

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

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

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes*

2020

vorgelegt von: M. Sc. Zoé Ann Schmal  
geboren am 06.10.1987 in Bad Wildungen

Dekan:

Univ. Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

**Prof. Dr. rer. nat. Carola Meier**

**Prof. Dr. med. Claudia Rube**

Tag der mündlichen Prüfung:

**27.11.2020**

# Inhalt

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1 Ionisierende Strahlung und ihre Effekte .....	5
2.2 Klinische Strahlentherapie .....	6
2.3 Strahleninduzierte DNA-Schäden / DSB-Reparaturmechanismen .....	8
2.3.1 DSB-Reparaturdefekte.....	11
2.4 Der Hippocampus.....	12
2.5 Adulte Neurogenese.....	15
2.6 Gliazellen und Neuroinflammation .....	21
2.7 Magnetresonanztomographie (MRT) .....	25
2.8 Fragestellung.....	30
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
3.1 Materialien.....	31
3.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	31
3.1.2 Reagenzien.....	32
3.1.3 Geräte und Software .....	33
3.1.4 Angesetzte Lösungen und Puffer .....	35
3.1.5 Antikörper .....	37
3.2 Methoden .....	38
3.2.1 Tierexperimente .....	38
3.2.2 Bestrahlungsplanung .....	39
3.2.3 Immunfluoreszenz-Untersuchung.....	44
3.2.4 Golgi-Cox.....	49

3.2.5	Blut-Hirn-Schranke.....	52
3.2.6	Proteomanalyse und Westernblot .....	53
3.2.7	Magnetresonanztomographie (MRT).....	57
3.2.8	Statistische Auswertung.....	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
4.1	DNA-Schäden nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung.....	60
4.1.1	DNA-Schadensanalyse direkt nach Bestrahlung mit 0.1 Gy.....	60
4.1.2	Persistierende DNA-Schäden nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung.....	61
4.2	Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf Proliferation und Apoptose .....	63
4.2.1	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu verminderter Proliferationsrate im Hippocampus juveniler Mäuse.....	63
4.2.2	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung hat keinen langfristigen Einfluss auf den programmierten Zelltod.....	65
4.3	Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Neurogenese .....	66
4.3.1	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu einer langfristigen Abnahme der Stammzellpopulation.....	66
4.3.2	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt unmittelbar und langfristig zu einer Abnahme der Vorläuferzellpopulation.....	69
4.3.3	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt unmittelbar und langfristig zu einer reduzierten Verschaltung der Vorläuferzellpopulation.....	71
4.3.4	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu verminderter synaptischer Plastizität.....	74
4.3.5	Proteom-Untersuchung von juvenilen Hippocampi nach repetitiver Niedrig-Dosis-Bestrahlung .....	75
4.3.6	IPA-Analyse nach repetitiver Niedrig-Dosis-Bestrahlung.....	76
4.3.7	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung verändert Expression von CREB und <i>downstream</i> liegenden Genen.....	78

4.3.8	Untersuchung der adulten Neurogenese in reparaturdefizienten Mäusen nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung.....	79
4.4	Änderung des Zellschicksals durch fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung.....	80
4.5	Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf Gliazellen.....	82
4.5.1	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu veränderten Zellzahlen der Astrozyten.....	82
4.5.2	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu einer Abnahme der Oligodendrozyten.....	86
4.5.3	Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu einem Anstieg der Mikroglia .....	88
4.6	In-vivo Untersuchungen mittels Kleintier-MRT .....	91
4.6.1	Perfusionsgewichtetes MRT.....	92
4.6.2	Diffusionsgewichtetes MRT.....	93
4.6.3	Relaxationszeiten T1 und T2.....	94
4.7	Einfluss auf Unversehrtheit der Blut-Hirn-Schranke.....	95
4.8	Golgi-Cox .....	95
4.8.1	Neuronale Imprägnierung.....	96
4.8.2	Gliale Imprägnierung.....	97
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>98</b>
5.1	DNA-Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüchen mithilfe von 53BP1 .....	99
5.2	Strahleninduzierte Beeinträchtigung der adulten Neurogenese .....	101
5.2.1	Adulte Neurogenese in DNA-Reparaturdefizienten Hippocampi.....	108
5.3	Strahleninduzierte Veränderung der Gliazellpopulationen als Indiz der Neuroinflammation .....	110
5.4	In-vivo messbare Veränderungen mittels MRT .....	115
<b>6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnisse .....</b>	<b>120</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

7.1	Literaturverzeichnis .....	120
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	144
7.3	Tabellenverzeichnis .....	147
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>148</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>149</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>151</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>µm</b>	Mikrometer
<b>3'</b>	DNA Ende mit freier OH-Gruppe, ‚downstream‘ hinter der Sequenz
<b>3D</b>	dreidimensional
<b>53BP1</b>	p53-binding protein
<b>ADC</b>	<i>apparent diffusion coefficient</i>
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ARC</b>	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
<b>ASL</b>	<i>arterial spin labeling</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>B</b>	magnetische Flussdichte
<b>Bax</b>	Bcl-associated X-Protein
<b>BDNF</b>	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BHS</b>	Blut-Hirn-Schranke
<b>BMP</b>	<i>bone morphogenetic protein</i>
<b>BP</b>	Basenpaare
<b>BrdU</b>	Bromdesoxyuridin
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serume albumine</i> )
<b>BW</b>	Körpergewicht ( <i>body weight</i> )
<b>CA</b>	Ammonshorn ( <i>Cornu Ammonis</i> )
<b>CI</b>	Konfidenzintervall
<b>Cm</b>	Zentimeter
<b>CREB</b>	<i>cyclic AMP-responsive element binding protein</i>
<b>D</b>	Energiedosis
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DCX</b>	Doublecortin
<b>DDR</b>	DNA Schadensantwort ( <i>DNA damage response</i> )
<b>Dkk1</b>	Dickkopf-1
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNA-PKcs</b>	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
<b>DSB</b>	Doppelstrangbruch
<b>E</b>	embryonale Phase
<b>e<sup>-</sup></b>	Elektron
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EPI</b>	<i>echo planar imaging</i>
<b>eV</b>	Elektronenvolt
<b>FAIR</b>	<i>flow sensitive alternating inversion recovery</i>
<b>G</b>	Gramm
<b>GA</b>	Glutaraldehyd
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GCL</b>	Granularzellschicht ( <i>granular cell layer</i> )
<b>GFAP</b>	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
<b>Gy</b>	Gray
<b>H</b>	Stunde

<b>H2AX</b>	Histonvariante des Histon H2A
<b>HR</b>	Homologe Rekombination
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IBA1</b>	allograft inflammatory factor 1 AIF1
<b>IEG</b>	<i>immediate early gene</i>
<b>IMRT</b>	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
<b>IQ</b>	Intelligenzquotient
<b>J</b>	Joule
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>keV</b>	Kiloelektronenvolt
<b>Kg</b>	Kilogramm
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>M</b>	Monat
<b>mA</b>	Milliampere
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MD</b>	<i>Mittlere Differenz</i>
<b>meV</b>	Megaelektronenvolt
<b>Min</b>	Minute
<b>ML</b>	Molekularschicht ( <i>molecular layer</i> )
<b>MRE11</b>	<i>meiotic recombination 11</i>
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>Ms</b>	Millisekunden
<b>MU</b>	<i>monitoring unit</i>
<b>MV</b>	Megavolt
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NHEJ</b>	nicht-homologes <i>end-joining</i>
<b>Nm</b>	Nanometer
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>NSZ</b>	neurale Stammzellen
<b>OLIG2</b>	Oligodendrocyte transcription factor
<b>OPC</b>	oligodendrozytische Vorläuferzellen
<b>p</b>	probabilitas (Wahrscheinlichkeit)
<b>P</b>	postnatale Phase
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	<i>potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffexponent)
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PTBS</b>	posttraumatische Belastungsstörung
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>RARE</b>	<i>rapid acquisition relaxation-enhanced</i>
<b>RBPj</b>	recombination signal binding protein for immunoglobulin Kappa J region
<b>RIF</b>	<i>radiation-induced foci</i>
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>Rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>SCID</b>	severe combined immunodeficiency
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Ser</b>	Serin
<b>SGZ</b>	subgranuläre Zone
<b>Shh</b>	Sonic hedgehog
<b>SOX2</b>	<i>Sex-determining region Y-Box2</i>
<b>Sv</b>	Sievert
<b>SVZ</b>	subventrikuläre Zone
<b>T</b>	Tesla
<b>TBS-T</b>	Tris-buffered Saline + 0.1% Tween20
<b>TE</b>	Echozeit
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>TR</b>	Repetitionszeit
<b>Wnt</b>	<i>wingless-related integration site</i>
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
<b><math>\omega</math></b>	Larmor-Frequenz

# 1 Zusammenfassung

Radiotherapie mit ionisierender Strahlung stellt eine wirkungsvolle Behandlungsmethode dar, um Tumorwachstum effektiv zu kontrollieren. Über die Anpassung des Bestrahlungsfeldes an die Tumorkontur durch verschiedene Einstrahlrichtungen und die fraktionierte Applikation von Strahlendosen wird eine optimale Tumorkontrolle mit gleichzeitiger Minimierung der Normalgewebstoxizitäten gewährleistet, da nur der Tumor hohen Strahlendosen und das umliegende gesunde Gewebe niedrigen Strahlendosen ausgesetzt ist. Die Effekte und Konsequenzen niedriger Strahlendosen wurden bisher nur unzureichend untersucht. Da jedoch bereits kognitive Beeinträchtigungen nach einer pädiatrischen Radiotherapie zu beobachten waren, sollten Auswirkungen niedriger Strahlendosen stärker in den Fokus aktueller Forschungen treten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung mit 0.1 Gy auf den Hippocampus und die adulte Neurogenese charakterisiert. Hierbei wurden sowohl juvenile (11 Tage alte), als auch adulte (8 Wochen alte) gesunde C57BL6-Mäuse bestrahlt. Die Untersuchungen fanden während der Bestrahlung (72 Stunden) sowie lange nach Bestrahlungsende (1 Monat, 3 Monate und 6 Monate) statt, um auch mögliche Spätfolgen zu erfassen. Für die Analyse der DNA-Schadensantwort wurden persistierende 53BP1-Foci quantifiziert, wobei eine Foci-Akkumulation mit steigender kumulativer Dosis und ein erhöhtes Foci-Level bis zu 3 Monate nach Bestrahlung im Vergleich zur altersgerechten Kontrolle nachgewiesen werden konnten. Potenzielle Auswirkungen auf die adulte Neurogenese wurden durch Immunfluoreszenzmarkierungen von Stamm- (SOX2) und Vorläuferzellen (DCX) analysiert. Bereits drei Tage nach der niedrigsten applizierten Dosis (5x0.1 Gy) lag die proliferierende Vorläuferzellpopulation deutlich vermindert vor und auch ihre dendritische Arborisation war signifikant reduziert. Beide Abnahmen waren bis zu sechs Monate nach Bestrahlung eindeutig nachweisbar. Eingeschränkte Arborisation impliziert eine beeinträchtigte neuronale Verschaltung und Konnektivität der Vorläuferzellen. Die verminderte synaptische Plastizität setzte sich ebenfalls auf neuronaler Ebene durch die reduzierte Expression von PSD-95 fort. Im Gegensatz zu den Vorläuferzellen lag die Stammzellpopulation erst einen Monat nach Applikation der letzten Dosisfraktion deutlich dezimiert vor und blieb es, zumindest in den juvenil-bestrahlten Mäusen, bis zu sechs Monate nach Bestrahlung. Fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt somit zu einer starken Beeinträchtigung der Neurogenese. Diese Annahme wurde durch eine umfassende Proteomanalyse juvenil-bestrahlter Hippocampi belegt, die unter anderem eine Deregulation des CREB-Signalweges zeigte. CREB ist sowohl für die Neurogenese als auch für die synaptische Plastizität entscheidend. Aufgrund der ebenfalls neuroprotektiven Funktion von CREB wurde weiterhin mithilfe verschiedener Immunfluoreszenzmarker der Einfluss auf die Neuroinflammation und Gliazellen eruiert. Fraktionierte Niedrig-

Dosis-Bestrahlung nahm auf die verschiedenen Gliazellen Einfluss, indem sowohl die Mikroglia- (IBA1) als auch die Oligodendrozyten-Population (OLIG2) in den bestrahlten Proben stark erhöht vorlagen. Auch die Astrozyten (GFAP) zeigten zunächst (72h) eine deutliche Zunahme, bevor sie einen Monat nach Bestrahlung stark dezimiert vorlagen. Die Markierung mit BrdU offenbarte zudem eine Änderung des Zellschicksals von der Neurogenese hin zur Gliogenese, da markierte Stammzellen nach Bestrahlung eher in einen glialen Phänotyp ausdifferenzierten. Um herauszufinden, ob die strahlungsinduzierten Veränderungen bereits durch nicht-invasive Methoden feststellbar sind, wurden zusätzlich verschiedene MRT-Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten einen erhöhten zerebralen Blutfluss, sowie erhöhte T1- und T2-Relaxationszeiten im Hippocampus nach Bestrahlung, was indikativ für eine Entzündung oder Zellatrophie steht, wie sie bereits durch die immunhistologischen Experimente gezeigt werden konnte.

Die tierexperimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit offenbarten eine Beeinträchtigung der adulten Neurogenese durch repetitive Exposition mit niedrigen Strahlendosen. Die Entstehung neuer Neurone wurde stark eingeschränkt und auch das Verhältnis der Gliazellen lag nach Bestrahlung gestört vor, was beides eine verminderte synaptische Plastizität und damit kognitive Beeinträchtigung zur Folge haben könnte. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Relevanz für Untersuchungen von Niedrig-Dosis exponiertem Gehirngewebe, um potenzielle Nebenwirkungen einer Strahlentherapie benennen und möglicherweise reduzieren zu können. Aufgrund der ausgeprägteren Effekte in jungen Hippocampi sollte dieser während einer Radiotherapie möglichst maximal geschont werden.

## Summary

Ionizing radiation is an effective treatment modality utilized in radiotherapy for tumor growth control. Optimized tumor control with minimal normal tissue toxicity is achieved through adjustments of the irradiation field with multiple photon-beams from varying directions, as well as, fractionated application of radiation dose. Consequently, a high dose is delivered to the tumor while surrounding tissue is spared and exposed only to low radiation doses. However, consequences of such low-dose radiation (LDR) are, to date, unknown and as cognitive impairments following pediatric radiotherapy have been observed, an increased focus of current research is required.

The scope of this work was to determine the effects of fractionated LDR with 0.1 Gy on the hippocampus, focusing specifically on adult neurogenesis. For this purpose both juvenile, 11 days old at beginning of irradiation, and adult, 8 weeks old, healthy C57BL6-mice were analyzed. Analysis took place 72 hours after irradiation, and to study late effects, 1 month, 3 months and 6 months after irradiation. DNA damage response was analyzed by 53BP1-foci quantification in neurons which revealed foci accumulation with increasing cumulative doses and elevated foci levels in irradiated samples detectable as late 3 months following irradiation. Potential consequences for adult neurogenesis were determined by immunofluorescence staining of stem- (SOX2) and neuroprogenitor cells (DCX). Proliferating neuroprogenitors already declined three days after application of the lowest dose (5x0.1 Gy) and, additionally, their dendritic arborisation was significantly reduced. These effects were present until 6 months after irradiation. Diminished arborisation may implicate impaired neuronal connectivity and less synaptic plasticity, which was also shown on a neuronal level by the reduced expression of PSD-95. In contrast, stem cells did not decline until one month after irradiation and at least in the juvenile mice, remained low until 6 months after irradiation. Thus, fractionated LDR has a major impact on adult neurogenesis, which was further confirmed by proteomic assay. This showed, amongst others, deregulated CREB signaling. CREB signaling plays a crucial role in adult neurogenesis, synaptic plasticity and also neuroprotection. Due to its involvement in neuroprotection, the impact on neuroinflammation and glial cells was investigated by immunofluorescence staining of different glia markers. Fractionated LDR strongly influenced glial cells by increasing microglia (IBA1) and oligodendrocyte (OLIG2) populations. Additionally, astrocytes (GFAP) increased initially (72h), followed by a drastic decline. Labeling mice with BrdU enabled observation of a cell fate shift from neurogenesis to gliogenesis induced by LDR. Functional MRI was performed to demonstrate that the ascertained changes could be determined by non-invasive methods. Higher cerebral blood flow and increased T1- and T2- relaxation time was detected which may indicate inflammation or cell atrophy.

## Summary

---

The animal experiments of this present work identified that repeated exposition to low radiation doses induced strong impairment in adult neurogenesis. Formation of new neurons was notably restricted and the proportion of glial cells was affected, both of which can lead to reduced synaptic plasticity and thereby to cognitive impairment. These results illustrate the relevance of low dose exposed tissue analysis to determine potential side effects of radiotherapy and to possibly reduce them. As juvenile patients show more pronounced side effects and longer life expectancy, all efforts should be made to treat the hippocampus with maximum care.

## 2 Einleitung

### 2.1 Ionisierende Strahlung und ihre Effekte

Als ionisierende Strahlung bezeichnet man Teilchen- und elektromagnetische Strahlung, die genug Energie aufbringt, um Atome oder Moleküle zu ionisieren, d.h. Elektronen aus der Atomhülle loszulösen. Diese Energie wird Ionisierungsenergie genannt und beträgt mehrere Elektronenvolt (eV). Ab einer kinetischen Energie von 5 eV zählen geladene Teilchen (freie Protonen und Elektronen) zur ionisierenden Strahlung (Alpha- und Beta-Strahlung). Elektromagnetische Strahlung hingegen besitzt bei einer hohen Frequenz und einer kurzen Wellenlänge (weniger als 200nm) genug Energie, um Elektronen freizusetzen. Dies entspricht Röntgenstrahlen mit einer Energie von bis zu 250 Kiloelektronenvolt (keV) und Gammastrahlen mit einer Photonenenergie von bis zu 100 Megaelektronenvolt (MeV) und wird als Photonenstrahlung bezeichnet.

Trifft ionisierende Strahlung auf einen Organismus oder Gewebe, so induziert sie vielfältige, molekulare Schäden. Diese Schäden können sowohl direkt als auch indirekt erzeugt werden. Beim direkten Strahleneffekt interagieren Photonen direkt mit den Molekülen innerhalb der Zellen, wie z.B. Desoxyribonukleinsäure (DNA). Da Zellen jedoch überwiegend aus Wasser bestehen - im Normalfall liegt der Wassergehalt bei etwa 70-80% - werden Schäden mit höherer Wahrscheinlichkeit (70-80%) durch den indirekten Strahleneffekt induziert (Pauly, 1966). Hierbei wird bei der Kollision von Photonen mit Wassermolekülen Energie übertragen, worauf die Radiolyse des Wassers folgt (Nikjoo *et al.*, 1997). Wassermoleküle werden durch ionisierende Strahlung entweder angeregt oder ionisiert. Angeregte Wassermoleküle zerfallen sehr schnell in Radikale ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}\cdot + \text{OH}\cdot$ ), welche sich aufgrund ihrer geringen kinetischen Energie kaum vom Ort der Entstehung wegbewegen und sich durch ihr ungepaartes Elektron meist innerhalb von Nanosekunden wieder zu einem Wassermolekül vereinigen. Bei der Ionisierung hingegen zerfällt ein Wassermolekül unter Abgabe eines Bindungselektrons  $e^-$ . Das entstandene positiv geladene Wassermolekül zerfällt im zweiten Reaktionsschritt in ein Proton und ein Hydroxyradikal ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \cdot\text{H}_2\text{O}^+ + e^- \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}\cdot + e^-$ ). Im Weiteren bilden sich instabile Peroxide wie z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) begünstigen und die DNA schädigen (Rink, 1971).

Als Maßeinheit für die Wirkung ionisierender Strahlung gilt die Energiedosis  $D$  bezeichnet. Sie ist definiert als die absorbierte Energiemenge über einen Belastungszeitraum pro Masseinheit und wird in der Einheit Gray (Kalani *et al.*, 2008) angegeben:

$$\text{Energiedosis } D \text{ (Gray [Gy])} = \frac{\text{absorbierte Energie (Joule [J])}}{\text{Masse (Kilogramm [kg])}}$$

Um die Wirksamkeit verschiedener ionisierender Strahlenarten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) miteinander vergleichen zu können, ist es erforderlich, deren übertragene Energiedosis zu berücksichtigen. Dies geschieht über die Multiplikation mit dem dimensionslosen Faktor  $f$ , der die Strahlenart nach ihrer biologischen Wirksamkeit gewichtet. Die hieraus resultierende Äquivalenzdosis wird in der Einheit Sievert (Sv) angegeben:

$$\text{Äquivalenzdosis (Sievert [Sv])} = \text{Energiedosis } D \text{ [Gy]} * \text{Faktor } f$$

## 2.2 Klinische Strahlentherapie

Ionisierende Strahlung findet in der Medizin sowohl diagnostisch als auch therapeutisch ihre Anwendung. In der Diagnostik wird ionisierende Strahlung vor allem für bildgebende Verfahren, wie die Röntgendiagnostik oder die Computertomografie, verwendet. Bei therapeutischen Anwendungen macht man sich die schädigende Wirkung der ionisierenden Strahlung, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, zu Nutze. Eine solche Radiotherapie wird bei etwa 60-70% der an Krebs erkrankten Menschen allein oder in Kombination mit anderen Therapien verordnet (Kauffmann, 2006). Hierbei sind das Abwägen der optimalen Tumorkontrolle sowie die Minimierung der Normalgewebstoxizitäten essentiell wichtig für das Überleben des Patienten. Gewährleistet wird dies durch die optimale Anpassung des Bestrahlungsfeldes an die Größe, Kontur und Lage des Tumors sowie über die repetitive, fraktionierte Applikation der Strahledosen (Teildosis). Die optimale Anpassung des Bestrahlungsfeldes erfolgt am Linearbeschleuniger mithilfe sogenannter *Multileaf-Kollimatoren*, d.h. über elektronisch gesteuerte Metalllamellen werden Teildosen aus verschiedenen Einstrahlrichtungen appliziert. Dies hat zur Folge, dass sich die Gesamtdosis im Tumor aufsummiert, während gleichzeitig das umliegende Normalgewebe nur mit geringen Dosen belastet und somit maximal geschont wird. Die fraktionierte Radiotherapie, also die Aufteilung einer Dosis in mehrere Einzeldosen, ermöglicht zusätzlich die Reduzierung von Normalgewebstoxizitäten, da Tumorgewebe durch langsamer ablaufende Erholungs- und Reparaturvorgänge empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung als das Normalgewebe ist. Die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Organe wird über Faktoren beeinflusst, die als die 4R's der Strahlentherapie bezeichnet werden: Reparatur, Repopulierung, Redistributierung und Reoxygenierung (Sauer, 1993). Die Reparatur erfolgt im Normalgewebe effizienter als im Tumorgewebe, weswegen sich gesunde Zellen von subleta-

len Strahlenschäden zwischen den Fraktionen erholen, während sie in Tumorzellen zum Zelltod führen. Um abgestorbene Zellen durch neue Zellen zu ersetzen, kommt es zu erhöhter Proliferation, die vor allem innerhalb des Tumors unerwünscht ist. Um die Repopulation zu verhindern, sollte ein Bestrahlungsschema nicht unterbrochen werden, damit sich die Dosis zeitlich nicht zu stark verdünnt und Tumorzellen erneut beginnen zu proliferieren. Die Strahlenempfindlichkeit einer Zelle hängt zudem von der jeweiligen Zellzyklusphase ab, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden. Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase reagieren empfindlicher auf ionisierende Strahlung als ruhende Zellen in G<sub>0</sub> oder G<sub>1</sub> (Terasima und Tolmach, 1961). Durch die Abtötung der Zellen in den empfindlichen Phasen, kommt es zur Redistributierung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen und damit auch zum Eintritt von ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>) in den Zellzyklus. Dies wiederum verstärkt die Strahlenempfindlichkeit des Tumors, da bei Applikation der nächsten Fraktion wieder Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase vorliegen. Abschließend kommt es durch die Fraktionierung auch zur Reoxigenierung des Tumors, was die Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung erhöht (Gray *et al.*, 1959). Einer der Gründe für die Reoxigenierung ist, dass durch die Abtötung von euoxischen Tumorzellen in der Peripherie des Tumors die Tumormasse vermindert wird, wodurch innenliegende hypoxische Zellen besser mit Sauerstoff versorgt werden können. Die Fraktionierung der Gesamtdosis zielt somit auf die maximale Zerstörung des Tumors mit der gleichzeitig bestmöglichen Erholung des gesunden, umliegenden Gewebes ab.

Bei der konventionellen fraktionierten Strahlentherapie werden Tumore einmal täglich mit einer Dosis von 1,8 - 2 Gy, fünfmal wöchentlich über einen Zeitraum von mehreren Wochen bestrahlt. Hierbei wird die Dosis über mehrere ‚flache‘ Felder in den Tumor appliziert, in dem sich die Gesamtstrahlendosis aufsummiert. Hochkonformale Bestrahlungstechniken, wie beispielsweise die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT), ermöglichen überdies eine noch exaktere Bestrahlung des Tumors, da die 3D-Konformationsbestrahlung aus verschiedenen Richtungen über zahlreiche (7-9) Bestrahlungsfelder durchgeführt wird, die jeweils aus mehreren Segmenten bestehen. Hierdurch wird eine präzisere Erfassung des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des umliegenden Normalgewebes durch einen steil abfallenden Dosisgradienten ermöglicht. Dies bedingt, dass der Tumor aus jeder Bestrahlungsrichtung ionisierender Strahlung und somit hohen Dosen ausgesetzt ist, wohingegen die gesunden umliegenden Regionen nur mit niedrigen Strahlendosen belastet werden. Durch die verschiedenen Einstrahlrichtungen variieren die Bereiche des exponierten gesunden Gewebes und die im Normalgewebe applizierte Dosis kann niedrig gehalten werden. Allerdings erhöht sich hierdurch auch das Volumen des Normalgewebes, das mit niedrigen Dosen belastet wird. Die Auswirkungen und damit auch die Spätfolgen dieser sehr niedrigen Strahlendosen auf das gesunde Gewebe und somit für den Patienten sind bisher jedoch nur unzureichend untersucht.

## 2.3 Strahleninduzierte DNA-Schäden / DSB-Reparaturmechanismen

Die durch ionisierende Strahlung induzierten biologischen Schäden sind vielfältig, doch vor allem der Verlust der genetischen Integrität stellt einen gravierenden Risikofaktor für das Zellüberleben dar. Eine Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy induziert in etwa 2000 Basenveränderungen, 1000 Einzelstrangbrüche, 200 Cross-Links sowie 50 Doppelstrangbrüche (Kauffmann, 2006; Prise *et al.*, 2005). DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind hierbei für die Zelle die schwerwiegendsten Schäden. Bereits ein nicht rechtzeitig reparierter DSB kann chromosomale Veränderungen oder sogar den Zelltod zur Folge haben. Die genetische Integrität wird durch die zelluläre DNA-Schadensantwort (*DNA Damage Response* DDR) gewahrt. Diese umfasst die Erkennung des DNA-Schadens, die Anreicherung von DNA-Reparaturfaktoren sowie die Reparatur der Läsion. Veränderungen der DNA werden von Sensorproteinen erkannt, die daraufhin eine Signaltransduktionskaskade auslösen, durch die Mediatorproteine phosphoryliert werden und Effektorproteine den Zellzyklusarrest und die Reparatur des DNA-Schadens einleiten. Sollten die Veränderungen innerhalb der DNA allerdings zu gravierend sein, um sie vor dem Übergang der Zelle in die Mitose ausreichend zu reparieren, wird der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert. Apoptose kann sowohl durch ein extrinsisches als auch durch ein intrinsisches Signal ausgelöst werden. Bei der extrinsischen Initiation werden durch Ligandenbindung sogenannte Todesrezeptoren mit einer zytoplasmatischen Domäne (z.B. TNF-Rezeptor) durch T-Zellen aktiviert. Über die Bindung verschiedener Adapterproteine wird schließlich proCaspase-8 rekrutiert und autokatalytisch aktiviert. Die intrinsische Apoptose hingegen wird durch einen mitochondrialen Signalweg, beispielsweise durch DNA-Schäden herbeigeführt, ausgelöst. Durch die Aktivierung von Tumorsuppressoren, wie beispielsweise p53, werden pro-apoptotische Faktoren der Bcl-2 Familie, wie *Bcl-associated X-protein* (Bax) und Cytochrom C, freigesetzt. Es bildet sich aus Cytochrom C, dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und pro-Caspase-9 ein Komplex, das Apoptosom, welches die aktive Form von Caspase-9 darstellt. Die Aktivierung der beiden Initiator-Caspasen-8 und -9 führt zur Initiation der Caspase-Kaskade, d.h. Effektor-Caspasen wie Caspase-3, -6 und -7 werden aktiviert und spalten zelleigene Proteine wie Lamine auf, wodurch der Zelltod eintritt (Woo *et al.*, 1998).

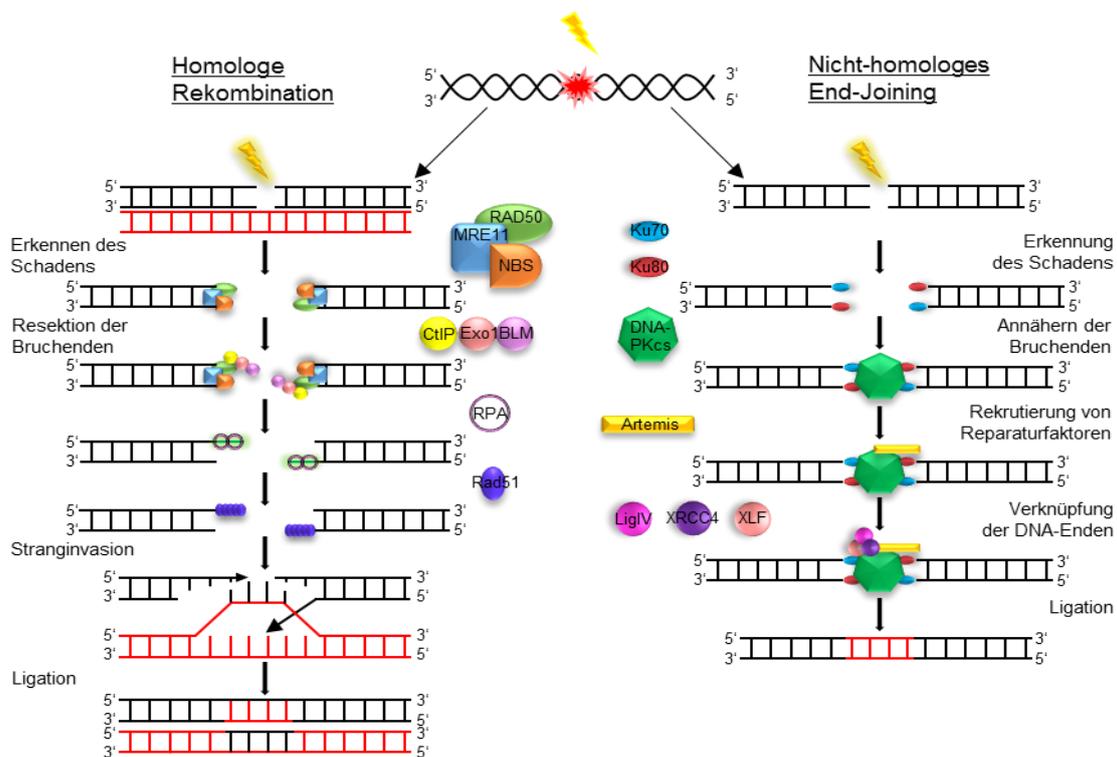
Bei der eukaryotischen DNA-Schadensantwort bindet zunächst der MRN-Komplex, der aus den Proteinen MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 und Nbs1 (Nibrin) besteht (Lee und Paull, 2005, 2007), mit großer Affinität an die DNA-Bruchenden und hält diese in räumlicher Nähe zueinander (Williams *et al.*, 2008). Im weiteren Verlauf wird *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM), eine Proteinkinase, zum MRN-Komplex rekrutiert, die weitere Reparaturfaktoren, wie die Histonvariante H2AX phosphoryliert (Burma *et al.*, 2001; Shrivastav *et al.*, 2008),

die dann als  $\gamma$ H2AX bezeichnet wird. Schon wenige Minuten nach der Induktion eines DNA-Schadens kann  $\gamma$ H2AX im Umfeld der DSBs mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) als leuchtender Punkt, auch Focus genannt, visualisiert werden (Rogakou *et al.*, 1998). Hierdurch hat sich  $\gamma$ H2AX als zuverlässiger Marker etabliert, um strahlungsinduzierte DSBs zu lokalisieren und zu quantifizieren (Rogakou *et al.*, 1998). Neben  $\gamma$ H2AX stellt auch 53BP1 einen Reparaturfaktor dar, der über die Bildung von *radiation-induced foci* (RIF) zur Identifikation von DSBs beiträgt (Rappold *et al.*, 2001; Schultz *et al.*, 2000). 53BP1 wurde im Jahr 1994 als Interaktionspartner des Tumorsuppressorgens p53 in Hefe identifiziert (Iwabuchi *et al.*, 1994). Neben der Bindedomäne für p53 besitzt 53BP1 noch viele weitere Domänen, u.a. eine *chromatin-binding* Tudor Domäne, über die 53BP1 mit methylierten Histonen interagiert (Botuyan *et al.*, 2006). Außerdem stellt die Tudor Domäne auch die notwendige Bindedomäne bei der Bildung von RIF dar, wobei diese Domäne allein nicht ausreicht, um 53BP1 zum DSB zu rekrutieren (Zgheib *et al.*, 2009). Auch 53BP1 kann durch ATM, sowie durch DNA-PKcs, phosphoryliert werden (Harding und Bristow, 2012; Munoz *et al.*, 2007). 53BP1 ist an der DSB-Reparatur beteiligt und bewirkt zudem eine Veränderung des Verpackungsgrades des Chromatins, um die DNA für die Reparatur zugänglicher zu machen (Dimitrova *et al.*, 2008).

Die Reparatur von DSBs erfolgt über zwei Hauptwege, die Homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR) und das Nicht-homologe End-Joining (*non-homologous End-Joining*, NHEJ) (Abbildung 2.1).

Homologe Rekombination kann nur bei Anwesenheit einer intakten Matrize fehlerfrei ablaufen, d.h. es muss ein homologes Schwester-Chromatid vorliegen, weshalb HR ausschließlich während der S- und G2-Phase stattfindet (van Gent *et al.*, 2001). Zu Beginn der HR wird der DSB durch den MRN-Komplex erkannt, woraufhin dieser an die Bruchenden bindet (Petrini, 1999, 2000). Anschließend werden weitere Proteine u.a. die Endonukleasen CtIP, die Exonuklease Exo1 und die Helikase BLM an die Bruchenden rekrutiert, um diese zu prozessieren und einzelsträngige 3'-DNA-Überhänge zu erzielen (Nimonkar *et al.*, 2011; Sartori *et al.*, 2007). Die einzelsträngigen DNA-Bruchenden binden wiederum schnell das *ssDNA-binding protein* RPA, das innerhalb kürzester Zeit von Rad51 ersetzt wird. Die Akkumulation mehrerer Rad51-Proteine führt zur Ausbildung eines Nukleoproteinfilaments, das die DNA nach Homologien absucht und eine ‚Strang-Invasion‘ initiiert (Bianco *et al.*, 1998). Die Strang-Invasion des homologen DNA-Strangs führt zu einem vorübergehenden D-Loop und eine Polymerase verlängert das 3'-Ende des eindringenden Strangs bis zum 5'-Ende des Bruchs. Die dabei entstandenen sogenannten *holliday junctions* werden durch Schneiden und Ligieren aufgelöst und es entstehen wieder zwei einzelne fehlerfreie Doppelstränge (Hartlerode und Scully, 2009; Wu und Hickson, 2003).

Im Gegensatz zur HR kann das nicht-homologe End-Joining NHEJ auch unabhängig von einer intakten homologen Sequenz ablaufen, weshalb es vor allem in der G0- und G1-Phase stattfindet (Sonoda *et al.*, 2006). Nach der Entstehung eines DSBs bindet zunächst ein Heterodimer aus Ku70-Ku80 an die Bruchenden, um diese vor weiterem Abbau durch Nukleasen zu schützen. Aufgrund der hohen Affinität von DNA-PKcs zu den KU-DNA-Enden formiert sich der sogenannte DNA-PK Komplex, der die Bruchenden in räumliche Nähe bringt (Meek *et al.*, 2008). Die Autophosphorylierung von DNA-PKcs führt zur Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren wie Artemis, LIG4, XRCC4 und XLF. Der Artemis-DNA-PKcs-Komplex ist aufgrund seiner Endonukleaseaktivität in der Lage fehlerhafte DNA-Überhänge zu entfernen (Ma *et al.*, 2005). Durch den Ligase-Komplex aus DNA-Ligase IV, XRCC4 und XLF wird die Ligation der prozessierten Bruchenden katalysiert, da DNA-Ligase IV die besondere Fähigkeit hat über Lücken hinweg zu ligieren (Gu *et al.*, 2007), wodurch die Kontinuität des DNA-Doppelstrangs wieder hergestellt wird.



**Abbildung 2.1: DSB-Reparaturwege in Eukaryoten**

In Eukaryoten existieren unterschiedliche Mechanismen, um DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren.

Homologe Rekombination findet statt, wenn eine intakte Matrize anwesend ist. Zunächst wird der DSB durch den MRN-Komplex (Mre11, Rad50 und Nbs1) erkannt und anschließend werden die Bruchenden durch weitere Faktoren, wie CtIP, Exo1 und BLM, prozessiert, wodurch 3'-Überhänge entstehen. Diese binden schnell RPA, um sich zu stabilisieren. RPA löst sich wieder von den Bruchenden, damit Rad51 binden kann und durch Akkumulation mehrerer Proteine ein Nukleoproteinfilament entsteht. Dieses sucht die DNA nach Homologien ab und induziert eine Stranginvasion. Nach Erreichen des 5'-Endes der DNA werden die *holliday junctions* aufgelöst und die Bruchstücke zu zwei intakten Strängen ligiert. Das nicht-homologe End-Joining kann ohne Matrize stattfinden und bindet im ersten Schritt Ku70 und Ku80 an die Bruchenden. Diese rekrutieren daraufhin DNA-PKcs, welches die Bruchenden in räumliche Nähe zueinander bringt. Durch die Rekrutierung von Artemis werden die Bruchenden prozessiert und anschließend verknüpft ein Komplex aus Ligase4, XRCC4 und XLF die Bruchenden miteinander.

### 2.3.1 DSB-Reparaturdefekte

Im Rahmen dieser Dissertation wurden auch zwei Mausstämme untersucht, die einen Defekt in der DNA-Reparatur besitzen, der auf dem Fehlen der Proteinkinase ATM oder DNA-PKcs (SCID) beruht. Die Mutation dieser für die DNA-Schadensantwort wichtigen Proteinkinasen hat schwerwiegende Folgen für den Organismus. So zeigen beide Mutationen erhöhte Radiosensitivität, eine defiziente Immunabwehr und zum Teil bereits neuronale Degeneration (Bosma und Carroll, 1991; Sedgwick, 1991).

*Ataxia telangiectasia* (AT) ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Krankheit in Folge einer Mutation im ATM-Gen. Aufgrund der Größe des ATM-Gens (150kDa) kann die Mutation an verschiedenen Stellen des Gens auftreten (Telatar *et al.*, 1998). Die meisten Mutationen führen allerdings zu verkürzten instabilen Proteinfragmenten (Sandoval *et al.*, 1999). Die Diversität der Mutationen von ATM führt in den Betroffenen ebenfalls zu einer unterschiedlichen Konstellation an Symptomen und Laborwerten. Charakteristisch für diesen Defekt ist eine progressive zerebellare Degeneration, eine Immundefizienz, eine erhöhte Radiosensibilität sowie vorzeitige Seneszenz und ein erhöhtes Aufkommen von Krebserkrankungen (Rothblum-Oviatt *et al.*, 2016). Beim klassischen Verlauf dieser Krankheit zeigen sich die ersten neurologischen Symptome bereits im Säuglingsalter, da Betroffene ihren initialen wackeligen Gang nicht verbessern können und in Folge dessen bereits im Alter von 10-15 Jahren auf den Rollstuhl angewiesen sind (Crawford, 1998). Neurobildgebende Studien konnten mittels Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen, dass es zu einer Degeneration und Atrophie im Kleinhirn kommt. Bei zwei Drittel der Betroffenen treten außerdem Auffälligkeiten im Immunsystem auf, da sie nur eine sehr geringe Menge an Immunglobulinen besitzen und aufgrund einer Impfung oder Infektion nicht in der Lage sind Antikörper zu bilden (Kraus *et al.*, 2014). Da die Serin/Threonin-Kinase ATM eine wichtige Rolle während der DNA-Reparatur spielt, indem sie zahlreiche Proteine phosphoryliert, kommt es bei Betroffenen zu einem erhöhten Aufkommen an Krebserkrankungen und außerdem zu erhöhter Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (Hannan *et al.*, 2002; Lorat *et al.*, 2016; Reiman *et al.*, 2011).

Eine Mutation im *Prkdc*-Gen, das die Proteinkinase DNA-PKcs codiert, wird in Mäusen unter dem Begriff SCID (*severe combined immune deficiency*) geführt. SCID beschreibt eine Gruppe von vererbten Störungen des Immunsystems, die mit einem Fehlen oder einer Fehlfunktion von B- und T-Zellen einhergeht (Woodbine *et al.*, 2014). Betroffene Personen sterben normalerweise ohne eine Stammzellspende innerhalb der ersten zwei Jahre aufgrund immer wieder auftretender Infekte und allgemeinen Gedeihstörungen. Obwohl die Mutation auch in Mäusen zu einem schwerwiegenden Mangel an B- und T-Lymphozyten führt und diese damit anfällig gegenüber jeglicher Infektion macht, können sie als *specific-pathogen-free* (SPF)-Mäuse ohne

fatale Infektionen gezüchtet werden (Bosma und Carroll, 1991). Neben der stark ausgeprägten Immundefizienz sind SCID-mutierte Zellen auch deutlich sensitiver gegenüber ionisierender Strahlung (Fulop *et al.*, 1988; Lorat *et al.*, 2016).

## 2.4 Der Hippocampus

Der Hippocampus stellt einen der am besten untersuchten Bereiche des Zentralen Nervensystems (ZNS) dar und befindet sich als Teil des limbischen Systems beiderseits am Boden der Seitenventrikel im Temporallappen der Großhirnrinde. Zusammen mit dem Neocortex, sowie verschiedenen Cortexarealen gilt der Hippocampus als entscheidend für die Ausbildung des deklarativen Gedächtnisses sowie von Lernprozessen. Hierbei gelangen sensorische Informationen der Ohren oder Augen über ein neuronales Netzwerk aus den Assoziationsregionen des rhinalen und parahippocampalen Cortex in den Hippocampus und von hier über den Fornix in den Thalamus und Hypothalamus.

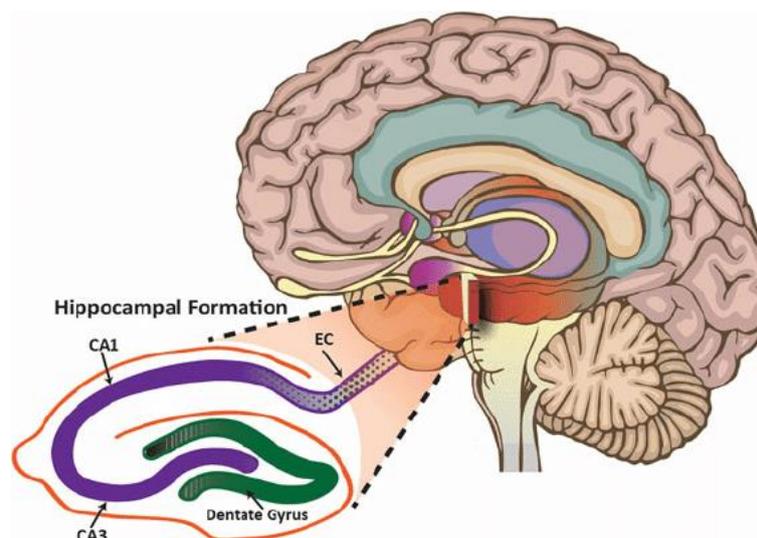


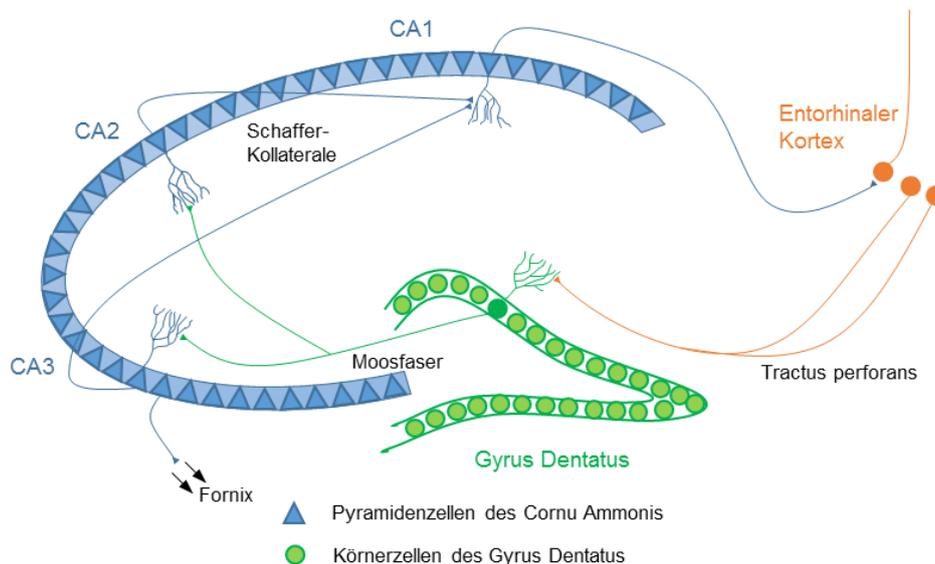
Abbildung 2.2: Der Hippocampus und seine assoziierten Strukturen (Vineyard *et al.*, 2012).

Damit ein neuronales Netzwerk entstehen kann und Informationen und Reize innerhalb desselbigen von Neuron zu Neuron weitergegeben werden können, bestehen Neurone aus mehreren Teilen: dem Soma, den Dendriten und einem Axon. Das Soma, auch Perikaryon, stellt den eigentlichen Zellkörper dar und enthält neben dem Zellkern auch alle weiteren Zellorganellen, was das Soma zum Ort der Proteinbiosynthese macht. Für die Weiterleitung von Reizen sind hingegen die Zellfortsätze von entscheidender Bedeutung. Eingehende Reize bzw. Stimuli einer Sinneszelle werden über Synapsen, die sich in einer Vielzahl auf der Oberfläche der Dendriten befinden, aufgenommen. Um möglichst viele Informationen aus der Umgebung

aufnehmen zu können, sind die Dendriten eines einzigen Neurons stark verzweigt und bilden einen sogenannten Dendritenbaum. Die Übertragung eines Reizes an Synapsen kann auf elektrischer und chemischer Weise erfolgen. Bei der elektrischen Übertragung gibt die Präsynapse des Axons aufgrund des Reizes Ionen in den synaptischen Spalt ab, die durch sogenannte *gap junctions* in die Postsynapse des nächsten Dendriten aufgenommen werden und hier zu einer Änderung des Membranpotentials (Depolarisation) führen, auch postsynaptisches Potenzial genannt. Weitaus verbreiteter im Säugetiergehirn sind hingegen die chemischen Synapsen. Hier werden aufgrund des Reizes Neurotransmitter mittels sekretorischer Vesikel aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt entlassen. Diese Neurotransmitter binden an Neurotransmitterrezeptoren der Postsynapse, woraufhin sich entweder direkt transmitterabhängige Ionenkanäle öffnen oder aber über G-Protein gekoppelte Rezeptoren Effektorproteine aktiviert werden. Bei Effektorproteinen kann es sich entweder selbst um Ionenkanäle handeln, die sich öffnen und zu einer Depolarisation führen oder aber es werden *second messenger* (z.B. cAMP, IP3) Kaskaden aktiviert. Diese *second messenger* führen zu einer Aktivierung von Proteinkinasen, die daraufhin Membranproteine wie Calciumkanäle oder Natrium-Kalium-Pumpen aktivieren oder von Phospholipasen, deren Aktivierung die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern zur Folge hat. Für die Weiterleitung des Signals muss die Depolarisation der Membran einen Schwellenwert überschreiten, woraufhin ein Aktionspotential am Axonhügel, dem Übergang des Somas zum Axon, entsteht und erneut eine synaptische Übertragung der Präsynapse an der Axonterminale auf die Postsynapse des nächsten Dendrits erfolgt. Auf diese Art und Weise wird ein Reiz von Neuron zu Neuron immer weitergegeben bis er beispielsweise auf eine motorische Endplatte eines Muskels trifft und dort zu einer Muskelbewegung führt (Bear *et al.*, 2018).

Der Hippocampus besteht aus drei Strukturen, dem *Gyrus dentatus*, dem Ammonshorn (*Cornu Ammonis*, CA) und dem Subiculum, weshalb er oftmals auch als Hippocampusformation bezeichnet wird (Abbildung 2.2). Der *Gyrus Dentatus* bildet die Pforte zum Hippocampus und seine zumeist erregenden Körnerzellen liegen in einer dünnen Schicht, dem *Stratum granulare*, und entsenden ihre Dendriten in das *Stratum moleculare*. Die Dendriten treffen am *Tractus perforans* auf die Axone vom *Cortex entorhinalis* und erhalten dort ihre Informationen (Abbildung 2.3). Über den *mossy fibre pathway* erstrecken die Körnerzellen dann ihre Axone, auch Moosfasern genannt, bis hin zu den Pyramidenzellen der CA3-Region. Diese Pyramidenzellen entsenden zum einen ihre Axone über den Fornix zum Hirnstamm, worüber der Hippocampus in den Papez-Kreis eingebunden wird. Zum anderen bilden weitere Axone der CA3-Region, sogenannte Schaffer-Kollaterale, Synapsen mit Neuronen der CA1-Region, was bedeutet, dass Informationen zurück an die CA1-Region und über das Subiculum zum entorhinalen Cortex gesandt werden. Über diese Schaffer-Kollaterale findet die Langzeit-Potenzierung

(LTP) statt, die unmittelbar mit Lern- und Gedächtnisprozessen zusammenhängt (Whitlock *et al.*, 2006). Die synaptische Übertragung im Hippocampus wird meist durch Glutamatrezeptoren vermittelt, wobei vor allem die NMDA-Rezeptoren auf der Postsynapse der CA1-Neuronen durch Glutamat und Depolarisation zu einem Einströmen von Calcium führen, das an der Induktion der LTP entscheidend beteiligt ist.



**Abbildung 2.3: Verschaltung in der Hippocampusformation**

Die Hippocampusformation wird unterteilt in den Gyrus Dentatus (grün), das Cornu ammonis (blau) und das Subiculum. Informationen gelangen über den Tractus perforans aus dem entorhinalen Cortex auf die dendritischen Ausläufer der Körnerzellen des Gyrus Dentatus. Diese Körnerzellen senden wiederum ein Axon über den mossy fibre pathway zu den Pyramidenzellen der CA3-Region. Die Pyramidenzellen senden nun die Information entweder über den Fornix zum Hirnstamm oder über die sogenannten Schaffer-Kollaterale in die CA1-Region. Von hier gelangen die Informationen über das Subiculum zurück zum entorhinalen Cortex.

Bereits 1957 konnten Scoville und Milner zeigen, dass die Ektomie des Hippocampus zu Amnesie und erheblichen Lern- und Gedächtnisverlusten führt (Scoville und Milner, 1957). Dies waren die ersten Indizien dafür, dass der Hippocampus maßgeblich an der Konsolidierung des Kurz- und Langzeitgedächtnisses beteiligt ist. 1973 konnten Bliss und Lomo zeigen, dass eine hochfrequente Stimulation der eingehenden Nervenfasern zu einer langanhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung im Hippocampus führt und beschrieben damit zum ersten Mal die Langzeit-Potenzierung, welche bis heute als das attraktivste Modell für den Vorgang des Lernens und des Gedächtnisses gilt (Bliss und Lomo, 1973; Nakazawa *et al.*, 2004).

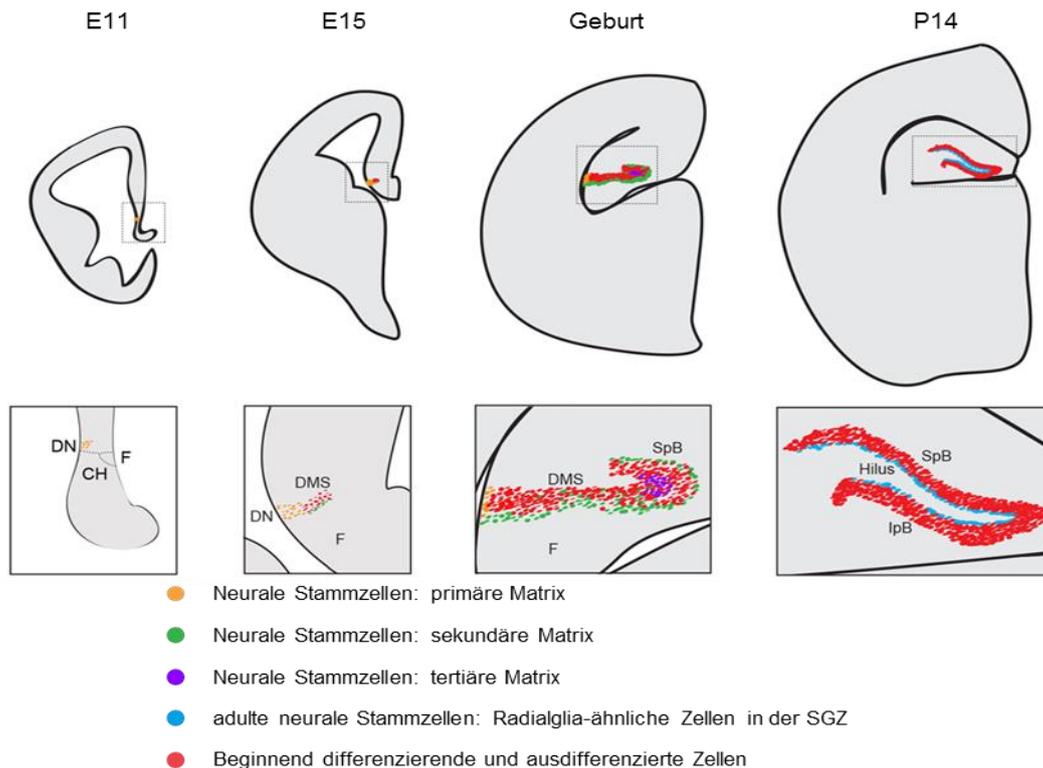
Für die Gedächtniskonsolidierung sowie Lernprozesse ist ein Vorgang, der fast ausschließlich im Hippocampus bzw. im Gyrus Dentatus stattfindet, essentiell wichtig. Dieser wird als adulte Neurogenese bezeichnet und beschreibt die Entstehung neuer Neurone aus bereits vorhandenen Stammzellen im erwachsenen Organismus. Die neuen Neurone werden in das hippocampale Netzwerk eingebunden und leisten damit einen wichtigen Beitrag zur Gedächtnisausbildung und zum Lernen (van Praag *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2003).

## 2.5 Adulte Neurogenese

Adulte Neurogenese bezeichnet den Vorgang, bei dem selbst im Erwachsenenalter noch neue Neurone aus einem bestehenden Stammzellpool generiert werden können. Bis vor einigen Jahrzehnten wurde angenommen, dass Neurogenese nur in der embryonalen und perinatalen Phase stattfindet und es nur eine bestimmte Anzahl an Neuronen gibt, die zeitlebens bestehen bleiben (Ming und Song, 2005). 1965 konnten dann erstmals Altman und Das zeigen, dass in postnatalen Rattenhippocampi neugebildete Neurone vorkommen (Altman und Das, 1965). In den darauffolgenden Jahren wurden die für die adulte Neurogenese notwendigen Vorläuferzellen aufgrund ihrer vorhandenen Proliferation sowie die neu entstehenden Neurone mithilfe von sogenannten ‚*birthmarkers*‘, wie z.B. Bromodesoxyuridin (BrdU), identifiziert (Cameron *et al.*, 1993; Kaplan und Hinds, 1977; Kuhn *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 2016). Adulte Neurogenese findet jedoch nicht im gesamten Säugetiergehirn statt, sondern ist streng begrenzt auf zwei Regionen. Eine dieser neurogenen Regionen, in denen Zellen mit stammzellartigem Charakter vorkommen, ist die subventrikuläre Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels aus der zeitlebens neugebildete Neuroblasten zum olfaktorischen Bulbus wandern, um dort letztlich zu Interneuronen zu differenzieren (Altman, 1969; Lois und Alvarez-Buylla, 1994). Eine weitere neurogene Nische stellt die subgranuläre Zone (SGZ) des *Gyrus Dentatus* im Hippocampus dar, in der Körnerzellen entstehen (Cameron *et al.*, 1993; Kaplan und Hinds, 1977). Gerade die hippocampale, adulte Neurogenese stellt einen essentiell wichtigen Prozess dar, da die Generierung von neuen Neuronen zur Funktionalität des Hippocampus beiträgt und somit kognitive Leistungen wie Lernen und Gedächtnis ermöglicht. Weiterhin spielt die korrekte Funktionsweise des Hippocampus eine entscheidende Rolle in vielen pathologischen Krankheitsbildern wie Depressionen, Schizophrenie und Morbus Alzheimer, was den Hippocampus und die adulte Neurogenese zu einem viel untersuchten und diskutierten Forschungsthema der letzten Jahre macht.

Die adulte Neurogenese ist ein hochdynamischer, jedoch streng regulierter Prozess, der in vier verschiedene Phasen eingeteilt werden kann (Kempermann *et al.*, 2004; Kempermann *et al.*, 2015; Ming und Song, 2005) (Abbildung 2.5). In der ersten sogenannten Vorläuferzellphase liegen in der SGZ die Typ-1-Zellen oder auch neuronalen Stammzellen (NSZ) vor. Diese besitzen einen stammzellartigen Charakter, da sie sich selbst immer wieder erneuern und sowohl in Neurone als auch in Makroglia ausdifferenzieren können (Bonaguidi *et al.*, 2011; Encinas *et al.*, 2013; Lugert *et al.*, 2010). Woher die NSZ des adulten *Gyrus Dentatus* stammen, ist bisher nur unzureichend untersucht und bleibt daher weitestgehend unklar. Es ist bekannt, dass der *Gyrus dentatus* aus dem dorsalen Neuroepithelium des kortikalen Saums, dem sogenannten *Dentate Notch* (Bedner *et al.*), entstanden ist, wo sich die erste proliferative

Zone des *Gyrus Dentatus*, auch primäre Matrix genannt, befindet (Abbildung 2.4) (Altman und Bayer, 1990). In der späten embryonalen Phase (E14) entsteht die sekundäre Matrix durch die Vermehrung dieser Vorläuferzellen, aus denen dann die ersten granulären Zellen entstehen (Li und Pleasure, 2005). Die Vorläufer erstrecken sich entlang der ventrikularen Keimzone und bilden das ursprüngliche Radialglia-Gerüst, an dem die neuen granulären Zellen in den sich entwickelnden *Gyrus Dentatus* wandern (Rickmann *et al.*, 1987). Kurz nach der Geburt entsteht ein weiteres Gerüst aus Radialglia, bei denen sich die Orientierung der Fortsätze ändert und die proliferativen Vorläuferzellen sich nun innerhalb des *Gyrus Dentatus*, in der Hilus-Region (tertiäre Matrix), befinden (Rickmann *et al.*, 1987; Sievers *et al.*, 1992). Nach 14 Tagen hat sich zusätzlich zur suprapyramidalen Schicht die infrapyramidale Schneide gebildet, die dem *Gyrus Dentatus* seine charakteristische Form gibt. Die Proliferation beschränkt sich nun ausschließlich auf die SGZ, da die sekundäre Matrix aus dem Hilus weitestgehend entfernt wurde. Nach der dritten postnatalen Woche (P21) gilt die Entstehung des *Gyrus Dentatus* als abgeschlossen und die verbliebenen Radialglia in der SGZ stellen die adulten, neuronalen Stammzellen für die adulte Neurogenese dar (Nicola *et al.*, 2015; Seki *et al.*, 2014).



