
EFFEKTE IONISIERENDER STRAHLUNG AUF HUMANE ZEREBRALE ORGANOIDE

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

von

Celine Katharina Schielke

Mainz 2021

Effekte ionisierender Strahlung auf humane zerebrale Organoide

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Dissertation von M.Sc. Celine Katharina Schielke aus Weiterstadt

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Gutachten:

2. Gutachten:

Tag der Einreichung:

Mainz – D 77

Für meine Eltern

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Celine Katharina Schielke, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Effekte ionisierender Strahlung auf humane zerebrale Organoide“ ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt zu haben. Alle Stellen, Daten, Techniken und Materialien, die Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht worden. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Weiterstadt, den 14. Juli 2021



.....
Celine Schielke

VORWORT

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des Verbundprojektes *Brain Radiation Assay* in der Zeit von April 2018 bis Juli 2021 an der GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH in Darmstadt angefertigt. Finanziert wurde das Projekt mit dem Förderkennzeichen 02NUK049A durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen ionisierender Strahlung (*ionizing radiation*; IR) auf die Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) in Bezug auf strahleninduzierte, neurologische Spätfolgen als Konsequenz von Radiodiagnostik und Strahlentherapien. Dazu wurde ein zerebrales Organoid-Modell (ZOs) nach Lancaster et al., 2017 etabliert, welches die Schlüsselmerkmale der humanen Hirnentwicklung widerspiegelt und somit die Analyse der Strahleneffekte von Röntgen- und Partikelstrahlung auf das ZNS-Gewebe ermöglicht. Hierfür wurden ZOs unterschiedlicher Reifegrade mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und Protonenstrahlen im Dosisbereich von 0,5 - 15 Gy exponiert. Dabei diente die Bestrahlung unreifer ZOs an Tag (d) 20 der Kultivierung mit Dosen von 0,5 - 8 Gy als früher Bestrahlungszeitpunkt zur Modellierung der Strahleneffekte auf die Proliferation, Viabilität und Differenzierungsfähigkeit embryonaler, neuraler Stamm- und Vorläuferzellen. Die Bestrahlung reiferer ZOs an d80 der Kultivierung mit Dosen von 3 - 15 Gy hingegen ermöglichte eine Analyse der Strahleneffekte auf die fetale Neuro- und frühe Gliogenese. Zur Charakterisierung der Strahleneffekte wurden Analysen hinsichtlich der Morphologie, des strahleninduzierten Zelltods und der Expression neuraler Marker durchgeführt.

Die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche zeigten eine dosisabhängige Wachstumsinhibierung für alle Strahlenarten. Dabei korrelierte die Wachstumsinhibierung, neben der applizierten Dosis und dem Reifegrad der exponierten ZOs, mit der verwendeten Strahlenqualität. Dadurch wurde die höhere Effektivität von Partikelstrahlung und somit deren Eignung in der Tumorthherapie verifiziert. Die Wachstumsverminderung ging zudem mit einer dosisabhängigen Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen nach Bestrahlung einher, wobei der Strahleneffekt auf unreife ZOs (d20) stärker war als auf reife ZOs (d80). Darüber hinaus wurde ein Dosisseffekt bzgl. der Häufigkeit der Ausbildung flüssigkeitsgefüllter, epithelialer Kavitäten etwa 2 - 3 Wochen nach Bestrahlung für alle Strahlenarten beobachtet, welche wiederum mit der verwendeten Dosis und dem Reifegrad der bestrahlten ZOs korrelierte. Eine Protonenbestrahlung von ZOs an d80 im *Spread-Out Bragg Peak* (SOBP), stellvertretend für die Exposition des Tumorgewebes, führte dabei zu einer häufigeren Kavitäten-Bildung als eine Bestrahlung in der Plateauphase, die als Maß für die Belastung des Normalgewebes diente. Dabei ging die Ausbildung der strahleninduzierten Kavitäten mit einem dosisabhängigen,

erhöhten Anteil nekrotischer Zellen einher. Dies lässt vermuten, dass es sich dabei um sogenannte Radionekrosen, welche als *in vivo* beobachteter Langzeiteffekt der kraniospinalen Tumorthherapie beschrieben wurden, handelt. Die morphologische Übereinstimmung sowie die nachgewiesene, epitheliale Barrierefunktion der flüssigkeitsgefüllten Kavitäten könnte jedoch auch auf eine strahleninduzierte Differenzierung in Choroid Plexus-Strukturen hindeuten, wie sie von Pellegrini et al., 2020 beschrieben wurden. Somit bieten ZOs zusätzlich die Möglichkeit den Zusammenhang zwischen der Ausbildung strahleninduzierter Radionekrosen und epithelialer Choroid Plexus-Strukturen in Bezug auf einen eventuellen Schutzmechanismus nach Strahlenschäden zu untersuchen. Darüber hinaus wurden mittels Gen- und Proteinexpressionsanalysen gezeigt, dass nach der Röntgenexposition unreifer ZOs an d20 insbesondere Marker für naive Zelltypen des ZNS dosisabhängig und signifikant niedriger exprimiert wurden, was folglich in einer gestörten Neurogenese resultierte. Marker für reife, neuronale und gliale Zellen des ZNS hingegen wurden nach der Bestrahlung an d80 tendenziell höher exprimiert, was einen Einfluss von IR auf bestimmte Differenzierungssignalwege, wie z. B. die WNT- und BMP-Signalwege, vermuten lässt. Die *in vivo* beobachteten Langzeiteffekte von Hirntumorpatienten können demnach auf die Schädigung besonders strahlensensitiver, neuraler Stamm- und Vorläuferzellen sowie von reifen, neuronalen Zellen und folglich auf eine veränderte Neuro- und Gliogenese sowie auf eine inhibierte Neuroregeneration zurückgeführt werden.

Somit eignen sich ZOs zur Analyse potenzieller, neuraler Strahleneffekte und zur Abbildung und Untersuchung bisher unerklärter, *in vivo* beobachteter, strahleninduzierter Langzeitfolgen der Tumorthherapie wie der Radionekrose. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Strahlenexperimente veranschaulichen zudem die Abhängigkeit der Schwere der auftretenden Strahleneffekte von dem Reifegrad der exponierten Zelltypen. Dies unterstreicht die hohe Strahlensensitivität pädiatrischer Patienten, deren Hirnentwicklung noch nicht vollends abgeschlossen ist, und somit das erhöhte Risiko zur Ausbildung neurologischer Langzeitfolgen. Diese Ergebnisse verdeutlichen noch einmal die Dringlichkeit der Entwicklung angepasster Strahlentherapien und adäquater Schutzmaßnahmen vor allem zur Bestrahlung pädiatrischer Hirntumorpatienten, zeigen jedoch auch das enorme, wissenschaftliche und therapeutische Potenzial von ZOs, als innovatives und realistisches *in vitro* Modell für das humane Gehirn, im Gebiet der Strahlenforschung auf.

ABSTRACT

In the present study, so-called cerebral organoids (ZOs), reflecting the key features of human brain development, serve as an innovative *in vitro* model to investigate the molecular mechanisms underlying radiation-induced, neurological long-term effects resulting from undesired consequences of radio diagnostics and radiotherapy. Therefore, ZOs of different degrees of maturity were exposed to X-rays, carbon ions and protons in the dose range of 0.5 - 15 Gy. Irradiation of immature ZOs on day (d) 20 of cultivation with doses of 0.5 - 8 Gy served as an early irradiation time point for modelling the radiation effects on proliferation, viability and differentiation ability of embryonic neural stem and progenitor cells. In contrast, irradiation of mature ZOs at d80 of cultivation with doses of 3 - 15 Gy allowed the analysis of potential radiation effects on fetal neuro- and early gliogenesis. To characterize the radiation effects, analyses regarding morphology, radiation-induced cell death and the expression of neural markers were performed.

The results of the irradiation experiments showed a dose-dependent growth inhibition for all radiation types. In addition to the applied dose and the degree of maturity of the exposed ZOs, the growth inhibition correlated with the radiation quality, which verified the higher effectiveness of particle radiation and thus its suitability for tumor therapy. The growth reduction was accompanied by a dose-dependent increase in the proportion of apoptotic cells after irradiation, where the radiation effect on immature ZOs (d20) was stronger than on mature ZOs (d80). In addition, a dose effect on the frequency of the formation of fluid-filled, epithelial cavities approximately 2 - 3 weeks post-irradiation for all radiation types was observed, which correlated with the applied dose and the degree of maturity of the irradiated ZOs. In addition, radiation quality influenced the frequency of formation of radiation-induced cavities, where proton irradiation of mature ZOs at d80 in the spread-out Bragg peak (SOBP) led to more cavity formation compared to the irradiation in the plateau phase or the X-ray irradiation. The formation of the radiation-induced cavities was accompanied by a dose-dependent, increased proportion of necrotic cells (radionecrosis), which was also observed as a long-term effect of craniospinal tumor therapy *in vivo*. However, the morphological similarity and the proven epithelial barrier function of the fluid-filled cavities could also indicate a radiation-induced differentiation into choroid plexus structures as described by Pellegrini et al., 2020. Thus, ZOs provide an additional opportunity to investigate the

correlation between the formation of radiation-induced radionecrosis and epithelial choroid plexus structures as a possible protective mechanism after radiation damage. In addition, gene and protein expression analyses showed a dose-dependent, lower expression of markers for naïve CNS cell types after X-ray exposure of immature ZOs at d20, that consequently resulted in impaired neuro- and gliogenesis. Markers for mature, neuronal and glial CNS cells tended to be more highly expressed after irradiation at d80, suggesting an influence of IR on certain differentiation pathways, such as the WNT and BMP signaling pathways. Therefore, the long-term effects observed *in vivo* in brain tumor patients can be attributed to damage to diverse radiation-sensitive neural stem and progenitor cells or mature neuronal cells and, consequently, to altered neurogenesis and gliogenesis and inhibited neuroregeneration.

Thus, in summary ZOs are suitable for analyzing potential neural radiation effects and to mimic and investigate previously unexplained, radiation-induced, long-term effects of tumor therapy, such as radionecrosis. The radiation experiments also illustrate the dependence of the severity of the radiation effects on the degree of maturity of the exposed cell types, which explains the high radiation sensitivity of pediatric patients whose brain development is not fully completed, explaining their increased risk for the development of long-term neurological deficits. These results underline the urgency of developing adapted radiation therapies and adequate protective measures, especially for the irradiation of pediatric brain tumor patients, and highlight the enormous scientific and therapeutic potential of ZOs as an innovative and realistic *in vitro* model for the human brain in the field of radiation research.

INHALTSVERZEICHNIS

1	MOTIVATION.....	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
2.1	Ionisierende Strahlung.....	3
2.1.1	Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung.....	3
2.1.2	Biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung.....	6
2.2	Die humane Hirnentwicklung <i>in vivo</i>	8
2.2.1	Neurulation während der Embryogenese.....	8
2.2.2	Neurogenese während der Fetogenese.....	10
2.3	Humane embryonale Stammzellen.....	12
2.4	Die humane Hirnentwicklung <i>in vitro</i> – Modellsysteme.....	14
2.4.1	Klassische Modellsysteme.....	14
2.4.2	Hirn-Organoiden als innovative Modellsysteme.....	15
2.5	Effekte ionisierender Strahlung auf das humane Gehirn - Stand der Forschung.....	18
3	ZIELSETZUNG.....	21
4	MATERIALIEN UND METHODEN.....	23
4.1	Materialien.....	23
4.2	Zellbiologische Methoden.....	23
4.2.1	Feeder-freie Kultivierung von hESCs.....	24
4.2.1.1	Beschichtung von Petrischalen mit Laminin-521.....	24
4.2.1.2	Auftauen von kryokonservierten hESCs.....	24
4.2.1.3	Passage von hESCs.....	24
4.2.2	Generierung von ZOs.....	25
4.2.3	Bestrahlung von ZOs.....	29
4.2.3.1	Röntgenbestrahlung.....	30
4.2.3.2	Partikelbestrahlung.....	30
4.3	Analytische Methoden.....	31
4.3.1	Morphologische Charakterisierung von ZOs.....	31
4.3.1.1	Größenbestimmung.....	31
4.3.1.2	Kavitäten-Bildung.....	31
4.3.1.3	Tinten-Test zur Überprüfung der Barrierefunktion.....	31
4.3.2	RNA-Isolierung und RT-PCR.....	32
4.3.3	Quantifizierung des strahleninduzierten Zelltods.....	33

4.3.4	Anfertigung von Kryoschnitten	34
4.3.5	Immunfluoreszenzfärbungen	35
4.3.5.1	IFF von hESCs	35
4.3.5.2	IFF von ZOs.....	35
4.3.6	Statistik.....	37
5	ERGEBNISSE.....	39
5.1	Pluripotenznachweis der hESCs.....	39
5.2	Generierung und Charakterisierung der ZOs	41
5.2.1	Generierung der ZOs	41
5.2.2	Molekulare Charakterisierung der ZOs	43
5.3	Effekte von Röntgenstrahlung auf ZOs.....	55
5.3.1	Effekte von Röntgenstrahlung auf unreife ZOs.....	55
5.3.1.1	Morphologie	55
5.3.1.2	Molekulare Charakterisierung der Strahleneffekte	58
5.3.1.3	Quantifizierung des strahleninduzierten Zelltods (Apoptose)	62
5.3.2	Effekte von Röntgenstrahlung auf reife ZOs.....	63
5.3.2.1	Morphologie	63
5.3.2.2	Molekulare Charakterisierung der Strahleneffekte	66
5.3.2.3	Quantifizierung des strahleninduzierten Zelltods (Apoptose)	70
5.3.3	Vergleich der Effekte von Röntgenstrahlung auf un-/reife ZOs.....	71
5.4	Effekte von Partikelstrahlen auf ZOs	76
5.4.1	Effekte von Kohlenstoffionen auf unreife ZOs.....	76
5.4.1.1	Morphologie	76
5.4.2	Effekte von Protonenstrahlen auf reife ZOs	79
5.4.2.1	Morphologie	79
5.4.3	Vergleich der Effekte von Röntgen- und Partikelstrahlung auf un-/reife ZOs... 82	
5.4.3.1	Vergleich der Effekte von Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen	82
5.4.3.2	Vergleich der Effekte von Röntgenstrahlung und Protonenstrahlen.....	82
5.5	ZOs als Modell zur Abbildung strahleninduzierter Spätfolgen.....	85
6	DISKUSSION UND FAZIT	87
6.1	Eignung der ZOs als <i>in vitro</i> Modellsystem für das humane Gehirn	87
6.2	Effekte ionisierender Strahlung auf ZOs.....	94
6.2.1	Effekte von Röntgenstrahlung auf ZOs	94
6.2.2	Effekte von Partikelstrahlen auf ZOs.....	99

6.3	Eignung von ZOs zur Analyse unerklärter Spätfolgen wie der Radionekrose	100
6.4	Fazit und Ausblick	101
ANHANG		103
I.	Literaturverzeichnis	103
II.	Abbildungsverzeichnis	115
III.	Tabellenverzeichnis	117
IV.	Abkürzungsverzeichnis	119
V.	Materialverzeichnis	121
VI.	Ergänzende Daten	127
LEBENS LAUF		155

“What I cannot create, I do not understand”

- Richard Feynman

Hirntumore stellen mit einer Inzidenz von 24 % die häufigsten, pädiatrischen, soliden Malignome dar [1] und gehören somit zu den häufigsten Todesursachen bei Krebserkrankungen von Kindern [2, 3]. Zu den klassischen, kurativen Behandlungsmethoden zählen chirurgische Resektion sowie Chemo- und Strahlentherapien. Dabei ist die Exposition mit ionisierender Strahlung (IR) ein anerkannter Risikofaktor in Bezug auf neurologische Spätfolgen, welche sich u.a. als progressive Lern-, Aufmerksamkeits- und Gedächtnisdefizite äußern [4, 5]. Die Häufigkeit und Schwere der neurokognitiven Defizite hängen zudem vom Alter zum Bestrahlungszeitpunkt ab, sodass Kinder im Allgemeinen stärker betroffen sind als Erwachsene [6, 7]. In den letzten Jahren konnte die Langzeitüberlebensrate von Patienten mit Hirntumoren aufgrund von kontinuierlich verbesserter Röntgendiagnostik und innovativer Strahlentherapien signifikant gesteigert werden [8, 9], weswegen die Untersuchung und Verminderung der behandlungsbedingten Spätfolgen zunehmend in den Fokus der Ärzte und Wissenschaftler gerückt sind. Nichtsdestotrotz sind die detaillierten, molekularen Wirkmechanismen von IR auf die Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) noch weitestgehend unbekannt. Zur Untersuchung der potenziellen, neurotoxischen Strahleneffekte bedienen sich Wissenschaftler alternativer Modellsysteme wie zweidimensionaler (2D-) Zellkultursysteme und Tiermodellen. Diese erweisen sich jedoch aufgrund des Mangels an Zellvielfalt und -organisation als nicht ausreichend, um die komplexe, humane Hirnentwicklung und -architektur zu simulieren [10–13]. Ein neues und vielversprechendes Forschungsfeld stellen sogenannte zerebrale Organoide (ZOs) dar, welche spezifische Schlüsselmerkmale der humanen Hirnentwicklung aufweisen und somit die Möglichkeit bieten, die Auswirkungen verschiedener Noxae auf das humane Gehirn und deren Rolle bei der Ausbildung neurologischer Krankheitsbilder zu untersuchen [14]. In der vorliegenden Arbeit wird sich, zur Analyse der molekularen Wirkmechanismen von Röntgen- und Partikelstrahlung auf das ZNS-Gewebe, eines auf humanen, embryonalen Stammzellen (*human embryonic stem cells*; hESCs) basierenden ZO-Modells nach Lancaster et al., 2017 [15] bedient. Dadurch soll eine bessere Risikobewertung, insbesondere für pädiatrische Patienten, durch die Analyse und Prädikation von Schäden im ZNS nach der Exposition mit IR ermöglicht werden.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung ist omnipräsent und die Menschheit somit unausweichlich terrestrischer Hintergrundstrahlung oder zivilisatorisch bedingter Strahlenexposition ausgesetzt [16]. Dabei beträgt der Anteil der medizinischen Strahlenexposition in Diagnostik und Therapie etwa 43 % der gesamten Strahlenbelastung [17]. In der Krebstherapie werden verschiedene Arten ionisierender Strahlung angewandt. Dazu gehören vor allem routinemäßig verwendete, schwach ionisierende Photonen- bzw. Röntgenstrahlung (*X-rays*) sowie Partikelstrahlen, zu denen ungeladene Neutronen und geladene Teilchen, wie Elektronen, Protonen und Schwerionen zählen. Während Röntgenstrahlung durch Elektronenprozesse innerhalb einer Röntgenröhre oder eines Linearbeschleunigers entstehen, werden Partikelstrahlen mittels Teilchenbeschleunigern (Zyklotronen und Synchrotronen) erzeugt [18]. Protonen und Kohlenstoffionen kommen, aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, insbesondere in der Therapie pädiatrischer Patienten zum Einsatz [19], weswegen sie im Rahmen der in der Arbeit durchgeführten, partikelbasierenden Strahlenexperimente angewandt wurden. Im Nachfolgenden werden nun die physikalischen Eigenschaften sowie die biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung genauer erläutert. Das folgende Kapitel 2.1.1 über die physikalischen Grundlagen ionisierender Strahlung bezieht sich dabei auf die Literatur von Hall und Giaccia 2006 [20] und Krieger 2012 [21]. Die Ausführungen über die biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung in Absatz 2.1.2 beruhen zudem auf der Literatur von Scholz 2003 [22].

2.1.1 Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung

Unter ionisierender Strahlung versteht man elektromagnetische Strahlung (z. B. Photonenstrahlung) sowie Partikelstrahlen, die durch Energieübertragung auf die durchdrungene Materie in der Lage sind, Atome und Moleküle zu ionisieren, d.h. aus den Atomen bestrahlter Materie Elektronen herauszulösen. Die absorbierte Energiedosis (D) wird in Gray (Gy) angegeben und beschreibt die pro Masseneinheit (m) deponierte Energie (E):

$$\text{Dosis} = \frac{E}{m}; [D] = \frac{J}{kg} = \text{Gy}$$

Formel 1

Durch diese Ionisierungsprozesse werden ein positives Ion und mindestens ein Sekundärelektron erzeugt. Allgemein unterscheidet man zwischen dicht- und dünn-ionisierender Strahlung, um die räumliche Verteilung der Ionisationsereignisse zu beschreiben. Dünn ionisierend impliziert dabei seltene, zufällig verteilte und räumlich getrennte Ionisationsereignisse im Gegensatz zu vielen dicht gelegenen Ionisationen. Beispiele für dünn-ionisierende Photonenstrahlung sind Röntgen- und Gammastrahlung, welche über Compton-Effekte, Photoabsorption und Paarbildung wechselwirken. Zu dicht-ionisierender Strahlung werden geladene Teilchen wie Protonen und Kohlenstoffionen gezählt, welche hauptsächlich über Coulomb-Interaktionen wechselwirken und in der Regel einen höheren linearen Energietransfer (LET) sowie eine höhere relative biologische Wirksamkeit (RBW) aufweisen. Der sogenannte LET beschreibt dabei die Energie (ΔE), die vom Primärstrahl auf das Zielvolumen pro Wegstrecke (Δx) übertragen wird (s. Formel 2) und ist spezifisch für unterschiedliche Strahlenarten. Der LET kann somit als indirektes Maß für die Häufigkeit von Ionisationsereignissen entlang einer Wegstrecke betrachtet werden. Je höher die Energie eines ionisierenden Teilchens, desto geringer ist die Interaktion mit der umgebenden Materie und desto tiefer dringt das Teilchen in die Materie ein, bevor es seine Energie durch Wechselwirkungen mit der Materie verringert und der LET steigt.

$$\text{LET} = \frac{\Delta E}{\Delta x}; [\text{LET}] = \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}$$

Formel 2

Die RBW hingegen bezieht sich auf die Veränderungen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und hängt von der Gesamtdosis, dem LET und der Strahlenempfindlichkeit der Zelllinie oder des Gewebes ab. Definiert ist die RBW als das Verhältnis der Dosis einer Referenzstrahlung (D_{ref}), zu der Dosis einer vergleichenden Strahlung (D_{test}), die unter gleichen Bedingungen für das Eintreten des gleichen biologischen Effektes notwendig ist:

$$\text{RBW} = \frac{D_{\text{ref}}}{D_{\text{test}}}$$

Formel 3

Zudem unterscheiden sich Photonen- und Partikelstrahlung, welche beide in der Radiotherapie Anwendung finden, in der Verteilung der Energiedeposition. Obwohl die photonenbasierte Strahlentherapie kontinuierlich verbessert wurde und immer noch die

Standardmodalität für die Behandlung von Hirntumoren darstellt, ist gerade in den letzten Jahren die partikelbasierte Strahlentherapie, die hauptsächlich eine Bestrahlung mit Protonen oder Kohlenstoffionen beinhaltet und eine effizientere, tumorkonforme Bestrahlung erlaubt, in den Fokus gerückt [23]. Der Vorteil der Ionenstrahlung gegenüber der Photonenstrahlung liegt in der besseren Dosisverteilung aufgrund von niedrigen Eintrittsdosen und eines einzigartigen Absorptionsprofils im Gewebe, welches nach einem langsamen Dosisanstieg (Plateauphase) einen sogenannten *Bragg Peak* aufweist (s. Abbildung 1). Hierbei wird die maximale Dosis in einer von der Ausgangsenergie des Teilchens abhängigen Gewebstiefe abgegeben, was eine präzise Bestrahlung des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des umliegenden, gesunden Gewebes ermöglicht. Bei dem Einsatz von Schwerionen in der Tumorthherapie ist der Durchmesser des *Bragg Peaks* jedoch zu gering, um die gesamte Tumorphläche abzudecken. In diesem Fall wird der *Bragg Peak* durch die Variation der Eingangsenergien und die Nutzung eines Strahl-modulierenden *Ripple-Filters* zu einem sogenannten *Spread-Out Bragg Peak* (SOBP) ausgeweitet. Dabei wird durch die Überlagerung der einzelnen im Gewebe deponierten Energien eine homogene Dosisverteilung über das gesamte Tumorumfang erzielt [24].

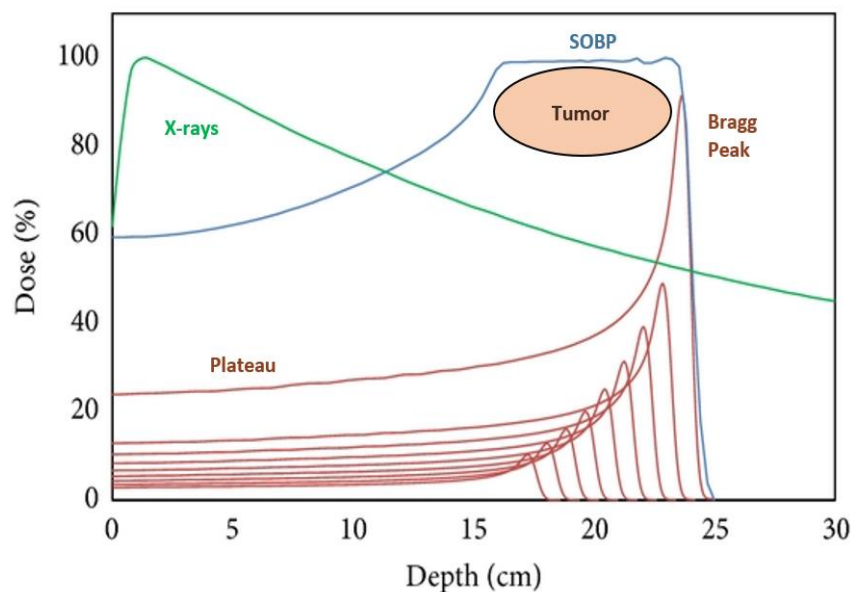


Abbildung 1: Vergleichende Tiefendosisprofile von Photonen (*X-rays*) und Protonen. Photonenstrahlung (grün) zeichnet sich nach einem anfänglichen Anstieg durch eine exponentielle Abnahme der Energiedosis mit der Eindringtiefe aus. Hochenergetische Protonen (rot) hingegen geben ihre Energie nach einer anfänglichen Plateauphase als Maximum in einem sogenannten *Bragg Peak* ab. Die mehrfachen, roten Kurven stellen die einzelnen Protonenstrahl-Energien dar, wobei Protonen mit höheren Energien tiefer in das Gewebe eindringen. Die Summierung der Einzelstrahlen zu einem SOBP, welcher das gesamte Tumorumfang abdeckt, wird durch die blaue Kurve dargestellt. Modifiziert nach [25].

2.1.2 Biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung

Trotz der verbesserten Strahlenmodalitäten ist die Bestrahlung des Normalgewebes unvermeidlich und kann, abhängig von der Dosis, dem Zelltyp und dem Differenzierungsstadium, innerhalb von Mikrosekunden zur direkten oder indirekten DNA-Schädigung einer Zelle führen (s. Abbildung 2A). Bei der direkten Strahlenwirkung findet die Absorption der Strahlenenergie sowie die damit einhergehende Ionisation in den biologisch wichtigen Molekülen wie z. B. der DNA oder den Proteinen statt, deren strahlenchemische Veränderung eine Schädigung des bestrahlten Systems zur Folge hat. Bei einer Bestrahlung mit geladenen Teilchen, wie Protonen und Kohlenstoffionen, überwiegt die direkte Schädigung, wohingegen Photonen überwiegend indirekt ionisieren. Bei der indirekten Strahlenwirkung wird die Strahlenenergie durch Wassermoleküle absorbiert, wodurch hoch reaktive, freie Radikale entstehen, die wiederum in der Lage sind, Biomoleküle zu verändern und die DNA zu schädigen. Äußern können sich diese strahleninduzierten Schädigungen als Basenschäden sowie als Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA-Doppelhelix (s. Abbildung 2B). Eine Photonenstrahlung mit 1 Gy induziert dabei durchschnittlich mehr als 2000 Basenschäden und 1000 Einzelstrang- und 40 Doppelstrangbrüche. Doppelstrangbrüche stellen die schwerwiegendste Form der Schädigung nach Bestrahlung der Zelle dar. Treten diese lokal in großer Häufigkeit auf und werden nicht oder fehlerhaft repariert, bedingt dies Mutationen und Transformationen innerhalb der Zelle und kann zu deren Zelltod führen.

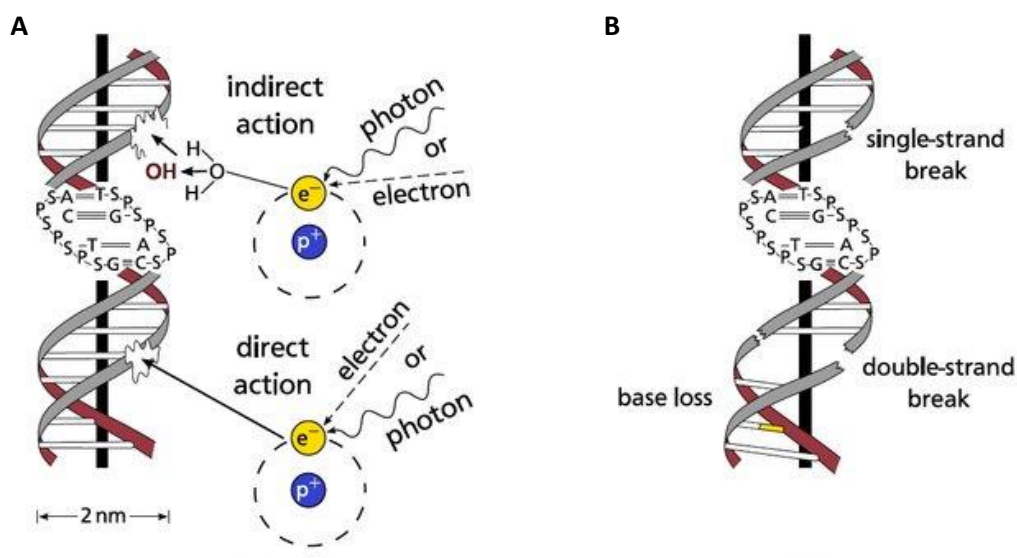


Abbildung 2: A: Schematische Darstellung der in-/direkten Wechselwirkung von IR mit der DNA. B: Strahleninduzierte DNA-Schäden, die sich als Basenschäden sowie Einzel- oder Doppelstrangbrüche äußern [26].

Zu den Hauptformen des Zelltods zählen die Apoptose und die Nekrose. Dabei stellt die sogenannte Apoptose eine Form des aktiven, programmierten Zelltods dar, bei der geschädigte Zellen durch biologische Prozesse eliminiert werden. Charakterisiert ist der apoptotische Zelltod durch morphologische Prozesse wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und die Bildung von Zellfragmenten, sogenannte apoptotische Körperchen, welche von benachbarten Zellen phagozytiert und intrazellulär degradiert werden [27]. Nukleäre, morphologische Merkmale apoptotischer Zellen wie die Fragmentierung oder Zellschrumpfung können durch eine DNA-Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342 oder *4', 6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) histologisch nachgewiesen werden [28]. Die Induktion des apoptotischen Zelltods basiert zudem auf der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und bestimmter Caspase-Enzyme, insbesondere der Caspasen 3 und 7, welche sowohl Kern- als auch Zytoskelettproteine spalten und im aktivierten Zustand immunhistochemisch nachgewiesen werden können [29]. Im Gegensatz zu dem kontrollierten, apoptotischen Zelltod handelt es sich bei der Nekrose um eine passive, zufällige Zelltodform infolge von physikalischer oder chemischer Einwirkung. Diese geht mit dem Anschwellen der Zellorganellen, dem Verlust der Membranintegrität, der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und einer nachfolgenden Entzündungsreaktion des Gewebes einher [30]. Immunhistochemisch nachweisbar sind nekrotische Zellen z. B. mittels selektiver, membranundurchlässiger Farbstoffe wie Propidiumiodid oder Ethidium-Homodimere, welche die perforierten Zellmembranen nekrotischer Zellen, jedoch nicht die intakten Zellmembranen lebender Zellen durchdringen können [31, 32]. Die unvermeidbare Exposition des gesunden Hirngewebes kann also gravierende bzw. letale Zellschädigungen bedingen und so zu der Ausbildung neurologischer Krankheitsbilder beitragen. Das Normalgewebe stellt somit den limitierenden Faktor für strahlenempfindliche Gewebe wie das Gehirn dar. Dementsprechend ist für eine bessere Risikoabschätzung von Strahlentherapien, die mindestens 50 % aller Krebspatienten erhalten [33], ein besseres Verständnis der therapeutisch-relevanten Strahleneinflüsse auf die Zellen des ZNS dringend erforderlich. Um eine bessere Risikobewertung nach einer Exposition mit ionisierender Strahlung zu gewährleisten, ist es zudem nötig den Ablauf der humanen Hirnentwicklung im Einzelnen nachzuvollziehen, weswegen im folgenden Kapitel 2.2 die wesentlichen Prozesse der neuronalen Organogenese dargestellt werden.

2.2 Die humane Hirnentwicklung *in vivo*

Die in diesem Kapitel folgenden Ausführungen über die humane Hirnentwicklung beruhen auf dem Übersichtsartikel von Stiles und Jernigan 2010 [34] sowie auf der Literatur von Moore et al., 2013 [35].

2.2.1 Neurulation während der Embryogenese

Die sogenannte Embryogenese, ein Prozess aus intensiver Zellteilung und zellulärer Differenzierung, beginnt mit der Empfängnis und erstreckt sich über die ersten acht Schwangerschaftswochen. Dabei bilden die pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse (*inner cell mass*; ICM) der Blastozyste im Laufe der Gastrulation die drei Keimblätter (Ekto, Ento- und Mesoderm), welche im weiteren Verlauf der Entwicklung die Organe und das Gewebe des Organismus formen. Dabei entwickelt sich das äußere Ektoderm hauptsächlich zur Epidermis und dem Neuralsystem. Im Anschluss an die Gastrulation beginnt in der dritten Schwangerschaftswoche die neurale Induktion und somit die primäre Entwicklung des Nervensystems. Dabei entwickelt sich das Ektoderm unter dem Einfluss der *Chorda dorsalis* („Achsenstab“) während der Neurulation zum sogenannten Neuroektoderm, welches entlang der dorsalen Mittellinie des Embryos verläuft. Anschließend faltet sich das Neuroektoderm unter der Bildung der Neuralplatte in das Neuralrohr auf (s. Abbildung 3A). Das Neuralrohr besteht aus einem Hohlraum, aus welchem sich während der Entwicklung das Ventrikelsystem ausbildet, sowie aus einer einschichtigen Epithelschicht (Neuroepithelium), welche das Neuralrohr auskleidet und multipotente, neurale Stammzellen (*neural stem cells*; NSCs) bzw. radiale Gliazellen (*radial glia cells*; RGs), aufweist. Per Definition beschreiben NSCs multipotente Stammzellen, die sich selbst erneuern und mind. eine neurale oder gliale Zelllinie hervorbringen können [36], weswegen unter dem Begriff NSCs eine heterogene Kultur aus neuronalen Stammzellen zusammengefasst wird, zu denen auch RGs zählen. Die embryonalen NSCs vergrößern die Stammzellpopulation zunächst durch symmetrische Zellteilung innerhalb der ventrikulären Zone (VZ) und bilden anschließend im Laufe der Neurogenese durch asymmetrische Zellteilung und Differenzierung die verschiedenen Zelltypen des ZNS [37]. Charakterisiert sind NSCs durch die Expression bestimmter Markerproteine wie SOX2 (*SRY (sex determining region Y)-box 2*), PAX6 (*paired box protein 6*) und Nestin [38]. Der Großteil der humanen RGs ist in der äußeren, subventrikulären Zone (oSVZ) lokalisiert und bildet eine eigenständige Stammzellpopulation, die sogenannten äußeren RGs (oRGs), welche den Transkriptionsfaktor *homeodomain-only protein* (HOPX) exprimieren [39] und im Mausmodell

nicht oder nur in begrenzter Anzahl nachzuweisen sind [40, 41]. Diese Zellen tragen durch die Generierung kortikaler Nervenzellen zur Neurogenese bei und stellen die Hauptpopulation der neuralen Vorläuferzellen dar. Diese werden als entscheidend für die evolutionäre Zunahme der Größe und Komplexität der menschlichen Hirnrinde und die Ermöglichung höherer, kognitiver Funktionen angesehen [41–43]. Zudem weisen RGs lange, radiale Fortsätze auf, welche den neugebildeten Neuronen zur radialen Migration in die kortikalen Schichten dienen. Vor dem Verschluss des Neuralrohrs beginnt sich das anteriore Ende auszudehnen, wodurch die drei primären Hirnvesikel entstehen. Das anteriore Vesikel wird als Prosencephalon bezeichnet und bildet den Vorläufer des Vorderhirns, welches u.a. Strukturen wie den Hippocampus ausbildet. Das Mesencephalon dient als Vorläufer der Mittelhirnstrukturen, wohingegen das posteriore Rhombencephalon im Laufe der Entwicklung das Rautenhirn ausbildet. Am Ende der Embryonalperiode entstehen aus diesen Vorläufersegmenten fünf sekundäre Hirnvesikel (Telen-, Dien-, Mesen-, Meten- und Myelencephalon), die die primäre Strukturierung des humanen Hirns bilden (s. Abbildung 3B).

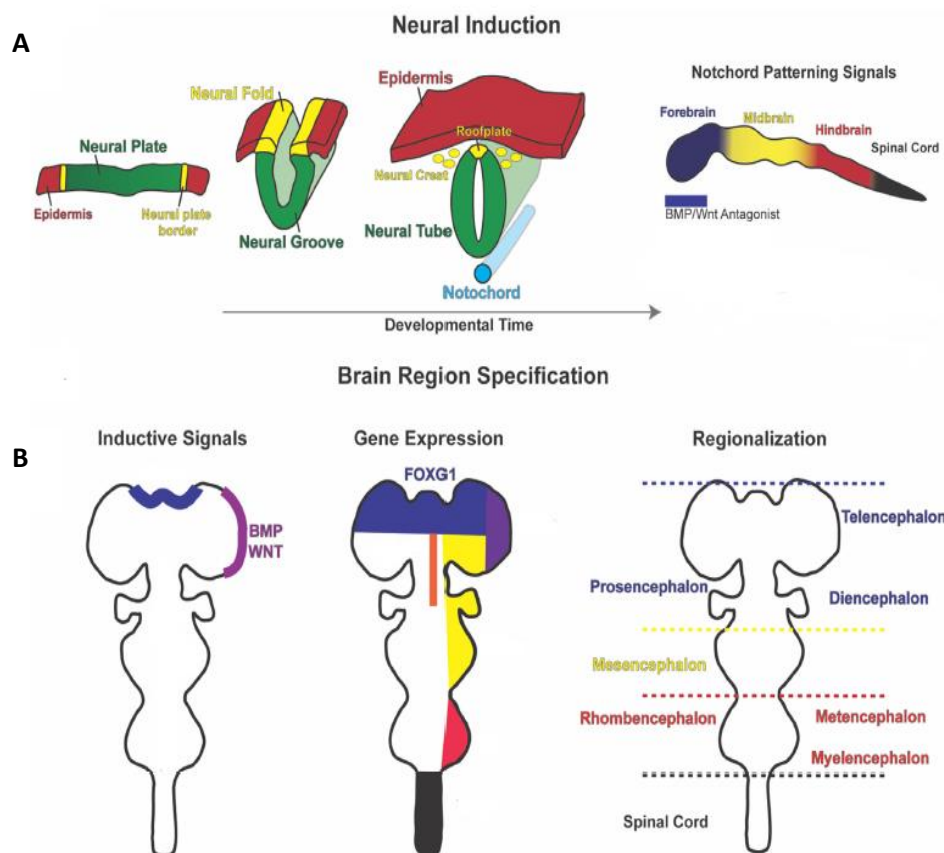


Abbildung 3: Entwicklung des ZNS *in vivo*. **A:** Während der Neurulation entwickelt sich das Neuroektoderm zum Neuralrohr und bildet anschließend die drei primären Hirnvesikel. **B:** Aus diesen entstehen am Ende der Embryonalperiode fünf sekundäre Hirnvesikel. Modifiziert nach [44].

