyte progenitors to growth factors and axon signals. In: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* Bd. 69 (2010), Nr. 9, S. 930–944
- DAHMANE, N. ; RUIZ I ALTABA, A.: Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. In: *Development* Bd. 126 (1999), Nr. 14, S. 3089–3100. — 00523
- D'ANGELO, E. ; MAZZARELLO, P. ; PRETORI, F. ; MAPELLI, J. ; SOLINAS, S. ; LOMBARDO, P. ; CESANA, E. ; GANDOLFI, D. ; CONGI, L.: The cerebellar network: from structure to function and dynamics. In: *Brain Research Reviews* Bd. 66 (2011), Nr. 1–2, S. 5–15
- DASTJERDI, F. V. ; CONSALEZ, G. G. ; HAWKES, R.: Pattern formation during development of the embryonic cerebellum. In: *Frontiers in Neuroanatomy* Bd. 6 (2012), S. 10
- DE LUCA, A. ; PARMIGIANI, E. ; TOSATTO, G. ; MARTIRE, S. ; HOSHINO, M. ; BUFFO, A. ; LETO, K. ; ROSSI, F.: Exogenous Sonic hedgehog modulates the pool of GABAergic interneurons during cerebellar development. In: *Cerebellum* Bd. 14 (2015a), Nr. 2, S. 72–85. — 00001
- DE LUCA, ANNARITA ; CERRATO, VALENTINA ; FUCÀ, ELISA ; PARMIGIANI, ELENA ; BUFFO, ANNALISA ; LETO, KETTY: Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. In: *Cell. Mol. Life Sci.* (2015b). — 00000
- DE ZEEUW, C. I. ; BERREBI, A. S.: Postsynaptic targets of Purkinje cell terminals in the cerebellar and vestibular nuclei of the rat. In: *The European Journal of Neuroscience* Bd. 7 (1995), Nr. 11, S. 2322–2333

- DECAMP, D. L. ; THOMPSON, T. M. ; DE SAUVAGE, F. J. ; LERNER, M. R.: Smoothed activates Galphai-mediated signaling in frog melanophores. In: *The Journal of Biological Chemistry* Bd. 275 (2000), Nr. 34, S. 26322–26327
- DENG, YIYU ; XIE, DI ; FANG, MING ; ZHU, GAOFENG ; CHEN, CHUNBO ; ZENG, HONGKE ; LU, JIA ; CHARANJIT, KAUR: Astrocyte-derived proinflammatory cytokines induce hypomyelination in the periventricular white matter in the hypoxic neonatal brain. In: *PloS One* Bd. 9 (2014), Nr. 1, S. e87420
- DEULOFEUT, RICHARD ; DUDELL, GOLDE ; SOLA, AUGUSTO: Treatment-by-gender effect when aiming to avoid hyperoxia in preterm infants in the NICU. In: *Acta Paediatr.* Bd. 96 (2007), Nr. 7, S. 990–994. — 00054 PMID: 17577339
- DIMITROVA, A. ; WEBER, J. ; REDIES, C. ; KINDSVATER, K. ; MASCHKE, M. ; KOLB, F. P. ; FORSTING, M. ; DIENER, H. C. ; TIMMANN, D.: MRI atlas of the human cerebellar nuclei. In: *NeuroImage* Bd. 17 (2002), Nr. 1, S. 240–255
- DIZON, MARIA JOHANNA ; KHODAKHAH, KAMRAN: The role of interneurons in shaping Purkinje cell responses in the cerebellar cortex. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 31 (2011), Nr. 29, S. 10463–10473
- DOBBING, J. ; SANDS, J.: Comparative aspects of the brain growth spurt. In: *Early Hum. Dev.* Bd. 3 (1979), Nr. 1, S. 79–83. — 01735
- DOMINGUES, HELENA S. ; PORTUGAL, CAMILA C. ; SOCODATO, RENATO ; RELVAS, JOÃO B.: Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Bd. 4 (2016), S. 71
- TEN DONKELAAR, H. J. ; LAMMENS, M. ; WESSELING, P. ; THUISSEN, H. O. M. ; RENIER, W. O.: Development and developmental disorders of the human cerebellum. In: *Journal of Neurology* Bd. 250 (2003), Nr. 9, S. 1025–1036
- DOUGHERTY, K. D. ; DREYFUS, C. F. ; BLACK, I. B.: Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. In: *Neurobiology of Disease* Bd. 7 (2000), Nr. 6 Pt B, S. 574–585
- DUGAS, JASON C. ; CUELLAR, TRINNA L. ; SCHOLZE, ANJA ; ASON, BRANDON ; IBRAHIM, ADILJAN ; EMERY, BEN ; ZAMANIAN, JENNIFER L. ; FOO, LYNETTE C. ; MCMANUS, MICHAEL T. ; U. A.: Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. In: *Neuron* Bd. 65 (2010), Nr. 5, S. 597–611
- DUVERNOY, HENRI M: *The Human Brain Stem and Cerebellum: Surface, Structure, Vascularization, and Three-Dimensional Sectional Anatomy, with MRI*. Vienna : Springer Vienna, 1995 — ISBN 978-3-7091-3078-0
- EFTEKHARI, AZIZ ; AHMADIAN, ELHAM ; AZARMI, YADOLLAH ; PARVIZPUR, ALIREZA ; HAMISHEHKAR, HAMED ; EGHBAL, MOHAMMAD ALI: In vitro/vivo studies towards mechanisms of risperidone-induced oxidative stress and the protective role of coenzyme Q10 and N-acetylcysteine. In: *Toxicology Mechanisms and Methods* Bd. 26 (2016), Nr. 7, S. 520–528
- ENDESFELDER, STEFANIE ; ZAAK, IRINA ; WEICHEL, ULRIKE ; BÜHRER, CHRISTOPH ; SCHMITZ, THOMAS: Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. In: *Free Radical Biology & Medicine* Bd. 67 (2014), S. 221–234

- EYO, UKPONG B. ; DAILEY, MICHAEL E.: Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. In: *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology* Bd. 8 (2013), Nr. 3, S. 494–509
- FAGEL, DEVON M. ; GANAT, YOSIF ; SILBEREIS, JOHN ; EBBITT, TIMOTHY ; STEWART, WILLIAM ; ZHANG, HEPING ; MENT, LAURA R. ; VACCARINO, FLORA M.: Cortical neurogenesis enhanced by chronic perinatal hypoxia. In: *Exp. Neurol.* Bd. 199 (2006), Nr. 1, S. 77–91. — 00105 PMID: 15916762
- FAVRAIS, GÉRALDINE ; VAN DE LOOIJ, YOHAN ; FLEISS, BOBBI ; RAMANANTSOA, NELINA ; BONNIN, PHILIPPE ; STOLTENBURG-DIDINGER, GISELA ; LACAUD, ADRIEN ; SALIBA, ELIE ; DAMMANN, OLAF ; U. A.: Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. In: *Ann. Neurol.* Bd. 70 (2011), Nr. 4, S. 550–565. — 00061 PMID: 21796662
- FERENT, JULIEN ; ZIMMER, CÉLINE ; DURBEC, PASCALE ; RUAT, MARTIAL ; TRAIFFORT, ELISABETH: Sonic Hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 33 (2013), Nr. 5, S. 1759–1772
- FERRETTI, ELISABETTA ; DE SMAELE, ENRICO ; MIELE, EVELINA ; LANEVE, PIETRO ; PO, AGNESE ; PELLONI, MARIANNA ; PAGANELLI, ARIANNA ; DI MARCOTULLIO, LUCIA ; CAFFARELLI, ELISA ; U. A.: Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. In: *The EMBO journal* Bd. 27 (2008), Nr. 19, S. 2616–2627
- FERRINI, FRANCESCO ; DE KONINCK, YVES: Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. In: *Neural Plasticity* Bd. 2013 (2013), S. 429815
- FINK, ANDREW J. ; ENGLUND, CHRIS ; DAZA, RAY A. M. ; PHAM, DIANE ; LAU, CHARMAINE ; NIVISON, MARY ; KOWALCZYK, TOM ; HEVNER, ROBERT F.: Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 26 (2006), Nr. 11, S. 3066–3076
- FLEMING, JONATHAN T. ; HE, WENJUAN ; HAO, CHUANMING ; KETOVA, TATIANA ; PAN, FONG C. ; WRIGHT, CHRISTOPHER C. V. ; LITINGTUNG, YING ; CHIANG, CHIN: The Purkinje neuron acts as a central regulator of spatially and functionally distinct cerebellar precursors. In: *Dev. Cell* Bd. 27 (2013), Nr. 3, S. 278–292. — 00007
- FOGARTY, MARIE P. ; EMMENEGGER, BRIAN A. ; GRASFEDER, LINDA L. ; OLIVER, TRUDY G. ; WECHSLER-REYA, ROBERT J.: Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 104 (2007), Nr. 8, S. 2973–2978
- FREEMAN, MARC R.: Specification and morphogenesis of astrocytes. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 330 (2010), Nr. 6005, S. 774–778
- FRICTSCH, BRITA ; REIS, JANINE ; MARTINOWICH, KERI ; SCHAMBRA, HEIDI M. ; JI, YUANYUAN ; COHEN, LEONARDO G. ; LU, BAI: Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. In: *Neuron* Bd. 66 (2010), Nr. 2, S. 198–204
- FRÖHLICH, NICOLE ; NAGY, BÁLINT ; HOVHANNISYAN, ANAHIT ; KUKLEY, MARIA: Fate of neuron-glia synapses during proliferation and differentiation of NG2 cells. In: *Journal of Anatomy* Bd. 219 (2011), Nr. 1, S. 18–32
- FRUTTIGER, M. ; KARLSSON, L. ; HALL, A. C. ; ABRAMSSON, A. ; CALVER, A. R. ; BOSTRÖM, H. ; WILLETTS, K. ; BERTOLD, C. H. ; HEATH, J. K. ; U. A.: Defective oligodendrocyte development and severe