**Abbildung 2.4: Entstehung des Gyrus Dentatus**

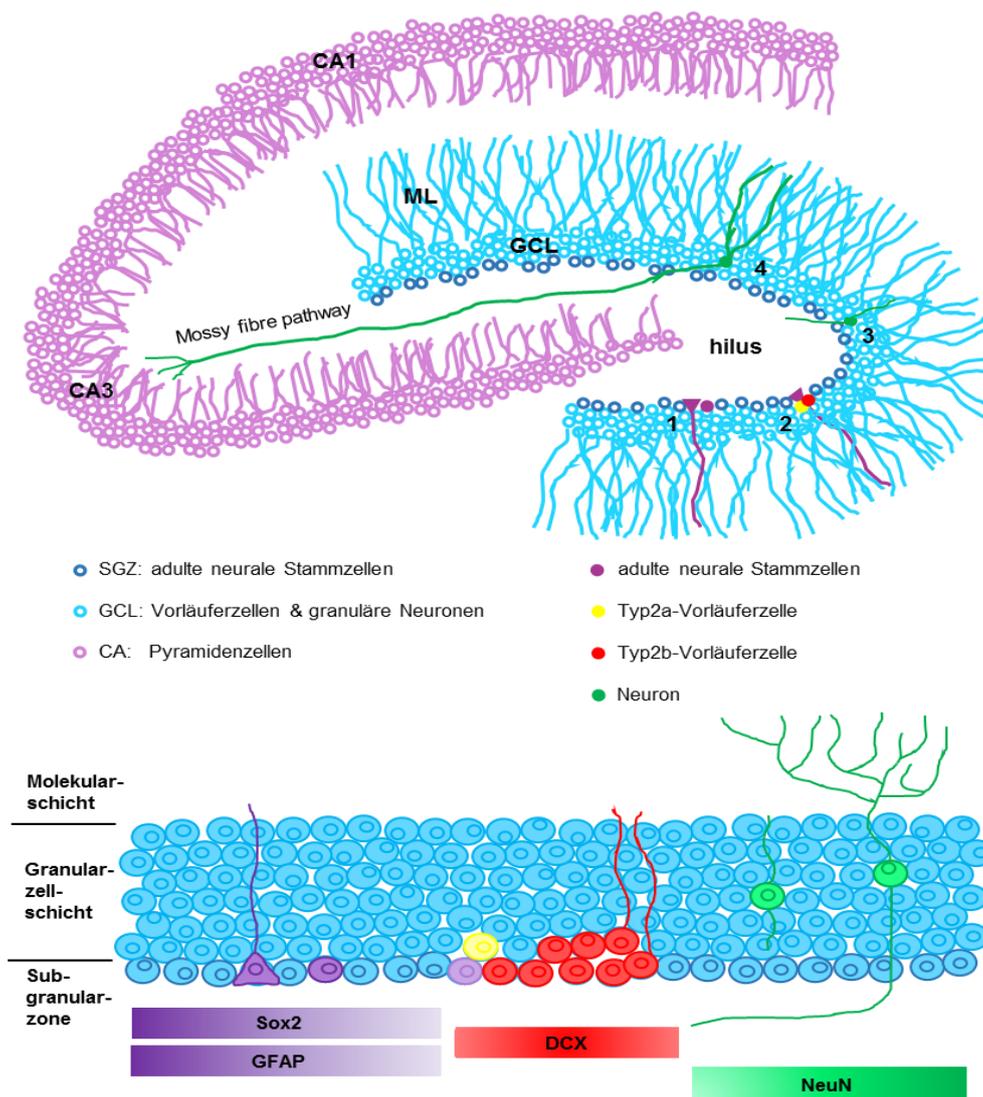
Die Entstehung des Gyrus Dentatus beginnt bereits in der embryonalen Phase in der um den 11.Tag (E11) die primäre Matrix aus neuronalen Stammzellen in der Nähe des kortikalen Saums den sogenannten *Dentate Notch* bildet. Während der embryonalen Neurogenese (E15) entsteht medial zum *Dentate Notch* die sekundäre Matrix, die aus Stamm- und Vorläuferzellen besteht und die sich entlang der ventrikularen Keimzone erstreckt. Anhand dieses Radialglia-Gerüsts wandern die granulären Zellen in den sich entwickelnden *Gyrus Dentatus* ein. Um den Zeitpunkt der Geburt entsteht die suprapyramidale Schneide, in deren innerem Bereich, dem späteren Hilus, sich die tertiäre Matrix bildet. Nach weiteren 14 Tagen hat sich auch die infrapyramidale Schneide ausgebildet und die Proliferation findet lediglich im Hilus statt, da die sekundäre Matrix weitestgehend entfernt wurde. (verändert nach (Berg *et al.*, 2018))

Adulte NSZ exprimieren verschiedene Marker, unter anderem die Stammzellmarker SOX2 (*sex determining region Y-box2*), Nestin sowie aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zu Radialglia den Astrozyten-Marker GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Bonaguidi *et al.*, 2011; Filippov *et al.*, 2003; Seri *et al.*, 2001; Suh *et al.*, 2007). NSZ besitzen einen radialen Fortsatz, der sich über die Granularzellschicht (GCL) bis hin zur Molekularschicht (ML) erstreckt, um dort mit seinen Endköpfchen sowohl an Synapsen als auch an Blutgefäßen anzuschließen (Moss *et al.*, 2016; Palmer *et al.*, 2000).

In der zweiten Phase entstehen durch asymmetrische Zellteilung Vorläuferzellen oder Neuroprogenitoren (Typ-2- Zellen) mit kurzen Prozessen und einer hohen Proliferationsrate, die in zwei Untertypen, Typ-2a und Typ-2b, unterteilt werden können (Kronenberg *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 1996). Beide Subtypen tragen weiterhin den Marker Nestin, allerdings exprimiert lediglich der Typ-2b den neuronalen Unreifemarker Doublecortin (DCX). Die genaue molekulare Funktion von DCX ist bisher nicht bekannt, es unterstützt allerdings die Mikrotubuli Polymerisation und da seine Expression weder in Stammzellen noch in reifen Neuronen nachgewiesen werden kann, gilt DCX als Marker der adulten Neurogenese (Brown *et al.*, 2003). Typ-2-Zellen reifen weiter zu Typ-3-Zellen, oftmals auch Neuroblasten genannt, die weiterhin den Marker DCX tragen, aber Nestin-negativ sind (Brandt *et al.*, 2003; Encinas *et al.*, 2006; Filippov *et al.*, 2003). Neuroblasten sind in der Lage entlang der SGZ zu wandern, bevor sie in die Granularzellschicht eindringen, um weiter zu differenzieren (Sun *et al.*, 2015). Auch diesen Zelltyp zählt man noch in das Vorläuferzellstadium, denn obwohl ein massiver morphologischer Umbau stattfindet (Zellen sind nun rund), teilen sie viele Merkmale mit den Typ-2-Zellen.

In der dritten Phase, der sogenannten frühen Überlebensphase, verlassen die Zellen den Zellzyklus und beginnen post-mitotische Marker, beispielsweise NeuN, zu exprimieren. Von der initialen asymmetrischen Zellteilung bis zu diesem Zellstadium vergehen etwa drei Tage, in denen sich die Zellpopulation etwa um das Vier- bis Fünffache erhöht. Innerhalb der nächsten vier Tage reduziert sich die Zellpopulation jedoch wieder dramatisch und der größte Teil, etwa 2/3, der neu entstandenen Zellen geht in Apoptose und wird durch im Hippocampus ansässige Mikroglia phagozytiert (Biebl *et al.*, 2000; Sierra *et al.*, 2010). Dies bedeutet, dass das Vorläuferzellstadium der Ausweitung der Zellzahl dient, wohingegen die Entscheidung zur terminalen Differenzierung im frühen post-mitotischen Stadium getroffen wird. Das frühe post-mitotische Stadium ist zusätzlich zur Expression von NeuN durch die vorübergehende Expression des Calcium-bindenden Protein Calretinin charakterisiert (Brandt *et al.*, 2003). In diesem Stadium beginnen die post-mitotischen Zellen außerdem ihr Axon über den *mossy fibre pathway* in Richtung der CA3-Region zu entsenden und sich dendritisch weiter zu verzweigen, um sich synaptisch zu integrieren (Hastings und Gould, 1999).

Nach weiteren 3-4 Wochen ist das neu entstandene post-mitotische Neuron funktionell integriert und die Expression des Calcium-bindenden Proteins wechselt von Calretinin zu Calbindin, was die letzte Reifephase der adulten Neurogenese beschreibt. Bis das neu entstandene Neuron allerdings nicht mehr von den bereits existierenden Neuronen zu unterscheiden ist, vergehen weitere 4-7 Wochen (Jessberger und Kempermann, 2003; van Praag *et al.*, 2002). Die Entstehung eines neuen Neurons, das in das hippocampale Netzwerk eingebunden und nicht mehr von bereits existierenden Neuronen zu unterscheiden ist, dauert im adulten Gehirn somit etwa 8-12 Wochen.



**Abbildung 2.5: Adulte hippocampale Neurogenese**

Der hochdynamische Prozess der adulten Neurogenese nimmt seinen Anfang in der Subgranularzone (SGZ) des Gyrus Dentatus. Hier befinden sich die neuralen Stammzellen (NSC), die unter anderem Marker wie Sox2 und GFAP exprimieren. Über asymmetrische Zellteilung gehen aus den NSC die Typ-2 Vorläuferzellen hervor, die sich in Typ2a und Typ2b untergliedern lassen, wobei nur Typ2b den Unreifemarker Doublecortin (DCX) trägt. Dieses Zellstadium stellt das proliferativste Stadium dar und dient der Ausweitung des Zellpools. Typ2-Zellen reifen weiter zu den Typ-3 Zellen, welche ebenfalls noch proliferieren und zu dem Vorläuferzellstadium gezählt werden. Als nächstes verlassen die Zellen den Zellzyklus und beginnen post-mitotische Marker wie NeuN zu exprimieren. Während dieses Stadium gehen etwa 2/3 der Zellen in Apoptose, d.h. hier wird die Entscheidung zur terminalen Differenzierung gefällt. In der nächsten Phase wird das neu entstandene Neuron nun über Dendriten und einem Axon synaptisch in den Hippocampus integriert.

Adulte Neurogenese wird sowohl von intrinsischen als auch extrinsischen Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormonen, Neurotransmittern, Transkriptionsfaktoren, epigenetischen Regulatoren, aber auch durch die Interaktion der Neurone und Vorläuferzellen mit der Mikro-umgebung, also den Astrozyten, den Blutgefäßen und anderen neuronalen Zellen reguliert.

Zu den Einfluss nehmenden extrazellulären Liganden gehören unter anderem *sonic hedgehog* (Shh), Notch, *bone morphogenetic protein* (BMP) und *wingless-related integration site* (Wnt). Der Shh-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung und Bildung von Radialglia in der SGZ (Ahn und Joyner, 2005; Breunig *et al.*, 2008). Ein Knock-Out von Shh führt zu einer reduzierten Proliferationsrate der neuronalen Stammzellen (Komada *et al.*, 2008), wohingegen die Zugabe von Shh die Proliferation stimuliert (Lai *et al.*, 2003). Außerdem verstärkt die Aktivierung von Shh in hippocampalen Dendriten das Wachstum des Axons des gleichen Neurons (Yao *et al.*, 2015).

Der Notch-Signalweg hingegen reguliert Proliferation, aber auch die Festlegung des Zellschicksals von Radialglia (Ables *et al.*, 2010). Durch Zellzyklusarrest und durch Verkleinerung des Vorläuferzellpools hält Notch außerdem den adulten neuronalen Stammzellpool in Balance (Hitoshi *et al.*, 2002). Durch den Verlust von RBPj (*downstream* von Notch) wird die adulte Neurogeneserate derart erhöht, dass dies sowohl zu einem Verlust des Vorläuferzell- als auch des Stammzellpools führt (Ehm *et al.*, 2010).

Auch BMP ist in die Aufrechterhaltung der Radialglia involviert, indem es das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Stilllegung der Radialglia reguliert (Bonaguidi *et al.*, 2008; Mira *et al.*, 2010). Andere Liganden hingegen regulieren die Vergrößerung und Reifung von Vorläuferzellen (Bond *et al.*, 2014). BMP nimmt somit über unterschiedliche Rezeptoren Einfluss auf die verschiedenen Phasen der Neurogenese und begünstigt die Astrogenese. Das Hemmen von BMP über Noggin führt zu einer verstärkten Proliferation der neuronalen Stammzellen und erhöht damit die Neurogeneserate (Guo *et al.*, 2011).

Der Wnt-Signalweg ist ebenfalls an der Proliferation der Vorläuferzellen sowie an der Differenzierung der Zellen beteiligt (Kalani *et al.*, 2008; Li und Pleasure, 2005; Lie *et al.*, 2005). Zum Beispiel führt die erhöhte Expression von Wnt3, das vermutlich von Astrozyten sekretiert wird, zu einer erhöhten adulten Neurogeneserate durch die Expression von NeuroD1 und Prox1, was wiederum die Proliferation und die Spezifikation des Zellschicksals fördert (Karalay *et al.*, 2011; Kuwabara *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2002). Auch der Wnt-Signalweg nimmt auf die altersabhängige Abnahme der Neurogeneserate Einfluss, da alternde Astrozyten weniger kanonische Wnt-Liganden produzieren und zusätzlich die Expression von Wnt-Antagonisten, wie Dickkopf-1 (Dkk1), ansteigt (Miranda *et al.*, 2012; Seib *et al.*, 2013).

Zu den intrinsischen Faktoren, die Einfluss auf die adulte Neurogenese nehmen, zählen vor allem Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren und auch epigenetische Faktoren (Hodge und Hevner, 2011). Die Zellzyklusinhibitoren p16, p21 und auch p53 sind entscheidend bei der Stilllegung von adulten Vorläuferzellen und ihr Abbau würde zu einer vorübergehenden Aktivierung und einem folgenden Schwund an Vorläuferzellen führen.

Einer der bekanntesten Transkriptionsfaktoren, der bei der adulten Neurogenese eine Rolle spielt, stellt SOX2 dar, der sowohl als Mediator von Notch als auch als Regulator von Shh, Einfluss auf den Stammzellpool nimmt und dessen Verlust zu einer verminderten hippocampalen Neurogenese führt (Ehm *et al.*, 2010; Favaro *et al.*, 2009). SOX2 nimmt somit über einen autokrinen Mechanismus Einfluss auf die Balance zwischen Aufrechterhaltung der Stammzellen und der Zellschicksalsdetermination. Sox2 rekrutiert außerdem viele weitere Transkriptionsfaktoren und epigenetische Regulatoren, die wiederum Einfluss auf die Neurogenese nehmen (Lodato *et al.*, 2013; Shimosaki *et al.*, 2013).

Neben vielen anderen Transkriptionsfaktoren spielt auch der Transkriptionsfaktor *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB) eine wichtige Rolle bei der adulten Neurogenese. Es ist bekannt, dass CREB von großer Bedeutung für Lernprozesse und Gedächtnisausbildung sowie für das Langzeit-Gedächtnis ist (Bourtchuladze *et al.*, 1994). CREB ist ein Mitglied der Leucin-Zipper-Familie und seine Aktivität ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Serinrestes 133 (Ser133). Die Phosphorylierung wird durch cAMP-abhängige Proteinkinasen, durch die Aktivierung der katalytischen Untereinheit von Calmodulinkinasen und weiteren Proteinkinasen (z.B. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase CAMK Typ II und Typ IV, Proteinkinase A PKA, *mitogen-activated protein kinase* MAPK), sowie durch Phosphatasen (z.B. Phospholipase C PLC) generiert (Gonzalez und Montminy, 1989; Lonze und Ginty, 2002; Sheng *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1994; Yamashima, 2012). Phosphoryliertes CREB (pCREB) kommt in neugeborenen unreifen Neuronen vor und seine Expression deckt sich mit der Expression von DCX (Nakagawa *et al.*, 2002). Mit dem Auftreten von reifen neuronalen Markern (NeuN, Calbindin) lässt die Expression von CREB nach (Jagasia *et al.*, 2009). Durch die Zugabe von Phosphodiesterase-Inhibitoren wird CREB verstärkt und dies führt zu einem erhöhten Überleben von reifen Neuronen, mehr Vorläuferzellproliferation und verstärktem Neuritenauswuchs und dendritischen Verzweigungen (Fujioka *et al.*, 2004; Merz *et al.*, 2011; Nakagawa *et al.*, 2002). Wird hingegen CREB gehemmt, so sinkt das Überleben der neugebildeten Zellen und die Expression von DCX geht verloren (Fujioka *et al.*, 2004). CREB stimuliert somit die Proliferation von Vorläuferzellen und das Überleben von neugebildeten Neuronen und beeinflusst daher auch die Funktionalität des Hippocampus.

Die Phosphorylierung von CREB führt zur Transkription von verschiedenen Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren, neurotrophen Faktoren, wie *brain-derived neurotrophic factor* BDNF (West *et al.*, 2001) und auch *immediate early genes* IEG, wie *activity-regulated cytoskeleton-associated protein* ARC. Neurotrophe Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Nervensystems sowie bei deren Fortbestehen im Erwachsenenalter. Die Infusion von BDNF in den Hippocampus führt zu erhöhter Proliferation und Neurogenese (Scharfman *et al.*, 2005). Hingegen führt die Entfernung des BDNF-Rezeptors (TrkB) in Vorläuferzellen zu gestörtem dendritischen und synaptischen Wachstum in den neugebildeten Neuronen, was wiederum Defizite in der Langzeitpotenzierung zur Folge hat (Bergami *et al.*, 2008). BDNF ist somit involviert in die Proliferation, die Differenzierung und die Verschaltung während der adulten Neurogenese. ARC gehört zu den sogenannten Effektor-IEGs und spielt eine kritische Rolle bei der Ausbildung des Gedächtnisses und der synaptischen Plastizität (Guzowski *et al.*, 1999; Guzowski *et al.*, 2001).

## 2.6 Gliazellen und Neuroinflammation

Für eine reibungslose Entwicklung sowie Funktionalität des Zentralen Nervensystems (ZNS) wird neben den Neuronen ein weiterer, lange Zeit unterschätzter Zelltyp, die Gliazellen, benötigt. Bereits im 19. Jahrhundert von Rudolf Virchow entdeckt, ist über die Funktion von Gliazellen verhältnismäßig wenig bekannt, obwohl es im Säugergehirn etwa 10mal so viele Glia wie Neurone gibt und sie damit etwa die Hälfte des Nervensystemvolumens ausmachen (Pelvig *et al.*, 2008; Shariff, 1953). Nachdem Gliazellen lange Zeit nur eine unterstützende Funktion zugesprochen wurde, wird ihnen inzwischen eine vielfältige und stark regulatorische Funktion vor allem bei der Entwicklung und der Plastizität des Nervensystems zugeschrieben (Barres, 2008; Fields *et al.*, 2015). Glia regulieren die Entstehung und die korrekte Verschaltung des Nervensystems, das Überleben und die Versorgung von Neuronen sowie die synaptische Plastizität durch Zell-Zell-Interaktionen. Auch beim Entzündungsprozess des Gehirns, der Neuroinflammation, spielen Gliazellen - vor allem Mikroglia und Astrozyten - eine entscheidende Rolle. Aufgrund ihres Ursprungs werden Glia in Makroglia, die Astrozyten und Oligodendrozyten umfassen, und Mikroglia unterschieden.

Makroglia entstehen aus neuralen Vorläuferzellen des embryonalen Neuralrohrs und des Vorderhirns (Rowitch und Kriegstein, 2010). Während der embryonalen Phase transformieren sich diese Zellen in Radialglia, die wiederum weiter zu Astrozyten oder Oligodendrozytischen Vorläuferzellen (OPC) differenzieren. Verschiedene Faktoren wie Shh, Notch, BMPs, sowie wei-

tere Wachstumsfaktoren und Zytokine kontrollieren das Zellschicksal und führen zum Auftreten spezifischer Domänen, die selektiv für die Entstehung von Astrozyten oder OPCs sind (Rowitch und Kriegstein, 2010; Zuchero und Barres, 2013). Der Übergang zur Gliogenese wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie Sox9, *nuclear factor 1* und der *serum response factor*, vermittelt. Für die Entstehung von OPCs spielen außerdem OLIG1/OLIG2 eine Rolle (Lu und Ramanan, 2012).

Mikroglia hingegen besitzen einen mesodermalen Ursprung und entstehen während der Embryogenese im Dottersack. Es entstehen zunächst Makrophagen aus hämatopoetischen Stammzellen, die den Dottersack verlassen und zum sich entwickelnden ZNS wandern, wo sie Mikroglia werden (Aguzzi *et al.*, 2013; Casano und Peri, 2015; Ginhoux und Prinz, 2015).

Den häufigsten Zelltyp im ZNS stellen die Astrozyten dar, denen heute diverse regulatorische Funktionen zugesprochen werden. Astrozyten besitzen eine stark neuroprotektive Funktion, indem sie z.B. Neurone mit Nährstoffen aus dem Blut versorgen (Pellerin *et al.*, 2007). Astrozyten sind ebenfalls in neurovaskuläre Verbindungen integriert, erhöhen den Blutfluss in Hirnregionen mit aktiven Neuronen (Attwell *et al.*, 2010) und wirken bei der Entstehung der Blut-Hirn-Schranke mit (Janzer und Raff, 1987). Bei der synaptischen Weiterleitung verstärken Astrozyten die Übertragung, indem sie Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt entfernen. Weiterhin sind sie an der Bildung von Synapsen und deren Stärke durch die Freisetzung einer Vielzahl an Proteinen maßgeblich beteiligt (Clarke und Barres, 2013).

Eine weitere wichtige Funktion besitzen Astrozyten bei der Entzündung des ZNS, indem sie zusammen mit Mikroglia axonale Trümmer phagozytieren und damit funktionsunfähige Synapsen abbauen. Dieser Vorgang wird als *synaptic pruning* bezeichnet (Schafer und Stevens, 2015). Astrozyten sind auch in der Lage, sowohl pro- also auch anti-inflammatorische Moleküle zu sekretieren, je nach auslösendem Stimulus. An der Regulation der adulten Neurogenese sind Astrozyten durch Sekretion neuroaktiver Moleküle wie z.B. Gliotransmitter, Neuromodulatoren, Nahrungsfaktoren und Hormone ebenfalls beteiligt. So führt die Sekretion von Adenosintriphosphat (ATP) zu einer erhöhten Teilungsrate der neuronalen Stammzellen, ebenso wie die Sekretion von D-Serin, dem Co-Agonist des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors (Cao *et al.*, 2013; Sultan *et al.*, 2015). Auch Thrombospondin erhöht die Proliferation von neuronalen Stammzellen und gleichzeitig die neuronale Differenzierung (Lu und Kipnis, 2010). Neurogenin-1, welches von Neuronen und Astrozyten produziert wird, erhöht die Wahrscheinlichkeit auf ein neuronales Zellschicksal von neugebildeten, hippocampalen Zellen (Ueki *et al.*, 2003). Weiterhin stehen Astrozyten in direktem Kontakt zu neuronalen Stammzellen, wobei dieser Kontakt über die Sekretion von GFAP und Vimentin zur Inhibition der neuronalen Differenzierung führt (Wilhelmsson *et al.*, 2012). Der Effekt auf die Proliferation und Differenzierung hängt

somit vom Zustand der Astrozyten und damit einhergehend von ihrem Expressionsprofil ab (Casse *et al.*, 2018).

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen im ZNS sind Astrozyten auch für verschiedene neurologische Krankheiten von Bedeutung. Hierbei kann je nach Krankheit eine Astroglia-Atrophie oder eine reaktive Astroglieose zu Grunde liegen. Der Verlust von Astrozyten konnte unter anderem bei Schizophrenie, Epilepsie, Depression und PTBS (Posttraumatische Belastungsstörung) nachgewiesen werden (Bedner *et al.*, 2015; Niciu *et al.*, 2014; Verkhratsky *et al.*, 2014). Bei chronischem Stress sowie PTBS wird angenommen, dass die Reduktion der Astroglia und deren Ausläufer durch eine erhöhte Aktivität von Glucocorticoid-Rezeptoren, vermutlich induziert durch ein erhöhtes Corticosteron-Level, vermittelt wird (Lou *et al.*, 2018). Eine reaktive Astroglieose entsteht hingegen meist in Folge einer Schädigung des ZNS und beinhaltet eine Zunahme der Astrozytenausläufer und eine Hochregulierung von GFAP (Pekny und Pekna, 2014; Pekny *et al.*, 2014). Dies ist charakteristisch bei Traumata, Schlaganfällen, Hirnblutungen sowie bei ZNS-Infektionen und Morbus Alzheimer (Acosta *et al.*, 2017; Burda *et al.*, 2016; Sims und Yew, 2017). Das eigentliche Ziel der Astroglieose beinhaltet Neuroprotektion und Unterstützung der gereizten Neurone, die Isolierung des geschädigten Areals sowie eine möglicherweise nötige Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Dies bedeutet, dass Astroglieose gemeinhin als vorteilhaft für das Nervensystem gilt (Sofroniew und Vinters, 2010). In Patienten mit Morbus Alzheimer wurde jedoch um Amyloid- $\beta$ -Plaques herum eine gesteigerte GFAP-Expression mit erhöhter Dichte von Ausläufern nachgewiesen. Dieser erhöhte Anteil an Astrozyten führt möglicherweise zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren (Furman *et al.*, 2012), die eine vermehrte Ausbildung von der für Morbus Alzheimer charakteristischen Amyloid-Plaques begünstigen. Das richtige Verhältnis von Neuron zu Astrozyten scheint somit essentiell wichtig für eine normale Funktion des ZNS zu sein, während pathologische Veränderungen dramatische Auswirkungen haben können.

Die Oligodendrozyten wurden aufgrund ihrer geringen Anzahl bisher wenig erforscht. Bekannt ist, dass es sich bei Oligodendrozyten um myelinisierende Gliazellen handelt, die ihre Fortsätze um ein Axon wickeln und ein reifes Myelin Internodium bilden (Nawaz *et al.*, 2015; Snaidero und Simons, 2014). Dies bewirkt eine verbesserte Signalweiterleitung, gleichzeitig jedoch erschwert die Myelinscheide die Versorgung mit Nährstoffen, weshalb Oligodendrozyten einen eigenen Weg gefunden haben Neurone metabolisch zu unterstützen, beispielsweise mit der Bereitstellung von Lactat für die ATP-Produktion (Saab *et al.*, 2013; Simons und Nave, 2015). Es konnte auch gezeigt werden, dass bei Kontakt von Oligodendrozyten zu einem wachsenden Axon deren eigenes Wachstum gehemmt wird (Bandtlow *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2002a; Chen *et al.*, 2002b). Eine erhöhte Anzahl an Oligodendrozyten kann somit eine

verminderte Synapsenbildung mit sich bringen. Chetty et al. konnten einen durch Stress oder Glucocorticoide induzierten Anstieg von Oligodendrozyten nachweisen, welcher über zwei unterschiedliche Wege Einfluss auf das kognitive Potential nehmen kann. Zum einen durch ein gestörtes Verhältnis zwischen Oligodendrozyten und Neuronen und zum anderen durch eine veränderte Myelinisierung (Chetty *et al.*, 2014). Glucocorticoide führten außerdem dazu, dass in NSZ-Kulturen mehr Oligodendrogenese und weniger Neurogenese stattfinden. Erhöhte Myelinisierungsaktivität bewirkt einen erhöhten Anteil der weißen Substanz im Gehirn, die eine schlechtere Versorgung der Neurone und eine veränderte synaptische Plastizität zur Folge haben kann. Altersabhängige kognitive Einschränkungen sowie psychische Erkrankungen wie Depressionen, Schizophrenie und PTBS basieren auf einer Veränderung der weißen Substanz (Ehrlich *et al.*, 2005; Jackowski *et al.*, 2008; Regenold *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2010).

Mikroglia haben die Fähigkeit Makrophagen-ähnliche Maßnahmen wie die Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen ergreifen zu können weshalb sie an der Immunüberwachung beteiligt sind. Sie zählen zu den beweglichsten Zellen im ZNS, d.h. sie können mit einer Geschwindigkeit von etwa 4,1µm/min ihre Ausläufer ausweiten oder zurückziehen (Catalin *et al.*, 2013; Dibaj *et al.*, 2010; Nimmerjahn *et al.*, 2005). Mikroglia liegen in gesunden, unbeschädigten Regionen in einem ruhenden, überwachenden Zustand vor. Aufgrund einer Schädigung wie einer Infektion, einem Trauma oder Krankheiten wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Multipler Sklerose können Mikroglia in eine aktive Form übergehen, die Zytokine und Chemokine produzieren. Beim Übergang in diese aktive Form verändert sich das Transkriptionsprofil und das Zytoskelett, wodurch ein Vordringen zum Ort der Schädigung ermöglicht wird (Russo und McGavern, 2015). Hier entfernen Mikroglia aufgrund ihrer phagozytotischen Eigenschaften Zelltrümmer, infektiöse Stoffe oder Toxine, womit die Neuroinflammation zunächst zu den protektiven Prozessen für den Organismus zählt. Eine übermäßige oder gar chronische Neuroinflammation kann jedoch ernsthafte pathologische Veränderungen hervorrufen, da die neuronale Regeneration geschwächt wird. Während die basale Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, beispielsweise TNF- $\alpha$  und CCL2, notwendig für die physiologischen Funktion des Organismus ist, führt eine erhöhte Menge an inflammatorischen Mediatoren zu gegenteiligen Effekten (Z. Li *et al.*, 2016; O'Connor *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2002). Die pathologische Neuroinflammation aktiviert Gliazellen, wodurch eine starke Zytokin- und Chemokinproduktion induziert wird. Außerdem erfolgt durch eine gestörte Blut-Hirn-Schranke eine verstärkte Infiltration peripherer Immunzellen (Hawkins und Davis, 2005; Monahan *et al.*, 2008).

Neben ihrer Beteiligung an der Neuroinflammation sind Mikroglia entscheidend an der Entstehung des ZNS und der synaptischen Plastizität beteiligt (Schafer *et al.*, 2013; Schafer und

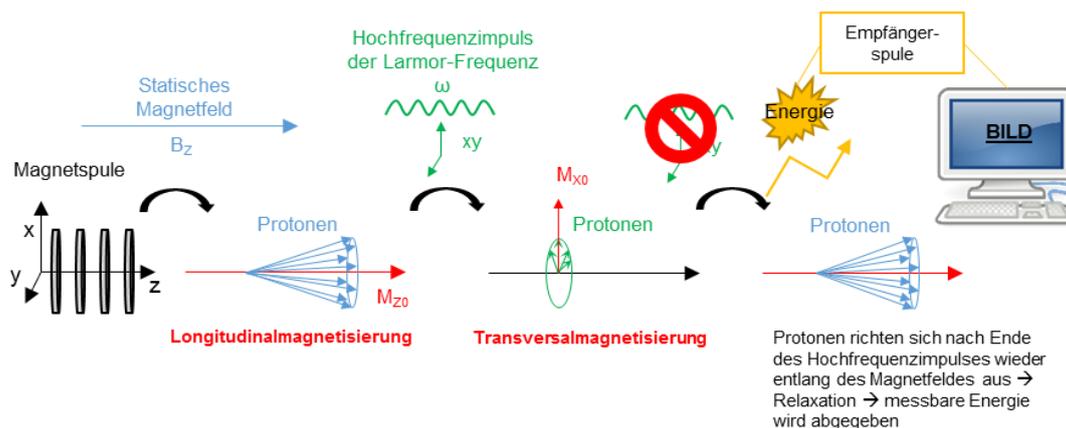
Stevens, 2015; Tremblay, 2011; Wake *et al.*, 2013). Für die Entstehung des ZNS mit den unterschiedlichen räumlichen Strukturen ist der programmierte Zelltod (Apoptose) unerlässlich, da etwa 50% aller neugebildeten Neurone wieder entfernt werden müssen. Hierbei sind Mikroglia entscheidend involviert, weil sie Apoptose initiieren können und somit gesunde, lebende Zellen phagozytieren und die Homöostase des ZNS aufrechterhalten (Marin-Teva *et al.*, 2004; Sedel *et al.*, 2004; Wakselman *et al.*, 2008). Die Fähigkeit, lebende Zellen zu phagozytieren, ist der Grund, warum Mikroglia auch in der adulten Neurogenese von entscheidender Bedeutung sind, da sie neu entstandene aber nicht eingebundene Neurone entfernen (Song *et al.*, 2012). Zur synaptischen Plastizität tragen Mikroglia zusätzlich bei, indem sie durch *synaptic pruning* auch Synapsen eliminieren (Wake *et al.*, 2013). Tremblay *et al.* konnten zeigen, dass die mit Mikroglia in Kontakt tretenden Spines nach einiger Zeit verkürzt werden oder überhaupt nicht mehr vorliegen (Tremblay *et al.*, 2011). *Synaptic pruning* erfolgt über die klassische Komplementkaskade. In dieser binden Synapsen, die eliminiert werden sollen, C1q und C3, wodurch sie über C3-Rezeptoren der Mikroglia erkannt werden (Schafer *et al.*, 2012). Wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, wird *Synaptic pruning* durch Mikroglia sowie durch Astrozyten vermittelt, die unmittelbar an der Phagozytose von Synapsen beteiligt sind (Chung *et al.*, 2013). Lana *et al.* konnten außerdem zeigen, dass Mikroglia auch beim Entfernen von ektopischen Neuronen und Zelltrümmern von Astrozyten unterstützt werden und zusammen mit dem zu entfernenden Neuron eine sogenannte Triade bilden (Lana *et al.*, 2016). Für eine korrekte Verschaltung des Gehirns sowie für die Entfernung von Zelltrümmern und Noxen arbeiten demzufolge beide Zelltypen mit phagozytotischen Eigenschaften eng miteinander zusammen.

## 2.7 Magnetresonanztomographie (MRT)

Ein nicht-invasives Analyseverfahren zur Darstellung von Struktur und Funktionen von verschiedenen Organen und Geweben stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Bei diesem bildgebenden Verfahren werden die Eigenschaften von Atomkernen genutzt, die einen Kernspin und damit ein magnetisches Moment besitzen. Die Eigenschaft, dass sich netto ein magnetisches Moment ergibt, besitzen nur Isotope mit einer ungeraden Massenzahl (Protonen und Neutronen). Durch externe Magnetfelder und die Einstrahlung von (elektromagnetischen) Radiowellen geeigneter Frequenz kann das Moment beeinflusst werden und damit zur MRT-Bildgebung genutzt werden. Am häufigsten wird hier das Wasserstoffatom genutzt, da etwa 70% des menschlichen Körpers aus Wasser besteht und dieses ein besonders starkes magnetisches Moment besitzt. Der Wasseranteil von unterschiedlichen Geweben variiert von

etwa 20% im Fett bis zu 95% im Blutplasma, wodurch verschiedene Gewebearten gut voneinander zu unterscheiden sind.

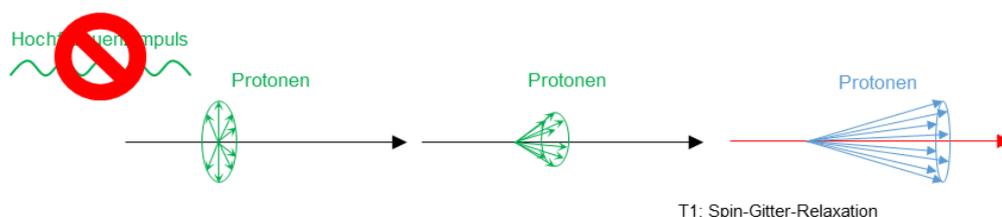
Wird ein Patient oder Versuchstier in einem starken homogenen Magnetfeld positioniert, richten sich die Atomkerne bzw. die Protonen entlang des Magnetfeldes (z-Ebene) aus. In Richtung des statischen Magnetfeldes baut sich eine Nettomagnetisierung auf, die als Longitudinalmagnetisierung ( $M_{z0}$ ) bezeichnet wird. Analog zur Bewegung des Kreisels im Erdmagnetfeld entsteht aufgrund des Eigendrehimpulses (Kernspin) des Atomkerns und dem damit verknüpften magnetischen Dipolmoment eine Präzisionsbewegung entlang der z-Achse mit der sogenannten Larmorfrequenz  $\omega$ . Dabei ist die Larmorfrequenz proportional zu der von außen angelegten Feldstärke. Legt man zusätzlich zum senkrecht einwirkenden statischen Magnetfeld ein hochfrequentes Wechselfeld mit zu  $\omega$  identischer Frequenz an, werden die Drehbewegungen synchronisiert und Resonanz entsteht, d.h. die Rotationsebene der Atomkerne wird aus dem statischen Feld gelenkt, wodurch die Nettomagnetisierung aus der Richtung des Magnetfeldes gekippt wird ( $M_{x0}$ ). Durch Abschalten des Wechselfeldes wird die Transversalmagnetisierung reduziert und die Atomkerne richten sich erneut entlang des permanent von außen anliegenden Magnetfeldes aus (Longitudinalmagnetisierung), was als Relaxation bezeichnet wird. Hierbei wird die T1- und T2-Relaxation unterschieden. Für die MRT-Bildgebung werden zusätzlich zu statischem Magnetfeld und hochfrequentem Wechselfeld Magnetfeldgradienten in allen drei räumlichen Richtungen eingesetzt, die die Zuordnung der aufgezeichneten Signale zu bestimmten Orten ermöglichen. Die Kombination aus Magnetfeldgradientenschaltung, Hochfrequenzimpuls und Signalmessung wird als Pulssequenz bezeichnet, die zur Erstellung eines Bildes 100 bis 1000mal wiederholt wird (Abbildung 2.6).



**Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Magnetresonanztomographen (MRT)**

Das Prinzip des MRT beruht darauf, dass Atome mit ungerader Massenzahl einen sogenannten Kernspin und damit einhergehend ein magnetisches Moment im Atomkern besitzen. Im MRT stellt Wasserstoff das am meisten genutzte Atom dar. Durch Einbringen der Atomkerne in ein statisches Magnetfeld richten sich diese Atomkerne entlang der z-Ebene aus (Longitudinalmagnetisierung). Aufgrund des Eigendrehimpulses (Kernspin) präzedieren die Kerne entlang der z-Ebene mit der Larmorfrequenz  $\omega$ . Durch einen nun senkrecht zur z-Achse eingebrachten Hochfrequenzimpuls werden die Atomkerne phasensynchron aus dem Magnetfeld gekippt, was eine Wechselspannung (mit zugehörigem elektromagnetischem Wechselfeld) induziert (Transversalmagnetisierung). Nach Abschaltung richten sich die Atomkerne wieder entlang der z-Ebene aus (Relaxation), wodurch wieder ein Strom induziert wird, wodurch dieser Prozess wiederholt werden kann.

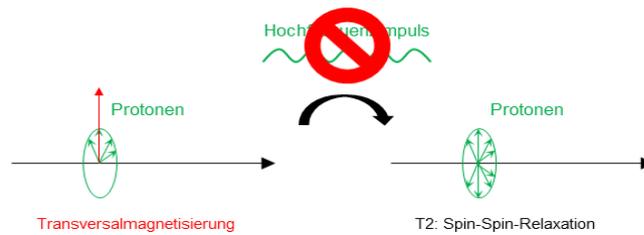
Die T1-Relaxation, auch Spin-Gitter-Relaxation oder Longitudinalrelaxation, beschreibt den Zeitverlauf der Einstellung des Gleichgewichtszustandes ( $M_z=0$ ) mit ausschließlich longitudinaler Magnetisierung nach Abstellen des Wechselfeldes (Abbildung 2.7). Dies bedeutet, dass sich die Spins wieder ausschließlich entlang des Magnetfeldes, der z-Ebene, ausrichten und somit auf ihr niedrigeres Ausgangsniveau zurückkehren. Haben sich 63% der Spins wieder entlang des Magnetfeldes ausgerichtet, wird dies als T1-Relaxationszeit bezeichnet. Die Länge dieser T1-Relaxationszeit hängt im Wesentlichen von der Wärmeleitfähigkeit des Gewebes ab, aber auch die Temperatur des Gewebes sowie die magnetische Flussdichte können Einfluss nehmen. Gewebe mit einer kurzen T1-Relaxationszeit (100-200ms), wie z.B. Fett, stellen sich in T1-gewichteten Bildern hell dar, da sich die Longitudinalmagnetisierung schnell wiedereinstellt und es eine hohe Signalintensität gibt. Niedrigviskose Flüssigkeiten hingegen, wie z.B. Wasser, in denen der Wärmetransfer langsamer vorgeht, besitzen längere T1-Relaxationszeiten (1-4 Sekunden), was zu einer dunklen Darstellung in einem T1-gewichteten Bild führt.



### Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der T1-Relaxation

Die T1-Relaxation, oder auch Spin-Gitter-Relaxation, beschreibt den Zeitverlauf bis zur Einstellung des Gleichgewichtszustandes mit ausschließlich longitudinaler Magnetisierung beim erstmaligen Einbringen einer Probe in einen externen Magneten oder nachdem das Wechselfeld abgestellt wurde. Dies bedeutet, dass sich die Spins wieder entlang der z-Ebene ausrichten und auf niedrigeres Energieniveau zurückkehren. Wenn sich 63% aller Spins wieder in diesem niedrigeren Ausgangsstadium befinden, bezeichnet man dies als T1-Relaxationszeit.

Die T2-Relaxation, auch Spin-Spin-Relaxation oder Transversalrelaxation, beschreibt den Übergang der Transversalmagnetisierung in ihren Gleichgewichtszustand ( $M_{xy}=0$ ), schematisch dargestellt in Abbildung 2.8. Der Verlust der Transversalmagnetisierung resultiert daraus, dass jeder Spin ein kleines Magnetfeld erzeugt, wodurch Magnetfeldinhomogenitäten entstehen. Die Atomkerne verlieren ihre phasensynchrone Kreisbewegung, auch Dephasierung genannt, und die Quermagnetisierung der Spins zerfällt. Im Gegensatz zu T1-gewichteten Bildern stellen sich in T2-gewichteten Bildern Gewebe, die die Transversalmagnetisierung lange halten können, wie z.B. Wasser, hell dar. Die Länge der T2-Relaxationszeit hängt von der Bewegungsfreiheit der Moleküle in den verschiedenen Geweben ab, d.h. je stärker die Bewegung eingeschränkt ist, umso kürzer ist die Relaxationszeit. Wasser hat also auch hier die längste T2-Relaxationszeit (ca. 1 Sekunde), während Fette oder Muskeln kürzere T2-Relaxationszeiten (50-100ms) besitzen.



**Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der T2-Relaxation**

Die T2-Relaxation oder auch Spin-Spin-Relaxation beschreibt den Zeitverlauf bis sich ein Gleichgewichtszustand entlang der Transversalmagnetisierung eingestellt hat. Der Verlust der Transversalmagnetisierung resultiert aus den kleinen eigenen Magnetfeldern der Spins. Diese beeinflussen sich nach Abstellen des Wechselfeldes gegenseitig, wodurch Magnetfeldinhomogenitäten entstehen, was zum Verlust der phasensynchronen Kreiselbewegung (Dephasierung) und damit einhergehend zur Abnahme der Transversalmagnetisierung führt.

Beide Relaxationsmechanismen führen zu einer Abnahme der Signalintensität, weshalb sie nicht vollständig voneinander getrennt werden können. Über die Wahl der Parameter Repetitionszeit TR (die Zeit zwischen den aufeinanderfolgenden Hochfrequenzimpulsen) und Echozeit TE (die Zeit zwischen dem Hochfrequenzimpuls und dem Empfang des Signals) kann vorgegeben werden, ob hauptsächlich T1 oder T2 dargestellt werden soll. Durch diese Gewichtung der Bilder können unterschiedliche Gewebskontraste dargestellt werden.

**Tabelle 1: Relaxationszeitkonstanten bei einer Feldstärke von 1 Tesla (T)**

Gewebe	T1 [ms]	T2 [ms]
Fett	240 ± 70	84 ± 36
Leber	420 ± 90	43 ± 14
Niere	590 ± 160	58 ± 24
Weißer Substanz (Gehirn)	680 ± 120	92 ± 22
Muskel	730 ± 130	47 ± 13
Herz	750 ± 120	57 ± 16
Graue Substanz (Gehirn)	810 ± 140	101 ± 13
Wasser	2500	1400

Damit eine T1-Wichtung vorliegt, müssen kurze TR-Zeiten (300-800ms) gewählt werden, d.h. die Spins dürfen nicht vollständig relaxiert sein. Da nur vollständig relaxierte Spins wieder angeregt werden können, entscheidet die Schnelligkeit der Longitudinalrelaxation und somit die T1-Zeit die Signalstärke. Da auch die Dephasierung der Spins das Signal beeinträchtigt, wird eine kurze TE-Zeit (<30ms) gewählt, damit die T2-Relaxation wenig Einfluss nimmt. Bei einem T1-gewichteten Bild wird Wasser signalarm und dunkel dargestellt, Fett signalreich und hell. Für eine T2-gewichtete Bildgebung werden die Parameter so gewählt, dass T1 möglichst wenig Einfluss auf die Signalintensität nimmt. Es wird somit eine lange TR-Zeit (> 2s) gewählt, um eine vollständige Relaxation des Signals vor der nächsten Anregung zu erreichen. Außerdem wird eine lange TE-Zeit (60-120ms) gewählt, sodass die Dephasierung und die T2-Zeit einen starken Einfluss auf die Signalintensität nehmen. Hierbei zeigt Wasser die höchste Signalintensität und wird hell dargestellt, während Fett eine mittlere (im Gegensatz zur T1-Gewichtung niedrigere) Signalintensität besitzt.

Neben der bildlichen Darstellung bietet das MRT auch funktionelle Analysemöglichkeiten, wie z.B. die diffusionsgewichtete MRT, *Diffusion Weighted Imaging* (DWI) (Redwine *et al.*) oder eine perfusionsgewichtete MRT, *Perfusion Weighted Imaging* (PWI). Die DWI bietet die Möglichkeit, die ungerichteten Bewegungen von Wassermolekülen in Geweben darzustellen und verwendet dazu zusätzliche Gradienten. Durch das Einschalten eines kurzzeitigen Gradientenfeldes wird das Magnetfeld um  $90^\circ$  in die xy-Ebene gekippt. Dies hat zur Folge, dass nicht mehr alle Kerne mit der gleichen Larmorfrequenz präzedieren und sie somit aus der Phase geraten (Dephasierung). Wird nun durch einen inversen Hochfrequenz-Impuls die Drehrichtung der Zellkerne um  $180^\circ$  verändert und erneut das Gradientenfeld ( $90^\circ$ ) kurz eingeschaltet, gelangen die magnetischen Momente durch die identischen Frequenzunterschiede bei umgekehrter Richtung wieder in die gleiche Phase (Rephasierung), wodurch eine Spannung, das Spin-Echo, entsteht. Kommt es zwischen dem 1. und 2. Gradienten allerdings durch Diffusion zu einem Ortswechsel der Spins, da sich einige bereits in Richtung des Gradientenfeldes bewegt haben, ist die Rephasierung der Kerne unvollständig und man kann einen Signalabfall messen. Eine Abschwächung des Signals weist somit auf eine Diffusionsbewegung hin. Die DWI bietet zum einen die Möglichkeit einer Früherkennung von Schlaganfällen durch Erkennen einer verminderten Sauerstoffversorgung, zum anderen können auch Gehirntumore sowie infektiöse Veränderungen wahrgenommen werden. Das quantitative Maß für die Wasserdiffusion wird *apparent diffusion coefficient* (ADC) genannt und wird in  $\text{mm}^2/\text{s}$  angegeben.

Die PWI hingegen misst das Blutvolumen in der zu untersuchenden Region. Die Messung des Blutvolumens kann entweder über die Zugabe eines Kontrastmittels wie Gadolinium oder aber durch ein *Arterial Spin Labeling* (ASL) erfolgen. Gadolinium führt zu einer Reduzierung der T2-Zeit in der Nähe von Wasser, wodurch Erkenntnisse bezüglich der Perfusion gewonnen werden können. Ein wesentlich schonenderer Ansatz, da keine Kontrastmittelgabe notwendig ist, stellt die ASL dar. Hierbei wird das im Blut enthaltene Wasser in einer Schicht kurz vor der zu untersuchenden Schicht magnetisiert. Dies erfolgt durch einen  $180^\circ$  Radiofrequenz-Inversionspuls, der die Nettomagnetisierung vom Blutwasser umkehrt, d.h. Wassermoleküle werden sozusagen mit einem „paramagnetischen Tracer“ versehen. Nach einer kurzen Zeit, der Transitzeit, wird dieser „paramagnetische Tracer“ in die zu untersuchende Gewebeschicht einfließen, wo die invertierten Spins des Blutwassers die Magnetisierung des Gesamtgewebes verändern. Von diesem Zustand wird ein Bild akquiriert, von dem ein Kontrollbild, also ein Bild ohne Labeling, abgezogen wird und damit ein Perfusionsbild erstellt. Dieses Bild zeigt nun die Menge an arteriellem Blut an, das pro Voxel in dieser Schicht während der Transitzeit abgegeben wurde. Die PWI kann so Aufschluss über die neuronale Aktivität geben, da sich hierbei der arterielle Blutfluss erhöht (Williams *et al.*, 1992). Ein erhöhter zerebraler Blutfluss wird ebenfalls oft nach einer Entzündung beobachtet (Logothetis, 2008).

## 2.8 Fragestellung

Die Entwicklung innovativer Bestrahlungsmethoden mit einer hochkonformalen Adaption der Dosisverteilung an Zielvolumina, wie die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT), ermöglichen eine verbesserte Tumorkontrolle bei gleichzeitiger Minimierung von Normalgewebstoxizitäten. Der Einsatz von mehr Bestrahlungsfeldern führt zwar zur Exposition mit geringeren Strahlendosen im umliegenden Normalgewebe, erhöht allerdings dadurch das Volumen an niedrig-exponiertem Normalgewebe. Die Auswirkungen niedriger Strahlendosen wurden bisher nur unzureichend untersucht und sollten aufgrund der verbesserten Therapieerfolge und dem damit einhergehenden verlängerten Überleben deutlicher in den Fokus heutiger Forschung rücken.

Im Rahmen dieser Dissertation soll mithilfe eines tierexperimentellen Modells die Hypothese untersucht werden, ob bereits niedrige Strahlendosen bei repetitiver Applikation, wie sie während der Durchführung einer konventionellen Radiotherapie stattfindet, Auswirkungen auf die Entwicklung und Funktionalität des Hippocampus hat. Um die komplexen Wechselwirkungen verschiedener Zellpopulationen innerhalb eines biologischen Systems, in diesem Fall des Gehirns, erfassen zu können, wurde ein *in-vivo* Modell mit DNA-Reparatur-profizienten und -defizienten Mäusen genutzt. Es soll untersucht werden, ob fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung zu einer Akkumulation von DNA-Schäden in hippocampalen Neuronen führt und ob dies Auswirkungen auf den Prozess der adulten Neurogenese hat, der direkt mit Lern- und Gedächtnisprozessen zusammenhängt. Hierbei soll mithilfe verschiedener Zellmarker der Einfluss auf jeweilige Zellpopulationen der Neurogenese (Stammzellen, Vorläuferzellen) sowie der Neuroinflammation (Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten) analysiert werden. Auch die Auswirkungen auf die synaptische Verschaltung im Hippocampus und damit die neuronale Aktivität soll untersucht werden. Außerdem soll eruiert werden, ob strahlungsinduzierte Veränderungen bereits mit bildgebenden nicht-invasiven Techniken, wie dem MRT, visualisierbar gemacht werden können. Abschließend sollen die durchgeführten Experimente Aufschluss darüber geben, ob die Auswirkungen der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung abhängig vom Alter zu Beginn einer Radiotherapie sind, da die Entwicklung des Hippocampus bis weit nach der Geburt andauert und man gerade nach pädiatrischen Radiotherapien kognitive Beeinträchtigung beobachten konnte. Die hierbei untersuchten juvenilen Tiere sind zu Beginn der Bestrahlung 11 Tage alt, was dem Peak des Gehirnwachstums entspricht und gleichzeitig die sensibelste Phase für Schädigungen darstellt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

Im Folgenden werden alle verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden, zusammengefasst.

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien und die jeweilige Bezugsquelle

Artikel	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
2 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
BRADY Theromtransferetiketten THT-2-488-10 und BPT-616-488	BRADY GmbH (Offenbach, Deutschland)
Deckgläser (24 x 50mm)	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Deckgläser (24 x 60mm)	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Einbettkassetten	Sanowa GmbH (Leimen, Deutschland)
Einwegspritzen (1ml, 10ml, 20ml)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Glasplatten für Hoefer Vertikalgele 10x10,5 cm	Amersham Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA, USA)
Handschuhe, nitril	Abena (Zörbig, Deutschland)
Hoefer™ Mighty Small™ Vertikales Mini-Elektrophoresesystem	Hoefer Inc. (Holliston, MA, USA)
Intrafix® Safe Set	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Kanülen BD Microlance™ 3 26G ½“ 0,45 x 13mm 25G 1“ 0,5 x 25mm 20G 1½“ 0,9 x 40mm	BD (Drogheda, Irland)
Objektträger HistoBond	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging (Menasha, WI, USA)
Pipetten	Brandt
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Rasierklingen	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Skalpelle	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
U-Shape TC-Plate 96 well	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
---------------------------	--

### 3.1.2 Reagenzien

Tabelle 3: verwendete Reagenzien und die jeweilige Bezugsquelle

Reagenz	Hersteller
5-Bromo-2'-deoxyuridine	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Ammoniaklösung (32%)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BSA Bovine Serum Albumine	GE Healthcare Life Sciences (Pittsburgh, PA, USA)
Citrate Buffer pH 6	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
cOmplete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dako REAL™ Retrieval Lösung Citratpuffer pH 6	Dako (Glostrup, Dänemark)
di-Natrium Hydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Esel-Serum	Gibco; Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Ethanol abs.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylenglycol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eukitt Quick Hardening	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EvansBlue	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Gelatine Porcine Skin Type A	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glutaraldehyd (50%)	Electron Microscopy Science (Hatfield, UK)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
H <sub>2</sub> O dest.	Universitätsapotheke (Homburg, Saar)
Heparin Natrium (5000 I.E./ml)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Heparin Natrium 5000 I.E./ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Immersionsöl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Isofluran	Baxter Healthcare GmbH (Wien, Österreich)
Isoporopanol	Hedinger (Stuttgart, Deutschland)
Kaliumchromat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdichromat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ketaset Ketaminhydrochlorid 100mg/ml	Zoetis (Berlin, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

<b>Natrium-Hydrogen-Phosphat Monohydrat</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Natriumthiosulfat Pentahydrat</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Paraformaldehyd</b>	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Paraformaldehyd (32%)</b>	Electron Microscopy Science (Hatfield, UK)
<b>Paraplast® Paraffin</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>PBS nach Dulbecco pH 7.2-7.4</b>	Universitätsapotheke (Homburg, Saar)
<b>PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets</b>	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
<b>Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Pierce™ RIPA Buffer</b>	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Polyvinylpyrrolidone</b>	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Protein Marker VI (10-250kDa)</b>	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
<b>Quecksilberchlorid</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Rompun 2%</b>	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
<b>Roti® Immunoblock 10x</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Rotiporese Gel 30</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Trichloressigsäure</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Tris Base</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Triton 100</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Tween 20</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>VECTASHIELD® Hard-Set Eindeckmedium mit 4',6-Diamidino-2-phenylidone</b>	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
<b>Xylol</b>	Otto Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
<b>Ziegen-Serum</b>	Gibco; Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)

### 3.1.3 Geräte und Software

Tabelle 4: verwendete Geräte und Software und der jeweilige Hersteller

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Affinity Photo</b>	Serif (Europe) Ltd. (Nottingham, UK)
<b>Atemflusssensor (Kinder)</b>	Smiths Medical (Dublin, OH, USA)
<b>Ausblockstation Tissue-Tek TEC</b>	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
<b>Biospec Avance III 94/20</b>	Bruker Biospin GmbH (Ettlingen, Deutschland)
<b>BRADY Theromtransfer Etikettendrucker BBP™ 11</b>	BRADY GmbH (Offenbach, Deutschland)
<b>ChemiDoc XRS+ Imaging System</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
<b>Einbettautomat Shandor Exelsior ES</b>	Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA)

<b>Epifluoreszenzmikroskop Eclipse Ni-E inkl. NIS-Elements BR und Digitalkamera DS-Qi2</b>	Nikon (Tokio, Japan)
<b>Feinwaage BL2105</b>	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<b>Graphpad QuickCalcs</b>	Graphpad Software (La Jolla, CA, USA)
<b>Linearbeschleuniger (Artist, 6MV)</b>	Siemens AG (Healthcare Sector, Erlangen, Deutschland)
<b>Macbook Pro 13“ A1708</b>	Apple Inc. (Cupertino, CA, USA)
<b>Magnetrührer Stuart CB162</b>	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
<b>Microsoft Office (Excel, Word, Powerpoint)</b>	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
<b>Mikrotom (RM2235)</b>	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
<b>Monitoring and Gating System (Model 1025)</b>	SA Instruments Inc. (Stony Brook, NY, USA)
<b>Multiplattenreader Multiskan Ascent</b>	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>NanoDrop (2000c)</b>	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
<b>Origin 2015G und 2018</b>	OriginLab Corporation (Northhampton, MA, USA)
<b>Paraffin-Streckbad TFB45</b>	Medite GmbH (Burgdorf, Deutschland)
<b>Photoshop CS3</b>	Adobe Systems GmbH (München, Deutschland)
<b>Rektaltemperatursonde</b>	SA Instruments Inc. (Stony Brook, NY, USA)
<b>Software Labelmark™ 6</b>	BRADY GmbH (Offenbach, Deutschland)
<b>Software Osirix Light</b>	Pixmeo SARL (Bernex, Schweiz)
<b>Software Paravision 6.0.1</b>	Bruker Biospin GmbH (Billerica, MA, USA)
<b>Tischzentrifuge Biofuge fresco</b>	Heraeus (Hanau, Deutschland)
<b>Tower Workstation Dell Precision T3610</b>	Dell (Frankfurt am Main, Deutschland)
<b>Ultrathurax T8 inkl. Netzgerät T8.01</b>	IKA Laboratories
<b>Vortex Genie 2</b>	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
<b>Waage BL3100</b>	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<b>Wärmeschrank</b>	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
<b>Wasserbad Typ 1012</b>	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel, Deutschland)
<b>Zeiss Axioscan Slice Scanner und LSM 800 Airyscan</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
<b>ZenLite Blue</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
<b>Zirkulierendes Wasserbad + Thermostat Thermo Haake C10-P5</b>	Thermo Haake GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<b>IBM SPSS Statistics 25</b>	IBM (Armonk, NY, USA)

### 3.1.4 Angesetzte Lösungen und Puffer

- **Tierexperimente:**
  - Narkose:
    - 120 mg/ml Ketaminhydrochlorid
    - 16 mg/ml Rompun
    - in 0,9% isotonische NaCl-Lösung
  - Flush-Buffer:
    - 1% Heparin in PBS
- **BrdU**
  - BrdU – Injektionslösung:
    - 10 mg/ml  $C_9H_{11}BrN_2O_5$  in 0,9% isotonischer NaCl-Lösung
- **Immunfluoreszenz:**
  - Fixierlösung für Paraffineinbettung (4% PFA):
    - 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS (pH 7.4)
  - Immunoblock:
    - Roti® Immunoblock 1:10 verdünnt in  $H_2O_{dest}$
  - 2% Ziegenserum:
    - 2% (v/v) Ziegenserum in PBS
  - 2% Eselserum:
    - 2% (v/v) Eselserum in PBS
  - Citratpuffer:
    - Dako REAL™ Retrieval Lösung (pH 6) 1:10 verdünnt in  $H_2O_{dest}$
- **Golgi-Cox:**
  - Fixierlösung für Golgi-Cox-Färbung:
    - 4% Paraformaldehyd (32% Stammlösung)
    - 8% Glutaraldehyd (50% Stammlösung) in  $H_2O_{dest}$
  - 5% Kaliumdichromat:
    - 5% (w/v)  $K_2Cr_2O_7$  in  $H_2O_{dest}$
  - 5% Kaliumchromat:
    - 5% (w/v)  $K_2CrO_4$  in  $H_2O_{dest}$
  - 5% Quecksilberchlorid:
    - 5% (w/v)  $HgCl_2$  in  $H_2O_{dest}$

- Golgi-Cox-Lösung:
  - 50ml Kaliumchromat (5%)
  - 50ml Kaliumdichromat (5%)
  - 40ml Quecksilberchlorid (5%)
  - 100ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
  - 48h bei RT im Dunkeln stehen lassen, damit sich Präzipitat absetzt
- 0.1M Phosphatpuffer:
  - 0,02M Natriumhydrogen-Phosphat Monohydrat NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O
  - 0,68M di-Natrium-Hydrogen-Phosphat Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,3M Natriumchlorid NaCl
- Gewebeschutzlösung:
  - 30% Sucrose C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>
  - 0,09M Polyvinylpyrrolidone PVP40
  - 30% (v/v) Ethylenglycol C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>
  - in 500 ml 0.1M Phosphatpuffer + 500ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
- 5% Natriumthiosulfat:
  - 5% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
- 16% Ammoniak:
  - 32% Ammoniak 1:1 verdünnt in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
- **EvansBlue:**
  - 2% Evans Blue-Injektionslösung
    - 2% (w/v) C<sub>34</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub> in 0,9% isotonische NaCl-Lösung
  - 50% Trichloressigsäure
    - 50% (w/v) C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>
- **WesternBlot**
  - Sammelgelpuffer:
    - 0,5M Tris (pH 6.8)
    - 0,4% (w/v) SDS
  - Trenngelpuffer:
    - 1,5M Tris (pH 8.8)
    - 0,4% (w/v) SDS
  - Laufpuffer (10x):
    - 250mM Tris
    - 1,92 M Glycin

- Transferpuffer:
  - 25mM Tris
  - 192mM Glycin
  - 20% (v/v) Methanol
- 2x Sample Buffer:
  - 125mM Tris-HCl (pH 6.8)
  - 20% (v/v) Glycerol C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>
  - 5% SDS NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>
  - 20% Mercaptoethanol C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS
  - 0,05% Bromphenolblau C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S
- RIPA-Lyse Puffer:
  - in 10ml Pierce™ RIPA-Buffer je eine Tablette *PhosSTOP*, *Phosphatase Inhibitor Cocktail* und eine Tablette *cOmplete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail*

### 3.1.5 Antikörper

Tabelle 5: verwendete primäre Antikörper, die eingesetzte Verdünnung sowie die jeweilige Bezugsquelle

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-53BP1	1:5000	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
Kaninchen anti-Bax	1:1000	Cell Signaling Technology Europe (Frankfurt am Main, Deutschland)
Kaninchen anti-Caspase 3	1:600	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)
Kaninchen anti-CREB	1:1000	Cell Signaling Technology Europe (Frankfurt am Main, Deutschland)
Kaninchen anti-GAPDH	1:10.000	Abcam (Cambridge, UK)
Kaninchen anti-GFAP	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
Kaninchen anti-OLIG2	1:700	Abcam (Cambridge, UK)
Maus anti-CREB phosphoryliert (Ser133)	1:1000	Cell Signaling Technology Europe (Frankfurt am Main, Deutschland)
Maus anti-NeuN	1:500	Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Maus anti-PSD95	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
Maus anti-SOX2	1:500	Abcam (Cambridge, UK)
Ratte anti-BrdU	1:200	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Ratte anti-Ki67	1:600	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Ziege anti-DCX	1:500	SantaCruz (Dallas, TX, USA)
Ziege anti-IBA1	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)

Tabelle 6: verwendete sekundäre Antikörper, die eingesetzte Verdünnung sowie die jeweilige Bezugsquelle

Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Esel anti-Ziege IgG Alexa 568	1:400	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Kaninchen anti-Ziege Alexa 568	1:400	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-linked	1:10.000	Cell Signaling Technology Europe (Frankfurt am Main, Deutschland)
Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa 488	1:400	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa 568	1:400	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Maus IgG HRP-linked	1:10.000	Cell Signaling Technology Europe (Frankfurt am Main, Deutschland)
Ziege anti-Maus IgG Alexa 488	1:400	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Maus IgG Alexa 568	1:400	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ziege anti-Ratte IgG2a FITC	1:400	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierexperimente

#### 3.2.1.1 Verwendete Mausstämme

##### C57BL/6N

Die männlichen Wildtyp-Mäuse C57BL/6N (C57BL6) wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die 11 Tage alten C57BL6- Mäuse wurden im Wurf (6 Jungtiere und 1 Amme) verschickt und bis zum 21. Tag zusammengehalten.

