

Der Einfluss von Mikroglia auf die Differenzierung cerebellärer Purkinjezellen und deren Protektion durch Engrailed-2

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Carolin Victoria Bülte

aus Plettenberg

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Baader
2. Gutachterin: Prof. Dr. Stefanie Poll

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2025

Aus dem anatomischen Institut der Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Autism Spectrum Disorder	8
1.2 Aufbau und Verschaltung des Kleinhirns	10
1.3 Entwicklung des Kleinhirns	12
1.4 Prä- und postnatale Entwicklung der Purkinjezellen	13
1.5 Mechanismus der Neuroinflammation und Rolle der Mikroglia	15
1.6 Modulation von Mikroglia	18
1.7 Engrailed-2 und ASD	19
1.8 Engrailed-2 und Neuroprotektion	22
1.9 Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Geräte und Chemikalien	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Chemikalien	25
2.1.3 Weitere Gegenstände	31
2.2 Maushaltung	32
2.3 Molekularbiologische Methoden	33
2.3.1 Transformation der Plasmide in BL21(De3)-Bakterien	33
2.3.2 Isolierung der Plasmid-DNA	34
2.3.3 Restriktionsverdau	35
2.3.4 Sequenzierung des Plasmids	37
2.4 Biochemische Methoden	38
2.4.1 Proteinextraktion	38
2.4.2 Dialyse des isolierten Proteins	39
2.4.3 Bradford Assay	39
2.4.4 SDS Page	40
2.4.5 Western Blot	41
2.5 Schnittkulturen des murinen Kleinhirns	42

2.6 Behandlung der Schnittkulturen	44
2.6.1 Behandlung mit LPS und PLX3397	44
2.6.2 Behandlung mit IL-4 und dB-cAMP	45
2.6.3 Behandlung mit Engrailed-2 bzw. GST	46
2.6.4 Behandlung von P8 Schnitten mit LPS	47
2.7 Immunhistochemische Färbung	48
2.8 Aufnahmen der Schnitte unter dem Laser Scanning Mikroskop (LSM)	49
2.9 Auswertung	50
2.10 Statistik	51
3. Ergebnisse	56
3.1 Einfluss von PLX3397 auf das Dendritenwachstum von cerebellären PC	56
3.1.1 PLX blockiert die Mikroglia proliferation	57
3.1.2 Visuell darstellbare Effekte der LPS- und PLX-Behandlung auf die Purkinjezellmorphologie	58
3.1.3 PLX inhibiert die LPS-vermittelte Zunahme der Dendritenlänge	62
3.1.4 PLX inhibiert die LPS-induzierte Zunahme der Anzahl an Dendriten pro Purkinjezelle	63
3.1.5 PLX inhibiert die LPS-induzierte Zunahme der Dendritenverzweigungs- Punkte pro Purkinjezelle	64
3.1.6 PLX inhibiert die LPS-induzierte Zunahme der Polarität von Purkinjezellen	65
3.1.7 Einfluss von PLX auf Astrocyten und Oligodendrocyten	68
3.2 Effekt von Mikroglia subtypen auf die Dendritogenese cerebellärer PC	71
3.2.1 Einfluss von IL-4 und dB-cAMP auf Mikroglia und deren Konversion	72
3.2.2 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Reduktion des Dendri- tenwachstums	74
3.2.3 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Abnahme der Anzahl an Dendriten pro Purkinjezelle	76
3.2.4 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Abnahme der Dendri- tenverzweigungen	77
3.2.5 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Abnahme der Purkinje- Zellpolarität	79
3.2.6 Effekte der Mikroglia subtypen auf Astrocyten und Oligodendrocyten	81

3.3 Einfluss von Engrailed-2 auf die Purkinjezellmorphogenese	82
3.3.1 Herstellung eines rekombinanten GST-En2-Fusionsproteins	82
3.3.2 Einfluss von GST-En2 auf die Dendritogenese von cerebellären PC	86
3.3.3 Einfluss von GST-En2 auf Astrocyten, Oligodendrocyten und Mikroglia	91
4. Diskussion	94
4.1 Schnittkulturen als Modellsystem zur Untersuchung inflammatorischer Reaktionen auf die Dendritogenese von Purkinjezellen	94
4.2 Entwicklungsabhängige Effekte der LPS-Behandlung auf die neuronale Purkinjezellentwicklung	97
4.3 Mikroglial vermittelte Effekte der LPS-Behandlung auf die Differenzierung cerebellärer Purkinjezellen	100
4.4 Der Tumornekrosefaktor alpha als Mediator Mikroglia-induzierter pro-inflammatorischer Effekte auf die Purkinjezelldifferenzierung	103
4.5 LPS-Effekte auf die Differenzierung glialer Zellen im Kleinhirn der Maus	104
4.6 Antiinflammatorische Effekte des Homöodomänenproteins Engrailed-2 auf die Differenzierung cerebellärer Purkinjezellen	107
5. Zusammenfassung	111
6. Abbildungsverzeichnis	113
7. Tabellenverzeichnis	117
8. Literaturverzeichnis	118
9. Erklärung zum Eigenanteil	145
10. Veröffentlichungen	146
11. Danksagung	147

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ASD	Autismus-Spektrum-Störung (engl. Autism spectrum disorder)
bp	Basenpaare
CD	Differenzierungscluster (engl. Cluster of differentiation)
CSF1R	Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor (engl. Colony stimulating factor 1 receptor)
ctrl	Kontrolle (engl. control)
dB-cAMP	Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DIV	Tage in vitro (engl. Days in vitro)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
DOA	Dendritenorientierungswinkel (engl. Dendritic orientation angle)
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaler Entwicklungstag
En2	Engrailed-2
engl.	Aus dem Englischen
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. Glial fibrillary acidic protein)
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl. Horseradish peroxidase)
Iba1	Ionisiertes Calciumbindendes Adaptermolekül 1 (engl. Ionized calcium-binding adapter molecule 1)
IFN γ	Interferon gamma
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharid

LSM	Laser Scanning Mikroskop
MBP	Myelobasisches Protein (engl. Myelin basic protein)
MM	Gemischtes Modell (engl. Mixed effects model)
MW	Mittelwert
MWCO	Molekulargewichtsgrenze (engl. Molecular weight cut-off)
n	Anzahl
NBM	Modifiziertes Neurobasalmedium
Ncl.	Nucleus
Ncll.	Nuclei
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	nicht signifikant
Olig-2	Oligodendrocytentranskriptionsfaktor 2 (engl. Oligodendrocyte transcription factor 2)
P	Postnataler Entwicklungstag
PC	Purkinjezelle (engl. Purkinje cell)
PFA	Paraformaldehyd
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale (engl. Reactive Oxygen Species)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PyRAT	Python based Relational Animal Tracking
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
SDS Page	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SSC	Natriumcitrat Salzpuffer (engl. Saline sodium citrat)
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TREM2	Triggerrezeptor auf myeloiden Zellen 2 (engl. Triggering Receptor expressed on Myeloid Cells 2)

1. Einleitung

1.1 Autism Spectrum Disorder

Bereits 1943 beschrieb Leo Kanner in einem vielbeachteten Beitrag in der Zeitschrift „Nervous Child“ sehr detailgetreu non-verbale Kommunikationsstörungen sowie Defizite in der emotionalen Beziehung von Kleinkindern zu ihren Eltern (Kanner, 1943; Petit et al., 1995). Der Begriff Autismus hingegen entstand schon 1911 durch den Züricher Psychologen Eugen Bleuler, auch wenn dieser die Symptome nicht in der Systematik beschrieb wie Kanner nach ihm (Bleuler, 1911). Heutzutage bezeichnet man diese Auffälligkeiten auch als Autismus-Spektrum-Störung (engl. Autism Spectrum Disorder, (ASD)). Hierbei handelt es sich um die Zusammenfassung der Syndrome Autismus, Asperger Syndrom und „pervasive developmental disorder not otherwise specified“ (Choi et al., 2014). All diesen Syndromen sind jedoch neben den bereits beschriebenen Störungen Verhaltensauffälligkeiten gemein wie repetitive Verhaltensmuster, stark eingeschränkte Interessen, veränderte Wahrnehmung und Hyperreaktivität auf sensorische Stimuli sowie erhöhte Krampfanfälligkeit und verringertes räumliches Lernen (Lord et al., 2006; Rapin und Tuchman, 2008). Die Diagnose dieser Erkrankung beruht auch heute noch auf der Feststellung dieser Verhaltensmuster, wobei betroffene Kinder meist vor dem dritten Lebensjahr symptomatisch werden. Dabei imponieren besonders Störungen der sozialen Bindung, der Kommunikation sowie stereotaktisches Verhalten (Donovan und Basson, 2017; Phan et al., 2021; Varghese et al., 2017).

Mit einer Prävalenz von 13 auf 100.000 Einwohner weltweit bzw. sogar einem von 68 Kindern in den USA gehört es zu einer der häufigsten diagnostizierten psychiatrischen Erkrankungen, wobei Jungen etwa viermal so oft betroffen sind wie Mädchen (Kuemerle et al., 2007; Varghese et al., 2017). Da die Pathogenese allerdings noch immer nicht verstanden ist, ist ASD derzeit nicht heilbar. Daher setzen pharmakologische Ansätze bisher nur an den Symptomen wie epileptischen Anfällen, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Depressionen oder Angstanfällen an. Bekannt ist jedoch, dass, während sich beim Großteil der Patienten und Patientinnen keine Ursache eruieren lässt, sich in 20 – 30 % der Fälle genetische Mutationen nachweisen lassen (Varghese et

al., 2017). Dabei ist in der Regel keine einzelne Mutation oder genetische Läsion für die Ausprägung der Erkrankung ausschlaggebend, sondern eine Vielzahl genetischer Varianten hoher Penetranz (multifaktoriell) (Ellegood et al., 2015; Kuemerle et al., 2007; Phan et al., 2021). So sind bis heute über 500 Gene bekannt, die direkt oder indirekt mit der Ausprägung dieser Erkrankung assoziiert sind (Sgadò et al., 2013).

Die ausgeprägte genetische Komponente in der Pathogenese von ASD basiert auf der Beobachtung, dass dies eine der meistvererbbaeren psychiatrischen Krankheiten mit einer Konkordanz von 82 % bei monozygoten Zwillingen ist (Ellegood et al., 2015; Petit et al., 1995; Varghese et al., 2017). Während ASD von einer großen genetischen Heterogenität geprägt ist, sind die anatomischen Veränderungen im Vergleich verschiedener Betroffener meist sehr ähnlich (Donovan und Basson, 2017). Vorherrschend ist ein verringertes Hirnvolumen in verschiedensten Hirnarealen wie Frontallappen, Hypothalamus und Kleinhirn und strukturelle und morphologische Veränderungen auf Zellebene (Ellegood et al., 2015; Varghese et al., 2017). Die größten Abweichungen finden sich im Cerebellum mit Hypoplasie und verringerter Anzahl an Purkinjezellen (PC) (Benayed et al., 2005; Gharani et al., 2004).

Neben der genetischen Ursache für die Entstehung von ASD wird heute auch eine extrinsische Komponente vermutet. ASD könnte schon bei Ungeborenen durch Expositionen gegenüber bestimmten Umweltreizen noch im Mutterleib entstehen (Kuemerle et al., 2007; Varghese et al., 2017). So sind maternale Infektionen während der Schwangerschaft bereits bekannte Risikofaktoren für andere psychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie (Ozaki et al., 2020; Shi et al., 2009; Soumiya et al., 2011). Eine Infektion trächtiger Mäuse mit Influenza sorgte für ähnliche Veränderungen im Gehirn der neugeborenen Mäuse wie bei Betroffenen von ASD (Shi et al., 2009). Dabei ist wahrscheinlich nicht die Infektion selbst ausschlaggebend für die Effekte, sondern die maternale Immunantwort (Weir et al., 2015). Diese sorgt für eine Neuroinflammation, also eine entzündliche Immunantwort im Gehirn, die über Mediatorzellen wie Mikroglia und Astrocyten ausgelöst wird. Bei deren Aktivierung kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Cyto- und Chemokine (DiSabato et al., 2016; Kern et al., 2016). Im Gehirn wurde im Zuge dieser maternalen Immunantwort durch erhöhte Cytokinlevel eine verringerte Expression von Transkriptionsfaktoren sowie eine verringerte Synaptogenese

beobachtet. Außerdem ließ sich eine Veränderung der Mikroglia differenzierung feststellen (Ozaki et al., 2020; Soumiya et al., 2011). Neben einer Infektion wurden auch Frühgeburten durch entstandene Hypoxie als Auslöser einer Neuroinflammation identifiziert. Auch bei diesen Kindern ließ sich eine verstärkte Korrelation mit dem Auftreten von ASD nachweisen (Bokobza et al., 2019).

Da das Kleinhirn nicht nur morphologisch bei ASD Patienten besonders betroffen ist, sondern es auch nachweislich in funktionellen Magnetresonanztomographie (f-MRT) Studien eine Rolle in der Steuerung defizitärer Funktionen wie Sprache und Aufmerksamkeit bei ASD Betroffenen spielt, wurden die Versuche dieser Arbeit an Kleinhirnschnitten durchgeführt (Benayed et al., 2005; Gharani et al., 2004).

1.2 Aufbau und Verschaltung des Kleinhirns

Dem Kleinhirn (Cerebellum), das sich dorsal des Hirnstamms befindet und das Dach des vierten Ventrikels bildet, wurde in früheren Jahrzehnten hauptsächlich eine Rolle in motorischen Funktionen und der Integration von sensorischen Informationen aus der Peripherie zur Koordination von Bewegung und Balance zugeschrieben. Heute geht man allerdings davon aus, dass es auch für die Verarbeitung von Emotionen, Sprache und Kognition mitverantwortlich ist (Beckinghausen und Sillitoe, 2019; van Essen et al., 2020).

Daher lohnt es sich, einen genaueren Blick auf dessen Aufbau, Verschaltung und Entwicklung zu werfen. Anatomisch teilt sich das Kleinhirn in die Vermis und die zwei Hemisphären auf, während es sich funktionell in das Spinocerebellum (Bereich der Vermis und Paravermis, Afferenzen aus dem Rückenmark), Pontocerebellum (Bereich der Hemisphären ohne Paravermis, Afferenzen aus dem cerebralen Cortex via Pons und unterer Olive) und das Vestibulocerebellum (Bereich des Lobus flocculonodularis, Afferenzen aus vestibulären afferenten Fasern) gliedert (Beckinghausen und Sillitoe, 2019; Frantz et al., 1994).

Neben der Einteilung des Kleinhirncortex in Vermis und Hemisphären entlang der mediolateralen Achse erfolgt eine Gliederung des Cortex in anteroposteriorer Richtung anhand von zehn durch Fissuren getrennte Lobuli (I-X). Dieser Aufbau stellt sich auch

zwischen den Arten als evolutionär konserviert heraus (Beckinghausen und Sillitoe, 2019).

Auf zellulärer Ebene lässt sich das Kleinhirn in eine Rinde, den Cortex, und das Mark, die Medulla, aufteilen (Abb. 1). Die Rinde enthält drei Schichten (Beckinghausen und Sillitoe, 2019; van Essen et al., 2020). Die oberflächlichste Schicht, die Molekularschicht (Stratum moleculare), enthält den Dendritenbaum der Purkinjezellen, Korb- und Sternzellen als inhibitorische GABAerge Interneurone und exzitatorische glutamaterge Kletterfasern, die dem Kerngebiet der unteren Olive entstammen und die PC direkt innervieren. Die Schicht darunter, die Purkinjezellschicht (Stratum purkinjense), enthält, wie der Name bereits vermuten lässt, die Somata der PC, die Somata der Bergmann-Glia sowie die Kandelaber

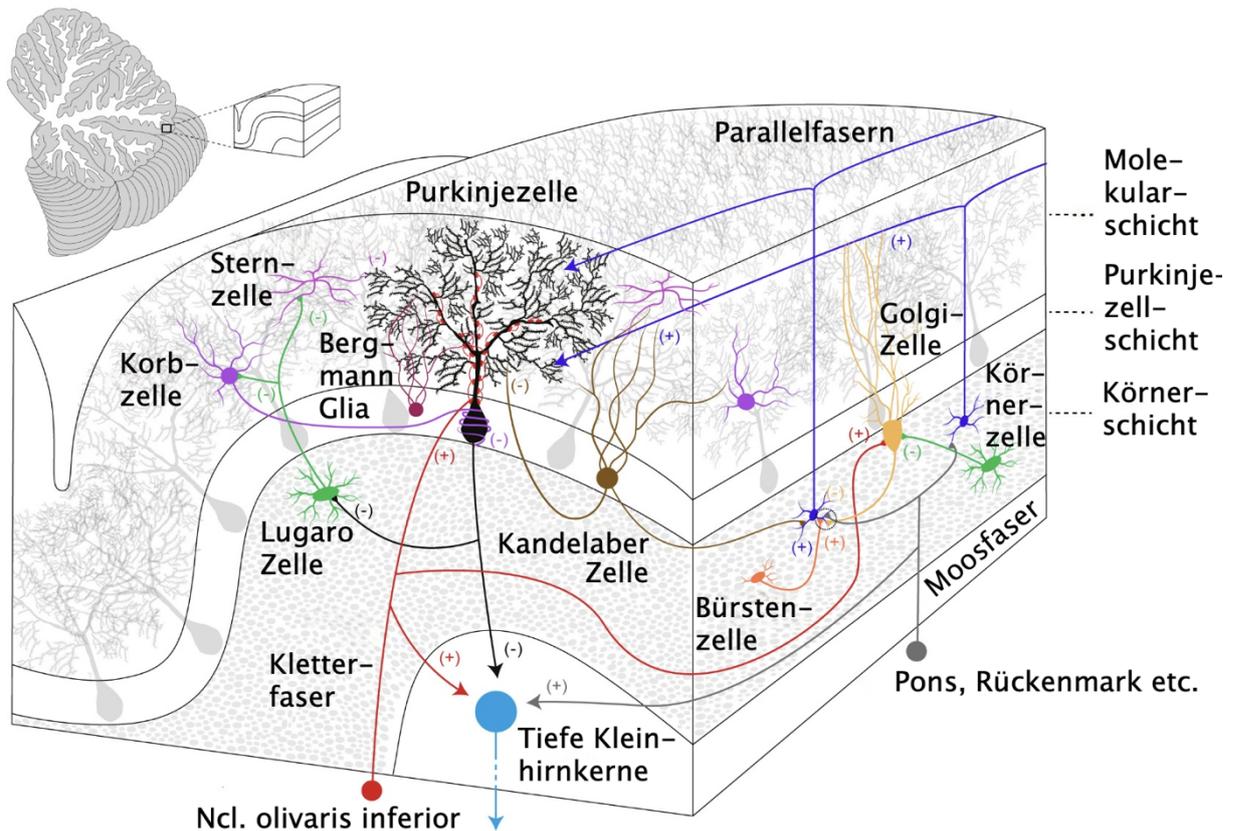


Abb. 1: Schematische Abbildung der Verschaltung des Kleinhirns und der Purkinjezellen (modifiziert nach Binda et al., 2020; open access); - inhibitorischer Einfluss, + stimulatorischer Einfluss. Purkinjezellen erhalten ihren Input über Kletterfasern und Parallelfasern der Körnerzellen und innervieren als einzige Efferenzen des Kleinhirns die tiefen Kleinhirnkernkerne sowie die Ncll. vestibulares. Ncl: Nucleus; Ncll: Nuclei.

zellen. Die unterste Schicht heißt Körnerzellschicht (Stratum granulosum) und enthält hauptsächlich exzitatorische glutamaterge Körnerzellen, deren Axone bis in die Molekularschicht aufsteigen und sich dort in sogenannte Parallelfasern verzweigen, die die PC innervieren. In dieser Schicht gibt es zudem inhibitorische Golgi- und Lugarozellen, unipolare Bürstenzellen (bevorzugt in Lobuli neun und zehn) sowie Moosfasern, die aus Hirnstamm und Rückenmark stammen und vestibuläre, motorische, sensorische und propriozeptive Informationen an Körnerzellen übermitteln (Beckinghausen und Sillitoe, 2019; Binda et al., 2020).

Unter der Körnerzellschicht befindet sich das Kleinhirnmark, das die sogenannten Kleinhirnkerne enthält. Diese heißen von medial nach lateral Nucleii (Ncll.) fastigii, Nucleus (Ncl.) globosus, Ncl. emboliformis, Ncl. dentatus und erhalten inhibitorischen Input von Axonen der PC, den einzigen Efferenzen des Kleinhirns. Nach Umschaltung in diesen Kernen verlassen die Efferenzen von dort aus das Kleinhirn oder gelangen direkt als Axone der PC ohne Umschaltung zu vestibulären Kernen (Binda et al., 2020; De Camilli et al., 1984; Haldipur et al., 2018; Reeber et al., 2013).

1.3 Entwicklung des Kleinhirns

Das Kleinhirn entwickelt sich in der Maus ab dem embryonalen Tag (E) 8,5 (Leto et al., 2016). Es entsteht aus dem dorsalen Anteil des ersten Rhombomers, dem proximalen Teil des Rhombencephalons, und dem distalen Teil des Mesencephalons (Haldipur und Millen, 2019; van Essen et al., 2020). Diese Region wird aufgrund seiner Lage auch als Mittelhirn-Nachhirn-Schranke bezeichnet.

Ab ca. E10 entstehen in parallel verlaufenden Wellen der Neurogenese die verschiedenen Zelltypen des Kleinhirns aus zwei verschiedenen Geweben: der cerebellären Ventrikulärzone und der Rautenlippe, die sich zwischen der Ventrikulärzone und der dorsalen Deckplatte entwickelt hat (Haldipur und Millen, 2019).

Aus der Ventrikulärzone entwickeln sich zunächst die GABAergen Interneurone und dann die PC. Anschließend wandern die PC entlang der Radialglia in Richtung des sich entwickelnden cerebellären Cortex und der pialen Oberfläche (Haldipur und Millen, 2019).

Parallel entstehen aus dieser Zone die cerebellären Astrocyten, Bergmann-Glia sowie Anteile der Oligodendrocyten.

Die Rautenlippe ist Ursprung der glutamatergen Neurone des Kleinhirns, der Projektionsneurone der tiefen Kleinhirnkerne, der unipolaren Bürstenzellen sowie der Körnerzellen. Die Vorläuferzellen dieser Körnerzellen befinden sich nach ihrer Auswanderung jedoch nicht direkt an ihrer späteren Lokalisation, sondern bilden zunächst eine äußere Körnerschicht, in der die Vorläuferzellen bis P15 Sonic Hedgehog getrieben stark proliferieren. Dies regt maßgeblich das cerebelläre Wachstum und die damit verbundene Einfaltung in Foliae an. Verlassen die Vorläuferzellen den mitotischen Zyklus, wandern sie entlang der Fortsätze der Bergmann-Glia von der äußeren Körnerschicht in ihre endgültige Position unter die PC-Schicht (Beckinghausen und Sillitoe, 2019; Haldipur et al., 2018; Haldipur und Millen, 2019).

Insgesamt kommt es durch die Proliferations- und Migrationsvorgänge zwischen E17,5 und P15 zu einer Vervielfachung der Oberfläche entlang der anteroposterioren Achse und zu einer parallelen Differenzierung der verschiedenen Kleinhirnzelltypen (Haldipur und Millen, 2019).

1.4 Prä- und postnatale Entwicklung der Purkinjezellen

Wie bereits erwähnt, entstehen die PC in CD1 bzw. Bl6-Mäusen ab E10,5 aus 100-150 Vorläuferzellen der Ventrikulärzone in der Maus (Baader et al., 1996; Green und Wingate, 2014). Diese wandern in Richtung der äußeren Körnerschicht aus und bilden eine mehrschichtige PC-Platte bis P18,5. Nach Auswanderung der letzten Neurone werden aus den dabei beteiligten Radialglia die späteren Bergmann-Glia. Aus besagter PC-Platte werden daraufhin über 50 Zellcluster, die sich bis zur Geburt in sagittale PC Bänder umwandeln und mit ihren Axonen die Kleinhirnkerne erreichen (Beckinghausen und Sillitoe, 2019; Binda et al., 2020; Haldipur et al., 2018; Haldipur und Millen, 2019). Innerhalb der ersten beiden postnatalen Wochen wandeln sich anschließend die noch in mehreren Lagen geschichteten PC in eine einzelne Schicht um (Dusart und Flamant, 2012).

Die weitere Entwicklung der PC wie der charakteristisch verzweigte Dendritenbaum erfolgt größtenteils postnatal (Abb. 2). Unmittelbar nach der Geburt sind die PC bipolar

mit je einem Axon und einem Dendriten an gegenüberliegenden Polen (einfaches fusiformes Stadium nach Ramon/Cajal und Armengol/Sotelo) (Armengol und Sotelo, 1991; Dusart und Flamant, 2012). An P3 bildet sich der prominente Dendrit zurück und es entstehen viele kleinere Dendriten sternförmig um das Soma herum. Eine Polarität existiert in dieser Phase nicht (stellares Stadium nach Ramon und Cajal, komplex fusiform nach Armengol/Sotelo). Ab P7 entwickelt sich ein Stammdendrit, der sich in der Sagittalebene dichotom zu teilen beginnt. Mit P15 ist die morphologische Reifung der PC weitestgehend abgeschlossen (Armengol und Sotelo, 1991; Dusart und Flamant, 2012). Insgesamt liegen die PC damit von Geburt an mit ihrem Dendritenbaum entlang der Fissuren vollständig senkrecht zur Hauptachse der Foliae in der Sagittalebene des Organismus (De Camilli et al., 1984; Kapfhammer und Gugger, 2012).

Auch die Synaptogenese findet hauptsächlich postnatal statt. Zwar entwickeln sich zwischen E19 und der murinen Geburt erste Synapsen mit Kletterfasern, sodass in der ersten postnatalen Woche noch eine Multiinnervation durch Kletterfasern vorliegt. Allerdings bilden sich diese innerhalb der zweiten Woche zugunsten einer verstärkten Synapsenbildung mit Parallelfasern, Körnerzellen (100.000 auf eine PC) und inhibitorischen Interneuronen zurück (Dusart und Flamant, 2012; Reeber et al., 2013). Diese verstärkte Synaptogenese hält noch bis zur dritten postnatalen Woche an (Dusart

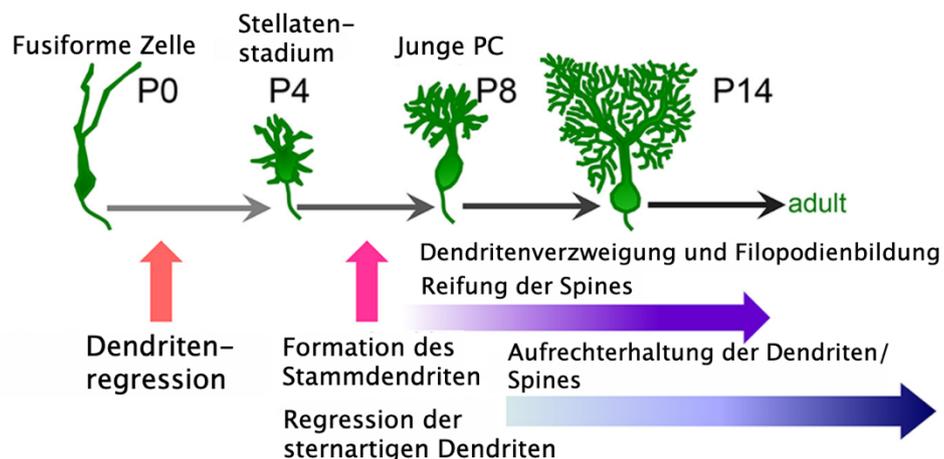


Abb. 2: Schematische Übersicht der Dendritenentwicklung einer PC postnatal (modifiziert nach Takeo et al. (2015); open access); P: Tage nach Geburt. Der Dendritenbaum von PC (Purkinjezellen) entwickelt sich über ein bipolares/fusiformes Stadium mit einem Dendrit und einem Axon über ein Stellatenstadium mit vielen sternförmigen Dendriten rund um das Soma zu seiner endgültigen Morphologie zwischen P10-14.

und Flamant, 2012).

Trotz komplexer Prozesse der Dendriten- und Synapsenbildung kommt es nach der Geburt zu einer Phase der verstärkten PC Apoptose und einer erhöhten Vulnerabilität dieser Zellen zwischen P1 und P8 mit einem Höhepunkt zwischen P3 und P5 (Dusart und Flamant, 2012; Jankowski et al, 2009).

1.5 Mechanismus der Neuroinflammation und Rolle der Mikroglia

Der Mechanismus der Neuroinflammation wird größtenteils über Mikroglia vermittelt. Dabei handelt es sich um gewebständige Makrophagen, die allerdings nach heutigem Wissen nicht mit den Monozyten des Knochenmarks verwandt sind, sondern aus dem embryonalen Dottersack (E7,5) entstehen, anschließend in das Gehirn einwandern (E8,5-9) und etwa 10-15 % der Zellen im adulten menschlichen Gehirn ausmachen (Orihuela et al., 2016; Sato, 2015). Da Mikroglia und deren Fortsätze sehr dynamisch sind, sind sie über ihre Kontakte zu Neuronen, Gliazellen, Blutgefäßen und Synapsen in der Lage, sehr heterogene Aufgaben zu erfüllen (Colonna und Butovsky, 2017). Einerseits überwachen sie die Umgebung von Neuronen, detektieren dort Pathogene und sorgen für eine Protektion vor diesen durch Auswanderung in die Läsionsgebiete. Zusätzlich initiieren sie einen Inflammationsprozess durch Erkennung körperfremder oder geschädigter Proteine, Ausschüttung von Cytokinen und Vermittlung einer Phagozytose (Kwon und Koh, 2020). Andererseits schütten sie während der Gehirnentwicklung neurotrophe Faktoren aus und sind so maßgeblich an der Bildung neuronaler Netze und Synapsen beteiligt (Araki et al., 2021; Parkhurst et al., 2013).

Daher lassen sich verschiedene morphologische Subtypen der Mikroglia unterscheiden, die sich wiederum in nicht aktivierte Zellen, sowie in aktivierte pro- und aktivierte antiinflammatorische Subtypen aufteilen (Cherry et al., 2014). Es gibt zwar spezifisch nachweisbare Mikroglia bei spezifischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder ALS, klassischerweise wird dabei allerdings in den proinflammatorischen M1 und den antiinflammatorischen M2 Subtyp unterteilt. Dieser M2 Subtyp lässt sich erneut in die Typen M2a, M2b und M2c einteilen (Cherry et al., 2014; Crain et al., 2013; Mills et al., 2000). Eine solche Mikrogliaaktivierung und Auslösung der initialen

Inflammation durch den M1 Subtyp geht mit einer Änderung der Zellmorphologie einher (Crain et al., 2013). Während ruhende Mikroglia lediglich über ein kleines Soma mit vielen dünnen Fortsätzen in alle Richtungen verfügen, schwillt dieses bei Aktivierung auf ca. das Fünffache der Ausgangsgröße an, die Fortsätze nehmen die Polarität in Richtung der Entzündung an und verdicken sich stark (Jonas et al., 2012). Zusätzlich lagern sich die Zellen aneinander, um das Gebiet der Läsion vom gesunden Nervengewebe abzugrenzen (Colonna und Butovsky, 2017).

Die verschiedenen Mikroglia Typen lassen sich auf verschiedene Arten aktivieren. Da Mikroglia als Teil des angeborenen Immunsystems fungieren, reagieren sie als erstes innerhalb von Stunden auf ein Pathogen. Entsprechend finden sich auf deren Zelloberfläche viele Immunrezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (TLR), NOD-like Rezeptoren oder Scavenger Rezeptoren, die bei Bindung ihrer entsprechenden Liganden die Mikrogliazelle aktivieren (Colonna und Butovsky, 2017; Orihuela et al., 2016). Treffen nun Schädigungs-assoziierte molekulare Muster-Proteine (Damage associated molecular patterns) oder Pathogen associated molecular patterns auf diese Rezeptoren der noch nicht aktivierten Mikroglia, kommt es zur Aktivierung der M1 Mikroglia und zur Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine wie IL-1b, TNF α , IL-6 oder IL-12 über den NF κ B Signalweg in Mikroglia, aber auch durch Th1 Zellen (autokrine und parakrine Aktivierung) (Cherry et al., 2014; Orihuela et al., 2016; Quincozes-Santos et al., 2021; Rice et al., 2015). Zusätzlich werden reaktive Sauerstoffradikale (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) als Abwehrstoffe produziert. Die Spezifität der Erkennung körperfremder Stoffe wird durch die verstärkte Expression des Major histocompatibility complex class II (MHCII) zur Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche der Mikroglia bewerkstelligt (Colonna und Butovsky, 2017). Durch die Mediatoren werden zusätzlich neutrophile Granulozyten angezogen, die neben den M1 Mikroglia selbst verstärkt pathogenes Material phagozytieren (Gensel und Zhang, 2015).

Um eine überschießende inflammatorische Reaktion und eine übermäßige Glianarbenbildung zu vermeiden, findet nun eine Konversion vom M1 zum M2 Phänotyp statt, der die Läsion beseitigen und zur Wundheilung beitragen soll (Cherry et al., 2014; Colonna und Butovsky, 2017; Orihuela et al., 2016). Dabei wird der M2a Phänotyp

besonders durch IL-4 via JAK1/STAT 6 Signalweg aktiviert, der weniger TNF α produziert und dessen Phagozytoseeigenschaften unterdrückt werden (He et al., 2020; Varnum und Ikezu, 2012). Stattdessen wird im Zuge der Wundheilung durch Ausschüttung von Wachstums- und antiinflammatorischer Faktoren die Zellproliferation, Neurogenese und Zellmigration gefördert (Gensel und Zhang, 2015). Der M2b Phänotyp folgt auf die Aktivierung des M2a Subtyps und steht im Zeichen der Immunregulation. Durch Aktivierung von TLR und Th2 Zellen sowie Bildung von IL-10 und Immunkomplexen sollen Zellreifung, Angiogenese sowie Synthese extrazellulärer Matrix gefördert werden (Cherry et al., 2014; Gensel und Zhang, 2015; Rice et al., 2015). Zum Schluss soll der M2c Subtyp die Entzündung durch Immunsuppression und Gewebeumbau bzw. Reparatur via Wachstumsfaktoren wie TGF β beenden (Cherry et al., 2014; Gensel und Zhang, 2015).

In den letzten Jahren rückte auf Basis dieses Modells die chronische Neuroinflammation als Funktion der Mikroglia in den Fokus bei der Suche nach Pathogenesemechanismen neurodegenerativer Erkrankungen. Dabei wird angenommen, dass durch M1 Aktivierung Cytokine produziert werden, die dann das Nervengewebe schädigen. Dadurch entstehen Damage associated molecular patterns (DAMPs), die dann wiederum Mikroglia aktivieren, was zu einer übermäßigen Nervengewebszerstörung führt. In jüngerer Zeit findet jedoch die neuroprotektive Seite der Mikroglia zunehmend Beachtung in der wissenschaftlichen Literatur (Cherry et al., 2014). Bereits während der Hirnentwicklung wird diesem Zelltyp eine Rolle in der Differenzierung weiterer Gliazellen zugeschrieben, da Mikroglia bereits ins Gehirn migrieren, bevor andere Gliazellen wie Astrocyten oder Oligodendrocyten sich überhaupt angefangen haben zu entwickeln (Squarzoni et al., 2014). Dabei behalten Mikrogliazellen noch bis nach der Geburt ihre amöboide und somit aktivierte Morphologie, was ein weiterer Hinweis auf Beeinflussung der Neurogenese ist (Michell-Robinson et al., 2015). Zusätzlich schütten sie auch neurotrophe Faktoren aus und halten über Regulation der Proliferation neuronaler Stammzellen den Pool dieser konstant, sodass sie so unmittelbar an Neurogenese und Synapsenbildung beteiligt sind (Araki et al., 2021; Cope und Gould, 2019; Tong und Vidyadaran, 2016). In Versuchen, in denen die Mikrogliaaktivierung während der Embryonalentwicklung unterdrückt wurde, wurde entsprechend auch eine verringerte Neuro- und Oligodendrogenese beobachtet (Al-Onaizi et al., 2020). Neben deren Rolle in der Gehirnentwicklung pränatal finden sich aber

auch postnatal Hinweise auf neurotrophe Effekte der Mikroglia. Einerseits wurde nach stattgehabten Läsionen im adulten Gehirn die Ausschüttung neurotropher sowie antiinflammatorischer Faktoren beobachtet, die Neuro- und Angiogenese im Zuge der Wundheilung fördern (Cope und Gould, 2019; Qin et al., 2019; Reshef et al., 2017). Andererseits führte eine unmittelbare postnatale Mikroglia-inhibition zu einer verringerten Neurogenese in der besonders neurogenetisch aktiven Subventrikulärzone des Seitenventrikels. Gleichzeitig waren bis P5 Mikroglia im Cerebellum noch amöboid aktiv (Nakayama et al., 2018; Shigemoto-Mogami et al., 2014). Daraus lässt sich schließen, dass Mikroglia nicht nur eine für das Gehirn toxische Rolle nach Entzündungen haben, sondern auch maßgeblich an der Differenzierung von Neuronen beteiligt sind.

Auch wenn heutzutage durch genetische Methoden wie der Exon Sequenzierung die Einteilung von Mikroglia in wesentlich höherem Detail möglich ist (Li et al. 2019), habe ich mich im Rahmen dieser Arbeit auf das gängige M1/2 System beschränkt. Die Mikrogliazellen sind hierdurch histologisch zu charakterisieren und bieten trotzdem eine ausreichende Genauigkeit für die Aussagen im Rahmen des Projekts.

1.6 Modulation von Mikroglia

Um dieser Rolle in Entzündungsinduktion, aber auch Neurogenese gerecht zu werden, benötigen Mikroglia die Stimulation des einzig auf diesen Zellen im Gehirn vorhandenen Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) via CSF1 als Überlebens- und Proliferationssignal, das von Neuronen und Gliazellen sezerniert wird (Coleman et al., 2020; Colonna und Butovsky, 2017; Rice et al., 2015). Für diesen Rezeptor existiert ein Antagonist, das PLX3397, das durch Überwinden der Blut-Hirn-Schranke so die Mikroglia-dichte um > 99 % *in vivo* und > 90 % *in vitro* im Hippocampus zu verringern vermag (Coleman et al., 2020). Induziert man nun zusätzlich künstlich eine Inflammation z.B. über Lipopolysaccharid (LPS), wird der sonst über Mikroglia vermittelte Effekt der Geninduktion, die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine und die Auslösung der Apoptose in Zielzellen über die Caspase 3 gehemmt (Coleman et al., 2020; Goshi et al., 2020; Xie et al., 2017). Ebenso finden sich weniger natürliche Killerzellen (NK-), CD4-Zellen, Makrophagen und Neutrophile im Gehirn sowie eine geringere Menge an ROS (Li

et al., 2017). Somit lassen sich also Mikrogliazellen durch eine Applikation von PLX3397 gezielt in ihrer Anzahl dezimieren.

Des Weiteren lässt sich der mikrogliale Subtyp gezielt modulieren. So sorgt eine Behandlung von einzelnen ramifizierten Mikrogliazellen aus der Ratte mit IL-4 für eine Umwandlung des M1 Typs in den M2a Phänotyp (Vergara et al., 2019). Gekoppelt mit einer Inflammation z.B. durch LPS beobachtet man so eine reduzierte Expression proinflammatorischer Cytokine. Nach menschlichen Rückenmarksverletzungen ist eine durch IL-4 verstärkte M2a Expression mit einer schnelleren Resorption der Entzündung und einer geringeren Gewebeerstörung assoziiert (Francos-Quijorna et al., 2016; Lively und Schlichter, 2018).

Ebenso lassen sich die Effekte des M1 Subtyps durch eine Behandlung mit Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat (dB-cAMP) abschwächen. Dies ist ein Struktur analogon des ubiquitären cAMP, ist jedoch im Gegensatz zu diesem in der Lage, über Zellmembranen hinweg zu diffundieren und so die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Abd-El-Basset und Rao, 2018). DB-cAMP unterdrückt dabei die durch eine Inflammation ausgelöste Ausschüttung des proinflammatorischen TNF α über Hemmung des NF κ B Signalwegs und fördert die Ausschüttung des antiinflammatorischen IL-10, ohne die Sekretion anderer proinflammatorischer Cytokine des M1 Subtyps zu inhibieren (Nakamura et al., 1999; Woo et al., 2004; Woo et al., 2003). Damit trägt es nicht nur zur Reparatur nach Traumata bei, sondern fördert auch die Astrocytenproliferation, die dann wiederum das Dendritenwachstum z.B. cerebellärer Neurone fördern (Abd-El-Basset und Rao, 2018; Miller et al., 1994). Es existieren folglich gute pharmakologische Möglichkeiten, den Subtyp der Mikroglia selektiv zu modulieren.

1.7 Engrailed-2 und ASD

Das Protein Engrailed-2 (En2) ist ein Homöoboxtranskriptionsfaktor, der für die Segmentierung und Festlegung der regionalen Identität einzelner Hirnregionen zuständig ist. Engrailed Proteine wurden von Insekten bis hin zu Säugetieren gefunden, was

vermuten lässt, dass Engrailed Proteine hochkonserviert sind und eine entscheidende Rolle in der Entwicklung spielen (Danielian und McMahon, 1996).

Wird das Engrailed Gen (Abb. 3) in *Drosophila*-Fliegen mutiert, entwickeln anteriore Flügelabschnitte posteriore Merkmale. Entsprechend waren in Mausmutanten mit einer En2-Defizienz zentrale cerebelläre Lobuli in den posterioren Lobus integriert (Millen et al., 1994).

Entlang der anteroposterioren Achse scheint Engrailed-2 hierbei nicht nur die Lage der Lobuli, sondern auch die Ausdehnung derselben zu steuern (Poudel et al., 2022; Willett et al., 2019). Zusätzlich findet sich ein veränderter Aufbau der Foliae im hinteren posterioren Anteil des Kleinhirns, weniger gut ausgeprägte Fissuren und auch eine glatte anstatt raue Oberfläche (Kuemerle et al., 1997; Millen et al., 1994; Sudarov und Joyner, 2007; Vogel et al., 1996; Willett et al., 2019).

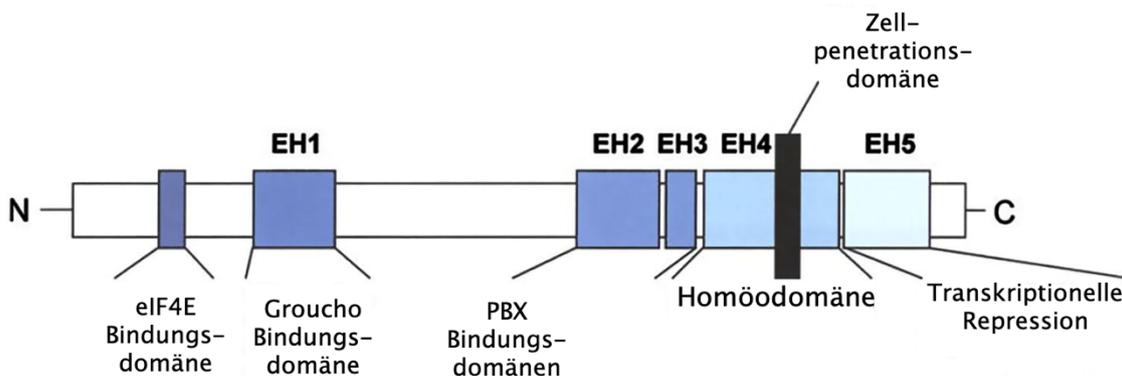


Abb. 3: Schematische Abbildung des En2 Proteins inklusive bekannter Domänen (modifiziert nach Morgan et al. (2006); open access). Domänen sind als Boxen in unterschiedlichen Blautönen markiert. eIF4E: Elongations-Initiationsfaktor 4E, EH: Homologe Regionen, Groucho: Transkriptionsrepressor, PBX: Prä-B-Zell Leukämie Transkriptionsfaktor.