- hypomyelination in PDGF-A knockout mice. In: *Development* Bd. 126 (1999), Nr. 3, S. 457–467. — 00326 PMID: 9876175
- FUCCILLO, MARC ; JOYNER, ALEXANDRA L. ; FISHELL, GORD: Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. In: *Nature Reviews. Neuroscience* Bd. 7 (2006), Nr. 10, S. 772–783
- FULMER, CLIFTON G. ; VONDRAN, MELISSA W. ; STILLMAN, ALTHEA A. ; HUANG, YANGYANG ; HEMPSTEAD, BARBARA L. ; DREYFUS, CHERYL F.: Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 34 (2014), Nr. 24, S. 8186–8196
- FUNA, KEIKO ; SASAHARA, MASAKIYO: The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. In: *J Neuroimmune Pharmacol* Bd. 9 (2014), Nr. 2, S. 168–181. — 00004 PMID: 23771592
- GAGE, F. H.: Mammalian neural stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 287 (2000), Nr. 5457, S. 1433–1438
- GARD, A. L. ; BURRELL, M. R. ; PFEIFFER, S. E. ; RUDGE, J. S. ; WILLIAMS, W. C.: Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and leukemia inhibitory factor-like protein. In: *Development* Bd. 121 (1995), Nr. 7, S. 2187–2197. — 00075 PMID: 7635062
- GEORGESON, GEORGE D. ; SZONY, BARNABÁS J. ; STREITMAN, KÁROLY ; VARGA, ILONA SZ ; KOVÁCS, ATTILA ; KOVÁCS, LÁSZLÓ ; LÁSZLÓ, ARANKA: Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. In: *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* Bd. 103 (2002), Nr. 2, S. 136–139
- GERSTNER, BETTINA ; BÜHRER, CHRISTOPH ; RHEINLÄNDER, CORNELIA ; POLLEY, OLIVER ; SCHÜLLER, ALEXANDRA ; BERNS, MONIKA ; OBLADEN, MICHAEL ; FELDERHOFF-MUESER, URSULA: Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia. In: *J. Neurosci. Res.* Bd. 84 (2006), Nr. 2, S. 306–315. — 00052 PMID: 16673399
- GERSTNER, BETTINA ; SIFRINGER, MARCO ; DZIETKO, MARK ; SCHÜLLER, ALEXANDRA ; LEE, JOAN ; SIMONS, SINNO ; OBLADEN, MICHAEL ; VOLPE, JOSEPH J. ; ROSENBERG, PAUL A. ; U. A.: Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. In: *Ann. Neurol.* Bd. 61 (2007), Nr. 6, S. 562–573. — 00051 PMID: 17427919
- GHOUMARI, A. M. ; IBANEZ, C. ; EL-ETR, M. ; LECLERC, P. ; EYCHENNE, B. ; O'MALLEY, B. W. ; BAULIEU, E. E. ; SCHUMACHER, M.: Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. In: *Journal of Neurochemistry* Bd. 86 (2003), Nr. 4, S. 848–859
- GIBSON, ERIN M. ; PURGER, DAVID ; MOUNT, CHRISTOPHER W. ; GOLDSTEIN, ANDREA K. ; LIN, GRANT L. ; WOOD, LAUREN S. ; INEMA, INGRID ; MILLER, SARAH E. ; BIERI, GREGOR ; U. A.: Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 344 (2014), Nr. 6183, S. 1252304
- GLICKSTEIN, MITCHELL ; SULTAN, FAHAD ; VOOGD, JAN: Functional localization in the cerebellum. In: *Cortex* Bd. 47 (2011), Nr. 1, S. 59–80
- GOLDENBERG, ROBERT L. ; CULHANE, JENNIFER F. ; IAMS, JAY D. ; ROMERO, ROBERTO: Epidemiology and causes of preterm birth. In: *Lancet (London, England)* Bd. 371 (2008), Nr. 9606, S. 75–84

- GOLDOWITZ, D ; HAMRE, K: The cells and molecules that make a cerebellum. In: *Trends Neurosci.* Bd. 21 (1998), Nr. 9, S. 375–382. — 00360 PMID: 9735945
- GOULD, ELIZABETH: How widespread is adult neurogenesis in mammals? In: *Nature Reviews. Neuroscience* Bd. 8 (2007), Nr. 6, S. 481–488
- GUO, WEIXIANG ; CROSSEY, ERIN L. ; ZHANG, LI ; ZUCCA, STEFANO ; GEORGE, OLIVIA L. ; VALENZUELA, C. FERNANDO ; ZHAO, XINYU: Alcohol exposure decreases CREB binding protein expression and histone acetylation in the developing cerebellum. In: *PLoS One* Bd. 6 (2011), Nr. 5, S. e19351
- HAGIHARA, KAZUKI ; ZHANG, ERIC E. ; KE, YUE-HAI ; LIU, GUOFA ; LIU, JAN-JAN ; RAO, YI ; FENG, GEN-SHENG: Shp2 acts downstream of SDF-1alpha/CXCR4 in guiding granule cell migration during cerebellar development. In: *Developmental Biology* Bd. 334 (2009), Nr. 1, S. 276–284
- HALDIPUR, PARTHIV ; BHARTI, UPASNA ; ALBERTI, CORINNE ; SARKAR, CHITRA ; GULATI, GEETIKA ; IYENGAR, SOUMYA ; GRESSENS, PIERRE ; MANI, SHYAMALA: Preterm delivery disrupts the developmental program of the cerebellum. In: *PLoS ONE* Bd. 6 (2011), Nr. 8, S. e23449
- HARAGUCHI, SHOGO ; SASAHARA, KATSUNORI ; SHIKIMI, HANAKO ; HONDA, SHIN-ICHIRO ; HARADA, NOBUHIRO ; TSUTSUI, KAZUYOSHI: Estradiol promotes purkinje dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis during neonatal life by inducing the expression of BDNF. In: *Cerebellum (London, England)* Bd. 11 (2012), Nr. 2, S. 416–417
- HARRY, G. JEAN ; KRAFT, ANDREW D.: Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. In: *Neurotoxicology* Bd. 33 (2012), Nr. 2, S. 191–206
- HARVEY, R. J. ; NAPPER, R. M.: Quantitative study of granule and Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. In: *The Journal of Comparative Neurology* Bd. 274 (1988), Nr. 2, S. 151–157
- HASHIMOTO, KOUICHI ; KANO, MASANOBU: Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. In: *Neuroscience Research* Bd. 53 (2005), Nr. 3, S. 221–228
- HASHIMOTO, RYOYA ; HORI, KEI ; OWA, TOMOO ; MIYASHITA, SATOSHI ; DEWA, KENICHI ; MASUYAMA, NORIHISA ; SAKAI, KAZUHISA ; HAYASE, YONEKO ; SETO, YUSUKE ; U. A.: Origins of oligodendrocytes in the cerebellum, whose development is controlled by the transcription factor, Sox9. In: *Mechanisms of Development* Bd. 140 (2016), S. 25–40
- HATTEN, M. E.: Central nervous system neuronal migration. In: *Annual Review of Neuroscience* Bd. 22 (1999), S. 511–539
- HATTEN, M. E. ; HEINTZ, N.: Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. In: *Annual Review of Neuroscience* Bd. 18 (1995), S. 385–408
- HAYNES, ROBIN L. ; FOLKERTH, REBECCA D. ; TRACHTENBERG, FELICIA L. ; VOLPE, JOSEPH J. ; KINNEY, HANNAH C.: Nitrosative stress and inducible nitric oxide synthase expression in periventricular leukomalacia. In: *Acta Neuropathologica* Bd. 118 (2009), Nr. 3, S. 391–399
- HERCULANO-HOUZEL, SUZANA: Coordinated Scaling of Cortical and Cerebellar Numbers of Neurons. In: *Front Neuroanat* Bd. 4 (2010). — 00079
- HILL, ROBERT A. ; PATEL, KIRAN D. ; MEDVED, JELENA ; REISS, ALEX M. ; NISHIYAMA, AKIKO: NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF. In: *J. Neurosci.* Bd. 33 (2013), Nr. 36, S. 14558–14566. — 00006 PMID: 24005306

- HIRAI, H. ; LAUNEY, T.: The regulatory connection between the activity of granule cell NMDA receptors and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 20 (2000), Nr. 14, S. 5217–5224
- HORCH, HADLEY WILSON ; KATZ, LAWRENCE C.: BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. In: *Nature Neuroscience* Bd. 5 (2002), Nr. 11, S. 1177–1184
- HORNIK, C. P. ; FORT, P. ; CLARK, R. H. ; WATT, K. ; BENJAMIN, D. K. ; SMITH, P. B. ; MANZONI, P. ; JACQZ-AIGRAIN, E. ; KAGUELIDOU, F. ; U. A.: Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. In: *Early Human Development* Bd. 88 Suppl 2 (2012), S. 569-74
- HOWSON, CHRISTOPHER P. ; KINNEY, MARY V. ; MCDUGALL, LORI ; LAWN, JOY E. ; BORN TOO SOON PRETERM BIRTH ACTION GROUP: Born too soon: preterm birth matters. In: *Reproductive Health* Bd. 10 Suppl 1 (2013), S. S1
- HUANGFU, DANWEI ; ANDERSON, KATHRYN V.: Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 133 (2006), Nr. 1, S. 3–14
- HUGHES, ETHAN G. ; ELMARIAH, SARINA B. ; BALICE-GORDON, RITA J.: Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* Bd. 43 (2010), Nr. 1, S. 136–145
- IKONOMIDOU, CHRYSANTHY ; KAINDL, ANGELA M.: Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. In: *Antioxidants & Redox Signaling* Bd. 14 (2011), Nr. 8, S. 1535–1550
- ISCHIROPOULOS, H.: Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* Bd. 356 (1998), Nr. 1, S. 1–11
- ISOPE, PHILIPPE ; BARBOUR, BORIS: Properties of unitary granule cell-->Purkinje cell synapses in adult rat cerebellar slices. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 22 (2002), Nr. 22, S. 9668–9678
- IWATA, SACHIKO ; NAKAMURA, TOMOHIKO ; HIZUME, ERIKO ; KIHARA, HIDEKI ; TAKASHIMA, SACHIO ; MATSUSHI, TOYOJIRO ; IWATA, OSUKE: Qualitative brain MRI at term and cognitive outcomes at 9 years after very preterm birth. In: *Pediatrics* Bd. 129 (2012), Nr. 5, S. e1138-1147
- IYENGAR, BHARAT R. ; CHOUDHARY, ASHWANI ; SARANGDHAR, MAYURESH A. ; VENKATESH, K. V. ; GADGIL, CHETAN J. ; PILLAI, BEENA: Non-coding RNA interact to regulate neuronal development and function. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* Bd. 8 (2014), S. 47
- JAIN, ASHISH ; AGGARWAL, RAJIV ; JEEVASANKER, M. ; AGARWAL, RAMESH ; DEORARI, ASHOK K. ; PAUL, VINOD K.: Hypoglycemia in the newborn. In: *Indian Journal of Pediatrics* Bd. 75 (2008), Nr. 1, S. 63–67
- JENKINSON, S. G.: Oxygen toxicity. In: *New Horizons (Baltimore, Md.)* Bd. 1 (1993), Nr. 4, S. 504–511
- JESSEN, KRISTJAN R.: Glial cells. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Bd. 36 (2004), Nr. 10, S. 1861–1867
- JIANG, LIDAN ; SHEN, FANXIA ; DEGOS, VINCENT ; SCHONEMANN, MARCUS ; PLEASURE, SAMUEL J. ; MELLON, SYNTHIA H. ; YOUNG, WILLIAM L. ; SU, HUA: Oligogenesis and oligodendrocyte progenitor

