

Der Einfluss von Entzündungsreaktionen auf die Reifung von Engrailed-2 überexprimierenden, zerebellären Purkinjezellen in Gewebekulturen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Mohammed Bahaeldin

aus Kairo/Ägypten

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Baader
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Schlee

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.05.2025

Aus dem Anatomischen Institut, Anatomie und Zellbiologie

Meinen Eltern, die mir den Weg geebnet haben

Meinen Geschwistern, die mich begleitet haben

Meinen Großeltern, auch jene, die mich verlassen haben

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	14
1.4	Diskussion	18
1.5	Zusammenfassung	22
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	23
2.	Veröffentlichung	29
3.	Danksagung	30

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ASD	Autismus-Spektrum-Störung
Calb1	Calbindin D-28k
CSF1R	Colony-Stimulating-Factor-1-Rezeptors
DIV	Tage in vitro (<i>Days In Vitro</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EN2	Engrailed-2
Fig	Abbildung (<i>figure</i>)
FVB/N	Friend Virus B NIH Jackson
Iba1	Ionized calcium-binding adaptor molecule 1
IFN-g	Interferon Gamma
L7En-2	Pcp-2(L7)-Engrailed-2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PC	Purkinjezelle
PLX3397	Pexidartinib
Tg	transgen
TNFa	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TNFaR	Tumor Nekrose Faktor Alpha Rezeptor
Wt	Wildtyp

1. Deutsche Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beruht auf der Publikation „Engrailed-2 and inflammation convergently and independently impinge on cerebellar Purkinje cell differentiation“ und soll den Anteil des Autors der hiesigen Dissertation an der Publikation vorstellen. Die Publikation wurde in einem international anerkannten Journal mit Begutachtungssystem veröffentlicht („Journal of Neuroinflammation“, Impact-Faktor: 9.3 (2023)). Die Verweise auf englischsprachige Abbildungen (figures) und Tabellen (tables) beziehen sich auf die englischsprachige Publikation. Gleichnamige deutsche Bezeichnungen nehmen Bezug auf die Zusammenfassung.

1.1 Einleitung

Autismus-Spektrum-Störung (ASD) ist eine Entwicklungsstörung, die häufig bei Kindern im Alter von bis zu drei Jahren diagnostiziert wird. Die Bandbreite der Symptome kann von milden Auffälligkeiten bis hin zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen reichen. Obwohl das autistische Spektrum weit gefächert ist, werden diese Kinder meist durch einen Mangel an sozialen Interaktionen, durch stereotype Verhaltensweisen und Sprachstörungen auffällig. In den letzten Jahren hat die Prävalenz von ASD zugenommen, was sowohl auf eine verbesserte Diagnostik als auch auf ein wachsendes öffentliches Bewusstsein für diese Erkrankung zurückzuführen ist (Zeidan et al., 2022). Die Ursachen von ASD sind nach wie vor nicht vollständig verstanden, und es wird eine Vielzahl von Faktoren diskutiert, die zur Entstehung dieser Störung beitragen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass sowohl extrinsische als auch genetische Einflüsse eine Rolle spielen und in unterschiedlichem Maße miteinander interagieren; eine multifaktorielle Genese der Erkrankung wird angenommen.

Als Ursache der Entstehung von ASD wurden zahlreiche genetische Polymorphismen diskutiert, hierunter eine Variation im Intron des Engrailed-2-Gens (EN2). (Soltani et al., 2017; Wang et al., 2008). EN2 ist ein Homöobox-Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielt. Ursprünglich wurde für EN2 eine zentrale Rolle für die physiologische Musterbildung im Kleinhirn beschrieben (Millen et al., 1994). Seitdem wurden zahlreiche Funktionen für das Gen entdeckt, beispielsweise bei der axonalen

Verschaltung von retinalen Zellen (Brunet et al., 2005). Außerdem ist EN2 ein wichtiger Überlebensfaktor für mesenzephal dopaminerge Neurone (Simon et al., 2004).

Eine Fehlregulation von EN2, beispielsweise durch übermäßige Expression wie in L7En-2 Mäusen, kann jedoch zu spezifischen Defiziten führen, einschließlich eines Verlusts von Purkinjezellen und einer verzögerten Entwicklung der äußeren Keimschicht an den Übergangsbereichen der Kleinhirnlappen (Baader et al., 1998). EN2 reguliert die perinatale Differenzierung von Purkinjezellen negativ und steuert damit die zeitliche Abstimmung der zellulären Entwicklung (Jankowski et al., 2004). Physiologisch kommt es perinatal zu einer verminderten EN2 Expression, was essenziell für die normale PC-Entwicklung ist (Davis et al., 1988). Zusätzlich führt eine EN2-Überexpression zu einer gestörten PC-Morphologie in vivo mit reduzierter durchschnittlicher Größe und eingeschränkter Verzweigung des Dendritenbaums.

Neben der genetischen Prädisposition rücken extrinsischen Ursachen für einen alternierende neuronale Differenzierung in jüngeren Arbeiten zunehmend in den Fokus. So ist aus klinischen Beobachtungen bekannt, dass Entzündungsprozesse während der Schwangerschaft autistische Erscheinungsformen fördern (de Theije et al., 2014). Die Vorstellung ist, dass Entzündungsmediatoren die Entwicklung von Neuronen und damit die synaptische Verschaltung im jungen Organismus stören (Bokobza et al., 2019). Von zahlreichen Zytokinen und Immunmodulatoren, die bei der neuronalen Inflammation mitwirken, ist der Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) ein häufig genannter Mediator (Becher et al., 2017). TNF α ist ein Entzündungsmediator, der bei zahlreichen Erkrankungen wie zum Beispiel Psoriasis oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen eine zentrale Rolle spielt (Bradley, 2008). Im zentralen Nervensystem wird TNF α unter anderem von Mikrogliazellen synthetisiert und nach inflammatorischen Prozessen im Gehirn sezerniert (Sawada et al., 1989). TNF α beeinflusst die Differenzierung von Nervenzellen und die synaptische Plastizität (Olmos und Lladó, 2014; Rizzo et al., 2018). Vor allem ist bekannt, dass TNF α den programmierten Zelltod in Purkinjezellen (PCs), einer speziellen Neuronengruppe im Kleinhirn, die für die Verschaltung und Verrechnung aller afferenten zerebellären Informationen zuständig sind und die einzigen Efferenzen des Kleinhirns darstellen, induziert. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Entzündungsprozessen, dem Mediator TNF α , der Differenzierung von PC und ASD ist bis jetzt nicht beschrieben.

Daher stellt sich die Frage, welche Zusammenhänge zwischen genetischer Prädisposition und extrinsischen Faktoren bei der Entstehung von ASD bestehen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine genetische Prädisposition, hier konkret die EN2-Überexpression in PC, und eine perinatale neuronale Entzündung in Bezug auf die morphologische Ausprägung eines autistischen Phänotyps interagieren. Genauer sollte untersucht werden, ob diese beiden unterschiedlichen Ursachen einen gemeinsamen Effekt auf die Differenzierung von Purkinjezellen im Kleinhirn haben. Darüber hinaus wird in dieser Dissertation geprüft, ob der Einfluss der Entzündung auf die neuronale Entwicklung durch eine Hemmung des TNFa-Signalwegs verhindert werden kann.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde das transgene (tg) L7En-2 Tiermodell verwendet, in dem das EN2-Gen spezifisch in zerebellären Purkinjezellen perinatal und postnatal überexprimiert wird. Es wurden Gewebeschnitte des Kleinhirns von postnatalen Mäusen in Kultur gehalten und einer entzündlichen Behandlung mit LPS unterzogen. LPS bindet an den TOLL-like Rezeptor Typ 4, welcher auf Purkinjezellen exprimiert wird und eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Homeostase dieser Zellen besitzt (Zhu et al., 2024). Anschließend werden die PCs morphologisch untersucht, um Veränderungen in der Dendritenbaumstruktur zu analysieren.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Versuchstiere

Um Schnittkulturen herzustellen, wurden heterozygote L7En-2 Mäuse auf einem reinen FVB/N Hintergrund und entsprechende FVB/N Wildtypiere verwendet. Die erfolgreiche Über-Nacht-Paarung heterozygoter L7En-2 Männchen mit FVB/N Weibchen wurde durch Paarungspfpfen kontrolliert. Der Tag des Wurfs wurde als Postnataltag 0 (P0) festgelegt. Einen Tag vor der Präparation wurden die Jungtiere mittels L7En-2 spezifischen Primern genotypisiert und mindestens zwei Genotyp-Paare für die Präparation selektiert. Die für die Genotypisierung notwendigen Gewebe wurden gemäß den im Jahr 2020 gültigen TierSchG, der TierSchV und den Empfehlungen der GV-SOLAS durchgeführt. Ein Tierversuchsantrag war hierfür nicht nötig.

