

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. Christian Rube

# **Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf Neuroinflammation im juvenilen und adulten Hippocampus**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2019

vorgelegt von:

Ben Hammer

geb. am: 24.02.1993 in Luxemburg

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Claudia Rube

2. Berichterstatter:

*Widmung*

*Meinen liebevollen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

## **EINFLUSS FRAKTIONIRTER NIEDRIG-DOSIS-BESTRAHLUNG AUF NEUROINFLAMMATION IM JUVENILEN UND ADULTEN HIPPOCAMPUS...I**

### **INHALTSVERZEICHNIS ..... I**

#### **1. ZUSAMMENFASSUNG ..... 1**

#### **2. EINLEITUNG ..... 3**

##### **2.1. Gyrus dentatus als Teil des Hippocampus ..... 3**

###### **2.1.1. Entwicklung und adulte Neurogenese ..... 3**

###### **2.1.2. Anatomie ..... 7**

###### **2.1.3. Zytoarchitektur und Neuronale Verschaltung ..... 7**

###### **2.1.4. Funktion ..... 9**

##### **2.2. Strahlung ..... 11**

###### **2.2.1. Physikalische Grundlagen ..... 11**

###### **2.2.2. Fraktionierte Strahlentherapie ..... 12**

###### **2.2.3. Biologische Strahlenschäden ..... 13**

###### **2.2.4. Niedrig-Dosis-Strahlung ..... 16**

##### **2.3. Immunhistochemie und Immunfluoreszenz ..... 17**

##### **2.4. Mikroglia ..... 18**

###### **2.4.1. Neuroinflammation ..... 18**

###### **2.4.2. Herkunft und Entwicklung der Mikroglia ..... 19**

2.4.3. Normalverteilung der Mikroglia und altersbedingte Neuroinflammation .....	20
2.4.4. Mikrogliale Funktion und Aktivierung .....	21
2.4.5. Marker zum Nachweis der Mikroglia und Gewebemakrophagen.....	23
2.5. Fragestellung im Rahmen der Dissertation .....	25
<b>3. MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>26</b>
3.1. Versuchstiere .....	26
3.2. Tierhaltung .....	26
3.3. Bestrahlungsprotokoll.....	26
3.4. Tötung der Tiere und Herstellung der Gewebeschnitte .....	28
3.5. Färbungsprotokoll: Iba-1 Antikörper .....	28
3.6. Auszählung mittels Fluoreszenzmikroskop .....	29
3.6. Statistische Auswertung.....	30
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
4.1. Bestrahlte juvenile C57BL6 Mäuse .....	31
4.1.1 Juvenil 5x 100mGy 72h, 10x 100mGy 72h.....	31
4.1.2. Juvenil 15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1Mo. ....	32
4.1.3. Juvenil 20x 100mGy 3 Mo. und 20x 100mGy 6 Mo.....	34
4.2. Bestrahlte adulte C57BL6 Mäuse .....	35
4.2.1. Adult 5x 100mGy 72h, 10x 100mGy 72h .....	35
4.2.2. Adult 15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1Mo.....	36
4.2.3. Adult 20x 100mGy 3 Mo., 20x 100mGy 6Mo. ....	38
4.3. Vergleich bestrahlter juveniler und adulter Mäuse.....	39

<b>4.4. Verteilung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen Stratum granulare und Hilus.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.1. Verteilung bei juvenil 5x 100mGy 72h und 20x 100mGy 72h .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.2. Verteilung bei adult 5x 100mGy 72h und 20x 100mGy 72h .....</b>	<b>41</b>
<b>4.5. Iba-1<sup>+</sup>Zellen im unbestrahlten alternden Gyrus dentatus und Hilus.....</b>	<b>42</b>
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Interpretation der Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Kritische Betrachtung der Methodik .....</b>	<b>46</b>
<b>5.3. Vergleichbare Studien .....</b>	<b>49</b>
<b>5.4. Schlussfolgerung.....</b>	<b>51</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>52</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>64</b>

**Abkürzung- und Einheitenverzeichnis**

53BPI	p53 Binding Protein 1
$\gamma$ H2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX
$\Gamma$	Gamma
AIF1	Allograft Inflammatory Factor 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2-Associated X Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CA, CA1, CA2, CA3, CA4	Cornu Ammonis (Region 1, 2, 3, 4)
CD11b, CD45, CD68	Cluster of Differentiation 11b, 45, 68
cDNA	Complementary DANN
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CR3	Complement Receptor 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DCX	Doublecortin
DANN	Deoxyribonucleid Acid
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
GFAP	Gial Fibrillary Acidic Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GZS	Granularzellschicht
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-Antigen D Related
Iba-1	Allograft Inflammatory Factor 1
ICAM-2	Intercellular Adhesion Molecule 2

IL-3, IL-4...	Interleukin 3, Interleukin 4...
INF $\gamma$	Interferon Gamma
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
JAK2	Januskinase 2
KU70/KU80	KU70/KU80 Heterodimer
LET	Linearer Energietransfer
LIG4	DNA Ligase 4
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MHC II/III	Major Histocompatibility Complex II/III
MRF-1	Mitochondrial Peptide Chain Release Factor 1
MRN-Komplex	Reparaturproteinkomplex aus Mre11p, Rad50 und NBS1
NBS1	Nibrin
NeuN	Neuronal Nuclei
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sup>2</sup>	Stickstoffdioxid
NOS	NO-Synthase
OH·	Hydroxyl-Radikal
PAXX	Non-Homologues End Joining Factor
PBS	Phosphate Bufferd Salin
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGD2	Prostaglandin D2

PKc	Proteinkinase C
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RAC1	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RANTES	Regulated on Activation Normal Expressed and Secreted
RG-Zellen	Radial-Glia-Zellen
SGS	Subgranularzellschicht
SOX-2	Sex determining region Y-BOX-2
Str.gran.	Stratum granulare (siehe GZS)
STAT1	Signal Transducer and Activation of Transcription 1
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tmem119	Transmembrane Protein 119
XLF	XRCC4-like Factor
XRCC4	X-ray Repair Cross-Complementing Protein 4
ZNS	Zentralnervensystem

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
Gy	Gray (1 Gray = 1 Joule pro kg)
H	Stunde
J	Joule

Da	Dalton
KeV	Kiloelektronenvolt
G	Gramm
M	Meter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
Min	Minuten
Mo.	Monate
MV	Megavolt

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 2-1: Stadien der adulten Neurogenese</i> .....	6
<i>Abbildung 2-2: Interne Hippocampusverschaltung</i> .....	9
<i>Abbildung 2-3: Homologe Rekombination</i> .....	15
<i>Abbildung 2-4: Mikrogliale Aktivierung</i> .....	23
<i>Abbildung 3-1: Darstellung des Bestrahlungsprotokolls</i> .....	27
<i>Abbildung 3-2: Vorgehen bei der Oberflächenberechnung</i> .....	30
<i>Abbildung 4-1: Ergebnisse juvenil 5x 100mGy 72h /10x 100mGy 72h</i> .....	31
<i>Abbildung 4-2: Ergebnisse juvenil 15x 100mGy 72h/ 20x 100mGy 72h/ 20x 100mGy 1Mo</i> .....	32
<i>Abbildung4-3: Ansicht juvenil Kontrolle,15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1Mo</i> .....	33
<i>Abbildung 4-4: Ergebnisse juvenil 20x 100mGy 3Mo. /20x 100mGy 6Mo</i> .....	34
<i>Abbildung 4-5: Ergebnisse adult 5x 100mGy 72h /10x 100mGy 72h</i> .....	35
<i>Abbildung 4-6: Ergebnisse adult 15x 100mGy 72h/ 20x 100mGy 72h/20x 100mGy 1Mo</i> ...	36
<i>Abbildung 4-7: Ansicht adult Kontrolle,15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1Mo</i> .....	37
<i>Abbildung 4-8: Ergebnisse für adult 20x 100mGy 3Mo. /20x 100mGy 6Mo</i> .....	38
<i>Abbildung 4-9: Übersicht der bestrahlten juvenilen und adulten C57Bl6 Mäuse</i> .....	39
<i>Abbildung 4-10: Verteilung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen dem juvenilen Str.gran. und Hi- lus</i> .....	40
<i>Abbildung 4-11: Verteilung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen dem adulten Str.gran. und Hi- lus</i> .....	41
<i>Abbildung 4-12: Vergleich der unbestrahlten Mäuse verschiedenen Alters</i> .....	42

# 1. Zusammenfassung

## Zielsetzung

Bei einer Radiotherapie im Kopf-Hals-Bereich kommt es unbestreitbar zur Einwirkung von niedrigen Dosen im Bereich des Gehirns. Eine wichtige Region des Gehirns stellt der Hippocampus dar, der durch die Fähigkeit zur adulten Neurogenese einen essentiellen Bestandteil der kognitiven Leistung erfüllt. Diese kognitive Leistung kann altersbedingt durch eine veränderte Neuroinflammation moduliert werden. Eine Untersuchung, der möglicherweise durch fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung ausgelöste und sich chronifizierende Neuroinflammation im juvenilen und adulten Gyrus dentatus, ist in diesem Zusammenhang von hohem Interesse.

## Methode und Materialien

Der Einfluss einer täglichen 100mGy Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Neuroinflammation, wurde durch eine Quantifizierung von Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Bereich des Gyrus dentatus untersucht. Insgesamt wurden 82 C57BL6 Mäuse in diesem Versuchsaufbau untersucht, wobei jeweils die bestrahlten Gruppen den Bedingungen 5x 100mGy, 10x 100mGy, 15x 100mGy und 20x 100mGy ausgesetzt wurden. Die Gehirnentnahme erfolgte hierbei 72h nach Bestrahlungsende. Zusätzlich erfolgte nach fraktionierter Bestrahlung mit 20x 100mGy eine histologische Untersuchung 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach der letzten Strahlenexposition, um auch die Langzeitauswirkungen der fraktionierten Niedrig-Dosis-Strahlung auf die Neuroinflammation ermitteln zu können.

## Ergebnisse

Sowohl für die juvenilen als auch für die adulten Versuchstiere gab es 72h nach 15x 100mGy und 20x 100mGy sowie 1 Monat nach 20x 100mGy einen signifikanten Anstieg der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Bereich des Gyrus dentatus. Dabei war die Zahl der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen tendenziell höher im Stratum granulare des Gyrus dentatus als in dessen Hilus. Ein signifikanter altersbedingter Anstieg der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus war zusätzlich zu verzeichnen.

## Schlussfolgerung

Fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu einer signifikante Neuroinflammation sowohl im juvenilen als auch im adulten Hippocampus. Diese Neuroinflammation ist auch 1 Monat nach Bestrahlungsende noch deutlich detektierbar. Die Neuroinflammation scheint sich dabei auf das zellreiche Stratum granulare, anstatt auf den Hilus des Gyrus dentatus zu konzentrieren.

### **Purpose**

It is undeniable, that during radiation therapy of the head and neck area, the brain is exposed to low-dose radiation. An important region is surely the hippocampus, which, with his capacity of adult neurogenesis, fulfils an essential part of the cognitive performance. This cognitive performance can be modulated age-related by a changed neuroinflammation. It is for this reason that an investigation into possible low-dose-irradiation-induced and chronic neuroinflammation of the adult and juvenile dentate gyrus, is of great interest.

### **Methods and Materials**

The influence of a daily 100mGy low-dose-irradiation, is monitored by quantification of Iba-1<sup>+</sup>cells in the dentate gyrus. In total, 82 C57BL6 mice were examined during this experimental setup, whereby the irradiated groups were exposed to 5x 100mGy, 10x 100mGy, 15x 100mGy and 20x 100mGy. Acquisition of the brain occurred 72h post-irradiation. Furthermore, to study the long-term effects of fractionated low-dose-irradiation on neuroinflammation, additional histological investigations were performed on 20x 100mGy cohorts 1 month, 3 months and 6 months past-irradiation.

### **Results**

Juvenile, as well as, the adult mice, showed a significant increase in Iba-1<sup>+</sup>cells in the dentate gyrus after the conditions 15x 100mGy and 20x 100mGy, with investigation 72h post-irradiation, as well as 1 month after the condition 20x 100mGy. Thereby, the number of Iba-1<sup>+</sup>cells was tendentially higher in the stratum granulare of the dentate gyrus than in the corresponding hilus. Furthermore, a significant age-related increase of Iba-1<sup>+</sup>-cells in the dentate gyrus was detected.

### **Conclusions**

Fractionated low-dose-irradiation causes significant neuroinflammation in the juvenile and adult hippocampi. This neuroinflammation is detectable even 1 month after irradiation. Evidently, the focus of the neuroinflammation seems to lie in the cell-rich stratum granulare rather than the corresponding hilus.

## 2. Einleitung

Die Radiotherapie stellt besonders bei Tumoren des ZNS im Kindesalter eine häufig angewendete Therapiemöglichkeit dar. Häufig auftretende Tumore sind hierbei unter anderem Medulloblastome, primitive ektodermale Tumore oder auch Gliome. Bei einer entsprechenden Strahlentherapie kann es jedoch unmittelbar zu Nebenwirkungen kommen, wobei im Rahmen der Langzeit-Nebenwirkungen (neben potentiellen Sekundärtumore), auch neurokognitive Einschränkungen auftreten können (Hoffman und Yock 2009). Die kognitive Leistungsfähigkeit wird in besonderer Weise durch die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus bestimmt (Gross 2000). Im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen kann eine potentielle Neuroinflammation zu einer Schädigung des Hippocampus und somit zu einer Verschlechterung der kognitiven Leistung führen (Bartsch und Wulff 2015). Eine solche Neuroinflammation kann auch nach Exposition mit ionisierender Strahlung auftreten und ist häufig mit einer mikroglialen Aktivierung assoziiert. So kommt es durch Strahleneinwirkung zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine, wie auch zu einem vermehrten Auftreten von reaktiven Prozessen, die schließlich einen persistierenden oxidativen Stress im Gewebe des ZNS auslösen (Tofilon und Fike 2000). Des Weiteren führt ionisierende Strahlung nachweislich zu einem Anstieg der mikroglialen und endothelialen Zellen im betroffenen Gebiet (Kalm et al. 2009). Ob und in welchem Maße auch niedrige Strahlendosen, die über einen längeren Zeitraum wiederholt appliziert werden, einen neuroinflammativen Effekt haben, ist bislang nur wenig erforscht.

### 2.1. Gyrus dentatus als Teil des Hippocampus

#### 2.1.1. Entwicklung und adulte Neurogenese

Allgemein beginnt die Entwicklung des gesamten Nervensystems bereits in der dritten Embryonalwoche. Hierbei gehen die Nervenzellen aus dem äußeren Keimblatt hervor. Am rostralen Ende des offenen Neuralrohrs, das nach Abfaltung der Neuralplatte entstanden ist, entwickeln sich drei primäre Hirnbläschen, die die Anlagen für Vorder-, Mittel- und Hinterhirn darstellen. Aus diesen drei primären Hirnbläschen gehen die fünf sekundären Hirnbläschen hervor, die auch die Vorlage für die fünf distinkten Hauptanteile des Gehirns bilden. Das ZNS ist bereits in der achten Embryonalwoche fast vollständig angelegt (Schünke et al. 2012).

Die Hippocampusformation, als Teil des limbischen Systems, bildet sich während der Entwicklung im dorso-medialen Anteil des Endhirns aus. Die mediale Wand der Endhirnhemisphäre wird dabei durch Einstülpungen der Hirnbläschen des Telencephalons gebildet. Die kortikalen Hemisphären nehmen ihrerseits ihren Ursprung von der dorsalen Mittellinie. Der Hippocampus, zusammen mit seiner strukturellen Untereinheit, dem Gyrus dentatus, gehen aus jener kortikalen Hemisphäre hervor (Grove et al. 1998).

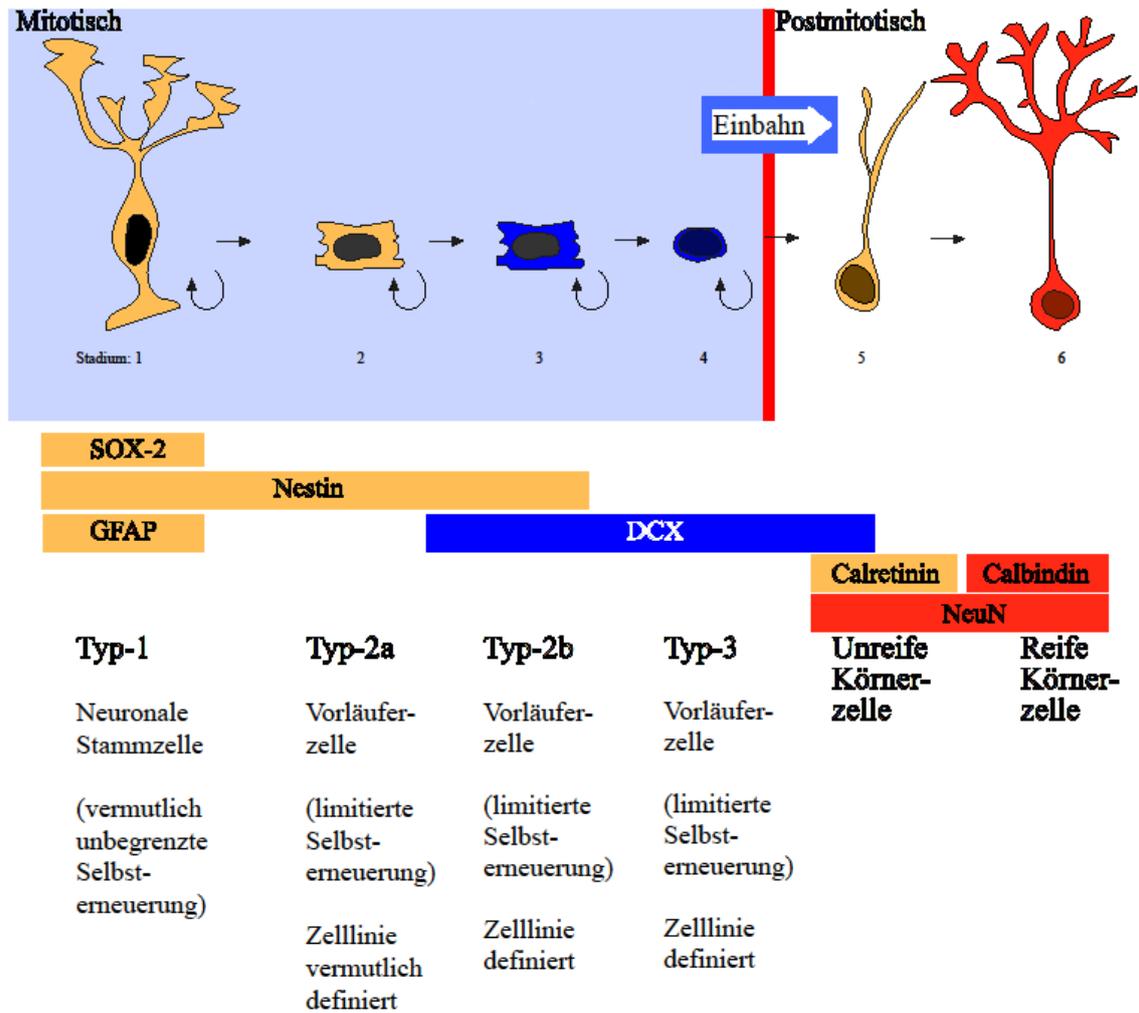
Der Ursprung, der für den Aufbau des Gyrus dentatus verantwortlichen Granularzellen sind die sogenannten Radial-Glia-ähnlichen Zellen, die mutmaßlich Stammzellen des ZNS darstellen. Zudem sind diese Radial-Glia-Zellen, die auch als Interneurone bezeichnet werden, in der Lage als Leitschiene zur Migration der postmitotischen Zellen von ihrer Proliferationszone zum endgültigen Zielareal zu fungieren. Dazu dienen die von den RG-Zellen ausgehenden Radial-Glia-Fasern als entscheidende Führungslinien. Beeinflusst scheinen die RG-Zellen weiterhin auch durch die von Ramon y Cajal entdeckten und nach ihm benannten Cajal-Retzius-Zellen zu werden (Rakic 1972; Soriano et al. 1997; Gubert et al. 2009). Die Cajal-Retzius-Zellen, sowie GABAerge Interneurone sind in der Lage für die Hippocampus-Entwicklung essentielle Signalmoleküle zu produzieren. Hierbei handelt es sich um ein extrazelluläres Matrixprotein, genannt Reelin (D'Arcangelo et al. 1995). Das Reelin unterstützt einerseits die oben beschriebene Migration der Vorläuferzellen an ihren Bestimmungsort, andererseits konnte auch in Evidenz gesetzt werden, dass es bei einem Fehlen von Reelin, zu strukturellen Fehlern bei der Laminierung des Hippocampus und des anteiligen Gyrus dentatus kommt (Caviness und Rakic 1978; Ikeda und Terashima 1997).

Der Gyrus dentatus nimmt eine besondere Stellung ein, da sein zytoarchitektonisches Muster auf zwei Quellen der Neurogenese zurückzuführen ist. Die Stammzellen der Granularzellen migrieren früh von der Subventrikularzone des Neuroepithels zur Fimbria Hippocampi, eine dem Gyrus dentatus aufliegende Struktur, bestehend aus Substantia alba. Die beschriebenen Stammzellen wandern weiter von der Ventrikularschicht zur präformierten Anlage des Gyrus dentatus, nahe der Pia-Oberfläche. Sie bilden dort schließlich, nach ihrer Einnistung, die äußeren Zellareale der Körnerzellschicht (Stanfield und Cowan 1979; Rickmann et al. 1987). Als zweite Quelle dienen wiederum Stammzellen, die ihren Ursprung ebenfalls im bereits genannten Neuroepithel des Hippocampus finden. Diese Stammzellen behalten jedoch, im Gegensatz zu den erstgenannten, ihre Fähigkeit zur Mitose. Sie wandern in den Hilus des Gyrus dentatus ein und migrieren nach kurzer Zeit weiter in die Subgranularzellschicht (SGS), eine sich

zwischen Hilus und Granularzellschicht (GZS) befindliche Schicht. (Altman und Bayer 1990; Shetty und Turner 1996; Chanas-Sacre et al. 2000; Li et al. 2011).

In welchem Maße sich diese Stammzellen im Zuge der adulten Neurogenese teilen und entwickeln hängt nun stark von äußeren Reizen wie z.B. einem Trauma oder dem vorherrschenden Hormonhaushalt ab. Auch die Umgebung, die im Gegensatz zu den Stammzellen ein statisches System darstellt, scheint die neuronale Proliferation zu beeinflussen. Teilt sich nun eine auch als Typ-1 Zelle bezeichnete Stammzelle, so vollzieht sie dies unter asymmetrischer Zellteilung. Aus einer Stammzelle entsteht hierbei eine Vorläufer- und eine Stammzelle, die weiterhin als Reserve der adulten Neurogenese dient. Die auch Typ-2 genannte Vorläuferzelle kann sich weiter teilen, um sich dann zunehmest von einer unreifen zu einer reifen Granularzelle zu entwickeln. Die Fähigkeit zur Mitose geht ab dem Stadium der unreifen Granularzelle verloren. Eine Vorläuferzelle, die bereits eine eindeutige Differenzierung zeigt und sich kurz vor dem Stadium der unreifen Granularzelle befindet wird als Typ-3 Zelle bezeichnet. Es sei angemerkt, dass der größte Teil der Zellen im Zuge der Neurogenese durch Apoptose eliminiert werden, sodass nur wenige Zellen das Stadium der Granularzelle erreichen und funktionell integriert werden. Dabei existieren die verschiedenen Stadien gleichzeitig im selben Gyrus dentatus. Um die verschiedenen Zellpopulationen in der komplexen Zytoarchitektur des Gyrus dentate eindeutig detektieren zu können, sind spezifische Marker nötig (Kempermann et al. 2004).

