

Die Entwicklung der weißen Substanz des Kleinhirns als instruktive Nische für GABAerge Interneurone

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anne Christin Ulrike Groteklaes

aus Heidelberg

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Karl Schilling
2. Gutachter*in: Prof. Dr. Torsten Pietsch

Tag der Mündlichen Prüfung: 29. August 2022

Aus dem Institut für Anatomie
Direktor*in: Prof. Dr. med. Karl Schilling

Meiner Familie und meinen Freunden gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Deutsche Zusammenfassung	8
1.1 Einleitung	8
1.1.1 Fragestellung	10
1.2 Material und Methoden	11
1.3 Ergebnisse	12
1.4 Diskussion	23
1.5 Zusammenfassung	30
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	31
2. Veröffentlichung	39
Abstract	39
Introduction	39
Materials and Methods	40
Results	40
Discussion	51
Conclusion	57
References	60
3. Danksagung	62

Abkürzungsverzeichnis

CNP-1 = cyclische Nucleotidphosphatase 1

DAB = Diamminobenzidin

DCN = deep cerebellar nuclei (tiefe Kerne des Cerebellums)

EGL = external granular layer (stratum granulosum externum, äußere Körnerzellschicht)

GC = granule cell = Körnerzelle

GFAP = saures Gliafasernprotein (glial fibrillary acid protein)

GFP = grün fluoreszierendes Protein

Iba-1 = ionisierendes Calcium bindendes Adaptermolekül 1

IGL = internal granular layer (stratum granulosum internum, innere Körnerzellschicht)

IN = Interneurone

MBP = basisches Myelinprotein (myelin basic protein)

mM = millimolar

ML = molecular layer (stratum moleculare, Molekularschicht)

P0, P4, P6, P8, P15, P28 = postnataler Tag 0, 4, 6, 8, 15, 28 (0, 4, 6, 8, 15, 28 Tage alte Mäuse)

P75 NTR = P75-Neurotrophin Rezeptor

Pax-2 = paired box gene 2

Pax-2-Zellen = in der Pax2-GFP-Maus (Pfeffer et al., 2002) Pax-2-exprimierende, GFP-markierte kleine, migrierende Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone des Cerebellums; die großen, stationären, ebenfalls Pax-2-GFP-positiven Golgi-Zellen werden von mir nicht als Pax-2 Zellen bezeichnet.

PCL = Purkinje cell layer (Purkinjezellschicht)

PH3 = Phosphohiston H 3

SHH = sonic hedgehog

VMS = velum medullare superius

WM = white matter(weiße Substanz)

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

In der Entwicklung und Differenzierung des zentralen Nervensystems sowie in der Erforschung von Neuroplastizität und neuronalen Stammzellen stellt das Kleinhirn eine besonders interessante Region dar, da wesentliche Schritte seiner Reifung erst postnatal erfolgen. Die inhibitorischen Interneurone (IN) des Kleinhirns sind ein besonders interessantes Modell, um Mechanismen der neuronalen Differenzierung zu untersuchen. Diese Zellen werden postnatal in der cerebellären weißen Substanz (WM) geprägt und können sich unter deren Einfluss sogar umdifferenzieren (Leto et al., 2009; Leto et al., 2010). Die Intention meiner Arbeit bestand darin, die als „instruktive Nische“ fungierende WM des sich entwickelnden Kleinhirns zu charakterisieren, um so die Mechanismen, die zu dieser außergewöhnlichen postnatalen Differenzierung führen, tiefer zu ergründen.

Die Entwicklung des Kleinhirnes geht von einer neuroepithelialen Wulst am kranialen Rand des Metencephalons aus. Dabei ist die Rautenlippe (labia rhombencephalica), aus welcher alle glutamergen Neurone des Kleinhirns hervorgehen, von der ventrikulären Zone (VZ) abzugrenzen, welcher alle GABAergen Neurone, sowohl Purkinje Zellen als auch verschiedenste inhibitorische IN, entstammen (Alder et al., 1996; Beckinghausen und Sillitoe, 2019). Von allen Zellen des Kleinhirns ist die Entwicklung dieser inhibitorischen IN trotz der Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte wahrscheinlich die am wenigsten ergründete (Carletti und Rossi, 2009; Leto et al., 2016 a; Leto et al., 2016 b; Sotelo, 2015). Die Vorläufer der inhibitorischen IN wandern auf ihrem Weg von der ventrikulären Zone zu ihren definitiven Positionen durch die sich entwickelnde WM der Kleinhirnanlage (Abb. 1). Erst während ihres Transits durch die entstehende WM wird der Phänotyp, und damit auch die endgültige Lokalisation der IN in den tiefen Kleinhirnkernen (DCN) oder den verschiedenen Schichten des cerebellären Cortex festgelegt. Die WM instruiert also die migrierenden Vorläuferzellen durch bisher nicht bekannte Mechanismen zur Differenzierung in ihren endgültigen Phänotyp und reguliert zudem ihre mitotische Aktivität (Fink et al., 2006; Leto et al., 2016 a; Schilling, 2013; Sotelo, 2015; Weisheit et al., 2006).

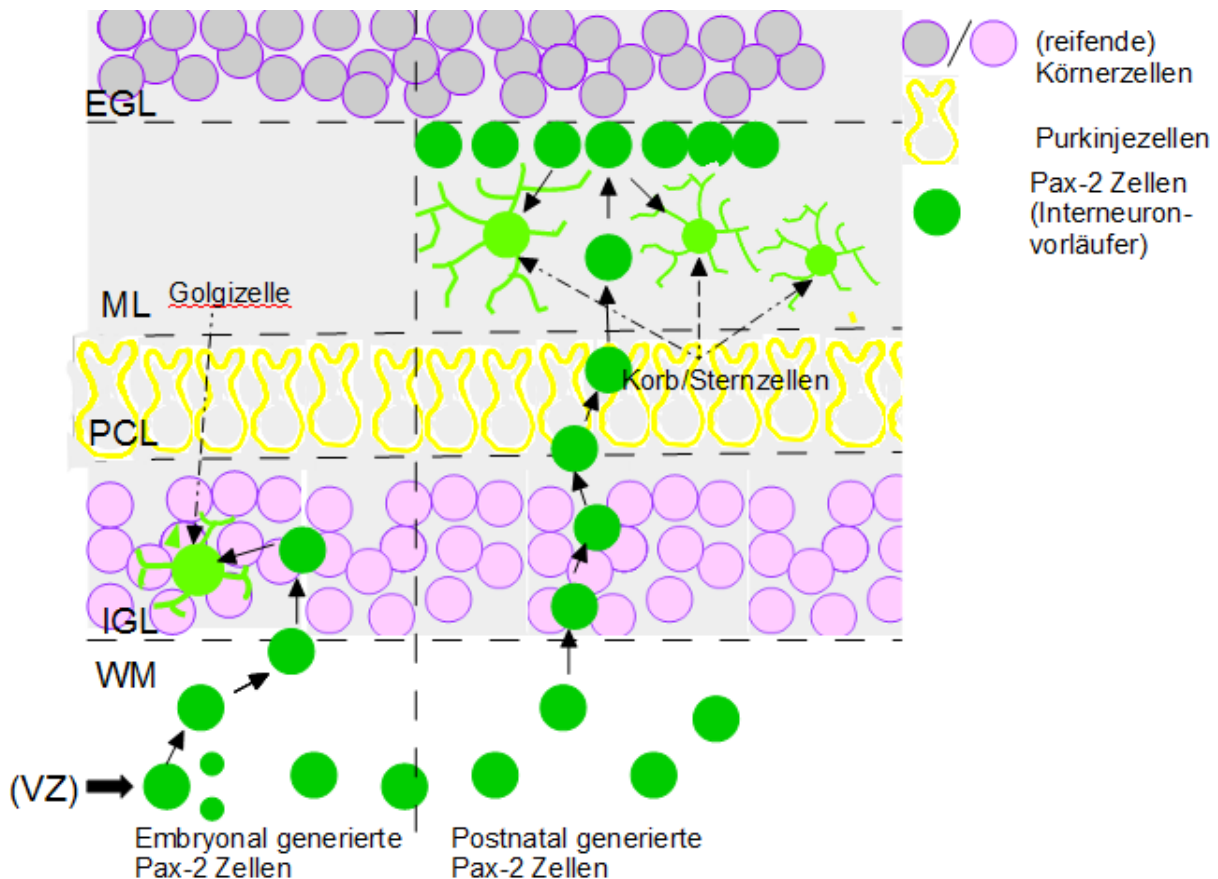


Abb. 1: Migration der IN-Vorläuferzellen, die Pax2 exprimieren und deshalb auch als „Pax-2-Zellen“ bezeichnet werden, migrieren von der VZ aus weitgehend tangential in die entstehende cerebelläre WM. Von dort aus migrieren sie radial in den Kortex und differenzieren sich je nach Zeitpunkt ihrer Migration zu jeweils schichtspezifischen IN. So werden beispielsweise embryonal generierte Pax-2 Zellen zu Golgizellen in der IGL. Die WM dient dabei, wie in heterochronischen Transplantationsstudien (Leto et al., 2009) beschrieben, als „instruktive Nische“, welche die Differenzierung der Pax-2 Zellen auch postnatal umprogrammieren kann. So differenzieren sie sich zu IN der tiefen Kerne (DCN), Golgizellen der inneren Körnerzellschicht (IGL) oder Korb- und Sternzellen der Molekularschicht (ML).

Heterochronische Transplantationsstudien von Leto et al. (2009) konnten eindrücklich belegen, dass die Differenzierung der IN von deren Migration durch die WM abhängt. Sie beobachteten, dass transplantierte Vorläuferzellen sich nicht etwa zu den Zellen entwickelten, zu denen sie im Spendertier zum Zeitpunkt der Explantation geworden wären, sondern zu denen, zu denen sich auch die eigenen Vorläuferzellen des Empfängertieres zum Implantationszeitpunkt entwickelten.

Während der Migration von der ventrikulären Zone durch diese instruktive Nische teilen sich die Vorläuferzellen und beginnen, Pax-2 zu exprimieren (Maricich und Herrup, 1999; Zhang und Goldman, 1996). Die Expression von Pax-2 beginnt etwa zum

Zeitpunkt der letzten Mitose der IN-Vorläuferzellen, die meist perinatal abgeschlossen wird, und Pax-2 ist ein spezifischer Marker der unreifen IN-Vorläuferzellen (Miale und Sidman, 1961; Weisheit et al., 2006). Diese Pax-2-Vorläuferzellen, im weiteren Pax-2-Zellen genannt, zeigen eine bislang einzigartige Differenzierungsfähigkeit und -plastizität (Leto et al., 2009; Leto et al., 2016 b; Schilling, 2013): Sie bleiben bis in die spät postnatale Entwicklungszeit hinein multipotent und können sich je nach Einflüssen der instruktiven Nische in verschiedene Zelltypen differenzieren (Leto et al., 2010).

Pax-2-Zellen können ab dem Embryonaltag 12,5 bis zum Ende der 2. postnatalen Woche in der sich entwickelnden WM gefunden werden (Maricich und Herrup, 1999). In diesem Zeitraum ist die WM selbst eine sich dynamisch verändernde Umgebung für die migrierenden Pax-2-Zellen, denen sie als instruktive Nische dient: Während sich afferente Verbindungen (Kletter- und Moosfasern) sowie efferente Axone von Purkinje Zellen und aus den tiefen Kernen formen und reifen, wandelt sich u.a. auch die Zusammensetzung und Differenzierung von Mikro- und Makroglia in der entstehenden WM (Araujo et al., 2019; Cerrato und Buffo, 2019; Curtis et al., 1988; Perez-Pouchoulen et al., 2015; Vela et al., 1995).

1.1.1 Fragestellung

Bisher wurden diese kaum erforschten Veränderungen der sich entwickelnden WM noch nicht in direkten Zusammenhang mit ihrer Funktion als instruktive Nische für die Entwicklung der GABAergen Interneurone gebracht. Daher leitete ich vor dem hier skizzierten Hintergrund die Fragestellung ab, wie sich die Zusammensetzung und Differenzierung der WM in der frühen postnatalen Periode verändert; dem Zeitraum, in welchem diese als instruktive Nische für Pax-2-Zellen dient, und in welchem Zusammenhang diese Veränderungen zu der Entwicklung der Pax-2-Zellen stehen. Dazu untersuchte ich immunhistochemisch die Kleinhirne von 0, 4, 6, 8, 15 und 28 Tage alten (im weiteren P0, P4, P6, P8, P15, P28) sowie adulten Mäusen, welche das Pax-2-GFP-Fusionsgen exprimierten. Damit soll diese Arbeit durch eine Charakterisierung der sich entwickelnden cerebellären WM Grundlagen für die weitere Suche nach Faktoren, die zur außergewöhnlichen Differenzierungsfähigkeit cerebellärer IN dienen, liefern.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Versuchstierhaltung, Gewebeaufbereitung und Färbungen

Die experimentelle Auswertung basiert auf Kleinhirngewebe von C57BL/6 Wildtyp Mäusen und transgenen C57BL/6 Mäusen, die ein Pax-2 GFP Fusionsprotein exprimieren (BAC Linie 30, siehe Pfeffer et al., 2002; Weisheit et al., 2006). Die Versuchstierhaltung erfolgte nach strenger Befolgung des gültigen Tierschutzrechtes und der Richtlinien örtlicher Aufsichtsbehörden (Direktive 2010/63/EU des Europäischen Parlaments, Tierversuchsantrag Aktenzeichen 84-02.04.2017.A120). Die Genotypisierung der Mäuse führte ich anhand der DNA von Schwanzbiopsien mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion durch. Details zur Gewebsgewinnung, Aufarbeitung und immunzytochemischen Färbung finden sich in der Originalarbeit, auf der die vorliegende Dissertation basiert. Hier sei nur kurz erwähnt, dass ich Gehirne von Mäusen in unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstadien (vom Tag der Geburt bis zur 4. Postnatalwoche sowie von erwachsenen Tieren) in Formalin fixierte, in Paraffin einbettete und anschließend 10 µm dicke Sagittalschnitte des Cerebellums anfertigte. Zum Nachweis von Astrozyten wurden die Schnitte anschließend mit Antikörpern gegen GFAP immungefärbt. Zum Nachweis von Oligodendrocyten nutzte ich Antikörper gegen CNP-1 und MBP. Zum Nachweis von Mikroglia nutze ich Iba-1-Antikörper. Mitotische Zellen wies ich mit Phosphohiston H 3 nach. Zum Nachweis der Pax-2-Zellen nutze ich Pax-2- und GFP- Antikörper. Als Zielstruktur für sonic-hedgehog-Signalwege färbte ich die Schnitte mit p75-NGF-Rezeptor-Antikörpern gegen. Neben dem Nachweis durch Immunofluoreszenz wies ich Antikörper auch mittels des Peroxidasdetektionssystemes nach. In jeder Färbereihe führte ich mindestens 2 Negativkontrollen durch, um unspezifische Reaktionen auszuschließen. Für jedes verwendete Antigen und jedes Alter wertete ich Schnitte von mindestens 3 verschiedenen Tieren und mindestens 4 Schnitte pro Tier aus.

1.3.2 Mikroskopie und fotografische Dokumentation

Mittels eines Axioskopes (Zeiss, Jena, Deutschland), ausgestattet mit einem Plan Neofluar x 2,5, NA 0,075, einem Plan Apochromat x 10, NA 0,3 und einem Plan Neofluar x 20, NA 0,5, nahm ich Fluoreszenzbilder auf. Dazu nutze ich eine Cool snap

Kamera (Visitron systems, Puchheim, Deutschland, Auflösung 1392x1040 Pixel) und die Axiovision software (Zeiss, Jena, Deutschland, Release 4.82). Zur Aufnahme der mit der Avidin-Biotin-Methode gefärbten Schnitte nutze ich ein Nikon Mikroskop (ECLIPSE Ni, Nikon, Tokyo) mit unterschiedlichen Objektiven (10x Objektiv NA 0,25) und dazugehöriger Kamera (DS-Fi2, 2560x1920 Pixel), sowie Software (NIS-Elements D). Die Bildzusammenstellung führte ich mit Adobe Photoshop durch. Dabei wurden lediglich Kontrast und Helligkeit linear angepasst. Weitere Bildmanipulationen wurden nicht vorgenommen.

1.3.3 Semiquantitative Dichteanalyse

Um bei der Färbung für P75^{NTR} zuverlässig zwischen Immunsignal und unspezifischer Hintergrundfärbung zu unterscheiden, unternahm ich eine semiquantitative Dichteanalyse mit R. Dabei nutze ich die streng schichtweise Anordnung der Zellen im cerebellären Kortex, um die Fluoreszenzintensität in der bekanntermaßen P75^{NTR+} EGL und der sicher P75^{NTR-} IGL semiquantitativ zu erfassen. Ich erstellte je Aufnahme mindestens 500 Linienscans der Kleinhirnrinde der Lobi 4 und 5 und mittelte die Färbungsintensität der Pixel entlang dieser Linie, sodass ein Profil der Färbungsintensität je nach Schicht und Marker entstand (ein Beispiel ist in Abb. 14 der zugrunde liegenden Publikation gezeigt).

1.4 Ergebnisse

Die Mehrzahl der im Folgenden gezeigten Bilder ergänzen die Abbildung in der Publikation, die dieser Dissertation zugrunde liegt. Wenn Teile von Abbildungen aus der Publikation hier zur besseren Darstellung übernommen wurden, ist dies ausdrücklich vermerkt.

1.4.1 Verteilung von Pax-2-positiven Vorläufern inhibitorischen Interneuronen im sich entwickelnden Cerebellum

Während an P0 Pax-2-positive Vorläufer inhibitorischer IN (Pax-2-Zellen) gleichmäßig im sich entwickelnden Cerebellum und dem velum medullare superius (VMS) - mit Ausnahme der EGL- verteilt waren (Abb. 2 a), konnte ich schon an Tag 4 regionale Unterschiede feststellen (Abb. 2 b). Diese verstärkten sich bis Tag 6, an welchem sich Pax-2-Zellen insbesondere in der WM befanden. Außerdem fand ich große Pax-2-Zellen

in der IGL (Abb. 1 c). Die Zahl der Pax-2-Zellen in der WM nahm danach ab, bis an Tag 15 nur noch vereinzelte Pax-2-Zellen in der WM zu finden waren (Abb.2 f). Dahingegen nahm die Zahl und Dichte von Pax-2-Zellen in in der IGL und in der ML von P6 zu P8 zu (Abb. 2 d).

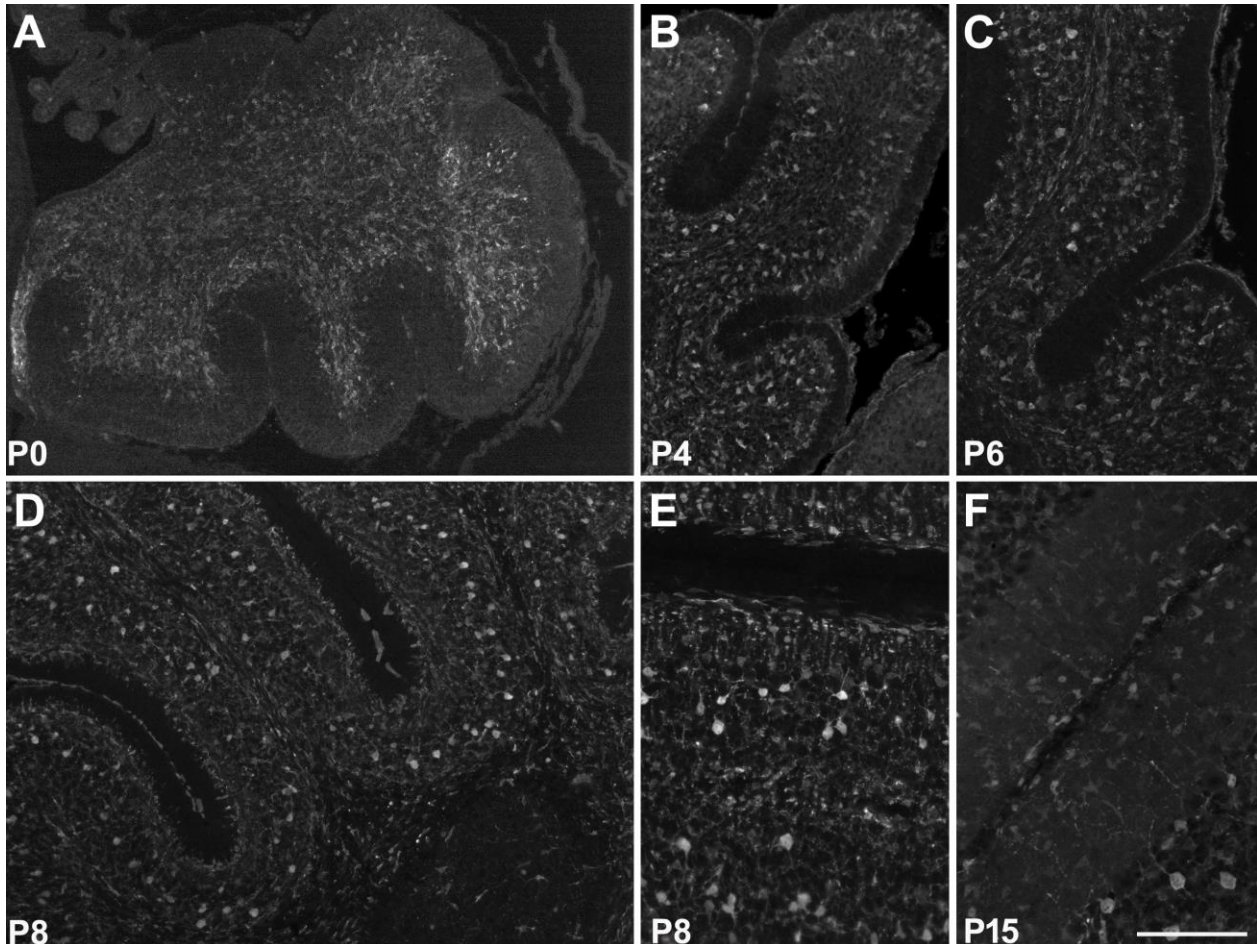


Abb. 2 Pax-2-Zellen im sich entwickelnden Cerebellum. Pax-2-Zellen sind ab P0 vor allem in der WM, aber auch in allen anderen cerebellären Schichten außer der EGL zu finden. An P8 und P15 ist ein eindrücklicher Gradient in der Anordnung der Pax-2-Zellen in der ML ersichtlich (E, F). Maßbalken = 210 μm für A, 160 μm für B, C und D; 80 μm für E und F. Das Teilbild 2 E wurde aus der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikation entnommen (dort Abb. 2 D).

An P8 waren Pax-2-Zellen durch die ganze ML verteilt, wobei ich stark gefärbte Pax-2-Zellen mit parallel zur Grenze zur EGL ausgerichteten Somata eher in der oberen ML fand, während in der inneren ML die Pax-2 Expression geringer war (Abb. 2 e). Dieser Effekt wurde an P15 verstärkt (Abb.2 f). Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass das mit der Migration der Körnerzellen in die IGL einhergehende Wachstum der ML zur zunehmenden Einbettung der Pax-2-Zellen in die ML führt; sodass die Distanz

der Pax-2-Zellen zur EGL zunimmt. Währenddessen differenzieren sich die Pax-2-Zellen zunehmend, wobei Pax-2 herunterreguliert wird. Somit finden sich undifferenzierte, stärker gefärbte Pax-2-Zellen näher an der EGL als schwächer gefärbte differenziertere Zellen, welche Pax-2 herunterreguliert haben und sich weiter innen in der ML befinden (Abb. 2 e, f). Eine genaue Beschreibung der von mir erhobenen Daten kann in den Abbildungen 1 und 2 meiner Originalpublikation gefunden werden.

1.4.2 Verteilung und Reifung cerebellärer Oligodendrocyten

Da CNP-1 von der frühen Entwicklung an bis ins adulte Alter in Oligodendrocyten exprimiert wird, nutzte ich CNP-1 zur Erkennung früh reifender Oligodendrocyten und deren Vorläuferzellen (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Braun et al., 1988; Yu et al., 1994). Außerdem nutze ich mit MBP ein ebenfalls myelinassoziertes Protein, welches 2-3 Tage nach CNP exprimiert wird, um die Verteilung und Reifung von Oligodendrocyten im Cerebellum zu untersuchen (Brunner et al., 1989; Reynolds und Wilkin, 1988).