Neben der anteroposterioren Gliederung lässt sich das Kleinhirn auch in der mediolateralen Achse segmentieren und auch hier spielt En2 eine ordnungsgebende Rolle. Wird En2 in Purkinjezellen überexprimiert, sind die sonst scharf begrenzten Zonen entlang der mediolateralen Achse verwaschen. Entsprechend waren in diesen L7En2 Mäusen die spinocerebellären Moosfasern in diffuseren Grenzen in den Kleinhirnkortex eingewachsen und zeigten deutliche Zeichen der Auflösung ihrer sonst sagittalen Organisation (Baader et al., 1999; Jankowski et al., 2004). Zusätzlich führte eine

vermehrte En2-Expression zu einer Abnahme an Neuronen inklusive der PC. Zudem fiel ein unreiferer Dendritenbaum, eine geringere Synapsenanzahl, aber auch eine herunterregulierte Expression definierter Gene in Neuronen auf (Holst et al., 2008; Soltani et al., 2017a).

Neben dem Einfluss auf die Segmentierung hat Engrailed auch für die PC Entwicklung eine wichtige Bedeutung. En2 wird bereits ab E8 im Bereich der Mittelhirn-Nachhirnschranke exprimiert, aus dem sich später Mittelhirn und Kleinhirnstrukturen entwickeln. Die Expression von En2 ist während der gesamten Entwicklung auf diesen Bereich der Mittelhirn-Nachhirnschranke beschränkt (Davis und Joyner, 1988). Im Bereich des Kleinhirns wurde dessen Expression in den PC und Körnerzellen beobachtet. Während diese jedoch in den PC um den Tag der Geburt deutlich zurückgeht, persistiert sie laut Sillitoe et al. (2010) in den Körnerzellen bis zum Erwachsenenalter. Wurde die Expression von En2 über den Tag der Geburt hinaus verlängert, verzögerte sich die PC Entwicklung signifikant, sodass die zeitlich korrekte Expressionsminderung des Proteins wahrscheinlich für die richtige zeitliche Abfolge der PC Entwicklung notwendig ist (Jankowski et al., 2004). Gleichzeitig zeigt sich bei En2-überexprimierenden Mäusen ein Rückgang der PC um 40%, was auf einen längeren Verbleib der L7En2 PC in einer Phase zurückgeführt wird, in denen PC sensibel auf apoptotische Stimuli wirken. Bei En2 Knockout Mäusen fehlen ebenfalls 40 % der Purkinjezellen, einhergehend mit einem atypischen Dendritenbaum, verringerter Dicke der weißen Substanz im Cerebellum und weniger axonalen Fortsätzen. Aus Studien an hippocampalen und mesencephalen Hirnregionen wissen wir, dass eine Deletion von En2 die Bildung von Neuronen und die nachfolgende apoptotische Degeneration stört (Albéri et al., 2004; Durens et al., 2021; Sgadò et al., 2006; Simon et al., 2001).

Makroskopisch und mikroskopisch erkennbare Unterschiede, die nach En2 Überexpression in L7En2-Mäusen gefunden wurden, und solche, die in ASD Patienten nachgewiesen wurden, sind in manchen Belangen sehr ähnlich. Dies betrifft die Größenzu- und abnahme des Kleinhirnvolumens, die Entwicklung von PC, aber auch Auswirkungen auf die anteroposteriore und die mediolaterale Achse. Zusätzlich konnten in diesen Mäusen auch Verhaltensanomalien festgestellt werden, die denen von ASD Patientinnen und Patienten zumindest ähneln. Dazu zählt ein gestörtes Sozialverhalten, verringertes räumliches Lernen und verstärkt epileptische Anfälle (Boschian et al., 2018;

Chelini et al., 2019; Provenzano et al., 2015; Sgadò et al., 2013). Daher wurde ein Zusammenhang zwischen En2 und ASD vermutet, sowohl im Mausmodell, als auch in genetischen humanen Assoziationsstudien. Hier ließen sich 2 Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism) feststellen, die mit einer Überexpression des En2 und damit auch mit ASD verbunden waren (Benayed et al., 2005; Boschian et al., 2018; Gharani et al., 2004; Soltani et al., 2017). Auch post-mortem wurden bei Patienten erhöhte En2 Level gemessen, möglicherweise im Zusammenhang mit übermäßiger Methylierung im Sinne einer epigenetischen Regulation (Choi et al., 2014; Sgadò et al., 2013).

Somit scheint En2 also als Zeitgeber der morphologischen Kleinhirnentwicklung zu fungieren, dessen Dysregulation sensibel in die Organogenese des Gehirns eingreift.

1.8 Engrailed-2 und Neuroprotektion

Interessanterweise fungiert En2 nicht nur als Regulator der Segmentierung und Differenzierung von definierten Neuronen, sondern es scheint auch als Wachstumsfaktor zu fungieren. Erste Hinweise darauf wurden in En2 Knockout (KO) Mäusen gefunden, die bereits früh embryonal ein verkleinertes Kleinhirn und damit eine verringerte PC Zahl zeigten. Später konnte nachgewiesen werden, dass dopaminerge Neurone im Mittelhirn nicht gebildet werden, wenn kein En2 exprimiert wird (Provenzano et al., 2020). Dies bedeutet, dass En2 die Proliferation und/oder das Überleben von Neuronen steuert.

Zusätzlich wird En2 auch durch Exocytose sezerniert und kann parakrine Funktionen ausüben (Maizel et al., 2002). Dies konnte für dopaminerge Neurone nachgewiesen werden, bei denen En2 als Überlebenssignal fungiert. En2 kann aber auch auf andere Neurone neuroprotektiv wirken, die dieses Protein nicht selbst herstellen. Sogar eine einzelne Injektion kann hier langanhaltende Effekte erzielen. So sind protektive Effekte auf den Komplex I der Atmungskette sowie gegen oxidativen Stress in Form von ROS bekannt (Alvarez-Fischer et al., 2011; Rekaik et al., 2015; Vargas Abonce et al., 2019).

1.9 Fragestellung

Wie oben ausgeführt, zeigen jüngste Arbeiten, dass Engrailed-2 neuroprotektiv wirken kann und offensichtlich schädliche Wirkungen von reaktiven Sauerstoffverbindungen kompensiert. Wie diese Funktion bewerkstelligt werden kann, ist bisher völlig unklar. Es ist auch nicht bekannt, welche neuronalen Zellen in dieser neuroprotektiven Wirkung oder ggf. auch neurotoxischen Wirkung bei Überexpression beteiligt sind. Bisher ist nur bekannt, dass En2 neuroprotektiv bei Behandlungen mit H₂O₂ wirkt. Ob es hingegen auch andere Stimuli gibt, weiß man bisher nicht. Da die Pathogenese von ASD häufig mit Infektionen während der Schwangerschaft in Zusammenhang gebracht wird, stellt sich die Frage, ob Entzündungsreaktionen durch En2 verändert werden können. Im Rahmen meiner Arbeit wurden deshalb Schnittkulturen des Kleinhirns genutzt, in denen grundlegende Schritte der Reifung cerebellärer Purkinjezellen in einem *in vivo* ähnlichen Umfeld ablaufen, um zelluläre Mechanismen der Störung der Differenzierung zu untersuchen. Dabei sollte herausgearbeitet werden, ob Differenzierungsstörungen an PC, die durch Lipopolysaccharide induziert werden, durch Mikroglia vermittelt werden, und ob diese Störungen durch exogenes En2 modifizierbar sind.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Für diese Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Modell, Hersteller
Thermoschüttler	Mixer HC, 2ml, Starlab, Hamburg, Deutschland (Kat. Nr. S8012-0000)
Blottinggerät	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad Laboratories, USA (Kat. Nr. 1704150)
Brutschrank (für Agarplatten)	T303 CO2-Incubator, Assab, Schweden
Brutschrank (für Schnittkulturen)	HERAcell 150i CO2 Incubator, Thermo Scientific, USA (Kat. Nr. 16496629)
Elektrophoresekammer	SubCell® GT, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA (Kat. Nr. 1704401)
Schüttelinkubator	New Brunswick™ Innova® 40/40R Incubator Shaker Series, Eppendorf, Deutschland (Kat. Nr. EPM1299-0094)
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma™ 900 Series, Thermo Scientific, USA (Kat. Nr. 10737554)
Laser Scanning Mikroskop (LSM)	Nikon Eclipse Ti2, Japan
Mikroskop	Stemi 1000 Stereomikroskop, Zeiss, Deutschland
pH Messgerät	Sevencompact, Mettler Toledo, USA (Kat. Nr. 11374233)
Photometer	BioPhotometer D30, Eppendorf, Deutschland (Kat. Nr. EP6133000908)
Photometer für 96-Well-Platten	μQuant™, BioTek Instruments, USA (Kat. Nr. 22211)
Roller Mixer	Roller Mixer SRT9, Stuart, UK (Kat. Nr. Z675113)
Orbitalschüttler	Unimax 1010, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland (Kat. Nr. 543-12310-00)
Sonifiziergerät	Bandelin Sonoplus HD 2070 Max. Power, Berlin, Deutschland (Kat. Nr. 10548351)

Gerät	Modell, Hersteller
Tissue Chopper	Mcllwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Ltd., USA (Kat. Nr. 51350)
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter L80XP, Krefeld, Deutschland (Rotortyp SW55Ti) (Kat. Nr. B31019)
UV Kammer	Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA (Kat. Nr. 04678)
Waage	NewClassic MF (MF303S), Mettler Toledo, USA (Kat. Nr.)
Wasserbad	SUB Aqua 2 Plus, Grant Instruments, Vereinigtes Königreich (Kat. Nr. 4AJ-9905860)
Western Blot Detektor	ImageQuant LAS 4000 Mini, GE Healthcare Life Science, UK (Kat. Nr.)
Zentrifuge 100 ml Falcons	Multifuge 3S/3S-R Rotortyp 3057, Heraeus, Deutschland (Kat. Nr. 2395)
Zentrifuge 2 ml Cup	Mikro 220/220R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland (Kat. Nr. Z722731)

2.1.2 Chemikalien

Tab. 2: Für diese Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Zusammensetzung
Agarosepulver	Biozym LE Agarose for gel electrophoresis, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland (Kat. Nr. 840004)
Ampicillin (100 mg/ml)	Ampicillin Sodium Salt BioChemica, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland (Kat. Nr. A0839,0010)
BamHI (20 U/ml)	New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. R0136L)
BamHI-HF (20 U/ml)	New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. R3136S)
BCA Standardreagenz	Aus BCA Protein Assay Kit, Pierce®, Thermo Scientific, USA (LOT: UF289331)
BL21 (De3) Bakterien	New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. C2527I)
Bradford Reagenz	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories, USA (Kat. Nr. 5000006)

Chemikalie	Hersteller/Zusammensetzung
Clal (10 U/ml)	New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. R0197L)
dB-cAMP (100x)	Cosmo Bio Co. LTD., Japan (Kat. Nr. CK027)
DMSO	Sigma-Aldrich®, USA (Kat. Nr. D2650-5X10ML)
DNase	Sigma-Aldrich®, USA (Kat. Nr. 11284932001)
EcoNI (10 U/ml)	New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. R0521L)
Eindeckelmedium	Fluoromount-G®, SouthernBiotech, USA (Kat. Nr. 0100-01)
Ethidiumbromid	Sigma Life Science, USA (Kat. Nr. 46067-50ML-F)
Glycerin (87%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Kat. Nr. 1.04094.0500)
GST Spin Purification Kit 0,2 ml	Pierce® Thermo Scientific, USA (Kat. Nr. 16106)
Hpal (5 U/ml)	New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. R0105S)
IL-4	Peprotech, Hamburg, Deutschland (Kat. Nr. 214-14-5UG)
IPTG	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland (Kat. Nr. A4773)
Isopropanol (99,8 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Kat. Nr. 6752.4)
Ladder 1 kb Gelelektrophorese	GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific, USA (Kat. Nr. SM0312)
Ladder SDS Page	Spectra™ Multicolor Broad Range (BR) Protein Ladder, Thermo Scientific, USA (Kat. Nr. 26634)
Ladepuffer (6x) Gelelektrophorese	Gel Loading Dye Purple (6x), New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. B7024A)
Ladepuffer (4x) + DTT für SDS Page	Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories Inc., USA (Kat. Nr. 1610747)
LB Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland (Kat. Nr. X968.1)
LPS-EK	InvivoGen, USA (Kat. Nr. tlr-eklps)
Lysozym	Lysozyme from chicken egg white, Sigma Life Science, USA (Kat. Nr. L6876-5G)
Milchpulver	Nonfat dried milk powder, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland (Kat. Nr. A0830)
NucleoSpin Plasmid DNA (NoLid) Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Chemikalie	Hersteller/Zusammensetzung
PLX3397	Selleckchem, Adooq Bioscience, USA (Kat. Nr. 1029044-16-3)
Puffer Cut Smart (10x)	New England Biolabs ® Inc, USA (Kat. Nr. B7204S)
Puffer R (10x) mit BSA	Fermentas, USA (Kat. Nr. BR5)
PvuI (10 U/ μ l)	Fermentas, USA (Kat. Nr. ER0622)
SOC outgrowth Medium	New England ® Inc, USA (Kat. Nr. C2527I) (aus BL21 (De3) Kit)
Transferpuffer Western Blot (5x)	Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer, Bio-Rad Laboratories, USA (Kat. Nr. 10026938)
Triton™ X-100	Sigma Life Science, USA (Kat. Nr. T8787-100ML)
Tween® 20	Sigma Life Science, USA (Kat. Nr. P9416-100ML)
Wasser steril	Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
XL1 Bakterien	New England Biolabs® Inc, USA (Kat. Nr. C2992I)

Tab. 3: Für diese Arbeit verwendete Lösungen

Lösungsgemisch	Substanz	Menge
Blockierlösung IHC	2% Gelatine 1:10 in PBS-Ca verdünnt	
Blockierlösung Western Blot	5% Milchpulver gelöst in 100 ml TBST	
CaCl ₂ -MgCl ₂ Lösung (100x)	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,5 g
	dd H ₂ O	100 ml
Gelatine (2%)	Gelatine from cold water fish skin, Sigma Life Science, USA, (Kat. Nr. G7041-100G)	2 g
	dd H ₂ O	100 ml
Hoechst 33342 Lösung	Hoechst 33342 Pulver	0,017 g
	PBS	30 ml
Lysepuffer Proteinextraktion	20 mM Tris pH 7,5	1578 μ l
	0,1% Triton X-100 (0,5 %)	400 μ l
	1 mg/ml Lysozym (100 mg/ml)	20 μ l
	1 μ g/ml DNase (1mg/ml)	2 μ l

Lösungsgemisch	Substanz	Menge
Modifizierte Hank's Lösung, pH 7,2	dd H ₂ O	100 ml
	KCl	0,373 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,125 g
	Glucose x H ₂ O	1 g
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,368 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,317 g
	NaHCO ₃	0,350 g
	ddH ₂ O	Auf 1000 ml auffüllen
	HCl	Bis pH 7,2 erreicht ist
Modifiziertes Neurobasalmedium	Neurobasal® Medium steril A (1x), Gibco, Life Technologies Limited, UK (LOT: 2124984)	48,5 ml
	GlutaMAX™-I (100x), Gibco, Life Technologies Limited, UK (LOT: 1945365)	0,5 ml
	B27® Supplement (50x), Gibco, Life Technologies Corporation, USA (LOT: 2077001)	1 ml
	Pen Strep, Gibco, Life Technologies Corporation, USA (LOT: 2112692)	0,5 ml
Paraformaldehyd 4%	Paraformaldehyd pulver	4 g
	PBS ⁻	100 ml
	NaOH	Bis pH 7,4 erreicht ist
PBS (10x) pH 7,0	NaCl	87,7 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	13,8 g
	dd H ₂ O	1000 ml
	HCl	Bis pH 7,0 erreicht ist

Lösungsgemisch	Substanz	Menge
PBS (1x)	PBS ⁻ 1:10 in ddH ₂ O verdünnt	
PBS-Ca (1x)	CaCl ₂ -MgCl ₂ Lösung 1:100 in 1x PBS verdünnt	
PLX3397 (10mM)	PLX3397	10 mg
	DMSO	2,39 ml
Regenerationspuffer 1 pH 8,5	NaCl	5,84 g
	Tris	2,4 g
	1% SDS	20 ml
	HCl	Bis pH 8,5 erreicht ist
Regenerationspuffer 2 pH 4,5	NaCl	5,84 g
	Natriumacetat	1,64 g
	1% SDS	20 ml
	HCl	Bis pH 4,5 erreicht ist
SDS 1%	1g SDS in 100 ml dd H ₂ O	
SSC-Puffer (20x) pH 7,0	NaCl	175,3 g
	Natriumcitrat	77,4 g
	dd H ₂ O	1000 ml
	HCl	Bis pH 7,0 erreicht ist
SSC-Puffer (2x)	SSC-Puffer (20x) 1:10 verdünnt in dd H ₂ O	
TBE Puffer	89 mM Tris	
	89 mM Borsäure	
	2 mM EDTA pH 8,0	
TBS Puffer (1x) pH 7,5	Tris	6,05 g
	NaCl	8,76 g
	dd H ₂ O	1000 ml
	HCl	Bis pH 7,5 erreicht ist
TBST Puffer (1x)	Tween [®] 20 1:1000 verdünnt in 1x TBS	
Transferpuffer Western Blot (1x)	Transferpuffer 5x	200 ml
	ddH ₂ O	600 ml
	Ethanol	200 ml
Tris-Glycin Puffer (1x) pH 8,3	25 mM Tris	
	192 mM Glycin	
	0,1 % SDS	
Tris-Puffer 10mM pH 8,0	Tris	0,12 g
	dd H ₂ O	100 ml
	HCl	Bis pH 8,0 erreicht ist
Tris-Puffer 20mM pH 7,5	Tris	0,49 g
	dd H ₂ O	200 ml
	HCl	Bis pH 7,5 erreicht ist
5% Triton [™] X-100	5 ml gelöst in 100 ml PBS	

Tab. 4: Für diese Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Calbindin-D28K, IgG	Kaninchen	ICH: 1:2000	Swant, Schweiz (Kat. Nr. CB-38a)
Anti-Calbindin-D28K, IgG	Maus	ICH: 1:2000	Sigma-Aldrich, USA (Kat. Nr. C9848)
Anti-GFAP, IgG	Maus	ICH: 1:1500	Millipore, USA (Kat. Nr. MAB360)
Anti-MBP	Maus	ICH: 1:500	Serotec, UK (Kat. Nr. MCA685)
Anti-Olig-2	Maus	ICH: 1:500	Millipore Corp., USA (Kat. Nr. MABN50)
Anti-Iba1	Kaninchen	ICH: 1:1000	WAKO, Neuss, Deutschland (Kat. Nr. 14046713)
Anti-CD14	Maus	ICH: 1:200	Novus Biologicals, USA, (Kat. Nr. NBP2-37291)
Anti-TREM2	Kaninchen	ICH: 1:100	Invitrogen, USA (Kat. Nr. PA85-87933)
Anti-CD64	Kaninchen	ICH: 1:50	Novus Biologicals, USA, (Kat. Nr. NBP2-90403AF350)
Anti-CD163	Kaninchen	ICH: 1:250	Invitrogen, USA (Kat. Nr. PA85-78961)
Anti-Engrailed 2	Kaninchen	Western Blot: 1:1000	Herstellung durch S. Kumar (ehemaliger Postdoktorand im Labor)
Anti-GST	Maus	Western Blot: 1:1000	Invitrogen, USA (Kat. Nr. Ma4-004)
Zweitantikörper			
Anti-Kaninchen, Alexa Flour 488	Ziege	ICH: 1:1000	Invitrogen, USA (Kat. Nr. A11034)
Anti-Maus, Alexa Fluor 488	Ziege	ICH: 1:1000	Invitrogen, USA (Kat. Nr. A11001)
Anti-Kaninchen, Alexa Flour 546	Ziege	ICH: 1:1000	Invitrogen, USA (Kat. Nr. A11035)
Anti-Maus, Alexa Flour 546	Ziege	ICH: 1:1000	Invitrogen, USA (Kat. Nr. A11030)
Anti-Ratte, Alexa Flour 546	Ziege	ICH: 1:1000	Invitrogen, USA (Kat. Nr. A11081)
Anti-Kaninchen, Horseradish Peroxidase	Ziege	Western Blot: 1:3000	Dako, Jena, Deutschland (Kat. Nr. P044801-2)

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus, Horseradish Peroxidase	Ziege	Western Blot: 1:30 000	Dako, Jena, Deutschland (Kat. Nr. P044701-2)

2.1.3 Weitere Gegenstände

Tab. 5: Für diese Arbeit verwendete weitere Gegenstände

Gegenstand	Hersteller/Modell
Cell Culture Inserts	Millicell® Cell Culture Inserts, 0,4 μ m, 30 mm Diameter, Merck Millipore Ltd., Irland (Kat. Nr. PIHP03050)
Deckgläschen (22x32mm)	VWR, USA (Kat. Nr. 631-0133)
Dialysekit	Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Devices, 10K MWCO 0,5 ml, Thermo Scientific, USA (Kat. Nr. 88401)
Falcons (50 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland (Kat. Nr. 227 261)
Filterstacks (7,5 x 10 cm)	Mini Trans-Blot® Filter paper, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA (Kat. Nr. 1703932)
Micro Tube Eppendorf (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland (Kat. Nr. 72.690.001)
Micro Tube Eppendorf (2 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (Kat. Nr. NA16.1)
Objekträger (76x26x1mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Parafilm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (Kat. Nr. H666.1)
Pasteurpipette (1ml)	Pastette® Extended Fine Tip Mini, neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland (Kat. Nr. LW4231)
Zellkulturschale groß (60 mm)	TPP®, Schweiz (Kat. Nr. 593060)
Zellkulturschale klein (35 mm)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland (Kat. Nr. 627160)
Pinsel (Größe 3/0)	Da Vinci, Nürnberg, Deutschland (Kat. Nr. 08-22599)
PVDF Membranen (7,1 x 8,5 cm)	TransBlot® Turbo™ Mini-size, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
6-Well-Platte	TPP®, Schweiz (Kat. Nr. 92006)
24-Well-Platte	TPP®, Schweiz (Kat. Nr. 92424)
96-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific, USA (Kat. Nr. 167008)

Gegenstand	Hersteller/Modell
Western Blot Gel	Mini-PROTEAN®TGX™ Precast Gels 4-15 %, 10-well comb, 50 µl/well, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA (Kat. Nr. 456-1084)

2.2 Maushaltung

Bei den für diese Arbeit verwendeten Tieren handelt es sich um FVB/N Mäuse. Mäuse werden jährlich von Janvier bezogen (Stammname: Rj) und im hauseigenen Tierstall gezüchtet. Die Haltung der Tiere erfolgte nach § 11 des geltenden Tierschutzgesetzes (TSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (Bürgerliches Gesetzbuch, (BGB)l. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 20 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist. Eine entsprechende Genehmigung des LANUV lag vor. Die postnatalen Tiere wurden entsprechend §4 des aktuellen TSchG unter Vermeidung von Schmerzen durch Dekapitation getötet.

Die hier verwendeten Mäuse wurden in Isolatoren in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus (12h Licht, 12h Dunkelheit) mit ad libito Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Käfige enthielten explorative Gegenstände in Form von Papier und Kartonagen, um den Tieren Beschäftigung und Versteckmöglichkeiten zu bieten.

Zur Verpaarung wurde je ein Männchen mit bis zu zwei Weibchen für drei Tage in einem Käfig zusammengesetzt. Um übermäßige Zucht zu vermeiden, wurden die Mäuse nur für 3-4 Tage zusammengesetzt und die Verpaarungen in der Tierzuchtmanagementsoftware Python based Relational Animal Tracking (PyRAT) dokumentiert. Die durchschnittliche Schwangerschaftsdauer beträgt 20 Tage. Der Tag der Geburt des Nachwuchses wird als P0 bezeichnet. Diese P0 Mäuse wurden für die Anfertigung der Kleinhirnschnitte verwendet (siehe 2.5).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Transformation der Plasmide in BL21(De3)-Bakterien

Eine Transformation erlaubt es Bakterien, fremde DNA aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren. Hierbei kann es entweder zum Einbau ins große ringförmige Chromosom kommen oder zum extrachromosomalen Vorliegen der DNA in einem Plasmid (Ambur et al., 2016).

Zur Herstellung von rekombinantem En2 wurde ein Plasmid konstruiert, in dem En2 unter einem bakteriellen Promotor in BL21-Bakterien in hohen Mengen exprimiert und daraus angereichert werden konnte. Zur Anreicherung mittels Affinitätschromatographie wurde das En2 Protein mit einem GST Protein fusioniert. Entsprechend diente das GST Protein allein als Kontrollprotein.

Zur Herstellung des En2 Proteins wurde das Plasmid pQE80L-HisGst-En2mfl genutzt. Dieses wurde von Herrn Dr. Sujeet Kumar freundlicherweise zur Verfügung gestellt (AG Baader, Univ. Bonn; Abb. 4). Die Vektoren wurden ursprünglich von Dr. Sujeet Kumar für die Herstellung von Antigenen zur Immunisierung von Kaninchen erzeugt, sollen hier aber nochmals kurz beschrieben werden, da der Aufbau des Konstrukts für die Interpretation der Daten von Wichtigkeit ist. Als Grundvektor diente pGEX-3X (Abb. 4). Hinter den CMV-Promotor mit nachgeschaltetem GST Protein wurde die komplette Engrailed-2 kodierende Sequenz kloniert inklusive ATG und Stop-Codon. Der Basisvektor enthielt bereits das GST Protein allerdings ohne Stop-Codon, sodass bei der Translation ein Fusionsprotein entstehen sollte mit Engrailed-2 am C-Terminus des GST. Auf dieses Plasmid wird im Folgenden nur als pQE-En2 Bezug genommen. Zur Vervielfältigung von pQE-En2 wurde Plasmid-DNA zunächst in *E. coli* Bakterien des Typs XL1 transformiert, später in *E. coli* Bakterien des Typs BL21(De3).

Dem Herstellerprotokoll folgend wurden dazu käuflich erworbene transformationskompetente BL21-Bakterien in einem 0,2 ml Gefäß auf Eis aufgetaut bis sich keine Eiskristalle mehr darin finden ließen. Die Plasmid-DNA wurde auf 40 ng/µl in 10 mM Tris pH 8,0 verdünnt. 1 µl dieser DNA-Verdünnung wurden zu 50 µl Bakterien zugegeben, die Gefäße einige Male invertiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 10 s bei 42 °C im Wasserbad kurzfristig erhitzt und sofort darauf für 5 min auf Eis gelagert, um die Zellwand für die DNA durchgängig zu machen. Daraufhin

wurde zu diesem Ansatz 950 µl SOC Medium pipettiert und das Gemisch bei 37 °C für 60 min im Schüttelinkubator kultiviert.

Zur Auftragung auf eine Agarplatte mit Ampicillin wurde der Ansatz 10-fach in SOC mit 100 µg/ml Ampicillinzusatz verdünnt und 100 µl dieser Suspension gleichmäßig auf der Platte verteilt. Da sowohl die pQE-En2-Plasmid DNA, als auch der pGEX-3X Vektor ein Ampicillinresistenzgen enthielten, das vorher nicht im Bakterienstamm vorhanden war, sollten nur Klone wachsen, die das jeweilige Plasmid internalisiert hatten. Im Anschluss wurden die Platten mit dem Boden nach oben über Nacht bei 37 °C bebrütet. So wird verhindert, dass die Platten austrocknen. Genauso wurde mit der Transformation des Vektors pGEX-3X verfahren, der dem Vektor ohne die Einbringung von En2 entspricht.

2.3.2 Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Isolierung der pQE-En2 Plasmid-DNA musste nach der Einbringung dieser Plasmid-DNA in Bakterien im nächsten Schritt ein Klon von Bakterien gefunden werden, der das gewünschte Plasmid aufgenommen hatte. Dazu wurde die DNA aus mehreren Klonen mittels Miniprep-Kit aufgereinigt und im Anschluss mittels Restriktionsverdau analysiert. Zur Isolierung der DNA wurden Bakterienklone von der über Nacht bebrüteten Agarplatte gepickt und diese in je 3 ml LB Medium + Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakteriensuspensionen bei 11.000 g für 30 Sekunden in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert. Die Plasmidisolierung wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid DNA (no lid) Purification Kits durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Bakterienzellen durch die mitgelieferten Puffer A1-A3 (Resuspendionspuffer, Lysepuffer mit alkalischen pH und Neutralisationspuffer mit saurem pH) lysiert und jeglicher Zellschrott durch Zentrifugation für 5 min bei 11.000 g entfernt. Der Überstand, der nun die DNA enthielt, wurde auf eine Säule des Kits gegeben, sodass die DNA an das Säulenmaterial binden konnte. Durch Zentrifugation der Säule wurden nun alle nicht-bindenden Bestandteile der Bakteriensuspension abzentrifugiert. Die Säule wurde mit einer Ethanol-haltige Lösung gemischt und erneut zentrifugiert, um übrigbleibende, chromosomale (nicht-Plasmid-) DNA zu entfernen. Dann wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, um die Säulenmembran zu trocknen. Zum Schluss wurde durch Zugabe des Elutionspuffers (salzarm und pH-neutral)

die Bindung der DNA von der Säule gelöst und diese bei der Zentrifugation in einem Microgefäß aufgefangen. Die DNA Lösungen wurden für den anschließenden Restriktionsverdau genutzt.

Für die Isolierung des pGEX-3X Vektors musste anders verfahren werden, da sich mittels der zuvor beschriebenen Methode der Miniprep die Vektor-DNA nicht vom wässrigen Überstand durch Auftragung auf die Säulen des Kits trennen ließ. Daher wurden hier die Bakterien, die in drei Falcons mit LB Medium + Ampicillin aus gepickten Bakterienklonen einer über Nacht bebrüteten Agarplatte + Ampicillin gewachsen waren, auch mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid DNA (no lid) Purification Kits mit den Puffern A1-3 lysiert. Allerdings wurde der nach Zentrifugation entstandene wässrige Überstand aus Zellschrott sowie DNA, RNA und Proteinen von ca. 750 μl mit demselben Volumen Isopropanol gemischt und nicht auf eine Säule des Kits gegeben. Dieses Gemisch wurde dann für 10 min bei -20 °C im Gefrierschrank belassen, damit die DNA durch das Isopropanol ausgefällt werden konnte. Anschließend konnte das Eppendorf Cup für 5 min bei 12 000 g zentrifugiert werden. Der Überstand wurde danach verworfen und das Pellet, das dann neben der Vektor-DNA auch chromosomale DNA und Proteine enthielt, trocknen gelassen. Nach ausreichender Trocknung wurden 50 μl ddH₂O zugegeben, um das Pellet darin zu resuspendieren (Holmes und Quigley, 1981). Da die hier gewonnene DNA nur zur Transformation von B21-Bakterien genutzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedliche DNA Aufreinigungsmethode für pQE80 Vektoren und pGEX Vektoren keinen Einfluss auf das Endprodukt, das GST-En2 bzw. GST alleine hatte.

2.3.3 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob die Bakterien das gewünschte Plasmid amplifiziert hatten, wurde die isolierte DNA mit Restriktionsenzymen verdaut. Diese Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass das Insert oder ein Teil des Inserts herausgeschnitten wurde.

Dazu wurden zu je 7 μl einer jeden pQE-En2 Klon-DNA 13 μl des Restriktionsansatzes gegeben, der die Restriktionsenzyme BamHI (20 U/ μl) und ClaI (10 U/ μl) sowie den Puffer CutSmart (10x) enthielt. Die Kontrolle des unverdauten Plasmids bestand aus 2 μl DNA eines der Klone, 0,1 μl Puffer sowie 11 μl Wasser, allerdings ohne Enzyme.

Die so entstandenen vier Ansätze (3 Proben + 1 Kontrolle) wurden bei 37 °C, also dem Temperaturoptimum der zugegebenen Enzyme, für eine Stunde im Thermoschüttler verdaut. Im Anschluss wurden je 3,3 µl 6x Ladepuffer hinzugegeben und auf ein 1% Agarosegel mit 5 µl Ethidiumbromid der Konzentration 5 ng/ml aufgetragen. In diesem Gel liefen die DNAs für 60 min bei 100 V und anfangs 115 A. Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnte das Gel in einer UV Kammer (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) mittels UV Licht bei einer Wellenlänge von 340 nm betrachtet werden. Somit ließen sich für die entsprechenden Restriktionsenzyme charakteristische Banden detektieren. Die gewählten Restriktionsenzyme BamHI und ClaI sollten besagtes pQE-En2-Plasmid mit 6378 Basenpaaren (bp) bei bp 145 (BamHI) und bp 1060 (ClaI) zerschneiden. Somit sollte sich bei einem erfolgreichen Verdau ein kurzes DNA-Fragment von 915 bp Länge sowie ein Längeres von 5463 bp Länge ergeben. Da das En2 Gen die bp von 862 bis 1836 umfasst, zerschnitten diese Restriktionsenzyme En2 auch nur im ersten Drittel. Für die DNA der pGEX-3X Klone wurden 2 Ansätze mit Restriktionsenzymen erstellt. Einerseits wurden zu 10 µl DNA jeder der drei Klone die Restriktionsenzyme BamHI-HF (20U/ml) und HpaI (5U/ml) gegeben (Restriktionsansatz

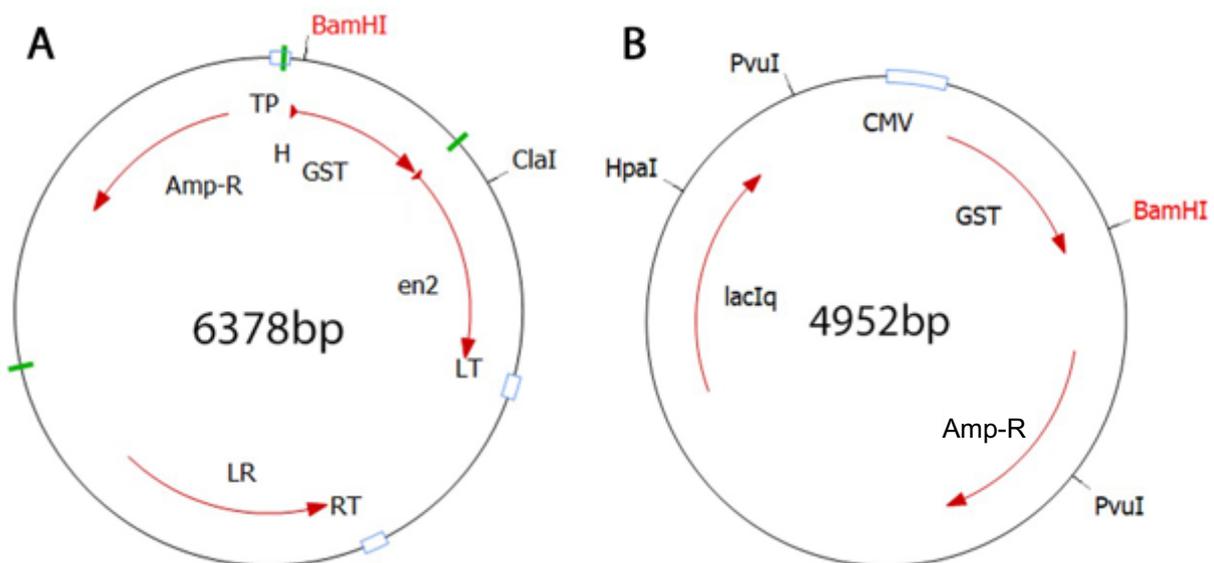


Abb. 4: Schematische Übersicht des pQE-En2-Plasmids und des pGEX-3X Vektors mit eingezeichneten Restriktionsenzymchnittstellen. **A:** pQE-En2; **B:** pGEX-3X. Die GST-Sequenz in beiden Proben ist auf Proteinebene zu 100% identisch. TP: T5 Promotor; H: His Tag; LT: lambda Transcriptional termination region; LR: lac repressor; RT: rrnB T1 Transcriptional termination region; Amp-R: Ampicillin Resistenz Gen; CMV: CMV Promotor; lacIq: Lac I Gen; bp: Basenpaate; BamHI, ClaI, HpaI, PvuI: Restriktionsenzyme.

= 10 µl, Puffer CutSmart (10U/µl)). Andererseits wurde in einem zweiten Ansatz das Enzym PvuI (10U/µl) hinzugefügt (Restriktionsansatz = 10 µl, Puffer Fermentas Red (10x)). Als Kontrollen dienten 5 µl jeder der drei DNAs mit 0,1 µl Puffer und 10 µl Wasser. Beim ersten Ansatz wurde bezüglich der Bebrütung genauso verfahren wie bei der pQE-En2-DNA, das Enzym PvuI im zweiten Ansatz musste jedoch nach der Bebrütung bei 37 °C für 1 h für 20 min bei 80 °C hitzedeaktiviert werden. Danach wurde wie oben erläutert der Ladepuffer hinzugegeben und die Gelelektrophorese sowie die Detektion des Gels in der UV Kammer genauso durchgeführt wie beim Verdau der pQE-En2-DNA.

Da GST die bp 258 bis 956 umfasst, wurden Enzyme gewählt, die das Gen möglichst nicht oder nur in der Anfangs- oder Endsequenz schnitten. Hier wurden dazu in einem ersten Ansatz die Enzyme BamHI-HF, das bei 934 bp schneidet, und HpaI, das bei 4155 bp schneidet, verwendet. Da das Plasmid über eine Gesamtlänge von 4952 bp verfügte, sollten zwei Fragmente von 3221 und 1731 bp Länge entstehen.

In einem zweiten Ansatz wurde isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym PvuI verdaut. Da dieses zwei Mal innerhalb des Plasmids schneidet, bei 1775 und 4640 bp, sollten so erneut zwei Fragmente der Längen 2865 und 2087 bp entstehen (Abb. 4).

2.3.4 Sequenzierung des Plasmids

Zur Sequenzierung des pQE-En2-Plasmids wurden 15 µl der durch das DNA Isolationskit gewonnenen Plasmid-DNA an die Firma Eurofins Genomics geschickt, um sicherzugehen, dass die Bakterien den Vektor tatsächlich unverändert aufgenommen hatten. Dafür wurde eigens ein Primer der Sequenz 5`-CCGAGCGTTCTGAACAAATC-3` von dieser Firma synthetisiert. Hierbei handelt es sich um einen reversen Primer, der von uns mit Hilfe des Programms Clone Manager Professional 9 ausgewählt wurde. Er bindet komplementär an die Basenpaare des Antisensestranges von bp 1922-1903. Da das En2 Gen lediglich von bp 862-1836 im Plasmid reicht, wurde so sichergestellt, dass dieses in Gänze bei der Sequenzierung untersucht wurde. Von einem Vorwärts-Primer haben wir auf Grund der GC-reichen Sequenz im 5' Bereich des En2 Fragmentes abgesehen, da bekannt ist, dass diese von DNA-Polymerasen nur unzureichend gelesen und repliziert werden können.

2.4 Biochemische Methoden

Zur Herstellung von En2 Protein war es notwendig, dieses Protein aus mit pQE-En2 transformierten BL21-Bakterien zu isolieren.

2.4.1 Proteinextraktion

Zur Gewinnung von Protein aus BL21-Bakterien wurden 500 ml der mit dem pQE-En2-Plasmid transformierten BL21-Bakterien bis zur Log-Phase, also einer Extinktion von ca. 0,6, in LB Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. In dieser Phase verläuft das Bakterienwachstum exponentiell durch einfache Teilung in minimaler Zeit (Wang et al., 2015). Anschließend wurde 100 µM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) zugegeben und die Bakteriensuspension weitere 5 h unter konstantem Schütteln kultiviert. Zur Gewinnung der Bakterien wurden die 500 ml Suspension auf 5 Falcons á 100 ml aufgeteilt und die Bakterien bei 4 °C 15 min in der Multifuge 3S/3S-R abzentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -80 °C gelagert. IPTG als Strukturanalogon der Lactose fungiert hierbei als Induktor des Lac Promotors, der vor den zu expressierenden Genen liegt und im E. coli Stamm BL21(De3) enthalten ist. Da IPTG im Gegensatz zu Lactose aber in den Bakterien nicht abgebaut werden kann, kommt es zur dauerhaften Induktion der Transkription und somit auch der Proteinexpression (Faust et al., 2015).

Die Proteinextraktion selbst beruhte anschließend auf Affinitätschromatographie durch Bindung des in unserem pQE-En2-Plasmids enthaltenem GST Proteins an Agarose-Harz immobilisiertes Glutathion (Thermo Fisher Scientific, 2022a).

Zunächst wurde dazu das Bakterienpellet einer 100 ml Suspension mit 2 ml Lysepuffer für 20 min bei Raumtemperatur lysiert und im Anschluss 3 x 15 s bei 20 kHz sonifiziert. Dabei werden durch Ultraschallwellen Druckwellen erzeugt, die intakte Zellen sowie deren Membranen und Zellwände aufreißen und die darin enthaltene hochmolekulare DNA zerkleinern, so dass diese später leichter von den Proteinen getrennt werden kann (Bandelin, 2022). Das so entstandene Lysat wurde für 25 min bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge bei 42.000 rpm (engl. Rounds per minute) (Rotor SW55Ti) zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde auf Säulen des „Pierce® GST Spin Purification

Kits“ gegeben, die über GST markierten Proteine gemäß Herstellerprotokoll an die Säulen gebunden, durch Waschpuffer gereinigt und im Anschluss durch einen Glutathion-haltigen Puffer von der Säule eluiert. Dieser sorgte für eine Verdrängung des GST Proteins mit oder ohne dem daran gebundenen En2 von den Glutathion-Agarose-Harz Partikeln, da Glutathion eine höhere Affinität zum GST hat. Durch Zentrifugation der Säulen ließen sich auf diese Weise 3 Proteinproben aus 3 nacheinander folgenden Elutionsschritten auffangen (Thermo Fisher Scientific, 2022a).

2.4.2 Dialyse des isolierten Proteins

Zur weiteren Aufreinigung des En2 Proteins wurde das in 2.4.1 gewonnene Proteingemisch durch Dialyse vom Glutathion befreit. Dazu wurden die Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Devices von Thermo Scientific mit einer Porengröße (Molecular Weight cut-off (MWCO)) von 10 kDa verwendet. Da Glutathion nur aus drei Aminosäuren besteht, GST jedoch eine Größe von 26 kDa und Engrailed-2 von 33 kDa hat, konnte so das Glutathion zuverlässig entfernt werden, ohne die Proteine selbst zu verlieren (Forman et al., 2009; Long et al., 2011; Morgan et al., 2011).

Zunächst wurden 15 ml ddH₂O in ein 15 ml Falcon-Gefäß gegeben. In dieses Falcon-Gefäß wurde der Dialyseschlauch gehängt, der zuvor mit 400 µl Extrakt gefüllt worden war, und das Falcon-Gefäß verschlossen. Die Proben wurden auf einem Orbitalschüttler bei ca. 150 rpm geschüttelt, nach zwei Stunden der Dialysepuffer gewechselt und anschließend über Nacht weiter geschüttelt. Am nächsten Morgen konnten die dialysierten Proteine aus den Einsätzen in frische Mikrotubes pipettiert werden.

2.4.3 Bradford Assay

Um die Konzentration des isolierten En2 zu messen, wurde eine Bradford Analyse durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und der damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums. Im ungebundenen Zustand liegt besagter Farbstoff in kationischer Form vor und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 465 nm. Bindet er jedoch an Proteine über Van der Waals Kräfte und hydrophobe

Wechselwirkungen, liegt Coomassie Brilliant Blue G-250 in anionischer Form vor, sodass sich dessen Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Diese Absorptionszunahme bei dieser Wellenlänge kann nun als Parameter für die gesuchte Proteinkonzentration dienen (Bradford, 1976; Compton und Jones, 1985).