1.2.2 Präparation

Die Präparation erfolgte angelehnt an das Protokoll von Jankowski et al. (2004). Die Mäuse wurden dekapitiert, die Gehirne aseptisch aus dem Schädel herausgelöst und in eiskalter, modifizierter Hank's Lösung (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 5 mM Glukose, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 4,17 mM NaHCO₃, pH 7,2) gesammelt. Innerhalb von 10 Minuten nach der Dissektion wurden die Kleinhirne von der Pia mater befreit und vom restlichen Nervensystem getrennt. Mittels einem Gewebeschnneider (McIlwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Ltd., USA, Kat. Nr. 51350) wurden 350 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt. Der Tag der Präparation wurde als Tag 0 in Kultur (DIV 0) festgelegt.

1.2.3 Schnittkulturen

Die Schnitte wurden in vorgewärmtes Neurobasal-Kulturmedium, zusammengesetzt aus 48,5 ml Neurobasal-Medium (Neurobasal® Medium steril A, Gibco, Life Technologies Limited, UK, LOT: 2124984), 0,5 ml Glutamax (GlutaMAX™-I 100x, Gibco, Life Technologies Limited, UK, LOT: 1945365), 1 ml B27-supplement (B27® Supplement 50x, Gibco, Life Technologies Corporation, USA LOT: 207700) und 0,5 ml PenStrep (Pen Strep, Gibco, Life Technologies Corporation, USA LOT: 2112692) überführt und auf Membranen mit 0,4 µm Porengröße (Millicell® Cell Culture Inserts, 0,4 µm, 30 mm Diameter, Merck Millipore Ltd., Irland, Kat. Nr. PIHP03050) platziert. Die Schnitte wurden in einer 6-Well-Zellkulturplatte (TPP®, Schweiz, Kat. Nr. 92006) bei 37 °C an der Schnittstelle zwischen 1 ml Kulturmedium und befeuchteter Luft (5% CO₂) inkubiert (HERAcell 150i CO₂ Incubator, Thermo Scientific, USA, Kat. Nr. 16496629). Ein kompletter Mediumwechsel wurde an DIV 1 durchgeführt. An DIV 3 wurden die Zellkulturen in neues Neurobasalmedium mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon Gamma (IFN-g) in niedriger (10 ng/ml) oder hoher (100 ng/ml) Konzentration für sechs Stunden inkubiert. Danach wurde das entzündliche Medium verworfen und die Schnitte bis DIV 6 in frischem Neurobasalmedium gehalten. Für die Entzündungshemmung wurden entweder Pexidartinib (PLX3397) (Selleckchem, Adooq Bioscience, USA, Kat. Nr. 1029044-16-3), ein Hemmer des Colony-Stimulating-Factor-1-Rezeptors (CSF1R) oder R-7050 (Merck, Deutschland, Kat. Nr. 303997-35-5), ein Tumornekrosefaktor alpha Rezeptorantagonist, in Konzentrationen zwischen 1 und 10 µM zusammen mit LPS und

IFN-g im Nährmedium gelöst. Die ermittelten Standardkonzentrationen waren 2,5 μM für R-7050 und 1 μM für PLX3397. Zusätzlich enthielt das Neurobasalmedium nach der entzündlichen Behandlung und bis zur Fixierung PLX3397 oder R-7050 in der gleichen Konzentration wie während der entzündlichen Behandlung. Weil R-7050 in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst war, wurden Zellkulturen mit gleicher DMSO-Konzentration (1 μl DMSO pro 1 ml Medium) zur Kontrolle behandelt. An DIV 6 wurden die Zellkulturen zur Fixierung in 4 % Paraformaldehyd überführt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen bei 4 °C in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) aufbewahrt.

1.2.4 Immunhistochemie

Für das Antigen-Retrieval wurden die Schnitte bei 80 °C in einer 10 mM Natriumzitat Lösung (pH 7.0) für 30 min inkubiert und zur anschließenden Permeabilisierung der Zellkulturen in eine 1% Triton X-100/PBS Lösung überführt. Nach 30-minütiger Inkubation in Triton wurden die Schnitte dreimal in PBS für 15 min gewaschen und in 0,2 % Gelatine/PBS für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Epitope zu blockieren. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer Lösung bestehend aus 0,2 % Gelatine/PBS, 1 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 und den primären Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Benutzte primäre Antikörper waren: Maus anti-Calbindin D-28k (Calb1,1:2000, Sigma, Deutschland, Kat. Nr. C9848), Kaninchen anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1, 1:500, Wako Chemicals, USA, Kat. Nr. 012-28521) und Kaninchen anti-EN2 (1:500, netterweise von Christoph Völker zur Verfügung gestellt). Die Schnitte wurden dann vier Mal in PBS für 15 min gewaschen und anschließend für 2h mit den sekundären Antikörpern Alexa Ziege anti-Maus 488 und Alexa Ziege anti-Kaninchen 546 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Deutschland, Kat. Nr. A-11001 und A-11010) und 0,2 % Gelatine/PBS versetzt. Es erfolgte erneut ein Waschschrift mit PBS 4 mal 15 min und eine anschließende Gegenfärbung der Zellkerne mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst-33342/PBS. Nach abschließender Überführung auf Objektträger wurden die Schnitte mit Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific, Deutschland, Kat. Nr. 00-4958-02) und Deckgläser eingedeckt.

1.2.5 Bildaufnahme

Zur Bildakquirierung wurde ein A1R HD25 Ti2E Resonant Laser Scanning Mikroskop verwendet (Nikon Eclipse Ti2, Japan). Durchgehend wurde der Modus „resonant“ mit Einhaltung gleicher Mikroskop-Einstellungen verwendet, um rot-grün-blaue Bilder zu generieren: Rot für Anti-Iba1 oder Anti-EN2 Färbung, grün für Anti-Calb1 und blau für die Zellkernfärbung mittels Hoechst.

