

Schlussbericht Projekt 974000-041 „Effekte durch Tief-Raumstrahlung an neuronalen Stammzellen des Hippocampus“

Teil I

1. Aufgabenstellung

Es sollte untersucht werden, inwiefern Hochenergie-Schwerionen-Strahlung (HZI), wie sie z.B. bei einer Marsmission auftreten würde, das menschliche Gehirn schädigen kann. Die wichtige Struktur hierbei ist der Hippocampus, da hier eine lebenslange Generation neuer Neuronen stattfindet und er eine wesentliche Rolle bei Lernprozessen spielt. Es wird vermutet, dass neuronale Vorläuferzellen aufgrund ihrer Teilungsfähigkeit weniger strahlenresistent sind als adulte Neuronen und deshalb anfälliger für Schäden. Außerdem wurden Effekte auf Proliferation einzelner Zelltypen im Hirn und das Entstehen von DNA-Schäden und deren Reparatur untersucht. Als Modell hierfür wurden hippocampale organotypische Slicekulturen von Mäusen verwendet.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Gruppe der Antragsteller hat über ein Jahrzehnt Erfahrung mit der Verwendung von Gewebekulturen als Testsystem für Neurodegeneration. Sie zog während der Laufzeit des Projektes von Frankfurt/Main nach Leipzig um, konnte jedoch unmittelbar weiterarbeiten bzw. wick während der Strahlzeiten an der GSI in ein Labor nach Mainz aus (Prof. Nitsch; Doktorvater von I. Bechmann).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde weitgehend wie geplant durchgeführt, allerdings wurde nach der Begutachtung der ersten Daten der Schwerpunkt etwas verändert. Da wir auch nach unphysiologisch hohen Dosen Strahlung keinen Tod adulter Neuronen oder Gliazellen sahen, richteten wir den Fokus der Untersuchungen auf die adulten Zellen im Hippocampus und deren Verhalten nach Bestrahlung (DNA-Reparatur, Proliferation). Die Experimente zum Überleben neuronaler Stammzellen wurden weiterverfolgt, sind aber noch nicht abgeschlossen, da es unerwartete Probleme mit deren Detektion gab (siehe 2). Allerdings ergab sich in der Region der Stammzellnische kein Hinweis für Neurodegeneration.

4. wissenschaftlicher und technischer Stand

Das organotypische Slicekulturmodell (organotypic hippocampal slice culture, OHSC) beruht auf der Originalpublikation von Stoppini et al (1991).

Die Bestrahlungs-Gegebenheiten an UNILAC und SIS bei der GSI waren fest installiert, so dass die Kultivierung zur Bestrahlung der OHSC daran angepasst wurde.

Für die Literaturrecherche wurde PubMed bzw. Medline vom National Institute of Health verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Artikel, die nicht frei verfügbar waren, wurden über das Fernleihsystem der Bibliothek bestellt.

Datenanalysen wurde mit ImageJ (frei verfügbar vom NIH) und GraphPad Prism erstellt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Betreuung seitens der GSI erfolgte durch die Abteilung Biophysik. Dort war die verantwortliche Gruppenleiterin Frau Dr. Gisela Taucher-Scholz.

Für Slice-Präparationen nach dem Umzug nach Leipzig wurde uns Laborplatz und Ausrüstung in den Laboren von Prof. Nitsch in Mainz zur Verfügung gestellt.

Bestrahlungen mit X-ray wurden zunächst in Frankfurt in der Klinik für Strahlentherapie bei der Gruppe von Dr. Franz Rödel, nach dem Umzug in Leipzig ebenfalls in der Klinik für Strahlentherapie bei der Gruppe von Prof. Kortmann durchgeführt.

In Leipzig wurde die Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie begonnen. Dieses hat eine immense Expertise in der routinemäßigen Aufarbeitung und Analyse z.B. von Zytokinen in Zellkulturüberständen, die wir für unsere Versuche nutzen möchten.

Teil II

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die Zuwendung ermöglichte durch Einstellung von Personal und den Einkauf von nötigen Materialien und Reagenzien die Durchführung der einzelnen Experimente des Projekts. Die Methoden zur Kultivierung und Bestrahlung der organotypischen hippocampalen Slice-Kulturen (OHSC) konnten weiterentwickelt und z.B. an die Gegebenheiten an der GSI angepasst werden. Für die Aufarbeitung der Proben (Kryoschnitte, Analyse von Zellkulturmedien) wurden neue Varianten erstellt, um möglichst großen Nutzen aus den Rohdaten ziehen zu können. Nach der Etablierungsphase wurden einige Strahlzeiten an der GSI mit verschiedenen Schwerionen sowie parallel dazu mit Photonen durchgeführt (siehe Teil III, 2). Der geplante Schwerpunkt auf den Effekten auf die Stammzellnische wurde zunächst verschoben, da wir während der Etablierungsphase des Projekts Ergebnisse erhielten, die uns dazu bewegten, zunächst unser Augenmerk auf Proliferationseffekte zu richten, die im Teil III detailliert dargestellt werden. Auch Zelltod nach Bestrahlung wurde untersucht. Für die genannten Untersuchungen wurden Färbemethoden bzw. verschiedene Antikörperkombinationen ausgetestet und optimiert.

Erste Schritte dieses Projekts wurden bereits in wissenschaftlichen Journals publiziert (siehe Punkt 6). Durch die enge Zusammenarbeit mit der GSI und den Unikliniken Leipzig und Mainz ergab sich ein weiteres Projekt, das sich mit der Nutzung humaner Glioblastom-Gewebe als Testmodell für die Strahlentherapie mit Kohlenstoffionen beschäftigt. Auch hier wurden erste Experimente durchgeführt sowie Veröffentlichungen erreicht (Merz F. und Bechmann I., *Fut Oncol*, 2011).

Da es während der Projektlaufzeit mehrfach zu Ausfällen des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops zu erheblichen Problemen bei der Auswertung von Färbungen kam, wurden die Untersuchungen zu DNA-Reparatur und Zelltod noch nicht vervollständigt. Dies wird jedoch nachgeholt.

2. Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die größte zahlenmäßige Position für das Projekt machte die Einstellung einer Technischen Assistentin aus. Frau Beutel hatte an der routinemäßigen Aufarbeitung der Proben wie Fixierungen, Einbettungen, Färbungen und Auszählungen einen großen Anteil und konnte die restlichen

Projektteilnehmer somit unterstützen. Ferner wurde eine studentische Hilfskraft eingestellt. Herr Serke unterstützte das Projekt durch Bildanalyse, die naturgemäß einen großen Teil der hier angefallenen Arbeit ausmachte.

Der Rest der Fördermittel wurde für Verbrauchs- und Labormaterialien wie Zellkulturmedien, Plastikware bzw. Membraninserts, Antikörper, Pufferlösungen, Glasobjektträger und Aufbewahrungsboxen und weitere Materialien des täglichen Gebrauchs wie beantragt aufgewendet. Ebenfalls von diesen Zuwendungen wurden Mäuse zur Lieferung an ein Partnerlabor zur Präparation vor Strahlzeiten bezahlt, da diese Tiere zu einem bestimmten Termin angeliefert werden mussten.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Notwendigkeit dieser Arbeit ergab sich aus der wachsenden Bedeutung von Strahlenbelastungen der heutigen Zeit, sei es durch radiologische Untersuchungen, Therapien oder bemannte Raumfahrt. Mittlerweile gilt der Hippocampus, gerade auch bei Kindern, als extrem kritisches Organ bei Strahlenexposition und es wird versucht, ihn soweit als möglich z.B. in Bestrahlungsplänen bei Radiotherapien auszusparen. Langzeitstudien bei Kindern, die wegen Hirntumoren in Behandlung waren, zeigen einen verringerten IQ. Auch im Tiermodell werden oft Beeinträchtigungen wie verringerte Neuronen-Neubildung, Lernschwächen oder Ängstlichkeit nach Bestrahlung des Hippocampus beobachtet.

Das OHSC-Modell bietet sich als Brücke zwischen Tierversuchen und (meist unzureichenden) Zellkulturexperimenten an. Die Antragsteller sind in verschiedenen Projekten zur Vermeidung von Tierversuchen aktiv, was ein weiterer Grund für die Verwendung von OHSC in der Grundlagenforschung ist. Desweiteren können Tierzahlen für die experimentelle Verwendung verringert werden, da aus einem Tier mehrere OHSC gewonnen werden. Vorteilhaft hierbei ist, dass sich die inter-individuelle Varianz durch die Durchmischung von OHSC verschiedener Tiere für die einzelnen Experimentgruppen verringert. Zudem bietet das System dem Versuch gegenüber den entscheidenden Vorteil, dass durch Lebendmikroskopie Effekte direkt in situ beobachtet werden können. Durch die Expertise der Antragsteller konnte eine breite Basis an Erfahrungswerten und Hintergrundinformationen sowie ein hilfreiches Netzwerk bereitgestellt werden, das sich positiv auf den Fortschritt des Projekts auswirkte.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die bislang erhaltenen Ergebnisse waren insofern unerwartet, als sich eine große Resistenz adulter Neuronen auch gegen hohe Dosen ionisierender Strahlung zeigte. Dies lässt sich wahrscheinlich mit einer anderen Art von DNA-Reparatur erklären, da Neuronen als postmitotische Zellen nicht mehr im Zellzyklus aktiv sind (siehe Teil III, 2). Für eine eventuelle Nutzung von Kohlenstoffionen als Therapieoption gegen Hirntumore ist dies eine essentielle Information.

Bislang war auch nicht bekannt, dass Mikroglia nach Bestrahlung ihre DNA-Schäden vollständig reparieren können. In der neuroimmunologischen Forschung könnte dies Implikationen bei Krankheiten wie Multipler Sklerose oder Alzheimer besitzen.

Da in den OHSC nach Bestrahlung kein auffälliger Zelltod zu beobachten war, wollten wir im Rahmen einer Anschlussförderung bei IBER-AO-10 physiologische Effekte untersuchen, also z.B. ob Neuronen zwar überleben, aber ihre Funktion beeinträchtigt ist. Für diese weiterführenden Experimente wurden bereits Vorarbeiten geleistet, bei denen die Gruppe von Prof. Eilers (Leipzig) entscheidende Beiträge

geleistet hat. Diese Anschlussförderung wurde jedoch nicht bewilligt, so dass diese Untersuchungen nicht fortgeführt werden können.

5. Während der Durchführung bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit erschienen eine Reihe neuer Studien, die sich mit Bestrahlung von Hirn befassen (Auswahl siehe unten). Allerdings wurden diese meist nur mit Röntgenstrahlung erstellt und benutzten das Tiermodell/ Mäuse. Auch werden für Untersuchungen oft Dosen verwendet, die in der Klinik keinerlei Relevanz haben, da sie zu hoch sind und bekanntermaßen den Patienten schädigen würden. Oder aber es werden sehr junge oder sogar embryonale Tiere bzw. Zellkulturen verwendet, die auf Grund ihrer fehlenden Differenzierung viel empfindlicher sind als adultes Gewebe. Unserer Kenntnis nach gibt es keine andere Gruppe, die sich mit dem OHSC-Modell und Strahleneffekten befasst. Somit können wir die erschienenen Daten nicht uneingeschränkt mit unseren vergleichen.

“Biological impact of low dose-rate simulated solar particle event radiation in vivo”; Chang PY, Doppalapudi R, Bakke J, Wang A, Menda S, Davis Z. *Radiat Environ Biophys.* 2010 Aug;49(3):379-88

“Effects of ⁵⁶Fe-particle cranial radiation on hippocampus-dependent cognition depend on the salience of the environmental stimuli”; Raber J, Rosi S, Chakraborti A, Fishman K, Dayger C, Davis MJ, Villasana L, Fike JR. *Radiat Res.* 2011 Oct;176(4):521-6

“Adult hippocampal neurogenesis and memory interference”; Winocur G, Becker S, Luu P, Rosenzweig S, Wojtowicz JM. *Behav Brain Res.* 2012 Feb 14;227(2):464-9

“Therapeutic doses of cranial irradiation induce hippocampus-dependent cognitive deficits in young mice”; Rao AA, Ye H, Decker PA, Howe CL, Wetmore C. *J Neurooncol.* 2011 Nov;105(2):191-8.

“Modulation of neurogenesis by targeted hippocampal irradiation fails to affect kindling progression”; Pekcec A, Lüpke M, Baumann R, Seifert H, Potschka H. *Hippocampus.* 2011 Aug;21(8):866-76.

“A free-radical scavenger protects the neural progenitor cells in the dentate subgranular zone of the hippocampus from cell death after X-irradiation”; Motomura K, Ogura M, Natsume A, Yokoyama H, Wakabayashi T. *Neurosci Lett.* 2010 Nov 12;485(1):65-70.

“Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice”; Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA. *Hippocampus.* 2012 Mar 19.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Orale Präsentationen:

- Vortrag bei “Heavy Ions in Therapy and Space Symposium” Köln, Juli 2009
- Vortrag bei “6th Conference on Radiation Damage in Biomolecular Systems (RADAM 2009)” Frankfurt

Veröffentlichungen:

“Tissue slice cultures from humans or rodents: a new tool to evaluate biological effects of heavy ions“; Merz F, Müller M, Taucher-Scholz G, Rödel F, Stöcker H, Schopow K, Laprell L, Dehghani F, Durante M, Bechmann I. Radiat Environ Biophys. 2010 Aug;49(3):457-62. PMID: 20490530

„Modeling radiation effects at the tissue level“; Muller, M., M. Durante, H. Stocker, F. Merz and I. Bechmann (2010). European Physical Journal D 60(1): 171-176.