Zur Konzentrationsbestimmung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe aus einer 2000 µg/ml konzentrierten Stocklösung der Firma Pierce hergestellt. Dazu wurden vier Lösungen der Konzentrationen 500, 250, 125 und 25 µg/ml in Elutionspuffer hergestellt. Je 10 µl dieser Verdünnungen sowie der drei Proteinproben und des Elutionspuffers allein als Blindwert wurden 3 x auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurde 200 µl Bradford Reagenz, die vorher 1:5 in ddH₂O verdünnt und daraufhin filtriert wurde, in jedes der bereits gefüllten Wells hinzugegeben und 5 min bei Raumtemperatur und Schütteln inkubiert. Dann konnte die Extinktion im µQuant™, BioTek Instruments bei 592 nm gemessen werden.

Anhand dieser Verdünnungsreihe wurde durch Extinktionsmessung mit Hilfe von Excel eine Standardgerade mit zugehöriger Gleichung ermittelt. Die Extinktion der drei Proteinproben wurde dann in ein Excel-Datenblatt eingetragen. Das Excel Datenblatt erzeugte eine Eichgerade und errechnete darauf die Protein-Konzentration der Proben.

2.4.4 SDS Page

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS Page, engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) können Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt werden. Damit kann Engrailed-2 von anderen bei der Aufreinigung anfallenden Proteinen getrennt und identifiziert und dessen Reinheit kontrolliert werden.

Dazu wurden zunächst je 100 ng der eluierten Proteinproben mit 4x Ladepuffer und Elutionspuffer auf 15 µl aufgefüllt und für 5 min bei 95 °C denaturiert, um deren native Konformation aufzuheben. Dazu diente einerseits das dem Ladepuffer hinzugefügte Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT), das zur Spaltung von Disulfidbrücken fähig ist, andererseits die Hitze selbst (Kuwajima et al., 1990). Anschließend konnten die Proben nach kurzer Zentrifugation in die Geltaschen pipettiert werden. Das Gel selbst sowie die

umgebene Kammer wurden mit 1x Tris-Glycin Puffer, der SDS enthält, gefüllt. Dieses SDS gibt den Proteinen eine negative Ladung, die die Ursprungsladung der nativen Proteine abschirmt und so gleiche Laufeigenschaften im Gel für alle Proteine gewährleistet, da dann besagtes Laufverhalten nur noch von der Molekulargröße und nicht mehr von der Ladung abhängig ist (Al-Tubuly, 2000).

Nach Befüllung des von Bio-Rad Laboratories gekauften Gels des Typs Mini-PROTEAN®TGX™ Precast mit den Proben wurden diese zunächst bei 65 V für 15 min ins großporige Sammelgel laufen gelassen und anschließend für eine weitere Stunde bei 100 V im kleinporigeren Trenngel aufgetrennt.

2.4.5 Western Blot

Zur eigentlichen Detektion der aufgetrennten Proteine wurde nun ein Western Blot durchgeführt und die hierbei entstandenen Proteinbanden mittels Oxidationsreaktion sichtbar gemacht. Hierbei enthält der sekundäre Antikörper eine Horseradish Peroxidase (HRP), die in Anwesenheit von Peroxiden (Reagenz B) als Oxidationsmittel Luminol (Reagenz A) zum angeregten Produkt 3-Aminophthalat oxidiert, das bläuliches Licht emittiert (Merck, 2022).

Zum Transfer der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wurden die Membranen zuerst in 100 % Methanol eingelegt und anschließend in Transferpuffer überführt. In diesem Transferpuffer wurden auch vier Filterstacks, also Filterpapiere, gewaschen. Anschließend wurden die Bestandteile von oben nach unten wie folgt in der Western Blot Apparatur geschichtet: 2 Filterstacks, die Membran, das Gel mitsamt der Proben, 2 Filterstacks.

Die Proteine auf dem Gel wurden durch Anlegen eines elektrischen Stroms für 8 min bei 25 V und 2,5 A im Trans-Blot® Turbo™ Transfer System auf die Membran transferiert.

Im Anschluss wurde die Protein-enthaltende Membran für 3 min in ddH₂O und dann 3 x für 10 min in TBS gewaschen. Danach wurden die unspezifischen Antikörperbindestellen mit 5 % Milchpulver in TBST für 1 h auf einem Rollenmischer blockiert. Anschließend folgte die Überführung der PVDF Membran in ein Falcon mit 5 ml En2 Antikörper, der 1:1000 in Blockierlösung verdünnt wurde, und 200 µl 0,1 % Natriumazid, um potentiell

Bakterienwachstum in der Milchlösung zu verhindern. Dieses Gemisch wurde bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 10 min in TBST gewaschen und im Anschluss mit dem sekundären Antikörper, der mit einer HRP gekoppelt war und 1:30 000 in TBST verdünnt wurde, für 1 h inkubiert. Danach erfolgten erneut drei Waschschriffe für je 10 min mit TBST sowie einmal am Ende mit TBS, um das Tween zu entfernen.

Zur Färbung der Proteinbanden wurden die Westar Supernova Reagenzen A und B 1:1 gemischt, 1:20 in TBS verdünnt und die Membranen mit 2 ml dieses Reagenz für 10 min lichtgeschützt inkubiert. Letztendlich wurden die Membranen im Western Blot Detektor dokumentiert.

2.5 Schnitkkulturen des murinen Kleinhirns

Schnitkkulturen werden aus Mäusen gewonnen und zeichnen sich dadurch aus, dass die Zellen in einer der *in vivo* Situation ähnlichen Umgebung gezüchtet werden. Die hier verwendete Methode stammt ursprünglich von Gähwiler (Gähwiler, 1981) und wurde von mehreren Labors adaptiert. Ich halte mich an das in den Grundzügen bei Jankowski beschriebene Protokoll (Jankowski et al., 2004).

Die Herstellung der Schnitkkulturen basiert zunächst darauf, dass die Gewebeschnitte unter eiskalten Bedingungen in einer physiologischen Salzlösung präpariert werden. Dies soll den Zellmetabolismus unterdrücken und das Absterben von Zellen verhindern. Im Anschluss werden die Schnitkkulturen in einem Medium bei 37 °C über einen längeren Zeitraum gehalten, wobei die Bedingungen hier möglichst konstant bleiben sollten. Deswegen wurde zur Vorbereitung auf die 37 °C Phase je 1 ml modifiziertes Neurobasalmedium in jedes Well einer 6-well-Platte (Zellkulturplatte) gegeben. In jedes Well wurde eine Zellkulturmembran (Cell Culture Insert Membrane) luftblasenfrei gegeben und die so präparierte Platte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ vorgewärmt.

Die Schnitkkulturen des Kleinhirns wurden von P0 oder P8 Mäusen präpariert entsprechend des in der Arbeitsgruppe Baader etablierten Protokolls wie bereits von Jankowski et al. (2004) beschrieben. Dazu wurden die Mäuse dekapitiert und die Schädelkalotte freipräpariert. Anschließend wurde die noch knorpelige Schädelkalotte von der Fontanella anterior aus mit einer Pinzette abgetragen. Die Hirnnerven wurden

durchtrennt, um das Gehirn im Ganzen aus der Schädelbasis herauslösen zu können. Das vollständige Gehirn konnte nun in eine mit 7 ml Hank's Lösung gefüllte, im Durchmesser 3 cm große Petrischale auf Eis gegeben werden. Unter einer Stereolupe wurde das Großhirn vom restlichen Gehirn mit Hilfe einer gebogenen Pinzette getrennt. Mit zwei feinen Pinzetten wurde das Kleinhirn und anhängende Teile des Mittelhirns und des Hirnstamms möglichst vollständig von den Hirnhäuten befreit. Anschließend wurden die Pedunculi cerebelli durchtrennt und das Kleinhirn isoliert.

Danach wurden vom Kleinhirn mit einem Tissue Chopper 350 μm dicke, sagittale Schnitte angefertigt. Sagittale Schnitte sind wichtig, da der Dendritenbaum der Purkinjezellen entlang der Sagittalebene ausgerichtet ist und somit der gesamte Dendritenbaum innerhalb eines Sagittalschnittes dargestellt werden kann (De Camilli et al., 1984). Diese Schnitte wurden dann mittels 1 ml Hank's Lösung vom Schneidetisch in eine kleine, mit 3 ml Hank's Lösung gefüllte Petrischale auf Eis, überführt. Unter dem Mikroskop erfolgt im Anschluss, falls notwendig, die Trennung der Schnitte mit einer Pinzette.

Zur Überführung auf die 6-well-Platten wurde die Hank's Lösung vorsichtig aus der kleinen Petrischale abpipettiert und durch 2 ml modifiziertes, auf 37 °C erwärmtes Neurobasalmedium ersetzt. Anschließend wurden die Schnitte durch Pipettieren mit einer gestutzten Pipettenspitze gleichmäßig auf die Membranen dreier Wells einer 6-well-Platte mit genügend Abstand zueinander verteilt, um ihr unabhängiges Wachstum voneinander zu gewährleisten. Danach wurde weiteres modifiziertes Neurobasalmedium zugegeben, um sicherzustellen, dass die gesamte Membran vollständig benetzt war. Überschüssiges Medium wurde wieder abpipettiert, sodass die Schnitte in einer Luft-Medium-Grenzschicht zu liegen kamen. Die Platten wurden in den Brutschrank gestellt.

Nach 6 h wurden 250 μl frisches modifiziertes Neurobasalmedium pro Well zugegeben. Davon wurden je drei Tropfen auf die Membranen und der Rest in die Wells unter die Membranen pipettiert.

Nach zwei Tagen erfolgte ein teilweiser Mediumwechsel. Dazu wurden 400 μl Medium aus den Wells entnommen und verworfen und je 450 μl frisches modifiziertes Neurobasalmedium zugegeben. Wiederum wurden einige Tropfen auf die Filtermembran gegeben. Weitere Medienwechsel bis zur Fixierung an Tag 10 (P0) bzw. Tag 6 (P8) erfolgten abhängig von den im Folgenden beschriebenen Behandlungsprotokollen.

2.6 Behandlung der Schnittkulturen

2.6.1 Behandlung mit LPS und PLX3397

Entzündungsähnliche Reaktionen wurden in den Schnittkulturen durch die Zugabe von LPS bewirkt. LPS ist ein Polysaccharid, das an Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) Rezeptoren bindet und je nach Polysaccharidkette pro- und antiinflammatorische Reaktionen an der Zielzelle auslöst (Cochet und Peri, 2017). Zur Auslösung von Entzündungsreaktionen in Schnittkulturen haben wir diese in Anlehnung an veröffentlichte Protokolle (Coleman et al., 2020; Delbridge et al., 2020; Lutz et al., 2015) und Arbeitsgruppen-internen Erfahrungen (Bahaaeldin et al., 2024) durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) der Konzentration 100 ng/ml sowie zeitgleich von PLX3397 der Konzentration 1 μ M in Anlehnung an Coleman et al. (2020) für 6 h an Tag 3 vorgenommen. LPS wurde als 1 μ g/ml-Aliquot in PBS bei -80 °C gelagert und unmittelbar vor Anwendung 1:10 in modifiziertem Neurobasalmedium (NBM) verdünnt (Endkonzentration 100 ng/ml). 10 mg des PLX3397 wurde in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, um eine Stocklösung der Konzentration 10 mM zu erhalten, und bei -20 °C gelagert (Araki et al., 2019). Unmittelbar vor der Verwendung wurde es 1:10 000 in modifiziertem Neurobasalmedium verdünnt (Li et al., 2017).

Zur Behandlung der Schnittkulturen wurde das gesamte Medium unter der Membran entfernt und durch 1 ml modifiziertes NBM mit und ohne LPS und/oder PLX3397 ersetzt. Nach 6 h wurde das LPS entfernt, indem erneut das gesamte Medium entfernt und nur durch modifiziertes NBM mit oder ohne PLX3397 ausgetauscht wurde. Bis zum 10. Tag in Kultur (DIV, Day in vitro) erfolgte dann ein teilweiser Mediumwechsel. Dazu wurden je

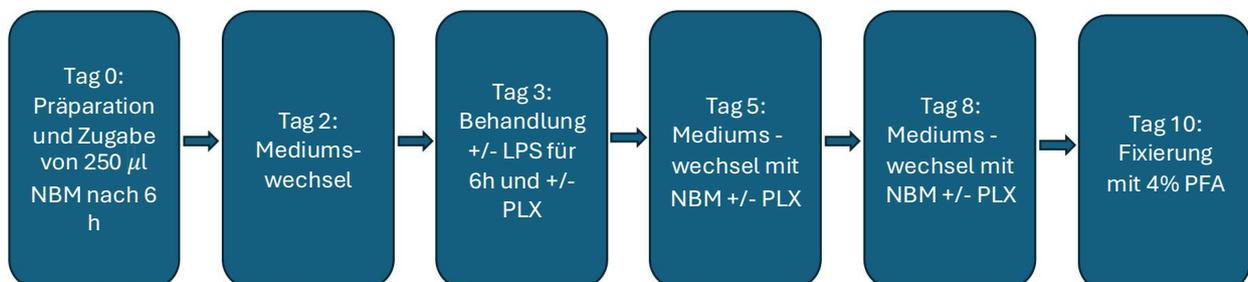


Abb. 5: Schematische Übersicht der Behandlung der Kleinhirnschnitte mit/ohne LPS sowie PLX3397. LPS: Lipopolysaccharid; NBM: Modifiziertes Neurobasalmedium; PFA: Paraformaldehyd; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

450 μ l modifiziertes NBM mit und ohne PLX3397 gegen 400 μ l des alten Mediums alle zwei bis drei Tage ausgewechselt. Dies gewährleistete, dass das Medium durch endogen produzierte Faktoren konditioniert war, was das Überleben der Zellen förderte.

Als Kontrollen wurden Schnittkulturen ohne LPS und PLX3397, nur mit LPS und nur mit PLX3397 durchgeführt. Der Mediumwechsel erfolgte dann an denselben Tagen wie der der Schnitte mit LPS und PLX3397. An Tag 10 der Inkubation wurden die Schnitte mit je 1 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Dazu wurde das Medium unter und auf der Membran durch Fixans ersetzt und für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (Abb. 5). Anschließend konnte PFA durch PBS ersetzt werden und die Schnitte bis zur Durchführung einer Immunhistochemie (IHC) im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden. Für jeden Versuch wurden jeweils vier Mäuse aus drei verschiedenen Würfen eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

2.6.2 Behandlung mit IL-4 und dB-cAMP

IL-4 und dB-cAMP sind Reagentien, die die proinflammatorische Aktivität der M1 Mikroglia unterdrücken. IL-4 wurde verwendet, um den M1 Subtyp in den antiinflammatorischen M2 Subtyp umzuwandeln, während dB-cAMP die TNF α Sekretion blockiert, die primär in Mikrogliazellen vom Typ M1 aktiv ist (Francos-Quijorna et al., 2016). Ähnlich dem vorherigen Versuch wurden erneut Schnittkulturen von P0 Mäusen angefertigt. In diesem Fall wurden die Kulturen bis zum sechsten Tag in Kultur gehalten, wobei an Tag 2, 4 und 6 das Medium teilweise gewechselt wurde. Am sechsten Tag erfolgte die Aufteilung in Experimental- und Kontrollgruppen (Abb. 6). Während die Experimentalgruppen für 6 h

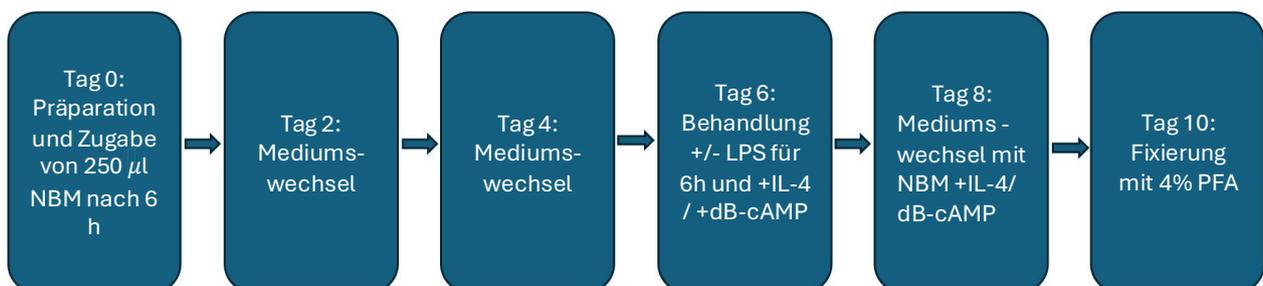


Abb. 6: Schematische Übersicht der Behandlung der Kleinhirnschnitte mit/ohne LPS sowie IL-4 und dB-cAMP. dB-cAMP: Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat; IL-4: Interleukin 4; LPS: Lipopolysaccharid; NBM: Modifiziertes Neurobasalmedium; PFA: Paraformaldehyd.

mit 100 ng/ml LPS und IL-4 der Konzentration 25 ng/ml bzw. dB-cAMP der Konzentration 0,5 mM behandelt wurden, wurde bei den Kontrollgruppen lediglich IL-4 bzw. dB-cAMP zum modifizierten NBM hinzugefügt. Nach 6 h wurde dann bei den Schnitten der Experimentalgruppe das Medium inklusive des LPS erneut entfernt und durch Medium, das nur IL-4 oder dB-cAMP wie in der Kontrollgruppe enthielt, ersetzt. Am achten Tag wurde erneut das Medium mit den entsprechenden Zusatzstoffen gewechselt. Die Schnitte wurden am Tag 10 mit 4 % PFA wie oben beschrieben fixiert. Die Lagerung der Schnitte bis zur immunhistochemischen Färbung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank. Die Reproduzierbarkeit wurde durch drei Wiederholungen des Experiments mit jeweils fünf Mäusen aus drei verschiedenen Würfen überprüft.

2.6.3 Behandlung mit Engrailed-2 bzw. GST

Für die Behandlung mit En2 wurden Schnittkulturen von P0 Mäusen angefertigt, die zunächst für 5 Tage in NBM in Kultur gehalten wurden. Dabei wurde an Tag 2 und 4 ein Mediumwechsel durchgeführt, indem 400 μ l des modifizierten NBM unter den Zellkultureinsätzen entnommen und durch 450 μ l frisches NBM ersetzt wurde. Bei der Zugabe des Mediums wurden 3-4 Tropfen auf die Membran getropft und der Rest unter die Membran gegeben. An Tag 6 wurden die Schnitte dann unterschiedlich weiterbehandelt. Die Kontrollen wurden mit 1 μ g/ml GST gelöst in modifiziertem NBM inkubiert. Zur Hälfte dieser Kontrollen wurde 100 ng/ml in modifiziertem NBM gelöstes LPS für 6 h zugegeben.

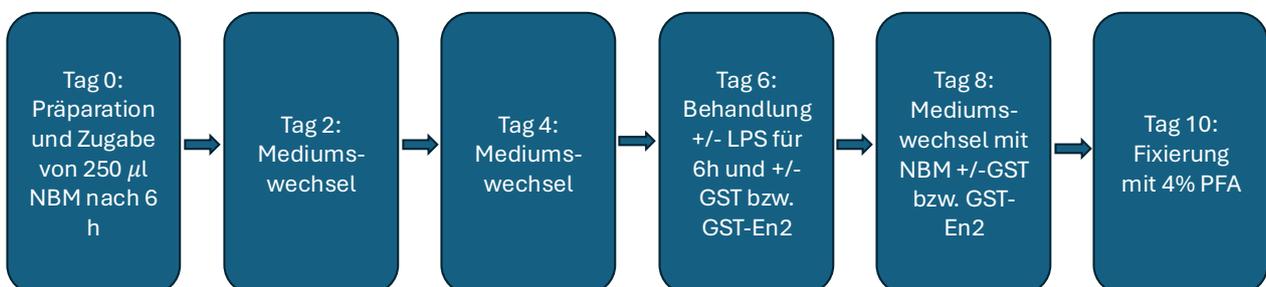


Abb. 7: Schematische Übersicht der Behandlung der Kleinhirnschnitte mit/ohne LPS sowie GST bzw. GST-En2. GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; LPS: Lipopolysaccharid; NBM: Modifiziertes Neurobasalmedium; PFA: Paraformaldehyd.

In der Experimentalgruppe wurden die Schnitte mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GST-En2 gelöst in modifiziertem NBM behandelt. Auch davon wurde wiederum die Hälfte mit und die andere Hälfte ohne LPS für 6 h behandelt, sodass vier Behandlungsgruppen entstanden: - LPS +GST, +LPS +GST, -LPS +GST-En2, +LPS +GST-En2. Nach 6 h wurde das LPS entfernt und durch Medium mit dem jeweiligen Protein (GST oder GST-En2) ersetzt. Danach erfolgte alle 2 Tage bis zum Tag 10 ein Mediumwechsel inklusive der Zugabe der genannten Proteine, sodass diese von Tag 6-10 wirken konnten. An Tag 10 wurden alle Schnitte mit 4% PFA fixiert und bis zur Verwendung für die IHC in PBS im Kühlschrank aufbewahrt (Abb. 7). Wie oben wurde dieser Versuch drei Mal mit jeweils vier Mäusen aus drei verschiedenen Würfen durchgeführt, um die Konsistenz der Effekte darzustellen.

2.6.4 Behandlung von P8 Schnitten mit LPS

Zur Durchführung der Mikrogliafärbungen wurden P8 Kleinhirnschnitte nach oben erläuterten Protokoll angefertigt (Abb. 8). Der spätere Entnahmezeitpunkt des Kleinhirns begründet sich dadurch, dass myeloide Vorläuferzellen der Mikroglia von E8 bis perinatal aus dem Knochenmark in das Gehirn einwandern und dort einen residenten Pool an Zellen bilden, der auf Entzündungsreaktionen reagieren kann (Ginhoux et al., 2013). Mit dem späteren Zeitpunkt lässt sich also die Zahl der Mikrogliazellen deutlich erhöhen, was die Identifikation erleichtert (Ginhoux et al., 2010; Greter und Merad, 2013). Der Pool an LPS-induzierbaren Zellen ändert sich nach momentanem Wissen nicht (Eyo und Wu, 2019). Am dritten Tag der Kultur wurde 100 ng/ml LPS-haltiges Medium zugefügt und die

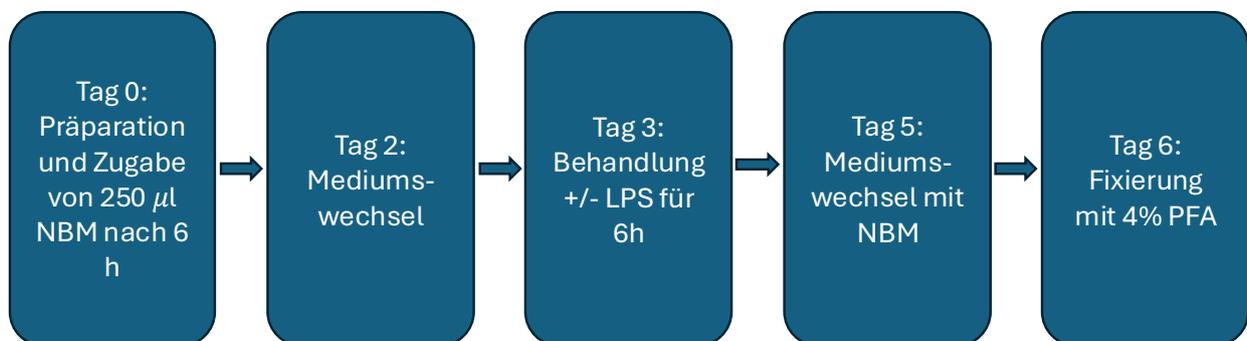


Abb. 8: Schematische Übersicht der Behandlung der P8 Kleinhirnschnitte mit/ohne LPS. LPS: Lipopolysaccharid; NBM: Modifiziertes Neurobasalmedium; PFA: Paraformaldehyd.

Schnittkulturen für 6 h behandelt. Die Kulturen wurden alle 2 Tage mit neuem modifiziertem Medium versehen und an DIV 6 mit 4% PFA fixiert.

2.7 Immunhistochemische Färbung

Zur Darstellung der unterschiedlichen Zelltypen in den Schnittkulturen wurden Zelltyp-spezifische immunhistochemische Färbungen benutzt. Hierfür wurde die indirekte Fluoreszenzfärbung verwendet.

Dazu werden fixierte Hirnschnitte mittels eines Pinsels unter dem Mikroskop von den Zellkulturmembranen gelöst und in ein Well einer 24-Well-Platte überführt. Dieses war zuvor mit 500 μ l PBS-Ca befüllt worden. Hierzu verwendet man PBS-Ca, da später Calbindin, ein calciumbindendes Protein der PC, gefärbt werden soll. Da sich PBS-Ca durch den Zusatz von Calcium auszeichnet, wird so die Sensitivität der Calbindinfärbung erhöht. Dieses PBS-Ca wurde nach 5 min gewechselt und die Kulturen weitere 10 min in PBS-Ca inkubiert. Danach wurden die Schnitte in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, das mit 1,5 ml 2 x SSC Puffer gefüllt war. Die Kulturen wurden für 30 min im Thermoschüttler bei 80 °C unter leichtem Schütteln (40 rpm) erhitzt. Dabei sollen Methylenbrücken, die zwischen Proteinen während des Fixierens entstehen, aufgebrochen werden, sodass Epitope, die vorher nicht für die primären AK zugänglich waren, freigelegt werden (Abcam, 2023). Anschließend wurden die Schnitte in je 500 μ l 0,5 % TX-100 gelöst in PBS-Ca überführt und darin für weitere 30 min inkubiert. Durch das Detergenz werden die Zellmembranen permeabilisiert, sodass die AK besser ins Zellinnere gelangen können. Nach zwei weiteren Waschschritten in PBS-Ca für 5 und 10 min zur Reduktion des TX-100 wurden die unspezifischen Antikörperbindestellen durch Inkubation in 0,2 % Gelatine gelöst in PBS-Ca für 2 h unter ständigem leichtem Schütteln auf dem Unimax 1010 geblockt. Danach wurden die entsprechenden primären AK nach Herstellerangaben in Blockierlösung verdünnt und bei 4 °C über Nacht darin inkubiert. Die verwendeten AK und AK-Verdünnungen finden sich im Anschluss.

Am nächsten Tag wurden die primären AK mittels eines Waschschrattes für 5 min und weiterer drei Waschschratte für je 15 min mit PBS-Ca entfernt. Darauf folgte die Inkubation mit den 1:1000 in PBS-Ca verdünnten, fluoreszenz-markierten, sekundären Antikörpern bei 37 °C im Brutschrank für 2 h. Nach erneuten Waschschrritten zur Entfernung auch

dieser Antikörper für 5 bzw. 10 min konnte die Gegenfärbung der Zellkerne mit 1 µg/ml in PBS gelöstem Hoechst 33342 erfolgen, mit welchem die Schnitte für 10 min inkubiert wurden. Auch dieses wurde durch Waschen mit PBS-Ca für 5 min sowie drei Mal je 15 min entfernt und die fertigen Schnitte auf Objektträger überführt und mit Deckgläschen und Fluoromount-G® eingedeckelt.

Anti-Calbindin D28K (1:2000) wurde als primärer Antikörper zur Färbung des calciumbindenden Proteins der PC verwendet, da Calbindin im Kleinhirn einzig und allein in PC enthalten ist (Arnold und Heintz, 1997; Kapfhammer und Gugger, 2012). Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (engl. Glial fibrillary acidic protein) (GFAP, 1:1500) zur Anfärbung von Astrocyten, gegen das myelobasische Protein (MBP, 1:500) für reife Myelinscheiden, gegen den Oligodendrocyten-Transkriptionsfaktor 2 (Olig-2, 1:500) für Oligodendrocytenvorläuferzellen und gegen das Ionisierte Calciumbindende Adaptermolekül (engl. Ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1, 1:1000) für Mikroglia dienten der Anfärbung weiterer häufig vorkommender neuraler Zellen im Gehirn. Zur Unterscheidung und zum Nachweis von M2a Mikrogliazellen wurde TREM2 verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden Alexa Fluor 488, ein grün fluoreszierender, und Alexa Fluor 546, ein rot fluoreszierender Antikörper genutzt.

2.8 Aufnahmen der Schnitte unter dem Laser Scanning Mikroskop (LSM)

Da die Schnittkulturen auch nach zehntägiger Inkubation immer noch mehr als 100 µm dick sind, wurden die Schnitte mit einem Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Dies ermöglicht die Darstellung einer gesamten PC in 3D, sodass es bei Auswertungen der Dendriten zu möglichst wenig Artefakten durch abgeschnittene Dendriten kommt.

Verwendet wurde für die Aufnahmen das Nikon A1RHD25-System mit inversem Eclipse Ti2E Mikroskop. Zur Einstellung der Ebene wurde die 20x Vergrößerung gewählt und PC mittels Epifluoreszenz gesucht. Mit dieser Vergrößerung wurden Übersichtsaufnahmen angefertigt, um später eine Orientierung zu haben, wo die PC im Schnitt lagen und in welchem topographischen Bezug sie zu anderen Zellen und wie nahe andere Zellen positioniert waren.

Im Anschluss wurden einzelne PC ausgewählt und mit dem 60x Öl-Immersionsobjektiv aufgenommen. Ausgewählt wurden solche PC, die möglichst einzeln lagen und einen

Mindestabstand von ca. 80-100 μm zu anderen PC hatten. Die Zellen mussten nach grober Einschätzung komplett getroffen sein, d.h. alle Fortsätze aus einem Soma mussten in continuum bis zu den feinen Verzweigungen nachverfolgbar sein.

Als Einstellungen am LSM wurde ein Zoomfaktor von 2,0 und ein Pinhole von 1,0 gewählt, ein oberer und unterer Rand in der z-Achse ausgesucht, sodass die gesamte PC dargestellt war, und die Anzahl der optischen Schnitte so gewählt, dass eine Schnittdicke von etwa 0.5 μm erreicht wurde. Zur Darstellung in dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben, Maximalprojektionen der Fluoreszenzen dieser Schnitte auf eine Ebene projiziert.

Zudem wurden zur Darstellung der allgemeinen Mikrogliafärbung sowie des Subtyps M2a Übersichtsaufnahmen in der 20x Vergrößerung gemacht. Dabei wurden die Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe mit einer festen Sensitivität, Offset, Pinhole und Laserstärke eingestellt und diese Einstellungen bei Aufnahme der mit LPS behandelten Mikroglia der Experimentalgruppe übernommen, um im Vergleich zu den Kontrollen neben einer Zu- oder Abnahme der Zellzahl auch einen Intensitätszuwachs oder Verlust der Antikörpersignale semiquantitativ erfassen zu können.

2.9 Auswertung

Die Auswertung der Schnittbildaufnahmen der einzelnen Zellen erfolgte mit dem Programm Imaris in der Version 7.6.5 von Bitplane. Der Vorteil dieses Programms bestand darin, dass die vorher aufgenommenen Schnittbilder einer einzelnen Zelle in 3D dargestellt und auch in 3 Dimensionen ausgemessen werden können. Die Dendriten wurden mit der Option Filament Tracer ausgewertet. Dazu wurden die Stammdendriten mit der Option Autopath und die davon abzweigenden Dendriten mit der Option Autodepth semiautomatisch nachgezeichnet. Abweichungen vom visuellen Bild wurden manuell nachkorrigiert. Nachdem alle Dendriten markiert waren, wurde der Durchmesser der nachgezeichneten Linien angepasst, sodass dieser genau der Dicke der eigentlichen Dendriten entsprach und die Linien die Dendriten möglichst exakt überlagerten. Im Anschluss konnten alle Parameter, die aus diesen nachgezeichneten Dendriten berechnet werden konnten, in einer Exceltabelle gespeichert werden. Ein Excel Datenblatt enthielt die Daten einer Zelle, die Datei alle Daten einer Auswertung. In der

statistischen Auswertung wurden die angegebenen Zahlenwerte sowie die Standardabweichungen, wenn nicht explizit anders erläutert, i.d.R auf zwei Nachkommastelle gerundet und teilweise (bei der Sholl Analyse) in 0,5er Schritten angegeben, um der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops und des Imaris Programms Ausdruck zu verleihen.

2.10 Statistik

Zur statistischen Analyse wurden die Daten der Excel-Tabelle in die Software R importiert. Die Software R in der Version 4.2.1 mit dem Hilfsprogramm RStudio inkl. der Basismodule sind im Netz frei erhältlich (R Core Team 2017, www.r-project.org). Die spezifischen Routinen wurden von S. Baader und M. Bahaaeldin zur Verfügung gestellt und von mir an meine Bedürfnisse angepasst.

Folgende Parameter wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet:

- Sholl Analyse
- Dendritenlänge
- Anzahl der Filamente pro PC
- Anzahl an Verzweigungspunkten pro Dendrit
- Dendritenorientierungswinkel und Distanzen der Dendritenabgänge vom Soma

Dendritenlänge, Anzahl der Filamente und Anzahl Verzweigungspunkte

Zur Analyse der Anzahl an Verzweigungspunkten wurden Verzweigungsstellen gewertet, die vom Soma ausgehen, d.h. auch Dendriten, die aus dem Soma abgingen, wurden als Verzweigungspunkt gemessen. Es wurden nur solche Dendriten als Verzweigungen gewertet, deren Durchmesser in etwa die Hälfte des höher geordneten Dendriten zeigten und die eindeutig im Bild darzustellen waren.

Zur statistischen Analyse wurden zunächst für jeden Parameter der Levene Test auf Varianzhomogenität durchgeführt. Danach wurden die Daten in einem Frequenzblot dargestellt und die Verteilung mit einer Normalverteilung verglichen. Waren die Daten parametrisch verteilt, wurde ein ein-, zwei- oder mehrfaktorieller ANOVA Test

durchgeführt. Bei fehlender Normalverteilung wurden die Daten logarithmiert und die Werte nochmals mit einer Normalverteilung verglichen. Bei der Dendritenlänge und der Anzahl an Dendritenverzweigungspunkten wurden die Originalwerte verwendet und mittels eines einfaktoriellen ANOVA Tests ausgewertet. Für die Parameter der Anzahl an Filamenten pro PC hingegen mussten die Daten erst logarithmiert werden. Im Anschluss waren die Werte normalverteilt, sodass sie mit den oben genannten Verfahren ausgewertet werden konnten. Allen Tests gemein ist, dass sie prüfen, ob sich mit einer gewissen Irrtumsmöglichkeit von 5% oder geringer ein Mittelwert von Daten von einem anderen Mittelwert unterscheidet (Petrie und Sabin, 2020).

Die Daten wurden als signifikant unterschiedlich gewertet, sobald ein p-Wert von $< 0,05$ vorlag. Im Folgenden entspricht „***“ einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert von $< 0,001$, „**“ einem p-Wert von $< 0,01$, „*“ einem p-Wert von $< 0,05$ und „ns“ einem p-Wert von $> 0,05$. Dies entspricht folglich keiner Signifikanz.

Sholl Analyse

Bei der Sholl Analyse werden konzentrische Kreise beginnend am Soma um die Zelle gezogen, deren Radius definiert ist und mit jedem Kreis größer werden. Dabei lassen sich die Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten und deren Filamente mit jeder Kreislinie ermitteln und in einem Sholl Diagramm darstellen (s. Abb. 9) (O’Neill et al., 2015).

Für die Daten der Sholl Analyse wurden die Originalwerte nach dem Modell von Wilson et al. (2017) mit dem Mixed Effects Model (MM) ausgewertet, was einem 2-Faktor ANOVA Test entspricht, und in einem Liniendiagramm dargestellt. In der Legende zur Sholl Analyse ist jeweils das dazugehörige Signifikanzniveau angegeben. In der Erläuterung der Diagramme werden zusätzlich die Mittelwerte der jeweiligen Parameter genannt.

Dendritenorientierungswinkel

Ein typischer Parameter der Neuronenreifung ist die Ausprägung einer klar definierten Polarität des Somazellkörpers mit einem Dendriten-tragenden Pol und einem axonalen Pol. Um diese Polarität annäherungsweise berechnen zu können, wurden zwei Parameter etabliert. Im ersten Verfahren wurden die Dendritenorientierungswinkel bestimmt. Der

Dendritenorientierungswinkel ist in Imaris definiert als der Winkel zwischen dem distalsten Punkt des Stammdendritensegments und dem Punkt, an dem der Stammdendrit vom Soma abgeht (Abb. 10). Da die Purkinjezellen in unterschiedlichen Orientierungen in einer

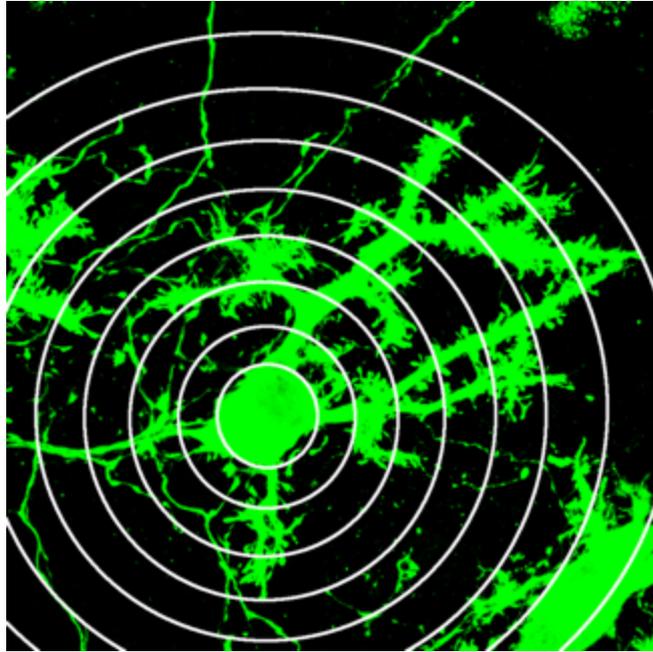


Abb. 9: Beispiel einer Sholl Analyse eines beispielhaften Dendritenbaums mit zugehörigen konzentrischen Kreisen.

Schnittkultur liegen, wurden alle Winkel an dem längsten Stammdendriten ausgerichtet. Der längste Stammdendrit hatte folglich immer den Winkel 0° . Ist eine Zelle polar, ist zu erwarten, dass nur ein oder zwei Dendriten aus dem Soma abgehen, die an zwei gegenüberliegenden Polen abgehen. Der mittlere Unterschied zwischen den Dendritenorientierungswinkeln sollte bei einer polar ausgerichteten Zelle folglich relativ groß sein. Ist eine Zelle multipolar aufgebaut, sind die mittleren Winkelabstände relativ gering. Zur Darstellung wurden die Winkel als Häufigkeitsverteilung in einem Halbkreisdiagramm mit Winkeln zwischen 0 und 180° dargestellt. 0° entsprach dabei dem Stammdendriten, sodass dieser Wert am häufigsten vorkam, da jede Zelle unabhängig vom Entwicklungsstadium einen solchen besitzt und sich die übrigen Dendriten am längsten Stammdendriten orientierten.

Diese Prozedur geht von der Annahme aus, dass alle Dendriten in einem annähernd 90° Winkel aus dem Soma abgehen. Da dies nur ein vereinfachtes Modell ist, wurden in einer weiteren Prozedur die Distanzen zwischen den Ursprungsstellen aller Stammdendriten

und einem Hauptstammdendriten gemessen. Als Hauptstammdendrit wurde wiederum der Dendrit gewählt, der den längsten Gesamtfortsatz hatte.

Da die Somata unterschiedliche Größen haben können, wurden die Distanz zwischen den

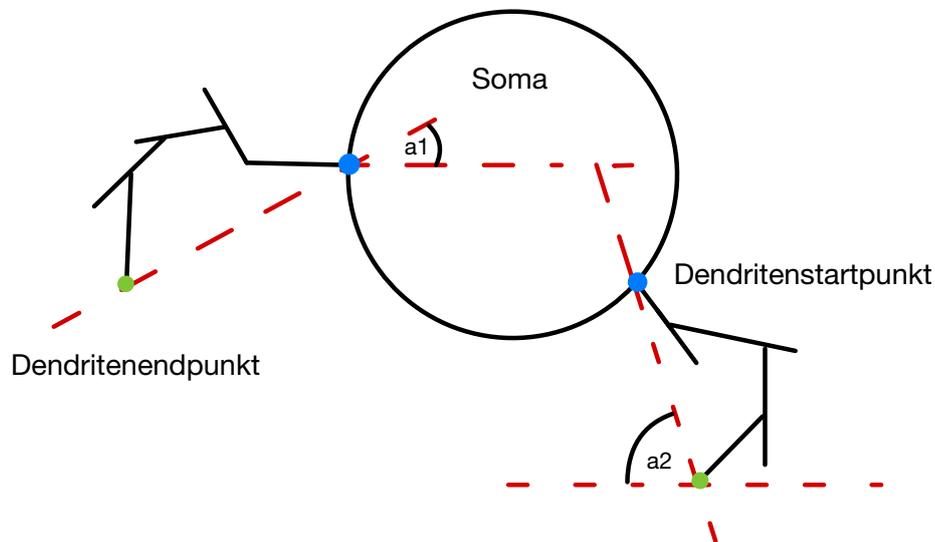


Abb. 10: Schematische Darstellung des Dendritenorientierungswinkels (modifiziert nach dem Imaris Handbuch von Bitplane der Version 9.2 (Bitplane, 2022)). a_1 , a_2 : Winkel zwischen einer Linie zwischen Dendritenstart- und Endpunkt sowie der Horizontalen.

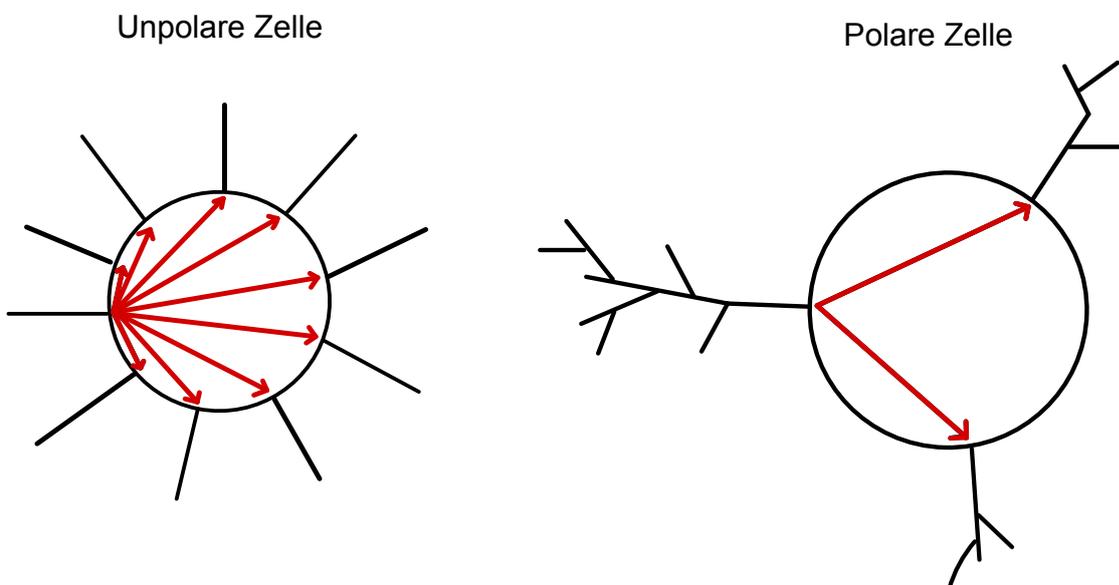


Abb. 11: Schematische Darstellung der Dendritendistanzen einer unpolaren und einer polaren Zelle im Vergleich.

Startpunkten der vom Soma abgehenden Dendriten auf $20 \mu\text{m}$ normiert. Ist die mittlere Distanz zwischen den Dendritenstartpunkten klein, spricht dies für eine multipolare Zelle mit vielen abzweigenden Dendriten. Ist die Distanz hingegen groß, ist dies ein Hinweis für weniger Dendriten einer polareren PC (s. Abb. 11). Zur Auswertung beider Parameter wurden die Originaldaten zunächst logarithmiert und im Anschluss mittels oben genannter Verfahren ausgewertet.