- maturation vary in different brain regions and partially correlate with local angiogenesis after ischemic stroke. In: *Translational Stroke Research* Bd. 2 (2011a), Nr. 3, S. 366–375
- JIANG, Y. ; WEI, N. ; LU, T. ; ZHU, J. ; XU, G. ; LIU, X.: Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats. In: *Neuroscience* Bd. 172 (2011b), S. 398–405
- JONES, B. J. ; ROBERTS, D. J.: The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. In: *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* Bd. 20 (1968), Nr. 4, S. 302–304
- KANEKO, MEGUMI ; YAMAGUCHI, KAZUHIKO ; EIRAKU, MOTOTSUGU ; SATO, MOTOHIKO ; TAKATA, NORIO ; KIYOHARA, YOSHIMOTO ; MISHINA, MASAYOSHI ; HIRASE, HAJIME ; HASHIKAWA, TSUTOMU ; U. A.: Remodeling of monopolar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. In: *PloS One* Bd. 6 (2011), Nr. 5, S. e20108
- KAPFHAMMER, JOSEF P.: Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. In: *Prog Histochem Cytochem* Bd. 39 (2004), Nr. 3, S. 131–182. — 00074
- KÁRADÓTTIR, R. ; ATTWELL, D.: Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. In: *Neuroscience* Bd. 145 (2007), Nr. 4, S. 1426–1438
- KARLSSON, U. ; SCHULTZ, R. L.: FIXATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM FROM ELECTRON MICROSCOPY BY ALDEHYDE PERFUSION. I. PRESERVATION WITH ALDEHYDE PERFUSATES VERSUS DIRECT PERFUSION WITH OSMIUM TETROXIDE WITH SPECIAL REFERENCE TO MEMBRANES AND THE EXTRACELLULAR SPACE. In: *J. Ultrastruct. Res.* Bd. 12 (1965), S. 160–186. — 00000 PMID: 14289426
- KATO, TAKAHIRO A. ; WATABE, MOTOKI ; KANBA, SHIGENOBU: Neuron-glia interaction as a possible glue to translate the mind-brain gap: a novel multi-dimensional approach toward psychology and psychiatry. In: *Frontiers in Psychiatry* Bd. 4 (2013), S. 139
- KAUFMANN, W. E. ; MOSER, H. W.: Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. In: *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* Bd. 10 (2000), Nr. 10, S. 981–991
- KAWAGUCHI, KOJI ; HABARA, TOMOMI ; TERASHIMA, TOSHIO ; KIKKAWA, SATOSHI: GABA modulates development of cerebellar Purkinje cell dendrites under control of endocannabinoid signaling. In: *J. Neurochem.* Bd. 114 (2010), Nr. 2, S. 627–638. — 00007
- KENNEY, A. M. ; ROWITCH, D. H.: Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. In: *Molecular and Cellular Biology* Bd. 20 (2000), Nr. 23, S. 9055–9067
- KENNEY, ANNA MARIE ; COLE, MICHAEL D. ; ROWITCH, DAVID H.: Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 130 (2003), Nr. 1, S. 15–28
- KETTENMANN, HELMUT ; HANISCH, UWE-KARSTEN ; NODA, MAMI ; VERKHRATSKY, ALEXEI: Physiology of microglia. In: *Physiol. Rev.* Bd. 91 (2011), Nr. 2, S. 461–553. — 00685
- KIM, HOSUNG ; GANO, DAWN ; HO, MAI-LAN ; GUO, XIAOYUE M. ; UNZUETA, ALISA ; HESS, CHRISTOPHER ; FERRIERO, DONNA M. ; XU, DUAN ; BARKOVICH, A. JAMES: Hindbrain regional growth in preterm

- newborns and its impairment in relation to brain injury. In: *Human Brain Mapping* Bd. 37 (2016), Nr. 2, S. 678–688
- KINNEY, MARY V. ; LAWN, JOY E. ; HOWSON, CHRISTOPHER P. ; BELIZAN, JOSÉ: 15 Million preterm births annually: what has changed this year? In: *Reproductive Health* Bd. 9 (2012), S. 28
- KLEIN, JEFFREY A. ; ACKERMAN, SUSAN L.: Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. In: *The Journal of Clinical Investigation* Bd. 111 (2003), Nr. 6, S. 785–793
- VAN DER KNAAP, MARJO S. ; NAIDU, SAKKUBAI ; POWWELS, PETRA J. W. ; BONAVITA, SIMONA ; VAN COSTER, RUDY ; LAGAE, LIEVEN ; SPERNER, JÜRGEN ; SURTEES, ROBERT ; SCHIFFMANN, RAPHAEL ; U. A.: New syndrome characterized by hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. In: *AJNR. American journal of neuroradiology* Bd. 23 (2002), Nr. 9, S. 1466–1474
- KNOEPFLER, PAUL S. ; CHENG, PEI FENG ; EISENMAN, ROBERT N.: N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. In: *Genes & Development* Bd. 16 (2002), Nr. 20, S. 2699–2712
- KOLB, BRYAN ; GIBB, ROBBIN: Brain Plasticity and Behaviour in the Developing Brain. In: *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry* Bd. 20 (2011), Nr. 4, S. 265–276
- KOMITOVA, MILA ; XENOS, DIONYSIOS ; SALMASO, NATALINA ; TRAN, KATHY MAY ; BRAND, THERESA ; SCHWARTZ, MICHAEL L. ; MENT, LAURA ; VACCARINO, FLORA M.: Hypoxia-induced developmental delays of inhibitory interneurons are reversed by environmental enrichment in the postnatal mouse forebrain. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 33 (2013), Nr. 33, S. 13375–13387
- KONYALIOGLU, SIBEL ; ARMAGAN, GULIZ ; YALCIN, AYFER ; ATALAYIN, CIGDEM ; DAGCI, TANER: Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells. In: *Neural Regeneration Research* Bd. 8 (2013), Nr. 6, S. 485–495
- KOPPEN, HILLE ; BOELE, HENK-JAN ; PALM-MEINDERS, INGE H. ; KOUTSTAAL, BASTIAAN J. ; HORLINGS, CORINNE GC ; KOEKOEK, BAS K. ; VAN DER GEEST, JOS ; SMIT, ALBERTINE E. ; VAN BUCHEM, MARK A. ; U. A.: Cerebellar function and ischemic brain lesions in migraine patients from the general population. In: *Cephalalgia: An International Journal of Headache* (2016)
- KRÄMER-ALBERS, EVA-MARIA ; WHITE, ROBIN: From axon-glia signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. In: *Cellular and molecular life sciences: CMLS* Bd. 68 (2011), Nr. 12, S. 2003–2012
- KUGLER, MATTHIAS C. ; JOYNER, ALEXANDRA L. ; LOOMIS, CYNTHIA A. ; MUNGER, JOHN S.: Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* Bd. 52 (2015), Nr. 1, S. 1–13
- KUHN, SUSANNE A. ; VAN LANDEGHEM, FRANK K. H. ; ZACHARIAS, ROBERT ; FÄRBER, KATRIN ; RAPPERT, ANGELIKA ; PAVLOVIC, SANJA ; HOFFMANN, ANJA ; NOLTE, CHRISTIANE ; KETTENMANN, HELMUT: Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* Bd. 25 (2004), Nr. 2, S. 312–322
- KUMAR, V. ; SHEARER, J. C. ; KUMAR, A. ; DARMSTADT, G. L.: Neonatal hypothermia in low resource settings: a review. In: *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* Bd. 29 (2009), Nr. 6, S. 401–412