1.4.2.1 Einwanderung und Verteilung von CNP-1 positiven Oligodendrocyten im sich entwickelnden Cerebellum

Während an P0 CNP-1-positive (im Folgenden: CNP-1⁺) Strukturen nur im Hirnstamm und nicht im Cerebellum sichtbar waren, konnte ich an P4 granulär erscheinende, CNP-1⁺ Elemente im VMS und rostralen Cerebellum darstellen, welche jedoch unreifer als die faserartigen CNP-1⁺ Strukturen im Hirnstamm imponierten (Abb. 3 a-b). An P6 hatten sich CNP-1⁺ Zellen (im Folgenden vereinfachend CNP-1⁺ Oligodendrocyten genannt) in der gesamten zentralen WM sowie bis in die Spitzen der WM der posterioren und der beiden anterioren Lobi und in die DCN verteilt (Abb. 3 c-d). Dahingegen konnte ich CNP-1⁺ Oligodendrocyten in den medialen Lobi überwiegend an deren Basis entdecken (Abb. 3 und 4 meiner Originalpublikation). Während CNP-1⁺ Oligodendrocyten in der zentralen WM eher granulär imponierten und keine einzelnen Zellen abgrenzbar waren, erschienen CNP-1⁺ positive Oligodendrocyten in der lobulären WM faserartig und reifer (Abb. 3 c).

An P8 waren CNP-1⁺ Oligodendrocyten in der gesamten cerebellären WM verteilt (Abb. 3 e-f) und zeigten größtenteils eine faserartige Morphologie. Einige CNP-1⁺ Fasern

konnten nun auch in der IGL gefunden werden, wo sie sich büschelartig verteilten (Abb. 3 f). Bis zu Tag 15 nahm die Zahl und Dichte von CNP-1⁺ Oligodendrocyten weiter zu. Nun konnte ich auch CNP-1⁺ Somata in der IGL finden, und CNP-1⁺ Fasern durchspannten radiär die gesamte IGL bis hin zur Purkinjezellschicht (Purkinje cell layer = PCL). CNP-1⁺ Somata in der äußeren IGL hingegen orientierten ihre Fortsätze parallel zur Grenze zwischen IGL und PCL (Abb.3 g-h). Bis ins adulte Alter nahm die Zahl und Dichte von CNP-1⁺ Oligodendrocyten im Cerebellum weiter zu, und ich fand sie in allen Schichten außer der ML (Abb. 4 meiner Originalpublikation).

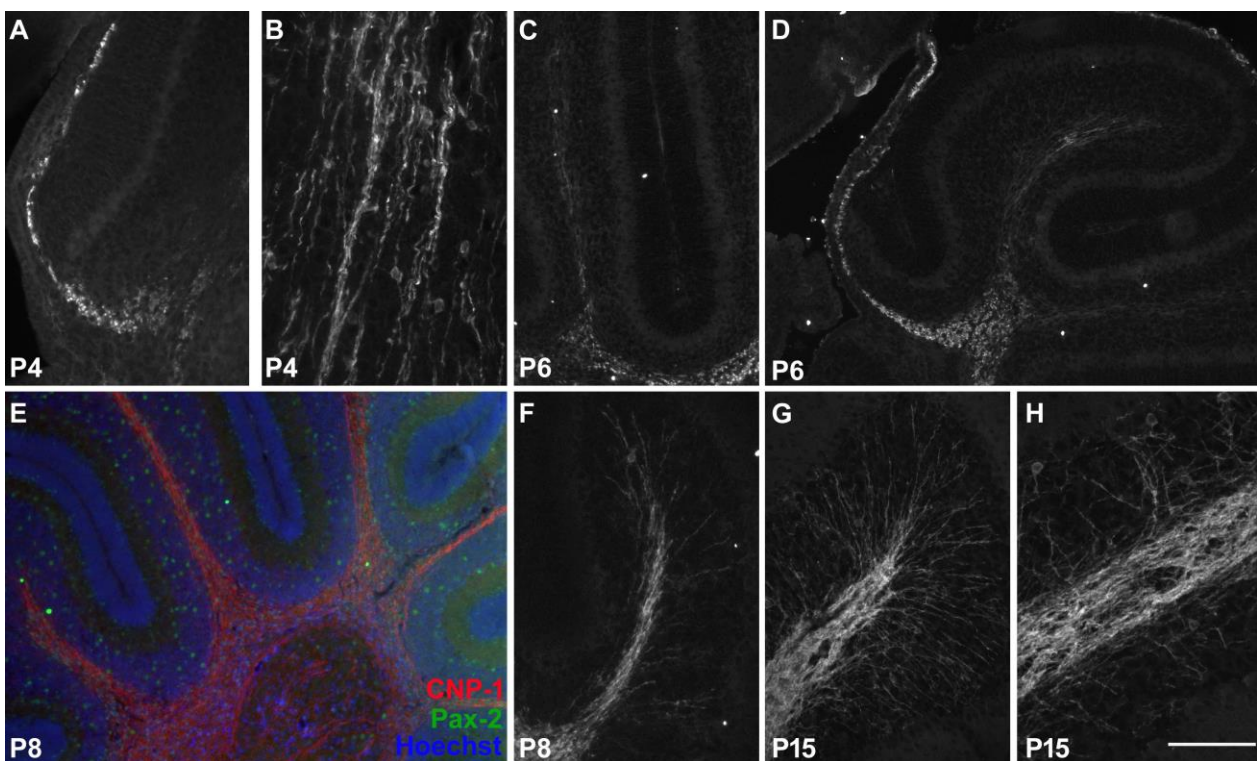


Abb. 3 CNP-1⁺ Oligodendrocyten im sich entwickelnden Cerebellum. An P4 liegen rundliche CNP-1⁺ Oligodendrocytenvorläufer im VMS(A) vor, während sie im Hirnstamm (B) bereits faserartig erscheinen. Oligodendrocyten verbreiten sich weiter in der WM an P6 (C, D) und bis in die IGL an P8 (E,F). An P8 liegen CNP-1⁺ Oligodendrocyten und Pax-2-Zellen in der WM vermischt vor (E). An P15 durchspannen CNP-1⁺ Oligodendrocyten die gesamte IGL bis in die lobulären Spitzen (G) und haben auch Somata in die IGL verlagert (H). Maßstabballen 160 μ m für A, C-H und 80 μ m für B. Die Teilbilder 3 A und 3 D wurden aus der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikation entnommen (dort Abb. 3 A und C)

1.4.2.2 Expression von Myelinbasischemprotein (MBP) im sich entwickelnden Cerebellum

Während an P0 MBP-positive (im Folgenden: MBP⁺) Strukturen weder im Hirnstamm noch im Cerebellum sichtbar waren, konnte ich an P4 vereinzelte, punktförmige MBP⁺ Zellen im VMS beobachten, während im Cerebellum selbst keinerlei MBP⁺-Strukturen zu finden waren (Abb. 4 a). Im Hirnstamm hingegen wies ich an P4 stark MBP-gefärbte Strukturen nach (Abb. 4 b). An P6 fand ich viele MBP⁺, eher rundliche Oligodendrocyten im VMS und in der zentralen cerebellären WM sowie deren Übergang in die Lobi (Abb. 4 c).
c).

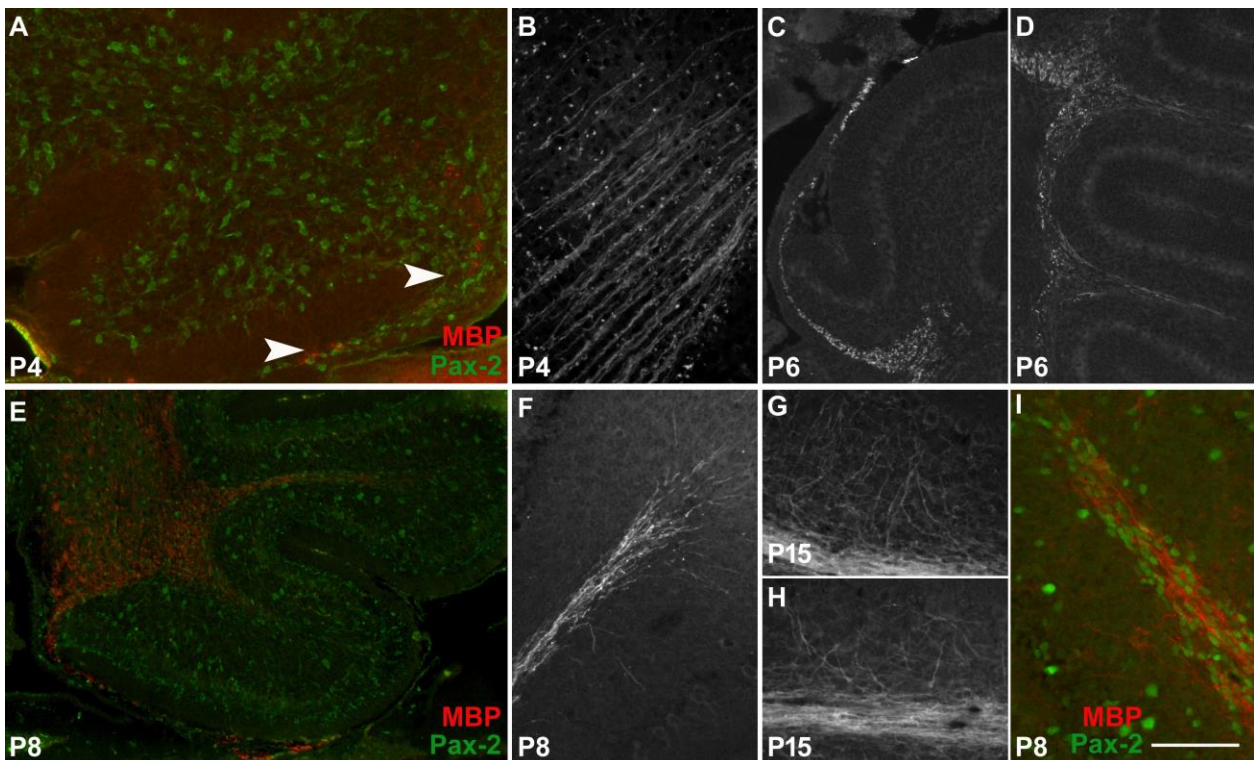


Abb. 4 Verteilung von MBP⁺ Zellen im sich entwickelnden Cerebellum. An P4 sind nur vereinzelte MBP⁺ Strukturen im VMS zu finden (A, Pfeile), während im Hirnstamm bereits faserartige MBP⁺ Strukturen vorliegen (B). Über P6 (C, D) verteilen sich MBP⁺ Oligodendrocyten bis P8 (E, F, I) in der gesamten WM und liegen vermischt mit Pax-2 Zellen vor (I, Detailaufnahme aus Lobus 4). An P15 konnte ich MBP⁺ Zellen in der gesamten proximalen lobulären IGL nachweisen (G), distal jedoch nur in der inneren IGL (H). Maßstabbalken 80 µm für A, F-I und 160 µm für B-E. Die Teilbilder 4 F, 4 G, 4 H und 4 I wurden aus der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikation entnommen (dort Abb. 5 F, 6 C, 6 D und 7 D).

Dahingegen fanden sich in der lobulären WM nur vereinzelte MBP⁺ Zellen (Abb. 4 d), welche faserartig und somit reifer imponierten. Bis P8 hatten sich MBP⁺

Oligodendrocyten in der gesamten WM und den DCN verteilt (Abb. 4 e). Während ich in den posterioren Lobi MBP⁺ Oligodendrocyten bis in die Spitze der WM und vereinzelt in der IGL fand (Abb. 3 f), waren in den anterioren Lobi MBP⁺ Zellen weder in den Spitzen der WM noch in der IGL zu finden (Abb. 4 e). Alle MBP⁺ Oligodendrocyten an P8 zeigten eine faserartige und somit reifere Morphologie. Verglichen mit P8 fanden sich an P15 deutlich mehr MBP⁺Oligodendrocyten (Abb. 4 g-h). Auch in der IGL wies ich nun viele MBP⁺ Oligodendrocyten nach, wobei diese im proximalen Bereich der Lobi bis in die PCL reichten (Abb. 4 g), sich distal jedoch vor allem auf die innere IGL begrenzten (Abb. 4 h). Sie zeigten ebenso wie CNP-1⁺Oligodendrocyten eine büschelartige Verteilung. Bis ins adulte Alter nahm die Zahl und Dichte MBP⁺ Oligodendrocyten in allen cerebellären Schichten außer der ML zu. Eine genauere Abbildung meiner Ergebnisse ist in den Abb. 3-7 meiner Originalpublikation zu finden.

1.4.2.3 Verteilung von CNP1/MBP⁺ Oligodendrocyten in Relation zu der von Pax-2-Zellen

Vergleiche zwischen der Verteilung von Oligodendrocyten und Pax-2-Zellen habe ich detailliert in den Abb.1-7 meiner Originalpublikation dokumentiert. Beispielsweise zeige ich dort in Abb. 4 a, dass an P4 Pax-2-Zellen bereits im ganzen Cerebellum verteilt sind, während Oligodendrocyten nur im VMS zu finden sind. An P8 hingegen liegen Pax-2-Zellen und Oligodendrocyten nebeneinander in der WM vor (Abb. 3 e; Abb. 4 e, i der Publikation). Insgesamt ließ sich kein systematischer räumlicher Zusammenhang zwischen der Verteilung von Oligodendrocyten und Pax 2 Zellen feststellen.

1.4.3.1 Reifung und Verteilung GFAP positiver Astroglia im Cerebellum

Im Rahmen der vorliegenden Studie nutzte ich den immunzytochemischen Nachweis von GFAP, um differenzierte Astroglia darzustellen. Damit ließ sich auch die Bergmann-Glia detektieren (Eng, 1985). Während an P0 keine GFAP-positiven (im Folgenden: GFAP⁺) Zellen im Cerebellum zu finden waren, stellte ich an P4 GFAP⁺ Zellen im VMS und angrenzenden Teilen der cerebellären WM sowie in geringerer Dichte in der zentralen WM und deren Übergang in die Lobi dar (Abb. 5 a). In der distalen lobulären WM waren mit Ausnahme der posterioren Lobi keine GFAP⁺ Strukturen zu finden. In den posterioren Lobi jedoch erkannte ich GFAP⁺ Zellen bis in die distale WM, IGL und ML

(Abb. 5 b). Die WM, IGL und ML der anterioren Lobi sowie die DCN und PCL zeigten hingegen keinerlei GFAP⁺ Strukturen (Abb. 8 meiner Originalpublikation). An P6 fand ich GFAP⁺ Astrocyten in der gesamten WM (Abb. 4 c). In der ML und IGL zeigten sich weniger und schwächer gefärbte GFAP⁺ Zellen und es ließ sich ein klarer anterioposteriorer Unterschied feststellen (vergleiche Abb. 8 i und j der zugrunde liegenden Originalpublikation). Die DCN waren auch zu diesem Entwicklungszeitpunkt weiterhin GFAP-negativ. Bis Tag 8 nahm die Dichte von GFAP⁺ Astrocyten weiterhin zu, und ich konnte GFAP⁺ Astrocyten in der IGL aller Lobi gut abgrenzen (Abb. 5 e). Die DCN blieben weiterhin GFAP-negativ.

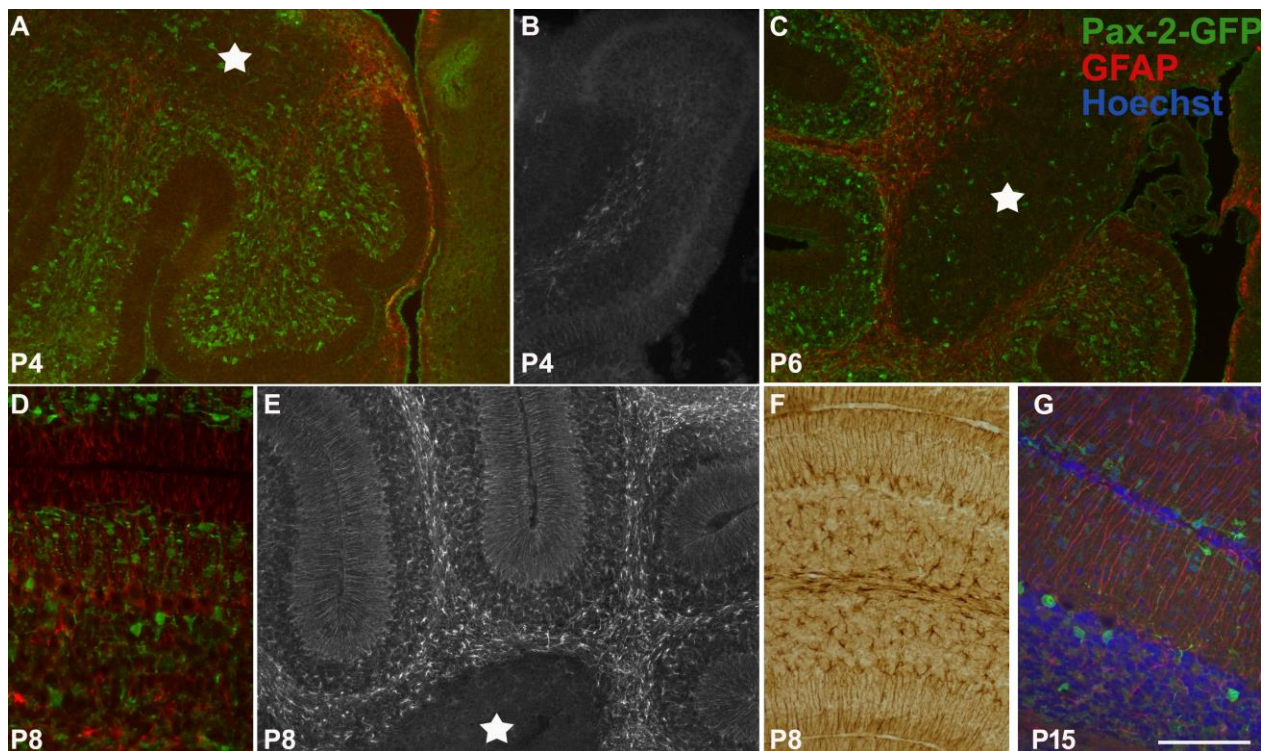


Abb. 5 GFAP⁺ Astroglia im sich entwickelnden Cerebellum. Anterioposteriore Unterschiede an P4 (A, VMS und anteriore Lobi; B, Lobus 8) sowie an P6 (C). Schichtspezifische Orientierung GFAP⁺ Zellen an P8 (D-F, F zeigt exemplarisch eine DAB-Färbung) sowie an P15 (G). Die DCN (Stern in A, C, E) bleiben bis ins adulte Alter GFAP-negativ. Maßstabbalken 160 μ m für A-C, E, F und 80 μ m für D. Das Teilbild 5 B wurde aus der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikation entnommen (dort Abb. 8 B)

Ich konnte zeigen, dass an P8 GFAP⁺ Zellfortsätze bereits in der schichtspezifischen (Ramon y Cajal, 1909, Seite 69ff) Orientierung adulter Glia vorlagen: Parallel zur PCL orientiert in der WM, sternförmig in der IGL und senkrecht zur PCL orientierte Fortsätze der Bergmann-Glia in der ML und EGL (Abb. 5 d-e). Insbesondere in den mit DAB gefärbten Schnitten (Abb. 5 e) zeigte ich, dass die Bergmanngliafortsätze in der ML

etwas geschlängelter verliefen als in der EGL (vergleiche auch Abb. 8 und 9 meiner Originalpublikation). Über P15 und P28 bis ins adulte Alter nahm die Dichte der GFAP⁺ Astroglia in allen cerebellären Schichten außer den DCN weiter zu, letztere waren bis ins adulte Alter GFAP-negativ (Abb. 5 g).

1.4.3.2 Vergleich der Verteilungen von GFAP⁺ Astrocyten und von Pax-2-Zellen

Anhand der Abbildungen 1, 2, 8 und 9 meiner Originalpublikation analysierte ich die Beziehung von GFAP⁺ Astrocyten und Pax-2-Zellen. Früh, vor P4 emigrierende Pax-2-Zellen (Abb. 5 a) besiedeln den cerebellären Kortex, ohne in Kontakt mit GFAP⁺ Astrocyten zu kommen. Dahingegen müssen die Pax-2-Zellen, die ab P4 in den Kortex emigrieren, durch eine WM wandern, welche bereits dicht mit Astroglia besiedelt ist (Abb. 5 c, d, g).

1.4.4.1 Reifung und Verteilung von Mikrogliazellen im sich entwickelnden Cerebellum

Ich nutzte Iba-1 als Marker, um Mikroglia im sich entwickelnden Cerebellum nachzuweisen (Ahmed et al., 2007). An P0 befanden sich runde bis polymorphe Iba-1 positive (im Folgenden: Iba1⁺) Mikroglia, die nur wenige Fortsätze zeigten, in der gesamten cerebellären WM, insbesondere in deren zentralen Anteilen (vergleiche Abb. 10 a der zugrunde liegenden Originalpublikation). Außerdem beobachtete ich, dass Iba⁺ Zellen mit Blutgefäßen und den Meningen assoziiert schienen (vergleiche Abb. 10 b der zugrunde liegenden Publikation). An P4 erschienen die Iba-1⁺ Mikroglia, die noch deutlicher als an P0 nur in der WM und vereinzelt in der unteren IGL zu finden waren, als runde Zellen mit kurzen, stärker als an P0 aufgezwigten Zellfortsätzen. Innerhalb der WM formten sie ein Netz um die DCN bis hoch in die Spitzen der lobulären WM (vergleiche Abb. 10 c der zugrunde liegenden Originalpublikation). Bis P6 nahm die Zahl der Iba-1⁺ Mikroglia im Cerebellum weiter zu und ich fand sie nun auch außerhalb der WM in geringerer Dichte in der IGL und PCL (vergleiche Abb. 10 der zugrunde liegenden Originalpublikation). Dabei beobachtete ich regionale Unterschiede in der Morphologie der Mikroglia insbesondere in den anterioren Lobi: Die kortikalen Mikroglia sowie diejenigen in der Spitze der lobulären WM erschienen rundlich, während Mikroglia in der zentralen und proximalen lobulären WM dünner und langgestreckter imponierten (Abb.10 e, f der zugrunde liegenden Originalpublikation). An P8 war dieser Unterschied

innerhalb der lobulären WM noch deutlicher ausgeprägt, sodass die Kombination von Ansammlungen großer, runder Iba-1⁺ Zellen in der Spitze der lobulären WM und dünner, langgestreckter Mikroglia in der restlichen lobulären WM den Eindruck eines Blumenstraußes erweckten (vergleiche Abb. 11 b der zugrunde liegenden Originalpublikation). Außerdem konnte ich an P8 Mikroglia nun auch in der ML und den DCN und somit in allen Bereichen des Cerebellums außer der EGL nachweisen (Abb. 11 a der zugrunde liegenden Originalpublikation). Zwischen P8 und P15 nahm die Dichte der Iba-1⁺ Mikroglia stark ab, sodass sie überwiegend nur noch in der WM zu finden waren. Alle Mikroglia erschienen dünn und länglich mit vielen Fortsätzen (Abb. 11 meiner Originalpublikation). Über P28 bis ins adulte Alter konnte ich eine weitere Abnahme der Dichte der Mikroglia im Cerebellum beobachten, sodass ich im adulten Cerebellum nur noch vereinzelt Iba-1 positive Mikroglia fand, die sternförmig erschienen (vergleiche Abb. 11 e der zugrunde liegenden Originalpublikation).

1.4.4.2 Vergleich der Verteilung von Iba-1⁺ Mikroglia und von Pax-2-Zellen

Vergleiche zwischen der Verteilung von Mikroglia und Pax-2-Zellen sind in den Abb. 1, 2, 7, 10 und 11 der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikation dargestellt. Wie ich beispielsweise in Abb. 6 c, d und e zeige, war zu keinem Zeitpunkt eine direkte räumliche Beziehung zwischen Mikroglia und Pax-2-Zellen zu beobachten.

1.4.5.1 Verteilung mitotischer Zellen im reifenden Cerebellum

Da die Phosphorylierung von Histon H 3 mit der mitotischen Chromatinkondensation korreliert, nutzte ich Phosphohiston H 3 (im Folgenden: PH3) als Marker für mitotische Zellen im sich entwickelnden Cerebellum (Hendzel et al., 1997).

Während an P0 PH3-positive (im Folgenden: PH3⁺) Zellen im gesamten Cerebellum einschließlich der WM und des VMS zu finden waren (Abb. 7 a), konnte ich schon an P4 regionale Unterschiede feststellen. So war die Dichte mitotischer Zellen in der EGL und der WM höher als in der IGL und den DCN (Abb. 7 c). An P6 war dieser Unterschied noch deutlicher zu erkennen, sodass ich die meisten mitotisch aktiven Zellen in der EGL fand. Sowohl in der lobulären als auch der zentralen WM sah ich PH3⁺ Zellen in geringerer Dichte (Abb. 7 d). Bis zu P8 nahm die Anzahl mitotischer Zellen stark ab, sodass ich nur noch wenige PH3⁺ Zellen in der EGL und vereinzelt in der WM detektierte

(Abb. 7 e). An P15 waren kaum noch mitotisch aktive Zellen im Cerebellum zu entdecken, und in P28 und adulten Cerebella ließen sich keine PH3⁺ Zellen nachweisen (nicht als Fotodokumentation gezeigt).