2.2.2 Neurogenese während der Fetogenese

Die anschließende Fötalperiode bzw. Fetogenese erstreckt sich von der neunten Schwangerschaftswoche bis zum Ende der Schwangerschaft. Diese Periode ist durch die Ausbildung kortikaler Strukturen sowie durch neuronale Reorganisations- und Differenzierungsprozesse charakterisiert. Während dieser Zeit ist das sich entwickelnde Gehirn besonders empfindlich gegenüber äußeren Störfaktoren, wie der Exposition gegenüber IR [45].

Der Prozess, bei dem sich *in vivo* aus neuralen Stamm- und Vorläuferzellen Neurone ausbilden, wird als Neurogenese bezeichnet. Dazu teilen sich die ventrikulären NSCs asymmetrisch und bilden so weiter ausdifferenzierte, intermediäre Progenitorzellen (*intermediate progenitor cells*; IPCs), welche sich durch die Expression des *T-box brain protein 2* (TBR2) auszeichnen [46]. Diese differenzieren im weiteren Verlauf der Neurogenese in verschiedene Neuronen-Subtypen aus (s. Abbildung 4). An der Regulierung der Neurogenese sind bestimmte Morphogene, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Transkriptionsfaktoren sowie einige epigenetische Faktoren beteiligt. Dazu gehören beispielsweise die *sonic hedgehog* (SHH)-, *bone morphogenetic protein* (BMP)- und WNT-Signalwege, welche essenziell für die NSC-Reifung und Differenzierung sind [47]. Die NSC-abgeleiteten, neuronalen Vorläufer exprimieren u.a. *doublecortin* (DCX) [48] und *neuronal differentiation 1* (NeuroD1) [49], reifen anschließend in den lateralen Ventrikeln zu unreifen Neuronen, welche β III-Tubulin (β TUB) exprimieren [50], heran und migrieren radial aus den proliferierenden Bereichen der ventrikulären Zone in ihre Zielregionen. Im Kortex positioniert, beginnen die ausgereiften Neurone Neurotransmitter sowie neurotrophe Faktoren zu produzieren und neurale Netzwerke auszubilden. Das menschliche Gehirn besitzt dabei eine besonders komplexe, zelluläre Vielfalt und neuronale Konnektivität, welche mind. 16 distinkte Neuronen-Subtypen umfasst [51]. Marker für reife Neurone sind beispielsweise das dendritische *microtubule associated protein 2* (MAP2) [52], der postmitotische Neuronen-Marker *neuronal nuclei* (NeuN) [53] sowie das Membranprotein Synaptophysin (SYP) [54]. Eine Teilpopulation der adulten NSCs bleibt zudem in sogenannten neurogenen Nischen wie z. B. in der subgranulären Zone des *Dentate Gyrus* im Hippocampus zurück, um als Regenerationspool der lebenslangen Neurogenese zu dienen [36, 47]. Ist die Migration der Neurone größtenteils abgeschlossen, findet die sogenannte Gliogenese statt, bei der aus NSC-abgeleiteten, glialen A2B5-positiven Progenitorzellen zunächst Astrozyten und anschließend aus oligodendrischen Vorläufern

Oligodendrozyten gebildet werden [55, 56]. Zu den Aufgaben von Astrozyten gehören u.a. die Nährstoffversorgung der Neuronen, die Aufrechterhaltung des Ionenhaushaltes im extrazellulären Raum sowie die Unterstützung der Neurotransmission und die Induktion der Synapsenbildung [57, 58]. Ein Marker zur Identifikation von Astrozyten ist das Intermediärfilament *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), während das *myelin basic protein* (MBP) und das *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG) Marker für Oligodendrozyten darstellen [59–61]. Zu den Funktionen der Oligodendrozyten zählt zum Beispiel die Isolierung von Axonen (Myelinisierung) zur Beschleunigung der elektrischen Transmission [62]. Die Schädigung glialer Zellen durch die Einwirkung von IR und die damit einhergehenden Veränderungen in der synaptischen Plastizität, können somit ebenfalls zu der Ausbildung neurologischer Krankheitsbilder beitragen. Im Gegensatz zu der Neurogenese, bei der die Produktion und Migration von Neuronen weitestgehend pränatal stattfinden, stellen die Proliferation und die Generierung glialer Progenitorzellen aus neuronalen Progenitorzellen, deren Differenzierung sowie die Myelinisierung der Neurone durch Oligodendrozyten größtenteils postnatale Prozesse dar [63]. Somit setzt sich ein Teil der Neurogenese und der Großteil der Gliogenese in postnatale Stadien bis in die späte Kindheit fort und begründet dementsprechend die größere Strahlenempfindlichkeit von Kindern gegenüber Adulten.

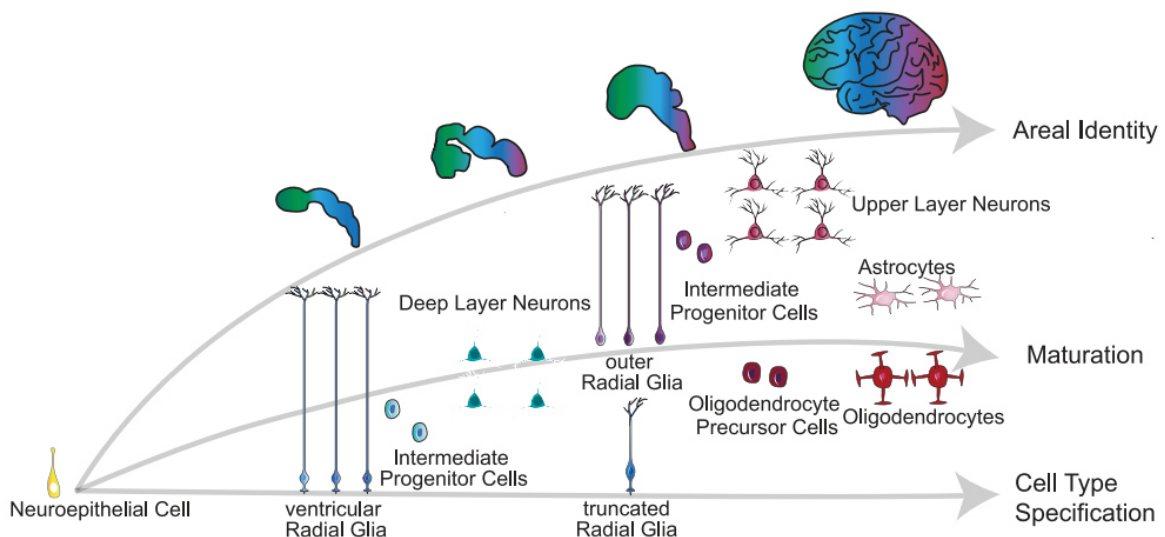


Abbildung 4: Schematische Entwicklung des humanen, zerebralen Kortex *in vivo*. Die neuronalen Stamm- und Progenitorzellen durchlaufen Zellspezifikations- und Reifungsprozesse und bilden zunächst intermediäre Progenitorzellen, die anschließend in die reifen, neuronalen und glialen Zellen des ZNS differenzieren. Modifiziert nach [64].

2.3 Humane embryonale Stammzellen

Zur Imitation der humanen Hirnentwicklung wird in der vorliegenden Arbeit auf ein stufenweises Differenzierungsprotokoll, welches auf pluripotenten hESCs basiert, zurückgegriffen. Im Folgenden wird daher näher auf die Eigenschaften pluripotenter Stammzellen sowie auf ihr wissenschaftliches Potenzial eingegangen.

Als Stammzellen werden undifferenzierte Zellen, welche neben der Fähigkeit zur kontinuierlichen Selbsterneuerung auch zur Differenzierung in spezialisierte Zelltypen und Gewebe eines Organismus befähigt sind, bezeichnet [65]. Klassifiziert werden Stammzellen entsprechend ihrer Herkunft in embryonale sowie in fetale und adulte Stammzellen [66] oder nach ihrer Differenzierungspotenz in totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente Zellen (s. Abbildung 5). Bei hESCs handelt es sich um pluripotente Zellen aus der ICM naiver Blastozysten, welche die Fähigkeit zur Ausbildung der drei Keimblätter besitzen. Die Isolierung von hESCs aus der ICM menschlicher Embryonen gelang erstmals James Thomson und Kollegen im Jahr 1998 [67] und führte zu der Etablierung von insgesamt fünf Zelllinien, u.a. auch zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten WA09/H9-Stammzelllinie.

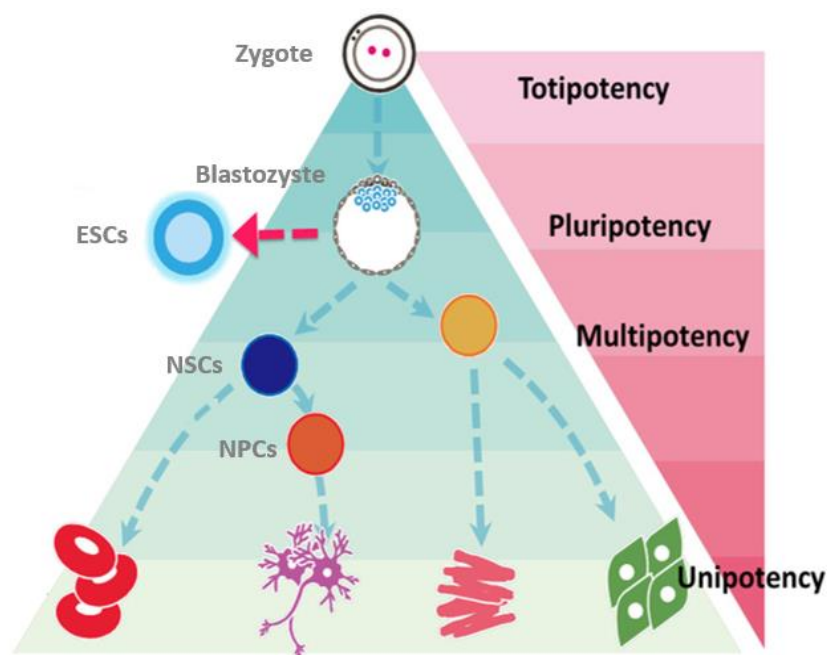


Abbildung 5: Stammzellhierarchie. Totipotente Zellen der Zygote können sich in alle Zellen des Organismus ausdifferenzieren und extraembryonales Gewebe bilden. Die pluripotenten, embryonalen Zellen (ESCs) der ICM besitzen noch das Potenzial sich in alle Derivate der drei Keimblätter auszdifferenzieren, können aber kein extraembryonales Gewebe mehr bilden. Multipotente, gewebsspezifische Zellen, wie z. B. neurale Stamm (NSCs)- und Progenitorzellen (*neural progenitor cells*; NPCs), weisen ein noch eingeschränkteres Differenzierungspotenzial auf und können sich nur in Zellen innerhalb eines Gewebetyps ausdifferenzieren. Unter unipotenten Zellen versteht man Zellen (z. B. Fibroblasten), welche dazu befähigt sind, Zellen desselben Typs zu bilden. Modifiziert nach [68].

Charakterisiert sind hESCs durch eine bemerkenswerte Selbsterneuerungs- und Proliferationsfähigkeit. Die Selbsterneuerung sowie die Induktion und Aufrechterhaltung der Pluripotenz *in vivo* basiert u.a. auf der Regulation der Genexpression durch *transforming growth factor* β (TGF- β)-, *basic fibroblast growth factor* (bFGF)- und WNT-Signaltransduktionskaskaden [69]. Zudem spielen bestimmte intrinsische Transkriptionsfaktoren, vor allem die Homöodomänen-Proteine *octamer binding transcription factor 4* (OCT4) und *nanog homeobox* (NANOG) sowie der Transkriptionsfaktor SOX2, eine wichtige Rolle beim Pluripotenzerhalt [69]. Durch eine definierte Kultivierung auf sogenannten *Feeder*-Zellen, bei denen es sich um bestrahlte, embryonale Mausfibroblasten handelt, und unter der exogenen Zugabe von bFGF kann die Pluripotenz der hESCs unter Beibehaltung der karyotypischen Stabilität auch *in vitro* über mehrere Passagen aufrechterhalten werden [67, 70]. Der Wachstumsfaktor bFGF fördert dabei die Stimulation von Aktin A, welches in einer geringen Konzentration unterstützend zur Proliferation und dem Überleben von hESCs *in vitro* beiträgt [71]. Eine alternative *feeder*-freie Kultivierung beinhaltet die Aussaat in serumfreies, bFGF-supplementiertes oder konditioniertes Medium auf extrazelluläre Zellsubstrate wie Fibronectin, Laminin oder Geltrex™ [72, 73]. Darüber hinaus besitzen hESCs eine nahezu unbegrenzte Differenzierungspotenz und lassen sich durch die Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren auch *in vitro* in die Derivate aller drei Keimblätter, u.a. auch in neurale Stamm- und Progenitorzellen sowie in reife Neurone und Gliazellen ausdifferenzieren [74, 75]. Da hESCs effizient *in vitro* expandiert und in nahezu alle Zelltypen ausdifferenziert werden können und somit ein enormes wissenschaftliches und therapeutisches Potenzial besitzen, stellen hESCs eines der vielseitigsten und weltweit am häufigsten genutzten Zellmodelle dar [76].

Die rechtliche Grundlage für die wissenschaftliche Einfuhr und Nutzung von hESCs in der Forschung und Medizin bilden in Deutschland das sogenannte Embryonenschutzgesetz (ESchG) sowie das Stammzellgesetz (StZG). Voraussetzungen für die streng begrenzte Verwendung von hESCs in der Forschung sind demnach ein hohes grundlegendes, wissenschaftliches bzw. medizinisches Interesse sowie die begründete Notwendigkeit von hESCs zur Untersuchung der vorhandenen Fragestellung, zu dessen Aufklärung kein anderes Modellsystem dienen kann. Im Nachfolgenden wird deshalb eine Übersicht über die konventionell verwendeten Modellsysteme gegeben und deren wissenschaftliches Potenzial und Limitierungen kurz erläutert.

2.4 Die humane Hirnentwicklung *in vitro* – Modellsysteme

2.4.1 Klassische Modellsysteme

Schon seit Jahrzehnten versuchen Wissenschaftler Modelle zu etablieren, welche die komplexe Neurophysiologie des humanen Gehirns in seiner Gesamtheit abbilden und somit die Untersuchung der Ursachen von strahleninduzierter Neurotoxizität und neurodegenerativen Krankheiten erlauben. Dazu zählen vor allem Zellkultursysteme und Nagetiermodelle.

Zu den bisher *in vitro* etablierten, neuronalen Zellkultursystemen gehören NSCs, welche aus dem fetalen oder adulten Gehirn isoliert oder aus pluripotenten Stammzellen ausdifferenziert werden [77]. *In vitro* kultivierte NSCs erlauben die Untersuchung diverser Noxae auf die Stammzellproliferation und -migration und somit auf die frühe, neurale Hirnentwicklung. Ebenso können reife Neuronen aus dem humanen Gehirn isoliert oder *in vitro* aus NSCs ausdifferenziert werden. Durch den Einsatz verschiedener Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren wurden bereits Neuronen unterschiedlicher Subtypen generiert und erfolgreich zur Untersuchung der neuronalen Funktionalität, synaptischen Plastizität und der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt [75]. Der Nachteil dieser Zellmodelle liegt jedoch darin, dass *Monolayer*-Kulturen nicht die Dreidimensionalität und die Zelldiversität des reifen Gehirns berücksichtigen und somit deutliche Unterschiede in der Morphologie und Differenzierung aufweisen [10]. Ein alternatives, komplexeres Modellsystem stellen sogenannte Neurosphären dar. Dabei handelt es sich um 3D-Aggregate verschiedener, neuronaler Vorläuferzellen, die aus einer Suspensionskultur von NSCs abgeleitet werden. Diese Zelltypen sind in der Lage sich selbst zu erneuern, verschiedene neuronale und gliale Subtypen unterschiedlichster Reifestadien zu generieren [78] und weisen zudem neuronale Funktionalität auf [79]. Im Gegensatz zum humanen Gehirn berücksichtigt dieses Modell jedoch nicht die hierarchische Zellstruktur und spiegelt somit nicht die komplexe Architektur des humanen Gehirns wider [80]. Alternativ werden Tiermodelle, insbesondere Nagetiere, verwendet, da sie die gesamte Vaskularisierung sowie die komplexe, biochemische Mikroumgebung des gesamten Säugerhirns abbilden [12, 81]. Abgesehen von den ethischen Diskussionen über die Verwendung von Tieren in der Forschung, weisen Mäuse und Menschen zudem artspezifische Unterschiede auf, die gegen die Verwendung von Nagetieren als Modell sprechen [82]. So unterscheiden sich das humane und murine Gehirn, neben Größe und Faltung, auch in der Vielfalt und Diversität neuraler und neuronaler Zelltypen [41, 42].

Die aufgezählten Limitierungen der herkömmlichen Modellsysteme verdeutlichen die Dringlichkeit eines adäquaten, innovativen Modellsystems für das humane Gehirn. Aufgrund dessen werden im Folgenden sogenannte Hirn-Organoiden (*Brain organoids*), die in den letzten Jahren als neuartiges *in vitro* Modellsystem im Bereich der Stammzellforschung in den Fokus gerückt sind, näher beschrieben.

2.4.2 Hirn-Organoiden als innovative Modellsysteme

Unter Hirn-Organoiden versteht man selbst organisierte, aus hESCs oder induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cells, iPSCs*) *in vitro* erzeugte Miniaturorgane. Laut Lancaster und Knoblich 2014 [83] ergibt sich als Definition für ein Organoid Folgendes: *„Ein Organoid enthält mehrere sich aus Stammzellen oder Vorläuferzellen entwickelte, organspezifische Zelltypen, welche sich durch Zellsortierung und lokal begrenzte, linienspezifische Prädisposition, ähnlich den Prozessen in vivo, selbst organisiert haben.“* (S. 278, Box 1).

Durch die Etablierung verschiedener Differenzierungsprotokolle und den Einsatz bestimmter Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle wurden bereits Organoiden verschiedener, funktioneller Hirnregionen, einschließlich Organoiden des ventralen Vorderhirns [84, 85], des Choroid Plexus [86], des Mittelhirns [87, 88], des Hypothalamus [89] sowie des Kleinhirns [90] generiert. Sogenannte zerebrale Organoiden (ZOs) wurden erstmals durch Lancaster et al., 2013 [91] beschrieben. Zur Generierung der ZOs wurden zunächst aus einer hESC-Einzelsuspension Embryoidkörperchen (*embryoid bodies; EBs*) gebildet, welche Derivate aller drei Keimblätter enthalten [92] und somit die frühe Embryogenese abbilden. Diese wurden dann über die Zugabe eines neuralen Selektionsmediums zu neuroektodermalen Zellen differenziert. Anschließend wurden die Zellaggregate in Matrigel™, welches als Stützskelett dient, eingebettet und unter der Zugabe eines Differenzierungsmediums in neuroepitheliale Zellen differenziert. Aus diesen Zellen wurden dann in einem rotierenden Bioreaktor, welcher einer erhöhten Nährstoffverfügbarkeit dient, ZOs mit einer Größe von bis zu 4 mm generiert. Im Jahr 2014 verwendeten Lancaster et al. [93] ein leicht abgewandeltes 3D-Kultursystem zur Generierung von ZOs. Dazu wurden die hESCs zur schnelleren EB-Aggregation in U-förmige 96-Well Platten in ein Minimalmedium ausgesät. An d15 wurden die neuroepitheliale Gewebe wiederum auf einen Orbitalschüttler überführt und durch die Verwendung unterschiedlicher Differenzierungsmedien weiter zu ZOs expandiert. Die Zugabe

von Matrigel™ zum Differenzierungsmedium als Rekonstruktion der Basalmembran ab d40 der Kultivierung führte zur Ausbildung charakteristischer, kortikaler Strukturen, einschließlich einer kortikalen Platte. Darüber hinaus zeigten Lancaster et al., 2017 [15], dass die Keimblatt-Identität trotz der ungerichteten Differenzierung durch die Kultivierung der hESCs auf mikrostrukturierten Substraten beeinflusst werden kann. Hierfür nutzten sie Fasermikrofilamente des resorbierbaren Copolymers *Poly(lactid-co-glycolid)* (PLGA) als schwimmendes Gerüst zur Generierung langgestreckter EBs. Die daraus erzeugten 5 - 6 mm großen ZOs wiesen eine reduzierte Variabilität sowie ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis und damit verbunden eine erhöhte Neuroektoderm-Bildung auf. Weiterhin konnte, durch die Zugabe des WNT-Aktivators CHIR9999021 (CHIR) an den Tagen 13 - 16 der neuronalen Differenzierung, eine erhöhte Generierung von kortikalem Neuroepithel erzielt werden. Die kombinierte Verwendung von Mikrosubstraten und CHIR führte letztendlich zu einer konstanteren Ausbildung von dorsalen Vorderhirnstrukturen, welche mittels des Vorderhirnmarkers *forkhead box protein G1* (FOXP1) immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz zu Tiermodellen wiesen die von Lancaster et al., 2017 generierten ZOs somit Schlüsselmerkmale der humanen *in vivo* Organogenese auf. Dazu gehörten u.a. auch eine dem sich entwickelnden, menschlichen Gehirns in frühen Stadien ähnliche, strukturelle kortikale Organisation, inklusive einer in der SVZ lokalisierten RG-Population. Zudem wurden neuronale Migration und die Generierung verschiedener Neuronen-Subtypen nachgewiesen, welche sich, ähnlich den Prozessen *in vivo*, temporal und räumlich organisierten. Das Hauptaugenmerk bei der Generierung von ZOs liegt bei den beschriebenen Protokollen somit in der Fähigkeit der hESCs zur intrinsisch-gesteuerten, spontanen, neuronalen Selbstorganisation bei minimalen extrinsischen Einflüssen. Durch die Wahl der Medien und Supplemente liegt der Fokus zudem in der Generierung von neuronalen Progenitorzellen und Neuronen. Dazu erlaubt die Verwendung eines Orbitalshakers bzw. eines Bioreaktors, durch die verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffaufnahme, eine Kultivierungsdauer von bis zu einem Jahr [93]. Zusammenfassend weisen Organoide charakteristische Merkmale der humanen Ontogenese, wie regionale Hirnidentitäten inklusive regionsspezifischer Zelltypen auf und bieten somit die Möglichkeit, die humane Hirnentwicklung sowie die Neurogenese zu modellieren (s. Abbildung 6). Zur Generierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten ZOs diente ein optimiertes Differenzierungsprotokoll nach Lancaster et al., 2017, welches unter Absatz 4.2.2 detailliert beschrieben wird.

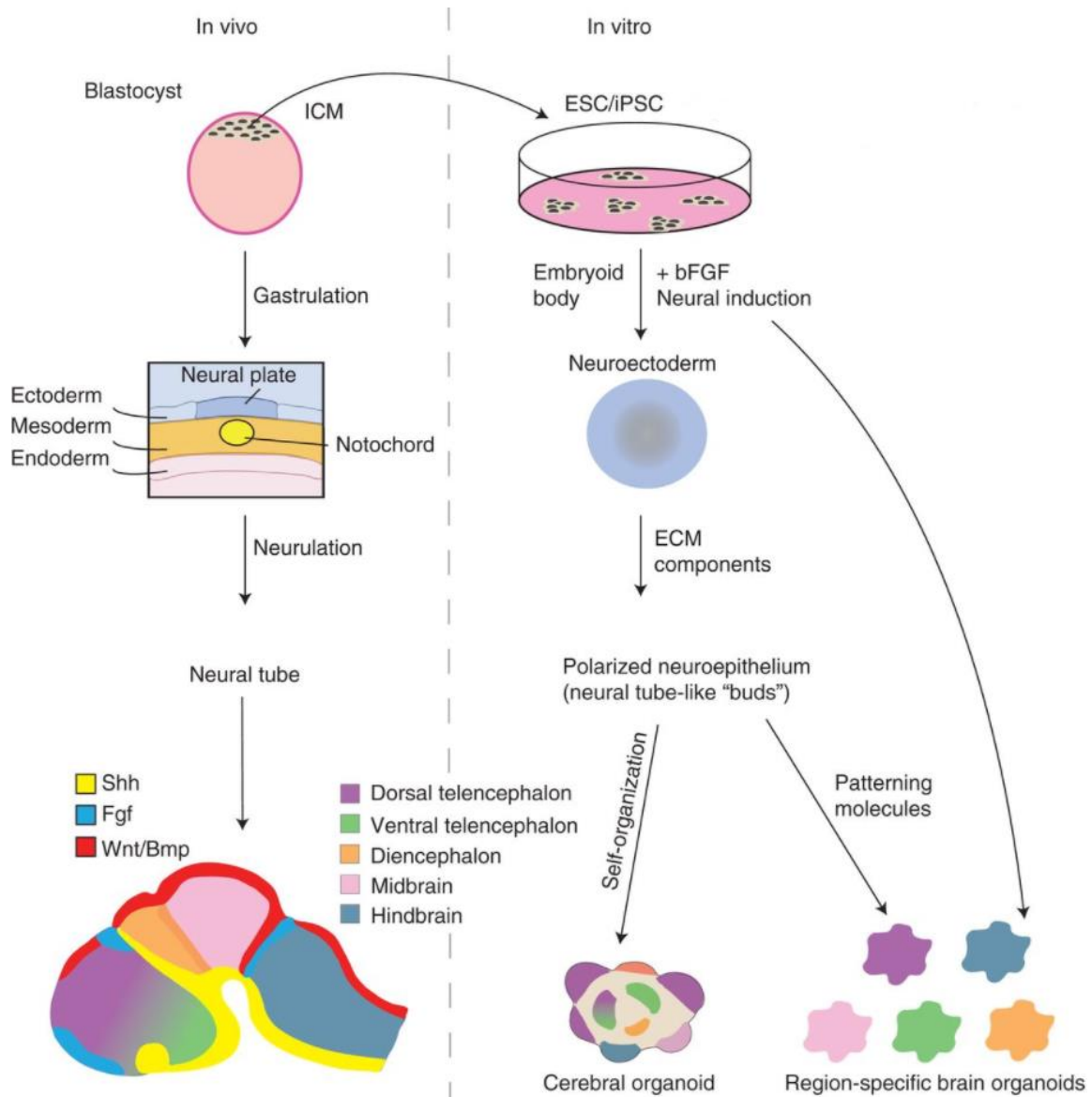


Abbildung 6: Vergleichende Abläufe der Hirnentwicklung *in vivo* vs. *in vitro*. *In vivo* entwickelt sich das humane Gehirn unter dem Einfluss bestimmter Signalwege aus der ektodermal-abgeleiteten Neuralplatte, welche sich in das Neuralrohr auffaltet, in verschiedene Hirnregionen. *In vitro* werden aus EBs neuroektodermale Zellen generiert, welche nach der Zugabe von Matrigel™ in neuroepitheliale Zellen differenzieren und durch Selbstorganisation und Differenzierung zerebrale Organoide bilden. Durch eine externe Zugabe bestimmter Signalmoleküle können, durch eine gerichtete Differenzierung, Organoide bestimmter Hirnregionen generiert werden. Modifiziert nach [94].

2.5 Effekte ionisierender Strahlung auf das humane Gehirn - Stand der Forschung

Das heutige Wissen über die gesundheitlichen Folgen von IR auf das humane Gehirn basiert größtenteils auf den Ergebnissen epidemiologischer Studien *in utero* exponierter Atombomben-Überlebender [95] sowie auf Nachverfolgungsstudien von Hirntumorpatienten, die einer kranialen Strahlentherapie unterzogen wurden [96, 97]. Dabei zeigten die Betroffenen übereinstimmend neurokognitive Defizite, die sich u.a. in einer verringerten Intelligenz-, Aufmerksamkeits- und Gedächtnisleistung widerspiegelten [98]. Da der Zugang zu humanem Hirngewebe als Forschungsgrundlage sehr limitiert ist und es ethisch nicht vertretbar ist, Strahleneffekte und deren Mechanismen im menschlichen Organismus zu untersuchen, werden zur Analyse von Strahleneffekten in der Regel Zell- und Tiermodelle verwendet. Im Folgenden wird ein Überblick über bereits durchgeführte *in vitro* und *in vivo* Studien gegeben, die sich hauptsächlich auf die Effekte von IR auf die hippocampale Neurogenese fokussierten. Dabei wird zunächst auf die Effekte von Röntgenstrahlung und anschließend auf die Wirkung von Partikelstrahlen eingegangen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst der Einfluss von Photonen (Röntgenstrahlung), als Referenz zu Partikelstrahlen, auf die neurale Entwicklung der ZOs untersucht werden. Die Auswirkung einer Photonenbestrahlung ist von besonderem Interesse, da die Röntgendiagnostik die häufigste Anwendung von IR in der Medizin und die Standardmodalität zur Krebsbehandlung darstellt [99, 100]. *In vitro* Studien von Acharya et al., 2010 [101] mit humanen NSCs zeigten bereits, dass eine Photonenbestrahlung mit 1 - 5 Gy zu einer dosisabhängigen, verminderten Proliferation und Differenzierungsfähigkeit der NSCs führte. Darüber hinaus wurde nach der Exposition mit 5 Gy innerhalb von 48 h p. IR eine strahleninduzierte Apoptose nachgewiesen. Studien von Isono et al., 2015 [102] und Yokota et al., 2020 [103] zeigten, dass eine Exposition von humanen NSCs im Dosisbereich von 0,5 - 10 Gy Photonen zu einer dosisabhängigen Apoptose führte, welche als Grund für die beobachtete, Wachstumsinhibierung angenommen wurde. Die Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung von *in vitro* kultivierten, murinen Neuronen führte zudem zu einer Abnahme der exzitatorischen Synapsendichte und damit einhergehenden Veränderungen in der synaptischen Plastizität [104]. *In vivo* Studien an Nagetieren zeigten außerdem, dass eine Exposition mit ≥ 10 Gy zu einer strahleninduzierten Inflammation mit nachfolgender Demyelinisierung und Nekrose der weißen Substanz führte. Zusätzlich wurde eine dosisabhängige Reduzierung der hippocampalen Neurogenese in Form einer inhibierten

Proliferation von NPCs und folglich einer verringerten Generierung unreifer Neurone und Gliazellen in der SGZ beobachtet, welche mit Lern- und Gedächtnisstörungen einherging [105–110]. Diese Verhaltensauffälligkeiten und neurologischen Defizite können somit die strahleninduzierten, kognitiven Beeinträchtigungen widerspiegeln, wie sie auch bei Patienten auftreten, die einer kranialen Bestrahlung unterzogen wurden. Zusammenfassend indizieren die beschriebenen Studien bereits ab therapeutisch-relevanten Dosen von 1 - 2 Gy, wie sie bei der fraktionierten Strahlentherapie angewandt werden [111], einen negativen Effekt von IR auf die Proliferation, Viabilität und Differenzierungsfähigkeit von NSCs und eine damit einhergehende gestörte hippocampale Neurogenese. Damit verifizieren diese Studien die hohe Strahlenempfindlichkeit von neuralen Stamm- und Progenitorzellen, welche insbesondere in den strahlensensitiven Stadien der frühen Neurogenese aufzufinden sind. Dies stellt auch den Grund dar, warum Strahlentherapien bei Kindern unter 3 Jahren, bei denen die Hirnentwicklung noch nicht vollends abgeschlossen ist, i.d.R. vermieden werden [6, 112, 113]. Die Bestrahlung von Neuronen mit ≥ 10 Gy IR bedingt zudem Veränderungen in der synaptischen Plastizität, welche im Nagetiermodell zu der Ausbildung funktionaler, neurologischer Defizite beiträgt [104–110]. Zusätzlich führt die Bestrahlung von Gliazellen zu einer chronischen Neuroinflammation und Demyelinisierung und letztendlich zu degenerativen Veränderungen der weißen Substanz.

Mögliche Effekte einer Bestrahlung mit Protonen und Kohlenstoffionen sollen ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, da die Partikeltherapie zunehmend bei der Behandlung von Tumoren eingesetzt wird [114]. *In vitro* Studien zeigten, dass die Exposition mit 0,5 - 10 Gy Kohlenstoffionen gegenüber den Kontrollen zu einer verminderten Proliferation humaner NSCs sowie zu einer dosisabhängigen Induktion der Apoptose führte [102, 103, 115]. Darüber hinaus hatte die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen einen stärkeren Effekt auf die NSCs im Vergleich zur Röntgenbestrahlung, wodurch das therapeutische Potenzial von Partikelstrahlen bzw. Schwerionen zur Krebsbehandlung verdeutlicht wird. Jüngste Nagetierstudien von Sorokina et al., 2021 [116] zeigten, dass eine Bestrahlung von 0,7 Gy Kohlenstoffionen zu Langzeiteffekten führten, die 2 - 3 Monate nach der Bestrahlung auftraten. Diese äußerten sich u.a. in einem veränderten Verhaltensmuster und einer Verschlechterung der hippocampalen Gedächtnisleistung. Zusätzlich wurde eine Reduktion der Zelldichte im dorsalen Hippocampus der bestrahlten Mäuse festgestellt. Somit verdeutlichen diese Studien, dass bereits eine Bestrahlung mit geringen Dosen von

Kohlenstoffionen neurokognitive Defizite im Mausmodell bedingt. *In vivo* Studien an jungen Mäusen, die mit Protonen im Dosisbereich von 0,1 - 1 Gy exponiert wurden, belegten die Reduktion der hippocampalen Zellproliferation, der Neurogenese sowie der synaptischen Plastizität, welche zu der Ausbildung neurokognitiver Störungen beitrug [117, 118]. Neben den bereits genannten Strahleneffekten stellt die sogenannte Radionekrose bzw. Hirnekrose einen weiteren potenziellen, irreversiblen Langzeiteffekt der zerebralen Strahlentherapie dar. Sie tritt in der Regel innerhalb von 6 - 24 Monaten nach der Therapie auf und geht mit einer Entzündungsreaktion des gesunden Hirngewebes, Gefäßschädigungen, Ödembildung und der Ausbildung neurologischer Defizite einher [119–121]. Die Inzidenz zur Ausbildung der Hirnekrose hängt u.a. von der Gesamtdosis, dem Alter zum Zeitpunkt der Bestrahlung sowie von dem bestrahlten Hirnvolumen ab [122]. Studien von Kralik et al., 2015 [123] zeigten zudem, dass die Inzidenz zerebraler Radionekrosen in Folge einer Protonenbestrahlung von pädiatrischen Hirntumorpatienten mit 31 % deutlich höher lag als die für die Photonenbestrahlung mit 5 %. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Chemotherapeutika einen wesentlichen Risikofaktor im Zusammenhang mit der Ausbildung der Strahlennekrose bei pädiatrischen Patienten darstellt. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Ausbildung von Radionekrosen sind bisher jedoch weitgehend unerforscht. Die beschriebenen Studien verdeutlichen somit die komplexen und dynamischen Effekte von IR auf die verschiedenen Zelltypen des ZNS, einschließlich neuraler Stamm- und Vorläuferzellen sowie Neurone und Gliazellen, welche zu diversen Hirnschäden führen und somit zu der Ausbildung vielfältiger neurodegenerativer Krankheiten beitragen können. Des Weiteren zeigen die Studien auf, dass die Entstehung von Langzeiteffekten in Kognition und Neurodegeneration weniger gut untersucht sind als akute Strahleneffekte. Diese Darlegungen begründen die Dringlichkeit der Untersuchung der Auswirkungen von IR auf die Zelltypen des ZNS in einem adäquaten, realistischen Modellsystem. Dazu könnten die im vorherigen Absatz beschriebenen ZOs dienen. Da Organoide ein sehr junges, innovatives Forschungsfeld darstellen, liegt zu der Bestrahlung von humanen ZOs bisher nur eine Studie vor, welche die Effekte von Röntgenstrahlung auf iPSC-induzierte ZOs beschreibt. Diese Studie deutet darauf hin, dass, nach einer Einzelbestrahlung mit 2 Gy, neurale Vorläuferzellen eine effizientere Reparatur-Kinetik von Doppelstrangbrüchen aufweisen als reife Neurone [124] und verdeutlicht somit das Potential von ZOs als humanes *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung von Strahleneffekten in einer klinisch relevanten Mikroumgebung.

3 ZIELSETZUNG

Strahleninduzierte, neurotoxische Kurz- und Langzeitschäden vermindern die Lebensqualität von Patienten, die einer kranialen Bestrahlung unterzogen wurden, drastisch, weshalb eine detaillierte Risikoabschätzung dringend erforderlich ist. Studien an 2D-Zell- und Tiermodellen belegten bereits Strahleneffekte auf die Viabilität und Proliferation von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen sowie auf die hippocampale Neurogenese, die wiederum den Beeinträchtigungen der kognitiven Fähigkeiten zugrunde liegen können. Die genaue Wirkweise von IR auf das humane Gehirn ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Anhand eines reproduzierbaren ZO-Modells nach Lancaster et al., 2017 soll die Wirkung verschiedener Dosen von IR hinsichtlich morphologischer Veränderungen und des strahleninduzierten Zelltods sowie anhand von Expressionsanalysen neuraler Marker (mRNA- und Proteinanalysen) untersucht werden, um die molekularen Wirkweisen verschiedener Strahlenmodalitäten aufzuklären. Dabei sollen, neben der in der Tumorthherapie routinemäßig angewandten Röntgenstrahlung, sowohl Kohlenstoffionen als auch Protonenstrahlen eingesetzt werden, da zu den Folgen einer Exposition mit Partikelstrahlen nur wenige Studien vorliegen.

4 MATERIALIEN UND METHODEN

Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Versuche wurden im Zeitraum von April 2018 bis Juli 2021 in den gentechnischen S1-Laboren der Abteilung *Biophysik - Stem Cell Differentiation and Cytogenetics Group* am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt durchgeführt. Alle Arbeiten mit den hESCs wurden im Einklang mit dem deutschen Stammzellgesetz (§11 StZG) und im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes *Brain Radiation Assay* unter Genehmigung nach §6 des Stammzellgesetzes getätigt (Aktenzeichen 3.04.02/0125 und 3.04.02/0125-E01). Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte sowie die dazu benötigten Materialien beschrieben.

4.1 Materialien

Die im Anhang unter Ziffer V. Materialverzeichnis beigefügten Tabellen enthalten eine Auflistung aller für die Zellkultur notwendigen Geräte, Materialien, Lösungen und Reagenzien, welche vor der Verwendung durch Autoklavieren, Hitzesterilisation oder Filtration sterilisiert oder bereits steril vom Hersteller bezogen wurden. Reinstwasser (H_2O_{reinst}) wurde mittels des Wasseraufbereitungssystems *Purelab®Flex* (ELGA) gewonnen.