- LAMETTI, DANIEL ROBERT ; OOSTWOUW WIJDENES, LEONIE ; BONAIUTO, JAMES ; BESTMANN, SVEN ; ROTHWELL, JOHN C.: Cerebellar tDCS Dissociates the Timing of Perceptual Decisions from Perceptual Change in Speech. In: *Journal of Neurophysiology* (2016), S. jn.00433.2016
- LEE, EUNICE Y. ; JI, HONGKAI ; OUYANG, ZHENGQING ; ZHOU, BAIYU ; MA, WENXIU ; VOKES, STEVEN A. ; MCMAHON, ANDREW P. ; WONG, WING H. ; SCOTT, MATTHEW P.: Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Bd. 107 (2010), Nr. 21, S. 9736–9741. — 00054
- LEE, YOUNGJIN ; MORRISON, BRETT M. ; LI, YUN ; LENGACHER, SYLVAIN ; FARAH, MOHAMED H. ; HOFFMAN, PAUL N. ; LIU, YITING ; TSINGALIA, AKIVAGA ; JIN, LIN ; U. A.: Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. In: *Nature* Bd. 487 (2012), Nr. 7408, S. 443–448
- LEVINE, J. M. ; STINCONE, F. ; LEE, Y. S.: Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. In: *Glia* Bd. 7 (1993), Nr. 4, S. 307–321
- LEVITON, ALAN ; ALLRED, ELIZABETH ; KUBAN, KARL C. K. ; DAMMANN, OLAF ; O'SHEA, T. MICHAEL ; HIRTZ, DEBORAH ; SCHREIBER, MICHAEL D. ; PANETH, NIGEL ; ELGAN STUDY INVESTIGATORS: Early blood gas abnormalities and the preterm brain. In: *Am. J. Epidemiol.* Bd. 172 (2010), Nr. 8, S. 907–916. — 00016 PMID: 20807736
- LEWIS, PAULA M. ; GRITLI-LINDE, AMEL ; SMEYNE, RICHARD ; KOTTMANN, ANDREAS ; MCMAHON, ANDREW P.: Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. In: *Developmental Biology* Bd. 270 (2004), Nr. 2, S. 393–410
- LI, CUI ; XIAO, LIN ; LIU, XIUYUN ; YANG, WENJING ; SHEN, WEIRAN ; HU, CHUN ; YANG, GUANG ; HE, CHENG: A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. In: *Glia* Bd. 61 (2013), Nr. 5, S. 732–749
- LI, JIASI ; ZHANG, LEI ; CHU, YONGXIN ; NAMAKA, MICHAEL ; DENG, BENQIANG ; KONG, JIMING ; BI, XIAOYING: Astrocytes in Oligodendrocyte Lineage Development and White Matter Pathology. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* Bd. 10 (2016), S. 119
- LIMPEROPOULOS, CATHERINE ; CHILINGARYAN, GEVORG ; GUIZARD, NICOLAS ; ROBERTSON, RICHARD L ; DU PLESSIS, ADRIÉ J: Cerebellar injury in the premature infant is associated with impaired growth of specific cerebral regions. In: *Pediatr. Res.* Bd. 68 (2010), Nr. 2, S. 145–150
- LIMPEROPOULOS, CATHERINE ; SOUL, JANET S ; GAUVREAU, KIMBERLEE ; HUPPI, PETRA S ; WARFIELD, SIMON K ; BASSAN, HAIM ; ROBERTSON, RICHARD L ; VOLPE, JOSEPH J ; DU PLESSIS, ADRIÉ J: Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. In: *Pediatrics* Bd. 115 (2005), Nr. 3, S. 688–695. — PMID: 15741373
- LIN, SHU-TING ; HENG, MARY Y. ; PTÁČEK, LOUIS J. ; FU, YING-HUI: Regulation of Myelination in the Central Nervous System by Nuclear Lamin B1 and Non-coding RNAs. In: *Translational Neurodegeneration* Bd. 3 (2014), Nr. 1, S. 4
- LINDSTRÖM, KAROLINA ; LINDBLAD, FRANK ; HJERN, ANDERS: Preterm birth and attention-deficit/hyperactivity disorder in schoolchildren. In: *Pediatrics* Bd. 127 (2011), Nr. 5, S. 858–865
- LIVAK, K. J. ; SCHMITTGEN, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* Bd. 25 (2001), Nr. 4, S. 402–408. — 00017

- LORDKIPANIDZE, TAMAR ; DUNAEVSKY, ANNA: Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. In: *Glia* Bd. 51 (2005), Nr. 3, S. 229–234
- LOSI, GABRIELE ; MARIOTTI, LETIZIA ; CARMIGNOTO, GIORGIO: GABAergic interneuron to astrocyte signalling: a neglected form of cell communication in the brain. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* Bd. 369 (2014), Nr. 1654, S. 20130609
- LOURENÇO, TÂNIA ; PAES DE FARIA, JOANA ; BIPPES, CHRISTIAN A. ; MAIA, JOÃO ; LOPES-DA-SILVA, JOSÉ A. ; RELVAS, JOÃO B. ; GRÃOS, MÁRIO: Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined biochemical and mechanical cues. In: *Scientific Reports* Bd. 6 (2016), S. 21563
- LU, JIAN-QIANG ; JOSEPH, JEFFREY T. ; NASH, RICHARD A. ; STOREK, JAN ; STEVENS, ANNE M. ; METZ, LUANNE M. ; CLARK, ARTHUR W. ; JOHNSON, EDWARD S. ; YONG, V. WEE: Neuroinflammation and demyelination in multiple sclerosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Archives of Neurology* Bd. 67 (2010), Nr. 6, S. 716–722
- LUYT, KAREN ; SLADE, TIMOTHY P. ; DORWARD, JIENCHI J. ; DURANT, CLAIRE F. ; WU, YUE ; SHIGEMOTO, RYUICHI ; MUNDELL, STUART J. ; VÁRADI, ANIKÓ ; MOLNÁR, ELEK: Developing oligodendrocytes express functional GABA(B) receptors that stimulate cell proliferation and migration. In: *Journal of Neurochemistry* Bd. 100 (2007), Nr. 3, S. 822–840
- MACAULEY, SHANNON L. ; SIDMAN, RICHARD L. ; SCHUCHMAN, EDWARD H. ; TAKSIR, TATYANA ; STEWART, GREGORY R.: Neuropathology of the acid sphingomyelinase knockout mouse model of Niemann-Pick A disease including structure-function studies associated with cerebellar Purkinje cell degeneration. In: *Experimental Neurology* Bd. 214 (2008), Nr. 2, S. 181–192
- MARAGAKIS, NICHOLAS J. ; ROTHSTEIN, JEFFREY D.: Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. In: *Nature Clinical Practice. Neurology* Bd. 2 (2006), Nr. 12, S. 679–689
- MARLOW, N. ; ROSE, A. S. ; RANDS, C. E. ; DRAPER, E. S.: Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. In: *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* Bd. 90 (2005), Nr. 5, S. F380-387
- MARTINEZ, SALVADOR ; ANDREU, ABRAHAM ; MECKLENBURG, NORA ; ECHEVARRIA, DIEGO: Cellular and molecular basis of cerebellar development. In: *Frontiers in Neuroanatomy* Bd. 7 (2013)
- MARZBAN, HASSAN ; DEL BIGIO, MARC R. ; ALIZADEH, JAVAD ; GHAVAMI, SAEID ; ZACHARIAH, ROBBY M. ; RASTEGAR, MOJGAN: Cellular commitment in the developing cerebellum. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* Bd. 8 (2014), S. 450
- MATUTE, CARLOS ; DOMERCQ, MARÍA ; SÁNCHEZ-GÓMEZ, MARÍA-VICTORIA: Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. In: *Glia* Bd. 53 (2006), Nr. 2, S. 212–224
- MCCARTHY, K. D. ; DE VELLIS, J.: Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. In: *J. Cell Biol.* Bd. 85 (1980), Nr. 3, S. 890–902. — 03243 PMID: 6248568
- MCDOLE, B. ; ISGOR, C. ; PARE, C. ; GUTHRIE, K.: BDNF over-expression increases olfactory bulb granule cell dendritic spine density in vivo. In: *Neuroscience* Bd. 304 (2015), S. 146–160
- MCKAY, BRUCE E. ; TURNER, RAY W.: Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. In: *J. Physiol. (Lond.)* Bd. 567 (2005), Nr. Pt 3, S. 829–850. — 00132

- MCMAHON, ANDREW P. ; INGHAM, PHILIP W. ; TABIN, CLIFFORD J.: Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. In: *Current Topics in Developmental Biology* Bd. 53 (2003), S. 1–114
- MECKLENBURG, NORA ; GARCIA-LÓPEZ, RAQUEL ; PUELLES, EDUARDO ; SOTELO, CONSTANTINO ; MARTINEZ, SALVADOR: Cerebellar oligodendroglial cells have a mesencephalic origin. In: *Glia* Bd. 59 (2011), Nr. 12, S. 1946–1957
- MENSCH, SIGRID ; BARABAN, MARION ; ALMEIDA, RAFAEL ; CZOPKA, TIM ; AUSBORN, JESSICA ; EL MANIRA, ABDELJABBAR ; LYONS, DAVID A.: Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. In: *Nature Neuroscience* Bd. 18 (2015), Nr. 5, S. 628–630
- METZGER, F.: Molecular and cellular control of dendrite maturation during brain development. In: *Curr Mol Pharmacol* Bd. 3 (2010), Nr. 1, S. 1–11. — 00020
- MEYER-FRANKE, A. ; SHEN, S. ; BARRES, B. A.: Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* Bd. 14 (1999), Nr. 4–5, S. 385–397
- MIKLIC, SPELA ; JURIC, DAMIJANA MOJCA ; CARMAN-KRZAN, MARIJA ; CAMAN-KRZAN, MARIJA: Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. In: *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* Bd. 22 (2004), Nr. 3, S. 119–130
- MILLER, BRANDON A. ; CRUM, JEANNINE M. ; TOVAR, C. AMY ; FERGUSON, ADAM R. ; BRESNAHAN, JACQUELINE C. ; BEATTIE, MICHAEL S.: Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia in vitro. In: *Journal of Neuroinflammation* Bd. 4 (2007), S. 28
- MIN, YOUNJIN ; KRISTIANSEN, KAI ; BOGGS, JOAN M. ; HUSTED, CYNTHIA ; ZASADZINSKI, JOSEPH A. ; ISRAELACHVILI, JACOB: Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 106 (2009), Nr. 9, S. 3154–3159
- MITEW, S. ; HAY, C. M. ; PECKHAM, H. ; XIAO, J. ; KOENNING, M. ; EMERY, B.: Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. In: *Neuroscience* Bd. 276 (2014), S. 29–47
- MÖBIUS, WIEBKE ; COOPER, BENJAMIN ; KAUFMANN, WALTER A. ; IMIG, CORDELIA ; RUHWEDDEL, TORBEN ; SNAIDERO, NICOLAS ; SAAB, AIMAN S. ; VAROQUEAUX, FRÉDÉRIQUE: Electron microscopy of the mouse central nervous system. In: *Methods Cell Biol.* Bd. 96 (2010), S. 475–512. — 00024 PMID: 20869535
- MODI, KHUSHBU K. ; SENDTNER, MICHAEL ; PAHAN, KALIPADA: Up-regulation of ciliary neurotrophic factor in astrocytes by aspirin: implications for remyelination in multiple sclerosis. In: *The Journal of Biological Chemistry* Bd. 288 (2013), Nr. 25, S. 18533–18545
- MOLOFSKY, ANNA V. ; KRECIK, ROBERT ; KRENICK, ROBERT ; ULLIAN, ERIK M. ; ULLIAN, ERIK ; TSAI, HUI-HSIN ; DENEEN, BENJAMIN ; RICHARDSON, WILLIAM D. ; BARRES, BEN A. ; U. A.: Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. In: *Genes & Development* Bd. 26 (2012), Nr. 9, S. 891–907
- MOLOFSKY, ANNA VICTORIA ; DENEEN, BENJAMIN: Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. In: *Glia* Bd. 63 (2015), Nr. 8, S. 1320–1329