##### SCID-Mäuse

Männliche CB17/Icr-Prkd<sup>Scid</sup>-Mäuse wurden von Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen. Die Mäuse besitzen eine homozygote Punktmutation des PRKDC-Gens, wodurch ein Stop-Codon generiert wird und die Aminosäuresequenz c-terminal um 83 Aminosäuren verkürzt wird, was eine Inaktivität der Proteinkinase zur Folge hat und zu einer gestörten Immunabwehr führt (Bosma und Carroll, 1991).

### AT-Mäuse

Die 129S6/SvEVTac-Atm<sup>tm1Awb</sup>-Mäuse stammen aus eigener Zucht, die vor einigen Jahren von Stefanie Schanz in unserem Labor durchgeführt wurde. Die ursprünglichen Zuchtpaare stammen aus dem Labor von Herrn PD Dr. rer. nat. R. Schubert aus dem Allergologischen Labor des Klinikums der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main. Generiert wurde der Mausstamm von Dr. Anthony Wynshow-Boris durch die Insertion einer Phosphoglycerinkinase (PGK)-Neomycin-Kassette (*neo*-Kassette) auf Chromosom 9 an Position 5979 des ATM-Gens. Hierdurch kommt es zur Expression eines verkürzten ATM-Gens, das nicht mehr funktionsfähig ist (Barlow *et al.*, 1996).

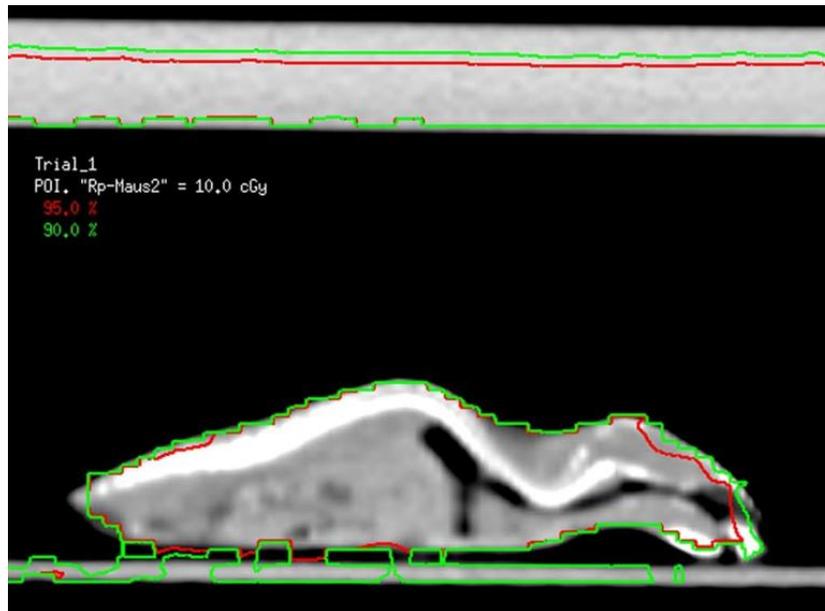
#### 3.2.1.2 Tierhaltung

Alle Tierexperimente sowie die Tierhaltung erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und nach den Vorgaben des Landesamtes für Verbraucherschutz - Abteilung ‚Amtstierärztlicher Dienst, Lebensmittelüberwachung‘ des Saarlandes. Alle Mäuse wurden in Gruppen von bis zu sechs Tieren in IVC-Käfigen unter identischen, standardisierten Laborbedingungen (Temperatur 22°C±2, Luftfeuchtigkeit 55%±10 und einem gleichbleibenden Tag-Nacht-Rhythmus von 12h:12h) in der Versuchstierhaltung der experimentellen Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes gehalten. Die Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Futter und Wasser, *ad libitum*. Die entsprechenden Versuchsprotokolle wurden durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes sowie des Landesamtes für Verbraucherschutz genehmigt und werden unter den Versuchsnummern 05/2014 und 35/2016 geführt.

#### **3.2.2 Bestrahlungsplanung**

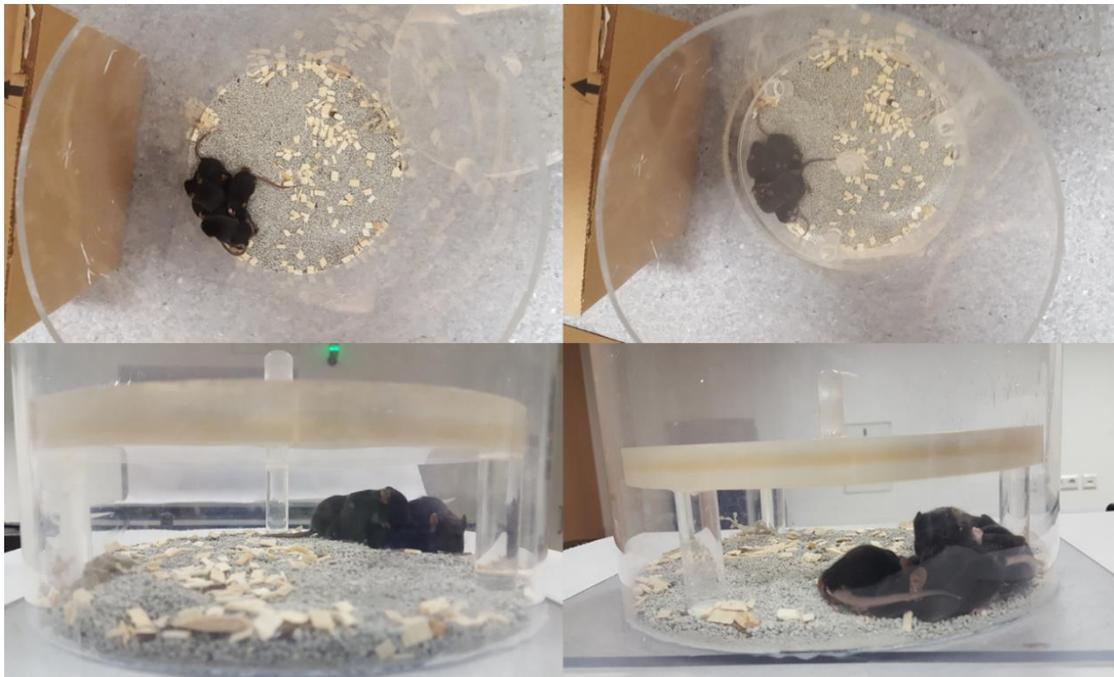
Die Bestrahlung der Tiere erfolgte in der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikum Homburg. Es erfolgte eine Ganzkörperbestrahlung an einem Linearbeschleuniger (Artiste™, Siemens) mit 6 Megavolt (MV). Hierzu befanden sich die Mäuse in Gruppen von 3 bis 6 Tieren in einem Plexiglaszylinder (19 cm Durchmesser) unter einem Plexiglasdeckel mit einer Dicke von 1,5 cm. Durch den Plexiglasdeckel wurde ein 5 cm Hohlraum für die Mäuse geschaffen (Abbildung 3.2). Der Aufbaueffekt im Plexiglasdeckel ermöglicht aufgrund seiner gewebsähnlichen Struktur eine homogene Dosisverteilung (Abbildung 3.1). Die Dosis von 0.1 Gy wurde durch ein senkrecht ausgerichtetes Strahlenfeld (Gantrywinkel 0°, Kollimatorwinkel 0°) mit einer Feldgröße von 30x30 cm und einer Dosisleistung von 200 MU/min (Monitoreinheiten pro

Minute) appliziert. Die Validierung der Dosisverteilung erfolgte mit Hilfe des Pinnacle™ Planungssystems (Philips, Amsterdam, Niederlande).



**Abbildung 3.1: CT-geplante Dosisverteilung im Mausgewebe**

CT-geplante Dosisverteilung bei der Bestrahlung einer Maus mit 0.1 Gy mithilfe des Pinnacle™ Planungssystem. In einer Ebene werden die 90% (grün) und 95% Isodosenverteilung gezeigt. Die Dosisverteilung wurde anhand einer CT-Aufnahme mit einer Schichtdicke von 1 mm von einer Maus innerhalb eines Plexiglaszylinders mit Plexiglasdeckel berechnet.

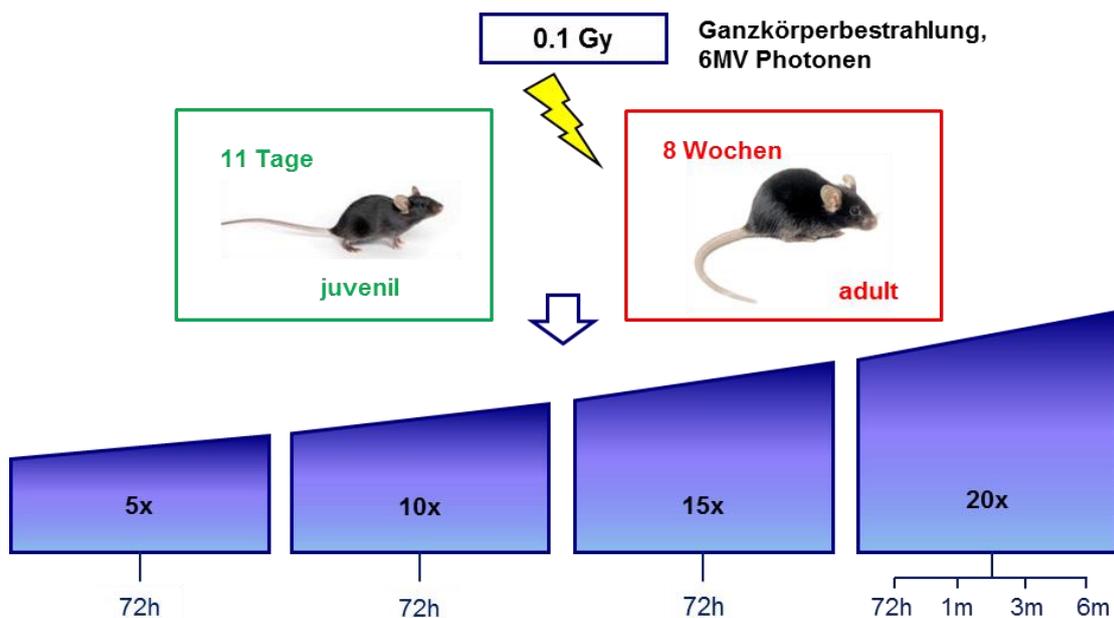


**Abbildung 3.2: Positionierung der Mäuse vor und während der Bestrahlung innerhalb des Plexiglaszylinders im Hohlraum unter dem Plexiglasdeckel.**

Die Mäuse wurden in Gruppen von 3 - 6 Tieren in einem Plexiglaszylinder mit einem Durchmesser von 19 cm und einem 1.5 cm dicken Deckel am Linearbeschleuniger mit 0.1 Gy bestrahlt.

### 3.2.2.1 Fraktionierte Bestrahlung

Die Mäuse wurden einmal täglich von Montag bis Freitag und immer zur gleichen Uhrzeit (7:45h) über einen Zeitraum von 1, 2, 3 oder 4 Wochen mit 0.1 Gy bestrahlt. Dies entspricht einer zugehörigen Anzahl von 5x, 10x, 15x oder 20x Fraktionen (Abbildung 3.3). Zu Beginn der Bestrahlung waren die Mäuse entweder 11 Tage (juvenil) oder 8 Wochen (adult) alt. Für IFM-Untersuchungen wurden 72 Stunden nach jeder Bestrahlungswoche die Mäuse intrakardial perfundiert und die Gewebe entnommen. Ebenfalls wurden Mäuse jeweils 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach der höchsten applizierten Dosis von 20x0.1 Gy untersucht. Für die Golgi-Cox-Färbungen, die Proteomanalyse, die Untersuchung der Unversehrtheit der Blut-Hirn-Schranke sowie die MRT-Untersuchungen wurden ausschließlich juvenile Tiere mit der höchsten kumulativen Dosis (20x0.1 Gy) bestrahlt und diese zu den gleichen Zeitpunkten nach Bestrahlung untersucht. Als Vergleichskontrolle dienten jeweils altersgerechte, unbestrahlte Tiere. Es wurden pro Versuchsgruppe mindestens 3 biologische Replikate (n=3) für jede Untersuchungsmethode analysiert.



**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung**

Die Mäuse wurden von Montag bis Freitag (5x pro Woche) über einen Zeitraum von 4 Wochen mit 0.1 Gy am Linearbeschleuniger mit 6MV Photonen bestrahlt. Es handelt sich um eine Ganzkörperbestrahlung bei deren Beginn die Mäuse der einen Gruppe 11 Tage (juvenil) und die der anderen Gruppe 8 Wochen (adult) alt waren. 72 Stunden nach jeder Bestrahlungswoche wurden je 3 - 6 Mäuse einer Gruppe entweder intrakardial perfundiert oder zervikal disloziert und ihre Gehirne entnommen. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde immer eine unbestrahlte, altersgerechte Kontrollgruppe mitgeführt. Nach der höchsten Dosisapplikation (20x0.1 Gy) wurden zusätzlich Mausgruppen nach 1 Monat, 3 und 6 Monaten untersucht.

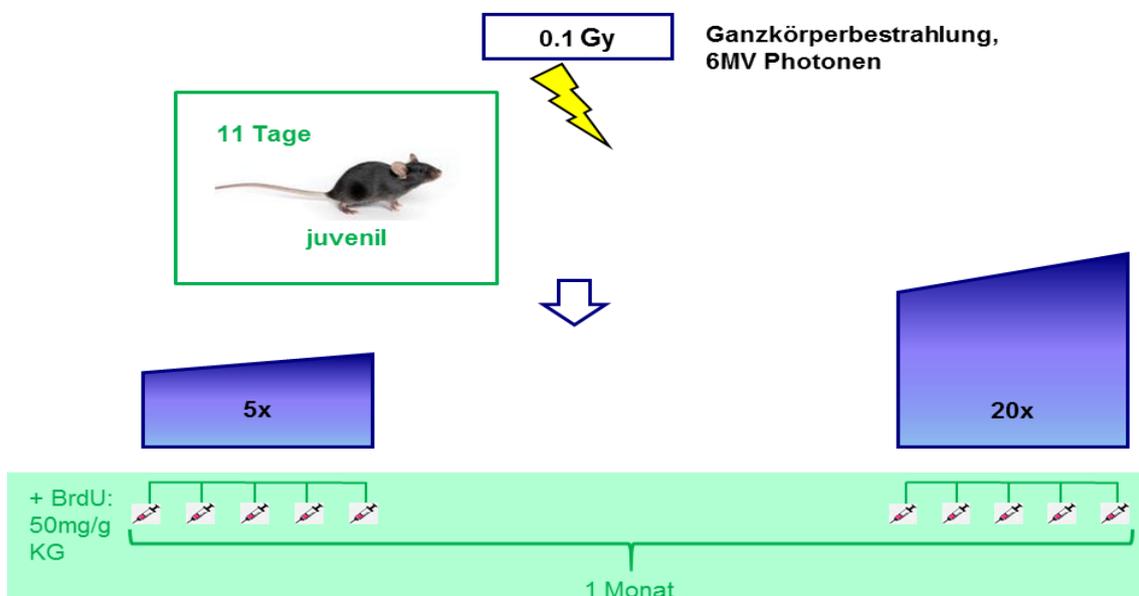
	Woche 0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6	Woche 7	Woche 8	Woche 9	Woche 13	Woche 17	Woche 21	Woche 29	Woche 33
84 P11 Mäuse															
42 P56 Mäuse	P56														
	Kontrolle														
5 x 100mGy															
72h post IR															
10 x 100mGy															
72h post IR															
15 x 100mGy															
72h post IR															
20 x 100mGy															
72h post IR															
20 x 100mGy															
1 Monat post IR															
20 x 100mGy															
3 Monate post IR															
20 x 100mGy															
6 Monate post IR															

Abbildung 3.4: Tabellarische Übersicht des Ablaufs der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung von juvenilen und adulten Mäusen

Excel-Tabelle des Zeitplans der 1. Bestrahlungsserie von juvenilen (grün) und adulten (lila) Mäusen für die Einbettung der Organe in Paraffin für Immunfluoreszenz-Untersuchungen

### 3.2.2.2 Fraktionierte Bestrahlung mit BrdU-labeling

Um das Zellschicksal der Stammzellen nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung zu untersuchen, wurde eine fraktionierte Bestrahlung mit gleichzeitiger BrdU-Markierung für juvenile Mäuse (P11) durchgeführt. BrdU, ein Thymidinanalogon, wird während der Replikation in der Interphase der Mitose in die DNA eingebaut. Da ausschließlich die nach der Markierung mit BrdU neu synthetisierten DNA-Stränge den Marker tragen, ist dieser zum Nachweis von Proliferation geeignet und ermöglicht darüber hinaus, markierte Zellen nach der Replikation weiter zu verfolgen. In diesem Experiment wurden proliferierende Zellen täglich (Montag - Freitag) während der letzten Bestrahlungswoche markiert, d.h. BrdU wurde im Rahmen der Zellteilung von Stamm- und Vorläuferzellen in die DNA eingebaut. Diese markierten Zellen wurden nach weiteren 4 Wochen - dies entspricht in etwa dem Zeitraum, den eine Stammzelle braucht, um sich zu einem Neuron oder einem Makroglia zu differenzieren - dahingehend untersucht, zu welchem Zell-Typ sie sich differenziert haben. Hierfür wurden die Mäuse 5x oder 20x mit 0.1 Gy bestrahlt. Die Mäuse der ersten Gruppe (5x) erhielten während der gesamten Bestrahlungswoche täglich eine intraperitoneale BrdU-Injektion, wohingegen die Mäuse der anderen Gruppe (20x) die tägliche Injektion in der letzten Bestrahlungswoche bekamen (Abbildung 3.5). Die Injektion von 50mg BrdU pro Gramm Körpergewicht der Maus (50mg/g KG) erfolgte an den jeweiligen Tagen 5 Stunden nach der Bestrahlung. Einen Monat nach Applikation der letzten Strahlendosis wurden die Mäuse intrakardial perfundiert und die Gewebe entnommen.



**Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der verabreichten BrdU-Markierung**

Die Mäuse wurden von Montag bis Freitag (5x pro Woche) über einen Zeitraum von 4 Wochen mit 0.1 Gy am Linearbeschleuniger mit 6MV Photonen bestrahlt. Es handelte sich um eine Ganzkörperbestrahlung, bei deren Beginn die Mäuse 11 Tage (juvenil) alt waren. Zusätzlich zur Bestrahlung wurde den Mäusen in der jeweils letzten Bestrahlungswoche täglich 5 Stunden nach der Bestrahlung 50mg/g KG BrdU intraperitoneal injiziert. Einen Monat nach Bestrahlungsende wurden je 3 Mäuse einer Gruppe intrakardial perfundiert und ihre Gehirne entnommen, um sie in Paraffin einzubetten. Zu jeder bestrahlten Gruppe wurde immer eine unbestrahlte, altersgerechte Kontrollgruppe mitgeführt, denen ebenfalls BrdU injiziert wurde.

## Material und Methoden

				Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 6	Woche 7	Woche 8	Woche 9
				5x100mGy			20x100mGy				
	Mausalter			P11	P18	P25	P32	P46	P53	P60	P67
5 x 100 mGy, 1 Monat	BrdU	bestrahlt	5 Tiere	+ BrdU							
		Kontrolle	5 Tiere	+ BrdU				Perfusion			
20 x 100 mGy, 1 Monat	BrdU	bestrahlt	5 Tiere				+ BrdU				
		Kontrolle	5 Tiere				+ BrdU				Perfusion

**Abbildung 3.6: Bestrahlungsplan der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung mit BrdU-Markierung von juvenilen Mäusen**  
Excel-Tabelle des Zeitplans der Bestrahlungsserie mit BrdU-Markierung von juvenilen Mäusen für die Einbettung der Organe in Paraffin für Immunfluoreszenz-Untersuchungen

### 3.2.3 Immunfluoreszenz-Untersuchung

Die Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) ermöglicht die Visualisierung der zellulären Lokalisation von verschiedenen Proteinen und Strukturen in Gewebe oder Zellen mithilfe von Fluorochrom-markierten Antikörpern. Bei der direkten Methode ist bereits der primäre Antikörper, der gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist, mit einem Fluorochrom gekoppelt. Bei der indirekten Methode wird zunächst ein primärer Antikörper auf das zu Probenmaterial aufgebracht und anschließend ein sekundärer Antikörper, der zum einen gegen den primären Antikörper gerichtet ist und zum anderen ein Fluorochrom gebunden hat. Bei beiden Methoden wird zur Detektion das Fluorochrom unter dem Fluoreszenzmikroskop durch spezielle Filter mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und es emittiert daraufhin ein Signal, das detektiert werden kann. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Antikörper in der gleichen Probe wird darauf geachtet, dass die Anregungs- und Abstrahlungswellenlängen der Fluorochrome möglichst weit voneinander entfernt liegen.

#### 3.2.3.1 Gewebeentnahme

Für die IFM wurden die Mäuse für die intrakardiale Perfusion mit anschließender Gewebeentnahme durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 µg/g KG) und Rompun (16 µg/g KG) in 0,9 %iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung anästhesiert. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz, was durch Überprüfen der Zwischenzehenreflexe überprüft wurde, wurden die Bauchhöhlen geöffnet und durch intrakardiale Perfusion mit 2% Paraformaldehyd (PFA) die Organe und Gewebe fixiert. Hierzu wurde in den linken Ventrikel des Mäuseherzens ein Intrafix® eingeführt und gleichzeitig das rechte Atrium zum Entweichen des Blutes und der überschüssigen Fixierlösung geöffnet. Zunächst wurde über den Intrafix® 20ml Flush-Buffer injiziert und anschließend die Maus durch Einleiten von 40-45 ml 4% PFA fixiert. Hierdurch wird das Blut vollständig durch Fixierlösung ersetzt und zeitgleich Gewebe und Organe vor Eintreten von Verwesungsprozessen fixiert. Nach Fixierung wurden den Mäusen die Gehirne

sowie weitere Organe (Herz, Lunge, Leber, Niere, Dünndarm, Hoden) entnommen und über Nacht in 4% PFA erneut fixiert.

### 3.2.3.2 Gewebereinbettung

Nach Fixierung mit 4% PFA über Nacht wurden die Organe für die Einbettung vorbereitet. Das Gehirn wurde hierfür durch zwei koronare Inzisionen in 3 Teile geschnitten. Der erste Schnitt erfolgte in etwa bei Bregma -1,5 mm (Abbildung 3.7 I), anschließend wurde das Cerebellum durch einen weiteren Schnitt entlang des *Sinus Transversus* (Abbildung 3.7 II) entfernt.

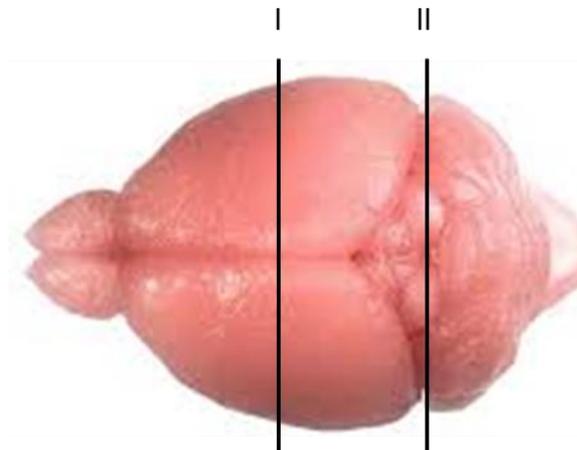
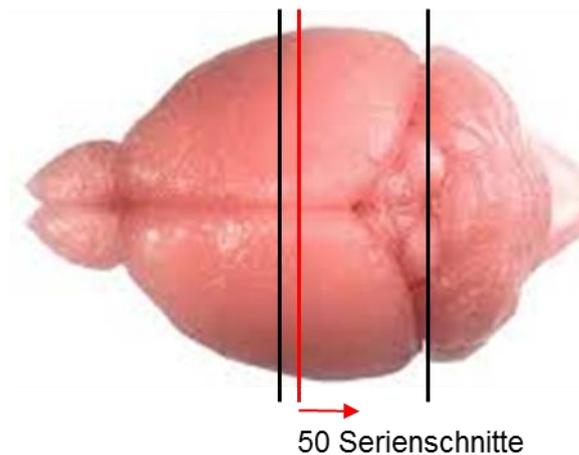


Abbildung 3.7: Darstellung der durchgeführten koronaren Inzisionen nach Sektion des murinen Gehirns  
[https://www.nsf.gov/discoveries/disc\\_images.jsp?cntn\\_id=130442&org=NSF](https://www.nsf.gov/discoveries/disc_images.jsp?cntn_id=130442&org=NSF)

Das Cerebellum sowie der vordere Teil des Gehirns samt olfaktorischem Bulbus wurden zusammen eingebettet, wohingegen der mittlere Teil allein eingebettet wurde. Hierfür wurden die Organe in Gewebekassetten überführt und in *phosphate buffered saline* (PBS) gelagert, bis sie über Nacht in einem Einbettungsautomaten (Shandon Exelsior ES) nach dem Standardprotokoll der Neuropathologie des Universitätsklinikums Homburg/Saar automatisiert dehydriert und in Paraffin konserviert wurden. Gemäß dem Standardprotokoll erfolgt zunächst eine schrittweise Entwässerung mittels steigender Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 100%), gefolgt von einer mehrmaligen Inkubation in Xylol. Die Organe wurden anschließend in flüssiges Paraffin überführt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Organe an einer Ausblockstation (Tissue-Tek TEC) mit Hilfe von Edelstahl-Einbettenschälchen in Paraffinblöcke gegossen. Hierbei wurde die Orientierung der mittleren Gehirnprobe so gewählt, dass sich die Schnittfläche bei Bregma -1,5mm (Abbildung 3.7 I) außen befand und hierdurch eine Schnittführung am Mikrotom von Schnittfläche I zu II ermöglicht wurde.

### 3.2.3.3 Sektionierung

Von den in Paraffin eingebetteten Gehirnen wurden mithilfe eines Mikrotoms (RM2235, Leica) 4  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Hierzu wurden die Gehirne zunächst bis etwa Bregma -1,9 mm getrimmt (s. rote Linie in Abbildung 3.8) und anschließend 50 Serienschritte à 4  $\mu\text{m}$  angefertigt. Diese Schnitte wurden nacheinander auf Objektträger aufgebracht und anschließend in einem etwas 50°C warmen Wasserbad glattgezogen. Auf einen Objektträger wurden je drei Hirnschnitte der drei biologischen Replikate aufgebracht. Die Serienschritte wurden bis zur IFM-Markierung in Objektträgerkästen aufbewahrt.



**Abbildung 3.8:** Darstellung der durchgeführten koronaren Inzisionen nach der Sektion des murinen Gehirns (schwarz) und der Schnittebene, die den Beginn der 50 Serienschritte anzeigt.

### 3.2.3.4 Immunfluoreszenzmarkierung

Für die Markierung der Serienschritte mit unterschiedlichen Fluorochrom-markierten Antikörpern wurde zunächst das Paraffin durch Inkubation in Xylol (3x7 Minuten) entfernt und die Schnitte anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) für je drei Minuten rehydriert. Um die Epitope zu demaskieren, wurden die Paraffinschnitte für eine Stunde in Citratpuffer (pH 6) in einem 95°C heißen Wasserbad inkubiert. Einzig für die Markierung von 53BP1 wurden die Paraffinschnitte nur für 40 Minuten im Citratpuffer gekocht. Nach einer Abkühlzeit von 20 Minuten, erfolgte eine 1-stündige Inkubation in einer Blockierlösung, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Bei der verwendeten Blockierlösung handelte es sich bei den meisten Antikörpern um eine kommerziell erworbene Immunoblock-Gebrauchslösung (Roti Immunoblock 1:10 verdünnt). Ausnahmen stellten die Antikörper BrdU, GFAP und Olig2 dar, die mit einer 2%-igen Ziegen-Serum/PBS-Lösung geblockt wurden. Die Inkubation erfolgte in einer Feuchtekammer, indem 200  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Blockierlösung auf den Objektträger gegeben und anschließend blasenfrei mit einem Deckglas eingeschlossen wurden. Vor Inkubation der Probe mit dem primären Antikörper wurden das Deckglas und die

Blockierlösung entfernt. Der primäre Antikörper wurde entsprechend Tabelle 5 in der zugehörigen Blockierlösung verdünnt auf den Objektträger und die Gewebeschnitte aufgetragen und mit einem Deckglas eingeschlossen. Die Inkubation der Proben erfolgte in einer Feuchtekammer bei 4°C über Nacht.

Am darauffolgenden Tag wurde der überschüssige primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen (jeweils 10 Minuten) mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen, in entsprechende Blockierlösung verdünnten, sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (Tabelle 6) für eine Stunde bei RT im Dunkeln. Erneut wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, jedoch wurde nun zur Schonung des Fluoreszenzsignals weiterhin im Dunkeln gearbeitet. Zum Schluss wurden die Proben mit einem *4',6-Diamidin-2-phenylindol* (DAPI)-haltigen Eindeckmedium eingedeckt und bei 4°C komplett ausgehärtet. Bis zur Untersuchung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop wurden die Präparate bei 4°C im Kühlschrank unter Lichtausschluss gelagert.

### 3.2.3.5 Auswertung

Für jede Antikörpermarkierung wurden mindestens drei Sektionen aus drei biologischen Replikaten (Mäusen) ( $n=3$ ) pro Bedingung und Zeitpunkt untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurden immer drei altersgerechte, unbestrahlte Kontrollen mitgeführt. Die drei untersuchten Sektionen wurden in einem Abstand von 80  $\mu\text{m}$  zueinander gewählt, d.h. jeder 20. Serienschnitt wurde für denselben Antikörper verwendet. Somit lag die erste Sektion etwa im Bereich Bregma -1,9 mm, die zweite Sektion im Bregma -2mm und die dritte bei Bregma -2.1 mm (Tabelle 7). Die Untersuchungen und Foci-Auszählungen erfolgten verblindet am Epifluoreszenzmikroskop Nikon Ni-E und die Bilder wurden mit der integrierten Nikon DS-Qi2-Kamera akquiriert. Die Auswertungen sowie die graphischen Darstellungen der erhobenen Daten erfolgten mithilfe von Excel 2013 (Microsoft), Origin 2015G und Origin2018 (OriginLab Corporation), Photoshop CS3 (Adobe) und Affinity Photo (Serif).

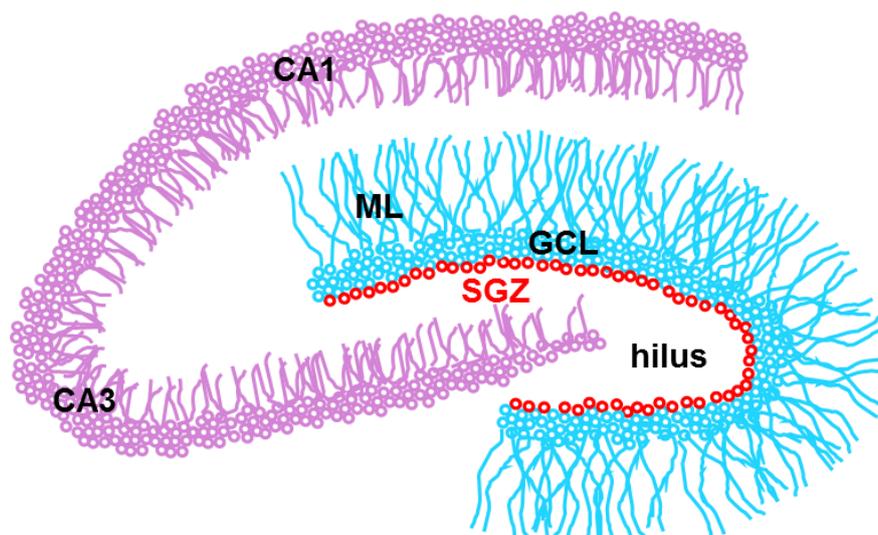
Die Quantifizierung der 53BP1-Foci in hippocampalen Neuronen erfolgte in Sektionen nach Markierung von NeuN und 53BP1 (Doppelmarkierung). Die 53BP1-Foci wurden „per Auge“ am Mikroskop mit einer 1000-fachen Vergrößerung in NeuN-positiven Zellen gezählt. Hierbei wurden pro Messpunkt und biologischem Replikat mindestens 40 Foci erfasst und nach Prüfung der Normalverteilung der Mittelwert sowie der Standardfehler für drei biologische Replikate errechnet.

Zur Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulation wurde zunächst die Fläche der Granularzellschicht des *Gyrus Dentatus* mithilfe des DAPI-Signals ermittelt. Verwendet wurde hierzu das Tool ‚Objektanzahl‘ der NIS-Elements BR-Software (Nikon), mit dem die Zellkerne anhand

ihres DAPI-Signals selektiert wurden und sich daraus anschließend aufgrund der Nähe der Zellen zueinander für die Granularzellschicht eine Fläche bestimmen lässt. Die jeweiligen Zellpopulationen wurden mit 600-facher Vergrößerung innerhalb dieser Granularzellschicht in beiden Hippocampi (rechts und links) gezählt. Zur Erfassung der Vorläuferzellen wurde das Mikrotubuli-assoziierte Protein Doublecortin (DCX) gefärbt, das ausschließlich in neuronalen Vorläuferzellen und Neuroblasten nachweisbar ist.

Für die Gliazellen wurde zusätzlich auch die Hilusregion miterfasst. Bei der numerischen Erfassung der Astrozyten wurden nur die Zellen gezählt, die doppelt positiv für GFAP (ein Protein für Intermediärfilament) und für SOX2 (einem Transkriptionsfaktor) waren. Die Erfassung der Oligodendrozyten erfolgte anhand des Markers OLIG2 (ein Transkriptionsfaktor) und für die Mikroglia mittels *allograft inflammatory factor 1 AIF1* (IBA1).

Stammzellen wurden durch den Marker SOX2 identifiziert, jedoch wurden nur die Zellen gezählt, die sich in der Subgranularzone (SGZ) befanden, d.h. in der Zellschicht, die direkt an den Hilus angrenzt (s. rot markierte Zellen in Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Hippocampus**

Darstellung der Cornu Ammonis (CA) Region (violett) und des Gyrus Dentatus (DG) (blau) des Hippocampus mit Granularzellschicht (GCL), Molekularschicht (ML) und Hilus. Die Subgranularzone (SGZ) ist in rot markiert.

Alle Zellen, die sich mit mehr als dem Durchmesser eines Neurons ( $\sim 10\mu\text{m}$ ) außerhalb der Granularzellschicht bzw. bei den Stammzellen außerhalb der SGZ befanden, wurden nicht miterfasst. Die Anzahl der Zellen wurde abschließend im Verhältnis zur Fläche der Granularzellschicht angegeben und die Werte der drei Sektionen (technische Replikate) sowie der drei Mäuse (biologische Replikate) gemittelt und der jeweilige Standardfehler dazu berechnet.

**Tabelle 7: verwendete Antikörper zur Markierung bestimmter Zelltypen und die jeweils ausgewertete Region**

Zelltyp, -vorgang	Sektion	IFM-Marker / Antigen	Auszuwertende Region
Neurone + Foci	2; 22; 42	NeuN	GCL
Vorläuferzellen	4; 24; 44	DCX	GCL
Stammzellen	6; 26; 46	SOX2	SGZ
Astrozyten	7; 27; 47	GFAP/SOX2	GCL + Hilus
Oligodendrozyten	8; 28; 48	OLIG2	GCL + Hilus
Mikroglia	9; 29; 49	IBA1	GCL + Hilus
Proliferation	3; 23; 43	Ki67	GCL
Apoptose	5; 25; 45	Caspase-3	GCL

### 3.2.4 Golgi-Cox

Die Golgi-Methode stellt eine bewährte Technik dar, um die neuronale Morphologie durch Imprägnierung des gesamten Gehirns zu untersuchen. Hierbei können durch die Visualisierung von nur etwa 1 bis 3% der gesamten Neurone, die dendritischen Verzweigungen sowie die Axone sichtbar gemacht werden, ohne dass sich die Signale zu stark überlagern (Golgi, 1873). Die Golgi-Technik basiert auf Ablagerungen von Schwermetallen im Gewebe durch die Imprägnierung mit Chromat-Dichromat-Lösungen. Im Laufe der Zeit wurden viele verschiedene Protokolle etabliert, wie Golgi-Cox, Rapid Golgi und Golgi-Kopsch, wobei die Golgi-Cox Methode die zuverlässigsten Ergebnisse generiert (Koyama und Tohyama, 2012). Bei der Golgi-Cox Technik wird das ursprünglich verwendete Silbernitrat oder das bei der Rapid Golgi verwendete Osmium durch Quecksilberchlorid ersetzt (Landas und Phillips, 1982). Nachdem bereits 1995 festgestellt wurde, dass die besten Ergebnisse mit frischen Proben erzielt werden (Marin-Padilla, 1995), konnte 2012 gezeigt werden, dass in Proben, die vor der Imprägnierung fixiert wurden, nicht neuronale Zellen, sondern Gliazellen visualisiert werden (Ranjan und Mallick, 2012).

#### 3.2.4.1 Gewebeentnahme

Um die murinen Gehirne mithilfe der Golgi-Cox Methode untersuchen zu können, wurden juvenile Mäuse zunächst wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben bestrahlt. Es wurden hierbei juvenile

Mäuse (P11 zum Bestrahlungsbeginn) mit der höchsten kumulativen Dosis (20x0.1 Gy) bestrahlt und für jeden Zeitpunkt nach der Bestrahlung drei biologische Replikate generiert. Für jeden Zeitpunkt wurden immer drei altersgerechte, unbestrahlte Kontrollen mitgeführt (n=3). Zum jeweiligen Zeitpunkt nach Bestrahlung wurden die Mäuse dann durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 µg/g KG) und Rompun (16 µg/g KG) in 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Dekapitation und der Gehirnektomie wurden die Gehirne entlang der longitudinalen Fissur in rechte und linke Hemisphäre geteilt und durch zwei koronare Inzisionen in drei Teile geschnitten (Abbildung 3.7).

### 3.2.4.2 Imprägnierung der Gewebe

Die Teile der linken Hemisphäre wurden zur Generierung von neuronalen Proben in ein Glasgefäß mit 6 ml Golgi-Cox-Lösung gegeben und in dieser über Nacht bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung durch neue Golgi-Cox-Lösung ersetzt und die Hemisphären in dieser für 9 Tage bei 37°C im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden die Gewebe in ein Glasgefäß mit 6 ml Gewebeschutzlösung überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem am nächsten Tag die Gewebeschutzlösung durch neue ersetzt wurde, verblieben die Gehirne bis zur Einbettung in dieser Lösung bei 4°C. Für die Einbettung wurden die Gewebe zunächst auf einem Tuch etwas getrocknet, bevor sie in eine Silikon-Eiswürfel-form gegeben und mit 4%-iger Agarose blasenfrei übergossen wurden. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, wurden die Eiswürfel-formen luftdicht in Frischhaltefolie verpackt und bis zur Sektionierung bei 4°C aufbewahrt.

Die Teile der rechten Hemisphäre hingegen wurden 2 Tage in eine Fixierlösung mit 8% Glutaraldehyd (GA) und 4% PFA inkubiert, um Gliazellen darstellen zu können. Anschließend wurden die Gewebe, wie bereits bei der linken Hemisphäre beschrieben, imprägniert. Im Gegensatz zu den neuronalen Proben wurden die glialen Proben nicht in Agarose eingebettet und verblieben bis zur Sektionierung in der Gewebeschutzlösung bei 4°C.

### 3.2.4.3 Beschichtung der Objektträger

Vor der Sektionierung wurden zunächst Objektträger mit 2% Gelatine beschichtet. Hierzu wurden 2% Gelatine (*low-melt*) unter Rühren und Erhitzen in destilliertem Wasser gelöst und anschließend durch ein Filterpapier in eine histologische Farbebox überführt. Gesäuberte und getrocknete Objektträger wurden mithilfe eines Gestells in die filtrierte Gelatine-Lösung eingetaucht und für 10 Minuten dort belassen. Anschließend wurden die Objektträger unter dem Abzug getrocknet und in einem Objektträgerkasten bis zur Sektionierung aufbewahrt.

### 3.2.4.4 Sektionierung

Von den neuronalen Proben wurden mithilfe eines Vibratoms (VT1000S, Leica) 100 µm dicke Schnitte angefertigt. Hierzu wurde zunächst überschüssige Agarose im Umfeld des Gehirns mithilfe einer Rasierklinge entfernt, um den zu schneidenden Block so klein wie möglich zu halten. Anschließend wurden die Agaroseblöcke mit Sekundenkleber auf den Probenhalter geklebt. Das Eisbad des Vibratoms wurde mit Eis sowie die Pufferwanne mit Gewebeschutzlösung befüllt, bevor der Probenhalter mit dem daran befestigten Gehirn eingespannt wurde. Anschließend wurde die Probe mit einer Frequenz von 80 Hertz (Hz) und einer Geschwindigkeit von 0,1 mm/s in 100 µm dicke Schnitte sektioniert, die nacheinander auf Gelatine-beschichtete Objektträger mithilfe eines Pinsels übertragen wurden. Um die Schnitte auf dem Objektträger zu fixieren, wurden diese mit einem mit Gewebeschutzlösung getränkten Tuches auf den Objektträger gepresst. Bis zur Markierung wurden die Serienschritte in Objektträgerkästen aufbewahrt.

Die glialen Proben wurden direkt vor der Sektionierung aus der Gewebeschutzlösung entnommen und dann mit Sekundenkleber auf eine leere Gewebekassette geklebt. Diese Gewebekassette wurde anschließend in ein Mikrotom (RM2235, Leica) eingespannt und die Schnittabfallwanne mit 6%iger Saccharose-Lösung gefüllt. Von den Proben wurden 40 µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend mithilfe eines Pinsels aus der Schnittabfallwanne auf einen Gelatine-beschichteten Objektträger übertragen wurden. Nach Beendigung der Sektionierung wurden auch diese Gewebe mit einem mit Gewebeschutzlösung getränktem Tuch auf den Objektträger gepresst. Die Proben sollten noch am selben Tag gefärbt werden.

### 3.2.4.5 Markierung

Die Markierung erfolgte bei den neuronalen und den glialen Proben nach derselben Methode. Zunächst wurden die Proben auf den Objektträgern zweimal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation in 50% Ethanol und eine 8-minütige Inkubation in einer 16%-igen Ammoniaklösung. Nach erneutem zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Proben für 10 Minuten in einer 5%-igen Natriumthiosulfat-Lösung im Dunkeln inkubiert. Darauffolgend wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 95%, abs.) jeweils 6 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben in Xylol überführt und blieben dort für weitere 6 Minuten. Zum Eindecken wurden zwei Objektträger aus dem Xylol entnommen und eine Minute leicht angetrocknet (*semi-dry*). Je nach Schichtdicke wurden einige Tropfen Eukitt auf den Objektträger gegeben und die Proben luftblasenfrei mit einem Deckglas eingeschlossen. Durch die erhöhte Schnittdicke wurden die

Deckgläschen auf dem Objektträger zusätzlich mit Klarlack versiegelt, damit keine Luftblasen unter das Deckglas gelangen können.

### 3.2.5 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine wichtige Barriere zum Gehirn für Pathogene, Antikörper, etc. dar, weshalb ihre Unversehrtheit essentiell wichtig für das Überleben des Organismus ist. Um die strukturelle Integrität zu untersuchen, wurde den Mäusen *EvansBlue* injiziert. *EvansBlue* ist ein Azofarbstoff, der eine hohe Affinität zu Serumalbumin aufweist. Da Serumalbumin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, sollte auch der vom Serumalbumin gebundene Farbstoff bei einer intakten Blut-Hirn-Schranke nicht im Gehirngewebe nachweisbar sein.

#### 3.2.5.1 Gewebeentnahme

Die Überprüfung der strukturellen Integrität der Blut-Hirn-Schranke erfolgte nach dem Protokoll von Manaenko (Manaenko *et al.*, 2011). Hierfür wurden lediglich juvenile Mäuse mit 20x0.1 Gy bestrahlt und je drei biologische Replikate für 72h sowie einen Monat nach der letzten Bestrahlung untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurden immer drei altersgerechte, unbestrahlte Kontrollen mitgeführt (n=3). Hierbei wurde den Mäusen eine 2%-ige *EvansBlue*-Lösung (4 µl/g Körpergewicht) prior zu Organentnahme injiziert. Fünf Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 µg/g KG) und Rompun (16 µg/g KG) in 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung anästhesiert und mit 40ml PBS intrakardial perfundiert. Nach der Dekapitation wurde das Gehirn unverzüglich entfernt, entlang der longitudinalen Fissur geteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

#### 3.2.5.2 *Evansblue*-Konzentrationsmessung

Die Menge an *Evansblue* im murinen Gehirngewebe wurde mithilfe des Multiplattenreaders Multiskan Ascent (ThermoFisher) nachgewiesen. Hierfür wurden die schockgefrorenen Hemisphären zunächst im Reaktionsgefäß gewogen und anschließend in 1,1 ml PBS mithilfe eines Ultrathurax T8 (IKA laboratories) homogenisiert. Danach wurden die Proben 30 Minuten bei 15000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in je zwei Aliquots á 500 µl überführt. Zu jedem Aliquot wurden 500 µl 50% Trichloressigsäure zugefügt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung erneut für 30 Minuten bei 15000g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden von jedem Ansatz je 200 µl in die Vertiefungen einer 96-well Platte gegeben, welche bei 630 nm in einem Plattenreader gemessen wurde.

Vor der Durchführung der *EvansBlue* Messung wurde eine Standardkurve (0.05, 0.125, 0.25, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25, 100  $\mu\text{g/ml}$  *EvansBlue*) erstellt und auf der 96-well Platte mitgemessen. Die gemessenen *EvansBlue*-Konzentrationen wurden abschließend zu  $\mu\text{g}$  *EvansBlue/g* des eingesetzten Gewebes umgerechnet.

Für jeden Versuch wurde pro linke und rechte Hemisphäre eine dreifach-Bestimmung durchgeführt, der Mittelwert gebildet und der Standardfehler berechnet.

### 3.2.6 Proteomanalyse und Westernblot

Um zu untersuchen, ob die fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung Auswirkungen auf die Proteinexpression im Hippocampus hat, wurde zunächst eine umfassende Proteomanalyse am Helmholtz-Zentrum in München in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Soile Tapio von der Doktorandin Frau Daniela Hladik durchgeführt. Um die Resultate zu verifizieren, wurden anschließend Westernblots von Frau Hladik durchgeführt. Es wurden hierbei juvenile Mäuse (P11 bei Bestrahlungsbeginn) untersucht, die mit  $20 \times 0.1$  Gy bestrahlt wurden. Für jeden Zeitpunkt nach Bestrahlung (72h, 1 Monat, 3 Monate, 6 Monate) wurden je 5 biologische Replikate sowie 5 altersgerechte, unbestrahlte Kontrollen untersucht.

#### 3.2.6.1 Gewebeentnahme

Zur Entnahme der Hippocampi für die Proteomanalyse und den Westernblot wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin ( $120\mu\text{g/g}$  KG) und Rompun ( $16\mu\text{g/g}$  KG) in 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung anästhesiert. Unmittelbar nach der zervikalen Dislokation wurde die Mäuse dekapitiert und das Gehirn entfernt. Dieses wurde auf Eis überführt und die Hippocampi unverzüglich, aber mit Sorgfalt aus beiden Hirnhälften präpariert und sofort mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden zunächst bei  $-80^\circ\text{C}$  bei uns gelagert und gesammelt bis alle zu untersuchenden Proben akquiriert worden waren. Der jeweils linke Hippocampus wurde für die Proteomuntersuchung auf Trockeneis an das Helmholtz-Zentrum in München geschickt. Die Messung der Proben wurde in der *Core Facility Proteomics* mithilfe des QExactive Massenspektrometer verbunden mit der UltiMate<sup>TM</sup>3000 nano-RSLC durchgeführt und die erhaltenen Daten wurden mit der ProgenesisQ1 Software weiter analysiert (Grosche *et al.*, 2016). Der rechte Hippocampus hingegen verblieb bei  $-80^\circ\text{C}$ , um Proteinextrakte für Westernblots zu generieren.

### 3.2.6.2 Proteinextrakte

Für die Isolierung der Proteine aus dem Hippocampus wurden 400µl RIPA Lysepuffer mit bereits enthaltenen Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zu jeder Probe (rechter Hippocampus) hinzugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Hippocampi mithilfe eines Ultrathurax T8 (IKA laboratories) zerkleinert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis wurden die Proben durch Ultraschall lysiert und für 15 Minuten bei 13000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mithilfe des Multiplattenreader Multiskan Ascent und dem *Pierce<sup>TM</sup> Rapid Gold BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C.

### 3.2.6.3 Westernblot

Zur Visualisierung von Veränderungen der Proteinexpression im Gewebe werden die Proteine anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) übertragen. Das zu untersuchende Protein wurde mit einem primären Antikörper spezifisch markiert, gegen den ein Peroxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper gerichtet wurde. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid sowie einer Luminol/Enhancer-Lösung katalysiert die Peroxidase die Umsetzung von Luminol, wodurch ein Lichtsignal entsteht, das mithilfe der *ChemiDoc* (Bio-Rad, München) detektiert werden kann.

Damit Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt werden können, ist es erforderlich, durch Zugabe des Tensids Natriumdodecylphosphat (SDS) die verschiedenen Ladungen, die ein Protein aufgrund seiner Aminosäuresequenz besitzt, auszugleichen. Pro Gramm Protein werden etwa 1,4 g SDS eingelagert, was ein ausgeglichenes Masse-Ladungs-Verhältnis zur Folge hat. Durch Kochen der Probe sowie durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken reduziert und die Tertiärstruktur aufgebrochen. Nun können Proteine aufgrund ihrer einheitlichen negativen Ladung in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei das SDS-Gel als eine Art molekulares Sieb dient und somit kleine Proteine schneller passieren lässt als Proteine mit einem hohen Molekulargewicht.

## SDS-PAGE

Für die Größentrennung der Proteine wurde ein SDS-Gel gegossen mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

### 12% Trenngel

<b>KOMPONENTE</b>	<b>MENGE</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>DEST</sub></b>	1,672 ml
<b>TRENNGELPUFFER</b>	1,3 ml
<b>ROTIPORESE GEL 30</b>	2 ml
<b>10% APS</b>	25 µl
<b>TEMED</b>	3 µl

### 4,5% Sammelgel

<b>KOMPONENTE</b>	<b>MENGE</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>DEST</sub></b>	1,447 ml
<b>SAMMELGELPUFFER</b>	0,650 ml
<b>ROTIPORESE GEL 30</b>	0,375 ml
<b>10% APS</b>	25 µl
<b>TEMED</b>	3 µl

In den Hohlraum zwischen den beiden Glasplatten der Gelgieß-Apparatur wurde das Trenngel gefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um das Austrocknen an der Luft zu verhindern. Nachdem das Gel auspolymerisiert war wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel zugegossen. Durch Einbringen eines Taschenkamms wurden im Sammelgel Vertiefungen für die Proben geschaffen. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Glasplatten in eine Plastikapparatur eingespannt und diese mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Taschen wurden mit 5 µl eines vorgefärbten Proteinmarkers sowie je 15-20 µg des zu untersuchenden Proteinextraktes beladen. Zunächst wurde das Gel an eine Stromstärke von 10mA angeschlossen, bis die Lauf-front das Sammelgel passiert und das Trenngel erreicht wurde. Anschließend wurde die Stromstärke auf 25mA erhöht

### Transfer auf PVDF-Membran

In Vorbereitung des Transfers der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Gelhalterkassette folgender Aufbau:

Kathode
Schwamm
Whatman-Papier
SDS-Gel
PVDF-Membran
Whatman-Paper
Schwamm
Anode

Diese zusammengebaute Gelhalterkassette wurde in eine Blotting-Apparatur geschoben, die mit Transferpuffer befüllt wurde. Die elektrische Übertragung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 30mA über Nacht auf die PVDF-Membran. Zur Visualisierung des erfolgreichen Blottens wurde die Membran am nächsten Tag mit Ponceau S angefärbt.

### Antikörpermarkierung

Zunächst wurde die Membran mit PBS vom Ponceau S entfärbt. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran mit 5% *bovine serum albumine* (BSA) in TBS-T für eine Stunde inkubiert. Der primäre Antikörper wurde danach wie in Tabelle 5 beschrieben in 5% BSA/TBS-T verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Für jeden primären Antikörper wurden immer drei biologische Replikate untersucht und mindestens vier technische Replikate generiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit TBS der sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper in 5% BSA/TBS-T verdünnt (Tabelle 6) und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBS gewaschen. Durch Zugabe der beiden Lösungen aus dem *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad, München) wurden die Protein-Banden auf der Membran sichtbar und mithilfe der *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad, München) detektiert.

Die detektierten Banden wurden mithilfe eines *housekeeping* Gens, in diesem Fall Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), normalisiert.

### 3.2.7 Magnetresonanztomographie (MRT)

Für die Untersuchung im Kleintier-MRT wurden juvenile Mäuse, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, bestrahlt. Im Gegensatz zu den Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die Tiere lediglich nach der Applikation der höchsten kumulativen Dosis von  $20 \times 0.1$  Gy untersucht. Es wurden zu jedem Zeitpunkt (72 Stunden, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate) dieselben drei unbestrahlten und bestrahlten Mäuse untersucht ( $n=3$ ).

Die MRT-Untersuchungen wurden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran und Sauerstoff durchgeführt. Die Einleitung der Narkose erfolgte innerhalb einer Induktionskammer mit 3% Isofluran und 97% Sauerstoff. Während der Bildgebung wurde die Narkose mithilfe einer Atemmaske durch die Gabe von 0.8-1,5% Isofluran bei einer Flussrate von  $1.5 \text{ l min}^{-1}$  aufrechterhalten. Die Körpertemperatur der Mäuse wurde mittels eines Rektalthermometers überwacht und durch ein wasserführendes Heizkissen mit verbundenem Thermostat-gesteuerten Wasserbad konstant bei ca.  $37-38^\circ\text{C}$  gehalten. Die Atemfrequenz wurde mittels eines dedizierten Tiermonitoringsystems (PC SAM 32, SA Instruments Inc.) überwacht und durch die Menge an verabreichtem Isofluran konstant bei  $30-50 \text{ min}^{-1}$  gehalten, um die Beeinflussung der Messung durch schwankende physiologische Parameter zu minimieren.

Alle Mäuse wurden in einem für die Bildgebung bei Kleintieren entwickelten MRT-Gerät mit einer Feldstärke von 9.4T und horizontaler Bohrung (Biospec Avance III 94/20, Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland) mit proprietärer Betriebssoftware (Paravision 6.0.1, Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland) untersucht. Das verwendete Gradientensystem BGA12S besaß eine maximale Feldstärke von 675 mT/m, eine lineare, induktive Anstiegszeit von  $130 \mu\text{s}$  und eine maximale Änderungsgeschwindigkeit von  $4673 \text{ mT/m/s}$ . Als Sendespule diente ein aktiv entkoppelter linearer Resonator mit einem Innendurchmesser von 72 mm. Als Empfangsspule wurde eine speziell für die Messung des Mausgehirns entwickelte sattelförmige, aus vier unabhängigen Elementen bestehende Phase-Array-Oberflächenspule benutzt.