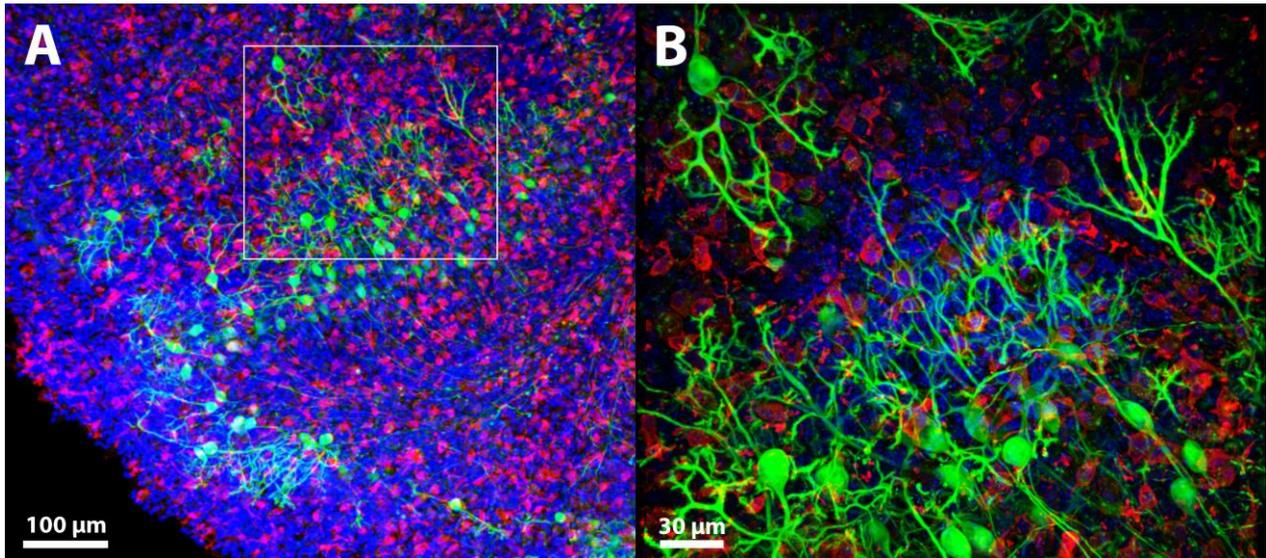


Abb. 1: Immunhistochemische Färbung von P6 und DIV6 Schnitt-Kulturen
Immunhistochemische Färbung mittels Calbindin D28K (grün) sowie Iba1 (rot) und Gegenfärbung mittels Hoechst-33342 (blau). A zeigt einen Überblick von einem Schnitt, aufgenommen mit dem $\times 20$ Objektiv des Laser Scanning Mikroskops. Für morphologische Analysen wurden mit dem $\times 60$ Objektiv detaillierte PC-Bilder aufgenommen (B).

Für einen groben Überblick des Schnittes wurden Bilder mit einem $\times 20$ Objektiv (CFI P35 Apochromat VC $\times 20/0.75/1.00$) akquiriert (Abb. 1A). Im Gegensatz dazu wurden Bilder von einzelnen Purkinje Zellen zur detaillierten Analyse mit einem $\times 60$ Objektiv (CFI P-Apo Lambda Oil $\times 60/1.40/0.13$) aufgenommen (Abb. 1B). Alle Bilder wurden mit einer Auflösung von 1080×1080 Pixels in z-Stacks mit einer Schichtdicke von $2 \mu\text{m}$ für die Übersichtsaufnahmen und $0,5 \mu\text{m}$ für die detaillierten Aufnahmen generiert. Zur Bildpräsentation wurden nur lineare Adjustierungen in Adobe Photoshop Elements 2024 durchgeführt.

1.2.6 Bildanalyse

Die Morphologie von Purkinjezellen in Schnittkulturen ist stark abhängig von der umliegenden Umgebung innerhalb des Schnittes und ist deswegen variabel. Deswegen wurden definierte Parameter zur Auswahl von Zellen für die Analyse festgelegt, um eine Vergleichbarkeit zwischen zwei oder mehr Gruppen zu gewährleisten. Für jeden Schnitt wurden Zellen ausgewählt, die jeweils repräsentativ für die Morphologie der PCs einer Behandlungsgruppe waren. Nur jene Zellen wurden ausgewählt, bei denen sowohl der gesamte dendritische Baum identifiziert werden konnte als auch eine unmittelbare Nähe zu anderen PCs bestand. Schnitte, die weniger als zehn PCs enthielten, wurden ausgeschlossen.

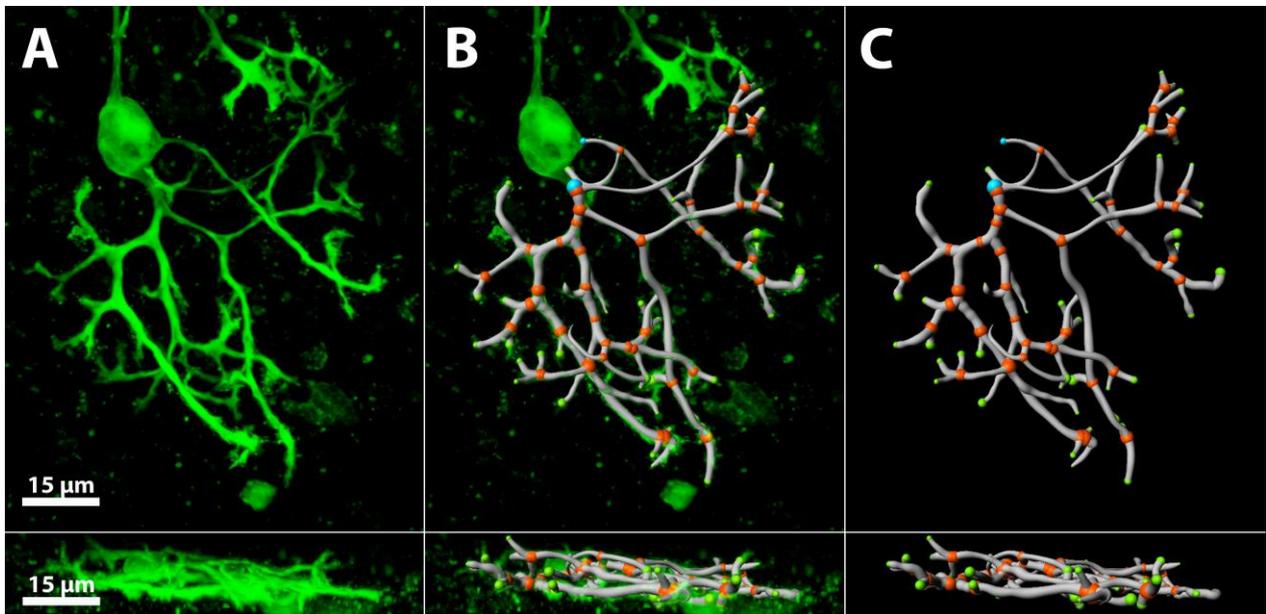


Abb. 2: Morphologische Analyse der Dendritenbäume in Imaris

Für die 3D Analyse der Purkinjezell-Morphologie wurde der Grünkanal (Calb1-Färbung) der $\times 60$ Bilder verwendet. A-C zeigen eine Purkinjezelle in der x/y -Ansicht (oben) und darunter in der x/z Ansicht. Vom Originalbild (A) wurde der Dendritenbaum semi-automatisch verfolgt (graue Segmentierung in B) und das segmentierte Bild (C) für die Messung der Parameter genutzt. Blaue Punkte repräsentieren Startpunkte, orange Punkte Verzweigungspunkte und grüne Punkte Endpunkte.

Die ausgewählten PCs wurden mithilfe von Imaris 6.1.4 (Oxford Instruments, Vereinigtes Königreich) analysiert. Die erfassten Rohdaten im nd2-Format wurden in Imaris geöffnet, und ein Bildüberlagerung aus den Z-Stacks erstellt. Die zu analysierende PC wurde ausgeschnitten und das Filament-Tracer-Tool verwendet, um den dendritischen Pfad halbautomatisch zu verfolgen. Der Ausgangspunkt des Stamm-Dendriten wurde manuell

an der Oberfläche des Somas festgelegt. Anschließend wurden die Endpunkte der Dendriten manuell nachverfolgt, während die Software die Dendritensegmente automatisch in 3D maß und die Verzweigungspunkte zuordnete. Segmente, die von der Software nicht korrekt erkannt wurden, wurden manuell korrigiert. Schließlich wurden die Überlagerungen von Segmenten und Verzweigungspunkten mit dem „Center“-Tool ausgerichtet und das „Smooth“-Tool verwendet, um raue Kanten von den erstellten Volumina abzuschleifen.