3. Ergebnisse

In der Arbeit von Bahaaeldin et al. (2024) konnte gezeigt werden, dass die Blockierung des TNFa-Rezeptor-Signalweges in kultivierten cerebellären Purkinjezellen den inhibitorischen Einfluss von LPS auf die Dendritenentwicklung *in vitro* unterdrücken konnte (Bahaaeldin et al., 2024). Da TNFa von Mikroglia sezerniert wird (Henning et al., 2023; Kuno et al., 2005), sollte in dieser Arbeit zunächst gezeigt werden, dass tatsächlich Mikrogliazellen hauptverantwortlich für die durch LPS-induzierten Effekte auf das Dendritenwachstum der PC waren (Horiuchi et al., 2010).

3.1 Einfluss von PLX3397 auf das Dendritenwachstum von cerebellären PC

M. Bahaaeldin führte seine Experimente an Schnittkulturen von 6 Tage alten Mäusen durch (P6) und verwendete LPS und Interferon gamma (IFN γ) zur Induktion inflammatorischer Kulturbedingungen. Da Mikrogliazellen bereits am Tag der Geburt im Gehirn vorkommen und die Dendritogenese der PC perinatal beginnt, wurden für meine Arbeit Kleinhirne von neugeborenen Mäusen (P0) als Kulturmodell gewählt. Ein weiterer Unterschied zu den vorherigen Versuchen war, dass nur LPS zur Induktion inflammatorischer Veränderungen genutzt wurde. Diese Änderung beruhte auf initialen Versuchen, die zeigten, dass keine Unterschiede in der PC Differenzierung nach Behandlung mit und ohne IFN γ zu sehen waren. Wie bereits bei M. Bahaaeldin beschrieben, wurde eine Konzentration von 100 ng/ml LPS eingesetzt.

Um herauszufinden, ob Mikrogliazellen den LPS-induzierten Effekt auf die Entwicklung cerebellärer PC sowie deren Dendritenbaum vermittelten, wurde ein bekannter Inhibitor der Mikroglia-Proliferation, PLX3397, verwendet (Rice et al., 2015). Nach Induktion entzündlicher Mediatoren sollte die Proliferation von Mikroglia unterdrückt und getestet werden, ob der LPS-Effekt aufgehoben oder zumindest abgeschwächt werden konnte. Da von Untersuchungen an post-mortem Gewebe von Autismus-Patienten bekannt ist, dass PC in ihrer Differenzierung beeinflusst sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die PC Morphologie gesetzt. Als Parameter wurden die Dendritenlänge, die Anzahl an Dendriten pro PC, die Anzahl an Dendritenverzweigungspunkten, der

Dendritenorientierungswinkel sowie die Dendritendistanz bei Abgang vom Soma als Maß für die Polarisierung von Zellen in unterschiedlich behandelten Kulturen verglichen.

3.1.1 PLX blockiert die Mikroglia proliferation

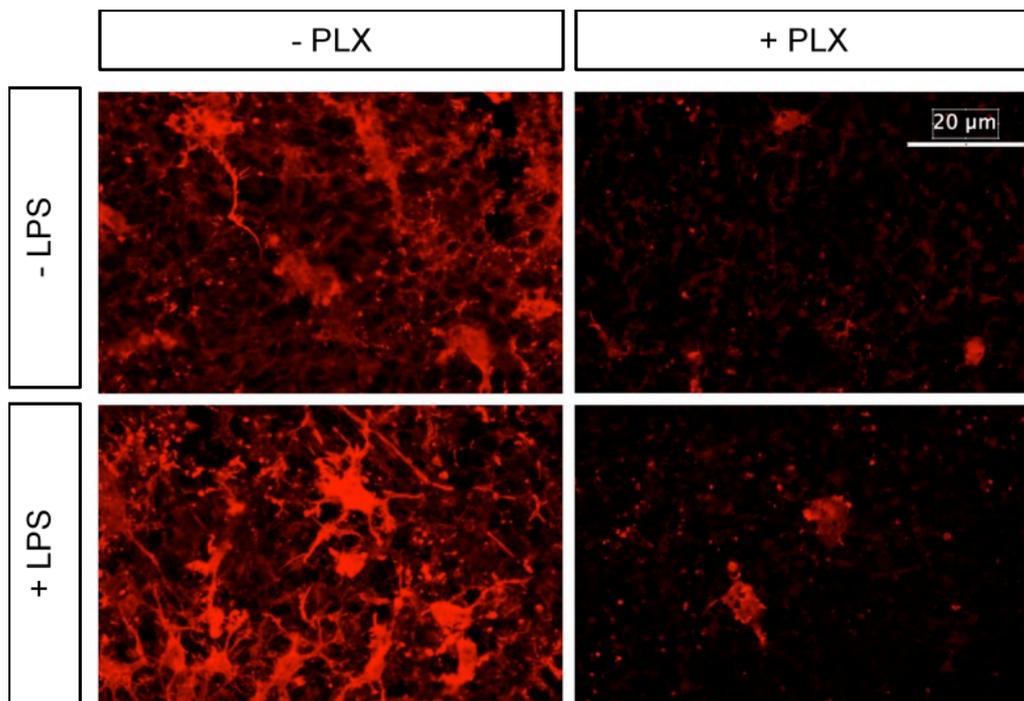


Abb. 12: Immunhistochemische Färbungen von Schnittpkulturen mit Iba1-spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Die Kleinhirnschnittpkulturen von neugeborenen Mäusen wurden an DIV 3 in Kultur mit LPS und/oder PLX behandelt und an DIV 10 gefärbt. DIV: Days in vitro; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

PLX3397 gilt als Inhibitor der Mikroglia proliferation. Entsprechend sollte untersucht werden, ob LPS einen Einfluss auf Mikroglia hat und ob PLX einen solchen potentiellen Einfluss zu verhindern vermag.

Tatsächlich konnte ein Effekt des LPS auf Mikroglia beobachtet werden (Abb. 12). Die Anzahl an mit Iba1 anfärbbarer Mikroglia nahm nach Behandlung mit LPS im Vergleich zu Kulturen ohne LPS-Behandlung deutlich zu. Die Iba1-positiven Kontrollzellen hatten ein relativ kleines Zellsoma und filigrane Fortsätze. Nach LPS-Stimulation war die Intensität der Färbung deutlich erhöht, die Zellsomata schienen vergrößert und hatten mehr Fortsätze, die wiederum dicker erschienen. Diese Befunde ließen sich durch eine

gleichzeitige Behandlung mit LPS und PLX rückgängig machen. Auch eine alleinige Applikation von PLX erniedrigte die Gesamtmikrogliazahl, da Mikrogliazellen bereits durch die Präparation der Kulturen zur Proliferation angeregt werden. PLX hemmt den Rezeptor CSFR1, der die Proliferation und/oder das Überleben der Mikroglia vermittelt (Coleman et al., 2020).

Zur Erstellung der Graphiken der PC bzw. Mikroglia wurde die Gruppierungsfunktion von Microsoft Word oder ImageJ verwendet. Die dazugehörigen Beschriftungen der Bilder und von Soma, Dendriten und Axonen erfolgte ebenfalls mittels ImageJ.

3.1.2 Visuell darstellbare Effekte der LPS- und PLX-Behandlung auf die Purkinjezellmorphologie

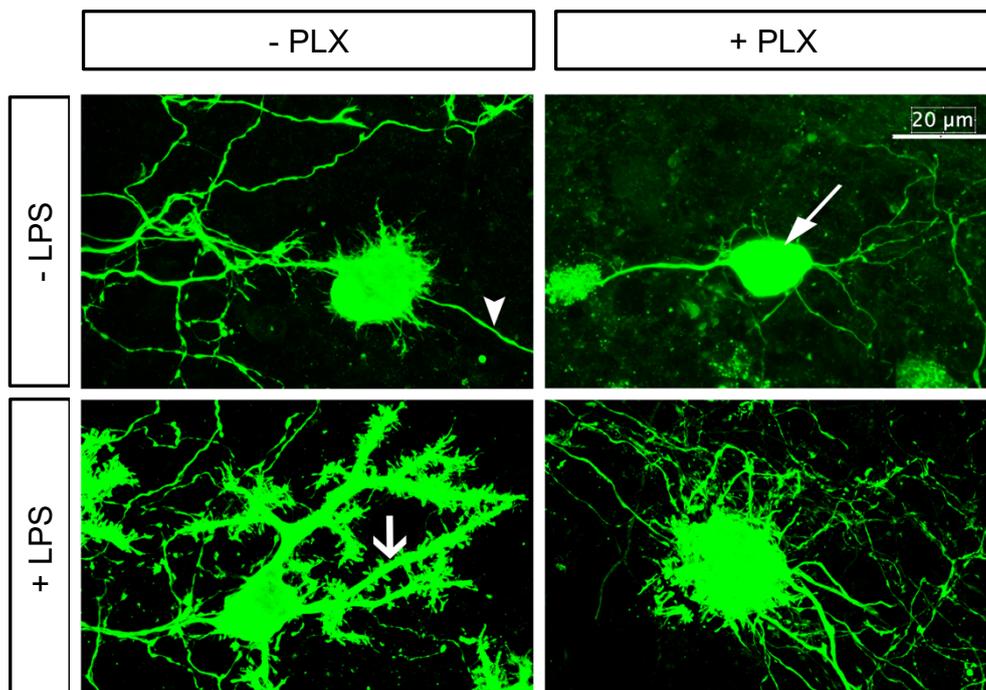


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung von Purkinjezellen mit einem Calb1 spezifischen Antikörper. Die PC wurden mit oder ohne LPS und/oder PLX behandelt. Pfeilkopf: Axon, Pfeil mit gefüllter Spitze: Soma, Pfeil: Dendrit. DIV: Days in vitro; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

Nachdem ich zeigen konnte, dass LPS und PLX die Anzahl und Morphologie der Mikrogliazellen beeinflusste, wurden die Schnittkulturen gegen Calbindin D28k angefärbt.

Dieses Calcium-bindende Protein wird im Kleinhirn ausschließlich von PC exprimiert und zwar bereits spät embryonal (Enderlin et al., 1987). Da Calb1 im gesamten Zytoplasma verteilt ist, kann mithilfe dieser Färbung jede PC eindeutig identifiziert und ihr gesamter Zellumfang inklusive der feinsten Dornfortsätze dargestellt werden (Abb. 13). Unbehandelte PC zeigten ein rundes Soma von etwa 10 μm mit multiplen, zu allen Seiten abgehenden Dendriten und einem Axon. Die meisten der Dendriten waren unverzweigt und relativ kurz. Wurden diese Zellen einer LPS-Behandlung unterzogen, stieg die Anzahl der Dendriten, die Dendritenlänge nahm zu und das Verzweigungsmuster wurde deutlich komplexer. In einigen Fällen waren sogar deutliche Dornfortsätze zu sehen, die ein Zeichen synaptisch aktiver Zellen darstellen. Wurden die Kulturen mit PLX behandelt, sahen sowohl die zusätzlich mit LPS behandelten als auch die nur mit PLX behandelten Zellen den Kontrollzellen ähnlich. Diese vielversprechenden Beobachtungen sollten im Folgenden morphometrisch vermessen werden, da die hohe Variabilität der PC Morphologie in Kultur eine klare Aussage verhindert.

Die Sholl Analyse liefert sowohl Informationen über den Verzweigungsgrad eines Dendritenbaums in Abhängigkeit vom Abstand vom Soma als auch über die Länge der Dendriten. Dazu wurden Kleinhirnkulturen von neugeborenen Mäusen an Tag 3 mit LPS und/oder PLX behandelt und nach 7 weiteren Kulturtagen fixiert und gefärbt. Analysiert wurden die Kreuzungspunkte mit den Kreislinien um das Soma, die automatisch mithilfe der Imaris Software ermittelt wurden. Die Zeichnung des Dendritenbaums erfolgte semiautomatisch wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben.

Betrachtet man die Kurvenverläufe in Abb. 14, so fällt auf, dass sich die Kurven für Dendritenabstände vom Soma unterhalb von 35 μm deutlich von denen oberhalb von 35 μm unterscheiden. In den Kontrollgruppen, die nicht mit LPS und nur mit oder ohne PLX behandelt wurden, zeigte sich innerhalb von 35 μm vom Soma lediglich 1 Kreuzungspunkt mit den Kreislinien. Die parallel zur x-Achse verlaufende Kurve bedeutet, dass die Zahl der Kreuzungspunkte gleich blieb. Das heißt, dass die Dendriten sich kaum verzweigten und etwa gleichlang waren. Zwischen ca. 15-30 μm hatten die mit PLX behandelten Zellen geringfügig mehr Kreuzungspunkte als die ohne PLX. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Diese niedrig verzweigten Dendriten finden sich häufig bei PC im unreifen Zustand. Jenseits der 35 μm bestanden ebenfalls keine Unterschiede zwischen der

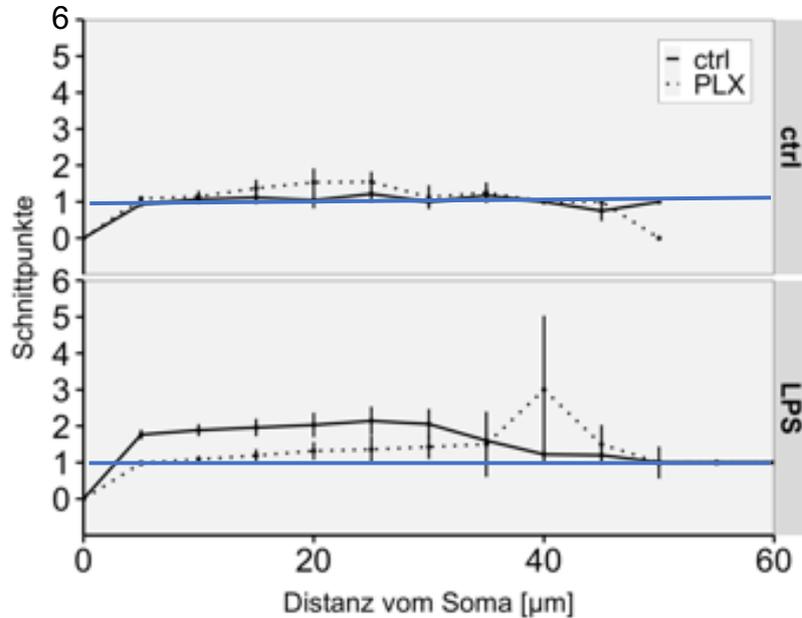
Behandlung mit oder ohne PLX. Allein bei 45 μm waren in den PLX behandelten PC deutlich weniger Kreuzungspunkte als in Kontrollzellen zu finden. Gemeinsam war beiden Zellgruppen, dass der Dendritenbaum in etwa gleich lang war und ca. 50 μm vom Soma entfernt endete.

In der Experimentalgruppe mit LPS-Behandlung zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, dass eine LPS-Applikation zu längeren Dendriten mit ca. 60 μm im Gegensatz zu ca. 50 μm führte. Auf die gesamte Dendritenlänge betrachtet, lagen unter LPS-Behandlung auch signifikant mehr Schnittstellen mit den konzentrischen Kreisen vor. Dabei ist zu beachten, dass innerhalb der 30 μm vom Soma die mit LPS behandelten Zellen durchschnittlich zwei Schnittstellen aufwiesen, die Kontrollzellen jedoch nur eine. Dies ließ sich jedoch mittels gleichzeitiger PLX-Behandlung wieder ausgleichen, da nun der Dendritenbaum auch wieder weniger Schnittstellen mit ca. einer Schnittstelle aufwies. So war der Verzweigungsgrad in der ersten Gruppe im Gegensatz zu durchschnittlich einer Schnittstelle bei den PLX behandelten Zellen innerhalb von 30 μm vom Soma doppelt so groß. Mit zunehmender Länge des Dendritenbaums, also jenseits der 30 μm , nahm dann allerdings auch der Verzweigungsgrad in der Gruppe mit LPS auf ungefähr eine Schnittstelle pro Kreis bis zum Ende des Baumes ab. Bei der Gruppe mit PLX war bei 40 μm Abstand eine Abweichung auf >2 Schnittstellen zu sehen, die aber auf Grund der hohen Standardabweichung an dieser Stelle nicht signifikant war. Es bleibt festzuhalten, dass der Effekt zwischen einer alleinigen LPS-Behandlung und einer Kombination derer mit PLX noch deutlicher ausfallen würde, wenn nicht die gesamte Länge des Dendritenbaums betrachtet würde wie in der Statistik hier, sondern nur bis zu einer Länge von 30 μm .

Insgesamt führte eine LPS-Behandlung basierend auf der Sholl Analyse zu einer stärkeren Verzweigung der auswachsenden Dendriten. Wurden die Schnittkulturen mit LPS und gleichzeitig mit PLX behandelt, war der Dendritenbaum wieder kürzer und die Kreuzungspunkte nahmen ab. Die LPS und PLX behandelten PC sahen in Ihrer Morphologie den unbehandelten Kontrollzellen ähnlich.

Die Sholl Analyse ist in ihrer Genauigkeit wesentlich von dem Abstand abhängig, in dem die Kreuzungen von Dendriten mit imaginäre Kreisen um das Soma gemessen werden.

Ist dieser Abstand sehr klein, werden viele Messungen gemacht und redundante Daten erhoben, die einen Unterschied vortäuschen könnten. Wird der Abstand zu grob gewählt,



Behandlung	MW ± SE	Anzahl analysierter Zellen	Behandlung	MM p-Wert Behandlung	Signifikanzniveau	MM p-Wert Abstand vom Soma	Signifikanzniveau
- LPS - PLX	0,5 ± 0,4	25	- PLX +/- LPS	2,33 x 10 ⁻⁵	***	<2 x 10 ⁻¹⁶	***
- LPS + PLX	1,0 ± 1,3	22	- LPS +/- PLX	0,1910	ns	<2 x 10 ⁻¹⁶	***
+ LPS - PLX	0,5 ± 1,2	34	+ LPS +/- PLX	3,71 x 10 ⁻⁶	***	<2 x 10 ⁻¹⁶	***
+ LPS + PLX	0,5 ± 1,2	37					

Abb. 14: Sholl Analyse von PC Dendriten in Abhängigkeit von der LPS- und PLX-Behandlung sowie dem Abstand vom Soma. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS behandelt (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne PLX an DIV 3 (ctrl, PLX) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) der Schnittstellen mit konzentrischen Kreisen der Sholl Analyse sowie die dazu analysierten Zellzahlen. (MM: Mixed effects model; ns=nicht signifikant; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) DIV: Days in vitro; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

können Dendritenverzweigungen nicht gemessen werden. Daher ist diese Art der Analyse sehr ungenau, sodass parallel mithilfe des Imaris Programms Verzweigungspunkte direkt ausgezählt wurden und für weitere Versuche auf die Sholl Analyse verzichtet wurde.

Im Folgenden sollen daher nun die einzelnen hier im Überblick vorgestellten Parameter genauer analysiert werden.

3.1.3 PLX inhibiert die LPS-vermittelte Zunahme der Dendritenlänge

Die Dendritenlänge ergibt sich aus der Summe der Länge eines Stammdendriten und der Segmentlängen, die von diesem Stammdendriten ausgehen. Gehen mehrere Dendriten von einem Soma aus, hat jeder einzelne Dendrit eine Gesamtlänge.

Während die PC ohne Behandlung einen Mittelwert der Dendritenlänge von ca. 13 μm hatten, sorgte eine LPS-Behandlung für signifikant längere Dendriten im Vergleich zu deren unbehandelten Kontrollzellen (58 μm im Mittel). Wurden die Schnittkulturen

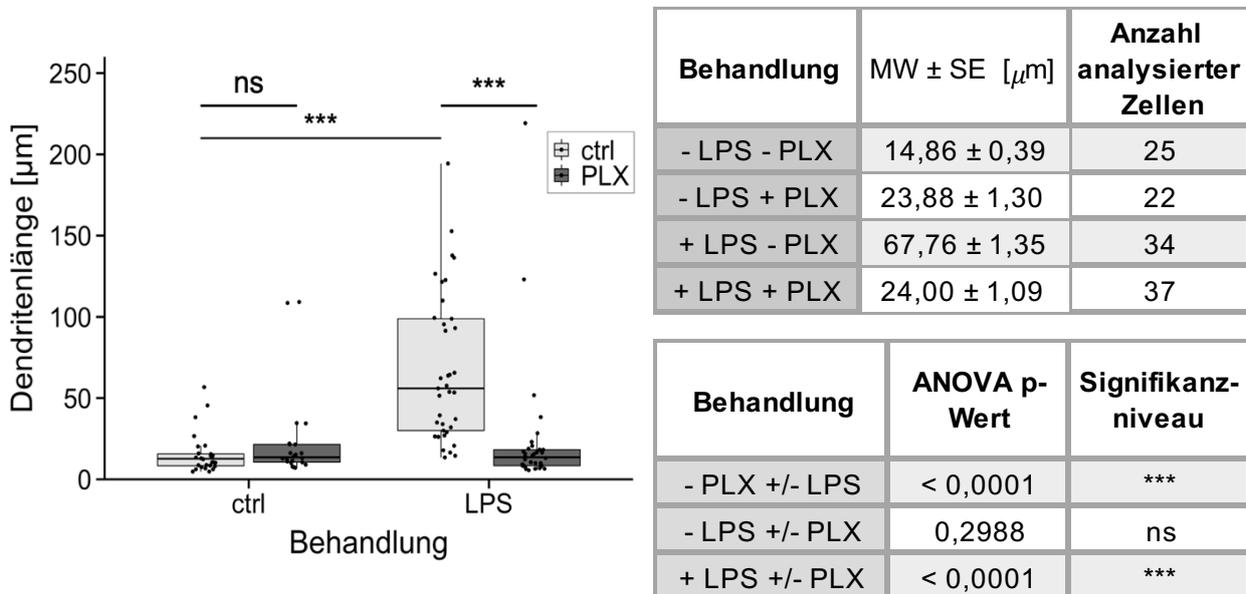


Abb. 15: Darstellung der Dendritenlänge von PC in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne PLX an DIV 3 (ctrl, PLX) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet.

(ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

DIV: Days in vitro; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

gleichzeitig mit LPS und PLX behandelt, lag die durchschnittliche Dendritenlänge beim Kontrollwert. Somit konnte eine Zugabe von PLX die durch LPS-induzierte Verlängerung

der Dendriten aufheben. Die Behandlung mit PLX alleine hatte keinen Effekt auf die Dendritenlänge. In Abb. 15 repräsentiert jeder Punkt eine PC, für die der Mittelwert der Dendritenlängen aller von ihr ausgehenden Dendriten dargestellt ist.

Die Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse aus der Sholl Analyse: LPS induziert die Dendritenlänge und diese Induktion wird durch die Hemmung der Mikroglia proliferation unterdrückt.

3.1.4 PLX inhibiert die LPS-induzierte Zunahme der Anzahl an Dendriten pro Purkinjezelle

Neben dem reinen Wachstum der einzelnen somatischen Dendriten ist die Anzahl der Dendriten, die aus dem Soma entspringen, ein wichtiger Parameter für die Reifung der PC. Während junge PC noch viele Dendriten besitzen, werden die meisten Dendriten während der Reifung retrahiert und nur ein oder zwei Stammdendriten verbleiben, die sich

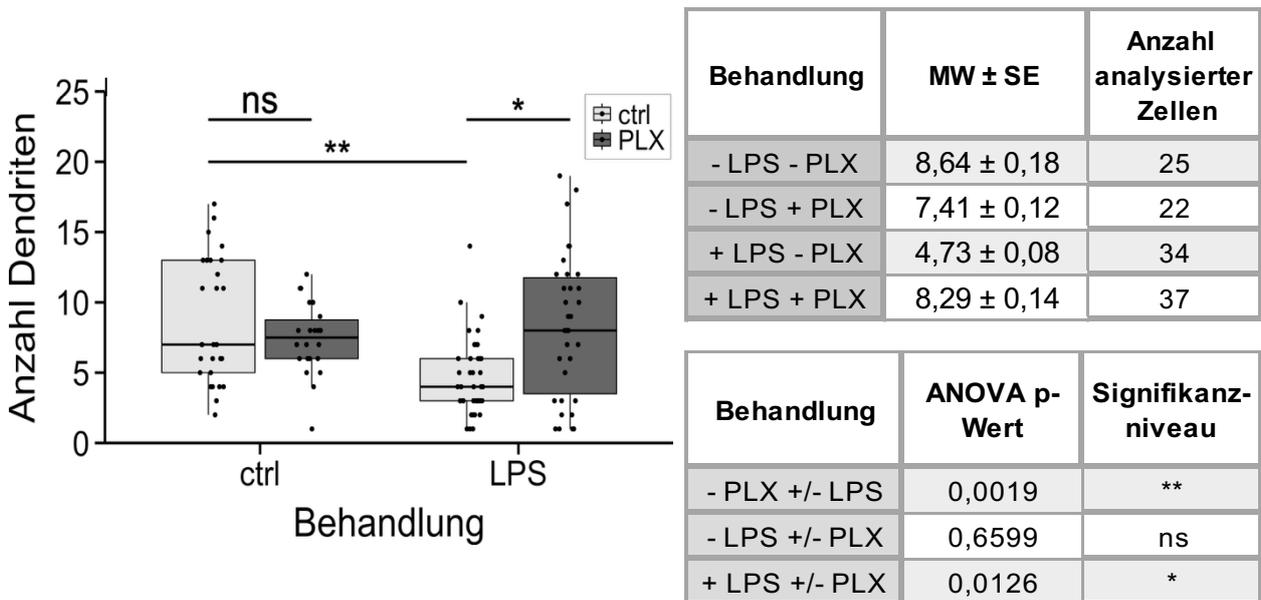


Abb. 16: Darstellung der Dendritenanzahl pro PC in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS behandelt (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne PLX an DIV 3 (ctrl, PLX) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)
 DIV: Days in vitro; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

zunehmend verzweigen und in die Länge wachsen (Abb. 2). Unbehandelte Kontrollzellen wiesen ca. 9 Dendriten pro PC auf. Wurden die Kulturen mit LPS behandelt, waren signifikant weniger Dendriten pro PC nachweisbar (im Mittel 5). Wie bei der Dendritenlänge ließ sich auch dieser Effekt durch eine gleichzeitige Applikation durch PLX verhindern (Abb. 16). Somit unterschieden sich gänzlich unbehandelte Zellen nicht mehr von sowohl mit LPS-, als auch mit PLX behandelten PC. Die alleinige PLX-Behandlung hatte keinen Effekt auf die Aussprossung oder Retraktion von Dendriten.

In Zusammenschau mit der Dendritenlänge kann also geschlossen werden, dass der Zuwachs der Dendritenlänge nicht mit einer Zunahme an Filamenten, sondern mit weniger, aber längeren Filamenten pro PC einhergeht.

3.1.5 PLX inhibiert die LPS-induzierte Zunahme der Dendritenverzweigungspunkte pro Purkinjezelle

Änderungen der Gesamtlänge eines Dendriten können sowohl durch die Verlängerung vorhandener Dendritensegmente als auch durch die Zunahme der Anzahl von Segmenten verursacht werden. Je mehr Verzweigungen eine Zelle besitzt, desto mehr Informationen können gleichzeitig in dieser Zelle verarbeitet werden. Insofern nehmen unter physiologischen Bedingungen die Anzahl der Dendritenverzweigungen mit der Reifung der PC zu.

Wurden die Verzweigungspunkte der kultivierten unbehandelten PC analysiert, lag im Durchschnitt nur weniger als eine Verzweigung pro Dendrit vor (Abb. 17). In der alleinig mit LPS behandelten Gruppe hingegen waren es durchschnittlich drei Verzweigungen. Wurden Zellen mit LPS und PLX behandelt, lag erneut ein Mittelwert von unter einer Verzweigung vor. PLX alleine hatte keinen Einfluss auf die Verzweigung der PC Dendriten. Der Unterschied zwischen den LPS mit und ohne PLX behandelten Gruppen war hoch signifikant. Die zuvor beschriebene LPS-vermittelte Dendritenlängenveränderung basiert folglich nicht nur auf einem Wachstum, sondern auch auf der Zunahme der Verzweigungen eines Dendriten. Dieser durch LPS-induzierte Verzweigungsanstieg konnte nach Inhibition der Mikroglia proliferation unterdrückt werden.

Wie der Tabelle in Abb. 17 zu entnehmen ist, war ein signifikanter Unterschied zwischen PLX behandelten Zellen und Kontrollzellen feststellbar. Dieser Effekt war in absoluten

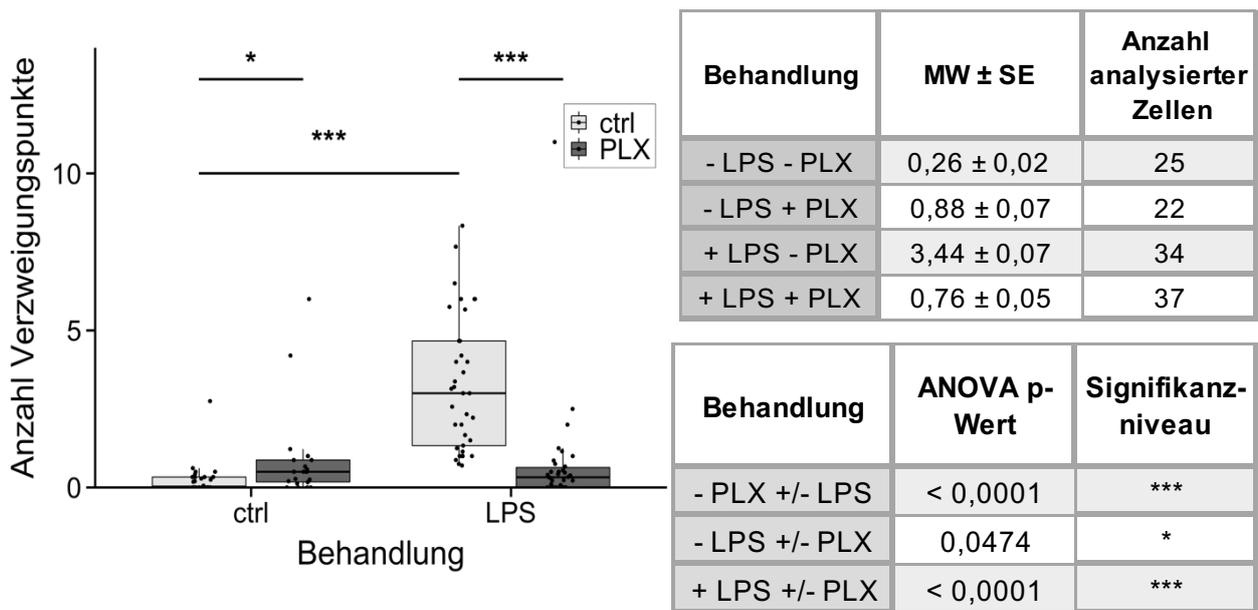
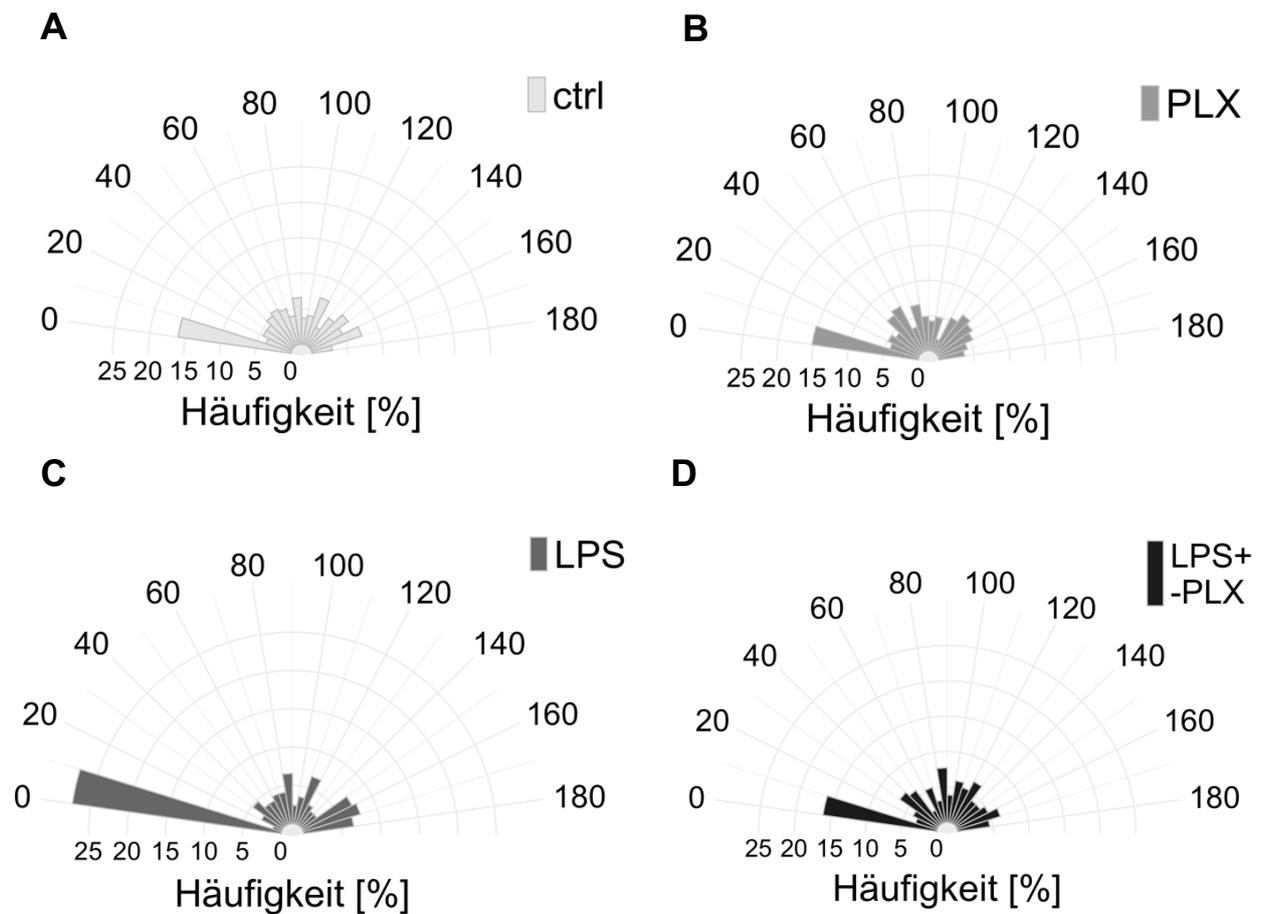


Abb. 17: Darstellung der Dendritenverzweigungspunkte von PC in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne PLX an DIV 3 (ctrl, PLX) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). DIV: Days in vitro; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

Zahlen nur sehr gering und gegenläufig zum Effekt, der bei LPS und PLX-Behandlung verursacht wurde. Es ist also davon auszugehen, dass der inhibitorische Effekt der PLX-Behandlung auf die LPS-Effekte dieselben Effektoren adressiert.

3.1.6 PLX inhibiert die LPS-induzierte Zunahme der Polarität von Purkinjezellen

Ein charakteristisches Merkmal reifender PC ist die zunehmende Polarisierung der Zellen, die sich in einer Reduktion der somatischen Dendriten und einem zunehmenden Längenwachstum der verbleibenden Stammdendriten sichtbar macht. Diese Polarisierung wurde durch zwei Auswertungsparameter adressiert: den Dendritenorientierungswinkel der Stammdendriten und die Abstände zwischen den Startpunkten der Stammdendriten (siehe Kapitel „Material und Methoden“ 2.10, Abb. 10&11). Bei einer unpolaren Zelle mit vielen Dendriten sind die Dendriten in alle Rich-



Behandlung	Watson-Williams p-Wert	Signifikanzniveau
- PLX +/- LPS	0,00829	*
- LPS +/- PLX	0,00165	**
+ LPS +/- PLX	0,01269	*

Abb. 18: Häufigkeit von Stammdendriten mit definierten Ausrichtungen (dendritischen Orientierungswinkeln) in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung. Dargestellt sind in den Abbildungen A-D die verschieden behandelten Schnittkulturen. Im Gegensatz zu den vorherigen Diagrammen ist hier als n-Zahl die Dendritenzahl angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlich genutzten Dendritenzahlen wurden relative Häufigkeiten berechnet. Signifikante Unterschiede im Mittelwert zwischen den Gruppen wurden durch den Watson-Williams Test ermittelt (ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)
ctrl: Kontrolle; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

tungen orientiert. Wird also die Häufigkeit von Dendriten in die verschiedenen Richtungen in einem Kreisdiagramm dargestellt, würde man erwarten, dass alle PC einen Dendriten in Richtung 0° besitzen (Ausrichtung aller Purkinjezellen am längsten Dendriten). Da jede PC mindestens einen Stammdendriten besitzt, ist die Anzahl der Dendriten bei 0° in allen Diagrammen am höchsten. Vergleicht man die Abgangswinkel der Dendriten in den verschiedenen Versuchsgruppen fällt auf, dass die LPS behandelten PC verhältnismäßig mehr Dendriten bei 0° besitzen als in den anderen Behandlungsgruppen. Dies heißt, dass diese Zellen häufiger nur einen Stammdendriten entwickelten. Dieser Effekt wurde durch PLX aufgehoben. Die Behandlung mit PLX hatte wie bei der Auswertung der Verzweigungspunkte ebenfalls einen Effekt auf die Polarität der Zellen. Dies ist nicht verwunderlich, da Mikrogliazellen durch die Präparation der Schnittkulturen aktiviert und durch PLX diese Aktivierung der Proliferation unterdrückt wird.

Die Bestimmung der Orientierungswinkel geht von der Annahme aus, dass alle Dendriten in einem 90° Winkel vom Soma ausgehen. Da dies ein idealisiertes Modell ist, wurde die

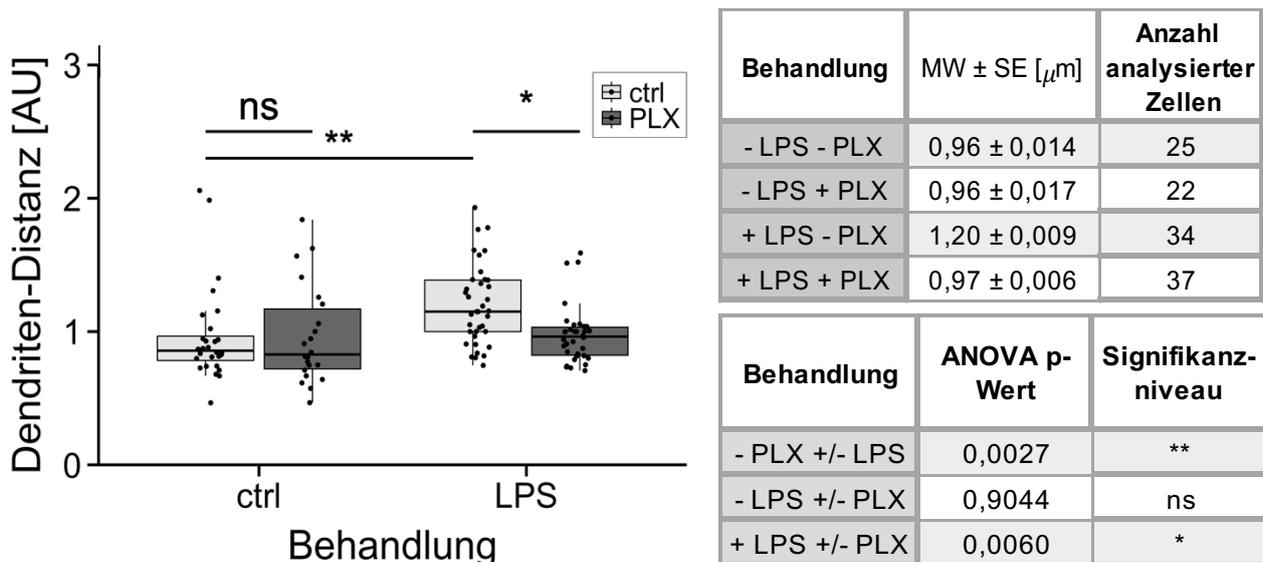


Abb. 19: Darstellung Abstände zwischen den Dendritenstartpunkten in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne PLX an DIV 3 (ctrl, PLX) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellenzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. Die gemessenen Distanzen wurden auf einen durchschnittlichen Somadurchmesser von 20 μm normiert. (ANOVA ; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). DIV: Days in vitro; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

Polarität zusätzlich durch die Abstände der Dendritenstartpunkte vom Soma bewertet. Bei einer polar ausgerichteten Zelle mit wenigen und an unterschiedlichen Positionen entstammenden Dendriten sollte der Abstand relativ groß sein. Bei einem multipolaren Neuron dagegen ist im Mittel ein kleinerer Abstand zwischen den Startpunkten zu erwarten. Zur Normierung der Werte wurden die Distanzen auf eine Somagröße von 20 μm umgerechnet (Abb. 18). Vergleicht man die durchschnittlichen Abstände der Dendritenstartpunkte miteinander, fällt auf, dass die PLX-Behandlung keinen Effekt hatte.

LPS vergrößerte den Abstand zwischen den Dendritenstartpunkten signifikant und eine gleichzeitige Behandlung mit PLX verringerte diesen Abstand wiederum (Abb. 19). Dies bedeutet, dass die PC nach LPS-Behandlung einen reiferen Charakter annehmen als ihre unbehandelten Kontrollzellen und dass dieser LPS-Effekt durch PLX aufgehoben werden kann.

Vergleicht man die beiden Prozeduren zur Messung der Polarität der PC Somata, erscheint die Messung der Abstände der Dendritenstartpunkte verlässlicher zu sein, da die Messung nicht von der Annahme eines Dendritenabgangswinkels von 90° ausgeht. Insofern habe ich im Weiteren nur noch die Dendritenstartpunktabstände als Maß für die Polarität einer PC genutzt.

3.1.7 Einfluss von PLX auf Astrocyten und Oligodendrocyten

PLX gilt als spezifischer Inhibitor der Mikroglia proliferation. Es muss allerdings festgehalten werden, dass auch andere Gliazellen in Kultur stark proliferieren. Bekannt ist dies vor allem für Astrocyten, die nach Anlage der Kulturen in den ersten Tagen stark zunehmen und an der Oberfläche eine Art Glianarbe bilden. Oligodendrocyten werden sich in der Kultur ohne zusätzliche Wachstumsfaktoren nicht wesentlich vermehren. PLX sollte also auf diesen Gliazelltyp weniger Einfluss haben.

Um diese Hypothese zu testen, wurden die Kleinhirnschnitte gegen GFAP (für Astrocyten), MBP (für reife Oligodendrocyten) und Olig-2 (für Oligodendrocyten-Vorläuferzellen) gefärbt. GFAP Antikörper färben Zytoskelettbestandteile, die u.a. in Fortsätzen vorkommen. Die Färbung mit GFAP bewirkt folglich die Darstellung eines ausgeprägten Fasergeflechts (Messing und Brenner, 2020). Wurden GFAP gefärbte, LPS behandelte

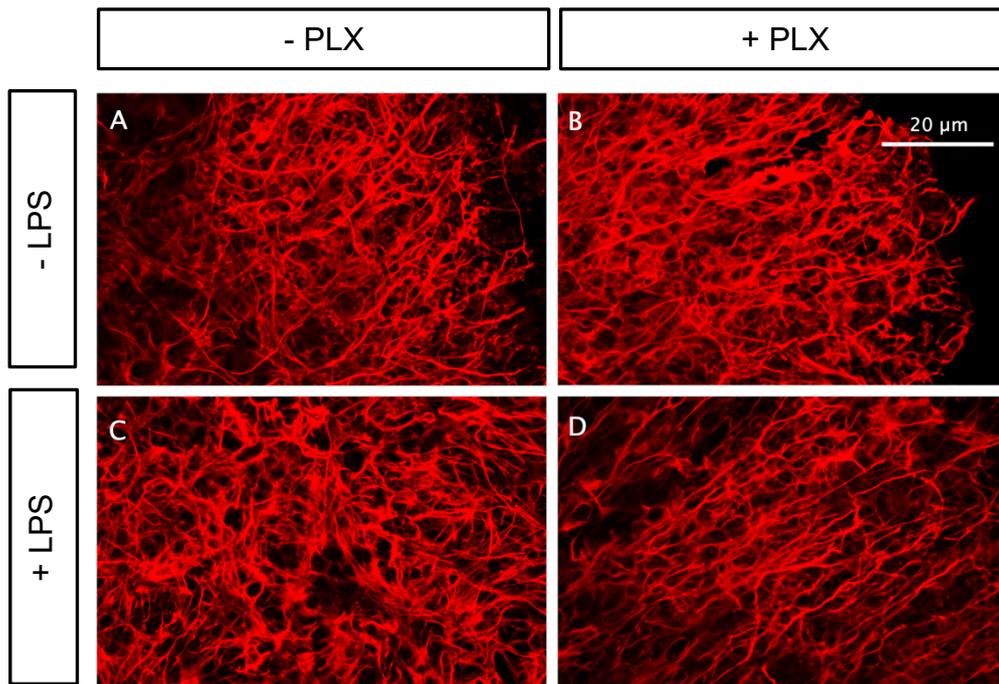


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder PLX behandelten Schnittkulturen mit Astrocyten-spezifischem GFAP. GFAP: Saures Gliafaserprotein; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

oder LPS und PLX behandelte Schnitte verglichen, war die Färbeintensität in allen Fällen sehr hoch. Dies bedeutete zwar, dass kein Effekt von LPS auf die normale präparationsbedingten Stimuli der GFAP-positiven Zellen gezeigt werden konnte, der Einsatz von PLX bewirkte aber auch keine erkennbare Reduktion der Färbeintensität. In grober Annäherung scheint also PLX nicht auf Astrocyten zu wirken. Diese Aussage wird in der Diskussion eingehend bewertet.