Die multipotenten neuronalen Stammzellen können sowohl zu neuronalen, wie auch astrozytären Vorläuferzellen differenzieren. Mit dem Transkriptionsfaktor SOX-2 „*sex determining region Y-box2*“, können neuronale Stammzellen nachgewiesen werden, allerdings ist SOX-2 auch ein Marker für adulte Astrozyten (Suh et al. 2007). Ein anderer Marker für neurale Stammzellen ist GFAP (Glia Fibrillary Acid Protein), das in Kombination mit Nestin als Nachweis der Typ-1 Stammzellen gelten kann. Das als intermediär bezeichnete Stadium der Typ-2a Zellen ist spezifisch durch den Nachweis von Nestin abzugrenzen. Die Typ-2b Zellen lassen sich durch DCX(Doublecortin) und Nestin unterscheiden. Ab der Typ-3 Zelle, dem Stadium das als letztes noch eine mitotische Potenz besitzt, lässt sich lediglich noch DCX detektieren. Die unreife, sowie die reife Granularzellen sind spezifisch mit dem postmitotischen Marker, NeuN zu identifizieren. Sie unterscheiden sich jedoch wiederum durch die Expression von Calretinin in unreifen Körnerzellen und von Calbindin in reifen Granularzellen. (Kempermann et al. 2004; Nicola et al. 2015)



**Abbildung 2-1: Stadien der adulten Neurogenese**

Darstellung der Zelltypen und spezifischen Markern, die zur Unterscheidung der unterschiedlichen Entwicklungsstadien der neuronalen Stammzellen während der adulten Neurogenese dienen (modifiziert nach Kempermann et al. 2004).

Die Fähigkeit der neuronalen Stammzellen, sich im adulten Individuum zu teilen, nimmt nachweisbar mit zunehmendem Alter ab (Kuhn et al. 1996). Es hat sich zudem gezeigt, dass die adulten Stammzellen nur innerhalb der neurogenen Zonen des Gyrus dentatus sowie des Bulbus olfactorius ihr neurogenes Potential behalten. Dafür verantwortlich scheinen spezialisierte Astrozyten zu sein, die über Signalmoleküle die Mitosen der Stammzellen steuern (Ming und Song 2005).

### **2.1.2. Anatomie**

Die paarig vorliegende Hippocampus-Formation ist Teil des Lobus temporalis und stellt den medio-basalen Abschluss der Großhirn-Hemisphären da. Zur Hippocampus-Formation, der den größten Anteil des Archicortex stellt, zählen Gyrus dentatus, Cornu ammonis und Subiculum. Die verschiedenen Abschnitte des Hippocampus werden relativ zu ihrer Lage zum Corpus callosum eingeteilt. Das Corpus callosum bildet dabei die größte Kommissur und ist richtungsweisend. Je nach Lage wird der Hippocampus retrocommissuralis, supracommissuralis sowie precommissuralis unterschieden. Bei Sicht von lateral-oben auf das Unterhorn wird die Hippocampus-Formation als Pes hippocampi mit den Digitationes hippocampi sichtbar. Im Frontalschnitt durch den Pes hippocampi sind der Gyrus parahippocampalis erkennbar, der jedoch nur zu einem geringen Teil zum Hippocampus gehört. Dieser Anteil hat Kontakt zum Gyrus dentatus und wird als Subiculum bezeichnet. Das Cornu ammonis, das wegen seiner Zytoarchitektur und neuronaler Verschaltung in vier Anteile gegliedert wird, liegt gegenüber dem Gyrus dentatus. Er wird mehreren Autoren zufolge auch als Hippocampus proprius bezeichnet. Der Gyrus dentatus zeigt eine starke Zahnung und ist durch den Sulcus hippocampalis vom Gyrus hippocampalis getrennt. Die Fimbria hippocampi, die in den Fornix übergeht, bildet den essentiellen Ausgang des Hippocampus (Aumüller und Wurzinger 2010).

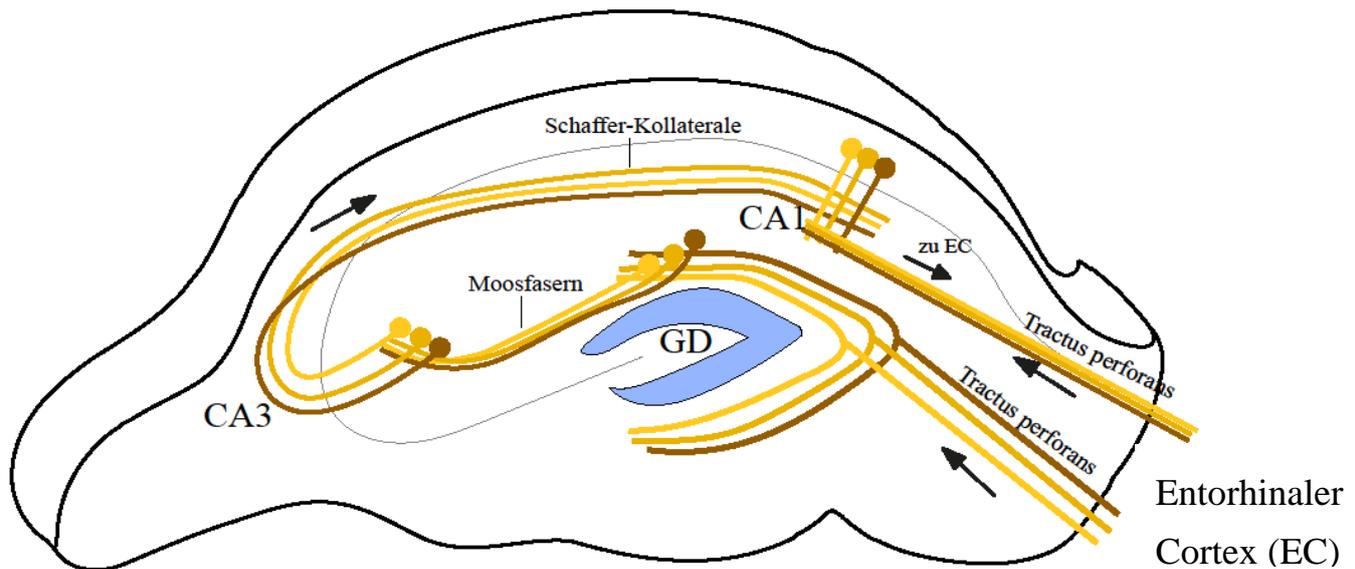
### **2.1.3. Zytoarchitektur und Neuronale Verschaltung**

Der Gyrus dentatus zeigt bei der Ratte, der Maus, dem Affen und dem Menschen speziesübergreifend einen trilaminären Aufbau, wobei es zwischen den Arten einen Unterschied hinsichtlich der Dichte an Körnerzellen gibt. So zeigt sich bei der Ratte eine höhere Dichte an Granularzellen als beim Menschen. Es ist anzumerken, dass im Gegensatz zu anderen Anteilen des Gehirns, die Verschaltungen innerhalb der Hippocampus-Formation von unidirektionaler Natur sind (Amaral et al. 2007).

Wie bereits genauer erläutert, unterteilt sich der Hippocampus in den Gyrus dentatus, das Subiculum, den entorhinalen Cortex sowie das Cornu ammonis, der weiter in die Bereiche CA1, CA2, CA3 und CA4 unterteilt werden kann. Der Gyrus dentatus zeigt eine V- oder U-förmige Konfiguration mit einem im Inneren gelegenen Hilus. Es kann ein suprapyramidaler Schenkel, der an die Hippocampalfissur grenzt, von einem ihm gegenüberliegenden infrapyramidalen Schenkel unterschieden werden. Die Spitze, an der beide Schenkel zusammentreffen, wird allgemein als Kamm bezeichnet. Der Gyrus dentatus präsentiert sich auf histologischer Ebene dreischichtig. Erstens sei hier die Molekularschicht, in der unter anderem die Fasern des Tractus

perforans, sowie die Dendriten der Pyramidenzellen des CA und der Körnerzellen des Gyrus dentatus enden, zu nennen. Es folgt die Granularzellschicht, in der die größte Zelldichte besteht und die Perikarya der Körnerzellen vorherrschend sind. Als letztes folgt das Stratum multiforme, das einige polymorphe Zellen, sowie hauptsächlich Axone der Granularzellen enthält. Diese Axone sammeln sich und bilden schließlich die sogenannten Moosfasern. Die Moosfasern wurden schon früh im Jahre 1955 von Ramon y Cajal beschrieben. Ihren Namen verdanken sie ihrem moosigen Anschein bei Darstellung mittels Golgi-Technik. Beachtet man jedoch jetzt nebenbei noch die Kapazität der adulten Neurogenese des Gyrus dentatus, so muss noch einmal eine der Granularzellschicht basal gelegene Schicht unterschieden werden, die sog. Subgranularzellschicht. Sie enthält die mitotisch potenten Stammzellen. Auch das CA (Hippocampus proprius) zeigt auf mikroskopischer Ebene eine laminäre Aufteilung. Auf der Außenseite präsentiert sich das Stratum moleculare, das die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen des Stratum pyramidale, sowie die aus der Regio entorhinalis kommenden Axone enthält. Im darauffolgenden Stratum radiatum ist die Schaffer-Kollaterale anzutreffen. Hierbei handelt es sich um eine Kollaterale, die von Pyramidenzellen anderer Regionen des CA ausgeht und für eine innere Verbindung der verschiedenen CA Anteile sorgt. Die Pyramidenzellen des CA befinden sich im Stratum pyramidale (Amaral und Witter 1989; Aumüller und Wurzing 2010).

Information gelangen auf unidirektionalem Weg über den entorhinalen Cortex zum Hippocampus. Diese Signale stammen aus neocortikalen Anteilen, die wiederum über den parahippocampalen und perirhinalen Cortex zum entorhinalen Cortex gelangen (van Strien et al. 2009). In der Hippocampus-Formation projizieren die Neuronen der Schicht 2 des Tractus perforans zum Gyrus dentatus (Strange et al. 2014). Über die bereits beschriebenen Moosfasern gelangen die Signale von der Granularzellschicht des Gyrus dentatus über trisynaptische Verbindungen weiter zu CA3. Die Informationen werden daraufhin über die Schaffer-Kollaterale zu CA1 weitergeleitet. Zudem gelangen aber auch direkte Signale von den Neuronen des entorhinalen Cortex über den Tractus perforans zur CA1 Region. Der Output findet schließlich über die Pyramidenzellen der CA1 Region zu den tiefen Schichten des entorhinalen Cortex und zu kortikalen/subkortikalen Regionen statt (Bartsch und Wulff 2015).



**Abbildung 2-2: Interne Hippocampusverschaltung**

Die interne Verbindung findet ihren Eingang am entorhinalen Cortex (EC), um dann über den Tractus perforans zum Gyrus dentatus zu gelangen. Die Signale werden dann über die Moosfasern zu CA3 weitergeleitet, um über die Schaffer-Kollaterale die CA1 Region zu erreichen. Der Ausgang findet durch die Pyramidenzellen von CA1 zurück zum EC statt. (Inkomplette Darstellung aller Verbindungen, angelehnt an (Bartsch und Wulff 2015))

### 2.1.4. Funktion

Bereits frühe Studien und Therapiekonzepte brachten hervor, dass die episodische Gedächtnisbildung auf essentielle Art und Weise an die Hippocampusformation gebunden ist. So konnte festgestellt werden, dass es bei Alzheimer-Patienten, bei denen eine progressive Schädigung der medialen Temporallappen vorlag, ein Verlust der Fähigkeit der räumlichen und episodischen Gedächtnisbildung eintrat (Kolb et al. 2015). Der wohl berühmteste Patient in Zusammenhang mit der Hippocampus-Erforschung ist Henry Gustav Molaison, der bis zu seinem Tode intensiv studiert wurde. Er litt seit jungen Jahren an Epilepsieanfällen, die auf den rechten, sowie linken medialen Temporallappen zurückzuführen waren. Nach therapeutischer Entfernung beider Lappen, war der Patient frei von Epilepsieanfälle, jedoch kam es zu einer ausgeprägten, anterograden Amnesie. Henry war nicht mehr in der Lage neue Ereignisse im deklarativen Langzeitgedächtnis abzuspeichern (Scoville und Milner 1957).

Die Hippocampus-Formation ist beim Menschen zuständig für die Bildung des deklarativen Gedächtnisses, zudem auch das episodische Gedächtnis gehört. Desweiteren ist es aber auch für die zeitlich-räumliche Gedächtnisbildung zuständig (Burgess et al. 2002). Dabei besteht beim Menschen ein Unterschied zwischen der rechten und linken Hemisphäre. Während die rechte Hippocampushälfte für das Gedächtnis in Zusammenhang mit den visuell-räumlichen Beziehungen zuständig ist (Smith und Milner 1981), ist die linke Hemisphäre für das sprachlich-erzählerische Gedächtnis verantwortlich (Frisk und Milner 1990). Bei Tieren konnte festgestellt werden, dass vor allem das räumliche Gedächtnis prädominant zu sein scheint. In diesem Zusammenhang sollten die sogenannten "place cells" erwähnt sein. Bei Ratten hat sich gezeigt, dass spezifische Neuronen des Hippocampus für die Assoziation mit einer räumlichen Gegebenheit im Zuge der Gedächtnisbildung zuständig sind. So konnte zudem auch eine bestimmte Region des Hippocampus (in CA1 und CA3) einem spezifischen Ort in der Umgebung zugeordnet werden. So zeigten diese Neurone eine erhöhte Feuerrate, wenn sich für die Ratte an einem Punkt in der Umgebung eine gegebene Situation veränderte. Es prägte sich der Begriffe der "inneren kognitiven Karte" (O'Keefe und Dostrovsky 1971; O'Keefe 1976)

Die Informationen die zum Hippocampus weitergeleitet werden, stammen in erster Linie aus uni- sowie polymodalen Assoziationsarealen. Über den perirhinalen sowie parahippocampalen Cortex gelangen diese Informationen dann weiter zum entorhinalen Cortex, der diese dann schlussendlich an den Hippocampus gibt (Schmidt et al. 2017). Im Hippocampus kommt es wegen der Verschaltung mittels eines positiven Feedbacks zu einer Langzeitpotenzierung. In der Hippocampus-Formation werden wahrscheinlich jedoch nur „Gedächtnisspuren“ erstellt, während die Speicherung vermutlich im assoziativen Kortex des Temporallappens, im Zwischenhirn sowie auch teilweise im Hippocampus selbst stattfindet (Aumüller und Wurzinger 2010).

Die oben genannte Langzeitpotenzierung ist auf zellulärer Ebene auf eine hohe Frequenz der Öffnung der postsynaptischen NMDA-Kanäle zurückzuführen, bei der große Mengen an Kalzium in die Zellen einfließen und die Enzymaktivität modulieren. Es resultiert eine rezeptorvermittelte Empfindlichkeitssteigerung für das Glutamat, sowie eine Aktivierung der NO-Synthase. Das NO kann an die Präsynapse diffundieren und die Empfindlichkeit der Überträgerstoffe erhöhen. Auch die Anzahl der Spines kann z.B. durch den Nerv Growth Factor erhöht werden. Eine wichtige Rolle bei der korrekten Langzeitpotenzierung spielt zudem eine ungestörte Proteinbiosynthese, da sich herausgestellt hat, dass eine bestimmte Antibiotikagabe bei Ratten zu einer Hemmung des Langzeitgedächtnisses führt (Schmidt et al. 2017).

Der Gyrus dentatus spielt dabei eine wichtige Rolle, da er als Eingangstor zur Hippocampus-Formation gilt (Wright und Jackson 2014). Dies hat sich bereits bei der näheren Erläuterung der Hippocampus-internen Verschaltung bewiesen.

## 2.2. Strahlung

### 2.2.1. Physikalische Grundlagen

Strahlung findet heutzutage in der Medizin ihre Anwendung sowohl in der Radiologie, wie auch in der Nuklearmedizin. Dabei handelt es sich bei Strahlung um nichts anderes als Energie in Bewegung. Diese Energie kann in Form von elektromagnetischen Wellen oder nach der dualistischen Theorie in Form von Photonen vorliegen. Zu dieser Form der Strahlung gehören unter anderem die  $\gamma$ - sowie die Röntgenstrahlung. Des Weiteren ist die Teilchenstrahlung eine zweite Form der Strahlung. Bei dieser Art der Strahlung wird die Energie durch Korpusküle wie z.B. Elektronen oder Protonen übertragen (Tonnessen und Pounds 2011).

Da in der Strahlentherapie die Wirkung der eingesetzten Strahlung ein vorhersagbares Ergebnis liefern soll, ist das Wissen um die Strahlendosis, die der physikalischen Größe der Energiedosis entspricht, unumgänglich. Dabei entspricht die vom Medium aufgenommene Strahlenenergie der Energiedosis. Sie wird also aus dem Quotienten Energie/Masse(J/kg) gebildet und trägt die S.I. Einheit Gray (Gy). Die Energiedosis von 1Gy erzeugt bei einem aus Wasser bestehenden Würfel von  $1\text{cm}^3$  etwa  $10^5$  Ionisationen. Ionisation bedeutet dabei, dass durch Teilchenstrahlung, aber auch elektromagnetische Strahlung, Kollisionen mit einem Atom oder Molekül entstehen, und dabei Elektronen aus dessen Hülle herausgeschlagen werden. Die hier ablaufende Energieübertragung folgt jedoch solch einer Stochastik, dass ein bestrahlter Körper eine räumlich ungleichmäßige Verteilung der Ionisationen innerhalb seines Volumens aufweist. Bei der Interaktion von Photonen oder Elektronen mit einem Medium kommt es zu Schwächungen und Energieumwandlungen. Schwächungen bei der  $\gamma$ -Strahlung wären etwa der photoelektrische Effekt, die Paarbildung wie auch der Compton-Effekt. So werden beim Paarbildungs- und Compton-Effekt sekundäre Elektronen gebildet und es resultieren wiederum Photonen, die aber an Energie verloren haben. Es kommt zu einer Energieumwandlung, wobei die Energie der Photonen in kinetische Energie von sekundären Elektronen oder Positronen umgewandelt wird. Diese Umwandlung kann teilweise oder auch ganz, wie z.B. beim photoelektrischen Effekt, vorkommen. Die sekundären Elektronen ihrerseits geben ihre kinetische Energie über atomare Anregungen, Ionisationen oder über die Photon-emittierende Bremsstrahlung wieder ab. Diese Wechselwirkungen der sekundären Elektronen finden auch bei der primären Bestrahlung

mittels Elektronen statt. Es kommt zu unelastischen Kollisionen der beschleunigten Elektronen und den atomaren Hüllenelektronen. Das betroffene Atom kann dabei ionisiert oder lediglich angeregt werden. Wiederum zu erwähnen ist auch hier die Bremsstrahlung, bei der ein Verlust der kinetischen Energie des beschleunigten Elektrons stattfindet. Das Elektron erfährt bei seinem Weg durch das Medium einen Energieverlust, den man als Bremsvermögen bezeichnet und die Einheit Joule/m trägt (Hartmann und Schlegel 2013).

Auch von biologischer Wichtigkeit ist der LET (linear energy transfer), bei der indirekt beschrieben wird, wie viele Ionisationen pro zurückgelegten Weg auftreten. Der LET wird in der Einheit keV/m ausgedrückt und ist umso stärker, je schwerer die beschleunigten Teilchen (Neutronen) sind. Eine erhöhte Ionisationszahl bewirkt einen größeren biologischen Effekt (Kahl-Scholz und Vockelmann 2017).

### **2.2.2. Fraktionierte Strahlentherapie**

Bei einer typischen fraktionierten Strahlentherapie teilt man Gesamtdosen von etwa 60 Gy in tägliche Einzeldosen von je 2Gy auf. Die Fraktionierung hat besonders den Vorteil, dass sie eine Reduktion von chronischen Nebenwirkungen durch eine Erholung in den bestrahlungsfreien Intervallen von den subletalen Strahlenschäden herbeiführt. Wie hoch die einzelnen fraktionierten Dosen dabei sind, macht bei der Schädigung von Tumorgewebe, im Gegensatz zum Normalgewebe, nur einen vergleichbar geringen Unterschied aus, solange die Gesamtdosis entsprechend hoch ist (Wannenmacher et al. 2006). Jedoch ist im Gegensatz zur einer Einzelbestrahlung bei einer fraktionierten Bestrahlung eine höhere Gesamtdosis zu applizieren, um einen gleichen Effekt auf definiertes Tumorgewebe zu erzielen (Kauffmann et al. 2006).

Die oben beschriebene Erholung der bestrahlten Zellen während des bestrahlungsfreien Intervalls nennt man die sogenannte Elkind-Erholung vom subletalen Strahlenschaden. Die halblogarithmische Auftragung der Dosis-Wirkungsbeziehung ergibt bei der Elkind Kurve eine typische Schulter, da die Zellen nach subletalen Schäden zur Erholung befähigt sind. Dementsprechend sinkt mit steigender Anzahl an Dosisfraktionen bei gleichbleibender Gesamtdosis die Strahlenwirkung und die resultierenden Schäden für das Normalgewebe. Die entsprechende Höhe der Schulter kann als relative Erholungskapazität der bestrahlten Zellen angesehen werden (Scherer und Sack 1996).

### 2.2.3. Biologische Strahlenschäden

Bei der Interaktion von Strahlung und Gewebe kann man die sogenannten deterministischen von den stochastischen Strahlenschäden unterscheiden. Der deterministische Strahlenschaden ist vorhersagbar an eine spezifische Schwellendosis gebunden. Er nimmt mit zunehmender Dosis zu und tritt mit Latenzzeiten von Stunden bis zu Jahren nach der Strahlenexposition auf. So zählen zu den Frühfolgen etwa Hauterytheme oder auch die Strahlenkrankheit. Vielfältige Gewebsveränderungen wie z.B. Atrophien oder Gefäßveränderungen zählen zu den Folgen, die erst zeitversetzt nach der Strahlenexposition auftreten. Im Gegensatz dazu ist der stochastische Strahlenschaden an keiner Schwellendosis festzumachen und bleibt ein Produkt des Zufalls. Im Rahmen des stochastischen Strahlenschadens entstehen genetische und epigenetische Veränderungen, die letztendlich zur Tumorinduktion führen können (Fuhrmann 2013).

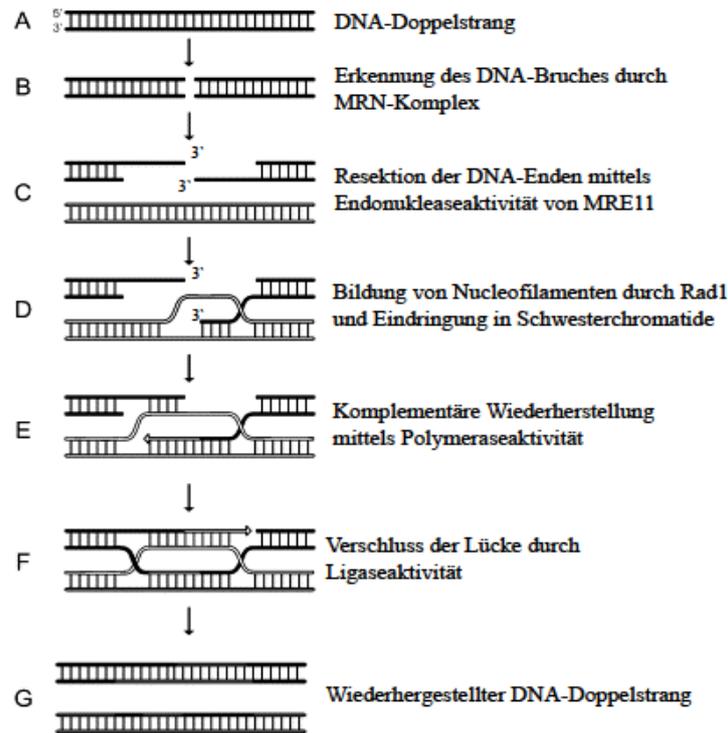
Im Zuge der Strahlenexposition kommt es in verschiedenen Bereichen der Zelle zu Schäden. So treten durch die Strahlung einerseits Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA-Doppelhelix auf, andererseits findet auch eine direkte Zerstörung der Zellmembran statt. Bei einer Schädigung der Membran setzt sich dabei eine Signalmolekülkaskade in Gang, die zum Untergang der Zelle führt. Der strahleninduzierte Zelltod kann auf eine Nekrose oder Apoptose zurückzuführen sein (Cohen–Jonathan et al. 1999).