Die Versuchstiere wurden im Isocenter des Magneten positioniert. Anschließend wurde mithilfe einer *fast low angle shot* (FLASH)-Sequenz die Einbringung in den Magneten überprüft und gegebenenfalls angepasst. Für eine bestmögliche Bild- und Messqualität wurde eine lineare, iterative shim-Routine in erster und zweiter Ordnung auf das gesamte Messgebiet angewendet, gefolgt von erneuter Abstimmung der Resonanzfrequenz und der Stärke der Sendeleistung. Zur Darstellung der Anatomie und zur Identifizierung des Hippocampus wurden zunächst T2-gewichtete Untersuchungen des gesamten Gehirns durchgeführt (MRT-Sequenz *turbo rapid acquisition relaxation-enhanced* (tRARE)). Für die T2-gewichtete Bildgebung wurden die Parameter so gewählt, dass T1 möglichst wenig Einfluss auf die Signalintensität nimmt. Dies bedeutet es wurde eine möglichst lange Repetitionszeit ( $\text{TR}=2000\text{ms}$ ) gewählt,

damit das Signal vor der nächsten Anregung vollständig relaxiert ist. Außerdem wurde eine relativ lange Echozeit eingestellt ( $TE=30ms$ ), damit die Dephasierung und die T2-Zeit einen starken Einfluss auf die Signalintensität nehmen. Zusätzlich wurde ein flipback Puls eingesetzt, um die Reorientierung der Spins in Richtung des externen Magnetfeldes zu beschleunigen. Anhand dieser Bildgebung wurden dann einzelne Schichten mit proximalen Anteilen des Hippocampus identifiziert, die sich relativ zum Bregma  $-1.9mm$  befanden. Diese Schichten wurden für die folgenden Perfusions- und Diffusionsmessungen sowie für die Bestimmung der T1- und T2-Relaxationszeiten ausgewählt.

Die Messung des zerebralen Blutflusses erfolgte mithilfe einer perfusionsgewichteten MRT-Sequenz (*perfusion weighted imaging*; PWI), die auf einer *echo planar imaging* (EPI)- Technik basiert. Kombiniert wurde diese Technik mit einem *flow sensitive alternating inversion recovery* (FAIR) Modul. Erzeugt wird so ein *Arterial Spin Labeling* (ASL), mit dem das in die selektierte Schicht fließende Blutvolumen gemessen werden kann. Dies wird durch die Anwendung von  $180^\circ$  Radiofrequenz-Inversionspulsen ermöglicht, welche die Nettomagnetisierung des Bluts umkehren und das im Blut enthaltene Wasser mit einem „paramagnetischen Tracer“ versehen (siehe Kapitel 2.7.). Die FAIR-EPI-MRI wurde mit konstanter Relaxationszeit (*recovery time*), Fettunterdrückung und 12 unterschiedlichen Inversionszeiten (30, 100, 300, 600, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, 1300, 1600 und 2400ms) durchgeführt. Durch die so mögliche Bestimmung der Relaxationszeit T1 mit und ohne einströmendem Blutsignal wird die Genauigkeit gegenüber Verfahren auf Basis der Bestimmung der Nettomagnetisierung deutlich erhöht. Mithilfe der *t1invacq function* der ParaVision 6.0.1 Software wurden für die selektive und nicht selektive Inversion Voxel für Voxel T1-Werte berechnet. Aus den korrespondierenden T1-Karten wurde dann eine Karte der Perfusion erstellt.

Für die Messung der gerichteten Wasserbewegung im Gehirn wurde ein diffusionsgewichtetes MRT (*diffusion weighted imaging*; DWI) nach Stejskal und Tanner durchgeführt (Stejskal und Tanner, 1965). Es wurde zunächst ein T2-gewichtetes  $B_0$ -Bild (ohne Diffusionsgradienten) erstellt, das die Ausgangslage für spätere Berechnungen bildet. Durch die anschließend applizierten Gradientenfelder ( $90^\circ$ ,  $180^\circ$ ) kam es zunächst zur Dephasierung und anschließend zur Rephasierung. Durch Diffusion kommt es zu einem Ortswechsel des Spins vor der Rephasierung und ein Signalabfall kann gemessen werden. Die Abschwächung des Signals ist proportional zur Diffusionsbewegung von Wasser und zur verwendeten Gradientenstärke. Um das multidirektionale Diffusionsvermögen auf einen einzigen Wert zu komprimieren, kommt eine *Trace of the diffusion tensor* Modellierung zum Einsatz, die den Diffusionswert auf einen Wert pro Voxel reduziert. Werden diese Werte Voxel für Voxel von den  $B_0$ -Bildern subtrahiert, ergibt sich eine Karte des apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC). Dieser Wert beschreibt

ein hinreichend gutes Maß für pathophysiologisch bedingte Veränderungen der Beweglichkeit von Wasser in Geweben dar.

**Tabelle 8: Einstellungen für die unterschiedlichen MRT-Untersuchungen**

MR-Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	Kippwinkel	Schichtdicke (mm)	Bildgröße	Schichtanzahl	Dauer
T1-Flash Localizer	15	3	10°	1	192x192	3x5	
T2-Turbo-RARE	2000	30	90°/180°	0,8	240x240	11	
FAIR-EPI Perfusion	10000	16,5	90°/180°	0,8	100x64	1	17m 33s
Trace-EPI Diffusion	2500	17	90°/180°	0,8	180x250	5x5	13m

### Bildanalyse

Die Bilder der T2-gewichteten Messungen, sowie die rekonstruierten T1-, T2-, ADC- und Perfusionskarten aus der parametrischen Bildgebung wurden als DICOM-Dateien exportiert und auf ein MacBook Pro übertragen. Die Auswertung erfolgte mit der Software OsirixLite. Innerhalb der T2-gewichteten TurboRARE-Aufnahmen wurde die Hippocampusregion definiert und als polygonale, geschlossene *regions of interest* (ROI) markiert. Die ROI wurden anschließend auf die verschiedenen Karten übertragen. Die transferierten ROI werden für die eingeschlossenen Voxel Mittelwerte für T1, T2, ADC und Perfusion berechnet. Die Werte wurden mithilfe eines Plugins exportiert und statistisch ausgewertet.

### **3.2.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software IBM SPSS Statistics 25. Hierbei wurden die Werte der verschiedenen Gruppen zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ( $p > 0.05$ ) untersucht. Um die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der bestrahlten und der zugehörigen unbestrahlten, altersgerechten Gruppe zu ermitteln, wurde bei normalverteilten Werten ein Zwei-Stichproben-t-Test für unabhängige Stichproben und bei Nicht-Normalverteilung ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für normalverteilte Werte wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler von drei biologischen und drei technischen Replikaten berechnet. Für nicht normalverteilten Werte galt es im Gegensatz dazu, den Median darzustellen. Dies galt hier für die Auswertung der BrdU-Markierungen sowie für die Relaxationszeiten und die ADC-Werte. Die altersabhängige Verteilung wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) untersucht und, um die Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen zu bestimmen, anschließend ein Games-Howell-post-hoc-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz für alle Auswertungen wird mit  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$  und  $***p < 0.001$  angegeben.

## 4 Ergebnisse

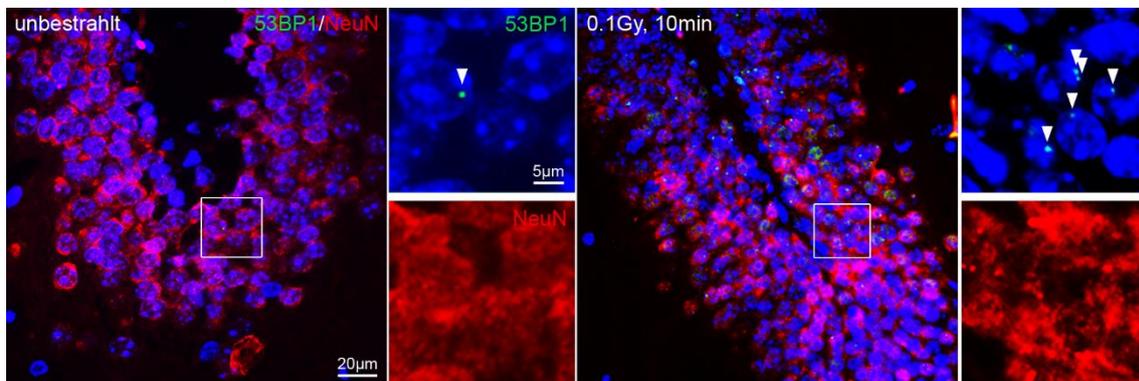
### 4.1 DNA-Schäden nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung

#### 4.1.1 DNA-Schadensanalyse direkt nach Bestrahlung mit 0.1 Gy

Zur Wahrung der genomischen Integrität ist es für Zellen essentiell wichtig, entstandene Schäden in der DNA schnellstmöglich und fehlerfrei zu reparieren. Die Effizienz der Reparatur ist abhängig von der Art der Schädigung sowie der Aktivität verschiedener an der Reparatur beteiligter Proteine. Eine etablierte Untersuchungsmethode zur Erkennung von DNA-Schäden stellt die Quantifizierung von Reparaturfoci, sogenannten RIFs, wie  $\gamma$ H2Ax und 53BP1 (Rube *et al.*, 2008) dar. 53BP1 wurde bereits als zuverlässiger Marker für DNA-Schäden und Chromatinveränderungen in kortikalen Neuronen etabliert, weshalb dieser auch im Hippocampus verwendet wurde (Lorat *et al.*, 2016).

Für die Darstellung von 53BP1-Foci in hippocampalen Neuronen wurden Paraffinschnitte von muriner Gehirne verwendet, die 10 Minuten nach einmaliger Bestrahlung mit 0.1 Gy akquiriert worden sind. In diesen Schnitten wurde zusätzlich der neuronale Marker NeuN zur Identifizierung der Neurone dargestellt.

Kurz nach der Bestrahlung mit 0.1 Gy zeigte sich eine deutliche Induktion von 53BP1-Foci in den hippocampalen Neuronen (Abbildung 4.1).

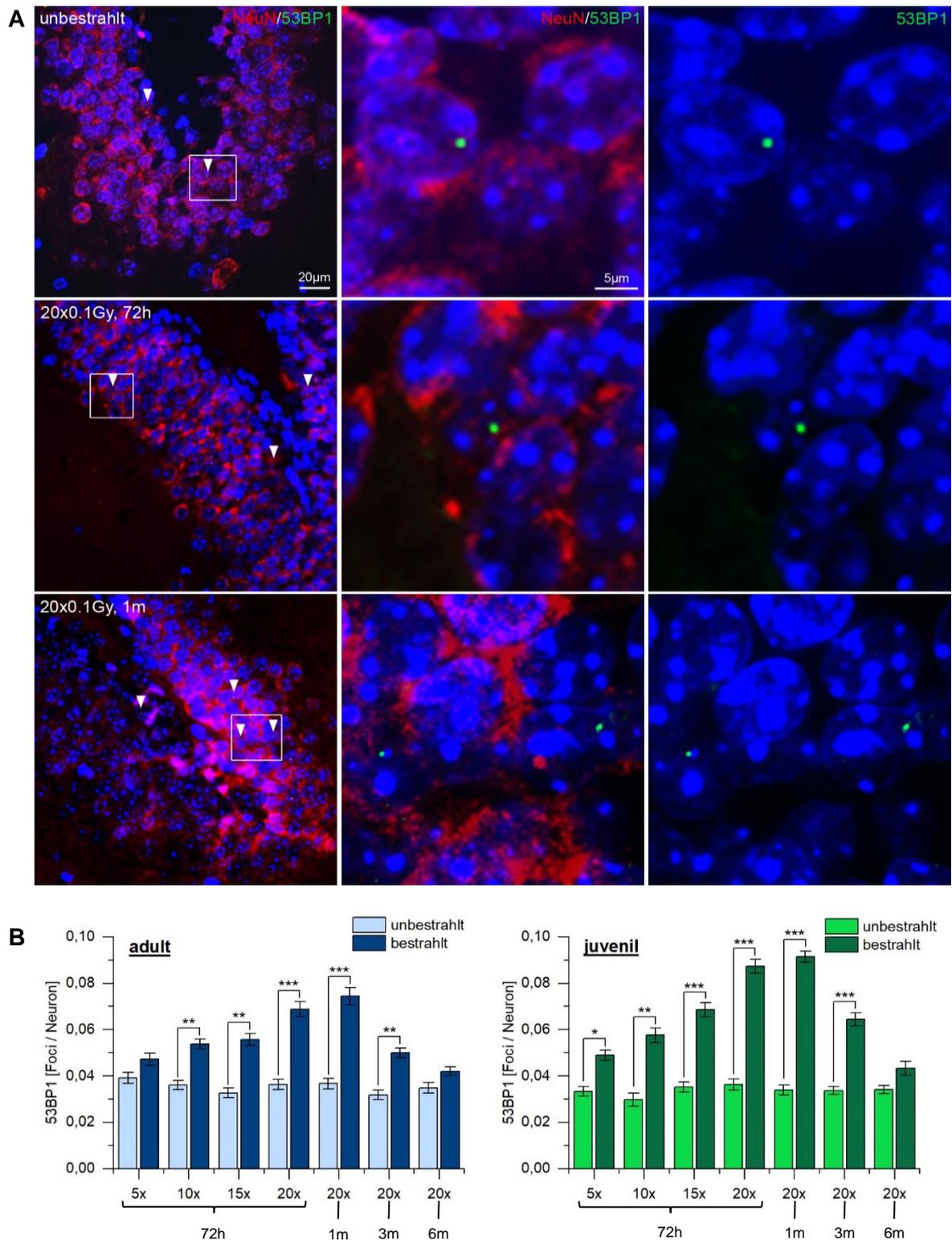


**Abbildung 4.1: Induktion von 53BP1-Foci in hippocampalen Neuronen**

Übersichtsaufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierung mit 53BP1-Foci (grün) in hippocampalen Neuronen, markiert durch NeuN (rot), in einem unbestrahltem *Gyrus Dentatus* (links) im Vergleich zu einem *Gyrus Dentatus* (rechts), der mit 0.1 Gy bestrahlt und 10 Minuten nach Bestrahlung fixiert wurde (Vergrößerung: 200x). Jeweils randständig wird eine Detailaufnahme des markierten Bildausschnitts mit Aufspaltung des grünen und roten Fluoreszenzkanals dargestellt, um Foci optisch deutlicher hervorzuheben (Vergrößerung: 1000x). 53BP1-Foci sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

#### 4.1.2 Persistierende DNA-Schäden nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung

Der Fragestellung folgend, ob 53BP1-Foci noch 72 Stunden und bis zu sechs Monaten nach der letzten Fraktion nachweisbar sind, wurden NeuN und 53BP1 immunologisch markiert und die Anzahl der 53BP-Foci erfasst. Um zu eruieren, ob das Alter für die Persistenz der 53BP1-Foci eine Rolle spielt, wurden juvenile und adulte Mäuse (P11 oder P56 bei Bestrahlungsbeginn) untersucht. Die unbestrahlten Mäuse zeigten unabhängig von ihrem Alter ein gleichbleibendes sehr niedriges Level an Foci pro Neuron ( $0.035 \pm 0.001$  Foci/Neuron), wobei nur etwa 3% der Neurone überhaupt einen Focus aufwiesen (Abbildung 4.2). Bereits 72 Stunden nach Bestrahlung mit  $5 \times 0.1$  Gy zeigten sowohl die adulten als auch die juvenilen Mäuse ein gesteigertes Foci-Level, wobei der Anstieg der 53BP1-Foci nur in den juvenil-bestrahlten Tieren signifikant unterschiedlich zur altersabhängigen, unbestrahlten Kontrolle war ( $0.048 \pm 0.003$  Foci/Neuron;  $t(4) = -3.48$ ,  $p = 0.025$ ). Mit steigender Anzahl der Fraktionen und somit steigender kumulativer Dosis nahm auch die Anzahl der Foci pro Neuron zu. In den adult-bestrahlten Mäusen bedeutete dies ein Foci-Anstieg 72 Stunden nach der Bestrahlung um fast das Doppelte ( $0.069 \pm 0.003$  Foci/Neuron;  $t(4) = -8.49$ ,  $p < 0.001$ ), während der Anstieg in den juvenil-bestrahlten Mäusen 35% betrug ( $0.087 \pm 0.003$  Foci/Neuron;  $t(4) = -11.85$ ,  $p < 0.001$ ). Der höchste Foci-Wert war in den adult- und in den juvenil-bestrahlten Tieren einen Monat nach Bestrahlungsende (adult:  $0.075 \pm 0.004$  Foci/Neuron,  $t(4) = -8.81$ ,  $p < 0.001$ ; juvenil:  $0.092 \pm 0.004$  Foci/Neuron;  $t(4) = -13.7$ ,  $p < 0.001$ ) zu verzeichnen. Die Foci-Werte stiegen bei den adult-bestrahlten Mäusen einen Monat nach Bestrahlung um  $0.038$  Foci/Neuron an (95%-CI[-0.043,-0,028]), während die juvenil-bestrahlten Mäuse einen Monat nach Bestrahlung  $0.058$  Foci/Neuron mehr verzeichneten (95%-CI[-0.069,-0,046]), bevor die Werte danach in beiden Altersgruppen wieder abnahmen. Die Anzahl an Foci war sowohl in den juvenil-bestrahlten ( $0.043 \pm 0.003$  Foci/Neuron;  $t(4) = -2.65$ ,  $p = 0.057$ ) als auch den adult-bestrahlten Mäusen ( $0.043 \pm 0.002$  Foci/Neuron;  $t(4) = -2.46$ ,  $p = 0.07$ ) noch leicht aber nicht mehr signifikant erhöht.



**Abbildung 4.2: Persistierende 53BP1-Foci nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung**

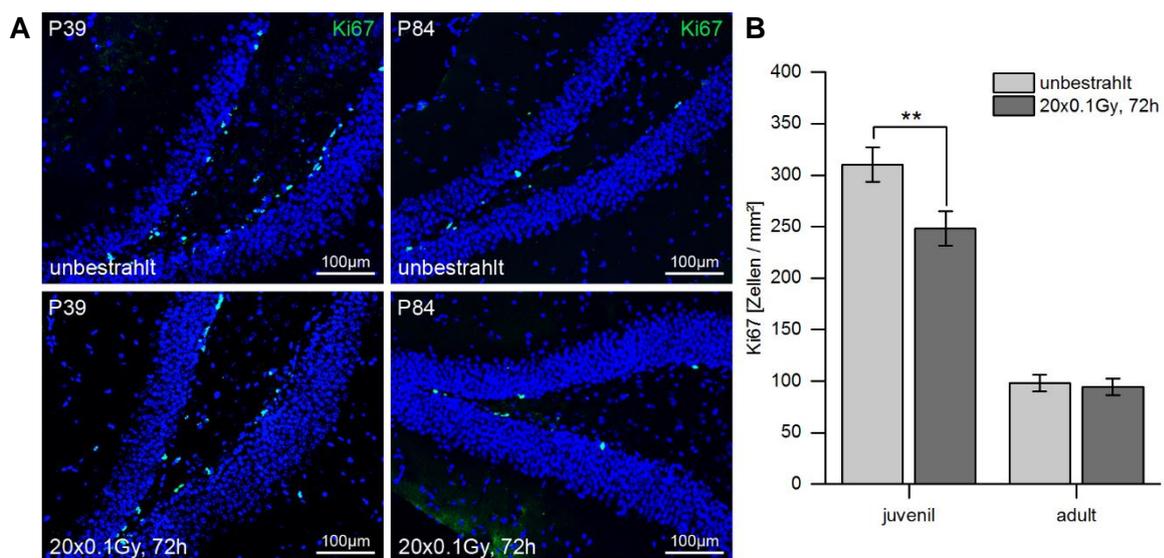
(A) Linke Spalte: Übersichtsaufnahmen der *Gyrus Dentatus* nach immunologischer Markierung von 53BP1 (grün) und NeuN (rot) in unbestrahlten und bestrahlten (72h und einen Monat nach 20x0.1 Gy) C57BL6-Mäusen. 53BP1-Foci sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Mittlere Spalte: Detailaufnahme zur Darstellung des markierten Bildausschnitts in höherer Vergrößerung. Rechte Spalte: Darstellung des grünen Fluoreszenzkanals zur deutlicheren Visualisierung der 53BP1-Foci (Vergrößerung 1000x).

(B) Quantifizierung der 53BP1-Foci in hippocampalen Neuronen zu verschiedenen Zeitpunkten nach repetitiver Bestrahlung mit 0.1 Gy im Vergleich zur altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte der 53BP1-Foci pro Neuron und der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

## 4.2 Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf Proliferation und Apoptose

### 4.2.1 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu verminderter Proliferationsrate im Hippocampus juveniler Mäuse

Proliferierende Zellen sind in Abhängigkeit ihrer Zellzyklusphase besonders sensibel gegenüber den Auswirkungen ionisierender Strahlung (Peissner *et al.*, 1999). Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G2/M-Phase befinden, bleiben bis zum Eintritt der Mitose nicht genügend Zeit, um DSBs zu reparieren, weshalb sie in Apoptose gehen. Ruhende Zellen (G0/G1) hingegen gehen aufgrund der Reparatur der DSBs in Zellzyklusarrest bevor die Mitose eintritt. Ionisierende Strahlung führt somit durch Apoptose und Zellzyklusarretierung zu einer Herabsetzung der Proliferationsrate. Die Auswirkungen niedriger Strahlendosen auf die Proliferationsrate wurden mithilfe des Proliferationsmarker Ki67 in Paraffinschnitten untersucht. Ki67 wird in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert, während seine Expression während der G0-Phase vollständig ausbleibt (Gerdes *et al.*, 1984).

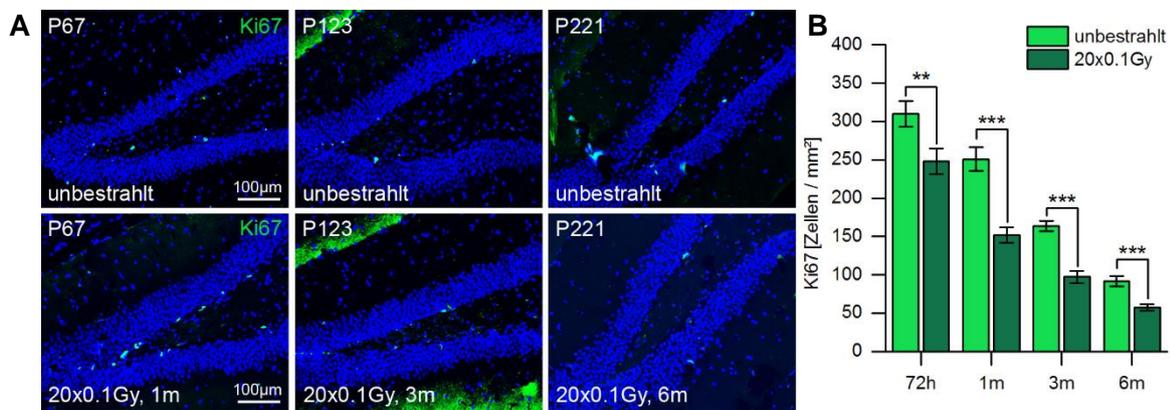


**Abbildung 4.3: Proliferation 72 Stunden nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy**

(A) Repräsentative Übersichtsaufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung mit Ki67 (grün) von unbestrahlten *Gyri Dentatus* im Alter von 39 Tagen (P39) und 12 Wochen (P84), sowie die entsprechenden bestrahlten Proben 72h nach 20x0.1 Gy in der Reihe darunter. (B) Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyri Dentatus* 72h nach 20x0.1 Gy, sowohl in den juvenilen (P39) als auch den adulten (P84) Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ki67-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit  $**p < 0.01$  angegeben.

Die Auswertung der Ki67-positiven Zellen im Hippocampus zeigte zunächst eine deutliche Abnahme der Zellzahl mit steigendem Alter (Abbildung 4.3). Bei den beiden unbestrahlten Kontrollen, die sich in der 5. und 12. Lebenswoche befanden, reduzierte sich die Zellzahl um mehr als 200 Zellen/mm<sup>2</sup>, was einer Abnahme um 70% entspricht (95%-CI[174.5, 249.3]),  $t(50) = 11.38, p < 0.001$ ).

Durch die fraktionierte Bestrahlung mit 0.1 Gy reduzierte sich die Ki67-Zellzahl im juvenilen Hippocampus noch weiter. 72 Stunden nach Applikation von 20x0.1 Gy war eine deutliche Abnahme der proliferierenden Zellen um 20% in den juvenil-bestrahlten Mäusen zu beobachten (unbestrahlt:  $310 \pm 16.7$ ; bestrahlt:  $248.2 \pm 16.5$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(49) = 2.63, p = 0.0113$ ). Die adult-bestrahlten Mäuse hingegen zeigten 72 Stunden nach der letzten Bestrahlungseinheit keine Veränderung in der sich teilenden Zellfraktion (unbestrahlt:  $98.1 \pm 8.2$ ; bestrahlt:  $94.4 \pm 7.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(49) = 0.32, p = 0.75$ ) (Abbildung 4.3).



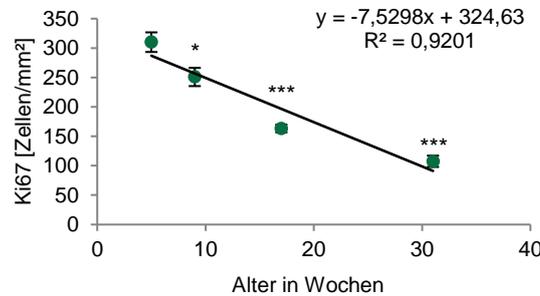
**Abbildung 4.4: Proliferation zu verschiedenen späten Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy**

(A) Repräsentative Übersichtsaufnahmen einer Immunfluoreszenzmarkierung von Ki67 (grün) in unbestrahlten *Gyri Dentatus* aus Mäusen im Alter von 9, 17 und 31 Wochen sowie den altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Proben 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach 20x0.1 Gy in der Reihe darunter. (B) Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyri Dentatus* 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ki67-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  angegeben.

In Abbildung 4.4 stellt sich die weitere Abnahme der Proliferationsrate in juvenil-bestrahlten Mäusen bis zu 6 Monate nach der letzten Bestrahlungseinheit (unbestrahlt:  $91.7 \pm 6.3$ ; bestrahlt:  $57.3 \pm 4.4$ ;  $t(32) = 4.45, p < 0.001$ ) dar. Die geringste Proliferation wurde einen Monat nach Bestrahlungsende nachgewiesen mit nur 60% Ki67-positiven Zellen gegenüber der entsprechenden altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (unbestrahlt:  $250.82 \pm 15.47$ ; bestrahlt:  $151.8 \pm 9.8$  Zellen /mm<sup>2</sup>;  $t(38) = 5.52, p < 0,001$ ).

Auch hier zeigte sich erneut eine altersabhängige Abnahme von Ki67-positiven Zellen im Alter von 5 bis 32 Wochen, die einen linearen Verlauf mit einer Steigung von -69.51 und einem Bestimmtheitsmaß von 0.9925 nahm (Abbildung 4.5). Der Games-Howell post-hoc-Test zeigte

signifikante Unterschiede ( $p < 0.001$ ) der Ki67-positiven Zellzahl zwischen den 5 und 17 Wochen alten Mäusen (Mdn = 146.7, 95%-CI[98.06, 195.09]), den 17 und 32 alten Mäusen (Mdn = 71.6, 95%-CI[46.73, 96.42]) sowie den 9 und 17 Wochen alten (Mdn = 87.5, 95%CI-[41.15, 133.90]) und den 9 und 32 Wochen alten Mäusen (Mdn = 159.1, 95%-CI[112.97, 205.23]).

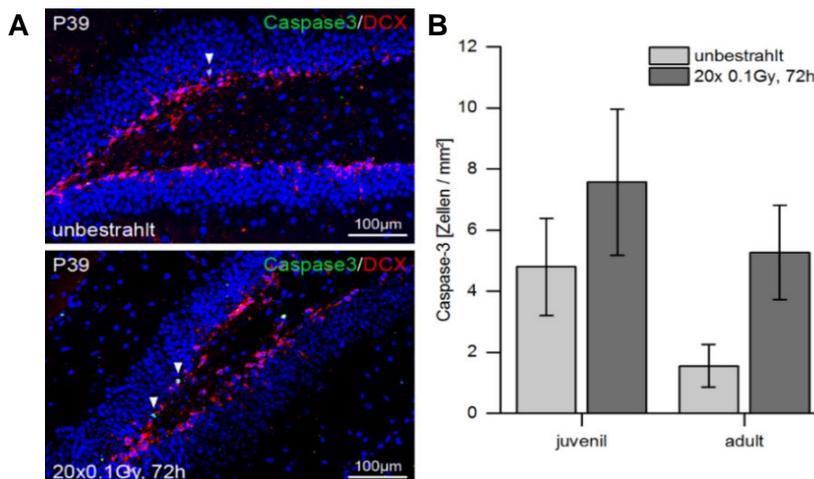


**Abbildung 4.5 Altersabhängige Abnahme der Ki67-positiven Zellen**

Darstellung der altersabhängigen linearen Abnahme der Mittelwerte Ki67-positiven Zellen innerhalb des Hippocampus von 5, 9, 17 sowie 32 Wochen alten Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ki67-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den aufeinander folgenden Altersgruppen wurde mithilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) und dem Games-Howell-Post-Hoc-Test beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

#### 4.2.2 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung hat keinen langfristigen Einfluss auf den programmierten Zelltod

Die Applikation von ionisierender Strahlung kann auch in neuronalen Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen (Enokido *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998). Ob dieser Anstieg an apoptotischen Zellen auch 72 Stunden nach der letzten Bestrahlung noch zu verzeichnen ist, sollte mithilfe des Apoptose-Markers Caspase-3 untersucht werden (s. Kapitel 2.1; S. 6).



**Abbildung 4.6: Apoptose 72 Stunden nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy**

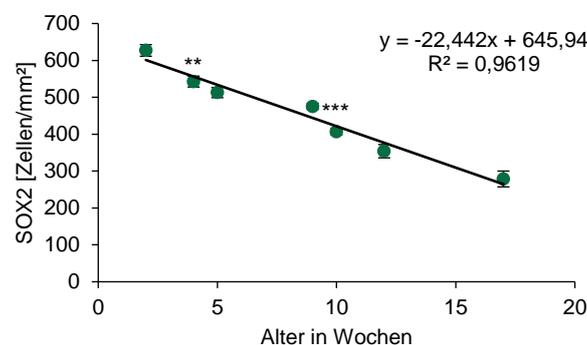
(A) Repräsentative Übersichtsaufnahmen einer Immunfluoreszenzmarkierung von Caspase3 (grün) und DCX (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* einer Maus im Alter von 39 Tagen sowie die altersentsprechende, bestrahlte Probe 72h nach 20x0.1 Gy. Weiße Pfeile markieren die Caspase-3-positiven Zellen innerhalb des *Gyrus Dentatus*. (B) Quantifizierung der Caspase-3-positiven Zellen im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus* 72h nach 20x0.1 Gy in juvenilen (P39) und adulten (P84) Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Caspase3-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate ( $n=3$ ).

Es konnten weder in den adult- noch in den juvenil-bestrahlten Mäusen signifikante Unterschiede in der apoptotischen Zellzahl 72 Stunden nach Bestrahlung mit einer Dosis von  $20 \times 0.1$  Gy im Vergleich zur jeweiligen altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (Abbildung 4.6) nachgewiesen werden. Allerdings war zu beobachten, dass alle Zellen die positiv für Caspase-3 waren, auch den Marker DCX trugen.

### 4.3 Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Neurogenese

#### 4.3.1 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu einer langfristigen Abnahme der Stammzellpopulation

Als eine der zwei wenigen neurogenen Stammzellnischen im Gehirn ist der *Gyrus Dentatus* eine Region, in der sich noch im erwachsenen Alter neue Neurone ausbilden können. Adulte Stammzellen sind multipotent und können sich im Gegensatz zu embryonalen, omnipotenten Stammzellen nicht in jeglichen Zelltyp ausdifferenzieren, sondern lediglich gewebstypische Zellen der jeweiligen Stammzellnische, in der sie sich befinden, neu ausbilden. Adulte Stammzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebemöostase und sind an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität des Organismus beteiligt. Aufgrund ihrer Langlebigkeit sind sie jedoch ebenfalls sensibel gegenüber Auswirkungen ionisierender Strahlung. Dies kann letztendlich zu einer Veränderung der Zellzahl führen, was wiederum fatale Auswirkungen auf den Organismus haben kann (Kimler *et al.*, 1985). Die Auswirkungen einer fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die neurale Stammzellnische (SGZ) des Hippocampus wurde mithilfe des immunologischen Marker SOX2 in Paraffinschnitten untersucht und die SOX2-positiven Zellen innerhalb der SGZ quantifiziert.

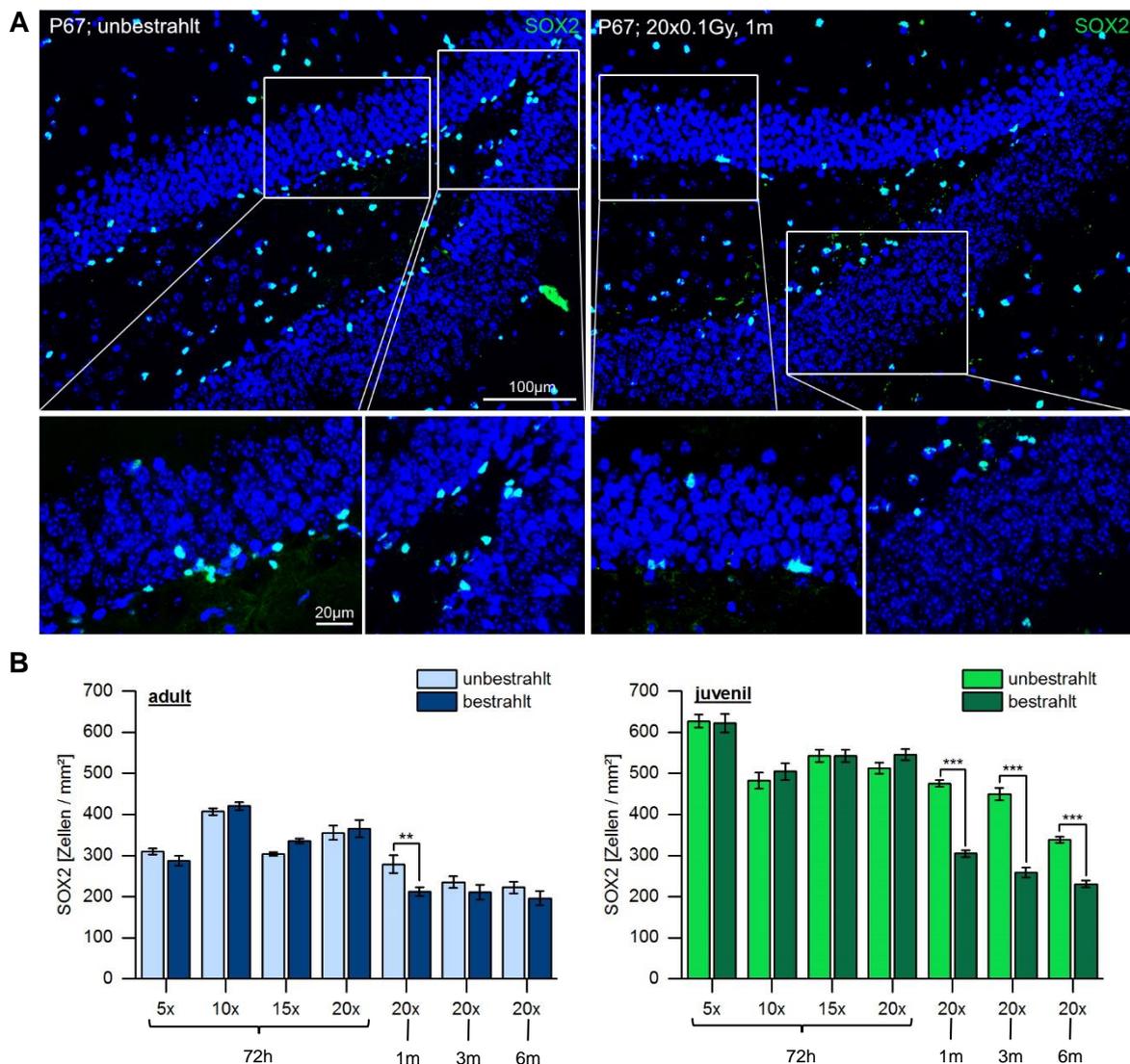


**Abbildung 4.7: Altersabhängige Abnahme der SOX2-Stammzellen**

Darstellung der altersabhängigen, linearen Abnahme der SOX2-positiven Zellen innerhalb der SGZ des Hippocampus von 2, 4, 5, 9, 10, 12 sowie 17 Wochen alten Mäusen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei biologischen und drei technischen Replikaten dar ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den aufeinander folgenden Altersgruppen wurde mithilfe einer Varianzanalyse (Welch-ANOVA) und dem Games-Howel-Post-Hoc-Test beurteilt und mit  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  angegeben.

## Ergebnisse

Die Quantifizierung der Stammzellpopulation zeigte laut ANOVA zunächst eine starke Abnahme mit zunehmendem Alter (Abbildung 4.7). Im Alter von zwei ( $627.1 \pm 15.7$  Zellen/mm<sup>2</sup>) bis 16 Wochen ( $278.7 \pm 21.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>) nahm die Abnahme einen linearen Verlauf mit einer Steigung von -22.442 und einem Bestimmtheitsmaß von 0.9619 (Abbildung 4.8). In einem Alter von 38 Wochen waren 404 SOX2-Stammzellen weniger als im Alter von zwei Wochen nachweisbar (95%-CI[360.99, 448.65],  $t(27) = 18.95$ ,  $p < 0.001$ ). Der im Folgenden durchgeführte Games-Howell-post-hoc-Test konnte eine signifikante Abnahme jedoch nur zwischen zwei und vier Wochen (95%-CI[16.16, 152.63],  $p = 0.008$ ) sowie zwischen 9 und 10 Wochen (95%-CI[32.5, 104.51],  $p < 0.001$ ) alten Mäusen feststellen.

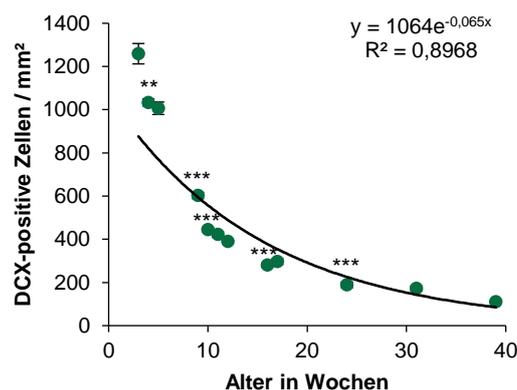


**Abbildung 4.8: SOX2-positive Stammzellen in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen**  
 (A) Repräsentative Übersichtsaufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierung von SOX2 (grün) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* im Alter von etwa 9 Wochen sowie eine altersentsprechende, juvenil-bestrahlte Probe 1 Monat nach 20x0.1 Gy. Die untere Reihe zeigt die Vergrößerung der markierten Bildausschnitte in 600-facher Auflösung. (B) Quantifizierung der SOX2-positiven Zellen in der Subgranularzone des *Gyrus Dentatus* im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus*. Links sind die adult-bestrahlten C57BL6-Mäuse und rechts die juvenil-bestrahlten C57BL6-Mäuse abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte der SOX2-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Abbildung 4.8 zeigt, dass die Bestrahlung nach 72 Stunden keinen Einfluss auf die Anzahl der SOX2-Stammzellen hatte, und dies unabhängig von der kumulativen Dosis und dem Alter der Mäuse zu Beginn der Bestrahlung. Weitere vier Wochen nach der letzten applizierten Dosisfraktion kam es allerdings sowohl in den adult- als auch den juvenil-bestrahlten Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der Stammzellen. In den adult-bestrahlten Mäusen reduzierte sich die Stammzellpopulation um etwa 25% ( $212.2 \pm 9.8$  Zellen/mm<sup>2</sup>) gegenüber der altersgerechten, unbestrahlten Kontrollgruppe ( $278.3 \pm 21.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>),  $t(26) = 3.06$ ,  $p = 0.005$ . Die juvenil-bestrahlten Mäuse zeigten einen Monat nach Bestrahlung sogar eine Verminderung der Stammzellzahl um mehr als 35% (unbestrahlt:  $475.4 \pm 8.1$  Zellen/mm<sup>2</sup>; bestrahlt:  $305.1 \pm 8.3$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(34) = 14.71$ ,  $p < 0.001$ ). In den adult-bestrahlten Mäusen normalisierte sich die Stammzellzahl nach drei bzw. sechs Monaten gegenüber der unbestrahlten Kontrollgruppe wieder. Die juvenil-bestrahlten Mäuse hingegen zeigten drei Monate nach der Bestrahlung eine Abnahme um mehr als 40% (unbestrahlt:  $449.1 \pm 14.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>; bestrahlt:  $259.1 \pm 12.6$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(34) = 9.82$ ,  $p < 0.001$ ) und nach sechs Monaten noch eine Verminderung um 30% (unbestrahlt:  $339 \pm 7.6$  Zellen/mm<sup>2</sup>; bestrahlt:  $230.3 \pm 8.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(34) = 9.61$ ,  $p < 0.001$ ).

### 4.3.2 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt unmittelbar und langfristig zu einer Abnahme der Vorläuferzellpopulation

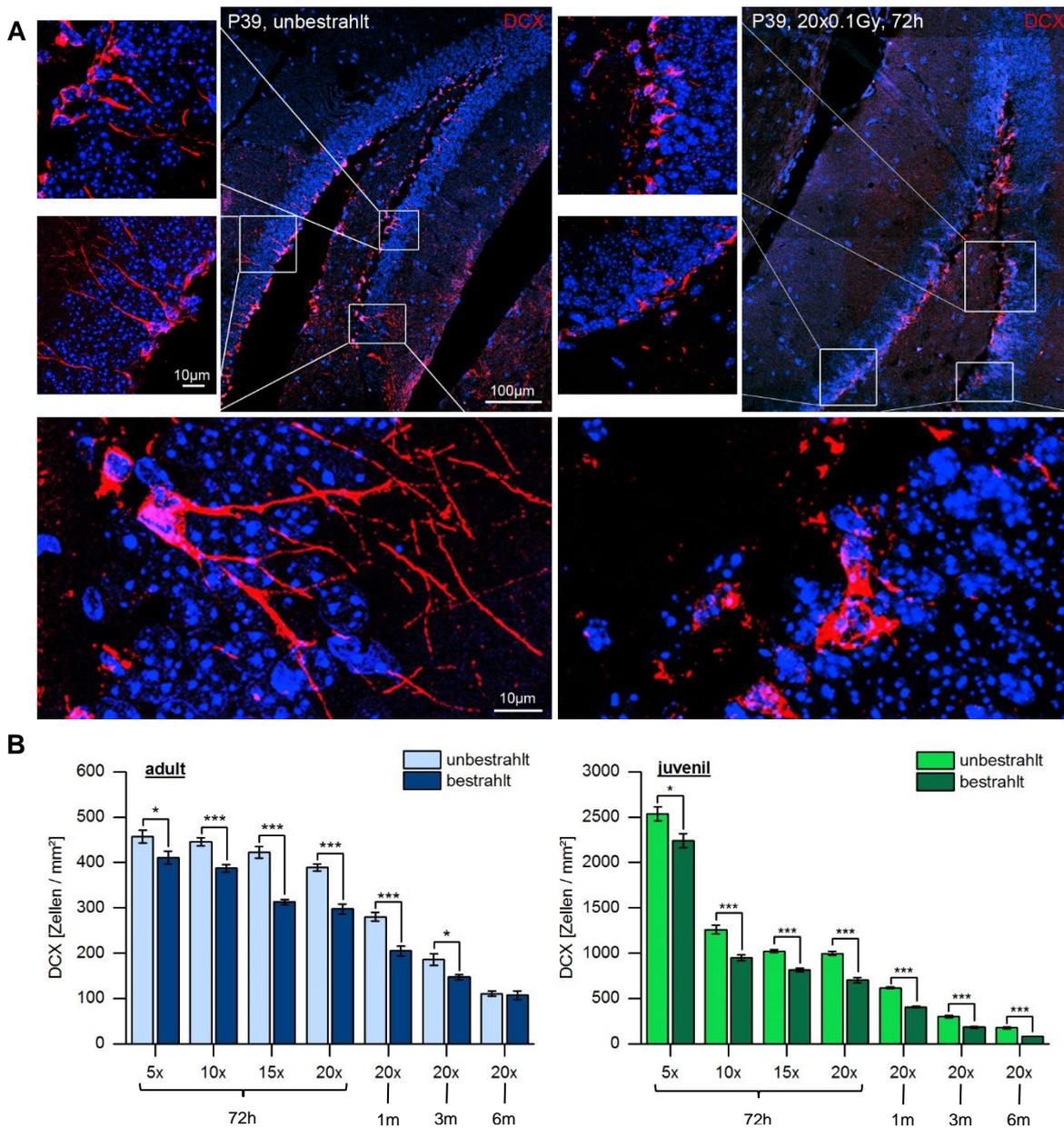
Ionisierende Strahlung nimmt aber nicht nur massiven Einfluss auf Stammzellen, sondern auch, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, auf proliferierende Zellen. Während der adulten Neurogenese stellen die Vorläuferzellen das Zellstadium dar, in dem am meisten Proliferation stattfindet. Somit ist dieses Zellstadium von besonderem Interesse, wenn der Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die adulte Neurogenese untersucht werden soll. Für das Vorläuferzell-Stadium wurde der Marker Doublecortin (DCX) verwendet, da mit seiner Hilfe sowohl die Typ-2- als auch die Typ-3-Zellen während der adulten Neurogenese identifiziert werden können. In den letzten Jahren hat sich DCX zudem zu einem Marker für den gesamten Prozess der adulten Neurogenese etabliert. Um den Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die adulte Neurogenese zu eruieren, ist somit eine immunhistologische Untersuchung mit DCX unerlässlich und die Zahl der DCX-positiven Zellen wurde in Relation zur gemessenen Größe des *Gyrus Dentatus* bestimmt.



**Abbildung 4.9: Altersabhängige Abnahme der DCX-Vorläuferzellen**

Darstellung der altersabhängigen exponentiellen Abnahme der DCX-positiven Zellen innerhalb der SGZ des Hippocampus von 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 24, 32 sowie 39 Wochen alten Mäusen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei biologischen und drei technischen Replikaten dar (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den aufeinander folgenden Altersgruppen wurde mithilfe einer Varianzanalyse (Welch-ANOVA) und dem Games-Howel-Post-Hoc-Test beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Auch dieses Zellstadium zeigte erneut eine starke negative Korrelation mit zunehmendem Alter, die sich laut ANOVA-Analyse signifikant darstellte. Während sich die Zellzahl von der zweiten zur dritten Lebenswoche mehr als halbiert (2 Wochen:  $2538.4 \pm 77.6$  Zellen/mm<sup>2</sup>; 3 Wochen  $1259.1 \pm 47.3$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $p = 0.001$ ), nimmt die Abnahme bis zur 38. Lebenswoche ( $110.8 \pm 5.8$  Zellen/mm<sup>2</sup>) einen eher exponentiellen Verlauf mit der Formel  $1064e^{-0.065x}$  und einem Bestimmtheitsmaß von 0.8968, womit nach 38 Wochen nur 4% der Neuroprogenitoren nachweisbar sind im Vergleich zu einem zwei Wochen alten Hippocampus (Abbildung 4.9).



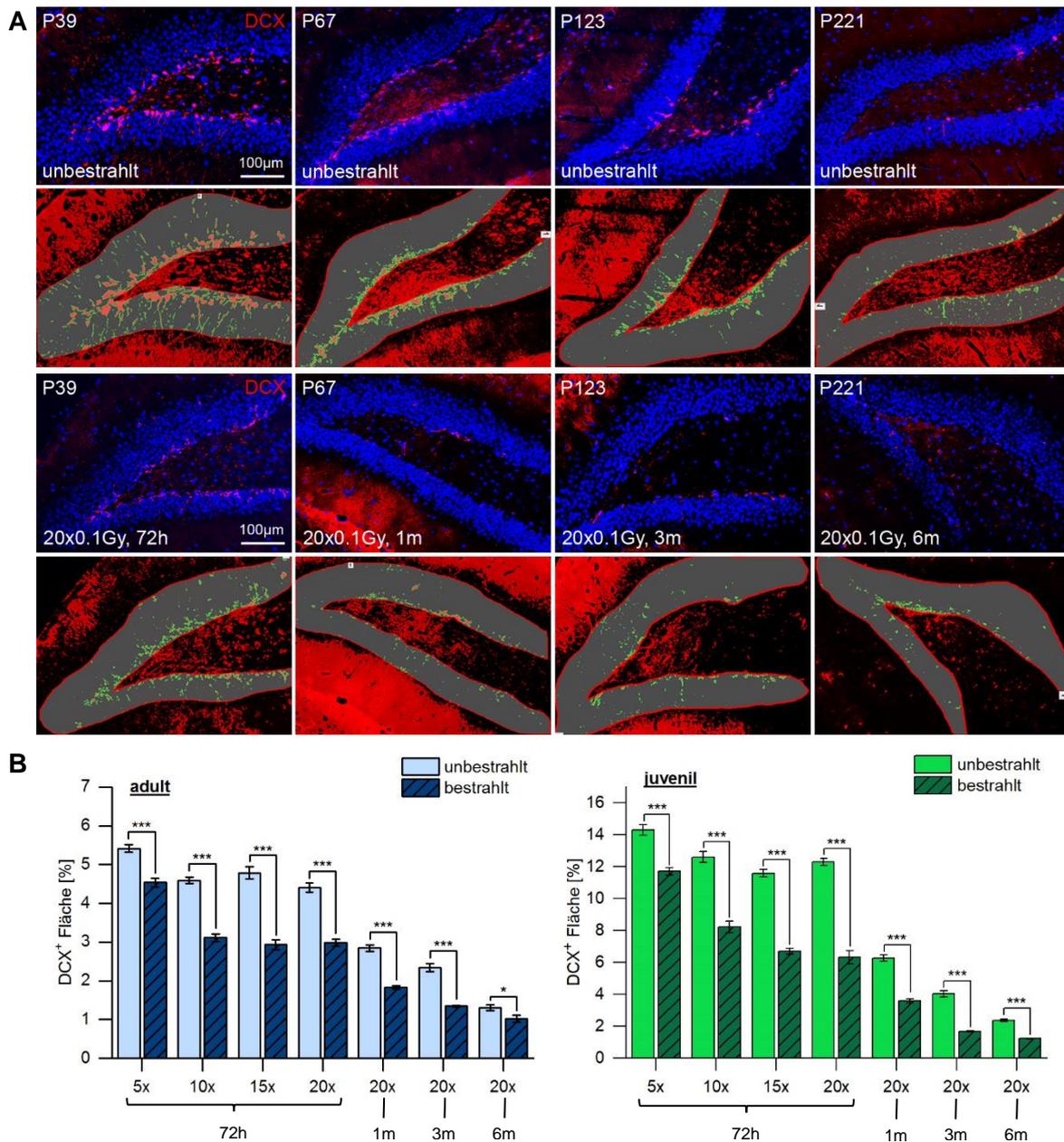
**Abbildung 4.10: DCX-positive Vorläuferzellen in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen**  
 (A) Repräsentative Übersichtsaufnahmen einer Immunfluoreszenzmarkierung von DCX (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von 5 Wochen alten Mäusen sowie von einer altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Probe 72h nach 20x0.1 Gy. Die untere Reihe sowie links von der Übersichtsaufnahme sind die Vergrößerungen der markierten Bildausschnitte in 600-facher Auflösung dargestellt. (B) Quantifizierung der DCX-positiven Zellen im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus*. Links sind die Proben der adult-bestrahlten C57BL6-Mäuse und rechts die der juvenil-bestrahlten C57BL6-Mäuse abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte der DCX-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Die Quantifizierung der DCX-positiven Zellen zeigte zudem, dass sich die Zellzahl durch die fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung noch weiter reduziert (Abbildung 4.10). 72 Stunden nach der Applikation von 5x0.1 Gy konnte eine Abnahme von 10% im Vergleich zur altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle sowohl in den adult- als auch den juvenil-bestrahlten Mäusen (juvenil: unbestrahlt:  $2538.4 \pm 77.6$ ; bestrahlt:  $2239.8 \pm 76.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(30) = 2.69$ ,  $p = 0.011$ ; adult: unbestrahlt:  $457.2 \pm 14.4$ ; bestrahlt:  $410.9 \pm 13.6$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(32) = 2.31$ ,

$p = 0.027$ ) nachgewiesen werden. In den adult-bestrahlten Mäusen verminderte sich die DCX-positive Zellzahl am stärksten einen Monat nach Bestrahlungsende mit einer Abnahme um fast 30% (unbestrahlt:  $280.1 \pm 9.8$ ; bestrahlt:  $204.8 \pm 11.1$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(30) = 5.09$ ,  $p < 0.001$ ). Drei Monate nach Bestrahlung war noch eine Verminderung um gut 20% messbar (unbestrahlt:  $186.1 \pm 13.3$ ; bestrahlt:  $146.8 \pm 5.2$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(24) = 2.59$ ,  $p = 0.016$ ), bevor sich die Zellpopulation wieder erholte und nach sechs Monaten kein Unterschied mehr nachweisbar war (unbestrahlt:  $110.8 \pm 5.8$ ; bestrahlt:  $107.4 \pm 9.6$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(25) = 0.30$ ,  $p = 0.765$ ). In den juvenil-bestrahlten Mäusen wurde bis zu sechs Monate nach Bestrahlung eine stetige Abnahme der Neuroprogenitoren nachgewiesen. Während nach 72 Stunden die Zellzahl um 30% vermindert war (unbestrahlt:  $997.1 \pm 25$  Zellen/mm<sup>2</sup>; bestrahlt:  $702.1 \pm 26.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(40) = 8.08$ ,  $p < 0.001$ ), waren die Zellzahl nach einem Monat bereits um 35% (unbestrahlt:  $616.6 \pm 8.7$  Zellen/mm<sup>2</sup>; bestrahlt:  $405.1 \pm 9.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(31) = 15.74$ ,  $p < 0.001$ ) und nach drei Monaten sogar um 40% reduziert gegenüber der altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (unbestrahlt:  $299.67 \pm 11.49$  Zellen/mm<sup>2</sup>; bestrahlt:  $183.7 \pm 10.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(34) = 7.46$ ,  $p < 0.001$ ). Sechs Monate nach Bestrahlungsende zeigte sich die größte Abnahme um 55% im Hippocampus im Vergleich zur altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (unbestrahlt:  $175.4 \pm 9.3$ ; bestrahlt:  $81.7 \pm 2$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $t(30) = 9.81$ ,  $p < 0.001$ ).

### **4.3.3 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt unmittelbar und langfristig zu einer reduzierten Verschaltung der Vorläuferzellpopulation**

Die Quantifizierung der DCX-positiven Zellen des vorherigen Kapitels zeigte, dass die Niedrig-Dosis-Bestrahlung die Zellzahl beeinflusst. Zur Quantifizierung der dendritischen Verzweigungen wurde die Granularzellschicht (GCL) mithilfe des DAPI-Signals und der NIS-Elements Software als *region of interest* (ROI) bestimmt und anschließend die Fläche des DCX-Signals innerhalb der ROI gemessen (Abbildung 4.11A).



**Abbildung 4.11: DCX-positive Fläche (%) in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen**

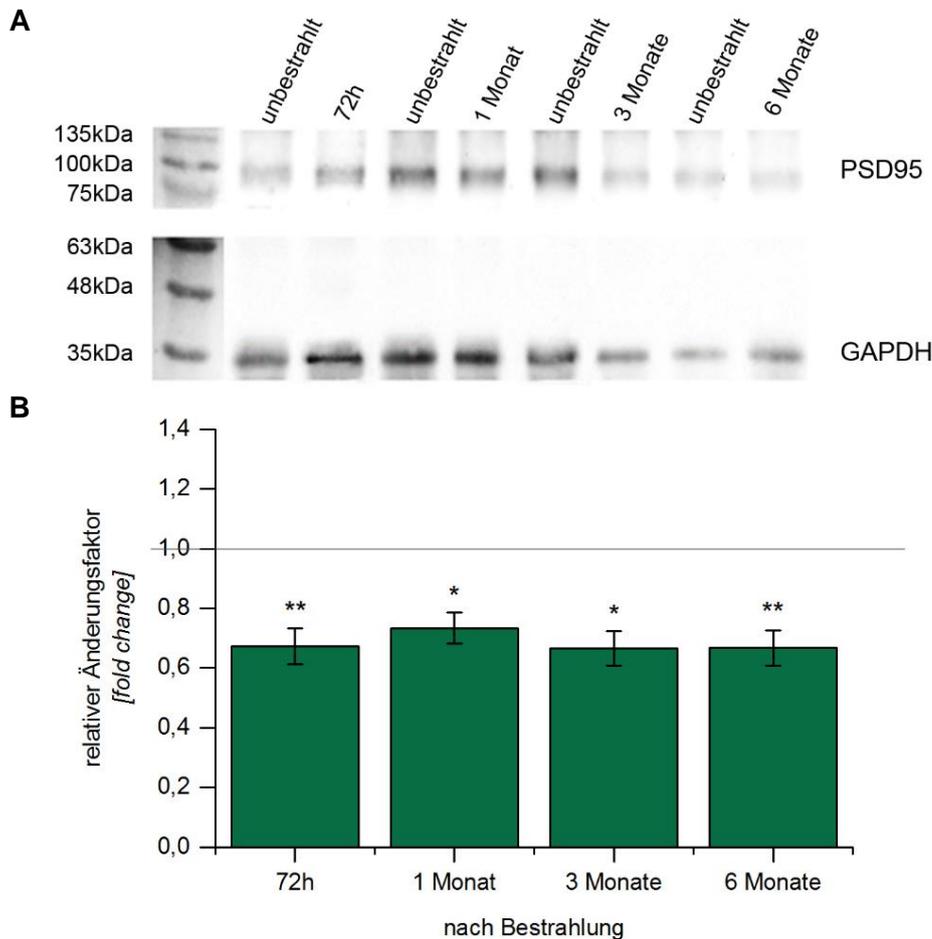
(A) Die obere Reihe zeigt repräsentative Übersichtsaufnahmen einer Immunfluoreszenzmarkierung von DCX (rot) innerhalb des unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von Mäusen im Alter von etwa 5, 9, 17 und 31 Wochen. Die Reihe darunter zeigt die entsprechende DCX-positive Fläche innerhalb der Region of Interest (*Gyrus Dentatus*). In der 3. Reihe sind die jeweils altersgerechten, juvenil-bestrahlten Proben 72h, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach 20x0.1 Gy dargestellt. Die entsprechende DCX-positive Fläche innerhalb der ROI wurde in der untersten Reihe dargestellt. (B) Darstellung der DCX-positiven Fläche innerhalb des jeweiligen *Gyrus Dentatus*. Links sind die adult-bestrahlten C57BL6-Mäuse und rechts die juvenil-bestrahlten C57BL6-Mäuse abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte der DCX-positiven Fläche sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Auch hier zeigte sich erneut eine altersabhängige Abnahme der dendritischen Verzweigungen der DCX-Vorläuferzellen um 90% (2 Wochen:  $14.3 \pm 0.3$ ; 38 Wochen:  $1.3 \pm 0.07$  %,  $t(24) = 40$ ,  $p < 0.001$ ).

Die Vermessung der DCX-positiven Fläche zeigte durch die Bestrahlung noch eine zusätzliche signifikante Abnahme der dendritischen Verzweigungen gegenüber der Fläche in den jeweiligen altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle zu jedem Zeitpunkt nach der Bestrahlung (Abbildung 4.11). Bereits 72 Stunden nach der geringsten applizierten Dosis von  $5 \times 0.1$  Gy lag sowohl in den adult-bestrahlten Proben (unbestrahlt:  $5.4 \pm 0.1$ ; bestrahlt:  $4.5 \pm 0.1$  %;  $t(30) = 5.94$ ,  $p < 0.001$ ) als auch in den juvenil-bestrahlten Proben die DCX-positive Fläche um 20% reduziert vor (unbestrahlt:  $14.3 \pm 0.3$ ; bestrahlt:  $11.7 \pm 0.2$  %;  $t(28) = 6.62$ ,  $p < 0.001$ ). In den adult-bestrahlten Mäusen zeigte sich die höchste Abnahme drei Monate nach Bestrahlungsende mit  $20 \times 0.1$  Gy (unbestrahlt:  $2.3 \pm 0.1$ ; bestrahlt:  $1.3 \pm 0.02$  %,  $t(25) = 8.13$ ,  $p < 0.001$ ). Hier reduzierte sich die Fläche um mehr als 1%, was einer Abnahme um 43% entspricht (95%-CI[0.7718,1.2861]). In den juvenilen Mäusen zeigte sich bereits 72 Stunden nach Bestrahlung mit  $20 \times 0.1$  Gy eine Reduktion der positiven Fläche um 50% (unbestrahlt:  $12.3 \pm 0.2$ ; bestrahlt:  $6.3 \pm 0.4$  %;  $t(43) = 13.39$ ,  $p < 0.001$ ). Auch einen Monat nach Bestrahlungsende war die DCX-positive Fläche noch deutlich vermindert (unbestrahlt:  $6.3 \pm 0.2$ ; bestrahlt:  $3.6 \pm 0.1$  %;  $t(32) = 11.31$ ,  $p < 0.001$ ) und auch sechs Monate danach war die Fläche noch um 50% reduziert (unbestrahlt:  $2.4 \pm 0.06$ ; bestrahlt:  $1.2 \pm 0.02$  %;  $t(29) = 15.37$ ,  $p < 0.001$ ).