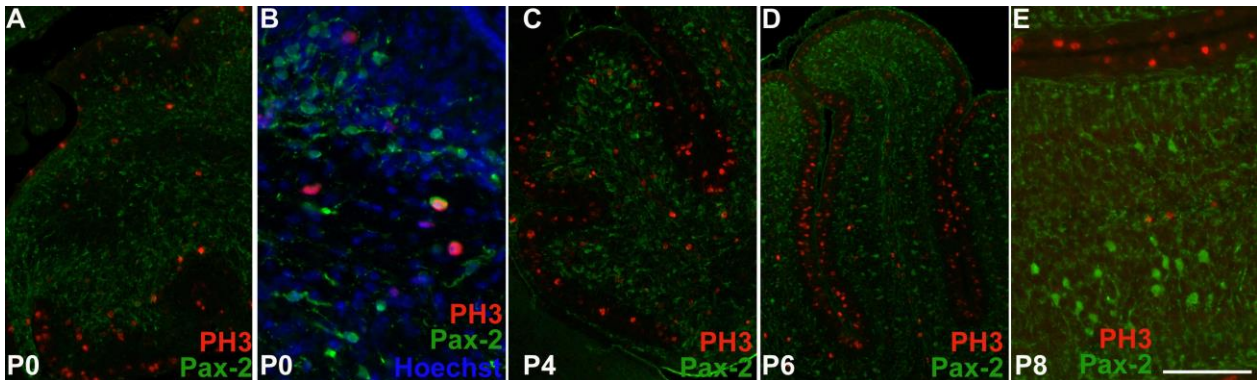


Abb. 7 PH3⁺ mitotische Zellen im sich entwickelnden Cerebellum. Bis auf eine einzige Ausnahme (B) sind Pax-2-Zellen PH3-negativ und postmitotisch. Keine besondere Anordnung von Pax-2 und PH3⁺ Zellen ist ersichtlich. Maßbalken=210 µm für A, 160 µm für C und D, und 80 µm für B und E. Das Teilbild 7 B wurde aus der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikation entnommen (dort Abb. 12 C)

1.4.5.2 Vergleich der Verteilung mitotisch aktiver und der von Pax-2-Zellen

Bis auf eine einzige Ausnahme (Abb. 7 b) zeigte sich keine Doppelfärbungen für Pax-2 und PH3. Wie aus den Abb. 2 und 7 ersichtlich ist, besteht kein offensichtlicher räumlicher Zusammenhang zwischen Pax-2 und mitotischen Zellen. Eine genauere Beschreibung meiner Beobachtungen findet sich in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Originalpublikation.

1.4.6.1 Expression des Neurotrophinrezeptors P75^{NTR} im sich entwickelnden Cerebellum

Wie von Kuchler et al. (2011) gezeigt, stimuliert sonic hedgehog (im Folgenden: shh) die Expression von P75^{NTR}. Shh reguliert die Proliferation von Körnerzellen (Wechsler-Reya und Scott, 1999) und könnte auch auf Pax-2-Zellen in der WM wirken. Daher nutzte ich P75^{NTR} als readout für shh, um mögliche shh-Signaltransduktionswege im reifenden Cerebellum und insbesondere bei Pax-2-Zellen zu untersuchen.

An P0 wies ich P75^{NTR}-Färbung nur in der EGL nach, während in der WM außer einigen blutgefäßassoziierten, runden Strukturen keinerlei P75^{NTR} Färbung zu sehen war. In der EGL stellten sich die P75^{NTR}-positiven (im Folgenden: P75^{NTR+}) Strukturen netzartig um

die immunonegativen Somata dar (Abb. 8 a). An P4 stellte ich eine stärkere Färbung der EGL fest. Zudem fanden sich nun P75^{NTR+} Purkinje Zellen und P75^{NTR+} Zellen in den DCN, während die WM weiterhin P75^{NTR} negativ war (Abb. 8 b). Bis zu P6 nahm die P75^{NTR} Färbung in der EGL, PCL und in den DCN weiter zu, während die WM erneut P75^{NTR}-negativ blieb (Abb. 8 c). Auch an P8 war kein P75^{NTR} Signal in der WM zu erkennen, und die EGL erschien schwächer gefärbt (Abb. 8 d). Ich wies jedoch stark P75^{NTR+} Purkinjezellen nach, wobei diese in den medialen Lobi stärker gefärbt erschienen als jene in den anterioren und posterioren Lobi (vergleiche Abb. 13 meiner Originalpublikation). An P15 ließ sich eine P75^{NTR} Färbung nur noch in den Purkinjezellen der medialen Lobi erkennen, wo die Grenze zwischen P75^{NTR}-positiven und -negativen Bereichen sehr scharf erschien (Abb. 8 e). In Schnitten von Cerebella von 28 Tage alten und adulten Tieren waren keinerlei P75^{NTR+} Strukturen mehr zu erkennen.

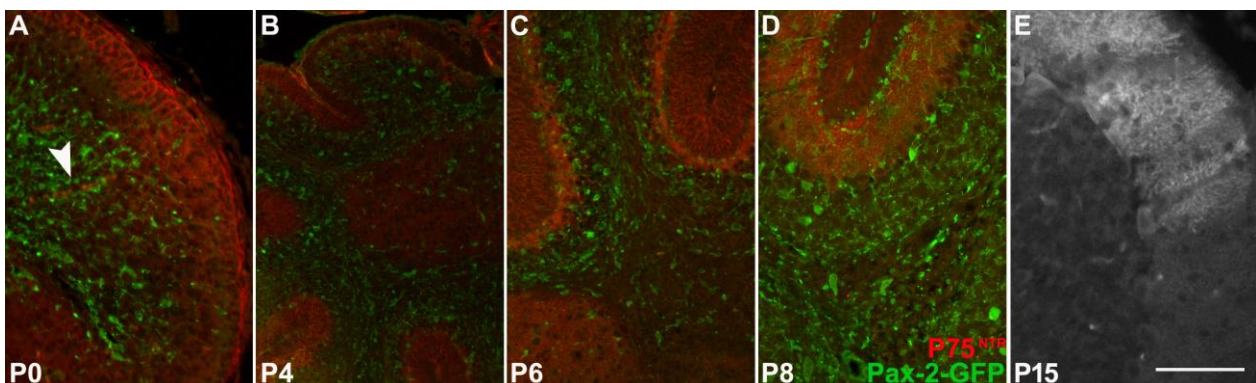


Abb. 8 Expression von P75^{NTR} im sich entwickelnden Cerebellum. Während an P0 in der WM nur die EGL blutgefäßassoziierte Strukturen P75^{NTR+} sind(A, Pfeil), wird P75^{NTR} ab P4 auch in den DCN und Purkinjezellen exprimiert. Ab P6 wird weniger P75^{NTR} exprimiert, bis an P15 nur noch die Purkinjezellen der medialen Lobi P75^{NTR+} sind. Maßstabbalken: 80 µm für A, C-E und 160 µm für B. Die Teilbilder 8 A und 8 E wurden aus der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikation entnommen (dort Abb. 13 A und G)

Ein Problem bei der Färbung für P75^{NTR} und deren Auswertung war, zuverlässig zwischen Signal und unspezifischer Hintergrundfärbung zu unterscheiden. Um hier eine Orientierung zu erhalten, nutzte ich die streng schichtweise Anordnung der Zellen der Kleinhirnrinde um die Fluoreszenzintensität in der bekanntermaßen P75^{NTR+} EGL und der sicher P75^{NTR-} IGL semiquantitativ zu erfassen. (siehe Abb. 14 der zugrunde liegenden Publikation). Mit diesem Ansatz konnte ich bestätigen, dass P75^{NTR} nur in

Purkinjezellen und in der EGL exprimiert wird. Ich konnte nachweisen, dass es keine P75^{NTR+} Strukturen weder in der IGL und in der WM noch in von Pax-2-Zellen besiedelten Arealen gibt (vergleiche Abb. 14 der zugrunde liegenden Publikation).

1.4.6. Vergleich der Expression von P75^{NTR} und Pax 2

Wie ich anhand der Abb. 8 zeige, konnte ich keine Doppelfärbung für P75^{NTR} und Pax-2 nachweisen. Zudem sah ich keine P75^{NTR+} Strukturen in der WM, die mit Pax-2- Zellen assoziiert erschienen.

1.5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich anhand des immunhistochemischen Nachweises ausgewählter Marker die Verteilung und Reifung von Makro- und Mikrogliazellen in der weißen Substanz des sich entwickelnden Kleinhirns. Ich analysierte auch die Verteilung PH3-markierter mitotischer Zellen sowie das Expressionsmuster von P75^{NTR}. Diese Daten verglich ich mit der Verteilung Pax-2⁺-IN-Vorläuferzellen, welche im untersuchten Zeitraum durch die weiße Substanz wandern und deren Differenzierung dabei determiniert wird. Meine Ergebnisse zeigen, dass Pax-2-Zellen abhängig vom Zeitpunkt ihrer Migration durch die sich entwickelnde WM mit einer sich dynamisch verändernden Umgebung konfrontiert werden.

Die von mir beobachtete zeitliche und räumliche Entwicklung der Verteilung und Morphologie von Pax-2-Zellen stimmt mit den Beschreibungen in früheren Arbeiten überein und bestätigen, dass Pax-2 ein zuverlässiger Marker zur Untersuchung der Entwicklung von inhibitorischen IN im Cerebellum ist (Maricich und Herrup, 1999; Weisheit et al., 2006). Ein bisher nicht beschriebener Befund ist meine Beobachtung, dass Pax-2 auch in den cerebellären Meningen exprimiert wird. Möglicherweise handelt es sich hierbei um endotheliale Zellen der meningealen Gefäße, da für ebendiese Zellen eine Pax-2-Expression beschrieben wurde (Ghazanfari und Stewart, 2001).

Während CNP-1 den frühesten myelinassoziierten Marker darstellt, ist MBP erst unmittelbar vor Beginn der Bildung der Myelinhüllen nachweisbar und zeigt die finale Differenzierung von Oligodendrocyten an (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Braun et al.,

1988; Brunner et al., 1989). Ich konnte beobachten, dass früh emigrierende Pax-2-Zellen den cerebellären Kortex vor der Ankunft von Oligodendrocyten im Cerebellum erreichen. Diese wandern an P4 über das VMS ein und verteilen sich von dort aus im Cerebellum (Abb. 2-4, vergleiche auch Reynolds und Wilkin, 1988). Dementsprechend sind früh emigrierende Pax-2-Zellen im Gegensatz zu den ab P4/P6 durch die WM migrierenden Pax-2-Zellen nicht dem Einfluss von Oligodendrocyten ausgesetzt. Zudem konnte ich anhand morphologischer Veränderungen sowie der Expression von MBP darstellen, dass sich Oligodendrocyten zwischen P6 und P8 in der gesamten cerebellären WM verteilen und reifen (Abb. 3, 4). Dementsprechend sind zwischen P4 und P8 emigrierende Pax-2-Zellen eher unreiferen Oligodendrocyten ausgesetzt, während nach P8 emigrierende Pax-2-Zellen den Einflüssen reiferer Oligodendrocyten unterliegen.

Kapfhammer und Schwab (1994) zeigten, dass Oligodendrocyten das Axonwachstum inhibieren. Dies führte zu der Frage, ob Oligodendrocyten mit Beginn der Myelinisierung Pax-2-Zellen aus der WM verdrängten. Meine hier vorgelegten Befunde der über einen längeren Abschnitt der Entwicklung gleichzeitigen Präsenz von Oligodendrocyten und Pax-2-Zellen in der WM (Abb. 3 e; 4 e) zeigen aber klar, dass Oligodendrocyten die Migration und Präsenz von Pax-2-Zellen in der WM nicht inhibieren. Im Gegenteil implizieren meine Ergebnisse in Zusammenschau mit Mathis et al. (2003), dass Oligodendrocyten die prämatüre Emigration von Pax-2-Zellen in den Kortex sowie eine vorzeitige Differenzierung der Pax-2-Zellen in der WM verhindern.

Die Astroglipopulation des Cerebellums stammt sowohl von radialen Gliazellen ab, die bei der Maus um E14 von der VZ ins Cerebellum emigrieren, als auch von bipotenten Vorläuferzellen in der WM (Parmigiani et al., 2015; Yamada und Watanabe, 2002; Yuasa, 1996). Während die radialen Gliazellen bereits an E15 ihre Ausläufer durchs Cerebellum schicken und ihre Somata um P2 in der PCL anlangen, migriert eine zweite Welle von Astroglia aus der VZ erst später ins Cerebellum und trägt zu den Astrogliazellen der WM und IGL bei (Marzban et al., 2014). Diese zweite Welle wird womöglich durch die GFAP⁺ Zellen dargestellt, die ich an P4 im VMS nachweisen konnte (Abb. 5 a).

GFAP wird nicht von Anfang an in allen später GFAP⁺ Zellen exprimiert (Eng, 1985; Yuasa, 1996). Wenn man jedoch für die folgende Überlegung alle GFAP⁺ Zellen als eine Gruppe betrachtet, kann man folgern, dass früh emigrierende Pax-2-Zellen den cerebellären Kortex erreichen, ehe im Kleinhirn GFAP⁺ Zellen auftreten, während nach P4 emigrierende Pax-2-Zellen dem Einfluss von GFAP⁺ Zellen in der entstehenden WM ausgesetzt sind.

Bei der Expression von GFAP in der WM konnte ich klare tempororegionale Unterschiede feststellen (Abb. 5). Wenn GFAP⁺ Zellen in der WM die Reifung von Pax-2-Zellen beeinflussten, würde man ebenso regionale Unterschiede in der Reifung der Pax-2-Zellen wie in der Reifung der Astroglia erwarten. Hinweise darauf zeigten sich jedoch nicht. Somit ist meinen Beobachtungen zufolge von keiner wesentlichen Beeinflussung der Pax-2-Zellen durch GFAP⁺ Zellen in der WM auszugehen.

Das von mir beschriebene Expressionsmuster von GFAP in der grauen Substanz zeigt, dass die verschiedenen Bereiche des cerebellären Kortex sowie der DCN, die durch jeweils verschiedene inhibitorische IN charakterisiert sind, auch von jeweils verschiedenen Astrogliazellen besiedelt werden. So findet man in der ML Bergmann-Glia zusammen mit Korb- und Sternzellen, in der IGL GFAP⁺-protoplasmatische Astroglia mit Golgi und anderen schichtspezifischen IN, und in den DCN GFAP⁻ Astroglia und DCN spezifische IN. Dies impliziert, dass die Reifung von Pax-2-Zellen durch Astroglia zwar nicht in der WM, aber lokal in den jeweiligen Schichten durch schichtspezifischen Astroglia in der terminalen Differenzierung der IN beeinflusst wird.

Außerdem zeigten meine Untersuchungen, dass Astroglia in den DCN während ihrer gesamten Entwicklung GFAP-negativ sind (Abb. 5 a, c, e). Die Astroglia der DCN exprimieren zudem Olig 2 (Tatsumi et al., 2018), was ein Charakteristikum GFAP-negativer Astroglia zu sein scheint.

Die Korrelation der morphologischen Differenzierung von Mikroglia und des Erscheinens GFAP⁺ Astroglia ist am besten in den Spitzen der lobulären WM zu beobachten (Abb. 5, 6). Dort beobachtete ich, dass zunächst runde Mikrogliazellen erschienen, gefolgt vom Auftreten GFAP⁺ Astroglia. Nach dem Erscheinen der Astroglia ändert sich die Morphologie der Mikroglia von einer runden, amöboiden in eine verzweigte, reife Form.

Dieselbe Reihenfolge wurde von Dalmau et al. (1997) auch im Hippocampus beobachtet. Mikroglia stimulieren die Proliferation von Astroglia und deren Reifung, in deren Rahmen Astroglia GFAP exprimieren (Antony et al., 2011; Giulian et al., 1988; Nakanishi et al., 2007). Andererseits kontrollieren differenzierte Astroglia die Reifung von Mikroglia (Pont-Lezica et al., 2011; Rezaie, 2003; Reemst et al., 2016; Tanaka und Maeda, 1996). Diese wechselseitige Beziehung verdeutlicht, dass ebenso die Reifung von Pax-2-Zellen nicht durch einseitige Differenzierungssignale erfolgen muss, sondern wahrscheinlich gleichenfalls einem komplexen, wechselseitigen Interaktionsprozess unterliegt.

Da Mikroglia sekundäre Keimschichten besiedeln und dort die Zahl der neuronalen Vorläuferzellen durch Phagozytose regulieren (Kettenmann et al., 2013), untersuchte ich, ob Iba-1-positive Mikroglia die WM als sekundäre Keimzone besiedeln und dort Pax-2-Zellen phagozytierten. Iba 1 war der einzige von mir untersuchte gliale Marker, der bereits an P0 in der WM nachweisbar war. Also sind bereits früh migrierende Pax-2-Zellen Mikroglia und deren eventuellen Einflüssen ausgesetzt. Ich beobachtete, dass die Dichte der Mikroglia mit der Zeit abnimmt und sie sich morphologisch von runden, amöboiden zu reifen, verzweigten Mikroglia entwickeln, welche ihre Umgebung kontinuierlich überwachen (DiBona et al., 2019; Karperien et al., 2013; Nimmerjahn et al., 2005; Reemst et al., 2016). Amöboide Mikroglia persistieren jedoch länger in der distalen lobulären WM und in der IGL. Diese Beobachtungen stimmen mit Ashwell (1990), Nakayama et al. (2018) und Vela et al. (1995) überein. Demnach sind früh migrierende Pax-2-Zellen schon um P0 unreifen Mikroglia exponiert, während spät migrierende Pax-2-Zellen in der WM auch auf reife, verzweigte Mikroglia treffen.

Ab P6/P8 konnte ich sowohl Pax-2-Zellen als auch Mikroglia in der ML und IGL beobachten. Dies ist besonders interessant, da Pax-2-Zellen während der Migration durch diese Schichten transiente Synapsen formen und Mikroglia überflüssige Synapsen modifizieren (Kettenmann et al., 2013, Wefers et al., 2017; Wefers et al., 2018). Zudem zeigten Nakayama et al. (2018), dass eine Ablation von Mikroglia über insuffiziente Signalgebung von Korb- und Sternzellen zu einer Reduktion der GABAergen Transmission im sich entwickelnden cerebellären Kortex führt und gegebenenfalls eine Verringerung der Dichte der ML zur Folge hat. Dies wirft die Frage

auf, ob diese Beobachtungen durch eine verhinderte Migration von Pax-2-positiven Korb/Stern-Vorläuferzellen nach Ablation von Mikroglia zu erklären ist, und beleuchtet, wie vielseitig die Interaktionen von Mikroglia und dem sich entwickelnden Cerebellum sind. In den hier vorliegenden Ergebnissen zeigte sich jedoch keine auffällige Kolokalisation von Pax-2-Zellen und amöboiden Mikroglia in der WM, die für eine mögliche Apoptose und Phagocytose von Pax-2-Zellen in der WM sprechen würde.

Ich untersuchte die Expression von P75^{NTR}, da dieser ein „readout“ für shh, einen möglichen Einflussfaktor auf Pax-2-Zellen in der WM, darstellt (Küchler et al., 2011). So konnten Fleming et al. (2013) mithilfe des Gli1-Transgenes zeigen, dass die Proliferation von IN- sowie glialen Vorläuferzellen in der WM shh-abhängig ist. Dahingegen ließen sich keine Pax-2-Zellen nachweisen, welche auch P75^{NTR+} waren (Abb. 8). Ebenso zeigten sich keine anderen P75^{NTR+} Zellen in der WM, mit Ausnahme vereinzelter, stark Hoechst-positiver Strukturen an P0, welche womöglich fehlplatzierte GCs darstellen, die durch MAG/p75-vermittelte Apoptose eliminiert werden (Fernández-Suárez et al., 2019). Hingegen waren in den von mir untersuchten Schnitten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Küchler et al. (2011) und Rahimi et al. (2016) Zellen in der EGL und PCs P75^{NTR}-positiv. Dies zeigt, dass sich der shh-Signalweg in Pax-2-Zellen, wenn sie ebenso wie ihre Vorläufer shh-sensitiv sind, von dem in GCs unterscheidet. Letztere exprimieren P75^{NTR} nach Stimulation mit shh (vergleiche Küchler et al., 2011). Eine weitere Folgerung, die aus meinen Ergebnissen abgeleitet werden kann, ist, dass IN-Vorläuferzellen in der WM kaum als Vorläufer für das P75^{NTR+} Medulloblastom in Frage kommen (vergleiche Pietsch und Haberler, 2016).

Pax-2 wird ab der S-Phase der letzten Mitose exprimiert, und somit sind Pax-2-Zellen weitestgehend postmitotisch (Luca et al., 2016; Weisheit et al., 2006). Dementsprechend ist meine Beobachtung, dass die meisten Pax-2-Zellen PH3 negativ sind (Abb. 7), nicht überraschend. Des Weiteren konnte ich darstellen, dass es keine besondere Assoziation von Pax-2-Zellen und sich teilenden Zellen gibt (Abb. 7). Während an P4 ähnlich viele mitotische, PH3⁺ Zellen in der WM wie in der EGL vorlagen, änderte sich diese Verteilung an P6 zugunsten der EGL. Da die meisten Pax-2-negativen Vorläuferzellen bis P5 ihre letzte Mitose durchlaufen, stellen mitotische Zellen in der WM bis P4 vermutlich sowohl gliale Vorläuferzellen als auch Pax-2-

negative IN Vorläuferzellen dar (Buffo und Rossi, 2013; Carletti und Rossi, 2008; Leto et al., 2016 a).

Eine Übersicht meiner Charakterisierung der WM zu definierten Zeitpunkten sowie der jeweiligen Entwicklungsschritte der IN ist nochmals in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Zusammensetzung der WM zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. Darstellung der von mir erstmalig so untersuchten Zusammensetzung und Reifung der WM in Zusammenschau mit dem Vorliegen und der Entwicklung von Pax-2-Zellen (vergleiche Leto et al., 2016 a; Weisheit et al., 2006). Diese Tabelle liefert die Grundlage zur Identifikation möglicher Quellen der Signalmoleküle, welche Pax-2-Zellen in der WM prägen und umprogrammieren können, und stellt somit eine Basis für weitere Untersuchungen dieser außergewöhnlichen Differenzierungsprozesse dar.