Bei der Einwirkung ionisierender Strahlung entstehen, wie bereits erwähnt, insbesondere DNA-Schäden. Dabei kann das geladene Strahlenpartikel direkt auf die Doppelhelix treffen und sie ionisieren oder eine Radiolyse der umgebenden Wassermoleküle provozieren. Bei der Radiolyse kommt es zur Ionisation, sowie einer Radikalbildung. Einen besonderen Stellenwert nimmt hierbei das  $\text{OH}\cdot$  ein, das als sehr reaktiv gilt und zu einer sog. indirekten Schädigung der DNA führt. Dabei diffundieren die Radikale zur DNA und lagern sich an dessen Basen an. Das  $\text{OH}\cdot$  ist zudem auch in der Lage ein Proton aus der Desoxyribose der DNA zu lösen. Weitere durch Strahlung entstehende Radikale sind reaktive Sauerstoffspezies, wie auch das in Folge der Ionisation entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kauffmann et al. 2006; Maier et al. 2016). Ob es nun häufiger zu direkten oder indirekten Schäden der DNA kommt, hängt von dem LET ab. Bei hohem LET kommt es eher zu direkten Schäden, wobei bei niedrigem LET die indirekten Schäden dominieren (Hall und Giaccia 2012). Eine hohe LET provoziert eine hohe Anzahl an gruppierten Schäden mit DNA-Doppelstrangbrüchen in vornehmlich heterochromatinen Regionen, während eine niedrige LET eher ungruppierte, über den Nucleus verteilte Doppelstrangbrüche hervorruft. Daraus wird ersichtlich das Hoch-LETs einen wesentlich grösseren biologischen Effekt als Niedrig-LETs ausüben (Lorat et al. 2016).

Wie weiter oben beschrieben, führt die Strahlung auf indirektem oder direktem Wege zur Schädigung der DNA. Dabei kommt es zu Einzelstrangbrüchen, sowie zu verschiedensten Variationen von Doppelstrangbrüchen, die mittels Fluoreszenzmikroskopietechnik nachweisbar sind. Eine Nachweismöglichkeit dieser Stranglücke ist der "Strahleninduzierte Foci-Test", bei denen mittels Fluoreszenzmikroskopie, die an die geschädigten Areale bindenden Reparaturproteine  $\gamma$ H2AX oder auch 53BP1 nachgewiesen werden können. Quantifiziert man diese Foci nach der Strahlenexposition im Verlauf der Zeit, lässt sich durch die Foci-Abnahme die DNA Reparatur-Kinetik der geschädigten Zellen erststellen. Für die unterschiedlichen DNA Schäden (Basenschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüche, Zuckerschäden sowie Crosslinks) hat die Zelle verschiedene Reparaturmechanismen entwickelt (Hall und Giaccia 2012).

Besonders bei Doppelstrangbrüchen gestaltet sich der Reparaturmechanismus komplizierter. Wie sich diese Reparatur vollzieht ist darüber hinaus abhängig, ob die Schwesterchromatide des gebrochenen DNA Doppelstranges noch intakt vorhanden ist (Löffler et al. 2007). Ist dies der Fall, so kann eine sogenannte homologe Rekombination vollzogen werden. Hier wird initial der Doppelstrangbruch via MRN-Komplex, bestehend aus den Proteinen MRE11, Rad50 und NBS-1, erkannt. Als Folge geht das Enzym ATM in den aktiven Zustand über und vollzieht eine Autophosphorylierung (Stracker und Petrini 2011). Das aktivierte ATM phosphoryliert bei Kontakt das Histon H2AX, was als Folge in eine strukturveränderte Form, nun genannt  $\gamma$ H2AX, übergeht (Morgan et al. 2015). Folgend wird die Kinase CHK2 an das  $\gamma$ H2AX gebunden, woraufhin unter Zuhilfenahme von dem vorher erwähnten ATM das p53 phosphoryliert wird. (Zannini et al. 2014). Dieses führt zu einer Induktion der für die DNA-Reparatur benötigten Reparaturmechanismen, sowie zur Arretierung des Zellzyklus (Löffler et al. 2007). Nun kann die homologe Rekombination ablaufen, indem das dem MRN-Komplex angehörige Protein MRE11 mittels Endonukleaseaktivität die Enden der DNA Bruchstelle so reseziert, dass je beidseits ein überlappendes 3'-DNA Einzelstrang Ende entsteht. Über andere Proteine bindet folgend Rad51, welches auch direkt Rad52 rekrutiert, um den DNA Strang vor einer Exonukleaseaktivität zu schützen. Rad1 bildet auf dem überlappenden DNA Strang Nucleofilamente, die es erlauben in den intakten DNA-Strang der Schwester Chromatide einzudringen und den verloren gegangenen Anteil mittels Polymeraseaktivität komplementär wiederherzustellen (Hall und Giaccia 2012; Morgan et al. 2015).

## Homologe Rekombination



**Abbildung 2-3: Homologe Rekombination**

*Ablauf der homologen Rekombination zur Wiederherstellung des geschädigten DNA-Strangs*

Die homologe Rekombination stellt aber im Vergleich zum Nicht-Homologen-Endjoining die weniger häufigere Variante da. Beim Homologen Endjoining wird dabei auf eine Interaktion mit der Schwesterchromatide verzichtet und die beiden Bruchstückenden, unter Verlust von Erbinformation, zusammengeführt. ATM und der MRN-Komplex aktivieren die DNA-stabilisierenden Ku70 und Ku80 Heterodimere, die daraufhin DNA-PKcs rekrutieren, die die beiden getrennte DNA-Enden annähern. 53BP1 und Ku70/80 verhindern weiterhin, dass DNA abgebaut wird, damit folgend die Proteine XRCC4, LIG4, XLF und PAXX die Stränge ausrichten und schließlich verbinden können. In die Entscheidungsfindung, ob eine homologe Rekombination oder ein Nicht-homologes Endjoining stattfindet, ist das Protein 53BPI eingebunden (Hall und Giaccia 2012; Morgan et al. 2015). Ist eine Reparatur des Erbgutes nicht möglich, so wird über p53 eine Apoptosekaskade eingeleitet. Dabei werden die proapoptotischen Gene wie PUMA und BAX hochreguliert, während z.B. das antiapoptotische Gen Bcl-2 inhibiert wird. Es kommt schließlich über eine Caspaseaktivität zur intrazelluläre Proteolyse, was im Untergang der Zelle endet (Wawryk-Gawda et al. 2014).

### 2.2.4. Niedrig-Dosis-Strahlung

Die biologischen Auswirkungen niedriger Strahlendosen auf den Menschen sind bislang nur unzureichend bekannt. Bei der Niedrigdosisbestrahlung kommen Strahlendosen  $\leq 100\text{mGy}$  zum Einsatz. Ob nun solch geringe Dosen einen eindeutig pathophysiologischen Effekt haben, ist ein kontroverses Forschungsthema. So ist einerseits einem französischen Bericht aus dem Jahre 2005 zufolge, kein signifikanter Anstieg der Krebsraten nach Kontakt mit Niedrigdosen bei Kleinkindern, Kindern oder Erwachsenen feststellbar. Dem Bericht zufolge soll auch die aus dem Jahre 1959 stammende Theorie des Linear No-Threshold, bei der eine lineare Beziehung zwischen Dosen und Krebsfällen besteht und folglich kein Schwellenwert vorliegt, verworfen werden. Laut der Studie war auch bei Tierexperimenten kein signifikanter Anstieg der Krebsraten feststellbar. Ganz im Gegensatz, es soll sogar eine Schwelle existieren, bei der es zu keiner Tumorbildung kommt und in 40% Prozent der Fälle war eine Strahlenhormesis in Betracht zu ziehen. Auch Zellen kommen laut der Studie besser mit oxidativem Stress und den Reparaturmechanismen bei Niedrigdosen zurecht. Gegensätzliche Studien beharren jedoch auf dem linearen Verhältnis von Dosen zu Krebsraten und sprechen auch Niedrigdosen ein kanzerogenes Potential zu. Ob Niedrigdosen nun eindeutig krebsfördernd sind, bleibt also zu klären (Tubiana et al. 2006).

Es gilt als erwiesen, dass hohe Strahlendosen zu einer mentalen Einschränkung führen, über die kognitiven Auswirkungen von Niedrigdosen auf die neurokognitive Funktion ist jedoch bislang wenig bekannt. Hall hielt im Jahre 2004 in seiner Studie fest, dass bei Erwachsenen, bei denen im Kindesalter Computer-Tomographie-Aufnahmen im Dosisbereich von 200-400mGy durchgeführt wurden, kognitiven Entwicklungsstörungen auftraten (Hall et al. 2004). In einer weiteren tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass wenige Stunden nach Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen, es zu einer Abnahme neuronaler Signalwege kam, die in Verbindung mit kognitiver Leistung stehen. Die resultierende kognitive Dysfunktion war dabei mit alternden Individuum oder einem Alzheimer Erkrankten insoweit vergleichbar, als dass auch hier die gleichen Signalwege herunterreguliert wurden (Lowe et al. 2009).

Besonders die potentiell durch Niedrigdosis ausgelöste Neuroinflammation bleibt eine kontroverses Thema, da Dosen von 2Gy eine nachweisbare Neuroinflammation mit sich führen, kleinere Dosen von 200mGy möglicherweise über eine Senkung von Cytokinfreisetzungen einen Rückgang der Neuroinflammation bewirken (Betlazar et al. 2016).

### **2.3. Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Die Immunhistochemie sowie die Immunfluoreszenz sind aus der modernen Labordiagnostik sowie Forschung nicht mehr wegzudenken. Das allgemeine Prinzip beruht dabei auf einer Affinität eines Antikörpers zu einem spezifischen Epitop, welches man als Antikörper-Antigen-Reaktion bezeichnen kann. Diese Bindung von Antikörper an Antigen kann nun detektiert werden, um einen Nachweis oder Quantifizierung vornehmen zu können. Unterscheiden kann man hinsichtlich der Antikörper zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Bei den polyklonalen Antikörpern wird dem Versuchstier ein fremdes Antigen (das nachzuweisende Antigen) injiziert. Dabei werden durch die Reaktion des Immunsystems immunologisch unterschiedliche Antikörper gegen eine Vielzahl verschiedener Epitope des injizierten Antigens hergestellt. Es resultieren also heterogene Antikörper, die ihren Ursprung von verschiedenen Plasmazellen haben (Lang 2006). Bei einem monoklonalen Antikörper ist es unterschiedlich, denn hier wird der Antikörper durch eine spezifische Plasmazelle gebildet. Genauer sind es B-Lymphozyten Klone, die Antikörper mit einer determinierten Affinität und Spezifität produzieren. Dazu wird die spezifische antikörperproduzierende Plasmazelle, die nicht mehr teilungsfähig ist, isoliert und mit einer Myelomzelle hybridisiert. Durch diese Fusionierung entstehen Hybridome, die selektioniert werden und nun in der Lage sind, sich *in vitro* zu vermehren und den spezifischen Antikörper zu erzeugen. (Löffler et al. 2007).

Zur Erkennung eines primäre Antikörpers bedarf es im Falle der indirekten Histochemie eines Sekundärantikörpers, der aus einer anderen Spezies stammt und für ein nötiges Signal sorgt (Lang 2006). Entwickelt wurde die sog. indirekte Technik durch Albert Hewert Coons. Sie steht im Gegensatz zur direkten Immunhistochemiemethode, bei der der Primärantikörper bereits "gelabelt" ist und das Potential der Signalgebung mit sich führt. Der Vorteil bei der indirekten Methode ist, dass bei einem primären monoklonalen Antikörper, der gelabelte polyklonale Antikörper mehrfach an den Primärantikörper binden kann und für ein verstärktes Signal sorgt (Ramos-Vara 2005). Das erwähnte Signal stammt im Falle der Immunfloreszenz von einem sich am Antikörper befindenden Fluorochrom. Sein Funktionsprinzip besteht darin, als dass es durch Absorption von Lichtenergie einer determinierten Wellenlänge in einen angeregten Zustand übergeht und für wenige Nanosekunden in diesem Zustand verharrt. Daraufhin kehrt das Fluorochrom in seinen initialen Zustand zurück und sendet dabei Licht aus, das einem detektierbarem charakteristischen Spektrum zuzuordnen ist. Das emittierte Licht besitzt dabei eine höhere Wellenlänge als das ursprüngliche Anregungslicht. Die Fluorochrome besitzen aromatische Ringe und können natürlichen oder synthetischen Ursprunges sein. Synthetische

Fluorochrome, wie das Phycoerythrin, sind dabei den natürlichen Fluorochromen dabei im Vorteil, da sie eine höhere Leuchtkraft besitzen (Boujard et al. 2014).

## 2.4. Mikroglia

### 2.4.1. Neuroinflammation

Bei der Neuroinflammation handelt es sich um einen Pathomechanismus, der vor allem nach Traumata, Infektionen oder auch im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen auftritt. (Shastri et al. 2013). Dabei ist im Rahmen der Strahlentherapie nachgewiesen, dass auch ionisierende Strahlung über mikrogliale und endotheliale Aktivierung inflammatorische Prozesse im ZNS auslösen (Kalm et al. 2009).

Allgemein unterscheidet sich der im ZNS vorkommende Entzündungsprozess in mehreren Hinsichten von einer peripheren Inflammation, besonders weil es sich bei den Effektorzellen um die Mikroglia oder Astrozyten handelt (Lyman et al. 2014). Die genannte Gliazell-Aktivierung in Zusammenhang mit einer Neuroinflammation tritt auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Multipler Sklerose auf. Im diesem Sinne kann eine verlängerte und inadäquate Gliazell-Stimulierung die Effekte der Inflammation verstärken und zu einer Zelldegeneration führen (González-Scarano und Baltuch 1999; Ghosh et al. 2007; Kempuraj et al. 2016). Im Zuge der Entzündung kommen proinflammatorische Mediatoren vor, die lokal hergestellt werden, oder ihren Weg über die Bluthirnschranke von der Blutbahn aus ins ZNS finden (Shastri et al. 2013).

Von zentraler Bedeutung bei der Neuroinflammation ist die Mikroglia. Diese ZNS spezifischen Makrophagen reagieren auf Reize mit einer Ausschüttung von Prostaglandinen sowie proinflammatorischen Cytokinen. Auf diese Cytokine reagieren in der entsprechenden Peripherie andere Zellen, die neuronalen oder nicht neuronalen Ursprungs sein können (Dantzer et al. 2008). Mikrogliale Zellen sind sehr dynamische Zellen, die ihre Verzweigungen, Zellmorphologie oder ihre Migrationsbewegungen schnell einer neuen Situation anpassen können. Morphologische Veränderungen können dabei innerhalb von 5-10 Minuten auftreten (Thomas 1990). Sogar im nicht aktiven Zustand ist die Mikroglia im Stande mit ihren Verzweigungen die Umgebung abzutasten und bei Verletzungen der Bluthirnschranke schnell von ihrer übervachenden Funktion in eine echte Abwehrfunktion überzugehen (Nimmerjahn et al. 2005).

Desweiteren spielen Astrozyten eine wichtige Rolle bei der Neuroinflammation. Getriggert durch Moleküle oder Mediatoren wie Interleukine, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , NO, ATP oder Toll-like

Rezeptoren kommt es im Rahmen der Neuroinflammation zu einer Astrogliosis. Die Astrozyten selbst sind dann in der Lage einen regulierenden Effekt auf die Neuroinflammation auszuüben, indem sie pro-inflammatorisch oder anti-inflammatorisch auf die Mikroglia wirken. So können sie z.B. die NO-Freisetzung der Mikroglia reduzieren, oder die Expression intrazellulären NOS modulieren (Pyo et al. 2003; Sofroniew 2009).

Mikroglia und Astrozyten werden durch Entzündungssignale, die von anderen Zellen des Immunsystems stammen, beeinflusst. Bedeutend sind dabei die Mastzellen. Diese vom Knochenmark abstammenden Zellen können entweder resident im ZNS perivaskulär vorhanden sein (Lambracht-Hall et al. 1990), oder bei Bedarf über die Bluthirnschranke ins Gehirn migrieren (Silverman et al. 2000). Die Mastzellen sind im ZNS in der Lage Histamin, Serotonin, PGD<sub>2</sub>, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$  sowie andere Entzündungsmediatoren freizusetzen (Johnson und Krenger 1992).

### **2.4.2. Herkunft und Entwicklung der Mikroglia**

Die Entwicklung und Herkunft der Mikroglia ist ein viel diskutiertes Thema und bleibt noch bis heute ein Streitpunkt. Grund hierfür sind zwei Quellen, die möglicherweise beide für die mikrogliale Aufrechterhaltung und Mikrogliose des ZNS zuständig sein könnten.

Ein Konsens besteht jedoch bei der embryonalen Herkunft der Mikroglia. Mehreren Autoren zufolge stammen sie aus dem peripheralen mesodermalen Gewebe ab. So geht man davon aus, dass mesodermale Vorläuferzellen, die keine Gemeinsamkeit mit der Linie der Monozyten aufweisen (Alliot et al. 1991; Chan et al. 2007), aus dem Dottersack ins ZNS einwandern. Dies tun sie über die Blutbahn, die Ventrikularzonen oder die Hirnhäute. Bei Mausembryonen konnten diese Vorläuferzellen bereits am 8. Tag nachgewiesen werden und waren vor diesem Tag nur im Dottersack anzutreffen. Die Mikroglia ihrerseits tauchten erst in der mittleren Schwangerschaftswoche auf und waren vermehrt 2 Wochen postnatal ausgebildet. Es besteht also ein direkter Zusammenhang zwischen den früh kolonialisierenden Vorläuferzellen und der reifen Mikroglia (Cuadros und Navascués 1998; Alliot et al. 1999). Die mikroglialen Vorläuferzellen orientieren sich dabei bei ihrem Einwandern an den Bahnen der weißen Substanz, um zu den grauen Arealen zu gelangen. Im Gehirnareal angekommen, bewegen sich die differenzierten amöboiden mikroglialen Zellen an den Ort ihrer Bestimmung, um dort in einer ramifizierten Form zu verbleiben. Bei Menschen beginnt in der 9. Schwangerschaftswoche die Kolonisation des Rückenmarks, die ihren Höhepunkt in der 16. Woche findet. Im Gehirn tauchen die Mikroglia in der intermediären Zone erst ab der 20.-22. Schwangerschaftswoche auf. Die zeitliche und

räumliche Koordination unterliegt dabei der Auswirkung von Chemokinen. Die an den sich ausbildenden Gefäßen beteiligten Proteine ICAM-2 sowie PECAM-1 und die im Cerebrum vorkommenden und chemotaktisch aktiven RANTES und MCP-1 scheinen hierbei eine größere Rolle zu spielen. Auch die nach dem apoptotischen Zelltod auftretenden Chemokine zeigen ihren Einfluss auf den Influx der Vorläuferzellen (Cuadros und Navascués 1998; Rezaie und Male 1999) .

Eine Ansicht geht davon aus, dass bei einer Eradikation und Nischenbildung der ansässigen Mikroglia im adulten Gehirn, eine Repopulation von bestimmten Gehirnteilen durch blutabstammende Monozyten stattfindet (Varvel et al. 2012). Eine Inflammation, die zu einer Mikrogliose führt, geht ebenfalls mit einer Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten in die betroffenen Arealen einher (Mildner et al. 2007). Auch nach Knochenmark-Transplantationen konnten hämatopoetische Zellen im Hippocampus, Kortex, Thalamus, Stammhirn sowie im Cerebellum nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um wahre phänotypisch neuronal abstammende Mikroglia, sondern eher um spezialisierte Zellen. Rein parenchymale mikrogliale Zellen fanden sich nur direkt an der geschädigten Stelle, sowie im Cerebellum (Vallières und Sawchenko 2003).

Ohne schädigende Noxen besteht durch eine ständige Selbsterneuerung eine mikrogliale Hämostase, ähnlich wie bei T-Zellen und Langerhans-Zellen (Ajami et al. 2007). So ist die Mikroglia, im Gegensatz zu Gewebemakrophagen, in der Lage auch ohne Zugang von Zellen aus dem Blutstrom im adulten ZNS aufrecht erhalten zu werden. Erstaunlicherweise halten die Mikroglia dabei sogar hochdosierter  $\gamma$ - Strahlung stand (Ginhoux et al. 2010). Des Weiteren existieren ZNS Progenitorzellen (Nestin-positiv), die in Lage sind die Mikroglia-Population aufrecht zu erhalten oder bei Bedarf zu ersetzen (Elmore et al. 2014). Um nach einer reaktiven Mikrogliosis wieder an den Ausgangspunkt der mikroglialen Zellzahl zu gelangen, greift der Körper unter anderem auf den Mechanismus der Apoptose zurück (Gehrmann und Banati 1995).

### **2.4.3. Normalverteilung der Mikroglia und altersbedingte Neuroinflammation**

Die Mikroglia zeigt im ZNS eine heterogene Verteilung. Sie machen etwa 12% der residenten Zellen in der Substantia nigra, aber nur 5% im Cortex und Corpus callosum bei adulten Mäusen aus. Es ist durchschnittlich eine höhere Anzahl an mikroglialen Zellen in der grauen, als in der weißen Substanz nachweisbar. Insgesamt wird die Anzahl der mikroglialen Zellen im adulten

Maushirn auf etwa  $3,5 \times 10^6$  geschätzt (Lawson et al. 1990). Hayes konnte nachweisen, dass beim Menschen der prozentuale Anteile der Mikroglia in der weißen Substanz bei etwa 13% liegt (Hayes et al. 1987). Im menschlichen Gehirn wurden jedoch im Vergleich zur Maus Unterschiede festgestellt. So liegt eine regional unterschiedliche Verteilung der Mikroglia in verschiedenen Gehirnarealen vor. Es lassen sich beim Menschen in der Pons, sowie in der Medulla oblongata eine hohe Anzahl an mikroglialen Zellen nachweisen, während, verglichen zum Mausmodell, nur wenig mikrogliale Zellen in den grauen Arealen anzutreffen sind (Mittelbronn et al. 2001).

Bei älteren Individuen zeigt sich eine erhöhte und verlängerte mikrogliale Aktivierung, wobei es zu einer zunehmenden Expression der Entzündungsmarker wie MHC-2, CD68 oder TLR kommt. Auch eine niedrige, aber konstante Ausschüttung von Cytokinen konnte in Zusammenhang mit einer alternden Mikroglia festgestellt werden. Es kommt zunehmend zu einer veränderten Zellmorphologie, sowie phänotypischen Veränderungen. So zeigen z.B. Iba-1<sup>+</sup>-Zellen ein weniger verzweigtes Muster im alternden ZNS (Sierra et al. 2007; Norden und Godbout 2013). Gründe für diese Veränderungen könnten möglicherweise Verluste von zelleigenen Faktoren sein, woraufhin es zu einer unkontrollierten mikroglialen Überreaktion kommt. Zudem ist es möglich, dass der anti-inflammatorische mikrogliale Phänotyp durch den Verlust endogener Faktoren weniger gefördert wird. Die degenerative Kraft, die von der alternden Mikroglia ausgeht, ist in Zusammenhang mit Erkrankung wie Morbus Alzheimer von zunehmender Bedeutung (Solito und Sastre 2012).