In Imaris wird ein dendritischer Baum als eine Reihe von Segmenten dargestellt, die durch Verzweigungspunkte getrennt sind. Ein „Filament“ bezeichnet einen einzelnen dendritischen Ast, der von seinem Ausgangspunkt am Soma der Purkinjezelle (PC) bis zu seinen Endpunkten reicht, was bedeutet, dass eine einzelne PC mehrere Filamente haben kann. Die Gesamtlänge der Dendriten wird berechnet, indem die Längen aller Segmente über alle Filamente einer bestimmten PC summiert werden. Die Länge eines dendritischen Segments stellt die durchschnittliche Länge eines einzelnen Segments innerhalb eines Filaments dar. Da proximale Segmente in der Regel länger als distale Segmente sind, kann dieser Durchschnitt jedoch Variationen entlang des dendritischen Pfades verschleiern. Um dem entgegenzuwirken, wurde in Imaris ein Segment-Level zugewiesen, um die Länge entlang des Pfades zu bewerten. Diese dendritischen Levels sind numerische Werte, die den Verzweigungsgrad anzeigen. Segmente direkt nach dem Ausgangspunkt wurden als Level 1 bezeichnet. Nach einem Verzweigungspunkt blieb das Segment mit dem größeren mittleren Durchmesser auf Level 1, während das andere auf Level 2 gesetzt wurde. Haben beide Tochtersegmente den gleichen mittleren Durchmesser, blieb das Segment mit dem kleineren Verzweigungswinkel auf dem ursprünglichen Level, und das andere erhielt einen höheren Wert.

Alle relevanten Parameter wurden aus Imaris exportiert, für jede PC ein Excel-Tabellenblatt erstellt und die Excel-Dateidaten mittels R statistisch analysiert.

1.3 Ergebnisse

LPS und IFN- γ werden häufig verwendet, um Entzündungen in vivo und in vitro zu induzieren. Die optimale Konzentration der Entzündungsmediatoren sollte eine sichtbare Wirkung auf die Differenzierung von Purkinjezellen (PC) haben, aber auch ermöglichen,

potenzielle pro-inflammatorische und damit additive Effekte der EN2-Expression sowie anti-inflammatorische Effekte zu erkennen. Darüber hinaus könnten die entzündlichen Reaktionen auch von der Kulturdauer abhängen. In dieser Arbeit wurden Schnittkulturen, die von 6 Tage alten FVB/N-Mauswelpen stammten, mit 10 ng/ml LPS und 10 ng/ml IFN-g am dritten Tag nach der Präparation für 6 Stunden inkubiert. Die Kulturen wurden für 6 oder 8 Tage *in vitro* unter Standardinkubationsbedingungen gehalten.

Die Behandlung solcher Kleinhirnschnitte von Wildtyp-Mäusen führte nach 6 und 8 Tagen *in vitro* zu einer signifikanten Reduktion der gesamten dendritischen Länge. Dendriten von unbehandelten PCs, die 8 Tage kultiviert wurden, waren tendenziell länger als die, die 6 Tage kultiviert wurden, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Abb. 3). Während die Gesamtdendritenlänge abnahm, nahm die Segmentlänge unter entzündlichen Bedingungen zu. Eine Erhöhung des entzündlichen Stimulus mittels LPS und IFN-g auf 100 ng/ml führte zu einer signifikanten Verringerung der Gesamtlänge der Dendriten, des maximalen Verzweigungsniveaus und der Anzahl der dendritischen Endpunkte. Zusätzlich stellte sich heraus, dass bei der Behandlung LPS auch ohne IFN-g eine signifikante entzündliche Reaktion erzeugte.

L7En-2 PCs zeigten ohne entzündliche Behandlung kürzere Gesamtdendritenlängen, eine geringere Anzahl an Enden und ein niedrigeres maximales Verzweigungsniveau im Vergleich zu Wildtypzellen (Abb. 4). Zusätzlich zum Genotyp führte die LPS/IFN-g-Behandlung zu einer noch kürzeren durchschnittlichen Dendritenlänge, die bei höheren Konzentrationen von LPS/IFN-g signifikant unterschiedlich war. Dies galt auch für das maximale Verzweigungsniveau und die Anzahl der Endpunkte. Bei der näheren Betrachtung des dendritischen Baumes konnte man zeigen, dass die Segmentlänge auf unterschiedliche Levels durch Genotyp und Behandlung anders beeinflusst wurde (Fig. 3 der Publikation Bahaaeldin et al. (2024)). Während die Segmentlänge in Level 1, 2 und 3 bei L7En-2 PCs nach entzündlicher Behandlung signifikant zunahm, blieb die durchschnittliche Segmentlänge in den jeweiligen Levels bei den Wildtyp PCs unbeeinflusst. Beide Genotypen zeigten ähnliche durchschnittliche Segmentlängen in Level 4 ohne Einflussnahme durch LPS-Behandlung.

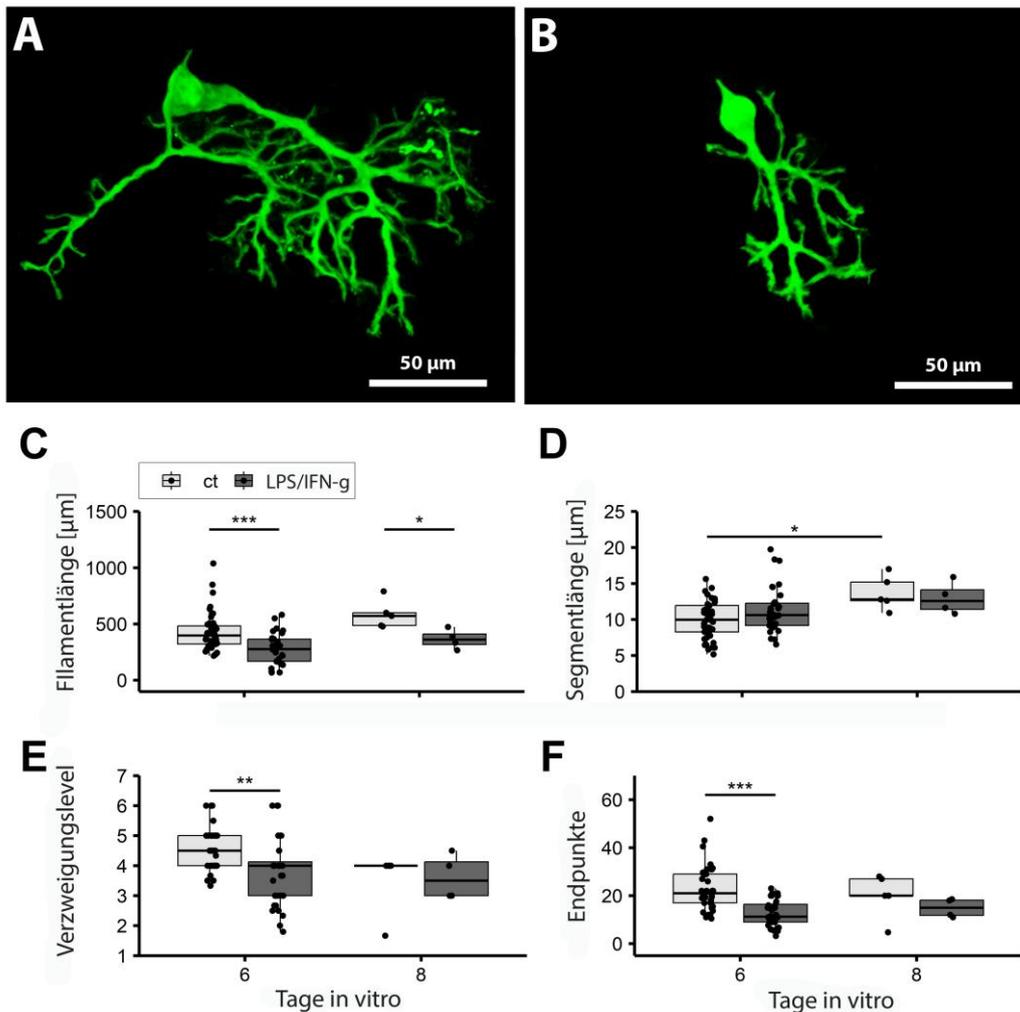


Abb. 3: Effekte der LPS/IFN-g Behandlung auf die Dendritenmorphologie von Wildtyp Purkinje-Zellen (PCs)