- MOORE, TAMANNA ; HENNESSY, ENID M. ; MYLES, JONATHAN ; JOHNSON, SAMANTHA J. ; DRAPER, ELIZABETH S. ; COSTELOE, KATE L. ; MARLOW, NEIL: Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: the EPICure studies. In: *BMJ (Clinical research ed.)* Bd. 345 (2012), S. e7961
- MOREIRA, RAFAELA S. ; MAGALHÃES, LÍVIA C. ; ALVES, CLAUDIA R. L.: Effect of preterm birth on motor development, behavior, and school performance of school-age children: a systematic review. In: *Jornal De Pediatria* Bd. 90 (2014), Nr. 2, S. 119–134
- MORRISON, M. E. ; MASON, C. A.: Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 18 (1998), Nr. 10, S. 3563–3573
- MULLIS, K. B.: Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. In: *Annales De Biologie Clinique* Bd. 48 (1990), Nr. 8, S. 579–582
- NAKAZAWA, KAZU ; ZSIROS, VERONIKA ; JIANG, ZHIHONG ; NAKAO, KAZUHITO ; KOLATA, STEFAN ; ZHANG, SHUQIN ; BELFORTE, JUAN E.: GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. In: *Neuropharmacology* Bd. 62 (2012), Nr. 3, S. 1574–1583
- NEDELESCU, HERMINA ; CHOWDHURY, TARA G. ; WABLE, GAURI S. ; ARBUTHNOTT, GORDON ; AOKI, CHIYE: Cerebellar sub-divisions differ in exercise-induced plasticity of noradrenergic axons and in their association with resilience to activity-based anorexia. In: *Brain Structure & Function* (2016)
- O'HARA, WILLIAM A. ; AZAR, WALID J. ; BEHRINGER, RICHARD R. ; RENFREE, MARILYN B. ; PASK, ANDREW J.: Desert hedgehog is a mammal-specific gene expressed during testicular and ovarian development in a marsupial. In: *BMC developmental biology* Bd. 11 (2011), S. 72
- OKUDA, HIROAKI ; TATSUMI, KOUKO ; MORITA-TAKEMURA, SHOKO ; NAKAHARA, KAZUKI ; NOCHIOKA, KATSUNORI ; SHINJO, TAKEAKI ; TERADA, YUKI ; WANAKA, AKIO: Hedgehog Signaling Modulates the Release of Gliotransmitters from Cultured Cerebellar Astrocytes. In: *Neurochemical Research* Bd. 41 (2016), Nr. 1–2, S. 278–289
- OLIVER, TRUDY G. ; GRASFEDER, LINDA L. ; CARROLL, AUDRA L. ; KAISER, CONSTANZE ; GILLINGHAM, CHRISTINE L. ; LIN, SIMON M. ; WICKRAMASINGHE, RASIKA ; SCOTT, MATTHEW P. ; WECHSLER-REYA, ROBERT J.: Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 100 (2003), Nr. 12, S. 7331–7336
- O'REILLY, MEGAN ; SOZO, FOULA ; HARDING, RICHARD: Impact of preterm birth and bronchopulmonary dysplasia on the developing lung: long-term consequences for respiratory health. In: *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* Bd. 40 (2013), Nr. 11, S. 765–773
- PANG, YI ; FAN, LIR-WAN ; TIEN, LU-TAI ; DAI, XUEMEI ; ZHENG, BAOYING ; CAI, ZHENGWEI ; LIN, RICK C. S. ; BHATT, ABHAY: Differential roles of astrocyte and microglia in supporting oligodendrocyte development and myelination in vitro. In: *Brain Behav* Bd. 3 (2013), Nr. 5, S. 503–514.  
— 00002 PMID: 24392271
- PANG, YI ; ZHENG, BAOYING ; FAN, LIR-WAN ; RHODES, PHILIP G. ; CAI, ZHENGWEI: IGF-1 protects oligodendrocyte progenitors against TNFalpha-induced damage by activation of PI3K/Akt and interruption of the mitochondrial apoptotic pathway. In: *Glia* Bd. 55 (2007), Nr. 11, S. 1099–1107. — 00000 PMID: 17577243

- PATEL, RAVI M. ; KANDEFER, SARAH ; WALSH, MICHELE C. ; BELL, EDWARD F. ; CARLO, WALDEMAR A. ; LAPTOOK, ABBOT R. ; SÁNCHEZ, PABLO J. ; SHANKARAN, SEETHA ; VAN MEURS, KRISA P. ; U. A.: Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. In: *The New England Journal of Medicine* Bd. 372 (2015), Nr. 4, S. 331–340
- PAUS, TOMÁS ; TORO, ROBERTO: Could Sex Differences in White Matter be Explained by g ratio? In: *Frontiers in Neuroanatomy* Bd. 3 (2009), S. 14
- PETERSON, LISA K. ; FUJINAMI, ROBERT S.: Inflammation, Demyelination, Neurodegeneration and Neuroprotection in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* Bd. 184 (2007), Nr. 1–2, S. 37–44
- PINATO, LUCIANA ; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, SANSEYAY ; FRANCO, DAIANE G. ; CAMPOS, LEILA M. G. ; CECON, ERIKA ; FERNANDES, PEDRO A. C. M. ; BITTENCOURT, JACKSON C. ; MARKUS, REGINA P.: Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. In: *Brain Structure & Function* Bd. 220 (2015), Nr. 2, S. 827–840
- POBLETE-NAREDO, IRAIS ; GUILLEM, ALAIN M. ; JUÁREZ, CLAUDIA ; ZEPEDA, ROSSANA C. ; RAMÍREZ, LETICIA ; CABA, MARIO ; HERNÁNDEZ-KELLY, LUISA C. ; AGUILERA, JOSÉ ; LÓPEZ-BAYGHEN, ESTHER ; U. A.: Brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Bergmann glia cells. In: *Neurochemistry International* Bd. 59 (2011), Nr. 8, S. 1133–1144
- POLAZZI, E. ; GIANNI, T. ; CONTESTABILE, A.: Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. In: *Glia* Bd. 36 (2001), Nr. 3, S. 271–280
- POLITO, ANNABELLA ; REYNOLDS, RICHARD: NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. In: *Journal of Anatomy* Bd. 207 (2005), Nr. 6, S. 707–716
- PORTER, J. A. ; YOUNG, K. E. ; BEACHY, P. A.: Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 274 (1996), Nr. 5285, S. 255–259
- PRINGLE, N. P. ; MUDHAR, H. S. ; COLLARINI, E. J. ; RICHARDSON, W. D.: PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 115 (1992), Nr. 2, S. 535–551
- RAMÓN Y CAJAL, SANTIAGO: *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés* : Paris : Maloine, 1909
- RAND, KATHERINE M. ; AUSTIN, NICOLA C. ; INDER, TERRIE E. ; BORA, SAMUDRAGUPTA ; WOODWARD, LIANNE J.: Neonatal Infection and Later Neurodevelopmental Risk in the Very Preterm Infant. In: *The Journal of Pediatrics* Bd. 170 (2016), S. 97–104
- RAVI, NAMASIVAYAM ; LI, ZHIJUN ; OETTL, LARS-LENNART ; BARTSCH, DUSAN ; SCHÖNIG, KAI ; KELSCH, WOLFGANG: Postnatal subventricular zone progenitors switch their fate to generate neurons with distinct synaptic input patterns. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 142 (2015), Nr. 2, S. 303–313
- RINHOLM, JOHANNE E. ; HAMILTON, NICOLA B. ; KESSARIS, NICOLETTA ; RICHARDSON, WILLIAM D. ; BERGERSEN, LINDA H. ; ATTWELL, DAVID: Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 31 (2011), Nr. 2, S. 538–548