### **2.4.4. Mikrogliale Funktion und Aktivierung**

Die Mikroglia, bei der es sich nicht nur um einfache Makrophagen handelt, spielt eine wichtige Rolle im reifen, sowie in dem sich entwickelnden ZNS. Sie reguliert dabei unter anderem den programmierten Zelltod, die Synapsen-Maturation und die Kommunikation mit anderen in der Umgebung befindlichen Zellen (Salter und Beggs 2014; Bilimoria und Stevens 2015).

Die Mikroglia kann im ZNS in verschiedenen Formen vorliegen. Eine mögliche Form stellt dabei die sogenannte "ruhende" Mikroglia dar. Die Bezeichnung "ruhend" ist jedoch nicht ganz passend, da die Mikroglia in diesem Zustand eine sehr dynamische Struktur darstellt. Diese mikroglialen Zellen stellen sich mit einem kleinen Zellkörper, der zierlich verästelte, bewegliche Fortsätze trägt, dar. Mit den hochmotilen und beständig sich selbst umstrukturierenden Fortsätzen, ist die Mikroglia in der Lage ihre Umgebung abzutasten. So überwacht die stationär verbleibenden Mikroglia die Umgebung, ohne die umgebenden Neuronen in ihrer Tätigkeit zu

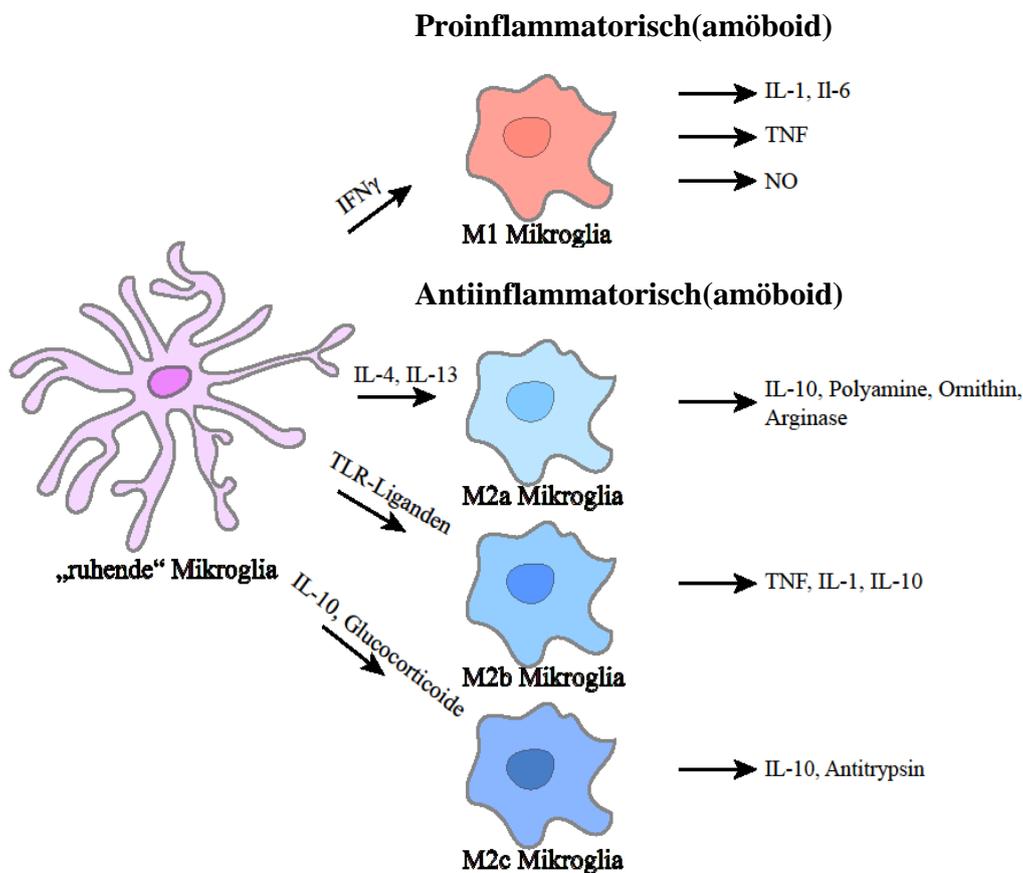
stören. Sie reagiert auf einen Reiz mit einer Aktivierung und sind in der Lage apoptotische und neu gebildete Zellen zu phagozytieren. Möglicherweise steuern sie auch die Proliferation von neurogenen Zellen über TGF- $\beta$  (Hanisch und Kettenmann 2007; Kettenmann et al. 2013; Sierra et al. 2014).

Nach adäquatem Reiz kommt es zu einer Antwort der Mikroglia, die als Reaktion in den "aktiven" oder besser reaktiven Zustand übergeht. Ausschlaggebend ist dabei das Auftauchen von unüblichen Faktoren oder Änderungen der Zusammensetzung von Komponenten in der Zelumgebung, die über die zuständigen Rezeptoren erkannt werden. Signale oder beeinflussende Faktoren können dabei z.B. Agonisten der TLR-Rezeptoren, Komplementfaktoren wie C1q oder C5a, Cytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-10, ATP oder Ceramid sein. Die kommunizierten Signalen können reaktivierend oder beruhigend auf die Mikroglia wirken (Hanisch und Kettenmann 2007).

Die Aktivierung der Mikroglia geht mit einer Formveränderung einher. Die Zellkörper runden ab und nehmen eine amöboide Morphologie an. Es kommt bei der klassischen Aktivierung, bei der die Mikroglia z.B. durch TLR-Liganden oder LPS stimuliert wird (Kofler und Wiley 2011), zu einer Induktion der proinflammatorischen Phase. Dominiert wird diese Phase von der Produktion von IL-1, IL-6, TNF, NO oder NO<sup>2</sup> (Colton und Wilcock 2010). Bei dieser klassischen Aktivierung wird der Makrophage allgemein als M1 bezeichnet (Tam und Ma 2014). Bei M1 spielt besonders IFN- $\gamma$  eine große Rolle, denn es wird als wichtiges Cytokin bei der klassischen Aktivierung gewertet. Die Hauptmediatoren bei der Signalübertragung von IFN- $\gamma$  sind dabei unter anderem STAT1, JAK2 und IRF-1 (Martinez und Gordon 2014). M1, als das proinflammatorische Stadium, hat seine Bedeutung bei der Erstabwehr sowie bei der Beseitigung von Pathogenen (Tang und Le 2016).

Die alternative Aktivierung, bei der die Makrophagen/mikroglialen Zellen über IL-4 oder IL-13 stimuliert werden, zeichnet sich durch ein reparatives und anti-inflammatorisches mikrogliales Verhalten aus (Kofler und Wiley 2011). Die als M2a bezeichneten Zellen produzieren IL-10, Ornithin und Polyamin und führen zu einem vermehrten Vorkommen von Scavenger-Rezeptoren, in eine Rolle bei der Phagozytose spielen (Mantovani et al. 2004; Martinez et al. 2009). Als besonderer Marker gilt das Enzym Arginase 1 (Arg1) (Munder et al. 1999), welches in der Lage ist Prolin und Polyamin zu bilden, die wiederum bei der Wundheilung beteiligt sind. Zudem ist Arginin fähig die NO-Synthese zu reduzieren (Corraliza et al. 1995; Munder 2009). Ein hohes Aufkommen von Immunkomplexen zusammen mit TLR-Agonisten führt zu einer Bildung von M2b Zellen, die in der Lage sind TNF, IL-1 und IL-10 zu bilden. M2b übt

einen immunregulierenden Effekt aus. Hierbei spielt IL-10 eine prädominante Rolle, indem es die Transkription beeinflusst. Es kommt dabei unter anderem zur Subpression von inflammatorischen Cytokinen, zu einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix, sowie zu einer Neurogenese des lymphoiden Gewebes. Als weitere Untergruppe sind die M2c Zellen, die nach ihrer "Aktivierung" durch IL-10 und Glucocorticoide vermehrt auftreten, zu erwähnen. Aufgrund ihres Verhaltens werden jene Zellen jedoch eher als "deaktiviert" bezeichnet. M2c Zellen produzieren ebenfalls IL-10, sowie unter anderem Antitrypsin und beeinflussen die Immunregulation durch Gewebeumbau-Maßnahmen (Mantovani et al. 2004; Röszer 2015).



**Abbildung 2-4: Mikrogliale Aktivierung**

*Aktivierung der ruhenden Mikroglia durch Signalmoleküle. Die pro- und anti-inflammatorische amöboide Mikroglia sezerniert daraufhin ihrerseits spezifische Stoffe.*

### 2.4.5. Marker zum Nachweis der Mikroglia und Gewebemakrophagen

Zum Nachweis der Mikroglia stehen eine Vielzahl von Markern zur Verfügung, die entweder größere Anteile des ZNS spezifischen Mikroglia/Makrophagen Systems in Evidenz setzen, oder zwischen den unterschiedlichen Subpopulationen unterscheiden lassen.

Iba-1 tut sich als ein häufig benutzter Marker, der in Zusammenhang mit der mikroglialen Erforschung genutzt wird, hervor. Das für das Iba-1 zuständige Gen AIF1 wird auf dem HLA III Komplex codiert. Der HLA III Komplex seinerseits befindet sich auf dem Chromosom 6, genauer am Locus 6p21.3 (Imai et al. 1996). Die zugehörige cDNA wurde im Zuge einer Studie von Allografts an Rattenherzen, bei der es zu chronischen Entzündungsreaktionen kam, erstmals nachgewiesen (Utans et al. 1995). Das für das Iba-1 codierende Gen zeigt zudem eine Übereinstimmung von Maus zu Mensch von 89% (Yamada et al. 2006). Die auf das Gen zurückzuführenden Proteine AIF1, Iba-1, MRF-1 und Dantain zeigen in ihrem strukturellen Aufbau eine Übereinstimmung (Deininger et al. 2002). So wird üblicherweise das AIF1 dem als Iba-1 bezeichneten Protein gleichgesetzt (Chinnasamy et al. 2015).

Das 17kDa schwere Calcium bindende Iba-1 kommt vor allem bei aktivierten Makrophagen und mikroglialen Zellen vor. Iba-1 zeigt zwei EF-Hand-Motive in seinem mittleren Drittel und besitzt einzigartige N- und C--terminale Endigungen. (Imai et al. 1996; Ito et al. 1998). Andere zwei EF-Hand-Motive führende Proteine wären etwa Calmodulin und S100 (Lewit-Bentley und Réty 2000).

Funktionell gilt Iba-1 vor allem bei der zellulären Membranausstülpung, sowie der Phagozytose als ein Schlüsselenzym. Das Mikroglia/Makrophagen spezifisch bindende Protein koexistiert mit F-Actin, das in die M-CSF getriggerte Membranausstülpung eingebunden ist. Zudem ist es in den Signalweg des Calciums und einer der Rho Familie gehörigen GTPase, dem sogenannten Rac, involviert. Dieser Signalweg, der wiederum Bestandteil der Actin Regulation während der Membranausstülpung ist, scheint Phospholipase C $\gamma$  abhängig abzulaufen (Hall 1998; Ohsawa et al. 2000; Kanazawa et al. 2002). Desweiteren bindet Iba-1 direkt an L-Fimbrin, was eine essentielle Rolle bei der Formation des Phagozytosekomplexes spielt (Ohsawa et al. 2004).

Ein neu entdeckter Oberflächenmarker der Mikroglia spezifisch exprimiert wird, wäre das Tmem119. Dieser Marker ist nicht bei anderen neuronalen Zellen oder Makrophagen vorhanden und beweist seine Spezifität beim Menschen sowie bei der Maus (Bennett et al. 2016). CD68 ist ein weiterer Marker, bei dem es sich um ein transmembranöses Protein handelt, das bei Gewebsmakrophagen und Monozyten in der lysosomalen und zellulären Membran vorkommt. Das CD68 spielt eine Rolle bei der Interaktion mit low-density Lipoproteinen. CD68 wird als zusätzlicher Marker genutzt, um aktivierte Mikroglia darzustellen (Korzhevskii und Kirik 2016; Hendrickx et al. 2017). Ein anderer Marker wäre das CD11b, bei dem es sich um einen Anteil des Komplementrezeptors CR3 handelt. Dieser Komplementrezeptor ist bei NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, sowie mononukleären Phagozyten zu finden. CD11b lässt

sich in Kombination CD45 zur Spezifizierung der Population nutzen. So sind mikrogliale Zellen CD11b/c<sup>High</sup>/CD45<sup>Low</sup> und gegensätzlich dazu Makrophagen CD11b/c<sup>High</sup>/CD45<sup>High</sup> (Badie und Schartner 2000; Korzhevskii und Kirik 2016). Das genannte CD45 ist ein Antigen, das bei fast allen hämatopoetischen Zellen, außer den reifen roten Blutkörperchen, vorkommt (Nakano et al. 1990). Das HLA-DR Antigen, was zur Gruppe der MHC II Proteinen gehört, kann ebenfalls bei der aktivierten Mikroglia über die spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Korzhevskii und Kirik 2016).

### **2.5. Fragestellung im Rahmen der Dissertation**

Bei der Radiotherapie im Kopf-Hals-Bereich, kommt es unweigerlich zu einer wiederholten Exposition des Gehirns mit niedrigen Strahlendosen. Höhere Strahlendosen lösen bekanntermaßen eine Neuroinflammation im ZNS aus. Die Auswirkungen einer fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung des Gehirns ist weitgehend unklar.

Ziel der Arbeit ist es durch eine Quantifizierung von Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Bereich des Gyrus dentatus eine potentielle Neuroinflammation im Hippocampus, ausgelöst durch eine fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung, nachzuweisen. Desweiteren sollen mögliche Unterschiede hinsichtlich der ausgelösten Neuroinflammation zwischen juvenilen und adulten Mäusen näher untersucht werden. Auch die Untersuchung von Unterschieden hinsichtlich der Verteilung von Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen Stratum granulare des Gyrus dentatus und dessen Hilus soll Teil dieser Arbeit sein.

Zu diesem Zweck wurden jüngere und ältere C57Bl6-Mäuse fraktionierter 100mGy Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt. Es wurden jeweils die Bedingungen 5x 100mGy, 10x 100mGy, 15x 100mGy und 20x 100mGy getestet, wobei die Untersuchungen des Gyrus dentatus jeweils 72h nach der letzten Strahlungsapplikation erfolgten. Bei der Bedingung 20x 100mGy wurden zusätzlich noch Untersuchungen 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach Bestrahlungsende durchgeführt.

## **3. Material und Methode**

### **3.1. Versuchstiere**

Bei den Versuchstieren handelte es sich um juvenile und adulte männliche Mäuse vom Stamm C57BL6 (Charles River GmbH, Sulzbach). Als juvenil waren dabei 11 Tage alte Mäuse definiert, wogegen man von adulten Mäusen ab dem 56. Lebenstag sprach. Insgesamt wurden 84 Mäuse, dessen Alter bei der Tötung von 21 bis zu 266 Tagen reichte, untersucht.

Bei den C57BL6 Mäusen handelt es sich um einen der ältesten und tierexperimentell meist genutzten Maustämme. Dieser Mausstamm stammt von den C57BL Mäusen ab, die im Jackson Laboratory 1921 von C.C Little gezüchtet wurden (Zurita et al. 2011).

### **3.2. Tierhaltung**

Die Haltung erfolgte nach Tierschutzgesetz im Tierstall des Institutes für Experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik Homburg/Saar. Zu maximal sechs Tieren pro Käfig wurden die Mäuse in einem pathogenfreien Raum (Laminar Air Flow System) gehalten. Die Temperatur betrug  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , sowie die Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 10\%$ . Zudem wurden die Tiere einem 12h Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt. Standardfutter, sowie Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.

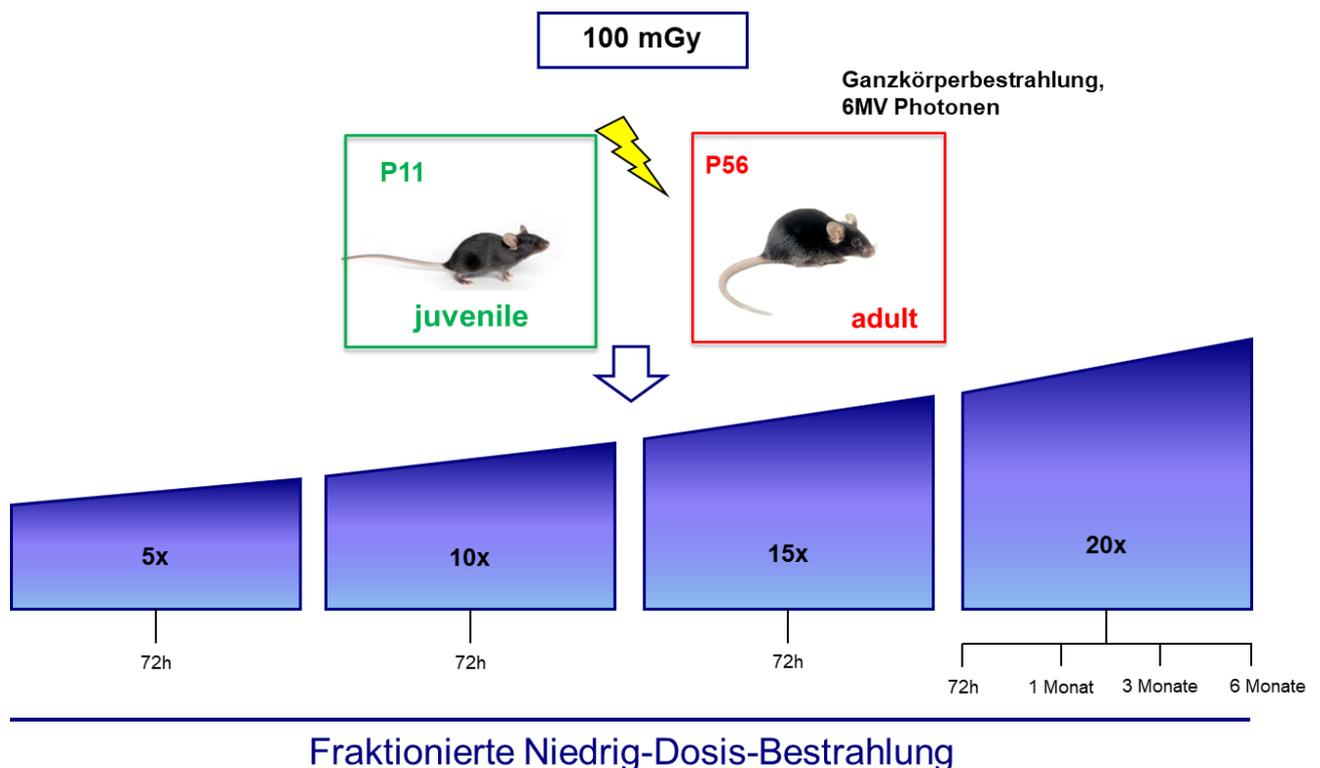
### **3.3. Bestrahlungsprotokoll**

Die juvenilen und adulten C57BL6 Mäuse erhielten jeweils fraktionierte 100mGy Ganzkörperbestrahlungen in einem Linearbeschleuniger (Artist<sup>TM</sup>, Siemens). Bei den juvenilen Mäusen erhielten für jede Bedingung jeweils 6 Mäuse eines Wurfes die fraktionierte Strahlengabe, während die restlichen 6 altersentsprechenden Mäuse als unbestrahlte Kontrollgruppe dienten. Bei den adulten Mäusen waren es jeweils 3 Mäuse die bestrahlt wurden, sowie 3 Mäuse die als unbestrahlte Kontrollgruppe dienten. Es sei anzumerken, dass dennoch nur jeweils 3 bestrahlte und 3 unbestrahlte Mäuse für jede Bedingung, sowohl bei den adulten als auch bei den juvenilen Mäusen, für die Untersuchung herangezogen wurden. Die erhöhte Anzahl an juvenilen Versuchstieren sollte ein ausreichendes Überleben der jungen Tiere garantieren.

Die entsprechenden Mäuse wurden in einem Plexiglaszylinder mit 18cm Durchmesser platziert. Um eine Homogenität der Strahlung zu gewährleisten wurde der Zylinder mit einer 1,5cm

dicken Acrylplatte bedeckt. Folgende Bedingungen lagen bei der Bestrahlung vor: das Strahlenfeld betrug 30x30cm, der Kolimatorwinkel betrug 0°, der Gantry-Winkel betrug 0°, die Strahlenenergie betrug 6MV und die applizierte Dosis 100mGy.

Um eine tägliche Bestrahlungsserie nachzuahmen, wurde unter der Woche von montags bis freitags immer zur gleichen Uhrzeit (8.00 Uhr) bestrahlt. Die Kohorten juveniler und adulter Mäuse wurden mit 5x 100mGy, 10x 100mGy, 15x 100mGy und 20x 100mGy bestrahlt. Die Tötung erfolge jeweils 72h nach der letzten Bestrahlung. Um auch die Langzeitschäden der Niedrig-Dosis-Bestrahlung zu untersuchen, wurden bei weiteren Kohorten juveniler und adulter Mäuse 20x 100mGy appliziert, die intrakardiale Perfusion erfolgte jedoch erst nach 1, 3 bzw. 6 Monaten, um die Langzeiteffekte untersuchen zu können.



**Abbildung 3-1: Darstellung des Bestrahlungsprotokolls (Laborintern)**

*Fraktionierte Bestrahlungsserien (5x 100mGy, 10x 100mGy...) der juvenilen und adulter Mäuse mit Entnahme der Gehirns 72h, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach der Bestrahlung. P11 bezeichnet dabei eine initial 11 Tage alte Maus (juvenil), wobei es sich bei P56 um eine bei Bestrahlungsstart 56 Tage alte Maus(adult) handelt.*

### **3.4. Tötung der Tiere und Herstellung der Gewebeschnitte**

Alle Tiere wurden nach Versuchstierordnung mittels intraperitonealer Injektion anästhesiert (Ketamin (120µg/kg) /Rompun(16µg/kg) in einer 0,9%NaCl Lösung). Die Mäuse wurden anschließend mittels einer 37°C warmen Salin/Formaldehyd Lösung intrakardial perfundiert. Es wurden Testis, Lunge, Leber, Herz, Darm, Haut, Niere und Gehirn entnommen. Jedes Organ wurde einzeln in einer 4 %-igen neutral gepufferten Paraformaldehyd-Lösung 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach diesen 24h wurde eine Dehydratation der Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe vorgenommen. Es folgte eine Behandlung mit Xylol, woraufhin die Organe in Paraffin eingebettet wurden. Die eingebetteten Paraffinblöcke wurden vor dem Schneiden 24 Stunden in einem - 20° C kalten Eisfach platziert. Mittels Mikrotoms (Leica RM2235) wurde der Gehirnparaffinblock in 4µm dünne Scheiben geschnitten. Vom Bregma -1,9mm aus erfolgten 50 Schnitte. Es sollte so garantiert werden, dass bei allen Versuchstieren definierte Hippocampusanteile untersucht werden konnten. Jeweils ein Schnitt aus einer gleichwertigen Hippocampusregion von jeweils drei gleichwertig bestrahlten Mäusen wurde auf einen Objektträger übertragen, sodass insgesamt drei Gehirnschnitte von drei distinkten Mäusen auf einem Träger resultierten.

### **3.5. Färbungsprotokoll: Iba-1 Antikörper**

Die Träger wurden zunächst zur Fixierung 1 Stunde bei 56° C im Ofen aufgebacken. Es folgte nach der Abkühlung eine Entparafinierung, indem die Träger für jeweils 7 Minuten in 3 sequenziellen Schalen mit 100% Xylol belassen wurden. Eine Entwässerung der Schnitte wurde mittels einer absteigenden Ethanolreihe (99%,96%,90%,80%,70%) vorgenommen. Zur Antigenmaskierung folgte ein einstündiges Kochen (96°C) in Citratpuffer (Dakro, Retrivial Puffer, pH6). Anschließend wurden die Träger 1 Stunde mittels verdünntem Immunoblock (1:10) inkubiert, so dass unspezifische Bindungsstellen gesättigt wurden. Der polyklonale Ziegenantikörper Anti-Iba-1 (Novus) wurde anschließend in der Verdünnung 1:500 (in Immunoblock) auf die Gehirnschnitte gegeben. Diese wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und in der Feuchtkammer bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am Folgetag wurden die Deckgläser wieder entfernt und die Träger 3x10 Minuten in PBS (pH 7,4) gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Fluorochrome gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa Fluor 568-conjugated Rabbit-anti-Goat) mit einer Verdünnung 1:400 für 1 Stunde. Danach wurden die Schnitte wieder 3x10 Minuten in PBS gewaschen und anschließend getrocknet. Das DAPI Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame,

CA) wurde zur Asservierung auf die Gewebeschnitte gegeben, wobei die Träger zur Aushärtung lichtgeschützt bei 4° C gelagert wurden.