#### 4.3.4 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu verminderter synaptischer Plastizität

Die Auswirkungen fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die synaptische Plastizität auf neuronaler Ebene des Hippocampus wurde durch die Expression von PSD-95 mithilfe eines Westernblots des Gesamtzelllysats des Hippocampus untersucht.



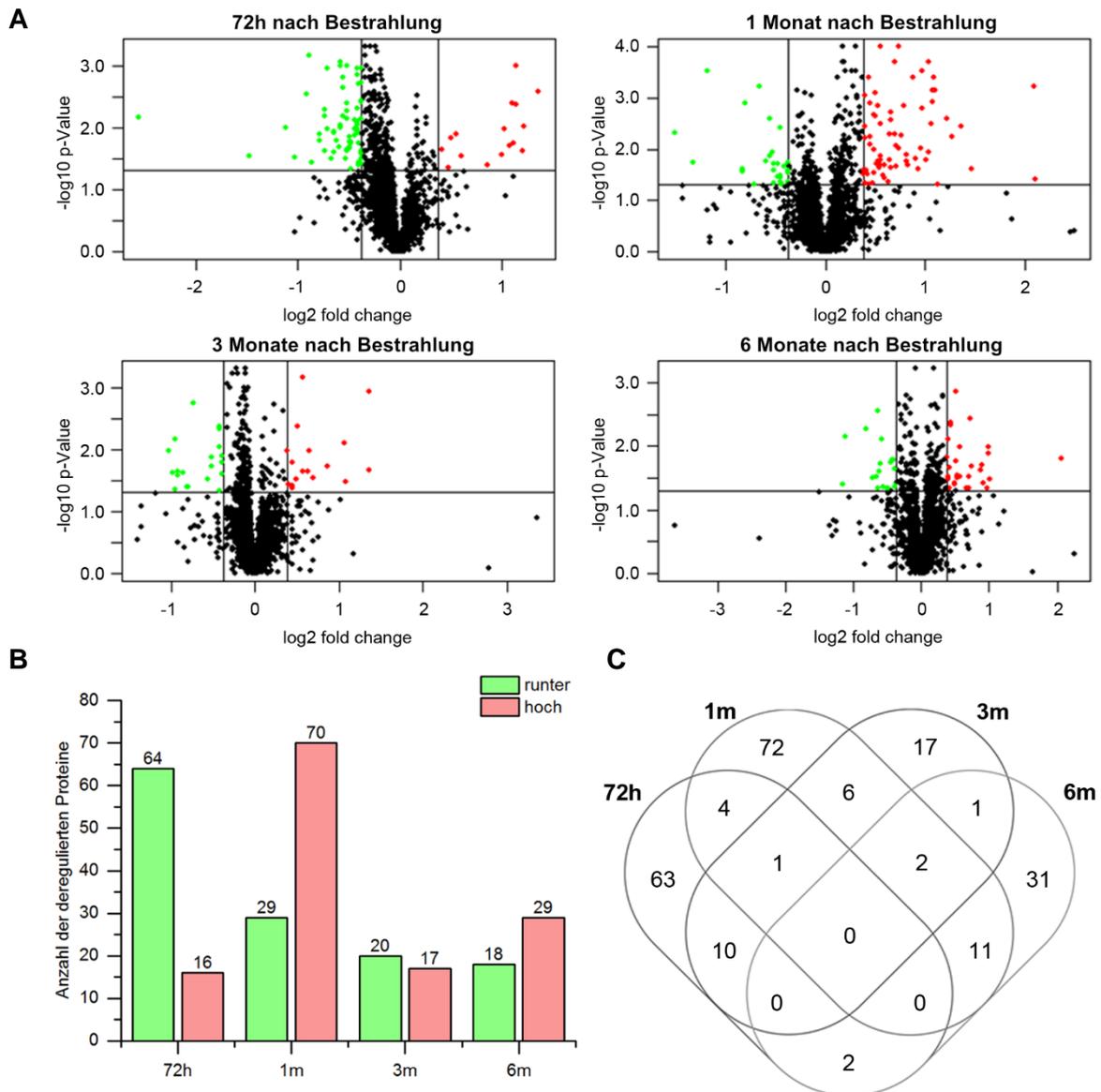
**Abbildung 4.12: Westernblot-Analyse der Expressionslevel von PSD-95**

(A) Exemplarischer Westernblot für PSD-95 von hippocampalen Lysaten der unbestrahlten und bestrahlten (20x0.1 Gy) Mäuse zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung (72h, 1 Monat, 3 und 6 Monate) sowie der dazugehörige Westernblot für das Haushaltsgen GAPDH. (B) Relative Änderung der Expression (*fold change*) von PSD-95 zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung jeweils im Vergleich und normalisiert zur entsprechenden altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (graue Linie: *fold change* = 1 = keine Veränderung). Die Expressionslevel von PSD-95 wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten PSD-95 Expressionslevel sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  angegeben.

Die Auswertung der Westernblots ergab eine signifikante Abnahme der relativen Expression von PSD-95 zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung (Abbildung 4.12). Die Abnahme lag zu allen untersuchten Zeitpunkten bei etwa 30% (72h:  $0.67 \pm 0.06$ ,  $t(19) = 2.9$ ,  $p = 0.009$ ; 1 Monat:  $0.73 \pm 0.05$ ,  $t(21) = 2.45$ ,  $p = 0.023$ ; 3 Monate:  $0.66 \pm 0.06$ ,  $t(22) = 2.48$ ,  $p = 0.021$ ; 6 Monate:  $0.66 \pm 0.06$ ,  $t(21) = 3.37$ ,  $p = 0.003$  *fold change*).

### 4.3.5 Proteom-Untersuchung von juvenilen Hippocampi nach repetitiver Niedrig-Dosis-Bestrahlung

Für eine umfassende Proteom-Untersuchung wurden juvenil-bestrahlte Hippocampi isoliert und schockgefroren an die Arbeitsgruppe von Frau Dr. rer. Nat. Soile Tapio am Helmholtz-Institut in München gesandt. Mithilfe einer massenspektrometrisch basierten Proteomanalyse wurden die Proben in der *Core Facility Proteomics* gemessen und analysiert (Grosche *et al.*, 2016) (Abbildung 4.13).



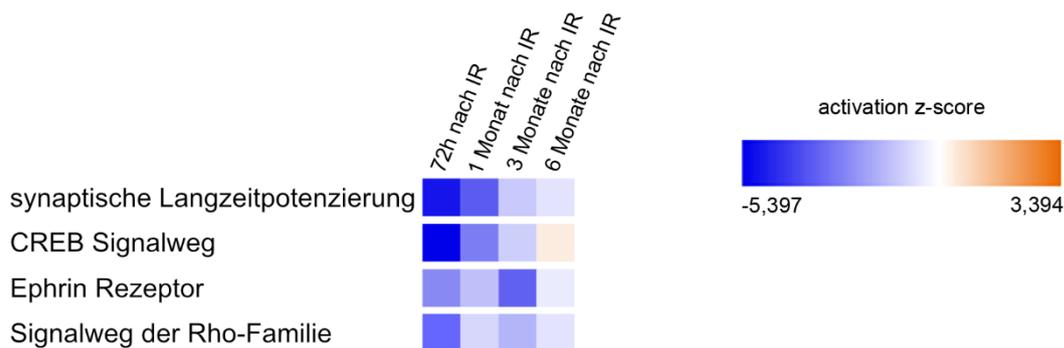
**Abbildung 4.13: Proteomics**

(A) Volcano plots zeigen die Verteilung aller quantifizierten Proteine (erfülltes Kriterium: Identifikation mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden) zum jeweiligen Zeitpunkt (72h, 1m, 3m, 6m) nach der Bestrahlung mit 20x0.1 Gy. Zum Nachweis einer Über- oder Unterregulation wurden als Bedingungen eine Veränderung von  $\pm 1.3$  (fold change) und ein p-Wert  $p \leq 0.05$  festgelegt. Die deregulierten Proteine erscheinen in grün (runterreguliert) und rot (hochreguliert). (B) Gesamtzahl der signifikant runter- (grün) und hochregulierten (rot) Proteine für alle Zeitpunkte. (C) Das Venn Diagramm zeigt die Überschneidungen der deregulierten Proteine zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Die Proteom-Untersuchung ergab ein verändertes Expressionsprofil (fold change:  $\pm 1.3$ ) verschiedener Proteine durch die Bestrahlung mit  $20 \times 0.1$  Gy zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (72 Stunden, 1 Monat, 3 und 6 Monate) nach Ende der Bestrahlung. 72 Stunden nach Bestrahlungsende kam es zu einer verminderten Expression von 64 Proteinen, während nach einem Monat die Expression von 70 Proteinen massiv erhöht vorliegt (Abbildung 4.13B). Auffällig war, dass es zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten zu keinen Überschneidungen in den betroffenen deregulierten Proteinen kommt (Abbildung 4.13C).

#### 4.3.6 IPA-Analyse nach repetitiver Niedrig-Dosis-Bestrahlung

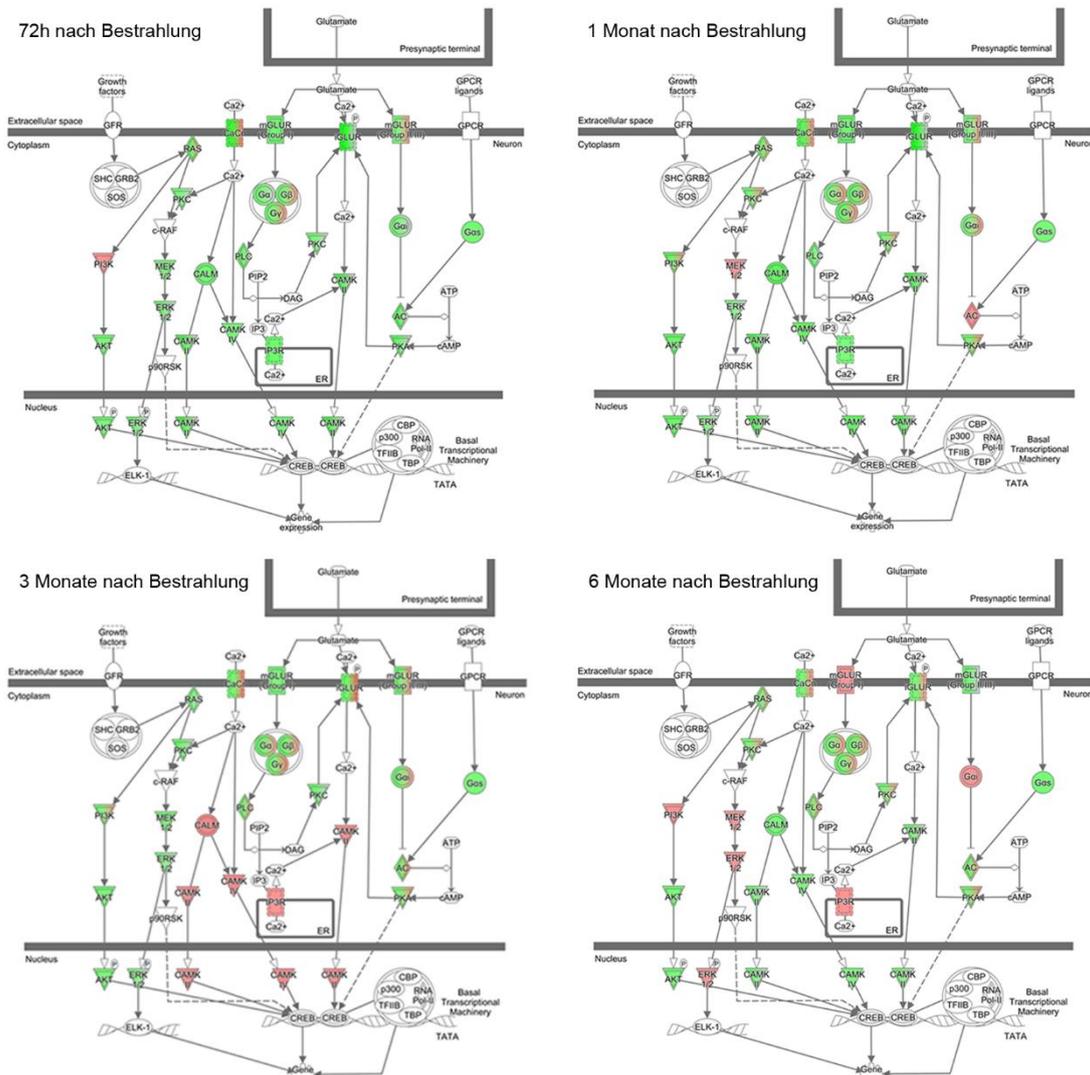
Zur Identifikation von Signalwegen, die durch fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung beeinflusst werden, wurden die deregulierten Proteine der Proteomanalyse mithilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) Software näher untersucht. Am stärksten betroffen zeigten sich die Signalwege der synaptischen Langzeitpotenzierung sowie der CREB-Signalweg (Abbildung 4.15). Beide zeigten bis zu drei Monate nach Bestrahlungsende eine Runterregulation.



**Abbildung 4.14: Strahlungsbeeinflusste Signalwege nach *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)**

Hippocampale Signalwege, die laut IPA durch fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung beeinflusst werden. Der Z-score gibt die voraussichtliche Deregulation an (blau: runterreguliert, orange: hochreguliert).

### 4.3.6.1 IPA-Analyse des deregulierten CREB-Signalweges nach repetitiver Niedrig-Dosis-Bestrahlung

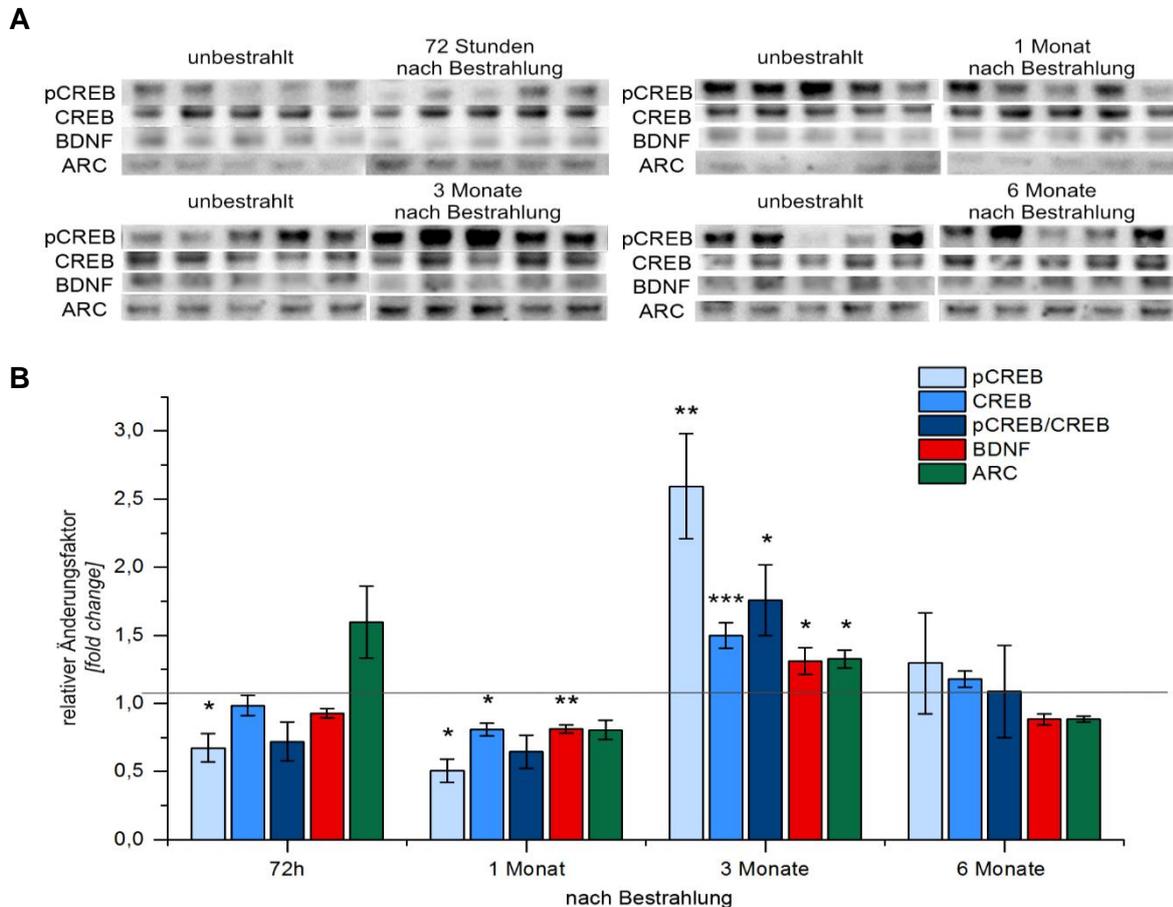


**Abbildung 4.15: Veränderung des CREB-Signalweges nach Ingenuity Pathway Analysis (IPA)**  
 Deregulierte Proteine innerhalb des CREB-Signalweges zu allen Zeitpunkten (72h, 1 Monat, 3 und 6 Monate) nach Bestrahlung (grün: runterreguliert, rot: hochreguliert).

Die nähere Betrachtung des deregulierten CREB-Signalweges (Abbildung 4.15) zeigt eine Runterregulation von Calmodulin I sowie eine Runterregulation der Calmodulin-Kinasen II und IV 72 Stunden und einen Monat nach Bestrahlung an, wohingegen sie nach drei Monaten hochreguliert werden.

Um die prognostizierten Veränderungen zu validieren, wurden Westernblots für CREB, seine phosphorylierte Form (pCREB) sowie für die *downstream*-Ziele von pCREB BDNF und ARC durchgeführt und mithilfe von *ImageJ* quantifiziert.

### 4.3.7 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung verändert Expression von CREB und *downstream* liegenden Genen



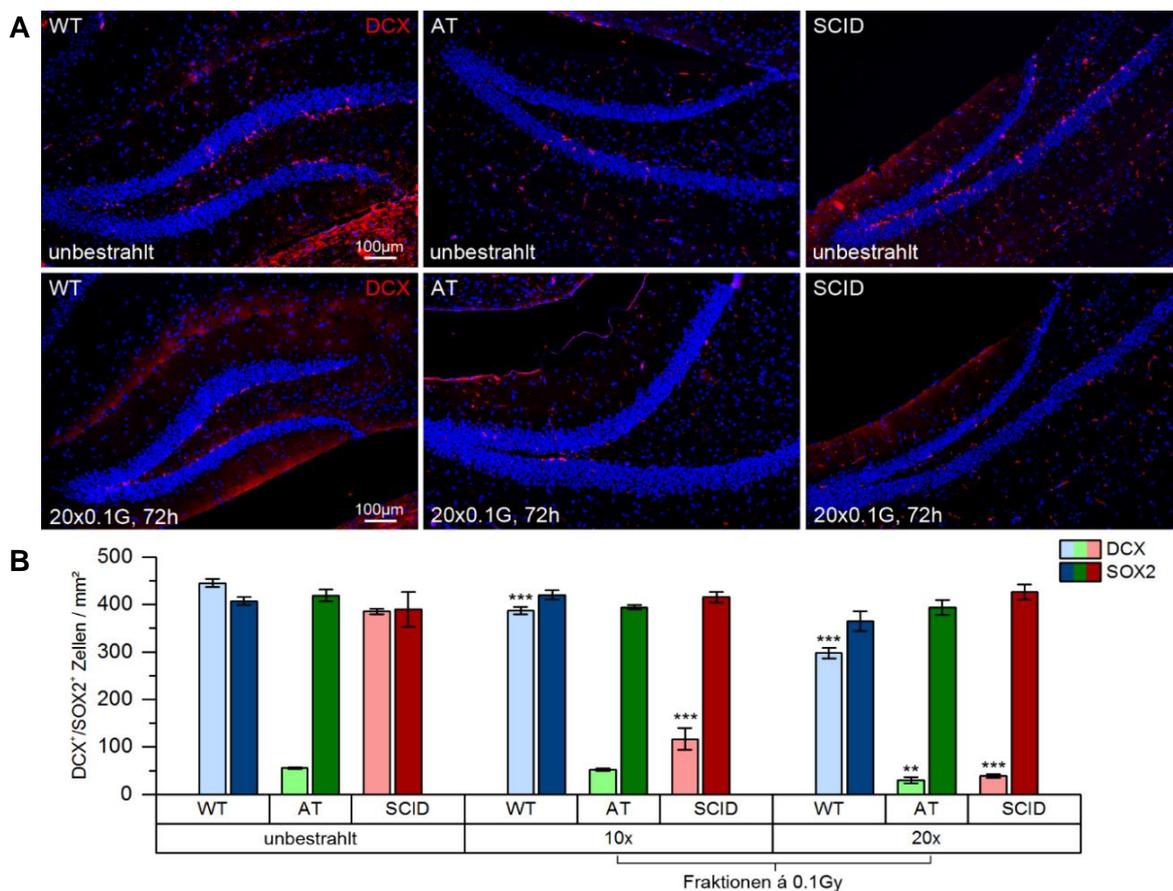
**Abbildung 4.16: Westernblot für CREB, pCREB, BDNF und ARC**

(A) Exemplarische Westernblots für CREB, pCREB, BDNF und ARC von hippocampalen Lysaten der unbestrahlten und bestrahlten (20x0.1 Gy) Mäuse zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung (72h, 1 Monat, 3 und 6 Monate). (B) Relative Änderung der Expression (fold change) von CREB, pCREB, BDNF und ARC zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung jeweils im Vergleich und normalisiert zur entsprechenden altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (graue Linie: fold change = 1 = keine Veränderung). Die Expressionslevel wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten Expressionslevel sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Abbildung 4.16 zeigt eine Runterregulation der Expression der phosphorylierten CREB-Form 72 Stunden nach Bestrahlungsende ( $0.67 \pm 0.11$ ,  $t(10) = 2.34$ ,  $p = 0.041$ ). Einen Monat nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy zeigt sich eine deutlich verminderte Expression der nativen ( $0.81 \pm 0.11$ ,  $t(8) = 2.84$ ,  $p = 0.023$ ) sowie des phosphorylierten CREB-Proteins ( $0.51 \pm 0.19$ ,  $t(8) = 2.79$ ,  $p = 0.023$ ). Auch die Expression von BDNF war einen Monat nach Bestrahlung signifikant reduziert ( $0.81 \pm 0.07$ ,  $t(8) = 3.59$ ,  $p = 0.007$ ). Drei Monate nach Bestrahlung zeigt sich hingegen eine Hochregulation von CREB ( $1.5 \pm 0.22$ ,  $t(10) = -5.17$ ,  $p < 0.001$ ), pCREB ( $1.7 \pm 0.64$ ,  $t(10) = -2.46$ ,  $p = 0.034$ ) sowie von BDNF ( $1.3 \pm 0.22$ ,  $t(9) = -3.17$ ,  $p = 0.011$ ) und ARC ( $1.3 \pm 0.16$ ,  $t(10) = -4.76$ ,  $p = 0.001$ ). Weitere drei Monate nach Beendigung der Bestrahlung (6 Monate) waren keine veränderten Expressionslevel mehr nachweisbar.

### 4.3.8 Untersuchung der adulten Neurogenese in reparaturdefizienten Mäusen nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung

Strahleninduzierte DSBs können in gesunden Zellen vollständig repariert werden oder die Zellen werden bei zu schwerwiegenden Schäden in Apoptose geschickt. Mutationen in Reparaturprotein-codierenden DNA-Sequenzen können jedoch dazu führen, dass einzelne Proteine in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Hierdurch erfolgt die DSB-Reparatur unvollständig, zeitverzögert oder gar nicht, weshalb von einer Reparaturdefizienz gesprochen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden der reparaturdefiziente *severe combined deficient* (SCID)- und AT-Mausstamm untersucht. Beide reparaturdefizienten Stämme weisen eine erhöhte Radiosensitivität und genomische Instabilität gegenüber Wildtyp-Mäusen auf (Lorat *et al.*, 2016). Inwieweit eine Reparaturdefizienz ebenfalls zu einer strahlungsinduzierten Abnahme der adulten Neurogenese führt, wurde mithilfe der immunologischen Marker DCX und SOX2 in den Hippocampi von SCID und AT-Mausstämmen erfasst.

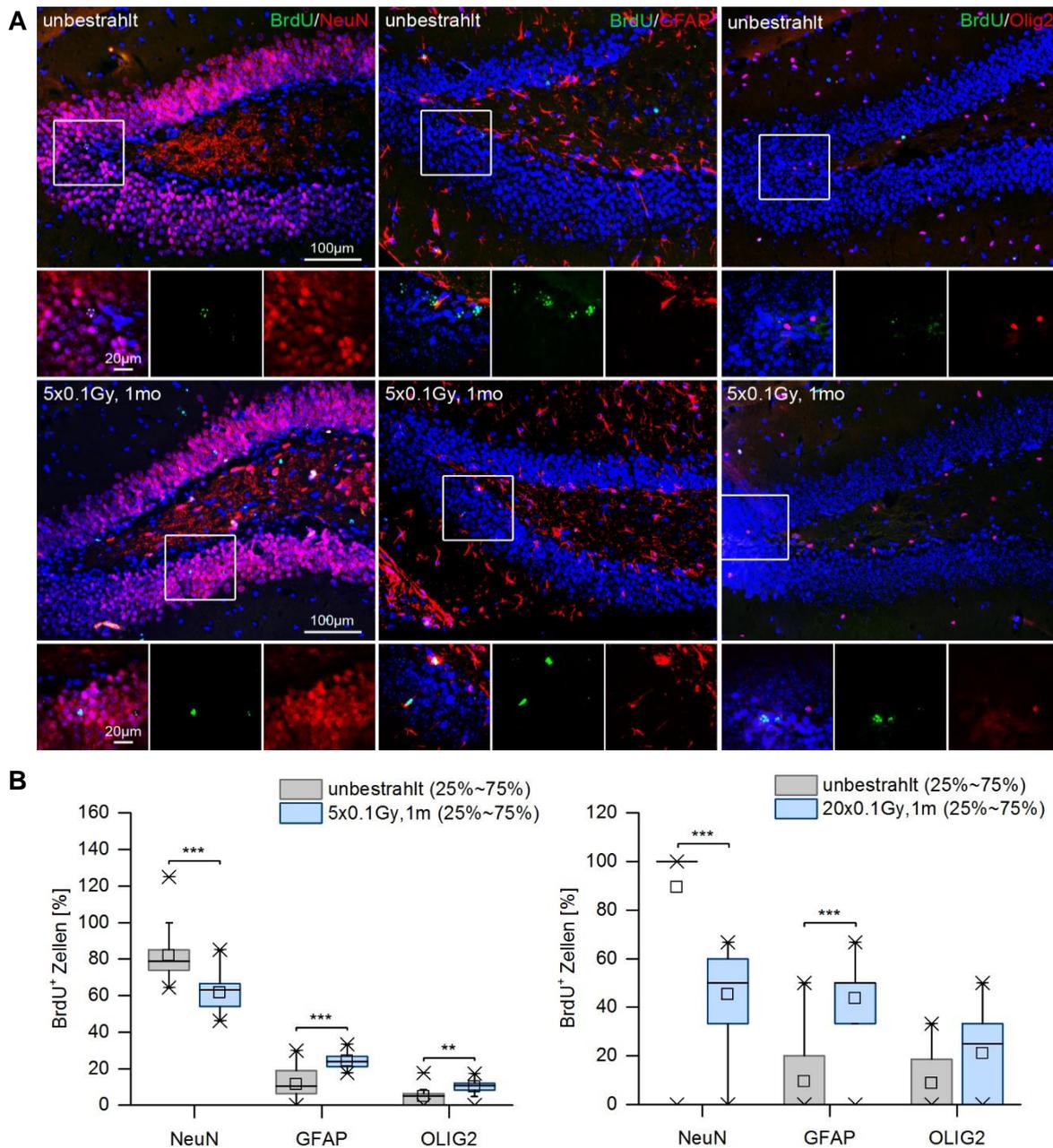


**Abbildung 4.17: DCX-positive Vorläuferzellen in unbestrahlten und bestrahlten Mäusen mit und ohne Reparaturdefekt**  
 (A) Die obere Reihe zeigt repräsentative Übersichtsaufnahmen einer Immunfluoreszenzmarkierung von DCX (rot) in unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von reparaturprofizienten WT-Typ-Mäusen (C57BL6) sowie von reparaturdefizienten AT- (ATM mutiert) und SCID-Mäusen (DNA-PKcs mutiert). Die untere Reihe zeigt die altersgerechten, adult-bestrahlten Proben 72h nach 20x0.1 Gy des jeweiligen Mausstammes. (B) Quantifizierung der DCX- sowie SOX2-positiven Zellen im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus* der unterschiedlichen Mausstämme. Dargestellt sind die Mittelwerte der DCX- und SOX2-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 angegeben.

Wie in Abbildung 4.17 dargestellt, wiesen bereits die unbestrahlten ATM-defizienten Mäuse ( $55.5 \pm 1.8$  Zellen/mm<sup>2</sup>) einen signifikanten Verlust von DCX-Zellen gegenüber den WT-Mäusen ( $445.3 \pm 9.01$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(27) = 2.97$ ,  $p < 0.001$ ) und den SCID-Mäuse auf ( $385.2 \pm 5.8$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(8) = 0.319$ ,  $p < 0.001$ ). 72 Stunden nach der Bestrahlung mit  $20 \times 0.1$  Gy wurde die Anzahl der DCX-positiven Zellen um weitere 50% reduziert ( $29.8 \pm 6.2$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(7) = 4.39$ ,  $p = 0.003$ ). SCID-Mäuse hingegen zeigten keine Veränderungen der Vorläuferzellpopulation in den unbestrahlten Proben. Nach Bestrahlung mit  $10 \times 0.1$  Gy hingegen verminderte sich die DCX-Population um 70% ( $116.4 \pm 22.8$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(9) = 10.45$ ,  $p < 0.001$ ). Nach der Applikation von weiteren 10 Fraktionen mit 0.1 Gy ( $20 \times 0.1$  Gy) reduzierte sich die Population sogar um 90% ( $39.1 \pm 3.7$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(14) = 51.702$ ,  $p < 0.001$ ). Die SOX2-positiven Stammzellen wiesen keine Veränderungen im Vergleich zu den WT-Mäusen auf und ihre Anzahl blieb 72 Stunden nach der Bestrahlung unverändert (unbestrahlt: WT:  $406.9 \pm 8.3$ ; AT:  $428.9 \pm 12.6$ ; SCID:  $389.7 \pm 36.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>;  $20 \times 0.1$  Gy, 72h: WT:  $365.1 \pm 21.3$ ; AT:  $394.1 \pm 15.6$ ; SCID:  $426.7 \pm 15.7$  Zellen/mm<sup>2</sup>).

#### **4.4 Änderung des Zellschicksals durch fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung**

Adulte Neurogenese ist ein hochdynamischer Prozess, bei dem aus Stammzellen vorwiegend neue Neurone, aber auch Astrozyten und gelegentlich Oligodendrozyten hervorgehen. Die Markierung mit dem Thymidinanalogon BrdU bietet die Möglichkeit zu untersuchen, ob sich das Zellschicksal aufgrund der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung ändert. BrdU wird während der DNA-Strangsynthese anstelle der Nukleinbase Thymidin eingebaut. Hierdurch ist es möglich neu synthetisierte DNA-Stränge durch das Vorhandensein von BrdU zu identifizieren und von den bereits vorhandenen DNA-Strängen (ohne BrdU) zu unterscheiden. BrdU kann somit als Proliferationsmarker verwendet werden. Während der adulten Neurogenese kann BrdU zusätzlich verwendet werden, um herauszufinden, in welchen Zelltyp die Stammzellen ausdifferenzieren. BrdU wird im Hippocampus nur in die proliferierenden Stamm- und Vorläuferzellen eingebaut, da Neurone postmitotisch sind. Vier Wochen nach der Markierung von Zellen mit BrdU (s. Kapitel 3.2.2.2) und einer additiven Markierung zur Bestimmung des Zelltyps kann ermittelt werden, wie viele neue Zellen eines bestimmten Zelltyps während dieser vier Wochen entstanden sind.



**Abbildung 4.18: BrdU-labeling zur Untersuchung der Änderung des Zellschicksals**

(A) links: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von BrdU (grün) und NeuN (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* einer Maus im Alter von 7 Wochen sowie in der altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Probe 1 Monat nach 5x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Unterhalb der Übersichtsaufnahmen werden die markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die einzelnen Farbkanäle separat mit BrdU (grün) und NeuN (rot) Mitte: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von BrdU (grün) und GFAP (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* einer Maus im Alter von 7 Wochen sowie der altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Probe 1 Monat nach 5x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Unterhalb der Übersichtsaufnahme werden die markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die einzelnen Farbkanäle separat mit BrdU (grün) und GFAP (rot). rechts: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von BrdU (grün) und Olig2 (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* einer Maus im Alter von 7 Wochen sowie der altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Probe 1 Monat nach 5x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Unterhalb der Übersichtsaufnahme werden die markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die Farbkanäle separat mit BrdU (grün) und Olig2 (rot). Die Mäuse wurden während der Bestrahlungswoche tägliche mittels Injektion von 50mg/g Körpergewicht (KG) BrdU markiert (5 Injektionen). (B) Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen und jeweils einem weiteren Marker für Neurone (NeuN), Astrozyten (GFAP) oder Oligodendrozyten (Olig2) im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus* nach einer Dosis von 5x0.1 Gy oder 20x0.1 Gy. Die Markierung mit BrdU erfolgte hierbei in der letzten Woche der Bestrahlung (15-20x) durch tägliche Injektionen von 50mg/g KG BrdU. Die ermittelten Zellzahlen zeigen keine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ) und werden als Boxplot mit unterem und oberem Quantil, dem Median sowie dem Minimum und Maximum ‚Whisker‘ dargestellt ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Test beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Die Quantifizierung der doppelt markierten Zellen nach Bestrahlung mit 5x0.1 Gy oder 20x0.1 Gy wurde aufgrund fehlender Normalverteilung als Median dargestellt und mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde die statistische Signifikanz der bestrahlten und unbestrahlten Proben ermittelt. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der neu entstandenen Neurone (BrdU-, NeuN-positiv) nach 5x0.1 Gy (unbestrahlt: Mdn = 79, bestrahlt: Mdn = 63,  $U = 26.5$ ,  $p < 0.001$ ) und auch nach der Applikation von 20x0.1 Gy war die Menge an neu entstandenen Neuronen um die Hälfte reduziert (unbestrahlt:  $M_{\text{Rang}} = 22.15$ , bestrahlt:  $M_{\text{Rang}} = 10.41$ ,  $U = 24$ ,  $p < 0.001$ ). Darüber hinaus waren ohne Bestrahlung etwa 82-90% aller neu entstandenen Zellen Neurone, während dieser Anteil nach Bestrahlung nur noch 45-62% betrug (Abbildung 4.18). In den Kontrollgruppen waren von allen neu entstandenen Zellen etwa 10% Astrozyten (Mdn = 10) und 6% Oligodendrozyten (Mdn = 5). Vier Wochen nach Bestrahlung zeigte sich eine Zunahme des Anteils an Astrozyten, um das 200% bis 500% (5x0.1 Gy: Mdn = 24,  $U = 20.5$ ,  $p < 0.001$ ; 20x0.1 Gy: Mdn = 50,  $U = 35.5$ ,  $p < 0.001$ ), während sich die Menge an Oligodendrozyten nach 5x 0.1 Gy verdoppelte auf etwa 10% (5x0.1 Gy: Mdn = 11,  $U = 47$ ,  $p = 0.001$ ). Nach der Bestrahlung mit 20x0.1 Gy konnte kein signifikant erhöhtes Vorkommen an Oligodendrozyten gezeigt werden (unbestrahlt: Mdn = 0, bestrahlt: Mdn = 25,  $U = 87$ ,  $p = 0.057$ ).

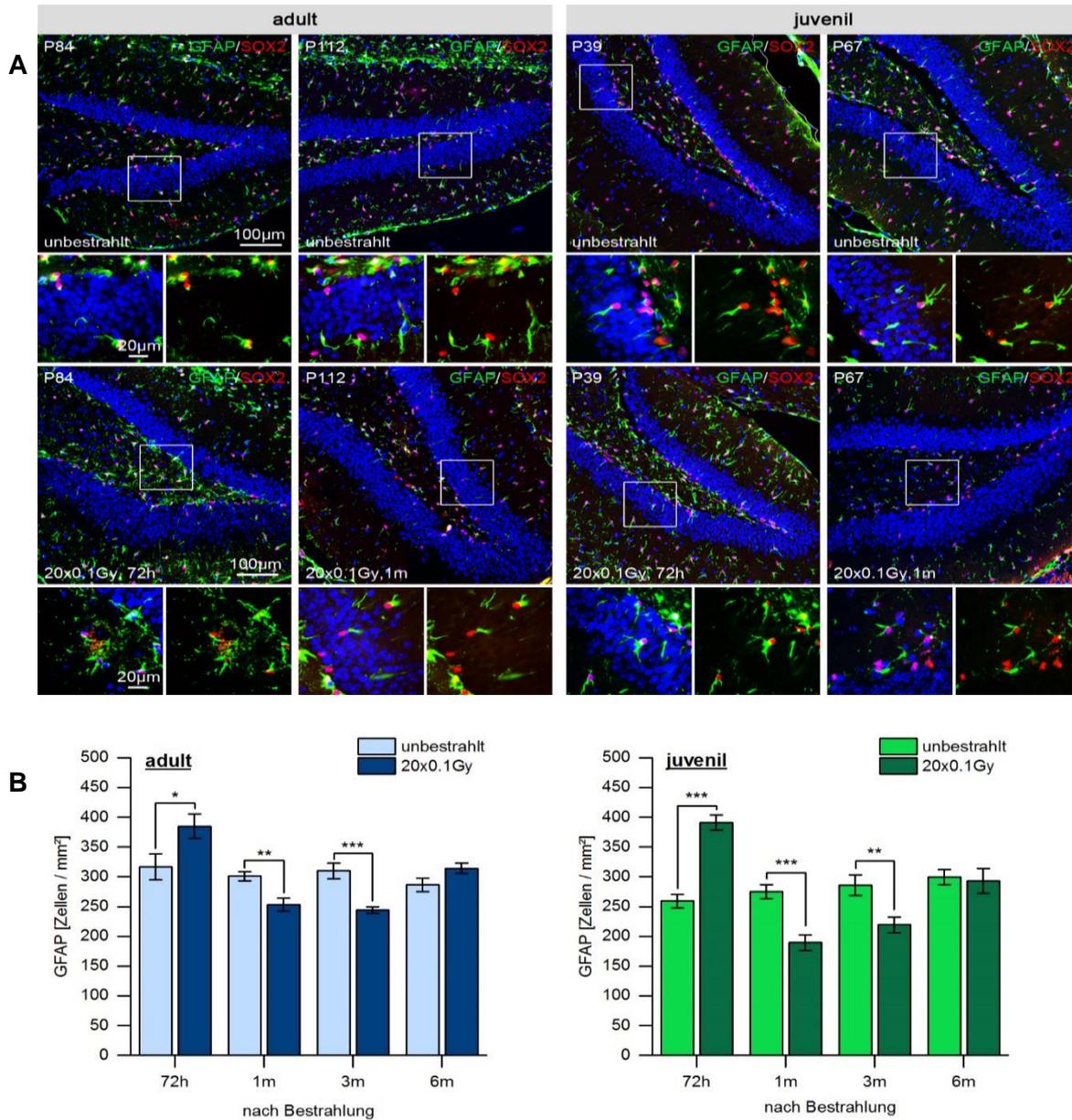
## 4.5 Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf Gliazellen

Im Säugetiergehirn sind etwa 90% der Zellen Gliazellen, was in etwa einer Zellzahl von knapp einer Billionen ( $10^{12}$ ) entspricht (Azevedo *et al.*, 2009). Ihre Funktionen sind vielfältig, wie bereits in Kapitel 2.6 näher erläutert wurde. Um zu untersuchen, ob auch nicht-neurale Zellen durch eine fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung beeinflusst werden, wurden die drei verschiedenen Gliazelltypen mithilfe spezifischer Marker untersucht.

### 4.5.1 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu veränderten Zellzahlen der Astrozyten

Astrozyten sind, wie in Kapitel 2.6 erläutert, ein wichtiger funktioneller Bestandteil des Säugerhirns. Ihnen kommen Aufgaben wie die Versorgung und Entsorgung von Neuronen, die Verstärkung der synaptischen Übertragung und die Entstehung der Blut-Hirn-Schranke zu. Um den Einfluss der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Astrozyten zu untersuchen, wurden diese mithilfe von GFAP und SOX2 markiert (s. Abbildung 4.19), innerhalb des gesamten *Gyrus Dentatus* (inklusive Hilus) quantifiziert und im Verhältnis zur Fläche der Granularzellschicht angegeben. GFAP markiert die Intermediärfilamente im Zytoplasma von Astrozyten und wird in der Diagnostik bereits als Marker für Hirn- bzw. Gliatumoren (Astrozytom,

Gliablastom) sowie für Gehirnerschütterungen angewendet, da GFAP aufgrund des Traumas durch die Blut-Hirn-Schranke in das Blut abgegeben wird (Papa *et al.*, 2015).

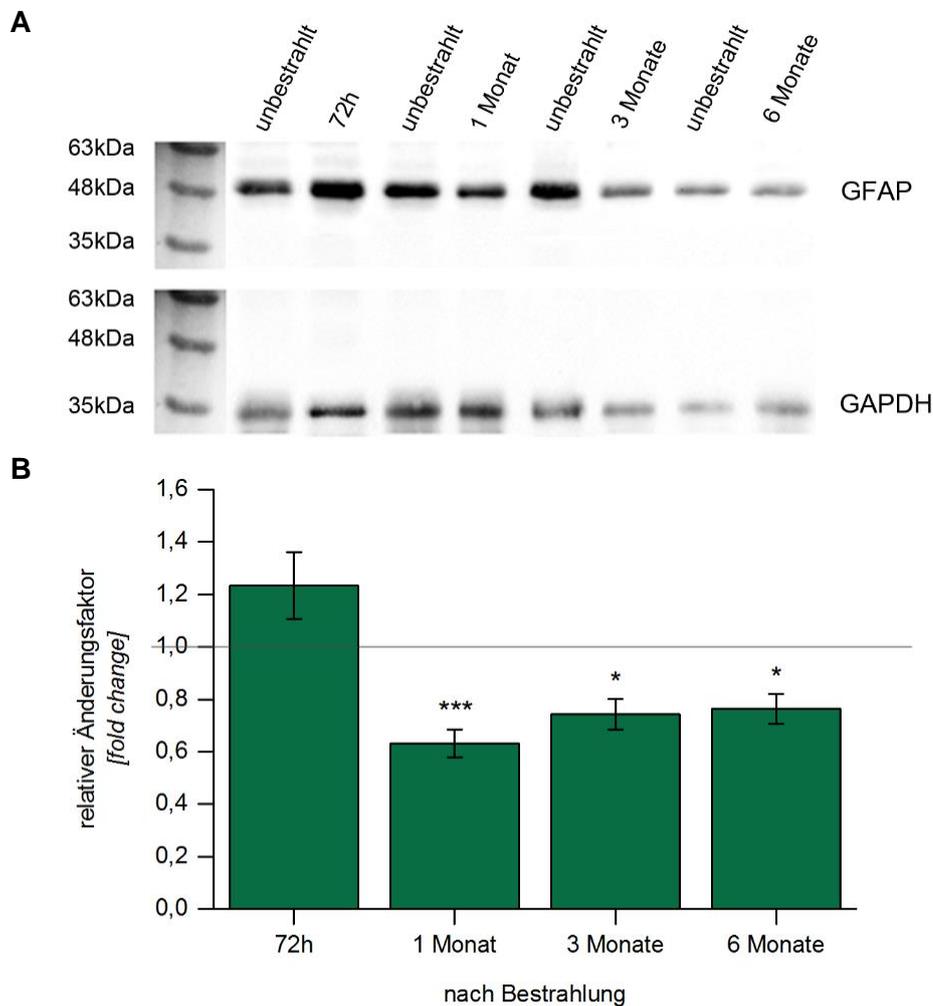


**Abbildung 4.19: GFAP-positive Astrozyten in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen**

(A) 1. und 2. Spalte: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von GFAP (grün) und SOX2 (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von Mäusen im Alter von etwa 12 (P4) oder 16 Wochen (P112) sowie die altersentsprechende, adult-bestrahlte Proben 72h oder 1 Monat nach 20x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Unterhalb der Übersichtsaufnahmen sind Detailaufnahmen der markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die einzelnen Fluoreszenzkanäle separat für GFAP (grün) und SOX2 (rot). 3. und 4. Spalte: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von GFAP (grün) und SOX2 (rot) eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von Mäusen im Alter von etwa 5 (p39) und 9 Wochen (P67) sowie die altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Proben 72h und 1 Monat nach 20x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Unterhalb der Übersichtsaufnahmen sind Detailaufnahmen der markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die einzelnen Fluoreszenzkanäle separat für GFAP (grün) und SOX2 (rot). (B) Quantifizierung der GFAP-positiven Zellen im gesamten *Gyrus Dentatus* im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus*. Links sind die adult-bestrahlten C57BL6-Mäuse und rechts die juvenil-bestrahlten C57BL6-Mäuse abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte der GFAP-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Wie in Abbildung 4.19 dargestellt, war die Astrozyten-Population 72 Stunden nach Ende der Bestrahlung mit 20x0.1 Gy signifikant erhöht. In den adult-bestrahlten Mäusen kam es zu einem Anstieg um 20% (unbestrahlt:  $316.6 \pm 21.3$ ; 20x0.1 Gy, 72h:  $384.9 \pm 20.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(29) = -2.31$ ,  $p = 0.028$ ), während sich in den juvenil-bestrahlten Mäusen der Astrozytenanteil sogar um 50% erhöhte (unbestrahlt:  $259.1 \pm 11$ ; 20x0.1 Gy, 72h:  $391.1 \pm 12.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(34) = -7.76$ ,  $p < 0.001$ ). Einen Monat sowie drei Monate nach Bestrahlungsende zeigte sich hingegen eine Abnahme der GFAP-positiven Zellen im bestrahlten Hippocampus unabhängig vom Alter während der Bestrahlung. In den adult bestrahlten Mäusen waren einen Monat nach Bestrahlung 48 GFAP-positive Zellen/mm<sup>2</sup> weniger im Hippocampus im Vergleich zu der altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (95%-CI[20.58, 74.73]) nachweisbar. Am stärksten war die Abnahme mit 22% drei Monate nach Ende der Bestrahlung in den adult-bestrahlten Mäusen (unbestrahlt:  $300.9 \pm 13.3$ ; bestrahlt:  $253.2 \pm 11.1$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(31) = 4.69$ ,  $p < 0.001$ ). Die juvenil-bestrahlten Mäuse zeigten die höchste Abnahme um etwa 30% bereits einen Monat nach Bestrahlung (unbestrahlt:  $274.9 \pm 12.1$ ; bestrahlt:  $189.3 \pm 12.8$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(33) = 3.94$ ,  $p < 0.001$ ). Drei Monate nach Bestrahlung war die GFAP-Zellzahl noch um 67 Zellen/mm<sup>2</sup> reduziert, was einer Abnahme um 25% entspricht (95%-CI[22.01, 111.23]). Sechs Monate nach Bestrahlungsende war kein Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben mehr ersichtlich, unabhängig vom Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Eine altersabhängige Veränderung der GFAP-Population war hier nicht erkennbar (5 Wochen:  $259.1 \pm 11$ ; 38 Wochen:  $286.5 \pm 11.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(33) = -1.729$ ,  $p = 0.093$ ).

## 4.5.1.1 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zur veränderten Expression von GFAP

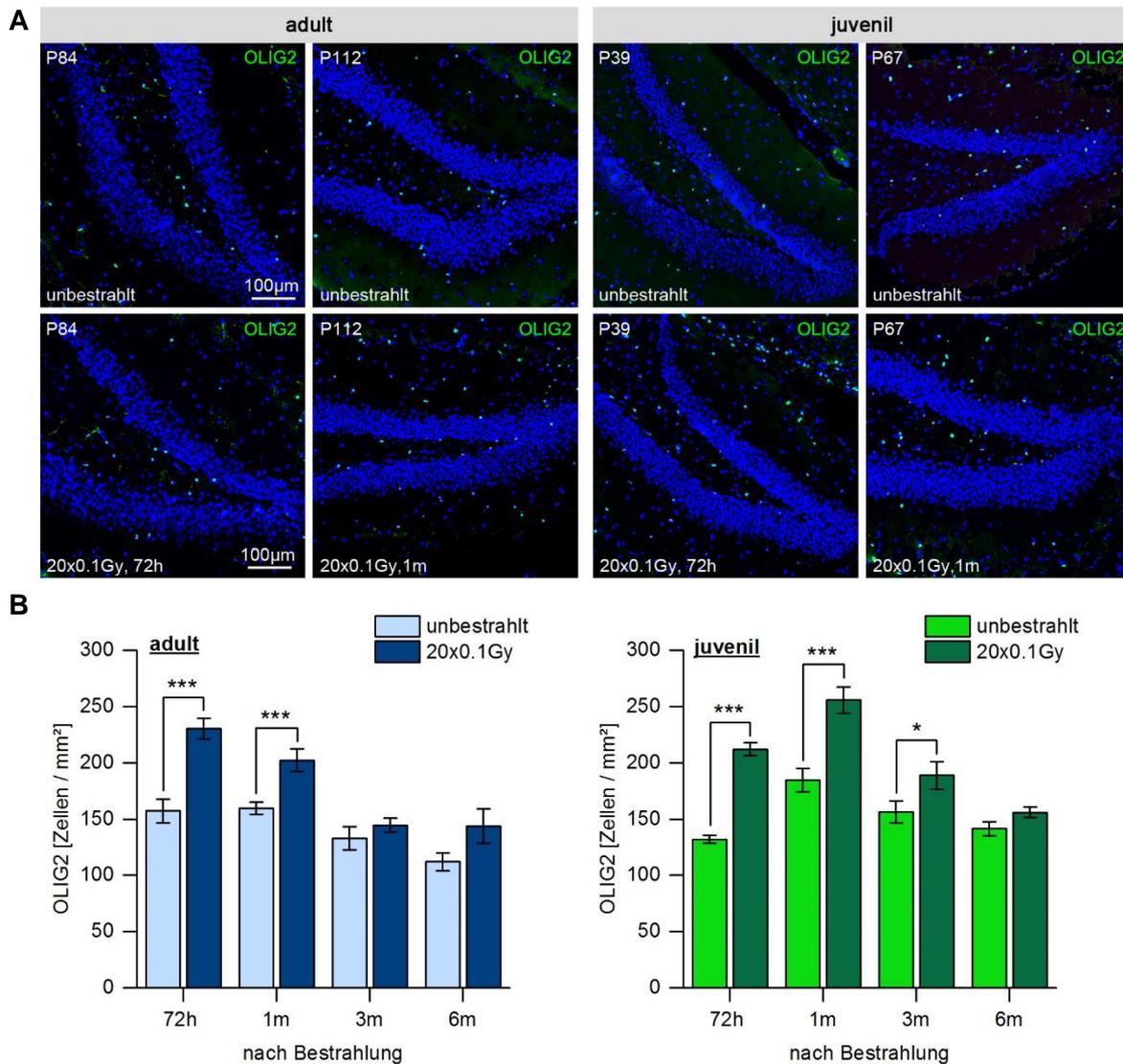
**Abbildung 4.20: Westernblot-Analyse der Expressionslevel von GFAP**

(A) exemplarischer Westernblot für GFAP von hippocampalen Lysaten der unbestrahlten und bestrahlten (20x0.1 Gy) Mäuse zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung (72h, 1 Monat, 3 und 6 Monate) sowie der dazugehörige Westernblot für das Haushaltsgen GAPDH (B) Relative Änderung der Expression (*fold change*) von GFAP zu allen Zeitpunkten nach Bestrahlung jeweils im Vergleich und normalisiert zur entsprechenden altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (graue Linie: *fold change* = 1 = keine Veränderung). Die Expressionslevel von PSD-95 wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten GFAP-Expressionslevel sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Abbildung 4.20 zeigt, dass auch die relative Expression von GFAP im Westernblots nach 72 Stunden zunächst erhöht war ( $1.23 \pm 0.13$  *fold change*,  $t(19) = -1.56$ ,  $p = 0.136$ ). Nach einem Monat hingegen war die Expression stark unterdrückt ( $0.63 \pm 0.05$  *fold change*,  $t(25) = 4.02$ ,  $p < 0.001$ ) und blieb bis zu sechs Monate nach Bestrahlung deutlich gehemmt ( $0.76 \pm 0.06$  *fold change*,  $t(21) = 2.27$ ,  $p = 0.034$ ).

#### 4.5.2 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu einer Abnahme der Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des Gehirns, deren Hauptaufgabe darin besteht Axone für eine verbesserte Signalweiterleitung zu myelinisieren. Der Einfluss der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Oligodendrozyten wurde mithilfe des Markers OLIG2 untersucht. Hierfür wurden die positiven Zellen innerhalb der GCL und des Hilus quantifiziert und im Verhältnis zur Fläche des Granularzellschicht angegeben.

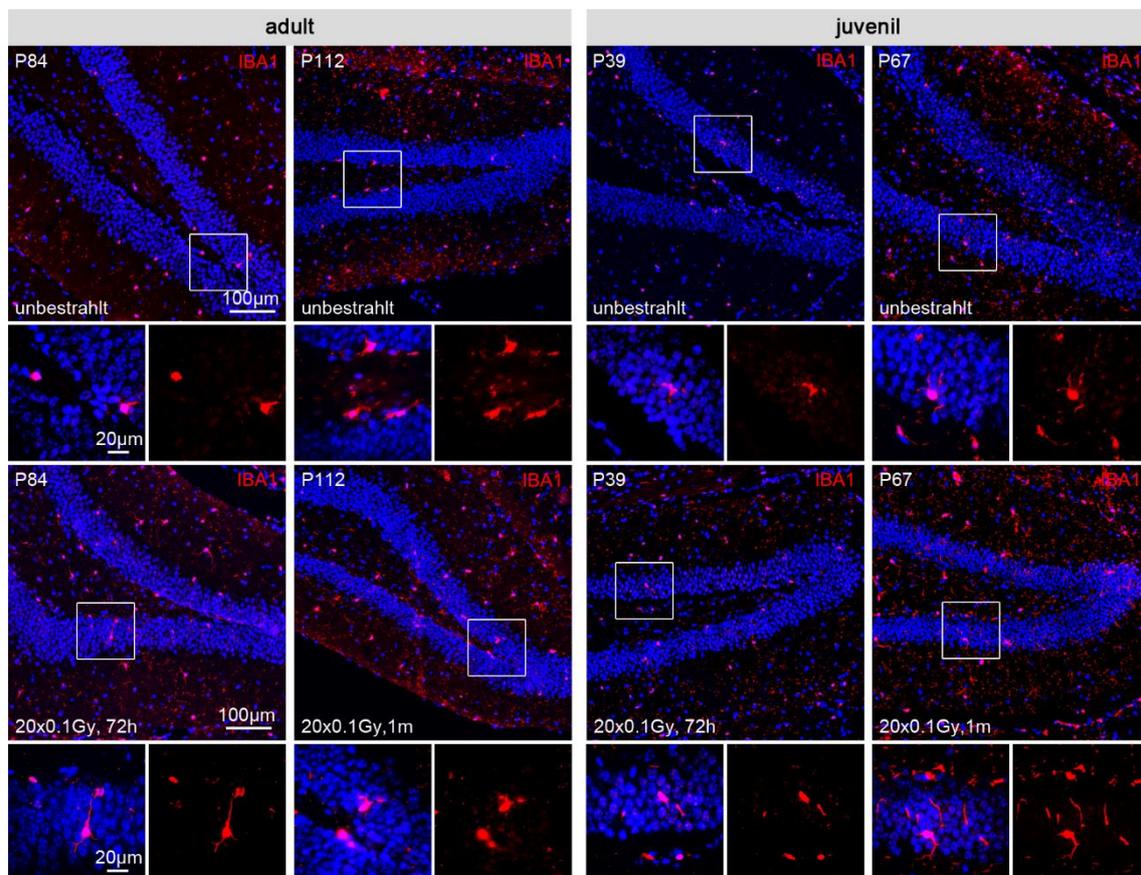


**Abbildung 4.21: OLIG2-positive Oligodendrozyten in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen** (A) 1. und 2. Spalte: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von OLIG2 (grün) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von Mäusen im Alter von etwa 12 (P4) oder 16 Wochen (P112) sowie die altersentsprechenden, adult-bestrahlten Proben 72h oder 1 Monat nach 20x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. 3. und 4. Spalte: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von OLIG2 (grün) eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von Mäusen im Alter von etwa 5 (p39) und 9 Wochen (P67) sowie die altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Proben 72h und 1 Monat nach 20x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. (B) Quantifizierung der OLIG2-positiven Zellen im gesamten *Gyrus Dentatus* im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus*. Links sind die adult-bestrahlten C57BL6-Mäuse und rechts die juvenil-bestrahlten C57BL6-Mäuse abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte der OLIG2-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Die Bestrahlung führte in den adult-bestrahlten Mäusen nach 72 Stunden zu einer deutlichen Zunahme der Oligodendrozyten um etwa 45% (unbestrahlt:  $157.2 \pm 10.5$ ; bestrahlt:  $230.1 \pm 9.2$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(25) = -5.06$ ,  $p < 0.001$ ) und nach einem Monat immerhin noch zu einem Anstieg um 25% (unbestrahlt:  $159.8 \pm 5.5$ ; bestrahlt:  $201.9 \pm 10.1$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(34) = -3.69$ ,  $p < 0.001$ ) (Abbildung 4.21). In den juvenil-bestrahlten Mäusen nahm die Anzahl der Oligodendrozyten 72 Stunden nach Bestrahlungsende um 50% zu (unbestrahlt:  $131.9 \pm 3.7$ ; bestrahlt:  $211.9 \pm 5.7$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(32) = -11.55$ ,  $p < 0.001$ ), d.h. in der bestrahlten Probe sind pro mm<sup>2</sup> 80 OLIG2-Zellen mehr zu finden (95%-CI[-93.99, -65.81]). Einen Monat nach Ende der Bestrahlung ergab sich immerhin noch eine Zunahme um 38% (unbestrahlt:  $184.6 \pm 10.1$ ; bestrahlt:  $255.6 \pm 11.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(34) = -4.53$ ,  $p < 0.001$ ) und auch drei Monate nach Bestrahlungsende war die Anzahl an OLIG2-positiven Zellen in der bestrahlten Probe noch leicht erhöht (unbestrahlt:  $156.3 \pm 9.6$ ; bestrahlt:  $188.7 \pm 12.2$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(31) = -2.07$ ,  $p = 0.047$ ). 6 Monate nach Beendigung der Bestrahlung konnten keine Unterschiede in der Zellzahl zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Gehirnen mehr beobachtet werden, unabhängig vom Alter während der Bestrahlung.