- RITTER, JONATHAN ; SCHMITZ, THOMAS ; CHEW, LI-JIN ; BÜHRER, CHRISTOPH ; MÖBIUS, WIEBKE ; ZONOUZI, MARZIEH ; GALLO, VITTORIO: Neonatal hyperoxia exposure disrupts axon-oligodendrocyte integrity in the subcortical white matter. In: *J. Neurosci.* Bd. 33 (2013), Nr. 21, S. 8990–9002. — 00008 PMID: 23699510
- RODRIGUES, ANDRÉ FELIPE ; BIASIBETTI, HELENA ; ZANOTTO, BRUNA STELA ; SANCHES, EDUARDO FARIAS ; SCHMITZ, FELIPE ; NUNES, VINÍCIUS TEJADA ; PIEROZAN, PAULA ; MANFREDINI, VANUSA ; MAGRO, DÉBORA DELWING DAL ; U. A.: D-Galactose Causes Motor Coordination Impairment, and Histological and Biochemical Changes in the Cerebellum of Rats. In: *Molecular Neurobiology* (2016)
- RODRIGUES, CARLOS A. V. ; DIOGO, MARIA MARGARIDA ; DA SILVA, CLÁUDIA LOBATO ; CABRAL, JOAQUIM M. S.: Hypoxia enhances proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* Bd. 106 (2010), Nr. 2, S. 260–270
- ROSE, JESSICA ; CAHILL-ROWLEY, KATELYN ; VASSAR, RACHEL ; YEOM, KRISTEN W. ; STECHER, XIMENA ; STEVENSON, DAVID K. ; HINTZ, SUSAN R. ; BARNEA-GORALY, NAAMA: Neonatal brain microstructure correlates of neurodevelopment and gait in preterm children 18-22 mo of age: an MRI and DTI study. In: *Pediatric Research* Bd. 78 (2015), Nr. 6, S. 700–708
- RÖSSERT, CHRISTIAN ; DEAN, PAUL ; PORRILL, JOHN: At the Edge of Chaos: How Cerebellar Granular Layer Network Dynamics Can Provide the Basis for Temporal Filters. In: *PLoS Comput. Biol.* Bd. 11 (2015), Nr. 10, S. e1004515. — 00000
- ROTHSTEIN, J. D. ; MARTIN, L. ; LEVEY, A. I. ; DYKES-HOBERG, M. ; JIN, L. ; WU, D. ; NASH, N. ; KUNCL, R. W.: Localization of neuronal and glial glutamate transporters. In: *Neuron* Bd. 13 (1994), Nr. 3, S. 713–725
- ROUSSEL, MARTINE F. ; HATTEN, MARY E.: Cerebellum development and medulloblastoma. In: *Current Topics in Developmental Biology* Bd. 94 (2011), S. 235–282
- SCAFIDI, JOSEPH ; HAMMOND, TIMOTHY R. ; SCAFIDI, SUSANNA ; RITTER, JONATHAN ; JABLONSKA, BEATA ; RONCAL, MARIA ; SZIGETI-BUCK, KLARA ; COMAN, DANIEL ; HUANG, YUEGAO ; U. A.: Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. In: *Nature* Bd. 506 (2014), Nr. 7487, S. 230–234
- SCELFO, BIBIANA ; STRATA, PIERGIORGIO: Correlation between multiple climbing fibre regression and parallel fibre response development in the postnatal mouse cerebellum. In: *The European Journal of Neuroscience* Bd. 21 (2005), Nr. 4, S. 971–978
- SCHUEER, TILL ; BROCKMÖLLER, VIVIEN ; BLANCO KNOWLTON, MARISSA ; WEITKAMP, JÖRN-HENDRIK ; RUHWEDEL, TORBEN ; MUELLER, SUSANNE ; ENDESFELDER, STEFANIE ; BÜHRER, CHRISTOPH ; SCHMITZ, THOMAS: Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline. In: *Glia* Bd. 63 (2015), Nr. 10, S. 1825–1839
- Scheuer, Till ; Sharkovska, Yuliya ; Tarabykin, Victor ; Marggraf, Katharina ; Brockmöller, Vivien ; Bührer, Christoph ; Endesfelder, Stefanie ; Schmitz, Thomas: Neonatal Hyperoxia Perturbs Neuronal Development in the Cerebellum. In: *Molecular Neurobiology* (2017)
- SCHMITZ, THOMAS ; ENDESFELDER, STEFANIE ; CHEW, LI-JIN ; ZAAK, IRINA ; BÜHRER, CHRISTOPH: Minocycline protects oligodendroglial precursor cells against injury caused by oxygen-glucose deprivation. In: *J. Neurosci. Res.* Bd. 90 (2012a), Nr. 5, S. 933–944

- SCHMITZ, THOMAS ; ENDESFELDER, STEFANIE ; REINERT, MARIE-CHRISTINE ; KLINKER, FLORIAN ; MÜLLER, SUSANNE ; BÜHRER, CHRISTOPH ; LIEBETANZ, DAVID: Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. In: *Exp. Neurol.* Bd. 235 (2012b), Nr. 1, S. 374–379
- SCHMITZ, THOMAS ; KRABBE, GRIETJE ; WEIKERT, GEORG ; SCHEUER, TILL ; MATHEUS, FRIEDERIKE ; WANG, YAN ; MUELLER, SUSANNE ; KETTENMANN, HELMUT ; MATYASH, VITALI ; U. A.: Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. In: *Exp. Neurol.* Bd. 254 (2014), S. 153–165.  
— 00001 PMID: 24491957
- SCHMITZ, THOMAS ; RITTER, JONATHAN ; MUELLER, SUSANNE ; FELDERHOFF-MUESER, URSULA ; CHEW, LI-JIN ; GALLO, VITTORIO: Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 31 (2011), Nr. 11, S. 4327–4344
- SHAHAM, SHAI: Glia-neuron interactions in nervous system function and development. In: *Current Topics in Developmental Biology* Bd. 69 (2005), S. 39–66
- SHANY, EILON ; INDER, TERRIE E. ; GOSHEN, SHARON ; LEE, IRIS ; NEIL, JEFFREY J. ; SMYSER, CHRISTOPHER D. ; DOYLE, LEX W. ; ANDERSON, PETER J. ; SHIMONY, JOSHUA S.: Diffusion Tensor Tractography of the Cerebellar Peduncles in Prematurely Born 7-Year-Old Children. In: *Cerebellum (London, England)* (2016)
- SHELIGA, B. M. ; YAKUSHIN, S. B. ; SILVERS, A. ; RAPHAN, T. ; COHEN, B.: Control of spatial orientation of the angular vestibulo-ocular reflex by the nodulus and uvula of the vestibulocerebellum. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* Bd. 871 (1999), S. 94–122
- SHOLL, D. A.: Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. In: *Journal of Anatomy* Bd. 87 (1953), Nr. 4, S. 387–406
- SILLITOE, ROY V. ; JOYNER, ALEXANDRA L.: Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Bd. 23 (2007), S. 549–577. — 00166
- SIMONS, MIKAEL ; TRAJKOVIC, KATARINA: Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. In: *Journal of Cell Science* Bd. 119 (2006), Nr. Pt 21, S. 4381–4389
- SKIÖLD, BÉATRICE ; VOLLMER, BRIGITTE ; BÖHM, BIRGITTA ; HALLBERG, BOUBOU ; HORSCH, SANDRA ; MOSSKIN, MIKAEL ; LAGERCRANTZ, HUGO ; ÅDÉN, ULRIKA ; BLENNOW, MATS: Neonatal magnetic resonance imaging and outcome at age 30 months in extremely preterm infants. In: *The Journal of Pediatrics* Bd. 160 (2012), Nr. 4, S. 559–566.e1
- SOLECKI, D. J. ; LIU, X. L. ; TOMODA, T. ; FANG, Y. ; HATTEN, M. E.: Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. In: *Neuron* Bd. 31 (2001), Nr. 4, S. 557–568. — 00266
- SPORNS, OLAF ; CHIALVO, DANTE R. ; KAISER, MARCUS ; HILGETAG, CLAUS C.: Organization, development and function of complex brain networks. In: *Trends in Cognitive Sciences* Bd. 8 (2004), Nr. 9, S. 418–425
- STANKOFF, BRUNO ; AIGROT, MARIE-STÉPHANE ; NOËL, FRÉDÉRIC ; WATTILLIAUX, AURÉLIE ; ZALC, BERNARD ; LUBETZKI, CATHERINE: Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 22 (2002), Nr. 21, S. 9221–9227

- STEINLIN, MAJA: Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. In: *Cerebellum* Bd. 7 (2008), Nr. 4, S. 607–610. — 00073 PMID: 19057977
- STIEFEL, KLAUS M. ; TORBEN-NIELSEN, BENJAMIN ; COGGAN, JAY S.: Proposed evolutionary changes in the role of myelin. In: *Frontiers in Neuroscience* Bd. 7 (2013), S. 202
- STILES, JOAN ; JERNIGAN, TERRY L.: The Basics of Brain Development. In: *Neuropsychology Review* Bd. 20 (2010), Nr. 4, S. 327–348
- STOLL, BARBARA J. ; HANSEN, NELLIE I. ; ADAMS-CHAPMAN, IRA ; FANAROFF, AVROY A. ; HINTZ, SUSAN R. ; VOHR, BETTY ; HIGGINS, ROSEMARY D. ; NATIONAL INSTITUTE OF CHILD HEALTH AND HUMAN DEVELOPMENT NEONATAL RESEARCH NETWORK: Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. In: *JAMA* Bd. 292 (2004), Nr. 19, S. 2357–2365
- STOODLEY, CATHERINE J. ; VALERA, EVE M. ; SCHMAHMANN, JEREMY D.: Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. In: *Neuroimage* Bd. 59 (2012), Nr. 2, S. 1560–1570. — 00106 PMID: 21907811
- STRAKA, HANS ; BECK, JAMES C. ; PASTOR, ANGEL M. ; BAKER, ROBERT: Morphology and physiology of the cerebellar vestibulolateral lobe pathways linked to oculomotor function in the goldfish. In: *Journal of Neurophysiology* Bd. 96 (2006), Nr. 4, S. 1963–1980
- SUDAROV, ANAMARIA ; JOYNER, ALEXANDRA L.: Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. In: *Neural Development* Bd. 2 (2007), S. 26
- TAKAYAMA, CHITOSHI ; INOUE, YOSHIRO: GABAergic signaling in the developing cerebellum. In: *Anatomical Science International* Bd. 79 (2004), Nr. 3, S. 124–136
- TEJEDOR, LAURA SALINAS ; GUDI, VIKTORIA ; KUCMAN, VALERIA ; PUL, REFIK ; GINGELE, STEFAN ; SÜHS, KURT-WOLFRAM ; STANGEL, MARTIN ; SKRIPULETZ, THOMAS: Oligodendroglial markers in the cuprizone model of CNS de- and remyelination. In: *Histology and Histopathology* Bd. 30 (2015), Nr. 12, S. 1455–1464
- THOMPSON, DEANNE K. ; INDER, TERRIE E. ; FAGGIAN, NATHAN ; JOHNSTON, LEIGH ; WARFIELD, SIMON K. ; ANDERSON, PETER J. ; DOYLE, LEX W. ; EGAN, GARY F.: Characterization of the corpus callosum in very preterm and full-term infants utilizing MRI. In: *NeuroImage* Bd. 55 (2011), Nr. 2, S. 479–490
- THORNE, R. G. ; PRONK, G. J. ; PADMANABHAN, V. ; FREY, W. H.: Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. In: *Neuroscience* Bd. 127 (2004), Nr. 2, S. 481–496
- TIMMER, MARCO ; CESNULEVICIUS, KONSTANTIN ; WINKLER, CHRISTIAN ; KOLB, JULIA ; LIPOKATIC-TAKACS, ESTHER ; JUNGNICKEL, JULIA ; GROTHE, CLAUDIA: Fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 3 are required for the development of the substantia nigra, and FGF-2 plays a crucial role for the rescue of dopaminergic neurons after 6-hydroxydopamine lesion. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 27 (2007), Nr. 3, S. 459–471
- TODORICH, BOZHO ; PASQUINI, JUANA M. ; GARCIA, CORINA I. ; PAEZ, PABLO M. ; CONNOR, JAMES R.: Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. In: *Glia* Bd. 57 (2009), Nr. 5, S. 467–478