## **3.6. Auszählung mittels Fluoreszenzmikroskop**

Zur Auswertung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Stratum granulare des Gyrus dentatus sowie dem zugehörigen Hilus, wurden die Gehirnschnitte unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse E600), ausgestattet mit einer Fluoreszenzlampe und dazugehöriger Analysesoftware, betrachtet. Die markierten Zellen wurden jeweils unter einem DAPI (382-477nm) und TEXAS RED (542-644nm) Filter ausgezählt.

Zur Messung der Anzahl der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen, wurde die Fläche des Hilus und des Stratum granulare des Gyrus dentatus bei 4-facher Vergrößerung berechnet. Zur Feststellung von möglichen Unterschieden hinsichtlich der Dichte an Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen dem Hilus und dem Stratum granulare, wurden die einzelnen Flächen bei einigen Konditionen getrennt berechnet. Um den systematischen Fehler gering zu halten, wurden bei den restlichen Bedingungen sofort die Gesamtflächen (Stratum granulare und Hilus) gemessen. Die Zellen wurden bei 60-facher Vergrößerung auffindig gemacht. Eine Zelle konnte dabei als eindeutig Iba-1<sup>+</sup>-Zelle bezeichnet werden, wenn bei ein und derselben Zelle gleichzeitig ein positives Signal unter dem DAPI- (382-477nm), sowie dem TEXAS RED-(542-644nm) Filter vorlag. Die Zugehörigkeit zum Gyrus dentatus war so definiert, dass eine Iba-1<sup>+</sup>-Zelle nicht weiter als den eigenen Zelldurchmesser von der restlichen Granularzell-Ansammlung des Gyrus dentatus entfernt sein durfte oder klar dem Hilus zuzuordnen war. Nachdem die Flächen berechnet und die Iba-1<sup>+</sup>Zellen ausgemacht waren, konnte die Dichte an Iba-1<sup>+</sup>-Zellen berechnet werden.

Ausgezählt wurde gleichzeitig immer eine Bedingung, wobei die Kontrollgruppe und die bestrahlte Gruppe verblindet ausgezählt wurden. Es lagen bei einer bestrahlten Gruppe (3 unterschiedliche Mäuse) jeweils 3 Gehirnschnitte aus einer gleichwertigen Hippocampus-Region auf einem Träger vor. Es sei anzumerken, dass durch die Auswahl von Schnitten, die gleich weit voneinander entfernt waren, 3 entsprechende biologische Replikate für jede Maus zur Verfügung standen. Der Abstand zwischen dem untersuchten Schnitt und dem ihm folgenden Schnitt betrug immer etwa 80µm. Es wurde also für die bestrahlte Gruppe bei jeder Bedingung 3 Träger mit jeweils 3 Gehirnschnitten von 3 verschiedenen Mäusen untersucht. Gleiches galt für die unbestrahlte Kontrollgruppe.

Ausgezählt wurden der linke und der rechte Gyrus dentatus, was zu n=18 für eine bestrahlte Gruppe führte. Gleiches lag für die altersentsprechende Kontrollgruppe vor.



**Abbildung 3-2: Vorgehen bei der Oberflächenberechnung**

*Einkreisung (grüne Umrandung) des Hilus und den ihn umgebenden Gyrus dentatus, zur Berechnung der Oberfläche mittels mikroskopzugehörigem Computerprogramm.*

### **3.6. Statistische Auswertung**

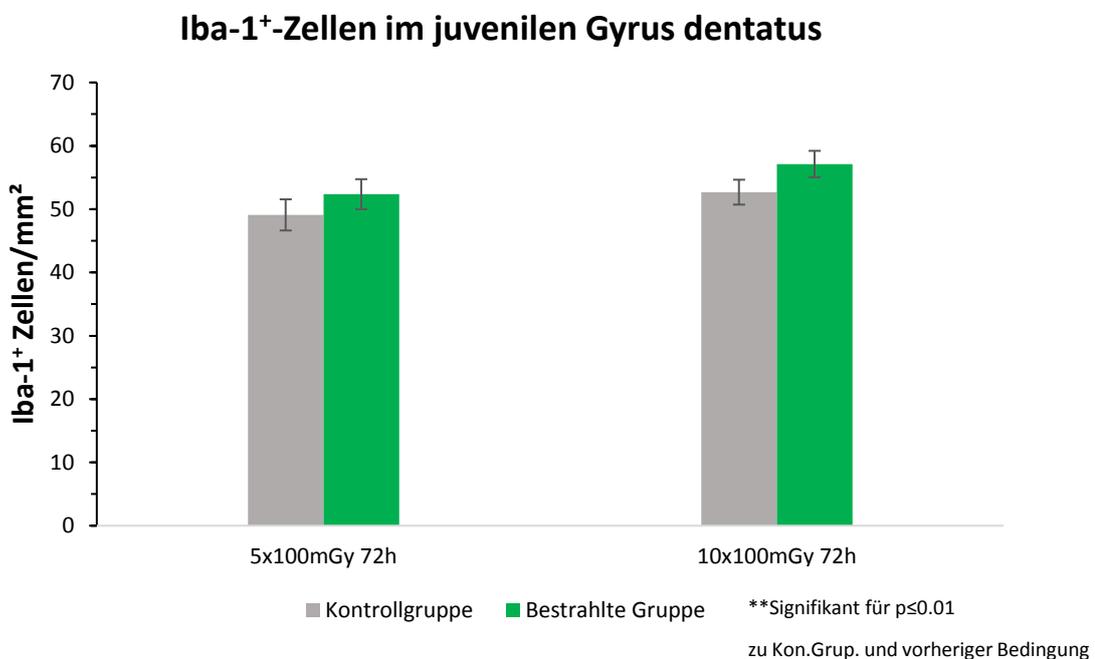
Um eine mögliche Differenz zwischen der bestrahlten Gruppe und der Kontrollgruppe festzustellen, wurde der 2-tailed Mann-Whitney U Test für jede Bedingung angewandt. Der kritische Wert betrug für die Signifikanz der Ergebnisse gleich  $p \leq 0.01$ . Alle Graphen und Fehlerbalken wurden mittels Microsoft® Excel erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bestrahlte juvenile C57BL6 Mäuse

#### 4.1.1 Juvenil 5x 100mGy 72h, 10x 100mGy 72h

Die unbestrahlten Kontrollgruppen weisen etwa 50 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Bereich des Stratum granulare des Gyrus dentatus und des entsprechenden Hilus auf. Sowohl die bestrahlte Gruppe 5x 100mGy als auch die Gruppe 10x 100mGy verzeichnen mit 52,68 und 57,12 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> einen geringen, aber nicht signifikanten Anstieg ( $p \leq 0.01$ ).



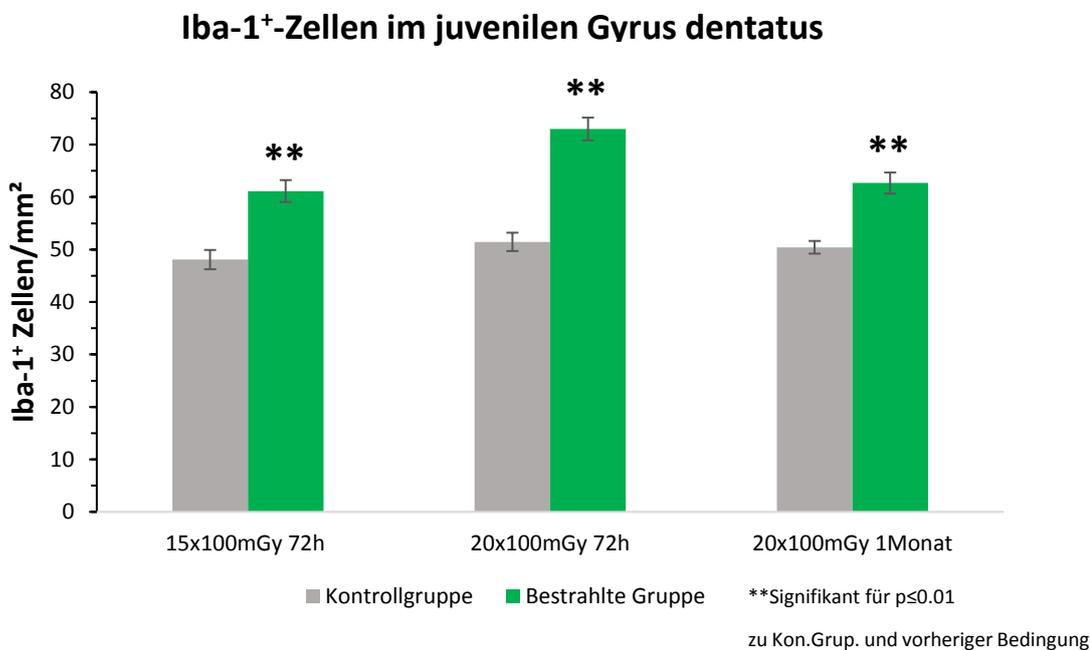
**Abbildung 4-1: Ergebnisse juvenil für 5x 100mGy 72h /10x 100mGy 72h**

*Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von juvenilen C56Bl6-Mäusen nach Bestrahlung mit 5x 100mGy und 10x 100mGy 72h nach Betsrahlungsende im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen.*

*\*\* signifikanter Unterschied zur altersentsprechenden Kontrollgruppe sowie der vorangegangenen bestrahlten Bedingung ( $p \leq 0.01$ )*

### 4.1.2. Juvenil 15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1Mo.

Die unbestrahlten Kontrollgruppen weisen wiederum etwa 50 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Bereich des Stratum granulare und des entsprechenden Hilus auf. 72h nach 15x 100mGy zeigt sich mit 61,15 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> ein signifikanter Anstieg von 27,4% zur entsprechenden Kontrollgruppe ( $p \leq 0.01$ ). 72h nach 20x 100mGy ist mit 72,98 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> ein entsprechend signifikanter Anstieg von 41,8% zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Auch 1 Monat nach Bestrahlung mit 20x 100mGy zeigt sich noch ein signifikanter Anstieg, mit 62,68 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup>, dies entspricht einer Steigerung von 24,3% im Vergleich zur Kontrollgruppe.



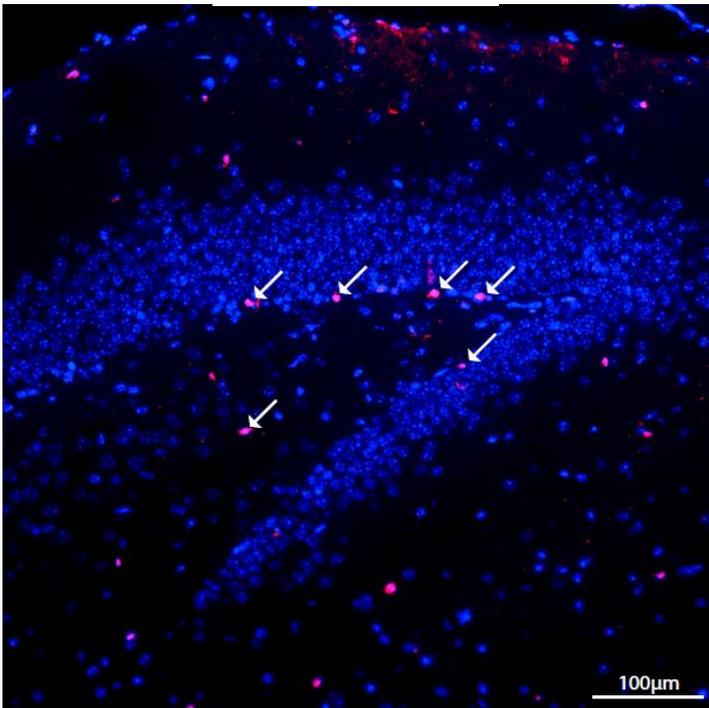
**Abbildung 4-2: Ergebnisse für juvenil 15x 100mGy 72h/ 20x 100mGy 72h/ 20x 100mGy 1Mo.**

*Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von juvenilen C56Bl6-Mäusen nach Bestrahlung mit 15x 100mGy und 20x 100mGy 72h sowie 1 Monat nach Bestrahlungsende im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen.*

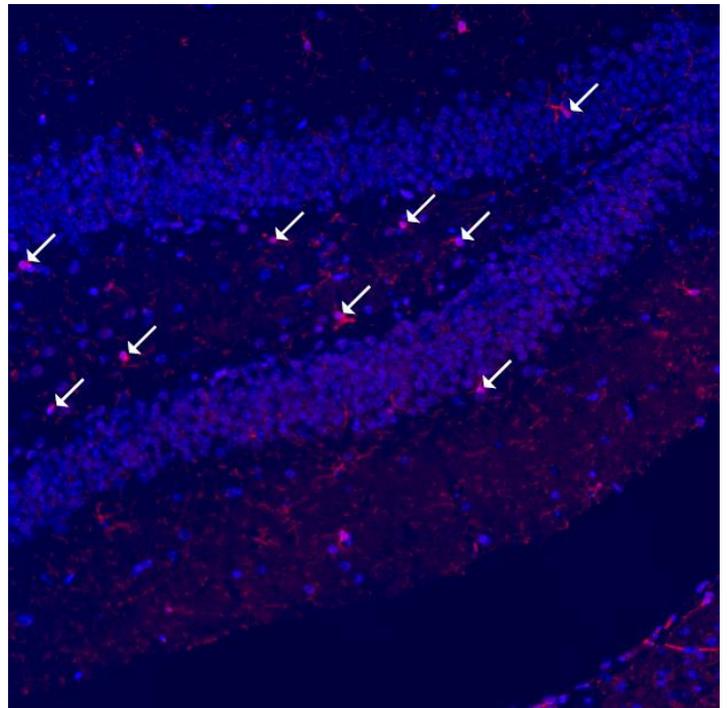
**\*\*** signifikanter Unterschied zur altersentsprechenden Kontrollgruppe sowie der vorangegangenen bestrahlten Bedingung ( $p \leq 0.01$ )

## Mikroskopische Darstellung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im juvenilen Hippocampus

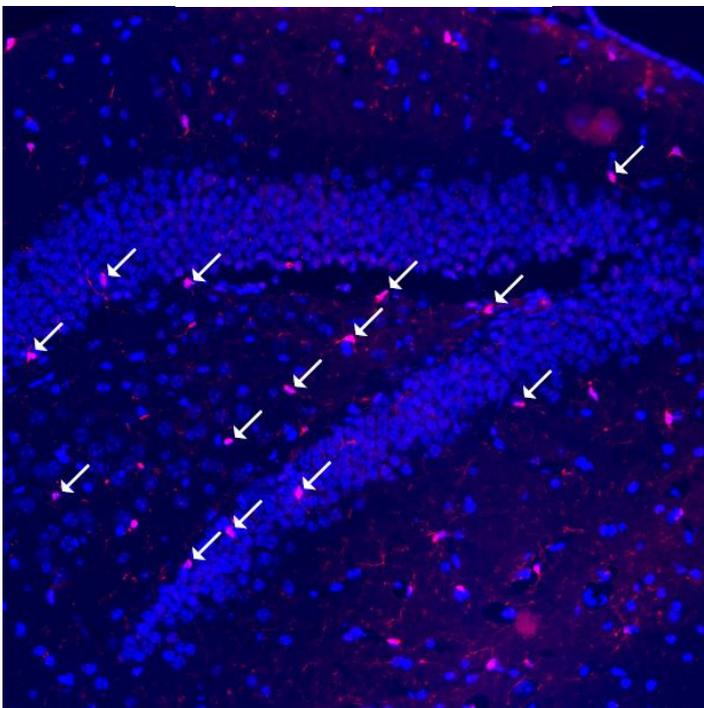
Juvenil Kontrolle



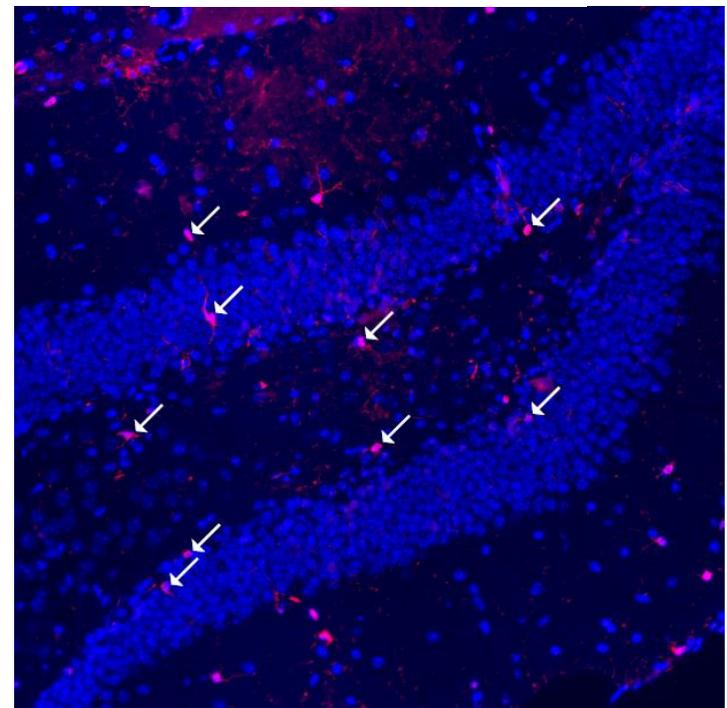
Juvenil 15x 100mGy 72



Juvenil 20x 100mGy 72h



Juvenil 20x 100mGy 1Monat

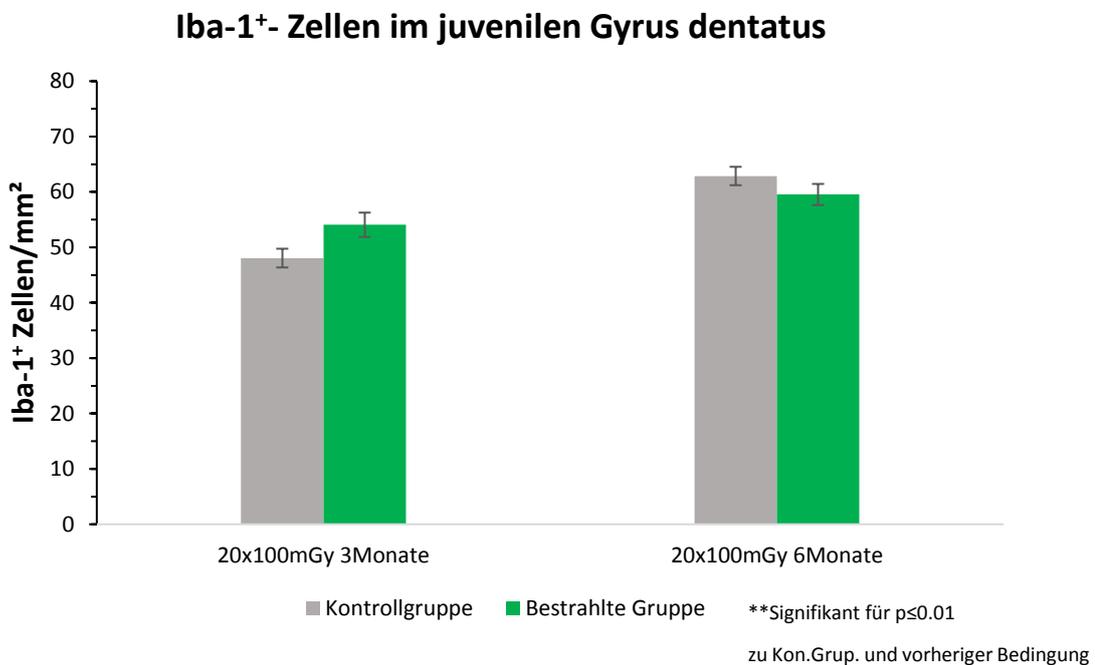


*Abbildung 4-3: Ansicht juvenil Kontrolle, 15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1Mo. Mikroskopische Ansicht 20x vergrößert, eindeutige Iba-1<sup>+</sup>-Zellen(rosa) sind jeweils durch einen Pfeil markiert.*

### 4.1.3. Juvenil 20x 100mGy 3 Mo. und 20x 100mGy 6 Mo.

Die unbestrahlte Kontrollgruppe zu 20x 100mGy mit Untersuchung nach 3 Monaten weist 48 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Bereich des Stratum granulare und des entsprechenden Hilus auf. Bei der altersentsprechenden Kontrollgruppe zu 20x 100mGy mit Untersuchung nach 6 Monaten ist ein Anstieg auf 62,88 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> zu verzeichnen.

Sowohl 3 Monate nach Bestrahlung mit 20x 100mGy, als auch 6 Monate nach 20x 100mGy Bestrahlung ist mit 54,07 und 59,54 *Iba-1*<sup>+</sup>- Zellen/mm<sup>2</sup> kein signifikanter Rückgang oder Anstieg zu den entsprechenden Kontrollgruppen zu verzeichnen ( $p \leq 0.01$ ).



**Abbildung 4-4: Ergebnisse juvenil 20x 100mGy 3Mo. /20x 100mGy 6Mo.**

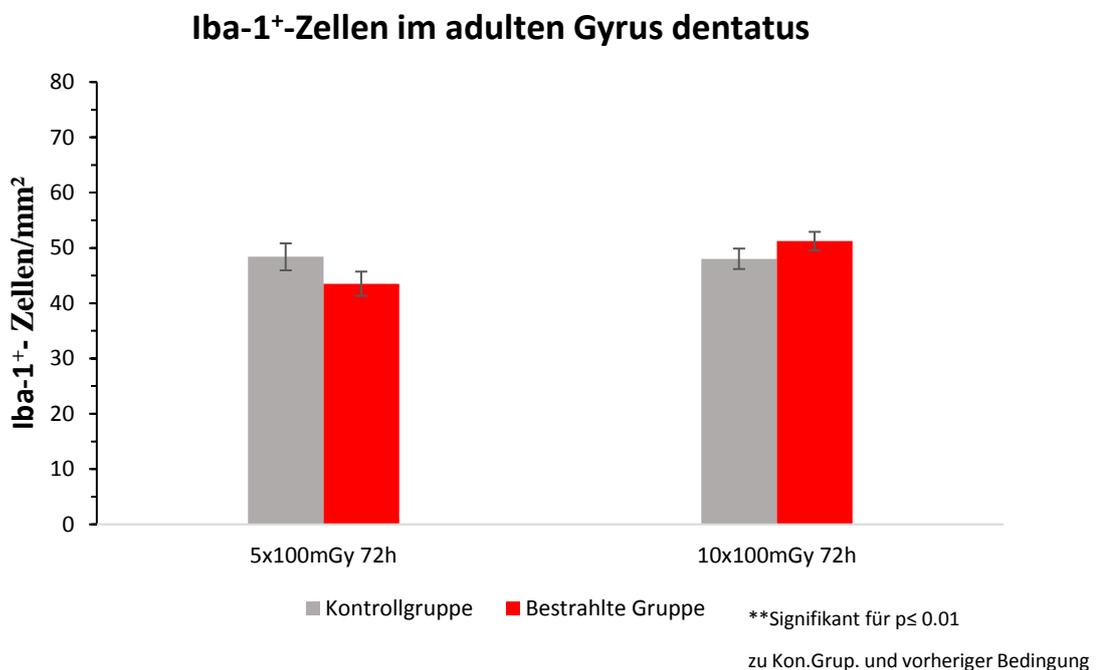
*Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von juvenilen C56Bl6-Mäusen nach Bestrahlung mit 20x 100mGy 3Monate sowie 6Monate nach Bestrahlungsende im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen.*

**\*\*** signifikanter Unterschied zur altersentsprechenden Kontrollgruppe sowie der vorangegangenen bestrahlten Bedingung ( $p \leq 0.01$ )

## 4.2. Bestrahlte adulte C57BL6 Mäuse

### 4.2.1. Adult 5x 100mGy 72h, 10x 100mGy 72h

Die adulten altersentsprechenden unbestrahlten Kontrollgruppen zu 5x 100mGy 72h und 10x 100mGy 72h weisen etwa 48 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Bereich des Gyrus dentatus auf. Sowohl die bestrahlte Gruppe 5x 100mGy, als auch die Gruppe 10x 100mGy weisen 72h nach Bestrahlungsende mit 43,53 und 51,24 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> keinen für  $p \leq 0.01$  signifikanten Unterschied zu ihren entsprechenden Kontrollgruppen auf.