4.2 Zellbiologische Methoden

Als Ausgangszellen für die ZO-Generierung dienten von *WiCell Research Institute Inc.* (Wisconsin) kommerziell erworbene, *feeder*-frei kultivierte hESCs der Linie WA09/H9 in Passage (P)23. Diese Zelllinie wurde durch Thomson et al., 1998 [67] generiert und enthält einen euploiden XX-Karyotyp. Im Folgenden wird der Begriff „H9“ synonym verwendet. Kultiviert wurden die hESCs auf 10 µg/mL Laminin-521 in 2 mL mTeSRTM1-Medium (s. Tabelle 1). Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂, atmosphärischem O₂-Gehalt sowie einer relativen Luftfeuchte von 95 %. Ein Medienwechsel mit 2 mL mTeSRTM1-Medium erfolgte täglich. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Versuchsschritte bei Raumtemperatur (RT) ausgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des mTeSRTM1-Mediums.

mTeSRTM1-Medium:	Finale Konzentration:
mTeSR TM 1 Basalmedium	
+ mTeSR TM 1 5X Supplement	1x
+ Penicillin / Streptomycin	50 U/mL, 50 µg/mL

4.2.1 Feeder-freie Kultivierung von hESCs

4.2.1.1 Beschichtung von Petrischalen mit Laminin-521

Im Zuge einer *feeder*-freien Kultivierung wurde am Vortag der Aussaat die Beschichtung der \varnothing 6 cm Petrischalen (PS) mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Laminin-521 vorgenommen. Daraufhin wurden die PS bis zum Gebrauch mit Parafilm abgedichtet und bei 4 °C gelagert. Vor der Nutzung wurden diese dann für 30 min bei RT inkubiert und das überschüssige Laminin vor Zugabe des Kultivierungsmediums abgenommen. Wurden die beschichteten PS erst am Tag der Aussaat vorbereitet, war vor der Zellaussaat eine Inkubation von mindestens 2 h bei 37 °C erforderlich.

4.2.1.2 Auftauen von kryokonservierten hESCs

Zur Aussaat der in 1,8 mL Kryomedium (90 % FCS + 10 % DMSO) konservierten hESCs wurden diese für 1 - 2 min im Wasserbad aufgetaut und in 8 mL kaltes mTeSRTM1-Medium transferiert. Daraufhin erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 200 g. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen in 2 mL mTeSRTM1-Medium resuspendiert und nach einer Lebendzellzählung jeweils $0,21 \times 10^6$ Zellen pro PS in 2 mL mTeSRTM1-Medium + 5 μM *Rho-associated protein kinase* (ROCK)-Inhibitor ausgesät. Anschließend erfolgte die Inkubation unter Standardbedingungen und alle 24 h ein Medienwechsel mit 2 mL mTeSRTM1-Medium.

4.2.1.3 Passage von hESCs

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte zur enzymatischen Passage der *feeder*-frei kultivierten hESCs (s. Abbildung 7) wurden zum Zellerhalt und zur Übertragung aller pluripotenten Kolonien zur Generierung von EBs (s. 4.2.2) wöchentlich durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 2 mL Phosphat-gepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS-/-) gewaschen. Anschließend wurden zur gezielten, nicht-enzymatischen Ablösung und Selektion der pluripotenten hESCs pro PS jeweils 200 μL ReLeSRTM hinzugegeben, die PS zur gleichmäßigen Verteilung des Reagenzes leicht geschwenkt und das ReLeSRTM Reagenz wieder abgenommen. Zum Ablösen der Zellen folgte ein Inkubationsschritt von max. 3 min bei 37 °C. Daraufhin wurden die Zellen in 2 mL mTeSRTM1-Medium pro PS aufgenommen und in ein 5 mL Eppendorfgefäß transferiert. Abschließend wurden nach einer Lebendzellzählung $0,21 \times 10^6$ Zellen pro \varnothing 6 cm PS in 2 mL mTeSRTM1-Medium ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Alternativ können die Zellen bei Nichtgebrauch in einer Dichte von 1×10^6 Zellen / 1,8 mL Kryomedium zunächst über Nacht bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff bis zur Nutzung eingefroren werden.

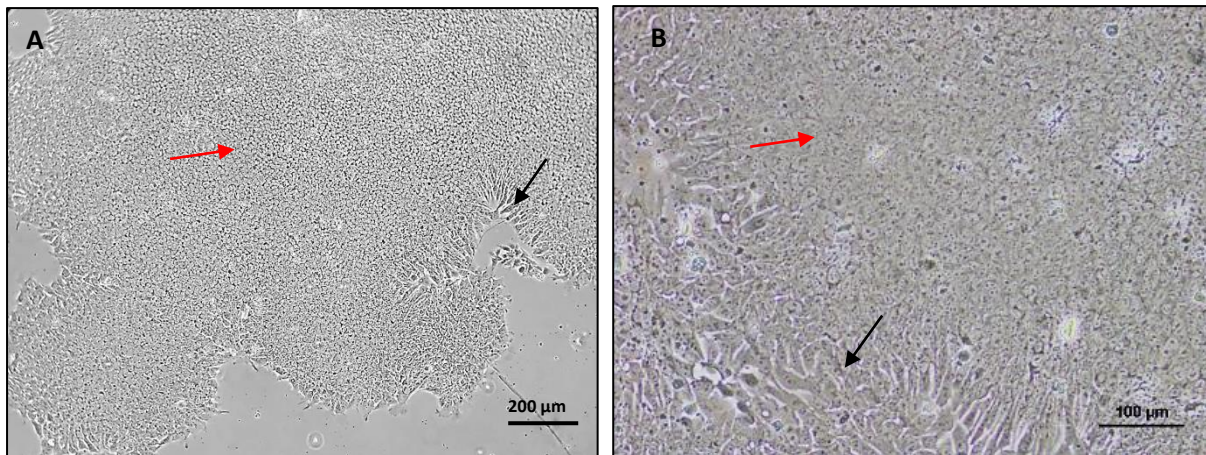


Abbildung 7: **A:** H9-Kolonien (P50) nach einwöchiger Kultivierung auf 10 µg/mL Laminin-521 in 2 mL mTeSR™1-Medium. Maßstab: 200 µm. **B:** H9-Kolonien (P49) nach einwöchiger Kultivierung auf 10 µg/mL Laminin-521 in 2 mL mTeSR™1-Medium. Maßstab: 100 µm. Undifferenzierte hESCs (**rote Pfeile**) werden bei der ReLeSR™- Passage übertragen, wohingegen differenzierte Zellen (**schwarze Pfeile**) exkludiert werden.

4.2.2 Generierung von ZOs

Die stufenweise Generierung der ZOs orientierte sich an dem Protokoll von Lancaster et al., 2017 und wird im Folgenden näher beschrieben. Zur Herstellung der PLGA-Mikrofilamente, welche den hESCs als Stützskelett dienen, wurde sechsfädiges, chirurgisches und resorbierbares VICRYL® Nahtmaterial genutzt. Dieses wurde mit Hilfe einer sterilen Federschere in ca. 0,5 - 1 mm lange Stücke geschnitten und in 4 mL *Embryoid Body Media* (EBM, s. Tabelle 2) transferiert. Durch Vortexen wurden die Faserstücke anschließend in Filamente (Einzelfäden) mit einem Durchmesser von etwa 15 µm aufgelöst. Diese wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt. Zur Optimierung der Adhärenz an den ausgesäten Mikrofilamenten wurden die zur EB-Generierung verwendeten, 96-Well Platten vor der Zellaussaat mit 75 µL Anti-Adhärenz-Lösung (StemCell™) beschichtet, da die Zellen ansonsten an den Böden der Wells adhärten und nicht aggregierten (s. Abbildung 59, S. 129 im Anhang). Dann erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 200 g und ein Waschgang mit 75 µL PBS/- pro Well. Daraufhin wurden in jedes Well ~ 10 Mikrofilamente unter Zuhilfenahme einer 200 µL Pipette eingesät und bis zur Zellaussaat bei RT gelagert. Zur Herstellung der EBs aus hESCs wurden diese, wie bereits unter Absatz 4.2.1.3 beschrieben, nicht-enzymatisch passagiert und pro 96-Well 1,8 x 10⁴ Zellen in 150 µL vorgewärmtes EBM ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen nach der Inkubation mit ReLeSR™ anstatt in 2 mL mTeSR™1- Medium in 2 mL EBM aufgenommen wurden. Die Aussaat der Zellen wurde als d0 und somit als Beginn der ZO-Generierung definiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des EBM.

EBM:	Finale Konzentration:
DMEM/F-12 +HEPES	
+ KnockOut™ Serum Replacement	20 %
+ FCS	3 %
+ Glutamin	1 %
+ NEA	1 %
+ β -Mercaptoethanol	0,1 mM
+ bFGF	4 ng/mL
+ ROCK-Inhibitor	50 μ M

An d3 wurde ein halber Medienwechsel durchgeführt, indem jeweils 75 μ L des alten Mediums durch 75 μ L frisches EBM ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren ersetzt wurden. An d6 erfolgte der Start der neuralen Induktion. Dazu wurden in die Wells einer 24-Well Platte 500 μ L vorgewärmtes *Neural Induction Media* (NIM, s. Tabelle 3) vorgelegt. Der Transfer der einzelnen ZO's in je ein Well wurde anschließend mit Hilfe einer schräg angeschnittenen 200 μ L Pipettenspitze vorgenommen. An den Tagen 7 und 9 wurden jeweils 500 μ L frisches NIM pro Well zugegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des NIM.

NIM:	Finale Konzentration:
DMEM/F-12 +HEPES	
+ N2-Supplement	1 %
+ Glutamin	1 %
+ NEA	1 %
+ Heparin	1 μ g/mL

An d11 wurde das neuroektodermale Gewebe in Matrigel™ eingebettet. Dazu wurden kommerziell erworbene *Organoid Embedding Sheets* (StemCell™) verwendet. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Einbetthilfen am Vortag für 1 min in 80 % EtOH sterilisiert und anschließend für 5 min mit H₂O_{reinst} gewaschen. Am nächsten Tag wurde mit einer schräg angeschnittenen 200 μ L Pipettenspitze je ein Aggregat neuroepithelialen Gewebes in eine Mulde der Einbetthilfe überführt und das überschüssige Medium mittels einer 100 μ L Pipette durch vorsichtiges Absaugen der Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurden zügig, um ein Austrocknen der Gewebe zu verhindern, 30 μ L Matrigel™ zu jedem Aggregat hinzugeben und dieses mittig positioniert (s. Abbildung 8).

Daraufhin erfolgte, zur Polymerisation des Matrigels, eine Inkubation von 20 min bei 37 °C. Abschließend wurden jeweils 10 - 12 ZO-Droplets in 5 mL NIM + 50 µL Penicillin / Streptomycin in eine Ø 6 cm Suspensions-PS überführt und im Brutschrank bei Standardbedingungen inkubiert. An den Tagen 13, 15 und 17 erfolgte jeweils ein Medienwechsel mit 5 mL *Improved Differentiation Media* - vitamin A (IDM-A, s. Tabelle 4) pro PS. Das IDM-A wurde dabei an d13 - d15 zusätzlich mit 3 µM CHIR99021 supplementiert.

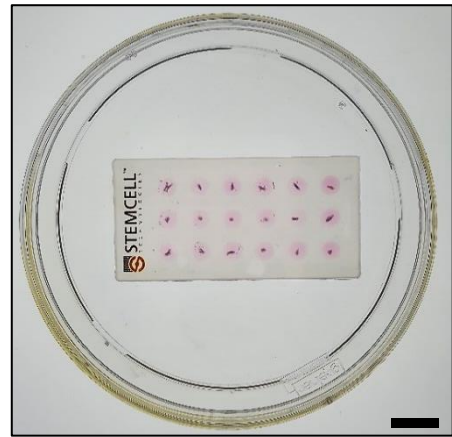


Abbildung 8: Organoid Embedding Sheets mit in Matrigel eingebetteten ZOs. Maßstab: 1 cm.

Tabelle 4: Zusammensetzung des IDM-A.

IDM-A:	Finale Konzentration:
DMEM/F-12 +HEPES	
Neurobasal® Medium	
+ N2-Supplement	0,5 %
+ B-27™ Supplement (- Vitamin A)	2 %
+ Insulin-Lösung	0,25 %
+ β-Mercaptoethanol	50 µM
+ Glutamin	1 %
+ NEA	0,5 %
+ Penicillin / Streptomycin	1 %
+ CHIR99021 (d13-d16)	3 µM

An d18 wurden die ZOs mittels einer gekürzten 1000 µL Pipettenspitze in T25-Suspensionsflaschen in je 10 mL IDM-A auf den Orbitalschüttler (Orbit: 1,9 cm, 62 rpm), welcher im Inkubator platziert wurde, überführt. Durch die Verwendung eines Orbitalschüttlers mit korrekter, moderater Geschwindigkeit wird eine verbesserte Nährstoff- und Sauerstoffversorgung ermöglicht, ohne nachteiligen Scherstress zu verursachen. Eine inkorrekte Einstellung des Schüttlers führt zu einer Nichtausbildung der kortikalen Platte [15]. Ein Medienwechsel mit 10 mL vorgewärmten Medium erfolgte ab der Überführung auf den Orbitalschüttler alle 3 - 4 Tage. 48 h nach der Überführung auf den Orbitalschüttler (d20) wurde das IDM-A durch 10 mL vorgewärmtes *Improved Differentiation Media + vitamin A* (IDM+A, s. Tabelle 5) ersetzt. Ab d40 wurde das IDM+A zusätzlich mit 20 µL/mL Matrigel™ versetzt, indem vor dem Erwärmen des Mediums die benötigte Menge an flüssigem Matrigel™ vollständig im kalten Medium gelöst wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung des IDM+A.

IDM+A:	Finale Konzentration:
DMEM/F-12 +HEPES	
Neurobasal® Medium	
+ N2-Supplement	0,5 %
+ B-27™ Supplement (+ Vitamin A)	2 %
+ Insulin-Lösung	0,25 %
+ β-Mercaptoethanol	50 µM
+ Glutamin	1 %
+ NEAA	0,5 %
+ Penicillin / Streptomycin	1 %
+ Vitamin C	0,4 mM
+ HEPES	1,49 g./500 mL
+ Matrigel™ (ab d40)	1 mL/50 mL

Der zeitliche Ablauf der ZO-Generierung ist in der nachfolgenden Abbildung 9 noch einmal schematisch dargestellt:

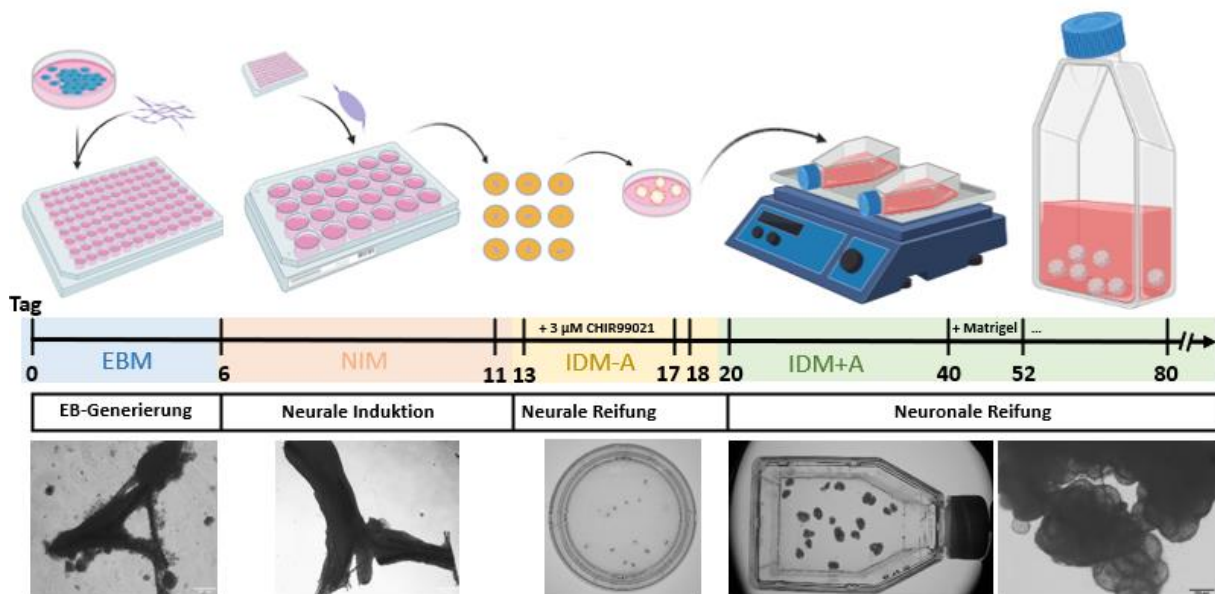


Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der ZO-Generierung. Zu Beginn wurden aus einer hESC-Einzelsuspension EBs generiert, die an d6 zur Induktion der neuroektodermalen Differenzierung in neurales Selektionsmedium (NIM) überführt wurden. Anschließend wurde das neuroektodermale Gewebe zur neuroepithelialen Differenzierung an d11 in Matrigel-Droplets eingebettet und an d13 in IDM-A überführt. Zur Expansion des Neuroepithels wurden die ZOs an d18 in 10 mL IDM-A in T25-Suspensionsflaschen auf einen Orbitalschüttler transferiert und ab d20 zur weiteren neuronalen Reifung in 10 mL IDM+A kultiviert. Ab d40 wurde das IDM+A zur Ausbildung der kortikalen Platte zusätzlich mit 20 µL/mL Matrigel™ angereichert. Erstellt über BioRender.com.

4.2.3 Bestrahlung von ZOs

Die Bestrahlung der ZOs, zur Untersuchung der Wirksamkeit von Röntgenstrahlung und Partikelstrahlen, erfolgte zum einen an d20, da dies dem Zeitpunkt der Stammzellproliferation bzw. -migration innerhalb der embryonalen Hirnentwicklung entspricht (s. Absatz 5.2.2). Zum anderen wurden ZOs an d80 der Kultivierung, welcher dem Zeitpunkt der Neuro- und frühen Gliogenese entspricht (s. Absatz 5.2.2), exponiert. Aufgrund der Strahlensensitivität naiver, undifferenzierter Zellen werden nach der Bestrahlung an d20 eventuell auftretende Strahleneffekte bereits bei niedrigeren Dosen erwartet, weswegen an d20 im Dosisbereich von 0,5 - 8 Gy und an d80 mit Dosen von 3 - 15 Gy bestrahlt wurde. Die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen an d20 erfolgte, aufgrund der höheren RBW, zudem mit niedrigeren Dosen (0,5 - 4 Gy) als die Röntgenbestrahlung (1 - 8 Gy). Die Bestrahlung der ZOs wurde in T25-Suspensionsflaschen bei RT vorgenommen. Die Kontrollen (0 Gy) wurden *sham*-bestrahlt. Pro Experiment wurde pro Dosis eine T25-Suspensionsflaschen (5 - 10 ZOs) exponiert. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde ein Medienwechsel mit 10 mL vorgewärmten IDM+A durchgeführt und die ZOs weiter nach Protokoll kultiviert. Analysiert wurden die bestrahlten ZOs nach einer Kultivierungsdauer von 20 - 46 Tagen hinsichtlich der Größenzunahme und morphologischer Veränderungen sowie der Gen- und Proteinexpression verschiedener neuraler Marker (s. Abbildung 10). Darüber hinaus wurde 24 h p. IR eine Quantifizierung des strahleninduzierten, programmierten Zelltods (Apoptose) durch die Bestimmung der Caspase3/7-Expression (s. Absatz 4.3.3) durchgeführt.

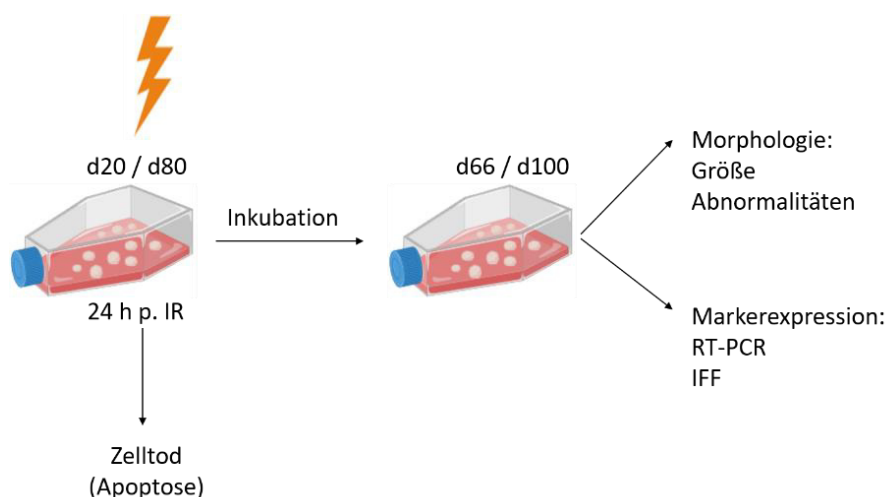


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Analyseverfahrens nach Bestrahlung der ZOs. IFF: Immunfluoreszenzfärbungen. RT-PCR: Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Erstellt über BioRender.com.

4.2.3.1 Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (X-IR) als Referenz zu Partikelstrahlen erfolgte an der GSI mittels der Röntgenröhre MXR 320/26 von Comet (s. Abbildung 11A). Die Röntgenröhre wurde mit einer Röhrenspannung von 250 kV und einer Stromstärke von 16 mA betrieben. Bestrahlt wurde mit einem Abstand von 27 cm zur Strahlenquelle und mit einer Dosisrate von $\sim 2,7$ Gy/min. Die ZOs wurden entweder an d20 mit 1, 2 und 8 Gy oder an d80 mit 3, 10 und 15 Gy bestrahlt.

4.2.3.2 Partikelbestrahlung

Die Bestrahlung der ZOs an d20 mit Kohlenstoffionen (^{12}C -IR) erfolgte im Rahmen der FAIR-Phase 0 am Schwerionen-Synchrotron SIS18 der GSI (s. Abbildung 11B). Die Bestrahlung mit den Dosen von 0,5, 1 und 4 Gy erfolgte in einem 40 mm SOBP (LET: 50 - 105 keV/ μm). Die Dauer des Bestrahlungsverfahrens, inklusive Vor- und Nachbereitung der Proben, betrug im Mittel $\sim 1,5$ h. Die Exposition der ZOs mit Protonen (^1H -IR) erfolgte am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT) mit den Dosen von 3, 10 und 15 Gy (s. Abbildung 11C). Bestrahlt wurden die Proben an d80 entweder in einem 30 mm SOBP (dem Bestrahlungsfeld eines Tumors entsprechend, LET: 2,5 - 8,9 keV/ μm) oder in der Plateauphase (PL, entsprechend dem Normalgewebe, LET: 0,9 - 1,5 keV/ μm). Die Dauer des Bestrahlungsverfahrens, einschließlich des Transports, belief sich auf 3 h.

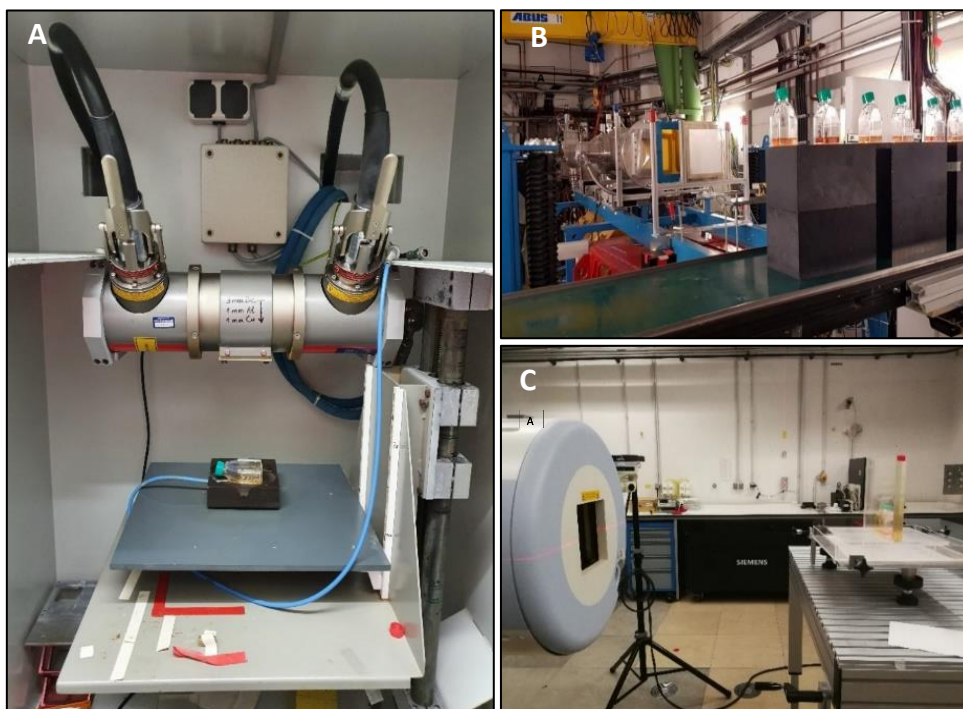


Abbildung 11: A: X-IR der ZOs mittels der Röntgenröhre MXR 320/26. B: ^{12}C -IR der ZOs am SIS18 an der GSI. C: ^1H -IR der ZOs am HIT in Heidelberg.

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Morphologische Charakterisierung von ZOs

4.3.1.1 Größenbestimmung

Zur Bestimmung des Größenwachstums der ZOs wurden unmittelbar vor der Exposition mit IR sowie an den gewählten Endpunkten mit einer am Institut entworfenen „Trichterkamera“ (s. Abbildung 12) Fotos der ZOs in T25-Suspensionsflaschen aufgenommen. Für die Aufnahmen der Bilder wurde eine Digitalkamera (DSC-W220, Sony) verwendet. Die grafische Auftragung der mit der Software *ImageJ* ermittelten Fläche der ZOs erfolgte anschließend mit Hilfe der Software *OriginLab*® 2019.

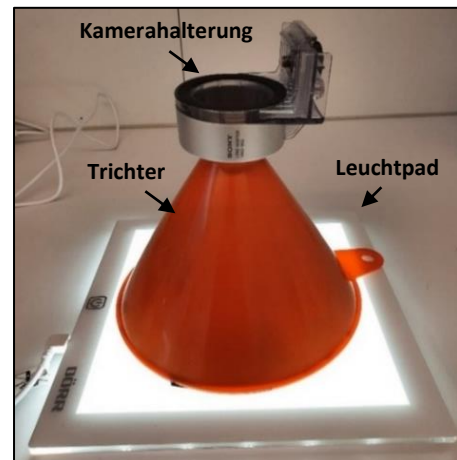


Abbildung 12: Trichterkamera zur Aufnahme der ZOs in T25-Suspensionsflaschen.

4.3.1.2 Kavitäten-Bildung

Zur qualitativen Analyse der Kavitäten-Bildung der ZOs wurde das Stereomikroskop SMZ-171-TLED (Motic) genutzt. Die grafische, prozentuale Auftragung der ausgezählten Kavitäten p. IR wurde anschließend mit der Software *OriginLab*® 2019 vorgenommen.

4.3.1.3 Tinten-Test zur Überprüfung der Barrierefunktion

Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit der p. IR ausgebildeten Kavitäten zu den im Artikel von Pellegrini et al., 2020 [86] beschriebenen Choroid Plexus-Organoiden, wurden die ausgebildeten Kavitäten hinsichtlich ihrer epithelialen Barriere-Eigenschaften untersucht. Zur Überprüfung der Barrierefunktion wurde ein Tinten-Test (s. Abbildung 13) durchgeführt. Hierzu wurden unter dem Mikroskop vorsichtig 6 Tropfen dunkelblaue Schreibtinte zu dem Kultivierungsmedium pipettiert, um die Permeabilität der Kavitäten zu überprüfen. Der Vorgang wurde dabei mit einer Bildfrequenz von 31,68 Bildern pro Sekunde mittels des Mikroskops Eclipse Ts2 (Nikon) videografisch festgehalten.

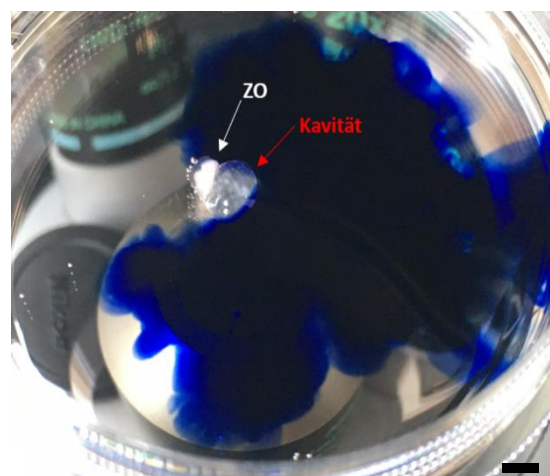


Abbildung 13: Experimentelle Durchführung des Tinten-Tests. Maßstab: 4 mm.

4.3.2 RNA-Isolierung und RT-PCR

Zur Isolierung der RNA an unterschiedlichen Tagen der Kultivierung wurden die zu untersuchenden Zellproben (je 3 - 5 ZOs) nach einem 5-minütigen Waschschrift mit PBS/- in 700 μL *QIAzol*[®] Lyse-Reagenz resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren. Zur anschließenden Analyse der Expression verschiedener Zelltypmarker innerhalb der generierten ZOs wurde eine Gesamt-RNA-Isolierung der Zelllysate, basierend auf einer Phenol-Chloroform-Extraktion und einer anschließenden Affinitätschromatographie mit Hilfe des *miRNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Zur abschließenden RNA-Eluierung wurden die Chromatographiesäulen mit jeweils 30 μL RNase-freiem Wasser versehen und für 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Die eluierten Proben wurden daraufhin auf Eis gelagert und die anschließende Konzentrationsmessung der isolierten RNA (1 μL /Probe) mittels des Nanophotometers *Colibri* vorgenommen. Bis zur Umschreibung in cDNA wurde die isolierte RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die anschließende cDNA-Synthese wurde mittels des *RevertAid RT Kit* von Life Technologies durchgeführt. Zur Umschreibung von 2 μg RNA wurden jeweils 9 μL des RT-PCR-Mastermix (s. Tabelle 6) sowie 2 μg der isolierten RNA mit Nuklease-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 μL in ein Eppendorfgefäß gemischt. Daraufhin wurden die Proben zur cDNA-Synthese im PCR *Thermocycler peqSTAR* zunächst für 5 min bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, für 60 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ und abschließend für 5 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermix.

<i>Random Hexamers</i>	1 μL
<i>5x Reaction Buffer</i>	4 μL
RIBO Lock RNase Inhibitor	1 μL
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	2 μL
<i>Reverse Transcriptase (RT)</i>	1 μL

Die anschließende Messung der relativen Expression der RNA erfolgte mittels einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) und mit Hilfe des *HOT FIREPol*[®] *EvaGreen*[®] *qPCR Mix Plus Kits* von Solis Biodyne. Dazu wurden jeweils 19 μL des qPCR-Mastermix (s. Tabelle 7) sowie 1 μL der transkribierten cDNA als Triplet in einer 96-Well Platte durch Verwendung des *QuantStudio*[™] 3 *Real-Time PCR Systems* und des in Tabelle 8 beschriebenen PCR-Programms analysiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des qPCR-Mastermix.

<i>Eva Green Stock</i>	4 μ L
Primer-Mix (<i>Forward und Reverse</i>)	2 μ L
Nuklease-freies H ₂ O	13 μ L

Tabelle 8: PCR-Programm.

Aktivierung der Polymerase	95 °C, 15 min	} 45 Zyklen
<i>Denaturation</i>	95 °C, 15 sek	
<i>Annealing</i>	60 - 65 °C, 20 sek	
<i>Elongation</i>	72 °C, 20 sek	

Die für die RT-PCR verwendeten *Primer* (s. Tabelle 19 im Anhang, S. 125) wurden mit der Software *Primer Express 3.0* designt und von der Firma Biomers.de bezogen. Diese wurden direkt nach Ankunft in 1x TE-Puffer gelöst und als Stammlösung in einer Konzentration von 100 μ M bis zur Nutzung bei -20 °C gelagert. Die anschließende Auswertung der RT-PCR erfolgte mit Hilfe der Software *QuantStudio™ Design & Analysis 1.4* unter Anwendung der relativen Standardkurvenmethode. Normalisiert wurde auf das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA. Als Kontrolle zur Expression der neuronalen Marker dienten fetale (FBr) und adulte (ABr) Gesamthirn-mRNA (s. Tabelle 19 im Anhang). Die grafische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der Software *GraphPad-Prism8™*.

4.3.3 Quantifizierung des strahleninduzierten Zelltods

Zur Ermittlung des Apoptose-Index nach Bestrahlung der ZOs wurde das *CellEvent™ Caspase-3/7 Reagent* Kit von Thermo Fisher Scientific hinsichtlich der Färbung von 3D-Geweben angepasst. Dazu wurden die ZOs 24 h p. IR in eine 24-Well-Platte überführt und für 5 min mit 2 mL PBS-/- gewaschen. Anschließend wurden die ZOs für 1h in 1 mL kaltem DMEM mit 2 Tropfen der Caspase-Lösung im Dunkeln inkubiert. Daraufhin folgten drei 5-minütige Waschschrte mit 2 mL PBS-/. Zur kombinierten Untersuchung des apoptotischen und nekrotischen Zelltods nach Bestrahlung wurde das *Apoptotic/Necrotic Cell Detection* Kit von PromoCell verwendet. Dazu wurden die ZOs zunächst in eine 24-Well-Platte überführt und für 5 min mit 2 mL PBS-/- gewaschen. Anschließend wurden die ZOs in 500 μ L 1X *Annexin Binding Buffer* und je 25 μ L der Farbstoffe *Fluorescein (FITC)-Annexin V* und *Ethidium homodimer III* (EtD-III) für 2 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die ZOs dreimal für je 5 min mit 2 mL des 1X *Annexin Binding Buffers* gewaschen. Nach dem Waschen der ZOs erfolgte eine

24-stündige Fixierung mit 3,7 % PFA bei 4 °C. Anschließend wurden die ZOs dreimal für je 5 min mit 2 mL PBS-/- gewaschen und über Nacht in 30 % Sucrose substituiert. Nach dem Einfrieren in 7,5 % Gelatine-10 % Sucrose und der Anfertigung der 10 µm dicken Kryoschnitte nach Absatz 4.3.4 erfolgte die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (4 min, RT). Anschließend wurden Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop getätigt und diese hinsichtlich der Fluoreszenzintensität mittels der Software *ImageJ* ausgewertet. Eine grafische Auftragung der Daten erfolgte anschließend unter Verwendung der Software *OriginLab*® 2019.

4.3.4 Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die ZOs nach Abnahme des Kultivierungsmediums zunächst mit PBS-/- gewaschen und mit 3,7 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden drei 5-minütige Waschschriffe mit PBS-/- durchgeführt. Anschließend wurden die ZOs für jeweils mindestens 4 h in einer aufsteigenden Sucrose-Reihe (s. Tabelle 9) bei 4 °C substituiert. Daraufhin wurden die Böden der zum Einbetten benötigten Einfrierhilfen aus Polydimethylsiloxan (PDMS) mit einem Tropfen einer 7,5 % Gelatine - 10 % Sucrose-Lösung (s. Tabelle 9) beschichtet und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die PDMS-Einfrierhilfen wurden von dem Projektpartner TH Aschaffenburg bereitgestellt und bestehen aus einem Gemisch aus den Silikonelastomeren Sylgard™ 184 und SE 1700 [125]. Anschließend wurde die 60 % Sucrose-Lösung von den ZOs abgenommen und durch die 7,5 % Gelatine - 10 % Sucrose-Lösung ersetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden, je nach Größe, 1 - 3 ZOs mit einem Tropfen 7,5 % Gelatine - 10 % Sucrose-Lösung in die PDMS-Gefäße transferiert und mittig positioniert (s. Abbildung 14). Nach einer 2-minütigen Inkubation bei RT wurden die ZOs vollständig mit der 7,5 % Gelatine - 10 % Sucrose-Lösung bedeckt und diese für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte zum Gefrieren der Proben eine 8 - 10-minütige Inkubation in Trockeneis, woraufhin die ZOs bis zur Anfertigung der Kryoschnitte bei -80 °C gelagert wurden. Die Anfertigung der 10 - 15 µm dicken Kryoschnitte erfolgte am Kryostat CM1860 UV (Leica) bei -21 bis -23 °C. Die Schnitte wurden nach dem Trocknen (30 min, RT) bis zur Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbungen (IFF) bei -20 °C gelagert.

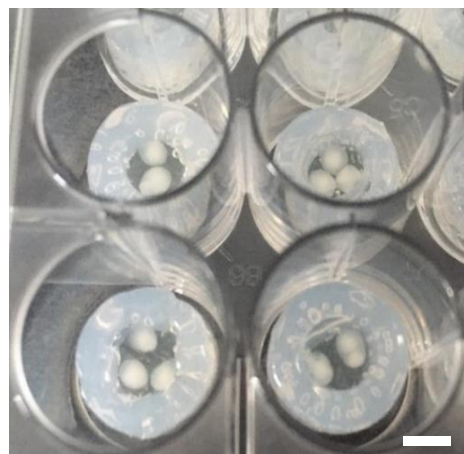


Abbildung 14: In 7,5 % Gelatine - 10 % Sucrose eingebettete ZOs in PDMS-Einfrierhilfen. Maßstab: 5 mm.

Tabelle 9: Herstellung der Sucrose-Lösungen zum Einfrieren der ZOs. Die Sucrose wurde jeweils bei 37 °C im Wasserbad vollständig in PBS-/- gelöst.

Lösungen	Ansatz	Lagerung
7 % Sucrose-Lösung	3,5 g in 50 mL PBS-/-	bei 4 °C
10 % Sucrose-Lösung	5 g in 50 mL PBS-/-	bei 4 °C
30 % Sucrose-Lösung	15 g in 50 mL PBS-/-	bei 4 °C
40 % Sucrose-Lösung	20 g in 50 mL PBS-/-	bei 4 °C
60 % Sucrose-Lösung	30 g in 50 mL PBS-/-	bei 4 °C
7,5 % Gelatine- 10 % Sucrose-Lösung	7,5 g Gelatine in 100 mL 10 % Sucrose	bei -20 °C

4.3.5 Immunfluoreszenzfärbungen

4.3.5.1 IFF von hESCs

Zur immunzytochemischen Analyse der hESCs wurden diese auf mit 10 µg/mL Laminin-521 beschichteten Ø 12 mm Deckgläsern in 2 mL mTeSRTM1-Medium ausgesät und fünf Tage in Kultur gehalten. Daraufhin wurde, nach einem Waschschrift mit PBS-/- (1 min) und einer 30-minütigen Fixierung mit 3,7 % PFA bei RT, eine 30-minütige Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X vorgenommen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einer 1 % BSA-Lösung. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden Konjugaten bzw. primären Antikörpern (s. Tabelle 10 und Tabelle 11) inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein 1-minütiger Waschschrift mit PBS-/- und bei Bedarf eine 1-stündige Inkubation mit den sekundären Antikörpern (s. Tabelle 12) bei RT. Nach dem Waschen mit PBS-/- (1 min) wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 für 4 min bei RT durchgeführt. Nach zwei Waschschriften mit PBS-/- und H₂O_{reinst} (je 1 min) wurden die Deckgläser mit *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt und zum Trocknen über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Ränder der Deckgläser mit Klarlack versiegelt und die Proben bis zur Analyse im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

4.3.5.2 IFF von ZOs

Zunächst erfolgte zum Auftauen der Kryoschnitte eine 15-minütige Inkubation bei RT. Zur anschließenden Permeabilisierung folgte eine 30-minütige Inkubation mit 0,5 % Triton-X bei RT. Anschließend wurde eine einstündige Inkubation mit einer 5 % BSA-Lösung vorgenommen. Daraufhin wurden die Schnitte mit den in 1 % BSA verdünnten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten oder unkonjugierten, primären Antikörpern bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS-/- (3x 5 min) wurden die Schnitte, falls benötigt,

für 1 h im Dunkeln mit den in 1 % BSA verdünnten, sekundären Antikörpern inkubiert. Nach 3x Waschen der Schnitte mit PBS-/- für jeweils 5 min wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 für 4 min vorgenommen. Nach dem Waschen der Schnitte mit PBS-/- und H₂O_{reinst} (je 2x 5 min) wurden diese mit dem *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt und zum Trocknen über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Am nächsten Tag wurden die Ränder der Deckgläser mit Klarlack versiegelt und die Schnitte bis zur Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels der Software *Metafer5* (MetaSystems) bei 4 °C gelagert. Die quantitative Auswertung hinsichtlich der Fluoreszenzintensität wurde abschließend mit Hilfe der Software *ImageJ* getätigt.