- TUCKER, JANET ; MCGUIRE, WILLIAM: Epidemiology of preterm birth. In: *BMJ : British Medical Journal* Bd. 329 (2004), Nr. 7467, S. 675–678
- UENO, MASAKI ; FUJITA, YUKI ; TANAKA, TATSUHIDE ; NAKAMURA, YUKA ; KIKUTA, JUNICHI ; ISHII, MASARU ; YAMASHITA, TOSHIHIDE: Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. In: *Nature Neuroscience* Bd. 16 (2013), Nr. 5, S. 543–551
- VAILLANT, CATHERINE ; MONARD, DENIS: SHH pathway and cerebellar development. In: *Cerebellum* Bd. 8 (2009), Nr. 3, S. 291–301. — 00052
- VAN KANEGAN, MICHAEL J. ; HE, DONG NING ; DUNN, DENISE E. ; YANG, PEIYING ; NEWMAN, ROBERT A. ; WEST, ANNE E. ; LO, DONALD C.: BDNF mediates neuroprotection against oxygen-glucose deprivation by the cardiac glycoside oleandrin. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 34 (2014), Nr. 3, S. 963–968
- VARJOSALO, MARKKU ; TAIPALE, JUSSI: Hedgehog: functions and mechanisms. In: *Genes & Development* Bd. 22 (2008), Nr. 18, S. 2454–2472
- VÉLEZ-FORT, MATEO ; MALDONADO, PALOMA P. ; BUTT, ARTHUR M. ; AUDINAT, ETIENNE ; ANGULO, MARÍA CECILIA: Postnatal switch from synaptic to extrasynaptic transmission between interneurons and NG2 cells. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 30 (2010), Nr. 20, S. 6921–6929
- VIEHOVER, A. ; MILLER, R. H. ; PARK, S. K. ; FISCHBACH, G. ; VARTANIAN, T.: Neuregulin: an oligodendrocyte growth factor absent in active multiple sclerosis lesions. In: *Developmental Neuroscience* Bd. 23 (2001), Nr. 4–5, S. 377–386
- VOLPE, JOSEPH J.: Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. In: *Journal of Child Neurology* Bd. 24 (2009a), Nr. 9, S. 1085–1104. — 00098 PMID: 19745085 PMCID: PMC2799249
- VOLPE, JOSEPH J: The encephalopathy of prematurity–brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. In: *Semin Pediatr Neurol* Bd. 16 (2009b), Nr. 4, S. 167–178
- VONDRAN, MELISSA W. ; CLINTON-LUKE, PATRICIA ; HONEYWELL, JEAN Z. ; DREYFUS, CHERYL F.: BDNF +/- Mice Exhibit Deficits in Oligodendrocyte Lineage Cells of the Basal Forebrain. In: *Glia* Bd. 58 (2010), Nr. 7, S. 848–856
- VOOGD, J ; GLICKSTEIN, M: The anatomy of the cerebellum. In: *Trends Neurosci.* Bd. 21 (1998), Nr. 9, S. 370–375. — 00467 PMID: 9735944
- WALLACE, V. A.: Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. In: *Current biology: CB* Bd. 9 (1999), Nr. 8, S. 445–448
- WANG, SAMUEL S.-H. ; KLOTH, ALEXANDER D. ; BADURA, ALEKSANDRA: The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism. In: *Neuron* Bd. 83 (2014), Nr. 3, S. 518–532. — 00000 PMID: 25102558 PMCID: PMC4135479
- WANG, YAPING ; CHENG, XIAOXIN ; HE, QIAN ; ZHENG, YIYAN ; KIM, DONG H. ; WHITTEMORE, SCOTT R. ; CAO, QILIN L.: Astrocytes from the contused spinal cord inhibit oligodendrocyte differentiation of adult oligodendrocyte precursor cells by increasing the expression of bone morphogenetic proteins. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 31 (2011), Nr. 16, S. 6053–6058

- WANG, ZHEN ; COGNATO, HOLLY ; FRENCH-CONSTANT, CHARLES: Contrasting effects of mitogenic growth factors on myelination in neuron-oligodendrocyte co-cultures. In: *Glia* Bd. 55 (2007), Nr. 5, S. 537–545
- WATT, ALANNA J. ; CUNTZ, HERMANN ; MORI, MASAHIRO ; NUSSER, ZOLTAN ; SJÖSTRÖM, P. JESPER ; HÄUSSER, MICHAEL: Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. In: *Nature Neuroscience* Bd. 12 (2009), Nr. 4, S. 463–473
- WEBER, BRUNO ; BARROS, L. FELIPE: The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* Bd. 7 (2015), Nr. 12
- WECHSLER-REYA, R. J. ; SCOTT, M. P.: Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. In: *Neuron* Bd. 22 (1999), Nr. 1, S. 103–114. — 00960
- WECHSLER-REYA, ROBERT J.: Analysis of gene expression in the normal and malignant cerebellum. In: *Recent Progress in Hormone Research* Bd. 58 (2003), S. 227–248
- WELKER, W. I.: The significance of foliation and fissuration of cerebellar cortex. The cerebellar folium as a fundamental unit of sensorimotor integration. In: *Archives Italiennes De Biologie* Bd. 128 (1990), Nr. 2–4, S. 87–109
- WHITE, JOSHUA J ; SILLITOE, ROY V: Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. In: *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* Bd. 2 (2013), Nr. 1, S. 149–164. — 00008  
PMID: 23799634
- WILSON, HEATHER C. ; ONISCHKE, CLAUS ; RAINE, CEDRIC S.: Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. In: *Glia* Bd. 44 (2003), Nr. 2, S. 153–165. — 00082  
PMID: 14515331
- XIAO, JUNHUA ; WONG, AGNES W. ; WILLINGHAM, MELANIE M. ; VAN DEN BUUSE, MAARTEN ; KILPATRICK, TREVOR J. ; MURRAY, SIMON S.: Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. In: *Neuro-Signals* Bd. 18 (2010), Nr. 3, S. 186–202
- XU, HAIWEI ; YANG, YANG ; TANG, XIAOTONG ; ZHAO, MEINA ; LIANG, FUCHENG ; XU, PEI ; HOU, BAOKE ; XING, YAN ; BAO, XIAOHANG ; U. A.: Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. In: *Molecular Neurobiology* Bd. 47 (2013), Nr. 2, S. 833–844
- YACUBOVA, ELINA ; KOMURO, HITOSHI: Intrinsic program for migration of cerebellar granule cells in vitro. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 22 (2002), Nr. 14, S. 5966–5981
- YAMADA, KEIKO ; WATANABE, MASAHIKO: Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. In: *Anatomical Science International* Bd. 77 (2002), Nr. 2, S. 94–108
- YEO, YEE ANDY ; MARTÍNEZ GÓMEZ, JULIA M. ; CROXFORD, J. LUDOVIC ; GASSER, STEPHAN ; LING, ENG-ANG ; SCHWARZ, HERBERT: CD137 ligand activated microglia induces oligodendrocyte apoptosis via reactive oxygen species. In: *Journal of Neuroinflammation* Bd. 9 (2012), S. 173
- YU, TIAN ; YAGUCHI, YUICHIRO ; ECHEVARRIA, DIEGO ; MARTINEZ, SALVADOR ; BASSON, M. ALBERT: Sprouty genes prevent excessive FGF signalling in multiple cell types throughout development of the cerebellum. In: *Development (Cambridge, England)* Bd. 138 (2011), Nr. 14, S. 2957–2968