Immunhistochemische Calbindin1 Färbung von Wildtyp (Wt) P6 Schnittkulturen. A zeigt eine typische Dendritenbaumstruktur einer Wildtyp PC ohne Behandlung mit ausdifferenzierten Fortsätzen. Im Gegensatz dazu zeigt B eine Zelle nach entzündlicher Behandlung mit 10 ng/ml LPS/IFN-g und morphologisch deutlich geringere Komplexität der Dendritenarchitektur. Die statistische Analyse, abgebildet in C-F zeigt signifikante Unterschiede in mehreren morphologischen Parametern (Welch Zwei-Proben-t-Test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$; $n_{ct, DIV6}$: 41, $n_{ct, DIV8}$: 5, $n_{LPS/IFN-g, DIV6}$: 32, $n_{LPS/IFN-g, DIV8}$: 4. PC Purkinjezelle, LPS Lipopolysaccharid, IFN-g Interferon-gamma, ct Kontrolle, DIV Tage in Kultur

Es stellte sich die Frage, ob die Überexpression des EN2-Gens PCs auf entzündliche Reize sensibilisiert. Um dies zu beantworten wurde untersucht, ob eine statistische Interaktion zwischen dem Genotyp und der entzündlichen Behandlung besteht. Die statistische Auswertung verschiedener Parameter der Dendritogenese, darunter die Gesamtlänge der Dendriten, die Anzahl der Verzweigungen und die Segmentlänge auf

verschiedenen Ebenen, ergab keine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Entzündung. Dies deutete darauf hin, dass die Effekte der EN2-Überexpression und der entzündlichen Stimulation auf die Dendritogenese rein additiv sind.

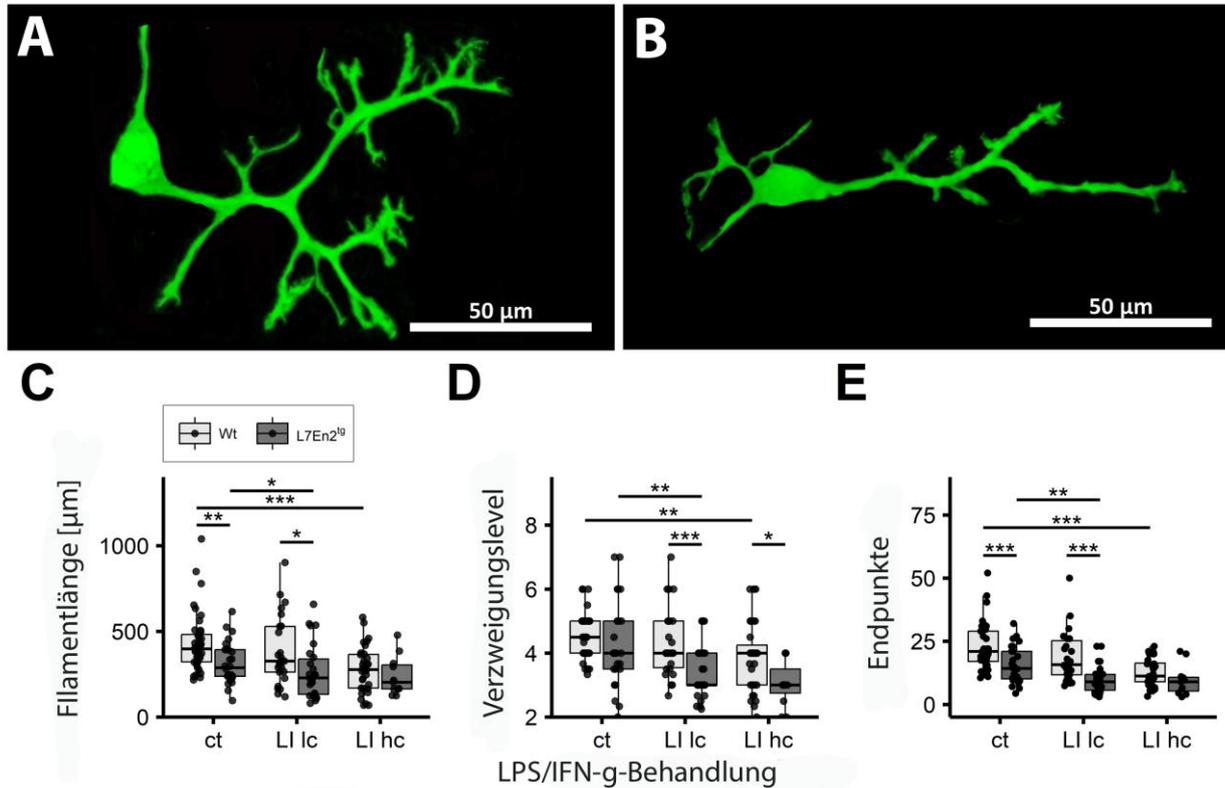


Abb. 4: Einfluss des Genotyps sowie der entzündlichen Behandlung auf die Dendritogenese.

Die morphometrische Analyse zeigte einen deutlichen Unterschied in der gesamten Dendritenlänge zwischen Wt- und tg-PC-Dendriten. Die dendritische Verzweigungsstufe sowie die Anzahl der Endpunkte pro Dendrit waren ebenfalls zwischen genetisch unterschiedlichen PCs reduziert. Alle Parameter wurden durch die gleichzeitige LPS/IFN-g-Behandlung weiter verringert. Insgesamt war die dendritische Verzweigung in Wt- und tg-PC-Dendriten nach LPS/IFN-g-Behandlung reduziert (Welch Zwei-Proben-t-Test, *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n_{ct, Wt}$: 41, $n_{lc, Wt}$: 26, $n_{ct, tg}$: 26, $n_{lc, tg}$: 26).

PC Purkinjezellen, tg L7En-2 transgen, Wt Wildtyp, LPS Lipopolysaccharid, IFN-g Interferon-gamma, LI LPS/IFN-g, hi hohe Konzentration, lc niedrige Konzentration.

Die PCs der Abbildungen A und B sowie die Diagramme C und E wurden in Anlehnung an Bahaaeldin et al. (2024) erstellt.

Neuroinflammation wird durch Mikroglia vermittelt. Um den Einfluss der Iba1-positiven Mikroglia auf den Entzündungsprozess in Slice Kulturen zu untersuchen, wurde an DIV3 zusätzlich zur Entzündungsbehandlung PLX3397 (Pexidartinib) eingesetzt. Hierunter konnte ein deutlicher Rückgang der LPS-induzierten Proliferation von Mikroglia

festgestellt werden und sogar die Effekte der Entzündung auf die Dendritogenese aufgehoben werden (fig. 4D-F, Bahaaeldin et al., 2024). Die PCs in Schnittkulturen mit LPS + PLX3397 Behandlung zeigten eine vergleichbare Morphologie zu PCs ohne Behandlung (fig. 4A, Bahaaeldin et al., 2024).