“Irradiation of human tumor tissue cultures: optimizing ion radiation therapy“; Merz F, Bechmann I. Future Oncol. 2011 Apr;7(4):489-91

- Zitiert durch Yoshida et al., (2012)

Nach Abschluss der Datenzusammenstellung werden alle Ergebnisse in einem geeigneten Journal veröffentlicht.

Teil III

Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen unter Angabe des Schwerpunkts

Unsere Ergebnisse deuten auf eine hohe Reparaturfähigkeit und Resistenz adulter hippocampaler Nervenzellen nach Exposition gegenüber Schwerionen hin. In der Tat ist eine Neurodegeneration auch bei hohen Dosen unsichtbar geworden. Im Hinblick auf das förderpolitische Ziel bedeutet das, dass mit einer schwerioneninduzierten Neurodegeneration auf einer Marsmission nach unseren Beobachtungen eher nicht zu rechnen ist. Inwieweit die Stammzellnische betroffen ist, können wir, wie unten ausgeführt, noch nicht definitiv sagen. Wir haben aber auch in der Region der Stammzellen (*Gyrus dentatus*) bislang keine Degeneration finden können. Ob deren Proliferationsfähigkeit beeinträchtigt ist, wird jetzt zu überprüfen sein.

2. wissenschaftlich-technisches Ergebnis, Nebenergebnisse, gesammelte wesentlichen Erfahrungen

Strahlzeiten und Organisation

Im Laufe des Projektes wurde an folgenden Strahlzeiten teilgenommen:

2009:

- Nickel (UNILAC), $0,5 \times 10^6$ p/cm² und 5×10^6 p/cm²
 - Xenon (UNILAC), $0,5 \times 10^6$ p/cm² und 5×10^6 p/cm²
 - Kohlenstoff (UNILAC), 8×10^6 p/cm² und 8×10^7 p/cm²
- SIS: 4 Gy

2010:

- Stickstoff SIS 1 und 4 Gy
- Argon SIS 1 und 4 Gy

2011:

- Kohlenstoff 1, 4 und 10 Gy

Parallel dazu wurden folgende Photonen-Bestrahlungen vorgenommen:

2009: Hochdosis-Versuch (bis zu 40Gy)

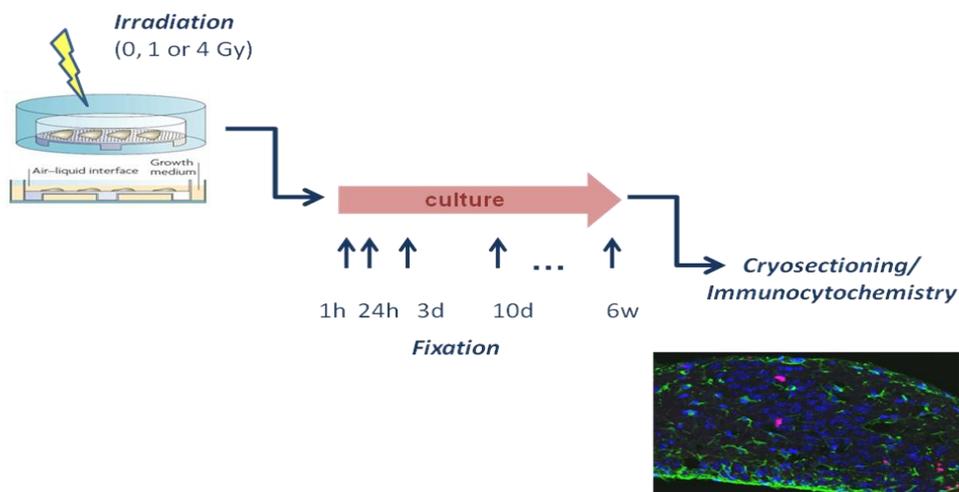
2010: 1 und 4 Gy

2011: 4 und 10 Gy

Dies war mit hohem logistischem Aufwand verbunden, da die Kulturen nicht direkt bei GSI präpariert werden konnten. Zu Beginn des Projektes befand sich die Arbeitsgruppe noch in Frankfurt, wodurch der Transport der OHSC Kulturen relativ einfach per Auto durchführen ließ. Nach dem Umzug nach Leipzig wurden die Kulturen in Laboren der AG Nitsch in Mainz hergestellt und einen Tag vor Bestrahlung zur GSI gebracht. Die Medienwechsel bzw. weitere Behandlungen der Kulturen über die Versuchszeiträume von bis zu 6 Wochen wurden durch Pendeln und Hilfe von technischen Assistenten der GSI bewerkstelligt. Nach Beendigung der Versuche durch Fixierung der Slices wurden sie nach Leipzig zurückgebracht und dort weiter für die Analyse bearbeitet.

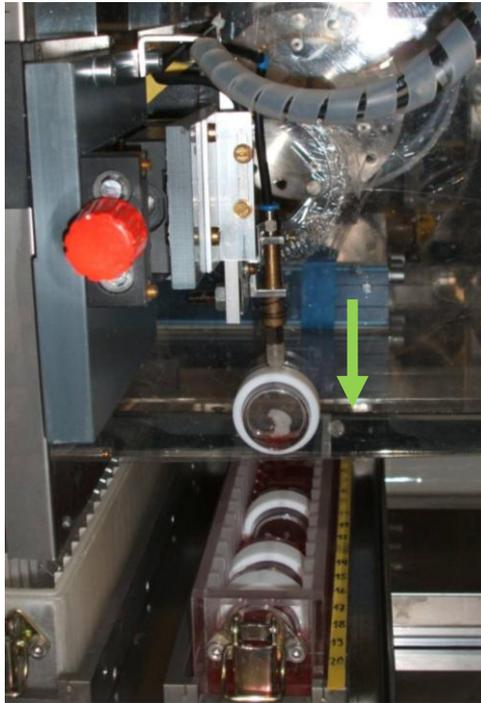
Anpassung der Kultivierung von OHSC für Bestrahlung

Das organotypische hippocampale Slicekulturmodell (OHSC) ist bereits lange etabliert. Dabei werden die Slices durch Schneiden von Maus-oder Rattenhirnen an einem Vibratom erhalten. Bei Vibratomschnitten wird das Gewebe durch die Vibration der Klinge geschont, so dass die Zellen so wenig wie möglich gequetscht und somit geschädigt werden. Die Hippocampus-Regionen wurden aus den zunächst erhaltenen Ganz-Hirn-Schnitten herausgelöst und auf Membraninsets überführt. Die Versorgung mit Medium erfolgte von unten; die Membran lag auf Kulturmedium auf, so dass sich der Slice an einer Flüssigkeits-Luft-Grenze befand. Nach einer Ruhephase von einer Woche wurden die OHSC für die Experimente verwendet und je nach Fragestellung bis zu 6 Wochen weiter kultiviert. Dies ist hier nochmals schematisch dargestellt:



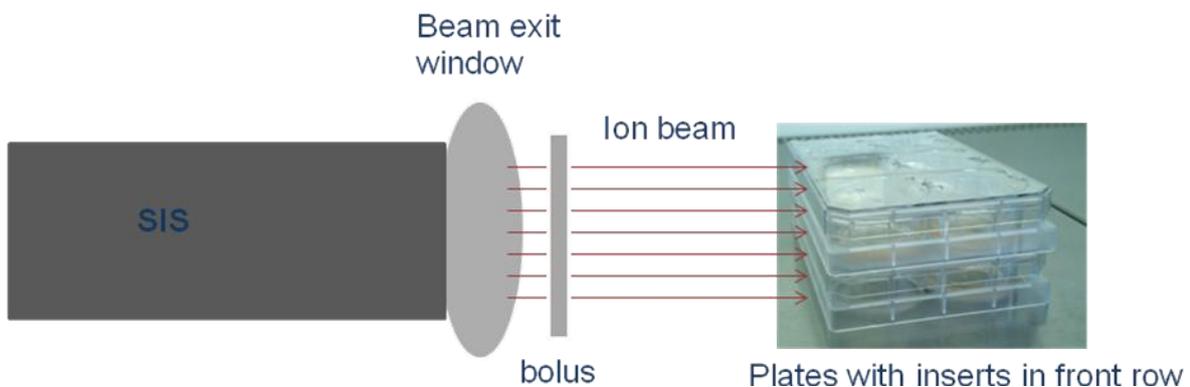
Die Bestrahlungs-Setups wurden an die Anforderungen der OHSC angepasst und sind im Folgenden genauer erklärt.

Bestrahlung am UNILAC



Für die Bestrahlung am UNILAC wurden die Slices in vorgegebene Magazine umgesetzt und in Teflonringe eingespannt. Zur Fixierung der Slices auf ihrer Kultur-Membran wurde eine sogenannte „BioFoil“ in der Größe der Membran ausgeschnitten, sterilisiert und auf den Slice gelegt. BioFoil ist sauerstoffdurchlässig und biokompatibel und beeinträchtigt somit nicht die Viabilität der Slices. Das Magazin wurde kurz vor der Bestrahlung komplett mit Medium aufgefüllt und in die UNILAC-Kammer gesetzt. Die Teflonringe wurden dann automatisch nacheinander von einem sogenannten „Grabber“ einzeln angesteuert und hochgehoben. Die eigentliche Bestrahlung erfolgte dann außerhalb des Mediums, und nach Erreichen der gewünschten Dosis wurde das Insert zurück ins Medium gesetzt.

Bestrahlung am SIS

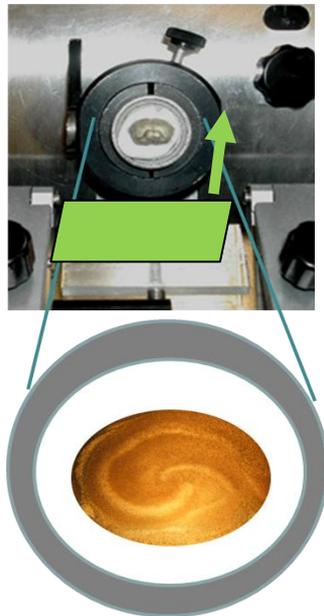


Die Bestrahlung am SIS erfolgte von der Seite, da die Slicekulturen hier nicht aufgestellt werden können. Das Austrittsfenster des Strahls war groß genug, um jeweils drei Platten übereinander zu

stapeln, von denen jeweils die vordere, dem Strahlfenster zugewandte Hälfte mit Inserts besetzt war (3 Inserts pro Platte). Der Strahl traf die einzelnen Slices somit parallel zur Membran, auf der die Slices wuchsen.

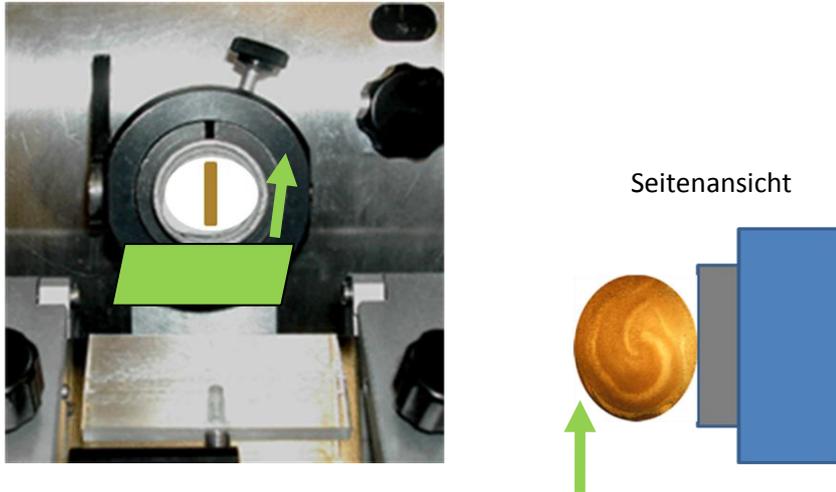
Anfertigung der Kryoschnitte

Von den OHSC wurden zwei Arten von Kryoschnitten angefertigt, um verschiedenen Analyseansätzen folgen zu können. Zum Einen wurden horizontale Schnitte gemacht, die die gesamte Struktur des Slices umfassen. Die Schnittebene hierbei war parallel zur Kulturmembran. Dies hatte allerdings den Nachteil, dass nur wenige Schnitte pro Slice entstanden, da die Dicke des Gewebes nach der Fixierung nur noch ca. 150 μm betrug.



Hier ist das Setup im Kryostat dargestellt, wie es für horizontale Kryoschnitte verwendet wurde. Grün dargestellt sind Klinge sowie Schnittrichtung. Der Slice wurde in speziellem Kryomedium eingefroren, das das Gewebe vor Schäden durch Eiskristalle schützt.