Die für die IFF verwendeten Antikörper bzw. Immunkonjugate sowie deren Verdünnungen (VD) sind den nachfolgenden Tabellen 10 - 12 zu entnehmen. Die Verdünnung der Antikörper bzw. Konjugate erfolgte in 1 % BSA, wohingegen der Kernfarbstoff Hoechst 33342 1:1000 in H₂O_{reinst} verdünnt wurde.

Tabelle 10: Auflistung der für die immunzytochemischen Analysen genutzten Immunkonjugate.

Immunkonjugate	Host	Hersteller	Referenz-Nr.	VD.
A. F.® 647 Anti-CALBINDIN1	rabbit	Abcam	ab207528	1:100
A. F.® 488 Anti-GAD2	mouse	Santa Cruz	sc377145	1:100
A. F.® 647 Anti-GFAP	rabbit	Abcam	ab194325	1:100
A. F.® 647 Anti-MAP2	rabbit	Abcam	ab225315	1:50
A. F.® 647 Anti-MOG	rabbit	Abcam	ab199472	1:100
A. F.® 488 Anti-NANOG (hESCs)	mouse	BD Pharming	560791	1:10
A. F.® 488 Anti-NeuN	rabbit	Abcam	ab190195	1:100
A. F.® 488 Anti-SYP	mouse	Santa Cruz	sc17750	1:100
A. F.® 647 Anti-TH	mouse	Santa Cruz	sc25269	1:100
A. F.® 488 Anti-β III Tubulin	mouse	Abcam	ab195879	1:100
eFluor® 615 Anti-Ki-67	rabbit	eBioscience™	42-5698-82	1:400
Hoechst 33342	-	Thermo Scientific™	62249	1:1000

Tabelle 11: Auflistung der für die immunzytochemischen Analysen genutzten primären Antikörper.

Primäre Antikörper	Host	Hersteller	Referenz-Nr.	VD.
A2B5	mouse	Abcam	ab53521	1:100
FOXG1	mouse	Abcam	ab18259	1:500
HOPX	rabbit	Sigma-Aldrich	HPA030180	1:500
Nestin	mouse	Life Technologies™	A24345	1:50

Tabelle 11: (Fortsetzung)

Primäre Antikörper	Host	Hersteller	Referenz-Nr.	VD.
OCT4 (hESCs)	mouse	Santa Cruz	sc-5279	1:400
PAX6	rabbit	Life Technologies™	A24340	1:50
SOX2	rabbit	Life Technologies™	A24339	1:50
SOX2 (hESCs)	goat	Santa Cruz	sc-17319	1:300
TBR2	rabbit	Abcam	ab23345	1:200
ZO-1	mouse	BD Bioscience	610966	1:150

Tabelle 12: Auflistung der für die immunzytochemischen Analysen genutzten sekundären Antikörper.

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Referenz-Nr.	VD.
A. F.® 488 donkey anti-mouse	Life Technologies™	A24350	1:250
A. F.® 488 goat anti-mouse	Life Technologies™	A11017	1:400
A. F.® 488 goat anti-rabbit	Life Technologies™	A150077	1:400
A. F.® 555 donkey anti-rabbit	Life Technologies™	A24342	1:250
A. F.® 594 donkey anti-rabbit	Life Technologies™	A24343	1:250
A. F.® 594 donkey anti-goat	Life Technologies™	A11058	1:400
A. F.® 594 goat anti-goat	Life Technologies™	A11012	1:400
A. F.® 594 donkey anti-mouse	Life Technologies™	A32744	1:200
A. F.® 647 goat anti-mouse	Life Technologies™	A21235	1:1000

4.3.6 Statistik

Zur Analyse der Röntgenexperimente wurden die Daten aus N = 3 unabhängigen Experimenten herangezogen. Die Ergebnisse zu den Effekten von Partikelstrahlen beruhen auf N = 2 Experimenten für ¹²C-IR sowie auf N = 1 Experiment für ¹H-IR. Analysiert wurden pro Versuch und Dosis n = 5 - 10 ZOs. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurden die Daten unter Verwendung der Software *OriginLab*® 2019 einem Zweistichproben-t-Test unterzogen (Signifikanzniveaus: * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Die in den Grafiken angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich dabei jeweils auf die *sham*-bestrahlten Kontrollen (0 Gy). Bei der Auswertung der RT-PCR wurde mit drei technischen Replikaten aus n = 3 - 5 gepoolten Organoiden gearbeitet, daher wurde von einem Signifikanztest abgesehen. Weitere Details sind den entsprechenden Abbildungen zu entnehmen.

5 ERGEBNISSE

In den nachfolgenden Kapiteln werden die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vorgestellt. Dabei wird zunächst unter Absatz 5.1 eine molekulare Charakterisierung der hESCs als Ausgangszellen zur ZO-Generierung vorgenommen. Anschließend folgen in Absatz 5.2 die Ergebnisse zur morphologischen und molekularen Charakterisierung der generierten ZOs. In den darauffolgenden Absätzen 5.3 und 5.4 werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Effekte von Röntgen- und Partikelstrahlung auf die ZOs dargestellt. Im Anschluss wird in Absatz 5.5 ein Ausblick auf die Eignung der ZOs als innovatives Modellsystem zur Imitation und Untersuchung behandlungsbedingter Spätfolgen gegeben.

5.1 Pluripotenznachweis der hESCs

Die Generierung der ZOs erfolgte, wie bereits in Absatz 4.2.2 beschrieben, stufenweise aus *feeder*-frei kultivierten hESCs in den Passagen 24 - 50. Zum Nachweis des Pluripotenzershalts über mehrere Passagen wurden in P49 mRNA- sowie in P50 Proteinanalysen gegen die Pluripotenzmarker OCT4, SOX2 und NANOG vorgenommen (s. Abbildung 15). Die Primärdaten aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen sind dem Anhang in Tabelle 21 beigelegt.

Anhand der mRNA-Expressionsanalysen in Abbildung 15A ist zu erkennen, dass die Pluripotenzmarker OCT4 und NANOG ausschließlich in den H9 und nicht in den 66 Tage alten ZOs exprimiert wurden. SOX2 hingegen wurde in beiden Proben exprimiert, jedoch war die Expression in den hESCs um ein 1,5-faches höher als in den ZOs. Anhand der ergänzenden IFF in Abbildung 15B ist zu erkennen, dass die Pluripotenzmarker OCT4, SOX2 und NANOG innerhalb der einzelnen Zellen unterschiedlich stark, jedoch im Großteil aller Zellen exprimiert wurden. Zellen, welche die Pluripotenzmarker nicht exprimierten, wiesen darüber hinaus eine abweichende Morphologie auf, welche auf eine spontane Ausdifferenzierung hindeutete (Daten nicht gezeigt). Spontan ausdifferenzierten Zellen wurden jedoch vor der Aussaat zur ZO-Generierung, wie unter Absatz 4.2.1.3 beschrieben, durch eine ReLeSR™-Passage exkludiert und somit nicht zur ZO-Generierung verwendet. Die Ergebnisse der molekularen Analysen bestätigen somit den Pluripotenzershalt der hESCs bis in P50 durch eine geeignete Kultivierung auf 10 µg/mL Laminin-521 in mTESR¹-Medium.

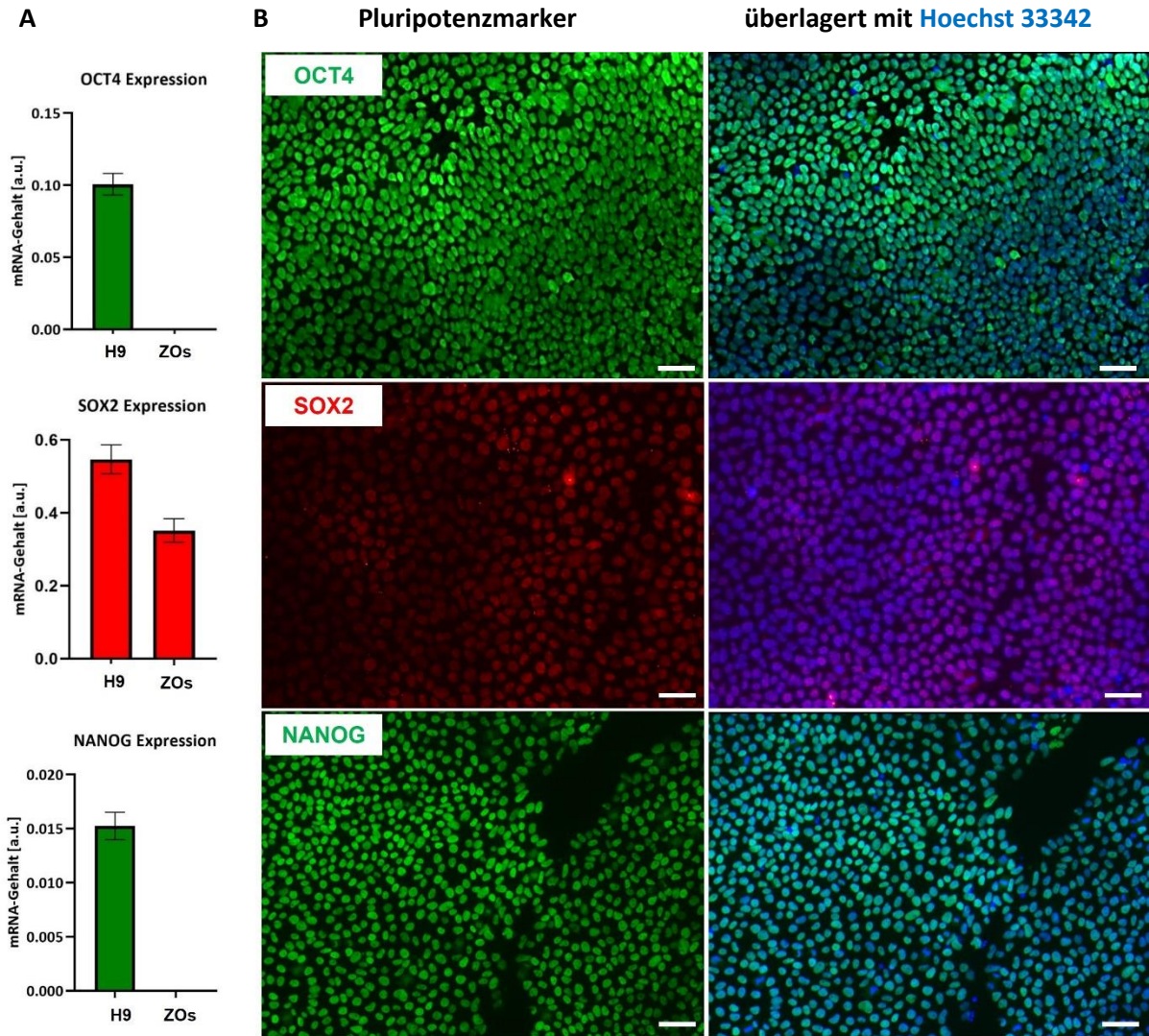


Abbildung 15: **A:** Relativer mRNA-Gehalt der Pluripotenzmarker OCT4, SOX2 und NANOG der *feeder*-frei kultivierten H9 (P49, N = 1, n = 2 PS) im Vergleich zu den ZOs (d66, N = 1, n = 3). Die Fehlerbalken repräsentieren die ermittelte Standardabweichung (SD) aus drei technischen Replikaten. Normalisiert wurde gegen das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA. **B:** IFF der *feeder*-frei kultivierten hESCs (P50), die nach einer 5-tägigen Kultivierung auf mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Laminin-521 beschichteten \varnothing 12 mm Deckgläsern in 2 mL mTeSRTM1-Medium mit 3,7 % PFA für 30 min fixiert und wie unter Absatz 4.3.5.1 beschrieben gegen die Pluripotenzmarker OCT4, SOX2 und NANOG gefärbt wurden. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 45 μm .

5.2 Generierung und Charakterisierung der ZOs

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus verschiedenen, unabhängigen Versuchsansätzen zur Generierung von ZOs dargestellt. Die mikroskopische Dokumentation der neuronalen Differenzierung konnte aufgrund der enormen Größenzunahme jedoch nur bis d20 vorgenommen werden. Die anschließende molekulare Charakterisierung der generierten ZOs wurde anhand von mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR sowie Proteinanalysen via IFF durchgeführt (s. Absatz 5.2.2).

5.2.1 Generierung der ZOs

In Abbildung 16 auf der nachfolgenden Seite sind beispielhafte Aufnahmen der Stadien der neuronalen Differenzierung der generierten ZOs im Vergleich zu den Abbildungen aus der Studie von Giandomenico et al., 2020 [126] (untere Reihe) dargestellt. Anhand der Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich die ausgesäten Einzelzellen zur EB-Generierung (d3) über die gesamte Länge der Mikrofilamente in einer dichten Zellzusammensetzung anhefteten. Dabei bevorzugten die hESCs nach der Aussaat quervernetzte bzw. längliche Mikrofilamente zur Akkumulation. Weiterhin wurde, übereinstimmend mit den Veröffentlichungen von Lancaster et al., 2017 und Giandomenico et al., 2020, ab d7 der Kultivierung morphologisch die Ausbildung des polarisierenden Neuroektoderms als äußere, helle Oberflächenstruktur sowie an d20 die Ausbildung des Neuroepithels in Form radialer Ausstülpungen nachgewiesen. Nach dem Transfer auf den Orbitalschüttler an d18 war zudem ein kontinuierliches Größenwachstum des zerebralen Gewebes zu beobachten. Darüber hinaus war, wie anhand von Abbildung 16 zu erkennen ist, bereits ab der EB-Generierung an d3 der Kultivierung eine morphologische Variabilität in Bezug auf Größe und Struktur zwischen den generierten Aggregaten zu erkennen, welche im weiteren Verlauf der neuronalen Induktion deutlich ersichtlich war. Dabei zeigten langgestreckte EBs ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis im Vergleich zu runden EBs und im Laufe der Differenzierung eine verringerte Generierung nicht-neuralen Gewebes bzw. eine erhöhte Neuroektoderm- bzw. Neuroepithelbildung. Zusammenfassend wiesen die generierten ZOs somit morphologisch identifizierbare Kortex-Strukturen auf, sodass anhand der morphologischen Entwicklung von einer erfolgreichen Neurogenese ausgegangen wurde.

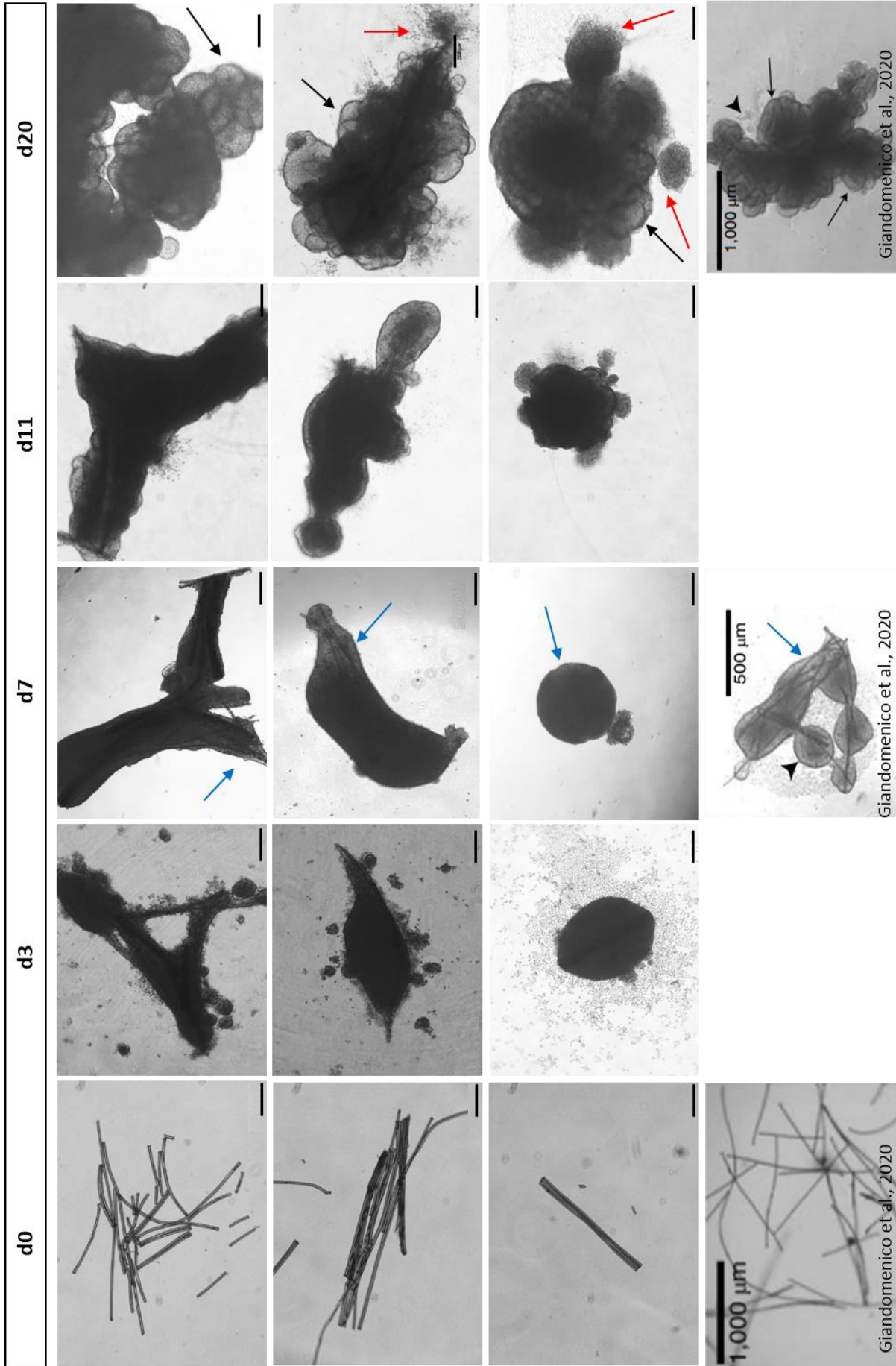


Abbildung 16: Stadien der neuralen Differenzierung der generierten ZOs im Vergleich zu den Abbildungen aus Giandomenico et al. 2020 (untere Reihe).
d: day, **blaue Pfeile:** polarisierendes Neuroektoderm, **schwarze Pfeile:** neuroepitheliale Ausstülpungen, **rote Pfeile:** nicht-neuroepitheliales Gewebe.
Maßstab, wenn nicht anders angegeben: 200 µm.

5.2.2 Molekulare Charakterisierung der ZOs

Zur molekularen Charakterisierung der ZOs sowie zur anschließenden Bestimmung geeigneter Bestrahlungszeitpunkte wurden umfassende mRNA- sowie Proteinanalysen hinsichtlich der Expression verschiedener, neuraler Marker durchgeführt. Die Genexpression der ZOs wurde dabei mit den jeweiligen Kontrollen (FBr, ABr) verglichen. Bei den rot umrandeten Abbildungen handelt es sich um Detailaufnahmen der jeweiligen IFF. Wie anhand der vorangegangenen Abbildung 16 zu erkennen ist, wurden ab d20 multiple, neuralrohrähnliche Ausstülpungen aus neuroepitheliale Gewebe gebildet und die frühe, neurale Differenzierung somit morphologisch nachgewiesen. Aufgrund dessen wurde d20 als Ausgangspunkt zur Analyse der neuralen Reifung während der maximalen Kultivierungsdauer von 365 Tagen gewählt.

Zunächst wurden die generierten ZOs hinsichtlich der Ausbildung von Vorderhirnregionen, welche wesentliche Strukturelemente für die integrative, kognitive Gehirnleistung stellen [127], untersucht. Wie beispielhaft anhand der nachfolgenden Abbildung 17 zu erkennen ist, bildeten die ZOs an d20 multiple Vordehirnregionen aus, welche durch die Expression des Vorderhirnmarkers FOXG1 charakterisiert sind. Eine reproduzierbare, kontinuierliche Ausbildung von Vorderhirnstrukturen innerhalb der generierten ZOs wurde anhand von n = 5 unabhängigen IFF nachgewiesen (s. Abbildung 60, S. 130).

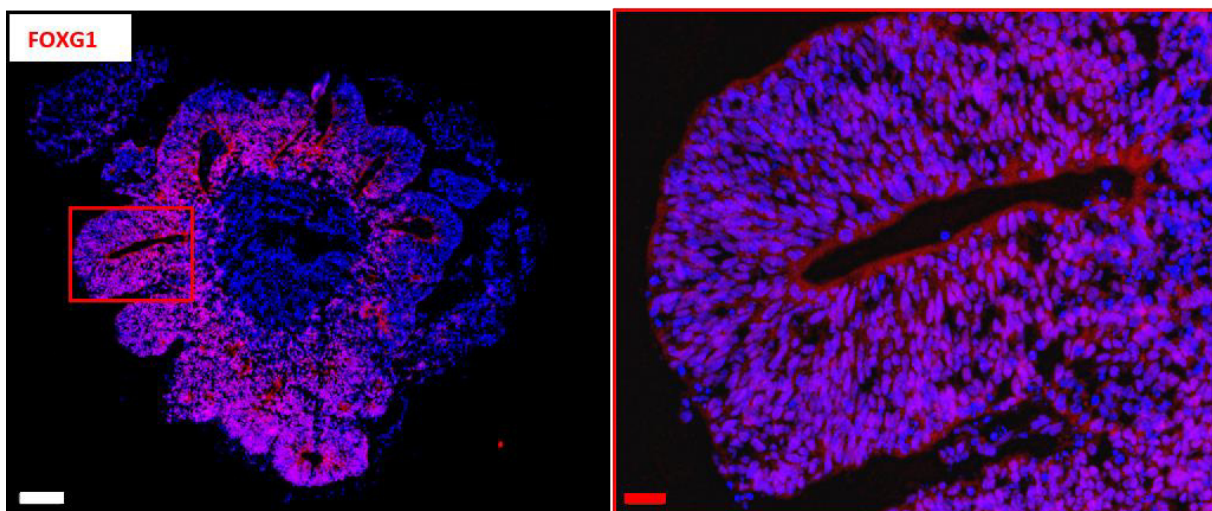


Abbildung 17: IFF gegen den Vorderhirnmarker FOXG1 (d20). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 100 µm, 50 µm.

Darüber hinaus ähneln die in Abbildung 18 noch einmal detailliert dargestellten, multiplen Ausstülpungen morphologisch SVZ-Regionen, weswegen im Folgenden von „Pseudo-Ventrikeln“ (PVs) gesprochen wird. Die in den PVs radial um Lumen organisierten, äußeren Zellen weisen dabei eine typische, längliche RG-Morphologie auf.

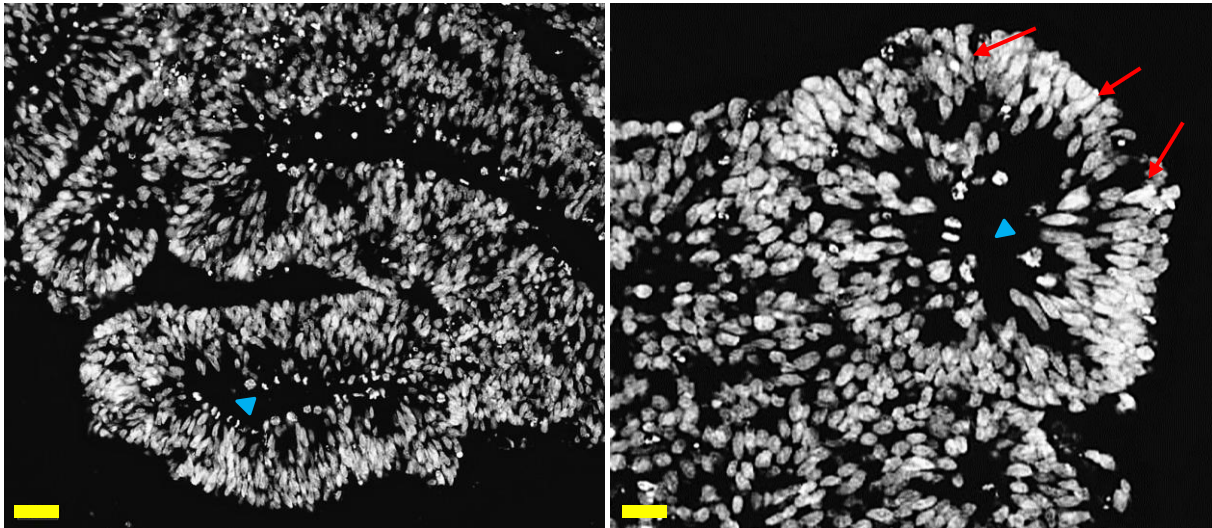


Abbildung 18: Detailaufnahmen der PVs zeigen langgestreckte RGs (**rote Pfeile**), welche sich dreidimensional um die apikalen Lumen (**blaue Pfeilspitzen**) organisieren und radial in die äußeren Schichten migrieren. Maßstab: **20 μ m**.

Zur Verifizierung der RG-Stammzeleigenschaften und dem Vorhandensein verschiedener, neuraler Zelltypen innerhalb der generierten ZOs wurden im Folgenden umfassende, molekulare mRNA- und Proteinanalysen durchgeführt. Dabei diente FBr-mRNA als Kontrolle für Marker früher, neuraler Zelltypen, wohingegen ABr-mRNA als Kontrolle für Marker reifer, neuronaler und glialer Zellen genutzt wurde. In der nachfolgenden Abbildung 19 sind die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen an d20 der Kultivierung grafisch dargestellt. Im Gegensatz zu den Kontrollen wurden die neuralen Stammzellmarker PAX6 und Nestin in den 20 Tage alten ZOs um ein Vielfaches höher exprimiert. Auch das *tight junction protein-1* (TJP1), welches die Ausbildung des Neuroepithels bestätigt [128], und der neuronale Vorläufermarker NEUROD1 wurden deutlich höher exprimiert als in den Kontrollen. Der neuronale Vorläufermarker DCX wurde nur geringfügig höher exprimiert, während β TUB, als Marker für unreife Neurone und vor allem MAP2, ein Marker für reife Neurone, niedriger exprimiert wurden als in den dazugehörigen Kontrollen. Somit wurden an d20 der Kultivierung auf mRNA-Ebene insbesondere Marker für neurale Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert.

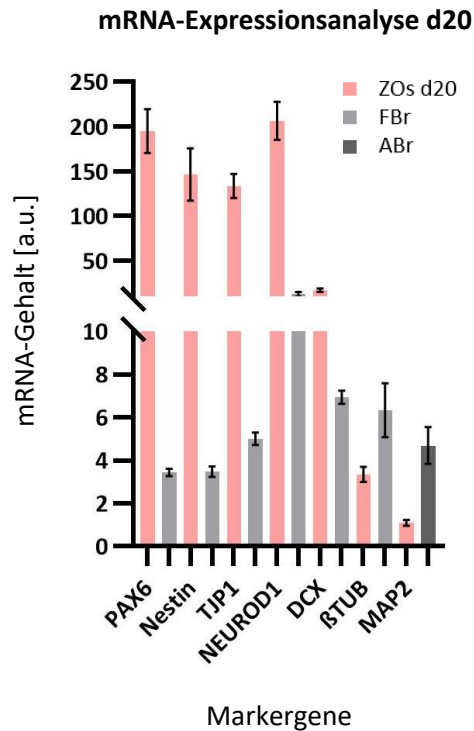


Abbildung 19: Genexpression der ZOs an d20 (N = 1, n = 5). Relativer mRNA-Gehalt der Marker PAX6, Nestin und TJP1, der Vorläufer-Marker NEUROD1 und DCX sowie der Neuronen-Marker β TUB und MAP2 im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. Normalisiert wurde gegen das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA.

Darüber hinaus wurden durch die an d20 der Kultivierung angefertigten, ergänzenden IFF (s. Abbildung 20) die für das humane Gehirn spezifischen, bipolar-geformten oRGs mittels der Expression des Markers HOPX nachgewiesen. Die oRGs waren hierbei größtenteils in der oSVZ der PVs lokalisiert. Die proliferierenden, Ki-67-positiven Zellen in den inneren Schichten der PVs sowie einzelne, in die äußeren Schichten migrierende Zellen (s. Abbildung 21) exprimierten zudem den NSC-Marker PAX6. Darüber hinaus wurden in den 20 Tage alten ZOs die typischen NSC-Marker SOX2 und Nestin exprimiert, wobei SOX2 in allen Zellschichten, Nestin jedoch hauptsächlich im Zytoplasma der äußeren Zellschichten der PVs exprimiert wurde (s. Abbildung 22). Zudem wurden β TUB als Marker unreifer Neurone und MAP2 als Markerprotein für dendritische Ausläufer reifer Neurone zytoplasmatisch zwischen den einzelnen PVs und teilweise in den Randbereichen der PVs exprimiert. Das filamentöse Protein β TUB, welches auch in den inneren Schichten der PVs angereichert war, wurde dabei deutlich stärker exprimiert als MAP2.

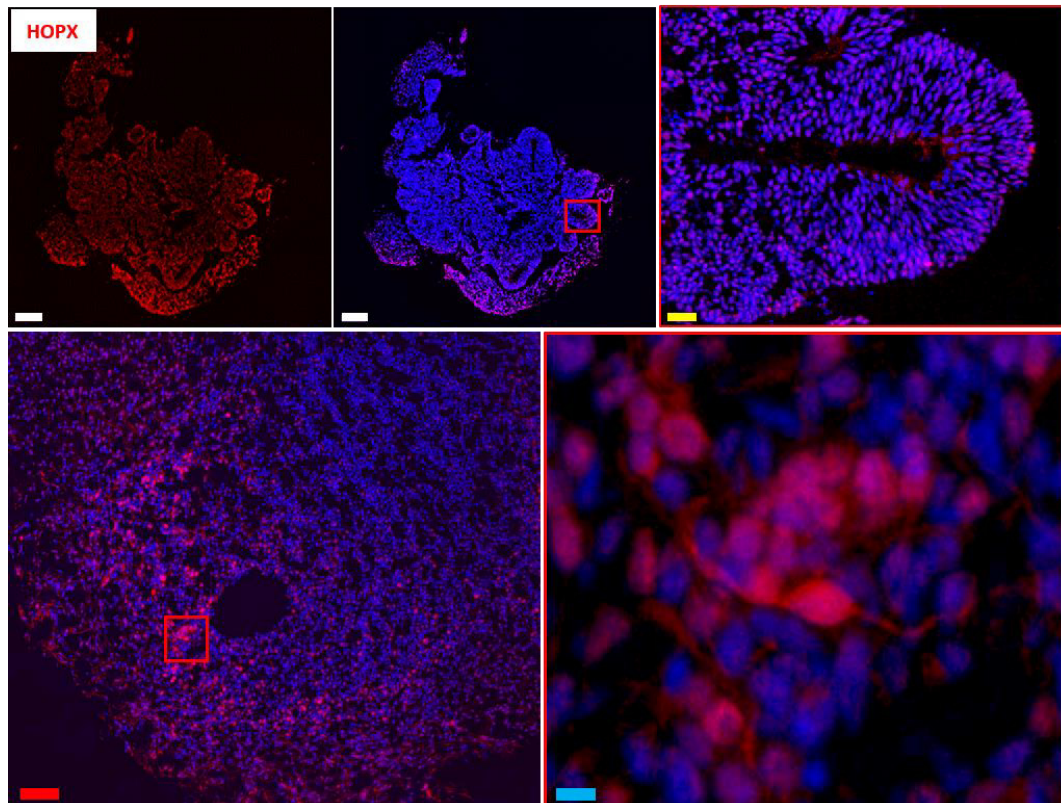


Abbildung 20: IFF von ZOs an d20 gegen den oRG-Marker HOPX, welcher vor allem in den äußeren Schichten der PVs exprimiert wurde. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 100 μm , 50 μm , 20 μm , 10 μm .

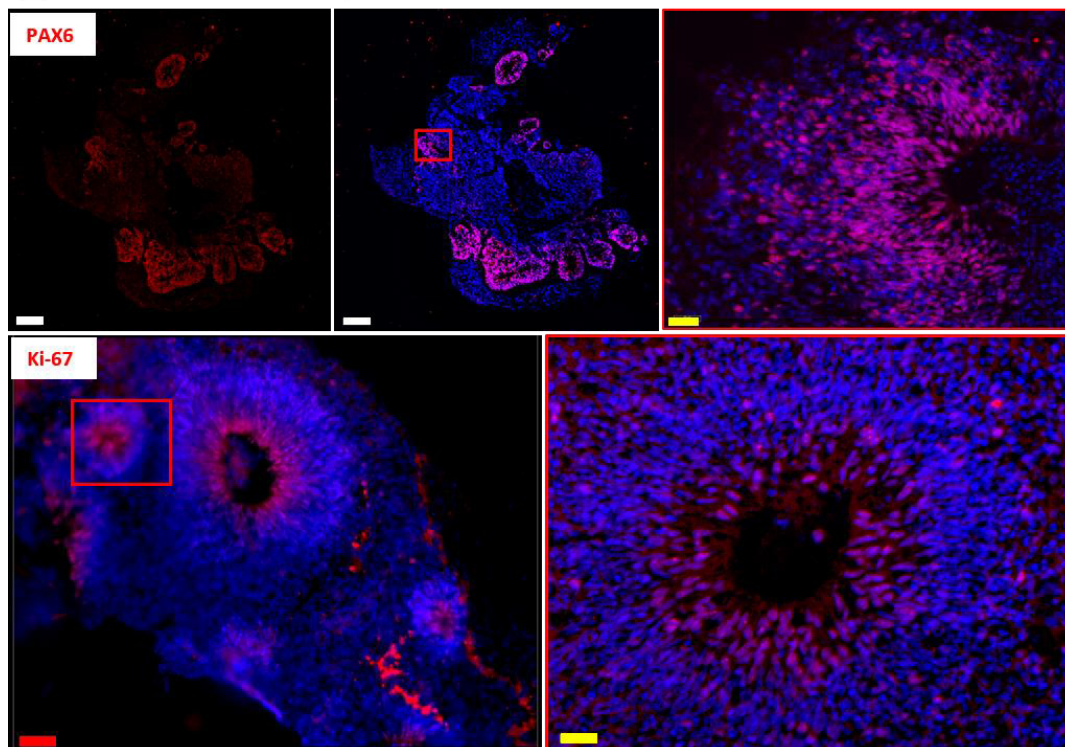


Abbildung 21: IFF von ZOs an d20 gegen den NSC-Marker PAX6 und den Proliferationsmarker Ki-67, welche hauptsächlich in den inneren Schichten der PVs exprimiert wurden. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 100 μm , 50 μm , 20 μm .

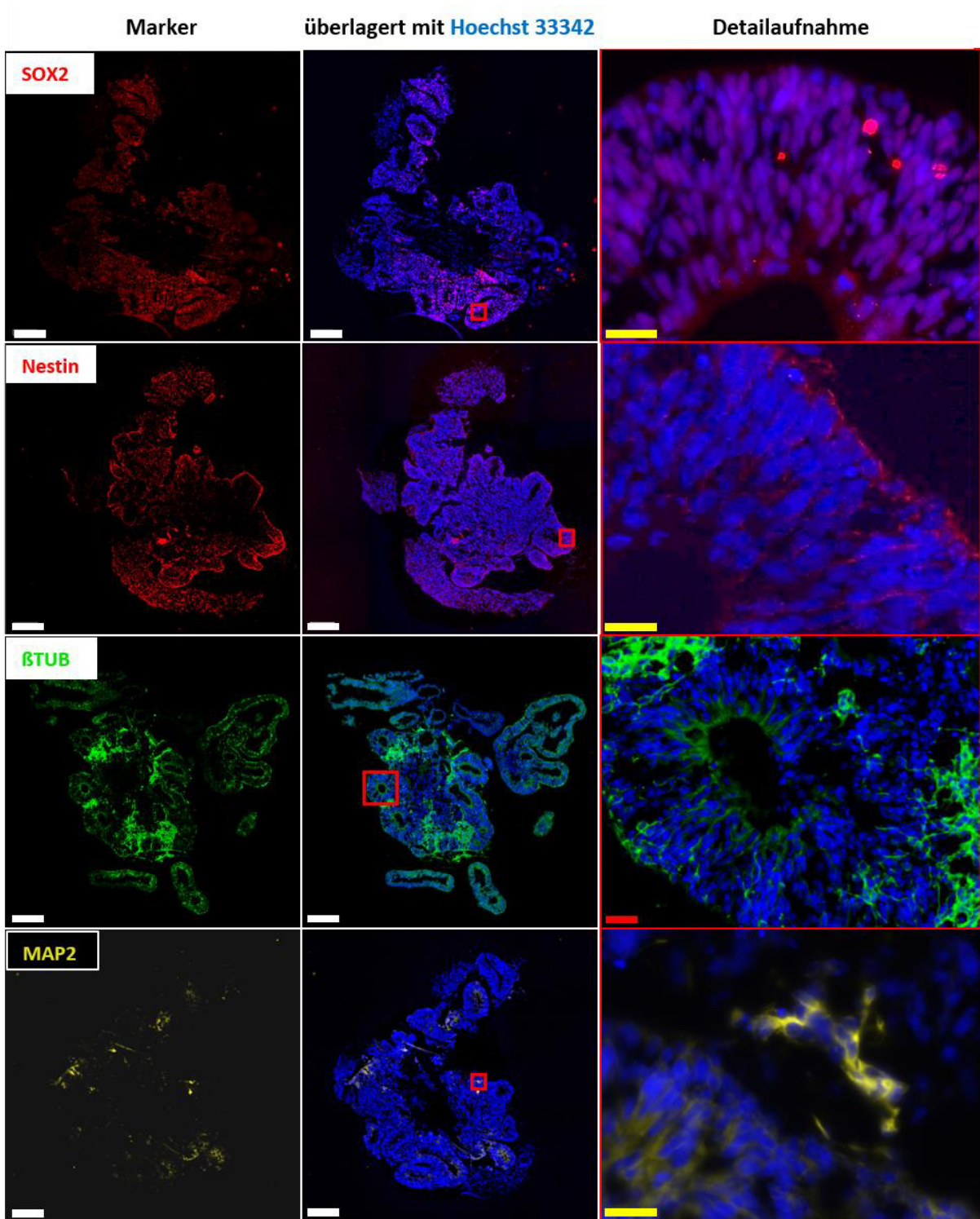


Abbildung 22: IFF von ZOs an d20 gegen die NSC-Marker SOX2 und Nestin sowie gegen die neuronalen Marker βTUB und MAP2. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 100 μm, 50 μm, 20 μm.