- YUASA, S. ; KAWAMURA, K. ; ONO, K. ; YAMAKUNI, T. ; TAKAHASHI, Y.: Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. In: *Anatomy and Embryology* Bd. 184 (1991), Nr. 3, S. 195–212
- YUEN, TRACY J. ; SILBEREIS, JOHN C. ; GRIVEAU, AMELIE ; CHANG, SANDRA M. ; DANEMAN, RICHARD ; FANCY, STEPHEN P. J. ; ZAHED, HENGAMEH ; MALTEPE, EMIN ; ROWITCH, DAVID H.: Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. In: *Cell* Bd. 158 (2014), Nr. 2, S. 383–396
- ZAQOUT, SAMI ; KAINDL, ANGELA M.: Golgi-Cox Staining Step by Step. In: *Frontiers in Neuroanatomy* Bd. 10 (2016), S. 38
- ZHANG, Y. ; PARDRIDGE, W. M.: Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. In: *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* Bd. 32 (2001), Nr. 6, S. 1378–1384
- ZONOUZI, MARZIEH ; SCAFIDI, JOSEPH ; LI, PEIJUN ; MCELLIN, BRIAN ; EDWARDS, JORGE ; DUPREE, JEFFREY L. ; HARVEY, LLOYD ; SUN, DANDAN ; HÜBNER, CHRISTIAN A. ; U. A.: GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. In: *Nat. Neurosci.* Bd. 18 (2015), Nr. 5, S. 674–682. — 00000
- PURVES, D. ; WILLIAMS, S. M. (Hrsg.): *Neuroscience*. 2nd ed. Aufl. Sunderland, Mass : Sinauer Associates, 2001 — ISBN 978-0-87893-742-4
- RUDOLPH, C. D. (Hrsg.): *Rudolph's pediatrics*. 21st ed. Aufl. New York : McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2003 — ISBN 978-0-8385-8285-5
- SHEPHERD, G. M. (Hrsg.): *The synaptic organization of the brain*. 5th ed. Aufl. Oxford ; New York : Oxford University Press, 2004 — ISBN 978-0-19-515955-4
- KANDEL, E. R. (Hrsg.): *Principles of neural science*. 5th ed. Aufl. New York : McGraw-Hill, 2013 — ISBN 978-0-07-139011-8
- WHO | *Preterm birth*. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>. - abgerufen am 2016-09-09. — WHO

## 12 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MRT Aufnahme eines Gehirns .....	9
Abbildung 2: Aufbau des Kleinhirns .....	10
Abbildung 3: Querschnitt durch die reife Kleinhirnrinde und durch die weiße Substanz des Kleinhirns .....	12
Abbildung 4: Wachstum des Kleinhirns ab der 20. Schwangerschaftswoche.....	13
Abbildung 5: Die Reifung von Oligodendrozyten .....	15
Abbildung 6: Reifung und Migration von Körnerzellen in der Kleinhirnrinde.....	16
Abbildung 7: Die Phasen der dendritischen Entwicklung von Purkinjezellen .....	18
Abbildung 8: SHH-Signalweg .....	19
Abbildung 9: Wachstum des unreifen Kleinhirns bei Nagern .....	22
Abbildung 10: Schematische Darstellung der erhöhten Sauerstoffexposition .....	23
Abbildung 11: Volumenbestimmung des Kleinhirns mittels MRT.....	41
Abbildung 12: Oxidativer Stress im Kleinhirn nach Hyperoxie.....	42
Abbildung 13: Erhöhter Zelltod von OPCs nach Hyperoxie.....	43
Abbildung 14: Hyperoxie vermindert die Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. ....	44
Abbildung 15: Verminderte Reifung von Oligodendrozyten nach erhöhter Sauerstoffexposition.....	45
Abbildung 16: Hyperoxie hemmt die Expression von MBP.....	46
Abbildung 17: Gestörte Myelinisierung nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	47
Abbildung 18: Die Expression von astrozytären Markern nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	49
Abbildung 19: Hyperoxie vermindert die Expression von Wachstumsfaktoren in Astrozyten .....	51
Abbildung 20: Aktivität von Mikroglia nach erhöhter Sauerstoffexposition .....	53
Abbildung 21: Erhöhter Zelltod von unreifen Neuronen nach Hyperoxie .....	55
Abbildung 22: Hyperoxie stört die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen .....	56
Abbildung 23: Fehlsteuerung der neuronalen Proliferation nach erhöhter Sauerstoffexposition.....	57
Abbildung 24: Postnatale Hyperoxie hat keinen Einfluss auf die Migration von Körnerzellen.....	58
Abbildung 25: Verminderte Expression von neuronalen Markern nach Hyperoxie .....	60
Abbildung 26: Hyperoxie reduziert die Expression von SHH in Purkinjezellen .....	61
Abbildung 27: Kein Unterschied in der Anzahl von Purkinjezellen nach Hyperoxie .....	62
Abbildung 28: Verzögerter Auswuchs von Dendriten nach erhöhter Sauerstoffexposition.....	64
Abbildung 29: Hyperoxie stört die Verzweigung von Purkinjezellendriten .....	65
Abbildung 30: Verminderte GABA-Synthese von Purkinjezellen nach Hyperoxie .....	66
Abbildung 31: Regulatorische Aktivität der Purkinjezellen .....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	25
Tabelle 2: Software.....	26
Tabelle 3: Verbrauchsmittel .....	26
Tabelle 4: Chemikalien .....	27
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 6: Enzyme.....	29
Tabelle 7: Primer und Sonden für die quantitative Real Time PCR.....	29
Tabelle 8: Primer der Standard-PCR.....	30
Tabelle 9: Primäre Antikörper .....	30

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper.....	31
Tabelle 11: Kits .....	32
Tabelle 12: Pipettierschema der Standard-PCR .....	33
Tabelle 13: Standard-PCR.....	34

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
BDNF	Gehirn stammender neurotrophe Faktor (Brain-derived neurotrophic factor)
BG	Bergmann-Glia
BMP	Knochenmorphogenetisches Proteine (Bone morphogenetic protein)
BSA	Bovine Serum Albumin
CALB1	Calbindin 1
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CASP3	Cleaved Caspase 3
CCND2	CyclinD2
cDNA	komplementäre DNA
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin
DHH	Desert-Hedgehog
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
EGL	Äußere Körnerzellschicht (external granular layer)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren 2 (Fibroblast growth factor 2)
FKS	Fetales Kälberserum
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure (gamma-Aminobutyric acid)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Körnerzelle (granul cell)
GCP	Körnervorläuferzelle (granule cell precursor)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein)
GLAST	Glutamat-Aspartattransporter
GS	Glutamin-Synthetase
h	Stunden
HES1	Hairy und Enhancer von split-1
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IBA1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IGF1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (Insulin-like growth factor 1)
IGL	Innere Körnerzellschicht (internal granular layer)
IHC	Fluoreszenz- Immunhistochemie
IHH	Indian hedgehog

IN	Interneurone
kDa	Kilodalton
Ki67	Kiel67
m	Meter
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MBP	Myelin-Basische Protein
miRNA	Micro RNA
min	Minuten
ML	Die molekulare Schicht (Molecular Layer)
MRT	Magnetresonanztomographie
NG2	NG2 Proteoglycan
NGF	Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT-3	Neurotrophin 3
OL	Oligodendrozyt
OPC	Vorläuferzelle der Oligodendrozyten (oligodendrocyte precursor cell)
P	Postnataler Tag
PAX6	Paired box protein Pax-6
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PC	Purkinje Zelle (Purkinje cell)
PCL	Purkinjezell-Schicht
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCP2	Purkinje-Zell-Protein 2 (Purkinje cell protein 2)
PCP4	Purkinje-Zell-Protein 4 (Purkinje cell protein 4)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFA	Platelet-derived growth factor A
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PROX1	Prospero Homeobox Protein 1
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
qPCR	Quantitative Real Time PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RL	Rhombische Lippe
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
SHH	Sonic hedgehog
SLC1A6	SLC-Transporter 1 Mitglied 6 (Solute Carrier Family 1 Member 6)
SMO	SMOOTHENED
SSW	Schwangerschaftswoche
SUFU	Suppressor of fused homolog
TBR2	T-box brain protein 2 (Eomes)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
VTN	Vitronectin

VZ                                      Ventrikuläre Zone  
 ZNS                                     Zentrales Nervensystem

### Publikationsliste

**Scheuer T**, Sharkovska Y, Tarabykin V, Marggraf K, Brockmöller V, Bühner C, Endesfelder S, Schmitz T. Neonatal Hyperoxia Perturbs Neuronal Development in the Cerebellum. *Mol Neurobiol*. 2017 May 25. [Epub ahead of print]

Brill C, **Scheuer T**, Bühner C, Endesfelder S, Schmitz T. Oxygen impairs oligodendroglial development via oxidative stress and reduced expression of HIF-1 $\alpha$ . *Sci Rep*. 2017 Feb 23;7:43000.

Endesfelder S, Weichert U, Strauß E, Schlör A, Sifringer M, **Scheuer T**, Bühner C, Schmitz T. Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 18;18(1).

**Scheuer T**, Brockmöller V, Blanco Knowlton M, Weitkamp JH, Ruhwedel T, Mueller S, Endesfelder S, Bühner C, Schmitz T. Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline. *Glia*. 2015 Oct;63(10):1825-39.

Schmitz T, Krabbe G, Weikert G, **Scheuer T**, Matheus F, Wang Y, Mueller S, Kettenmann H, Matyash V, Bühner C, Endesfelder S. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Exp Neurol*. 2014 Apr;254:153-65.

Ibrahim DM, Hansen P, Rödelberger C, Stiege AC, Doelken SC, Horn D, Jäger M, Janetzki C, Krawitz P, Leschik G, Wagner F, **Scheuer T**, Schmidt-von Kegler M, Seemann P, Timmermann B, Robinson PN, Mundlos S, Hecht J. Distinct global shifts in genomic binding profiles of limb malformation-associated HOXD13 mutations. *Genome Res*. 2013 Dec;23(12):2091-102.

### Posterbeiträge

#### **XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Bilbao | July 15 - 18, 2015:**

Postnatal hyperoxia affects OPC and GCP proliferation

**T. Scheuer**, V. Brockmöller, K. Marggraf, C. Bühner, S. Endesfelder, T. Schmitz

#### **BNF 2014 Berlin Neuroscience Forum | June 12 - 13, Congress Hotel Liebenwalde**

HYPEROXIA IMPAIRS POSTNATAL GRANULE CELL DEVELOPMENT IN THE CEREBELLUM

**Scheuer, T.**; Marggraf, K.; Bühner, C.; Endesfelder, S.; Schmitz, T