Bei der zweiten Schnittweise wurden die Slices um 90° gedreht aufgeblockt, so dass die Klinge parallel zur dünnen Seite und nicht zur Oberfläche schnitt. Dies hatte den Vorteil, dass man einen Querschnitt durch das Gewebe erhielt. Außerdem konnten auf diese Weise mehr Kryoschnitte von einem Slice angefertigt werden, wodurch mehr unterschiedliche Färbungen möglich waren. Allerdings waren regionsspezifische Analysen, z.B. Begrenzung auf den *Gyrus dentatus*, hier nicht möglich.



Für dieses Projekt wurden horizontale Kryoschnitte für Analysen vorgesehen, die eine Regiospezifität voraussetzten, also z.B. die Analyse von Proliferation im *Gyrus dentatus* oder die Anfärbung von Stammzellen. DNA Reparatur und Zelltyp-spezifische Proliferation wurden in Vertikalschnitten untersucht, da hier die Lokalisation der Zellen im Gewebe unwichtig war.

Doppelstrangbrüche und deren Reparatur nach Xray-Bestrahlung

Da das Hippocampus-Slice-Kultursystem an die Gegebenheiten an den Bestrahlungsplätzen angepasst werden musste, wollten wir zunächst kontrollieren, ob das Gewebe wirklich komplett bestrahlt wurde. Bei inhomogener Bestrahlung könnten Effekte verfälscht oder abgeschwächt werden. Der Nachweis wurde durch Markierung der DNA-Doppelstrangbrüche realisiert, die entstehen, wenn Ionen- oder Gammastrahlung Zellkerne durchdringt. Entsteht ein Doppelstrangbruch (dsb), werden innerhalb weniger Minuten Proteine rekrutiert, die an die losen Enden der DNA binden und somit eine Reparaturkaskade auslösen. Für unser Modell wählten wir Antikörper gegen zwei Proteine, von denen bekannt ist, dass sie sehr schnell an dsbs binden (γ H2AX und 53BP1). Sie stammen aus verschiedenen Spezies (Maus und Kaninchen), so dass sie mit anderen Antikörpern gegen neurale Zelltypen kombiniert werden konnten. Im Anschluss an die Färbung wurden dsb-positive Zellen ausgezählt.

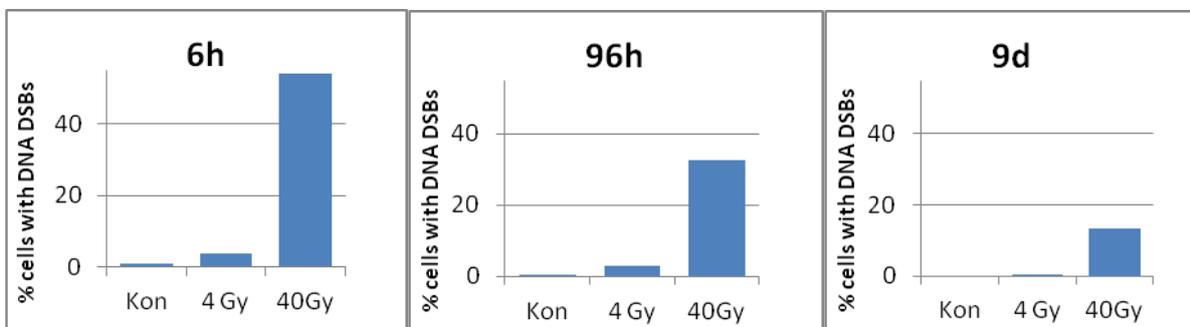


Abb. 1: Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen in OHSC im Zeitverlauf von 6 Stunden bis 9 Tage nach Bestrahlung mit Photonen.

Die Anzahl der Zellen mit DNA-Doppelstrangbrüchen nach Röntgenbestrahlung ist mit zunehmender Dosis erwartungsgemäß größer. Nach 6h und einer Dosis von 4 Gy weisen 3,7% der Zellen DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) auf, bei 40 Gy sind es 54% der Zellen. Die Kontrollslices weisen nur einen geringen basalen Anteil an DSB auf, was auf die Entstehung von Foci z.B. bei der DNA-Synthese während der Zellteilung zurückzuführen ist. Nach 96h wurde ein Teil der DSB bereits repariert, der Anteil an Foci-positiven Zellen nach 4 Gy beträgt noch 2,9%, nach 40 Gy 32,6%. Nach 9 Tagen sind noch in 0,4% der mit 4 Gy und in 13,2% der mit 40 Gy bestrahlten Zellen DSB-Foci nachweisbar.

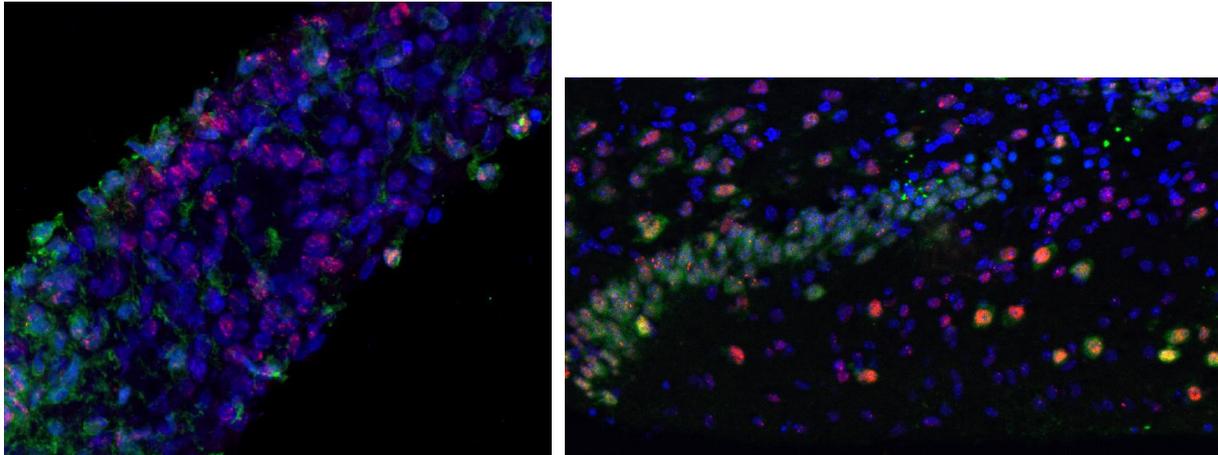


Abb. 2: Darstellung von DNA Doppelstrangbrüchen (dsbs) nach Bestrahlung mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Proteine, die sich an dsbs anlagern. Links: Visualisierung der Ionen-Tracks nach Bestrahlung am UNILAC (1×10^6 p/cm²) mit γ H2AX-Antikörpern (rot), Mikroglia (IBA-1, grün) und Zellkernen (blau). Rechts: homogene Bestrahlung am SIS (4Gy), rot: 53BP1, grün: Neuronen (NeuN), blau: Zellkerne. 200x.

Durch die Anfärbung der DNA Schäden konnten wir zeigen, dass die Slices komplett von Ionen durchdrungen werden. Bei der Bestrahlung am UNILAC kann man sogar die einzelnen Ionentracks durch die Zellkerne sehen (s. Abb. 2 links, rote Färbung), da die Fluenz der Ionen im Strahlfenster weniger dicht war. Der Strahleintritt war im Bild von links oben (vertikal zur Membranebene), und der Slice wurde fixiert, bevor Reparaturmechanismen vollständig ablaufen konnten. Die Schnittebene für die Kryoschnitte war in diesem Fall gleich der Strahleintrittsebene.

Bei der homogenen Bestrahlung im SIS (Abb. 2 rechts) dagegen ist die Ionendichte viel höher, weswegen die Zellkerne kurz nach Bestrahlung oft fast vollständig mit dsbs besetzt sind und es in der Färbung fast aussieht, als wäre der gesamte Zellkern angefärbt. Die Bestrahlung erfolgte hier parallel zur Membran, die Kryoschnitte wurden vertikal dazu angefertigt.

Nachdem die Strangbrüche zuverlässig detektiert werden konnten, untersuchten wir deren Reparatur in OHSC. Unserer Kenntnis nach ist dies mit diesem Modell zum ersten Mal geschehen. Der Vorteil hierbei ist die gleichzeitige Auswertung der einzelnen Zelltypen in einem Slice, wobei die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung bleiben und somit Artefakte einer Monokultur vermieden werden.

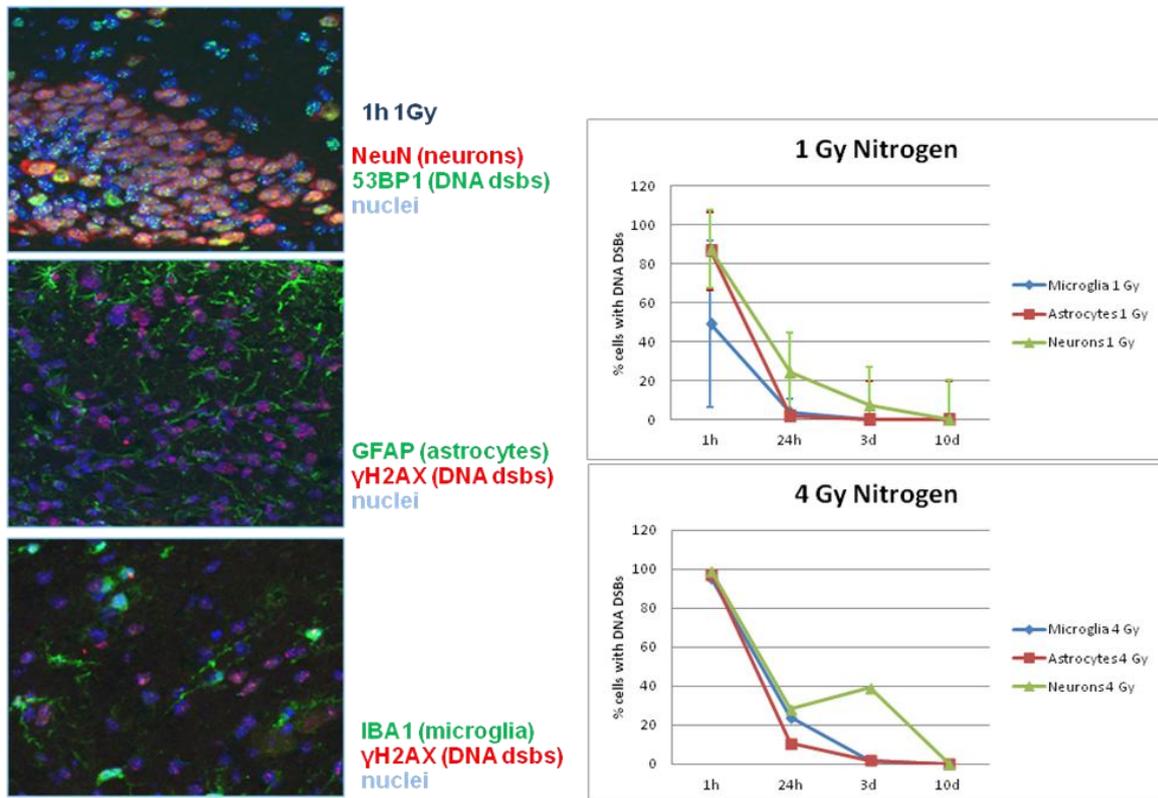


Abb. 3: Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (dsbs) in Mikroglia, Astrozyten und Neuronen in OHSC nach Stickstoff-Bestrahlung am SIS. DSBS wurden durch Antikörper markiert, die gegen dsb-assoziierte Proteine gerichtet sind. Gleichzeitig wurden zelltypspezifische Antikörper verwendet und Aufnahmen der Färbungen ausgewertet.

Für die Auswertung wurden jeweils von zwei Slices einer Dosis und Zeit zwei unterschiedliche Objektträger (mit jeweils 3 Kryoschnitten darauf) pro Färbung verwendet. Um die unterschiedlichen Zelltypen darstellen zu können, wurden folgende Antikörper-Kombinationen verwendet:

- IBA-1 (Mikroglia, aus Kaninchen) und γH2AX (DNA dsbs, aus Maus)
- GFAP (Astrozyten, aus Kaninchen) und γH2AX (DNA dsbs, aus Maus)
- NeuN (Neuronen, aus Maus) und 53BP1 (DNA dsbs, aus Kaninchen)

Zu Beginn des Projekts gab es für den NeuN-Antikörper aus Maus keine Alternative, weswegen statt γH2AX der Antikörper gegen 53BP1 verwendet wurde. Ende 2011 wurde jedoch ein NeuN-Antikörper aus Kaninchen auf den Markt gebracht, der dann auch getestet wurde und mit γH2AX kombiniert werden kann. Somit konnten Unterschiede in der Reparaturkinetik von γH2AX und 53BP1 ausgeschlossen werden.

Die Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem konfokalen Laserscanning- Mikroskop aufgenommen und mit der ImageJ-Software bzw. dem Plugin CellCounter ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde hierbei als 100% Zellen gesetzt und der Anteil des jeweiligen Zelltyps sowie der dsb-positiven Zellen darauf bezogen.