Es ist bekannt, dass Mikroglia TNF-alpha (TNFa) synthetisieren, was als pro-inflammatorisches Zytokin wirkt. Im Vergleich zu Astrozyten gelten Mikroglia als die Hauptquelle für TNFa. Bei der Behandlung von Schnittkulturen mit LPS nahm die Anzahl der Mikroglia deutlich zu und dabei wurden in den behandelten Kulturen höhere Konzentrationen von TNFa festgestellt. Die Blockierung vom TNFa-Rezeptor bei LPS-behandelten Schnittkulturen mittels R-7050 führte zu einer Zunahme der gesamten dendritischen Länge, der Anzahl der Stamm-Dendriten und der Anzahl der Endverzweigungen pro Zelle. Durch die Blockade der TNFa Rezeptoraktivierung wurden die LPS-induzierten Effekte signifikant abgeschwächt (fig. 6, Bahaaeldin et al., 2024).

1.4 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass LPS/IFN-g-induzierte Entzündungen die Dendritenmorphologie von P6 PCs signifikant beeinflussen. Während L7En-2 PCs im Vergleich zu Wildtyp PCs kürzere Dendriten und weniger Verzweigungen aufwiesen, führte die entzündliche Behandlung zu einer weiteren Reduktion dieser Parameter, ohne jedoch eine statistische Interaktion zwischen Genotyp und Entzündung erkennen zu lassen. Zusätzlich konnten diese Effekte der Neuroinflammation durch Einsetzung von PLX3397 oder R-7050 abgeschwächt werden.

Die morphologische Untersuchung der Dendritenbäume von PCs in Schnitt-Kulturen ist eine etablierte Methode, um den Einfluss von internen und externen Stimuli auf die PC-Entwicklung zu evaluieren (Kapfhammer and Gugger, 2012). Eine abnormale Dendritenstruktur der PCs ist bei zahlreichen Pathologien des ZNS präsent (Mavroudis et al., 2019), vor allem bei ASD (Fatemi et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das dendritische Wachstum und die Verzweigung von PCs in Zellkulturen durch entzündliche Reize negativ beeinflusst werden. LPS induzierte Effekte auf die PC-Reifung werden durch Mikrogliazellen über den toll like receptor 4 vermittelt und nutzen zumindest teilweise TNFa Rezeptorsignalwege (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2004;

Xaus et al., 2000). Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit war, dass gezeigt werden konnte, dass externe Stimuli wie Entzündungsprozesse genetische Prädispositionen wie eine Überexpression von EN2, wie sie bei autistischen Patientinnen und Patienten nachgewiesen werden konnten, verstärkte.

Interessanterweise stehen diese Ergebnisse im Einklang mit in vivo durchgeführten Experimenten, in denen die Dendritenlänge von PCs LPS-Behandlung in der zweiten postnatalen Woche reduziert wird (Hoffman et al., 2016) und unterstützt die Hypothese, dass perinatale neuronale Entzündung möglicherweise zu Erkrankungen des autistischen Spektrums führen.

Wie hier gezeigt werden konnte, wird die Reaktion der Purkinjezellen (PCs) auf Entzündungen im Wesentlichen durch Mikroglia vermittelt. PLX3397, ein dualer Hemmer des CSF1R und der c-Kit-Kinase, bewirkt nach längerer Verabreichung eine nahezu vollständige Eliminierung der Mikroglia aus dem ZNS (Elmore et al., 2014). In der vorliegenden Studie führte die gleichzeitige Behandlung von Schnittkulturen mit PLX3397 und LPS nicht nur zu einer signifikanten Reduktion der Mikroglia-Zellen im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit LPS, sondern auch zu einer Abschwächung der LPS-induzierten Veränderungen der Dendritenbaum-Morphologie der PCs. Diese Ergebnisse deuten auf einen Signalweg von Mikroglia zu Purkinjezellen hin, der die Dendritogenese unter inflammatorischen Bedingungen beeinflusst. Diese Reifungshemmenden Befunde würden mit Apoptose-induzierenden Effekten der Mikroglia auf PCs übereinstimmen.

Mikroglia sind dafür bekannt, den Untergang von Purkinjezellen zu fördern (Marín-Teva et al., 2004), ein physiologischer Mechanismus während der zerebellären Entwicklung, insbesondere um die Zeit von P3. Dieser Prozess findet auch pathologisch bei neurodegenerativen Erkrankungen statt (Minagar et al., 2002) und wird durch Mikroglia vermittelt. Interessanterweise wurde bei Jugendlichen mit ASD eine pathologische Mikroglia-Aktivierung im Zerebellum nachgewiesen (Suzuki et al., 2013). Obwohl eine direkte kausale Verbindung zwischen Mikroglia-Aktivierung und ASD noch nicht belegt ist, könnte die durch Mikroglia vermittelte Dysfunktionalität der PC-Dendritogenese ursächlich für die Symptomatologie von Autismus-Patientinnen und Patienten sein.

PLX3397 blockiert bei der benutzten Konzentration von 1µM nicht nur den Csf1 Signalweg, sondern auch FLT3 Rezeptoren (IC50, 160 nM) (Tap et al., 2015). Der FLT3-Signalweg spielt eine Rolle bei der Differenzierung von neuronalen Stammzellen (Brazel

et al., 2001). Der FLT3-R wird in PCs exprimiert (Lein et al., 2007) und dessen Ligand, flt3, von Mikroglia sezerniert (Meeuwse et al., 2005). Obwohl dieser Signalweg durch PLX3397 inhibiert wird, stellt er trotzdem neben der generellen PLX3397-induzierte Attenuation von Mikroglia einen möglichen direkten Signalweg für die LPS-induzierten Effekte der Mikroglia auf die PC-Dendritogenese dar.

Für die Bedeutung der Mikroglia auf die PC Dendritogenese unter entzündlichen Bedingungen spricht auch der anti-inflammatorische Einfluss von R-7050, der den TNFaR Signalweg blockiert. Mikroglia sezernieren unter Inflamationsbedingungen TNFa, und werden durch das Zytokin selbst stimuliert (Kuno et al., 2005; Takeuchi et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass diese Autostimulation zu einer Glutamat-Ausschüttung führt, die wiederum über eine Stimulation von Bergmann-Glia eine Hypererregbarkeit der Purkinjezellen herbeiführt (Shim et al., 2018; Xie et al., 2023). Zusätzlich ist bekannt, dass die neuronale Aktivität das axonale Wachstum einschränkt und dieser Effekt durch Mikroglia vermittelt wird (Schafer et al., 2012). Es kann also geschlossen werden, dass durch die Blockierung von TNFaR die Mikroglia-vermittelten Effekte der Entzündung durch LPS auf die Dendritogenese der Purkinjezellen erfolgreich gehemmt werden kann, ähnlich zur Mikroglia-Hemmung mittels PLX3397.

Im klinischen Alltag finden TNFa-Inhibitoren wie Etanercept oder Infliximab bereits Anwendung bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn (Willrich et al., 2015). Ihr Einsatz bei neurologischen Erkrankungen beschränkt sich bislang jedoch auf experimentelle Studien. Interessanterweise konnte sowohl für Etanercept als auch für R-7050 nachgewiesen werden, dass sie den neurologischen Schaden durch Entzündungen, beispielsweise nach einem intrazerebralen Hämatom, signifikant reduzieren (King et al., 2013; Tuttolomondo et al., 2014). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden der vorliegenden Arbeit, in der gezeigt wurde, dass die Hemmung des TNFa-Rezeptors die entzündlichen Effekte auf die Morphologie von Purkinjezellen signifikant mindern konnte. Diese Beobachtungen betonen das Potenzial der TNFa-Blockade als therapeutischen Ansatz zur Verhinderung und Behandlung entzündungsbedingter neuronaler Schäden.