	P0	P4	P6	P8	P15
Mikroglia	Iba 1 ⁺ , amoeboider Mikroglia in gesamter WM	Iba 1 ⁺ , etwas reifere Mikroglia in gesamter WM	Höchste Dichte Iba1 ⁺ Mikroglia in WM. Regionale Unterschiede zwischen reifen, ramifizierten und unreifen, amoeboiden Mikroglia (Blumenstraußverteilung)	Weniger Iba1 ⁺ Mikroglia in der WM, regionale Unterschiede in der Reifung	Deutlich geringere Dichte an Iba1 ⁺ Mikroglia, alle reif
Oligodendrocyten	Keine CNP-1/MBP ⁺ Oligodendrocyten	Unreife, CNP-1 ⁺ Zellen im VMS	CNP-1 ⁺ MBP ⁺ unreifere Zellen in der zentralen WM. Anteriposteriore Unterschiede reifender CNP-1 ⁺ MBP ⁺ Oligodendrocyten in der lobulären WM	Reife CNP-1 ⁺ MBP ⁺ Oligodendrocyten bis in die Spitzen der WM außer in den anterioren Lobi	Reife CNP-1 ⁺ MBP ⁺ Oligodendrocyten in größerer Dichte in gesamter WM
Astrocyten	Keine GFAP ⁺ Astrocyten	GFAP ⁺ Zellen im VMS, spärlich in der zentralen WM und der WM der posterioren Lobi	GFAP ⁺ Astrocyten in der gesamten zentralen WM, anteriposteriore Unterschiede in der lobulärer WM	GFAP ⁺ reife Astrocyten in der gesamten WM, selbe Verteilung wie in der adulten Maus	zunehmende Dichte GFAP ⁺ Astrocyten in gesamter WM
Mitotische Zellen	Viele mitotische Zellen in gesamter WM	Dichte mitotischer Zellen nimmt etwas ab	Geringere Dichte mitotischer Zellen	Sehr spärlich mitotische Zellen	Kaum noch mitotische Zellen
P75^{NTR+} Zellen	Keine P75 ^{NTR+} Zellen in der WM	Keine P75 ^{NTR+} Zellen in der WM	Keine P75 ^{NTR+} Zellen in der WM	Keine P75 ^{NTR+} Zellen in der WM	Keine P75 ^{NTR+} Zellen in der WM
Differenzierung der zu diesem Zeitpunkt durch die WM migrierenden Pax-2-Zellen	Pax-2- Zellen werden zu Golgizellen	Pax-2- Zellen werden zu Golgizellen	Pax-2- Zellen werden zu Korb- und Sternzellen	Pax-2- Zellen werden zu Korb- und Sternzellen	Pax-2- Zellen werden zu Sternzellen
Pax-2-Zellen	Dicht in gesamter WM, keine regionalen Unterschiede	Dicht in gesamter WM, keine regionalen Unterschiede	Dicht in gesamter WM, keine regionalen Unterschiede	Weniger dicht in gesamter WM, keine regionalen Unterschiede	Spärlich in der WM

1.6 Zusammenfassung

Während der Entwicklung des Cerebellums wandern die Vorläufer seiner inhibitorischen Interneurone (IN) durch die sich entwickelnde weiße Substanz (WM). Diese dient als instruktive Nische für die Differenzierung jener anhand ihrer Expression von Pax-2 identifizierbaren IN-Vorläuferzellen. Die auf diese Pax-2⁺ Zellen einwirkende Signale sind bislang nicht bekannt. In meiner Arbeit untersuchte ich immunhistochemisch murine Cerebella zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, um die zelluläre Zusammensetzung der WM zu charakterisieren und somit die Mechanismen, die die außergewöhnliche Differenzierung der Pax-2⁺-Zellen ermöglichen, tiefer zu ergründen. Dazu verglich ich die räumliche Verteilung migrierender Pax-2⁺-Zellen mit anhand verschiedener Differenzierungsmarker identifizierter glialer Zellen sowie mit der Lokalisation proliferierender Zellen. Ich konnte zeigen, dass früh migrierende Pax-2⁺-Zellen die WM verließen, ehe dort die meisten von mir analysierten glialen Marker exprimiert wurden. Eine Ausnahme dazu bildeten Iba-1⁺ Mikrogliazellen, die ich bereits dem Tag der Geburt in der WM nachweisen konnte. Im weiteren Verlauf kommen später migrierende Pax-2⁺-Zellen mit einer zunehmenden Zahl reifender Glia in Kontakt. Abhängig vom Zeitpunkt ihrer Migration durch die WM sind Pax-2⁺-Zellen also mit einer sich dynamisch verändernden Umgebung konfrontiert. Ich konnte zudem zeigen, dass reifende Glia Pax-2⁺-Zellen nicht aus der WM verdrängen. Außerdem stellte ich fest, dass Astroglia in den tiefen Kernen des Kleinhirns GFAP-negativ sind. Auf den migrierenden Pax-2⁺-Zellen ließ sich im Gegensatz zu proliferierenden Körnerzellvorläufern kein P75^{NTR} nachweisen. Dementsprechend müsste eine eventuelle Wirkung von sonic hedgehog auf Pax-2⁺-Zellen von P75^{NTR} unabhängig sein. Hier beobachtete anterioposteriore Unterschiede in der Entwicklung der WM, die sich insbesondere anhand der lokalen Reifung von Astro- und Oligodendrocyten zeigte, können nicht nur für das Verständnis der Entwicklung des Cerebellums wichtig sein, sondern auch für die Pathologie und Therapie verschiedener Erkrankungen wie z.B. der hypoxisch-ischämischen Encephalopathie (Gussenhoven et al., Stem Cells Transl Med. 10:57-67, 2021). Während meine Untersuchungen zwar nicht zur Identifikation der einzelnen Signalmoleküle führten, die Pax-2⁺-Zellen reprogrammieren können, so grenzen sie doch die möglichen Quellen dieser Einflussfaktoren ein. Die Expression von Signalmolekülen, die die Pax-2⁺-Zellen beeinflussen können, sollten zeitlich mit der Expression der von mir charakterisierten Markern korrelieren.

1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Ahmed Z, Shaw G, Sharma VP, Yang C, McGowan E, Dickson DW. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2007. 55: 687–700

Alder J, Cho NK, Hatten ME. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron*. 1996. 17: 389–399

Antony JM, Paquin A, Nutt SL, Kaplan DR, Miller FD. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *Journal of neuroscience research*. 2011. 89: 286–298

Araujo APB, Carpi-Santos R, Gomes FCA. The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. *Cerebellum (London, England)*. 2019. 18: 1017–1035

Ashwell K. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain research. Developmental brain research*. 1990. 55: 219–230

Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*. 2001. 81: 871–927

Beckinghausen J, Sillitoe RV. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neuroscience letters*. 2019. 688: 2–13

Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu JM, Privat A. Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1988. 8: 3057–3066

Brunner C, Lassmann H, Waehnel TV, Matthieu JM, Linington C. Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *Journal of neurochemistry*. 1989. 52: 296–304

Buffo A, Rossi F. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Progress in neurobiology*. 2013. 109: 42–63

Carletti B, Rossi F. Neurogenesis in the cerebellum. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2008. 14: 91–100

Cerrato V BA. Gliogenesis. In: Manto M, Gruol DL, Schmahmann J, Koibuchi N, Sillitoe RV, Hrsg. *Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders*: Springer, 2019

Curtis R, Cohen J, Fok-Seang J, Hanley MR, Gregson NA, Reynolds R, Wilkin GP. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. *Journal of neurocytology*. 1988. 17: 43–54

Dalmau I, Finsen B, Tønder N, Zimmer J, González B, Castellano B. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology*. 1997. 377: 70–84

DiBona VL, Zhu W, Shah MK, Rafalia A, Ben Cheikh H, Crockett DP, Zhang H. Loss of Par1b/MARK2 primes microglia during brain development and enhances their sensitivity to injury. *Journal of neuroinflammation*. 2019. 16: 11

Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*. 1985. 8: 203–214

Fernández-Suárez D, Krapacher FA, Andersson A, Ibáñez CF, Kisiswa L. MAG induces apoptosis in cerebellar granule neurons through p75(NTR) demarcating granule layer/white matter boundary. *Cell death & disease*. 2019. 10: 732

Fink AJ, Englund C, Daza RAM, Pham D, Lau C, Nivison M, Kowalczyk T, Hevner RF. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006. 26: 3066–3076

Fleming JT, He W, Hao C, Ketova T, Pan FC, Wright CCV, Litingtung Y, Chiang C. The Purkinje neuron acts as a central regulator of spatially and functionally distinct cerebellar precursors. *Developmental cell*. 2013. 27: 278–292

Ghazanfari FA, Stewart RR. Characteristics of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture. *Brain research*. 2001. 890: 49–65

Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1988. 8: 709–714

Essentials of cerebellum and cerebellar disorders: A primer for graduate students. Gruol, Donna L and Gruol, Donna L and Noriyuki Koibuchi, Noriyuki Koibuchi and Mario Manto, Mario Manto, Reg.: Springer. 2016

Gussenhoven R, Ophelders, Daan R M G, Dudink J, Pieterman K, Lammens M, Mays RW, Zimmermann LJ, Kramer BW, Wolfs, Tim G A M, Jellema RK. Systemic multipotent adult progenitor cells protect the cerebellum after asphyxia in fetal sheep. *Stem cells translational medicine*. 2021. 10: 57–67

Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within

pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997. 106: 348–360

Kapfhammer JP, Schwab ME. Inverse patterns of myelination and GAP-43 expression in the adult CNS: neurite growth inhibitors as regulators of neuronal plasticity? *The Journal of comparative neurology*. 1994. 340: 194–206

Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013. 7: 3

Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013. 77: 10–18

Küchler J, Hartmann W, Waha A, Koch A, Endl E, Wurst P, Kindler D, Mikeska T, Waha A, Goodyer CG, Büttner R, Schilling K, Pietsch T. p75(NTR) induces apoptosis in medulloblastoma cells. *International journal of cancer*. 2011. 128: 1804–1812

Leto K, Bartolini A, Rossi F. The prospective white matter: an atypical neurogenic niche in the developing cerebellum. *Archives italiennes de biologie*. 2010. 148: 137–146

Leto K, Hawkes R, Consalez G.G... Cerebellar Neurogenesis. In: Gruol, Donna L and Gruol, Donna L and Noriyuki Koibuchi, Noriyuki Koibuchi and Mario Manto, Mario Manto, Hrsg. *Essentials of cerebellum and cerebellar disorders: A primer for graduate students*: Springer, 2016

Leto K, Arancillo M, Becker EBE, Buffo A, Chiang C, Ding B, Dobyns WB, Dusart I, Haldipur P, Hatten ME, Hoshino M, Joyner AL, Kano M, Kilpatrick DL, Koibuchi N, Marino S, Martinez S, Millen KJ, Millner TO, Miyata T, Parmigiani E, Schilling K, Sekerková G, Sillitoe RV, Sotelo C, Uesaka N, Wefers A, Wingate RJT, Hawkes R. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum (London, England)*. 2016. 15: 789–828

Leto K, Bartolini A, Yanagawa Y, Obata K, Magrassi L, Schilling K, Rossi F. Laminar fate and phenotype specification of cerebellar GABAergic interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009. 29: 7079–7091

Leto K, Carletti B, Williams IM, Magrassi L, Rossi F. Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006. 26: 11682–11694

Luca A de, Cerrato V, Fucà E, Parmigiani E, Buffo A, Leto K. Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2016. 73: 291–303

Maricich SM, Herrup K. Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *Journal of neurobiology*. 1999. 41: 281–294

Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M. Cellular commitment in the developing cerebellum. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014. 8: 450

Mathis C, Collin L, Borrelli E. Oligodendrocyte ablation impairs cerebellum development. *Development (Cambridge, England)*. 2003. 130: 4709–4718

Miale IL, Sidman RL. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Experimental neurology*. 1961. 4: 277–296

Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *The European journal of neuroscience*. 2007. 25: 649–658

Nakayama H, Abe M, Morimoto C, Iida T, Okabe S, Sakimura K, Hashimoto K. Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. *Nature communications*. 2018. 9: 2830

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*. 2005. 308: 1314–1318

Parmigiani E, Leto K, Rolando C, Figueres-Oñate M, López-Mascaraque L, Buffo A, Rossi F. Heterogeneity and Bipotency of Astroglial-Like Cerebellar Progenitors along the Interneuron and Glial Lineages. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015. 35: 7388–7402

Perez-Pouchoulen M, VanRyzin JW, McCarthy MM. Morphological and Phagocytic Profile of Microglia in the Developing Rat Cerebellum. *ENeuro*. 2015. 2

Pfeffer PL, Payer B, Reim G, Di Magliano MP, Busslinger M. The activation and maintenance of Pax2 expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separate enhancers. *Development (Cambridge, England)*. 2002. 129: 307–318

Pietsch T, Haberler C. Update on the integrated histopathological and genetic classification of medulloblastoma - a practical diagnostic guideline. *Clinical neuropathology*. 2016. 35: 344–352

Pont-Lezica L, Béchade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A. Physiological roles of microglia during development. *Journal of neurochemistry*. 2011. 119: 901–908

Rahimi Balaei M, Jiao X, Ashtari N, Afsharinezhad P, Ghavami S, Marzban H. Cerebellar Expression of the Neurotrophin Receptor p75 in Naked-Ataxia Mutant Mouse. *International journal of molecular sciences*. 2016. 17

Ramon y Cajal S. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés, vol. II. Paris: A.Maloine. 1909

Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in human neuroscience*. 2016. 10: 566

Reynolds R, Wilkin GP. Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development (Cambridge, England)*. 1988. 102: 409–425

Rezaie P. Microglia in the human nervous system during development. *Neuroembryology and aging*. 2003: 18–31

Schilling K. Specification and Development of GABAergic Interneurons. In: Manto, Mario and Gruol, Donna L and Schmahmann, Jeremy D and Koibuchi, Noriyuki and Rossi, Ferdinando, Hrsg. *Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders*: Springer, 2013: 207–237

Sotelo C. Molecular layer interneurons of the cerebellum: developmental and morphological aspects. *Cerebellum (London, England)*. 2015. 14: 534–556

Tanaka J, Maeda N. Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Experimental neurology*. 1996. 137: 367–375

Tatsumi K, Isonishi A, Yamasaki M, Kawabe Y, Morita-Takemura S, Nakahara K, Terada Y, Shinjo T, Okuda H, Tanaka T, Wanaka A. Olig2-Lineage Astrocytes: A Distinct Subtype of Astrocytes That Differs from GFAP Astrocytes. *Frontiers in neuroanatomy*. 2018. 12: 8

Vela JM, Dalmau I, González B, Castellano B. Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *The Journal of comparative neurology*. 1995. 361: 602–616

Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of Neuronal Precursor Proliferation in the Cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*. 1999. 22: 103–114

Wefers AK, Haberlandt C, Surchev L, Steinhäuser C, Jabs R, Schilling K. Migration of Interneuron Precursors in the Nascent Cerebellar Cortex. *Cerebellum* (London, England). 2018. 17: 62–71

Wefers AK, Haberlandt C, Tekin NB, Fedorov DA, Timmermann A, van der Want JJL, Chaudhry FA, Steinhäuser C, Schilling K, Jabs R. Synaptic input as a directional cue for migrating interneuron precursors. *Development* (Cambridge, England). 2017. 144: 4125–4136

Weisheit G, Gliem M, Endl E, Pfeffer PL, Busslinger M, Schilling K. Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *The European journal of neuroscience*. 2006. 24: 466–478

Yamada K, Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anatomical science international*. 2002. 77: 94–108

Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD. Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron*. 1994. 12: 1353–1362

Yuasa S. Bergmann glial development in the mouse cerebellum as revealed by tenascin expression. *Anatomy and embryology*. 1996. 194: 223–234

Zhang L, Goldman JE. Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron*. 1996. 16: 47–54

2. Veröffentlichung

The Cerebellum (2020) 19:286–308
<https://doi.org/10.1007/s12311-020-01111-z>

ORIGINAL PAPER



Developmental Maturation of the Cerebellar White Matter—an Instructive Environment for Cerebellar Inhibitory Interneurons

Anne Grotklaes¹ · Carina Bönisch¹ · Britta Eiberger¹ · Andrea Christ¹ · Karl Schilling¹

Published online: 30 January 2020
 © The Author(s) 2020

Abstract

In the developing cerebellum, the nascent white matter (WM) serves as an instructive *niche* for cerebellar cortical inhibitory interneurons. As their Pax2 expressing precursors transit the emerging WM, their laminar fate is programmed. The source(s) and nature of the signals involved remain unknown. Here, we used immunocytochemistry to follow the cellular maturation of the murine cerebellar WM during this critical period. During the first few days of postnatal development, when most Pax2 expressing cells are formed and many of them reach the cerebellar gray matter, only microglial cells can be identified in the territories through which Pax2 cells migrate. From p4 onward, cells expressing the oligodendrocytic or astrocyte markers, CNP-1, MBP or GFAP, started to appear in the nascent WM. Expression of macroglial markers increased with cerebellar differentiation, yet deep nuclei remained GFAP-negative at all ages. The progressive spread of maturing glia did not correlate with the exit of Pax2 cells from the WM, as indicated by the extensive mingling of these cells up to p15. Whereas sonic hedgehog-associated p75^{NTR} expression could be verified in granule cell precursors, postmitotic Pax2 cells are p75^{NTR} negative at all ages analyzed. Thus, if Pax2 cells, like their precursors, are sensitive to sonic hedgehog, this does not affect their expression of p75^{NTR}. Our findings document that subsequently generated sets of Pax2 expressing precursors of inhibitory cerebellar interneurons are confronted with a dynamically changing complement of cerebellar glia. The eventual identification of fate-defining pathways should profit from the covariation with glial maturation predicted by the present findings.

Keywords Cerebellum · GABAergic interneurons · Basket cells · Stellate cells · Cerebellar glia · Pax2

Introduction

The cerebellum is derived from two major germinative layers, both of which ultimately originate from the dorso-rostral neuroepithelium lining the fourth ventricle (for a recent review and further references, see [1]). In the mouse, this part of the neuroepithelium may be discerned on embryonic day nine, and it subsequently gives rise to the rhombic lip, from which excitatory (glutamatergic) cerebellar neurons originate [2 pp. 80f; 3, 4], and the ventricular zone, which generates all GABAergic neurons, including Purkinje cells, GABAergic nucleo-olivary projection neurons and inhibitory interneurons of deep cerebellar nuclei and of the cerebellar cortex [5–8].

As precursors of inhibitory interneurons translocate from the ventricular epithelium to their definitive positions, the deep cerebellar mass and the nascent white matter function not only as a mere conduit. As first pointed out by Zhang and Goldman [8], these cells divide while in transit. Once they become postmitotic, they may be recognized by their expression of Pax2 [9], which starts during the last cell division [10, 11]. Subsequent studies, primarily by Ketty Leto and Ferdinando Rossi, revealed that adequate differentiation of cerebellar inhibitory interneurons depends on their transit through the nascent white matter. In a series of elegant experiments, they documented that transplanted interneuron-precursors develop independently of the age of the donor animal from which they were taken. Rather, transplanted cells developed into exactly those types of GABAergic interneurons that were also formed by hosts cells transiting the prospective white matter at the time of transplantation [10; see also 7]. Together, these findings led to the view that within the deep cerebellar mass and nascent white matter (WM) of

✉ Karl Schilling
karl.schilling@uni-bonn.de

¹ Anatomisches Institut, Anatomie & Zellbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Nussallee 10, D-53115 Bonn, Germany

the cerebellar anlage, precursors of inhibitory cerebellar interneurons are confronted with signals that regulate their numeric expansion and program their final phenotypic differentiation [12, 13].

During the rather protracted transit of inhibitory interneuron precursors through the deep cerebellar mass and nascent white matter, this environment changes extensively: afferent (mossy and climbing fibers) and efferent (Purkinje cells and deep nuclei efferent) fibers, mature. Morphologically, this is reflected primarily by conspicuous changes of the glial cells making up the (prospective) white matter (for a review on macroglia, see [14]; for microglia, see [15, 16]).

To date, these changes have not been related directly to the development of cerebellar inhibitory interneurons (see, e.g., [17]). Here, we present results from a series of experiments aimed to describe some aspects of the cellular composition and maturation of the nascent cerebellar white matter in the early postnatal period, i.e., the period during which most cerebellar inhibitory interneurons are generated, migrate and differentiate through this “instructive niche” [13]. It is hoped that these data help to focus the search for factors that govern cerebellar inhibitory interneuron differentiation.

Materials and Methods

Animals and Tissue Preparation

We used wild type C57BL/6 mice and transgenic mice of the same background expressing a Pax2-GFP fusion protein (BAC line #30, [11, 18]). All animal handling was done in strict adherence to governmental (Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010) and institutional animal care regulations.

For tissue preparation, newborn mice (p0) and mice aged 4, 6, 8, 15, or 28 days (p4, p6, p8, p15, p28) as well as adult (p56-p70) mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamin/Xylazin (10:1 Ketamin:Xylazin in 0.9%NaCl, 0.1 ml/10 g body weight). Animals were then perfused through their left ventricle with phosphate-buffered saline (PBS, 150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), followed by perfusion with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. After dissection, brains were postfixed in 2% PFA in PBS overnight. They were then transferred into tap water and rinsed for 1 week. Subsequently, they were dehydrated by passage through graded alcohols, transferred into xylol, and embedded in paraffin. Sagittal sections from the vermal and paravermal regions were cut with a microtome at 10 μm and mounted on superfrost plus glass slides (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Immunofluorescence Staining

For immunostaining, sections were heated up to 60 degrees for 20 min to enhance their adhesion to the slides. They were then deparaffinized and rehydrated using xylol and a passage through a series of graded alcohols. Antigens were retrieved by boiling sections in citrate puffer (10 mM, pH 6.0) containing 0.05% (v/v) Tween 20 for 20 min. Subsequently, sections were permeabilized for 10 min with 0.5% Triton-X-100 in PBS. This last step was omitted if sections were to be stained for Iba-1. Free protein binding sites were blocked with blocking solution (0.2% gelatin in PBS) at room temperature for 2 h. Next, sections were incubated at 4 °C overnight with primary antibodies (for dilution used, suppliers and specificity, see Table 1) diluted in blocking solution. Subsequently, sections were washed three times in PBS and Alexa 488 and 546-tagged secondary antibodies (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) diluted 1:400 in blocking solution were applied for 2 h at room temperature. Finally, sections were washed in PBS, counterstained with Hoechst 33342 (1 μg/ml in PBS) and embedded with Dako fluorescence mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark). For negative controls, sections were incubated without primary antibodies. For each age and each antigen analyzed, sections obtained from at least three different animals (of either sex) were studied, and at least 4 sections per animal were evaluated.

Microscopy and Image Processing

Fluorescent images were acquired with a Zeiss Axioskop and the following objectives: Plan Neofluar × 2.5, NA 0.075; Plan Apochromat × 10, NA 0.3; Plan Neofluar × 20, NA 0.5. They were recorded using a Cool snap camera (Visitron Systems; resolution of 1392 × 1040 pixels) and Axiovision software (Zeiss; release 4.82). Adobe Photoshop was used for the adjustment of image brightness and contrast (linear adjustments) and the arrangement of images.

Results

Developmental Distribution of Pax2-GFP Cells in the Cerebellar Anlage

The distribution of inhibitory interneuronal precursors in the cerebellar anlage has been described previously by [9], who also established that Pax2 is a specific marker for these immature cells. Further, Weisheit et al. [11] verified that Pax2-GFP expression faithfully replicates expression of the cognate Pax2 gene. Therefore, we refer to inhibitory interneuronal precursors identified by Pax2-GFP-expression as Pax2 cells.

In Figs. 1 and 2, we document the distribution of Pax2 cells in the developing cerebellar anlage to facilitate comparison

Table 1 Antibodies used

Antibody (species, supplier)	Dilution	Reference
CNP-1 (mouse, Synaptic Systems, Göttingen, Germany)	1:500	Braun et al. 1988
GFAP (mouse, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)	1:1000	Eng, et al. 1985
GFP (chicken, Abcam, Cambridge, UK)	1:500	Kamitakahara et al. 2017
MBP (rabbit, Synaptic Systems, Göttingen, Germany)	1:500	Brunner et al. 1999
Phosphohistone H3 (rabbit, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)	1:500	Hendzel et al. 1997
Pax 2 (rabbit, Thermo Fisher, Rockford, IL, USA)	1:500	Weisheit et al. 2006
Anti-p75 NGF receptor (rabbit, Abcam, Cambridge, UK)	1:300	Küchler et al. 2010
Anti-Iba-1 (rabbit, Wako, Osaka, Japan)	1:500	Ahmed et al. 2007

with the expression patterns of markers used to characterize the developing white matter (WM) described in the following paragraphs. At postnatal day 0 (p0; Fig. 1a, b), Pax2 cells appear distributed relatively evenly throughout the cerebellar anlage, with the exception of the external granule cell layer (EGL). They may also be found in the velum medullare (arrowhead in panel a). At p4 (Fig. 1c, d), the deep cerebellar nuclei (DCN) may be delineated as a region with a relatively low density of Pax2 cells (stars in panels c, d). In the nascent inner granule cell layer (IGL), many large Pax2 cells may be found. While the EGL is again devoid of Pax2 cells, many of them can be found throughout the nascent white matter (WM) and again within the velum medullare. At p6 (Fig. 1e–h), Pax2 cells in the nascent WM are even more prominent. Two days later, at p8, Pax2 cells are still found throughout the WM, although at a lower density than at p6 (Fig. 2a–d). In the IGL, large Pax2 cells are particularly prominent, and in the nascent molecular layer (ML), strongly stained Pax2 cells, with preferentially horizontally oriented somata, are found close to the border with the EGL. In the deeper ML, Pax2 expression is weaker, and there, Pax2 cell somata appear preferentially roundish (Fig. 2d). At p15, only an occasional Pax2-positive cell may still be found in the white matter. Large-bodied positive cells are prominent in the (inner) granule cell layer. In the ML, many clearly Pax2-positive cells can be seen close to the meningeal surface, while few weakly Pax2-positive cells may be discerned in the deeper regions of the ML (Fig. 2e–h).