Auffällig ist, dass nach 1 Gy weniger Zellen positiv sind und die dsbs auch schneller repariert werden. Bei 1 Gy sind nach einer Stunde nach Bestrahlung ca. 50-85% der Zellen dsb positiv, während bei 4 Gy fast alle Zellen dsbs aufweisen. Auch nach 24 Stunden ist der Unterschied noch zu sehen, während nach 3 Tagen fast alle Schäden repariert sind. Neuronen scheinen hierbei etwas langsamer zu reparieren als Astrozyten und Mikroglia, was daran liegen kann, dass adulte Neuronen postmitotische Zellen sind, also die Teilungsphase abgeschlossen haben. Die Notwendigkeit einer DNA-Reparatur besteht hauptsächlich für Zellen, die sich weiterhin teilen, da sie sonst fehlerhafte DNA an ihre Nachkommen weitergeben würden. Fehlende oder fehlerhafte DNA-Reparatur kann

allerdings zu Veränderungen in der Zelle selbst führen, wenn z.B. wichtige Gene nicht mehr abgelesen werden können und dies zu Funktionsverlusten oder Stoffwechselproblemen führt. Ob die unterschiedlichen Strahlenarten (Hochenergetisch/ Ionen oder niedrigenergetisch/ Xray bzw. Photonen) zu unterschiedlichen Kinetiken der DNA-Reparatur führen, wird interessant zu sehen sein. Die weiteren Auswertungen verzögern sich noch, da es seit zwei Jahren immer wieder erhebliche Probleme mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gab, die seitens des Herstellers bislang nicht beseitigt werden konnten.

Effekt auf die Proliferation im Hippocampus

Ionisierende Strahlung verursacht dosisabhängig eine Hemmung der Proliferation von (neuronalen) Zellen (z.B. Rola et al, 2005; Ramanan et al, 2009), worauf auch der Therapieeffekt beruht. Hiervon betroffen sind im Hirn jedoch nur die Zellen, die auch teilungsfähig sind, also Glia oder neuronale Vorläufer. Adulte Neuronen werden hingegen als postmitotische Zellen und somit als radioresistent angesehen. Wir untersuchten in diesem Projekt die Proliferation von Gliazellen und Neuronen und verwendeten dazu zelltypspezifische Antikörper in Kombination mit einem Proliferations-assoziierten Antikörper gegen Ki67. Dies ist ein Protein, das im gesamten Zellzyklus außer der G0, also Ruhephase, exprimiert wird. Beispielhaft sind hier einige Färbungen zur Bestimmung der Proliferation nach Bestrahlung mit Stickstoffionen gezeigt.

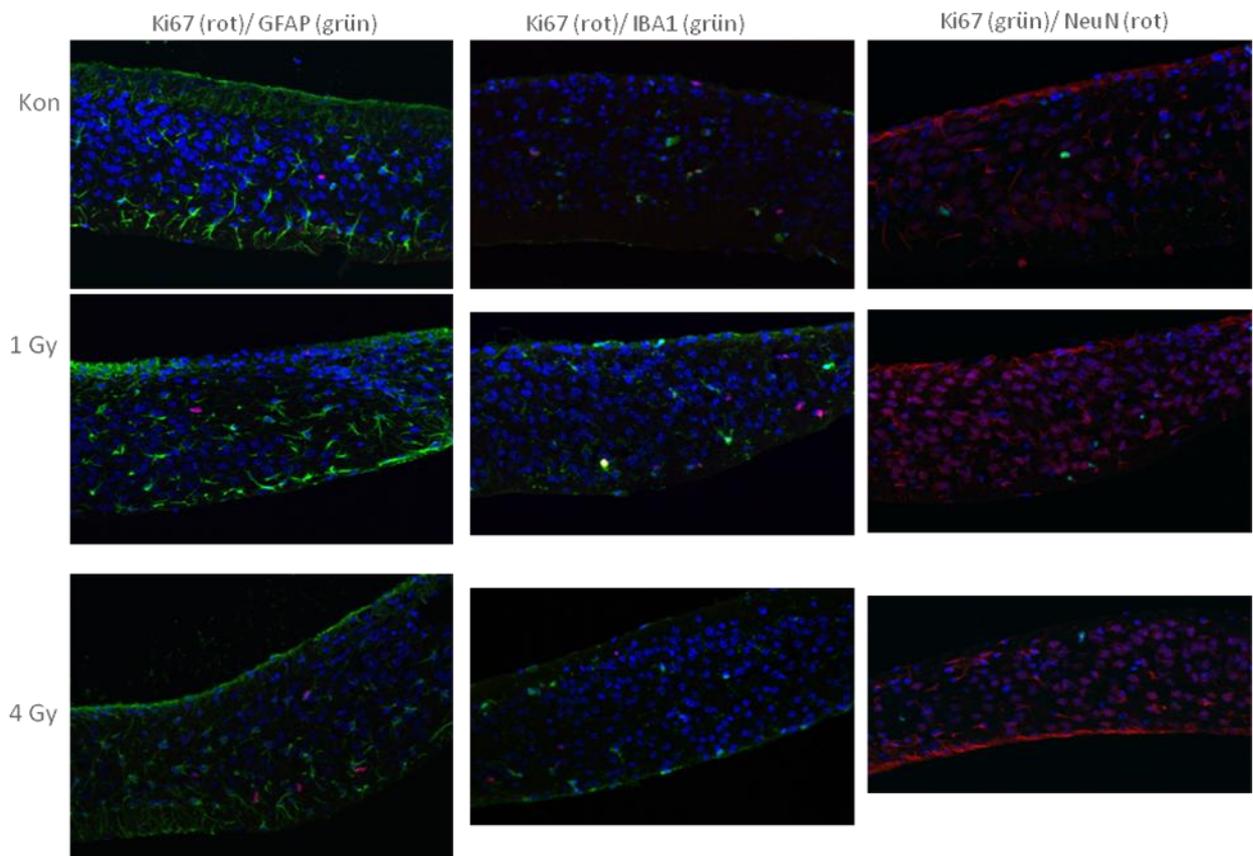


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten von OHSC. Hier wurden zelltypspezifische Marker für neurale Zellen (IBA-1 für Mikroglia, GFAP für Astrozyten und NeuN für Neuronen) mit einem Proliferationsmarker (Ki67) kombiniert.

Zunächst bestrahlten wir OHSC mit einer unphysiologisch hohen Dosis Gammastrahlung (4 und 40 Gy), um sicher Effekte zu sehen. Die Slices wurden nach 6 Stunden, 4 und 9 Tagen fixiert. Ki67-positive Zellen wurden in Aufnahmen der Färbungen ausgezählt und in Bezug auf die Gesamtzellzahl dargestellt (Proliferationsindex).

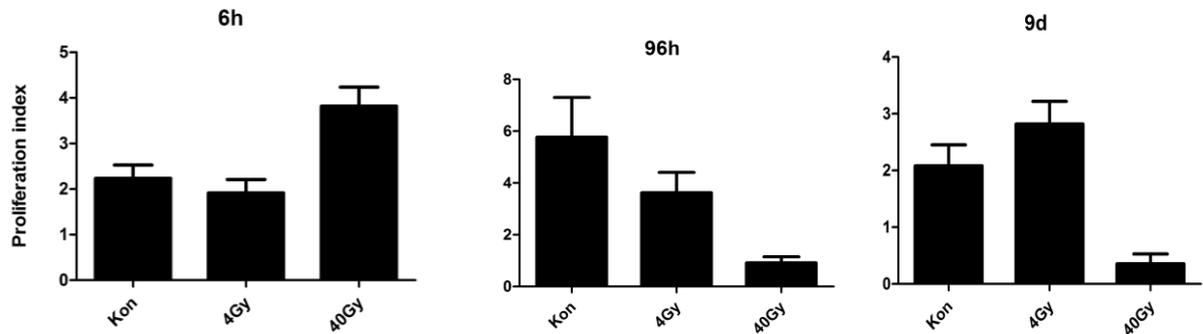


Abb. 5: Proliferationsindex von bestrahlten OHSC nach Xray. Slices wurden mit 0, 4 oder 40 Gy bestrahlt und nach 6 Stunden, 4 oder 9 Tagen fixiert. Proliferierende Zellen wurden durch eine Ki67-Färbung dargestellt und ausgezählt.

Nach 6 Stunden war noch kein Effekt auf die Proliferation zu sehen, während nach 4 und 9 Tagen ein deutlicher Rückgang bei Bestrahlung mit 40 Gy auftrat. Die niedrigere Dosis scheint die Proliferation nur kurzfristig und schwach zu beeinflussen.

Ein Pilotexperiment mit Kohlenstoffionen zeigte ebenfalls einen schwachen Rückgang der Proliferation nach 24 Stunden.

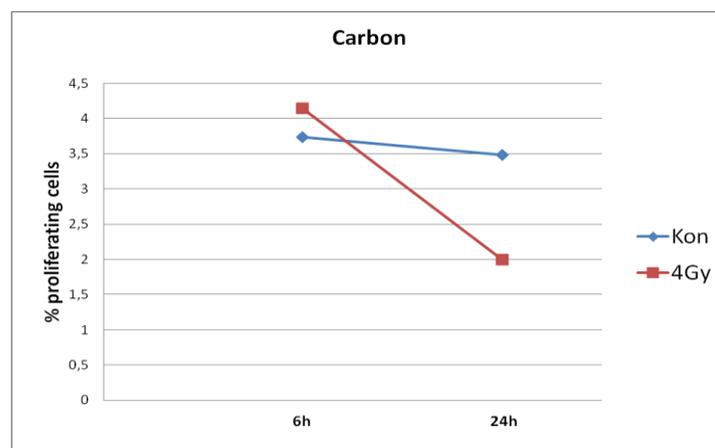


Abb. 6: Proliferationsindex von OHSC nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Slices wurden mit 0 oder 4 Gy bestrahlt und nach 6 oder 24 Stunden fixiert. Proliferierende Zellen wurden durch eine Ki67-Färbung dargestellt und ausgezählt.

Im Verlauf des Projektes wurden Experimente mit weiteren Schwerionen durchgeführt, die auch relevant für eine bemannte Raummission sein werden. Die Ergebnisse in Bezug auf die Proliferation sind nachfolgend dargestellt.

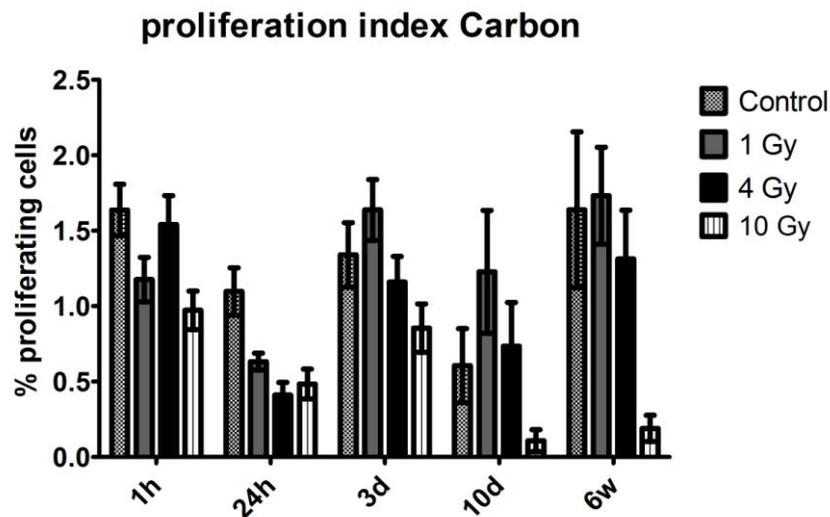
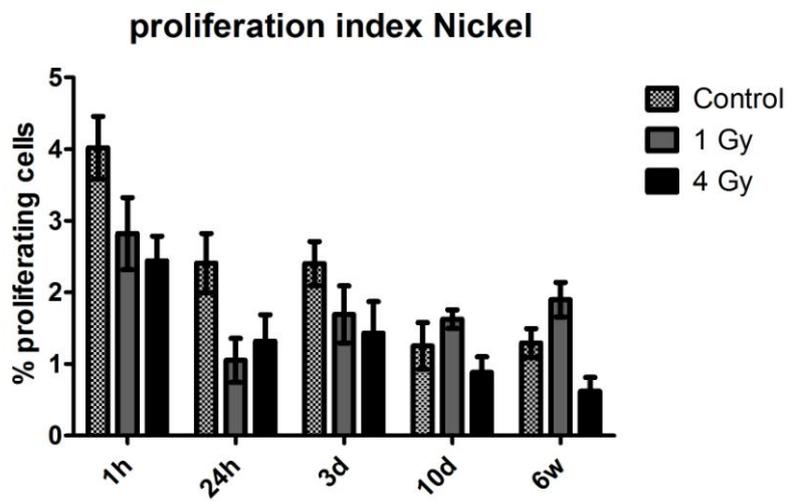
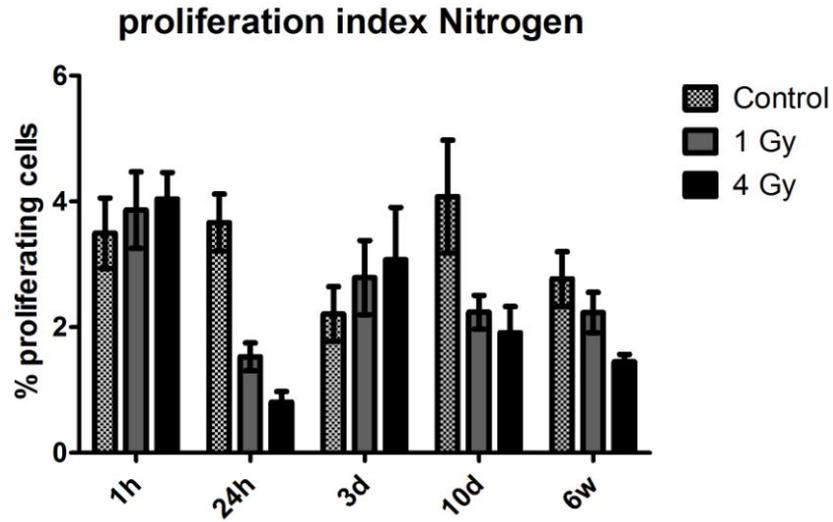


Abb. 7: Proliferationsindices von OHSC nach Bestrahlung mit Stickstoff-, Nickel- und Kohlenstoffionen. Slices wurden mit 0, 1 oder 4 Gy (bei Kohlenstoff zusätzlich mit 10 Gy) bestrahlt und nach 1h, 24h, 4d, 10d oder 6 Wochen fixiert. Proliferierende Zellen wurden durch eine Ki67-Färbung dargestellt und ausgezählt.