Zur weiteren Charakterisierung des Reifungsprozesses wurden ZOs an d66 der Kultivierung analysiert (s. Abbildung 23). Dabei ergaben die Genexpressionsanalysen weiterhin einen hohen Gehalt an Markern für NSCs (SOX2, PAX6 und Nestin). Der Transkriptionsfaktor *achaete-scute homolog 1* (ASCL1) wurde im Vergleich zu der Kontrolle niedriger exprimiert. ASCL1 ist für die embryonale, neuronale Differenzierung unerlässlich und wird zudem in einer Subpopulation von NSCs, die für die adulte Neurogenese in der SVZ verantwortlich sind, exprimiert [129]. Der neuroepitheliale Marker TJP1 hingegen wurde etwa doppelt so hoch exprimiert wie in der Kontrolle. Die Generierung neuronaler Progenitorzellen und unreifer Neurone wurde durch die Expression der Marker NEUROD1, DCX sowie β TUB nachgewiesen. Dabei wurden die Marker NEUROD1 und DCX um die Hälfte niedriger exprimiert als in den dazugehörigen Kontrollen. Das Vorhandensein reifer Neurone wurde durch die Expression der Marker MAP2 und SYP sowie der spezifischen, neuronalen Marker *GABAergic neuronal marker 2* (GAD2) und Calbindin 1 (CALB1) bestätigt. Die Expression von GAD2 und CALB1 war jedoch um ein Vielfaches geringer als in den Kontrollen. Der gliale Vorläufermarker Prominin 1 (PROM1) wurde ebenfalls exprimiert, wohingegen die glialen Marker GFAP für Astrozyten und MBP für Oligodendrozyten nicht exprimiert wurden.

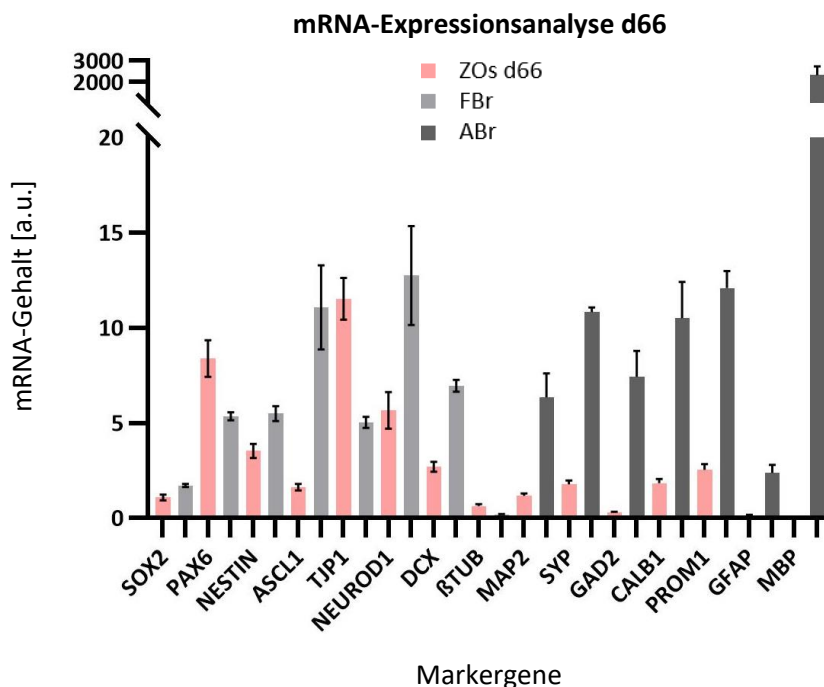


Abbildung 23: Genexpression der ZOs an d66 (N = 9, n = 3). Relativer mRNA-Gehalt der Marker SOX2, PAX6, Nestin, TJP1, NEUROD1, DCX, β TUB, MAP2, SYP, GAD2, CALB1, PROM1, GFAP und MBP im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. Normalisiert wurde gegen das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA.

Zur Verifizierung der mRNA-Analysen wurden ebenfalls ergänzende IFF an d66 der Kultivierung durchgeführt. Die angefertigten IFF (s. Abbildung 61, S. 131 im Anhang) zeigen, dass auch während des Reifungsprozesses HOPX- und PAX6-positive Stammzellen in den spezifischen Zellschichten der PVs erhalten bleiben. Die Anwesenheit von intermediären Progenitorzellen und unreifen Neuronen wurde durch die Expression der Markerproteine TBR2 und β TUB nachgewiesen. Dabei wurde das Intermediärfilament β TUB deutlich stärker als an d20 und über den ganzen Schnitt verteilt exprimiert. Hierbei erfolgte die stärkste Expression von β TUB jedoch in den kortikalen Randbereich. Zudem wurde, wie anhand der nachfolgenden Abbildung 24 zu erkennen ist, durch die zytoplasmatische Expression von MAP2 und dem Vesikelprotein SYP, die Generierung reifer Neurone in den äußeren Schichten der PVs nachgewiesen. Die Generierung spezifischer Neuronen-Subpopulationen mittels IFF gegen die Marker CALB1 (Interneurone), GAD2 (GABAerge Neurone) und Tyrosinhydroxylase (TH; dopaminerge Neurone) wurde nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnten gliale Vorläufer mittels des Markers A2B5, welcher ausschließlich im Zytoplasma der äußeren Zellschichten exprimiert wurde, jedoch weder GFAP-positive Astrozyten noch MOG-positive Oligodendrozyten detektiert werden.

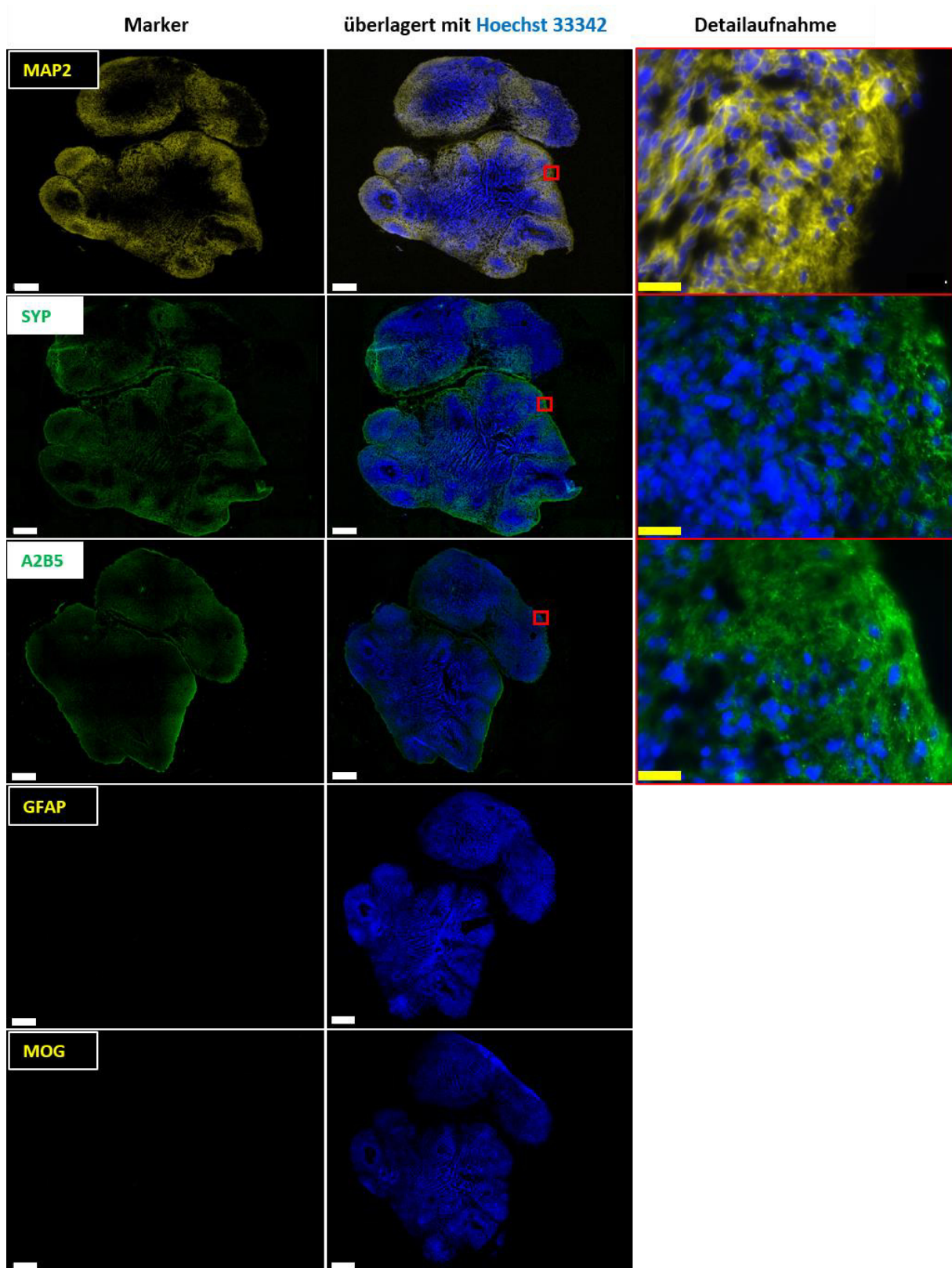


Abbildung 24: IFF von ZOs an d66 gegen die neuronalen Marker MAP2 und SYP sowie gegen die glialen Marker A2B5, GFAP und MOG. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μm , 20 μm .

Aufgrund der vorangegangenen Analysen wurden, um den Zeitpunkt der Gliogenese zu ermitteln, zusätzliche mRNA-Analysen mit reiferen, 100 Tage alten ZOs durchgeführt. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen sind in der folgenden Abbildung 25 dargestellt.

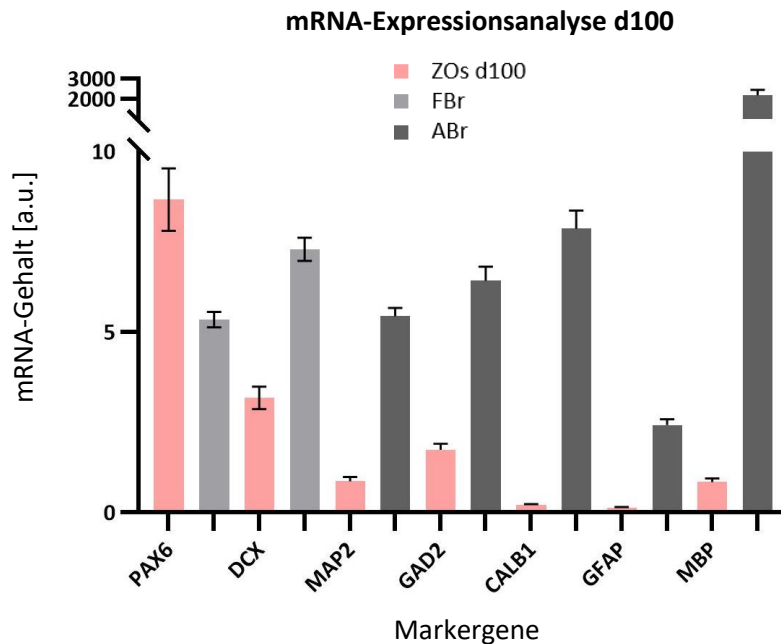


Abbildung 25: Genexpression der ZOs an d100 (N = 4, n = 3). Relativer mRNA-Gehalt der Marker PAX6, DCX, MAP2, GAD2, CALB1, GFAP und MBP im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. Normalisiert wurde gegen das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA.

Die Genexpressionsanalysen zeigen, dass der NSC-Marker PAX6 an d100 der Kultivierung weiterhin hoch exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu wurden der neuronale Vorläufer-Marker DCX sowie MAP2 als Marker für postmitotische Neurone deutlich niedriger exprimiert als in den Kontrollen. Darüber hinaus wurde an d100 auf mRNA-Ebene insbesondere der GABAerge Marker GAD2 exprimiert, wohingegen der Interneuronen-Marker CALB1 kaum exprimiert wurde. Der Oligodendrozyten-Marker MBP wurde ebenfalls, wenn auch um ein Vielfaches geringer als in der Kontrolle, exprimiert. Der astrogliale Marker GFAP wurde nicht exprimiert. Die Anwesenheit neuraler Stamm- und neuronaler Progenitorzellen sowie die Generierung reifer Neurone wurde durch ergänzende IFF verifiziert (s. Abbildung 62, S. 132 und Abbildung 63, S. 133 im Anhang). Dabei wurden die neuronalen Marker insbesondere in den äußeren Zellschichten exprimiert. Die Generierung spezifischer Neuronen-Subpopulationen wurde mittels IFF nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Anhand von Abbildung 26 ist zudem zu erkennen, dass der Astrozyten-Marker GFAP an d100 der Kultivierung insbesondere im Zytoplasma der Zellen in den Randbereichen des ZOs exprimiert wurde. Die Generierung von Oligodendrozyten wurde mittels IFF nicht nachgewiesen (s. Abbildung 63, S. 133).

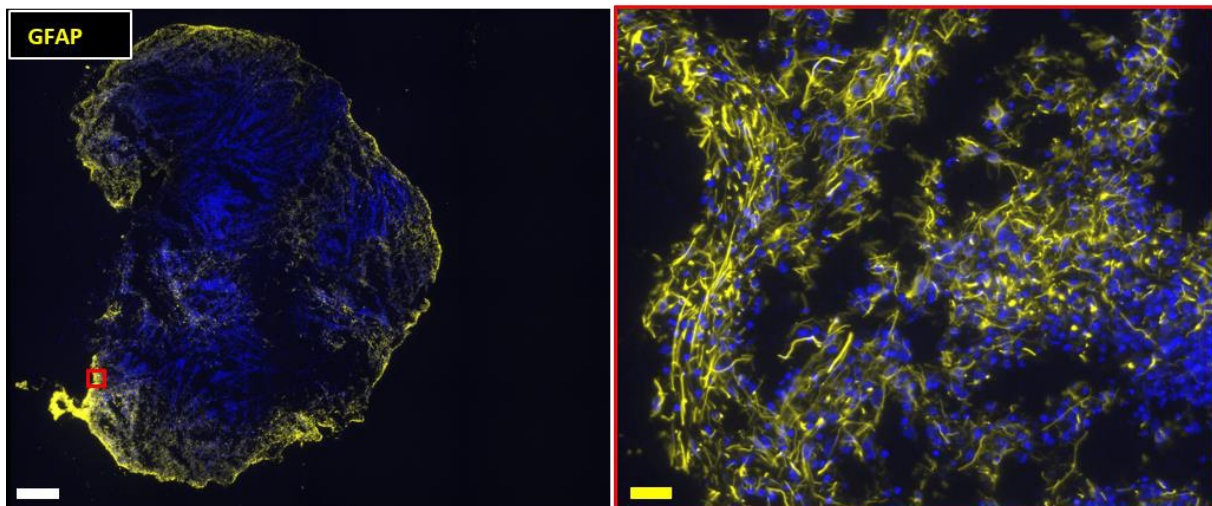


Abbildung 26: IFF an d100 gegen den Astrozyten-Marker GFAP. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 µm, 20 µm.

Abschließend wurden Gen- und Proteinanalysen von ZOs, welche nach einer einjährigen Kultivierung aufbereitet wurden, durchgeführt, um den maximalen Reifegrad der ZOs zu bestimmen und die ZOs hinsichtlich der glialen Differenzierungsfähigkeit und der Generierung reifer Oligodendrozyten zu untersuchen. Die Ergebnisse der mRNA-Analysen sind in der folgenden Abbildung 27 dargestellt und zeigen, dass nach einer Kultivierung von einem Jahr der NSC-Marker PAX6 wesentlich stärker exprimiert wurde, als in der Kontrolle. Die erfolgreiche Generierung neuronaler Vorläufer wurde durch die Expression von DCX nachgewiesen, die jedoch geringer als in der Kontrolle ausfiel. Das neuronale Markerprotein MAP2 wurde in den einjährigen ZOs im Vergleich zu der Kontrolle sehr hoch exprimiert. Die spezifischen Neuronen-Marker GAD2 und CALB1 hingegen wurden nicht exprimiert. Die Marker GFAP und MBP für reife Astro- und Oligodendrozyten wurden im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen stark erhöht exprimiert. Anhand der im Anhang in Abbildung 64 (S. 134) dargestellten IFF wurde die hohe Expression des neuralen Stammzell-Markers PAX6 und der β TUB-positiven, unreifen Neurone auch auf Proteinebene nachgewiesen. Die Generierung reifer SYP-positiver Neurone wurde ebenfalls mittels IFF nachgewiesen. Darüber hinaus wurde anhand der durchgeführten IFF gezeigt, dass an d365 der Kultivierung insbesondere der gliale Vorläufer-Marker A2B5 stark und über den gesamten Schnitt verteilt exprimiert wurde. Die Generierung reifer, myelinisierender Oligodendrozyten wurde nach einer einjährigen Kultivierung abschließend durch die in Abbildung 28 dargestellte Immunfärbung gegen den Marker MOG, welcher ausschließlich extrazellulär und in den äußeren Zellschichten exprimiert wurde, nachgewiesen.

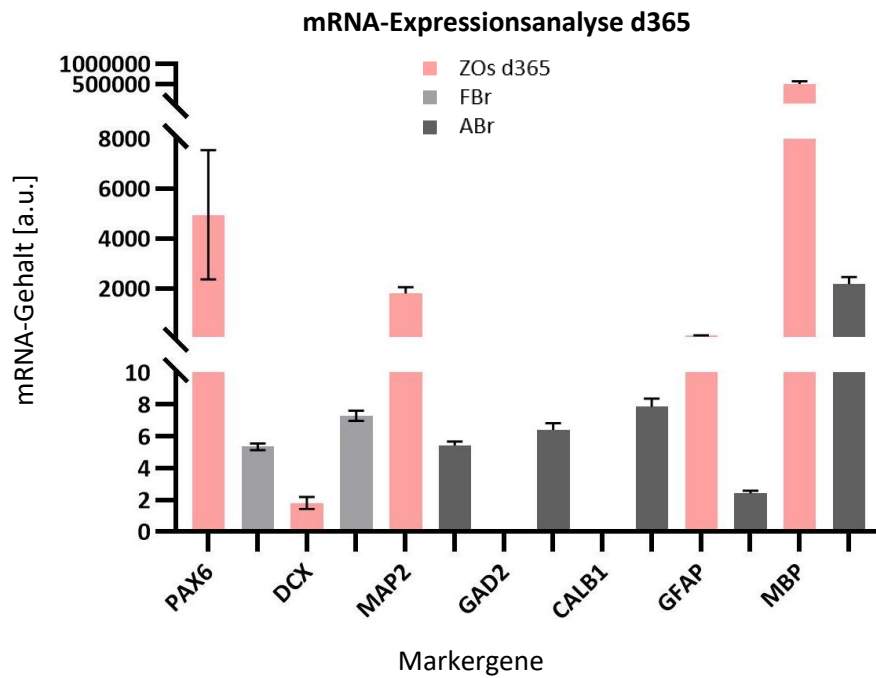


Abbildung 27: Genexpression der ZOs an d365 (N = 1, n = 3). Relativer mRNA-Gehalt der Marker PAX6, DCX, MAP2, GAD2, CALB1, GFAP und MBP im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. Normalisiert wurde gegen das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA.

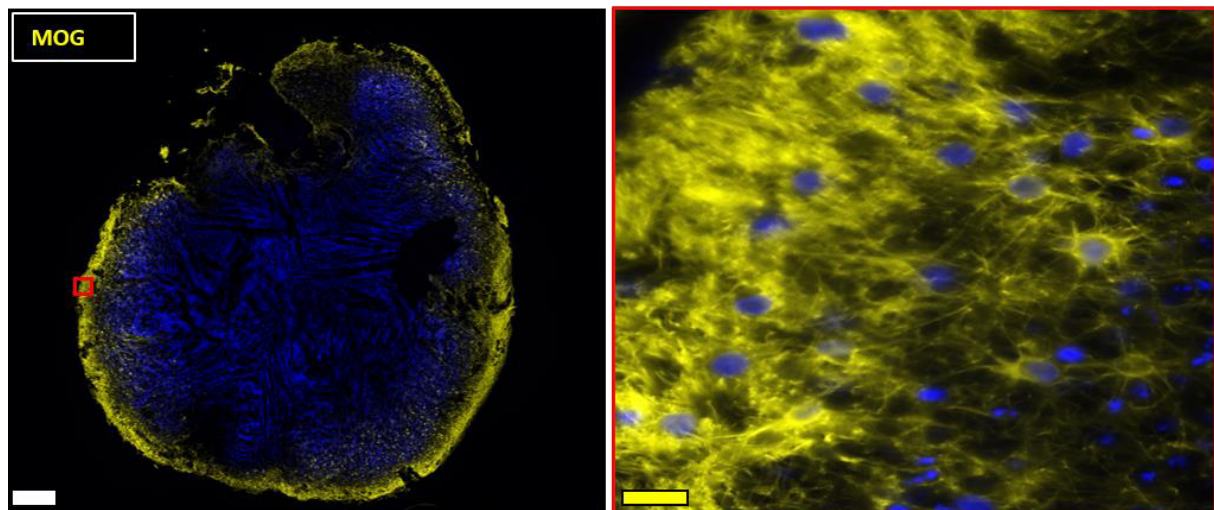


Abbildung 28: IFF an d365 gegen den Oligodendrozyten-Marker MOG. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μm , 20 μm .

Aufgrund der durchgeführten, molekularen Analysen wurde d20 als früherer Bestrahlungszeitpunkt gewählt und die exponierten ZOs an d66 der Kultivierung hinsichtlich der Wirkung von IR auf die Proliferation, Viabilität und Differenzierungsfähigkeit von neuronalen Stamm- und Progenitorzellen analysiert. Um potenzielle Strahleneffekte auf die Generierung reifer, neuronaler und glialer Zellen des ZNS zu untersuchen, wurde d80 als späterer Bestrahlungszeitpunkt und d100 als Endpunkt der Analyse gewählt. Die Analyse an d100 der Kultivierung lässt somit eine Untersuchung der Effekte von IR auf die Bildung von Astrozyten, jedoch nicht auf die Generierung von Oligodendrozyten zu. Eine Bestrahlung nach einer Kultivierungszeit von einem Jahr würde jedoch über den zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehen. Im Folgenden werden die Begriffe „unreife“ (d20) und „reife“ (d80) ZOs für die jeweiligen Reifestadien zum Zeitpunkt der Bestrahlung verwendet. In den folgenden Kapiteln 5.3.1 und 5.3.2 werden zunächst die Ergebnisse zu den durchgeführten Röntgenexperimenten, welche als Referenz für die Bestrahlungsversuche mit Kohlenstoffionen und Protonen dienen, dargestellt. Bestrahlt wurden die generierten ZOs an d20 bzw. an d80 im Dosisbereich von 1 - 15 Gy. Anschließend werden unter Absatz 5.4.1 und Absatz 5.4.2 die Ergebnisse zu den Versuchen, welche mit Kohlenstoffionen und Protonen durchgeführt wurden, gezeigt, um unter Absatz 5.4.3. einen Vergleich der Effektivität von Röntgen- und Partikelstrahlung zu ziehen.

5.3 Effekte von Röntgenstrahlung auf ZOs

5.3.1 Effekte von Röntgenstrahlung auf unreife ZOs

Um die Wirkung von Röntgenstrahlung auf die neuralen Stamm- und Vorläuferzellen sowie auf die einhergehende Neurogenese zu untersuchen, wurden unreife ZOs an d20 mit 1, 2 und 8 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und im Zeitraum von d40 - d61 der Kultivierung zunächst hinsichtlich strahleninduzierter, morphologischer Veränderungen untersucht. Anschließend wurden an d66 der Kultivierung Gen- und Proteinexpressionsanalysen zur Untersuchung potenzieller Strahleneffekte auf molekularer Ebene durchgeführt. Ergänzende Analysen hinsichtlich des strahleninduzierten Zelltods (Apoptose) wurden 24 h p. IR durchgeführt.

5.3.1.1 Morphologie

Zur Untersuchung der Effekte von Röntgenstrahlung auf die Morphologie der exponierten ZOs wurden unmittelbar vor der Bestrahlung sowie an d61 der Kultivierung lichtmikroskopische Aufnahmen der ZOs angefertigt. Die Aufnahmen in Abbildung 29A lassen erkennen, dass die unbestrahlten ZOs (0 Gy) 20 Tage p. IR (d40) bereits radiales Neuroepithel ausgebildet hatten und klare Geweberänder aufwiesen. Im Gegensatz dazu bildeten die bestrahlten ZOs flüssigkeitsgefüllte Kavitäten aus. Die mit 8 Gy bestrahlten ZOs wiesen zudem einen erkennbaren Zellzerfall auf. In Abbildung 29B ist die Kavitäten-Bildung der bestrahlten ZOs prozentual gegen die Dosis aufgetragen. Während in der Kontrolle ~ 3 % der ZOs spontan Kavitäten ausbildeten, bildeten ~ 33 % der mit 1 Gy bestrahlten ZOs Kavitäten aus. Die mit 2 Gy bestrahlten ZOs bildeten zu ~ 53 % Kavitäten aus, während die Exposition mit 8 Gy eine Kavitäten-Bildung in ~ 77 % der bestrahlten ZOs bedingte. Somit wurde innerhalb der bestrahlten ZOs eine dosisabhängige Kavitäten-Bildung nachgewiesen. Des Weiteren wurde eine Wachstumsinhibierung der bestrahlten ZOs beobachtet, die sich in einer verringerten Fläche der exponierten ZOs äußerte (s. Abbildung 30). Anhand der Grafik in Abbildung 30B ergab sich im Zeitraum von d20 - d61 der Kultivierung im Mittel eine Größenzunahme von ~ 10 mm² in der Fläche für die unbestrahlten ZOs, während die mit 1 Gy exponierten ZOs ein Wachstum von ~ 6 mm² aufwiesen. Die mit 2 Gy bestrahlten ZOs wuchsen innerhalb des Zeitraumes von etwa 6 Wochen nur noch um 3,6 mm² während die Größe der mit 8 Gy exponierten ZOs um 1 mm² abnahm. Zusammenfassend wiesen die bestrahlten ZOs ab d20 p. IR morphologische Abnormalitäten auf, welche sich in einer dosisabhängigen Wachstumsinhibierung und Zellzerfall sowie in der Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Kavitäten äußerten.

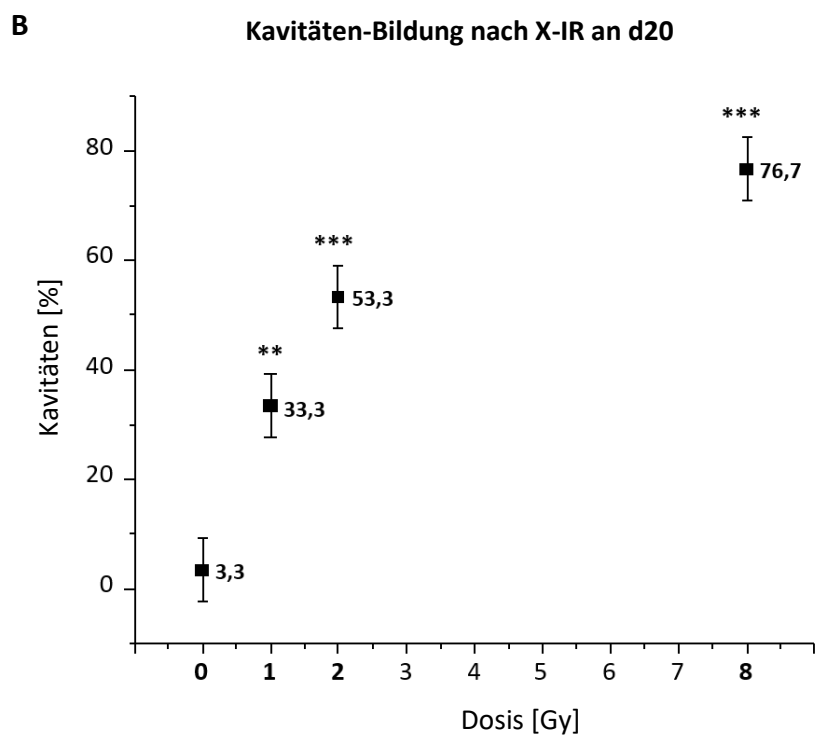
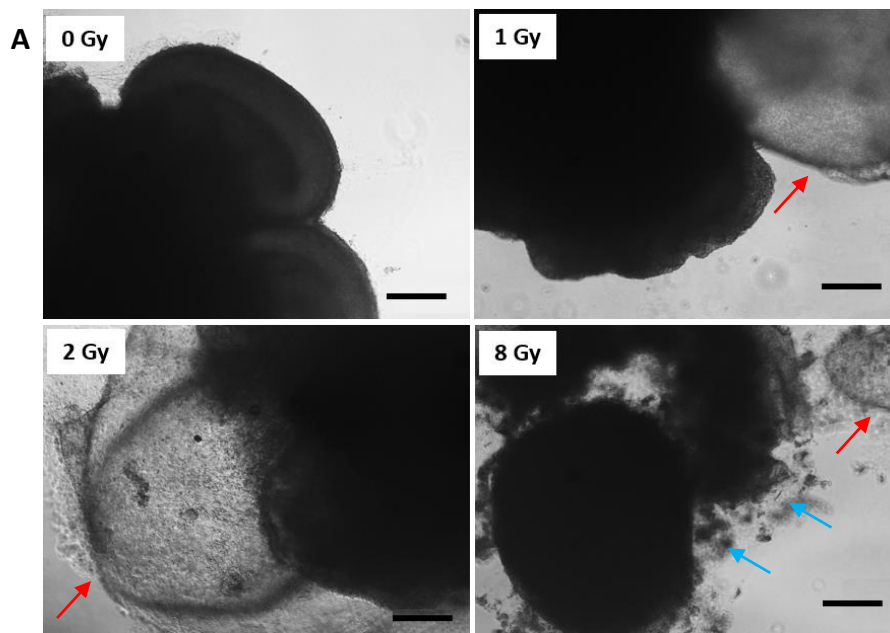


Abbildung 29: A: Aufnahmen der ZOs an d40 nach X-IR an d20 mit 1, 2 und 8 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Maßstab: 200 μ m. Zellerfall (blaue Pfeile), Kavitäten (rote Pfeile). **B:** Dosisabhängige Kavitäten-Bildung der ZOs, die an d40 - d47 der Kultivierung analysiert wurden (N = 3, n = 10). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

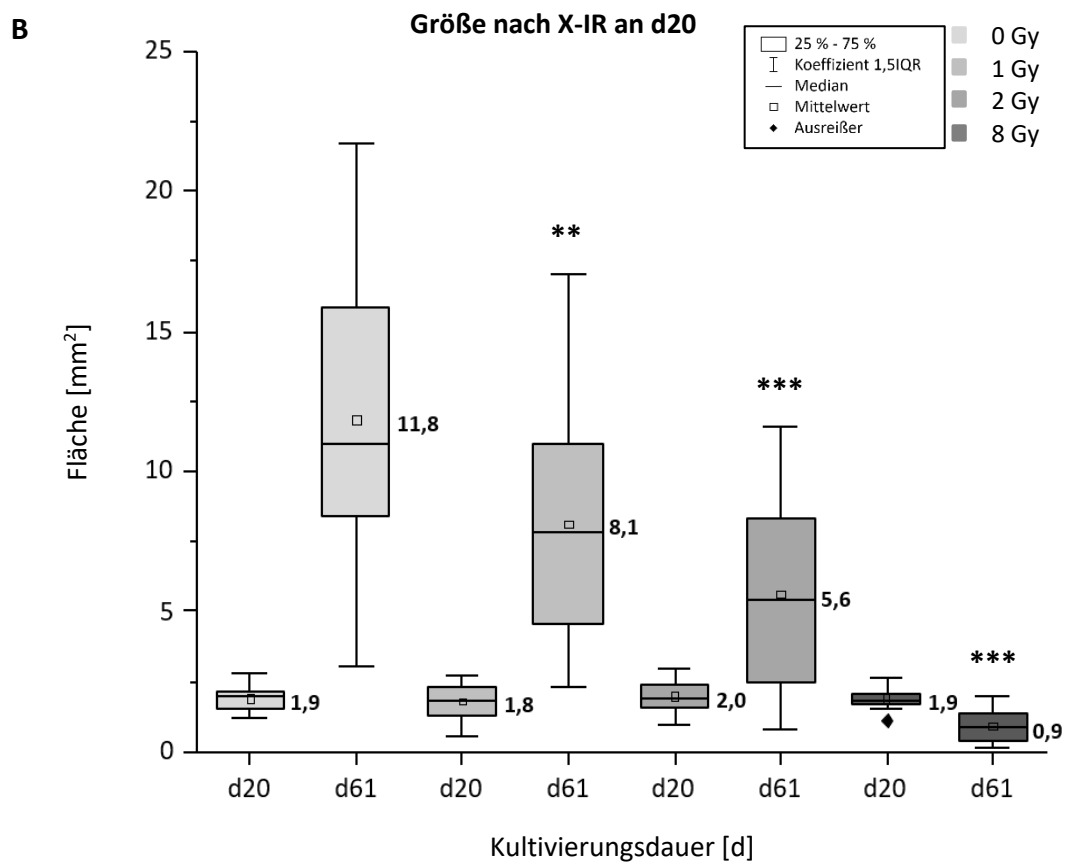
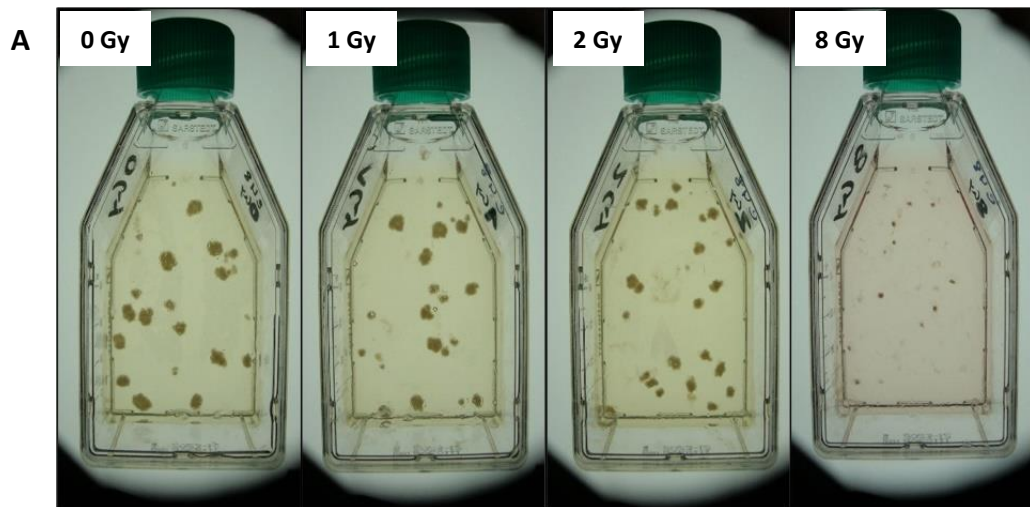


Abbildung 30: **A:** Aufnahmen der bestrahlten ZOs sowie der Kontrolle (0 Gy) in T25-Suspensionsflaschen an d61 der Kultivierung. **B:** Größenmessung der ZOs an d20 und d61 der Kultivierung nach X-IR an d20 mit 1, 2 und 8 Gy (N = 3, n = 10). ** p < 0,01, *** p < 0,001.

5.3.1.2 Molekulare Charakterisierung der Strahleneffekte

Zur detaillierten, molekularen Charakterisierung der Strahleneffekte wurden an d66 der Kultivierung mRNA- und immunzytochemische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse der mRNA-Genexpressionsanalysen nach Röntgenbestrahlung sind in Abbildung 31 dargestellt. Untersucht wurden die Expression des NSC-Markers PAX6, des neuronalen Progenitor-Markers DCX, des reifen Neuronen-Markers MAP2 sowie die Expression der glialen Marker GFAP und MBP.

Anhand der Grafik ist zu erkennen, dass die Expression von PAX6 nach einer Bestrahlung mit 1 und 2 Gy Röntgenstrahlung geringer, jedoch nach einer Exposition mit 8 Gy Röntgenstrahlung tendenziell höher als in der unbestrahlten Kontrolle ausfiel. Dieser Trend war auch für die Marker DCX und MAP2 zu erkennen. Die glialen Marker GFAP und MBP wurden in keiner der Proben exprimiert.

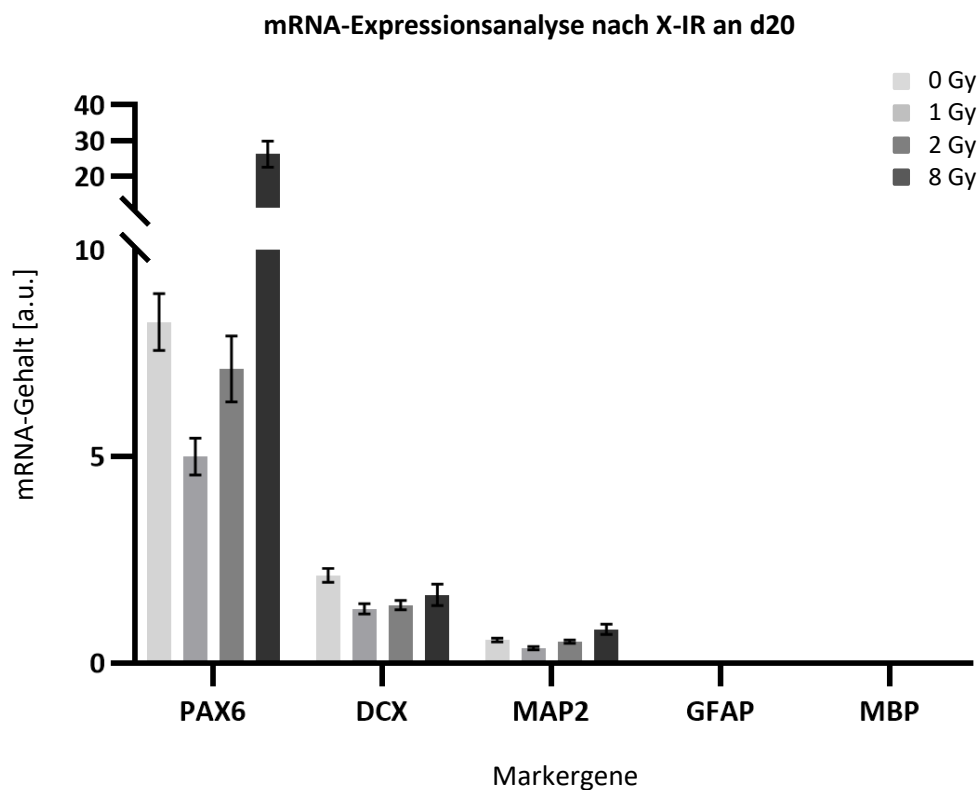


Abbildung 31: Genexpression der ZOs nach X-IR an d20 mit 1, 2 und 8 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZOs an d66 der Kultivierung (N= 3, n=3). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. Normalisiert wurde gegen das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA.

Ergänzend zu den Genexpressionsanalysen wurden, um die Wirkung von Röntgenstrahlung auf die einzelnen, neuronalen Zelltypen zu untersuchen, umfangreiche IFF angefertigt und diese hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten analysiert (s. Abbildungen 32 - 34). Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität des jeweiligen Markers gegen die Dosis. In der folgenden Abbildung 32 sind die Ergebnisse der Proteinanalysen für die neuronalen Stamm- und Vorläufermarker HOPX, PAX6 und TBR2 grafisch aufgetragen. Wie zu erkennen ist, ergaben die Analysen im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy) eine signifikante und dosisabhängige, niedrigere Expression für den oRG-Marker HOPX sowie für den intermediären Progenitor-Marker TBR2. Der NSC-Marker PAX6 hingegen wurde in den bestrahlten ZOs dosisabhängig höher exprimiert.