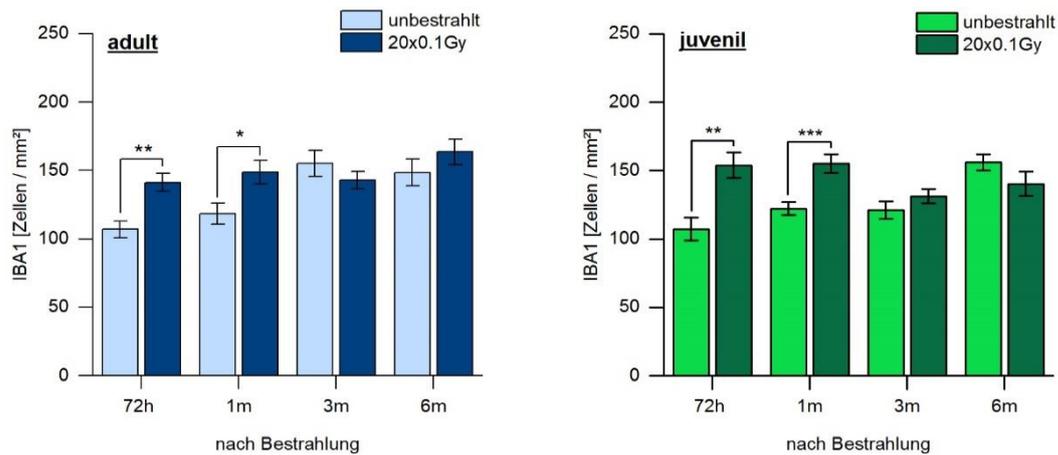
### 4.5.3 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zu einem Anstieg der Mikroglia

Um die Auswirkungen von fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Immunüberwachung des Gehirns zu untersuchen, wurden die Mikroglia mithilfe des Markers IBA1 erfasst. Mikroglia besitzen Makrophagen-ähnliche Eigenschaften und können neuronale Trümmer phagozytieren und Zytokine sekretieren. Die Quantifizierung der IBA1-positiven Zellen wurde von Ben Hammer im Rahmen seiner Dissertation zur Erlangung des Grades Dr. med. durchgeführt.



**Abbildung 4.22: IBA1-positive Mikroglia in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen**

1. und 2. Spalte: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von IBA1 (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von Mäusen im Alter von etwa 12 (P4) oder 16 Wochen (P112) sowie die altersentsprechende, adultbestrahlte Proben 72h oder 1 Monat nach 20x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Unterhalb der Übersichtsaufnahmen sind Detailaufnahmen der markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die einzelnen Fluoreszenzkanäle separat für IBA1 (rot). 3. und 4. Spalte: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von IBA1 (rot) eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* von Mäusen im Alter von etwa 5 (p39) und 9 Wochen (P67) sowie die altersentsprechenden, juvenilbestrahlten Proben 72h und 1 Monat nach 20x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Unterhalb der Übersichtsaufnahmen sind Detailaufnahmen der markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die einzelnen Fluoreszenzkanäle separat für IBA1 (rot).



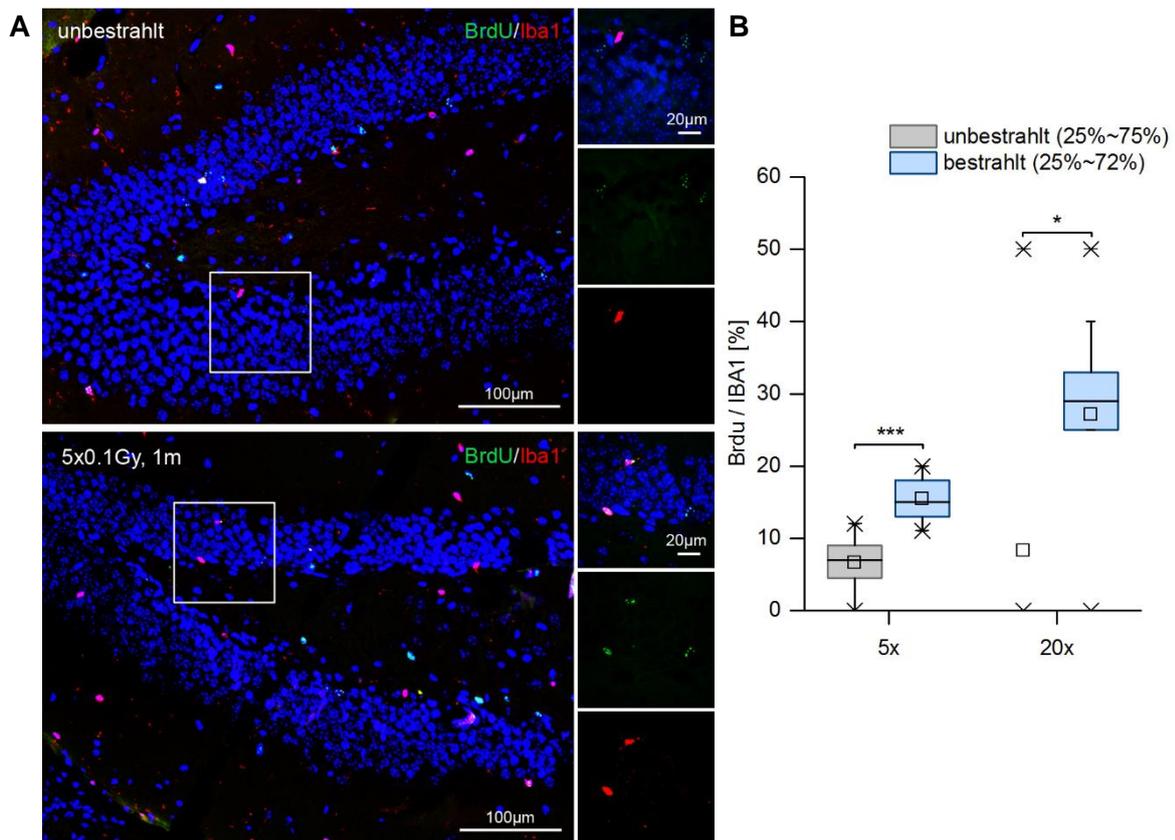
**Abbildung 4.23: Quantifizierung der IBA1-positiven Mikroglia in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen**

Quantifizierung der Iba1-positiven Zellen im gesamten *Gyrus Dentatus* im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus*. Links sind die adult-bestrahlten C57BL6-Mäuse und rechts die juvenil-bestrahlten C57BL6-Mäuse abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte der IBA1-positiven Zellen sowie der Standardfehler für drei biologische und drei technische Replikate (n=3). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Abbildung 4.23 zeigt, dass fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung 72 Stunden nach Applikation der letzten Strahlendosis (20x0.1 Gy) zu einem signifikanten Anstieg der Mikroglia führte. In den adult-bestrahlten Gehirnen kam es zu einem Anstieg um 33% gegenüber der altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (unbestrahlt:  $106.9 \pm 6.2$ ; bestrahlt:  $141.3 \pm 6.4$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(30) = -3.84$ ,  $p = 0.001$ ). In den juvenil-bestrahlten Mäusen erhöhte sich der Anteil sogar um knapp 50% (unbestrahlt:  $107.3 \pm 8.3$ ; bestrahlt:  $154 \pm 9.2$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $t(32) = -3.79$ ,  $p = 0.001$ ). Weitere vier Wochen nach Bestrahlung ist die Population der Mikroglia in den bestrahlten Mäusen noch 25% höher, unabhängig vom Alter zum Zeitpunkt der Bestrahlung (adult: unbestrahlt:  $118.3 \pm 7.8$ ; bestrahlt:  $148.92 \pm 8.62$ ;  $t(31) = -2.63$ ,  $p = 0.013$ ; juvenil: unbestrahlt:  $122.1 \pm 4.8$ ; bestrahlt:  $155 \pm 6.8$  Zellen/mm<sup>2</sup>  $t(33) = -3.99$ ,  $p < 0.001$ ). Dies entspricht einer Zunahme von 30 Mikroglia/mm<sup>2</sup> im adult-bestrahlten Hippocampus (95%-CI[-54.4, -6.89]) und einer Zunahme von 33 Mikroglia/mm<sup>2</sup> im juvenil-bestrahlten Hippocampus (95%-CI[-49.63, -16.09]).

### 4.5.3.1 Repetitive Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt zur erhöhten Proliferation der Mikroglia

Die Untersuchung, ob die gesteigerte Anzahl an Mikroglia durch eine vermehrte Rekrutierung aus den umliegenden Regionen zu Stande kommt, wurde mithilfe einer BrdU-Markierung durchgeführt (Kapitel 3.2.2.2). Vier Wochen nach Bestrahlung wurden die Zellen, die sowohl für BrdU als auch für IBA1 positiv sind, quantifiziert.



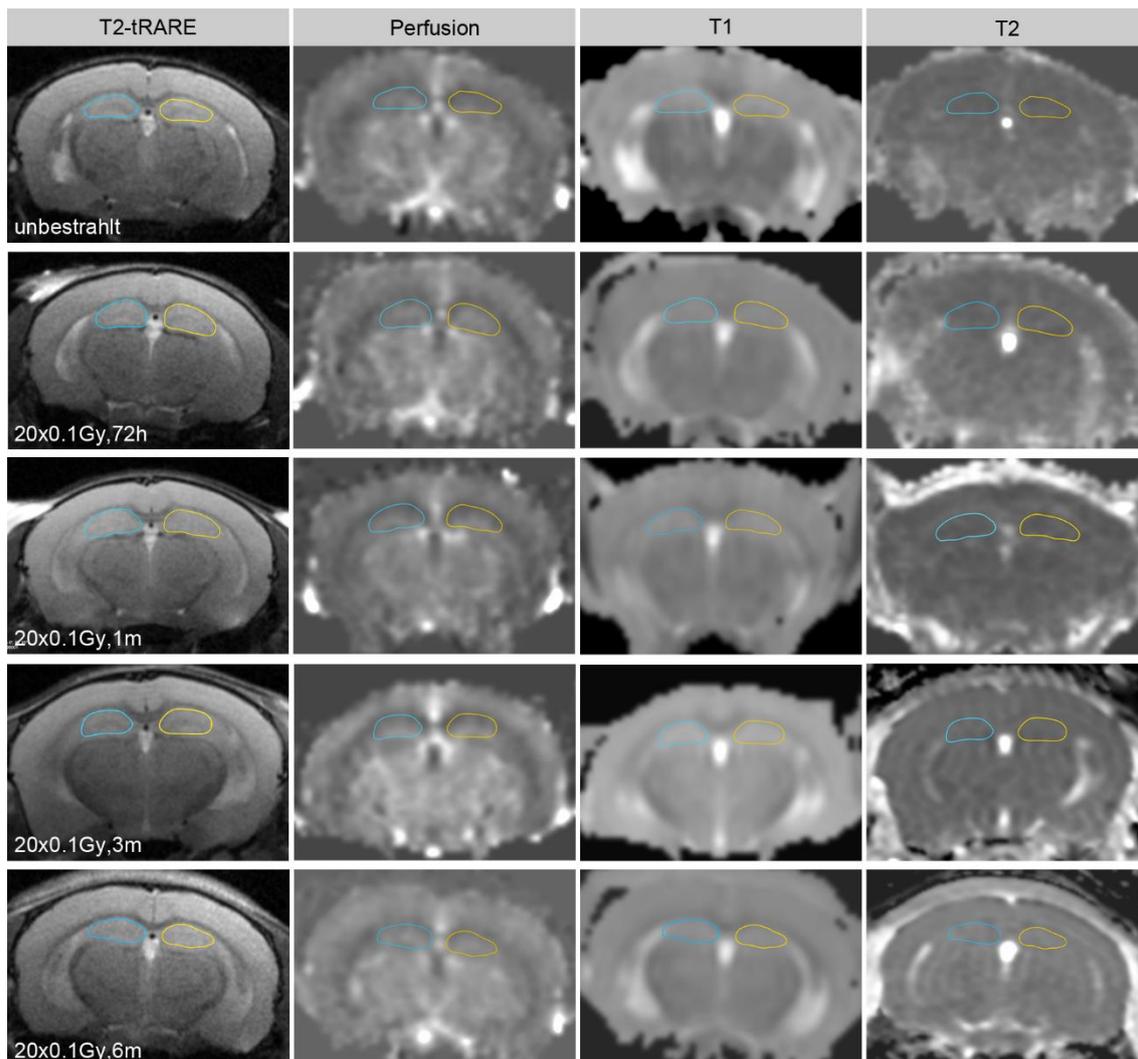
**Abbildung 4.24: BrdU-labeling der Mikroglia**

(A) links: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen von BrdU (grün) und IBA1 (rot) innerhalb eines unbestrahlten *Gyrus Dentatus* einer Maus im Alter von 7 Wochen sowie in der altersentsprechenden, juvenil-bestrahlten Probe 1 Monat nach 5x0.1 Gy in 200-facher Auflösung. Neben den Übersichtsaufnahmen werden die markierten Bildausschnitte in 1000-facher Auflösung gezeigt sowie die einzelnen Farbkanäle separat mit BrdU (grün) und Iba1 (rot). (B) Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen und einem weiteren Marker für Mikroglia (IBA1) im Verhältnis zur Fläche des jeweiligen *Gyrus Dentatus* nach einer Dosis von 5x0.1 Gy oder 20x0.1 Gy. Die Markierung mit BrdU erfolgte hierbei in der letzten Woche der Bestrahlung (15-20x) durch tägliche Injektionen von 50mg/g KG BrdU. Die ermittelten Zellzahlen zeigen keine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ) und werden als Boxplot mit unterem und oberem Quantil, dem Median sowie dem Minimum und Maximum ‚Whisker‘ dargestellt ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Test beurteilt und mit  $*p < 0.05$ ;  $***p < 0.001$  angegeben.

Die Quantifizierung der doppelt-markierten Zellen nach Bestrahlung ergab eine signifikante Zunahme der proliferierenden Mikroglia (Abbildung 4.24). Sowohl nach der Applikation von 5x0.1 Gy als auch nach 20x0.1 Gy erhöhte sich die Anzahl der proliferierenden Mikroglia signifikant. (5x0.1 Gy: unbestrahlt:  $Mdn = 7$ ; bestrahlt:  $Mdn = 15$ ;  $U = 2.5$ ,  $p < 0.001$ ; 20x0.1 Gy: unbestrahlt:  $M_{Rang} = 11.61$ ; bestrahlt:  $M_{Rang} = 20.31$ ,  $U = 57.5$ ,  $p = 0.005$ ).

## 4.6 In-vivo Untersuchungen mittels Kleintier-MRT

Die Auswirkungen fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung, die bereits in-vivo im Hippocampus festgestellt werden können, wurden mithilfe nicht-invasiver MRT-Untersuchungen erfasst. Hierzu wurden juvenil-bestrahlte Mäuse wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben analysiert. Die Untersuchungen erfolgten im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlungsende (72 Stunden, 1 Monat, 3 und 6 Monate) an denselben Mäusen. In Abbildung 4.25 wurde exemplarisch zu jedem Zeitpunkt nach der Bestrahlung jeweils ein Bild der erfolgten Untersuchung dargestellt.

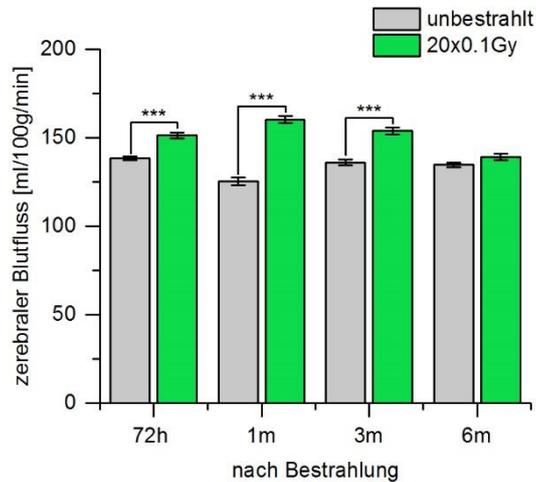


**Abbildung 4.25: MRT-Bilder der einzelnen untersuchten Paradigma mittels 9.4T Kleintier-MRT**

1. Spalte: T2-gewichtete anatomische Darstellung eines axial aufgenommenen Mausgehirns, in der die untersuchte *region of interest* (ROI; Hippocampus) definiert wurde, um sie anschließend auf die jeweiligen anderen Untersuchungen zu übertragen. Von oben nach unten ist zunächst das Gehirn einer unbestrahlten Maus und darunter das einer bestrahlten Maus 72h, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach Bestrahlungsende zu sehen. 2. Spalte: Perfusionskarte aus ASL-Experiment, Graustufencodierung derselben koronaren Schicht mit derselben gemessenen ROI wie in Spalte 1. 3. Spalte: Darstellung der T1-Relaxationszeiten derselben koronaren Schicht mit derselben gemessenen ROI wie in Spalte 1. 4. Spalte: Darstellung der T2-Relaxationszeiten derselben koronaren Schicht mit derselben gemessenen ROI wie in Spalte 1.

#### 4.6.1 Perfusionsgewichteter MRT

Der Einfluss fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf den Blutfluss im Gehirn erfolgte mithilfe einer perfusionsgewichteten MRT-Untersuchung, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben.



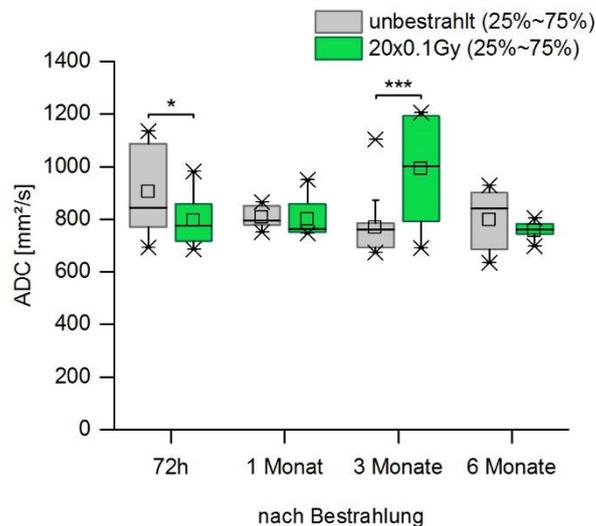
**Abbildung 4.26: Hippocampaler Blutfluss nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung**

Quantifizierung des zerebralen Blutflusses mithilfe einer perfusionsgewichteten MRT-Untersuchung innerhalb der Hippocampusregion 72h, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy in juvenil-bestrahlten Mäusen (P11 bei Bestrahlungsbeginn) im Vergleich zu der jeweils altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle. Die ermittelten Werte zeigen eine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk ( $p > 0.05$ ) und werden pro Zeitpunkt als Mittelwert dargestellt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei biologischen und drei technischen Replikaten dar ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des ungepaarten T-Tests beurteilt und mit  $***p < 0.001$  angegeben.

Die Werte der drei unabhängigen Messungen der drei biologischen Replikate ( $n=3$ ) wiesen eine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk auf ( $p > 0.05$ ), weshalb zu jedem Zeitpunkt die Mittelwerte mit ihrem Standardfehler dargestellt wurden. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde ein ungepaarter T-Test durchgeführt und zeigte bis zu drei Monate nach Bestrahlungsende, dass der zerebrale Blutfluss im Hippocampus der bestrahlten Mäuse signifikant höher ist als bei den altersgerechten, unbestrahlten Kontrolltieren (Abbildung 4.26). Bereits 72 Stunden nach Bestrahlung wiesen die bestrahlten Mäuse ( $151.2 \pm 1.5$  ml/100g/min) einen erhöhten zerebralen Blutfluss gegenüber der altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle ( $138.2 \pm 1.1$  ml/100g/min) auf,  $t(33) = -6.67$ ,  $p < 0.001$ . Der stärkste Anstieg des zerebralen Blutflusses um 32.7 ml/100g/min zeigte sich einen Monat nach Bestrahlung, was in etwa einer Erhöhung um 30% entspricht (95%-CI[-40.86, 24.57]). Drei Monate nach Bestrahlungsende war der Blutfluss noch immer erhöht (unbestrahlt:  $135.9 \pm 1.8$ ; bestrahlt:  $153.8 \pm 2.1$  ml/100g/min;  $t(34) = -6.6$ ,  $p < 0.001$ ), bevor er sich nach 6 Monaten wieder stabilisierte und keine Unterschiede mehr nachweisbar waren (unbestrahlt:  $134.5 \pm 1.3$ ; bestrahlt:  $139.1 \pm 1.9$  ml/100g/min;  $t(28) = -2.3$ ,  $p = 0.057$ ).

#### 4.6.2 Diffusionsgewichtetes MRT

Für die Auswirkungen von fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf die Bewegung der Wassermoleküle im Gehirn wurde eine diffusionsgewichtete MRT-Untersuchung wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben durchgeführt.



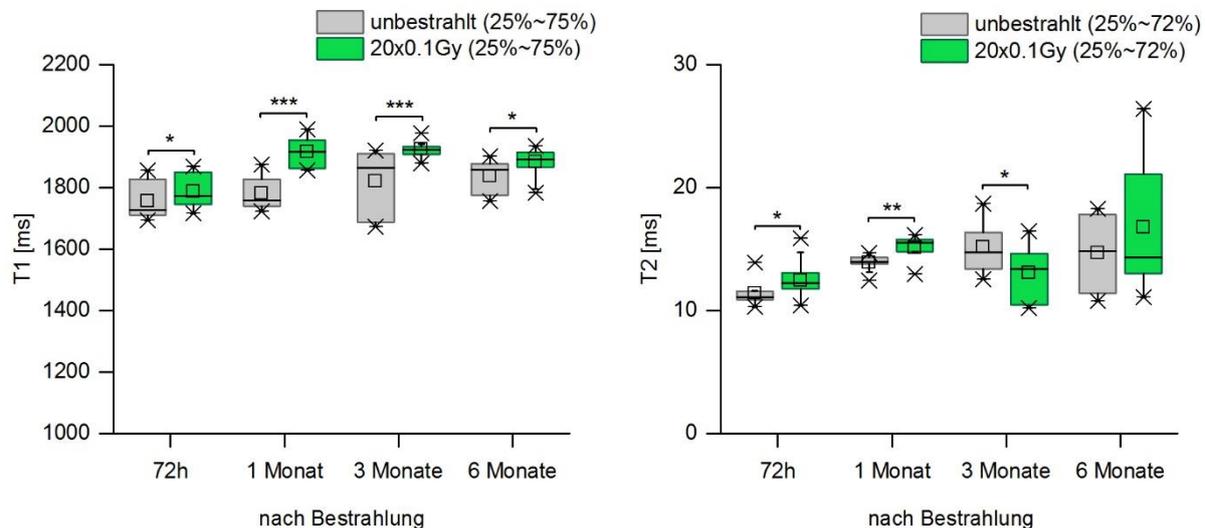
**Abbildung 4.27: Hippocampale Wasserbewegung nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung**

Quantifizierung der gerichteten Wasserbewegung mithilfe einer diffusionsgewichteten MRT-Untersuchung innerhalb der Hippocampusregion 72h, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy in juvenil-bestrahlten Mäusen (P11 bei Bestrahlungsbeginn) im Vergleich zu der jeweils altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle. Die ermittelten ADC-Werte (*apparent diffusion coefficient*) zeigen keine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ) und werden als Boxplot mit unterem und oberem Quantil, dem Median sowie dem Minimum und Maximum, 'Whisker' dargestellt ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Test beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Die ADCs der drei unabhängigen Messungen dreier biologischer Replikate ( $n=3$ ) wurden aufgrund fehlender Normalverteilung nach Shapiro-Wilk auf ( $p < 0.05$ ) als Median dargestellt. Der Mann-Whitney-U-Test gab Aufschluss über die statistische Signifikanz zwischen der unbestrahlten und bestrahlten Probe zum jeweiligen Zeitpunkt nach Bestrahlungsende. 72 Stunden nach Bestrahlungsende zeigte sich eine Reduktion des ADC im Hippocampus (unbestrahlt: Mdn = 843; bestrahlt: Mdn = 776; U = 76;  $p = 0.05$ ) (Abbildung 4.27). Einen Monat nach Bestrahlungsende zeigte sich keine Veränderung des ADC zwischen beiden Gruppen (unbestrahlt: Mdn = 794.5; bestrahlt: Mdn = 763.5; U = 120,  $p = 0.189$ ). Nach drei Monaten zeigte sich hingegen ein umgekehrter Effekt. Bestrahlte Mäuse wiesen höhere Messwerte (Mdn = 1002.5) auf als altersgerechte, unbestrahlte Versuchstiere (Mdn = 760),  $p < 0.001$  (U = 46). Sechs Monate nach Ende der Bestrahlungsbehandlung zeigte sich erneut kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren (unbestrahlt: Mdn = 841; bestrahlt: Mdn = 760.5; U = 96,  $p = 0.235$ ).

### 4.6.3 Relaxationszeiten T1 und T2

Über die Relaxationszeiten T1 und T2 können mögliche Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung des Wasser- und Fettgehalts verschiedener Gewebe untersucht werden.



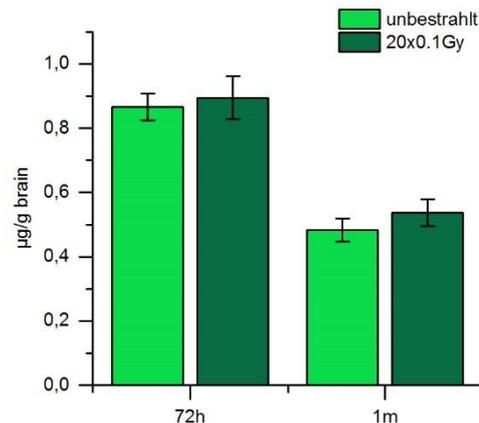
**Abbildung 4.28: Hippocampale Relaxationszeiten nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung**

Darstellung der T1 und T2 Relaxationszeiten innerhalb der Hippocampusregion 72h, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy in juvenil-bestrahlten Mäusen (P11 bei Bestrahlungsbeginn) im Vergleich zu der jeweils altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle. Die ermittelten T1- und T2-Werte zeigen keine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ) und werden als Boxplot mit unterem und oberem Quantil, dem Median sowie dem Minimum und Maximum ‚Whisker‘ dargestellt ( $n=3$ ). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Test beurteilt und mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  angegeben.

Die T1- und T2-Relaxationszeiten der drei unabhängigen Messungen dreier biologischer Replikate ( $n=3$ ) wiesen keine Normalverteilung nach Shapiro-Wilk auf ( $p < 0.05$ ) und wurden als Median im Boxplot dargestellt (Abbildung 4.28). Die Beurteilung der statistischen Signifikanz erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Bereits 72 Stunden nach Bestrahlungsende zeigte sich sowohl eine verlängerte T1- (unbestrahlt: Mdn = 1726.9; bestrahlt: Mdn = 1772.5;  $U = 88$ ,  $p = 0.019$ ) als auch eine längere T2-Relaxationszeit (unbestrahlt: Mdn = 11.1; bestrahlt: Mdn = 12.3;  $U = 89.5$ ,  $p = 0.021$ ) (Abbildung 4.28). Auch nach einem Monat waren beide Relaxationszeiten nach Bestrahlung erhöht (T1: unbestrahlt: Mdn = 1758.5; bestrahlt: Mdn = 1917.9;  $U = 9$ ,  $p < 0.001$ ) (T2: unbestrahlt: Mdn = 13.9; bestrahlt: Mdn = 15.5;  $U = 46$ ,  $p = 0.001$ ). Die T1-Relaxationszeit war auch noch drei Monate nach Bestrahlung stark erhöht (unbestrahlt: Mdn = 1865.6; bestrahlt: Mdn = 1923;  $U = 36$ ,  $p < 0.001$ ) und auch nach sechs Monaten war die T1-Relaxationszeit im bestrahlten Hippocampus (Mdn = 1891.5) leicht erhöht gegenüber der altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (Mdn = 1858.6),  $U = 66$ ,  $p = 0.002$ . Die T2-Relaxationszeit hingegen verkürzte sich drei Monate nach Bestrahlung (Mdn = 13.4) gegenüber der altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle (Mdn = 14.7),  $U = 90$ ,  $p = 0.022$ , bevor sie sich nach weiteren drei Monaten stabilisierte (unbestrahlt: Mdn = 14.8; bestrahlt: Mdn = 14.3),  $U = 77$ ,  $p = 0.2$ .

## 4.7 Einfluss auf Unversehrtheit der Blut-Hirn-Schranke

Die Untersuchung der strukturellen Integrität der Blut-Hirn-Schranke erfolgte mithilfe des Azofarbstoffs *EvansBlue*, der eine hohe Affinität zu Serumalbumin besitzt. Hierbei wurde die Konzentration von *EvansBlue* im Gehirn fünf Stunden nach der intraperitonealen Injektion des Farbstoffes gemessen (Kapitel 3.2.5).



**Abbildung 4.29: Konzentration von *EvansBlue* im murinen Gehirn**

Quantifizierung der Konzentration von *EvansBlue* im murinen Gehirn 72h und 1 Monat nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy in juvenil-bestrahlten Mäusen (P11 bei Bestrahlungsbeginn) im Vergleich zu der jeweils altersgerechten, unbestrahlten Kontrolle. Den Mäusen wurde 5 Stunden vor der zerebralen Dislokation eine 2%ige *EvansBlue*-Lösung intraperitoneal injiziert und die Konzentration anschließend mithilfe eines Multiplattenreaders, *Multiskan Ascent*, gemessen. Die Daten geben die gemessene Konzentration von *EvansBlue* im Verhältnis zum Gewicht der jeweiligen Gewebeprobe an. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei biologischen und drei technischen Replikaten dar (n=3).

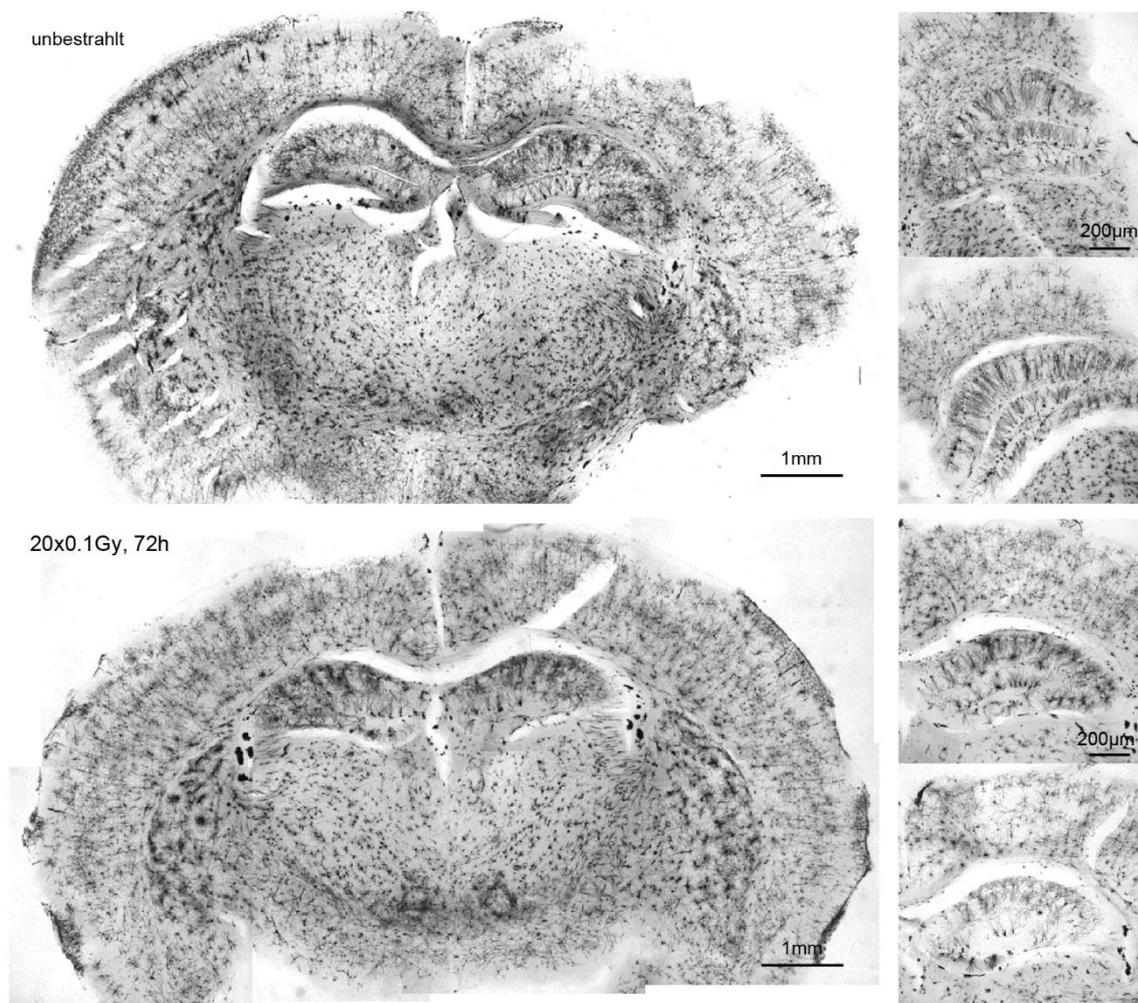
Die Auswertung der Konzentrationsmenge von *EvansBlue* im Gehirn von bestrahlten und unbestrahlten Mäusen ergab keine Unterschiede untereinander. Sowohl 72 Stunden als auch einen Monat nach Bestrahlung konnte keine gesteigerte Menge des Azofarbstoffes gemessen werden (Abbildung 4.29).

## 4.8 Golgi-Cox

Für die Darstellung von neuronalen Morphologien stellt die Imprägnierung mit verschiedenen Schwermetallen, wie bei der Golgi-Cox-Methode, eine geeignete Technik dar. Über die Ablagerungen im Gewebe können neuronale Netzwerke sichtbar gemacht werden, ohne dass sich die Signale überlagern, da nur etwa 1-3 % aller Neurone angefärbt werden. Werden die Proben zusätzlich zur Imprägnierung vorfixiert, so können neben den neuronalen Netzwerken auch Glia und ihre Verzweigungen sichtbar gemacht werden.

#### 4.8.1 Neuronale Imprägnierung

Die Imprägnierung der Mausproben mit dem in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Protokoll führte zu einer stabilen und reproduzierbaren Anfärbung des neuronalen Netzwerks im gesamten murinen Gehirn (Abbildung 4.30). Bei näherer Betrachtung der Hippocampi lässt sich bereits eine potentielle verminderte Ablagerung bzw. reduziertes Präzipitat im neuronalen Netzwerk der bestrahlten Probe erkennen (Abbildung 4.30 kleine Ausschnitte).

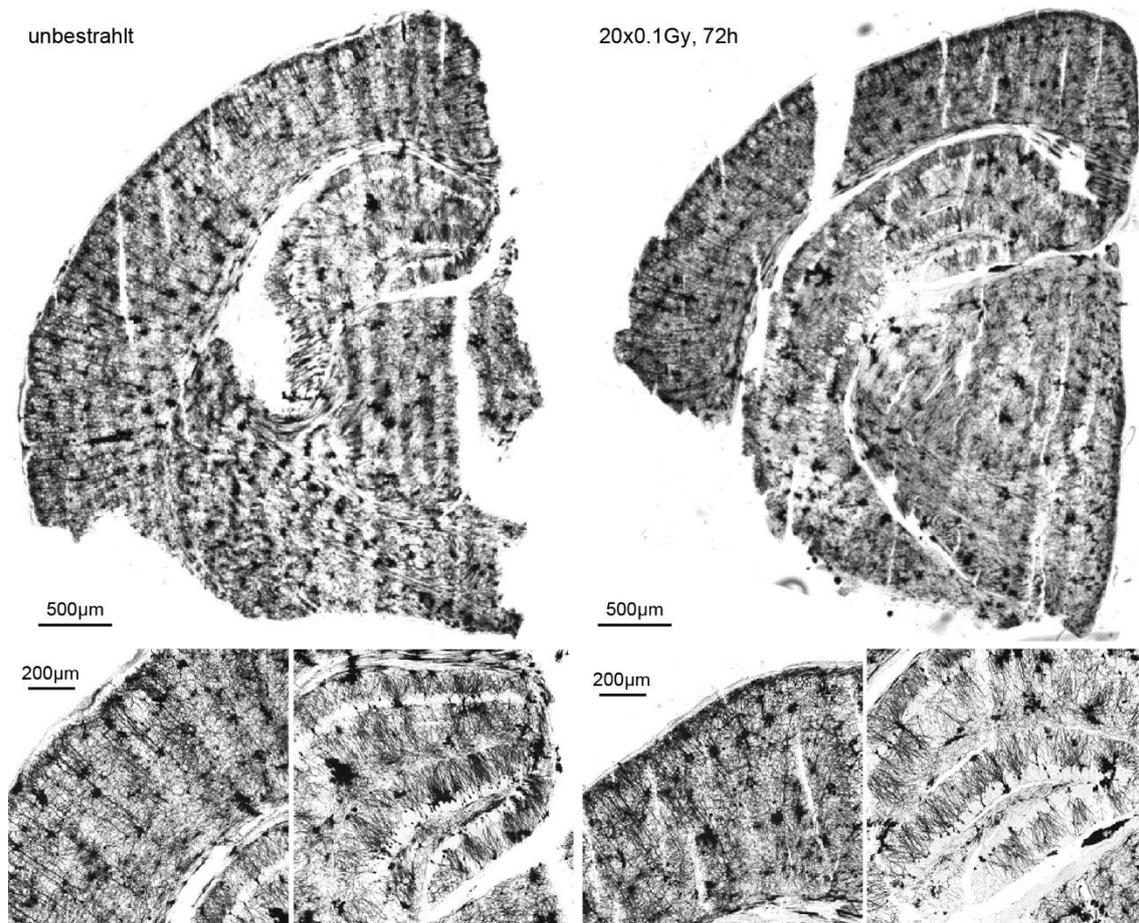


**Abbildung 4.30: Neuronale Golgi-Cox-Färbung**

Exemplarische Darstellung einer Übersichtsaufnahme der Golgi-Cox-Färbung für neuronale Morphologien einer koronaren Sektion eines murinen unbestrahlten sowie bestrahlten (20x0.1 Gy) Gehirns in 40-facher Auflösung. Auf der rechten Seite werden Hippocampi in 100-facher Vergrößerung gezeigt. Die Gehirne wurden im nativen Zustand in einer Kaliumchromat-, Kaliumdichromat- und Quecksilberchlorid-Lösung für 10 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert, bevor sie in einer Gewebeschutzlösung bis zur Sektion gelagert wurden. Die Sektion erfolgte an einem Vibratom mit einer Schnittdicke von 100µm. Die Schnitte wurden auf Gelatine-beschichteten Objektträger aufgefangen und die Ablagerungen mithilfe einer Ammoniaklösung und Natriumthiosulfatlösung sichtbar gemacht.

#### 4.8.2 Gliale Imprägnierung

Die Vorfixierung der Gehirne mit Paraform- und Glutaraldehyd vor dem eigentlichen Färbeprozess führte zu einer veränderten Darstellung der Schwermetallablagerungen im murinen Gehirn. Es waren hier deutlich größere Aggregate zu erkennen, was auf ein funktionierendes und stabiles Färbeprotokoll für Glia anstatt für Neurone hinweist. Hier waren augenscheinlich keine Veränderungen im bestrahlten und unbestrahlten Gehirn zu erkennen (Abbildung 4.31).



**Abbildung 4.31: Gliale Golgi-Cox-Färbung**

Exemplarische Darstellung einer Übersichtsaufnahme der Golgi-Cox-Färbung für gliale Morphologien einer koronaren Sektion eines murinen unbestrahlten sowie bestrahlten (20x0.1 Gy) Gehirns in 40-facher Auflösung. Unten werden Hippocampi und Cortex in 100-facher Vergrößerung gezeigt. Die Gehirne wurden zunächst in Paraformaldehyd und Glutaraldehyd vorfixiert bevor sie in einer Kaliumchromat-, Kaliumdichromat- und Quecksilberchlorid-Lösung für 10 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert wurden. Anschließend wurden sie in einer Gewebeschutzlösung bis zur Sektion gelagert. Die Sektion erfolgte an einem Mikrotom mit einer Schnittstärke von 40µm. Die Schnitte wurden auf Gelatine-beschichteten Objektträger aufgefangen und die Ablagerungen mithilfe einer Ammoniaklösung und Natriumthiosulfatlösung sichtbar gemacht.

## 5 Diskussion

Ionisierende Strahlung findet bereits seit einem Jahrhundert in der klinischen Strahlentherapie erfolgreich ihre Anwendung, um Krebserkrankungen zu therapieren und Tumorwachstum effektiv zu kontrollieren. Dabei sind die optimale Tumorkontrolle sowie die Reduzierung der Normalgewebstoxizitäten essentiell wichtig für den Erfolg der Radiotherapie und damit für das Überleben des Krebspatienten. Durch die Entwicklung fortschrittlicher Bestrahlungsmethoden wie dem IMRT summiert sich die benötigte Gesamtdosis durch die Applikation von Teildosen aus verschiedenen Richtungen im Tumor auf. Somit werden die im Normalgewebe applizierten Dosen zwar deutlich verringern, gleichzeitig erhöht sich jedoch das exponierte Volumen deutlich (Wannenmacher, 2006), wobei die Konsequenzen bisher nur unzureichend untersucht wurden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Auswirkungen einer repetitiven Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf gesunde murine Hippocampi und speziell auf die adulte Neurogenese untersucht. Es zeigte sich eine Akkumulation von persistierenden 53BP1-Foci mit steigender kumulativer Dosis sowie eine Beeinträchtigung der adulten Neurogenese. Diese spiegelte sich sowohl auf dem Stadium der SOX2-Stamm- als auch der DCX-Vorläuferzellen wider und konnte durch eine Störung des CREB-Signalweg, wie er mit einer durchgeführten Proteomanalyse eruiert wurde, bestätigt werden. Weiterhin zeigte sich eine verminderte Arborisation der DCX-Vorläuferzellen, die eine reduzierte Konnektivität der Vorläuferzellen bedingt. Die reduzierte synaptische Plastizität setzte sich im juvenil-bestrahlten Gewebe auf neuronaler Ebene fort und äußerte sich in einer verminderten Expression von PSD-95. Die repetitive Exposition mit niedrigen Strahlendosen führte außerdem zu einer Veränderung des Zellschicksals von der Neurogenese hin zur Gliogenese. Überhaupt zeigte sich eine veränderte Gliazellpopulation nach Bestrahlung, die vor allem aufgrund des erhöhten Aufkommens von Mikroglia auf eine neuroinflammatorische Reaktion hindeutet. Zu guter Letzt zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass bereits nicht-invasive Verfahren (MRT) Veränderungen aufzeigen können. Ionisierende Strahlung führte zu einem erhöhten zerebralen Blutfluss und veränderte die T1- und T2-Relaxationszeiten, was ebenfalls auf Neuroinflammation im Bereich des Hippocampus hindeutet. Abschließend zeigte sich die Relevanz des Alters zur Zeit der Strahlungsexposition, da sich die Auswirkungen in heranwachsenden Gehirnen ausgeprägter und langfristiger darstellten, was eine möglicher Erklärungsansatz für die festgestellten kognitiven Beeinträchtigungen nach einer pädiatrischen Radiotherapie wäre (Fouladi *et al.*, 2005; Hoppe-Hirsch *et al.*, 1995).

## 5.1 DNA-Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüchen mit Hilfe von 53BP1

Das Säugetiergehirn stellt ein hoch komplexes Netzwerk aus verschiedenen Zellen dar, die untereinander kommunizieren und Signale, in Form von Reizen, an entsprechende Areale übermitteln. Damit dies optimal funktionieren kann, ist es für den Organismus essentiell wichtig die Neuronenzahl und die genomische Integrität aufrechtzuerhalten, da ein Verlust von Neuronen sich oftmals in neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. Morbus Parkinson, niederschlagen kann (Bredesen *et al.*, 2006). Da es sich bei Neuronen um post-mitotische Zellen handelt, sind DSBs der häufigste Grund für den Verlust der genomischen Integrität oder sogar für die Einleitung des Zelltodes (Iyama und Wilson, 2013). Nach Auftreten eines DSBs versucht die Zelle zunächst über intrazelluläre DNA-Schadensreparatur-Mechanismen, die Veränderungen der DNA zu erkennen und diese möglichst schnell fehlerfrei zu beheben, um damit ihr Überleben zu garantieren. Die beiden Hauptwege, über die DSBs repariert werden können, stellen das nonhomologe End-Joining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) dar. Der Nachweis von Reparaturproteinen dieser beiden Reparaturwege hat sich in den letzten Jahren zur Identifizierung von DSBs bewährt, da diese im Umfeld von DSBs akkumulieren und so zur Bildung von RIFs beitragen. Die bekanntesten Reparaturproteine zum Nachweis von RIFs sind  $\gamma$ H2AX und 53BP1, da ihre Akkumulation am DSB in der Immunfluoreszenz als Focus visualisierbar ist (Rappold *et al.*, 2001; Rogakou *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000; Zgheib *et al.*, 2009). Eine deutliche Zunahme der Focizahl 10 Minuten nach einmaliger Applikation von 0.1 Gy zeigte sich durch die Markierung mit 53BP1, womit 53BP1 einen geeigneten Marker zum Nachweis von Niedrig-Dosis-induzierten DNA-Schäden darstellt (Grudzinski *et al.*, 2010; Schanz *et al.*, 2012). Auch die Tatsache, dass 53BP1 noch drei Tage nach Bestrahlung in kortikalen Neuronen nachweisbar ist, qualifiziert den Marker für eine Untersuchung von persistierenden DSBs nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung.

Die Auswirkungen von moderaten therapeutischen Strahlendosen (1,8 - 2 Gy) auf gesundes Normalgewebe wurden bereits eingehend untersucht (Mizumatsu *et al.*, 2003; Parihar und Limoli, 2013; Wilson *et al.*, 2010), während die Effekte von niedrigen Strahlendosen bisher unzureichend betrachtet worden sind. Da sich im Rahmen einer hochkonformalen Bestrahlung das Volumen an niedrig-Dosis-belasteten Areale jedoch stark erhöht, wird auch die Relevanz für Untersuchungen über potentielle Auswirkungen fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlungen gesteigert. Die Markierung mit 53BP1 ergab ein sehr geringes Aufkommen von spontan auftretenden Foci in den unbestrahlten hippocampalen Neurone, was auf eine hohe Effizienz in der Reparatur von neuronalen DSBs hinweist. Gegenüber ruhenden Zellen anderer Organe besitzen post-mitotische Neurone eine sehr geringe Anzahl an spontan auftretenden 53BP1-

Foci, um die Schadenslast so gering wie möglich zu halten (Schanz *et al.*, 2012). Die meisten der spontan auftretenden DSBs entstehen in post-mitotischen Neuronen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die während des normalen Zellmetabolismus entstehen (Mills *et al.*, 2003). Neurone besitzen aufgrund ihrer Aktivität einen verstärkten Sauerstoffverbrauch und auch das erhöhte Vorkommen von Mitochondrien in Neuronen potenziert die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von ROS, was eine Erklärung für das erhöhte Aufkommen von ROS-induzierte DSBs in Neuronen sein könnte (Floyd und Hensley, 2002). Auch das Alter scheint für die Reparatur von spontan auftretenden Foci in post-mitotischen Neuronen keine Rolle zu spielen, da keine Unterschiede zwischen den altersgerechten Kontrollen nachweisbar waren. Nach fraktionierter Bestrahlung mit 0.1 Gy ergab sich eine stetige Akkumulation von persistierenden 53BP1-Foci mit zunehmender kumulativer Dosis. Dabei war die Anzahl der persistierenden 53BP1-Foci unabhängig vom Alter der Mäuse zu Beginn der Bestrahlung. Lediglich eine leicht höhere Tendenz in den juvenil-bestrahlten Mäusen war nachweisbar, die durch die erhöhte Empfindlichkeit von jungen Mäusen gegenüber ionisierender Strahlung zu erklären wäre (Hudson *et al.*, 2011). Das höchste Level an 53BP1-Foci zeigte sich sowohl 72 Stunden als auch einen Monat nach Bestrahlungsende mit der höchsten kumulativen Dosis (20x 0.1 Gy). Bei den auftretenden persistierenden 53BP1-Foci muss es sich nicht zwangsläufig um in Reparatur befindliche DSBs handeln, sondern sie könnten zudem auf stabile Chromatinstrukturierungen hindeuten (Lorat *et al.*, 2016; Schanz *et al.*, 2012). In Neuronen konnte bereits gezeigt werden, dass zur Wahrung der genomischen Integrität DNA-Schäden in transkriptional-stillgelegtes Chromatin eingebettet werden, um einer fehlerhaften Transkription dieser DNA-Bereiche entgegen zu wirken, man bezeichnet dies als *persistent DNA damage foci* PDDF (Mata-Garrido *et al.*, 2016; Mata-Garrido *et al.*, 2018).

Bei Mäusen mit einem Defekt in der DNA-Schadensreparatur (Mutation in DNA-PKcs, ATM oder ATR) konnte bereits gezeigt werden, dass die strahlungsinduzierte Akkumulation von Schäden zu einer Beeinträchtigung der genomischen Integrität führt und dass dies negative Auswirkungen auf den Prozess der adulten Neurogenese hat (Enriquez-Rios *et al.*, 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch in reparaturprofizienten Wildtyp-Mäusen (C57BL6) die repetitive Bestrahlung mit 0.1 Gy zu einer Akkumulation von persistierenden 53BP1-Foci führt. Dies hat die Beeinträchtigung der genomischen Integrität zur Folge, die wiederum in einer verminderten Neurogeneseleistung resultiert, wie sie im nächsten Kapitel näher ausgeführt wird.

## 5.2 Strahleninduzierte Beeinträchtigung der adulten Neurogenese

Der Hippocampus ist eine der wenigen neurogenen Nischen im Gehirn, in dem durch adulte Neurogenese neue Neurone aus einem bestehenden Stammzellpool über ein stark proliferierendes Vorläuferzellen ausdifferenzieren können. Proliferierende Zellen sind für ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung bekannt. Bereits die Applikation einer einzelnen therapeutischen Dosis von 2 Gy oder einer hohen Dosis von 10 Gy hatte in verschiedenen Studien eine drastische Abnahme an proliferierenden Zellen zur Folge (Mizumatsu *et al.*, 2003). Proliferierende Zellen in der G2/M-Phase haben nicht genügend Zeit um Schäden bis zum Eintritt der Mitose zu reparieren, weshalb diese Zellen gezielt in Apoptose gehen. Auch die Experimente dieser Arbeit zeigten einen starken Rückgang der proliferierenden Zellen in den juvenil-bestrahlten Mäusen und dies bis zu sechs Monate nach Applikation der letzten Dosis. In den adult-bestrahlten Mäusen hingegen zeigten sich bereits 72 Stunden nach Ende der Bestrahlung keine Änderung der Ki67-positiven Zellzahl. Während also die Proliferation in den juvenil-bestrahlten Mäusen nachhaltig und andauernd gehemmt wurde, führte sie in erwachsenen Mäusen nicht zu einer langfristigen Beeinträchtigung der Proliferationsrate. Als Grund hierfür könnten zum Beispiel gelten, dass in den juvenilen Mäusen die Entwicklung des Gehirns und vor allem die des *Gyrus Dentatus* des Hippocampus zur Zeit der Bestrahlung noch nicht beendet ist und sich daher per se mehr Zellen in Zellteilung befinden. Man geht inzwischen davon aus, dass die Entwicklung des *Gyrus Dentatus* im murinen Gehirn erst mit der dritten Lebenswoche (P21) abgeschlossen ist (Nicola *et al.*, 2015; Seki *et al.*, 2014). Auch die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten eine negative Korrelation der proliferierenden Zellen mit steigendem Alter, d.h. die Anzahl der proliferierenden Zellen nimmt mit steigendem Alter linear ab, da sich Proliferation nur noch auf bestimmte Bereiche, die SGZ des *Gyrus Dentatus*, beschränkt. Eine erhöhte Proliferationsrate macht juvenile Mäuse empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung, was eine stärkere und frühere Verminderung der proliferierenden Zellen zur Folge hat und eine Erklärung für die nicht stattfindende Kompensation der verminderten Proliferation sechs Monate nach Bestrahlung in den juvenil-bestrahlten Mäusen darstellt (Fukuda *et al.*, 2005).

Die höchste Proliferationsrate während der adulten Neurogenese besitzt das Stadium der Vorläuferzellen, die mithilfe des Markers DCX identifiziert werden können. Das Vorläuferzellstadium ist nicht nur verantwortlich für die Vervielfältigung der Zellen, die sich potentiell in Neurone weiterdifferenzieren, hier findet außerdem die Regulierung darüber statt, wie viele Zellen sich tatsächlich weiterdifferenzieren oder aber apoptotisch werden und somit eliminiert werden. Da somit die Neurogeneserate über die DCX-Vorläuferzellen geregelt wird, hat sich DCX inzwischen als zuverlässiger Marker für den gesamten Prozess der adulten Neurogenese

etabliert. In den letzten Jahren konnten bereits viele Studien zeigen, dass adulte Neurogenese durch ionisierende Strahlung bei einmaliger Exposition mit klinisch relevanten Dosen (1-10 Gy) gestört wird und dass vor allem das Vorläuferzellstadium deutlich reduziert wird (Bostrom *et al.*, 2013; Mizumatsu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass nicht nur die Applikation einer hohen Strahlendosis, sondern auch die repetitive Exposition mit niedrigen Dosen (0.1 Gy) zu einer starken Abnahme in der Vorläuferzellpopulation führt. Diese war bereits während der fraktionierten Bestrahlung nach Applikation von  $5 \times 0.1$  Gy sowohl in juvenil- als auch adult-bestrahlten Mäusen erkennbar, wobei die Reaktion in den juvenilen Mäusen stärker ausfiel, was erneut auf die erhöhte Vulnerabilität von jungen Gehirnen gegenüber ionisierender Strahlung zurückzuführen ist (Fukuda *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2011). Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben zudem, dass auch die Anzahl der DCX-Vorläuferzellen mit dem Alter stark abnimmt. Gerade während der Entwicklung des *Gyrus Dentatus* gibt es einen deutlichen Einbruch der DCX-Vorläuferzellen um mehr als die Hälfte (2.-3. Lebenswoche). Aber auch mit Beendigung der Reifung des *Gyrus Dentatus* nimmt die Anzahl an Vorläuferzellen noch weiter ab, was den verstärkten Rückgang in den juvenil-bestrahlten Gehirnen erklärt, da diese zu jedem Zeitpunkt der Bestrahlung immer mehr proliferierende und damit strahlensensiblere Zellen besitzen. Die Abnahme der DCX-positiven Zellen war dosisabhängig und stieg mit zunehmender kumulativer Dosis immer weiter an. Die Tatsache, dass in adult-bestrahlten Mäusen zwar die DCX-Population wegbricht, die Anzahl an Ki67-positiven Zellen jedoch unbeeinflusst ist, spricht dafür, dass hier nicht die Zufuhr an neuen Zellen durch Zellteilung unterbrochen wird, sondern dass vermehrt früh differenzierte Neuroblasten entfernt werden. Dazu passt, dass auch die Mikroglia drei Tage nach Bestrahlung vermehrt vorliegen, da diese aufgrund ihrer phagozytotischen Eigenschaften für die Entfernung von unreifen und nicht integrierten Neuronen sowie Vorläuferzellen während der Neurogenese verantwortlich sind (Monje *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2012). Ein erhöhtes Aufkommen von Mikroglia konnte auch nach dem Auftreten eines Schlaganfalls gezeigt werden und ging dort ebenfalls mit einer verminderten DCX-Vorläuferzellpopulation einher (Xiong *et al.*, 2016). In den juvenil-bestrahlten Mäusen erfolgt zusätzlich zu der drastischen DCX-Vorläuferzellabnahme die starke Hemmung der Proliferation. Die starke Verminderung der DCX-Population scheint somit in den juvenil-bestrahlten Hippocampi nicht nur auf die vermehrte Entfernung von DCX-Zellen, sondern auch auf eine gehemmte Proliferation zurückzuführen zu sein. In den juvenil-bestrahlten Gehirnen werden somit zum einen DCX-Zellen vermehrt durch Mikroglia phagozytiert, wozu auch hierbei das beobachtete erhöhte Auftreten von Mikroglia passt, zum anderen findet gleichzeitig deutlich weniger Zellteilung statt. Auch Apoptose spielt innerhalb der DCX-Population eine wichtige Rolle, da wir feststellen konnten, dass die wenigen apoptotischen Zellen, die nach 72 Stunden noch gefunden werden konnten, alle positiv für

DCX waren, was mit der bisherigen Literatur übereinstimmt (Li *et al.*, 2016). Eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Aktivität konnte 72 Stunden nach Bestrahlungsende nicht mehr festgestellt werden, vermutlich weil die stark geschädigten Zellen bereits innerhalb der ersten 6-8 Stunden entfernt wurden und sich nach 24 Stunden bereits wieder das Kontrollniveau eingestellt hat (Acharya *et al.*, 2010). Die Reduzierung der DCX-Vorläuferzellen blieb in den juvenil-bestrahlten Mäusen bis zu sechs Monate und in den adult-bestrahlten Mäusen immerhin bis zu drei Monate nach Bestrahlung messbar. Die Gründe hierfür können zum einen sein, dass aufgrund der gestörten Proliferationsrate die Population nicht regeneriert werden kann und zum anderen kommt es womöglich durch den Verlust der fröhendifferenzierten Neuroblasten durch phagozytierende Mikroglia zu einer erhöhten Ausdifferenzierung, um den Verlust zu kompensieren. Ein weiterer Grund für die ausbleibende Regeneration der DCX-Population in den juvenil-bestrahlten Mäusen könnte auch der Einbruch der Stammzellpopulation sein, der einen Monat nach Bestrahlungsende erkennbar war und ebenfalls bis zu sechs Monate nach Bestrahlung anhielt, wie im Weiteren genauer beschrieben wird. Da DCX-Vorläuferzellen aus den Stammzellen hervorgehen, könnte der Verlust derselbigen eine weitere Erklärung für die fehlende Wiederherstellung des Vorläuferzellstadiums sein.

Neben der Abnahme der DCX-Vorläuferzellen an sich fiel in diesem Zellstadium zusätzlich ein massiver Verlust der dendritischen Ausläufer sowie deren verminderte Arborisation auf. Es kam somit nicht nur zu einem Verlust der DCX-Vorläuferzellen, sondern diejenigen, die bestehen bleiben, sind zusätzlich noch sehr schlecht bis gar nicht in das sie umgebende Netzwerk integriert. Eine derartige verschlechterte Arborisation konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Das Problem der verminderten Verschaltung scheint sich zudem bis in das nächsthöhere neuronale Zellstadium fortzuführen, da auch die Expression des postsynaptischen Proteins PSD-95 nach fraktionierter Bestrahlung signifikant vermindert vorlag. PSD-95 gilt als Marker für synaptische Plastizität von reifen Neuronen und spielt ebenfalls bei der Langzeitpotenzierung eine Rolle (El-Husseini *et al.*, 2000). Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die einmalige Bestrahlung von neonatalen oder in-utero Mäusen mit 1 Gy zu einem signifikanten Anstieg von PSD-95 im Hippocampus führt, was hier mit reduzierter kognitiver Leistung in Zusammenhang gebracht wurde (Kempf *et al.*, 2014; Kempf *et al.*, 2015b). Im Gegensatz dazu führt auch die verminderte Expression von PSD-95, wie sie durch Stress und dem damit einhergehenden erhöhten Corticosteron-Level induziert wird, zu einem verminderten Lernpotential (J. W. Cohen *et al.*, 2011; Shahin *et al.*, 2018). Da somit sowohl die Suppression als auch die Überexpression von PSD-95 zu einer Beeinträchtigung des Lernens und Gedächtnisses beitragen, scheint eine unveränderte PSD-95 Expression für die Funktionalität des Hippocampus unerlässlich, da nur so das richtige Verhältnis von exzitatorischen und inhibitorischen Synap-

sen gewährleistet werden kann (Migaud *et al.*, 1998; Prange *et al.*, 2004). Die reduzierte Expression von PSD-95 weist somit auf eine verminderte Signalweiterleitung innerhalb des neuronalen Netzwerks hin, die vermutlich schon auf der Ebene der Vorläuferzellen ihren Anfang nahm, wie die verminderte DCX-Arborisation zeigte. Auch die Imprägnierung mithilfe der Golgi-Cox-Methode könnte durch verminderte Ablagerungen im bestrahlten Gehirngewebe auf weniger dendritische Verzweigungen hinweisen und damit ein Indiz für eine geringere neuronale Konnektivität und synaptische Plastizität sein.