Maturation of Cerebellar Oligodendrocytes

CNP-1 immunostaining was used to detect early maturing oligodendrocytes and oligodendrocyte precursor cells. It is known to be expressed during early oligodendrocyte development, even before other myelin proteins such as MBP, and its expression persists until adult ages [19–22]. In more mature oligodendrocytes, the immunosignal of CNP-1 is typically distributed rather homogeneously [20] and thus allows to outline these cells. MBP is yet another differentiation marker for oligodendrocytes which has been reported to be expressed 2–

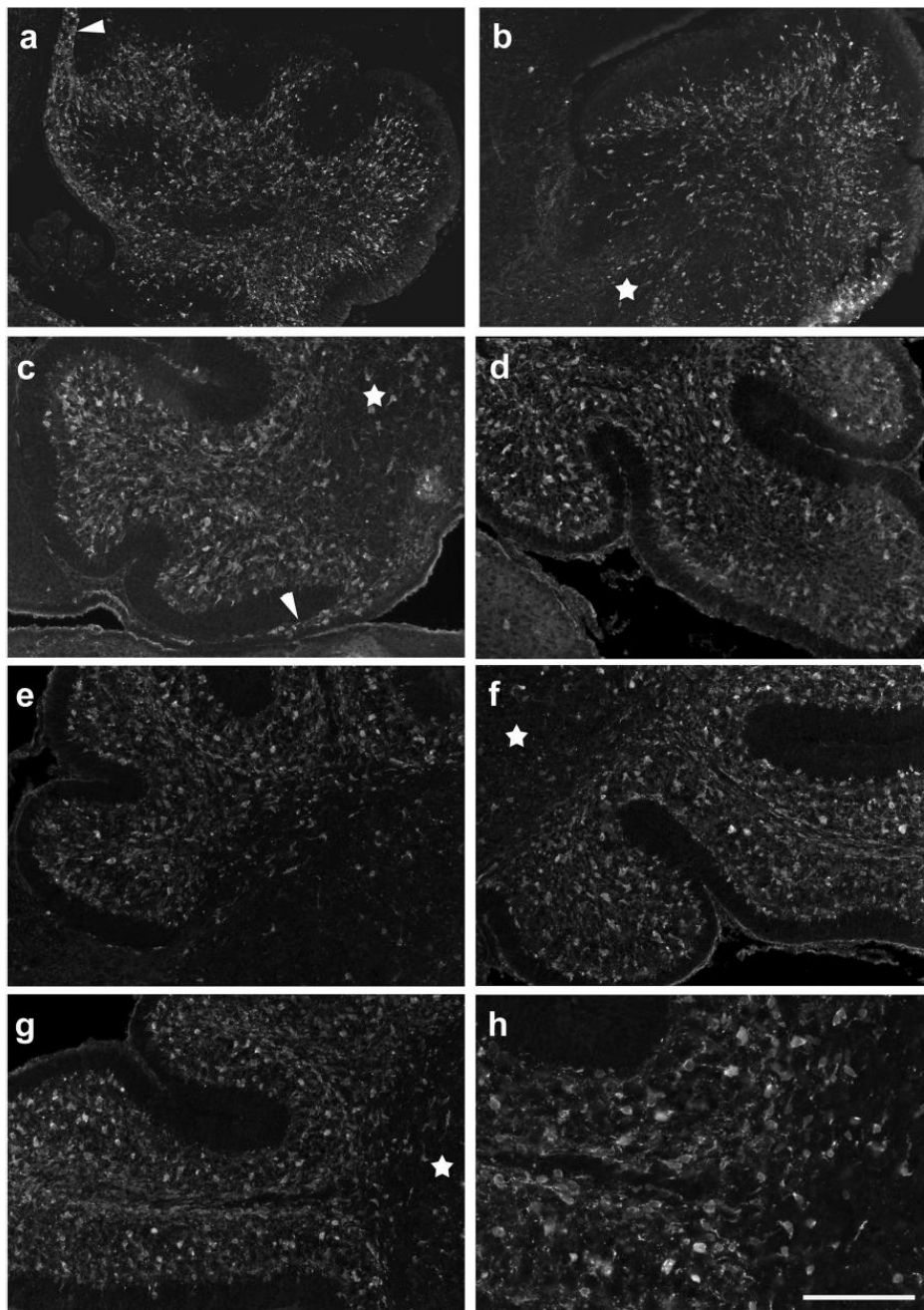
3 days after CNP-1 in rodent cerebellar oligodendrocytes [23, 24]. We used both of these markers to map the maturation of cerebellar oligodendroglia. As both markers are myelin-associated, we expected a staining pattern as typical for membranes.

Invasion and Settling of CNP-1-Positive Oligodendrocytes in the Cerebellar Anlage

At p0, we could not detect any CNP-1 immunopositive structures in the cerebellar anlage, while numerous CNP-1-positive cells were visible in the brain stem. In contrast, at p4, CNP-1 immunoreactivity could be seen in the velum medullare and rostral central mass of the cerebellum (Fig. 3a). It appeared granular, and individual cells could not really be delineated. Larger immunopositive granula were typically seen surrounding cell nuclei. In contrast, the obviously more mature CNP-1-positive cells in the brainstem showed an extended, fibrous morphology (Fig. 3b).

At p6, CNP-1-positive structures could be detected throughout the central WM of the cerebellum (Fig. 3c). At this age, CNP-1 immunoreactivity was also visible in the prospective WM of the posterior lobules (Fig. 3d), and of the first two anterior lobules (Fig. 3c). Intralobular CNP-1-positive structures could be detected up to the tip of the lobules, but not yet in the IGL. In contrast, at best very few CNP-1-positive structures could be seen in the medial lobules, primarily at their basis (Fig. 3e, f). While CNP-1-immunoreactivity appeared mostly granular, and individual cells could not reliably be delineated in the central parts of the cerebellum, immunostained structures in the nascent lobular WM of anterior and posterior lobules were elongated and reminiscent of long fibrous processes (Fig. 3c, e). Around the DCN, there was a dense, CNP-1-positive fibrous network. Somata of individual oligodendrocytes were hard to discern. CNP-1-positive structures were also visible within DCN (Fig. 3f).

Two days later, at p8, CNP-1-positive oligodendrocytes were found distributed throughout the developing WM (Fig. 4a), up to the tips of posterior and anterior lobules (Fig. 4b, c). They mostly displayed a fibrous morphology, and in



contrast to p6, granular CNP-1 staining was much reduced in the central parts of the cerebellum. Further, a few CNP-1-positive fibers could now also be detected within the IGL,

where they were essentially restricted to the region abutting the WM (Fig. 4b, c). These were somewhat irregularly distributed and recalled the strands of a bottlebrush. CNP-1-positive

Fig. 1 Distribution of Pax2-positive precursors of inhibitory interneurons (Pax2 cells) in the p0–p6 cerebellar anlage. **a, b** Sections close to the midline (**a**) and the lateral (**b**) cerebellar anlage at p0. Note the presence of Pax2 cells in the velum medullare (arrowhead in **a**) and throughout the cerebellar anlage proper, except in the external granule cell layer (EGL). The latter may be discerned due to its weak background staining. Note also that the density of Pax2 cells is lower in the region of the deep nuclei. **c–h** At p4, Pax2 cells are again seen in the velum medullare (arrowhead in **c**). Both at p4 (**c, d**) and p6 (**e–h**), Pax2 cells are preferentially localized in the nascent white matter, but also the nascent molecular (ML) and inner granule cell layers (IGL), both in the anterior (**c, e**) and the posterior (**d, f**) cerebellum. In the IGL, larger Pax2 cells are prominent. Pax2 cells are again excluded from the EGL, and their density in deep nuclei is rather low (star in **c, d, f, g**). Panels **g** and **h** show details from lobule 4. Note that positive cells are found throughout the white matter of this lobule, but preferentially localize to the margins close to the IGL. For all panels except **g** and **h**, anterior is to the left. Scale bar (in **h**) = 210 μm for panels **a, b**; 160 μm for panels **c–g**; 80 μm for panel **h**

somata could not be detected within the IGL. As at p6, CNP-1-positive oligodendrocytes were also found in the DCN (marked by a star in Fig. 4a). Throughout the nascent WM, the density of CNP-1-marked fibers had increased as compared with p6, and fibrous processes appeared much elongated. CNP-1-positive somata were preferentially discernible in areas where the density of oligodendrocytes (and their immunostained fibrous processes) was rather low.

By p15, an even denser network of CNP-1-positive oligodendrocytes throughout all of the cerebellum and up to the Purkinje cell layer (PCL) had developed. At the tips of the lobular WM, CNP-1-positive fibers entering the IGL branched radially into all directions (Fig. 4g). They spanned the entire IGL layer, where now also CNP-1-positive somata could be found (Fig. 4d, f). Typically CNP-1-positive fibrous structures were oriented more or less perpendicularly to the border of the WM and IGL (Fig. 4f, g). Moreover, we detected CNP-1-positive somata in the outer part of the IGL, the extensions of which formed CNP-1-positive fibers orientated parallel to the border between the IGL and PCL (Fig. 4h).

By p28 (Fig. 4i) and in the adult (Fig. 4e), we found an even denser network of CNP-1-positive fibers throughout the WM and the granular cell layer, again up to the PCL, and also within DCN.

At no age could we detect CNP-1-positive structures in the (nascent) ML, nor in the EGL.

Appearance of MBP-Positive Oligodendrocytes in the Cerebellar Anlage

At p0, both the cerebellum and the adjacent brainstem were negative for MBP. At p4, only a very few dot-like MBP-positive oligodendrocytes could be detected in the velum medullare (Fig. 5a), but no MBP-positive cells were present within the cerebellum proper. In contrast, in the p4 brainstem, strongly MBP-positive cells stood out as fiber like structures (Fig. 5b).

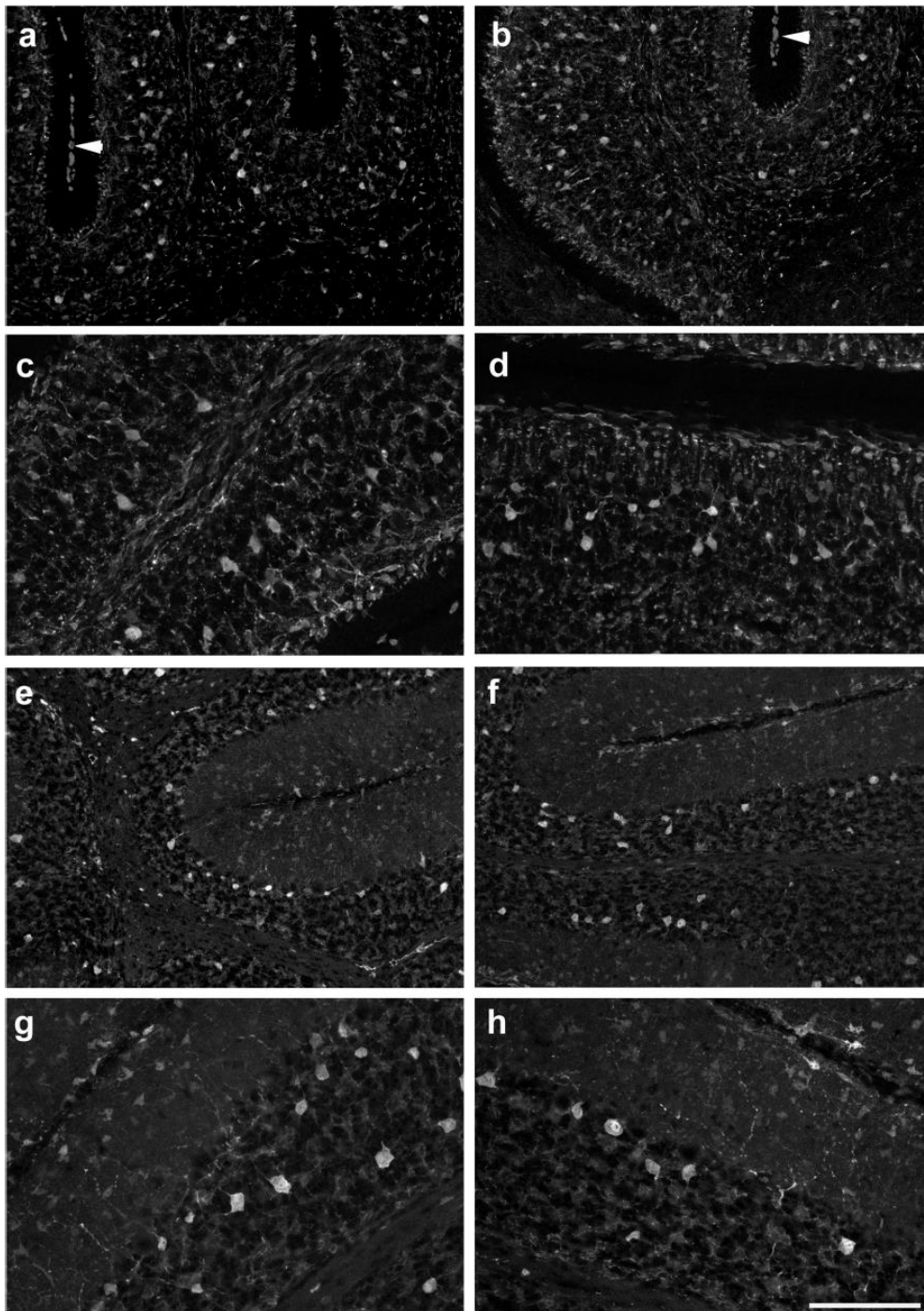
By p6, many MBP-positive oligodendrocytes could be seen in the velum medullare and the central cerebellar WM (Fig. 5c). MBP-positive cells were also found in the transitory region joining the central WM with that of individual lobules. In the nascent lobular WM, only a few MBP-positive cells were present, preferentially in the middle, i.e., about equidistant from the abutting IGLs (Fig. 5d). The distal parts of the nascent lobular WM were still MBP-negative. While MBP-expressing cells in the central WM and the velum medullare were preferentially roundish, those within lobules had a fibrous morphology (Fig. 5d).

In p8 mice, we found a dense population of MBP-positive oligodendrocytes throughout the entire cerebellar WM (Fig. 5e). In the anterior lobules MBP-expressing cells had not yet reached the tips of the individual lobules, and the IGL was as well still devoid of MBP-positive structures (Fig. 5e). Posterior, MBP-positive, fibrous structures could be detected up to the tips of the individual lobules, where they branched into thin and short strains (Fig. 5f). There, a few MBP-positive oligodendrocytes were also found in the inner part of the IGL. These were orientated at nearly right angles relative to the border of the IGL and the WM (Fig. 5f). MBP-positive oligodendrocytes could also be found within the DCN (Fig. 5e). By now, all MBP-positive cells in the cerebellum, including those in the IGL, had a fibrous structure.

By p15, the density of MBP-positive oligodendrocytes had increased throughout the cerebellum (Fig. 6a). A network of such cells had formed within the IGL, where it appeared denser in its lower than in its upper part (Fig. 6b–d). Moreover, within the proximal parts of the lobules, MBP-positive structures reached (almost) up to the PCL (Fig. 6c), while in distal parts they were preferentially found within the inner third of the granule cell layer (Fig. 6d). MBP-positive cells within the granule cell layer located close to the WM were often arranged in strand-like groups that were more or less perpendicularly arranged relative to the border of the granule cell layer and the WM (Fig. 6b–d). Closer to the PCL, the orientation of MBP-positive oligodendrocytes was more variable.

At p28 and in adult animals, MBP-positive oligodendrocytes appeared even denser, especially in the granule cell layer (Fig. 6e, f). MBP-positive fibers in proximal parts of the lobules often emanated from the WM in flat angles (Fig. 6e); more distally, they were orientated more or less perpendicular to the central WM in distal parts of the lobules (Fig. 6f).

The distribution of CNP-1- and MBP-defined oligodendroglia relative to that of Pax2-defined inhibitory interneurons and their precursors is documented in Fig. 7a–f. While, as detailed above, at p4, oligodendroglia could only be detected in the velum medullare, Pax2-positive interneuronal progenitors were spread rather homogeneously throughout the cerebellar anlage and the velum medullare (Fig. 7a). By p8, when oligodendroglial structures were found up to the tips of the lobular WM and also in the lower regions of the IGL (cf



above), Pax2 cells were found interspersed with oligodendrocytes within the cerebellar WM, but also throughout the cortex still devoid of MBP- or CNP-1-positive oligodendrocytes

(Fig. 7b–e). The large, strongly Pax2-positive interneurons in the IGL of the p15 cerebellum were not associated with structures marked by CNP-1 or MBP (Fig. 7f). Thus, we could

◀ **Fig. 2** Distribution of Pax2 cells in the p8–p15 cerebellar anlage. **a–d** At p8, the differential arrangement of Pax2 cells in distinct layers allows to identify the latter. There still remain some positive cells in the white matter; large positive somata are restricted to the IGL, and in the ML, staining intensity is stronger close to the border of the ML and the EGL than in the deeper ML. The EGL is again devoid of Pax2 cells. Pax2 cells in the meninges (arrowheads in panels **a, b**) may be vascular cells (see “Discussion”). **e–h** In the cerebella of p15 mice, the white matter contains only a few Pax2 cells. The IGL may be easily discerned due to the presence of large-bodied positive cells. In the ML, clearly Pax2-positive cells are concentrated close to the meningeal surface. In the deeper ML, Pax2 staining is very weak. Scale bar (in **h**) = 160 μ m for panels **a, b, e, f** and 80 μ m for panels **c, d, g, h**

not detect any systematic spatial relation between oligodendrocytes and Pax2 cells at any age studied.

GFAP-Defined Astroglial Maturation

To visualize the development and distribution of differentiated astrocytes, including Bergmann glia, we used immunostaining for GFAP [25].

At p0, we could not detect any GFAP-positive cells in the cerebellar anlage. In contrast, at p4, GFAP-positive cells were found throughout the velum medullare and in the transitory region joining the velum to the cerebellum proper. GFAP-positive cells were also visible within the central cerebellar WM and the bases of all lobuli, although at lower density (Fig. 8a). The distal parts of the nascent lobular WM were devoid of GFAP-positive structures (Fig. 8a), with the notable exception of the posterior lobules, where GFAP-positive cells could be seen up to the distal WM (arrows in Fig. 8b). Indeed, in posterior lobules, a few GFAP-positive cells could already be seen in the nascent IGL, and also the nascent ML (Fig. 8c). In contrast, in the anterior lobules, the IGL, just like the PCL and the ML, were GFAP-negative at p4 (Fig. 8a). The DCN were immunonegative for GFAP (Fig. 8a).

In p6 mice, we found GFAP-positive astrocytes in all of the prospective cerebellar WM, where they reached the tips of all lobuli (Fig. 8d, e). Staining of the cortex, including the ML, was weaker and showed clear antero-posterior differences. Whereas in posterior lobes (Fig. 8j) individual Bergmann glial fibers became discernible, staining of the ML and IGL in the central lobules was much weaker and diffuse (Fig. 8f, g, i, j). The anterior lobules showed an intermediate level of cortical staining (Fig. 8h). The DCN were negative for GFAP (Fig. 8e).

By p8, the density of GFAP-positive astrocytes had again increased throughout the cerebellum (Fig. 9a). Well delineated GFAP-positive cells were now visible within the IGL of all lobules. Also, Bergmann glia fibers in the ML and penetrating the EGL were now also more intensely stained and readily discernible (examples are shown in Fig. 9a–d). Again, the DCN stood out as a region devoid of GFAP-positive astrocytes (Fig. 9a). GFAP-positive glial processes were already arranged in the layer specific orientation typical for adult glia,

e.g., [2, p. 69, Fig 50]: within the WM, astrocytic processes were preferentially oriented parallel to the PCL; in the IGL, they had no preferential orientation, giving astrocytes their typical star-shaped appearance; and Bergmann glia in the ML and EGL were arranged perpendicular to the PCL (Fig. 9b, c, d). Of note, the exact appearance of GFAP-positive Bergmann glial fibers also reflected the distinct cellular compositions of the layers they traversed. In the ML, some could be seen to branch and staining was somewhat more diffuse, whereas in the EGL, fiber processes appeared straight and rather unbranched (Fig. 9b).

By p15, GFAP-positive astrocytes in the WM showed an even stronger orientation parallel to fiber tracts and often appeared as slender, bipolar, rather than star-shaped cells Fig. 9e, f). The density of Bergmann glia fibers in the ML (Fig. 9e, f) had again increased, and with the dissolution of the EGL, their appearance up to the meninges now was rather uniform. As at younger ages, GFAP-positive astrocytes could not be detected within the DCN (Fig. 9g). The distribution and appearance of GFAP-positive astrocytes at p28 and in adult animals was very much the same as at p15. Notably, DCN were devoid of GFAP-positive structures also at these ages (Fig. 9h).

Comparison of sections stained for Pax2 (Figs. 1 and 2) with those for GFAP (Figs. 8 and 9) as well as inspection of selected sections labeled for both Pax2 and GFAP (Fig. 8a, d, h; Fig. 9c–e) indicates that Pax2 cells settling the cerebellar cortex early on do not go through areas where they might contact, or get near, GFAP-positive cells. In contrast, those that immigrate into the cerebellar cortex around and beyond p4 have to transit the nascent WM at a time when it is already densely populated by GFAP-positive astrocytes. Double labeling for GFAP and Pax2 also highlights that while Bergmann glial processes penetrate the EGL, Pax2 cells are excluded from this layer (Fig. 9c–e).

Iba-1-Positive Microglia in the Cerebellar Anlage

Iba-1 staining was used to identify and localize microglia [26] in the developing cerebellum. At p0, Iba-1-stained microglial cells were visible throughout the nascent WM of the cerebellum, preferentially in its central parts (Fig. 10a). Many Iba-1-positive cells were associated with larger intracerebellar blood vessels and meninges (Fig. 10b, blood vessel marked by arrows). Within the velum medullare, the density of Iba-1-positive cells was comparable to that in the cerebellum proper (not shown). Iba-1-stained cells were roundish or polymorph, with only few processes (Fig. 10a, b).

At p4, the restriction of Iba-1-stained microglia to the nascent WM was even more obvious than at p0 (Fig. 10c, d). They appeared distributed more or less evenly up to the tips of the lobular WM (Fig. 10d) and around the DCN. A few Iba-1-positive cells could also be detected in the lower IGL (Fig. 10c, d). The remainder of the cerebellar cortex and the

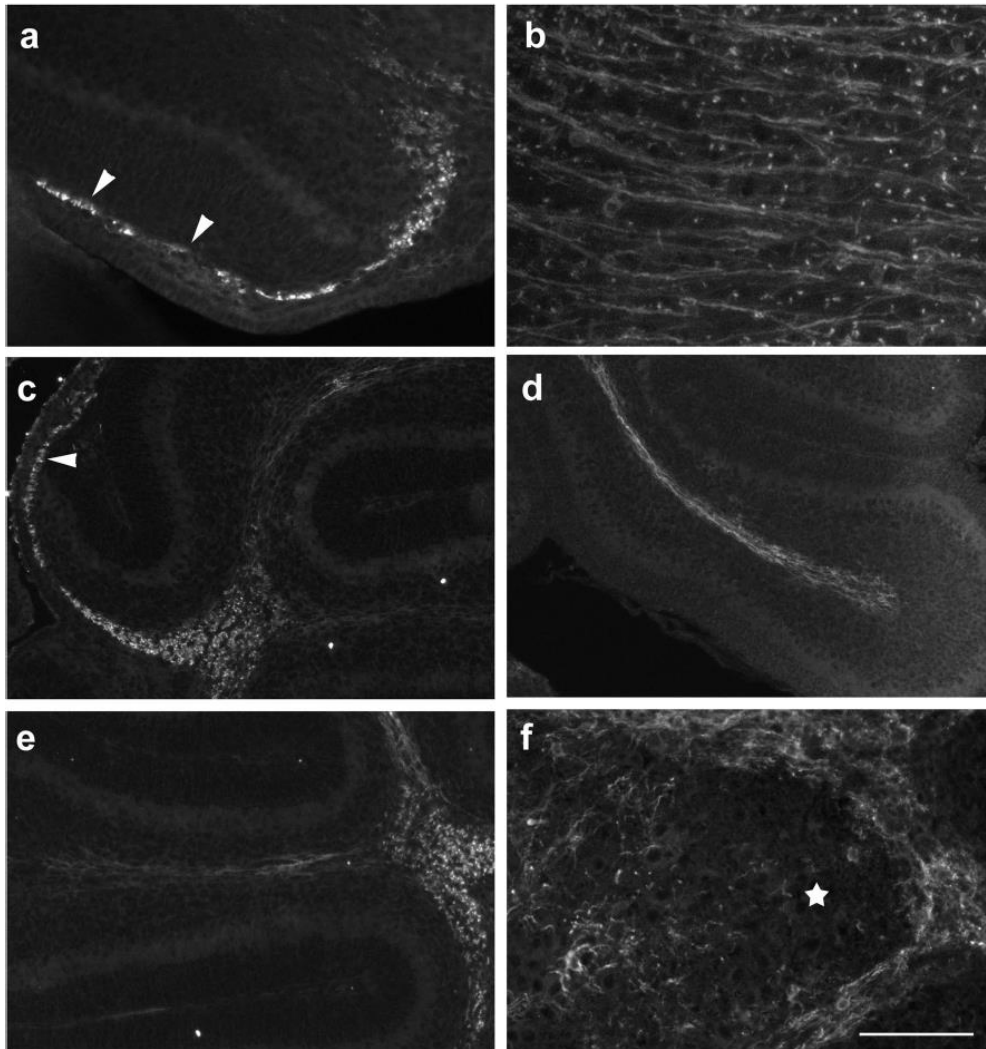


Fig. 3 CNP-1 immunoreactivity in the early postnatal mouse cerebellum (p0–p6). **a** CNP-1-positive cells in the p4 cerebellar anlage are roundish and may be found in the velum medullare (arrowheads in **a**) and the anteriormost parts of the cerebellar anlage. Sagittal section close to the midline; anterior is to the left. **b** In the brainstem, CNP-1-positive structures have a fibrous morphology at this age. **c, d** CNP-1-positive cells at p6. Immunoreactive cells can again be detected in the velum medullare (arrowhead in **c**). They can now also be seen in the nascent central WM and the nascent WM extending into the anterior and posterior lobules (**d**;

lobule 8). Sagittal sections close to the midline. Posterior is to the right. **e, f** In median lobules (**e** shows lobule 4; superior is to the left) CNP-1 expression is lower, but appears already fibrous, whereas staining in the central deep cerebellar mass (to the right of the panel) appears still granular at p6. Panel **f** displays a region from around deep cerebellar nuclei (marked by a star). These are surrounded by a rather dense fibrous immunopositive network. Some stained fiber-like structures can also be discerned within deep nuclei. Scale bar (in **f**) = 80 μm for panels **a, b, f** and 160 μm for panels **c, d, e**

DCN were devoid of Iba-1-positive cells, except for those associated with larger penetrating blood vessels (Fig. 10c). Again, many Iba-1-positive cells were found in the meninges. At this age, Iba-1-stained cells had roundish somata from which a few short processes emanated. These were more branched than at p0 (Fig. 10c).