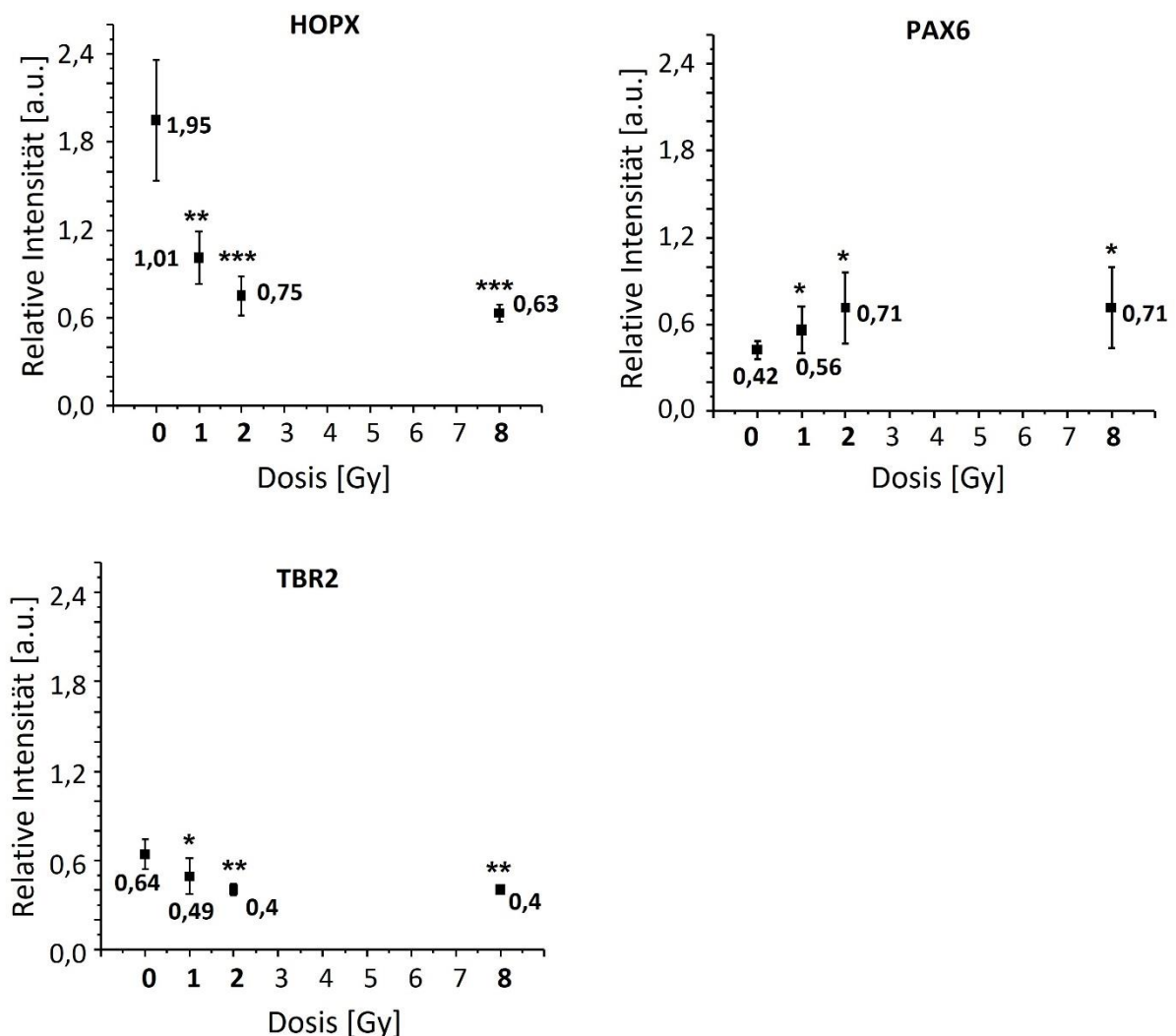


Abbildung 32: Relative Fluoreszenzintensität der neuronalen Stammzellmarker HOPX, PAX6 und des IPC-Markers TBR2 der ZOs nach X-IR an d20 mit 1, 2 und 8 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZOs an d66 der Kultivierung (N = 3, n = 1-2). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Weitere Analysen (s. Abbildung 33) hinsichtlich der Expression neuronaler Marker zeigten, dass β TUB in den exponierten ZOs und insbesondere nach einer Bestrahlung mit 8 Gy niedriger exprimiert wurde. Auch der dendritische Marker MAP2 wurde nach Bestrahlung partiell niedriger exprimiert. Der postmitotische Neuronen-Marker NeuN sowie der synaptische Marker SYP wurden gleichbleibend niedrig, SYP jedoch nach einer Bestrahlung mit 8 Gy geringer exprimiert. Darüber hinaus zeigen die in Abbildung 34 (S. 61) dargestellten Ergebnisse, dass der gliale Vorläufer-Marker A2B5 einen Expressionsanstieg bis 2 Gy aufwies und nach einer Exposition von 8 Gy stark abnahm. Der Astrozyten-Marker GFAP sowie der Oligodendrozyten-Marker MOG hingegen wurden tendenziell dosisabhängig niedriger exprimiert.

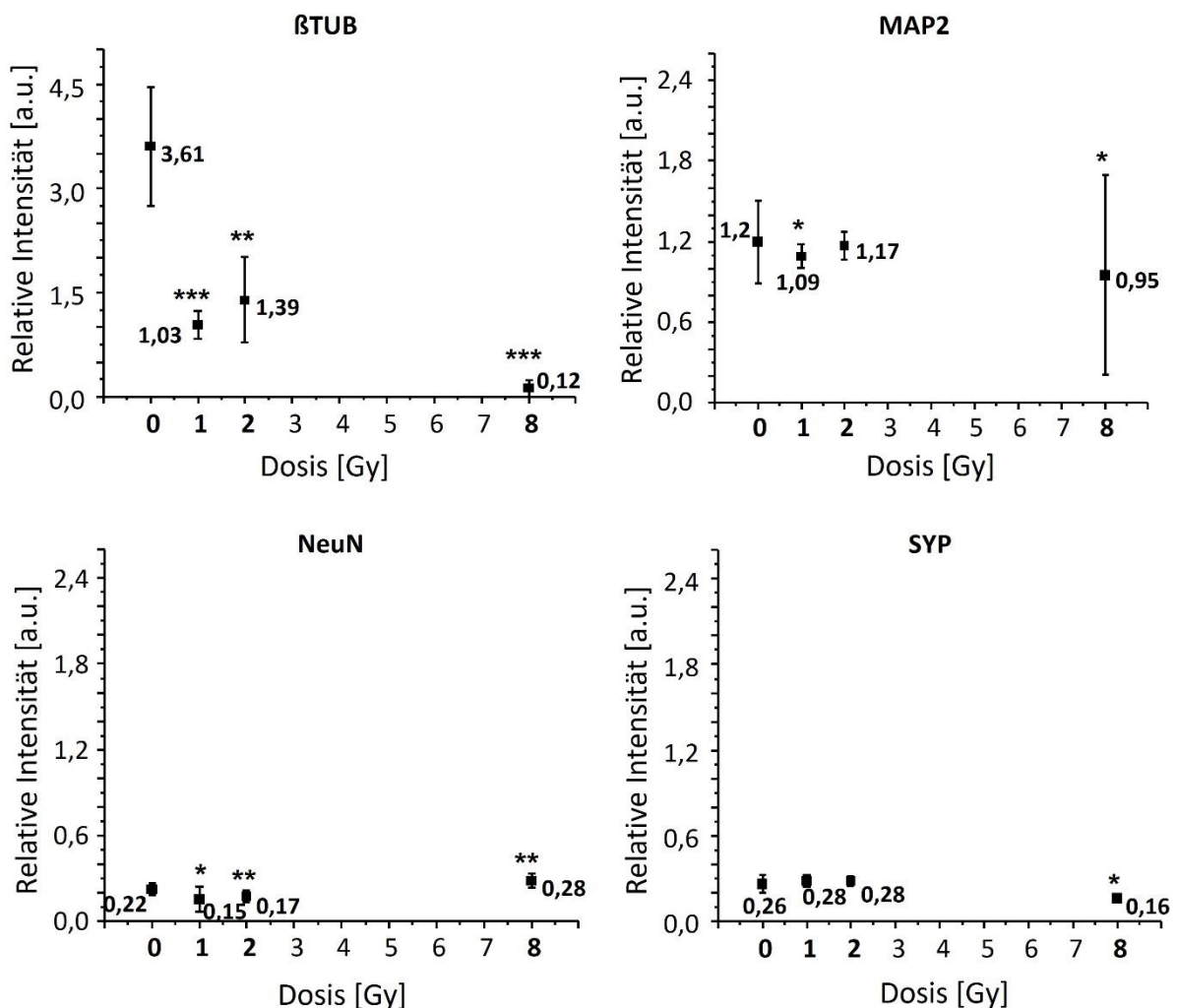


Abbildung 33: Relative Fluoreszenzintensität der neuronalen Marker β TUB, MAP2, NeuN und SYP der ZOs nach X-IR an d20 mit 1, 2 und 8 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZOs an d66 der Kultivierung (N = 3, n = 1-2). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

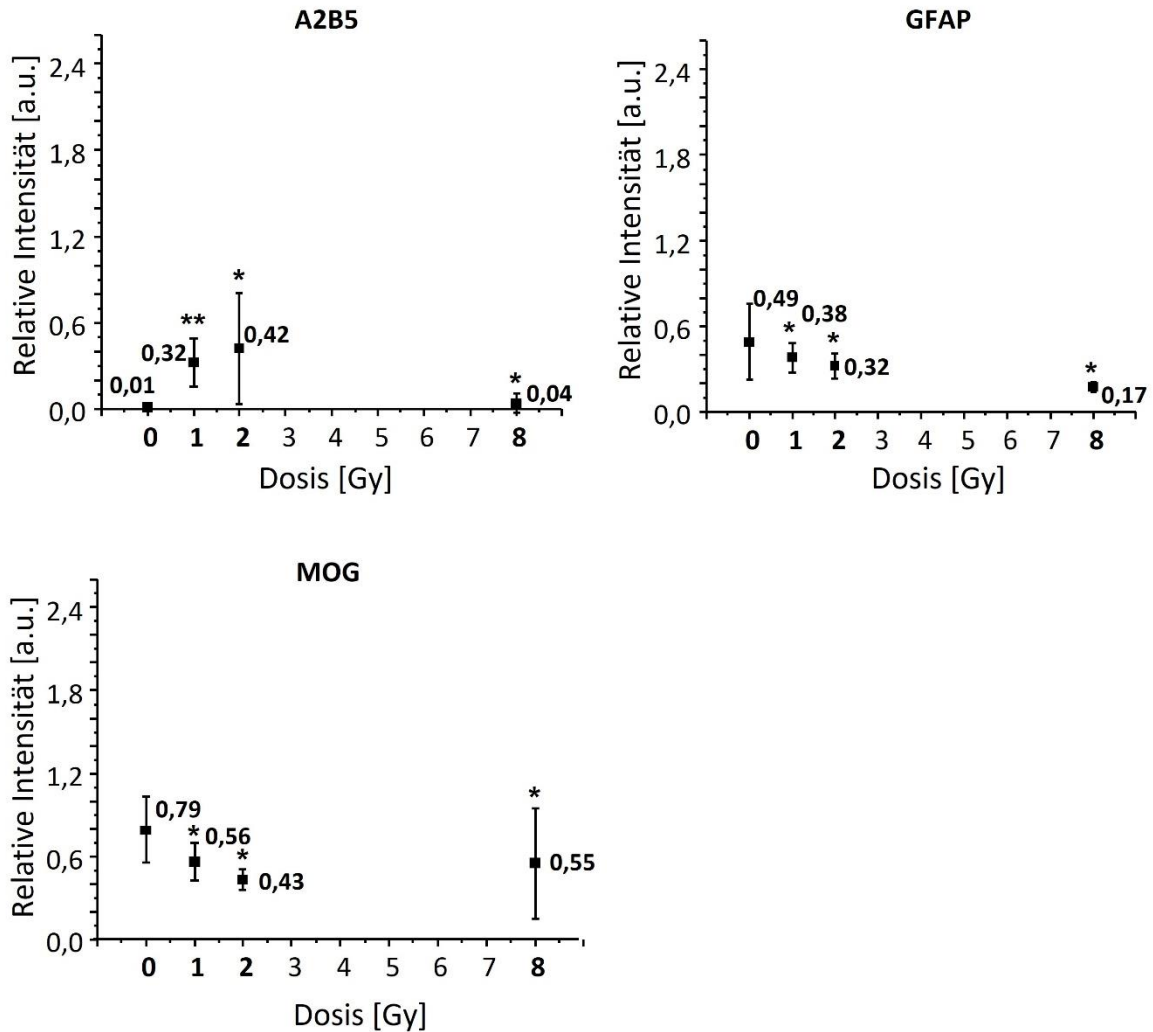


Abbildung 34: Relative Fluoreszenzintensität des glialen Progenitor-Markers A2B5 sowie der glialen Marker GFAP und MOG der ZOs nach X-IR an d20 mit 1, 2 und 8 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZOs an d66 der Kultivierung (N = 3, n = 1-2). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$.

Zusammenfassend zeigte die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten, dass eine Röntgenbestrahlung von unreifen ZOs (d20) zu einer veränderten Proteinexpression führte. Insbesondere der oRG-Marker HOPX sowie der Vorläufer-Marker TBR2 wurden dosisabhängig niedriger exprimiert, wohingegen der neurale Marker PAX6 dosisabhängig höher exprimiert wurde. Darüber hinaus wurde eine Abnahme unreifer Neurone durch die dosisabhängige, niedrigere Expression von β TUB nachgewiesen. Die reifen Neuronen-Marker NeuN, SYP sowie MAP2 wurden nach Bestrahlung partiell niedriger exprimiert. A2B5 als Marker für gliale Vorläuferzellen wurde erst nach einer Exposition mit 8 Gy geringer exprimiert, wohingegen die Expression von GFAP und MOG nach der Röntgenbestrahlung dosisabhängig niedriger ausfiel. Beispielhafte Aufnahmen, welche der Fluoreszenzmessungen zugrunde lagen, sind dem Anhang beigefügt (s. Abbildungen 65 - 66).

5.3.1.3 Quantifizierung des strahleninduzierten Zelltods (Apoptose)

Zur Quantifizierung des apoptotischen Zelltods nach Bestrahlung der ZO's an Tag 20 wurden abschließend nach 4.3.3 IFF gegen den Apoptose-Marker Caspase-3/7 vorgenommen (s. Abbildung 35) und hinsichtlich der FITC-Intensität ausgewertet. Dabei wurde gezeigt, dass die FITC-Intensität nach Bestrahlung signifikant, dosisabhängig erhöht war. Insbesondere nach einer Bestrahlung mit 8 Gy Röntgenstrahlung war die relative FITC-Fluoreszenzintensität, verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy), um ein 18-faches erhöht.

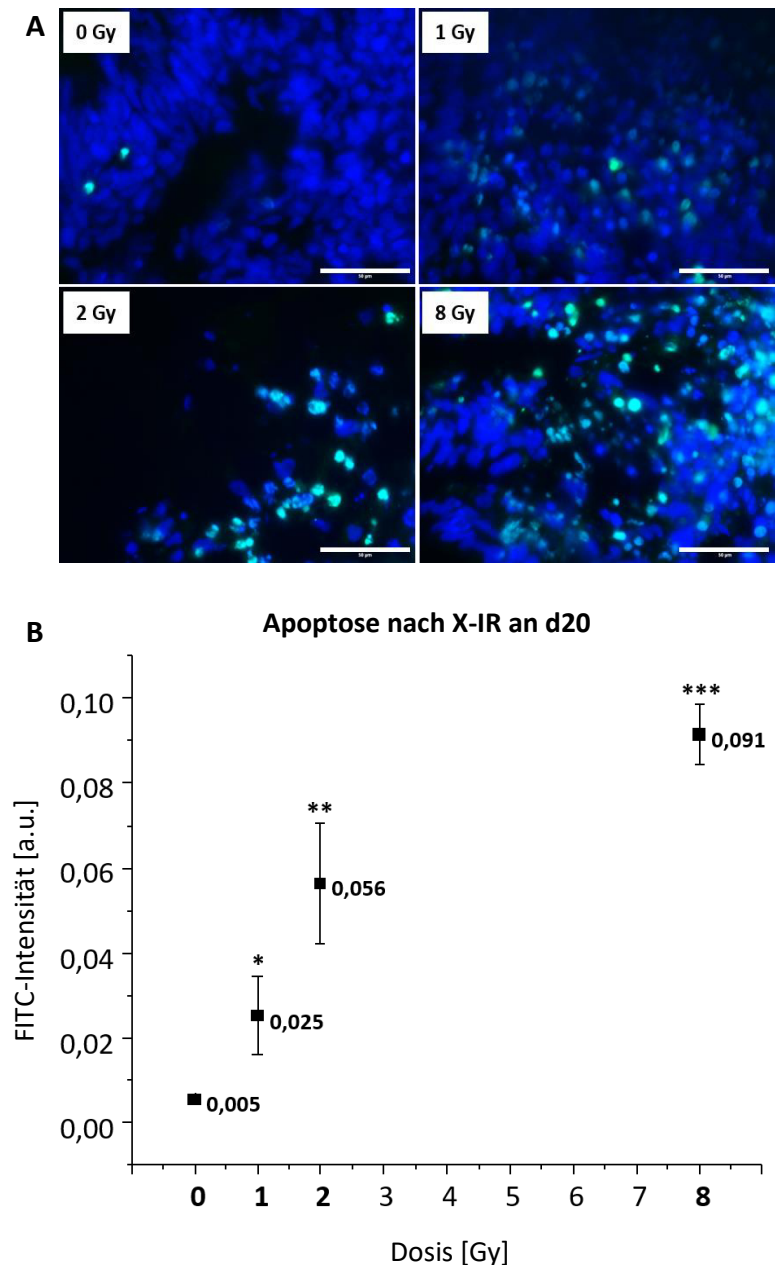


Abbildung 35: A: Beispielhafte IFF der ZO's nach X-IR an d20 mit 1, 2 und 8 Gy, die 24h p. IR mit dem CellEvent® Caspase-3/7 Green Reagenz gefärbt wurden. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Aufgenommen wurden die Detailaufnahmen mittels des Konfokalmikroskops DMI 4000B (Leica). Maßstab: 50 µm. **B:** FITC-Intensität der ZO's nach X-IR an d20 (N = 3, n = 1). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Zusammenfassend führte die Röntgenbestrahlung unreifer ZOs zu einer dosisabhängigen Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Kavitäten sowie zu einer Wachstumsinhibierung der bestrahlten ZOs. Darüber hinaus wurde 24 h p. IR. eine dosisabhängige Erhöhung der strahleninduzierten Apoptose beobachtet, welche nach einer Bestrahlung von 8 Gy mit einem messbaren Zellzerfall einherging. Die Genexpressionsanalysen indizierten zudem eine niedrigere Expression neuraler Marker im Dosisbereich von 1 - 2 Gy Röntgenstrahlung. Dies wurde durch ergänzende IFF verifiziert. Weiterhin zeigten die Proteinexpressionsanalysen, dass eine Röntgenbestrahlung nicht nur zu einer niedrigeren Expression neuraler Stamm- und Vorläuferzellen führte, sondern auch eine geringere Expression differenzierter, neuronaler und glialer Marker, insbesondere nach einer Exposition von 8 Gy, zur Folge hatte.

5.3.2 Effekte von Röntgenstrahlung auf reife ZOs

5.3.2.1 Morphologie

Um die Wirkung von Röntgenstrahlung auf die Neurogenese sowie auf die neuronalen Zellen des ZNS zu untersuchen, wurden die generierten ZOs an d80 der Differenzierung unterschiedlichen Dosen von Röntgenstrahlung (3, 10, 15 Gy) ausgesetzt und an d100 ebenfalls hinsichtlich morphologischer Veränderungen sowie mittels mRNA-Analysen und IFF untersucht.

Die Aufnahmen in der folgenden Abbildung 36A lassen erkennen, dass, im Gegensatz zu der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy), die bestrahlten ZOs ab d90 (10 Tage p. IR.) flüssigkeitsgefüllte Kavitäten ausbildeten. Darüber hinaus führte die Bestrahlung mit ≥ 10 Gy zu einem sichtbaren Zellzerfall. Die Quantifizierung der strahleninduzierten Kavitäten-Bildung ist in Abbildung 36B grafisch dargestellt. Es wurde gezeigt, dass die Kontrollen zu ~ 4 % Kavitäten ausbildeten, während die Bestrahlung mit 1 Gy zu einer Kavitäten-Bildung von ~ 18 % führte. Die mit einer Röntgenstrahlung von 10 Gy exponierte ZOs bildeten zu ~ 23 % Kavitäten aus, wohingegen die mit 15 Gy exponierten ZOs in ~ 36 % der Fälle Kavitäten aufwiesen. Zudem wurde, wie in Abbildung 37 dargestellt ist, bei der Kontrolle eine Größenzunahme von ~ 32 mm² sowie nach der Bestrahlung mit 3 Gy von ~ 25 mm² gemessen. Die mit 10 und 15 Gy bestrahlten ZOs hingegen wiesen von d80 - d100 der Kultivierung eine geringere Größenzunahme von ~ 18 bzw. ~ 14 mm² auf.

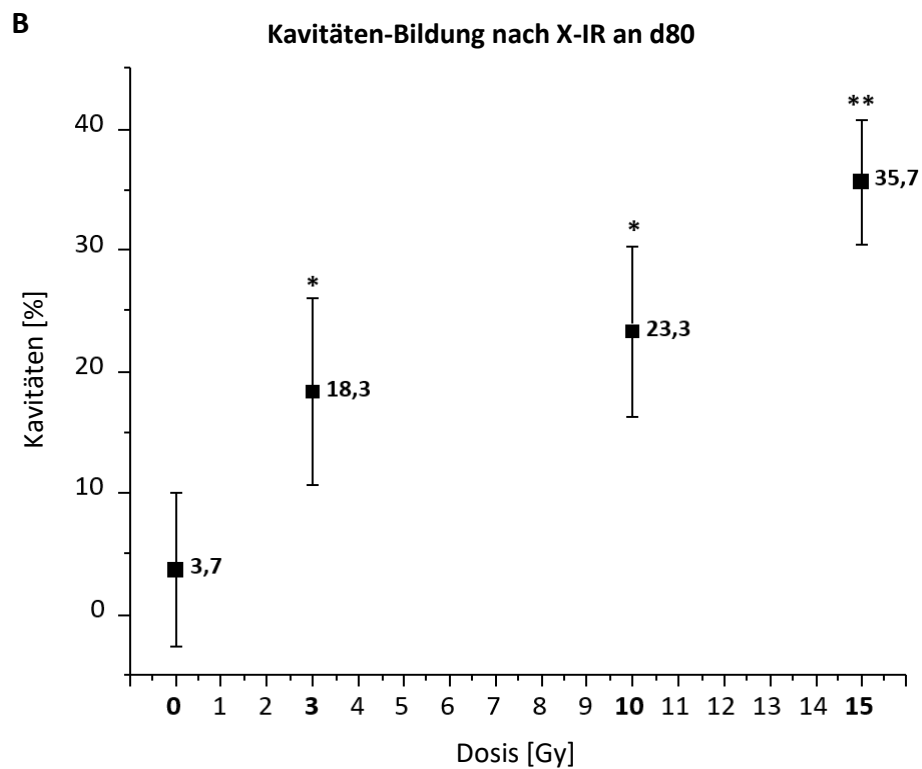
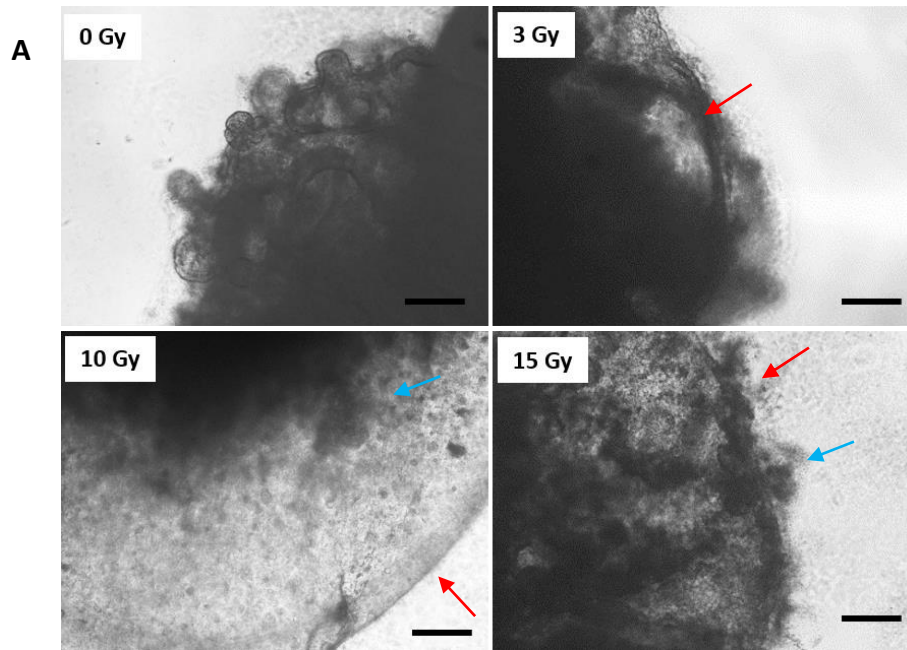


Abbildung 36: A: Aufnahmen der bestrahlten ZOs an d90 nach X-IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Maßstab: 200 μ m. Zellzerfall (blaue Pfeile), Kavitäten (rote Pfeile). **B:** Dosisabhängige Kavitäten-Bildung der ZOs, die an d90 - d100 der Kultivierung analysiert wurden (N = 3, n = 10). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$.

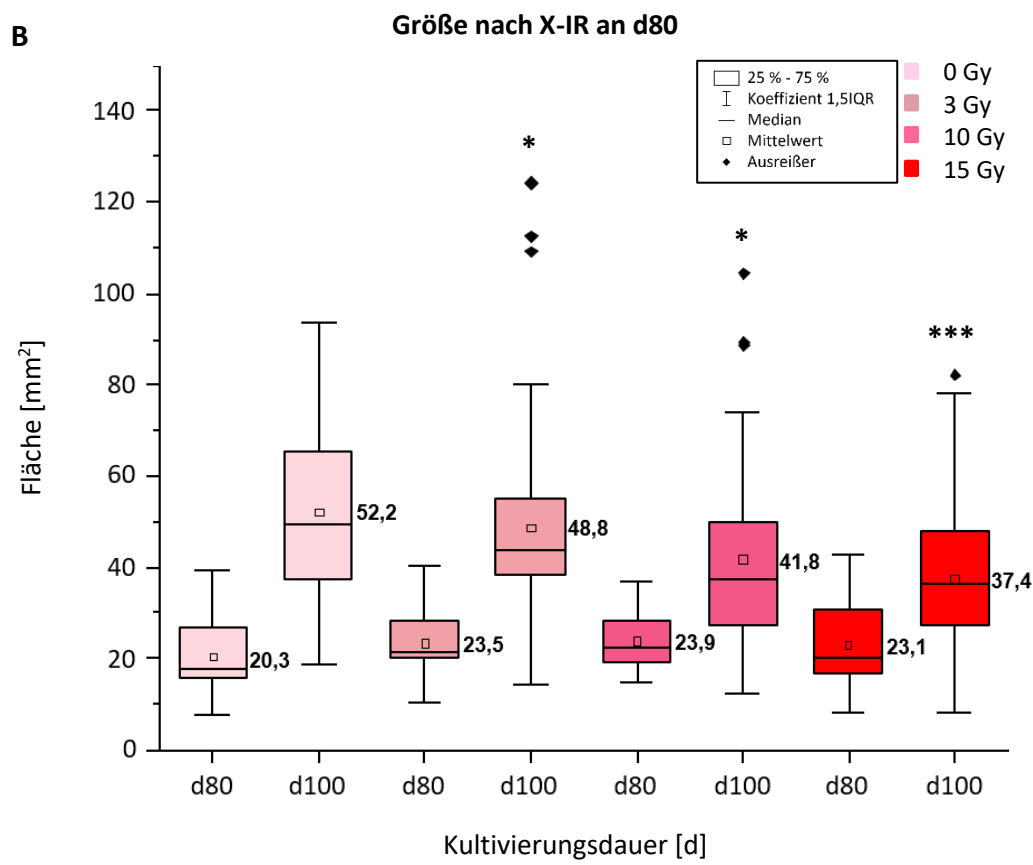
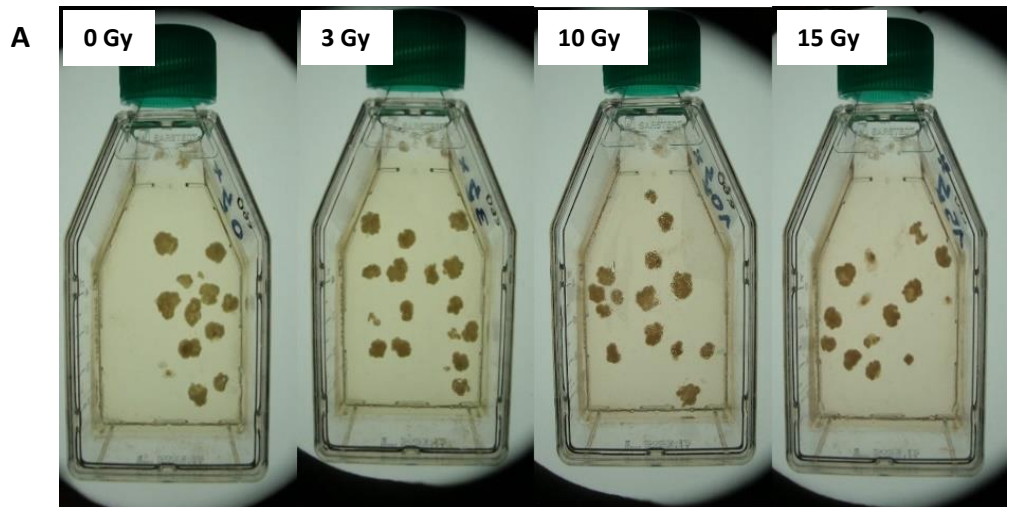


Abbildung 37: **A:** Aufnahmen der bestrahlten ZOs sowie der Kontrolle (0 Gy) in T25-Suspensionsflaschen an d100 der Kultivierung **B:** Größenmessung der ZOs an d80 und d100 der Kultivierung nach X-IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy (N = 3, n = 10). * p < 0,5, *** p < 0,001.

5.3.2.2 Molekulare Charakterisierung der Strahleneffekte

Zur detaillierten Charakterisierung der durch die Strahlung hervorgerufenen Schäden in reifen ZO_s wurden an d100 der Kultivierung mRNA-Analysen und immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Diese Ergebnisse der durchgeführten, molekularen Analysen sind in den folgenden Abbildungen grafisch dargestellt.

In der nachfolgenden Abbildung 38 sind zunächst die Ergebnisse der mRNA-Analysen dargestellt. Die Genexpression von PAX6 sowie MAP2 schwankte zwischen den unterschiedlichen Dosen und zeigte somit keinen eindeutigen Dosisseffekt innerhalb der Genexpression nach Röntgenbestrahlung an d80. DCX wurde nach einer Bestrahlung mit 1 und 2 Gy geringer exprimiert, nach einer Bestrahlung mit 8 Gy jedoch ähnlich hoch wie in der Kontrolle. GFAP wurde in allen Proben gering und MBP nicht exprimiert. Aufgrund dessen wurden, um die Auswirkungen von Röntgenstrahlung auf die einzelnen Zelltypen des ZNS genauer zu untersuchen, ergänzende IFF angefertigt und hinsichtlich der Proteinexpression analysiert. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen sind in den folgenden Abbildungen 39 - 41 auf S. 67 - S. 69 dargestellt.

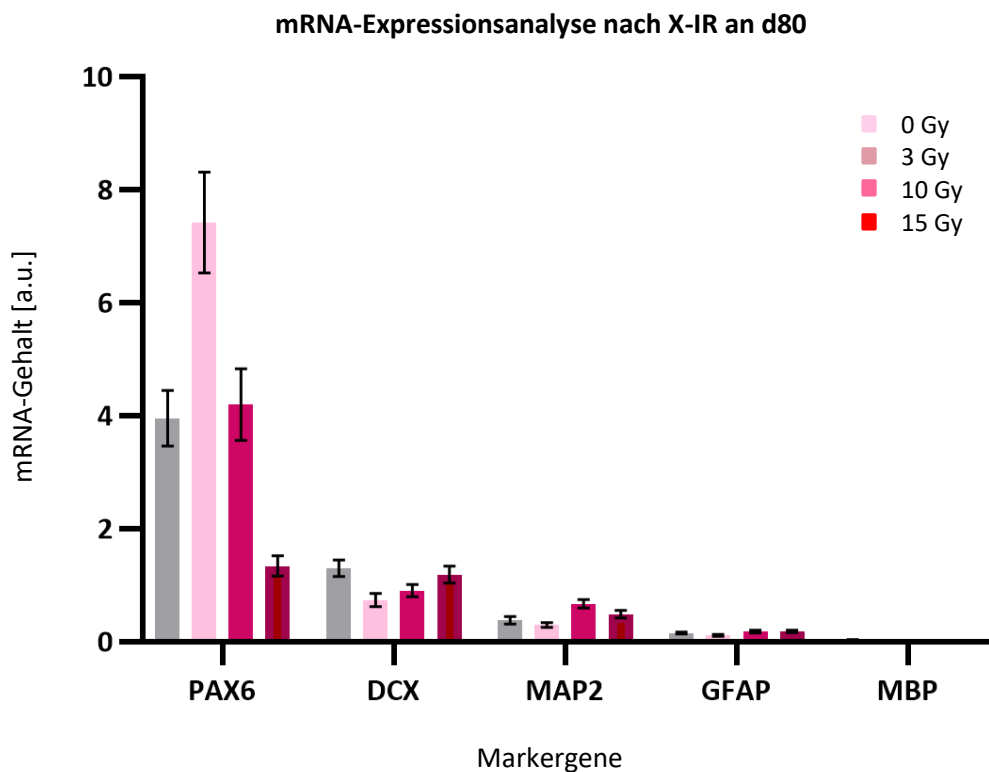


Abbildung 38: Genexpression der ZO_s nach X-IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZO_s an d100 der Kultivierung (N = 3). Die Fehlerbalken repräsentieren die ermittelte SD. Normalisiert wurde gegen das *Housekeeping*-Gen 18S-rRNA.

Wie anhand der nachfolgenden Abbildung 39 zu erkennen ist, ergaben die Fluoreszenzanalysen nach Bestrahlung mit 1 und 2 Gy im Trend eine niedrigere Expression für die Stammzell-Marker HOPX und PAX6 sowie für den Vorläufermarker TBR2. Während PAX6 nach einer Bestrahlung mit 8 Gy ebenfalls niedriger exprimiert wurde, wurden HOPX und TBR2 stärker als in der Kontrolle exprimiert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass β TUB nach Bestrahlung signifikant niedriger exprimiert, wohingegen die Marker MAP2, NeuN und SYP zwar gering aber im Trend dosisabhängig stärker exprimiert wurden als in der unbestrahlten Kontrolle (s. Abbildung 40, S. 68). Der gliale Vorläufermarker A2B5 wurde ebenfalls gering, jedoch in den bestrahlten ZOs ebenfalls höher exprimiert als in der Kontrolle, wohingegen der astrogliale Marker GFAP nach einer Bestrahlung mit 15 Gy erhöht exprimiert wurde. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung führte zudem zu einem dosisabhängigen Anstieg in der Expression von MOG (s. Abbildung 41, S. 69).

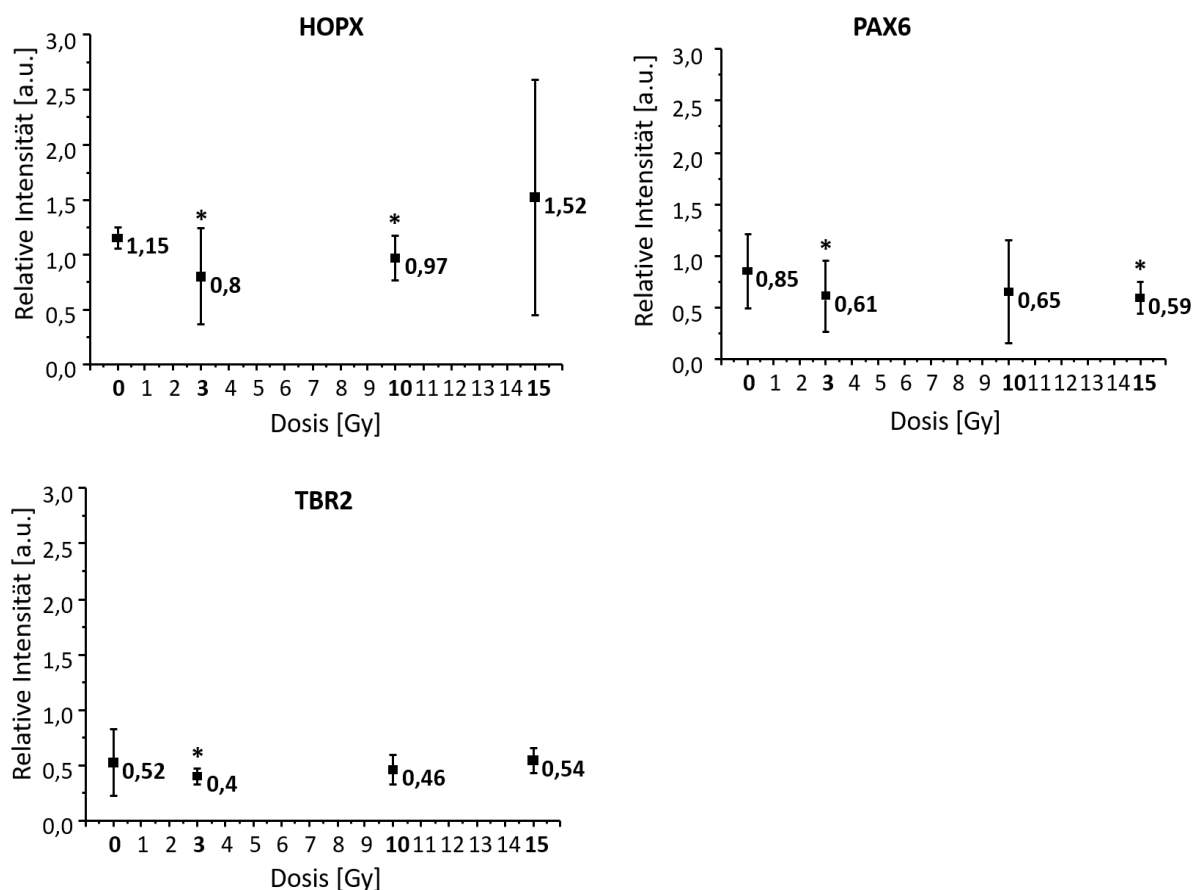


Abbildung 39: Relative Fluoreszenzintensität der neuralen Stammzellmarker HOPX, PAX6 und des IPC-Markers TBR2 der ZOs nach X-IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZOs an d100 der Kultivierung (N = 3, n = 1-2). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5.