**Abbildung 4-5: Ergebnisse adult 5x 100mGy 72h /10x 100mGy 72h**

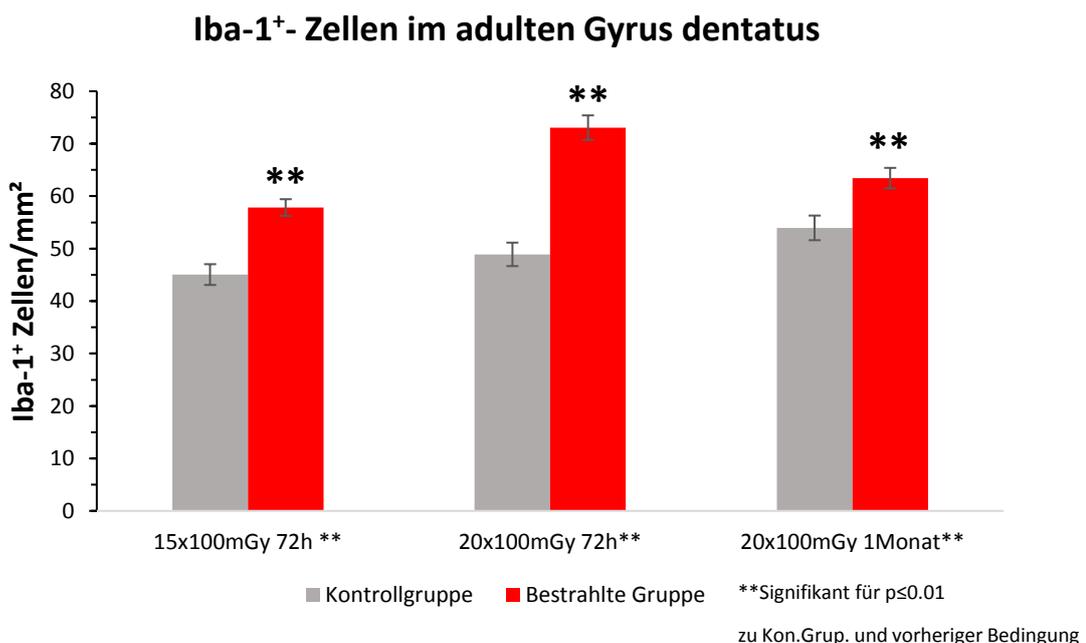
*Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von adulten C56Bl6-Mäusen nach Bestrahlung mit 5x 100mGy und 10x 100mGy 72h nach Bestrahlungsende im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen.*

**\*\* signifikanter Unterschied zur altersentsprechenden Kontrollgruppe sowie der vorangegangenen bestrahlten Bedingung ( $p \leq 0.01$ )**

### 4.2.2. Adult 15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1Mo.

Die unbestrahlte Kontrollgruppe zu 15x 100mGy 72h stellt sich mit etwa 45 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> dar. 48,9 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> weist die Kontrollgruppe zu 20x 100mGy 72h im Bereich des Stratum granulare des Gyrus dentatus und dessen Hilus auf. Die Kontrollgruppe zu 20x 100mGy 1Mo. zeigt etwa 54 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup>.

72h nach Bestrahlung mit 15x 100mGy ist mit 57,84 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> ein signifikanter Anstieg von 28,4% zur entsprechenden Kontrollgruppe feststellbar. Die bestrahlte Gruppe 20x 100mGy 72h nach Bestrahlungsende zeigt mit 73,07 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> einen signifikanten Anstieg von 49,4% zur altersentsprechenden Kontrollgruppe ( $p \leq 0.01$ ). Auch 1 Monat nach 20x 100mGy ist mit 63,44 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> eine signifikante Steigerung von 17,6% im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar.



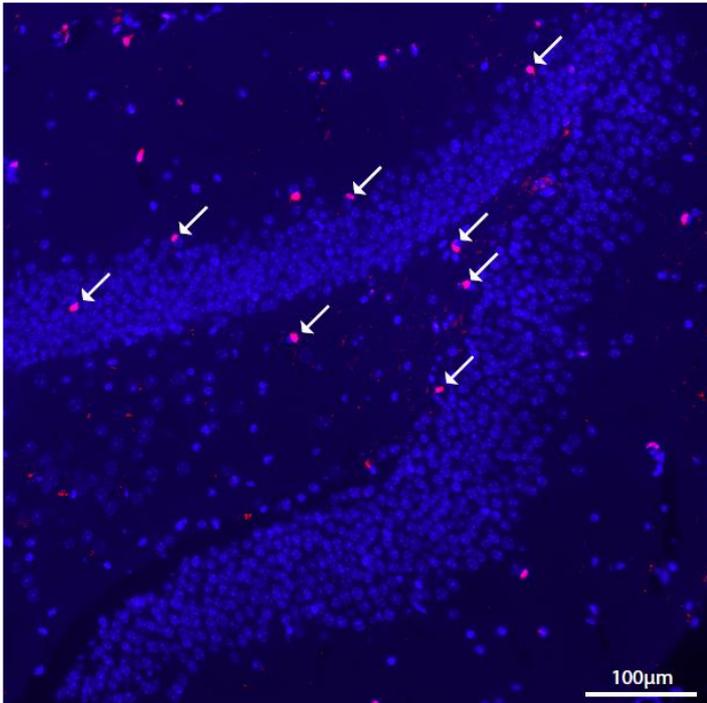
**Abbildung 4-6: Ergebnisse adult 15x 100mGy 72h/ 20x 100mGy 72h/ 20x 100mGy 1Mo.**

*Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von adulten C56Bl6-Mäusen nach Bestrahlung mit 15x 100mGy und 20x 100mGy 72h sowie 1 Monat nach Bestrahlungsende im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen.*

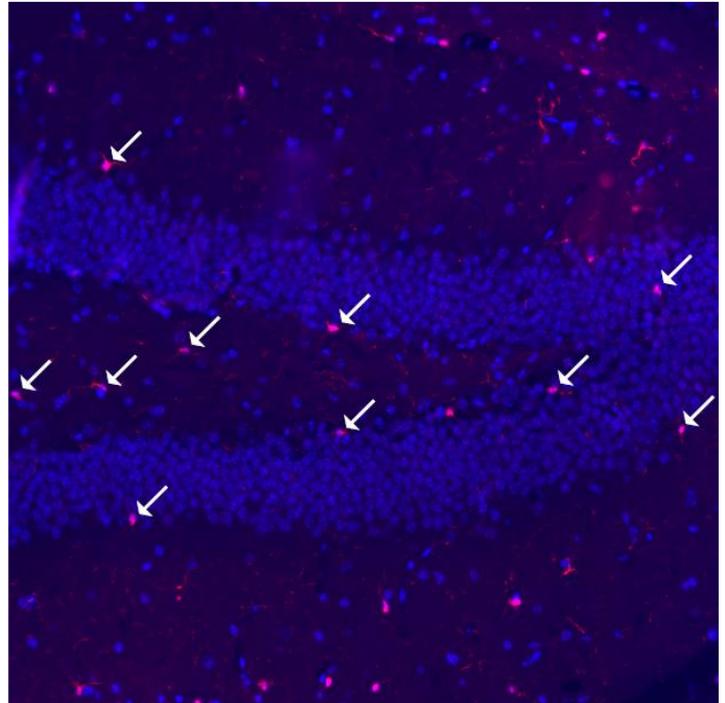
**\*\*** signifikanter Unterschied zur altersentsprechenden Kontrollgruppe sowie der vorangegangenen bestrahlten Bedingung ( $p \leq 0.01$ )

**Mikroskopische Darstellung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im adulten Hippocampus**

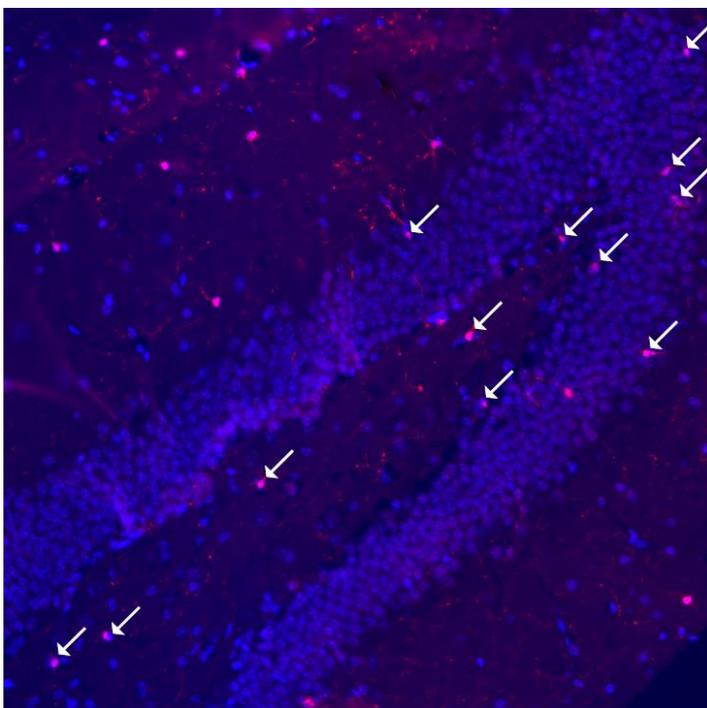
*Adult Kontrolle*



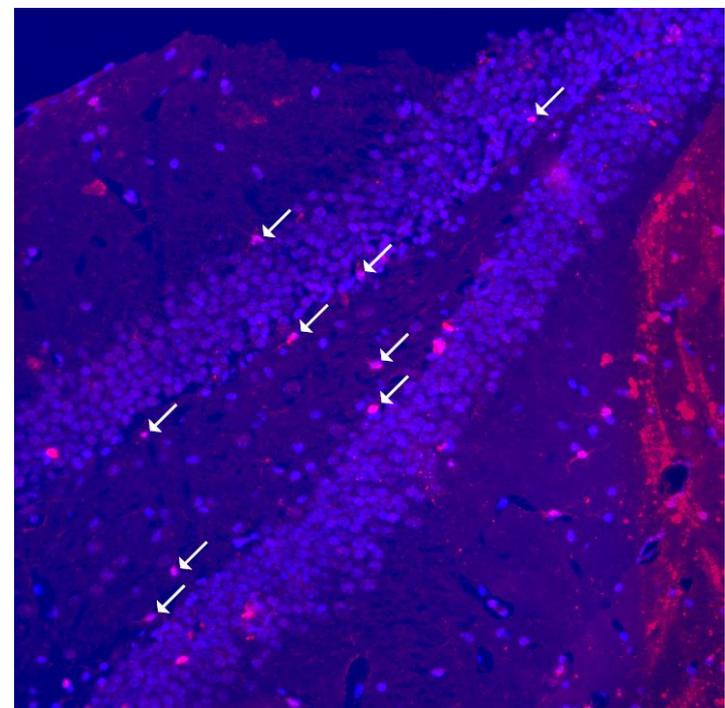
*Adult 15x 100mGy 72h*



*Adult 20x 100mGy 72h*



*Adult 20x 100mGy 1Monat*

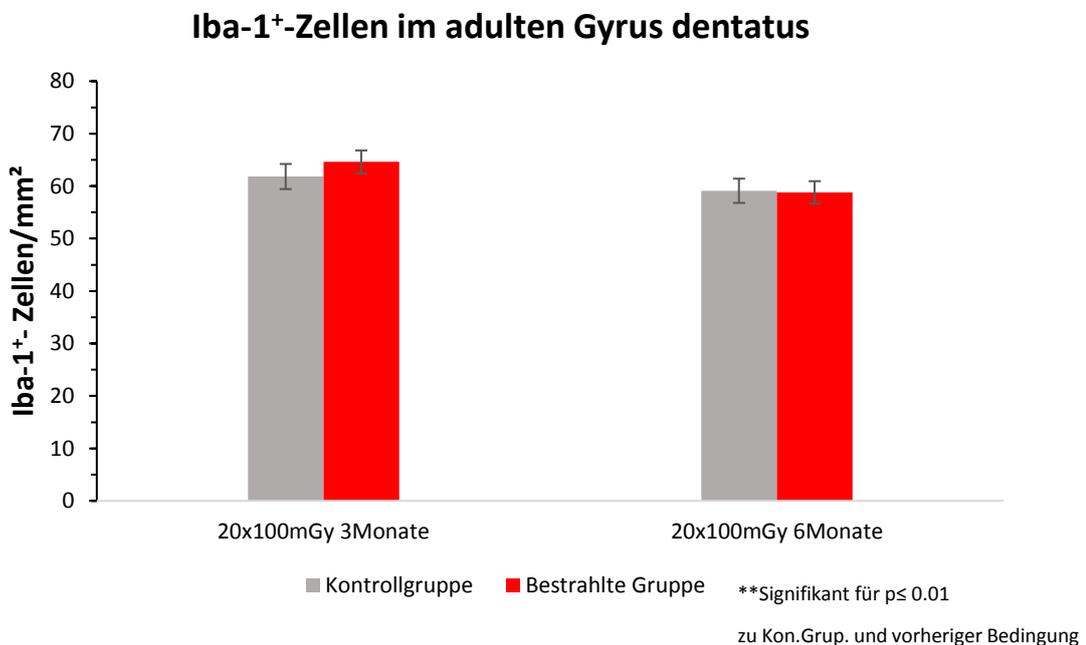


**Abbildung 4-7: Ansicht adult Kontrolle, 15x 100mGy 72h, 20x 100mGy 72h, 20x 100mGy 1 Mo.**  
Mikroskopische Ansicht 20x vergrößert, eindeutig Iba-1<sup>+</sup>Zellen (rosa) sind jeweils durch einen Pfeil markiert.

### 4.2.3. Adult 20x 100mGy 3 Mo., 20x 100mGy 6Mo.

Die altersentsprechenden Kontrollgruppen zu 20x 100mGy 3 Mo. und 20x 100mGy 6 Mo. weisen mit 61,83 und 59,11 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare und entsprechendem Hilus erhöhte Werte im Vergleich zu den restlichen adulten Kontrollgruppen auf.

3 Monate nach der Bestrahlung mit 20x 100mGy ist mit 64,62 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> kein signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrollgruppe zu verzeichnen. Die mit 20x 100mGy bestrahlte Gruppe 20x 100mGy weist 6 Monate nach Bestrahlungsende mit 58,79 *Iba-1*<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> einen fast identischen Wert zur Kontrollgruppe auf.



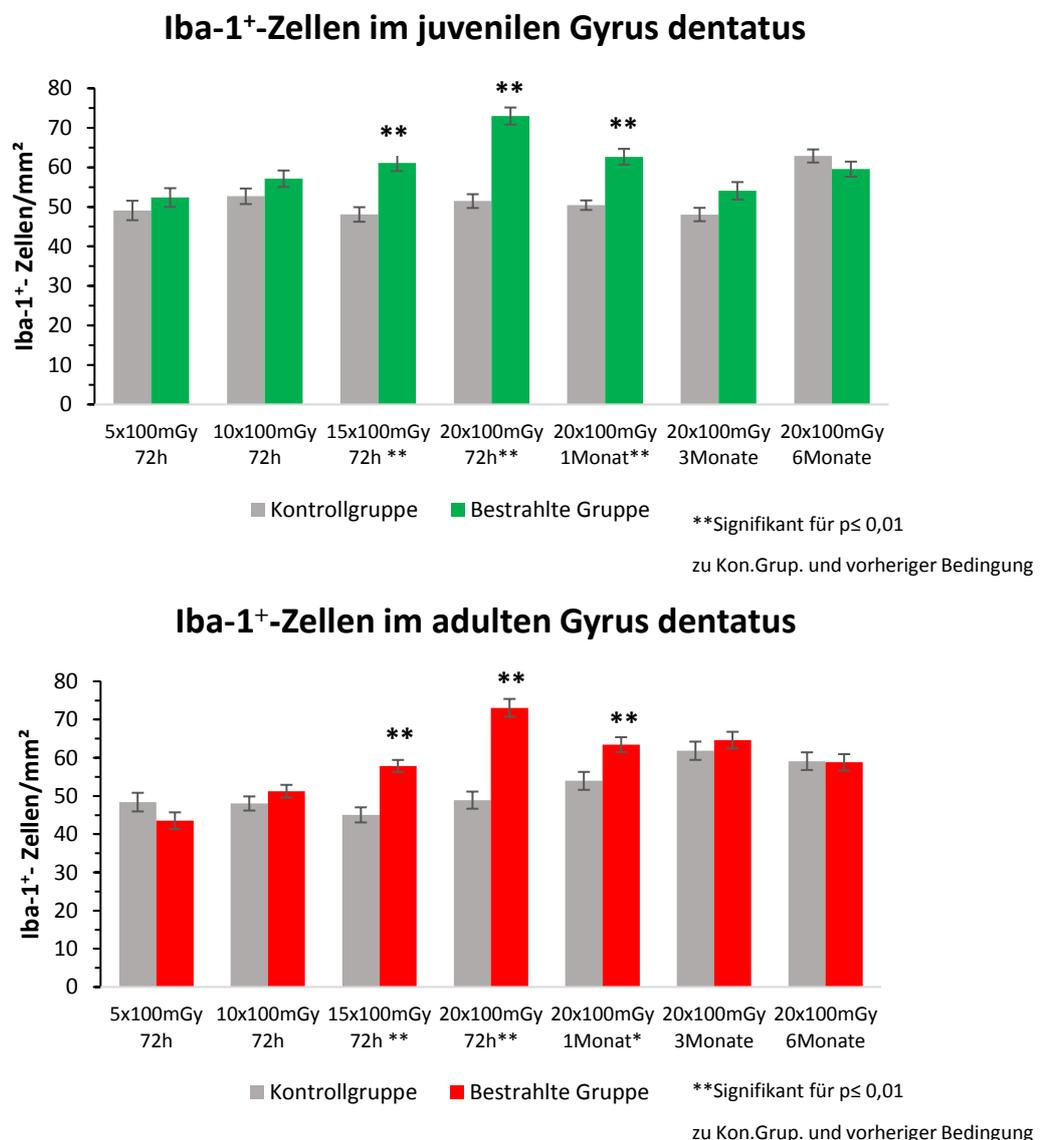
**Abbildung 4-8: Ergebnisse für adult 20x 100mGy 3 Mo. /20x 100mGy 6 Mo.**

*Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von adulten C56Bl6-Mäusen nach Bestrahlung mit 20x 100mGy 3 Monate sowie 6 Monate nach Bestrahlungsende im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen.*

*\*\* signifikanter Unterschied zur altersentsprechenden Kontrollgruppe sowie der vorangegangenen bestrahlten Bedingung ( $p \leq 0.01$ )*

### 4.3. Vergleich bestrahlter juveniler und adulter Mäuse

Mit 27,4% Steigerung zur Kontrollgruppe ist die juvenile bestrahlte Gruppe 72h nach 15x 100mGy annähernd vergleichbar mit der unter gleichen Bedingungen untersuchten adulten bestrahlten Gruppe (28,4%). Die juvenile bestrahlte Gruppe ist 72h nach 20x 100mGy mit 41,8% höheren Werten zur Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden zur gleich bestrahlten adulten Gruppe, die eine Steigerung von 49,9% aufweist. In gleicher Hinsicht sind bei den Gruppen die 1 Monat nach 20x 100mGy untersucht wurden, die juvenile bestrahlte Gruppe mit 24,3% nicht signifikant different zur adulten bestrahlten Gruppe mit 17,6%.



**Abbildung 4-9: Übersicht der bestrahlten juvenilen und adulten C57Bl6 Mäuse**

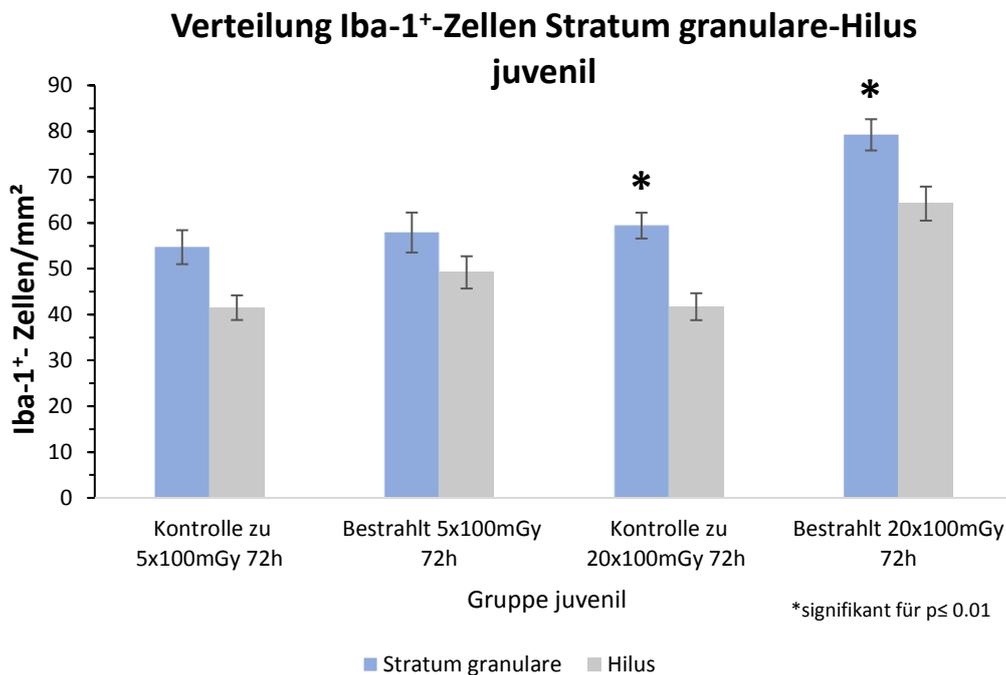
Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von adulten und juvenilen C56Bl6-Mäusen nach Bestrahlung mit 5x 100mGy, 10x 100mGy, 15x 100mGy und 20x 100mGy 72h sowie 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach Bestrahlungsende im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen.

## 4.4. Verteilung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen Stratum granulare und Hilus

### 4.4.1. Verteilung bei juvenil 5x 100mGy 72h und 20x 100mGy 72h

Für die Kontrollgruppe zu 5x 100mGy 72h besteht mit 54,7 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare des Gyrus dentatus und 41,5 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Hilus kein signifikanter Unterschied. Bei der bestrahlten Gruppe 5x 100mGy mit Untersuchung 72h nach Bestrahlungsende liegt mit 57,89 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare und 49,2 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Hilus ebenfalls keine signifikante Differenz vor.

Signifikant ist mit 59,4 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare die Differenz zum Hilus, der 41,71 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> bei der Kontrollgruppe zu 20x 100mGy 72h aufweist. Dies bedeutet einen um 42,4% erhöhten Wert im Stratum granulare im Vergleich zum entsprechenden Hilus. Bei der bestrahlten Gruppe 20x 100mGy mit Untersuchung 72h nach Bestrahlungsende liegt mit 79,21 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare und 64,2 Iba-1<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> im Hilus ein signifikanter Unterschied von 23,4% vor ( $p \leq 0.01$ ).