At p6, numbers of Iba-1-stained microglia had increased compared with p4 (Fig. 10e, f). Again, most Iba-1-positive

microglia could be found in the central and lobular WM (Fig. 10e, f), but a few were also detectable in the IGL and PCL (Fig. 10f). While Iba-1-stained microglia within the central and lobular WM now were thin and longish, those that had accumulated in the lobular tips were rather roundish (Fig. 10e). This morphological difference was more prominent in lobule 4 (Fig. 10e) than in posterior lobules (Fig. 10f). Iba-1-positive cells in the IGL were also roundish (Fig. 10e).

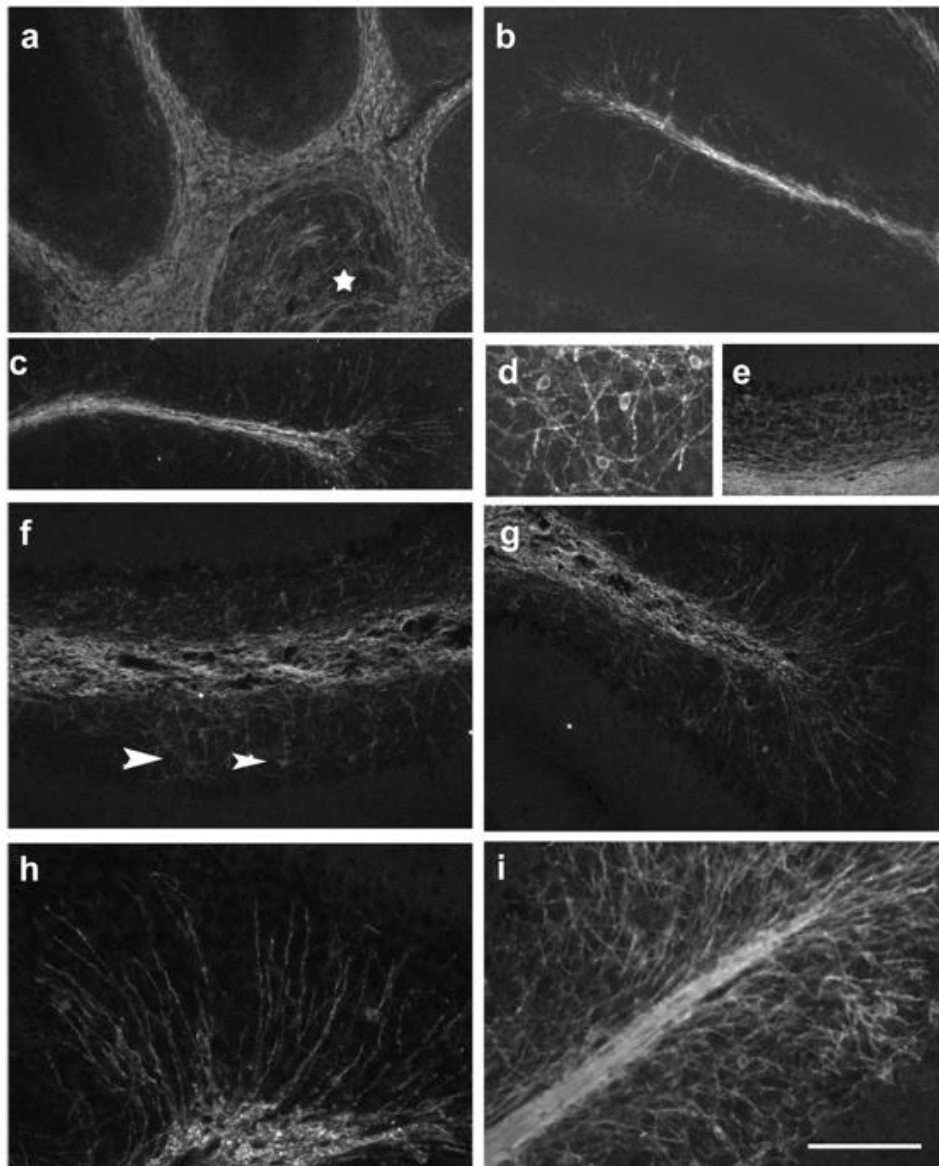


Fig. 4 CNP-1 immunoreactivity in the p8–p15 cerebellum. **a–c** CNP-1-positive structures in the p8 cerebellum. Note dense staining throughout the white matter and the fibrous morphology of all CNP-1-positive cells. A few CNP-1-positive cells are also present within the deep cerebellar nuclei (star in **a**). CNP-1-positive fibers reach the tips of all lobuli (shown for lobule 4 in panel **b** and lobule 8 in panel **c**) and can also be seen penetrating the IGL (**b**, **c**). No CNP-1-positive somata can be detected

within the IGL (**c**). **d**, **f**, **g**, **h** CNP-1-positive oligodendrocytes in the p15 cerebellum. Note CNP-1-marked fibers transverseing the IGL (**f**, **g**), where also stained somata are detectable (**d**; arrowheads in **f**). **i** At p28 and in the adult (**e**), a dense complement of CNP-1-positive fibers is present throughout the granule cell layer and the white matter. Scale bar (in **i**) = 160 μm for panels **a**, **b**, **c**, **e**, **f**, **g** and 80 μm for panels **d**, **h**, **i**

At p8, Iba-1-positive cells were found at a rather high density throughout the WM (and within the meninges), and at a clearly lower density within the IGL. A

few Iba-1-stained cells were now also found in the nascent ML, up to the border between the ML and the EGL (Fig. 11a). The latter appeared essentially devoid

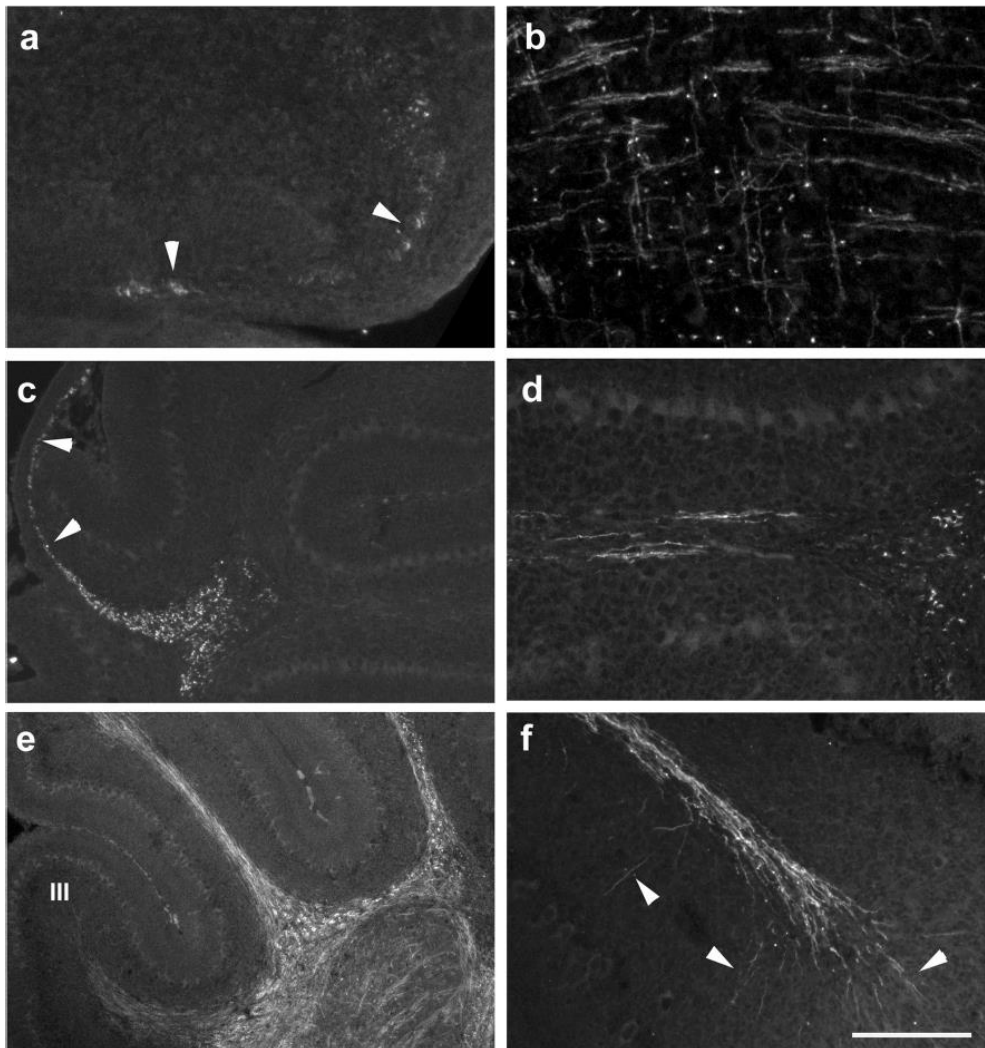


Fig. 5 MBP immunoreactivity in the early postnatal mouse cerebellum (p4–p8). **a, b** MBP-positive cells in the p4 cerebellar anlage are roundish and restricted to the velum medullare (arrowheads in **a**). For comparison, MBP-positive structures in the p0 brainstem have a fibrous appearance (**b**). **c, d** At p6, roundish MBP-positive cells are present in the velum medullare (arrowheads in **c**), the central cerebellar WM, and at the bases of individual lobules (**c**). Within the nascent lobular WM, a few fibrous MBP-positive structures may be discerned (**d**; basal is to the right; apical to the left.). **e, f** MBP-positive structures within the WM of the p8

cerebellum are intensely stained, and some weaker staining is also present within the DCN (**e**). All MBP-positive structures show a fibrous morphology. While within the anterior lobules (**e**; lobule III is marked), MBP-positive structures do not reach the tips of the lobular WM, they may be found up to the tips of the posterior lobules, where they branch into few thin short strains that enter the IGL in nearly rectangular angles (arrows in **f**). Scale bar (in **f**) = 80 μm for panels **a, b, d**; 160 μm for panels **c, f**; and 210 μm for panel **e**

of microglial cells. Iba-1-stained microglia were also found within the DCN (not shown).

The appearance of Iba-1-positive cells differed regionally. Within the IGL, PCL, ML, and in the DCN, these cells had mostly small, roundish somata and short processes (Fig. 11a). At the tips of the lobular WM, Iba-1-positive cells had roundish cell bodies with no discernible processes found, arranged as large accumulations

(Fig. 11b). In contrast, within the central and proximal lobular WM (Fig. 11a), Iba-1 cells had rather ramified processes and their cell bodies were typically not well demarcated. Together, the Iba-1 staining thus resulted in a “flower bouquet”-like appearance of the lobular WM (Fig. 11b, from lobule 4). In the posterior lobules, this distribution was not as distinctive as in the anterior lobules (not shown).

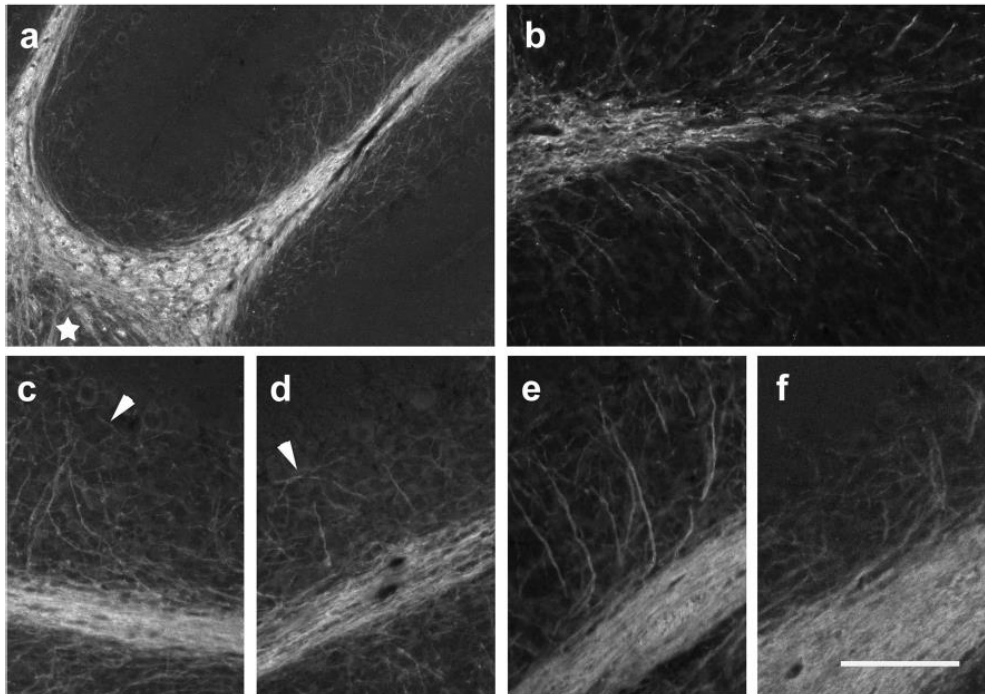


Fig. 6 MBP immunoreactivity in the p15 and p28 cerebellum. **a–d** The p15 cerebellum is characterized by intensive immunoreactivity for MBP throughout the WM. The density of MBP-positive fibers also increased within the DCN (star in **a**) and the IGL of all lobules. In the proximal parts of the lobules, MBP-positive fibers are found almost up to the PCL (**a, c**). Distally, MBP-positive fibers do not yet reach the PCL (**b, d**). At the tips of the lobular WM, MBP-positive fibers branch radially in all directions

(**b**). Arrowheads in **c** and **d** point out MBP-positive fibers running more or less parallel to the PCL. **e, f** In the p28 cerebellum, many MBP-positive fibers ascend through the IGL up to the PCL. Whereas they emanate at flat angles from the white matter in proximal parts of the lobules (**e**), more distally, they are oriented nearly rectangular to the white matter (**f**). Scale bar (in **f**) = 160 μm for panel **a** and 80 μm for panels **b–f**

At p15, the density of Iba-1-marked microglia had much decreased compared with p8 (Fig. 11c, d). Small, longish Iba-1-positive microglial cells were detected mainly in the WM (Fig. 11c, d), and few cells were visible in the IGL and ML. A few Iba-1-marked microglia were also found within the DCN (Fig. 11d).

At p28, the density of Iba-1-positive microglia appeared again lower than at p15. Microglial cells were found in the DCN, WM, IGL, and ML (the latter three are shown in Fig. 11e). Compared with previous ages, their processes could be better discerned, and many Iba-1-positive cells showed a stellate morphology with short, thin extensions (Fig. 11e). In adult cerebella, only an occasional Iba-1-positive cell could be detected in the cerebellum (not shown). They occurred in all cortical layers, the WM and the DCN, and typically had roundish somata and a few short processes. Given the scarcity of these cells, regional differences could not be ascertained.

To facilitate the comparison between the distribution of Iba-1-positive cells and Pax2 cells, a selection of double stained sections is shown in Fig. 7g, h). At no age, a direct association between Iba-1 microglia and Pax2 cells could be observed.

Distribution of Phosphohistone H3–Defined Mitotic Cells in the Nascent Cerebellum

To detect dividing cells, we used staining for phosphohistone H3 (pH3), a mitotic marker. At p0, mitotically active cells marked by pH3 were detectable throughout the cerebellum (Fig. 12a), including the nascent WM. pH3-positive cells were also detectable within the velum medullare superius (Fig. 12b). With a rare exception (Fig. 12c), Pax2 cells were negative for pH3.

At p4, cells marked by pH3 were again visible throughout the cerebellum (Fig. 12d), and also the velum medullare. Many of them were found in the EGL and in the nascent WM (Fig. 12d, e). A few pH3-positive cells could also be seen in the IGL and the DCN (Fig. 12d). Within the nascent WM, pH3-positive nuclei could be found up to the tips of individual lobules (Fig. 12e). They were characterized by different staining intensity and patterns (i.e., with different levels of chromatin condensation [27] (Fig. 12f).

In p6 mice (Fig. 12g), pH3-positive cells were distributed similarly as on p4. However, by now, the EGL was clearly the area that contained the highest density of pH3-positive cells.

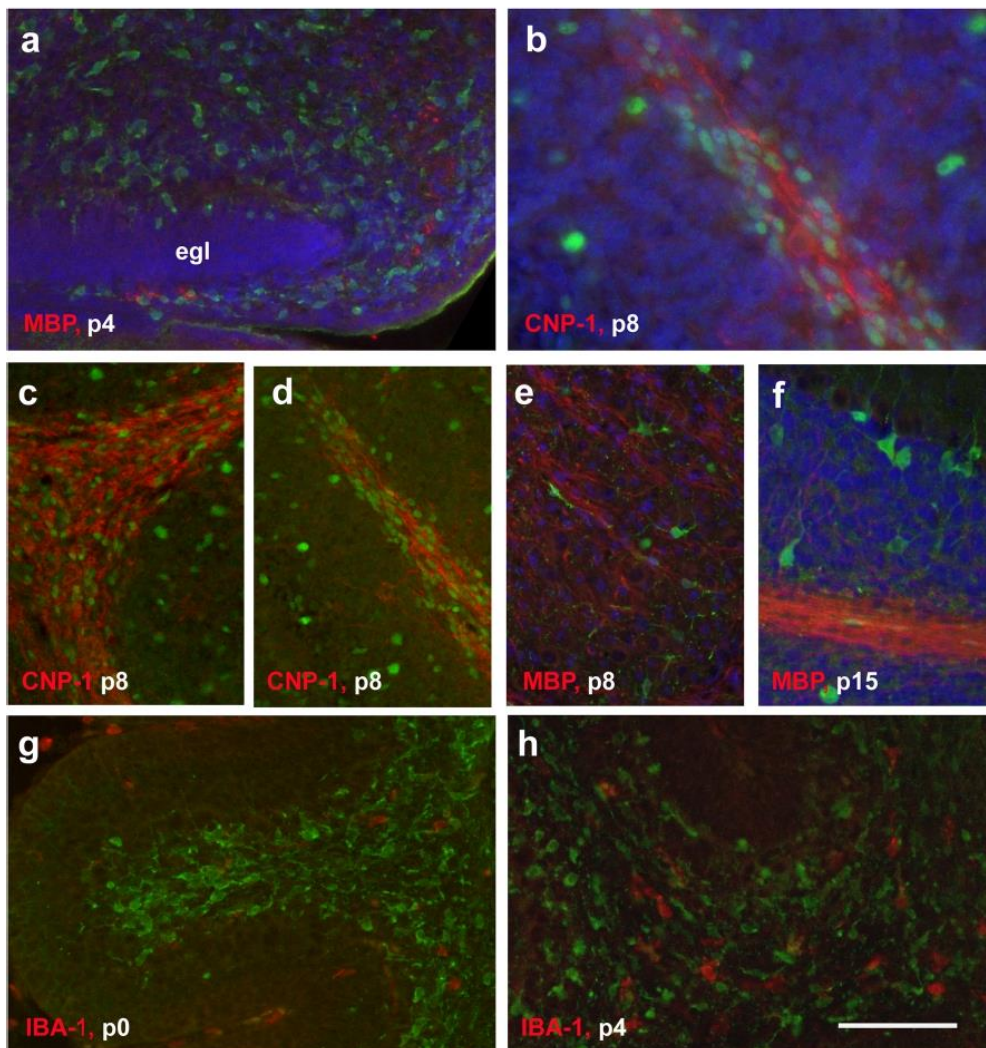


Fig. 7 Costaining for Pax2-GFP and markers for oligodendrocytes or microglia. **a** At p4, only a few MBP-positive oligodendrocytes (red) can be detected. These are restricted to the velum medullare, whereas Pax2 cells (green) are spread rather homogeneously in velum medullare and the nascent cerebellum, with the exception of the EGL. The EGL of lobule 1 is marked. **b–d** High power view (**b**) of the lobular WM of lobule 4/5 at p8. CNP-1-positive oligodendrocytes (red) are restricted to the WM. In contrast, Pax2 cells (green) are found both in the cerebellar cortex and the WM. In the WM, Pax2 cells and oligodendrocytes are mixed rather homogeneously and show no obvious association, as documented for the basis (**c**) and tip (**d**) of lobule 4/5. **e** DCN at p8. Pax2 cells and

MBP-positive oligodendrocytes (red) appear distributed throughout deep nuclei rather evenly and reveal no special association. **f** Lobule 4/5 at p15. Pax2 cells have now mostly migrated into the cerebellar cortex, while MBP-positive oligodendrocytes are restricted to the WM and IGL. **g, h** At p0 (**g**), both Iba-1-positive microglia (red) and Pax2 cells (green) can be detected in the cerebellar anlage. They intermingle in the prospective WM, but no spatial association can be observed. The same is true at p4 (**h**). In panels **a, b, e** and **f** nuclei are counterstained in with Hoechst (blue). Scale bar (in panel **h**) = 80 μ m for panels **a** and **c–h** and 40 μ m for panel **b**

Still, pH3-positive cells were also detectable within the central and lobular WM. Again, pH3-positive nuclei showed variable staining intensity and patterns.

At p8 (Fig. 12h), numbers of pH3-positive cells had much decreased compared with p6. pH3-positive cells were still detectable in the EGL of all cerebellar lobules, but in a lower

density than at p6. Within the WM, only a few pH3-positive cells were found at this age.

At p15, only very few solitary pH3-positive cells were found in what remained of the EL, and also within the WM. In 28-day and adult mice, no pH3-positive cells could be detected within the cerebellum (not shown).

Figure 12 shows costaining for Pax2 and pH3. With a rare exception (Fig. 12c), Pax2 cells were negative for pH3. No obvious spatial association of Pax2 and pH3 cells could be observed at any age.

Expression of the Neurotrophin Receptor, p75^{NTR}, During Cerebellar Maturation

Staining for the neurotrophin receptor, p75^{NTR}, was used with the intention to identify potential sonic hedgehog signaling [28].

At p0, p75^{NTR} immunostaining was confined to the EGL (Fig. 13a). Cell nuclei were immunonegative, such that a web-like staining pattern resulted. Within the WM, no staining was visible, with the exception of a few blood-vessel associated, roundish structures that were also very intensely and homogeneously stained for Hoechst (Fig. 13a).

At p4, staining of the EGL of all cerebellar lobules appeared stronger than at p0. By now, also the PCL was p75^{NTR} immunopositive (Fig. 13b, c). In the PCL, staining was somewhat diffuse, but the large size of Purkinje cells allowed localizing p75^{NTR} in their cytoplasm surrounding immunonegative nuclei (Fig. 13c). A similar staining pattern was also visible in the DCN (Fig. 13b). No p75^{NTR}-positive structures could be detected in the prospective WM (Fig. 13b, c) at p4.

At p6, p75^{NTR} immunoreactivity had generally increased, but the overall pattern of staining was identical to that described for p4. Purkinje neurons and the EGL were immunopositive in all cerebellar lobules (Fig. 13d), as were cells in the DCN (not shown). By now, delineation of individual cells based on their p75^{NTR} staining was clear-cut, particularly for Purkinje cells. No distinct p75^{NTR} immunosignal could be detected within the WM (Fig. 13d).

At p8, p75^{NTR} staining of the EGL had become weak, while Purkinje cells were still strongly p75^{NTR} immunopositive, particularly in the medial lobules (Fig. 13e, f). Purkinje cell staining in the anterior and posterior lobules was somewhat weaker. Again, no well localized p75^{NTR} immunosignal could be detected in the WM (Fig. 13e).

To better distinguish between true immunosignals and those due to nonspecific background staining, notably in Pax2 cells, we resorted to a (semi-) quantitative analysis. This was done using sections from p8 animals, since at this age, various layers can be well separated, and Pax2 cells may be found in all of these layers except the EGL. We selected areas from lobules 4/5 in which the borders between individual layers run essentially parallel. This allowed to average staining intensity along lines of pixels from the white matter to the EGL that transected layers perpendicularly. For each section analyzed, some 500–600 of such line scans were averaged, such that they may be interpreted as a profile of staining intensity. A typical image is shown in Fig. 14a, along with the resulting density scan (Fig. 14b) for p75^{NTR}. This may be

contrasted to the density of Pax2 cells, measured by GFP expression levels, and the average cell density, as assessed by nuclear staining. This approach confirmed that p75^{NTR} expression is essentially limited to Purkinje cells and cells in the EGL, whereas expression levels in the nascent IGL and in the nascent WM are very low. Indeed, focusing on the channel representing the p75^{NTR} immunosignal (red; shown in isolation in Fig. 14c) does not suggest any particular cellular structures enriched for p75^{NTR} immunoreactivity in these layers. This is in clear contrast with the “perinuclear” staining seen in the EGL. Significantly, we could not detect any p75^{NTR} signal (above background staining) in areas occupied by Pax2-GFP-positive perikarya, neither in the IGL nor in the nascent WM (compare Fig. 14, panels d and e).