Auch bei der Färbung gegen MBP ließen sich keine Unterschiede feststellen. Hier muss allerdings festgehalten werden, dass MBP nur in reifen Oligodendrocyten exprimiert wird (Widder et al., 2020), ich aber P0 Schnitte gefärbt habe, die kaum reife Oligodendrocyten enthalten. Aussagekräftiger sollte hier die Analyse von unreifen Oligodendrocyten sein. Die Färbung unreifer Oligodendrocyten mit Olig-2 zeigte etwas weniger Zellen in den LPS behandelten Kulturen als in den unbehandelten. Wurde gleichzeitig mit PLX behandelt, waren trotzdem weniger Olig-2-positive Zellen vorhanden. Gleichzeitig ließ sich die Anzahl Olig-2-positiver Zellen bei alleiniger PLX-Applikation ungefähr mit den unbehan-

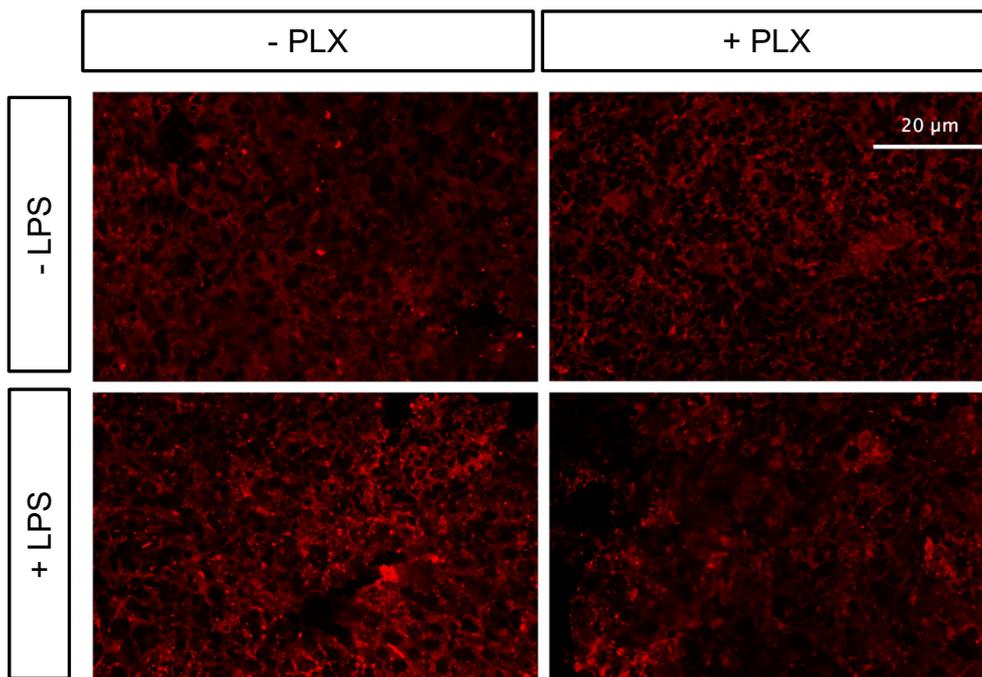


Abb. 21: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder PLX behandelten reifen Oligodendrocyten mit MBP. LPS: Lipopolysaccharid; MBP: Myelobasisches Protein; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

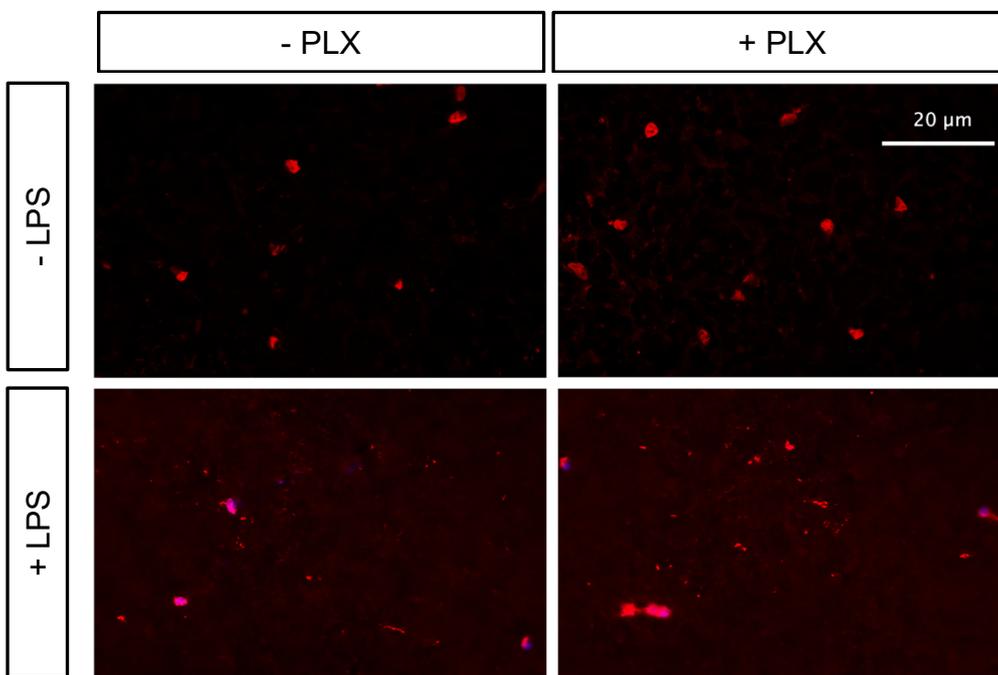


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder PLX behandelten unreifen Oligodendrocyten mit Olig-2. LPS: Lipopolysaccharid; Olig-2: Oligodendrocytentranskriptionsfaktor 2; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

delten Kontrollen vergleichen. Somit ist die Menge unreifer Oligodendrocyten offenbar von LPS abhängig. Diese Abnahme scheint jedoch nicht von PLX beeinflussbar zu sein. Da PLX alleine keinen erkennbaren Einfluss auf die Olig-2-Färbung hatte und PLX den LPS-Effekt nicht aufheben konnte, ist davon auszugehen, dass PLX nicht auf unreife Oligodendrocyten wirkt und der LPS-Effekt auf die Oligodendrocyten nicht über Mikrogliazellen vermittelt wird.

3.2 Effekt von Mikroglia-subtypen auf die Dendritogenese cerebellärer PC

Wenn Mikrogliazellen den LPS-induzierten Effekt auf die PC Differenzierung bewirken, ist anzunehmen, dass der M1 Phänotyp diesen Effekt hervorruft. Würde also die Entstehung des M1 Phänotyps verhindert bzw. der M1 in einen M2 Phänotyp umgewandelt werden, sollte der LPS-Effekt ebenfalls unterdrückt werden können. Um dies zu untersuchen, wurden Kleinhirnschnittkulturen mit LPS und IL-4 behandelt. IL-4 wandelte den proinflammatorischen M1 Phänotyp in den M2a Phänotyp um, der an der Begrenzung und Beendigung einer Entzündungsreaktion *in vivo* beteiligt ist (Cherry et al., 2014; He et al., 2020). Ein für die Vermittlung von Entzündungsreaktionen wichtiger und von M1 Mikrogliazellen sezernierter Faktor ist, wie hier schon öfter erwähnt, TNF α . Signalwege, die die TNF α -Synthese und -Sekretion anregen, laufen über cAMP als sekundären Botenstoff. Dibutyryl-cAMP (dB-cAMP) unterdrückt die Ausschüttung von TNF α , ohne jedoch einen Einfluss auf die Ausschüttung anderer Marker des proinflammatorischen M1 Subtyps zu haben oder die phagozytotische Aktivität zu blockieren (Woo et al., 2003). Somit sollte sich eine Aussage treffen lassen, ob die durch LPS hervorgerufenen inhibitorischen Effekte durch TNF α vermittelt werden, und sich damit indirekt bestätigen, ob LPS-Effekte durch den M1 Mikroglia-phänotyp vermittelt werden.

Wichtig für das Verständnis und die Interpretation der folgenden Ergebnisse ist, dass die Kulturen nicht wie bisher an DIV 3, sondern erst an DIV 6 behandelt wurden. Die Intention war, dass die Mikrogliazellen sich zunächst ausdifferenzieren und vermehren können, um einen nachweisbaren Effekt einer Konversion sehen zu können.

3.2.1 Einfluss von IL-4 und dB-cAMP auf Mikroglia und deren Konversion

Wie im vorherigen Versuch schon beobachtet wurde, nahm das Iba1 Signal nach LPS-Behandlung deutlich im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu (Abb. 23B). Jedoch nahm die Anzahl an anfärbbaren Mikroglia wieder ab, wenn man neben einer Applikation von LPS an Tag 6 auch dB-cAMP zugab (Abb. 23A). Da TNFa durch positive Rückkopplung die Mikrogliazellen stimuliert (Brás et al., 2020), ist dieses Ergebnis nicht unerwartet. Gab man zusätzlich zum LPS IL-4 zu, zeigte sich kaum ein Effekt zur alleinigen LPS-Behandlung. Da Iba1 ein genereller Marker für Mikrogliazellen ist, sollte eine Konversion nicht unbedingt die Gesamtzahl der Mikroglia verändern und insofern auch keine Änderungen der Iba1-Färbung hervorrufen. Die Behandlung von PC nur mit dB-cAMP bzw. IL-4 könnte aber einen Effekt auf die Anzahl der Mikrogliazellen haben, da durch die Präparation bereits Mikrogliazellen aktiviert werden. Tatsächlich zeigte sich ein durch Zugabe von IL-4 ein leichter Anstieg an Mikroglia, während dB-cAMP alleinig zu weniger Iba1-positiven Mikroglia führte. Auch dieser Effekt ist nach obigen Erklärungen nachvollziehbar, da IL-4 lediglich zu einer Konversion des Subtyps führt, dB-cAMP jedoch die positive Rückkopplung auf Mikroglia durch Hemmung der TNFa Sekretion inhibiert. Entsprechend kann die geschlussfolgert werden, dass der M1 Subtyp die LPS-induzierten Effekte auf PC vermittelt.

Um einen Eindruck zu bekommen, welche Mikrogliazellen in den Schnittkulturen vorkommen, wurden Kulturen von 8 Tage alten Tieren genutzt. Hintergrund für die Wahl der späteren Altersstufe war, dass bei P0 Kulturen zwar Iba1-positive Zellen, aber kaum eine TREM2-Färbung zu sehen war. Auch nach IL-4-Behandlung war in P0 Kulturen keine Färbung zu sehen. Wurden Schnittkulturen von 8 Tage alten Mäusen mit LPS behandelt, nahm wie erwartet die Anzahl an Iba1 Zellen deutlich zu. Gleichzeitig stieg aber auch die Anzahl der TREM2-positiven M2a Zellen und die Färbungsintensität selbst. Leider waren Färbungen mit CD14 (M1), CD64 (M2b) und CD163 (M2c) nicht erfolgreich, sodass ich derzeit keine Aussagen zu den oben genannten M2b und M2c Gliazellen treffen kann. Auch gibt es derzeit keine genauen Aussagen über die prozentuale Verteilungen von einzelnen Mikrogliazelltypen in den Kulturen. Trotzdem kann ich mit den soweit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die LPS-Behandlung M2a Mikrogliazellen in P8 Kulturen induzierte (Abb. 23C) und dass der Anstieg der TREM2-positiven Zellen

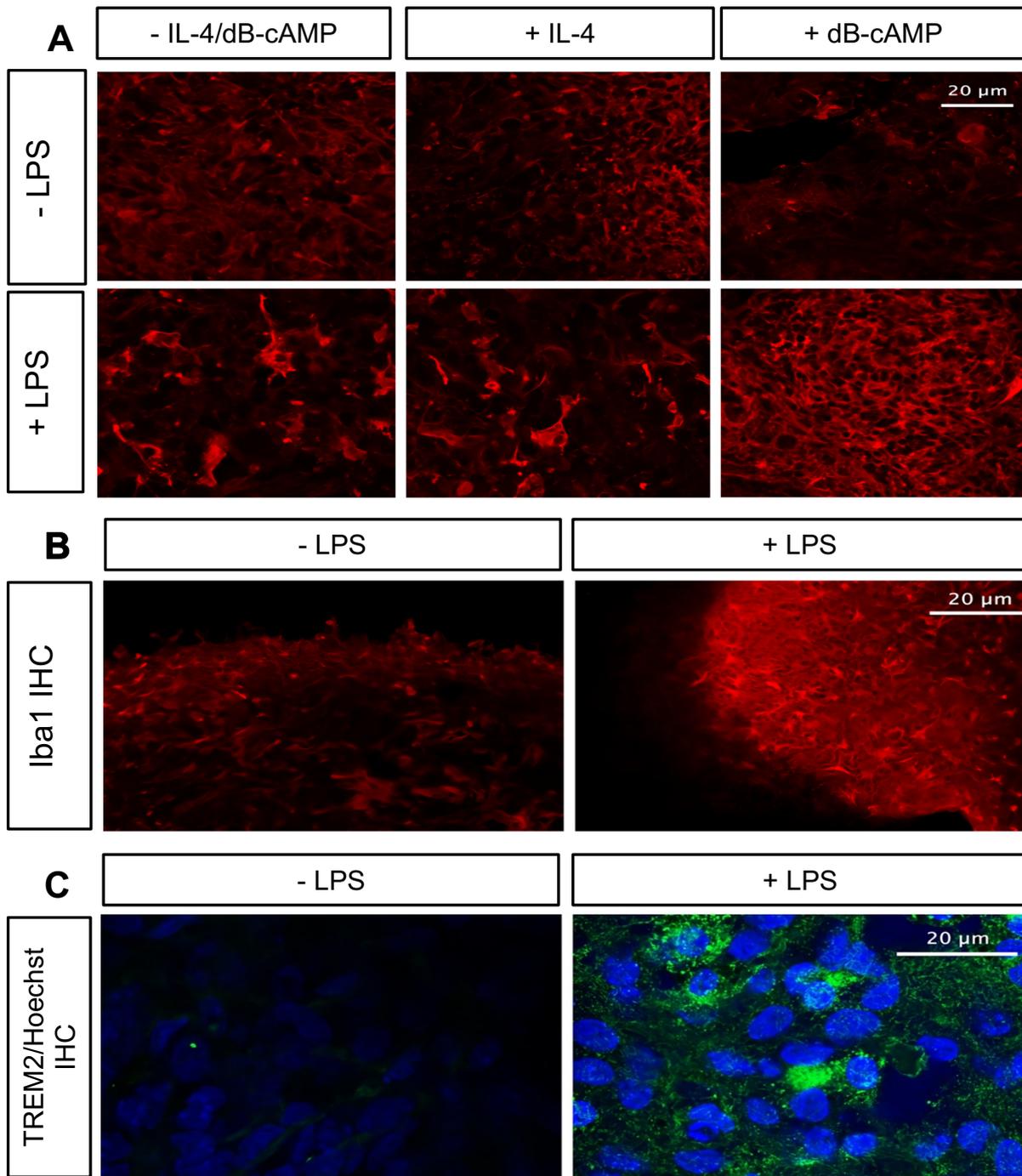


Abb. 23: A: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder IL-4/dB-cAMP behandelten Mikroglia von P0 Schnittkulturen gegen Iba1. B: Immunhistochemische Färbungen von mit/ohne LPS behandelten Mikroglia (Iba1) von P8 Schnittkulturen gegen Iba1. C: Immunhistochemische Färbung des mit/ohne LPS behandelten M2a Mikroglia subtyps von P8 Schnittkulturen gegen TREM2. Grün: TREM2-AK; Blau: Hoechst Kernfärbung. dB-cAMP: Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat; Iba1: Ionisiertes Calciumbindendes Adaptermolekül 1; IHC: Immunhistochemie; IL-4: Interleukin 4; LPS: Lipopolysaccharid; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor; TREM2: Triggerrezeptor auf myeloiden Zellen 2.

nicht in P0 sichtbar gemacht werden kann. Experimentell bleibt hier also offen, ob IL-4 tatsächlich eine Mikroglia-Konversion bei P0 hervorruft, sodass sich meine Aussage auf Literaturdaten verlässt.

3.2.2 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Reduktion des Dendritenwachstums

Wurden Schnittkulturen mit Calb1-Antikörpern gefärbt und zunächst einmal visuell inspiziert, zeigten sich bereits ohne morphometrische Analyse deutliche Änderungen in der Morphologie zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abb. 24). LPS führte häufig zu einem sehr eingeschränkten Dendritenwachstum mit kaum erkennbaren Verzweigungen. Wurden die Kulturen mit IL-4 behandelt, erschienen die Zellen tendenziell etwas polarer aufgebaut. Ein Unterschied zeigte sich aber ganz deutlich zwischen den LPS- und LPS+IL-4-Behandlungen. Die Dendritenzahl, -länge und -verzweigung schienen im Vergleich zu den LPS behandelten Zellen zuzunehmen. Ähnliches war bei den dB-cAMP behandelten Kulturen zu sehen, allerdings wesentlich weniger ausgeprägt. Die

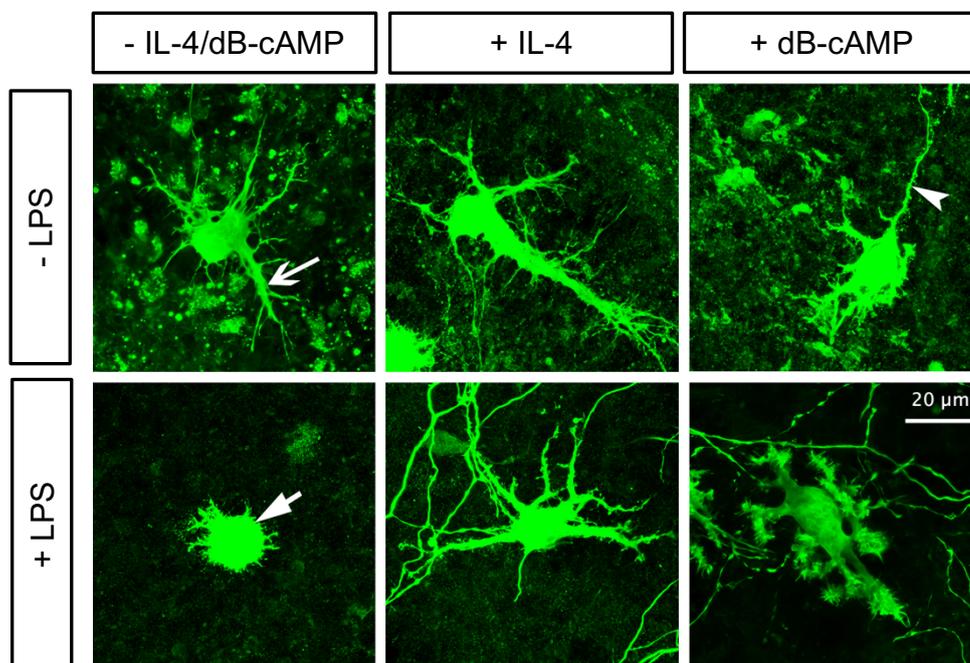
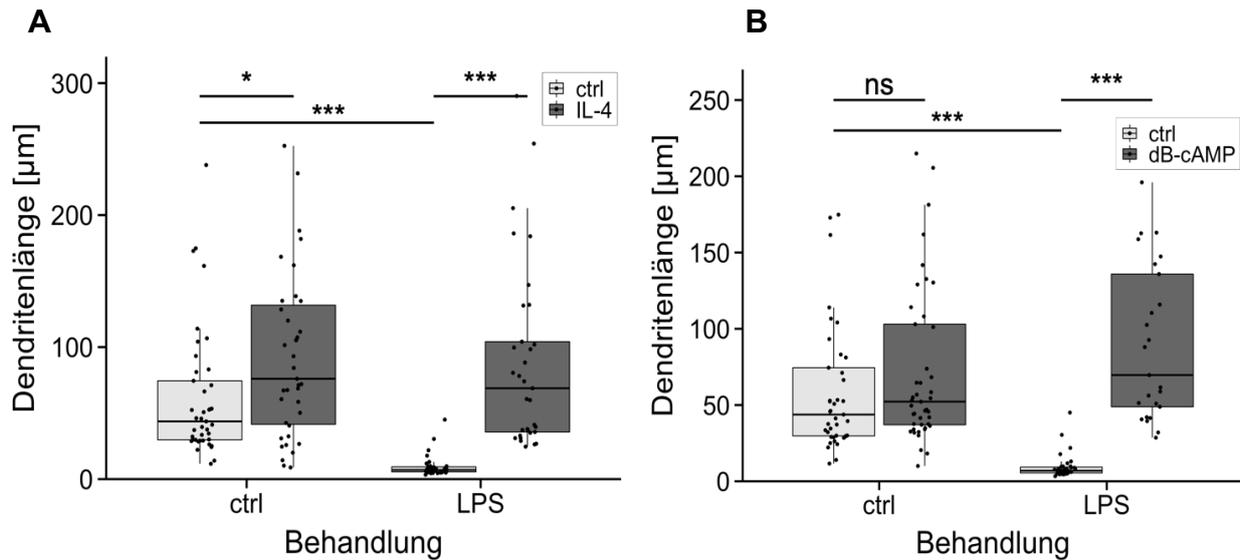


Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder IL-4/dB-cAMP behandelten Purkinjezellen gegen Calb1. Pfeilspitze: Axon, Pfeil mit gefüllter Spitze: Soma, Pfeil: Dendrit. Calb1: Calbindin 1; dB-cAMP: Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat; IL-4: Interleukin 4; LPS: Lipopolysaccharid.

morphometrische Analyse erschien also vielversprechend.

Wurden Schnittkulturen in dieser Versuchsreihe von P0 Tieren hergestellt und an DIV 10 analysiert, zeigten unbehandelte Kontrollzellen eine durchschnittliche Dendritenlänge von ca. 47 μm . Die Dendriten waren im Vergleich zu den DIV 3 behandelten Zellen wie sie in Abbildung 15 beschrieben wurden, im Mittel um 30 μm länger. Diese Unterschiede mögen



Behandlung	MW \pm SE [μm]	Anzahl analysierter Zellen
- LPS - IL-4/dB-cAMP	61,56 \pm 1,21	41
+ LPS - IL-4/dB-cAMP	9,55 \pm 0,23	35
- LPS + IL-4	101,91 \pm 2,01	40
+ LPS + IL-4	100,20 \pm 2,87	34
- LPS + dB-cAMP	74,36 \pm 1,24	45
+ LPS + dB-cAMP	126,27 \pm 5,73	27

Behandlung	ANOVA p-Wert	Signifikanzniveau
- IL4/dB-cAMP +/- LPS	< 0,0001	***
- LPS +/- IL-4	0,0191	*
+ LPS +/- IL-4	< 0,0001	***
- LPS +/- dB-cAMP	0,1873	ns
+ LPS +/- dB-cAMP	< 0,0001	***

Abb. 25: Darstellung der Dendritenlänge von PC in Abhängigkeit der LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS behandelt (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne IL-4 (A) bzw. dB-cAMP (B) an DIV 6 (ctrl, IL-4/dB-cAMP) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). dB-cAMP: Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat; IL-4: Interleukin 4; LPS: Lipopolysaccharid.

in den unterschiedlichen Behandlungsprotokollen liegen. Während für Abb. 15 die Schnittkulturen bereits an DIV 3 und dann mit einem DMSO haltigen Medium behandelt wurden, sind die Zellen hier erst an DIV 6 behandelt worden und das Medium wurde nicht mit DMSO versetzt. Unabhängig davon wurden immer Kontrollkulturen und behandelte Kulturen aus einem Versuch verglichen, sodass gleiche Bedingungen vorherrschten.

Die einzig mit LPS behandelten Zellen wiesen eine signifikant kürzere Länge der Dendriten auf. Dieser inhibierende Effekt des LPS ließ sich durch gleichzeitige Behandlung mit IL-4 verhindern. Der Dendritenbaum war im Mittel sogar länger als der der unbehandelten Kontrollzellen. Interessanterweise wiesen auch PC, die alleinig mit IL-4 behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen einen leichten Anstieg in der mittleren Dendritengesamtlänge im Vergleich zu mit LPS und IL-4 behandelten PC auf (Abb. 25A). Werden also proinflammatorische Mikrogliazellen vom Typ M1 in den M2a Typ umgewandelt, verliert LPS seinen Einfluss auf das Dendritenwachstum. Da M1 Mikrogliazellen bereits in unbehandelten Schnittkulturen vorlagen (s. Abb. 23A), ist das Ergebnis der IL-4 behandelten Kulturen nachvollziehbar.

Ein ähnliches Ergebnis konnte mit den dB-cAMP-Behandlungen erzielt werden. Wurde die cAMP Signalkette mit dB-cAMP blockiert und damit die TNF α Sekretion unterdrückt, waren auch die LPS-induzierten Effekte inhibiert. Das durch LPS nahezu blockierte Wachstum war durch dB-cAMP wieder signifikant erhöht. Die kompetitive Blockierung des cAMP Signalweges ohne eine gleichzeitige LPS-Behandlung hatte keinen Effekt.

Somit schienen sowohl dB-cAMP, als auch IL-4 die verkürzenden Effekte des LPS auf die Dendritenlänge zu verhindern.

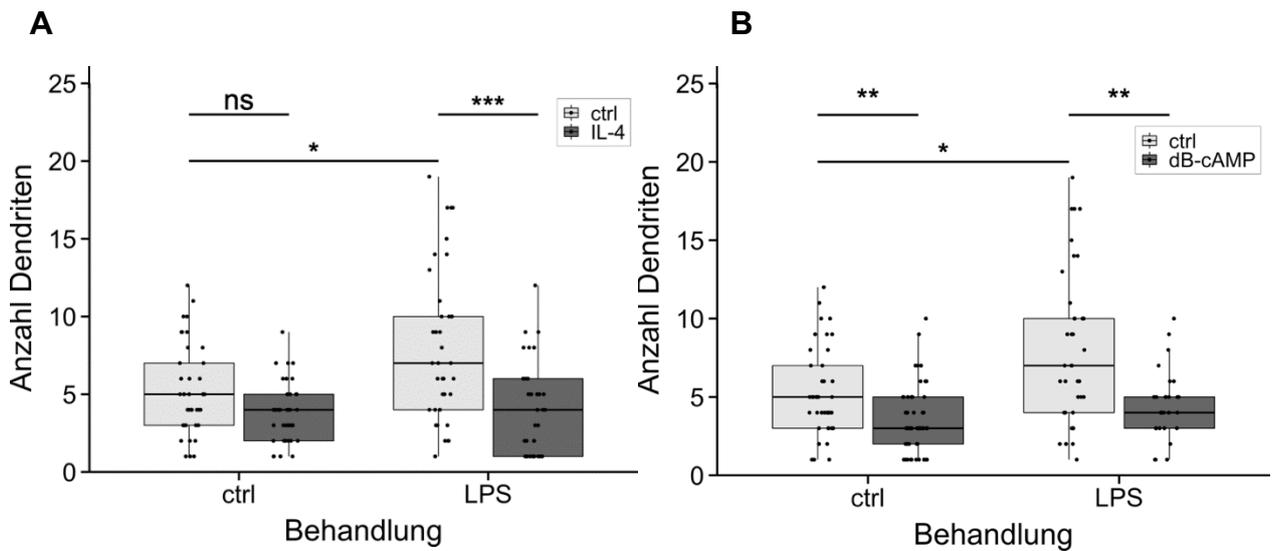
3.2.3 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Abnahme der Anzahl an Dendriten pro Purkinjezelle

Wenn die LPS-induzierte Abnahme der Dendritenlänge als Hinweis auf eine reduzierte Reifung der Dendriten gedeutet wird, dann muss erwartet werden, dass die Anzahl der Dendriten pro Zelle ansteigt entsprechend einem unreiferen multipolaren Zelltyp.

Unbehandelte Kontrollzellen hatten durchschnittlich 5 Dendriten pro Zelle. Applizierte man LPS, stieg die Zahl dieser Filamente auf ca. 8 pro PC an. Dieser Effekt ließ sich durch eine zusätzliche IL-4- oder dB-cAMP-Behandlung rückgängig machen (Abb. 26). Es lagen

wieder weniger Filamente vor als in den nur mit LPS behandelten Zellen. Wurden die Kulturen nur mit IL-4 behandelt, war kein signifikanter Einfluss auf die Dendritenzahl zu sehen. Eine dB-cAMP-Behandlung verursachte dagegen eine Reduktion der durchschnittlichen Dendritenzahl von 5 auf 4 pro PC.

3.2.4 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Abnahme der Dendritenverzweigungen

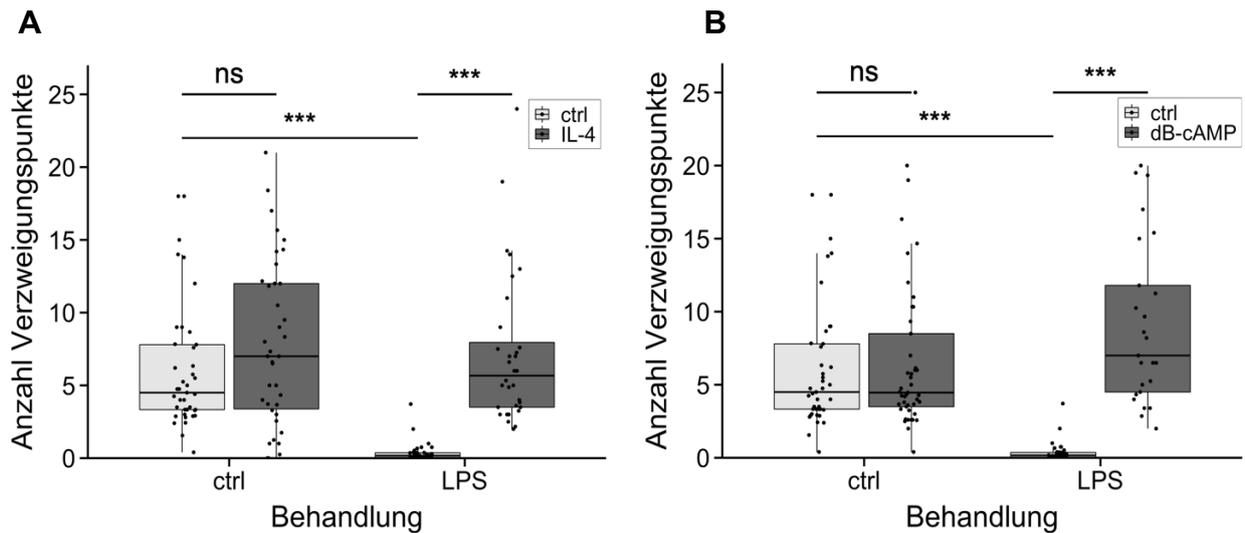


Behandlung	MW ± SE	Anzahl analysierter Zellen
- LPS - IL-4/dB-cAMP	5,22 ± 0,07	41
+ LPS - IL-4/dB-cAMP	8,11 ± 0,14	35
- LPS + IL-4	3,78 ± 0,05	40
+ LPS + IL-4	4,14 ± 0,09	34
- LPS + dB-cAMP	3,53 ± 0,05	45
+ LPS + dB-cAMP	4,48 ± 0,08	27

Behandlung	ANOVA p-Wert	Signifikanzniveau
- IL-4/dB-cAMP +/- LPS	0,0265	*
- LPS +/- IL-4	0,0550	ns
+LPS +/- IL-4	< 0,0001	***
- LPS +/- dB-cAMP	0,0036	**
+ LPS +/- dB-cAMP	0,0036	**

Abb. 26: Darstellung der Dendritenzahl pro PC in Abhängigkeit der LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS behandelt (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne IL-4 (A) bzw. dB-cAMP (B) an DIV 6 (ctrl, IL-4/dB-cAMP) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). dB-cAMP: Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat; IL-4: Interleukin 4; LPS: Lipopolysaccharid.

Wenn IL-4 und dB-cAMP die Reifung der Purkinjezellen fördern, würde man erwarten, dass beide Substanzen die LPS-induzierte Inhibierung der Reifung aufheben können. Eben diese Beobachtung konnten wir in den entsprechend behandelten Schnittkulturen nachvollziehen. Bei den unbehandelten Kontrollzellen lagen im Mittel ca. 5 Verzweigungspunkte pro Dendrit vor. Wurden die Zellen mit LPS behandelt, verringerte



Behandlung	MW ± SE	Anzahl analysierter Zellen
- LPS - IL-4/dB-cAMP	6,10 ± 0,11	41
+ LPS - IL-4/dB-cAMP	0,38 ± 0,02	35
- LPS + IL-4	8,85 ± 0,18	40
+ LPS + IL-4	8,98 ± 0,27	34
- LPS + dB-cAMP	6,71 ± 0,12	45
+ LPS + dB-cAMP	12,08 ± 0,46	27

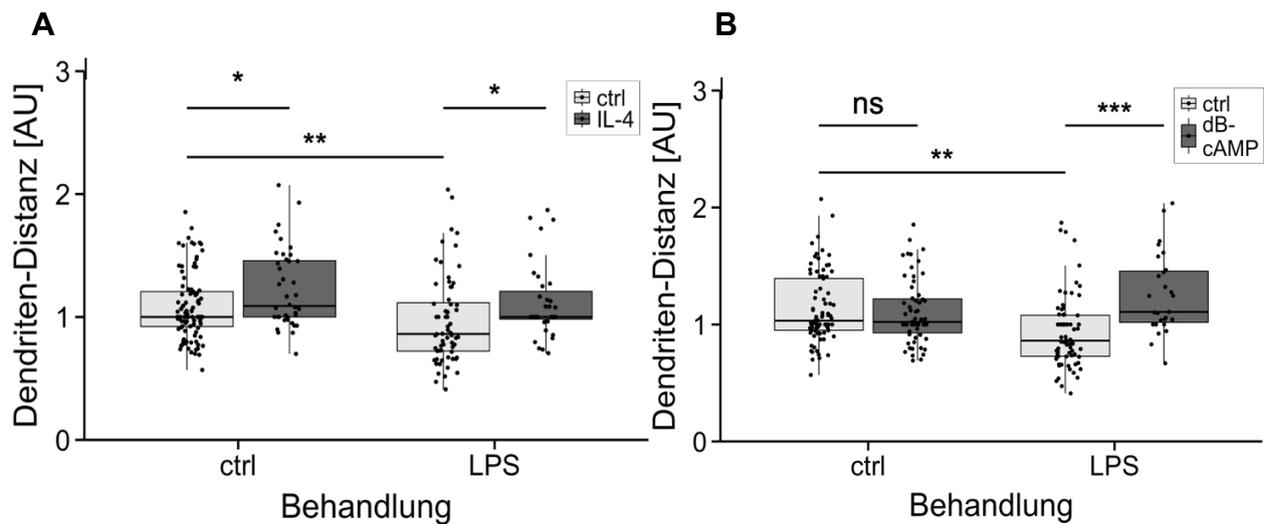
Behandlung	ANOVA p-Wert	Signifikanzniveau
- IL4/dB-cAMP +/- LPS	0,0002	***
- LPS +/- IL-4	0,0560	ns
+ LPS +/- IL-4	< 0,0001	***
- LPS +/- dB-cAMP	0,6646	ns
+ LPS +/- dB-cAMP	< 0,0001	***

Abb. 27: Darstellung der Dendritenverzweigungspunkte von PC in Abhängigkeit derer Verzweigungsordnungen unter LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS behandelt (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit IL-4 (A) bzw. dB-cAMP (B) an DIV 6 (ctrl, IL-4/dB-cAMP) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). dB-cAMP: Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat; IL-4: Interleukin 4; LPS: Lipopolysaccharid.

sich dieser Wert auf durchschnittlich 0,5 Verzweigungen pro Dendrit. Vergleich man diesen Wert der alleinig mit LPS behandelten Zellen mit der Anzahl an Verzweigungspunkten von PC, die sowohl mit LPS, als auch mit IL-4 oder dB-cAMP behandelt wurden, lagen durchschnittlich wieder so viele Verzweigungen vor, wie sie in unbehandelten Kontrollzellen vorgefunden worden waren (Abb. 27). Die alleinigen Behandlungen mit IL-4 oder dB-cAMP hatten keinen Einfluss auf den Verzweigungsgrad der Dendritenbäume.

3.2.5 IL-4 und dB-cAMP inhibieren die LPS-induzierte Abnahme der Purkinjezellpolarität

Ähnlich der Anzahl, Länge und der Verzweigung von Dendriten wurde durch die Behandlung von Kulturen mit IL-4 und dB-cAMP auch die LPS-induzierten Effekte auf die Polarität der PC beeinflusst. Es zeigte sich, dass eine LPS-Behandlung zu einer Abnahme der Distanz zwischen den Stammdendriten führte und sich dieser Effekt durch eine gleichzeitige Applikation von IL-4 bzw. dB-cAMP wieder aufheben ließ (Abb. 28). Dies bedeutet, dass LPS zu weniger polarisierten PC führte, jedoch durch die Umwandlung der Mikroglia in den M2a Subtyp durch IL-4 bzw. die Suppression der TNF α Ausschüttung durch dB-cAMP die PC wieder stärker polarisierten. dB-cAMP alleinig hatte keine Auswirkung auf die Dendritendistanz, IL-4 hingegen vermittelte bei alleiniger Applikation eine geringfügig längere Distanz und somit polarer ausgeprägte Zellen.



Behandlung	MW \pm SE [μ m]	Anzahl analysierter Zellen
- LPS - IL-4/dB-cAMP	1,08 \pm 0,007	41
+ LPS - IL-4/dB-cAMP	0,97 \pm 0,010	35
- LPS + IL-4	1,23 \pm 0,008	40
+ LPS + IL-4	1,12 \pm 0,009	34
- LPS + dB-cAMP	1,11 \pm 0,006	45
+ LPS + dB-cAMP	1,25 \pm 0,013	27

Behandlung	ANOVA p-Wert	Signifikanz-niveau
- IL-4/dB-cAMP +/- LPS	0,0037	**
- LPS +/- IL-4	0,0282	*
+LPS +/- IL-4	0,0060	*
- LPS +/- dB-cAMP	0,6627	ns
+ LPS +/- dB-cAMP	< 0,001	***

Abb. 28: Darstellung Abstände zwischen den Dendritenstartpunkten in Abhängigkeit der LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit und ohne IL-4 (A) bzw. dB-cAMP (B) an DIV 6 (ctrl, IL-4/dB-cAMP) behandelt und an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellenzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. Die gemessenen Distanzen wurden auf einen durchschnittlichen Somadurchmesser von 20 μ m normiert. (ANOVA ; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

dB-cAMP: Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat; IL-4: Interleukin 4; LPS: Lipopolysaccharid.

3.2.6 Effekte der Mikroglia-subtypen auf Astrocyten und Oligodendrocyten

Wie auch in den vorherigen beiden Versuchen ließ sich kein Unterschied zwischen den sechs Behandlungsgruppen mit/ohne LPS und mit/ohne IL-4 bzw. dB-cAMP in Bezug auf die immunhistochemische Färbung der Kleinhirnschnitte mit GFAP und MBP für Astrocyten und reife Oligodendrocyten feststellen, da hier erneut das Fasergeflecht bzw. die Färbung des Hintergrundes überwog.

Allerdings ließen sich Unterschiede in der Olig-2-Färbung erkennen (Abb. 29). Eine Applikation von LPS an Tag 6 *in vitro* verringerte die Anzahl an Olig-2 anfärbbaren unreifen Oligodendrocyten sichtbar. Diese Reduktion in der Anzahl der Oligodendrocyten konnte durch die gleichzeitige Gabe von IL-4 oder dB-cAMP rückgängig gemacht werden.

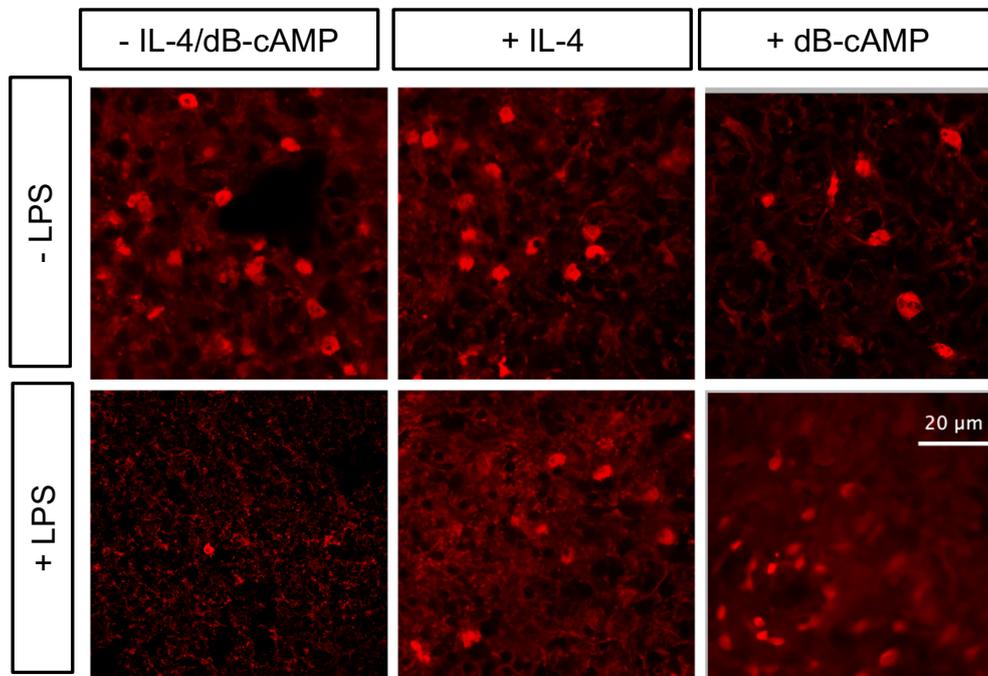


Abb. 29: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder IL-4/dB-cAMP behandelten unreifen Oligodendrocyten mittels Olig-2. LPS: Lipopolysaccharid; Olig-2: Oligodendrocytentranskriptionsfaktor 2; PLX: Kolonie-stimulierender-Faktor-1-Rezeptor-Inhibitor.

Wie von Modellsystemen mit MS bekannt, hat die Aktivierung von Mikroglia einen negativen Einfluss auf die Oligodendrocytendifferenzierung (Boutou et al., 2024).