Die Untersuchung von Stammzellen mithilfe immunhistologischer Markierung ist oftmals anspruchsvoll und meist nicht mit einem einzigen Marker zu gewährleisten. In-vivo Untersuchungen von SOX2-GFP transgenen Mäusen ergaben allerdings, dass diese Zellen das Potential besitzen, sich in Neurone und Astrozyten auszudifferenzieren, womit SOX2 einen adäquaten Marker darstellt, um die frühen undifferenzierten Vorläuferzellen in der SGZ, im weiteren als Stammzellen bezeichnet, zu markieren (Suh *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu der Vorläuferzellpopulation, die bereits drei Tage nach der letzten Dosisapplikation Veränderungen zeigte, war in den Stammzellen während der Bestrahlung sowie 72 Stunden danach keine Reaktion auf ionisierende Strahlung nachweisbar. Der Verlust der Stammzellen erfolgte erst einen Monat nach Bestrahlungsende und fand sowohl in den juvenil- als auch den adult-bestrahlten Mäusen statt. Die verzögerte Reaktion könnte möglicherweise eine direkte Folge des Einbruchs des Vorläuferzellstadiums sein, da über eine erhöhte Auswanderung der Stammzellen aus der Stammzellnische möglicherweise das Stadium der Vorläuferzellen wiederhergestellt werden soll. Ein Einbruch der Stamm- und Vorläuferzellpopulation konnte bereits in mehreren Studien nach Applikation von therapeutischen Dosen (2 Gy – 8 Gy) nachgewiesen werden (Fukuda *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2009). Eine weitere Erklärung für den Verlust der Stammzellen wäre auch das Einsetzen von Autophagie, da nach der Bestrahlung von Mäusen mit fehlendem Atg7-Gen, welches in die Induktion der Autophagie involviert ist, die Reduktion der Stammzellen moderater ausfiel (Wang *et al.*, 2017). Autophagie spielt außerdem eine Rolle bei der Regulation von Mikroglia und da diese nach einem Monat ebenfalls erhöht vorliegen und phagozytische Eigenschaften besitzen (Yuan *et al.*, 2017), könnten Mikroglia für das starke Ausdünnen der Stammzellen mitverantwortlich sein. Während der Verlust in den adult-bestrahlten Mäusen nach drei und sechs Monaten nicht mehr nachweisbar war, blieb er in den juvenil-bestrahlten Mäusen bis zu sechs Monate nach Bestrahlung deutlich nachweisbar. Auch Naylor *et al.* konnte eine langanhaltende Reduktion der Stammzellen bis zu drei Monate nach Bestrahlung feststellen, allerdings nach Applikation einer therapeutischen Dosis von 6 Gy (Naylor *et al.*, 2008). Die Stammzellpopulation zeigte ebenfalls eine altersabhängige Abnahme, welche bis zum Erreichen der 16. Lebenswoche einen linearen Verlauf nahm, weshalb die Untersuchung

von altersgerechten, unbestrahlten Kontrollen unerlässlich war. Die stärkere und länger anhaltende Abnahme der Stammzellen in den juvenil-bestrahlten Mäusen könnte also eine Folge des erhöhten Vorkommen dieser Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung sein, da diese ebenfalls proliferieren und somit sensitiver gegenüber ionisierender Strahlung sind (Fukuda *et al.*, 2005). Ein weiterer Erklärungsansatz für die langanhaltende Reduktion der Stammzellen stellt auch der autokrine Wirkungsmechanismus, den der Transkriptionsfaktor SOX2 auf seine eigene Stammzellnische besitzt, dar (Favaro *et al.*, 2009). Die Deletion von SOX2 führt dazu, dass sich die Stammzellnische nicht selbst aufrecht erhalten kann und somit zu einer verminderten Anzahl an Stammzellen und zu einer gestörten Neurogenese (Cavallaro *et al.*, 2008; Ferri *et al.*, 2004). Durch die initiale Abnahme der Stammzellen wird auch die Expression des Transkriptionsfaktors vermindert, was wiederum die Regeneration der Stammzellnische negativ beeinflussen könnte. Ein später Einbruch der Stammzellnische konnte auch in hämatopoetischen Stammzellen beobachten werden und wurde hier auf eine erhöhte Anwesenheit von ROS zurückgeführt (Rodrigues-Moreira *et al.*, 2017). Da Bestrahlung im Gehirn zu erhöhtem oxidativem Stress führt (Balentova und Adamkov, 2015), könnte auch der höhere Anteil an ROS eine Erklärungsansatz für die massive und langanhaltende Verminderung der Stammzellen sein.

Fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung führt folglich zu einem deutlichen Einbruch der adulten Neurogenese, sowohl in den juvenil- als auch in den adult-bestrahlten Mäusen. Während in den adult-bestrahlten Mäusen die morphologischen Veränderungen nach 1-3 Monaten wieder kompensiert wurden, ist selbst sechs Monate nach Bestrahlungsende der Einbruch der Stamm- und Vorläuferzellpopulation in den juvenil-bestrahlten Mäusen noch deutlich zu erkennen. Blomstrand *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Bestrahlung von adulten und juvenilen Hippocampi unterschiedliche Mechanismen in Gang setzen, die Degeneration zur Folge haben (Blomstrand *et al.*, 2014). Während also lange Zeit angenommen wurde, dass junge Gehirne aufgrund ihrer erhöhten Proliferation und gesteigerten Plastizität Schäden schneller kompensieren können, scheinen wissenschaftliche Experimente, wie auch in dieser experimentellen Arbeit, auf das genaue Gegenteil hinzuweisen. Juvenile Mäuse, bei denen die Applikation ionisierender Strahlung während der Entwicklung des Gehirns stattfindet, tragen somit schwerwiegendere und langanhaltendere Verluste von Zellen davon.

Die beobachteten Veränderungen auf zellulärer Ebene konnten durch die Ergebnisse der Proteomanalyse und der mit den deregulierten Proteinen durchgeführten *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) gestützt werden. Obwohl sich je nach Zeitpunkt nach Bestrahlung die deregulierten Proteine änderten und es kein Protein gab, das zu allen Zeitpunkten eine veränderte Expression aufweist, schienen doch immer dieselben Signalwege betroffen zu sein. Die am stärksten

beeinflussten Signalwege waren die Langzeitpotenzierung und der CREB-Signalweg. Die Langzeitpotenzierung stellt eine Form der synaptischen Plastizität dar und beschreibt eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung, die involviert ist in die Gedächtniskonsolidierung sowie das Erlernen von Dingen (Bliss und Lomo, 1973). Die festgestellte Deregulation dieses Prozesses könnte ein Grund für die beobachteten kognitiven Defizite sein, die nach einer Radiotherapie zu beobachten sind. Unter anderem konnte in Patienten, die in jungen Jahren ionisierender Strahlung ausgesetzt waren, ein verminderter Intelligenzquotient (IQ), Schwierigkeiten beim Lernen sowie Probleme mit dem logischen Denken beobachtet werden (Fouladi *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2004; Hoppe-Hirsch *et al.*, 1995; Mulhern *et al.*, 2004). Eine wichtige Rolle bei der Langzeitpotenzierung spielt die Phosphorylierung von CREB und die damit initiierte Transkription von *downstream* liegenden Genen (Josselyn und Nguyen, 2005). Wie sowohl die IPA-Analyse aber auch die Auswertung der Westernblots zeigte, gab es eine deutlich niedrigere Expression der phosphorylierten und damit aktiven Form von CREB 72 Stunden und einen Monat nach Bestrahlungsende. Die Phosphorylierung von CREB am Serinrest 133 wird durch Calmodulin-Kinasen vermittelt (Bito *et al.*, 1996; Deisseroth *et al.*, 1998), welche laut IPA-Analyse des CREB-Signalweges ebenfalls reduziert vorlagen. Calmodulin-Kinasen sind aber nicht nur über die Phosphorylierung von CREB in die Langzeitpotenzierung involviert. Durch erhöhten Calcium-Einstrom translozieren die aktiven Calmodulin-Kinasen II außerdem in die Synapsen und führen über Phosphorylierung von Untereinheiten der Glutamat-Rezeptoren zu einer Potenzierung (Lisman *et al.*, 2012). Auch während der adulten Neurogenese spielt CREB eine wichtige Rolle, da der Transkriptionsfaktor die Differenzierung, das Überleben, die Reifung sowie die Integration der neuen Neurone kontrolliert (Alonso *et al.*, 2002; Fujioka *et al.*, 2004; Jagasia *et al.*, 2009; Merz *et al.*, 2011; Nakagawa *et al.*, 2002). CREB ist außerdem in die synaptische Plastizität involviert, in dem es in dendritisches Wachstum und neuronale Reifeprozesse verwickelt ist (Benito und Barco, 2010; Redmond *et al.*, 2002; Wayman *et al.*, 2006) und besitzt zusätzlich eine neuroprotektive Funktion im Gehirn (Motaghinejad *et al.*, 2017). Eine verminderte Expression von CREB aber auch der herabgesetzte Phosphorylierungsstatus, der aus dem reduzierten Vorkommen der Calmodulin-Kinasen resultiert, können zu einer gestörten synaptischen Plastizität und zu eingeschränkter Gedächtnisleistung führen (Miyamoto, 2006). Auch die bereits erwähnte deutliche Reduktion von DCX könnte eine Folge der verminderten Expression CREB sein (Fujioka *et al.*, 2004). Die Beeinträchtigung des CREB-Signalweges konnte bereits nach der einmaligen Applikation von 0.5 Gy und 1 Gy auf in utero- und juvenil-bestrahlte (10 Tage) Mäuse nachgewiesen werden (Kempf *et al.*, 2015a; Kempf *et al.*, 2015b). Weiterhin zeigte sich, dass die juvenil-bestrahlten

Mäuse ein eingeschränktes Erkundungsverhalten aufweisen, was auf eine fehlerhafte Integration von neuen Informationen hindeutet und damit eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistungen zur Folge hat (Kempf *et al.*, 2014).

Neben dem verminderten Level von CREB einen Monat nach Bestrahlungsende zeigte sich auch die verminderte Expression des neurotrophen Faktors BDNF. BDNF spielt eine wichtige Rolle im Gehirn, da es an der Bildung und Aufrechterhaltung von Neuronen beteiligt und somit ebenfalls kritisch für die synaptische Plastizität sowie Lernen und Gedächtnis ist (Acheson *et al.*, 1995; Bekinschtein *et al.*, 2008; Squire, 1992; Yamada und Nabeshima, 2003). Im Hippocampus fördert BDNF die Proliferation und Neurogenese (Scharfman *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011) und die Entfernung seines Rezeptors führt zu vermindertem dendritischen und synaptischen Wachstum in neugebildeten Neuronen und damit zu einer gestörten Langzeitpotenzierung (Bergami *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 1997). Das gestörte dendritische und synaptische Wachstum, das hier durch die verminderte DCX-Arborisation auf Vorläuferzellebene und die PSD-95 Expression auf neuronale Ebene gezeigt wurde, könnte somit die Folge des geringen BDNF Aufkommens und damit der reduzierten Rezeptoraktivität geschuldet sein. Son *et al.* konnten ebenfalls einen Monat nach einer Einzelbestrahlung mit 10 Gy ein vermindertes Expressionslevel von BDNF und damit einhergehend eine eingeschränkte Gedächtnisleistung nachweisen (Son *et al.*, 2015).

Drei Monate nach Bestrahlung ergab die Auswertung der Westernblots eine erhöhte Expression der nativen sowie der phosphorylierten Form von CREB, die erneut gut mit der ebenfalls stattfindenden Hochregulation der Calmodulin-Kinasen vereinbar ist. Das erhöhte Aufkommen der Calmodulin-Kinasen ermöglicht eine stärkere Phosphorylierung von CREB und induziert dadurch die erhöhte Expression der downstream von CREB liegenden Gene *arc* und *bdnf*, die ebenfalls im Westernblot nachgewiesen wurde. ARC gehört zu den *immediate early genes*, ist involviert in die Entstehung des Langzeitgedächtnisses und beeinflusst jede Art von synaptischer Plastizität. In hippocampalen Neuronen erhöht ARC die Anteile an sogenannten ‚*learning-spines*‘ und suggeriert eine mögliche Rolle bei der Entstehung neuer Erinnerungen (Peebles *et al.*, 2010). Dafür spricht auch, dass Mäuse mit einem Knock-Out von ARC Schwierigkeiten bei der Konsolidierung von neuen Erinnerungen haben (Plath *et al.*, 2006). Ein möglicher Grund für die erhöhte Expression von CREB, ARC, BDNF sowie der verstärkten Phosphorylierung von CREB ist möglicherweise eine kompensatorische Hochregulation, um der gestörten synaptischen Plastizität entgegenzuwirken, die durch ein erhöhtes Aufkommen an Calmodulin-Kinasen induziert wurde. Dafür spricht, dass sich weitere drei Monate später (sechs Monate nach Bestrahlungsende) keine veränderte Expression der untersuchten Gene

mehr aufwies und auch die betroffenen Signalwege zeigten laut *activation z-score* keine Veränderung mehr.

Auf gestörte synaptische Plastizität nach Bestrahlung wies in der IPA-Analyse der Proteomanalyse auch die verminderte Expression von Ephrin-Rezeptoren hin. Ephrin-Rezeptoren und Ephrine spielen eine wichtige Rolle im adulten Nervensystem. So stimuliert EphrinB NMDA-Rezeptoren und bewirkt auf diesem Weg die Bildung und Reifung von neuen Synapsen (Dalva *et al.*, 2000). Zusätzlich zur synaptischen Plastizität sind Ephrine ebenfalls an die Langzeitpotenzierung beteiligt (Grunwald *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2001). Auch bei der Orientierung von Axonen spielen Ephrine eine wichtige Rolle (Kullander und Klein, 2002), indem sie den Übergang von RhoGTPasen in die aktive Form über *guanine nucleotide exchange faktor* (GEF) begünstigen oder über GTPase-aktivierende Proteine (GAP) verhindern. Eine gestörte Expression der Familie der RhoGTPasen wurde durch die Proteomanalyse ebenfalls erkennbar, was sich gut in die Annahme der gestörten Langzeitpotenzierung fügt, da durch RhoA die Aktinpolymerisation stimuliert und damit die Bildung dendritischer Spines vorangetrieben wird (Tashiro und Yuste, 2004). RhoGTPasen sind somit in die Regulierung der dendritischen Verlängerungen und auch die Rückentwicklung von Dendriten involviert (Li *et al.*, 2000). Die Größe der dendritischen Spines korreliert direkt mit der Stärke von synaptischen Verbindungen und aktinreiche Spines konnten mit der Langzeitpotenzierung in Verbindung gebracht werden (Lisman, 2003). Eine stark veränderte Signalwirkung der Ephrin-Rezeptoren sowie der RhoGTPasen zeigte sich auch fünf Wochen nach einmaliger Applikation von 0.5 Gy und 1 Gy (Kempf *et al.*, 2015b).

Zusammenfassend stützen die Ergebnisse der Proteomanalyse unsere Beobachtungen auf zellulärer Ebene und zeigen eine starke Beeinträchtigung der adulten Neurogenese sowie der Langzeitpotenzierung und der synaptischen Plastizität, was eine kognitive Beeinträchtigung zur Folge haben könnte.

### **5.2.1 Adulte Neurogenese in DNA-Reparaturdefizienten Hippocampi**

Ein DNA-Reparaturdefekt, wie er durch das Fehlen einer der Proteinkinasen DNA-PKcs oder ATM eintritt, äußerte sich bereits in unbestrahlten Neuronen durch ein deutlich höheres Foci-Level (Schanz *et al.*, 2012). Betroffene mit einer Mutation in diesen Proteinkinasen besitzen eine höhere Radiosensitivität, was durch ein höheres Level an Foci gegenüber Wildtyp-Mäusen deutlich wird (Schanz *et al.*, 2012; Schmal *et al.*, 2019). Das Fehlen von ATM führt bereits in den unbestrahlten Hippocampi zu einer deutlich reduzierten Neurogeneserate, was sich

durch eine stark verminderte DCX-Vorläuferzellpopulation manifestierte. Es ist bekannt, dass ATM bei der adulten Neurogenese eine entscheidende Rolle während des Differenzierungsprozesses der Vorläuferzellen spielt und in die Eliminierung von geschädigten Neuronen involviert ist (Allen *et al.*, 2001; Herzog *et al.*, 1998). In den DNA-PKcs mutierten SCID-Mäusen hingegen zeigte sich eine vergleichbare Anzahl an DCX-Vorläuferzellen gegenüber den Wildtyp-Mäusen (C57BL6), was auf eine per se unveränderte Neurogenese-Leistung hinweist. Das Fehlen der Proteinkinase ATM scheint somit für den Organismus schwerwiegendere Folgen auf die Neurogenese zu haben, was möglicherweise einer der Gründe für die geringere Lebenserwartung (halbes Jahr) der Mäuse mit einem ATM-Defekt sein könnte. *Ataxia telangiectasia* wird zwar mit einer normalen Gehirnentwicklung, aber im Weiteren mit einer schnell fortschreitenden Neurodegeneration charakterisiert, die vermutlich auf eine beeinträchtigte Langzeitpotenzierung zurückgeführt werden kann, wofür der Einbruch der DCX-Population mitverantwortlich gemacht werden könnte (Sedgwick, 1991).

Drei Tage nach Bestrahlung mit 10x0.1 Gy und 20x0.1 Gy zeigte sich in den SCID-Mäusen eine starke Abnahme der DCX-Vorläuferzellen, was auf einen massiven Einbruch der adulten Neurogenese hindeutet. In den ATM-defizienten Mäusen war nach Bestrahlung mit 10x0.1 Gy keine Veränderung erkennbar. Nach der Applikation von 20 Fraktionen zeigte sich hingegen eine signifikante Abnahme der DCX-Vorläuferzellen. Diese gestaltete sich weniger ausgeprägt im Vergleich zu den SCID-Mäusen, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen hingegen fiel die Abnahme jedoch deutlich gravierender aus. Während die Mutation von DNA-PKcs somit per se keinen Einfluss auf die Neurogenese nimmt, ist die Abnahme der Neurogeneserate nach Bestrahlung stärker ausgeprägt als in Wildtyp-Mäusen. Eine ATM-Mutation hingegen führt schon unbestrahlt zu einer gestörten Neurogenese, welche durch Bestrahlung weiter negativ beeinflusst wurde. Der strahleninduzierte Einbruch der Neurogeneserate nach Bestrahlung in den SCID-Mäusen könnte auf eine schlechtere und langsamere Reparatur der strahleninduzierten DSBs hinweisen, wie sie nach Bestrahlung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bereits gezeigt wurde. Eine erhöhte Akkumulation von 53BP1-Foci in DNA-PKcs defizienten Zellen konnte bereits gezeigt werden, was die enorme Wichtigkeit von DNA-PKcs für die Reparatur von DSBs zeigt (Rube *et al.*, 2008). Auch ATM spielt eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DSBs und ist außerdem in die strahlungsinduzierte Apoptose involviert (Chong *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 1998). Da die Mutation von ATM aber bereits im Vorhinein die Neurogenese stark beeinträchtigt, waren die strahleninduzierten Effekte weniger dramatisch als in den SCID-Mäusen. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen sind die Effekte auf die Vorläuferzellen in beiden mutierten Mausstämmen jedoch ausgeprägter und vermutlich auf die ebenso erhöhten Foci-Level zurückzuführen (Schmal *et al.*, 2019). Enriquez-Rios *et al.* konnten bereits zeigen, dass durch strahleninduzierte DNA Schäden genomische Instabilität erhöht und damit die adulte

Neurogenese in reparaturdefizienten Mäusen stark in Mitleidenschaft gezogen wird (Enriquez-Rios *et al.*, 2017).

Im Gegensatz zu den Vorläuferzellen, die schon per se in den ATM-mutierten Mäusen reduziert vorliegen, wurde die Stammzellpopulation durch die Mutation beider Proteinkinasen nicht verändert. Auch drei Tage nach Bestrahlung zeigten beide reparaturdefizienten Mausstämme dasselbe Verhalten wie die Wildtyp-Mäuse und damit keine Auswirkungen von niedrigen Strahlendosen auf die Stammzellpopulation. Ob der Einbruch genau wie in den Wildtyp-Mäusen erst einen Monat später eintritt, lässt sich leider nicht ermitteln, da in diesem Fall nur auf bereits bestehende Paraffin-Gehirnproben zurückgegriffen werden konnte und diese leider nur bis 72 Stunden nach Bestrahlung akquiriert wurden. Da aber die Vorläuferzellpopulation in den reparaturdefizienten Mäusen ebenfalls einbricht und dies sogar in einem noch erheblicheren Maße, würde man auch hier davon ausgehen, dass die Stammzellen eher aus der Nische heraustreten, um die Vorläuferzellpopulation wieder zu regenerieren und die Zahl der Stammzellen daraufhin deutlich reduziert wird.

### **5.3 Strahleninduzierte Veränderung der Gliazellpopulationen als Indiz der Neuroinflammation**

Gliazellen stellen neben Neuronen die wichtigsten Zellen im ZNS dar und machen etwa die Hälfte des Gesamtvolumens aus. Aufgrund ihrer vielfältigen regulatorischen Funktionen sind sie sowohl an der Entstehung, Verschaltung und Versorgung der Neurone maßgeblich beteiligt. Weiterhin spielen Gliazellen bei Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle, indem sie Zelltrümmer vom Schadensort entfernen und Zytokine sekretieren (Catalin *et al.*, 2013). Unterschieden werden die verschiedenen Gliazelltypen aufgrund ihres Entstehungsursprungs. Während Mikroglia einen mesodermalen Ursprung haben, können Makroglia, die Astrozyten und Oligodendrozyten umfassen, aus neuronalen Vorläuferzellen differenzieren und somit auch noch während der adulten Neurogenese entstehen (Kitamura *et al.*, 1984). Die Mechanismen, die die Entscheidung über das Zellschicksal treffen, sind bisher nur unzureichend untersucht und Gegenstand vieler derzeitiger Forschungen. Monje *et al.* konnten bereits zeigen, dass eine Bestrahlung mit therapeutischen Dosen von 2 bzw. 10 Gy zu einer starken Abnahme an neugeborenen Neuronen führt und die bestehenden Vorläuferzellen eher in Gliazellen ausdifferenzieren (Monje *et al.*, 2002). Die Markierung mithilfe des Thymidin-Analogons BrdU bietet je nach Labeling-Muster und abhängig vom Zeitpunkt der anschließenden Untersuchung die Möglichkeit Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben zu eruieren (Kempermann *et al.*, 1997; Miller und Nowakowski, 1988). Da Neurone post-mitotisch sind, wird BrdU nur in

Stamm- und Vorläuferzellen inkorporiert und durch den vier Wochen später angesetzten Untersuchungszeitpunkt kann nun mithilfe einer gleichzeitigen Markierung für einen bestimmten Zelltyp bestimmt werden, zu was sich die gelabelten Zellen entwickeln (Cooper-Kuhn und Kuhn, 2002; Kuhn *et al.*, 1996). Die fraktionierte Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen führte in den juvenil-bestrahlten Mäusen zu einem verminderten Anteil an neu entstandenen Neuronen, während gleichzeitig mehr neue Astrozyten und Oligodendrozyten auftreten. Ein Grund für die verminderte Neurogenese könnte das deutlich verminderte Auftreten von Stamm- und Vorläuferzellen nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung sein, aus denen normalerweise Neurone differenzieren. Weiterhin könnte ebenfalls ein verändertes ‚*microenvironment*‘ der Grund für die reduzierte Neurogenese sein, da die strahlungsinduzierte Reduktion der Neurogenese nur *in-vivo* nachgewiesen werden konnte (Monje *et al.*, 2002). Eine Veränderung des *microenvironment* ist möglicherweise eine Folge des erhöhten Vorkommens von aktivierten Mikroglia. Das erhöhte Aufkommen von Mikroglia könnte mit einer erhöhten Sekretion von Zytokinen einhergehen. Eine strahlungsinduzierte Erhöhung der Interleukin-6 Sekretion konnte nach Applikation von höheren Dosen bereits nachgewiesen werden, was als hemmender Faktor für Neurogenese bekannt ist (Vallières *et al.*, 2002). Auch der direkte Kontakt von Astrozyten zu Stammzellen und die damit einhergehende Sekretion von GFAP führt zu einer verminderten Neurogenese (Wilhelmsson *et al.*, 2012). Nach der fraktionierten Niedrig-Dosis-Bestrahlung kommt es aber nicht nur zu einer verminderten Neurogenese, sondern gleichzeitig zu einer Änderung des Zellschicksals und damit zu einem Anstieg der Gliogenese. Eine verstärkte Gliogenese konnte bereits nach Gehirntraumata sowie Ischämie beobachtet werden, wo Gliazellen, vor allem Mikroglia und Astrozyten, für die Beseitigung von Zelltrümmern am Schadensort verantwortlich sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes Aufkommen von OLIG2-positiven Zellen, die Gliogenese induziert (Buffo *et al.*, 2005; Kronenberg *et al.*, 2010). Eine erhöhte Gliogenese könnte somit zum einen eine direkte neuroprotektive Reaktion des Gehirns sein, um entstandene Zellschäden schwinden zu lassen. Gleichzeitig könnte die zusätzliche Rekrutierung von Gliazellen zum Schadensort, wie wir sie ebenfalls beobachten konnten, die Neuentstehung von Neuronen negativ beeinflussen und damit das Zellschicksal von Neurogenese zu Gliogenese zwingen.

Ein starker Anstieg der Oligodendrozyten nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung, der die Gliogenese positiv beeinflussen könnte, konnte bereits drei Tage nach Bestrahlungsende gezeigt werden. In den juvenil-bestrahlten Mäusen war die erhöhte Anzahl an Oligodendrozyten bis zu drei Monate nach Bestrahlung deutlich messbar und möglicherweise eine Folge des positiven Feed-Back-Loops den Oligodendrozyten auf ihr eigenes Schicksal und Überleben haben (Buffo *et al.*, 2005). Auch in verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. PTBS, Depression und Schizophrenie, gehört die erhöhte Anzahl an Oligodendrozyten zum

pathologischen Muster und trägt zu einer erhöhten Myelinisierung bei. Dies hat wiederum eine schlechtere Versorgung der Neurone zur Folge und kann die synaptische Plastizität abschwächen (Jackowski *et al.*, 2008; Regenold *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2010). Verminderte synaptische Plastizität wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durch die reduzierte Expression von PSD-95 gezeigt. Die neuronale Signalübertragung wird zusätzlich durch Oligodendrozyten gestört, da bei Kontakt eines Axons mit einem Oligodendrozyten das Wachstum desselbigen Axons gestört wird (Bandtlow *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2002b). Ein erhöhtes Aufkommen an Oligodendrozyten kann die Folge eines erhöhten Glucocorticoid-Levels sein, wie er beispielsweise durch Stress induziert werden kann (Chetty *et al.*, 2014; E. P. Cohen *et al.*, 2011). Während die adult-bestrahlten Mäuse bereits einen Monat nach Bestrahlungsende wieder ein normales Level an Oligodendrozyten besitzen, benötigen die juvenil-bestrahlten Mäuse weitere zwei Monate um ein konventionelles Level an Oligodendrozyten zu erreichen. Dies spricht erneut für die erhöhte Radiosensitivität von jungen Gehirnen.

Im Gegensatz zu den Oligodendrozyten, die sowohl kurz- (72h) als auch langfristig (1-3 Monate) erhöhte Präsenz nach der fraktionierten Bestrahlung zeigten, verhielten sich Astrozyten je nach Untersuchungszeitpunkt unterschiedlich. Drei Tage nach der Bestrahlung kam es zunächst zur Astroglie, d.h. zu einem erhöhten Auftreten von Astrozyten, die auch durch die erhöhte Expression des Markers GFAP im Westernblot gezeigt werden konnte. Astroglie tritt meist aufgrund eines Gehirntraumas, eines Schlaganfalls oder einer Infektion des ZNS auf, um die entstandenen Zelltrümmer und nicht funktionale Synapsen in Zusammenarbeit mit Mikroglia zu entfernen und somit den Schaden schnellstmöglich zu beseitigen (Schafer *et al.*, 2013). Dafür spricht, dass auch das Aufkommen von Mikroglia stark erhöht ist, denn für die Entfernung neuronaler Zelltrümmer bilden Astrozyten und Mikroglia mit dem zu entfernenden Neuron eine Triade (Lana *et al.*, 2016). Das erhöhte Auftreten von Astrozyten hat somit eine neuroprotektive Funktion für das Gehirn, kann jedoch bei einem chronischen Anstieg zu krankhaften Symptomen führen, wie z.B. in Morbus Alzheimer. Auch Kalm *et al.* konnten zeigen, dass sich kurz nach Bestrahlung (7 Tage) mit einer hohen Dosis von 8 Gy die Expression von GFAP sowie das Auftreten von Astrozyten massiv erhöhte und damit auch die Konzentration verschiedener Zytokine (Kalm *et al.*, 2009). Eine erhöhte Anzahl an Astrozyten könnte die Folge der ebenfalls erhöhten Mikroglia-Population sein, da Astroglie durch die Freisetzung bestimmter Faktoren aus den Mikroglia induziert wird (Hwang *et al.*, 2006). Ein Anstieg beider Gliazelltypen weist auf eine vorübergehende Inflammation und einen neuroprotektiven Mechanismus hin, da sie gemeinsam für das Entfernen von Synapsen und Trümmern verantwortlich sind (Chung *et al.*, 2013; Schafer und Stevens, 2015). Einen Monat nach Bestrahlung änderte sich das Verhältnis gegenüber der unbestrahlten, altersgerechten Kontrolle und es waren deutlich weniger Astrozyten und eine verminderte Expression von GFAP zu finden. Astrozyten-

Atrophie gehört ebenfalls in vielen neurologischen und kognitiven Krankheitsbildern wie PTBS, Depression und Epilepsie, zu den pathologischen Veränderungen des Gehirns. Induziert werden kann der Rückgang von Astrozyten durch eine durch Stress erhöhte Aktivität der Glucocorticoid-Rezeptoren und wird mit verminderter kognitiver Leistung des Gehirns in Verbindung gebracht (Bedner *et al.*, 2015; Lou *et al.*, 2018; Niciu *et al.*, 2014; Verkhatsky *et al.*, 2014). Die Astrozyten Atrophie kann somit möglicherweise durch erhöhte Corticosteron-Level erklärt werden, da man 70 Tage nach Applikation von 10 Gy einen derartigen Anstieg der Konzentration bereits nachweisen konnte. Auch hier war nach 8 Tagen keine Erhöhung der Corticosteron-Level nachweisbar, was die verzögerte Atrophie erklären könnte (E. P. Cohen *et al.*, 2011). Die Einschränkungen kognitiver Leistungen sowie eine gestörte Signalweiterleitung wird heute nicht mehr nur durch das Fehlen von Neuronen erklärt, sondern scheint viel mehr ein Resultat des gestörten Verhältnisses von Neuronen zu Astrozyten zu sein. Dies bedeutet, dass die festgestellte Beeinträchtigung der Reizweiterleitung, gezeigt durch eine verminderte Expression von PSD-95, nicht nur auf neuronaler Ebene induziert wird, sondern auch das veränderte Auftreten der Makroglia hier eine entscheidende Rolle spielen könnte. Der akute Anstieg von Astrozyten sowie der anschließende Rückgang der Population nach einem Monat war sowohl in den juvenil- als auch den adult-bestrahlten Mäusen nachweisbar. Dies kann bedeuten, dass zumindest für die Astrozyten-Population das Alter zu Beginn der Bestrahlung eine untergeordnete Rolle spielt. In beiden Untersuchungsgruppen konnten die Veränderungen innerhalb der Astrozyten-Population nach sechs Monaten überwunden werden und die bestrahlten Hippocampi zeigten ein ähnliches Level wie die zugehörigen Kontrollgruppen. Ein Zusammenbruch der Astrozytenpopulation kann auch mit erhöhter Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke einhergehen (Janzer und Raff, 1987), was in diesem Fall mithilfe eines *EvansBlue*-Experiments jedoch nicht validiert werden konnte. Ein Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke konnte in Experimenten nur nach Applikation von sehr hohen Dosen wie 18 Gy und 60 Gy beobachtet werden, was dafür spricht, dass die hier applizierte Dosis zu gering ist, um die strukturelle Integrität der Blut-Hirn-Schranke zu gefährden (Kaya *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2018).

Mikroglia stellen aufgrund ihres Makrophagen-ähnlichen Charakters und Expressionsprofils die regulären Immunzellen des ZNS und damit einen wichtigen Zelltyp für die Neuroinflammation dar (Catalin *et al.*, 2013; Dibaj *et al.*, 2010). Nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy zeigte sich sowohl in den juvenil- als auch in den adult-bestrahlten Hippocampi eine starke Zunahme der Mikroglia 72 Stunden und bis zu einem Monat nach Applikation der letzten Dosisfraktion. Ein Anstieg der Mikroglia nach Bestrahlung konnte bereits nach der Applikation von hohen Dosen von 8-10 Gy gezeigt werden (Huo *et al.*, 2012; Monje *et al.*, 2003). Durch die Applikation von BrdU wurde nachgewiesen, dass die Zunahme zumindest in den juvenil-bestrahlten Proben

durch proliferierende Mikroglia zu Stande kommt, was auf einen aktiven Zustand der Mikroglia hindeutet (Monje *et al.*, 2003). In den juvenil-bestrahlten Mäusen ist die Zunahme nach drei Tagen deutlich höher als in den adult-bestrahlten Mäusen. Ein möglicher Grund könnte die höhere Proliferationsrate der jungen Mäuse darstellen, da so mehr Mikroglia aufgrund des strahleninduzierten Schadens akquiriert werden können. Ein erhöhtes Auftreten von Mikroglia wird durch ein Trauma oder eine Infektion begünstigt und ihre induzierte Aktivität führt zur Ausschüttung von Zytokinen. Direkt am Schadensort entwickeln Mikroglia phagozytische Eigenschaften, um neuronale Trümmer zu entsorgen (Russo und McGavern, 2015). Die Rekrutierung von Mikroglia und ihr erhöhtes Aufkommen ist möglicherweise auch eine Folge des gestörten CREB-Signalweges, da die Deletion von CREB zu einem Anstieg an Mikroglia führt (Marchese *et al.*, 2017). Die Aktivierung und Rekrutierung von Mikroglia stellt zunächst eine neuroprotektive Funktion für den Organismus dar. Allerdings gilt auch für Mikroglia, dass eine chronische Erhöhung ihrer Anzahl und Aktivität zu einem pathologischen Krankheitsbild beitragen kann, wie bei Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer. Die hier gezeigte langanhaltende bis zu einem Monat nach Bestrahlung nachgewiesene Erhöhung der Mikroglia-Zahl ist wohl aber eher der anhaltenden Reduzierung der Stamm- und Vorläuferzellen geschuldet, und deren Eliminierung Mikroglia beteiligt sein werden.

Neben der klassischen Neuroinflammation sind Mikroglia aber auch entscheidend an der adulten Neurogenese beteiligt, da sie nicht eingebundene Neurone wieder entfernen (Song *et al.*, 2012). Dies ist, wie bereits erwähnt, ein möglicher Grund für die massive Abnahme an DCX-Vorläuferzellen, da diese aufgrund des erhöhten Aufkommens der Mikroglia stärker phagozytiert werden. Auch für die verminderte synaptische Plastizität könnte das Auftreten der Mikroglia ein Grund sein, da diese durch das sogenannte „*synaptic pruning*“ Synapsen entfernen (Wake *et al.*, 2013).

Fraktionierte Niedrig-Dosis-Bestrahlung hat zusammenfassend einen massiven Einfluss auf die Gliazellpopulation und damit auch auf die Neuroinflammation. Dazu passt die festgestellte Deregulation des CREB-Signalweges, der auch in die Neuroprotektion involviert ist (Motaghinejad *et al.*, 2017). Die beobachtete Inflammation und veränderte Gliazellzusammensetzung könnte zusätzlich ein Grund für die stark beeinträchtigte Neurogeneseleistung sein, da Inflammation sowie ein gestörtes Verhältnis von Gliazellen und Neuronen die Neurogenese negativ beeinflusst (Ekdahl *et al.*, 2003).

## 5.4 In-vivo messbare Veränderungen mittels MRT

Eine Möglichkeit, zellstrukturelle und sogar funktionelle Veränderungen bereits *in-vivo* festzustellen, bietet die nicht-invasive Magnetresonanztomographie. Um Informationen über die Funktion bestimmter Organe zu erhalten, wurden neben der rein bildgebenden Methode noch zahlreiche spezielle funktionelle Verfahren entwickelt, um unter Umständen eine Basis für individuelle Behandlungsstrategien bilden zu können (van der Heide *et al.*, 2012). Während die Bildgebung in der klinischen Strahlentherapie ihre Anwendung findet, um das makroskopische Tumolvolumen (*gross tumor volume*) zu bestimmen (Sander *et al.*, 2014; Schmidt und Payne, 2015), werden funktionelle Untersuchungen im Klinikalltag seltener angewendet. Funktionelle MRTs (fMRT) können zum Beispiel nach der Behandlung Aufschluss über Veränderungen in bestimmten Geweben und Organen geben, insbesondere über die Durchblutung. Außerdem bieten nicht-invasive Verfahren die Möglichkeit, denselben Organismus mehrfach zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung zu untersuchen, wie es auch im Rahmen dieser experimentellen Arbeit geschehen ist.

Die von uns durchgeführten MRT-Verfahren zeigten bis zu drei Monate nach dem Bestrahlungsende mit 20x0.1 Gy einen signifikanten Anstieg des zerebralen Blutflusses im Hippocampus. Der zerebrale Blutfluss wurde mithilfe der *arterial spin labeling*-Technik (ASL) gemessen und beschreibt den Anteil der Blutabgabe an bestimmte Gehirngewebe und gibt darüber Aufschlüsse über die Viabilität und die Gehirnfunktion (Alsop und Detre, 1996; Donnan, 2007; Williams *et al.*, 1992). Ein Anstieg des Blutflusses in bestimmten Gehirnarealen wird mit kognitiver Aktivität assoziiert (Logothetis, 2008). Da ein erhöhter zerebraler Blutfluss jedoch ebenfalls nach Entzündungen und Infektionen des Gehirns zu beobachten ist (Juhler und Paulson, 1986; Wuerfel *et al.*, 2004; Wuerfel *et al.*, 2007), scheint er in unserem Fall wohl eher ein erstes Indiz für eine Entzündungsreaktion zu sein, da die vorangegangenen immunhistologischen Experimente eher eine verminderte neuronale Aktivität andeuteten. Ein entzündungsinduzierter, gesteigerter Blutfluss deckt sich sehr gut mit den bereits festgestellten Veränderungen der Gliapopulation, die mithilfe der Immunfluoreszenz erhoben wurden. Besonders die geänderte Expression von GFAP lässt sich mit diesem Ergebnis gut in Einklang bringen, da Astrozyten einen großen Einfluss auf den Blutfluss nehmen und ihn entsprechend des Aktivitätsprofils verändern können (Attwell *et al.*, 2010). Für eine Entzündungsreaktion bzw. Neuroinflammation würden auch die fast durchgehend signifikant erhöhten T1- und T2-Relaxationszeiten sprechen. Die Erhöhung beider Messwerte ist ein starker Hinweis darauf, dass sich der Wasseranteil im Hippocampus aufgrund der Bestrahlung erhöht hat. Die Erklärungen für eine Erhöhung des Wasseranteils sind vielseitig. Sie können zum einen auf eine Entzündungsreaktion hinweisen, zum anderen kann der erhöhte Wasseranteil aber auch auf eine Zellatrophie und

damit auf die Flüssigkeitszunahme im Extrazellularraum (EZR) hindeuten. Dies würde ebenfalls zu den beobachteten zellulären Veränderungen passen, da wir sowohl eine verminderte Population von Stamm- und Vorläuferzellen als auch eine verminderte Astrozytenzahl durch ionisierende Strahlung nachweisen konnten.

Neben der perfusionsgewichteten MRT stellt die diffusionsgewichtete MRT (Stejskal und Tanner, 1965) eine weitere funktionelle Untersuchung dar, in der die Diffusion von Wassermolekülen mithilfe des ‚*apparent diffusion coefficient*‘ ADC gemessen wird. Die DWI kann so pathologische Veränderungen der Mikrostruktur aufzeigen und bietet außerdem die Möglichkeit, Hirnkrankheiten nicht-invasiv zu untersuchen (Bammer, 2003; Sundgren *et al.*, 2006). Hier zeigte sich zunächst nach drei Tagen eine Abnahme des ADC, bevor er sich nach einem Monat unverändert und nach drei Monaten erhöht darstellt. Ein Grund für einen niedrigen ADC kann ein zytotoxisches Ödem sein, bei dem die Dysfunktion der Calciumkanäle zu einem erhöhten Wasserimport führt, was Neuronen und Astrozyten anschwellen lässt (Tsui *et al.*, 2001) und die relative Beweglichkeit des Wassers im Gewebe einschränkt. Auch eine Restriktion der Myelinscheide kann mit einem niedrigeren ADC einhergehen, dagegen spricht jedoch die festgestellte Zunahme an Oligodendrozyten. Ein erhöhter DWI hingegen spricht für die Entstehung eines vasogenen Ödems oder eine Radionekrose (Chan *et al.*, 2003; Sundgren *et al.*, 2006). Ein vasogenes Ödem ist die Folge des Zusammenbruchs der Blut-Hirn-Schranke und geht mit einer Flüssigkeitsansammlung im EZR einher. Unser Experiment mit *EvansBlue* konnte keinen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke einen Monat nach Bestrahlung messen, was mit den DWI-Daten übereinstimmt. Der gemessene erhöhte ADC drei Monate nach Bestrahlungsende könnte allerdings ein Indiz für einen späteren Zusammenbruch sein, der noch untersucht werden sollte. Auch Yuan *et al.* konnten zeigen, dass die Blut-Hirn-Schranke erst 90 Tage nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 2 Gy zusammenbrach und sich diese für weitere 90 Tage nicht wieder erholte (Yuan *et al.*, 2006).

Abschließend lässt sich festlegen, dass die MRT-Untersuchungen bis zu drei Monate nach Bestrahlungsende starke Veränderungen der bestrahlten Gehirne im Gegensatz zu den altersgerechten, unbestrahlten Kontrollen demonstrieren, was noch einmal die Bedeutsamkeit dieser nicht-invasiven Untersuchungen unterstreicht. Über die gewonnenen Erkenntnisse wissenschaftlicher Studien erhalten vor allem funktionelle MRT-Untersuchungen im Klinikalltag immer größere Relevanz. MRTs können nicht nur in der Prädiagnostik helfen, die beste Therapie auszumachen, sondern helfen inzwischen auch bei der Nachsorge, die Effektivität, aber auch Nebenwirkungen einer Therapie besser einzuschätzen und damit die Therapien dahingehend zu verbessern.

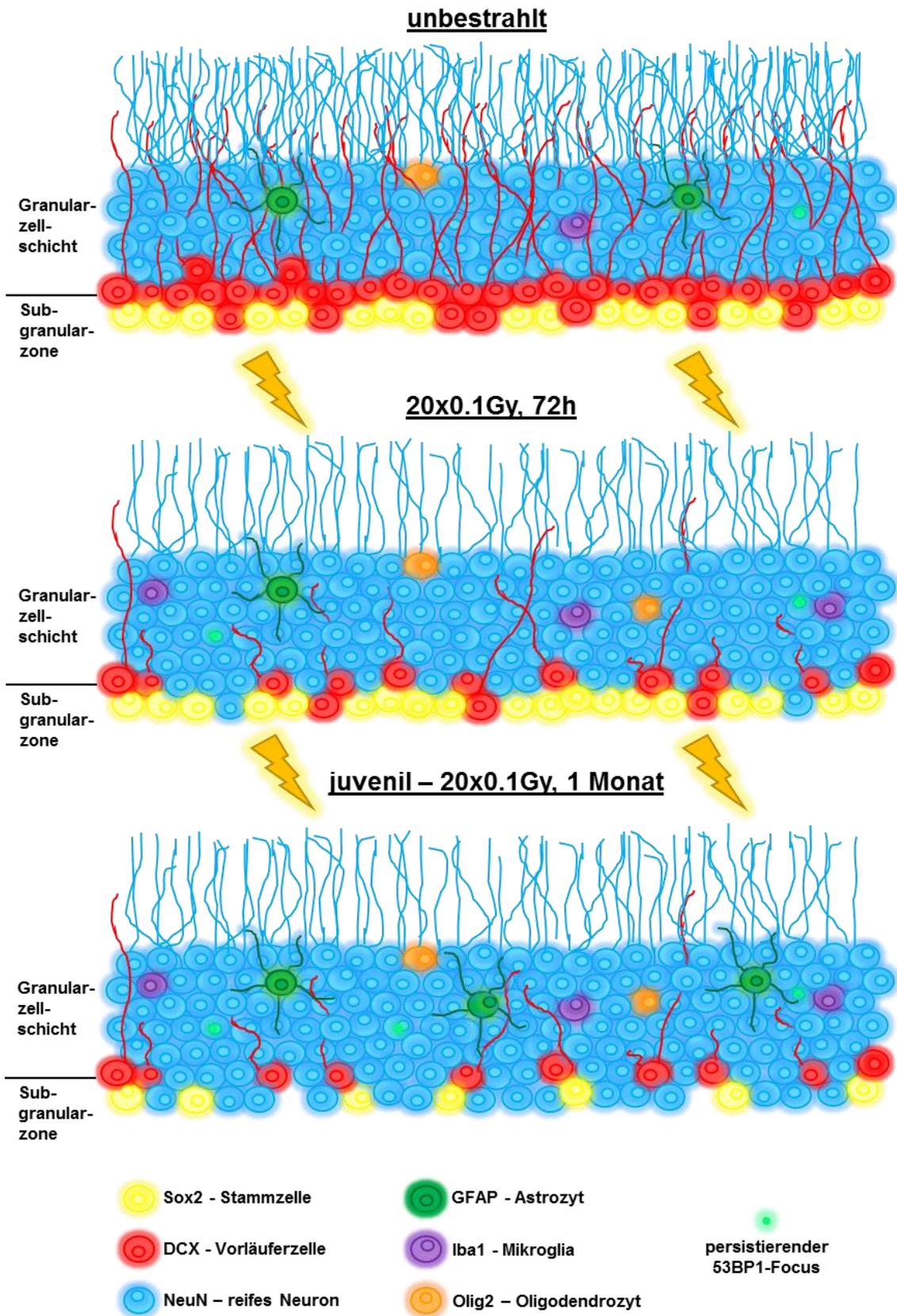


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der zellulären Veränderungen nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit die weitreichenden Auswirkungen einer repetitiven Bestrahlung mit niedrigen Strahlendosen (0.1 Gy) (Abbildung 5.1). Die festgestellten Auswirkungen stellen einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachteten kognitiven Beeinträchtigungen nach einer pädiatrischen Radiotherapie dar und unterstreichen die Relevanz für Forschungen über Niedrig-Dosis-Effekte. Die adulte Neurogenese zeigt eine starke Beeinträchtigung während aber auch noch lange nach Bestrahlungsende. Vor allem der Zusammenbruch der Stammzellpopulation in juvenil-bestrahlten Mäusen könnte weitreichende Folgen auf die Entwicklung und Funktionalität des Hippocampus haben. Eine verminderte Neurogeneserate nimmt zudem massiven Einfluss auf die Verarbeitung von neuen Informationen und erschwert die Gedächtniskonsolidierung und das Lernverhalten stark. Auch die reduzierte synaptische Plastizität durch ein weniger verzweigtes dendritisches Netzwerk sowie durch das veränderte Verhältnis von Neuronen zu Glia könnte die kognitiven Leistungen und die neuronale Aktivität deutlich minimieren. Viele Veränderungen waren bereits durch nicht-invasive Verfahren, wie dem fMRT, erkennbar, was die Relevanz für die Entwicklung und Anwendung neuer funktioneller bildgebender Verfahren mit einer höheren Auflösung unterstreicht. Mit diesen Verfahren wäre es möglich, auch Patienten langfristig nach einer Behandlung zu beobachten und die Auswirkungen besser beurteilen zu können, was womöglich einen verbesserten Therapieansatz zur Folge haben könnte. Die verstärkten und länger anhaltenden Veränderungen der juvenil-bestrahlten Gehirne verdeutlichen zudem, dass das Alter zu Beginn einer Bestrahlung ein wichtiger Risikofaktor darstellt. Gehirne, die sich noch mitten im Entwicklungsprozess befinden, wie es sich beim Menschen bis hin zum Jugendalter darstellt, sind deutlich sensibler gegenüber ionisierender Strahlung und konnten viele Veränderungen, vor allem den Rückgang der Stammzellpopulation, nicht einmal sechs Monate nach Bestrahlungsende kompensieren.

Die beobachteten Nebenwirkungen einer Radiotherapie durch die fraktionierte Applikation von niedrigen Strahlendosen zeigen die hohe Vulnerabilität des Hippocampus gegenüber ionisierender Strahlung und sollten bei diagnostischen und therapeutischen Behandlungen stärker berücksichtigt werden.

## 6 Ausblick

Aufgrund der hier festgestellten Auswirkungen fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung auf den Hippocampus ergeben sich weitere Fragestellungen, die Grundlage künftiger Experimente darstellen könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass sich die Auswirkungen in juvenil-bestrahlten Mäusen ausgeprägter und langfristiger darstellten. Von großem Interesse wäre es hierbei zu untersuchen, ob der Rückgang der Stammzellpopulation zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung (1 Jahr) kompensiert werden kann und ob dies gleichzeitig zu einer Erholung des Vorläuferzellstadiums und der Neurogenese führt.

Weiterhin wäre es aufschlussreich zu überprüfen, ob sich die beeinträchtigte Neurogenese und die verminderte synaptische Plastizität tatsächlich in einem veränderten Verhalten und kognitiver Beeinträchtigung widerspiegeln. Verschiedene Verhaltensexperimente, die mit dem Erlernen und der Gedächtnisausbildung bei Mäusen und damit mit hippocampaler Aktivität in Verbindung gebracht werden, könnten darüber Aufschluss geben. Die Durchführung des *morris-water-maze*-Test (MWM) würde sich anbieten, da dieser Aufschluss über das räumliche Gedächtnis sowie das Langzeitgedächtnis gibt. Zudem wäre auch die Anwendung des *novel-object-recognition*-Tests (NOR) interessant, da er Einblick in die Kognition und das Wiedererkennen von Objekten bei Mäusen gibt.

Die inflammatorische Reaktion, die sich hier bereits durch veränderte Gliapopulationen andeutet, sollte ebenfalls näher betrachtet werden. Dafür sollte die mögliche Zytokinsekretion von Gliazellen mittels ELISA und die Untersuchung des Aktivitätsprofils der Gliazellen und vor allem der Mikroglia mithilfe von FACS-Untersuchungen näher betrachtet werden. Weiterhin interessant wäre es zu untersuchen, ob das veränderte Verhältnis von Glia und Neuronen die synaptische Übertragung beeinträchtigen, z.B. über Messung neuronaler Calcium-Ströme.

Aufgrund der beobachteten Auswirkungen von 0.1 Gy auf den Hippocampus wäre es oben-drein interessant zu erfahren, ob sogar noch niedrigere Dosen (z.B. 0.01 Gy) ebenfalls Veränderungen hervorrufen. Diese Strahlendosen entsprächen Dosen im diagnostischen Bereich und würden bei der Durchführung eines CT-Scan appliziert werden (ca. 0.05-0.3 Gy).

Im Ganzen gesehen sollten aber bereits die hier festgestellten Veränderungen in der Hippocampusformation eine erhöhte Sensibilität gegenüber niedrigen Strahlendosen zur Folge haben und die Relevanz für Studien im Niedrig-Dosis-Bereich unterstreichen.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Ables, J. L., DeCarolis, N. A., Johnson, M. A., Rivera, P. D., Gao, Z. L., Cooper, D. C., . . . Eisch, A. J. (2010). Notch1 Is Required for Maintenance of the Reservoir of Adult Hippocampal Stem Cells. *Journal of Neuroscience*, 30(31), 10484-10492. doi:10.1523/Jneurosci.4721-09.2010
- [2] Acharya, M. M., Lan, M. L., Kan, V. H., Patel, N. H., Giedzinski, E., Tseng, B. P., & Limoli, C. L. (2010). Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic Biol Med*, 49(12), 1846-1855. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.021
- [3] Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., . . . Lindsay, R. M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*, 374(6521), 450-453. doi:10.1038/374450a0
- [4] Acosta, C., Anderson, H. D., & Anderson, C. M. (2017). Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J Neurosci Res*, 95(12), 2430-2447. doi:10.1002/jnr.24075
- [5] Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*, 339(6116), 156-161. doi:10.1126/science.1227901
- [6] Ahn, S., & Joyner, A. L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature*, 437(7060), 894-897. doi:10.1038/nature03994
- [7] Allen, D. M., van Praag, H., Ray, J., Weaver, Z., Winrow, C. J., Carter, T. A., . . . Barlow, C. (2001). Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis. *Genes Dev*, 15(5), 554-566. doi:10.1101/gad.869001
- [8] Alonso, M., Vianna, M. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2002). Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, 22(5-6), 663-674.
- [9] Alsop, D. C., & Detre, J. A. (1996). Reduced transit-time sensitivity in noninvasive magnetic resonance imaging of human cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16(6), 1236-1249. doi:10.1097/00004647-199611000-00019
- [10] Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137(4), 433-457. doi:10.1002/cne.901370404
- [11] Altman, J., & Bayer, S. A. (1990). Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol*, 301(3), 325-342. doi:10.1002/cne.903010302
- [12] Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335.
- [13] Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321), 232-243. doi:10.1038/nature09613

- [14] Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., . . . Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*, *513*(5), 532-541. doi:10.1002/cne.21974
- [15] Balentova, S., & Adamkov, M. (2015). Molecular, Cellular and Functional Effects of Radiation-Induced Brain Injury: A Review. *Int J Mol Sci*, *16*(11), 27796-27815. doi:10.3390/ijms161126068
- [16] Bammer, R. (2003). Basic principles of diffusion-weighted imaging. *Eur J Radiol*, *45*(3), 169-184. doi:10.1016/s0720-048x(02)00303-0
- [17] Bandtlow, C., Zachleder, T., & Schwab, M. E. (1990). Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J Neurosci*, *10*(12), 3837-3848.
- [18] Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., . . . Wynshaw-Boris, A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, *86*(1), 159-171. doi:10.1016/s0092-8674(00)80086-0
- [19] Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, *60*(3), 430-440. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013
- [20] Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2018). *Neurowissenschaften* (4 ed.): Springer Spektrum.
- [21] Bedner, P., Dupper, A., Huttmann, K., Muller, J., Herde, M. K., Dublin, P., . . . Steinhauser, C. (2015). Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain*, *138*(Pt 5), 1208-1222. doi:10.1093/brain/awv067
- [22] Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., . . . Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(7), 2711-2716. doi:10.1073/pnas.0711863105
- [23] Benito, E., & Barco, A. (2010). CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci*, *33*(5), 230-240. doi:10.1016/j.tins.2010.02.001
- [24] Berg, D. A., Bond, A. M., Ming, G. L., & Song, H. (2018). Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from? *F1000Res*, *7*, 277. doi:10.12688/f1000research.12684.1
- [25] Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M., & Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(40), 15570-15575. doi:10.1073/pnas.0803702105
- [26] Bianco, P. R., Tracy, R. B., & Kowalczykowski, S. C. (1998). DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front Biosci*, *3*, D570-603.
- [27] Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J., & Kuhn, H. G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, *291*(1), 17-20.
- [28] Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: A Ca<sup>2+</sup>(+)- and stimulus duration-dependent switch for

- hippocampal gene expression. *Cell*, 87(7), 1203-1214. doi:Doi 10.1016/S0092-8674(00)81816-4
- [29] Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2), 331-356.
- [30] Blomstrand, M., Kalm, M., Grander, R., Bjork-Eriksson, T., & Blomgren, K. (2014). Different reactions to irradiation in the juvenile and adult hippocampus. *Int J Radiat Biol*, 90(9), 807-815. doi:10.3109/09553002.2014.942015
- [31] Bonaguidi, M. A., Peng, C. Y., McGuire, T., Falciglia, G., Gobeske, K. T., Czeisler, C., & Kessler, J. A. (2008). Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 28(37), 9194-9204. doi:10.1523/JNEUROSCI.3314-07.2008
- [32] Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., & Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7), 1142-1155. doi:10.1016/j.cell.2011.05.024
- [33] Bond, A. M., Peng, C. Y., Meyers, E. A., McGuire, T., Ewaleifoh, O., & Kessler, J. A. (2014). BMP Signaling Regulates the Tempo of Adult Hippocampal Progenitor Maturation at Multiple Stages of the Lineage. *Stem Cells*, 32(8), 2201-2214. doi:10.1002/stem.1688
- [34] Bosma, M. J., & Carroll, A. M. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol*, 9, 323-350. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.001543
- [35] Bostrom, M., Kalm, M., Karlsson, N., Hellstrom Erkenstam, N., & Blomgren, K. (2013). Irradiation to the young mouse brain caused long-term, progressive depletion of neurogenesis but did not disrupt the neurovascular niche. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(6), 935-943. doi:10.1038/jcbfm.2013.34
- [36] Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., Kim, J. E., Thompson, J. R., Chen, J., & Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, 127(7), 1361-1373. doi:10.1016/j.cell.2006.10.043
- [37] Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., & Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1), 59-68.
- [38] Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., . . . Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, 24(3), 603-613.
- [39] Bredesen, D. E., Rao, R. V., & Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature*, 443(7113), 796-802. doi:10.1038/nature05293
- [40] Breunig, J. J., Sarkisian, M. R., Arellano, J. I., Morozov, Y. M., Ayoub, A. E., Sojitra, S., . . . Town, T. (2008). Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(35), 13127-13132. doi:10.1073/pnas.0804558105

- [41] Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., & Kuhn, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, *467*(1), 1-10. doi:10.1002/cne.10874
- [42] Buffo, A., Vosko, M. R., Erturk, D., Hamann, G. F., Jucker, M., Rowitch, D., & Gotz, M. (2005). Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(50), 18183-18188. doi:10.1073/pnas.0506535102
- [43] Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*, *275 Pt 3*, 305-315. doi:10.1016/j.expneurol.2015.03.020
- [44] Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, *276*(45), 42462-42467. doi:10.1074/jbc.C100466200
- [45] Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., & Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, *56*(2), 337-344.
- [46] Cao, X., Li, L. P., Qin, X. H., Li, S. J., Zhang, M., Wang, Q., . . . Zhu, X. H. (2013). Astrocytic adenosine 5'-triphosphate release regulates the proliferation of neural stem cells in the adult hippocampus. *Stem Cells*, *31*(8), 1633-1643. doi:10.1002/stem.1408
- [47] Casano, A. M., & Peri, F. (2015). Microglia: multitasking specialists of the brain. *Dev Cell*, *32*(4), 469-477. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.018
- [48] Casse, F., Richetin, K., & Toni, N. (2018). Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci*, *12*, 432. doi:10.3389/fncel.2018.00432
- [49] Catalin, B., Cupido, A., Iancau, M., Albu, C. V., & Kirchhoff, F. (2013). Microglia: first responders in the central nervous system. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, *54*(3), 467-472.
- [50] Cavallaro, M., Mariani, J., Lancini, C., Latorre, E., Caccia, R., Gullo, F., . . . Nicolis, S. K. (2008). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*, *135*(3), 541-557. doi:10.1242/dev.010801
- [51] Chan, Y. L., Yeung, D. K., Leung, S. F., & Chan, P. N. (2003). Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in radiation-induced cerebral necrosis. Apparent diffusion coefficient in lesion components. *J Comput Assist Tomogr*, *27*(5), 674-680. doi:10.1097/00004728-200309000-00003
- [52] Chen, Z. J., Negra, M., Levine, A., Ughrin, Y., & Levine, J. M. (2002a). Oligodendrocyte precursor cells: reactive cells that inhibit axon growth and regeneration. *J Neurocytol*, *31*(6-7), 481-495.
- [53] Chen, Z. J., Ughrin, Y., & Levine, J. M. (2002b). Inhibition of axon growth by oligodendrocyte precursor cells. *Mol Cell Neurosci*, *20*(1), 125-139. doi:10.1006/mcne.2002.1102

- [54] Chetty, S., Friedman, A. R., Taravosh-Lahn, K., Kirby, E. D., Mirescu, C., Guo, F., . . . Kaufer, D. (2014). Stress and glucocorticoids promote oligodendrogenesis in the adult hippocampus. *Mol Psychiatry*, 19(12), 1275-1283. doi:10.1038/mp.2013.190
- [55] Chong, M. J., Murray, M. R., Gosink, E. C., Russell, H. R., Srinivasan, A., Kapsetaki, M., . . . McKinnon, P. J. (2000). Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(2), 889-894. doi:10.1073/pnas.97.2.889
- [56] Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., . . . Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394-400. doi:10.1038/nature12776
- [57] Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci*, 14(5), 311-321. doi:10.1038/nrn3484
- [58] Cohen, E. P., Bruder, E. D., Cullinan, W. E., Ziegler, D., & Raff, H. (2011). Effect of high-dose total body irradiation on ACTH, corticosterone, and catecholamines in the rat. *Transl Res*, 157(1), 38-47. doi:10.1016/j.trsl.2010.09.007
- [59] Cohen, J. W., Louneva, N., Han, L. Y., Hodes, G. E., Wilson, R. S., Bennett, D. A., . . . Arnold, S. E. (2011). Chronic corticosterone exposure alters postsynaptic protein levels of PSD-95, NR1, and synaptopodin in the mouse brain. *Synapse*, 65(8), 763-770. doi:10.1002/syn.20900
- [60] Cooper-Kuhn, C. M., & Kuhn, H. G. (2002). Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Developmental Brain Research*, 134(1-2), 13-21. doi:Pii S0165-3806(01)00243-7
- [61] Doi 10.1016/S0165-3806(01)00243-7
- [62] Crawford, T. O. (1998). Ataxia telangiectasia. *Semin Pediatr Neurol*, 5(4), 287-294. doi:10.1016/s1071-9091(98)80007-7
- [63] Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W., & Greenberg, M. E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, 103(6), 945-956. doi:10.1016/s0092-8674(00)00197-5
- [64] Deisseroth, K., Heist, E. K., & Tsien, R. W. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*, 392(6672), 198-202. doi:Doi 10.1038/32448
- [65] Dibaj, P., Nadrigny, F., Steffens, H., Scheller, A., Hirrlinger, J., Schomburg, E. D., . . . Kirchhoff, F. (2010). NO Mediates Microglial Response to Acute Spinal Cord Injury Under ATP Control In Vivo. *Glia*, 58(9), 1133-1144. doi:10.1002/glia.20993
- [66] Dimitrova, N., Chen, Y. C., Spector, D. L., & de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature*, 456(7221), 524-528. doi:10.1038/nature07433
- [67] Donnan, G. A. G. A. a. I. F. (2007). *The ischemic penumbra : pathophysiology, imaging and therapy*. New York: Informa Healthcare.