At p15, p75^{NTR} is only detectable in Purkinje cells of the medial lobuli (Fig. 13g). There, areas with intensely p75^{NTR}-positive cells contrasted with unstained areas. The transition between p75^{NTR}-positive and p75^{NTR}-negative Purkinje cells within these lobules was marked by a sharp border (Fig. 13g). In 28-day-old and adult mice, no p75^{NTR}-positive structures could be found in the cerebellum (not shown).

Exemplary views from costaining for Pax2 and p75^{NTR} are shown in Fig. 14. We could not detect any Pax2 cell positive for p75^{NTR}, at any age; nor could we detect p75^{NTR}-positive structures in the WM showing any association with Pax2 cells.

Discussion

We compared the developmental distribution, in the early postnatal cerebellum, of Pax2-defined precursors of cerebellar inhibitory interneurons with that of cerebellar macro- and microglial cells. We also analyzed the distribution of proliferating cells and cells expressing the neurotrophin receptor, p75^{NTR}, during this developmental period. Our results document that early-migrating Pax2 cells reach the cerebellar cortex well before most of the (glial) maturation markers analyzed are expressed in the cerebellar anlage. As development proceeds, migrating precursors of cerebellar inhibitory interneurons have to navigate an environment that is increasingly populated by maturing glia.

The time course of Pax2-GFP expression and the distribution of Pax2 cells within the early postnatal cerebellar anlage described here is consistent with previous results [9, 11] and underlines the utility of this marker to follow the development of cerebellar inhibitory interneurons. The one exception here is the presence of Pax2-GFP-positive cells within the meningeal surface (visible in Fig. 2, panels a, b). The nature of these cells is unknown, although their appearance suggests that they might be vascular cells. It has been suggested that endothelial cells might express Pax2 [29]. While there is no independent evidence that the transgene used here is expressed in vascular cells [11, 18], we note that this would not affect the

interpretation of our findings. Pax2-GFP-positive cells within the cerebellar anlage may be faithfully considered precursors of inhibitory interneurons.

CNP and MBP are two established markers to follow oligodendrocyte development, with CNP as the earliest known myelin-specific protein expressed by cells of the oligodendrocyte lineage [19, 20]; in contrast, MBP becomes detectable immediately before formation of the myelin sheath begins [19, 23], and thus indicates the final differentiation of these cells. The spatio-temporal pattern of expression of both of these markers indicates that, as previously documented in chicken [30], and surmised for rat [24, 31], murine cerebellar oligodendrocytes also immigrate into the cerebellar anlage through the velum medullare (superius). From there, they disperse throughout the cerebellar anlage, except into the layers above the PCL, within about 8 days.

The differential time course described above for the appearance and distribution of Pax2 cells and the oligodendrocyte differentiation markers, CNP-1 and MBP, clearly indicate that many Pax2 cells reach the cerebellar cortex prior to the arrival/differentiation of CNP-1- and/or MBP-defined oligodendroglia in the cerebellar anlage, i.e., prior to about p4/6. Consequently, these cells are not exposed to CNP-1 and/or MBP-defined oligodendrocytes during their migration and early settling. In contrast, Pax2 cells traversing the nascent WM after p4/6 navigate a territory characterized by increasing density of CNP-1- and/or MBP-positive cells and extensively mingle with them (for p4/6 see Fig. 7a; for p8, Fig. 7b–e).

Comparison of the distribution of these oligodendrocyte maturation markers with that of Pax2 cells, notably at p8 (Fig. 2 and Figs. 4 and 5; Fig. 7b–f for double labeled sections), documents that increasingly mature glial cells do not preclude the migration of Pax2 cells. Nor do they seem to “push out” Pax2 cells from the maturing WM. This is also confirmed by the extensive mingling of Pax2 cells and CNP and MBP-positive glia seen in double-stained sections (Fig. 7b–f).

The ablation of cerebellar oligodendrocytes during the first postnatal week, but not later, has been shown to result in extensive loss of basket and stellate cells [32]. Results by these authors also suggest that the loss of oligodendrocytes might cause a premature emigration of interneuronal precursors from the nascent WM, and possibly their premature differentiation in the IGL. In addition, it is known that myelinating oligodendrocytes powerfully inhibit neurite growth [33]. Together, these findings suggest that oligodendrocytes inhibit the (premature) exit of Pax2 cells and their differentiation, specifically of those Pax2-positive interneuron precursors that transit the nascent WM for protracted periods. Previous experiments (cf [34] and references given there) have established that Pax2 cells follow an internal clock, set in fact by the expression of Pax2. The present findings, together with the evidence obtained from oligodendrocyte-ablation studies (cf above), suggest/indicate that maturing cerebellar glia can reset this clock.

Fig. 8 Expression of GFAP in the early postnatal cerebellum (p4–p6). **a–c** GFAP-immunoreactivity can first be seen on p4 in the velum medullare and adjoining region of the cerebellar anlage (**a**, red). A few GFAP-positive cells can also be detected in the central WM surrounding the DCN (star) and at the bases of all lobules. Within lobules, the prospective WM is essentially devoid of GFAP-positive cells (**a**, red) with the exception of the posterior lobules (**b**, **c**), where GFAP-positive cells are found up to the tips of the lobular WM (arrows in **b**) and in the cerebellar cortex (**c**). In panel **a**, Pax2 cells are labeled green. Note that the DCN are immunonegative for GFAP. **d**, **e** At p6, the density of GFAP-positive cells (red in **d**) has increased and they can be detected in both the central and lobular WM up to the tips of the individual lobules. The DCN (**e**, star) remain immunonegative for GFAP. In panel **d**, Pax2 cells are labeled green. **f–j** Anterior-posterior differences of GFAP immunoreactivity at p6. In the medial lobules (**f**, tip of lobule 4; **g**, basis of lobule, 4; **i**, lobule 6/7), only a few Bergmann glia are immunopositive for GFAP, and only a few GFAP-positive cells can be detected in the IGL. In the posterior lobules (**j**), Bergmann glia and astrocytes in the IGL show stronger staining. Note, however, that the density of GFAP-positive cells in the lobular white matter seems to be higher in medial than in posterior lobules. Panel **h** shows part of the anterior lobule 3 stained for GFAP (red) and Pax2 (green). Scale bar (in **j**) = 160 μ m for panels **a**, **b**, **d**, **i**, **j**; 80 μ m for panels **c**, **f**, **g**; and 210 μ m for panel **e**

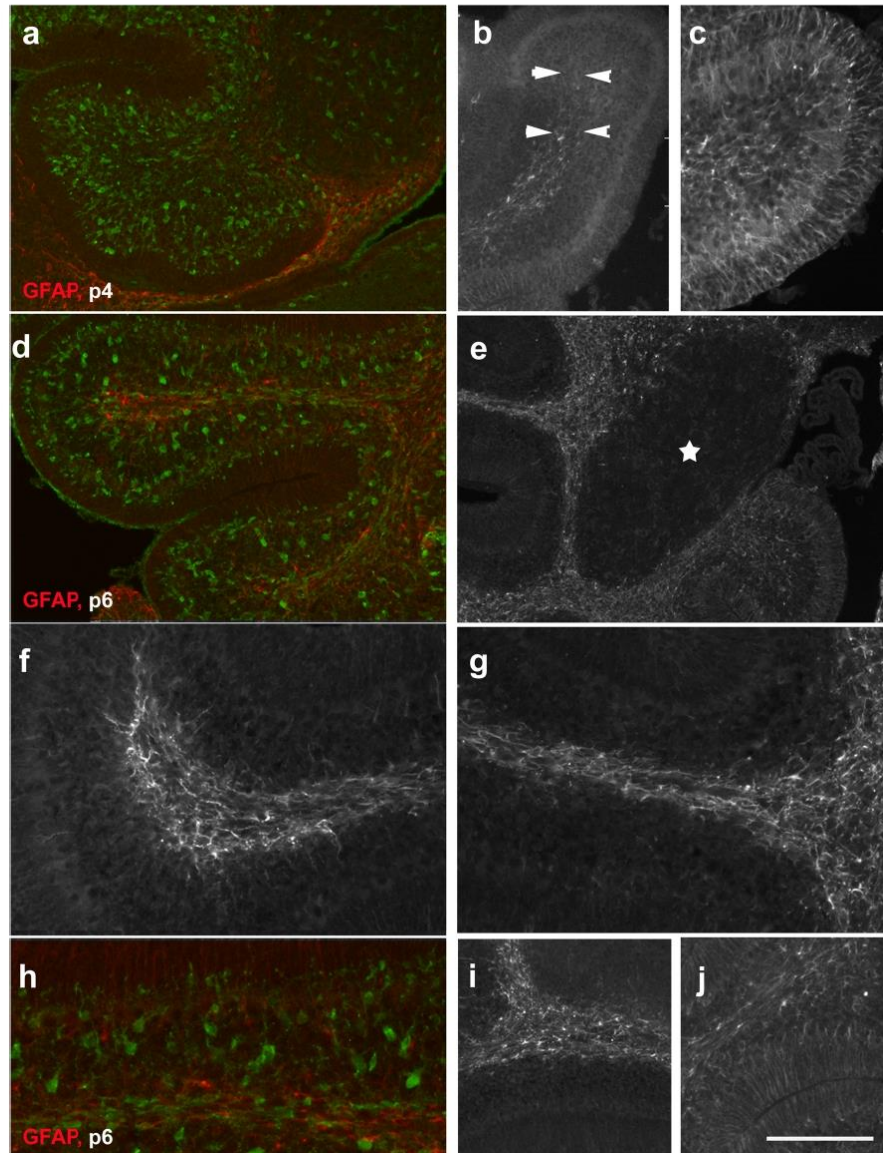
Whereas CNP-1 is a marker that allows following the invasion of prospective oligodendrocytes into the cerebellar anlage, GFAP is certainly not a marker to do the same for all cells that will eventually express this protein. If we may consider, for the moment, all GFAP-positive cells as one group, we may again note that many Pax2 cells reach the ML well before GFAP is expressed.

Expression of GFAP in the various regions of (prospective) WM shows considerable temporal and regional differences, and consequently, so does the mingling of GFAP-positive and Pax2 cells. If Pax2 cell differentiation was affected by GFAP-positive cells in the WM, one might expect also regional differences in terminal differentiation of Pax2 cell-derived interneurons. Such differences have so far not been observed.

On the other hand, it is well established that cerebellar gray matter regions that are populated by distinct types of inhibitory interneurons are also characterized by strikingly different types of astroglia, thus as Bergman glia in the ML, and velate and protoplasmic astrocytes in the IGL (see [35, 36] and [37] for detailed discussion). The yet distinct character of astrocytes in the DCN is again supported by our finding that their hallmark characteristic, i.e., the lack of GFAP expression [38], may be observed throughout their development.

Thus, while the expression pattern of GFAP in the nascent WM does not suggest that GFAP-defined cells differentially affect the fate of Pax2 cells in transit, the local terminal differentiation of Pax2 cells may well be influenced by the distinct types of astrocytes found in the ML, the IGL, or in deep nuclei.

Of all differentiation/cell-type markers analyzed here, Iba-1 is the only one expressed as early as p0 in the nascent white matter. Also, the density of Iba-1 immunoreactive structures decreased with ongoing cerebellar maturation, and their morphology changed from



roundish, amoeboid to ramified, as typical for mature microglia. These latter cells are well known to continuously and actively monitor their environment (cf [39]). Roundish/amoeboid microglia persisted, in the early postnatal cerebellum, preferentially in the distal lobular WM and the IGL.

The distribution and changing morphology of microglia observed presently is fully consistent with the descriptions given by Ashwell et al. [40], by Perez-Pouchoulen [15], and again by Nakayama and colleagues [41]. The temporal changes in microglial density and morphology observed presently support the

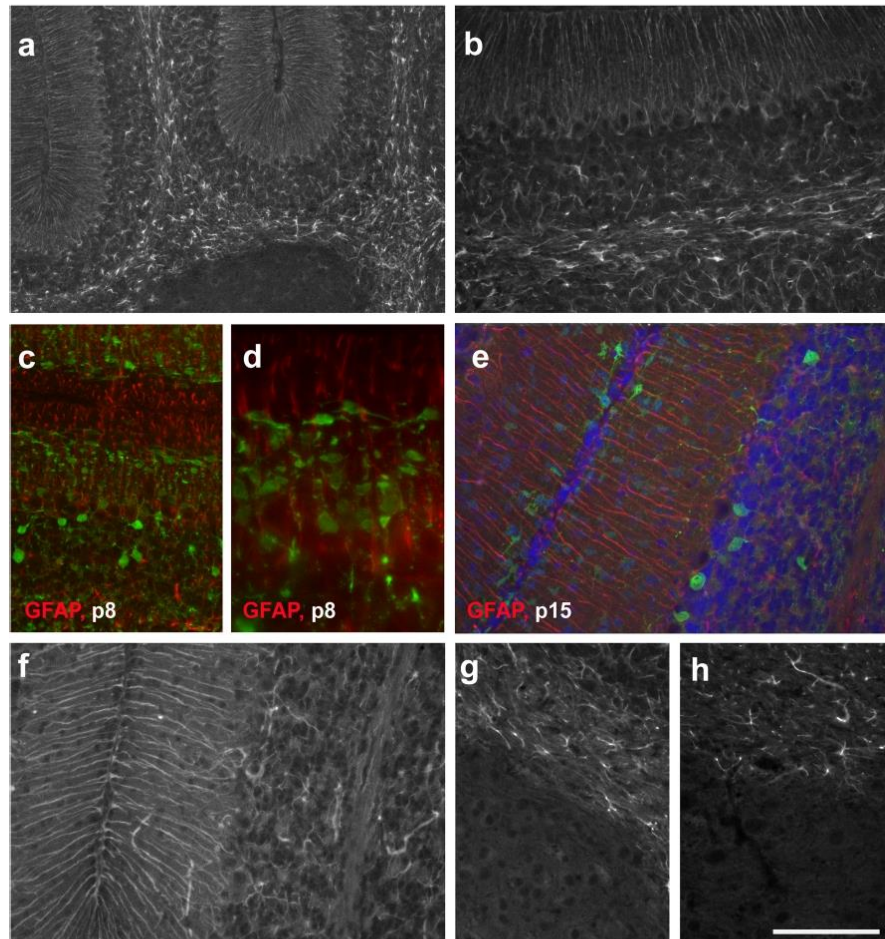


Fig. 9 Expression of GFAP in p8–p28 cerebellum. **a–d** At p8, GFAP-positive cells are found in the central and lobular WM, the IGL and as Bergman glia in the PCL reaching up to the meninges. DCN are GFAP negative. The higher power view shown in **b** documents the layer-specific orientation of GFAP-positive processes. In the ML (**c, d**; GFAP shown in red; Pax2 in green), GFAP-stained Bergmann glial processes are cut preferentially longitudinally, whereas in the EGL, they are cut transversally. Note that processes of Pax2 cells underneath the EGL run essentially perpendicular to those of Bergman glia (**c, d**). **e–g** GFAP-positive

structures in the p15 cerebellar cortex (**e**; GFAP = red; Pax2 = green; nuclei = blue), cortex and adjacent white matter (**f**), and in the central white matter and deep nuclei (**g**). Note that the latter are again immunonegative for GFAP. Note also that strongly Pax2-positive cells are restricted to the IGL and a small strip right underneath the remnant of the EGL at this age. Intemeurons in the deeper ML are only very faintly Pax2-positive. **h** In the p28 cerebellum, the DCN remain immunonegative for GFAP. Scale bar (in panel **h**) = 160 μm for panel **a**, and 80 μm for panels **b–g**

scenario suggested by Nakayama [41] that microglia invade the cerebellar anlage primarily via the nascent WM.

As the shape of Iba-1-positive cells is an indicator of microglial maturity or activation (cf [41]; see also [42–44]), this implies that Pax2 cells reaching the cerebellar cortex early on would be confronted/exposed only to immature (roundish) Iba-1 cells. Pax2 cells that

traverse the WM later on also encounter more mature (ramified) microglia.

The simultaneous presence of microglia and migrating Pax2 cells in the IGL and the nascent ML from day 6/8 onwards is particularly intriguing. On the one hand, it has recently been shown that Pax2 cells en route through these layers form transient synapses that direct their migration. On the other hand, microglia are known to modify or eliminate supernumerary

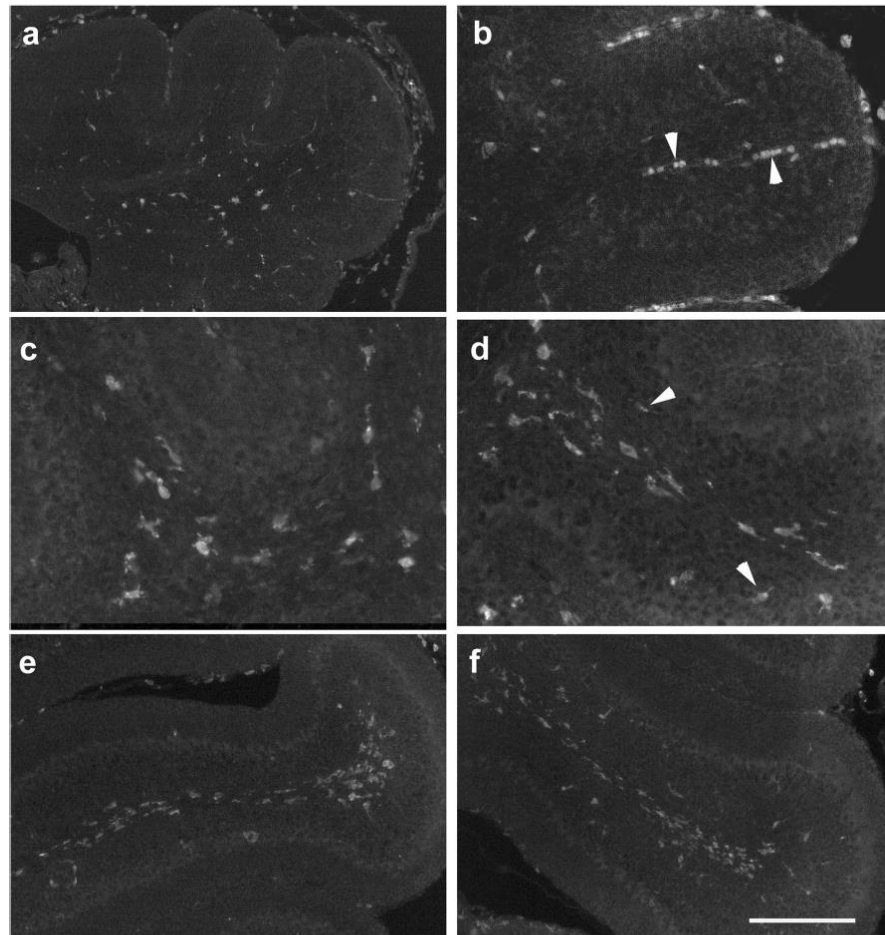


Fig. 10 Iba-1 expression in the cerebellum from p0 to p6. **a, b** Iba-1-positive cells in a midsagittal section of the cerebellum of a newborn (p0) mouse (**a**). Cells appear roundish and are often associated with blood vessels (**b**, arrowheads) and the meninges. **c, d** At p4, Iba-1-positive cells are spread throughout the cerebellar WM up to the tips of individual lobules (**d**). In the IGL, only a very few Iba-1-positive cells can be detected (arrowheads in **d**). Iba-1-positive cells have roundish somata with short, thick processes which are stronger branched than at p0 (**c**). **e, f** At

p6, numerous Iba-1-positive cells are found throughout the WM (**e**, lobule 4; **f**, lobule 8). A few Iba-1-positive cells can also be detected in the IGL up to the PCL. While the cells located in the WM display a thin and straight morphology, cells located in the IGL appear more roundish (**f**). In the tips of the WM of the anterior lobules, roundish Iba-1-positive cells accumulate (**e**, lobule 4). Scale bar (in **f**) = 210 μm for panel **a**; 80 μm for panels **b–d**; and 160 μm for panels **e, f**

synapses (for a review, see [45]). Lastly, Nakayama et al. [41] recently presented data indicating that elimination of microglial ablation resulted in a reduction of GABAergic transmission in the developing cerebellar cortex due to a presynaptic deficiency (i.e., insufficient signaling from basket/stellate cells). Eventually, this resulted also in a reduction of ML thickness [41]. The present findings beg the question whether this might also be due to hindered migration of basket/stellate cell precursors following microglial ablation.

We would also like to draw attention to correlation between the morphological differentiation of microglia and the appearance of GFAP-positive cells. This is best seen in lobular tips, where roundish microglia can be seen first, followed by the appearance of GFAP-positive cells, again followed by a switch of microglia to a ramified morphology. Such a temporal sequence has also been observed in the hippocampus [46]. Indeed, both the proliferation of astroglial precursors and their maturation (GFAP-expression) are stimulated by microglia [47–49]. Conversely, it

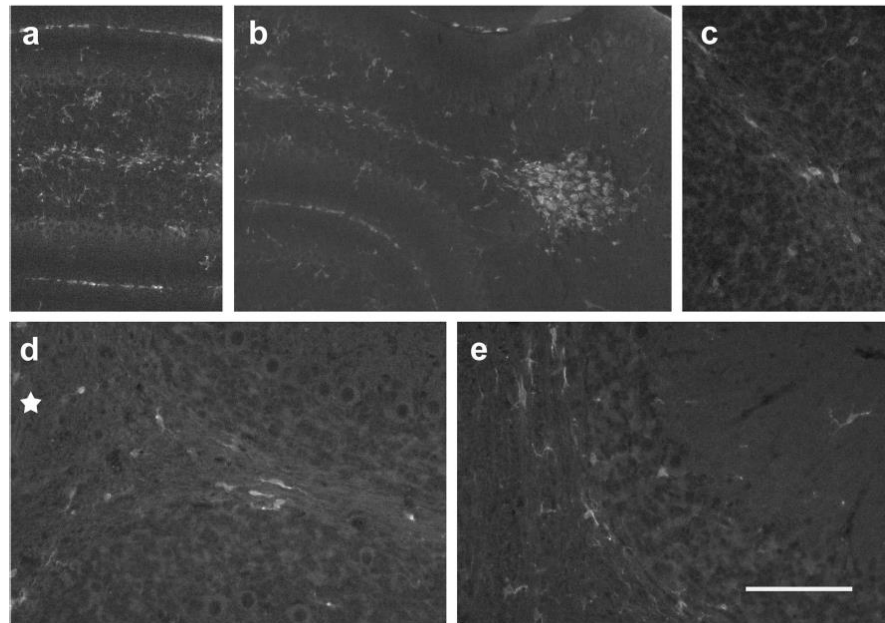


Fig. 11 Iba-1 expression in the cerebellum from p8 to p28. **a, b** Exemplary view of Iba-1-positive cells in the p8 cerebellum taken from lobule 4. In the lobular and central WM, the density of Iba-1 cells is higher than in the IGL. A few Iba-1-positive cells can also be seen in the nascent ML. The meninges are also intensely Iba-1-immunoreactive. Note morphological variability of immunoreactive cells in the cortex and nascent WM. At the tips of the lobular white matter (**b**, to the right),

aggregations of larger, roundish Iba-1-positive somata prevail. **c–e** In the p15 (**c, d**) and p28 (**e**) cerebellum, Iba-1-positive cells are mainly found in the WM, with a few cells also in the IGL, the ML and in the DCN (star in **d**). At p15, they appear mostly as small, longish cells that became increasingly ramified at p28 (compare **d** and **e**). The overall density of Iba-1 cells is lower than at p8. Scale bar (in **e**) = 160 μm for panels **a, b** and 80 μm for panels **c–e**

has been suggested that differentiated astrocytes control microglia maturation [44, 50–52]. This exemplifies that an understanding of Pax2 cell maturation will eventually also require an appreciation of how its various cellular interaction partners may influence each other (cf also [53]).

While the signals by which glial and microglial cells may affect migration and maturation of Pax2 cells remain enigmatic for the moment, Purkinje-cell-derived sonic hedgehog (Shh) is an obvious candidate that might impinge on Pax2 cells in transit through the white matter. Fleming et al. [12] have previously shown that proliferation of precursors of both glial and Pax2 cells (or rather, their precursors) in the prospective WM is sensitive to Shh, as verified by a Gli1-based transgene. Induction of p75^{NGF} was recently identified as another readout for Shh signaling in granule cells [28].