3.3 Einfluss von Engrailed-2 auf die Purkinjezellmorphogenese

Wie einleitend beschrieben gibt es Hinweise darauf, dass Homöodomänen-enthaltende Proteine eine neuroprotektive Wirkung auf Neurone und andere neurale Zellen ausüben können (Vargas Abonce et al., 2019). Dies wurde bisher an embryonalen Zellen gezeigt und Hinweise darauf gefunden, dass das Überleben und/oder die Proliferation beeinflusst werden. Hingegen konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine in murinen Kleinhirnschnitten von 6 Tage alten Mäusen verstärkte endogene Expression von En2 einen durch LPS-induzierten negativen Effekt auf die Dendritogenese förderte (Bahaaeldin et al., 2024). Da En2 sezerniert werden kann und als axonales Wegfindungsprotein im visuellen System fungiert, sollte im hiesigen Projekt untersucht werden, ob exogen zugegebenes En2 einen positiven oder negativen Einfluss auf die Dendritogenese ausübt oder ob es die inhibitorischen Effekte des LPS im Sinne einer bereits für andere Zellen bekannten Neuroprotektion zu verhindern vermag. Da die endogene En2 Synthese der Maus erst bei P0 beginnt, konnte durch eine Verwendung der hier genutzten P0 Tiere der Einfluss des endogenen En2 minimiert werden.

3.3.1 Herstellung eines rekombinanten GST-En2-Fusionsproteins

Bereits aus einer früheren Arbeit zur Herstellung eines Antikörperserums gegen murines En2 (S. Kumar) war im Labor ein Konstrukt vorhanden, in dem unter einem bakteriellen Promotor murines En2 mit dem GST in einem Fusionsprotein exprimiert werden konnte (pQE-En2). Dieses pQE-En2-Plasmid sollte genutzt werden, um GST-En2 bakteriell zu exprimieren und das Protein aufzureinigen. Als Kontrollplasmid wurde der käuflich erworbene pGEX-3X-Vektor genutzt, der unter demselben Promotor die identische GST Sequenz enthielt, aber ohne zusätzliche andere Sequenzen.

Um GST-En2 und GST bakteriell exprimieren zu können, wurden die Plasmide in B21-Zellen transformiert. Der Erfolg der Transformation wurde anschließend durch Restriktionsanalysen verifiziert. Wurde die aus transformierten B21-Bakterien isolierte

DNA mit BamHI und ClaI verdaut, erhielt ich zwei Banden auf Höhe von 6000 und 1000 bp (Abb. 30). Dies entsprach den erwarteten Fragmentgrößen von 915 bp und 5463 bp. Die erfolgreiche Transformation des pGEX-3X-Plasmids wurde durch einen Doppelverdau mit den Enzymen BamHI und HpaI und mit dem Einzelverdau durch PvuI verifiziert. Der Doppelverdau führte zu zwei Fragmenten in Höhe von 3000 bp und 1500 bp, der Einzelverdau zu zwei Banden in Höhe von 2500 und 2000 bp (BamHI-HF/HpaI: 3221 bp/1731 bp; PvuI: 2865 bp/2087 bp).

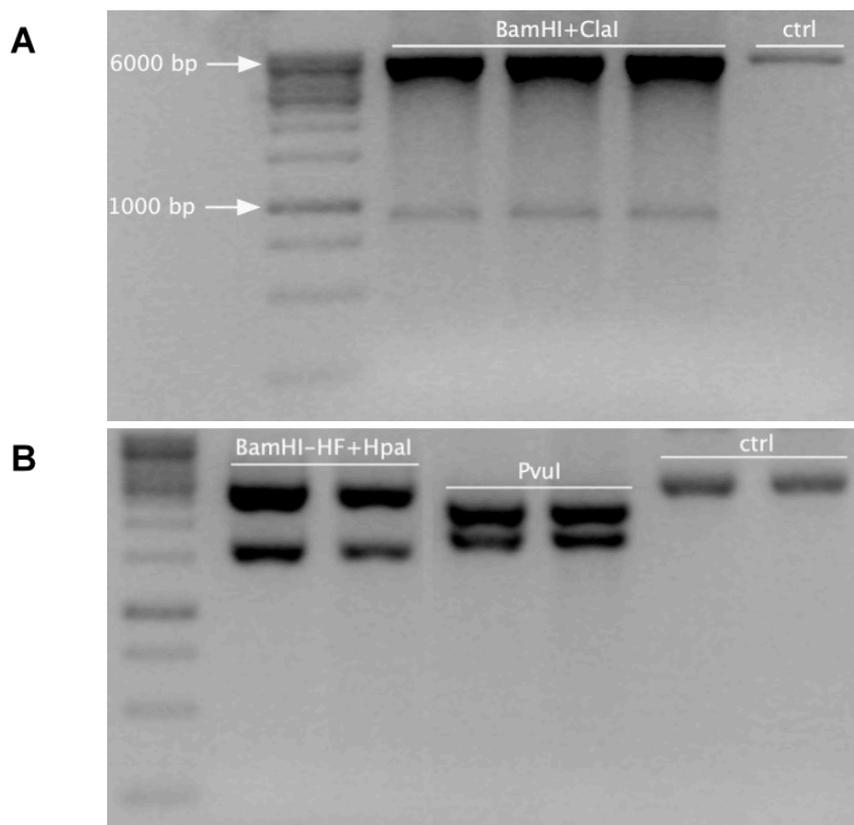


Abb. 30: Restriktionsverdau des pQE-En2-Plasmids und des pGEX-3X-Vektors. A: Verdau des pQE-En2-Plasmids mit BamHI und ClaI (ctrl: Kontrolle, d.h. unverdaute DNA). B: Verdau des pGEX-3X-Vektors mit den Enzymen BamHI-HF und HpaI und PvuI (ctrl sind unverdaute DNA Plasmide. Der 1kb DNA Größenstandard ist jeweils in der linken Spur zu sehen. bp: Basenpaare; BamHI, ClaI, PvuI: Restriktionsenzyme).

Zur Verifikation der Sequenzen wurden die Inserts und Klonierungsstellen zusätzlich von der Firma Eurofins Genomics sequenziert. Das Ergebnis dieser Sequenzierung zeigte, dass der Vektor inklusive des En2 Gens mit Ausnahme dreier Punktmutationen in der En2 Sequenz korrekt von den Bakterien übernommen und exprimiert wurde (Abb. 31). Diese

Mutationen wurden beim Vergleich der sequenzierten Sequenz mit der uns vorliegenden Sequenz des Plasmids mit dem Programm Clone Manager Professional 9 identifiziert. Die erste Punktmutation befand sich an Position 303 der kodierenden Sequenz, an der ein Cytosin gegen ein Thymin ausgetauscht worden war. Beide Varianten codierten jedoch für die Aminosäure Alanin, sodass es zu keinem Aminosäureaustausch kommt. Bei der zweiten Punktmutation an der Stelle 319 wurde ein Guanin gegen ein Adenin ausgetauscht. Dies führt zu einem Austausch von Glycin gegen Serin. Während Glycin eine neutrale Aminosäure ist, gehört Serin zu den hydroxylierten Aminosäuren, die häufig in Proteinen phosphoryliert werden können. Dieser Genaustausch liegt allerdings nicht in einem aktiven Zentrum. Zudem sind von Engrailed Proteinen nur einige wenige Phosphorylierungen bekannt, die in Datenbanken einheitlich notiert sind (Positionen 31, 32, 167, und 267 in der Maus; die Suche wurde in folgenden Datenbanken durchgeführt: PhosphoSitePlus (Hornbeck et al., 2012), EPSD (Lin et al., 2021) und qPTM (Yu et al., 2019). Von den genannten Phosphorylierungsstellen liegt nur die Phosphorylierung von Serin an Position 267 innerhalb der Homöodomäne und nur von dieser ist eine Funktion beschrieben (Hjerrild et al., 2004). Es kann also davon ausgegangen werden, dass dieser Aminosäureaustausch keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität des En2 Proteins besitzt. Die dritte Mutation liegt an Stelle 429, an der ein Alanin gegen ein Cytosin ausgetauscht wurde. Diese Mutation führt zu keinem Aminosäureaustausch. Die Aminosäure Valin bleibt erhalten. Nach Herstellung der Proteine En2-GST und GST in

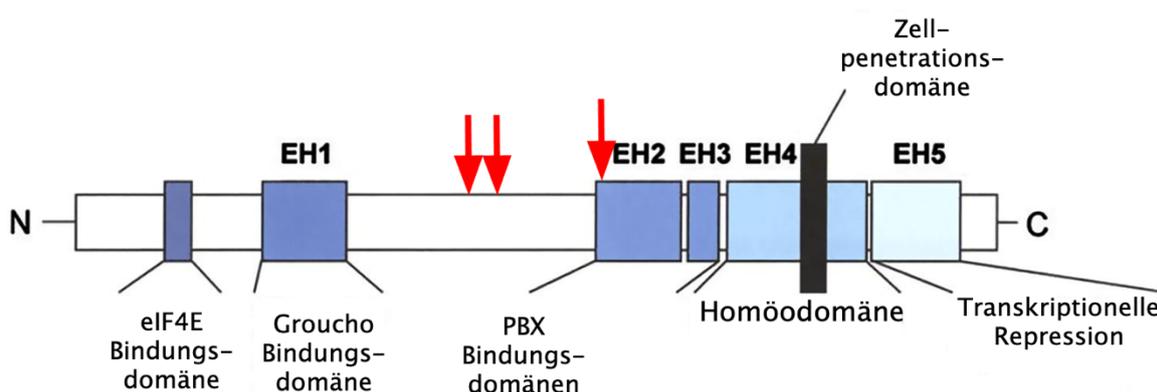


Abb. 31: Schematische Abbildung des En2 Proteins inklusive bekannter Domänen und Punktmutationen (modifiziert nach Morgan (2006), open access). Domänen sind als Boxen in unterschiedlichen Blautönen markiert. Rote Pfeile: Punktmutationen des von mir hergestellten En2; eIF4E: Elongations-Initiationsfaktor 4E; EH: Homologe Regionen; Groucho: Transkriptionsrepressor; PBX: Prä-B-Zell Leukämie Transkriptionsfaktor.

B21-Bakterien wurden die Überstände der Bakterienkulturen über Affinitätschromatographie aufgereinigt, dialysiert und die Konzentration mittels Bradford Assay bestimmt.

Zur Überprüfung der Reinheit der in BL21-Bakterien hergestellten Proteine GST-En2 und GST wurden Western Blots durchgeführt. Beim Western Blot des GST-En2 (Abb. 32B) fanden sich zwei Banden, die sich beim Vergleich mit der Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) (Abb. 32A) ungefähr im Bereich 70 und 50 kDa befanden. Hier ist davon auszugehen, dass es sich um das GST-En2 handelt. Da En2 eine Größe von ca. 33 kDa und GST von ca. 26 kDa hat, befände sich eine Verbindung beider Proteine ungefähr im Bereich der 70 kDa Bande (Long et al., 2011; Morgan et al., 2011). Bei der unteren Bande handelt es sich vermutlich um reines En2. Dafür spricht zum einen die Größe, bei der die Proteinbande zu sehen ist, und zum anderen die Anfärbbarkeit mit dem En2 Antikörper. Die Aufnahmen der Agarosegele der Restriktionsanalysen sowie der Western Blots wurden einer Bildbearbeitung mit dem Programm ImageJ unterzogen. Diese umfasste neben der Übereinanderlagerung von Marker- und Bandenbildern der Western Blots lediglich die Helligkeit und Kontrastierung im linearen Bereich. Auch alle hier gezeigten Bilder wurden ausschließlich durch lineare

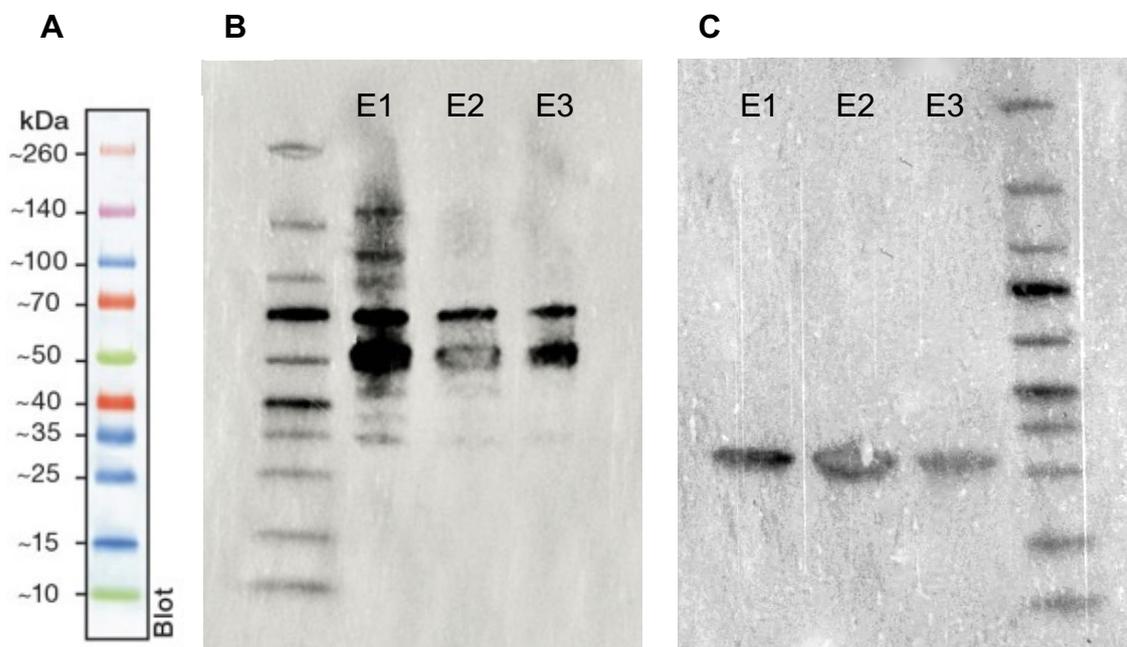


Abb. 32: Western Blot der extrahierten GST-En2 und GST Proben. **A:** Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, 2022b) **B:** Western Blot En2 **C:** Western Blot GST jeweils mit Elutionsschritten E1-3.

Adjustierungen in Helligkeit und Kontrast modifiziert, um die Darstellung im Druck zu optimieren.

Beim Western Blot des aus dem pGEX-3X in BL21 hergestellten GST (Abb. 32C) ließ sich lediglich eine Bande detektieren, die sich in der Gegenüberstellung mit oben genannter Protein Ladder etwas oberhalb der 25 kDa Bande befand. Weiterhin war ersichtlich, dass die Intensität der Bandenfärbung mit jedem der drei aufgetragenen Elutionsschritte abnahm. Da immer dasselbe Volumen an Proteinsuspension aufgetragen wurde, nahm somit auch der Proteingehalt innerhalb der Proben ab, was für eine erfolgreiche Elution sprach. Gleichzeitig zeigte sich besonders beim En2, dass das Protein bei der ersten Elution noch nicht völlig rein vorlag, sondern erst ab der zweiten Elution kontaminationsarm war.

3.3.2 Einfluss von GST-En2 auf die Dendritogenese von cerebellären PC

Zur Analyse des Einflusses von En2 auf LPS-induzierte Veränderungen in der Dendritogenese von PC in Kleinhirnschnitten wurden Schnittkulturen von neugeborenen Mäusen angelegt, diese nach 6 Tagen behandelt und die PC nach insgesamt 10 Tagen in Kultur fixiert, gefärbt und morphometrisch ausgemessen. In Abb. 33 kann man bereits einen ersten visuellen Eindruck des Effekts des LPS und En2 bekommen. GST-En2 scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die PC Morphologie zu haben, da Dendritenanzahl, deren Verzweigungen sowie die Polarität ähnlich zu nur mit GST behandelten Kontrollen erscheinen. Wie bereits im Versuch mit IL-4 und dB-cAMP sorgte eine LPS-Applikation zu einer Konversion der PC in eine unreifere Entwicklungsform. Die PC besaßen mehr, um das Soma gleichmäßig verteilte und kurze unverzweigte Dendriten. Dies schien durch eine gleichzeitige Behandlung mit GST-En2 wieder rückläufig zu sein, da sich diese Zellen in der Abbildung kaum von den nur mit GST behandelten Kontrollzellen zu unterscheiden schienen. Diese ersten Eindrücke der PC Morphologie in den LSM Bildern sollen im Folgenden durch morphomerische Messungen näher analysiert werden.

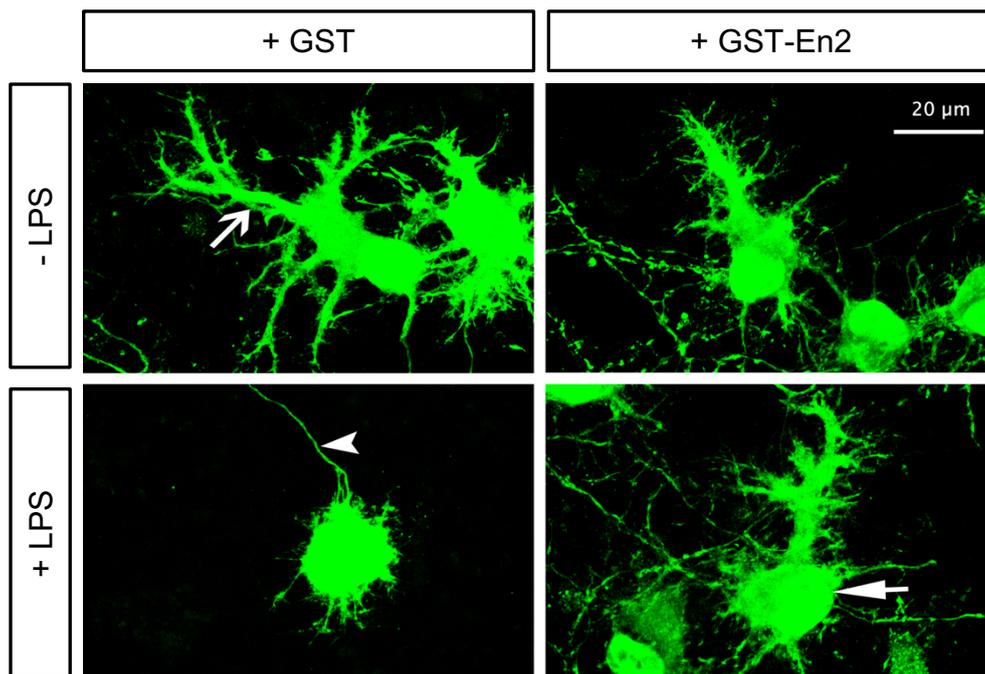


Abb. 33: Immunhistochemische Färbung von Purkinjezellen, die mit LPS und GST/GST-En2 behandelt und mit Calb1 Antikörpern gefärbt worden waren. Pfeilspitze: Axon, Pfeil mit gefüllter Spitze: Soma, Pfeil: Dendrit. GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; LPS: Lipopolysaccharid.

3.3.2.1 Einfluss von exogenem En2 auf die Purkinjezellendendritenlänge

Wurden die durchschnittlichen Dendritenlängen der unterschiedlich behandelten PC miteinander verglichen, waren die der LPS behandelten Zellen signifikant kürzer als der Kontrollzellen oder der GST behandelten Zellen (siehe Abb. 34). Dieser LPS-induzierte Effekt auf das Dendritenwachstum war durch eine gleichzeitige Behandlung mit En2 nicht mehr sichtbar. Dies würde bedeuten, dass En2 im Sinne einer LPS-induzierten Entzündungsreaktion diese Effekte zu unterdrücken vermochte.

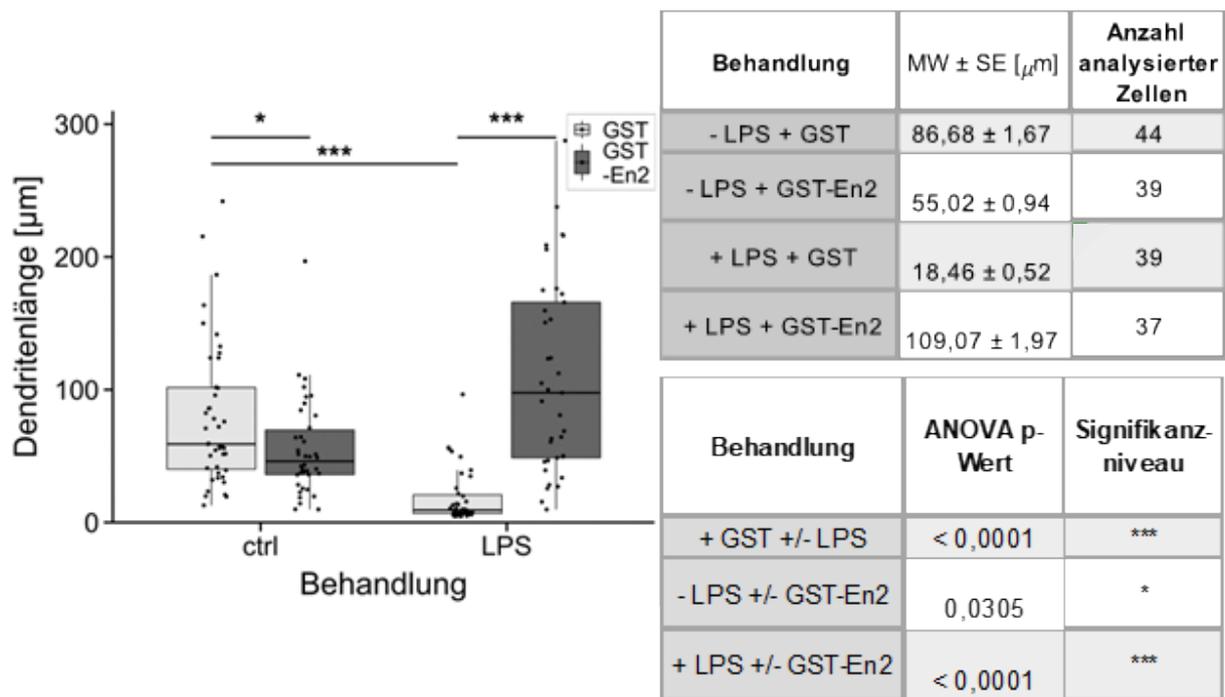


Abb. 34: Darstellung der Dendritenlänge von PC in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden an DIV 6 mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit GST-En2 oder GST (GST, GST-En2) behandelt. Die PC Morphologie wurde an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; LPS: Lipopolysaccharid.

3.3.2.2 En2 inhibiert die durch LPS-induzierte Zunahme der Dendritenzahl

In den lediglich mit GST behandelten Kontrollen zeigten sich ca. 4 Filamente pro Zelle. Wurden die PC mit LPS behandelt, lagen zwar durchschnittlich 5,5 Filamente vor. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 35). Es sei an dieser Stelle an die Ergebnisse von Abbildung 26 erinnert. Hier konnten ähnliche Dendritenzahlen gemessen werden. Die Unterschiede lagen aber außerhalb des Konfidenzintervalls von 95%. Insofern kann festgehalten werden, dass sich die Ergebnisse durchaus gleichen, Unterschiede allerdings nahe am 95% Konfidenzintervall liegen. Vergleicht man nun die GST-En2 behandelten mit den LPS und GST-En2 behandelten PC, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Filamente. Somit führt eine LPS-Applikation zu einer Verminderung der Dendritenlänge und gleichzeitig zu einer leichten Verschiebung der Dendriten-

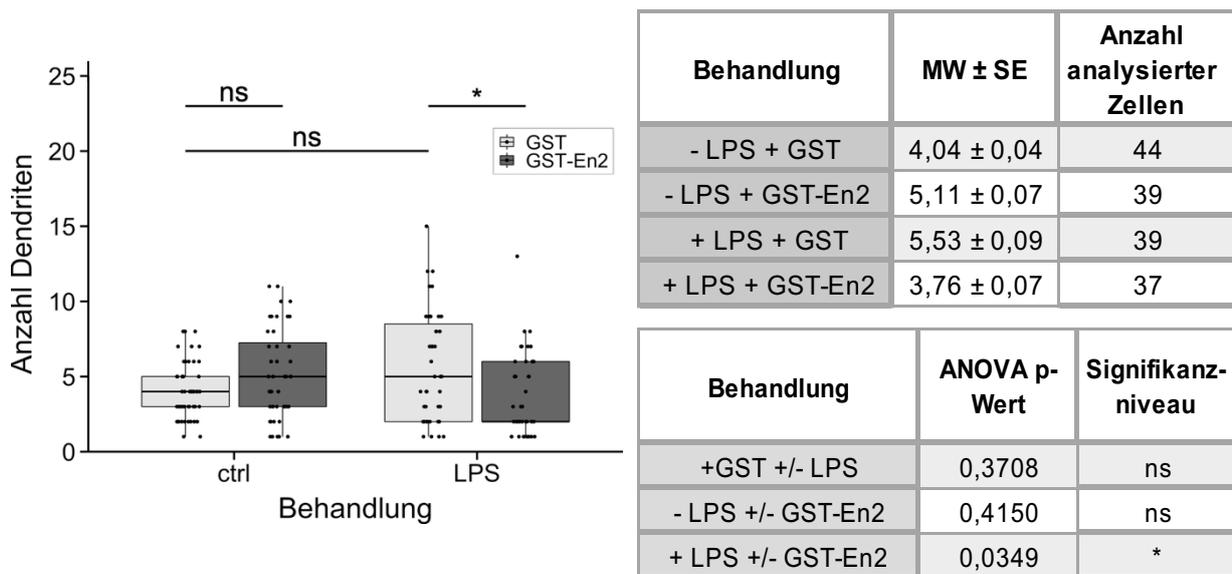


Abb. 35: Darstellung der Dendritenanzahl pro PC in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden an DIV 6 mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit GST-En2 oder GST (GST, GST-En2) behandelt. Die PC Morphologie wurde an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; LPS: Lipopolysaccharid.

zahl. Die PC, die gleichzeitig mit GST-En2 behandelt wurden, sind von Kontrollzellen nicht zu unterscheiden. En2 scheint somit einen antiinflammatorischen Effekt auszuüben.

3.3.2.3 En2 inhibiert die LPS-induzierte Abnahme des Verzweigungsgrads von Dendriten

Ähnlich der Dendritenlänge war der Verzweigungsgrad der Dendriten nach LPS-Behandlung und nach LPS- und GST-En2-Behandlung deutlich unterschiedlich (Abb. 36). Wurden die PC Dendriten von LPS behandelten Zellen mit Kontrollen ohne LPS verglichen, war eine hoch signifikante Reduktion im Verzweigungsgrad zu messen. Wurde gleichzeitig mit GST-En2 behandelt, war die Anzahl der Verzweigungspunkte der Dendriten wieder vergleichbar zu den Kontrollzellen. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass En2 einen LPS-induzierten Effekt auf die Dendritogenese von

PC aufheben kann. Während LPS die Reifung der Dendriten unterdrückt, scheint En2 diesen Reifungsprozess wieder zu steigern. Dieser Effekt ist nicht zu sehen, wenn keine LPS-Behandlung vorgenommen wurde. Der En2 Effekt scheint also mit der Entzündungsreaktion assoziiert zu sein.

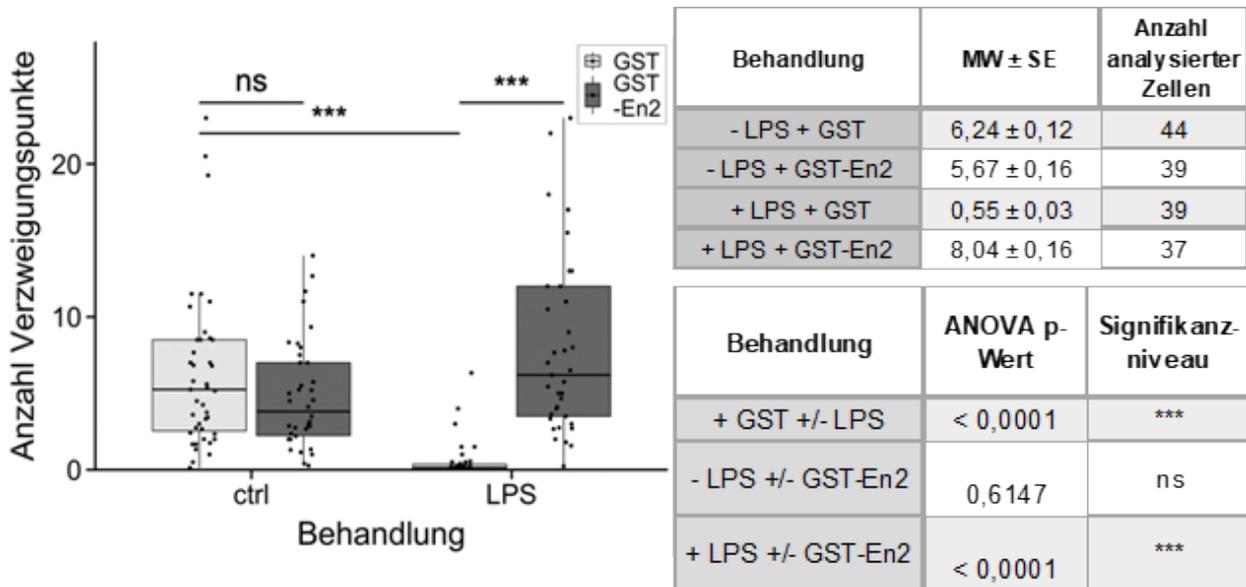


Abb. 36: Darstellung der Dendritenverzweigungspunkte von PC in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden an DIV 6 mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit GST-En2 oder GST (GST, GST-En2) behandelt. Die PC Morphologie wurde an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; LPS: Lipopolysaccharid.

3.3.2.4 En2 inhibiert den LPS-induzierten Polaritätsverlust von Purkinjezellen

Auch in diesem Versuch wurde die Polarität der behandelten PC mittels der Dendritenstartpunkt-Distanzen zwischen dem Stammdendriten und weiteren vom Soma abgehenden Dendriten untersucht. In PC ohne Behandlung waren sehr viele Zellen mit einem Stammdendriten und kleineren Ausläufern vertreten. Wurden die PC mit LPS behandelt, waren von diesen in eine Richtung ausgerichteten Dendriten deutlich weniger Zellen vorhanden. Viele hatten multiple Fortsätze in alle Richtungen. Wurden die PC neben dem LPS mit En2-GST behandelt, waren wiederum deutlich mehr Zellen

vorhanden, die bevorzugt eine Dendritenrichtung ausgebildet hatten. Entsprechend führte eine LPS-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Dendritendistanz im Sinne einer Abnahme der Zellpolarität. Diese Abnahme der Polarität ließ sich durch eine gleichzeitige Behandlung mit GST-En2 verhindern. Allerdings sorgte auch eine Behandlung nur mit GST-En2 für eine signifikant kürzere Distanz zwischen den Dendritenstartpunkten und somit zu einer Abnahme der Zellpolarität (Abb. 37). LPS hingegen hatte keinen Effekt in Bezug auf den Winkel der Dendriten.

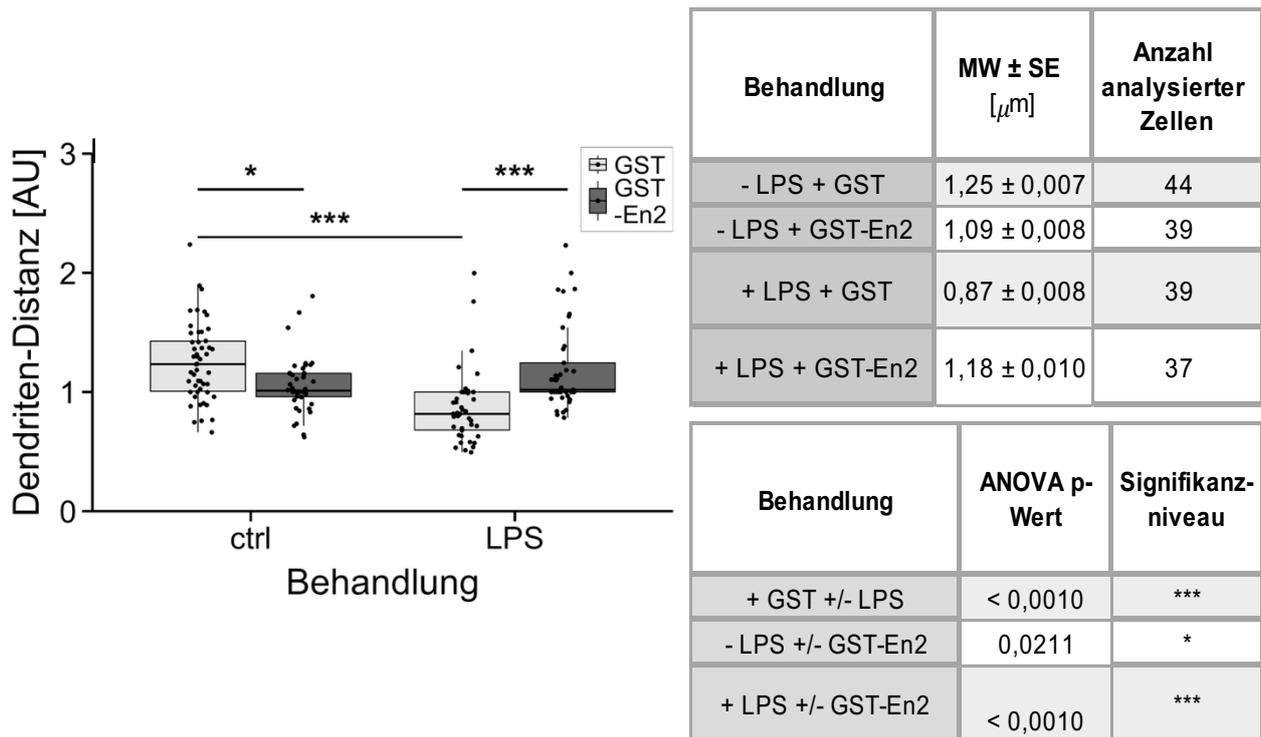


Abb. 37: Darstellung Abstände zwischen den Dendritenstartpunkten in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung. Schnittkulturen vom Kleinhirn neugeborener Mäuse wurden an DIV 6 mit und ohne LPS (ctrl = Kontrolle ohne LPS; LPS: mit LPS) und mit GST-En2 oder GST (GST, GST-En2) behandelt. Die PC Morphologie wurde an DIV 10 analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) mit deren Standardfehler (SE) sowie die dazu analysierten Zellzahlen. Für die statistische Auswertung wurden logarithmierte Daten verwendet. (ANOVA; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; LPS: Lipopolysaccharid.

3.3.3 Einfluss von GST-En2 auf Astrocyten, Oligodendrocyten und Mikroglia

Da En2 einen dem LPS entgegenwirkenden Effekt verursachte, stellte sich die Frage, welche Mechanismen an der En2 Wirkung beteiligt sind. Oben wurde bereits gezeigt, dass

die Mikrogliazellen wichtige Mediatoren von inflammatorischen Prozessen sind. Insofern wurden als erstes diese Gliazellen in den LPS und En2 behandelten Kulturen verglichen. Ähnlich wie auch bei der Behandlung muriner Schnittkulturen mit LPS und PLX3397 ließ sich hier bei der Applikation von LPS mit En2 oder GST kein Unterschied zwischen den vier Behandlungsgruppen bezüglich der Astrocytenfärbung mit GFAP bzw. der reifen Oligodendrocytenfärbung mit MBP feststellen (Daten sind nicht gezeigt). Erneut zeigte sich in der GFAP-Färbung ein dichtes Fasergeflecht, während bei der MBP-Färbung die des Hintergrunds überwog.

Bei der Färbung der P0 Kleinhirnschnittkulturen mit Olig-2 zeigte sich eine Abnahme der unreifen Oligodendrocyten bei Behandlung mit LPS an DIV 6 im Vergleich zu den lediglich mit GST behandelten Kontrollen. Dieser Effekt ließ sich durch eine gleichzeitige Applikation von GST-En2 nicht inhibieren (Abb. 38). En2 allein schien jedoch zu einem Anstieg des Olig-2 Signals zu führen, sodass hier mehr unreife Oligodendrocyten vorhanden waren.

Bezüglich Iba1 zeigte sich eine Zunahme der Mikroglia bei Zugabe von LPS, was durch eine parallele Behandlung mit En2 unterdrückt wurde. Das Protein alleine sorgte jedoch

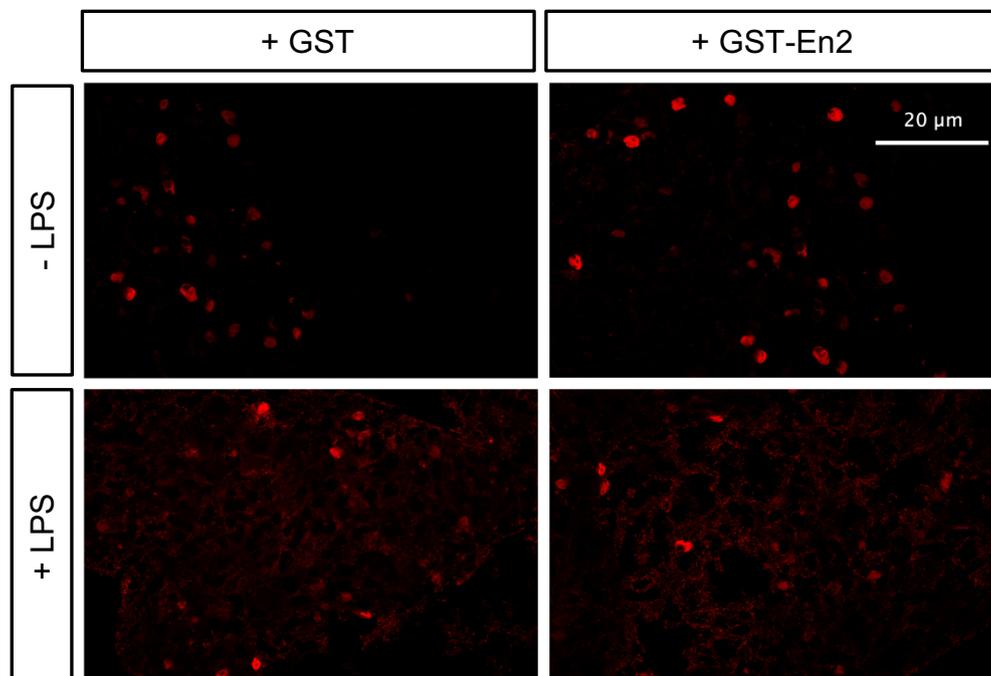


Abb. 38: Immunhistochemische Färbungen von mit LPS und GST/GST-En2 behandelten unreifen Oligodendrocyten gegen Olig-2. GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; LPS: Lipopolysaccharid; Olig-2: Oligodendrocytentranskriptionsfaktor 2.

für keine Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Somit scheint dieses Homöoboxprotein die Proliferation der Mikroglia zu verhindern (Abb. 39).

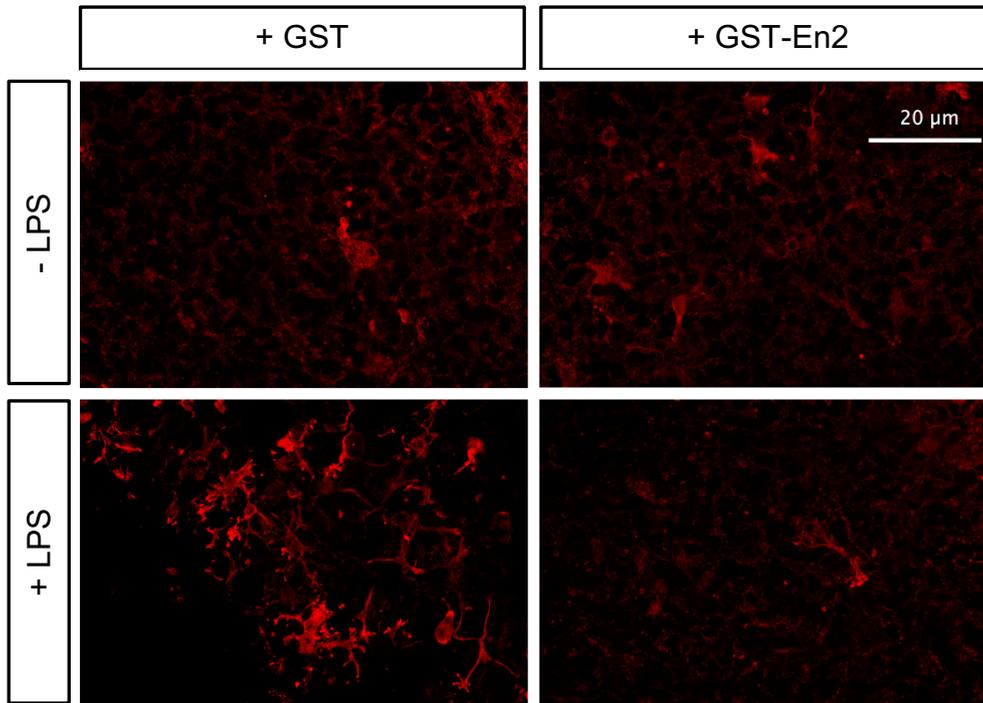


Abb. 39: Immunhistochemische Färbungen von mit LPS und GST/GST-En2 behandelten Mikroglia gegen Iba1. GST: Glutathion-S-Transferase; GST-En2: Glutathion-S-Transferase-Engrailed-2; Iba1: Ionisiertes Calciumbindendes Adaptermolekül 1; LPS: Lipopolysaccharid.

4. Diskussion

Entzündungsprozesse während der Schwangerschaft werden mit dem Auftreten von neuropsychiatrischen Erkrankungen assoziiert. Meist werden bei Untersuchungen zum Ursache-Wirkungsprinzip Vorderhirnareale untersucht, da Veränderungen in diesen Arealen ursächlich für das Auftreten von Schizophrenien, Depressionen oder dem autistischen Wirkungsspektrum angesehen werden. Morphologische und funktionelle Studien haben aber seit längerem auch das Kleinhirn in den Fokus kognitiver Prozesse gerückt, bisher in Bezug auf die autistischen Erscheinungsformen. Bisher wurde aber noch nicht experimentell gezeigt, dass entzündliche Reaktionen die Differenzierung cerebellärer Neurone beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass Schnittkulturen von neugeborenen Mäusen ein geeignetes Modell für die Untersuchung von Entzündungsreaktionen auf die Purkinjezeldifferenzierung darstellen. LPS zeigte einen entwicklungsabhängigen Effekt auf die Dendritogenese dieser Neurone. Dieser Effekt wurde zumindest teilweise durch Mikroglia vermittelt, da er sich durch PLX3397, einem Inhibitor der Mikroglia proliferation, verhindern ließ. Die LPS-induzierte Hemmung der PC Differenzierung ließ sich sowohl mit IL-4, das eine Konversion von proinflammatorischen M1 in antiinflammatorische M2a Mikroglia induzierte, als auch mittels dB-cAMP, das die Ausschüttung des proinflammatorischen TNF α durch M1 Mikroglia reduzierte, nicht nur reduzieren, sondern komplett aufheben. Engrailed, ein Homöodomänenprotein mit parakrinen Funktionen, wirkte ebenfalls antiinflammatorisch und inhibierte LPS-induzierte differenzierungshemmende Effekte, mutmaßlich über die Regulation der Mikroglia-Proliferationsaktivität. Mikrogliazellen sind folglich auch eine, wenn nicht sogar die primäre Ursache inflammatorischer neuromodulatorischer Prozesse und potentiell Ziel antiinflammatorischer Signale.

4.1 Schnittkulturen als Modellsystem zur Untersuchung inflammatorischer Reaktionen auf die Dendritogenese von Purkinjezellen

Schnittkulturen sind seit ihrer Entwicklung durch Gähwiler ein gängiges und probates Mittel, um die Dendritogenese von Neuronen zu untersuchen (Gähwiler, 1981). In diesen

Schnittkulturen wachsen die Neurone in einer zellulären Umgebung, die den nativen Zuständen zumindest ähnlich ist. PC sind in Schnittkulturen über 3 Wochen vital und durchlaufen alle *in vivo* bekannten Entwicklungsstadien. Die Verschaltung bis auf die ultrastrukturelle Ebene ist mit der *in vivo* Situation vergleichbar (Jaeger et al., 1988) und auch grundlegende physiologische Eigenschaften bleiben über mindestens 2 Wochen erhalten (Llano et al., 1988). Neben den *in vitro* ähnlich ablaufenden Aspekten der PC Differenzierung haben Schnittkulturen den Vorteil, dass die darin wachsenden Zellen pharmakologisch manipuliert werden können.