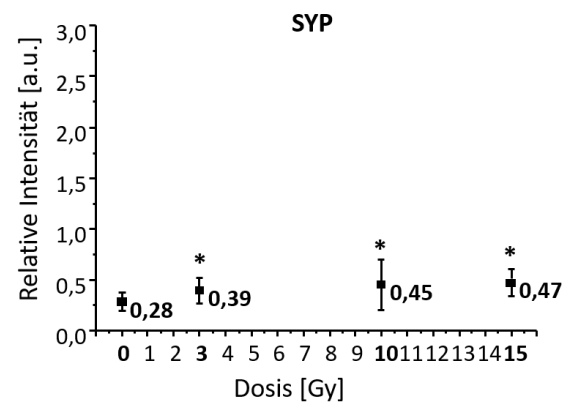
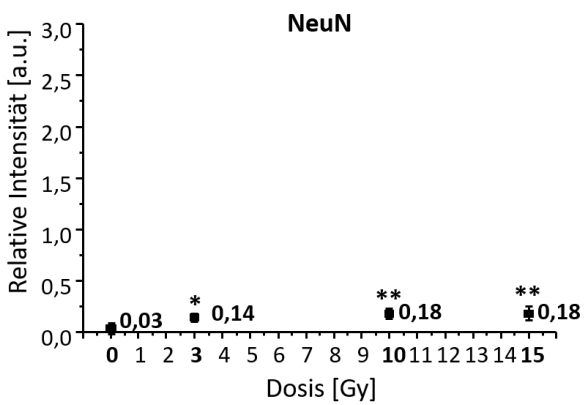
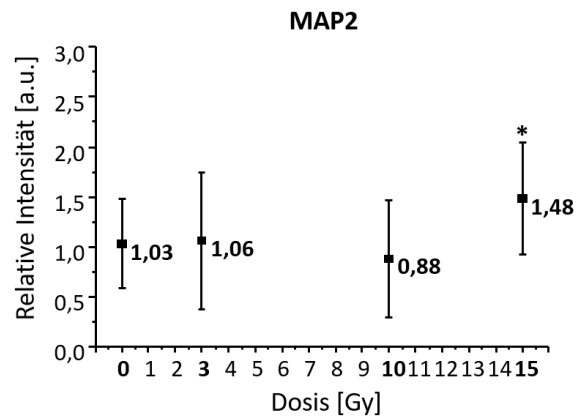
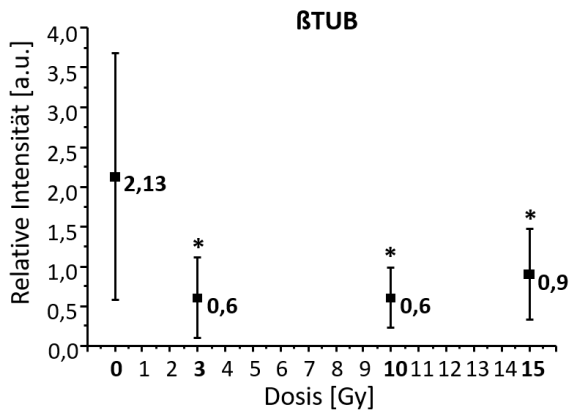


Abbildung 40: Relative Fluoreszenzintensität der neuronalen Marker β TUB, MAP2, NeuN und SYP der ZO's nach X-IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZO's an d100 der Kultivierung (N = 3, n = 1-2). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$.

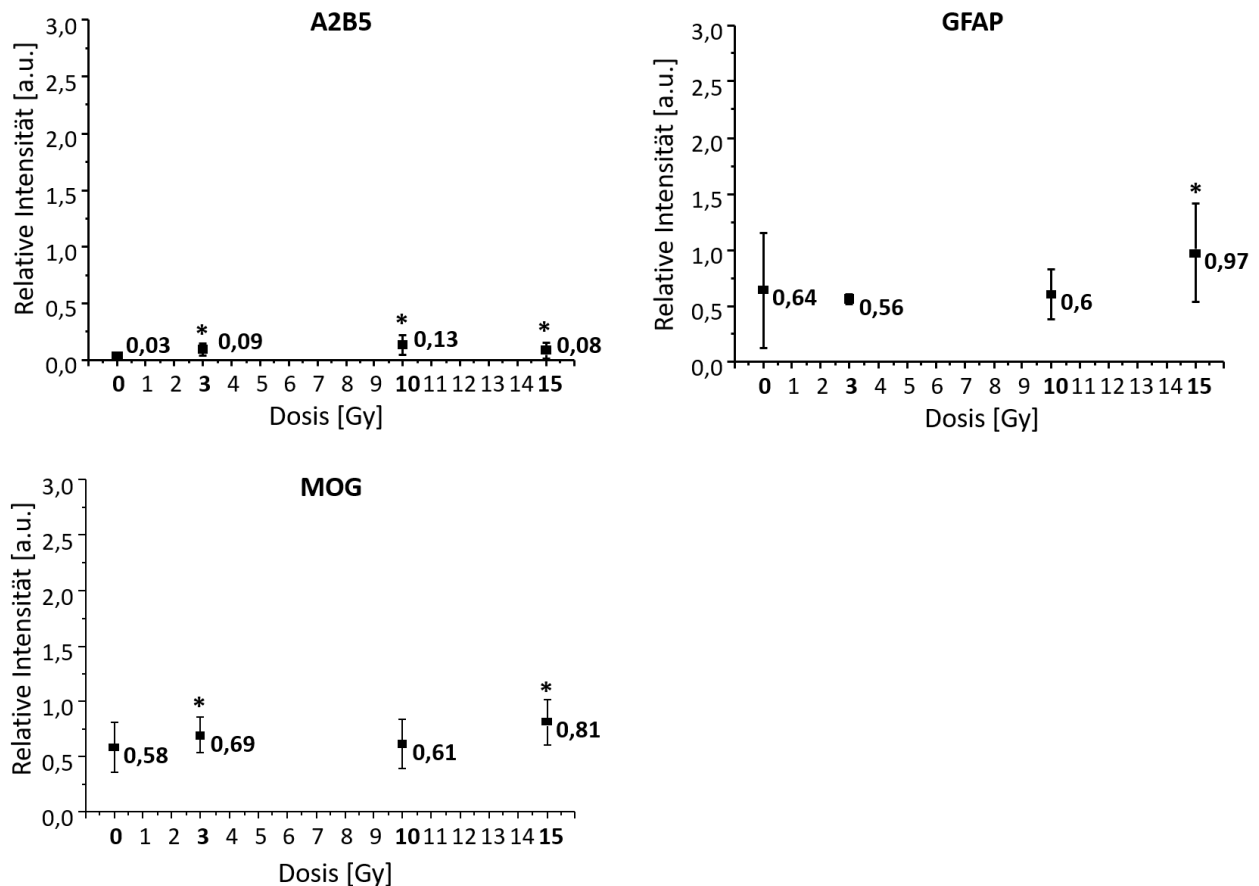


Abbildung 41: Relative Fluoreszenzintensität des glialen Progenitor-Markers A2B5 sowie der glialen Marker GFAP und MOG der ZOs nach X-IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Analysiert wurden die ZOs an d100 der Kultivierung (N = 3, n = 1-2). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,5$.

Zusammenfassend wurde anhand der durchgeführten Fluoreszenzanalysen gezeigt, dass eine Röntgenbestrahlung von reifen ZOs an d80 mit 1 und 2 Gy zu einer verminderten Expression von Markern für neurale Stamm- bzw. Vorläuferzellen führte. Darüber hinaus wurde eine strahleninduzierte, verminderte Expression unreifer β TUB-positiver Neuronen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden die reifen Neuronen-Marker NeuN und SYP nach Bestrahlung partiell stärker exprimiert. Zusätzlich führte die Bestrahlung zu einer gering erhöhten Expression glialer Vorläuferzellen sowie zu einem Expressionsanstieg von Markern für reife Gliazellen (GFAP, MOG). Somit hat die Bestrahlung an d80 der Kultivierung einen starken Effekt auf die Proteinexpression naiver Zelltypen, führt jedoch tendenziell zu einem Expressionsanstieg von Markern für reife Zelltypen. Beispielhafte IFF, welche der Fluoreszenzmessungen zugrunde lagen, sind dem Anhang beigelegt (s. Abbildungen 67 - 68).

5.3.2.3 Quantifizierung des strahleninduzierten Zelltods (Apoptose)

Zur Ermittlung des Anteils apoptotischer Zellen nach Bestrahlung der ZO's an d80 wurden zusätzlich IFF hinsichtlich des Apoptose-Markers Caspase-3/7 durchgeführt. Die Ergebnisse sind der nachfolgenden Abbildung 42 zu entnehmen. Mittels der Fluoreszenzanalysen wurde eine erhöhte, dosisabhängige Apoptose innerhalb der bestrahlten ZO's nachgewiesen. Dabei stieg die FITC-Intensität, im Vergleich zu der Kontrolle, nach der Bestrahlung mit 15 Gy um ein $\sim 1,6$ -faches an.

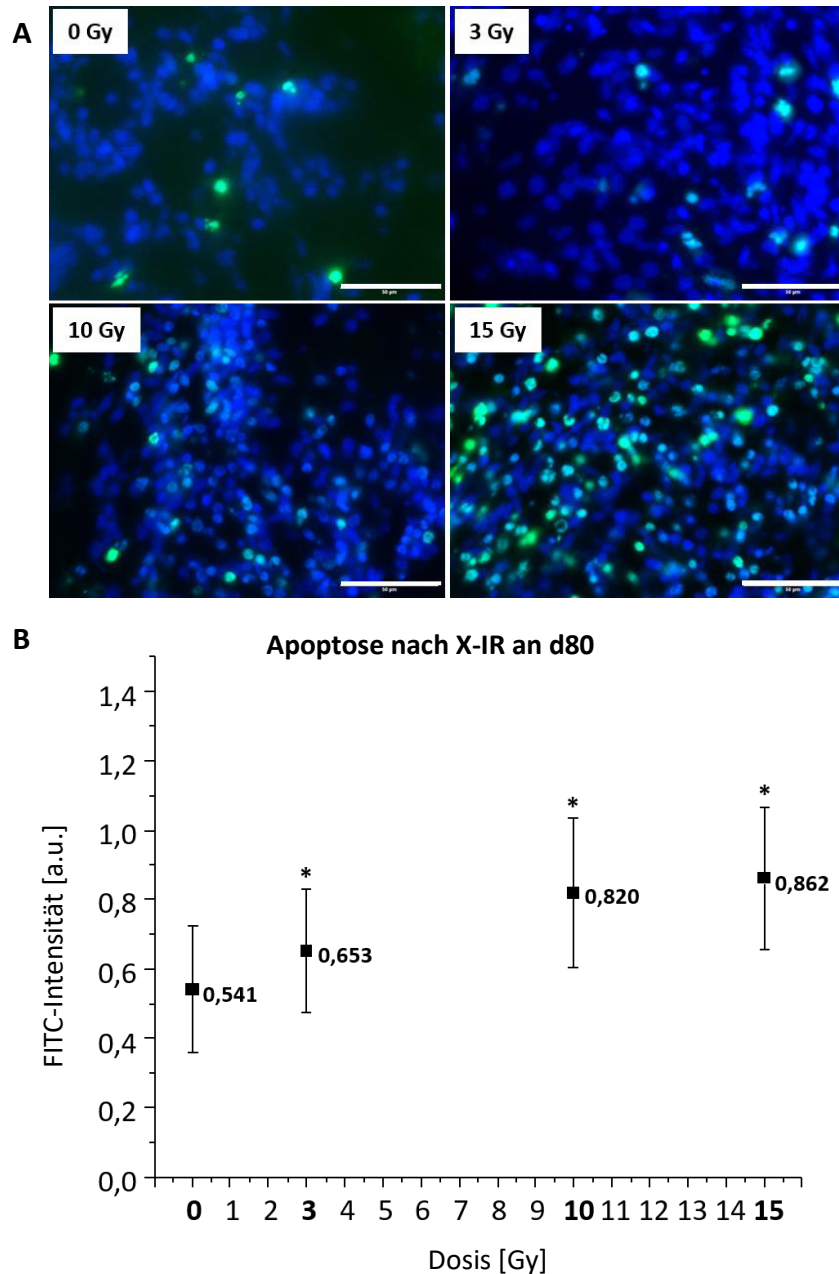


Abbildung 42: A: Beispielhafte IFF der ZO's nach X-IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy, die 24h p. IR mit dem *CellEvent® Caspase-3/7 Green* Reagenz gefärbt wurden. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Aufgenommen wurden die Detailaufnahmen mittels des Konfokalmikroskops DMI 4000B (Leica). Maßstab: 50 µm. **B:** FITC-Intensität der an d80 mit 3, 10 und 15 Gy X-bestrahlten ZO's (N = 3, n = 1). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5.

Die morphologischen und molekularen Analysen der bestrahlten, reifen ZOs zeigten somit, dass eine Röntgenbestrahlung an d80 der Kultivierung mit einer dosisabhängigen Kavitäten-Bildung und Wachstumsinhibierung einherging. Zudem wiesen die molekularen Analysen einen Effekt von Röntgenstrahlung auf die Proteinexpression der ZOs auf. Dies äußerte sich in einer verminderten Expression neuraler Stamm- und Vorläuferzellen sowie in einer tendenziell erhöhten Expression reifer, neuronaler und glialer Zelltypen. Darüber hinaus führte eine Exposition mit Röntgenstrahlung im Dosisbereich von 3 - 15 Gy zu einem dosisabhängig erhöhten Apoptose-Index.

5.3.3 Vergleich der Effekte von Röntgenstrahlung auf un-/reife ZOs

Um die Strahlensensitivität unreifer und reifer ZOs zu vergleichen, wurde im Folgenden ein Vergleich zwischen den Analysen der an d20 und d80 mit Röntgenstrahlung exponierten ZOs gezogen. Die vergleichenden Abbildungen sind auf den nachfolgenden Seiten 72 - 75 dargestellt. Wie anhand von Abbildung 43 zu erkennen ist, bildeten die unreifen, bestrahlten ZOs, trotz niedrigerer Dosen, mehr als doppelt so oft Kavitäten aus als die reifen, bestrahlten ZOs. Während nach einer Röntgenbestrahlung an d20 mit der maximalen Dosis von 8 Gy etwa 77 % der ZOs Kavitäten ausbildeten, führte eine Bestrahlung an d80 mit der höchsten Dosis von 15 Gy zu einer Kavitäten-Bildung in nur 36 % der bestrahlten ZOs. Darüber hinaus war, wie in Abbildung 44 dargestellt ist, der Strahleneffekt auf das Wachstum der ZOs stärker, wenn die ZOs an d20 statt an d80 exponiert wurden. Während die Exposition an d20 mit 8 Gy zu einem Zellzerfall von 1 mm² führte, wurde das Wachstum der an d80 mit 15 Gy bestrahlten ZOs nur um etwa die Hälfte reduziert. Ein Vergleich der strahleninduzierten Apoptose zeigte zudem, dass, nach der Normierung auf die jeweilige Kontrolle, in den an d80 mit 15 Gy Röntgenstrahlung exponierten ZOs um ein 10-faches weniger Apoptose induziert wurde als in den an d20 mit 8 Gy exponierten ZOs. Die in Abbildung 46 und Abbildung 47 gezeigten, vergleichenden Proteinanalysen belegten zudem, dass nach einer Bestrahlung an d20 insbesondere neurale Stamm- und Vorläufer-Marker niedriger exprimiert wurden, wohingegen reife Nerven- und Gliazell-Marker nach einer Bestrahlung an d80 der Kultivierung sogar partiell höher exprimiert wurden. Somit wurde zusammenfassend gezeigt, dass eine Röntgenbestrahlung unreifer ZOs an d20 der Kultivierung, trotz niedrigerer Dosen, einen stärkeren Strahleneffekt auf die Morphologie, den strahleninduzierten Zelltod und die Expression neuraler Marker hatte, als die Bestrahlung reifer ZOs an d80.

Kavitäten nach X-IR an d20 vs. d80

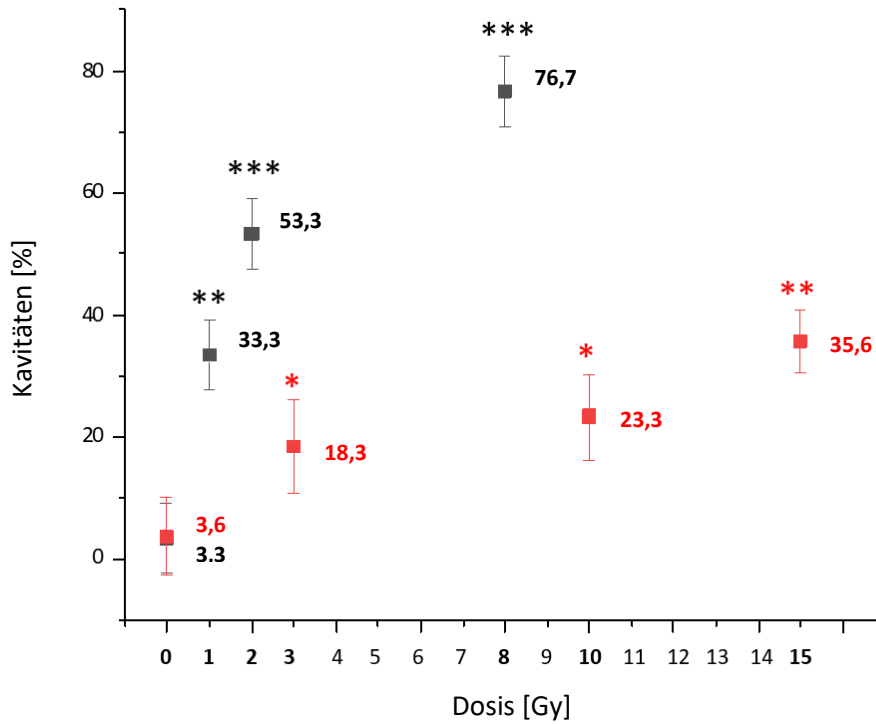


Abbildung 43: Vergleichende Grafik der Kavitäten-Bildung nach X-IR an d20 und d80 (N = 3, n = 10). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Größe nach X-IR an d20 vs. d80

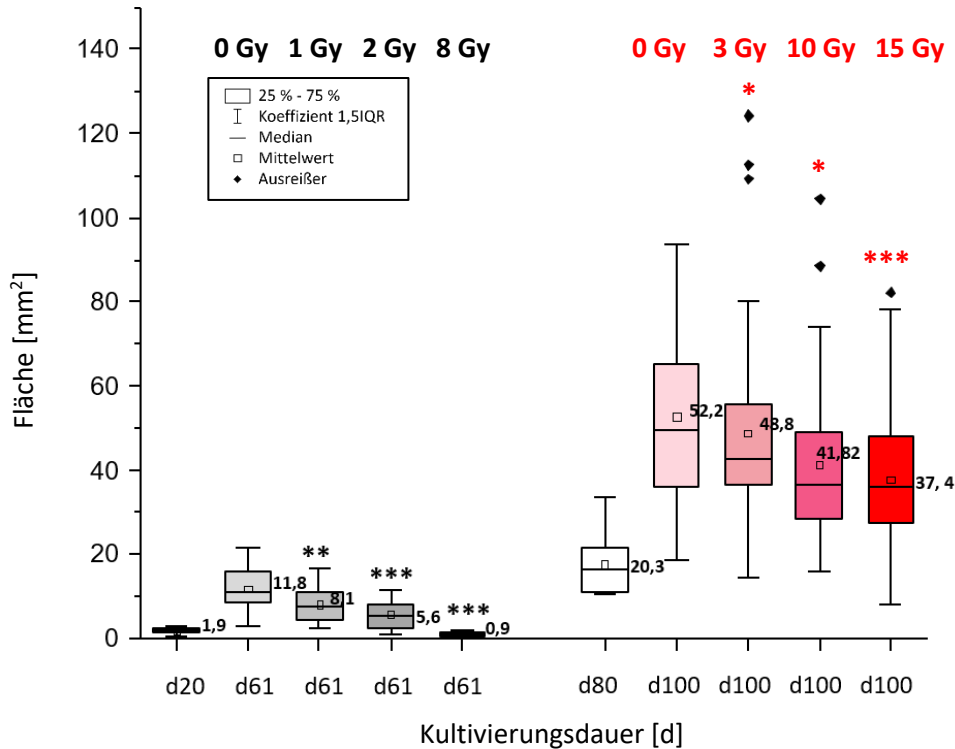


Abbildung 44: Vergleichende Grafik der Wachstumsinhibierung nach X-IR an d20 und d80 (N = 3, n = 10). * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Apoptose nach X-IR an d20 vs. d80

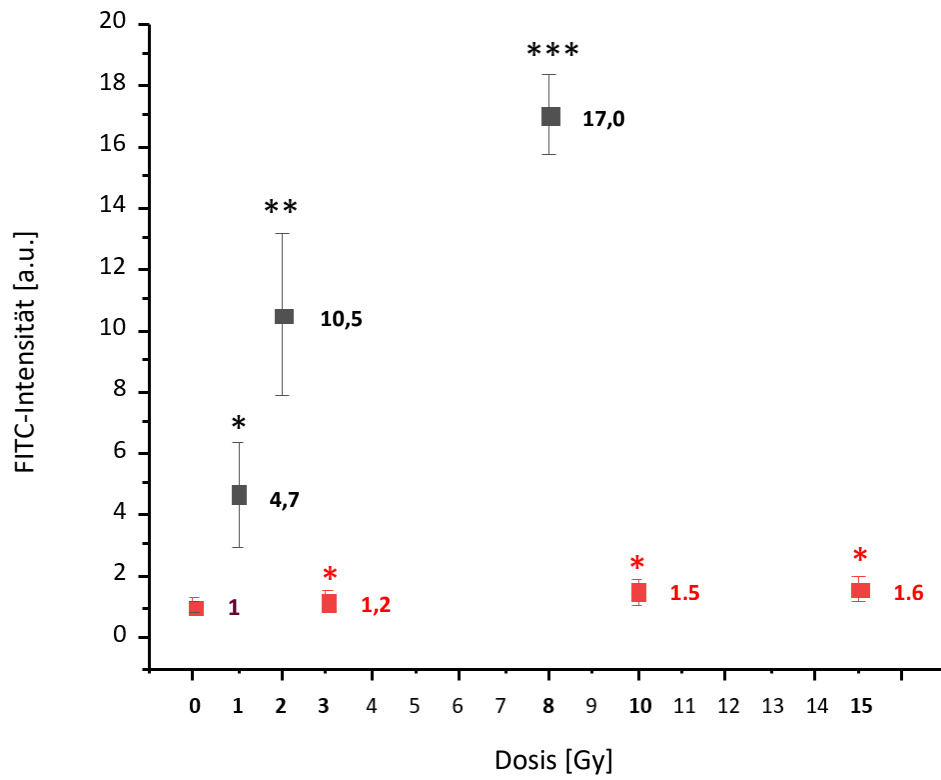


Abbildung 45: Vergleichende Grafik der FITC-Intensität nach X-IR an d20 und d80 (N = 3, n = 1). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Normiert wurde jeweils auf die unbestrahlte Kontrolle (0 Gy).

Proteinexpression nach X-IR an d20 vs. d80

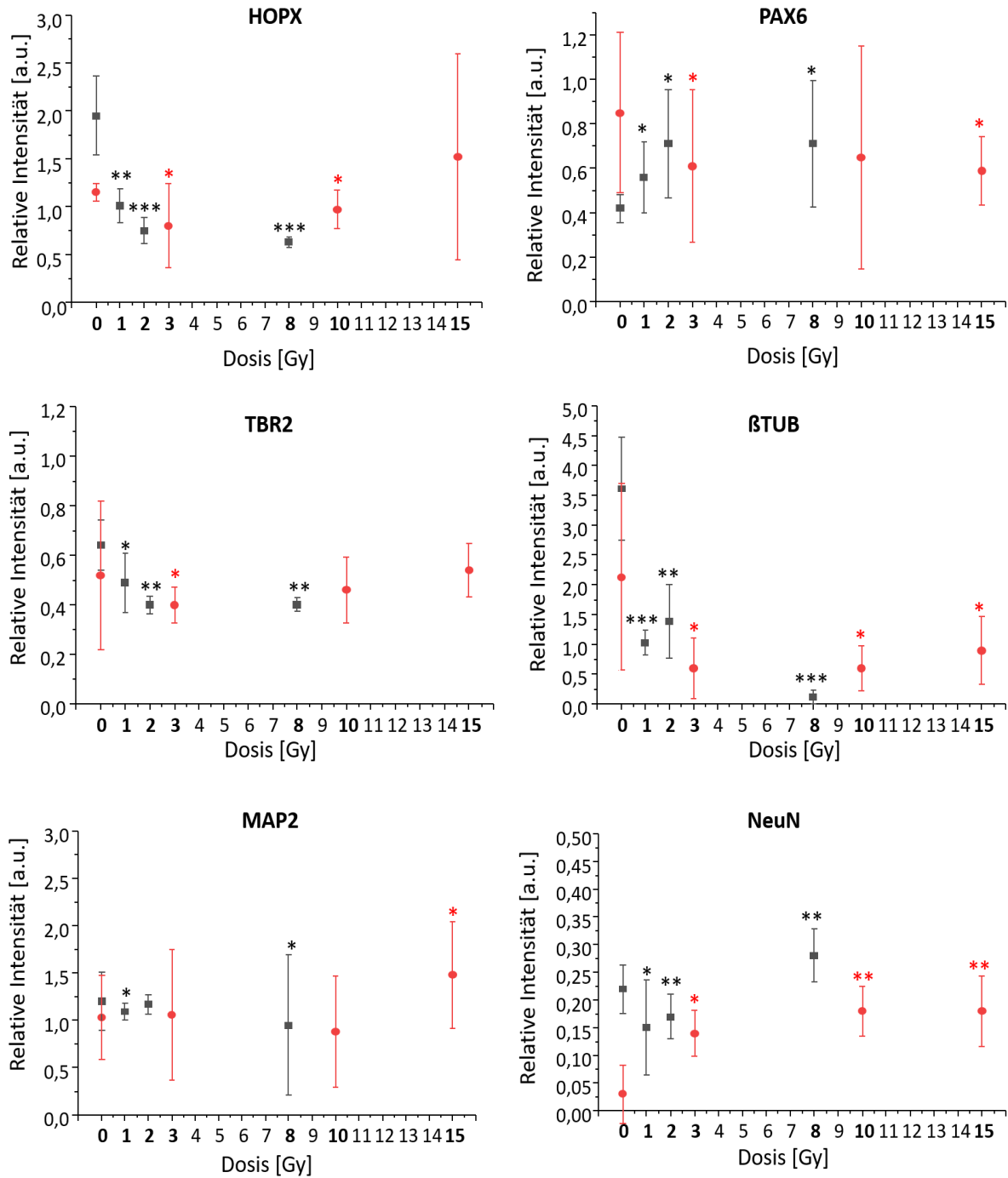


Abbildung 46: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten der Marker HOPX, PAX6, TBR2, βTUB, MAP2 und NeuN der ZO's nach X-IR an d20 und an d80. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Proteinexpression nach X-IR an d20 vs. d80

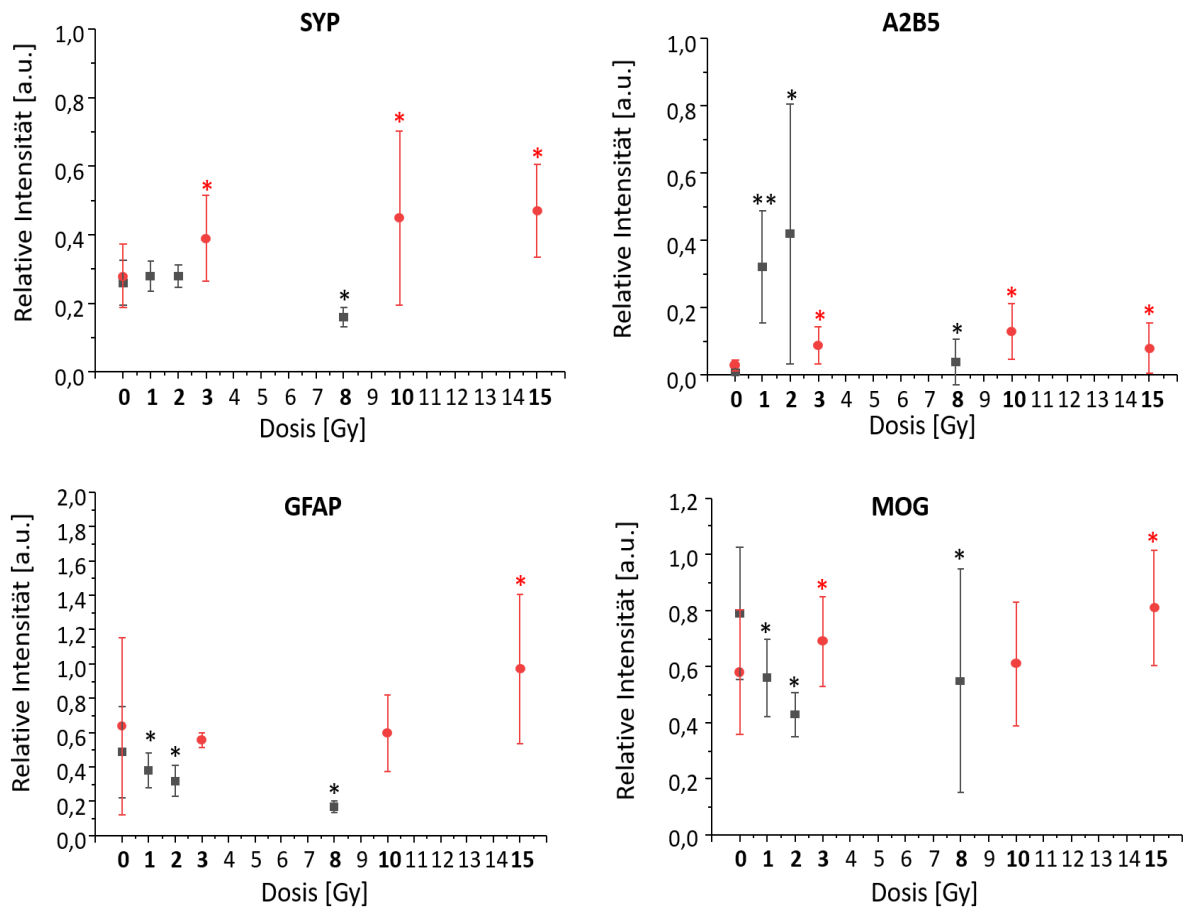


Abbildung 47: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten der SYP, A2B5, GFAP und MOG der ZOs nach X-IR an d20 und an d80. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4 Effekte von Partikelstrahlen auf ZOs

Aufgrund der effizienteren Bestrahlung ist die Zahl von Hirntumorpatienten, die mit Kohlenstoffionen und Protonen behandelt wurden, in den letzten Jahren stetig gestiegen [114], weswegen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste Versuche zur Untersuchung der Effekte von Partikelbestrahlung auf die Morphologie un-/reifer ZOs durchgeführt wurden. Zunächst werden unter Absatz 5.4.1 die Ergebnisse der Effekte einer ^{12}C -Bestrahlung auf unreife ZOs dargelegt, worauf unter Absatz 5.4.2 die Ergebnisse zu den Auswirkungen einer ^1H -Bestrahlung auf reife ZOs folgen. Ein abschließender Vergleich der Effektivität von Röntgen- und Partikelstrahlung ist unter Absatz 5.4.3 dargestellt.

5.4.1 Effekte von Kohlenstoffionen auf unreife ZOs

Um potenzielle Effekte einer ^{12}C -Exposition auf die neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden die generierten ZOs an d20 der Kultivierung mit 0,5, 1 und 4 Gy Kohlenstoffionen im 40 mm SOBP (LET: 50-105 keV/ μm) bestrahlt und hinsichtlich strahleninduzierter, morphologischer Abnormalitäten im Kultivierungszeitraum von d40 - d61 analysiert.

5.4.1.1 Morphologie

Wie anhand der nachfolgenden Abbildung 48A zu erkennen ist, bildeten die bestrahlten ZOs, im Gegensatz zu der Kontrolle, innerhalb von rund 3 Wochen (d40) flüssigkeitsgefüllte Kavitäten aus. Dabei wurde, wie in Abbildung 48B dargestellt, ein Dosiseffekt beobachtet. Während in der unbestrahlten Kontrolle 5 % der ZOs Kavitäten ausbildeten, bildeten nach einer Exposition mit 0,5 Gy Kohlenstoffionen bereits 35 % der ZOs Kavitäten aus. Eine Bestrahlung mit 1 Gy führte zu einer Kavitäten-Bildung von 55 %, wohingegen die Bestrahlung mit 4 Gy zu einer Kavitäten-Bildung in 65 % der ZOs führte. Darüber hinaus wurde eine strahleninduzierte Wachstumsinhibierung beobachtet (s. Abbildung 49, S. 78). Dabei zeigten die unbestrahlten ZOs im Zeitraum von etwa 6 Wochen ein Flächenwachstum von $\sim 14 \text{ mm}^2$, wohingegen die mit 0,5 Gy exponierten ZOs ein Wachstum von $\sim 9 \text{ mm}^2$ aufwiesen. Die mit 1 Gy bestrahlten ZOs wiesen ein Wachstum von $\sim 7 \text{ mm}^2$ auf wobei die mit 4 Gy bestrahlten ZOs nur um $\sim 2 \text{ mm}^2$ in der Fläche wuchsen. Somit wurde nach der ^{12}C -Bestrahlung an d20 der Kultivierung ein dosisabhängiger Strahleneffekt hinsichtlich des Auftretens morphologischer Abnormalitäten beobachtet.

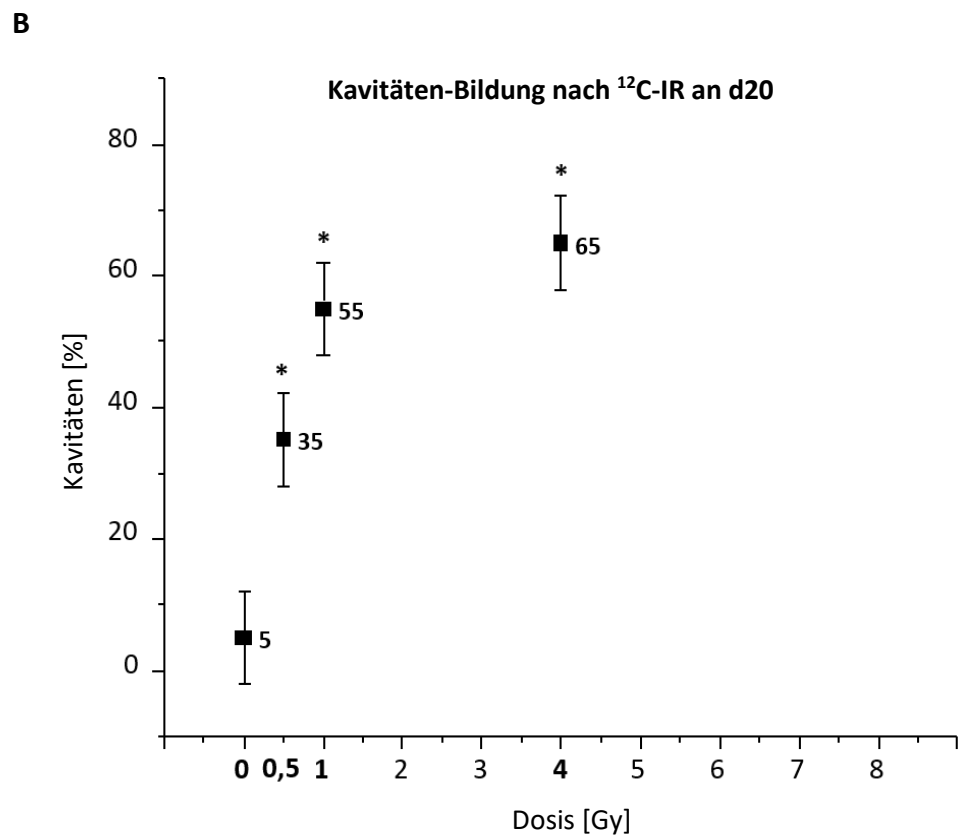
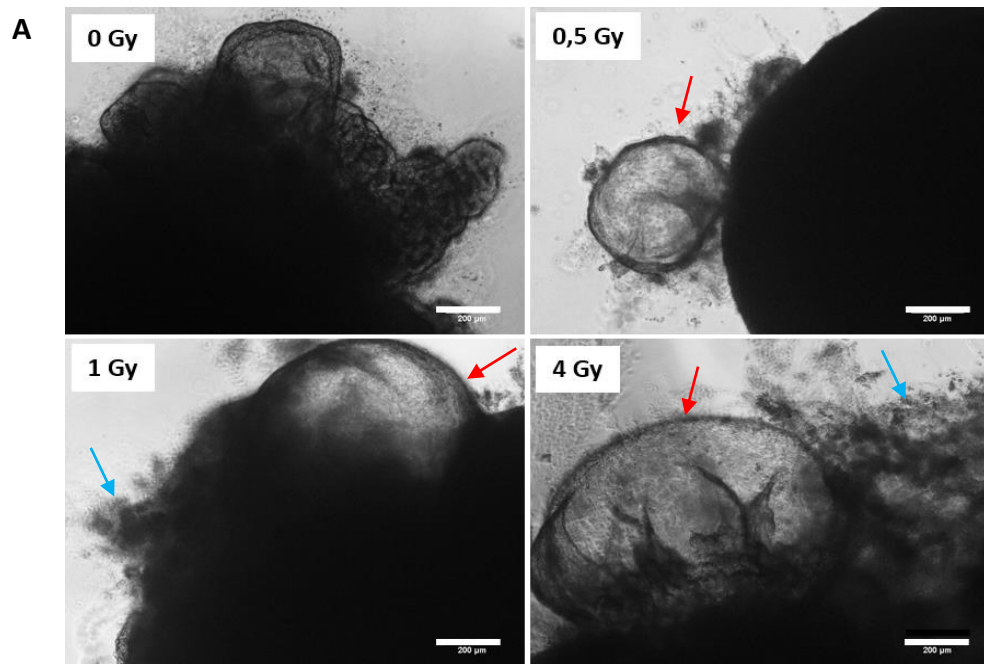


Abbildung 48: A: Aufnahmen der bestrahlten ZOs an d40 nach ^{12}C -IR an d20 mit 0,5, 1 und 4 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Maßstab: 200 μm . Zellerfall (**blaue Pfeile**), Kavitäten (**rote Pfeile**). **B:** Dosisabhängige Kavitäten-Bildung der ZOs, die an d40 - d47 der Kultivierung analysiert wurden (N = 2, n = 10). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,05$.