Whereas we could detect an unambiguous p75^{NTR} signal in those regions of the cerebellum where it had been described before, viz., proliferative, Shh-sensitive granule cell precursors [28] and, from p4 onward, in Purkinje cells [54], we could not detect Pax2 cells that also stained for p75^{NTR}. The few very intensely

p75^{NTR}-stained structures in the prospective WM also showed strong and homogenous nuclear staining for Hoechst, suggesting/indicating that these are apoptotic cells, possibly aberrant granule cells that have been suggested to be eliminated by MAG/p75^{NTR}-triggered apoptosis [55]. They also differed from p75^{NTR}-positive granule cell precursors and Purkinje cells in that the p75^{NTR} signal completely colocalized with their condensed nuclei.

Together, these findings indicate that precursors within the prospective WM that will eventually mature and populate the cerebellum do not express p75^{NTR}, at least not at levels detectable by immunostaining. Moreover, as Pax2 cells, like their Pax2-negative precursors, are sensitive to Shh [56], this implies that Shh-signal processing in these cells diverges from that in granule cell precursors. Unfortunately, the technical tools to identify canonical Gli1 expression at the cellular level are not yet available to follow up on this issue. Finally, these findings also suggest that precursors in the WM may not give origin to p75^{NTR}-positive medulloblastoma [57], though more direct evidence would be required to strengthen this idea.

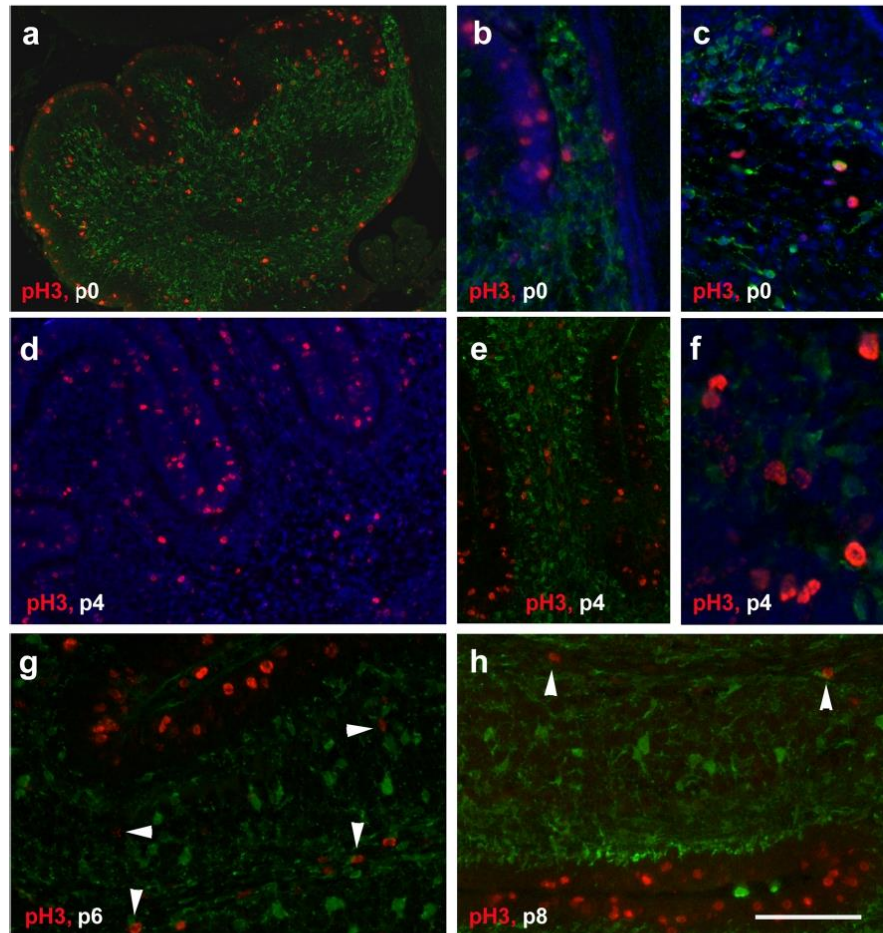


Fig. 12 Phosphohistone H3 p0–p8. **a–c** In the newborn cerebellum, cells marked by pH3 (red) are detectable throughout the cerebellum including the velum medullare (**b**), with the highest density in the EGL (**a**). Pax2 cells are marked in green. Panel **c** shows one of the very few Pax2 cells also being positive for pH3 seen at any age studied. **d–f** At p4, pH3-positive cells are found throughout the cerebellum, but again preferentially in the EGL (**d, e**). The WM also comprises a higher density of pH3 expressing cells than the IGL, the ML or the DCN. pH3-positive cells

within the WM show variable staining intensity and patterns (**f, g, h**). At p6 (**g**) and again at p8 (**h**), numerous pH3-positive cells remain in the EGL, but such cells are also found in the (prospective) WM (vertical arrowheads in **g, h**). A few pH3-positive cells can also be seen in the IGL (horizontal arrowheads in **g**). In panels **b–d** and **f**, cell nuclei are counterstained with Hoechst (blue). Scale bar (in **h**) = 210 μ m for panel **a**; 80 μ m for panels **b, c, g, h**; 160 μ m for panels **d, e**; and 40 μ m for panel **f**

To monitor the mitotic activity of Pax2 cells, or their spatial relationship with proliferating cells, we stained sections for phosphohistone H3. The fact that we found only very rare Pax2 cells that also stained for pH3 fully agrees with previous findings that expression of Pax2 essentially starts in postmitotic precursors of inhibitory cerebellar interneurons (Pax2 cells) [10, 11, 56]. Further, we could not identify any spatial correlation between Pax2 cells and proliferating cells.

The one exception of this is the well-known exclusion of Pax2-positive cells from the proliferative active EGL.

Conclusions

The present study relates the formation and migration of Pax2-defined precursors of cerebellar inhibitory interneuron to the

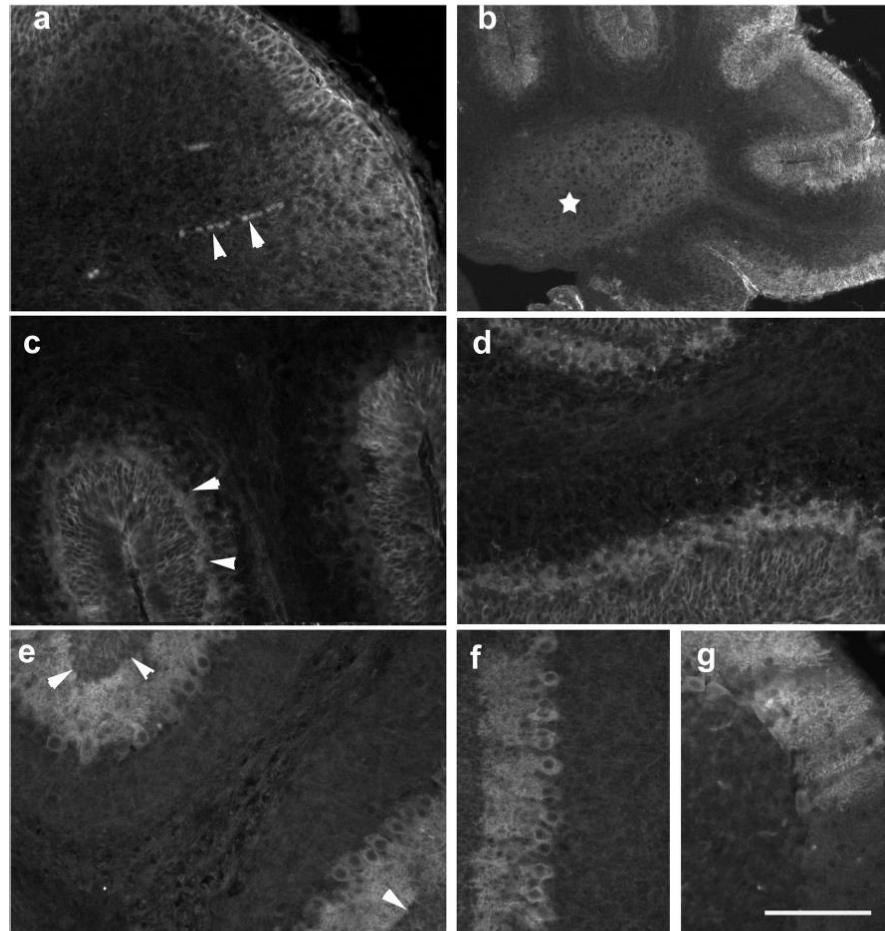


Fig. 13 $p75^{NTR}$ immunoreactivity in the developing cerebellum. **a** At p0, only the EGL is immunopositive for $p75^{NTR}$. Note that cell nuclei are immunonegative, resulting in a web-like staining pattern. Within the prospective WM (visible in the lower left part of the image), no $p75^{NTR}$ -stained structures are visible. Roundish, blood-vessel associated, $p75^{NTR}$ -positive structures are marked by arrowheads. **b, c** Four days later, $p75^{NTR}$ staining is strongest in the EGL. A somewhat diffuse staining can also be seen within the PCL. Nuclei of Purkinje cells are immunonegative (arrowheads in **c**). Immunonegative nuclei also stand out within the rather homogeneously $p75^{NTR}$ -stained DCN (marked by a star in **b**). The nascent WM is $p75^{NTR}$ -immunonegative. Panel **c** shows the basis of lobule 4/5. **d** At p6, $p75^{NTR}$ -staining is strongest in Purkinje

cells, and again clearly visible in the EGL. In contrast, the developing WM remains immunonegative. Exemplary view of the basis of lobule 4/5. **e, f** At p8, Purkinje cells, especially in the medial lobules, still show strong staining for $p75^{NTR}$, while staining in the EGL (visible along the left margin in panel **f**; and marked by arrowheads in **e**) has become weaker than at p6. As at younger ages, the WM remains immunonegative. **e** shows the basis of lobule 4/5; **f** shows an area of lobule 6/7. **g** At p15, only Purkinje cells in discrete areas of the medial lobules remain immunopositive for $p75^{NTR}$. The transition between strongly stained and immunonegative cells is rather well demarcated. Scale bar (in panel **g**) = 80 μm for panels **a, c–g** and 210 μm for panel **b**

neurochemical maturation and dispersion of cerebellar glia, including microglia. Pax2 cells traversing the nascent WM at different times are confronted with a progressively changing complement of macro- and microglial cells, and might be exposed to dynamically changing signals emanating from these cells. While the present findings do not inform us as to

the nature of the signaling molecule(s) that in fact can even reprogram heterochronically transplanted Pax2 cells to the hosts laminar fate [10], they narrow down likely sources of these developmental regulators. They also suggest that signaling molecules differentially affecting Pax2 cells that reach the cerebellar cortex at different developmental stages should be

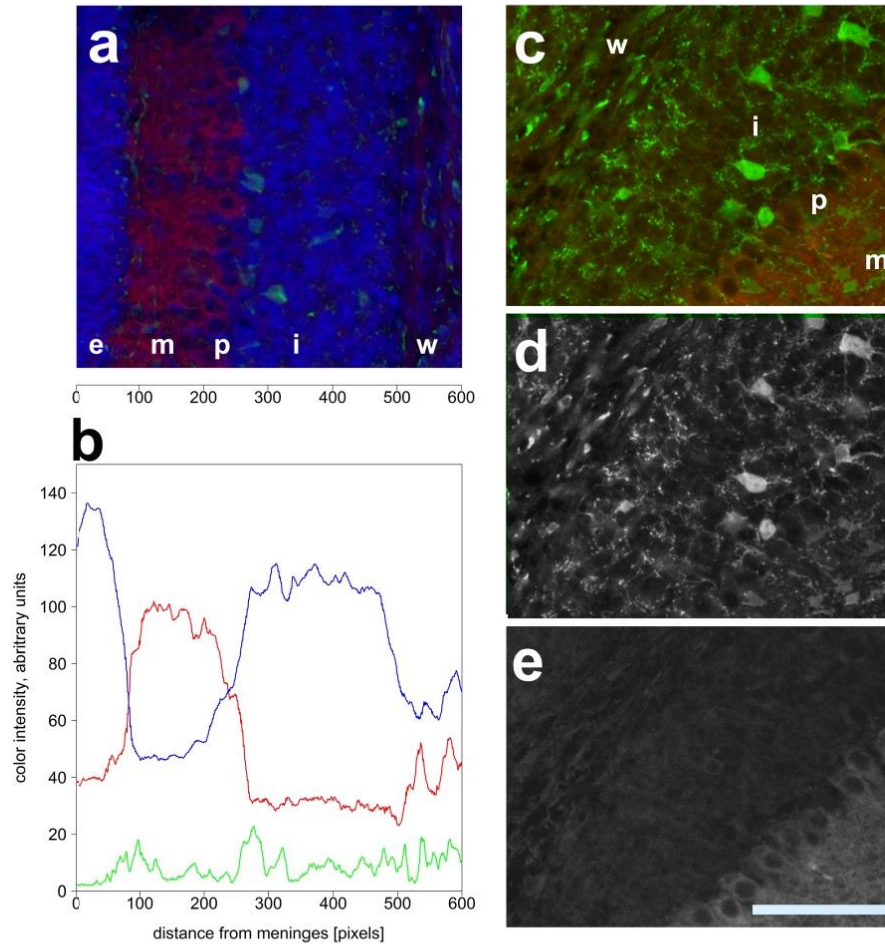


Fig. 14 Quantitative definition of p75^{NTR} immunoreactivity in the cerebellar cortex. **a** Area from lobule 4/5 of a p8 cerebellum stained for p75^{NTR} (red), Pax2 (green) and nuclei (Hoechst, blue). Cortical layers are marked as follows: e, EGL; m, ML, p, PCL, i, IGL; and w, (prospective) WM. Numbers underneath the panel indicate positions from the EGL to the WM in pixels (for comparison with panel **b**). **b** Density scan of the

image shown in panel **a**. **c–e** High power view from lobule 4/5 stained for Pax2 (green) and p75^{NTR} (red). Individual channels are shown in **d** (Pax2) and **e** (p75^{NTR}). Note that no p75^{NTR} signal can be detected in or close to areas positive for Pax2, neither in the IGL (i) nor in the nascent WM (w). Scale bar (in panel **e**) = 80 μm in panels **a**, **c–e**

coregulated with glial differentiation markers such as the ones studied here. Finally, the continued intermingling of Pax2 cells and various types of glia in the nascent white matter throughout development indicates that maturing glia do not provide Pax2 cells with a signal that triggers their exit from the white matter.

Acknowledgments The authors are very grateful to Stefanie Ramrath for excellent technical help, and to Daniela Krauss and Narziss Haias for providing animal husbandry. Anne Groteklaes is a fellow of the Deutsche Studienstiftung and the Evangelische Studienwerk.

Funding Information Open Access funding provided by Projekt DEAL. Anne Groteklaes is supported by the Evangelische Studienwerk.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical Approval All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Beckinghausen J, Sillitoe RV. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci Lett*. 2019;688:2–13.
- Ramon y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, vol. II. Paris: A. Maloine; 1909.
- Alder J, Cho NK, Hatten ME. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule cell identity. *Neuron*. 1996;17:389–99.
- Fink AJ, Englund C, Daza RA, Pham D, Lau C, Nivison M, et al. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci*. 2006;26:3066–76.
- Carletti B, Rossi F. Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist*. 2008;14:91–100.
- Leto K, Arancillo M, Becker EB, Buffo A, Chiang C, Ding B, et al. Consensus paper: cerebellar development. *Cerebellum*. 2016;15:789–828.
- Leto K, Carletti B, Williams IM, Magrassi L, Rossi F. Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. *J Neurosci*. 2006;26:11682–11,694.
- Zhang L, Goldman JE. Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron*. 1996;16:47–54.
- Maricich SM, Herrup K. Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol*. 1999;41:281–94.
- Leto K, Bartolini A, Yanagawa Y, Obata K, Magrassi L, Schilling K, et al. Laminar fate and phenotype specification of cerebellar GABAergic interneurons. *J Neurosci*. 2009;29:7079–91.
- Weisheit G, Gliem M, Endl E, Pfeffer PL, Busslinger M, Schilling K. Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci*. 2006;24:466–78.
- Fleming JT, He W, Hao C, Ketova T, Pan FC, Wright CC, et al. The purkinje neuron acts as a central regulator of spatially and functionally distinct cerebellar precursors. *Dev Cell*. 2013;27:278–92.
- Leto K, Bartolini A, Rossi F. The prospective white matter: an atypical neurogenic niche in the developing cerebellum. *Arch Ital Biol*. 2010;148:137–46.
- Cerrato V, Buffo A. Gliogenesis. In: Manto M, Gruol DL, Schmahmann J, Koibuchi N, Sillitoe RV, editors. *Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders*. Cham: Springer; 2019.
- Perez-Pouchoulen M, VanRyzin JW, McCarthy MM. Morphological and phagocytic profile of microglia in the developing rat cerebellum. *eNeuro*. 2015;2:eN.0036.
- Vela JM, Dalmau I, Gonzalez B, Castellano B. Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol*. 1995;361:602–16.
- Araujo APB, Carpi-Santos R, Gomes FCA. The role of astrocytes in the development of the cerebellum. *Cerebellum*. 2019;18:1017–35.
- Pfeffer PL, Payer B, Reim G, di Magliano MP, Busslinger M. The activation and maintenance of Pax2 expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separate enhancers. *Development*. 2002;129:307–18.
- Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001;81:871–927.
- Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu JM, Privat A. Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J Neurosci*. 1988;8:3057–66.
- Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD. Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron*. 1994;12:1353–62.
- Zou Y, Jiang W, Wang J, Li Z, Zhang J, Bu J, et al. Oligodendrocyte precursor cell-intrinsic effect of Rheb1 controls differentiation and mediates mTORC1-dependent myelination in brain. *J Neurosci*. 2014;34:15764–78.
- Brunner C, Lassmann H, Wachneldt TV, Matthieu J, Linington C. Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem*. 1989;52:296–304.
- Reynolds R, Wilkin GP. Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development*. 1988;102:409–25.
- Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1985;8:203–14.
- Ahmed Z, Shaw G, Sharma VP, Yang C, McGowan E, Dickson DW. Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:687–700.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997;106:348–60.
- Kuchler J, Hartmann W, Waha A, Koch A, Endl E, Wurst P, et al. p75(NTR) induces apoptosis in medulloblastoma cells. *Int J Cancer*. 2011;128:1804–12.
- Ghazanfari FA, Stewart RR. Characteristics of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture. *Brain Res*. 2001;890:49–65.
- Mecklenburg N, Garcia-Lopez R, Puelles E, Sotelo C, Martinez S. Cerebellar oligodendroglial cells have a mesencephalic origin. *Glia*. 2011;59:1946–57.
- Curtis R, Cohen J, Fok-Seang J, Hanley MR, Gregson NA, Reynolds R, et al. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. *J Neurocytol*. 1988;17:43–54.
- Mathis C, Collin L, Borrelli E. Oligodendrocyte ablation impairs cerebellum development. *Development*. 2003;130:4709–18.
- Kapfhammer JP, Schwab ME. Inverse patterns of myelination and GAP-43 expression in the adult CNS: neurite growth inhibitors as regulators of neuronal plasticity? *J Comp Neurol*. 1994;340:194–206.
- Sotelo C. Molecular layer interneurons of the cerebellum: developmental and morphological aspects. *Cerebellum*. 2015;14:534–56.
- Buffo A, Rossi F. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol*. 2013;109:42–63.

36. Parmigiani E, Leto K, Rolando C, Figueres-Onate M, Lopez-Mascaraque L, Buffo A, et al. Heterogeneity and bipotency of astroglial-like cerebellar progenitors along the interneuron and glial lineages. *J Neurosci*. 2015;35:7388–402.
37. Cerrato V, Parmigiani E, Figueres-Onate M, Betizeau M, Aprato J, Nanavaty I, et al. Multiple origins and modularity in the spatiotemporal emergence of cerebellar astrocyte heterogeneity. *PLoS Biol*. 2018;16:e2005513.
38. Tatsumi K, Isonishi A, Yamasaki M, Kawabe Y, Morita-Takemura S, Nakahara K, et al. Olig2-lineage astrocytes: a distinct subtype of astrocytes that differs from gfap astrocytes. *Front Neuroanat*. 2018;12:8.
39. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005;308:1314–8.
40. Ashwell K. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res*. 1990;55:219–30.
41. Nakayama H, Abe M, Morimoto C, Iida T, Okabe S, Sakimura K, et al. Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. *Nat Commun*. 2018;9:2830.
42. DiBona VL, Zhu W, Shah MK, Rafalia A, Ben CH, Crockett DP, et al. Loss of Par1b/MARK2 primes microglia during brain development and enhances their sensitivity to injury. *J Neuroinflammation*. 2019;16:11–1390.
43. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:3.
44. Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Front Hum Neurosci*. 2016;10:566.
45. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013;77:10–8.
46. Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol*. 1997;377:70–84.
47. Antony JM, Paquin A, Nutt SL, Kaplan DR, Miller FD. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J Neurosci Res*. 2011;89:286–98.
48. Giuliani D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci*. 1988;8:709–14.
49. Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Microglia-derived interleukin-6 and leukemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci*. 2007;25:649–58.
50. Pont-Lezica L, Bechade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A. Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem*. 2011;119:901–8.
51. Rezaie P. Microglia in the human nervous system during development. *Neuroembryol Aging*. 2003;2:18–31.
52. Tanaka J, Maeda N. Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp Neurol*. 1996;137:367–75.
53. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci*. 2014;34:2231–43.
54. Rahimi BM, Jiao X, Ashtari N, Afsharinezhad P, Ghavami S, Marzban H. Cerebellar expression of the neurotrophin receptor p75 in naked-ataxia mutant mouse. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):115. <https://doi.org/10.3390/ijms17010115>.
55. Fernandez-Suarez D, Krapacher FA, Andersson A, Ibanez CF, Kisiswa L. MAG induces apoptosis in cerebellar granule neurons through p75(NTR) demarcating granule layer/white matter boundary. *Cell Death Dis*. 2019;10:732–1970.
56. de Luca A, Cerrato V, Fuca E, Parmigiani E, Buffo A, Leto K. Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73:291–303.
57. Pietsch T, Haberler C. Update on the integrated histopathological and genetic classification of medulloblastoma - a practical diagnostic guideline. *Clin Neuropathol*. 2016;35:344–52.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zahlreichen Menschen herzlich danken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Karl Schilling. Dieser hat mir das hier vorgestellte spannende Projekt ermöglicht. Die zahlreichen hilfreichen und inspirierenden Gespräche und Diskussionen mit ihm zu wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Themen sowie seine wertvollen Ratschläge haben mir sehr geholfen und nicht nur diese Arbeit, sondern auch mein weiteres medizinisches und wissenschaftliches Verständnis und Arbeiten geprägt. Ich hatte zu jeder Zeit einen sehr hilfsbereiten Ansprechpartner, der mich mit starkem persönlichen Einsatz durch die Jahre der Promotion begleitet und unterstützt und eine mir sehr lehrreiche Zeit ermöglicht hat.

Außerdem möchte ich meiner Arbeitsgruppe besonders danken, welche mir insbesondere während der experimentellen Arbeiten mit Ratschlägen und steter Hilfsbereitschaft, aber auch einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre mit schönen gemeinsamen Momenten zur Seite stand.

Insbesondere danken möchte ich Britta Eiberger für die Einführung und die Begleitung beim Arbeiten mit Versuchstieren sowie dem Präparieren und Einbetten der Kleinhirne, Carina Bönisch und Andrea Christ für die Unterstützung im Erlernen immunhistochemischer Arbeitsweisen und steter Hilfsbereitschaft während der experimentellen Arbeiten und Carina Bönisch für die Einführung in die Mikroskopie und Fotografie angefertigter Präparate. Stefanie Ramrath und Antonia van Rienen standen mir mit steter Hilfsbereitschaft zur Seite. Iboika Haias danke ich für die Arbeit mit den Versuchstieren.

Auch allen anderen Kollegen aus dem Anatomischen Institut der Universität Bonn danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und eine sehr erlebnisreiche und schöne Zeit.

Außerdem möchte ich Herrn PD Roland Jabs vom Institut für zelluläre Neurowissenschaften für die Einführung in den Umgang mit dem Konfokalmikroskop seiner AG sowie der Möglichkeit, dieses für meine Untersuchungen zu nutzen, herzlich danken.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich dafür, dass sie mich jederzeit liebevoll unterstützt und ermutigt haben sowie für ihre unermessliche Geduld.

Meine Freunde haben mit dem Schaffen einer wissenschaftlich interessierten Atmosphäre, aber insbesondere auch mit den vielen schönen Zeiten außerhalb des Labors immer wieder meine Motivation gestärkt und mich unterstützt. Besonders danken möchte ich hierbei Joel, Anna, Diana, Henrik (insbesondere für die vielen Mittagspausen, die mich im Laboralltag sehr motiviert haben), Stefan, Thomas und Kathrin (insbesondere für die Durchsicht dieser Arbeit), Johanna T., Ilse und meinem Bonner und Ostheldener Freundeskreis, welche mich stets unterstützt haben.