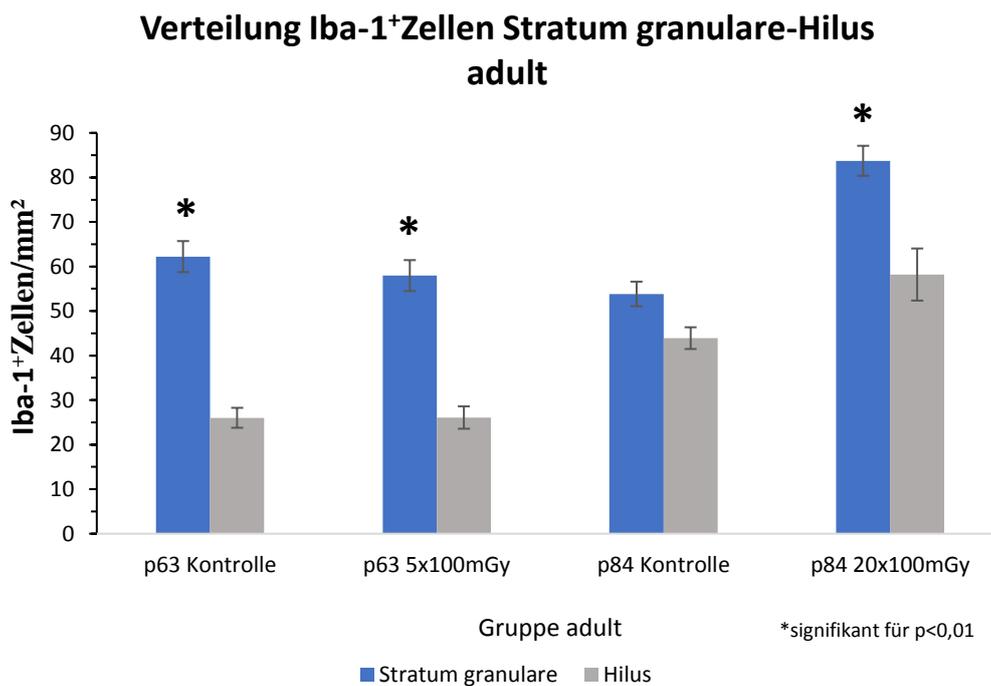
#### Abbildung 4-10: Verteilung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen dem juvenilen Str.gran. und Hilus

Untersuchung der Verteilung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen Stratum granulare und Hilus des Gyrus dentatus durch Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>-Zellen im Gyrus dentatus von unbestrahlten sowie mit 5x 100mGy und 20x 100mGy (Untersuchung nach 72h) bestrahlten juvenilen C56Bl6-Mäusen.

#### 4.4.2. Verteilung bei adult 5x 100mGy 72h und 20x 100mGy 72h

Für die Kontrollgruppe zu 5x 100mGy 72h besteht mit 62,23 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Bereich des Stratum granulare des Gyrus dentatus und 26,03 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Hilus ein signifikanter Unterschied. Dies entspricht einem um 239% höheren Wert im Stratum granulare im Vergleich zum Hilus. Bei der bestrahlten Gruppe 5x 100mGy mit Untersuchung 72h nach Bestrahlungsende liegt mit 57,96 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare und 26,09 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Hilus ebenfalls eine signifikante Differenz vor. Prozentual gesehen liegt auch hier ein um 222% höheres Ergebnis im Stratum granulare verglichen zum Hilus vor.

Bei der Kontrollgruppe zu 20x 100mGy 72h ist mit 53,84 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare die Differenz zum Hilus, der lediglich 43,92 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> aufweist, nicht signifikant. 72h nach Bestrahlung mit 20x 100mGy ist mit 83,74 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare und 58,2 *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Hilus, was einem 43,9% erhöhten Wert entspricht, ein signifikanter Unterschied vorhanden.

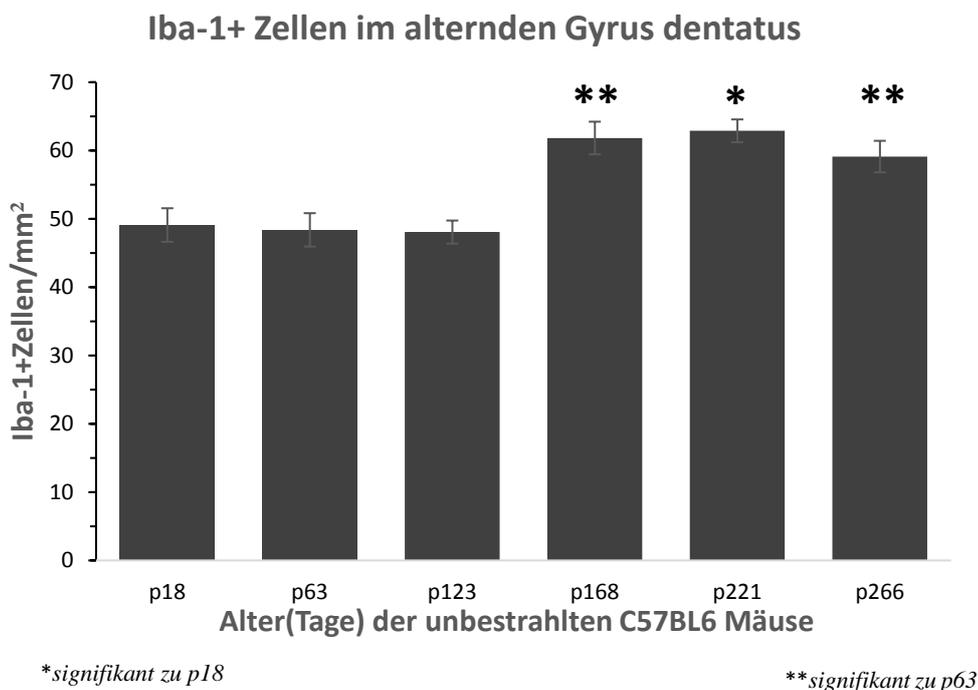


**Abbildung 4-11: Verteilung der *Iba-1*<sup>+</sup> Zellen zwischen dem adulten Str.gran. und Hilus**  
 Untersuchung der Verteilung der *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen zwischen Stratum granulare und Hilus des Gyrus dentatus durch Quantifizierung der *Iba-1*<sup>+</sup>Zellen im Gyrus dentatus von unbestrahlten sowie mit 5x 100mGy und 20x 100mGy (Untersuchung nach 72h) bestrahlten juvenilen C56Bl6-Mäusen.

## 4.5. Iba-1<sup>+</sup>Zellen im unbestrahlten alternden Gyrus dentatus und Hilus

Es besteht mit 49,09 Iba-1<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> bei den 18 Tage alten unbestrahlten Mäusen ein signifikanter Unterschied zu den 221 Tage alten Mäusen, die 62,88 Iba-1<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Stratum granulare und Hilus aufweisen. Dies entspricht einer Steigerung von 28% im Vergleich zu den 18 Tage alten Mäusen.

Bei den 63 Tage alten unbestrahlten Mäusen zeigen sich 48,39 Iba-1<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup>, während die 266 Tage alten Mäuse zudem 59,11 Iba-1<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> im Gyrus dentatus vorweisen. Auch hier ist eine signifikante Steigerung von 22,2% im Vergleich zu den 63 Tage alten Mäusen zu verzeichnen. Auch bei den 168 Tage alten Mäusen zeigt sich mit 61,83 Iba-1<sup>+</sup>Zellen/mm<sup>2</sup> ein signifikantes Ergebnis im Vergleich zu 63 Tage alten Mäusen.



**Abbildung 4-12 Vergleich der unbestrahlten Mäuse verschiedenen Alters**

Untersuchung der Iba-1<sup>+</sup>Zellen im alternden Gyrus dentatus durch Quantifizierung der Iba-1<sup>+</sup>Zellen im Gyrus dentatus von unbestrahlten 18 Tage(p18), 63 Tage(p63), 123 Tage(p123), 168 Tage (p168), 221 Tage (p221) und 266 Tage(p266) alten C56Bl6-Mäusen. Zur Signifikanzprüfung wurde jeweils innerhalb der primär juvenilen (p18, p123, p221) oder primär adulten Kohorten (p63, p221, p266) verglichen.

(Signifikant für  $p < 0.01$  zu p18 juvenil oder zu p63 adult)

## 5. Diskussion

### 5.1. Interpretation der Ergebnisse

Bei der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich kommt es regelmäßig zu Strahlenbelastungen des Gehirns, wenn auch nur mit niedrigen Dosen. Diese Untersuchungen ermöglichen es die Auswirkungen einer Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Neuroinflammation im Bereich des Gyrus dentatus zu analysieren. Dabei wurde eine fraktionierte Bestrahlung mit 100mGy über verschiedene Zeitspannen appliziert, und eine Quantifizierung von Iba-1<sup>+</sup>Zellen im Stratum granulare des Gyrus dentatus und dessen Hilus durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach längerem Applikationszeitraum eine Neuroinflammation induziert wurde, was sich in einem Anstieg der Iba-1<sup>+</sup>Zellen im Hippocampus bemerkbar machte. Dabei waren für das juvenile, sowie das adulte Individuum keine nennenswerten Unterschiede feststellbar. Bei beiden ist 72h nach 15x 100mGy und 20x 100mGy, sowie 1 Monat nach 20x 100mGy ein deutlicher Anstieg an Iba-1<sup>+</sup>Zellen festzustellen, was dementsprechend als eine verstärkte Neuroinflammation zu interpretieren ist. Nachuntersuchungen die 3 Monate oder 6 Monate nach Bestrahlung vorgenommen wurden, zeigen keine spezifische auf Niedrig-Dosis-Bestrahlung zurückzuführende Neuroinflammation. Hier spielt jedoch der Faktor des Alterns des Individuums eine zunehmend größere Rolle, was sich in einer basal verstärkten Neuroinflammation niederschlägt. So waren bei unbestrahlten Mäusen ab dem 168 Lebenstag eine signifikant erhöhte Anzahl an Iba-1<sup>+</sup>Zellen im Gyrus dentatus nachzuweisen. Dabei scheint sich die strahleninduzierte Neuroinflammation auf das zellreiche Stratum granulare zu konzentrieren, was möglicherweise einen Hinweis auf eine strahleninduzierte neuroinflammative Triggerrung gibt. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass die Stammzellen des Gyrus dentatus, welche im Stratum granulare ansässig sind, stark durch äußere Reize beeinflusst werden (Kempermann et al. 2004).

Nicht signifikant waren die Ergebnisse für die nur kurz bestrahlten juvenilen und adulten Gruppen, die 72h nach 5x 100mGy und 10x 100mGy untersucht wurden. Offenbar reichen 100mGy Strahlendosen, die über einen zu kurzen Zeitraum verabreicht wurden nicht aus, um eine sicher nachweisbare Neuroinflammation im Bereich des Gyrus dentatus zu provozieren. Zwischen den einzelnen applizierten Strahlendosen scheint es dem Gehirn zu gelingen die repetitive Noxe auszugleichen und eine zunehmende Neuroinflammation vorerst zu unterdrücken. So zeigt sich

beim Vergleich zwischen den Gruppen 72h nach 5x 100mGy und 10x 100mGy und den altersentsprechenden Kontrollgruppen sogar in Einzelfällen eine tendenziell niedrigere Zahl an Iba-1<sup>+</sup>Zellen als bei den bestrahlten Gruppen. Dies unterstreicht wiederum die neuroinflammatorische Unberührtheit des Gehirnes nach zu kurzer Applikation von niedrigen Dosen. Man bedenke jedoch, dass solch kurze therapeutische Bestrahlungszeiträume (5x, 10x fraktionierte Bestrahlung) klinisch untypische Bestrahlungsprotokolle darstellen und somit eine etwas untergeordnete Rolle spielen.

Bei den Bedingungen 72h nach 15x 100mGy und 20x 100mGy war ein signifikanter Anstieg der Iba-1<sup>+</sup>Zellen zu verzeichnen. Nach 15 und 20 Applikationen ist die Akkumulation der bis dato applizierte Niedrig-Dosen-Strahlung ausreichend, um eine nachweisbare Neuroinflammation auszulösen. Ob der Anstieg der Iba-1<sup>+</sup>Zellen schlussendlich das Resultat einer lokalen Vermehrung von mikroglialen Zellen, einem Einwandern aus benachbarten Arealen oder einem Zuwachs aus dem Pool der Blutmonozyten ist, ist mittels des benutzten Antikörpers und den daraus generierten Ergebnissen nicht nachzuvollziehen. Dazu müsste man beispielsweise auf eine CD11b/c /CD45 Färbung zurückgreifen. Tatsächlich ist nämlich bei einmalig applizierten Dosen von 10 Gy, ein Einwandern von Makrophagen aus der Peripherie nachgewiesen worden (Morganti et al. 2014). Zwischen den adulten und juvenilen Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied in der strahleninduzierten Neuroinflammation. Möglicherweise zeigt also bei beiden Gruppen der Gyrus dentatus, mit seinen zur Neurogenese fähigen Stammzellen, eine ähnliche neuroinflammatorische Strahlensensibilität.

Auch nach 1 Monat zeigt sich immer noch eine signifikante, durch repetitive 100mGy Strahlenexposition verstärkte, Neuroinflammation. Von der Ausprägung her entspricht es in etwa der Neuroinflammation die 72h nach 15x 100mGy feststellbar ist. Somit war die Neuroinflammation wiederum weniger ausgeprägt als 72h nach Bestrahlung mittels 20x 100mGy. Es ist nicht eindeutig nachzuvollziehen, ob es sich bei der weiterhin gesteigerten Neuroinflammation nach 1 Monat, tatsächlich um eine strahleninduzierte Chronifizierung handelt. So kann es sich lediglich um das Ergebnis eines langsamen Rückganges der durch langandauernde konsekutive Niedrig-Dosis-Strahlung signifikant erhöhte Neuroinflammation handeln. Es wäre also nur das Resultat einer rückläufigen Neuroinflammation, die ihren Ursprung in den 20x 100mGy Bestrahlungsfractionen findet. Entscheidend wäre hier die Beobachtung von Mäusen, bei denen 1,5 Monate und 2 Monate nach der Bestrahlung der Gyrus dentatus auf Iba-1<sup>+</sup>Zellen untersucht wird. Es fällt ebenfalls schwer die Ergebnisse der adulten Gruppe, die 3 Monate nach 20x 100mGy untersucht wurden, in Beziehung zu einem chronischen Entzündungsprozess zu

setzen. Schuld daran ist die zunehmend durch das Alter beeinflusste Neuroinflammation. So gehen die strahleninduzierte und die altersbedingte Neuroinflammation kontinuierlich im Laufe der Beobachtung ineinander über und lassen bei den entscheidenden Gruppen für eine Untersuchung der chronischen Vorgänge keine klare Distinktion mehr zu.

Bei der juvenilen Gruppe 20x 100mGy mit Untersuchung 3 Monate nach Bestrahlungsende lassen sich die Langzeitauswirkungen erahnen, da aus der Kontrollgruppe ersichtlich wird, dass noch keine altersbedingte Zunahme der Neuroinflammation stattgefunden hat. Bei dieser Gruppe waren die Ergebnisse mit  $p < 0,51$  nicht signifikant. Die erhöhten Werte nach 3 Monaten zeigen dabei aber die Tendenz zur weiterhin erhöhten, strahleninduzierten Neuroinflammation. Auch hier wird ersichtlich, dass auch die Beobachtungszeiträume 1,5 Monate und 2 Monate nach Bestrahlung genauer untersucht werden müssen. Dadurch, dass es bei der 168 Tage alten juvenilen Kontrollgruppe noch zu keinem altersbedingten Anstieg der Neuroinflammation kam, wird auch 1,5 Monaten und 2 Monaten nach Bestrahlungsende voraussichtlich nicht mit einer zusätzlich altersbedingten Zunahme der Neuroinflammation zu rechnen sein.

Vergleicht man adulte und juvenile unbestrahlte Gruppen wird ersichtlich, dass zwischen der juvenilen und adulten Kontrollgruppe (p168 adult und p123 juvenil) nur 1,5 Monate Altersdifferenz liegen. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist bei der 168 Tage alten adulten Gruppe eine signifikante Zunahme im Vergleich zu 63 Tage alten Mäusen an Iba-1<sup>+</sup>Zellen zu verzeichnen. Bei der unbestrahlten 123 Tage alten juvenilen Gruppe ist dies nicht der Fall. Dies kann als eine altersbedingte Zunahme der Neuroinflammation interpretiert werden.

Bei den juvenilen und adulten Mäusen lässt sich 6 Monate nach 20x 100mGy hinsichtlich der Iba-1<sup>+</sup>Zellen keine Differenz zwischen den Kontrollgruppen und den bestrahlten Gruppen feststellen. Auch hier macht sich die altersbedingte Neuroinflammation bemerkbar und verdeckt mögliche Effekte der Niedrig-Dosis-Bestrahlung.

Beim Vergleich zwischen Stratum granulare und Hilus zeigt sich, dass sowohl bei den Kontrollgruppen als auch bei den bestrahlten Gruppen eine signifikante oder tendenziell höhere Anzahl an Iba-1<sup>+</sup>Zellen im Stratum granulare des Gyrus dentatus zu finden ist. Die erhöhte Präferenz für das Stratum granulare ist womöglich auf die erhöhte Dichte an Zellen in jenem Anteil zurückzuführen. Der stark ausgeprägte Unterschied zwischen Stratum granulare und Hilus bei p63 Kontrolle und p63 5x 100mGy 72h ist womöglich auf das Färbeprotokoll zurückzuführen. Da es tatsächlich die Präparate des ersten Färbungssatzes waren, könnten Ungenauigkeiten beim Färbungsprozess zu dieser starken Differenz geführt haben.

## 5.2 Kritische Betrachtung der Methodik

### Versuchstiere

C57BL6 Mäuse sind der älteste und meistgenutzte Mausstamm weltweit. Mit 84 Mäusen und dementsprechend 6 Mäusen pro Bedingung (inklusive Kontrollgruppe) war die Anzahl der untersuchten Tiere für tatsächlich aussagekräftige Ergebnisse ausreichend. Eine höhere Anzahl würde die Aussagekraft der Ergebnisse weiter positiv beeinflussen. Besonders zum Zwecke der Langzeituntersuchungen müssten weitere Mäuse für die Bedingungen 20x 100mGy 1,5 Monate und 2 Monate herangezogen werden.

### Bestrahlungsprotokoll

Das Bestrahlungsprotokoll entsprach mit 5-maliger Bestrahlung pro Woche einer typisch verlaufenden klinischen Bestrahlungstherapie. Die Uhrzeit der Bestrahlung war jeden Tag die gleiche, sodass auch dies den klinischen Alltag repräsentiert. Die Nachuntersuchungen 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach der Bestrahlung sollen die Langzeitauswirkungen der fraktionierten Niedrig-Dosis-Strahlung auf die Neuroinflammation im Hippocampus darlegen. Weitere Untersuchungen wie z.B. 1,5 Monate, 2 Monate und 2,5 Monate nach der Bestrahlung würden die Aussagekraft hinsichtlich einer möglichen Chronifizierung deutlich verbessern. Besonders bei den juvenilen Mäusen scheinen diese Intervalle interessant zu sein. Auch Nachuntersuchungen (1 Monat, 2 Monate...) bei Bestrahlung mit 15x100mGy könnte die neuroinflammatorische Potenz der Niedrig-Dosis-Bestrahlung im Gyrus dentatus weiter unterstreichen.

Die Tötung der Tiere 72h nach der letzten Bestrahlung war in Gegensatz zu einer früheren Tötung zu bevorzugen, um tatsächlich die kumulative und zeitabhängige Nuance der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung hervorzuheben. In Wahrheit könnte die Kritik laut werden, dass hauptsächlich die zuletzt applizierte Dosis für die erhöhte Anzahl an Iba-1<sup>+</sup>Zellen verantwortlich sei und man hier lediglich akute Effekte beobachten könne. Ergebnisse die eigentlich nicht signifikant sind, würden in diesem Fall plötzlich eine ihnen nicht gerechte Signifikanz erhalten.

Die Auswirkungen einer mehrfach applizierten fraktionierten Niedrigdosis würden also durch ein zu kurzes Intervall zwischen Bestrahlung und Tötung an Aussagekraft verlieren.

### Gewebeschnitte

Bei den Gewebeschnitten war es wichtig, dass bei allen Tieren jeweils Gewebeschnitte aus etwa der gleichen Region des Gyrus dentatus gewonnen wurden. Die untersuchten Serienschnitte hatten in etwa immer den gleichen Abstand zueinander (80µm) und somit resultierten 3 biologische Replikate. Zudem soll der Gyrus dentatus und dessen zugehöriger Hilus in der Gesamtheit untersucht werden, was bedeutet, dass die Schnitte möglichst mehreren Arealen stammen sollten. Zur Orientierung dient das Bregma, welches nach dem Hineinschneiden in den Paraffinblock, eine einigermaßen sichere Methode zur Identifikation der einzelnen Anschnitte des Gyrus dentatus darstellt. Es wurden jeweils 3 Gehirnschnitte von jeder Maus hergestellt. Zur weiteren Verbesserung der Signifikanz der Ergebnisse wäre die Auswertung von jeweils 4 Gehirnschnitten pro Maus durchaus in Erwägung zu ziehen.

### Färbungsprotokoll

Bei den Untersuchungen der Neuroinflammation im adulten und juvenilen Hippocampus wurde der Antikörper gegen das Protein Iba-1 genutzt. Iba-1 ist dabei ein Marker, der bei der Mikroglia sowie den Makrophagen vorkommt (Ito et al. 1998). Iba-1 ist somit kein spezifischer Marker, der dazu dient ausschließlich phänotypisch eindeutige Mikroglia in Evidenz zu setzen. Die Quelle der nachgewiesenen Entzündungszelle spielt jedoch für diese Untersuchung eine untergeordnete Rolle. Das vermehrte Vorkommen von Iba-1<sup>+</sup> Zellen ist demzufolge mit einer verstärkten Neuroinflammation gleichzusetzen, da es mehrere Quellen der neuroinflammativen Zellen mit einbezieht. Die Untersuchung eines Markers, der spezifisch nur die Mikroglia nachweist, würde den Effekt der Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Neuroinflammation womöglich nicht in ihrem vollen Umfang darstellen. Jedoch ist eine genauere Untersuchung der beteiligten Subpopulationen der neuroinflammativen Zellen von Interesse. Eine CD11b/CD45 Flow Cytometrie könnte zu diesem Zwecke angewandt werden.

Bei dem Iba-1 Antikörper von Abcam handelt es sich um einen polyklonalen Ziegenantikörper. Es existiert zurzeit nur ein monoklonaler Iba-1 Antikörper auf dem Markt. Leider ist dieser Antikörper ein Maus-Antikörper und somit sehr störanfällig bei der Färbung von murinem Gewebe. Aus diesem Grund wurde der Ziegenantikörper genutzt. Dieser zeichnete sich durch eine sehr konstante replizierbare Färbung aus.

### Untersuchte Region und Auszählung

Bei der untersuchten Region handelt es sich um den Gyrus dentatus, der ein Teil des Hippocampus darstellt. Schon seit längerem ist bekannt, dass der Gyrus dentatus in der Lage ist aus sich teilenden Stammzellen unter anderem neue Neuronen zu bilden (Eriksson et al. 1998). Die Integration von neu entstandenen Neuronen, die sich in verschiedenen Stadien der Reife befinden, spielen hinsichtlich der adulten Neurogenese im Hippocampus eine wichtige Rolle bei Lernprozessen (Deng et al. 2010). Zudem gilt der Gyrus dentatus als Eingangstor zur Hippocampusformation (Whrigt und Jackson 2014). Diese Eigenschaften machen den Gyrus dentatus hinsichtlich des Auftretens einer strahleninduzierten Neuroinflammation interessant. Die Auswirkungen der strahleninduzierten Neuroinflammation könnten dann besonders in diesem Bereich einen größeren Einfluss auf die kognitiven Fähigkeiten des Individuums ausüben.