Für die Behandlung wurden R-7050 und PLX3397 in DMSO gelöst. Zahlreiche Effekte von DMSO auf das ZNS werden beschrieben, unter anderem auch gegensätzliche Wirkungen wie Apoptose Induktion und Neuroprotektion durch seine antioxidativen

Eigenschaften (Hanslick et al., 2009; Sanmartín-Suárez et al., 2011). Aus diesem Grund wurde R-7050 als Stock-Lösung hochkonzentriert in DMSO gelöst und die Stocklösung zum Gebrauch 1:1000 in Zellkulturmedium verdünnt. Zudem wurden Zellkulturschnitte mit einem 1:1000-fach verdünnten DMSO:Medium Gemisch als Kontrolle behandelt. Somit wurde sichergestellt, dass die anti-inflammatorische Wirkung auf R-7050 und PLX3397 und nicht auf DMSO zurückzuführen ist.

Wie zuvor bereits in vivo gezeigt werden konnte, ist die Dendritogenese in PCs, die das Homöobox-Gen EN2 vermehrt exprimieren, reduziert (Baader et al., 1998; Jankowski et al., 2004). In meinen Arbeiten konnten ich diesen Befund an Schnittkulturen bestätigen. Endogen exprimiertes EN2 beeinflusste das dendritische Wachstum und die Verzweigung der PC in vitro. Der Zeitpunkt P6 für die Präparation wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt alle PC EN2 überexprimieren (Baader et al., 1998; Oberdick et al., 1990). EN2 wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor beschrieben, der die neuronale Differenzierung und das Überleben der PCs reguliert (Baader et al., 1998, 1999; Joyner et al., 1991). Diese Effekte wurden auf die Regulation der Proteinexpression auf transkriptioneller Ebene zurückgeführt (Holst et al., 2008). Engrailed-Proteine werden aber auch sekretiert und können damit parakrine Funktionen bei der Steuerung und dem Überleben von Axonen erfüllen (Brunet et al., 2005; Joshi et al., 2011). Es ist derzeit nicht bekannt, über welche Wege EN2 die PC-Differenzierung in dem vorliegenden Entzündungsmodell reguliert. Ergebnisse aus einer weiteren Arbeit im Labor von Prof. Baader, in der EN2 in vitro hergestellt und extrinsisch den Kulturen zugegeben wurde, zeigen aber einen gegenteiligen anti-inflammatorischen Effekt. Dies stützt die Hypothese, dass endogen synthetisiertes EN2 Entzündungsreaktionen verstärkt und dieser Effekt tatsächlich endogen vermittelt wird.

Beim Vergleich der vielen Signalwege, die an Entzündungen beteiligt sind, mit den derzeit bekannten Interaktionspartnern von EN2 und seinen transkriptionellen Zielen konnte keine Überschneidung gefunden werden. Beide Kaskaden beeinflussen jedoch die neuronale Aktivität, Kommunikation und Dendritogenese (Shen et al., 2023; Winston et al., 2016). Wenn entzündliche Reize hinzugefügt wurden, konnte der negative Effekt von EN2 verstärkt werden. Dieser additive Effekt der endogenen EN2-Expression und der Entzündung deutet darauf hin, dass EN2 und Entzündung zumindest teilweise unterschiedliche Signalwege nutzen.

1.5 Zusammenfassung

Die Pathogenese von autistischen Erscheinungsformen wird sowohl auf genetische Prädispositionen als auch auf extrinsische Einflüsse zurückgeführt. Auch wenn dieser duale Effekt schon lange postuliert wurde, sind experimentelle Evidenzen bisher nicht verfügbar. Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen einer bekannten genetischen Prädisposition, der Überexpression des Transkriptionsfaktors Engrailed-2, und perinataler neuronaler Entzündung auf die Differenzierung von Purkinjezellen im Kleinhirn. Es sollte geklärt werden, ob diese beiden Faktoren additiv oder interaktiv auf die Purkinjezellendritogenese wirken und ob entzündungsbedingte Schäden durch Hemmung der Mikroglia-Aktivität verhindert werden können.

Mit Hilfe von zerebellären Schnittkulturen von sechs Tage alten Wildtyp- und transgenen L7En-2 Mäusen, in denen Engrailed-2 spezifisch in Purkinjezellen überexprimiert wird, konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus Lipopolysaccharid und Interferon-gamma die Purkinjezellendritogenese sichtbar einschränkte. Diese Effekte wurden durch Mikrogliazellen vermittelt, da eine Blockade der Mikroglia-Proliferation mit Pexidartinib und die Hemmung des Tumornekrosefaktor- α Rezeptor Signalweges die Lipopolysaccharid-induzierten Effekte nahezu aufhob.

Purkinjezellen von L7En-2-Mäusen zeigten ohne Entzündungsreize eine reduzierte Gesamtlänge und Verzweigung der Dendriten. Die zusätzliche Behandlung mit Lipopolysaccharid / Interferon-gamma führte in L7En-2-Purkinjezellen zu einer im Vergleich zu Wildtypmäusen zusätzlichen Reduktion der dendritischen Länge, der Anzahl der Verzweigungen und der Endpunkte. Diese Effekte waren additiv und nicht interaktiv. Dies deutet darauf hin, dass Engrailed-2 und Entzündungen unterschiedliche Signalwege nutzen, die konvergieren und gemeinsam die Purkinjezellendritogenese beeinflussen. Mikroglia-vermittelte Prozesse und der Tumornekrosefaktor- α spielen dabei eine zentrale Rolle.

Während die Ursachen von Autismus-Spektrum-Störung zahlreich sind und der genaue Pathomechanismus hinter der Erkrankung weiterhin ungeklärt bleibt, liefert die vorliegende Arbeit wichtige Einblicke in zwei unterschiedliche Ursachen von Autismus-Spektrum-Störung und zeigt auf, wie beide Mechanismen gemeinsam zum autistischen Phänotyp beitragen können.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Baader SL, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J, Oberdick J. Ectopic Overexpression of Engrailed-2 in Cerebellar Purkinje Cells Causes Restricted Cell Loss and Retarded External Germinal Layer Development at Lobule Junctions. *J. Neurosci.* 1998; 18(5): 1763–1773

Baader SL, Vogel MW, Sanlioglu S, Zhang X, Oberdick J. Selective disruption of “late onset” sagittal banding patterns by ectopic expression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.* 1999; 19(13): 5370–5379

Bahaaeldin M, Bülte C, Luelsberg F, Kumar S, Kappler J, Völker C, Schilling K, Baader SL. Engrailed-2 and inflammation convergently and independently impinge on cerebellar Purkinje cell differentiation. *J Neuroinflammation.* 2024; 21(1): 306

Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(1): 49–59

Bokobza C, Van Steenwinckel J, Mani S, Mezger V, Fleiss B, Gressens P. Neuroinflammation in preterm babies and autism spectrum disorders. *Pediatr Res.* 2019; 85(2): 155–165

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008; 214(2): 149–160

Brazel CY, Ducceschi MH, Pytowski B, Levison SW. The FLT3 tyrosine kinase receptor inhibits neural stem/progenitor cell proliferation and collaborates with NGF to promote neuronal survival. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 18(4): 381–393

Brunet I, Weinl C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature.* 2005; 438(7064): 94–98

Davis CA, Noble-Topham SE, Rossant J, Joyner AL. Expression of the homeo box-containing gene En-2 delineates a specific region of the developing mouse brain. *Genes Dev.* 1988; 2(3): 361–371

de Theije CGM, Koelink PJ, Korte-Bouws GAH, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, Garssen J, Kraneveld AD. Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2014; 37:240–247

Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*. 2014; 82(2): 380–397

Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist DA, Thuras P, Merz A. Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cell Mol Neurobiol*. 2002; 22(2): 171–175

Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis*. 2009; 34(1): 1–10

Hoffman JF, Wright CL, McCarthy MM. A Critical Period in Purkinje Cell Development Is Mediated by Local Estradiol Synthesis, Disrupted by Inflammation, and Has Enduring Consequences Only for Males. *J Neurosci*. 2016; 36(39): 10039–10049

Holst MI, Maercker C, Pintea B, Masseroli M, Liebig C, Jankowski J, Miething A, Martini J, Schwaller B, Oberdick J, Schilling K, Baader SL. Engrailed-2 regulates genes related to vesicle formation and transport in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci*. 2008; 38(4): 495–504