Die ersten Experimente mit Stickstoff- und Nickelionen ergaben nur einen kurzzeitigen und schwachen Effekt auf die Proliferation, die nach 24 Stunden und drei Tagen leicht gehemmt wurde. Deshalb wurde im letzten Experiment mit Kohlenstoffionen eine zusätzliche hohe Dosis von 10 Gy hinzugefügt. Hier bestätigt sich der Trend, dass die Proliferation leicht zurückgeht und nach den geringeren Dosen von 1 und 4 Gy nach 10 Tagen wieder normalisiert. Es scheint, dass die Bestrahlung mit 10 Gy die Proliferation nachhaltiger hemmt. Hierzu sollten weitere Experimente ausgewertet werden.

Zusätzlich zu den Ionenbestrahlungen wurden Experimente mit Gammastrahlung durchgeführt, deren Ergebnis hier gezeigt ist.

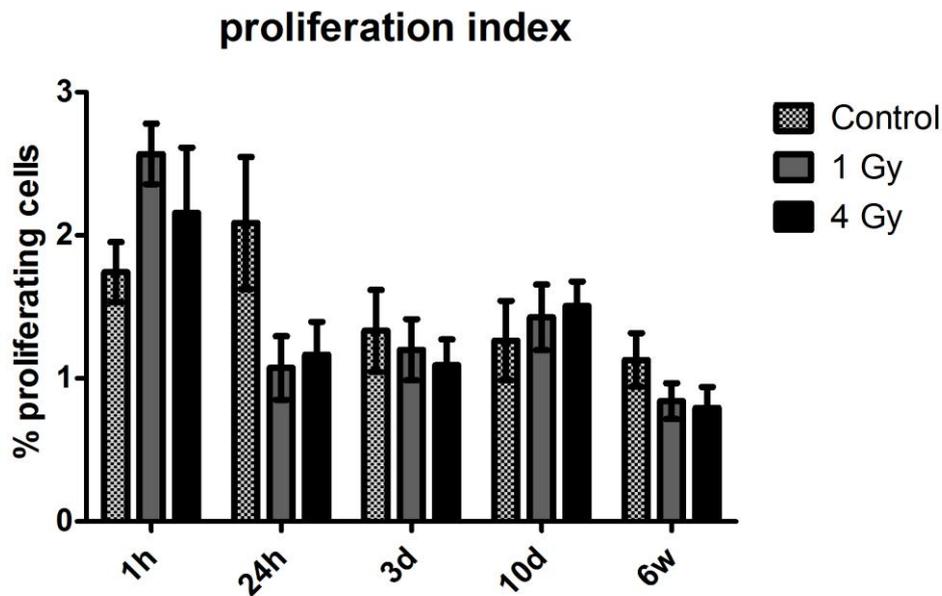


Abb. 8: Proliferationsindex von OHSC nach Bestrahlung mit Gammastrahlen/Xrays. Slices wurden mit 0, 1 oder 4 Gy bestrahlt und nach 1h, 24h, 3d, 10d oder 6 Wochen fixiert. Proliferierende Zellen wurden durch eine Ki67-Färbung dargestellt und ausgezählt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier verwendeten Dosen nur wenig Einfluss auf die Proliferation im gesamten Hippocampus haben. Da die Slicekulturen über die Zeit generell an Proliferationsfähigkeit verlieren, sind die Effekte der Bestrahlung bezogen auf die Kontrollen statistisch nicht signifikant. Es lässt sich jedoch ein Trend ausmachen, dass es eine leichte Reduzierung der Proliferation nach 24 Stunden und drei Tagen gibt, die sich zu späteren Zeitpunkten wieder verliert. Bei einer höheren Dosis von 10 Gy scheint der Effekt verstärkt und verlängert zu sein. Ein Unterschied zwischen Hoch- und Niedrigenergetischer Strahlung (also Ionen- oder Photonenstrahlung) lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant ausmachen.

Zelltypspezifische Effekte nach Bestrahlung

Nachfolgend sind zelltypspezifische Effekte nach Bestrahlung dargestellt. Hierfür wurde der Proliferationsmarker Ki67 mit Markern für Zelltypen im Hippocampus (IBA-1 für Mikroglia, GFAP für Astrozyten und NeuN für Neuronen) kombiniert, so dass sich die einzelnen Zellfraktionen und ihre Veränderung über die Zeit bestimmen lassen. Die Zellfraktionen wurden dann noch auf die proliferierende Subpopulation hin untersucht sowie deren Veränderung über die Zeit.

Schwerionen:

Nickel:

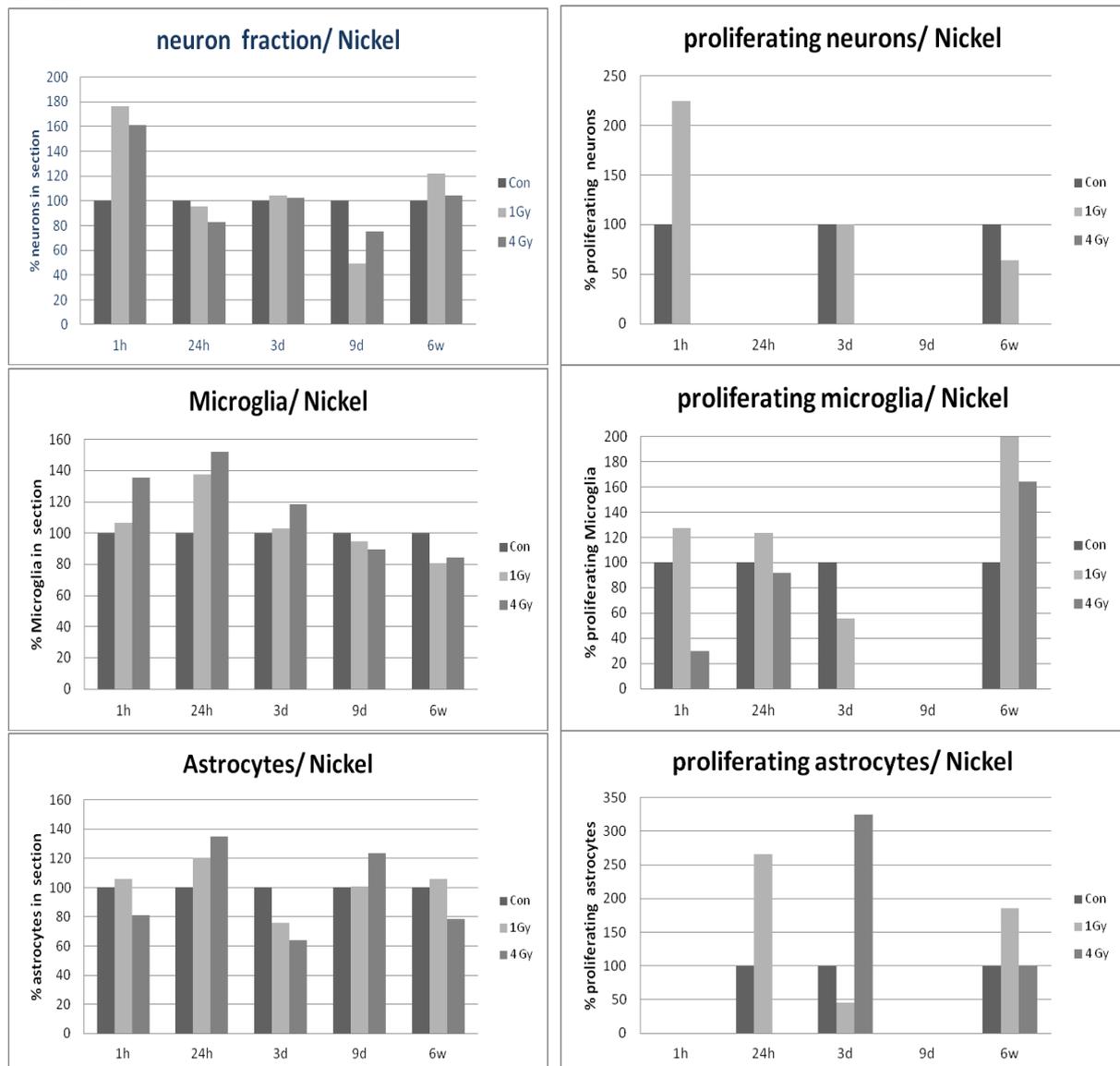


Abb. 9: Prozentualer Anteil der einzelnen neuronalen Zelltypen in OHSC nach Bestrahlung mit Nickel-Ionen und deren Änderung über die Zeit. Jeweils links aufgetragen ist der Anteil der Zellpopulation, rechts aufgetragen ist die proliferierende Subpopulation.

Stickstoff:

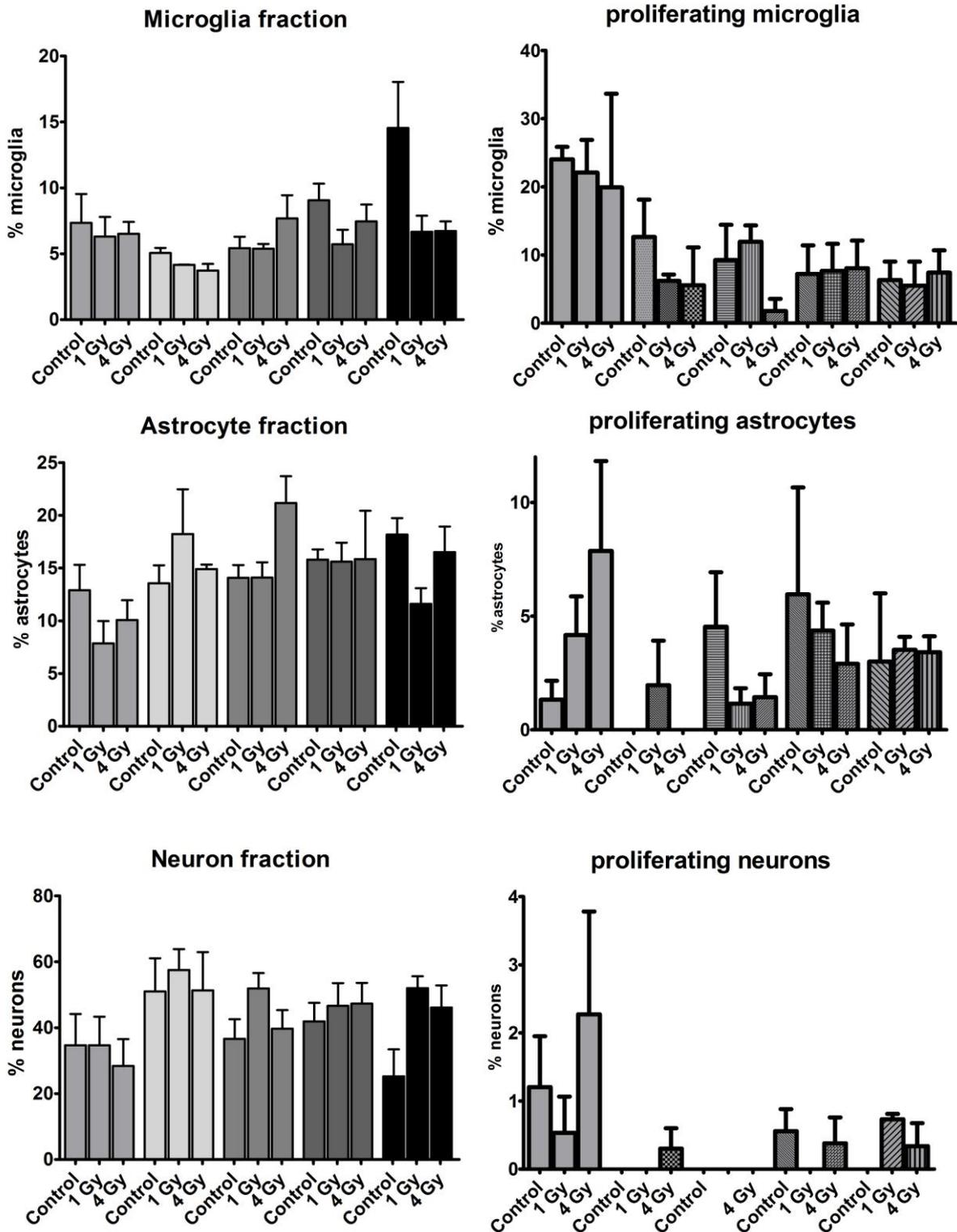
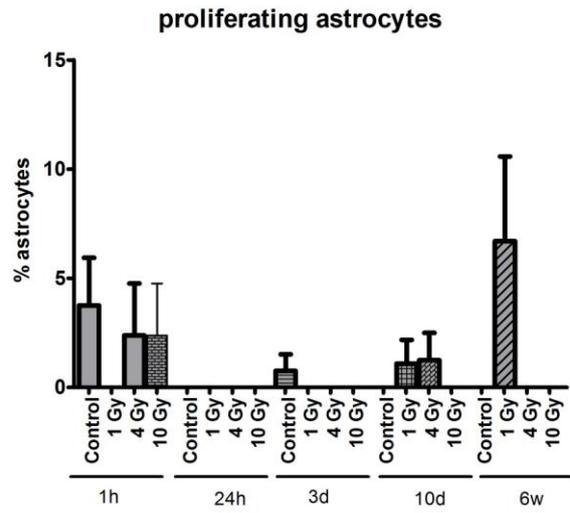
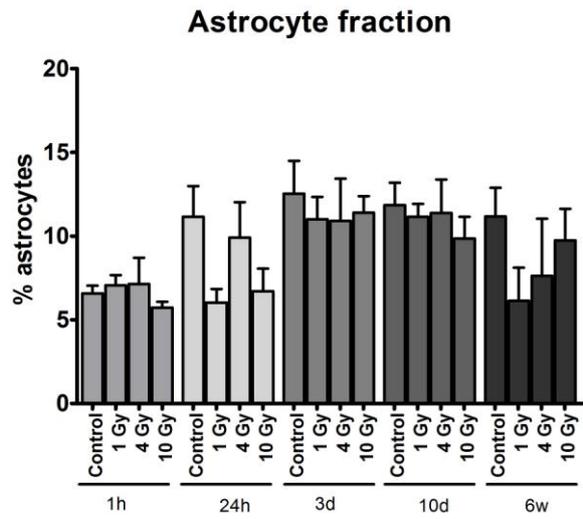
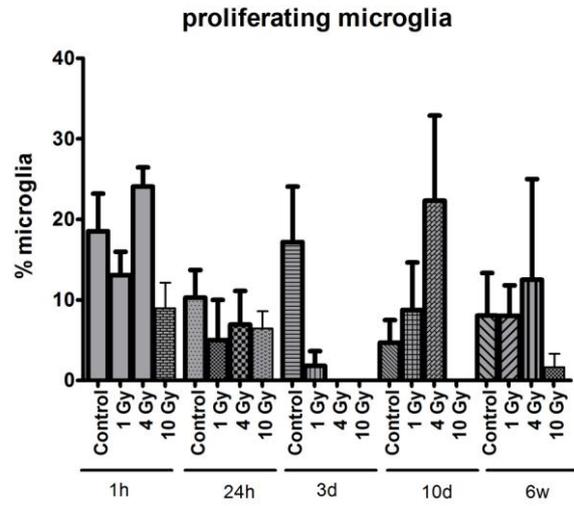
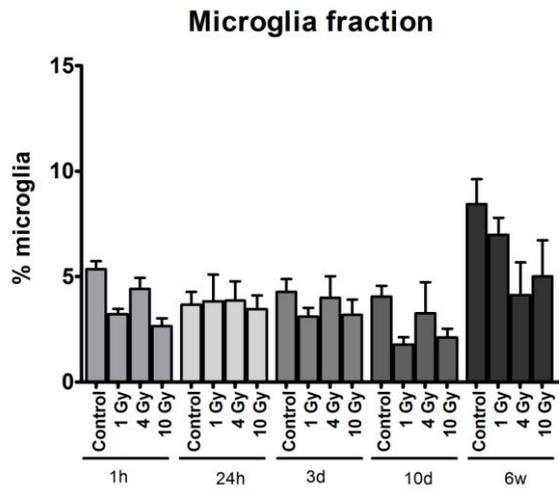


Abb. 10: Prozentualer Anteil der einzelnen neuronalen Zelltypen in OHSC nach Bestrahlung mit Stickstoff-Ionen und deren Änderung über die Zeit. Jeweils links aufgetragen ist der Anteil der Zellpopulation, rechts aufgetragen ist die proliferierende Subpopulation.

Kohlenstoff:



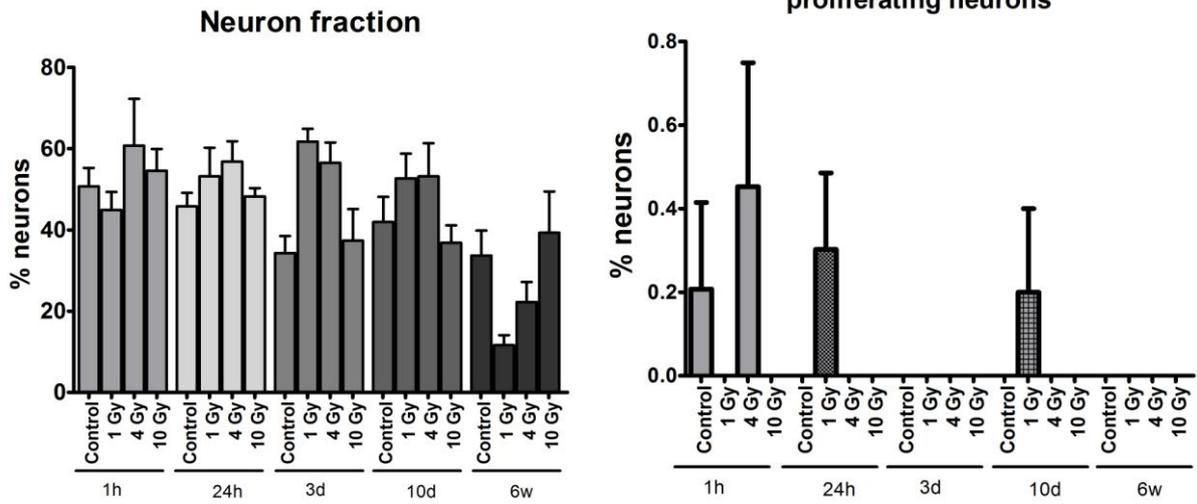
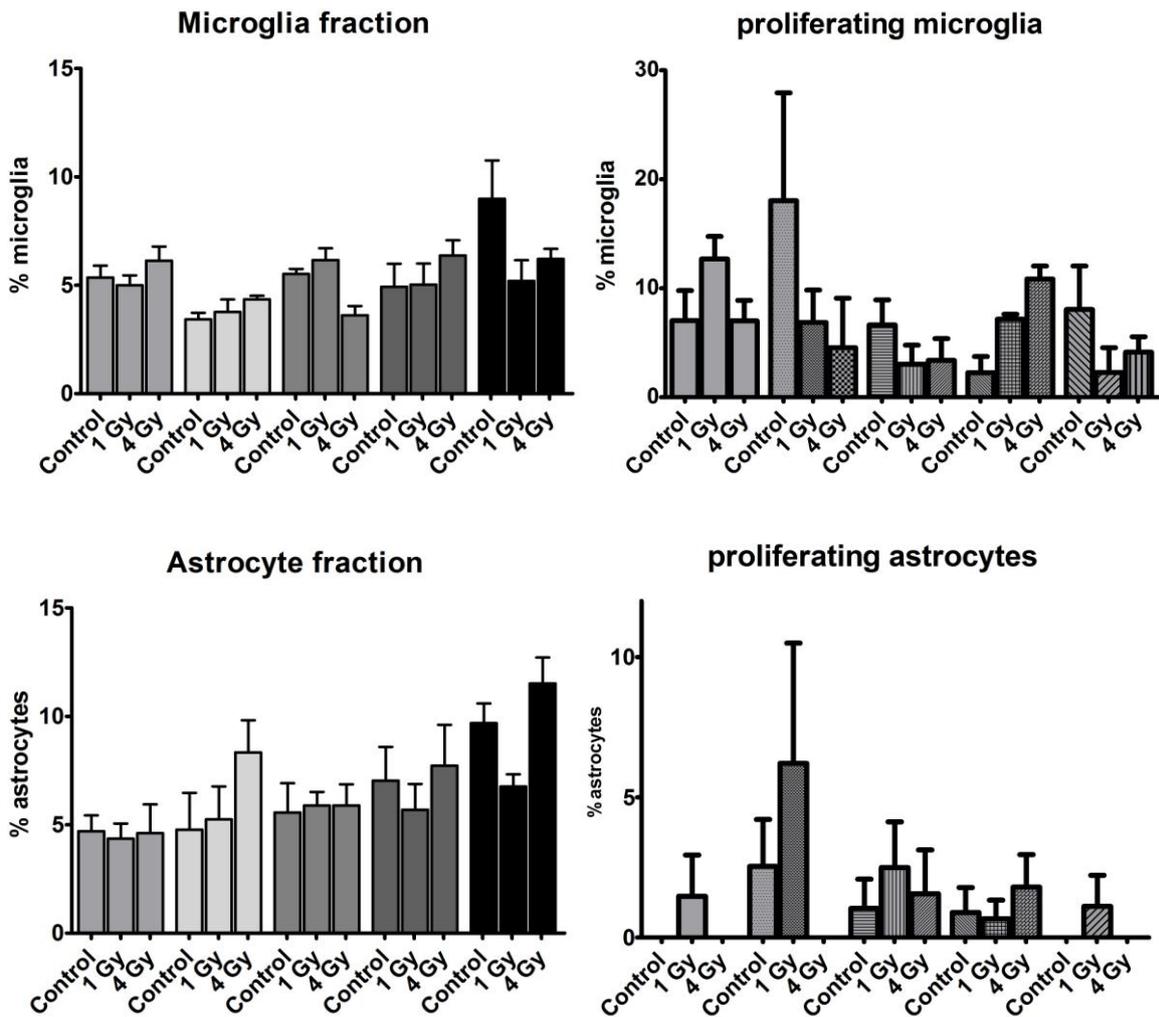


Abb. 11: Prozentualer Anteil der einzelnen neuronalen Zelltypen in OHSC nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und deren Änderung über die Zeit. Jeweils links aufgetragen ist der Anteil der Zellpopulation, rechts aufgetragen ist die proliferierende Subpopulation.

Xrays:



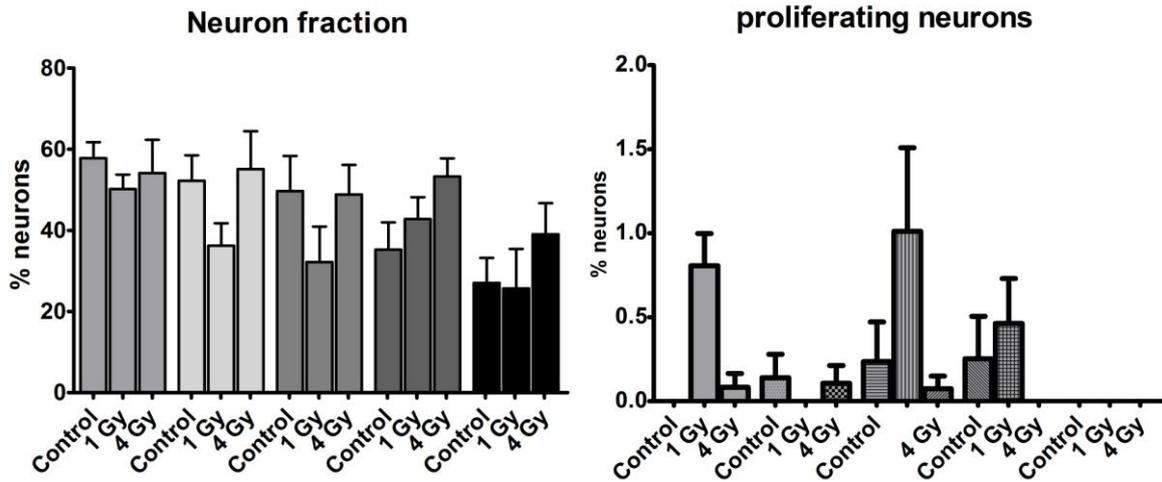


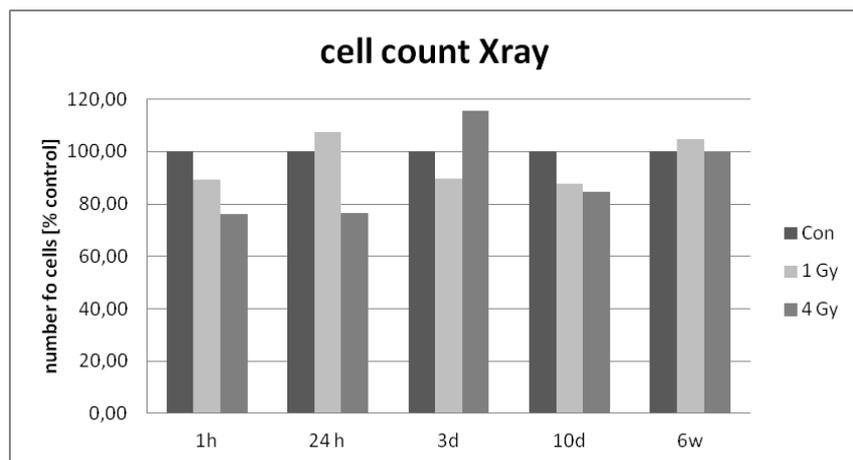
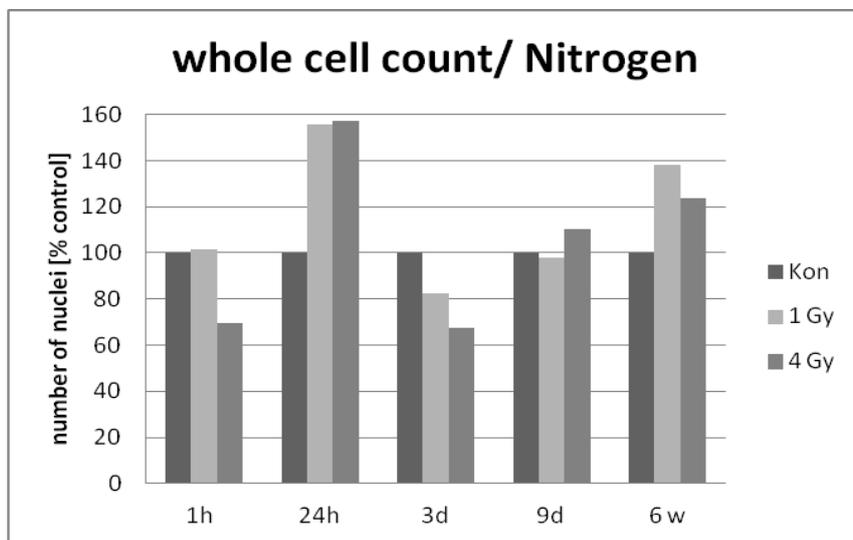
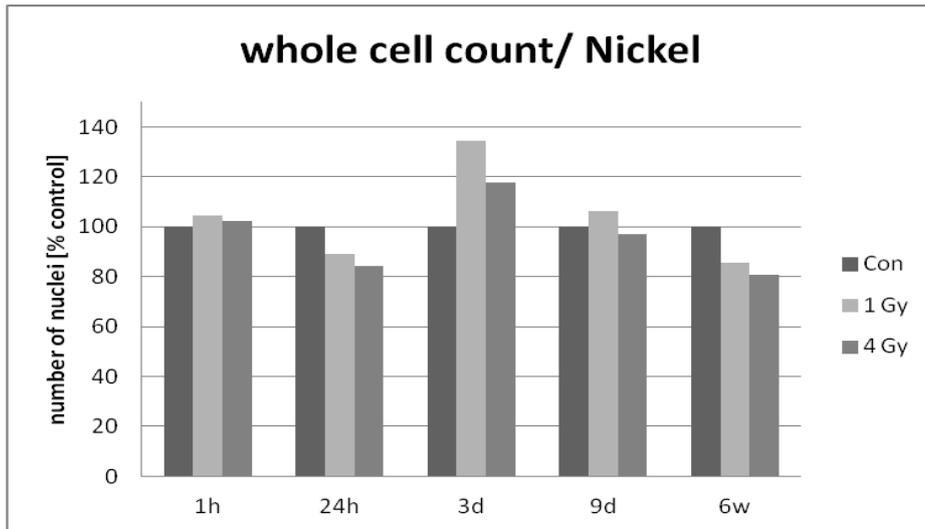
Abb. 12: Prozentualer Anteil der einzelnen neuronalen Zelltypen in OHSC nach Bestrahlung mit Photonen (Xrays) und deren Änderung über die Zeit. Jeweils links aufgetragen ist der Anteil der Zellpopulation, rechts aufgetragen ist die proliferierende Subpopulation.

Es ist zu sehen, dass die Neuronenfraktion über die Zeit unabhängig von der Bestrahlung ungefähr gleich bleibt. Leichte Schwankungen, auch in den Kontrollen, lassen eher auf Kultivierungsartefakte bzw. Unterschiede in den Slices schließen.

Mikroglia- und Astrozytenfraktion scheinen über die Zeit leicht anzuwachsen, aber dies auch unabhängig von der Behandlung, so dass hier von einer Verstärkung der Glianarbe im Slice über die Zeit auszugehen ist. Die Mikroglia- und Astrozytenproliferation erscheint nach Bestrahlung leicht vermindert (nach 24 Stunden und 3 Tagen), zu späteren Zeitpunkten ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Astrozyten- und Neuronenproliferation scheint völlig unabhängig von Zeitpunkt und Behandlung zu sein. Es ist zu beachten, dass die Neuronenproliferation generell sehr gering ist. NeuN und Ki67-doppelt positive Zellen stellen wahrscheinlich eine „junge“ Generation Neuronen dar, die sich gerade am Ende ihrer Ausdifferenzierung befinden und somit noch nicht völlig aus dem Zellzyklus ausgetreten sind.

Veränderung der Gesamtzellzahl in OHSC nach Bestrahlung

Um zu sehen, ob Zellen nach Bestrahlung sterben, werteten wir auch die Gesamtanzahl an Zellen in den Slices über die Zeit aus. Dafür wurde die Anzahl der Kernfärbungen pro Bildfeld aus allen Färbungen zusammengefasst.



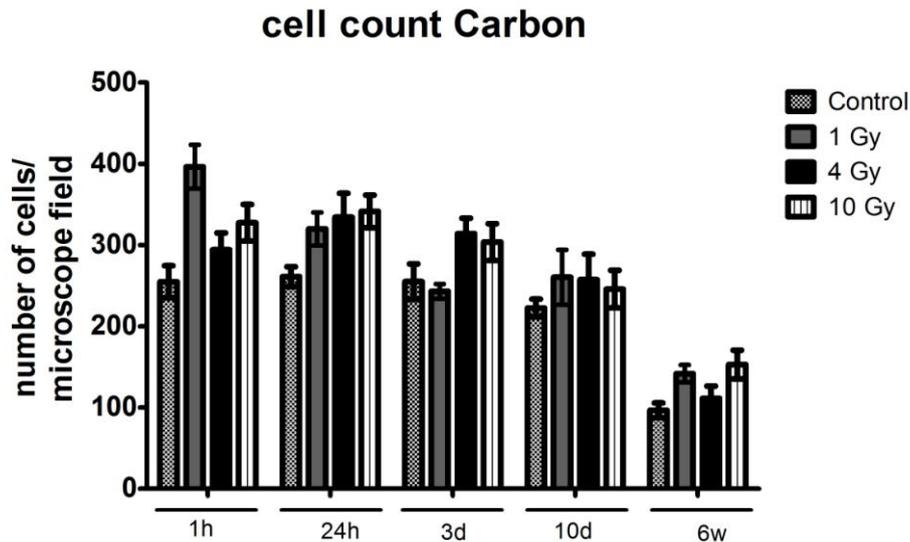


Abb. 13: Gesamtzellzahl in OHSC nach Bestrahlung mit Ionen- oder Photonenstrahlung über die Zeit.

Es ist nach Bestrahlung kein auffälliger Zelltod zu verzeichnen. Bezogen auf die Kontrollen, wie es in den Diagrammen von Nickel-, Stickstoff- und Xray- Bestrahlung aufgetragen ist, sind nur leichte Schwankungen zu sehen, die durch Slice-Unterschiede zu erklären sind. Im letzten Bild (Carbon) ist die Darstellung etwas verändert. Hier wurden die absoluten Zahlen dargestellt, und man sieht eine Abnahme der Zellzahl über die Zeit, aber nicht abhängig von der Bestrahlung. Falls also Zellen im Laufe der Inkubation nach der Bestrahlung sterben, werden diese offensichtlich regeneriert. Um sterbende Zellen nach kürzeren Zeitpunkten sichtbar zu machen, verwendeten wir den Zelltodmarker Caspase 3, was im folgenden Abschnitt dargestellt ist.

Zelltod in OHSC nach Bestrahlung

Zellen können nach negativen Einflüssen auf zwei Arten sterben. Man spricht von „ungeordnetem“ oder „geordnetem“ oder „programmierten“ Zelltod. Beim ungeordneten Zelltod, der Nekrose, geht die Zelle sehr schnell zugrunde und entlässt dabei ihre Zellbestandteile in die Umgebung, was zu einer starken Entzündung führt. Dies geschieht meist nach sehr starken Einflüssen wie Hitze, Druck oder Säure. Der geordnete Zelltod oder Apoptose erfolgt eher nach schwächeren, aber trotzdem fatalen Einflüssen, z.B. einer starken DNA-Schädigung. Hierbei stirbt die Zelle von innen heraus, was man anhand einer Zellkern-Fragmentierung und Expression verschiedener Apoptose-Marker beobachten kann. Apoptose führt letztendlich zu einer vollständigen Fragmentierung der Zelle, so dass sie von Makrophagen erkannt und beseitigt werden kann, ohne dass die umgebenden Zellen dem Debris ausgesetzt sind.

In unseren Experimenten erwarteten wir keine Nekrose, da die Einflüsse zu schwach waren. Wir analysierten die Slices auf den Apoptosemarker Caspase3 bzw. dessen Spaltprodukt aktivierte Caspase3 (Cas3).

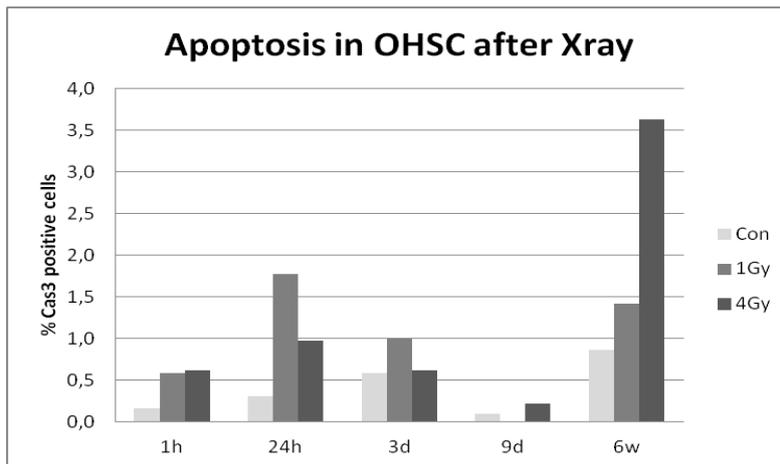


Abb. 14: Zelltod in OHSC nach Bestrahlung mit Photonen (Xray). Kryoschnitte von OHSC wurden mit dem Zelltodmarker Caspase3 angefärbt und ausgezählt.

Wie aus dieser Grafik ersichtlich ist, gibt es auch in Kontrollslices aktivierte Caspase3. Dies liegt am natürlichen Turnover von Gliazellen. 1 Stunde bis 9 Tage nach Bestrahlung liegt der Apoptoseindex bei unter 2%, nach 6 Wochen steigt er an, da wahrscheinlich eine Alterung der Slices eintritt und vermehrt Zellen sterben. Es ist aber kein Zusammenhang zwischen Bestrahlung und Anstieg der Caspase-Aktivität zu sehen, bzw. es sieht hier fast so aus, als würde die niedrigere Dosis von 1 Gy mehr Apoptose verursachen als die höhere Dosis von 4 Gy. Um verlässlichere Daten zu bekommen, müssen hier noch mehr Schnitte ausgewertet werden, da bislang die Zahl der ausgezählten Färbungen keine statistisch verlässliche Auswertung zulässt. Die weiteren Experimente werden noch ausgewertet.

Darstellung von neuronalen Vorläuferzellen im Hippocampus

Die neuronalen Vorläuferzellen, die für die lebenslange Neurogenese verantwortlich sind, liegen im Gyrus dentatus, einer Struktur im Hippocampus. Zur Veranschaulichung ist hier eine Grafik mit den relevanten Strukturen gezeigt. Der Gyrus dentatus ist in blau dargestellt, die Cornu ammonis (CA)-Region in rot. Neuronale Vorläuferzellen exprimieren während ihrer Differenzierung zeitlich gesehen zuerst Doublecortin (DCX), dann Nestin und schließlich adulte Neuronenmarker wie Calbindin oder NeuN.

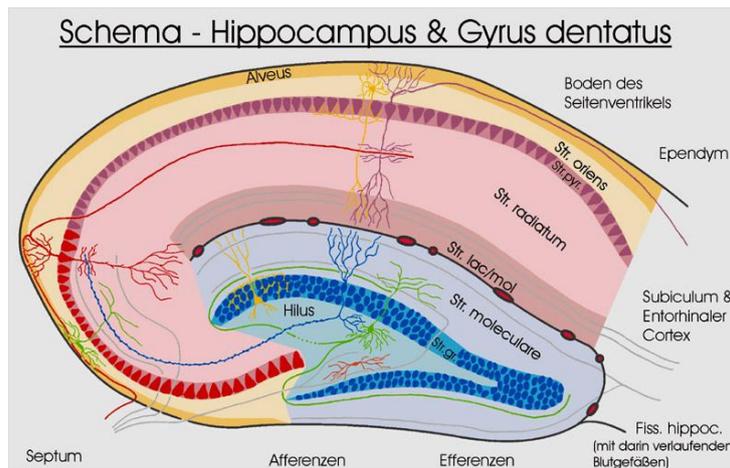


Abb 15: Schematische Darstellung des Hippocampus. Die Stammzellnische befindet sich im Gyrus dentatus (blau dargestellt). Aus: <http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/index.html>

Wir etablierten die Färbungen für Doublecortin und Nestin an horizontalen Kryoschnitten von OHSC, um die Struktur des Hippocampus zu erhalten (s. III, 2, S.8). Beispiele hiervon sind nachfolgend gezeigt.