Ein großer Unterschied zur physiologischen Situation ist, dass afferente und efferente Fasern, die in das Kleinhirn ziehen und aus dem Kleinhirn kommen, bei der Präparation durchtrennt werden. Es ist bekannt, dass synaptische Kommunikation das Überleben und die Differenzierung von Neuronen beeinflusst (Strata et al., 1997). Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Differenzierung von PC im Schnittkultursystem durch die Denervation nicht beeinflusst wird. Allerdings wurden die hier durchgeführten Behandlungen immer an einer Serie von Schnittkulturen durchgeführt, so dass technische Variabilitäten wie Präparationsdauer oder Medienunterschiede minimiert werden konnten. Durch das Wachstum der PC im Gewebeverband ist die Identifizierung der Zellen nur nach spezifischer Färbung möglich. Mit der Heterogenität der Schnitte und der Verteilung der PC im Gewebeverband ist eine hohe Variabilität verbunden, die von Experiment zu Experiment deutliche Unterschiede hervorrufen kann. Dies war in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich der Kontrollzellen in der PLX-Versuchsreihe mit denen der IL-4-Versuchsreihe zu beobachten. In beiden Kontrollgruppen wurde nur das Medium gewechselt, bei den PLX Versuchsreihe an den Tagen 2, 3, 6 und 8, bei der IL-4 Versuchsreihe an den Tagen 2, 4, 6 und 8. Trotz der vergleichbaren zeitlichen Abfolge des Mediumwechsels waren Unterschiede in der Dendritenlänge sichtbar und morphometrisch nachweisbar. Ursache kann sein, dass durch den 2-3 tägigen partiellen Mediumwechsel essentielle neurotrophe oder wachstumsinhibierende sezernierte Faktoren entfernt wurden. Bei Schnittkulturen muss also darauf geachtet werden, dass das Behandlungsprotokoll zwischen Kontroll- und behandelten Zellen exakt übereinstimmt. Innerhalb einer Versuchsgruppe sind aber Vergleiche durchaus möglich, da Heterogenitäten durch die Adaptation der Fallzahlen ausgeglichen werden können.

Ein weiteres Spezifikum der Schnittkulturen besteht in der Zerteilung des Gewebes in einzelne Schnitte. Dies bewirkt in Kultur eine enorme Gliazellproliferation, die *in vivo* nicht zu erwarten ist. Auch hier kann festgehalten werden, dass alle Kulturen, behandelt oder nicht, derselben Prozedur unterzogen waren. Ich ließ in der Arbeit auch in allen Versuchsreihen Kontrollfärbungen gegen Astrocyten mitlaufen, sodass zumindest grobe Änderungen sichtbar gemacht werden konnten.

Ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass die Ausrichtung der Schnitte in sagittaler Richtung leichten Schwankungen unterworfen gewesen sein mag. Dies kann zur Folge haben, dass Fortsätze von PC, die sagittal ausgerichtet sind, teilweise durchtrennt wurden, was einen unmittelbaren Einfluss auf die Analyse der PC gehabt hätte. Dieser Störfaktor erscheint mir aber aus mehreren Gründen nicht für die Analyse maßgeblich zu sein. Erstens werden bei der Anfertigung der Schnitte immer mehrere Schnitte aus einem Kleinhirn gewonnen, die unterschiedlich behandelt wurden, und zweitens mussten für jedes Experiment mehrere Schnittserien angefertigt werden, sodass der Schnittwinkel in allen Behandlungsgruppen leicht unterschiedlich war. Trotzdem waren die Messungen in den verschiedenen Durchläufen vergleichbar.

Bisherige Arbeiten, die sich mit dem Thema der Neuroinflammation im Gehirn beschäftigten, nutzen größtenteils Einzelzellkulturen oder extrahierten einzelne Zellen aus Hirnschnitten (Goshi et al. (2020), Lively und Schlichter (2018), Parkhust et al. (2013), Vergara et al. (2019) oder Yuan et al., (2017)). Diese dissoziierten Kultursysteme sind ebenfalls pharmakologisch manipulierbar und Einzelzellen sind aufgrund der Einzelzellsuspension leichter zu identifizieren. Die Zellen werden aber bei der Präparation aus dem normalen Zellverband herausgelöst, sodass die Einzelzellen nicht mehr im physiologischen Zellverband integriert sind. Dies ist aus oben genannten Gründen ein maßgeblicher Nachteil des dissoziierten Zellkultursystems.

Deswegen nutzten andere Autoren Mikrotom- bzw. Vibratomschnitte (Nakayama et al. (2018), Rice et al. (2015), Xie et al. (2017)). Diese Schnitte wurden aber nicht in Kultur gehalten, sodass sie zwar durch schnellere Fixierung nach der Gewebeentnahme dem *in vivo* Zustand näher liegen, allerdings keine Beobachtungen an Zellen nach Behandlung mit Pharmaka durch die nicht überwindbare Blut-Hirn-Schranke am intakten Organismus erlauben. Entsprechende Experimente am Tier benötigen wiederum aufwändige

Vorbereitungen wie die Erstellung von Tierversuchsanträgen oder die kostenintensive Versorgung von Mäusen, sodass das hier vorgeschlagene Modell *in vivo* nahe, manipulierbar, analysierbar und leichter handhabbar ist.

Schnittkulturen, gerade auch cerebellären Ursprungs, wurden bisher vor allem zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen eingesetzt. So wurden sie z.B. zur Untersuchung von Demyelinisierungsprozessen herangezogen (Baksmeier et al., 2021; Mekhaeil et al., 2023; Pashenkov et al., 2006; Toth et al., 2021), da hier die Neuron-Glia-Interaktion eine wichtige Komponente der Myelinisierung darstellt. Aber auch für die Wirkung von inflammatorischen Signalen stellen Schnittkulturen ein gängiges System dar (Cheng et al., 2024; Gentile et al., 2018; Rodgers et al., 2015). So wurden Gewebekulturen genutzt, um Zell-Zell-Interaktionen sichtbar zu machen, überwiegend anhand von Antikörperfärbungen verschiedener Zellproteine (Cheng et al., 2024) oder anhand quantitativer Analysen der Zellzahlen (Gutiérrez-Franco et al., 2017). Verwendet wurden meist Schnittkulturen aus teils mehrere Wochen alten Mäusen oder Ratten wie bei Mekhaeil et al. (2023). Die in meiner Arbeit gewählte Methode von cerebellären Schnittkulturen von deutlich jüngeren P0 Mäusen und die sich daran anschließende morphologische Analyse von PC stellt somit eine neue Analysevariante an einem bereits etablierten System dar.

4.2 Entwicklungsabhängige Effekte der LPS-Behandlung auf die neuronale Purkinjzellentwicklung

Ein zunächst einmal unerwartetes Ergebnis meiner Arbeiten war, dass eine LPS-Behandlung der PC in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe zu unterschiedlichen Effekten auf die Purkinjzellreifung im Kleinhirn führte. Während eine LPS-Behandlung an DIV 3 zu einer Wachstumsinduktion des Dendritenbaums der PC führte mit verlängerten Dendriten, weniger somatischen, dafür polarer ausgerichteten Dendriten und mehr Verzweigungen der Dendritenbäume, führte eine LPS-Behandlung an DIV 6 zu einer Hemmung des Wachstums mit mehr somatischen Dendriten und weniger Verzweigungen. An cerebellären Schnittkulturen von P6 und P8 Mäusen konnte in der Arbeit von Bahaaeldin et al. (2024) ebenfalls eine verringerte Gesamtdendritenlänge

sowie weniger Verzweigungspunkte als Folge der LPS-Behandlung gezeigt werden, was konsistent mit meinen Beobachtungen an P0 Schnittkulturen war, die an DIV 6 mit LPS behandelt worden waren. LPS scheint also je nach Reifungszustand der PC unterschiedliche Effekte auszuüben.

In der Literatur wird Neuroinflammation als einer der Hauptauslöser für die Degeneration verschiedenster Neuronentypen sowie für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen verstanden. LPS führt über den TLR4-Rezeptor zu einer Aktivierung proinflammatorischer Gene und einer Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine wie TNF α oder IL-1 β (Zughaier et al., 2005). Ebenso kann LPS über die Aktivierung der Caspase-3 für eine Apoptose von Neuronen sorgen (Goshi et al., 2020). Entsprechend beobachtete man neben strukturellen Auswirkungen auf Gehirnareale auch kognitive Veränderungen und Änderungen im Verhalten von Mäusen. Dabei kam es zu beeinträchtigten Lern- und Gedächtnisfunktionen, Sozialverhalten sowie motorischen Defiziten (Dantzer, 2004; Gupta und Kaur, 2019). Für einen solchen entwicklungsverzögernden Effekt spricht, dass LPS in älteren murinen Jungtieren und sogar adulten Mäusen im Sinne eines inflammatorischen Mediators zu einer abnormen PC Morphologie mit verkürzten, verdickten und unreiferen Dendriten führte (Zhang et al., 2019). Eine weitere Studie zeigte, dass der perinatale LPS-Stimulus durch Zunahme des oxidativen Stresses zu einer geringeren Verzweigung des Dendritenbaumes in Ratten führte (Xu et al., 2013). Ein wachstumsinhibierender Effekt von LPS erscheint also basierend auf Literaturdaten durchaus nachvollziehbar.

Wie lassen sich also meine Ergebnisse eines wachstumsfördernden Einflusses von LPS bei jüngeren PC interpretieren? Wie einleitend beschrieben, bilden sich früh postnatal viele kurze sternförmig um das Soma verteilte Dendriten aus. Dieser multipolare Zelltyp konvertiert bis P7 zu einem bipolaren Purkinjezelltyp mit einem Hauptstammdendriten mit hoch verzweigten Verästelungen und einem Axon (Armengol und Sotelo, 1991; Dusart und Flamant, 2012). Eine vermehrte Anzahl an Stammdendriten, die einer PC zugewiesen werden kann, könnte also als Verbleib der Zellen in einem unreiferen Stadium interpretiert werden. Entsprechend wäre eine geringere Anzahl an Dendriten pro Soma in älteren Zellen mit einem reiferen Entwicklungsstadium der PC interpretierbar.

Entwicklungsabhängige Effekte von LPS konnten auch an Rattenneuronen gezeigt werden. Während ein LPS-Stimulus zu einem verkürzten Dendritenbaum in der zweiten postnatalen Woche führt, zeigt LPS keine Wirkung auf Neurone in der ersten Postnatalwoche (Hoffman et al., 2016). Entsprechend unterscheiden sich die PC an den Tagen 3 und 6 auch in ihrem molekularen Muster (Fujishima et al., 2018; Toyoda et al., 2014). Es ist durchaus vorstellbar, dass Neurone bei negativen Einflüssen gerade in jungen Stadien versuchen, kompensatorisch Wachstumsprozesse zu induzieren und zu verstärken. Zum Beispiel führen Entzündungsreaktionen in der Retina zu einem verstärkten neuronalen Überleben und Axonregeneration (Au und Ma, 2022). Ebenso wurde ein verstärktes neuronales corticales Überleben in Mäusen nach TNF-Behandlung beobachtet (Abd-El-Basset et al., 2021). Die neuronale Plastizität ist in diesem Alter noch deutlich höher als bei Erwachsenen, was die Remodellierung von Dendriten, das Dornfortsatzwachstum, das axonale Wachstum, die erneute Myelinisierung und Neurogenese anregt (Qiao et al., 2023).

Letztendlich stimmen die von mir postulierten entwicklungsabhängigen Effekte auch mit klinischen Beobachtungen überein. Bei Patienten mit ASD konnte beobachtet werden, dass unmittelbar postnatal das Hirnvolumen zunahm, anschließend aber besonders im Frontal- und Kleinhirn abnahm (Courchesne et al., 2001; Uddin et al., 2017; Verhoeven et al., 2010). ASD tritt vermehrt nach Inflammation auf, sodass eine Parallele zur LPS-Behandlung gezogen werden könnte (Ozaki et al., 2020; Shi et al., 2009). Auch auf Zellebene zeigen sich deutliche Veränderungen der Zellmorphologie bei ASD. So zeigte sich postmortem eine Reduktion der PC Zellzahl sowie deren Größe, was die Volumenabnahme erklären könnte (Fatemi et al., 2002; Hampson und Blatt, 2015). Ebenso zeigten sich Veränderungen und Größenreduktion im Axonwachstum und den Dendriten diverser Zelltypen im ASD Mausmodell nicht nur im Cerebellum, sondern auch in anderen Hirnregionen wie dem Hippocampus (Alexander et al., 2007; Bahry et al., 2021; Cloarec et al., 2019; Ellegood et al., 2011;).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die entwicklungsabhängige Reaktivität der PC auf LPS sowohl mit physiologischen aber auch mit pathologischen Zuständen erklärt werden kann. Welche genaue Ursache dieser Beobachtung zugrunde

liegt, ist noch nicht abschließend geklärt. Mikrogliazellen stellen aber interessante Mediatoren dar, wie im nächsten Kapitel diskutiert werden soll.

4.3 Mikroglial vermittelte Effekte der LPS-Behandlung auf die Differenzierung cerebellärer Purkinjezellen

An die zuvor erläuterten Effekte des LPS auf die PC Reifung schließt sich die Frage an, durch welchen Zelltyp eine solche Neuroinflammation vermittelt wird. In einer Arbeit von Bahaaeldin et al. (2024) konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des TNF α -Rezeptors in cerebellären Schnittkulturen die inhibitorischen Effekte einer LPS-Applikation auf PC von P6 Mäusen zumindest teilweise aufheben konnte. TNF α wird von verschiedenen Zellen sezerniert, darunter Astrocyten und Mikroglia im Gehirn (Abd-EI-Basset et al., 2021). Allerdings zeigte sich bereits im Versuch mit Astrocyten, dass eine alleinige Zugabe von LPS ohne Anwesenheit von Mikroglia zu keinem Effekt führte, der zu erwartende inhibitorische Effekt sich aber bei LPS-Gabe in gleichzeitiger Kultur von Astrocyten und Mikroglia ergab (Goshi et al., 2020). Somit scheinen Astrocyten alleine nicht den wachstumsinhibierenden Effekt zu vermitteln.

In meiner Arbeit konnte ich nun zeigen, dass der Mikroglia proliferationshemmer PLX3397 die Mikrogliazahlen in Schnittkulturen unterdrückte und LPS-induzierte Dendritendifferenzierungseffekte aufhob. Diese Zu- und Abnahme der Mikrogliazahl ist konsistent mit Daten aus der Literatur. Wurden nach ischämischem Insult Mikrogliazellen ausgezählt, nahm die Zahl der Mikrogliazellen kontinuierlich zu (Zamanian et al., 2012). Neben den Mikrogliazellen könnten auch andere dendritische Zellen als Produzenten inflammatorischer Substanzen fungieren. Dies erscheint allerdings unwahrscheinlich, da in Schnittkulturen kein extracerebelläres Gewebe vorhanden ist, aus dem dendritische Zellen nach der Geburt normalerweise einwandern (Pashenkov et al., 2006).

Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass PLX3397 in DMSO gelöst werden muss. DMSO selbst hat einen geringen Effekt auf cerebelläre PC (M. Bahaaeldin, Dissertation in Arbeit) und kann immunmodulatorisch über TNF α -Sekretion fungieren (De Abreu Costa et al., 2017; Javaid et al., 2020; Zhang et al., 2017). Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurde hier einerseits eine 100-fach geringere Konzentration gewählt als bei Mohammed Bahaaeldin. Andererseits hatte auch eine alleinige Behandlung der

PC mit PLX keinerlei fördernde oder hemmende Auswirkung auf deren Morphologie, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass DMSO, wenn überhaupt, nur einen geringen Effekt haben konnte.

PLX3397 ist ein kompetitiver Antagonist des CSF1-Rezeptors, der wichtig für das Überleben und die Proliferation der Mikroglia ist (Coleman et al., 2020). PLX3397 besitzt aber auch eine, wenn auch geringere Affinität zu den Rezeptoren Kit und Flt3, die von PC exprimiert werden.

Der Kit-Ligand kann über den Kit-Rezeptor die synaptische Aktivität von PC inhibieren (Zaman et al., 2024). Die synaptische Aktivität ist ein wichtiger Faktor, der das Überleben von PC fördert. Wird die synaptische Übertragung blockiert, könnte dies einen negativen Einfluss auf die Dendritogenese ausüben. In diesem Fall würden wir also einen zusätzlich zum LPS-Effekt negativen Effekt erwarten und keinen, wie hier gezeigt, antiinflammatorischen Effekt. Der zweite Rezeptor, Flt3, wurde nur intrazellulär gefunden (Çakmak-Görür et al., 2019), sodass der Rezeptor durch das extrazellulär gegebene PLX nicht adressiert werden kann. Zudem ist die Affinität des PLX zum Flt3 Rezeptor um das 10-fache niedriger. Ich gehe also davon aus, dass PLX3397 spezifisch auf den CSF1-R wirkt und somit Mikroglia beeinflusst. Betrachtet man die Expression des Rezeptors im Kleinhirn, muss festgehalten werden, dass der Rezeptor auch von cerebellären Neuronen exprimiert wird, vornehmlich von PC (Wang et al., 1999). Diese Expression nimmt bei LPS-Stimulation zu. Insofern wäre es möglich, dass PLX auch direkt auf PC wirkt und die Dendritogenese beeinflusst. Mehrere folgende Argumente lassen diese Hypothese allerdings als unwahrscheinlich erscheinen.

Wie zuvor bereits angedeutet wurde, zeigte sich, dass Mikroglia im Sinne einer pro- bzw. antiinflammatorischen Aktivierung sowohl neurotoxisch als auch neuroprotektiv und entwicklungsfördernd wirken können. Deren neurotoxische Rolle wurde bereits durch die Zunahme der Dendritenzahl, der Abnahme der Dendritenlänge sowie deren Verzweigungsgrad bei Behandlung der P0 Schnittkulturen mit LPS an DIV 6 deutlich. Analog dazu wurde in der Literatur beschrieben, dass durch Hypoxie aktivierte Mikroglia in P1 Ratten mehr proinflammatorische Cytokine sezernierten und es zu einem verstärkten Zelltod der PC kam (Kaur et al., 2014). Dieser Entzündungszustand wurde von mir durch LPS induziert. Es ist bekannt, dass LPS proinflammatorisch über die

Caspase 3 wirkt und so zur vermehrten Apoptose führt (Goshi et al., 2020; Silva et al., 2021). Wurden Mikroglia also im Rahmen der Kleinhirnentwicklung nun gehemmt, beobachtete man eine Reduktion der Apoptose der PC (Marín-Teva et al., 2004). Damit konsistent zeigte eine Entzündungsreaktion in Cryostatschnitten ein geringeres Calbindinsignal, was als vermehrter PC Zelltod interpretiert wurde (Hong et al., 2020).

Diese als Reaktion auf LPS proinflammatorische Rolle der Mikroglia wird durch Aktivierung des M1 Subtyps induziert (Orihuela et al., 2016). Auch eine gezielte anderweitige M1 Aktivierung durch IL-6 bei adulten Mäusen sorgt für eine verringerte Anzahl an PC und eine zusätzliche Dendritenverkürzung sowie eine Abnahme des Verzweigungsgrads ähnlich meiner Beobachtungen (Childs et al., 2021).

Die neuroprotektive Rolle der Mikroglia konnte ich auch dadurch zeigen, dass ich mit Hilfe von IL-4 die Ausprägung des M2a Phänotyps der Mikroglia forcierte. Dies hob die neurotoxischen Effekte des LPS auf, was konsistent mit Daten der Literatur ist (Kong et al., 2020; Li et al., 2019; Zhang et al., 2017). IL-4 stimuliert die Expression von TREM2 (Triggering Receptor expressed on Myeloid Cells 2), dem typischen Marker antiinflammatorischer M2a Mikroglia. Diesem Marker kommt eine besondere Rolle im Überleben von Mikrogliazellen zu (Yi et al., 2020; Zheng et al., 2017) und ist für die Wundheilung und Zellproliferation zuständig (Gensel und Zhang, 2015), indem es die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine hemmt (Lively und Schlichter, 2018). Daher konnte die Cytotoxizität einer LPS-Behandlung verringert werden (Li et al., 2019; Liu et al., 2020; Wu et al., 2017).

Es ist zu vermuten, dass das Zusammenspiel von TREM2 und LPS-induzierten proinflammatorischen Mikroglia streng reguliert wird. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass drei Tage nach der Auslösung der Entzündung (DIV 6) die Anzahl an Mikrogliazellen reaktiv zunahm. Somit lässt sich mutmaßen, dass auch die Anzahl der M2a Mikroglia zunahm (Yi et al., 2020) bzw. diese Zunahme maßgeblich durch die Zunahme der TREM2-positiven M2a Mikroglia bestimmt ist. Tatsächlich konnte ich dies durch eine TREM-Färbung zeigen. Dies bestätigte, dass Mikroglia die Effekte des LPS an PC vermitteln. Es sei darauf hingewiesen, dass ich diesen Nachweis der Typenkonversion in Kulturen von 8 Tage alten Mäusen vorgenommen habe, da in P0 Kulturen TREM nur sehr gering exprimiert wurde und auch keine Zunahme an TREM2 nach LPS Exposition zu sehen war. Auch wenn ich bisher noch nicht weiß, ob die M1 zu M2a Konversion

erfolgreich war, so wäre dies zumindest ein gutes Erklärungsmodell für meine Experimente.

Die hier erhobenen *in vitro* Daten sind mit *in vivo* Beobachtungen konsistent. IL-4 führte nach Rückenmarksverletzungen zu mehr resorptiven Makrophagen und einer schnelleren Ausräumung der Entzündung (Francos-Quijorna et al., 2016). Außerdem geht die Gabe des Interleukins mit einer Induktion der Neurogenese einher (Varnum und Ikezu, 2012).

Die Klassifizierung von Mikrogliazellen ist aktuelles Thema in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen, aber auch der Grundlagenforschung. Es ist nicht bekannt, welche Faktoren die Konversion von Mikroglia von neurotroph zu neurotoxisch induzieren, und die Klassifikation der Mikroglia wandelt sich mit der Zunahme genomischer Analysen (Tuddenham et al., 2024). Zudem verbleibt es zukünftigen Studien zu klären, ob die hier beobachteten neurotrophen Effekte durch proinflammatorische Substanzen wie LPS von der Dauer oder Konzentration der Applikation dieser abhängig sind und ob es somit ein klares Fenster für die Mikroglia vermittelte Aktivierung gibt. Sollte ein solcher Mechanismus bestätigt werden können, wäre eine weitere Erforschung der Anwendung für diverse psychiatrische Erkrankungen potentieller neuroinflammatorischer Genese wie auch das hier beschriebene ASD vorstellbar. Letztendlich verbleibt es herauszufinden, ob durch PLX, IL-4 und dB-cAMP unterschiedliche Parameter der Dendritogenese moduliert werden können. Für PLX lagen mir keine Daten bei Behandlung an DIV 6, sondern nur an DIV 3 vor, sodass sich dessen Effekte nicht mit denen des IL-4 und dB-cAMP vergleichen ließen. Sicherlich ist für eine solche Aussage aber eine Auswertung deutlich zahlreicherer Parameter der Dendritogenese notwendig.

4.4 Der Tumornekrosefaktor alpha als Mediator Mikroglia-induzierter proinflammatorischer Effekte auf die Purkinjezellendifferenzierung

Mikrogliazellen sind eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, die bei Entzündungsprozessen je nach Umgebung sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken können. Ein häufig beschriebener, aber sicherlich nicht alleiniger Mediator, der von Mikrogliazellen synthetisiert wird, ist TNF α . Die TNF α Expression wird durch eine Reihe von Signalwegen aktiviert, wobei cAMP als wichtiger Mediator der TNF α Aktivierung

angesehen wird. Wurden mit LPS behandelte PC mit dem Strukturanalogon dB-cAMP behandelt, ließen sich die durch LPS vermittelten wachstumsinhibierenden Effekte wie eine verkürzte Dendritenlänge, verringerte Dendritenverzweigungspunkte sowie eine höhere Dendritenanzahl aufheben. DB-cAMP ist membrangängig, verringert die durch LPS ausgelöste TNFa Ausschüttung und fördert eine vermehrte Ausschüttung von antiinflammatorischen Cytokinen wie IL-10 (Abd-El-Basset und Rao, 2018; Woo et al., 2004). Die Sekretion von TNFa ist charakteristisch für den proinflammatorischen M1 Phänotyp der Mikroglia. Somit war davon auszugehen, dass dB-cAMP gezielt die Funktion des M1 Subtyps inhibierte. Da sich dies in einer Abnahme der durch LPS vermittelten Effekte auf PC meiner cerebellären Schnittkulturen zeigte, kann die Wirkung des dB-cAMP als weiteres Indiz dafür angesehen werden, dass Mikrogliazellen ein wichtiger Mediator der LPS-induzierten PC Morphogenese sind. Zusammen mit Daten, die einen antiinflammatorischen Effekt von TNFa Rezeptor Blockern zeigen (Bahaaeldin et al., 2024), unterstützt meine Arbeit eine zumindest akzessorische Rolle der TNFa Signalgebung bei LPS-induzierten Effekten auf die PC Dendritogenese.

4.5 LPS-Effekte auf die Differenzierung glialer Zellen im Kleinhirn der Maus

TNFa ist ein diffusibler Faktor, der in vielen Immunreaktionswegen beteiligt ist. Entsprechend ist eine protektive Rolle des dB-cAMPs auch auf Astrocyten bekannt und scheint hier die Proliferation, Differenzierung und Reparatur dieses Zelltyps nach Traumata zu vermitteln (Miller et al., 1994).

Auch im Kleinhirn spielt TNFa eine wichtige Rolle bei immunologischen Reaktionen. Sowohl die Herkunft des TNFa, als auch die Zielzellen sind hierbei aber nicht eindeutig definiert und wahrscheinlich auf ein größeres Spektrum von Zellen einwirkend als dies üblicherweise in experimentellen Untersuchungen adressiert werden kann. Dass TNFa nicht nur auf Purkinjezellen wirkt, sondern auch andere Zellen und Neurone des ZNS in ihrer Differenzierung beeinflusst, wurde bereits früher vermutet und experimentell gezeigt (Akassoglou et al., 1997; Jeohn et al., 1998). Offensichtlich reagieren aber nicht alle Neurone in gleicher Weise auf TNFa. Körnerzellen zum Beispiel sind inert gegen eine Behandlung mit TNFa, obwohl beide Rezeptoren für TNFa auf Körnerzellen vorkommen

(Oldreive und Doherty, 2010). Dass TNFa auf Mikrogliazellen selbst einen Einfluss hat, wurde bereits ausführlich diskutiert. Die Frage ist, ob es auch auf anderen Gliazellen wirkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass das saure Gliafaserprotein GFAP, das häufig zur Darstellung von Astrocyten genutzt wird, unabhängig von der LPS-Behandlung einen dichten Rasen astrocytärer Fortsätze sichtbar machte. Diese Beobachtung könnte im einfachsten Fall darauf zurückzuführen sein, dass bei der Herstellung von Schnittkulturen Läsionen gesetzt werden, die die Proliferation von Astrocyten anregt. Diese massige Zunahme verhindert den Nachweis einer weiteren Zunahme an GFAP-positiven Strukturen. Allerdings konnte auch Norden et al. (2016) keine Zunahme des GFAP Signals 24 bzw. 48 h nach Injektion von LPS in adulte Mäusen beobachten. Trägt man allerdings alle Daten von LPS und Astrocyten zusammen, muss man festhalten, dass in den allermeisten Fällen entzündliche Reaktionen zu einer astrozytären Proliferation führen (Hong et al., 2020). Konsistent damit konnte auch in Astrocyteneinzelzellkulturen aus dem Cortex und Corpus callosum eine Zunahme des GFAP Signals nach Auslösung einer Inflammation durch LPS beobachtet werden (Zamanian et al., 2012). Derselbe Effekt ließ sich in dünnen Mikrotomschnitten von Gehirnen adulter Mäuse zeigen sichtbar durch Zellkörperhypertrophie und verlängerte Fortsätze sowie eine deutlich sichtbare Proliferation dieses Zelltyps (Perez-Dominguez et al., 2019; Silva et al., 2021). Bei keiner der Studien wurden allerdings Schnittkulturen wie in dieser Arbeit verwendet. Dies ist verständlich, da bei der Herstellung der Schnittkulturen Zellen zwangsweise so verletzt werden, dass eine basale Inflammation ausgelöst wird und Astrocyten stark proliferieren (Bernaudin et al., 1998).

Ähnlich zu GFAP ließ sich auch kein Unterschied im MBP Signal für reife Oligodendrocyten in Abhängigkeit verschiedener Behandlungen eruieren. Es sollte allerdings beachtet werden, dass MBP im Cerebellum erst postnatal zwischen P5-7 exprimiert wird (Kuhn et al., 2019). Gleichzeitig reduziert LPS in der frühen Entwicklung die Anzahl MBP-positiver Zellen und führt bei zwei Monate alten Ratten sogar zur Demyelinisierung und Zellverlust (Ahn et al., 2021; Yao et al., 2010). Somit muss einerseits davon ausgegangen werden, dass die hier verwendeten P0 Schnittkulturen bei Entnahme noch nicht weit genug differenziert waren, um reife Oligodendrocyten aufzuweisen. Zusätzlich könnte erneut die Anfertigung der Schnitte selbst über eine

zugrundeliegende Inflammation weitere MBP-positive Zellen analog zu einer frühen postnatalen Induktion einer Inflammation reduziert haben.

Unreife Oligodendrocyten ließen sich jedoch im Gegensatz zu MBP mittels Färbung mit einem Antikörper gegen Olig-2 sichtbar machen. Dieser Marker wird bereits embryonal exprimiert und induziert die Umwandlung neuraler Vorläuferzellen in Oligodendrocytenvorläuferzellen (Kuhn et al., 2019).

Wurden in der vorliegenden Arbeit Schnittkulturen mit und ohne LPS-Behandlung verglichen, nahm die Anzahl der Olig-2-positiven Zellen sowohl bei Behandlung an Tag 3, als auch an Tag 6 deutlich ab im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Wurden in neugeborenen Ratten die Olig-2 Expression nach LPS-Gabe untersucht, war die Olig-2 Expression auch über mindestens 28 Tage im Hippocampus und präfrontalem Cortex erniedrigt (Huang et al., 2020). Ein solcher Verlust von Oligodendrocyten konnte neben neugeborenen auch an adulten Ratten im Corpus callosum gezeigt werden (Yao et al., 2010).

Auf der anderen Seite ließ sich im Rückenmark von P5 Ratten ein verstärktes Olig-2 Signal nach Stimulation mit LPS messen (Hsieh et al., 2020). Auch bei P9 Mäusen vermehren LPS und Hypoxie die Anzahl unreifer Oligodendrocyten (Bonestroo et al., 2015). Allerdings lassen sich diese Versuche im Vergleich zur Methodik in dieser Arbeit schlechter mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichen als die von Yao et al. (2010) und Huang et al. (2020), da diese beide am Gehirn, wenn auch nicht am Kleinhirn, forschten und ein Eingriff in die Ratten lediglich durch Injektion und später Perfusion erfolgte, währenddessen Hsieh et al. (2020) und Bonestroo et al. (2015) durch Arbeiten am Rückenmark bzw. durch starken Eingriff durch Induktion einer Hypoxie mit anschließender Sauerstoffgabe doch sehr von den hier angewandten Methoden abweichen.

Daher zeigte sich zwar bei unreifen Oligodendrocyten als einzige Gliazellart neben den Mikroglia ein Effekt durch LPS, allerdings kam es hier zu einem Verlust dieser Zellart, sodass oben beschriebene Effekte des LPS nur dadurch erklärt werden könnten, wenn Olig-2-positive Zellen proinflammatorisch wirken würden. Bisherige Daten zeigen aber eher das Gegenteil. So konnte nachgewiesen werden, dass Olig-2-positive Oligodendrocyten die Regeneration von Neuronen nach Demyelinisierung entscheidend verbesserten (Peng et al., 2024) und auch neurale Stammzellen, in denen Olig-2

überexpressiert wurde, signifikant stärker zur Remyelinisierung nach Rückenmarksverletzungen beitragen als die entsprechenden Kontrollen (Hu et al., 2012). Zusammenfassend kann ich also festhalten, dass Mikroglia basierend auf deren Zunahme der Zellzahl und ihrer Verzweigungen sowie aufgrund der Tatsache, dass deren Konversion in einen aktiven Phänotyp die Effekte auf die PC Dendritogenese verstärkt, Hauptakteure des proinflammatorischen Effektes in den Schnittkulturen sind.

4.6 Antiinflammatorische Effekte des Homöodomänenproteins Engrailed-2 auf die Differenzierung cerebellärer Purkinjezellen

Da inflammatorische Effekte neurodegenerative Prozesse nach sich ziehen und Entzündungen als Ursache neuropsychiatrischer Erkrankungen angesehen werden, sind potentiell entzündungshemmende Stoffe von klinischem Interesse. Engrailed-Proteine steuern als Transkriptionsfaktoren nicht nur die Expression von Genen, die die Reifung von Neuronen beeinflussen, sondern sind seit längerem als parakrine Faktoren bekannt, die die axonale Wegfindung im retinalen und cerebellären System beeinflussen (Fuchs et al., 2012; Maizel et al., 2002). Derzeit sind im Säuger zwei paraloge Gene von Engrailed bekannt, Engrailed-1 und -2. In Genersatz-Studien konnte gezeigt werden, dass diese paraloge Proteine vergleichbare Funktionen ausüben können, sodass der Verlust eines der Paraloge kompensatorisch vom jeweils anderen übernommen werden kann (Hanks et al., 1995). Es ist also davon auszugehen, dass En1 und En2 ähnliche oder gar gleiche Funktionen ausüben und derzeit unterschiedlich Funktionen nur auf dem unterschiedlichen Expressionsprofil beruhen.

Neben den bekannten Funktionen von En bei der neuronalen Entwicklung, konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass exogen zu Schnittkulturen zugegebenes En2 LPS-induzierte Effekte auf die PC Differenzierung vollständig blockieren konnte. Die mit LPS und En2 behandelten Zellen besaßen längere Dendriten, mehr Verzweigungspunkte pro Dendritenbaum sowie eine Zunahme der Polarität der PC Somata als die mit LPS behandelten Kontrollzellen. Dieser Effekt ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: erstens konnte gezeigt werden, dass extrinisch gegebenes Engrailed-2 Protein die Purkinjezellreifung beeinflusst und zweitens, dass dieses exogene En2 im Gegensatz zu endogenem En2 eine inflammatorische Reaktion unterdrücken konnte.

Bahaaeldin et al. (2024) konnten zeigen, dass endogenes Engrailed LPS-induzierte proinflammatorische Effekte verstärkte. Dieser proinflammatorische Effekt könnte auf einer unabhängig voneinander, d.h. über unterschiedliche Signalwege ablaufenden Beeinträchtigung der PC Differenzierung beruhen. Unter physiologischen Bedingungen nimmt die En2 Expression unmittelbar postnatal innerhalb weniger Tage in cerebellären Purkinjenzellen ab (Davis et al., 1988). Eine verlängerte artifizielle Expression darüber hinaus verlangsamt die Entwicklung der PC in den ersten Tagen nach der Geburt (Jankowski et al., 2004). Zudem sorgt eine murine En2 Überexpression für eine verzögerte Entwicklung weiterer cerebellärer Strukturen wie der äußeren Körnerschicht (Baader et al., 1998). Jener Effekt konnte dadurch erklärt werden, dass dieser Homöoboxtranskriptionsfaktor für den Austritt der betroffenen Zellen aus dem Zellzyklus sorgte, die sich somit in der G0 Phase befanden (Rossman et al., 2014).

Dem widersprechend zeigen Experimente an Engrailed Knockoutmäusen eher neuroprotektive Wirkungen. Joshi et al. (2011) fanden heraus, dass dopaminerge Neurone in En-Knockoutmäusen ab der sechsten postnatalen Woche absterben und dass dies durch eine externe Gabe von En1 verhindert werden kann, wahrscheinlich durch Induktion der DNA Reparatur (Rekaik et al., 2015; Vargas Abonce et al., 2019). Auch bei En2 konnte beobachtet werden, dass es protektiv auf Neurone wirkt, die dieses Protein selbst nicht herstellen. Diese diskrepanten Ergebnisse könnten zweierlei Ursachen haben. Erstens könnte es eine Rolle spielen, zu welchem Zeitpunkt die En Expression verändert ist, und zweitens woher und damit über welchen Reaktionsweg En wirkt.

Eine zweite wichtige Erkenntnis aus meinen Arbeiten ist, dass En je nach Herkunftsort unterschiedliche Funktionen ausübt. Wird En dem Kulturmedium zugegeben, ist es neuroprotektiv, wird es dagegen intrinsisch vermehrt synthetisiert, scheint es eher neurodegenerativ zu wirken. Diese Beobachtung ist entscheidend, da bisherige Untersuchungen auf diesen Punkt nur am Rande hingewiesen haben und dezidierte Aussagen an *in vivo* Modellen eher schwierig sind. Wird die Expression von En im transgenen Modell manipuliert, kann nicht sicher zwischen einer intrinsischen und extrinsischen Funktion unterschieden werden. Die Arbeitsgruppe um Prochiantz konnte durch Inaktivierung von Engrailed oder Entfernung dessen Sekretionssignals zeigen, dass Engrailed sezerniert wird (Maizel et al., 1999; Prochiantz und Joliot, 2003). Ebenso kann

es zu anderen Zellen transportiert und von ihnen aufgenommen werden (Maizel et al., 2002). Da jüngere Studien Hinweise darauf geben, dass Engrailed-Proteine Immundefizienzen hervorrufen, wenn ihre Expression genetisch manipuliert wird (Pangrazzi et al., 2022), lag es nahe, eine immunmodulatorische parakrine Wirkung von Engrailed-2 zu untersuchen.

Im Rahmen der von mir durchgeführten Experimente wurde En2 anhand eines GST-Fusionsproteins hergestellt, aufgereinigt und den Kulturen zugegeben. Es sollte nicht verschwiegen werden, dass diese Isolation zu Fehlinterpretationen führen könnte. Da En2 als Fusionsprotein mit GST synthetisiert wurde, könnte der neuroprotektive Effekt auch durch den GST-Anteil verursacht worden sein. Um zu verhindern, dass Effekte dem GST und nicht En2 zugeschrieben wurden, wurde GST genau wie En2 in BL21-Bakterien transformiert und das darin hergestellte Protein extrahiert, um es zur Behandlung der Schnittkulturen als Kontrolle zu verwenden. Da in den Ergebnissen nun ein signifikanter Effekt des En2 bei Cobehandlung mit LPS im Vergleich zu den mit GST und LPS behandelten Kontrollen auf die PC der Schnitte nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass GST keinen relevanten Effekt auf PC und die zu untersuchende Fragestellung hatte.

Zusätzlich verbleibt die Frage, ob in den hergestellten Extrakten noch andere Proteine hätten vorliegen können. Da das pQE-En2-Plasmid allerdings sequenziert wurde, lag uns eine genaue Erkenntnis der darin enthaltenen Proteine vor. Dies galt auch für den Vektor pGEX-3X, da dieser ja dem pQE-En2-Plasmid entsprach, lediglich ohne die DNA für das En2 Protein. Zusätzlich wurde nach der Proteinherstellung eine Dialyse durchgeführt, die es mir ermöglichte, kleinere Peptide und Proteine bis zu einer Größe von 10 kDa aus dem Gemisch heraus zu filtrieren, sodass möglichst nur das En2/GST Protein vorlag. Und letztendlich wurden das GST und das GST-En2 Fusionsprotein in denselben Bakterien hergestellt und dieselben Kits genutzt. Wie im Material- und Methodenteil beschrieben, musste allerdings das GST Protein bzw. dessen Vektor-DNA mittels Isopropanol ausgefällt werden und nicht wie das pQE-En2-Plasmid durch Affinitätschromatographie isoliert werden, sodass ein kleines Restrisiko verbleibt, dass andere Proteine ebenfalls an dem neuroprotektiven Effekt beteiligt sind. Weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Proteindomänen sollten hier mehr Sicherheit bieten.

Die hier erhobenen Befunde können Ausgangspunkt für viele weitere Untersuchungen sein, die grundlagenwissenschaftliche, aber auch klinisch interessante Fragen adressieren können. Über welche Mechanismen wirkt extrinsisches En2 auf Purkinjezellen? Ein Rezeptor hierfür wurde noch nicht beschrieben. Möglich wäre aber eine Diffusion des Proteins wie es auch für andere Proteine postuliert wurde, die eine Antennapedia Domäne enthalten (Homöodomäne) (Derossi et al., 1996; Derossi et al., 1994). Welche Domänen des Engrailed sind für den Transduktionsprozess verantwortlich? Diesen Fragen und Hypothesen gilt es in der Zukunft weiter nachzugehen.

5. Zusammenfassung

Autismus ist eine Störung sozialer Kommunikation, die in unserer Bevölkerung zunehmende Bedeutung erlangt. Obwohl die Diagnose noch immer auf Basis von Verhaltensauffälligkeiten diagnostiziert wird, gibt es Hinweise, dass der Auslöser in externen Stimuli begründet liegen könnte. So wurden auf neuroanatomischer Ebene bei Mäusen nach maternaler Induktion einer Inflammation in der Schwangerschaft die gleichen Veränderungen der Hirnmasse oder der Zellmorphologie der Purkinjezellen (PC) im Kleinhirn entdeckt wie bei Menschen mit Autism Spectrum Disorder (ASD) postmortem. Daher sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, welchen Einfluss eine Inflammation, ausgelöst durch LPS, auf murine PC hat, und ob diese Effekte von Mikroglia vermittelt werden. Ebenso sollte untersucht werden, ob sich diese Entzündungsreaktionen durch das Homöodomänenprotein Engrailed-2, einem wichtigen Taktgeber der cerebralen embryonalen und perinatalen Hirnentwicklung, beeinflussen lassen.

Mithilfe von cerebellären Schnittkulturen, die von neugeborenen Mäusen gewonnen wurden, wurden PC über 10 Tage in Kultur gehalten und in dieser Zeit pro- und antiinflammatorischen Substanzen ausgesetzt. Die PC wurden anschließend immunhistochemisch gefärbt, mikroskopiert und deren Morphologie semiautomatisch vermessen. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Reifung der PC nach Lipopolysaccharid (LPS)-Behandlung am dritten Tag in Kultur weiter vorangeschritten war als in unbehandelten Kontrollzellen. Wurden die Schnittkulturen 3 Tage später (am sechsten Tag in Kultur) mit LPS behandelt, waren die Effekte umgekehrt. LPS verzögerte die PC Differenzierung, die Dendriten waren im Durchschnitt kürzer, es wurden mehr Stammdendriten ausgebildet, die aber weniger Verzweigungspunkte hatten. Dieser Effekt ließ sich durch eine Hemmung der Mikroglia proliferation mittels PLX3397 und durch die Konversion des proinflammatorischen M1 Typs in den antiinflammatorischen M2 Typ durch IL-4 inhibieren. Gleichzeitig konnte die Blockade des Tumornekrosefaktor alpha Signalweges durch dB-cAMP die LPS-induzierten Effekte verhindern. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die extrinsische Gabe des Homöoboxproteins Engrailed-2 die inhibierenden Effekte auf PC durch LPS-Applikation zu hemmen vermochte.