Jankowski J, Holst MI, Liebig C, Oberdick J, Baader SL. Engrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. *J Comp Neurol*. 2004; 472(1): 87–99

Joshi RL, Torero Ibad R, Rhee J, Castagner F, Prochiantz A, Moya KL. Cell non-autonomous functions of homeoproteins in neuroprotection in the brain. *FEBS Lett*. 2011; 585(11): 1573–1578

Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J. Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science*. 1991; 251(4998): 1239–1243

Kapfhammer JP, Gugger OS. The analysis of purkinje cell dendritic morphology in organotypic slice cultures. *J Vis Exp.* 2012; 613637

King MD, Alleyne CH, Dhandapani KM. TNF-alpha receptor antagonist, R-7050, improves neurological outcomes following intracerebral hemorrhage in mice. *Neurosci Lett.* 2013; 54292–96

Kuno R, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol.* 2005; 162(1–2): 89–96

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen T-M, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, ... Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 2007; 445(7124): 168–176

Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron.* 2004; 41(4): 535–547

Mavroudis I, Petridis F, Kazis D, Njau SN, Costa V, Baloyannis SJ. Purkinje Cells Pathology in Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2019; 34(7–8): 439–449

Meeuwsen S, Bsibsi M, Persoon-Deen C, Ravid R, van Noort JM. Cultured human adult microglia from different donors display stable cytokine, chemokine and growth factor gene profiles but respond differently to a pro-inflammatory stimulus. *Neuroimmunomodulation.* 2005; 12(4): 235–245

Millen KJ, Wurst W, Herrup K, Joyner AL. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development.* 1994; 120(3): 695–706

Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders:

HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2002; 202(1–2): 13–23

Oberdick J, Smeyne RJ, Mann JR, Zackson S, Morgan JI. A promoter that drives transgene expression in cerebellar Purkinje and retinal bipolar neurons. *Science.* 1990; 248(4952): 223–226

Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014861231

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 2004; 113(2): 153–162

Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, Guadalupi L, Stampanoni Bassi M, Buttari F, Mandolesi G, Centonze D, Gentile A. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 β Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plasticity.* 2018; 2018(1): 8430123

Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011; 63(2): 209–215

Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Research.* 1989; 491(2): 394–397

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012; 74(4): 691–705

Shen L, Chen D-Y, Lou Q-Q, Cao P, Hu R, Jin Y, Wang D, Hu S-S. Angiotensin Type 2 Receptor Pharmacological Agonist Relieves Neurocognitive Deficits via Reducing Neuroinflammation and Microglial Engulfment of Dendritic Spines. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2023; 18(1–2): 41–57

Shim HG, Jang S-S, Kim SH, Hwang EM, Min JO, Kim HY, Kim YS, Ryu C, Chung G, Kim Y, Yoon B-E, Kim SJ. TNF- α increases the intrinsic excitability of cerebellar Purkinje cells through elevating glutamate release in Bergmann Glia. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 11589

Simon HH, Thuret S, Alberi L. Midbrain dopaminergic neurons: control of their cell fate by the engrailed transcription factors. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1): 53–61

Soltani A, Lebrun S, Carpentier G, Zunino G, Chantepie S, Maïza A, Bozzi Y, Desnos C, Darchen F, Stettler O. Increased signaling by the autism-related Engrailed-2 protein enhances dendritic branching and spine density, alters synaptic structural matching, and exaggerates protein synthesis. *PLoS One.* 2017; 12(8): e0181350

Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Futatsubashi M, Takebayashi K, Yoshihara Y, Omata K, Matsumoto K, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry.* 2013; 70(1): 49–58

Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem.* 2006; 281(30): 21362–21368

Tap WD, Wainberg ZA, Anthony SP, Ibrahim PN, Zhang C, Healey JH, Chmielowski B, Staddon AP, Cohn AL, Shapiro GI, Keedy VL, Singh AS, Puzanov I, Kwak EL, Wagner AJ, Von Hoff DD, Weiss GJ, Ramanathan RK, Zhang J, ... Bollag G. Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor. *N Engl J Med.* 2015; 373(5): 428–437

Tuttolomondo A, Pecoraro R, Pinto A. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date. *Drug Des Devel Ther.* 2014; 82221–2238

Wang L, Jia M, Yue W, Tang F, Qu M, Ruan Y, Lu T, Zhang H, Yan H, Liu J, Guo Y, Zhang J, Yang X, Zhang D. Association of the ENGRAILED 2 (EN2) gene with autism in

Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147B(4): 434–438

Willrich MAV, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res.* 2015; 165(2): 270–282

Winston CN, Noël A, Neustadtl A, Parsadanian M, Barton DJ, Chellappa D, Wilkins TE, Alikhani AD, Zapple DN, Villapol S, Planel E, Burns MP. Dendritic Spine Loss and Chronic White Matter Inflammation in a Mouse Model of Highly Repetitive Head Trauma. *Am J Pathol.* 2016; 186(3): 552–567

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood.* 2000; 95(12): 3823–3831

Xie S-T, Fan W-C, Zhao X-S, Ma X-Y, Li Z-L, Zhao Y-R, Yang F, Shi Y, Rong H, Cui Z-S, Chen J-Y, Li H-Z, Yan C, Zhang Q, Wang J-J, Zhang X-Y, Gu X-P, Ma Z-L, Zhu J-N. Proinflammatory activation of microglia in the cerebellum hyperexcites Purkinje cells to trigger ataxia. *Pharmacol Res.* 2023; 191106773

Zeidan J, Fombonne E, Scolah J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, Yusuf A, Shih A, Elsabbagh M. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res.* 2022; 15(5): 778–790

Zhu J, Qiu W, Wei F, Zhang J, Yuan Y, Liu L, Cheng M, Xiong H, Xu R. Toll-like receptor 4 deficiency in Purkinje neurons drives cerebellar ataxia by impairing the BK channel-mediated after-hyperpolarization and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Death Dis.* 2024; 15(8): 1–15

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Bahaaeldin M, Bülte C, Luelsberg F, Kumar S, Kappler J, Völker C, Schilling K, Baader SL. Engrailed-2 and inflammation convergently and independently impinge on cerebellar Purkinje cell differentiation. *Journal of Neuroinflammation*. 2024; 21: 306

<https://doi.org/10.1186/s12974-024-03301-6>

3. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Stephan Baader. Durch seine stets offene Tür konnte ich in Momenten der Unsicherheit immer nach Orientierung bei ihm suchen. Gleichzeitig schätzte ich es sehr, dass er mir den Raum ließ, eigenständig zu arbeiten und meine eigenen Ideen umzusetzen. Seine Anregungen und wertvollen Rückmeldungen haben diese Arbeit auf vielfältige Weise bereichert und inspiriert.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitenden des Anatomischen Instituts, die mich herzlich in Ihr Team aufgenommen haben und bei jeder Rückfrage mich bereitwillig unterstützt haben. Besonders möchte ich Stephanie Ramrath und Sabine Molley hervorheben, deren umfangreiche Erfahrung im experimentellen Arbeiten einen reibungslosen Ablauf meines Projekts entscheidend erleichtert hat.

Ein weiterer Dank gebührt Carolin Bülte und Fabienne Luelsberg, deren Beiträge die Publikation meiner Forschungsergebnisse erheblich bereichert haben. Ebenso möchte ich Herrn Professor Karl Schilling meinen Dank aussprechen. Seine langjährige Expertise in der Forschung, besonders in der Statistik, hat die Qualität dieser Arbeit maßgeblich gesteigert.

Zum Abschluss gilt mein tiefster Dank meinen Eltern. Ihre bedingungslose Unterstützung und Ermutigung haben es mir ermöglicht, diese Arbeit zu vollenden.