Des Weiteren ist der Gyrus dentatus und dessen Hilus als Struktur leicht zu differenzieren und einzugrenzen. Die Zugehörigkeit einer Zelle zum Gyrus dentatus fiel somit leicht zu bestimmen. Zur weiteren Verbesserung der Auszählung wurde jedoch noch zusätzlich definiert, dass eine Iba-1<sup>+</sup> Zelle nur dann dem Gyrus dentatus oder dessen Hilus zugehörig war, wenn sie nicht mehr als den eigenen Zelldurchmesser von mehreren anderen Zellen des Gyrus dentatus entfernt war. Dies war besonders wichtig, da verhältnismäßig wenig Iba<sup>+</sup>Zellen auf eine große Fläche verteilt waren. Die sonst entstandenen Schwankungen bei der Auszählung wären somit zu groß geworden.

Das Auszählen bei 60-facher Vergrößerung unter zwei Filtern des Fluoreszenzmikroskops garantierte, dass erst dann eine Iba-1<sup>+</sup>Zelle detektiert werden konnten, wenn sowohl das zellspezifische (358nm) als auch das markerspezifische Signal (568nm) gleichzeitig positiv waren.

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney-U-Testes durchgeführt. Diese Signifikanzprüfung wurde gewählt, da es aufgrund der Präsenz von wenigen Iba-1<sup>+</sup>Zellen auf einer verhältnismäßig großen Fläche, zu Ausreißern bei der Auszählung kam. Es war zudem auch nicht von einer Normalverteilung auszugehen. Da es sich bei dieser Untersuchung nicht um eine gerichtete Hypothese, sondern um die grundlegende Frage eines Unterschiedes zwischen der Kontrollgruppe und der bestrahlten Gruppe handelte, wurde ein zweiseitiger Test verwendet.

### 5.3. Vergleichbare Studien

Bei einer Studie, bei der unter anderem CD11<sup>+</sup>Zellen im Gyrus dentatus untersucht wurden, zeigte sich im Gyrus dentatus nach einmaliger Ganzkörperbestrahlung mittels 1Gy ein Anstieg der CD11<sup>+</sup>Zellen von 62,2% im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dazu kam es zu einem signifikanten Anstieg von TNF $\alpha$  nach Applikation von 1Gy (Kempf et al. 2014). Die Dosis lag mit 1Gy deutlich über der Definition einer Niedrigdosis und kann auch hinsichtlich eines kumulativen Effekts von Niedrigdosen mit dieser Untersuchung nicht direkt verglichen werden. Trotzdem zeigt die Studie ebenfalls, dass auch nach Applikation von niedrigeren Bestrahlungsdosen, ein deutlich messbarer Anstieg der Neuroinflammation im Gyrus dentatus nachgewiesen werden kann.

In einer weiteren Studie wurden unter anderem die Effekte von einmalig applizierten Niedrigdosen auf die Neuroinflammation mittels des Iba-1 Markers gemessen. 10 Tage und 10 Wochen alte Mäuse wurden dabei jeweils 100mGy und 2Gy Schädelbestrahlung ausgesetzt. Nachuntersuchungen erfolgten jeweils 1 Tag, 7 Tage, 3 Monate und 6 Monate nach der Bestrahlung. Bei der Untersuchung des gesamten Hippocampus waren nur die Ergebnisse für 2Gy bei den 10 Tage alten Mäusen 1 Tag nach Bestrahlung signifikant ( $p=0,04$ ). Die restlichen Bedingungen zeigten keine Signifikanz. Auch bei 10 Wochen alten Mäusen zeigte sich nach der Bestrahlung mit 2Gy Einzeldosis kein signifikanter Unterschied (Casciati et al. 2016). Vergleicht man diese Ergebnisse nun mit denen aus dieser Dissertation, so wird einem klar, dass der entscheidende Unterschied in einer Mehrfachapplikation einer definierten Strahlendosis über einen längeren Zeitraum liegt. Man kann zunächst davon ausgehen, dass die 2Gy Einzeldosis der Gesamtdosis von 20x 100mGy entsprechen und 10 Wochen alte Mäuse mit den 12 Wochen alten Mäusen der Bedingung 20x 100 mGy 72h dieser Untersuchung annähernd vergleichbar sind. Die Ergebnisse waren für die Bedingung 2Gy 10Wo alte Maus bei der eben beschriebenen Studie nicht signifikant, während aber die Bedingung 20x100mGy 72h bei den 12Wo alten Mäusen klar signifikante ( $p<0,0001$ ) Ergebnisse lieferte. Somit lässt sich erahnen, dass dem Faktor eines sich immer wiederholenden Reizes, und sei es nur eine niedrige Dosis von 100mGy, womöglich eine besondere Rolle zuzusprechen ist. Nicht nur hohe Dosen, sondern auch niedrige Dosen würden über diesen Weg ihr neuroinflammatives Potential erhalten. Leider lassen beim Vergleich zwischen den beiden Studien lediglich Mutmaßungen anstellen. Um einen direkten Vergleich herstellen zu können, sollte die Bedingung 2Gy 72h zusätzlich zu den anderen Bedingungen untersucht werden.

Ein BrdU/Iba-1 Doppelfärbung wurde bei einer Studie angewandt, die männliche C57 Mauskohorten jeweils im Alter von 2, 4, 6, 12 und 18 Monaten mit 5Gy Einzeldosis bestrahlten. Untersucht wurden dabei der Gyrus dentatus sowie die CA1 Region. Es konnte festgehalten werden, dass BrdU/Iba-1<sup>+</sup> Zellen im Gyrus dentatus und der CA1 Region in allen Alterskategorien nach Bestrahlung signifikant erhöht waren. Zudem konnte ein altersbedingter signifikanter Anstieg der BrdU/Iba-1<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden (Cheng et al. 2016). Die 5Gy liegen hier deutlich höher als die bei dieser Studie verwendeten fraktionierten Bestrahlung mit 100mGy. Jedoch zeigt sich auch hier, dass es durchgehend bei allen Alterskategorien zu einem strahlenbedingten Anstieg der BrdU/Iba-1<sup>+</sup>Zellen kommt. Auch deckt sich die Aussage einer altersbedingten Zunahme der BrdU/Iba-1<sup>+</sup>Zellen mit den Ergebnissen aus dieser Untersuchung.

Die Auswirkungen von Schwerionen wurde bei einer anderen Untersuchung an 2 Monate alten C57BL6 Mäusen mit jeweils Einzelfraktionen von 500mGy, 1Gy, 2Gy und 4Gy untersucht. Bei den Schwerionen handelte es sich um <sup>56</sup>Fe-Partikel, die bei isolierter Kopfbestrahlung appliziert wurden. Nach der Einzelbestrahlung erfolgte 2 Monate später die Untersuchung des Gyrus dentatus auf CD68<sup>+</sup>Zellen. Man konnte dabei feststellen, dass zwar tendenziell bei allen Bedingungen eine erhöhte Anzahl an CD68<sup>+</sup>Zellen vorhanden war, jedoch war keines der Ergebnisse signifikant (Rola et al. 2008). Diese Untersuchung ist hinsichtlich der differentiellen Strahlungsquelle und dem späten Untersuchungszeitraum schwierig mit der jetzigen Untersuchung zu vergleichen. Jedoch wird einem bewusst, dass die neuroinflammatorische Potenz der sich akkumulierenden fraktionierten Niedrigdosen im Vergleich zu der Einzelapplikation von Schwerionen wohl nicht zu unterschätzen ist.

Es lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse dieser Untersuchung nur mit Vorbehalt mit anderen Studien verglichen werden können. Insgesamt ist die aktuelle Datenlage zur Auswirkung von Niedrigdosen auf die Neuroinflammation sehr ernüchternd. Nur wenige Arbeitsgruppen applizieren dabei wirkliche Niedrigdosen oder applizieren diese, wenn überhaupt, nur als Einzeldosen. Andere signifikante Studien, die die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Neuroinflammation untersuchen, greifen oft auf Dosen von über 5Gy zurück. Eine Investigation unter diesen Bedingungen scheint jedoch wenig zielführend, wenn man bedenkt, dass bei derart hohen Dosen Tiere verenden oder schwere Organschäden davontragen.

Der hier nachgewiesene kumulative Effekt fraktionierter Niedrigdosen auf die Neuroinflammation lässt sich schlussfolgernd schwer mit anderen Studien vergleichen.

### 5.4. Schlussfolgerung

Es lässt sich resümieren, dass fraktionierte Niedrigdosen nach längerem Applikationszeitraum eine Neuroinflammation im Stratum granulare des Gyrus dentatus und dem dazugehörigen Hilus auslösen. In der Tat sind die Anzahl der Iba-1<sup>+</sup>Zellen sowohl bei den adulten als auch bei den juvenilen C57BL6 Mäusen 72h nach Bestrahlung mittels 15x 100mGy und 20x 100mGy 72h sowie 1 Monat nach 20x 100mGy im Vergleich zu ihren altersentsprechenden Kontrollgruppen signifikant erhöht. Ein Unterschied zwischen juvenilen und adulten Mäusen ist hinsichtlich der Gruppen mit signifikanten Ergebnissen nicht feststellbar. Die Beobachtung der Verteilung der Iba-1<sup>+</sup>Zellen zwischen dem Stratum granulare und dem Hilus des Gyrus dentatus zeigt eine Präferenz der Zellen für das Stratum granulare, dies auch bei der unbestrahlten Kontrollgruppe. Es ist zudem eine altersbedingte Neuroinflammation feststellbar, die sich bereits bei 24 Wochen alten Mäusen signifikant bemerkbar macht.

Die hier erhobenen Daten und die entsprechenden Auswertungen lassen sich nur schwer mit anderen Studien vergleichen. Der Grund sind die Anwendung höherer Dosen oder der Applikation von Niedrigdosen als Einzeldosen bei annähernd vergleichbaren Untersuchungen. Mit Fokus auf die rezidivierende Mehrfachapplikation in dieser Untersuchung und verglichen mit anderen Studien, lässt sich aber feststellen, dass besonders die Charakteristika der mehrfach wiederholten fraktionierten Niedrigdosis, eine besondere Rolle zu spielen scheint. Über diesen Weg erhält auch eine Niedrigdosis ihr neuroinflammatives Potential, dies besonders unter dem Gesichtspunkt, dass fraktionierte Niedrigdosen in der klinischen Routine der Radioonkologie wesentlich häufiger vorkommen als die einmalige Applikation einer Hochdosis. Niedrigdosen sind somit im klinischen Alltag keinesfalls als harmlos einzuordnen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538–1543.
2. Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B (1991). Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1541–1545.
3. Alliot F, Godin I, Pessac B (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res* 117:145–152.
4. Altman J, Bayer SA (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol* 301:365–381.
5. Amaral DG, Witter MP (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571–591.
6. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007). The dentate gyrus: Fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3–22.
7. Aumüller G, Wurzinger LJ (2010). *Anatomie*. 2. überarb. Aufl. Thieme, Stuttgart.
8. Badie B, Schartner JM (2000). Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery* 46:957-961.
9. Bartsch T, Wulff P (2015). The hippocampus in aging and disease. From plasticity to vulnerability. *Neuroscience* 309:1–16.
10. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA et al. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:1738-46.
11. Betlazar C, Middleton RJ, Banati RB, Liu G-J (2016): The impact of high and low dose ionising radiation on the central nervous system. *Redox Biol* 9:144–156.

12. Bilimoria PM, Stevens B (2015). Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res* 1617:7–17.
13. Boujard D, Anselme B, Cullin C, Raguénès-Nicol C (2014). *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. Springer, Berlin, Heidelberg.
14. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35:625–641.
15. Casciati A, Dobos K, Antonelli F et al. (2016). Age-related effects of X-ray irradiation on mouse hippocampus. *Oncotarget* 7:28040–28058.
16. Caviness VS, Rakic P (1978). Mechanisms of cortical development: A view from mutations in mice. *Annu Rev Neurosci* 1:297–326.
17. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007). The origin and cell lineage of microglia: New concepts. *Brain Res Rev* 53:344–354.
18. Chanas-Sacre G, Rogister B, Moonen G, Leprince P (2000). Radial glia phenotype: Origin, regulation, and transdifferentiation. *J Neurosci Res* 61:357–363.
19. Cheng Z, Li Y-Q, Wong CS (2016). Effects of Aging on Hippocampal Neurogenesis After Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 94:1181–1189.
20. Chinnasamy P, Lutz SE, Riascos-Bernal DF et al. (2015). Loss of Allograft Inflammatory Factor-1 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Limiting Encephalitogenic CD4 T-Cell Expansion. *Mol Med* 21:233–241.
21. Cohen-Jonathan E, Bernhard EJ, McKenna WG (1999). How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol* 3:77–83.
22. Colton CA, Wilcock DM (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Current Drug Targets* 9:174–191.
23. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M (1995). Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206:667–673.

24. Cuadros MA, Navascués J (1998). The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173–189.
25. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008). From inflammation to sickness and depression. When the immune system subjugates the brain. *Nat rev Neurosci* 9:46–56.
26. D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374:719–723.
27. Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ (2002). The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS lett* 514:115–121.
28. Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Neurosci* 11:339–350.
29. Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA et al. (2014). Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380–397.
30. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T. et al. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317.
31. Frisk V, Milner B (1990). The role of the left hippocampal region in the acquisition and retention of story content. *Neuropsychologia* 28:349–359.
32. Fuhrmann A (2013): *Zahnärztliche Radiologie*. 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, KG.
33. Gehrman J, Banati RB (1995). Microglial turnover in the injured CNS: Activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:680–688.
34. Ghosh A, Roy A, Liu X et al. (2007): Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18754–18759.

35. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M et al. (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841–845.
36. Grález-Scarano F, Baltuch G (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22:219–240.
37. Gross CG (2000). Neurogenesis in the adult brain: Death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1:67–73.
38. Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW (1998). The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* 125:2315–2325.
39. Gubert F, Zaverucha-do-Valle C, Pimentel-Coelho PM, Mendez-Otero R, Santiago MF (2009). Radial glia-like cells persist in the adult rat brain. *Brain Res* 1258:43–52.
40. Hall A (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509–514.
41. Hall EJ, Giaccia AJ (2012): Radiobiology for the radiologist. 7. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
42. Hall P, Adami H-O, Trichopoulos DP et al. (2004). Effect of low doses of ionising radiation in infancy on cognitive function in adulthood. Swedish population based cohort study. *BMJ Clin res ed* 328:19.
43. Hanisch U-K, Kettenmann H (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387–1394.
44. Hartmann G, Schlegel W (2013). Physikalische Grundlagen. In: Wannemacher M, Wenz F und Debus J (eds) *Strahlentherapie*, Springer Berlin, Heidelberg S.11–46.
45. Hayes GM, Woodroffe MN, Cuzner ML (1987). Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J Neurol Sci* 80:25–37.
46. Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol* 309:12–22.

47. Hoffman KE, Yock TI (2009). Radiation therapy for pediatric central nervous system tumors. *J Child Neurol* 24:1387–1396.
48. Ikeda Y, Terashima T (1997). Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn* 210:157–172.
49. Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996). A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biocheml Biophys Res Commun* 224:855–862.
50. Ito, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Brain Res Mol Brain Res* 57:1–9.
51. Johnson D, Krenger W (1992). Interactions of mast cells with the nervous system: Recent advances. *Neurochem Res* 17: 939–951.
52. Kahl-Scholz M, Vockelmann C (2017). Physikalische Grundlagen. In: Kahl-Scholz M und Vockelmann C(eds), *Basiswissen Radiologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, S.3–14.
53. Kalm M, Fukuda A, Fukuda H et al. (2009). Transient inflammation in neurogenic regions after irradiation of the developing brain. *Radiat Res* 171:66–76.
54. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y (2002). Macrophage/microglia-specific protein *Iba1* enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *J Biol Chem* 277:20026–20032.
55. Kauffmann GW, Moser E, Sauer R (2006). *Radiologie. Fragen und Antworten*. 3., überarb. Aufl., Elsevier Urban & Fischer, München.
56. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B Kronenberg G (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447–452.
57. Kempf SJ, Casciati A, Buratovic S et al. (2014). The cognitive defects of neonatally irradiated mice are accompanied by changed synaptic plasticity, adult neurogenesis and neuroinflammation. *Mol Neurodegener* 9:57

58. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA et al. (2016). Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine* 1.
59. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013). Microglia: New roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77:10–18.
60. Kofler J, Wiley CA (2011). Microglia. Key innate immune cells of the brain. *Toxicol Pathol* 39:103–114.
61. Kolb, Bryan; Whishaw, Ian Q. (2015). *Fundamentals of human neuropsychology*. 7. ed. Worth Publ, New York.
62. Korzhevskii DE, Kirik OV (2016). Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci Behav Physiol* 46:284–290.
63. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–2033.
64. Lambracht-Hall M, Dimitriadou V, Theoharides TC (1990). Migration of mast cells in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 56:151–159.
65. Lang G (2006). *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, Springer, Wien.
66. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151–170.
67. Lewit-Bentley A, Réty S (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10:637–643.
68. Li H, Jin G, Qin J et al. (2011). Identification of neonatal rat hippocampal radial glia cells in vitro. *Neurosci Lett* 490:209–214.
69. Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE (Hg.) (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*. 8., Auflage, Springer Medizin Verlag, Berlin, Heidelberg

70. Lorat Y, Timm S, Jakob B, Taucher-Scholz G, Rube CE (2016). Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation. *Radiother Oncol* 121:154–161.
71. Lowe XR, Bhattacharya S, Marchetti F, Wyrobek AJ (2009). Early brain response to low-dose radiation exposure involves molecular networks and pathways associated with cognitive functions, advanced aging and Alzheimer's disease. *Radiat Res* 171:53–65.
72. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci Res* 79:1–12.
73. Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci* 17.
74. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677–686.
75. Martinez FO, Gordon S (2014): The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000prime Rep* 6:13.
76. Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009). Alternative activation of macrophages. An immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27:451–483.
77. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M et al. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10:1544–1553.
78. Ming G-L, Song H (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250.
79. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta neuropathol* 101:249–255.
80. Morgan MA, Lawrence TS (2015). Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways. *Clin Cancer Res* 21:2898–2904.

81. Morganti JM, Jopson TD, Liu S, Gupta N, Rosi S (2014). Cranial irradiation alters the brain's microenvironment and permits CCR2+ macrophage infiltration. *PloS One* 9 e93650.
82. Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163:3771–3777.
83. Munder M (2009). Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158:638–651.
84. Nakano A, Harada T, Morikawa S, Kato Y (1990). Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol Jpn* 40:107–115.
85. Nicola Z, Fabel K, Kempermann G (2015): Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat* 9:53.
86. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318.
87. Norden DM, Godbout JP (2013). Review. Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *NeuroPathol App Neurobiol* 39:19–34.
88. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113 3073–3084.
89. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88:844–856.
90. O'Keefe J (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78–109.
91. O'Keefe J, Dostrovsky J (1971): The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171–175.

92. Pyo H, Yang M-S, Jou I, Joe E-H (2003). Wortmannin enhances lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in microglia in the presence of astrocytes in rats. *Neurosci Lett* 346:141–144.
93. Rakic P (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61–83.
94. Ramos-Vara JA (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42:405–426.
95. Rezaie P, Male D (1999). Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia. A review. *Microsc Res Tech* 45:359–382.
96. Rickmann M, Amaral DG, Cowan WM (1987). Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 264:449–479.
97. Rola R, Fishman K, Baure J et al. (2008). Hippocampal neurogenesis and neuroinflammation after cranial irradiation with (56)Fe particles. *Radiat Res* 169:626–632.
98. Röszer T (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediat Inflamm* 2015:816460.
99. Salter MW, Beggs S (2014). Sublime microglia: Expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158:15–24.
100. Scherer E, Sack H (1996). *Strahlentherapie. Radiologische Onkologie*. 4te Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg.
101. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hg.) (2017). *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. 31. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Berlin.
102. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2012). *Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 3. Aufl., Thieme (Prometheus, LernAtlas der Anatomie), Stuttgart
103. Scoville WB, Milner B (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11–21.
104. Shastri A, Bonifati DM, Kishore U (2013). Innate immunity and neuroinflammation. *Mediat Inflamm* 2013:342931.

105. Shetty AK, Turner DA (1996). Development of fetal hippocampal grafts in intact and lesioned hippocampus. *Prog Neurobiol* 50:597–653.
106. Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay M-È (2014). Surveillance, phagocytosis, and inflammation: How never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural plast* 2014:610343.
107. Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K (2007). Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55:412–424.
108. Silverman AJ, Sutherland AK, Wilhelm M, Silver R (2000). Mast cells migrate from blood to brain. *J Neurosci* 20:401–408.
109. Smith ML, Milner B (1981). The role of the right hippocampus in the recall of spatial location. *Neuropsychologia* 19:781–793.
110. Sofroniew MV (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647.
111. Solito E, Sastre M (2012). Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 3:14.
112. Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Río JA, Sotelo C (1997). Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 18:563–577.
113. Stanfield BB, Cowan WM (1979). The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 185:423–459.
114. Stracker TH, Petrini JHJ (2011). The MRE11 complex: Starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:90–103.
115. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 15:655–669.
116. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515–528.

117. Tam WY, Ma CHE (2014). Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep* 4:7279.
118. Tang Y, Le W (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53:1181–1194.
119. Thomas WE (1990). Characterization of the dynamic nature of microglial cells. *Brain Res Bull* 25:351–354.
120. Tofilon PJ, Fike JR (2000). The Radioresponse of the Central Nervous System. A Dynamic Process. *Radiat Res* 153:357–370.
121. Tonnessen BH, Pounds L (2011). Radiation physics. *J Vasc Surg* 53:6S–8S.
122. Tubiana M, Aurengo A, Averbeck D, Masse R (2006). Recent reports on the effect of low doses of ionizing radiation and its dose-effect relationship. *Radiat Environ Biophys* 44:245–251.
123. Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME (1995). Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: A novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clinl Investig* 95:2954–2962.
124. Vallières L, Sawchenko PE (2003). Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci* 23:5197–5207.
125. Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP (2009). The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272–282.
126. Varvel NH, Grathwohl SA, Baumann F et al. (2012). Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:18150–18155.
127. Wannemacher M, Debus J, Wenz F (2006). *Strahlentherapie*. Springer, Berlin, Heidelberg
128. Wawryk-Gawda E, Chylińska-Wrzos P, Lis-Sochocka M et al. (2014). P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma* 251:525–533.

129. Wright BJ, Jackson MB (2014). Long-term potentiation in hilar circuitry modulates gating by the dentate gyrus. *J Neurosci* 34:9743–9753.
130. Yamada M, Ohsawa K, Imai Y, Kohsaka S, Kamitori S (2006). X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium binding. *J Mol Biol* 364:449–457.
131. Zannini Laura, Delia D, Buscemi G (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol* 6:442–457.
132. Zurita E, Chagoyen M, Cantero M et al. (2011). Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res* 20:481–489.

## 7. Danksagung

Ich bedanke mich beim bei der Leiterin des Strahlenbiologischen Labors des Universitätsklinikums des Saarlandes, Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rube, für die Überlassung dieses Dissertationsthemas, die Betreuung und Unterstützung, die ich während meiner Promotion erfahren haben.

Ein weiterer Dank gebührt Frau Dr. Nadine Schuler für die Anleitung während der experimentellen Phase. Weiterhin möchte ich dem ganzen Laborteam danken.

Ein überaus großer Dank gebührt in besonderem Maße Frau M.Sc. Zoe Schmal. Ohne dich wäre vieles nicht möglich gewesen. Du hattest immer ein offenes Ohr für alle Fragen und standest immer kompetent mit dem richtigen Rat zur Seite. Danke für deine große Unterstützung.