Die vorliegende Dissertationsschrift liefert experimentelle Beweise, dass die neuronale Differenzierung durch LPS beeinflusst werden kann und dieser Einfluss maßgeblich durch Mikroglia vermittelt wird. Zudem konnte in den Schnittkulturen erstmals gezeigt werden, dass extrinsisch gegebenes Engrailed LPS-induzierte Effekte auf die Dendritogenese von PC unterdrückte. Engrailed-2 könnte also eine duale Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen, eine proinflammatorische bei zellulärer Expression in der Zielzelle und eine antiinflammatorische Rolle bei extrinsischer Gabe des Proteins.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung der Verschaltung des Kleinhirns und der Purkinjezellen	11
Abbildung 2: Schematische Übersicht der Dendritenentwicklung einer PC postnatal	14
Abbildung 3: Schematische Abbildung des En2 Proteins inklusive bekannter Domänen	20
Abbildung 4: Schematische Übersicht des pQE-En2-Plasmids und des pGEX-3X Vektors mit eingezeichneten Restriktionsenzymststellen	36
Abbildung 5: Schematische Übersicht der Behandlung der Kleinhirnschnitte mit/ ohne LPS sowie PLX3397	44
Abbildung 6: Schematische Übersicht der Behandlung der Kleinhirnschnitte mit/ ohne LPS sowie IL-4 und dB-cAMP	45
Abbildung 7: Schematische Übersicht der Behandlung der Kleinhirnschnitte mit/ ohne LPS sowie GST bzw. GST-En2	46
Abbildung 8: Schematische Übersicht der Behandlung der P8 Kleinhirnschnitte mit/ohne LPS	47
Abbildung 9: Beispiel einer Sholl Analyse eines beispielhaften Dendritenbaums mit zugehörigen konzentrischen Kreisen	53
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Dendritenorientierungswinkels	54

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Dendritendistanzen einer unipolaren und einer polaren Zelle im Vergleich	54
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen von Schnittkulturen mit Iba1 spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern	57
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung von Purkinjezellen mit einem Calb1 spezifischen Antikörper	58
Abbildung 14: Sholl Analyse von PC Dendriten in Abhängigkeit von der LPS- und PLX-Behandlung sowie dem Abstand vom Soma	61
Abbildung 15: Darstellung der Dendritenlänge von PC in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung	62
Abbildung 16: Darstellung der Dendritenanzahl pro PC in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung	63
Abbildung 17: Darstellung der Dendritenverzweigungspunkte von PC in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung	65
Abbildung 18: Häufigkeit von Stammdendriten mit definierten Ausrichtungen (dendritischen Orientierungswinkeln) in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung	66
Abbildung 19: Darstellung Abstände zwischen den Dendritenstartpunkten in Abhängigkeit der LPS- und PLX-Behandlung	67
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder PLX behandelten Schnittkulturen mit Astrocyten-spezifischem GFAP	69

Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder PLX behandelten reifen Oligodendrocyten mit MBP	70
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder PLX behandelten unreifen Oligodendrocyten mit Olig-2	70
Abbildung 23: A: Immunhistochemische Färbungen von mit/ohne LPS behandelten Mikroglia (Iba1) von P8 Schnittkulturen gegen Iba1. B: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder IL-4/dB-cAMP behandelten Mikroglia von P0 Schnittkulturen gegen Iba1. C: Immunhistochemische Färbung des mit/ohne LPS behandelten M2a Mikrogliasubtyps von P8 Schnittkulturen gegen TREM2	73
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder IL-4/dB-cAMP behandelten Purkinjezellen gegen Calb1	74
Abbildung 25: Darstellung der Dendritenlänge von PC in Abhängigkeit der LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung	75
Abbildung 26: Darstellung der Dendritenanzahl pro PC in Abhängigkeit der LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung	77
Abbildung 27: Darstellung der Dendritenverzweigungspunkte von PC in Abhängigkeit derer Verzweigungsordnungen unter LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung	78
Abbildung 28: Darstellung Abstände zwischen den Dendritenstartpunkten in Abhängigkeit der LPS- und IL-4 bzw. dB-cAMP-Behandlung	80
Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und/oder IL-4/dB-cAMP behandelten unreifen Oligodendrocyten mittels Olig-2	81

Abbildung 30: Restriktionsverdau des pQE-En2-Plasmids und des pGEX-3X Vektors	83
Abbildung 31: Schematische Abbildung des En2 Proteins inklusive bekannter Domänen und Punktmutationen	84
Abbildung 32: Western Blot der extrahierten GST-En2 und GST Proben	85
Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung von mit LPS und GST/GST-En2 behandelten Purkinjezellen gegen Calb1	87
Abbildung 34: Darstellung der Dendritenlänge von PC in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung	88
Abbildung 35: Darstellung der Dendritenanzahl pro PC in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung	89
Abbildung 36: Darstellung der Dendritenverzweigungspunkte von PC in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung	90
Abbildung 37: Darstellung Abstände zwischen den Dendritenstartpunkten in Abhängigkeit der LPS- und GST-En2-Behandlung	91
Abbildung 38: Immunhistochemische Färbungen von mit LPS und GST/GST-En2 behandelten unreifen Oligodendrocyten gegen Olig-2	92
Abbildung 39: Immunhistochemische Färbungen von mit LPS und GST/GST-En2 behandelten Mikroglia gegen Iba1	93

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für diese Arbeit verwendete Geräte	24
Tabelle 2: Für diese Arbeit verwendete Chemikalien	25
Tabelle 3: Für diese Arbeit verwendete Lösungen	27
Tabelle 4: Für diese Arbeit verwendeten Antikörper	30
Tabelle 5: Für diese Arbeit verwendete weitere Gegenstände	31

8. Literaturverzeichnis

Abcam, 2023: Antigen retrieval for IHC. <https://www.abcam.com/kits/antigen-retrieval-for-ihc> (Zugriffsdatum: 22.02.2023)

Abd-El-Basset EM, Rao MS. Dibutyl Cyclic Adenosine Monophosphate Rescues the Neurons From Degeneration in Stab Wound and Excitotoxic Injury Models. *Front Neurosci.* 2018; 12: 546

Abd-El-Basset EM, Rao MS, Alshawaf SM, Ashkanani HK, Kabli AH. Tumor necrosis factor (TNF) induces astrogliosis, microgliosis and promotes survival of cortical neurons. *AIMSN* 2021; 8: 558–584

Ahn J-H, Lee HJ, Lee K, Lim J, Hwang JK, Kim C-R, Kim HA, Kim H-S, Park H-K. Effects of Lipopolysaccharide on Oligodendrocyte Differentiation at Different Developmental Stages: an In Vitro Study. *J Korean Med Sci* 2021; 36: e332

Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol* 1997; 158: 438–445

Albéri L, Sgadò P, Simon HH. Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 2004; 131: 3229–3236

Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Boudos R, DuBray MB, Oakes TR, Miller JN, Lu J, Jeong E-K, McMahon WM, Bigler ED, Lainhart JE. Diffusion tensor imaging of the corpus callosum in Autism. *NeuroImage* 2007; 34: 61–73

Al-Onaizi M, Al-Khalifah A, Qasem D, ElAli A. Role of Microglia in Modulating Adult Neurogenesis in Health and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 6875

Al-Tubuly AA. SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med* 2000; 40: 391–405

Alvarez-Fischer D, Fuchs J, Castagner F, Stettler O, Massiani-Beaudoin O, Moya KL, Bouillot C, Oertel WH, Lombès A, Faigle W, Joshi RL, Hartmann A, Prochiantz A. Engrailed protects mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1260–1266

Ambur OH, Engelstädter J, Johnsen PJ, Miller EL, Rozen DE. Steady at the wheel: conservative sex and the benefits of bacterial transformation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2016; 371: 20150528

Araki T, Ikegaya Y, Koyama R. Microglia attenuate the kainic acid-induced death of hippocampal neurons in slice cultures. *Neuropsychopharmacol Rep* 2019; 40: 85–91.

Araki T, Ikegaya Y, Koyama R. The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. *Eur J Neurosci* 2021; 54: 5880–5901

Armengol J-A, Sotelo C. Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in 'in vitro' slices. *Developmental Brain Research* 1991; 64: 95–114

Arnold DB, Heintz N. A calcium responsive element that regulates expression of two calcium binding proteins in Purkinje cells. *PNAS* 1997; 94: 8842–8847

Au NPB, Ma CHE. Neuroinflammation, Microglia and Implications for Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Regeneration in Traumatic Optic Neuropathy. *Front. Immunol.* 2022; 13: 860070

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: 1763

Baader SL, Schilling ML, Rosengarten B, Pretsch W, Teutsch HF, Oberdick J, Schilling K. Purkinje Cell Lineage and the Topographic Organization of the Cerebellar Cortex: A View from X Inactivation Mosaics. *Dev. Biol.* 1996; 174: 393–406

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: 5370

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: 306

Bahry JA, Fedder-Semmes KN, Sceniak MP, Sabo SL. An Autism-Associated de novo Mutation in GluN2B Destabilizes Growing Dendrites by Promoting Retraction and Pruning. *Front. Cell. Neurosci.* 2021; 15: 692232

Baksmeier C, Blundell P, Steckel J, Schultz V, Gu Q, Da Silva Filipe A, Kohl A, Linnington C, Lu D, Dell A, Haslam S, Wang J, Czajkowsky D, Goebels N, Pleass RJ. Modified recombinant human IgG1-Fc is superior to natural intravenous immunoglobulin at inhibiting immune-mediated demyelination. *Immunology* 2021; 164: 90–105

Bandelin. Sonoplus, Ultraschall-Homogenisatoren, Anwendungshinweise und Einsatzmöglichkeiten. 2022

Beckinghausen J, Sillitoe RV. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci Lett.* 2019; 688: 2–13

Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, DiCicco-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the Homeobox Transcription Factor Gene ENGRAILED 2 as an Autism Spectrum Disorder Susceptibility Locus. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 851–868

Bernaudin M, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. Selective Neuronal Vulnerability and Specific Glial Reactions in Hippocampal and Neocortical Organotypic Cultures Submitted to Ischemia. *Exp. Neurol.* 1998; 150: 30–39

Binda F, Pernaci C, Saxena S. Cerebellar Development and Circuit Maturation: A Common Framework for Spinocerebellar Ataxias. *Front Neurosci.* 2020; 14: 293

Bitplane, 2022: Imaris Reference Manual. http://www.bitplane.com/download/manuals/ReferenceManual9_2_0.pdf (Zugriffsdatum: 22.02.2022)

Bleuler E. *Das autistische Denken.* Karlsruhe: Verlag F.C.W. Vogel, 1911

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: 155–165

Bonestroo HJC, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F, Nijboer CH. Development of cerebral gray and white matter injury and cerebral inflammation over time after inflammatory perinatal asphyxia. *Dev Neurosci* 2015; 37: 78–94

Boschian B, Messina A, Bozza A, Castellini ME, Provenzano G, Bozzi Y, Casarosa S. Impaired Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells Lacking the Engrailed-2 Gene. *Neurosci* 2018; 386: 137-149

Boutou A, Roufagalas I, Politopoulou K, Tastsoglou S, Abouzeid M, Skoufos G, Verdu De Juan L, Ko JH, Kyrargyri V, Hatzigeorgiou AG, Barnum CJ, Tesi RJ, Bauer J, Lassmann H, Johnson MR, Probert L. Microglia regulate cortical remyelination via TNFR1-dependent phenotypic polarization. *Cell Rep.* 2024; 43: 114894

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254

Brás JP, Bravo J, Freitas J, Barbosa MA, Santos SG, Summavielle T, Almeida MI. TNF-alpha-induced microglia activation requires miR-342: impact on NF-kB signaling and neurotoxicity. *Cell Death Dis* 2020; 11: 415

Çakmak-Görür N, Radke J, Rhein S, Schumann E, Willimsky G, Heppner FL, Blankenstein T, Pezzutto A. Intracellular expression of FLT3 in Purkinje cells: implications for adoptive T-cell therapies. *Leukemia* 2019; 33: 1039–1043

Chelini G, Zerbi V, Cimino L, Grigoli A, Markicevic M, Libera F, Robbiati S, Gadler M, Bronzoni S, Miorelli S, Galbusera A, Gozzi A, Casarosa S, Provenzano G, Bozzi Y. Aberrant Somatosensory Processing and Connectivity in Mice Lacking Engrailed-2. *J. Neurosci.* 2019; 39: 1525–1538

Cheng A, Jia W, Finkelstein DI, Stefanova N, Wang H, Sasaki T, Kawahata I, Fukunaga K. Pharmacological inhibition of FABP7 by MF 6 counteracts cerebellum dysfunction in an experimental multiple system atrophy mouse model. *Acta Pharmacol Sin* 2024; 45: 66–75

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* 2014; 11: 98

Childs R, Gamage R, Münch G, Gyengesi E. The effect of aging and chronic microglia activation on the morphology and numbers of the cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett.* 2021; 751: 135807

Choi J, Ababon MR, Soliman M, Lin Y, Brzustowicz LM, Matteson PG, Millonig JH. Autism Associated Gene, ENGRAILED2, and Flanking Gene Levels Are Altered in Post-Mortem Cerebellum. *PLoS ONE* 2014; 9: e87208

Cloarec R, Riffault B, Dufour A, Rabiei H, Gouty-Colomer L-A, Dumon C, Guimond D, Bonifazi P, Eftekhari S, Lozovaya N, Ferrari DC, Ben-Ari Y. Pyramidal neuron growth and increased hippocampal volume during labor and birth in autism. *Sci. Adv.* 2019; 5: eaav0394

Cochet F, Peri F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 2318

Coleman LG, Zou J, Crews FT. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling. *J. Neuroinflammation* 2020; 17: 27

Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 2017; 35: 441–468

Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 1985; 151: 369–374

Cope EC, Gould E. Adult neurogenesis, glia, and the extracellular matrix. *Cell stem cell* 2019; 24: 690–705

Courchesne E, Karns CM, Davis HR, Ziccardi R, Carper RA, Tigue ZD, Chisum HJ, Moses P, Pierce K, Lord C, Lincoln AJ, Pizzo S, Schreibman L, Haas RH, Akshoomoff NA, Courchesne RY. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI study. *Neurology* 2001; 57: 245–254

Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult CNS in male and female mice. *J Neurosci Res* 2013; 91: 1143–1151

Danielian PS, McMahon AP. Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 1996; 383: 332–334

Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500: 399–411

Davis CA, Joyner AL. Expression patterns of the homeo box-containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene int-1 diverge during mouse development. *Gene Dev* 1988; 2: 1736–1744

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. *Gene Dev* 1988; 2: 361–371

De Abreu Costa L, Henrique Fernandes Ottoni M, Dos Santos M, Meireles A, Gomes De Almeida V, De Fátima Pereira W, Alves De Avelar-Freitas B, Eustáquio Alvim Brito-Melo G. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules* 2017; 22: 1789

De Camilli P, Miller PE, Levitt P, Walter U, Greengard P. Anatomy of cerebellar Purkinje cells in the rat determined by a specific immunohistochemical marker. *Neurosci* 1984; 11: 761-817

Delbridge ARD, Huh D, Brickelmaier M, Burns JC, Roberts C, Challa R, Raymond N, Cullen P, Carlile TM, Ennis KA, Liu M, Sun C, Allaire NE, Foos M, Tsai H-H, Franchimont N, Ransohoff RM, Butts C, Mingueneau M. Organotypic Brain Slice Culture Microglia Exhibit Molecular Similarity to Acutely-Isolated Adult Microglia and Provide a Platform to Study Neuroinflammation. *Front. Cell. Neurosci.* 2020; 14: 592005

Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *J Biol Chem* 1996; 271: 18188–18193

Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994; 269: 10444–10450

DiSabato D, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *J Neurochem* 2016; 139: 136–153

Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism – a developmental perspective. *J Anat* 2017; 230: 4–15

Durens D, M S, J M, E D-B. Engrailed-2 is a cell autonomous regulator of neurogenesis in cultured hippocampal neural stem cells. *Dev. Neurobiol.* 2021; 81: 724-735

Dusart I, Flamant F. Profound morphological and functional changes of rodent Purkinje cells between the first and the second postnatal weeks: a metamorphosis? *Front Neuroanat* 2012; 6: 11

Ellegood J, Anagnostou E, Babineau BA, Crawley JN, Lin L, Genestine M, DiCicco-Bloom E, Lai JKY, Foster JA, Peñagarikano O, Geschwind DH, Pacey LK, Hampson DR, Laliberté CL, Mills AA, Tam E, Osborne LR, Kouser M, Espinosa-Becerra F, Xuan Z, Powell CM, Raznahan A, Robins DM, Nakai N, Nakatani J, Takumi T, van Eede MC, Kerr TM, Muller C, Blakely RD, Veenstra-VanderWeele J, Henkelman RM, Lerch JP. Clustering autism - using neuroanatomical differences in 26 mouse models to gain insight into the heterogeneity. *Mol Psychiatry* 2015; 20: 118–125

Ellegood J, Lerch JP, Henkelman RM. Brain abnormalities in a Neuroligin3 R451C knockin mouse model associated with autism. *Autism Res* 2011; 4: 368–376

Enderlin S, Norman AW, Celio MR. Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol* 1987; 177: 15–28

Van Essen MJ, Nayler S, Becker EBE, Jacob J. Deconstructing cerebellar development cell by cell. *PLoS Genet* 2020; 16: e1008630

Eyo UB, Wu L-J. Microglia: Lifelong patrolling immune cells of the brain. *Prog. Neurobiol.* 2019; 179: 101614

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: 171–175

Faust G, Stand A, Weuster-Botz D. IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. *Eng. Life Sci.* 2015; 15: 824–829

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 1–12

Francos-Quijorna I, Amo-Aparicio J, Martinez-Muriana A, López-Vales R. IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *Glia* 2016; 64: 2079–2092

Frantz G, Weimann J, Levin M, McConnell S. Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J. Neurosci.* 1994; 14: 5725–5740

Fuchs J, Stettler O, Alvarez-Fischer D, Prochiantz A, Moya KL, Joshi RL. Engrailed signaling in axon guidance and neuron survival. *Eur J Neurosci* 2012; 35: 1837–1845

Fujishima K, Kawabata Galbraith K, Kengaku M. Dendritic Self-Avoidance and Morphological Development of Cerebellar Purkinje Cells. *Cerebellum* 2018; 17: 701–708

Gähwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1981; 4: 329–342

Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res* 2015; 1619: 1–11

Gentile A, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Rizzo FR, Centonze D, Mandolesi G. Laquinimod ameliorates excitotoxic damage by regulating glutamate re-uptake. *J. Neuroinflammation* 2018; 15: 5

Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH. Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry* 2004; 9: 474–484

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 2010; 330: 841–845

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; 7: 45

Goshi N, Morgan RK, Lein PJ, Seker E. A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 2020; 17: 155

Green MJ, Wingate RJ. Developmental origins of diversity in cerebellar output nuclei. *Neural Dev* 2014; 9

Greter M, Merad M. Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia* 2013; 61: 121–127

Gupta M, Kaur G. *Withania somnifera* (L.) Dunal ameliorates neurodegeneration and cognitive impairments associated with systemic inflammation. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19: 217

Gutiérrez-Franco A, Eixarch H, Costa C, Gil V, Castillo M, Calvo-Barreiro L, Montalban X, Del Río JA, Espejo C. Semaphorin 7A as a Potential Therapeutic Target for Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 4820-4831

Haldipur P, Dang D, Millen KJ. *Embryology. Handb Clin Neurol* 2018; 154: 29–44

Haldipur P, Millen KJ. What cerebellar malformations tell us about cerebellar development. *Neurosci Lett.* 2019; 688: 14–25

Hampson DR, Blatt GJ. Autism spectrum disorders and neuropathology of the cerebellum. *Front Neurosci.* 2015; 9: 420

Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL. Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 1995; 269: 679–682

He Y, Gao Y, Zhang Q, Zhou G, Cao F, Yao S. IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. *Neurosci* 2020; 437: 161–171

Henning L, Antony H, Breuer A, Müller J, Seifert G, Audinat E, Singh P, Brosseron F, Heneka MT, Steinhäuser C, Bedner P. Reactive microglia are the major source of tumor necrosis factor alpha and contribute to astrocyte dysfunction and acute seizures in experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 2023; 71: 168–186

Hjerrild M, Stensballe A, Jensen ON, Gammeltoft S, Rasmussen TE. Protein kinase A phosphorylates serine 267 in the homeodomain of engrailed-2 leading to decreased DNA binding. *FEBS Lett.* 2004; 568: 55–59

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: 10039–10049

Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 1981; 114: 193–197

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: 495–504

Hong J, Yoon D, Nam Y, Seo D, Kim J-H, Kim MS, Lee TY, Kim KS, Ko P-W, Lee H-W, Suk K, Kim SR. Lipopolysaccharide administration for a mouse model of cerebellar ataxia with neuroinflammation. *Sci Rep* 2020; 10: 13337

Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S -i., Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010; 49: 1215-1228

Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 261–270

Hsieh C-T, Lee Y-J, Lee JW, Lu S, Tucci MA, Dai X, Ojeda NB, Lee HJ, Fan L-W, Tien L-T. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates the pain hypersensitivity, spinal inflammation and oxidative stress induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats. *Neurochem Int* 2020; 135: 104686

Hu J-G, Shen L, Wang R, Wang Q-Y, Zhang C, Xi J, Ma S-F, Zhou J-S, Lü H-Z. Effects of Olig2-Overexpressing Neural Stem Cells and Myelin Basic Protein-Activated T Cells on Recovery from Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* 2012; 9: 422–445.

Huang P, Chen X, Hu X, Zhou Q, Lin L, Jiang S, Fu H, Xiong Y, Zeng H, Fang M, Chen C, Deng Y. Experimentally Induced Sepsis Causes Extensive Hypomyelination in the Prefrontal Cortex and Hippocampus in Neonatal Rats. *Neuromolecular Med* 2020; 22: 420–436

Jaeger CB, Kapoor R, Llinás R. Cytology and organization of rat cerebellar organ cultures. *Neurosci* 1988; 26: 509–538

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: 87–99

Jankowski J, Miething A, Schilling K, Baader SL. Physiological Purkinje Cell Death Is Spatiotemporally Organized in the Developing Mouse Cerebellum. *Cerebellum* 2009; 8: 277-290

Javaid N, Patra MC, Seo H, Yasmeen F, Choi S. A Rational Insight into the Effect of Dimethyl Sulfoxide on TNF- α Activity. *IJMS* 2020; 21: 9450

Jeohn G-H, Kong L-Y, Wilson B, Hudson P, Hong J-S. Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. *J. Neuroimmunol.* 1998; 85: 1–10

Jonas RA, Yuan T-F, Liang Y-X, Jonas JB, Tay DKC, Ellis-Behnke RG. The Spider Effect: Morphological and Orienting Classification of Microglia in Response to Stimuli in Vivo. *PLoS ONE* 2012; 7: e30763

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: 1573-1578

Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 1943; 2: 217–250

Kapfhammer JP, Gugger OS. The Analysis of Purkinje Cell Dendritic Morphology in Organotypic Slice Cultures. *J Vis Exp* 2012; 61: 3637

Kaur C, Sivakumar V, Zou Z, Ling E-A. Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain Struct Funct* 2014; 219: 151–170

Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Geier MR. Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. *Front. Cell. Neurosci.* 2016; 9: 519

Kong J, Du Z, Dong L. Pinitol Prevents Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses in BV2 Microglia Mediated by TREM2. *Neurotox Res* 2020; 38: 96–104

Kuemerle B, Gulden F, Cherosky N, Williams E, Herrup K. The mouse Engrailed genes: a window into Autism. *Behav Brain Res* 2007; 176: 121–132

Kuemerle B, Zanjani H, Joyner A, Herrup K. Pattern Deformities and Cell Loss in Engrailed-2 Mutant Mice Suggest Two Separate Patterning Events during Cerebellar Development. *J. Neurosci.* 1997; 17: 7881

Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 2019; 8: 1424

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

Kuwajima K, Ikeguchi M, Sugawara T, Hiraoka Y, Sugai S. Kinetics of disulfide bond reduction in alpha-lactalbumin by dithiothreitol and molecular basis of superreactivity of the Cys6-Cys120 disulfide bond. *Biochem* 1990; 29: 8240–8249

Kwon HS, Koh S-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 2020; 9: 42

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* 2016; 15: 789–828

Li C, Zhao B, Lin C, Gong Z, An X. TREM2 inhibits inflammatory responses in mouse microglia by suppressing the PI3K/NF- κ B signaling. *Cell Biol Int* 2019; 43: 360–372

Li M, Li Z, Ren H, Jin W-N, Wood K, Liu Q, Sheth KN, Shi F-D. Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: S. 2383–2395

Lin S, Wang C, Zhou J, Shi Y, Ruan C, Tu Y, Yao L, Peng D, Xue Y. EPSPD: a well-annotated data resource of protein phosphorylation sites in eukaryotes. *Brief. Bioinform.* 2021; 22: 298–307

Liu W, Taso O, Wang R, Bayram S, Graham AC, Garcia-Reitboeck P, Mallach A, Andrews WD, Piers TM, Botia JA, Pocock JM, Cummings DM, Hardy J, Edwards FA, Salih DA. Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions. *Hum Mol Genet* 2020; 29: 3224–3248

Lively S, Schlichter LC. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front. Cell. Neurosci.* 2018; 12: 215

Llano I, Marty A, Johnson JW, Ascher P, Gähwiler BH. Patch-clamp recording of amino acid-activated responses in „organotypic“ slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85: 3221–3225

Long F, Cho W, Ishii Y. Expression and purification of ¹⁵N- and ¹³C-isotope labeled 40-residue human Alzheimer's β -amyloid peptide for NMR-based structural analysis. *Protein Expr Purif* 2011; 79: 16–24

Lord C, Risi S, DiLavore PS, Shulman C, Thurm A, Pickles A. Autism from 2 to 9 years of age. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 694–701

Lutz JA, Carter M, Fields L, Barron S, Littleton JM. The Dietary Flavonoid Rhamnetin Inhibits Both Inflammation and Excitotoxicity During Ethanol Withdrawal in Rat Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 2015; 39: 2345–2353

Maizel A, Bensaude O, Prochiantz A, Joliot A. A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* 1999; 126: 3183–3190

Maizel A, Tassetto M, Filhol O, Cochet C, Prochiantz A, Joliot A. Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* 2002; 129: 3545-3553

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: 535–547

Mekhaeil M, Conroy MJ, Dev KK. Olaparib Attenuates Demyelination and Neuroinflammation in an Organotypic Slice Culture Model of Metachromatic Leukodystrophy. *Neurotherapeutics* 2023; 20: 1347–1368

Merck, 2022: Verfahren zum Nachweis von an Membranen gebundene Proteine und Nukleinsuren. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/genomics/nucleic-acid-labeling-and-detection/detection-methods> (Zugriffsdatum: 22.01.2022)

Messing A, Brenner M. GFAP at 50. *ASN NEURO* 2020; 12: 1759091420949680

Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 2015; 138: 1138–1159

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

Miller C, Tsatas O, David S. Dibutyl cAMP, interleukin-1 beta, and macrophage conditioned medium enhance the ability of astrocytes to promote neurite growth. *J Neurosci Res* 1994; 38: 56–63

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol* 2000; 164: 6166–6173

Morgan R. *Engrailed*: Complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Lett.* 2006; 508: 2531–2533

Morgan R, Boxall A, Bhatt A, Bailey M, Hindley R, Langley S, Whitaker HC, Neal DE, Ismail M, Whitaker H, Annels N, Michael A, Pandha H. *Engrailed-2 (EN2)*: A Tumor Specific Urinary Biomarker for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1090–1098

Nakamura Y, Si QS, Kataoka K. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res* 1999; 35: 95–100

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

Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout J. Sequential Activation of Microglia and Astrocyte Cytokine Expression Precedes Increased Iba-1 or GFAP Immunoreactivity following Systemic Immune Challenge. *Glia* 2016; 64: 300-316

Oldreive CE, Doherty GH. Effects of Tumour Necrosis Factor-alpha on Developing Cerebellar Granule and Purkinje Neurons In Vitro. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 44-52

O'Neill K, Akum B, Dhawan S, Kwon M, Langhammer C, Firestein B. Assessing effects on dendritic arborization using novel Sholl analyses. *Front. Cell. Neurosci.* 2015; 9: 285

Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 649-665

Ozaki K, Kato D, Ikegami A, Hashimoto A, Sugio S, Guo Z, Shibushita M, Tatematsu T, Haruwaka K, Moorhouse AJ, Yamada H, Wake H. Maternal immune activation induces sustained changes in fetal microglia motility. *Sci Rep* 2020; 10: 21378

Pangrazzi L, Genovesi S, Balasco L, Cerilli E, Robol C, Zunino G, Piazza S, Provenzano G, Bozzi Y. Immune dysfunction in the cerebellum of mice lacking the autism candidate gene *Engrailed 2*. *J. Neuroimmunol.* 2022; 367: 577870

Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan W-B. Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Cell* 2013; 155: 1596-1609

Pashenkov M, Teleshova N, Link H. Inflammation in the Central Nervous System: the Role for Dendritic Cells. *Brain Pathol.* 2006; 13: 23-33

Peng D, Lu R, Lü L, Yao Q, Yang K, Xu Y, Feng X, Pan R, Ma Y. Olig2+ single-colony-derived cranial bone-marrow mesenchymal stem cells achieve improved regeneration in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 2024; 25: 1108-1114

Perez-Dominguez M, Ávila-Muñoz E, Domínguez-Rivas E, Zepeda A. The detrimental effects of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation on adult hippocampal neurogenesis depend on the duration of the pro-inflammatory response. *Neural Regen Res* 2019; 14: 817–825

Petit E, Hérault J, Martineau J, Perrot A, Barthélémy C, Hameury L, Sauvage D, Lelord G, Müh JP. Association study with two markers of a human homeogene in infantile autism. *J Med Genet* 1995; 32: 269–274

Petrie A, Sabin C. Numerical data: more than two groups. In: John Wiley & Sons Ltd., Hrsg., *Medical Statistics at a Glance*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2020: 60–62

Phan ML, Liu TT, Vollbrecht MS, Mansour MH, Nikodijevic I, Jadav N, Patibanda N, Dang J, Shekaran G, Reisler RC, Kim WS, Zhou X, DiCicco-Bloom E, Samuels BA. Engrailed 2 deficiency and chronic stress alter avoidance and motivation behaviors. *Behav Brain Res* 2021; 413: 113466

Poudel PP, Bhattarai C, Ghosh A, Kalthur SG. Role of engrailed homeobox 2 (EN2) gene in the development of the cerebellum and effects of its altered and ectopic expressions. *Egypt J Med Hum Genet* 2022; 23: 95

Prochiantz A, Joliot A. Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 814–819

Provenzano G, Gilardoni A, Maggia M, Pernigo M, Sgadò P, Casarosa S, Bozzi Y. Altered Expression of GABAergic Markers in the Forebrain of Young and Adult Engrailed-2 Knockout Mice. *Genes* 2020; 11: 384

Provenzano G, Pangrazzi L, Poli A, Sgadò P, Berardi N, Bozzi Y. Reduced phosphorylation of synapsin I in the hippocampus of Engrailed-2 knockout mice, a model for autism spectrum disorders. *Neurosci* 2015; 286: 122–130

Qiao C, Liu Z, Qie S. The Implications of Microglial Regulation in Neuroplasticity-Dependent Stroke Recovery. *Biomolecules* 2023; 13: 571

Qin C, Zhou L-Q, Ma X-T, Hu Z-W, Yang S, Chen M, Bosco DB, Wu L-J, Tian D-S. Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull* 2019; 35: 921–933

Quincozes-Santos A, Santos CL, de Souza Almeida RR, da Silva A, Thomaz NK, Costa NLF, Weber FB, Schmitz I, Medeiros LS, Medeiros L, Dotto BS, Dias FRP, Sovrani V, Bobermin LD. Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells. *Mol Neurobiol* 2021; 58: 6577-6592

Rapin I, Tuchman RF. Autism: Definition, Neurobiology, Screening, Diagnosis. *Pediatr. Clin. North Am.* 2008; 55: 1129–1146

Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci* 2013; 7: 83

Rekaik H, Blaudin de Thé F-X, Fuchs J, Massiani-Beaudoin O, Prochiantz A, Joshi RL. Engrailed Homeoprotein Protects Mesencephalic Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress. *Cell Rep* 2015; 13: 242–250

Reshef R, Kudryavitskaya E, Shani-Narkiss H, Isaacson B, Rimmerman N, Mizrahi A, Yirmiya R. The role of microglia and their CX3CR1 signaling in adult neurogenesis in the olfactory bulb. *eLife* 2017; 6: e30809

Rice RA, Spangenberg EE, Yamate-Morgan H, Lee RJ, Arora RPS, Hernandez MX, Tenner AJ, West BL, Green KN. Elimination of Microglia Improves Functional Outcomes Following Extensive Neuronal Loss in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 2015; 35: 9977–9989

Rodgers JM, Robinson AP, Rosler ES, Lariosa-Willingham K, Persons RE, Dugas JC, Miller SD. IL-17A activates ERK1/2 and enhances differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 2015; 63: 768–779

Rossman IT, Lin L, Morgan KM, DiGiovine M, Van Buskirk EK, Kamdar S, Millonig JH, DiCicco-Bloom E. Engrailed2 modulates cerebellar granule neuron precursor proliferation, differentiation and insulin-like growth factor 1 signaling during postnatal development. *Mol Autism* 2014; 5: 9

Sato K. Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia* 2015; 63: 1394–1405

Sgadò P, Albéri L, Gherbassi D, Galasso SL, Ramakers GMJ, Alavian KN, Smidt MP, Dyck RH, Simon HH. Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal *Engrailed* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103: 15242–15247

Sgadò P, Provenzano G, Dassi E, Adami V, Zunino G, Genovesi S, Casarosa S, Bozzi Y. Transcriptome profiling in engrailed-2 mutant mice reveals common molecular pathways associated with autism spectrum disorders. *Mol Autism* 2013; 4: 51

Shi L, Smith SEP, Malkova N, Tse D, Su Y, Patterson PH. Activation of the Maternal Immune System Alters Cerebellar Development in the Offspring. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 116–123

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: 2231–2243

Sillitoe RV, Vogel M, Joyner A. Engrailed Homeobox Genes regulate Establishment of the Cerebellar Afferent Circuit Map. *J. Neurosci.* 2010; 30: 10015

Silva SP, Zago AM, Carvalho FB, Germann L, Colombo G de M, Rahmeier FL, Gutierrez JM, Reschke CR, Bagatini MD, Assmann CE, Fernandes M da C. Neuroprotective Effect of Taurine against Cell Death, Glial Changes, and Neuronal Loss in the Cerebellum of Rats Exposed to Chronic-Recurrent Neuroinflammation Induced by LPS. *J Immunol Res* 2021; 2021: 7497185

Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD, O'Leary DDM. Fate of Midbrain Dopaminergic Neurons Controlled by the Engrailed Genes. *J. Neurosci.* 2001; 21: 3126–3134

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: e0181350

Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res* 2011; 89: 1575–1585

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S. Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Rep* 2014; 8: 1271–1279

Strata P, Tempia F, Zagrebelsky M, Rossi F. Chapter 15: Reciprocal trophic interactions between climbing fibres and Purkinje cells in the rat cerebellum. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier, 1997: 263–282

Sudarov A, Joyner AL. Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Dev.* 2007; 2: 26

Takeo YH, Kakegawa W, Miura E, Yuzaki M. ROR α regulates multiple aspects of dendrite development in cerebellar Purkinje cells in vivo. *J. Neurosci.* 2015; 35: 12518-12534

Thermo Fisher Scientific, 2022a: Pierce™ GST Spin Purification Kit, 0.2 mL. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16106> (Zugriffsdatum: 04.02.2022)

Thermo Fisher Scientific, 2022b: Protein Standards & Ladders - DE. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis/protein-standards-ladders.html> (Zugriffsdatum: 08.01.2022)

Tong CK, Vidyadaran S. Role of microglia in embryonic neurogenesis. *Exp Biol Med* 2016; 241: 1669–1675

Toth E, Rasul SM, Berry M, Fulton D. A morphological analysis of activity-dependent myelination and myelin injury in transitional oligodendrocytes. *Sci Rep* 2021; 11: 9588

Toyoda S, Kawaguchi M, Kobayashi T, Tarusawa E, Toyama T, Okano M, Oda M, Nakauchi H, Yoshimura Y, Sanbo M, Hirabayashi M, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T. Developmental Epigenetic Modification Regulates Stochastic Expression of Clustered Protocadherin Genes, Generating Single Neuron Diversity. *Neuron* 2014; 82: 94–108

Tuddenham JF, Taga M, Haage V, Marshe VS, Roostaei T, White C, Lee AJ, Fujita M, Khairallah A, Zhang Y, Green G, Hyman B, Frosch M, Hopp S, Beach TG, Serrano GE, Corboy J, Habib N, Klein H-U, Soni RK, Teich AF, Hickman RA, Alcalay RN, Shneider N, Schneider J, Sims PA, Bennett DA, Olah M, Menon V, De Jager PL. A cross-disease resource of living human microglia identifies disease-enriched subsets and tool compounds recapitulating microglial states. *Nat Neurosci* 2024; 27: 2521-2537

Uddin LQ, Dajani DR, Voorhies W, Bednarz H, Kana RK. Progress and roadblocks in the search for brain-based biomarkers of autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Transl Psychiatry* 2017; 7: e1218

Vargas Abonce SE, Leboeuf M, Prochiantz A. Homeoprotein Neuroprotection of Embryonic Neuronal Cells. *eNeuro* 2019; 6: ENEURO.0061-19.2019

Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR. Autism spectrum disorder: Neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol* 2017; 134: 537–566

Varnum MM, Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch Immunol Ther Exp* 2012; 60: 251–266

Vergara D, Nigro A, Romano A, De Domenico S, Damato M, Franck J, Coricciati C, Wistorski M, Cardon T, Fournier I, Quattrini A, Salzet M, Furlan R, Maffia M. Distinct Protein Expression Networks are Activated in Microglia Cells after Stimulation with IFN- γ and IL-4. *Cells* 2019; 8: 580

Verhoeven JS, De Cock P, Lagae L, Sunaert S. Neuroimaging of autism. *Neuroradiology* 2010; 52: 3–14

Vogel V, Ji Z, Millen K, Joyner AL. The Engrailed-2 homeobox gene and patterning of spinocerebellar mossy fiber afferents. *Brain research. Dev. Brain Res.* 1996; 96: 210-218

Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci Rep* 2015; 5: 15159

Wang Y, Berezovska O, Fedoroff S. Expression of colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) by CNS neurons in mice. *J Neurosci Res* 1999; 57: 616–632

Weir RK, Forghany R, Smith SEP, Patterson PH, McAllister AK, Schumann CM, Bauman MD. Aberrant neuron morphology in a nonhuman primate model of maternal immune activation. *Brain Behav Immun* 2015; 48: 139–146

Widder K, Harauz G, Hinderberger D. Myelin basic protein (MBP) charge variants show different sphingomyelin-mediated interactions with myelin-like lipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* 2020; 1862: 183077

Willett Ryan T, Bayin NS, Lee AS, Krishnamurthy A, Wojcinski A, Lao Z, Stephen D, Rosello-Diez A, Dauber-Decker KL, Orvis GD, Wu Z, Tessier-Lavigne M, Joyner AL. Cerebellar nuclei excitatory neurons regulate developmental scaling of presynaptic Purkinje cell number and organ growth. *eLife* 2019; 8: e50617

Wilson MD, Sethi S, Lein PJ, Keil KP. Valid Statistical Approaches for Analyzing Sholl Data: Mixed Effects versus Simple Linear Models. *J Neurosci Methods* 2017; 279: 33–43

Woo M-S, Jang P-G, Park J-S, Kim W-K, Joh TH, Kim H-S. Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyryl-cAMP in BV2 microglial cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 113: 86–96

Woo M-S, Jung S-H, Hyun J-W, Kim H-S. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine gene expression by forskolin and dibutyryl-cAMP in lipopolysaccharide-stimulated murine BV2 microglial cells. *Neurosci Lett.* 2004; 356: 187–190

Wu R, Li X, Xu P, Huang L, Cheng J, Huang X, Jiang J, Wu L-J, Tang Y. TREM2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Mol Brain* 2017; 10: 20

Xie X, Luo X, Liu N, Li X, Lou F, Zheng Y, Ren Y. Monocytes, microglia, and CD200-CD200R1 signaling are essential in the transmission of inflammation from the periphery to the central nervous system. *J Neurochem* 2017; 141: 222–235

Xu M, Sulkowski ZL, Parekh P, Khan A, Chen T, Midha S, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. Effects of perinatal lipopolysaccharide (LPS) exposure on the developing rat brain; modeling the effect of maternal infection on the developing human CNS. *Cerebellum* 2013; 12: 572–586

Yao SY, Ljunggren-Rose A, Chandramohan N, Whetsell WO, Sriram S. In vitro and in vivo induction and activation of nNOS by LPS in oligodendrocytes. *J. Neuroimmunol.* 2010; 229: 146–156

Yi S, Jiang X, Tang X, Li Y, Xiao C, Zhang J, Zhou T. IL-4 and IL-10 promotes phagocytic activity of microglia by up-regulation of TREM2. *Cytotechnology* 2020; 72: 589–602

Yu K, Zhang Q, Liu Z, Zhao Q, Zhang X, Wang Y, Wang Z-X, Jin Y, Li X, Liu Z-X, Xu R-H. qPhos: a database of protein phosphorylation dynamics in humans. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: 451–458

Yuan J, Ge H, Liu W, Zhu H, Chen Y, Zhang X, Yang Yang, Yin Y, Chen W, Wu W, Yang Yunfeng, Lin J. M2 microglia promotes neurogenesis and oligodendrogenesis from neural stem/progenitor cells via the PPAR γ signaling pathway. *Oncotarget* 2017; 8: 19855–19865

Zaman T, Vogt D, Prokop J, Alshab QA, Simms G, Stafford A, Luikart BW, Williams MR. Kit Ligand and Kit receptor tyrosine kinase sustain synaptic inhibition of Purkinje cells. *eLife* 2024; 12: RP89792

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *J. Neurosci.* 2012; 32: 6391–6410

Zhang Chen, Deng Y, Dai H, Zhou W, Tian J, Bing G, Zhao L. Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Res.Bull* 2017; 128: 34–39

Zhang X, Yan F, Cui J, Wu Y, Luan H, Yin M, Zhao Z, Feng J, Zhang J. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Overexpression Inhibits Proinflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Stimulated Microglia. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 9340610

Zhang Z, Narayan S, Su L, Al-Alawyat H, Liu J, Kannan S. Cerebellar injury and impaired function in a rabbit model of maternal inflammation induced neonatal brain injury. *Neurobiol Learn Mem* 2019; 165: 106901

Zheng H, Jia L, Liu C-C, Rong Z, Zhong L, Yang L, Chen X-F, Fryer JD, Wang X, Zhang Y-W, Xu H, Bu G. TREM2 Promotes Microglial Survival by Activating Wnt/ β -Catenin Pathway. *J Neurosci* 2017; 37: 1772–1784

Zughaier SM, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS. Differential Induction of the Toll-Like Receptor 4-MyD88-Dependent and -Independent Signaling Pathways by Endotoxins. *Infect Immun* 2005; 73: 2940–2950

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im anatomischen Institut der Universität Bonn unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stephan L. Baader durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Baader.

Sämtliche Versuche inklusive der benötigten Tierversuche wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde von mir selbstständig generiert.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig unter Anpassung und Ergänzung eines in der Arbeitsgruppe bereits bestehenden R-Protokolls durch mich.

Ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Veröffentlichungen

Teile der Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

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

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

11. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Stephan Baader, danken, der mir jederzeit mit offenem Ohr zur Verfügung stand und bei Hürden und Problemen im Labor stets einen guten Anstoß oder Ratschlag geben konnte. Ich habe mich über die gesamte Zeit sehr gut betreut und im Verlauf der Dissertation von der Themenwahl bis zur Verfassung dieser Arbeit stets unterstützt gefühlt.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Karl Schilling bedanken, der maßgeblich zum Erfolg der Veröffentlichung unseres Papers beigetragen hat.

Eine weitere Würdigung gilt Sabine Molly-Klumbies und Stefanie Ramrath, die mir bei jeglichen Versuchen oder Problemen im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen, wie auch Andrea Christ, die trotz Zugehörigkeit zu einer anderen Arbeitsgruppe immer gute Ratschläge hatte. Für diese hervorragende Zusammenarbeit über das ganze Institut hinweg bin ich sehr dankbar.

Nicht unerwähnt bleiben soll auch Manuela Bolz, ohne deren Pflege der von mir verwendeten Mäuse diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zum Schluss gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mich über mein gesamtes Studium hinweg unterstützt und begleitet haben.