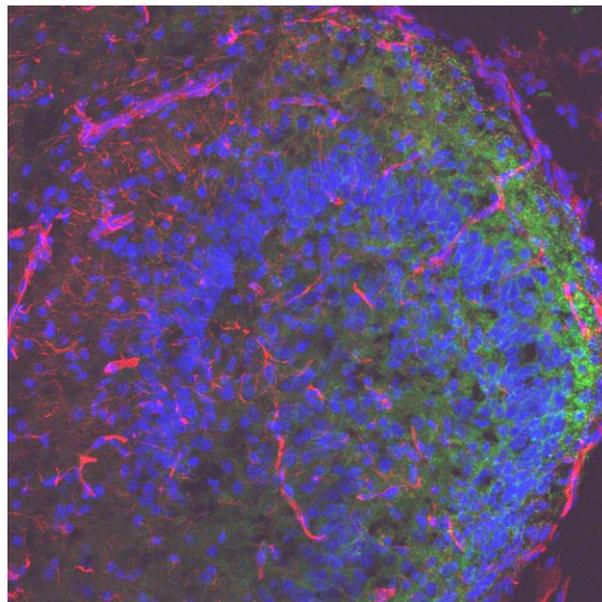


Abb. 16: Doppelfärbung für Nestin und Doublecortin (DCX) an einem Kryoschnitt einer OHSC von 4 Tage alten Mäusen. Rot: Nestin, grün: DCX, blau: Kernfärbung (Hoechst). Konfokale Z-Projektion, 200x

Im sich entwickelnden Hirn wird auch in Endothel-Zellen Nestin exprimiert, was der Antikörper ebenfalls erkennt. In unseren Kulturen überwiegt die Endothelfärbung gegenüber der NSC-Färbung, was zu Problemen bei der Auswertung führt. Außerdem wird Nestin in den Kryoschnitten hauptsächlich in den Fasern angefärbt, was eine zuverlässige Auswertung in Hinsicht auf die Anzahl der NSC in Hippocampus erschwert bzw. unmöglich macht. Für eine zuverlässige Auszählung muss der Zellkörper/-kern sichtbar sein.

Die DCX Färbung wird in unserem Labor erfolgreich an Vibratom-Schnitten von Maushirnen durchgeführt, lässt sich jedoch an Kryoschnitten von OHSC nicht zuverlässig auswerten. Dies kann an der geringeren Schnittstärke liegen.

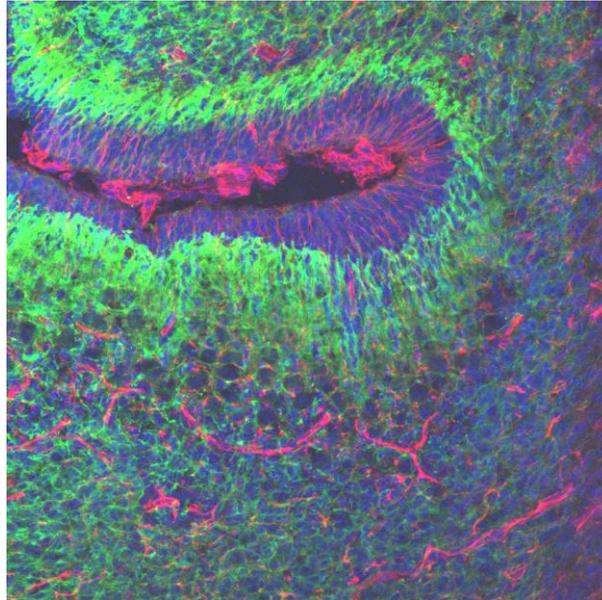


Abb. 17: Doppelfärbung von NSC in Maus-Cerebellum (Kleinhirn), 4 Tage alt. Rot: Nestin, grün: Doublecortin, blau: Kernfärbung (Hoechst). Konfokale Z-Projektion, 200x.

Im Kryoschnitt des Cerebellums ist die DCX Färbung deutlicher ausgeprägt als in OHSC, wodurch eine unspezifische Bindung oder ein unzureichendes Färbeprotokoll ausgeschlossen werden kann. Die hierfür verwendeten Mäuse waren gleich alt wie die für die OHSC-Präparationen.

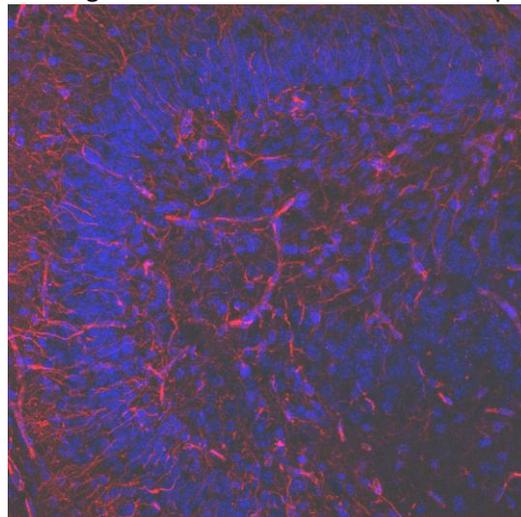


Abb. 18: Nestin-Färbung eines frisch präparierten Hirnslice einer 4 Tage alten Maus. Kryoschnitt. Rot: Nestin, blau: Kernfärbung (Hoechst). Konfokale Z-Projektion, 200x.

Um auszuschließen, dass die schwache Anfärbbarkeit der NSC in der Dauer der Kultivierung begründet liegt, verwendeten wir frisch präparierte Hirnschnitte für die Färbung. Auch hier sieht man eine starke Reaktion des Endothels sowie die Anfärbung von Nestin in den Fasern, aber nicht in den Somata der NSC.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Aufbauend auf unseren gesammelten Ergebnissen sollten funktionelle Aspekte der Bestrahlung untersucht werden, wofür sich das OHSC Modell wegen der intakten Reizweiterleitung sehr gut eignet. Elektrophysiologische Methoden, die auf Ableitungen elektrischer Ströme von Zellen aufbauen, sind weit verbreitet. Allerdings können OHSC in Langzeitkultur nur eingeschränkt für diese Messungen eingesetzt werden, da die Kultivierung die Bildung einer Glianarbe mit sich bringt, die von herkömmlichen Messelektroden bzw. in etablierten Messsystemen nur schwer durchdrungen werden kann. Deshalb werden bislang nur Akut-Slices verwendet, die maximal einige Stunden überleben. In Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe der Universität Leipzig wurden bereits Vorarbeiten begonnen, um das OHSC-Modell mit der Möglichkeit der Weiterkultivierung zwischen einzelnen Messungen zu adaptieren. Somit könnten an unterschiedlich behandelten/bestrahlten Slices über einen Zeitraum von mehreren Wochen immer wieder Messungen durchgeführt werden, die die Schwankungen zwischen einzelnen Kulturen sowie die benötigte Anzahl an Tieren minimieren

Die meisten Studien über Bestrahlung im Hippocampus werden mit Ganzhirn-Exposition durchgeführt, was für eine Risikoabschätzung für Astronauten wenig sinnvoll ist, da die Partikelfluenz im Weltraum sehr gering, aber dafür hochenergetisch ist. Hierfür würde sich zum Beispiel der Einsatz eines extrem fokussierten Micro-Beams eignen, wie er an der GSI schon für andere Fragestellungen eingesetzt wird. Das OHSC Modell könnte somit einer gezielten punktuellen Bestrahlung ausgesetzt werden und die Effekte untersucht werden, wobei sicherlich auch der Bystander-Effekt eine große Rolle spielen wird. Je nach Lage der Exposition im hippocampalen System (CA, GD, Fasern...) könnte man Aussagen über den Einfluss der Bestrahlung auf die Zellen in Hinblick auf Inaktivierung oder sogar Zelltod oder funktionell auf die Reizweiterleitung treffen.

Im Hinblick auf Effekte auf die Stammzellnische wäre ein Live-Imaging-Setup denkbar, bei dem OHSC aus Mäusen verwendet werden, bei denen ein Stammzellmarker-Gen (z.B. Nestin) mit GFP (grün fluoreszierendem Protein) gekoppelt ist. Auch hier wäre eine Beobachtung derselben Slices über längere Zeit möglich, wobei die Anzahl der Nestin-GFP-positiven Zellen in ihrer organotypischen Umgebung analysiert werden kann. Ein entsprechendes Setup wird gerade beschafft. Allerdings stellt sich uns nun eher die Frage nach klinisch relevanten Aspekten der Strahlenwirkung. Seit kurzem wird diskutiert, dass Bestrahlung die Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigt und kognitive Schäden bis hin zu epileptischen Veränderungen verursacht (z.B. Mildner et al, 2007; Lee et al, 2012; Fauquette et al, 2012). Dies war zum Zeitpunkt der Antragstellung noch nicht aktuell, weswegen dieser Punkt noch nicht in die Projektplanung einbezogen wurde. Wenn man bedenkt, dass die Stammzellnische im Hippocampus ein extrem kleines Ziel für mögliche Tief-Raum-Strahlung bietet, das Hirn als Gesamtes jedoch weitaus größer ist, sollte der Schwerpunkt weiterer Untersuchungen eher auf funktionellen Aspekten liegen als auf der neuronalen Neubildung. Untersuchungen zu Veränderungen an Endothel und Matrixproteinen in OHSC nach Bestrahlung werden hier gerade im Rahmen einer Masterarbeit begonnen.

Erfindungen wurden nicht getätigt, so dass sich bezüglich von Schutzrechten keine Fragen stellen. Bedauerlich finden wir, dass der entscheidende Befund unseres Projektes, nämlich die Entdeckung einer extremen, bislang nie gezeigten Strahlenresistenz von adulten Neuronen im Hinblick auf ihre

molekulare Ursache nicht in einem Anschlussprojekt untersucht werden soll. Leider lag uns eine Begründung der Ablehnung, also die Argumente der Gutachter, nicht vor. An der wissenschaftlichen Begründung wären wir nach wie vor interessiert. Aus unserer Sicht liegt in der Suche nach elektrophysiologische Veränderungen bestrahlter Neurone, wie wir sie beantragt haben, ein extrem innovatives, klinisch und raumfahrttechnisch hochrelevantes Feld.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Unsere Untersuchungen ergaben keinen Hinweis für Neurodegeneration, auch nicht im Bereich der Stammzellnische. Insofern ergibt sich für uns als nächste Frage, wie die hohe Strahlenresistenz von Neuronen zu erklären ist und ob sie auch chronischer Exposition gegenüber standhält.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer, z.B. Konferenzen

Auf Rückfrage erhältlich.

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Grundstruktur des Projektes konnte eingehalten werden. Die wesentliche Frage, ob ein Verlust der Stammzellnische zu erwarten ist, lässt sich nach unseren Daten verneinen.

Literatur

“A simple method for organotypic cultures of nervous tissue”; Stoppini L, Buchs PA, Muller D. J Neurosci Methods. 1991 Apr; 37(2):173-82

“Tissue slice cultures from humans or rodents: a new tool to evaluate biological effects of heavy ions”; Merz F, Müller M, Taucher-Scholz G, Rödel F, Stöcker H, Schopow K, Laprell L, Dehghani F, Durante M, Bechmann I. Radiat Environ Biophys. 2010 Aug; 49(3):457-62. PMID: 20490530

„Modeling radiation effects at the tissue level”; Muller, M., M. Durante, H. Stocker, F. Merz and I. Bechmann (2010). European Physical Journal D 60(1): 171-176

“Irradiation of human tumor tissue cultures: optimizing ion radiation therapy”; Merz F, Bechmann I. Future Oncol. 2011 Apr; 7(4):489-91

“High-LET radiation induces inflammation and persistent changes in markers of hippocampal neurogenesis”; Rola R, Sarkissian V, Obenaus A, Nelson GA, Otsuka S, Limoli CL, Fike JR. Radiat Res. 2005 Oct;164(4 Pt 2):556-60

“The PPARalpha agonist fenofibrate preserves hippocampal neurogenesis and inhibits microglial activation after whole-brain irradiation”; Ramanan S, Kooshki M, Zhao W, Hsu FC, Riddle DR, Robbins ME. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009 Nov 1;75(3):870-7

“Irradiation alters MMP-2/TIMP-2 system and collagen type IV degradation in brain”; Lee WH, Warrington JP, Sonntag WE, Lee YW. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012 Apr 1;82(5):1559-66

“Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study”; Fauquette W, Amourette C, Dehouck MP, Diserbo M. Brain Res. 2012 Jan 18;1433:114-26

“Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions”; Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M. Nat Neurosci. 2007 Dec;10(12):1544-53