- [68] Ehm, O., Goritz, C., Covic, M., Schaffner, I., Schwarz, T. J., Karaca, E., . . . Lie, D. C. (2010). RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*, *30*(41), 13794-13807. doi:10.1523/JNEUROSCI.1567-10.2010
- [69] Ehrlich, S., Breeze, J. L., Hesdorffer, D. C., Noam, G. G., Hong, X., Alban, R. L., . . . Renshaw, P. F. (2005). White matter hyperintensities and their association with suicidality in depressed young adults. *J Affect Disord*, *86*(2-3), 281-287. doi:10.1016/j.jad.2005.01.007
- [70] Ekdahl, C. T., Claassen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(23), 13632-13637. doi:10.1073/pnas.2234031100
- [71] El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, *290*(5495), 1364-1368.
- [72] Encinas, J. M., Sierra, A., Valcarcel-Martin, R., & Martin-Suarez, S. (2013). A developmental perspective on adult hippocampal neurogenesis. *Int J Dev Neurosci*, *31*(7), 640-645. doi:10.1016/j.ijdevneu.2013.04.001
- [73] Encinas, J. M., Vahtokari, A., & Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(21), 8233-8238. doi:10.1073/pnas.0601992103
- [74] Enokido, Y., Araki, T., Tanaka, K., Aizawa, S., & Hatanaka, H. (1996). Involvement of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in postmitotic CNS neurons. *Eur J Neurosci*, *8*(9), 1812-1821.
- [75] Enriquez-Rios, V., Dumitrache, L. C., Downing, S. M., Li, Y., Brown, E. J., Russell, H. R., & McKinnon, P. J. (2017). DNA-PKcs, ATM, and ATR Interplay Maintains Genome Integrity during Neurogenesis. *J Neurosci*, *37*(4), 893-905. doi:10.1523/JNEUROSCI.4213-15.2016
- [76] Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A. L., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., . . . Nicolis, S. K. (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci*, *12*(10), 1248-1256. doi:10.1038/nn.2397
- [77] Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., . . . Nicolis, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, *131*(15), 3805-3819. doi:10.1242/dev.01204
- [78] Fields, R. D., Woo, D. H., & Basser, P. J. (2015). Glial Regulation of the Neuronal Connectome through Local and Long-Distant Communication. *Neuron*, *86*(2), 374-386. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.014
- [79] Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., . . . Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, *23*(3), 373-382.
- [80] Floyd, R. A., & Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, *23*(5), 795-807.

- [81] Fouladi, M., Gilger, E., Kocak, M., Wallace, D., Buchanan, G., Reeves, C., . . . Mulhern, R. (2005). Intellectual and functional outcome of children 3 years old or younger who have CNS malignancies. *J Clin Oncol*, *23*(28), 7152-7160. doi:10.1200/JCO.2005.01.214
- [82] Fujioka, T., Fujioka, A., & Duman, R. S. (2004). Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *J Neurosci*, *24*(2), 319-328. doi:10.1523/JNEUROSCI.1065.03.2004
- [83] Fukuda, A., Fukuda, H., Swanpalmer, J., Hertzman, S., Lannering, B., Marky, I., . . . Blomgren, K. (2005). Age-dependent sensitivity of the developing brain to irradiation is correlated with the number and vulnerability of progenitor cells. *J Neurochem*, *92*(3), 569-584. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02894.x
- [84] Fukuda, H., Fukuda, A., Zhu, C., Korhonen, L., Swanpalmer, J., Hertzman, S., . . . Blomgren, K. (2004). Irradiation-induced progenitor cell death in the developing brain is resistant to erythropoietin treatment and caspase inhibition. *Cell Death Differ*, *11*(11), 1166-1178. doi:10.1038/sj.cdd.4401472
- [85] Fulop, G. M., Bosma, G. C., Bosma, M. J., & Phillips, R. A. (1988). Early B-cell precursors in scid mice: normal numbers of cells transformable with Abelson murine leukemia virus (A-MuLV). *Cell Immunol*, *113*(1), 192-201. doi:10.1016/0008-8749(88)90017-2
- [86] Furman, J. L., Sama, D. M., Gant, J. C., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Bachstetter, A. D., . . . Norris, C. M. (2012). Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, *32*(46), 16129-16140. doi:10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012
- [87] Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, *133*(4), 1710-1715.
- [88] Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(8), a020537. doi:10.1101/cshperspect.a020537
- [89] Golgi, C. (1873). Sulla Struttura della sostanza grigia della cervello. *Gazz Med Ital Lombardia*(6), 244-246.
- [90] Gonzalez, G. A., & Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, *59*(4), 675-680. doi:10.1016/0092-8674(89)90013-5
- [91] Gray, L. H., Chase, H. B., Deschner, E. E., Hunt, J. W., & Scott, O. C. (1959). The influence of oxygen and peroxides on the response of mammalian cells and tissues to ionizing radiations. *Prog Nucl Energy 6 Biol Sci*, *2*, 69-81.
- [92] Grosche, A., Hauser, A., Lepper, M. F., Mayo, R., von Toerne, C., Merl-Pham, J., & Hauck, S. M. (2016). The Proteome of Native Adult Muller Glial Cells From Murine Retina. *Mol Cell Proteomics*, *15*(2), 462-480. doi:10.1074/mcp.M115.052183
- [93] Grudzenski, S., Raths, A., Conrad, S., Rube, C. E., & Lobrich, M. (2010). Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(32), 14205-14210. doi:10.1073/pnas.1002213107

- [94] Grunwald, I. C., Korte, M., Wolfer, D., Wilkinson, G. A., Unsicker, K., Lipp, H. P., . . . Klein, R. (2001). Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 32(6), 1027-1040. doi:10.1016/s0896-6273(01)00550-5
- [95] Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M. F., & Lieber, M. R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J*, 26(4), 1010-1023. doi:10.1038/sj.emboj.7601559
- [96] Guo, W., Zhang, L., Christopher, D. M., Teng, Z. Q., Fausett, S. R., Liu, C., . . . Zhao, X. (2011). RNA-binding protein FXR2 regulates adult hippocampal neurogenesis by reducing Noggin expression. *Neuron*, 70(5), 924-938. doi:10.1016/j.neuron.2011.03.027
- [97] Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*, 2(12), 1120-1124. doi:10.1038/16046
- [98] Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci*, 21(14), 5089-5098.
- [99] Hall, P., Adami, H. O., Trichopoulos, D., Pedersen, N. L., Lagiou, P., Ekblom, A., . . . Granath, F. (2004). Effect of low doses of ionising radiation in infancy on cognitive function in adulthood: Swedish population based cohort study. *BMJ*, 328(7430), 19. doi:10.1136/bmj.328.7430.19
- [100] Hannan, M. A., Hellani, A., Al-Khodairy, F. M., Kunhi, M., Siddiqui, Y., Al-Yussef, N., . . . Aboussekhra, A. (2002). Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. *Carcinogenesis*, 23(10), 1617-1624. doi:10.1093/carcin/23.10.1617
- [101] Harding, S. M., & Bristow, R. G. (2012). Discordance between phosphorylation and recruitment of 53BP1 in response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 11(7), 1432-1444. doi:10.4161/cc.19824
- [102] Hartlerode, A. J., & Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J*, 423(2), 157-168. doi:10.1042/BJ20090942
- [103] Hastings, N. B., & Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, 413(1), 146-154.
- [104] Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173-185. doi:10.1124/pr.57.2.4
- [105] Henderson, J. T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J. C., & Pawson, T. (2001). The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron*, 32(6), 1041-1056. doi:10.1016/s0896-6273(01)00553-0
- [106] Herzog, K. H., Chong, M. J., Kapsetaki, M., Morgan, J. I., & McKinnon, P. J. (1998). Requirement for Atm in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science*, 280(5366), 1089-1091. doi:10.1126/science.280.5366.1089

- [107] Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A. J., Nye, J. S., . . . van der Kooy, D. (2002). Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev*, *16*(7), 846-858. doi:10.1101/gad.975202
- [108] Hodge, R. D., & Hevner, R. F. (2011). Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis. *Dev Neurobiol*, *71*(8), 680-689. doi:10.1002/dneu.20882
- [109] Hoppe-Hirsch, E., Brunet, L., Laroussinie, F., Cinalli, G., Pierre-Kahn, A., Renier, D., . . . Hirsch, J. F. (1995). Intellectual outcome in children with malignant tumors of the posterior fossa: influence of the field of irradiation and quality of surgery. *Childs Nerv Syst*, *11*(6), 340-345; discussion 345-346. doi:10.1007/bf00301666
- [110] Hudson, D., Kovalchuk, I., Koturbash, I., Kolb, B., Martin, O. A., & Kovalchuk, O. (2011). Induction and persistence of radiation-induced DNA damage is more pronounced in young animals than in old animals. *Aging (Albany NY)*, *3*(6), 609-620. doi:10.18632/aging.100340
- [111] Huo, K., Sun, Y., Li, H., Du, X., Wang, X., Karlsson, N., . . . Blomgren, K. (2012). Lithium reduced neural progenitor apoptosis in the hippocampus and ameliorated functional deficits after irradiation to the immature mouse brain. *Mol Cell Neurosci*, *51*(1-2), 32-42. doi:10.1016/j.mcn.2012.07.002
- [112] Hwang, S. Y., Jung, J. S., Kim, T. H., Lim, S. J., Oh, E. S., Kim, J. Y., . . . Han, I. O. (2006). Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. *Neurobiol Dis*, *21*(3), 457-467. doi:10.1016/j.nbd.2005.08.006
- [113] Iwabuchi, K., Bartel, P. L., Li, B., Marraccino, R., & Fields, S. (1994). Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(13), 6098-6102.
- [114] Iyama, T., & Wilson, D. M., 3rd. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, *12*(8), 620-636. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- [115] Jackowski, A. P., Douglas-Palumberi, H., Jackowski, M., Win, L., Schultz, R. T., Staib, L. W., . . . Kaufman, J. (2008). Corpus callosum in maltreated children with posttraumatic stress disorder: a diffusion tensor imaging study. *Psychiatry Res*, *162*(3), 256-261. doi:10.1016/j.psychresns.2007.08.006
- [116] Jagasia, R., Steib, K., Englberger, E., Herold, S., Faus-Kessler, T., Saxe, M., . . . Lie, D. C. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, *29*(25), 7966-7977. doi:10.1523/JNEUROSCI.1054-09.2009
- [117] Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, *325*(6101), 253-257. doi:10.1038/325253a0
- [118] Jessberger, S., & Kempermann, G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*, *18*(10), 2707-2712.
- [119] Josselyn, S. A., & Nguyen, P. V. (2005). CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, *4*(5), 481-497.

- [120] Juhler, M., & Paulson, O. B. (1986). Regional cerebral blood flow in acute experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res*, 363(2), 272-278. doi:10.1016/0006-8993(86)91012-7
- [121] Kalani, M. Y., Cheshier, S. H., Cord, B. J., Bababeygy, S. R., Vogel, H., Weissman, I. L., . . . Nusse, R. (2008). Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44), 16970-16975. doi:10.1073/pnas.0808616105
- [122] Kalm, M., Fukuda, A., Fukuda, H., Ohrfelt, A., Lannering, B., Bjork-Eriksson, T., . . . Blomgren, K. (2009). Transient Inflammation in Neurogenic Regions after Irradiation of the Developing Brain. *Radiation Research*, 171(1), 66-76. doi:Doi 10.1667/Rr1269.1
- [123] Kang, H., Welcher, A. A., Shelton, D., & Schuman, E. M. (1997). Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 19(3), 653-664. doi:10.1016/s0896-6273(00)80378-5
- [124] Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092-1094.
- [125] Karalay, O., Doberauer, K., Vadodaria, K. C., Knobloch, M., Berti, L., Miquelajauregui, A., . . . Jessberger, S. (2011). Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(14), 5807-5812. doi:10.1073/pnas.1013456108
- [126] Kauffmann, G. M., E.; Sauer, R. (2006). *Radiologie* (3 ed.): Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH.
- [127] Kaya, M., Palanduz, A., Kalayci, R., Kemikler, G., Simsek, G., Bilgic, B., . . . Karadeniz, A. (2004). Effects of lipopolysaccharide on the radiation-induced changes in the blood-brain barrier and the astrocytes. *Brain Res*, 1019(1-2), 105-112. doi:10.1016/j.brainres.2004.05.102
- [128] Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27(8), 447-452. doi:10.1016/j.tins.2004.05.013
- [129] Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493-495. doi:10.1038/386493a0
- [130] Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(9), a018812. doi:10.1101/cshperspect.a018812
- [131] Kempf, S. J., Casciati, A., Buratovic, S., Janik, D., von Toerne, C., Ueffing, M., . . . Tapio, S. (2014). The cognitive defects of neonatally irradiated mice are accompanied by changed synaptic plasticity, adult neurogenesis and neuroinflammation. *Mol Neurodegener*, 9, 57. doi:10.1186/1750-1326-9-57
- [132] Kempf, S. J., Sepe, S., von Toerne, C., Janik, D., Neff, F., Hauck, S. M., . . . Tapio, S. (2015a). Neonatal Irradiation Leads to Persistent Proteome Alterations Involved in Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus and Cortex. *J Proteome Res*, 14(11), 4674-4686. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00564

- [133] Kempf, S. J., von Toerne, C., Hauck, S. M., Atkinson, M. J., Benotmane, M. A., & Tapio, S. (2015b). Long-term consequences of in utero irradiated mice indicate proteomic changes in synaptic plasticity related signalling. *Proteome Sci*, 13, 26. doi:10.1186/s12953-015-0083-4
- [134] Kim, S. H., Chung, C. Y., & Son, C. H. (1998). Cell death by apoptosis in the neonatal mouse cerebellum following gamma-irradiation. *Anticancer Res*, 18(3A), 1629-1632.
- [135] Kimler, B. F., Park, C. H., Yakar, D., & Mies, R. M. (1985). Radiation response of human normal and leukemic hemopoietic cells assayed by in vitro colony formation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 11(4), 809-816. doi:10.1016/0360-3016(85)90315-3
- [136] Kitamura, T., Miyake, T., & Fujita, S. (1984). Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol*, 226(3), 421-433. doi:10.1002/cne.902260310
- [137] Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., & Ishibashi, M. (2008). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development*, 135(16), 2717-2727. doi:10.1242/dev.015891
- [138] Koyama, Y., & Tohyama, M. (2012). A modified and highly sensitive Golgi-Cox method to enable complete and stable impregnation of embryonic neurons. *J Neurosci Methods*, 209(1), 58-61. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.06.007
- [139] Kraus, M., Lev, A., Simon, A. J., Levrán, I., Nissenkorn, A., Levi, Y. B., . . . Somech, R. (2014). Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Immunol*, 34(5), 561-572. doi:10.1007/s10875-014-0044-1
- [140] Kronenberg, G., Gertz, K., Cheung, G., Buffo, A., Kettenmann, H., Gotz, M., & Endres, M. (2010). Modulation of Fate Determinants Olig2 and Pax6 in Resident Glia Evokes Spiking Neuroblasts in a Model of Mild Brain Ischemia. *Stroke*, 41(12), 2944-2949. doi:10.1161/Strokeaha.110.583039
- [141] Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., & Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, 467(4), 455-463. doi:10.1002/cne.10945
- [142] Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16(6), 2027-2033.
- [143] Kuhn, H. G., Eisch, A. J., Spalding, K., & Peterson, D. A. (2016). Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(3), a025981. doi:10.1101/cshperspect.a025981
- [144] Kullander, K., & Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(7), 475-486. doi:10.1038/nrm856
- [145] Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., . . . Gage, F. H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*, 12(9), 1097-1105. doi:10.1038/nn.2360

- [146] Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., & Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*, 6(1), 21-27. doi:10.1038/nn983
- [147] Lana, D., Iovino, L., Nosi, D., Wenk, G. L., & Giovannini, M. G. (2016). The neuron-astrocyte-microglia triad involvement in neuroinflammation mechanisms in the CA3 hippocampus of memory-impaired aged rats. *Exp Gerontol*, 83, 71-88. doi:10.1016/j.exger.2016.07.011
- [148] Landas, S., & Phillips, M. I. (1982). Staining of human and rat brain Vibratome sections by a new Golgi method. *J Neurosci Methods*, 5(1-2), 147-151.
- [149] Lee, J. H., & Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308(5721), 551-554. doi:10.1126/science.1108297
- [150] Lee, J. H., & Paull, T. T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 26(56), 7741-7748. doi:10.1038/sj.onc.1210872
- [151] Li, Cheng, Z., & Wong, S. (2016). Differential Apoptosis Radiosensitivity of Neural Progenitors in Adult Mouse Hippocampus. *Int J Mol Sci*, 17(5). doi:10.3390/ijms17060970
- [152] Li, G., & Pleasure, S. J. (2005). Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev Neurosci*, 27(2-4), 93-99. doi:10.1159/000085980
- [153] Li, Z., Van Aelst, L., & Cline, H. T. (2000). Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat Neurosci*, 3(3), 217-225. doi:10.1038/72920
- [154] Li, Z., Zheng, J. Q., Ruan, J., Li, Z., & Tzeng, C. M. (2016). Chronic Inflammation Links Cancer and Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*, 8, 126. doi:10.3389/fnagi.2016.00126
- [155] Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Desire, L., Mira, H., Consiglio, A., . . . Gage, F. H. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437(7063), 1370-1375. doi:10.1038/nature04108
- [156] Lisman, J. (2003). Actin's actions in LTP-induced synapse growth. *Neuron*, 38(3), 361-362. doi:10.1016/s0896-6273(03)00257-5
- [157] Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(3), 169-182. doi:10.1038/nrn3192
- [158] Lodato, M. A., Ng, C. W., Wamstad, J. A., Cheng, A. W., Thai, K. K., Fraenkel, E., . . . Boyer, L. A. (2013). SOX2 co-occupies distal enhancer elements with distinct POU factors in ESCs and NPCs to specify cell state. *PLoS Genet*, 9(2), e1003288. doi:10.1371/journal.pgen.1003288
- [159] Logothetis, N. K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, 453(7197), 869-878. doi:10.1038/nature06976
- [160] Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.

- [161] Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605-623.
- [162] Lorat, Y., Schanz, S., & Rube, C. E. (2016). Ultrastructural Insights into the Biological Significance of Persisting DNA Damage Foci after Low Doses of Ionizing Radiation. *Clin Cancer Res*, 22(21), 5300-5311. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-3081
- [163] Lou, Y. X., Li, J., Wang, Z. Z., Xia, C. Y., & Chen, N. H. (2018). Glucocorticoid receptor activation induces decrease of hippocampal astrocyte number in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 235(9), 2529-2540. doi:10.1007/s00213-018-4936-2
- [164] Lu, P. P., & Ramanan, N. (2012). A critical cell-intrinsic role for serum response factor in glial specification in the CNS. *J Neurosci*, 32(23), 8012-8023. doi:10.1523/JNEUROSCI.5633-11.2012
- [165] Lu, Z., & Kipnis, J. (2010). Thrombospondin 1--a key astrocyte-derived neurogenic factor. *FASEB J*, 24(6), 1925-1934. doi:10.1096/fj.09-150573
- [166] Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., . . . Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6(5), 445-456. doi:10.1016/j.stem.2010.03.017
- [167] Ma, Y., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)*, 4(7), 845-851. doi:10.1016/j.dnarep.2005.04.013
- [168] Manaenko, A., Chen, H., Kammer, J., Zhang, J. H., & Tang, J. (2011). Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods*, 195(2), 206-210. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.12.013
- [169] Marchese, E., Di Maria, V., Samengo, D., Pani, G., Michetti, F., & Geloso, M. C. (2017). Post-natal Deletion of Neuronal cAMP Responsive-Element Binding (CREB)-1 Promotes Pro-inflammatory Changes in the Mouse Hippocampus. *Neurochem Res*, 42(8), 2230-2245. doi:10.1007/s11064-017-2233-9
- [170] Marin-Padilla, M. (1995). Prenatal development of fibrous (white matter), protoplasmic (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral cortex: a Golgi study. *J Comp Neurol*, 357(4), 554-572. doi:10.1002/cne.903570407
- [171] Marin-Teva, J. L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., & Mallat, M. (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*, 41(4), 535-547.
- [172] Mata-Garrido, J., Casafont, I., Tapia, O., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2016). Neuronal accumulation of unrepaired DNA in a novel specific chromatin domain: structural, molecular and transcriptional characterization. *Acta Neuropathol Commun*, 4, 41. doi:10.1186/s40478-016-0312-9
- [173] Mata-Garrido, J., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M. T., Cuadrado, A., & Lafarga, M. (2018). Persistent accumulation of unrepaired DNA damage in rat cortical neurons: nuclear organization and ChIP-seq analysis of damaged DNA. *Acta Neuropathol Commun*, 6(1), 68. doi:10.1186/s40478-018-0573-6

- [174] Meek, K., Dang, V., & Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol*, *99*, 33-58. doi:10.1016/S0065-2776(08)00602-0
- [175] Merz, K., Herold, S., & Lie, D. C. (2011). CREB in adult neurogenesis - master and partner in the development of adult-born neurons? *European Journal of Neuroscience*, *33*(6), 1078-1086. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07606.x
- [176] Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., . . . Grant, S. G. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, *396*(6710), 433-439. doi:10.1038/24790
- [177] Miller, M. W., & Nowakowski, R. S. (1988). Use of Bromodeoxyuridine-Immunohistochemistry to Examine the Proliferation, Migration and Time of Origin of Cells in the Central Nervous-System. *Brain Research*, *457*(1), 44-52. doi:10.1016/0006-8993(88)90055-8
- [178] Mills, K. D., Ferguson, D. O., & Alt, F. W. (2003). The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev*, *194*, 77-95.
- [179] Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, *28*, 223-250. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459
- [180] Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, D. C., Jessberger, S., Consiglio, A., . . . Gage, F. H. (2010). Signaling through BMP-IA Regulates Quiescence and Long-Term Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*, *7*(1), 78-89. doi:10.1016/j.stem.2010.04.016
- [181] Miranda, C. J., Braun, L., Jiang, Y., Hester, M. E., Zhang, L., Riolo, M., . . . Kaspar, B. K. (2012). Aging brain microenvironment decreases hippocampal neurogenesis through Wnt-mediated survivin signaling. *Aging Cell*, *11*(3), 542-552. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00816.x
- [182] Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*, *100*(5), 433-442. doi:10.1254/jphs.cpj06007x
- [183] Mizumatsu, S., Monje, M. L., Morhardt, D. R., Rola, R., Palmer, T. D., & Fike, J. R. (2003). Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res*, *63*(14), 4021-4027.
- [184] Monahan, A. J., Warren, M., & Carvey, P. M. (2008). Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: An autoimmune hypothesis. *Cell Transplantation*, *17*(4), 363-372.
- [185] Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R., & Palmer, T. D. (2002). Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med*, *8*(9), 955-962. doi:10.1038/nm749
- [186] Monje, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*, *302*(5651), 1760-1765. doi:10.1126/science.1088417
- [187] Moss, J., Gebara, E., Bushong, E. A., Sanchez-Pascual, I., O'Laoi, R., El M'Ghari, I., . . . Toni, N. (2016). Fine processes of Nestin-GFP-positive radial glia-like stem cells in the adult dentate gyrus ensheath local synapses and vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(18), E2536-2545. doi:10.1073/pnas.1514652113

- [188] Motaghinejad, M., Motevalian, M., Babalouei, F., Abdollahi, M., Heidari, M., & Madjd, Z. (2017). Possible involvement of CREB/BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of topiramate against methylphenidate induced apoptosis, oxidative stress and inflammation in isolated hippocampus of rats: Molecular, biochemical and histological evidences. *Brain Res Bull*, 132, 82-98. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.05.011
- [189] Mulhern, R. K., Merchant, T. E., Gajjar, A., Reddick, W. E., & Kun, L. E. (2004). Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood. *Lancet Oncol*, 5(7), 399-408. doi:10.1016/S1470-2045(04)01507-4
- [190] Munoz, I. M., Jowsey, P. A., Toth, R., & Rouse, J. (2007). Phospho-epitope binding by the BRCT domains of hPTIP controls multiple aspects of the cellular response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 35(16), 5312-5322. doi:10.1093/nar/gkm493
- [191] Nakagawa, S., Kim, J. E., Lee, R., Malberg, J. E., Chen, J., Steffen, C., . . . Duman, R. S. (2002). Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*, 22(9), 3673-3682. doi:20026301
- [192] Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci*, 5(5), 361-372. doi:10.1038/nrn1385
- [193] Nawaz, S., Sanchez, P., Schmitt, S., Snaidero, N., Mitkovski, M., Velte, C., . . . Simons, M. (2015). Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system. *Dev Cell*, 34(2), 139-151. doi:10.1016/j.devcel.2015.05.013
- [194] Naylor, A. S., Bull, C., Nilsson, M. K., Zhu, C., Bjork-Eriksson, T., Eriksson, P. S., . . . Kuhn, H. G. (2008). Voluntary running rescues adult hippocampal neurogenesis after irradiation of the young mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(38), 14632-14637. doi:10.1073/pnas.0711128105
- [195] Niciu, M. J., Henter, I. D., Sanacora, G., & Zarate, C. A., Jr. (2014). Glial abnormalities in substance use disorders and depression: does shared glutamatergic dysfunction contribute to comorbidity? *World J Biol Psychiatry*, 15(1), 2-16. doi:10.3109/15622975.2013.829585
- [196] Nicola, Z., Fabel, K., & Kempermann, G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat*, 9, 53. doi:10.3389/fnana.2015.00053
- [197] Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D. T., & Terrissol, M. (1997). Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *Int J Radiat Biol*, 71(5), 467-483.
- [198] Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314-1318. doi:10.1126/science.1110647
- [199] Nimmonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., . . . Kowalczykowski, S. C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev*, 25(4), 350-362. doi:10.1101/gad.2003811

- [200] O'Connor, T., Borsig, L., & Heikenwalder, M. (2015). CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 15(2), 105-118.
- [201] Palmer, T. D., Willhoite, A. R., & Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425(4), 479-494.
- [202] Papa, L., Zonfrillo, M. R., Ramirez, J., Silvestri, S., Giordano, P., Braga, C. F., . . . Mittal, M. K. (2015). Performance of Glial Fibrillary Acidic Protein in Detecting Traumatic Intracranial Lesions on Computed Tomography in Children and Youth With Mild Head Trauma. *Acad Emerg Med*, 22(11), 1274-1282. doi:10.1111/acem.12795
- [203] Parihar, V. K., & Limoli, C. L. (2013). Cranial irradiation compromises neuronal architecture in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(31), 12822-12827. doi:10.1073/pnas.1307301110
- [204] Pauly, H. P., H.; Rajewski, B. (1966). *Über die direkte und indirekte Strahlenwirkung auf Enzyme in der Zelle* (Vol. 3). Biophysik: Springer.
- [205] Peebles, C. L., Yoo, J., Thwin, M. T., Palop, J. J., Noebels, J. L., & Finkbeiner, S. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(42), 18173-18178. doi:10.1073/pnas.1006546107
- [206] Peissner, W., Kocher, M., Treuer, H., & Gillardon, F. (1999). Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 71(1), 61-68.
- [207] Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*, 94(4), 1077-1098. doi:10.1152/physrev.00041.2013
- [208] Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*, 565, 30-38. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.071
- [209] Pellerin, L., Bouzier-Sore, A. K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Magistretti, P. J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update. *Glia*, 55(12), 1251-1262. doi:10.1002/glia.20528
- [210] Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., & Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging*, 29(11), 1754-1762. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013
- [211] Petrini, J. H. (1999). The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am J Hum Genet*, 64(5), 1264-1269. doi:10.1086/302391
- [212] Petrini, J. H. (2000). The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr Opin Cell Biol*, 12(3), 293-296.
- [213] Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., . . . Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52(3), 437-444. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.024
- [214] Prange, O., Wong, T. P., Gerrow, K., Wang, Y. T., & El-Husseini, A. (2004). A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and

- neuroligin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(38), 13915-13920. doi:10.1073/pnas.0405939101
- [215] Prise, K. M., Schettino, G., Folkard, M., & Held, K. D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol*, 6(7), 520-528. doi:10.1016/S1470-2045(05)70246-1
- [216] Ranjan, A., & Mallick, B. N. (2012). Differential staining of glia and neurons by modified Golgi-Cox method. *J Neurosci Methods*, 209(2), 269-279. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.06.023
- [217] Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T., & Chen, J. (2001). Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol*, 153(3), 613-620.
- [218] Redmond, L., Kashani, A. H., & Ghosh, A. (2002). Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron*, 34(6), 999-1010. doi:10.1016/s0896-6273(02)00737-7
- [219] Redwine, J. M., Kosofsky, B., Jacobs, R. E., Games, D., Reilly, J. F., Morrison, J. H., . . . Bloom, F. E. (2003). Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3), 1381-1386. doi:10.1073/pnas.242746599
- [220] Regenold, W. T., Phatak, P., Marano, C. M., Gearhart, L., Viens, C. H., & Hisley, K. C. (2007). Myelin staining of deep white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and unipolar major depression. *Psychiatry Res*, 151(3), 179-188. doi:10.1016/j.psychres.2006.12.019
- [221] Reiman, A., Srinivasan, V., Barone, G., Last, J. I., Wootton, L. L., Davies, E. G., . . . Taylor, A. M. (2011). Lymphoid tumours and breast cancer in ataxia telangiectasia; substantial protective effect of residual ATM kinase activity against childhood tumours. *Br J Cancer*, 105(4), 586-591. doi:10.1038/bjc.2011.266
- [222] Rickmann, M., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1987). Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 264(4), 449-479. doi:10.1002/cne.902640403
- [223] Rink, H. (1971). Die Radiolyse des Wassers. In *Chemie in unserer Zeit* (Vol. 5, pp. 90-95).
- [224] Rodrigues-Moreira, S., Moreno, S. G., Ghinatti, G., Lewandowski, D., Hoffschir, F., Ferri, F., . . . Romeo, P. H. (2017). Low-Dose Irradiation Promotes Persistent Oxidative Stress and Decreases Self-Renewal in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep*, 20(13), 3199-3211. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.013
- [225] Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273(10), 5858-5868.
- [226] Rothblum-Oviatt, C., Wright, J., Lefton-Greif, M. A., McGrath-Morrow, S. A., Crawford, T. O., & Lederman, H. M. (2016). Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis*, 11(1), 159. doi:10.1186/s13023-016-0543-7
- [227] Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468(7321), 214-222. doi:10.1038/nature09611

- [228] Rube, C. E., Grudzenski, S., Kuhne, M., Dong, X., Rief, N., Loblrich, M., & Rube, C. (2008). DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res*, 14(20), 6546-6555. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5147
- [229] Russo, M. V., & McGavern, D. B. (2015). Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends Immunol*, 36(10), 637-650. doi:10.1016/j.it.2015.08.002
- [230] Saab, A. S., Tzvetanova, I. D., & Nave, K. A. (2013). The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol*, 23(6), 1065-1072. doi:10.1016/j.conb.2013.09.008
- [231] Sander, L., Langkilde, N. C., Holmberg, M., & Carl, J. (2014). MRI target delineation may reduce long-term toxicity after prostate radiotherapy. *Acta Oncol*, 53(6), 809-814. doi:10.3109/0284186X.2013.865077
- [232] Sandoval, N., Platzer, M., Rosenthal, A., Dork, T., Bendix, R., Skawran, B., . . . Schindler, D. (1999). Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum Mol Genet*, 8(1), 69-79. doi:10.1093/hmg/8.1.69
- [233] Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., . . . Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169), 509-516. doi:10.1038/nature06337
- [234] Sauer, R. (1993). *Strahlentherapie und Onkologie für Technische Assistenten in der Medizin* (3 ed.): Urban & Schwarzenbeck Verlag.
- [235] Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., . . . Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691-705. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026
- [236] Schafer, D. P., Lehrman, E. K., & Stevens, B. (2013). The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*, 61(1), 24-36. doi:10.1002/glia.22389
- [237] Schafer, D. P., & Stevens, B. (2015). Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(10), a020545. doi:10.1101/cshperspect.a020545
- [238] Schanz, S., Schuler, N., Lorat, Y., Fan, L., Kaestner, L., Wennemuth, G., . . . Rube, C. E. (2012). Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. *DNA Repair (Amst)*, 11(10), 823-832. doi:10.1016/j.dnarep.2012.07.005
- [239] Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., & Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*, 192(2), 348-356. doi:10.1016/j.expneurol.2004.11.016
- [240] Schmal, Z., Isermann, A., Hladik, D., von Toerne, C., Tapio, S., & Rube, C. E. (2019). DNA damage accumulation during fractionated low-dose radiation compromises hippocampal neurogenesis. *Radiother Oncol*, 137, 45-54. doi:10.1016/j.radonc.2019.04.021

- [241] Schmidt, M. A., & Payne, G. S. (2015). Radiotherapy planning using MRI. *Phys Med Biol*, 60(22), R323-361. doi:10.1088/0031-9155/60/22/R323
- [242] Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., & Halazonetis, T. D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, 151(7), 1381-1390.
- [243] Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- [244] Sedel, F., Bechade, C., Vyas, S., & Triller, A. (2004). Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J Neurosci*, 24(9), 2236-2246. doi:10.1523/JNEUROSCI.4464-03.2004
- [245] Sedgwick, R. P., Boder, E. (1991). *Ataxia-telangiectasia* Elsevier.
- [246] Seib, D. R., Corsini, N. S., Ellwanger, K., Plaas, C., Mateos, A., Pitzer, C., . . . Martin-Villalba, A. (2013). Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell*, 12(2), 204-214. doi:10.1016/j.stem.2012.11.010
- [247] Seki, T., Sato, T., Toda, K., Osumi, N., Imura, T., & Shioda, S. (2014). Distinctive population of Gfap-expressing neural progenitors arising around the dentate notch migrate and form the granule cell layer in the developing hippocampus. *J Comp Neurol*, 522(2), 261-283. doi:10.1002/cne.23460
- [248] Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, 21(18), 7153-7160.
- [249] Shahin, S., Banerjee, S., Swarup, V., Singh, S. P., & Chaturvedi, C. M. (2018). From the Cover: 2.45-GHz Microwave Radiation Impairs Hippocampal Learning and Spatial Memory: Involvement of Local Stress Mechanism-Induced Suppression of iGluR/ERK/CREB Signaling. *Toxicol Sci*, 161(2), 349-374. doi:10.1093/toxsci/kfx221
- [250] Shariff, G. A. (1953). Cell counts in the primate cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 98(3), 381-400.
- [251] Sheng, M., Thompson, M. A., & Greenberg, M. E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 252(5011), 1427-1430. doi:10.1126/science.1646483
- [252] Shimosaki, K., Clemenson, G. D., Jr., & Gage, F. H. (2013). Paired related homeobox protein 1 is a regulator of stemness in adult neural stem/progenitor cells. *J Neurosci*, 33(9), 4066-4075. doi:10.1523/JNEUROSCI.4586-12.2013
- [253] Shrivastav, M., De Haro, L. P., & Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, 18(1), 134-147. doi:10.1038/cr.2007.111
- [254] Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., . . . Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483-495. doi:10.1016/j.stem.2010.08.014

- [255] Sievers, J., Hartmann, D., Pehlemann, F. W., & Berry, M. (1992). Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer, and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 320(1), 1-32. doi:10.1002/cne.903200102
- [256] Simons, M., & Nave, K. A. (2015). Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(1), a020479. doi:10.1101/cshperspect.a020479
- [257] Sims, N. R., & Yew, W. P. (2017). Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function. *Neurochem Int*, 107, 88-103. doi:10.1016/j.neuint.2016.12.016
- [258] Snaidero, N., & Simons, M. (2014). Myelination at a glance. *J Cell Sci*, 127(Pt 14), 2999-3004. doi:10.1242/jcs.151043
- [259] Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- [260] Son, Y., Yang, M., Kang, S., Lee, S., Kim, J., Kim, J., . . . Moon, C. (2015). Cranial irradiation regulates CREB-BDNF signaling and variant BDNF transcript levels in the mouse hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*, 121, 12-19. doi:10.1016/j.nlm.2015.03.002
- [261] Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), 39-44. doi:10.1038/417039a
- [262] Song, J., Christian, K. M., Ming, G. L., & Song, H. (2012). Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev Neurobiol*, 72(7), 1032-1043. doi:10.1002/dneu.22014
- [263] Sonoda, E., Hochegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 5(9-10), 1021-1029. doi:10.1016/j.dnarep.2006.05.022
- [264] Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*, 99(2), 195-231.
- [265] Stejskal, E. O., & Tanner, J. E. (1965). Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *Journal of Chemical Physics*, 42(1), 288-+. doi:Doi 10.1063/1.1695690
- [266] Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., & Gage, F. H. (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(5), 515-528. doi:10.1016/j.stem.2007.09.002
- [267] Sultan, S., Li, L., Moss, J., Petrelli, F., Casse, F., Gebara, E., . . . Toni, N. (2015). Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron*, 88(5), 957-972. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.037
- [268] Sun, G. J., Zhou, Y., Ito, S., Bonaguidi, M. A., Stein-O'Brien, G., Kawasaki, N. K., . . . Song, H. (2015). Latent tri-lineage potential of adult hippocampal neural stem cells revealed by Nf1 inactivation. *Nat Neurosci*, 18(12), 1722-1724. doi:10.1038/nn.4159

- [269] Sun, P., Enslin, H., Myung, P. S., & Maurer, R. A. (1994). Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*, 8(21), 2527-2539. doi:10.1101/gad.8.21.2527
- [270] Sundgren, P. C., Fan, X., Weybright, P., Welsh, R. C., Carlos, R. C., Petrou, M., . . . Chenevert, T. L. (2006). Differentiation of recurrent brain tumor versus radiation injury using diffusion tensor imaging in patients with new contrast-enhancing lesions. *Magn Reson Imaging*, 24(9), 1131-1142. doi:10.1016/j.mri.2006.07.008
- [271] Tashiro, A., & Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci*, 26(3), 429-440. doi:10.1016/j.mcn.2004.04.001
- [272] Telatar, M., Teraoka, S., Wang, Z., Chun, H. H., Liang, T., Castellvi-Bel, S., . . . Gatti, R. A. (1998). Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations. *Am J Hum Genet*, 62(1), 86-97. doi:10.1086/301673
- [273] Terasima, T., & Tolmach, L. J. (1961). Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature*, 190, 1210-1211. doi:10.1038/1901210a0
- [274] Tremblay, M. E. (2011). The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biol*, 7(1), 67-76. doi:10.1017/S1740925X12000038
- [275] Tremblay, M. E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., & Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*, 31(45), 16064-16069. doi:10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011
- [276] Tsui, E. Y., Chan, J. H., Ramsey, R. G., Leung, T. W., Cheung, Y. K., Luk, S. H., . . . Yuen, M. K. (2001). Late temporal lobe necrosis in patients with nasopharyngeal carcinoma: evaluation with combined multi-section diffusion weighted and perfusion weighted MR imaging. *Eur J Radiol*, 39(3), 133-138. doi:10.1016/s0720-048x(01)00328-x
- [277] Ueki, T., Tanaka, M., Yamashita, K., Mikawa, S., Qiu, Z., Maragakis, N. J., . . . Sato, K. (2003). A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 23(37), 11732-11740.
- [278] Vallières, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., & Sawchenko, P. E. (2002). Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*, 22(2), 486-492.
- [279] van der Heide, U. A., Houweling, A. C., Groenendaal, G., Beets-Tan, R. G., & Lambin, P. (2012). Functional MRI for radiotherapy dose painting. *Magn Reson Imaging*, 30(9), 1216-1223. doi:10.1016/j.mri.2012.04.010
- [280] van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., & Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, 2(3), 196-206. doi:10.1038/35056049
- [281] van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2(3), 266-270. doi:10.1038/6368

- [282] van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, *415*(6875), 1030-1034. doi:10.1038/4151030a
- [283] Verkhratsky, A., Rodriguez, J. J., & Steardo, L. (2014). Astroglipathology: a central element of neuropsychiatric diseases? *Neuroscientist*, *20*(6), 576-588. doi:10.1177/1073858413510208
- [284] Vineyard, C. M., Verzi, S. J., Bernard, M. L., Taylor, S. E., Dubicka, I., & Caudell, T. P. (2012). A multi-modal network architecture for knowledge discovery. *Security Informatics*, *1*(1), 20. doi:10.1186/2190-8532-1-20
- [285] Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., & Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci*, *36*(4), 209-217. doi:10.1016/j.tins.2012.11.007
- [286] Wakselman, S., Bechade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., & Bessis, A. (2008). Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci*, *28*(32), 8138-8143. doi:10.1523/JNEUROSCI.1006-08.2008
- [287] Wang, J., Asensio, V. C., & Campbell, I. L. (2002). Cytokines and chemokines as mediators of protection and injury in the central nervous system assessed in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol*, *265*, 23-48.
- [288] Wang, Y., Zhou, K., Li, T., Xu, Y., Xie, C., Sun, Y., . . . Zhu, C. (2017). Inhibition of autophagy prevents irradiation-induced neural stem and progenitor cell death in the juvenile mouse brain. *Cell Death Dis*, *8*(3), e2694. doi:10.1038/cddis.2017.120
- [289] Wannenmacher, D. J., Wenz F. (2006). *Strahlentherapie*: Springer Berlin Heidelberg.
- [290] Wayman, G. A., Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W. F., Derkach, V., & Soderling, T. R. (2006). Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron*, *50*(6), 897-909. doi:10.1016/j.neuron.2006.05.008
- [291] West, A. E., Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R. E., Kornhauser, J. M., Shaywitz, A. J., . . . Greenberg, M. E. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(20), 11024-11031. doi:10.1073/pnas.191352298
- [292] Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, *313*(5790), 1093-1097. doi:10.1126/science.1128134
- [293] Wilhelmsson, U., Faiz, M., de Pablo, Y., Sjoqvist, M., Andersson, D., Widestrand, A., . . . Pekny, M. (2012). Astrocytes Negatively Regulate Neurogenesis Through the Jagged1-Mediated Notch Pathway. *Stem Cells*, *30*(10), 2320-2329. doi:10.1002/stem.1196
- [294] Williams, D. S., Detre, J. A., Leigh, J. S., & Koretsky, A. P. (1992). Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(1), 212-216. doi:10.1073/pnas.89.1.212
- [295] Williams, R. S., Moncalian, G., Williams, J. S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D. S., . . . Tainer, J. A. (2008). Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease

- processing in double-strand-break repair. *Cell*, 135(1), 97-109. doi:10.1016/j.cell.2008.08.017
- [296] Wilson, K. D., Sun, N., Huang, M., Zhang, W. Y., Lee, A. S., Li, Z., . . . Wu, J. C. (2010). Effects of ionizing radiation on self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cells. *Cancer Res*, 70(13), 5539-5548. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4238
- [297] Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., . . . Mak, T. W. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*, 12(6), 806-819.
- [298] Woodbine, L., Gennery, A. R., & Jeggo, P. A. (2014). The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)*, 16, 84-96. doi:10.1016/j.dnarep.2014.02.011
- [299] Wu, L., & Hickson, I. D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*, 426(6968), 870-874. doi:10.1038/nature02253
- [300] Wuerfel, J., Bellmann-Strobl, J., Brunecker, P., Aktas, O., McFarland, H., Villringer, A., & Zipp, F. (2004). Changes in cerebral perfusion precede plaque formation in multiple sclerosis: a longitudinal perfusion MRI study. *Brain*, 127(Pt 1), 111-119. doi:10.1093/brain/awh007
- [301] Wuerfel, J., Paul, F., & Zipp, F. (2007). Cerebral blood perfusion changes in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 259(1-2), 16-20. doi:10.1016/j.jns.2007.02.011
- [302] Xiong, X. Y., Liu, L., & Yang, Q. W. (2016). Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol*, 142, 23-44. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.05.001
- [303] Yamada, K., & Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, 91(4), 267-270. doi:10.1254/jphs.91.267
- [304] Yamashima, T. (2012). 'PUFA-GPR40-CREB signaling' hypothesis for the adult primate neurogenesis. *Prog Lipid Res*, 51(3), 221-231. doi:10.1016/j.plipres.2012.02.001
- [305] Yang, M., Kim, H., Kim, J., Kim, S. H., Kim, J. C., Bae, C. S., . . . Moon, C. (2012). Fast neutron irradiation deteriorates hippocampus-related memory ability in adult mice. *J Vet Sci*, 13(1), 1-6.
- [306] Yao, P. J., Petralia, R. S., Ott, C., Wang, Y. X., Lippincott-Schwartz, J., & Mattson, M. P. (2015). Dendrosomatic Sonic Hedgehog Signaling in Hippocampal Neurons Regulates Axon Elongation. *J Neurosci*, 35(49), 16126-16141. doi:10.1523/JNEUROSCI.1360-15.2015
- [307] Yoshida, Y., Sejimo, Y., Kurachi, M., Ishizaki, Y., Nakano, T., & Takahashi, A. (2018). X-ray irradiation induces disruption of the blood-brain barrier with localized changes in claudin-5 and activation of microglia in the mouse brain. *Neurochem Int*, 119, 199-206. doi:10.1016/j.neuint.2018.03.002
- [308] Yuan, B., Shen, H., Lin, L., Su, T., Zhong, L., & Yang, Z. (2017). Autophagy Promotes Microglia Activation Through Beclin-1-Atg5 Pathway in Intracerebral Hemorrhage. *Mol Neurobiol*, 54(1), 115-124. doi:10.1007/s12035-015-9642-z

- [309] Yuan, H., Gaber, M. W., Boyd, K., Wilson, C. M., Kiani, M. F., & Merchant, T. E. (2006). Effects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood-brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 66(3), 860-866. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.06.043
- [310] Zgheib, O., Pataky, K., Brugger, J., & Halazonetis, T. D. (2009). An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 29(4), 1050-1058. doi:10.1128/MCB.01011-08
- [311] Zhang, Q., Liu, G., Wu, Y., Sha, H., Zhang, P., & Jia, J. (2011). BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules*, 16(12), 10146-10156. doi:10.3390/molecules161210146
- [312] Zhang, Y., Allodi, S., Sandeman, D. C., & Beltz, B. S. (2009). Adult neurogenesis in the crayfish brain: proliferation, migration, and possible origin of precursor cells. *Dev Neurobiol*, 69(7), 415-436. doi:10.1002/dneu.20717
- [313] Zhao, X., Ueba, T., Christie, B. R., Barkho, B., McConnell, M. J., Nakashima, K., . . . Gage, F. H. (2003). Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11), 6777-6782. doi:10.1073/pnas.1131928100
- [314] Zhu, C., Huang, Z., Gao, J., Zhang, Y., Wang, X., Karlsson, N., . . . Blomgren, K. (2009). Irradiation to the immature brain attenuates neurogenesis and exacerbates subsequent hypoxic-ischemic brain injury in the adult. *J Neurochem*, 111(6), 1447-1456. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06413.x
- [315] Ziegler, D. A., Piguet, O., Salat, D. H., Prince, K., Connally, E., & Corkin, S. (2010). Cognition in healthy aging is related to regional white matter integrity, but not cortical thickness. *Neurobiol Aging*, 31(11), 1912-1926. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.10.015
- [316] Zuchero, J. B., & Barres, B. A. (2013). Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development. *Curr Opin Neurobiol*, 23(6), 914-920. doi:10.1016/j.conb.2013.06.005

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	DSB-Reparaturwege in Eukaryoten .....	10
Abbildung 2.2:	Der Hippocampus und seine assoziierten Strukturen (Vineyard <i>et al.</i> , 2012). .....	12
Abbildung 2.3:	Verschaltung in der Hippocampusformation.....	14
Abbildung 2.4:	Entstehung des Gyrus Dentatus .....	16
Abbildung 2.5:	Adulte hippocampale Neurogenese .....	18
Abbildung 2.6:	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Magnetresonanztomographen (MRT).....	26
Abbildung 2.7:	Schematische Darstellung der T1-Relaxation .....	27
Abbildung 2.8:	Schematische Darstellung der T2-Relaxation .....	28
Abbildung 3.1:	CT-geplante Dosisverteilung im Mausgewebe .....	40
Abbildung 3.2:	Positionierung der Mäuse vor und während der Bestrahlung innerhalb des Plexiglaszylinders im Hohlraum unter dem Plexiglasdeckel. ....	40
Abbildung 3.3:	Schematische Darstellung des Versuchablaufs der fraktionierten Niedrig- Dosis-Bestrahlung.....	41
Abbildung 3.4:	Tabellarische Übersicht des Ablaufs der fraktionierten Niedrig-Dosis- Bestrahlung von juvenilen und adulten Mäusen .....	42
Abbildung 3.5:	Schematische Darstellung der verabreichten BrdU-Markierung .....	43
Abbildung 3.6:	Bestrahlungsplan der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung mit BrdU- Markierung von juvenilen Mäusen.....	44
Abbildung 3.7:	Darstellung der durchgeführten koronaren Inzisionen nach Sektion des murinen Gehirns .....	45
Abbildung 3.8:	Darstellung der durchgeführten koronaren Inzisionen nach der Sektion des murinen Gehirns (schwarz) und der Schnittebene, die den Beginn der 50 Serienschnitte anzeigt.....	46
Abbildung 3.9:	Schematische Darstellung des Hippocampus .....	48

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 4.1:	Induktion von 53BP1-Foci in hippocampalen Neuronen.....	60
Abbildung 4.2:	Persistierende 53BP1-Foci nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung .	62
Abbildung 4.3:	Proliferation 72 Stunden nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy .....	63
Abbildung 4.4:	Proliferation zu verschiedenen späten Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy .....	64
Abbildung 4.5:	Altersabhängige Abnahme der Ki67-positiven Zellen .....	65
Abbildung 4.6:	Apoptose 72 Stunden nach Bestrahlung mit 20x0.1 Gy .....	65
Abbildung 4.7:	Altersabhängige Abnahme der SOX2-Stammzellen.....	66
Abbildung 4.8:	SOX2-positive Stammzellen in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen .....	67
Abbildung 4.9:	Altersabhängige Abnahme der DCX-Vorläuferzellen.....	69
Abbildung 4.10:	DCX-positive Vorläuferzellen in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen.....	70
Abbildung 4.11:	DCX-positive Fläche (%) in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen .....	72
Abbildung 4.12:	Westernblot-Analyse der Expressionslevel von PSD-95 .....	74
Abbildung 4.13:	Proteomics.....	75
Abbildung 4.14:	Strahlungsbeeinflusste Signalwege nach <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA) .....	76
Abbildung 4.15:	Veränderung des CREB-Signalweges nach <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA) .....	77
Abbildung 4.16:	Westernblot für CREB, pCREB, BDNF und ARC .....	78
Abbildung 4.17:	DCX-positive Vorläuferzellen in unbestrahlten und bestrahlten Mäusen mit und ohne Reparaturdefekt.....	79
Abbildung 4.18:	BrdU-labeling zur Untersuchung der Änderung des Zellschicksals .....	81
Abbildung 4.19:	GFAP-positive Astrozyten in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen .....	83

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 4.20: Westernblot-Analyse der Expressionslevel von GFAP .....	85
Abbildung 4.21: OLIG2-positive Oligodendrozyten in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen.....	86
Abbildung 4.22: IBA1-positive Mikroglia in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen .....	88
Abbildung 4.23: Quantifizierung der IBA1-positiven Mikroglia in unbestrahlten und bestrahlten sowie adulten und juvenilen Mäusen .....	89
Abbildung 4.24: BrdU-labeling der Mikroglia.....	90
Abbildung 4.25: MRT-Bilder der einzelnen untersuchten Paradigma mittels 9.4T Kleintier-MRT .....	91
Abbildung 4.26: Hippocampaler Blutfluss nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung .....	92
Abbildung 4.27: Hippocampale Wasserbewegung nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung.....	93
Abbildung 4.28: Hippocampale Relaxationszeiten nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung.....	94
Abbildung 4.29: Konzentration von <i>EvansBlue</i> im murinen Gehirn .....	95
Abbildung 4.30: Neuronale Golgi-Cox-Färbung .....	96
Abbildung 4.31: Gliale Golgi-Cox-Färbung .....	97
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der zellulären Veränderungen nach fraktionierter Niedrig-Dosis-Bestrahlung .....	117

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Relaxationszeitkonstanten bei einer Feldstärke von 1 Tesla (T).....	28
Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien und die jeweilige Bezugsquelle.....	31
Tabelle 3: verwendete Reagenzien und die jeweilige Bezugsquelle .....	32
Tabelle 4: verwendete Geräte und Software und der jeweilige Hersteller .....	33
Tabelle 5: verwendete primäre Antikörper, die eingesetzte Verdünnung sowie die jeweilige Bezugsquelle .....	37
Tabelle 6: verwendete sekundäre Antikörper, die eingesetzte Verdünnung sowie die jeweilige Bezugsquelle .....	38
Tabelle 7: verwendete Antikörper zur Markierung bestimmter Zelltypen und die jeweils ausgewertete Region .....	49
Tabelle 8: Einstellungen für die unterschiedlichen MRT-Untersuchungen .....	59

## 8 Veröffentlichungen

### Publikationen

**Schmal, Z.**, Isermann, A., Hladik, D., von Toerne, C., Tapio, S., & Rube, C. E. (2019). DNA damage accumulation during fractionated low-dose radiation compromises hippocampal neurogenesis. *Radiother Oncol*, 137, 45-54. doi:10.1016/j.radonc.2019.04.021

Rube, C. E., Baumert, C., Schuler, N., Isermann, A., **Schmal, Z.**, Glanemann M., Mann, C., & Shertan, H., (2020). Human skin aging is associated with increased expression of the histone variant H2A.J in the epidermis. *Journal of investigative dermatology*, Under review

**Schmal, Z.**, Hammer, B., Müller, A., & Rube, C. E. (2020). Fractionated low-dose irradiation alters glial cell population and induces neuroinflammation. *Radiotherapy and Oncology, in progress*

### Vorträge

Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS) (2016): 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research in Erlangen, 26.- 28. September 2016

Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V. (DEGRO) (2018): 24. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Radioonkologie in Leipzig, 21.- 24. Juni 2018

International Conference for radiation research (ICRR) (2019) in Manchester (UK), 25.- 29. August 2019

Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF):

3. Verbundtreffen in Berlin (2016), 07. April 2016

4. Verbundtreffen in Erlangen (2016), 28. September 2016

5. Verbundtreffen in Frankfurt am Main (2017), 04. September 2017

6. Verbundtreffen in Frankfurt am Main (2018), 19. September 2018

7. Verbundtreffen in Frankfurt am Main (2019), 27. März 2019

8. Verbundtreffen in Frankfurt am Main (2019), 23. Oktober 2019

### Poster

European Radiation Research Society (ERR) / Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS) (2017): Meeting of the European Radiation Research Society and Gesellschaft für biologische Strahlenforschung 'ERRS GBS 2017' in Essen, 17.- 21. September 2017

Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS) (2018): 21<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research in Frankfurt am Main, 17.- 19. September 2018

International Conference for radiation research (ICRR) (2019) in Manchester (UK), 25.- 29. August 2019

## 9 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Claudia E. Rube für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie der ständigen Betreuung und Förderung der freien und selbstständigen Planung und Umsetzung der Experimente. Weiter gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Christian Rube für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Nutzung der Linearbeschleuniger und des dazugehörigen freundlichen und kompetenten Teams.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Carola Meier für die wissenschaftliche Begleitung der Doktorarbeit und den konstruktiven Austausch dahingehend herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Team des strahlenbiologischen Labors für die gute und freundliche Zusammenarbeit bedanken. Hierbei geht ein besonderer Dank an....

...Frau Dr. rer. med. Yvonne Lorat, die mich an ihrem umfassenden strahlenbiologischen Wissen teilhaben lassen, mir immer mit fachlichem Rat und Tat bei experimentellen Fragestellungen zur Seite stand und auch die Erstfassung dieser Dissertation konstruktiv bewertete. Danke, dass ich mich zu jeder Zeit mit wirklich jedem Problem an dich wenden konnte und du es immer wieder geschafft hast mich zu beruhigen und aufzubauen!

...Frau Kathrin Förderer, die mich in die tierexperimentellen und immunhistologischen Methoden eingearbeitet hat und mir immer mit fachlichem Laborwissen zur Verfügung stand. Du bist und bleibst die beste TA (auch extern) und ich danke dir für deinen stetigen Beistand.

...Frau M.Sc. Anna Isermann für den wissenschaftlichen und fachlichen Austausch, aber vor allem für ihre stets aufmunternden und unterstützenden Worte bei dem manchmal steinigen Weg zur Dissertation. Ich bin sehr froh, dass du den Weg von Irland hierhergefunden hast und hier immer ein offenes Ohr für mich hattest, um mir mit aufrichtigen Ratschlägen zur Seite zu stehen...Thank you little leprechuan! Just sayin' you know!

Ein weiterer Dank geht an Herr Dr. rer. nat. Andreas Müller ohne dessen umfassendes Wissen zum MRT und der Bedienung desselbigen die erfolgreichen MRT-Analysen wohl nicht zu Stande gekommen wären. Danke, dass ich mich jederzeit an dich wenden konnte, wenn mir mal wieder die Zusammenhänge und das Grundverständnis zum MRT fehlten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie (Direktor Prof. Dr. med. Michael Menger), in deren fähigen Händen sich meine Mäuse vor und nach der Bestrahlung befanden, sowie bei Frau Dr. med. vet. Monika Frings, an die ich mich immerzu mit tierexperimentellen Fragestellungen wenden konnte.

## Danksagung

---

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. rer. nat. Soile Tapio sowie M.Sc. Daniela Hladik für die erfolgreiche Durchführung der Proteomanalyse der juvenilen Hippocampi, sowie über den förderlichen Austausch über dieselbige.

Für die finanzielle Unterstützung mochte ich mich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung bedanken [Projektnummer: 02NUK035A und 02NUK045C].

Der größte und wichtigste Dank geht allerdings an meine Familie und meine Freunde!

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich bereits mein ganzes Leben und auch zu jeder Zeit der Promotion immer unterstützt, ermutigt und mir auch in schwierigen Phasen stets den Rücken gestärkt haben. Meinen Geschwistern danke ich für ihren immerwährenden Zuspruch, die Aufmunterung und den seelischen Beistand. Ohne euch alle wäre vieles nicht möglich gewesen und ich bin unendlich dankbar, dass es euch gibt.

## **10 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.