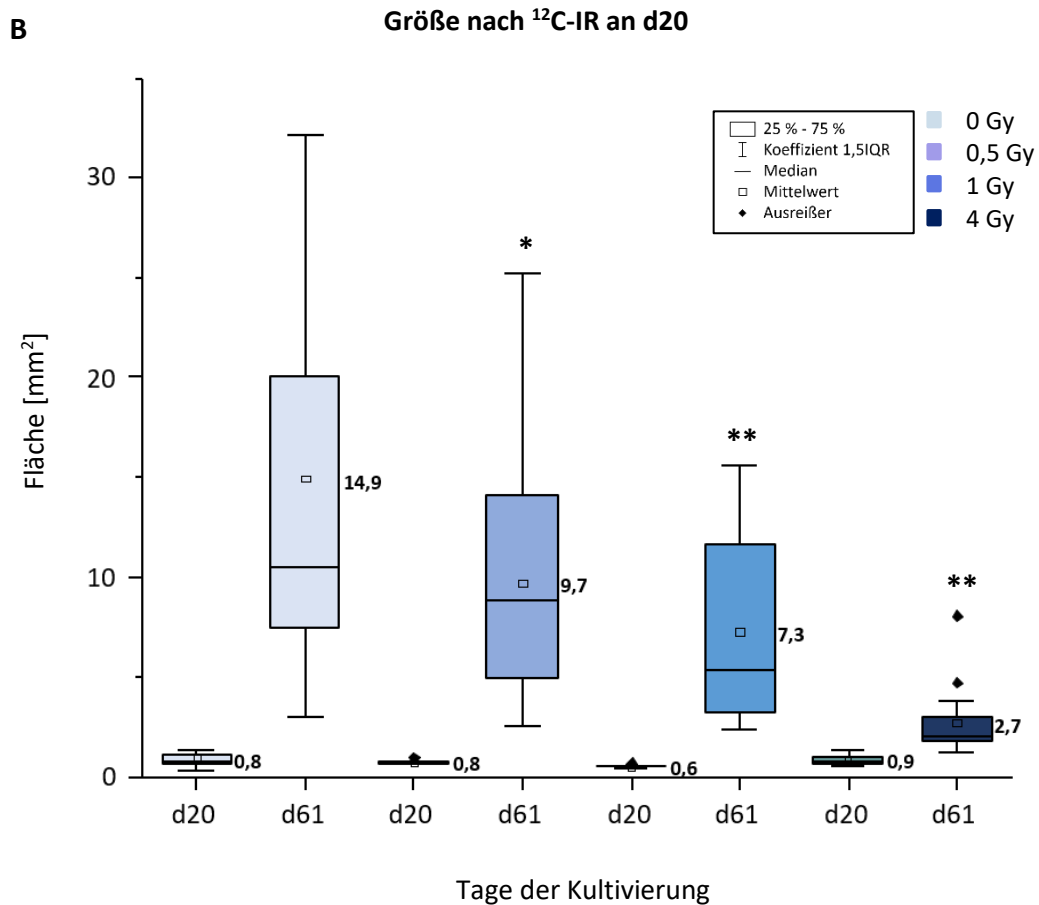
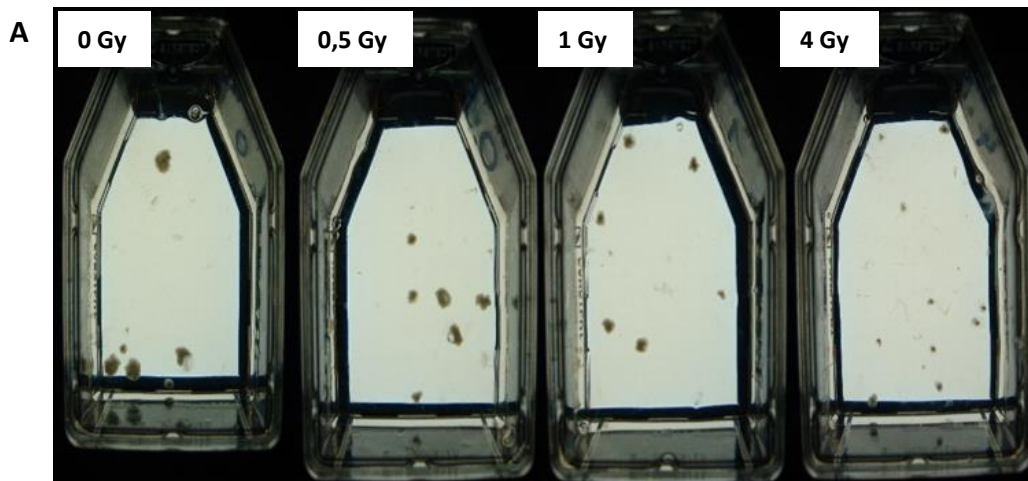


Abbildung 49: **A:** Aufnahmen der bestrahlten ZOs sowie der Kontrolle (0 Gy) in T25-Suspensionsflaschen an d61 der Kultivierung. **B:** Größenmessung der ZOs an d20 und d61 der Kultivierung nach ^{12}C -IR an d20 mit 0,5, 1 und 4 Gy (N = 2, n = 10). * p < 0,5, ** p < 0,01.

5.4.2 Effekte von Protonenstrahlen auf reife ZOs

Um die Effekte einer ^1H -Bestrahlung auf reife ZOs zu untersuchen, wurden diese an d80 der Kultivierung mit 3, 10 und 15 Gy Protonen bestrahlt und an d100 ebenfalls hinsichtlich morphologischer Veränderungen untersucht. Zur Untersuchung der Effekte verschiedener Strahlenmodalitäten wurden ZOs entweder im 30 mm SOBP, welches dem bestrahlten Tumervolumen entspricht, oder in der Plateauphase (PL), die der Exposition des Normalgewebes entspricht, bestrahlt.

5.4.2.1 Morphologie

Wie anhand der nachfolgenden Abbildung 50A zu erkennen ist, bildeten sowohl die im PL als auch die im SOBP bestrahlten ZOs 10 Tage p. IR (d90) flüssigkeitsgefüllte Kavitäten aus. Dabei bildeten die im SOBP und mit 3 Gy bestrahlten ZOs zu 30 % und nach einer Bestrahlung mit 10 Gy zu 45 % Kavitäten aus. Eine SOBP-Bestrahlung mit 15 Gy führte zu einer Kavitäten-Bildung in 57 % der bestrahlten ZOs. Im Gegensatz dazu führte die Bestrahlung der ZOs im PL zwar ebenfalls zu einer dosisabhängigen Kavitäten-Bildung, jedoch wurden nach einer Bestrahlung mit 3 Gy nur zu 20 % Kavitäten ausgebildet. Eine Bestrahlung mit 10 und 15 Gy führte zu einer Kavitäten-Bildung von 30 % und 33 %. Somit hatte eine Bestrahlung im PL mit 10 Gy denselben Effekt auf die Kavitäten-Bildung wie eine Bestrahlung mit 3 Gy im SOBP. Die Effekte einer ^1H -Bestrahlung im SOBP auf das Wachstum der ZOs waren, wie anhand von Abbildung 51 auf S. 81 zu erkennen ist, im Vergleich zu der Bestrahlung im PL ebenfalls stärker. Dabei zeigte sich, dass bei der unbestrahlten SOBP-Kontrolle eine Größenzunahme von $\sim 22 \text{ mm}^2$ in der Fläche sowie nach der Bestrahlung mit 3 Gy von nur noch $\sim 8 \text{ mm}^2$ gemessen wurden. Die mit 10 und 15 Gy bestrahlten ZOs hingegen wiesen von d80 - d100 nur noch eine Größenzunahme von $\sim 5 \text{ mm}^2$ bzw. $\sim 4 \text{ mm}^2$ auf. Die Kontrolle der im PL bestrahlten ZOs wies eine Größenzunahme von $\sim 26 \text{ mm}^2$ auf, wohingegen die mit 3 Gy exponierten ZOs ein Wachstum von $\sim 19 \text{ mm}^2$ aufwiesen. Die mit 10 Gy exponierten ZOs wuchsen um $\sim 15 \text{ mm}^2$ und die mit 15 Gy exponierten ZOs nahmen um $\sim 19 \text{ mm}^2$ in der Fläche zu. Somit war der Strahleneffekt nach der ^1H -Bestrahlung im SOBP hinsichtlich der Kavitäten-Bildung um ein 1,5-faches sowie hinsichtlich der strahleninduzierten Wachstumsinhibierung um ein ~ 4 -faches stärker als nach der Bestrahlung im PL.

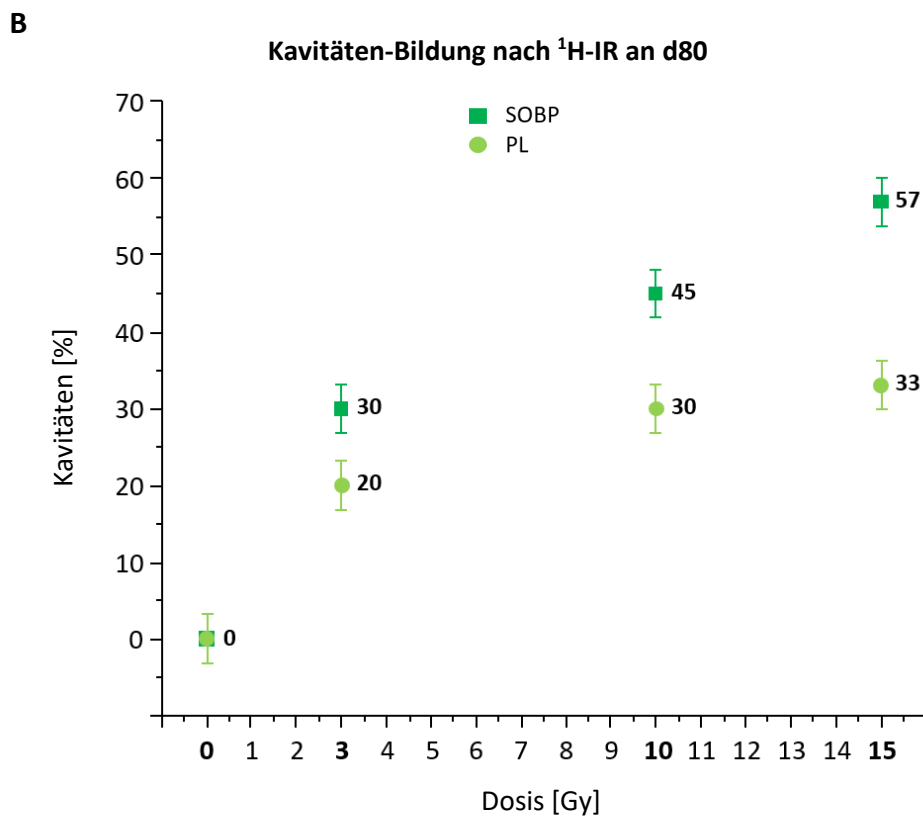
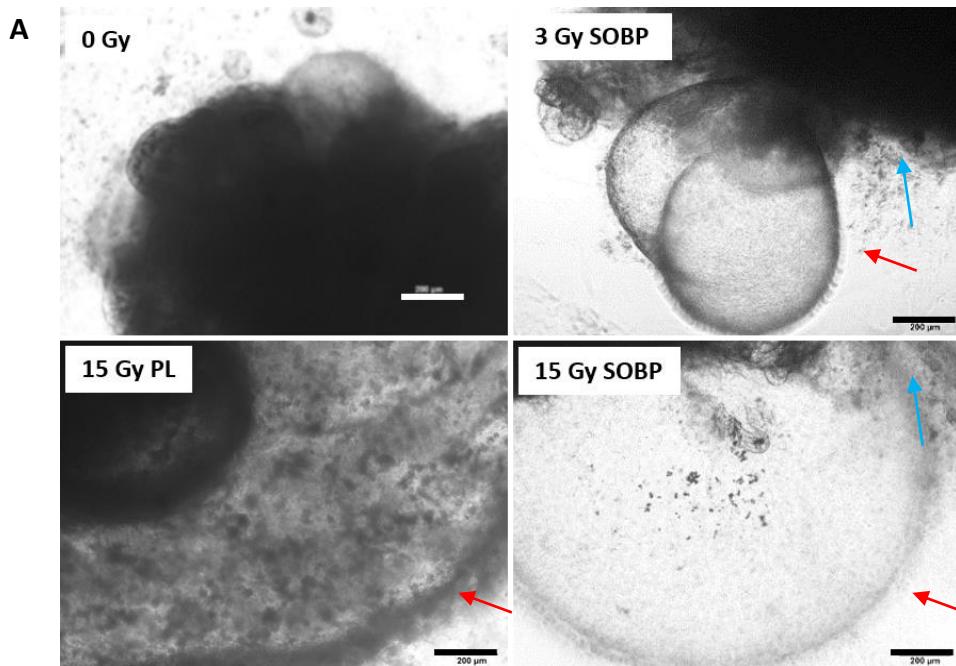


Abbildung 50: Aufnahmen der bestrahlten ZOs an d90 nach ^1H -IR an d80 mit 3, 10 und 15 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Maßstab: 200 μm . Zellzerfall (blaue Pfeile), Kavitäten (rote Pfeile). **B:** Dosisabhängige Kavitäten-Bildung der ZOs, die an d90 – d100 der Kultivierung analysiert wurden (N = 1, n = 10). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. PL: Plateau, SOBP: *Spread-Out Bragg Peak*.

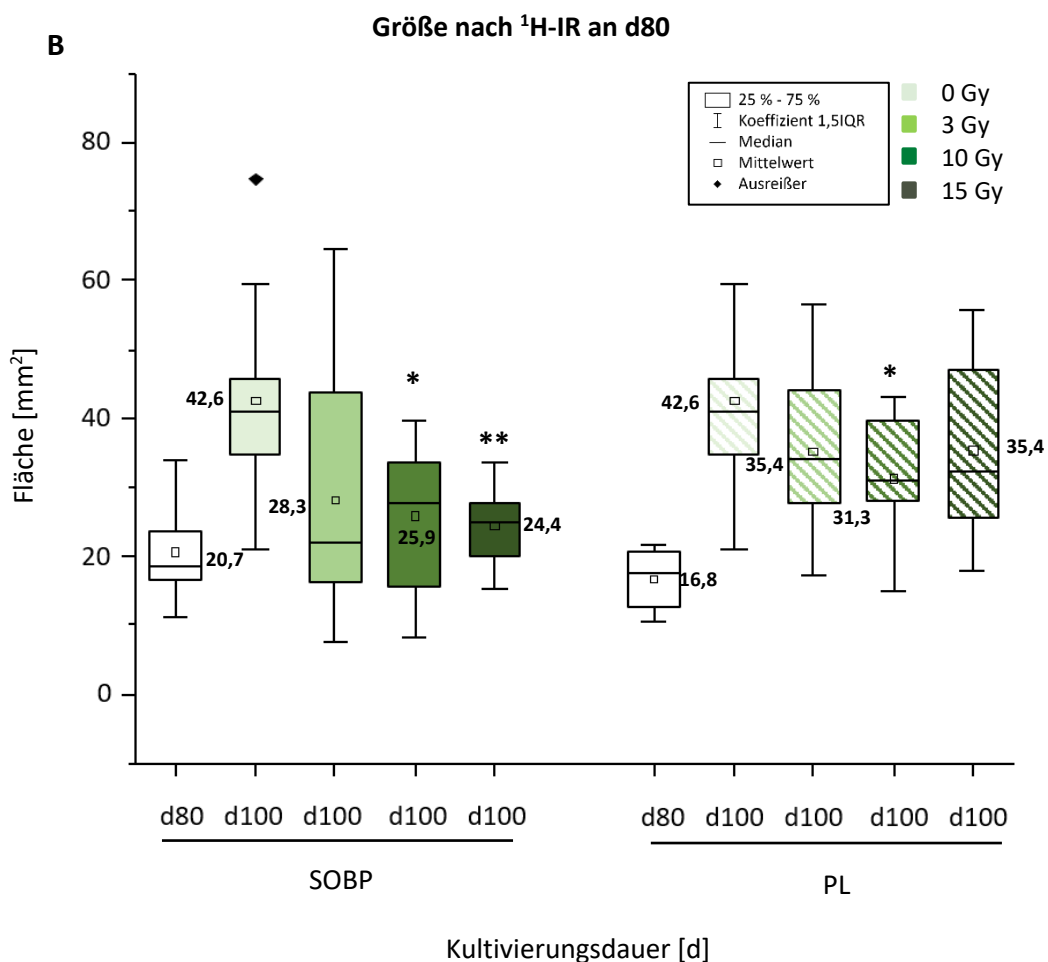
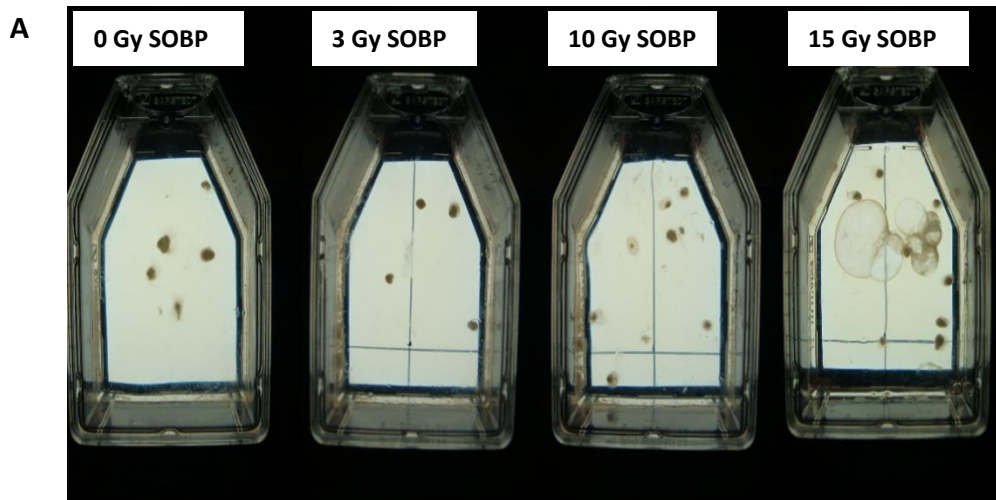


Abbildung 51: **A:** Aufnahmen der im SOBPs bestrahlten ZOs sowie der Kontrolle (0 Gy) in T25-Suspensionsflaschen an d100 der Kultivierung. **B:** Größenmessung der ZOs an d80 und d100 nach ¹H-IR im SOBPs oder PL an d80 mit 3, 10 und 15 Gy. (N = 1, n = 10). * p < 0,5, ** p < 0,01.

5.4.3 Vergleich der Effekte von Röntgen- und Partikelstrahlung auf un-/reife ZOs

Um erste Aussagen über die Effektivität verschiedener Strahlenmodalitäten auf ZOs zu treffen, wird im Folgenden ein Vergleich zwischen den morphologischen Effekten nach einer Röntgen- bzw. Partikelbestrahlung gezogen.

5.4.3.1 Vergleich der Effekte von Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen

Wie anhand der vergleichenden Abbildung 52 zu erkennen ist, bildeten sowohl die an d20 mit Röntgenstrahlung als auch die mit Kohlenstoffionen exponierten ZOs dosisabhängig flüssigkeitsgefüllte Kavitäten aus. Dabei war der Effekt der beiden Strahlenarten, trotz der für die Kohlenstoffbestrahlung niedrigeren, applizierten Dosen, auf die unreifen ZOs annähernd vergleichbar. Nur nach der Bestrahlung mit 4 Gy Kohlenstoffionen im Vergleich zu der Bestrahlung mit 8 Gy Röntgen, konnte ein Unterschied in der prozentualen Ausbildung der Kavitäten festgestellt werden. Dabei bildeten die mit 8 Gy Röntgenstrahlung exponierten ZOs zu etwa 10 % öfter Kavitäten aus als die mit 4 Gy Kohlenstoffionen exponierten ZOs. Der Strahleneffekt beider Strahlenarten auf die Größe der unreifen ZOs war, wie anhand von Abbildung 53 zu erkennen, ebenfalls vergleichbar. Während die mit 8 Gy Röntgenstrahlung exponierten ZOs, verglichen mit der Kontrolle, an d61 der Kultivierung um 11 mm² in der Fläche kleiner waren, waren die mit 4 Gy Kohlenstoffionen exponierten ZOs an d61 der Kultivierung um 12 mm² kleiner als die Kontrolle.

5.4.3.2 Vergleich der Effekte von Röntgenstrahlung und Protonenstrahlen

Ein Vergleich der an d80 mit 3 und 15 Gy Röntgenstrahlung und Protonenstrahlen exponierten, reifen ZOs zeigte, dass die ZOs nach einer PL-Bestrahlung eine vergleichbare Kavitäten-Bildung aufwiesen, wie nach der Röntgenbestrahlung (s. Abbildung 54, S. 84). Im Gegensatz dazu wurden nach einer SOBP-Bestrahlung im Schnitt um ein 1,5-faches mehr Kavitäten ausgebildet als nach einer Röntgen- oder PL-Bestrahlung. Der Größenvergleich in Abbildung 55 zeigt zudem, dass eine Exposition mit 15 Gy Röntgenstrahlung, verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle, zu einer Größenabnahme von etwa einem 1,8-fachem der Fläche führte. Eine ¹H-Bestrahlung mit 15 Gy im SOBP führte zu einer Größenabnahme von etwa einem 6-fachem der Fläche wohingegen eine ¹H-Bestrahlung mit 15 Gy im PL zu einer Größenabnahme von einem 1,4-fachem der Fläche führte. Zusammenfassend wurde anhand des Vergleiches gezeigt, dass eine Protonenbestrahlung im SOBP einen größeren Strahleneffekt auf die reifen ZOs hatte als eine Bestrahlung im PL oder mit Röntgenstrahlung.

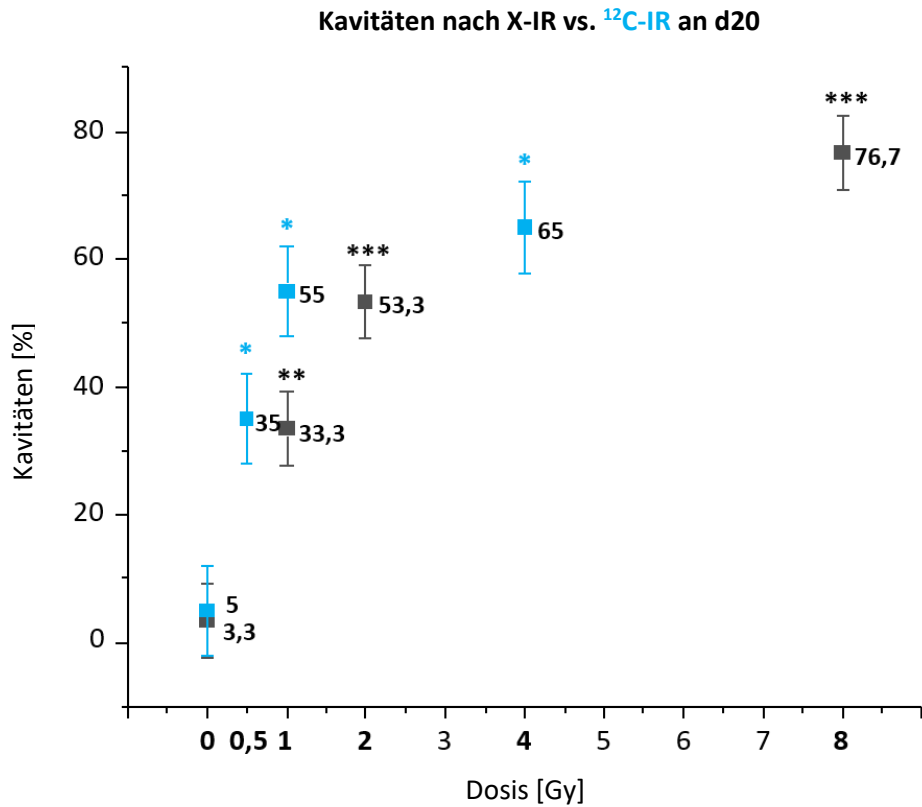


Abbildung 52: Vergleichende Grafik der Kavitäten-Bildung nach X-IR und ¹²C-IR an d20. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

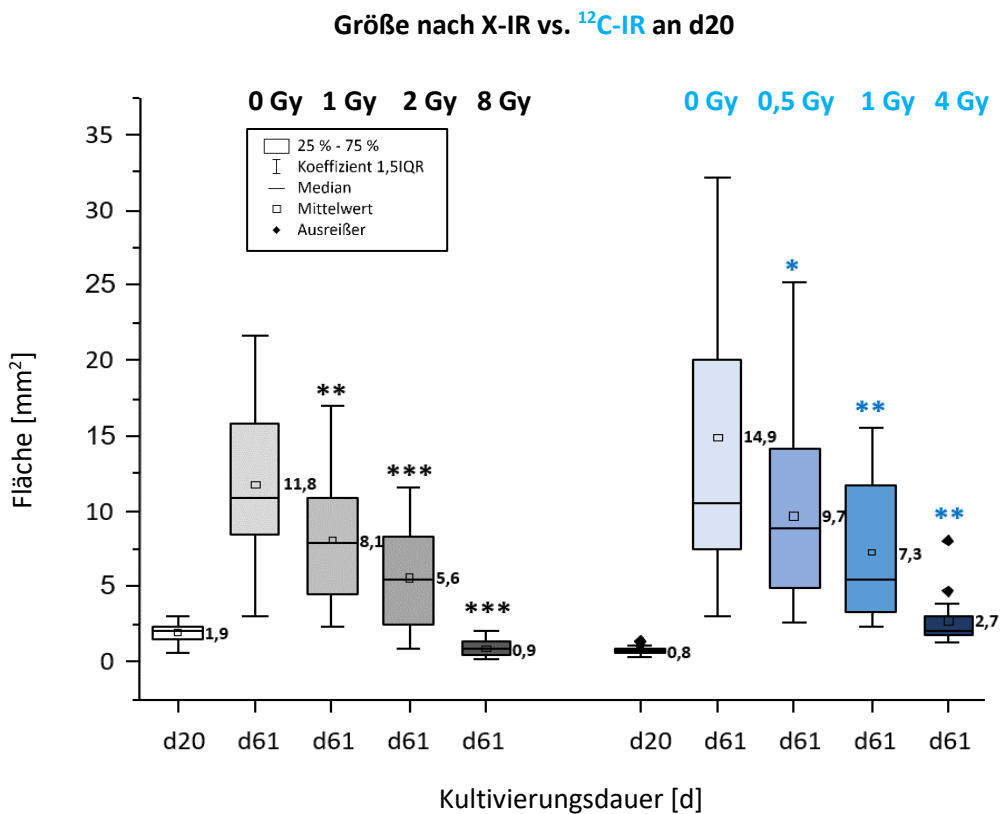


Abbildung 53: Vergleichende Grafik der Wachstumsinhibierung nach X-IR und ¹²C-IR an d20. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

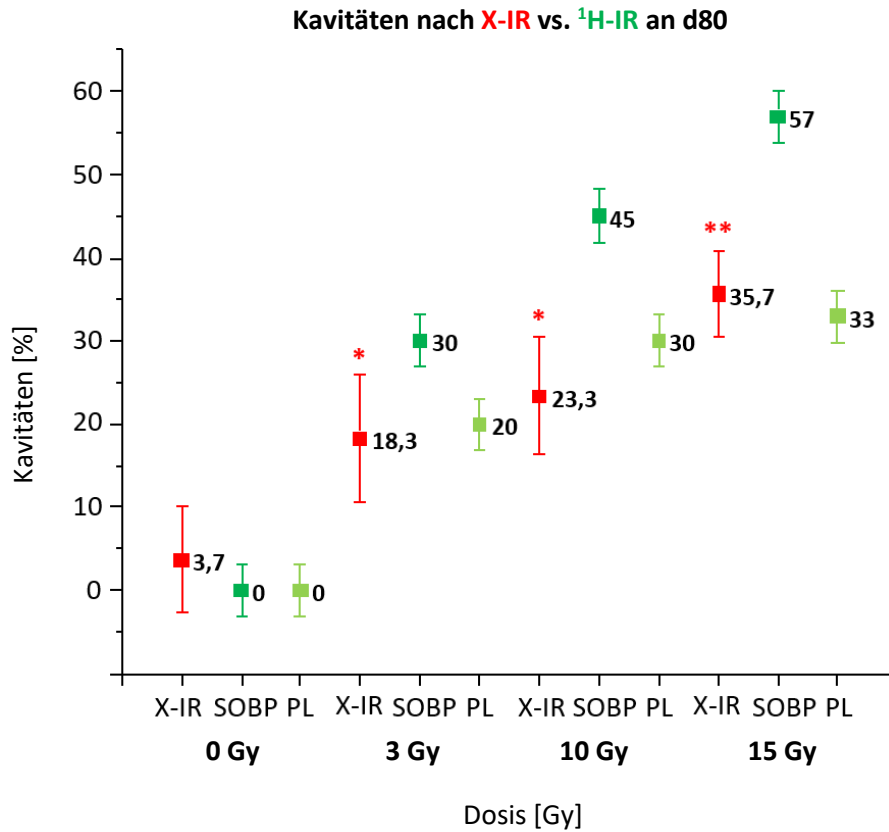


Abbildung 54: Vergleichende Grafik der Kavitäten-Bildung nach X-IR und ¹H-IR (SOBP, PL) an d80. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01.

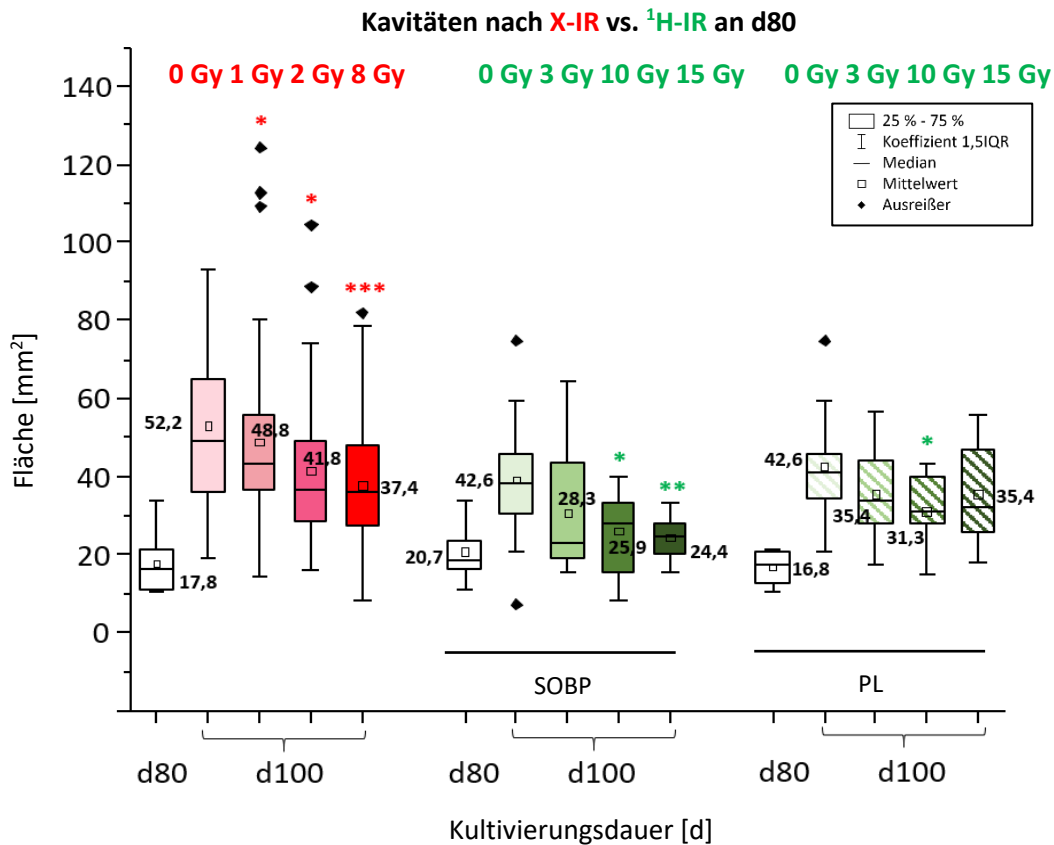


Abbildung 55: Vergleichende Grafik der Wachstumsinhibierung nach X-IR und ¹H-IR an d80. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * p < 0,5, ** p < 0,01.

5.5 ZOs als Modell zur Abbildung strahleninduzierter Spätfolgen

Wie bereits in Absatz 2.5 geschildert, stellt die sogenannte Radionekrose eine potenzielle Langzeitwirkung der zerebralen Strahlentherapie dar und geht u.a. mit der Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Ödeme einher. Trotz der zunehmenden Patientenpopulation mit potenziellen Langzeitfolgen sind die zugrundeliegenden Mechanismen der strahleninduzierten Neurotoxizität dennoch weitgehend unerklärt.

Die Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Kavitäten wurde auch nach Bestrahlung der ZOs beobachtet und würde folglich, als strahleninduzierte Spätfolge, mit der Ausbildung von Radionekrosen einhergehen. Da insbesondere nach einer ^1H -Bestrahlung pädiatrischer Hirntumorpatienten vermehrt die Ausbildung von Radionekrosen [123] und auch anhand der *in vitro* durchgeführten ^1H -Bestrahlungsversuche reifer ZOs eine vermehrte Kavitäten-Bildung beobachtet wurde, wurden nach 4.3.3 zusätzliche Analysen der im ^1H -SOBP bestrahlten ZOs hinsichtlich einer strahleninduzierten Nekrose durchgeführt (s. Abbildung 69, S. 139). Wie anhand der nachfolgenden Abbildung 56 zu erkennen ist, wurde nach Bestrahlung der ZOs ein dosisabhängig erhöhter Anteil apoptotischer als auch nekrotischer Zellen detektiert. Dabei führte die Bestrahlung mit 3 Gy, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, zu einem $\sim 1,5$ -fach und die Bestrahlung mit einer Höchstdosis von 15 Gy zu einem ~ 2 -fach erhöhten Anteil apoptotischer sowie nekrotischer Zellen.

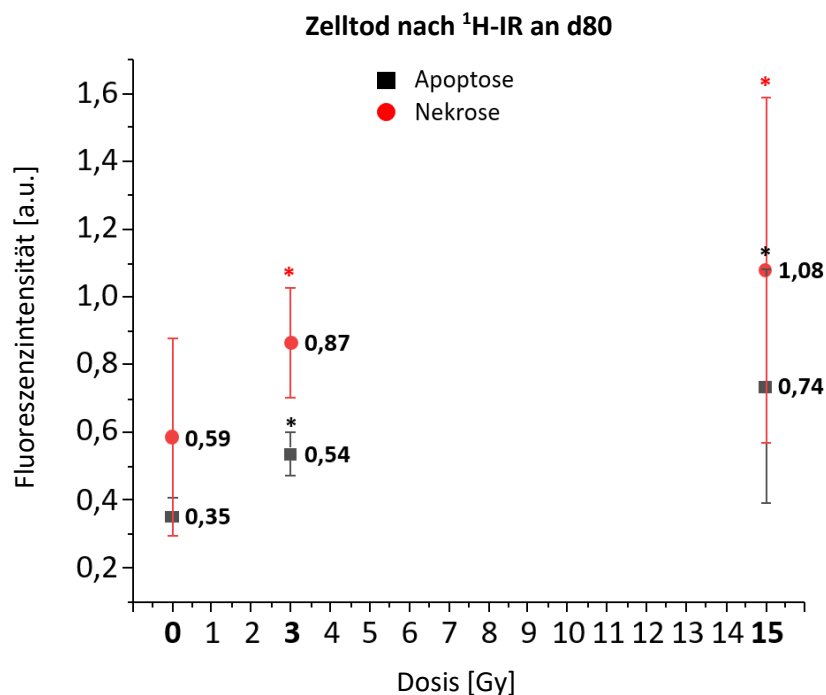


Abbildung 56: Fluoreszenzintensität der an d80 mit 3 und 15 Gy ^1H -bestrahlten ZOs (N = 2, n = 1). Die Färbung erfolgte an d100. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. * $p < 0,05$.

Darüber hinaus ähneln die nach Bestrahlung ausgebildeten, flüssigkeitsgefüllten Kavitäten morphologisch den Choroid Plexus-Organoiden, wie sie von Pellegrini et al., 2020 beschrieben wurden (s. Abbildung 57A und B). Bei dem sogenannten Choroid Plexus handelt es sich um ein sekretorisches Epithelgewebe des ZNS, welches für die Produktion der Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor) verantwortlich ist und eine Barrierefunktion besitzt, welche den Eintritt von molekularen Substanzen und Nährstoffen in das Gehirn reguliert [86]. Wie anhand der Aufnahme in Abbildung 57A zu erkennen ist, handelt es sich bei der Flüssigkeit in den strahleninduzierten Kavitäten ebenfalls um eine klare und farblose Flüssigkeit. Zur Überprüfung der epithelialen Barrierefunktion der ausgebildeten Kavitäten wurde, wie unter Absatz 4.3.1.2 beschrieben, ein Tinten-Test durchgeführt. Aufnahmen aus dem 30-sekündigen, videografischen Mitschnitt sind in Abbildung 57C-E dargestellt. Wie anhand der Aufnahmen zu erkennen ist, drang nach der tropfenweisen Zugabe der Schreibtinte in das Kultivierungsmedium, keine Tinte in die Kavitäten ein. Zudem wurde, wie anhand der Aufnahme in Abbildung 57D gezeigt, auch nach einem 5-minütigen Waschschrift mit PBS/- kein Eindringen der Tinte in die Kavität festgestellt. Somit wurde eine intakte Barrierefunktion der strahleninduzierten, epithelialen Kavitäten nachgewiesen.

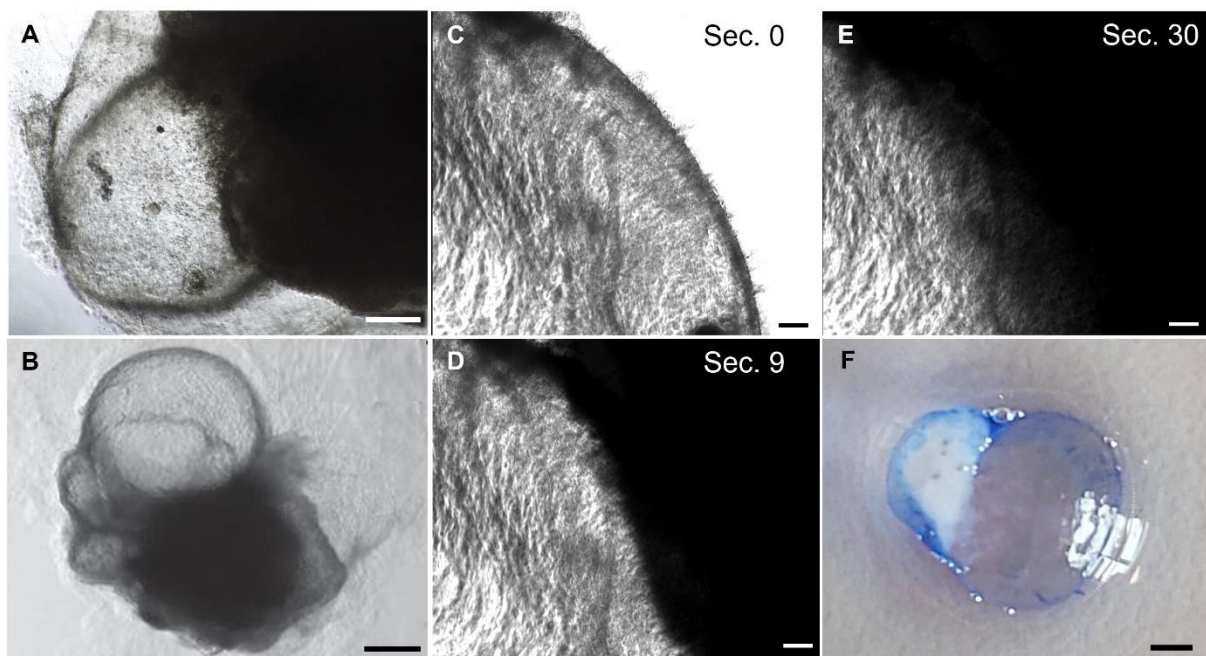


Abbildung 57: **A:** Kavitäten-Bildung eines ZO nach Bestrahlung. Maßstab: 200 µm. **B:** Choroid Plexus-Organoid nach [86]. Maßstab: 1000 µm. **C-E:** Aufnahmen des Tinten-Tests. Maßstab: 100 µm. Sec.: Sekunde. **F:** ZO nach einem 5-minütigen Waschschrift mit PBS/-/. Maßstab: 1000 µm.

6 DISKUSSION UND FAZIT

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen von ionisierender Strahlung auf die Zellen des ZNS zur besseren Risikobewertung von Strahlentherapien. Dazu wurde ein zerebrales Organoid-Modell nach Lancaster et al., 2017 [15] genutzt.

6.1 Eignung der ZOs als *in vitro* Modellsystem für das humane Gehirn

Die Generierung der ZOs basierte auf *feeder*-frei kultivieren hESCs in den Passagen 24 - 50. Zur Überprüfung des Pluripotenzerhalts über mehrere Passagen und somit der Eignung der hESCs als Ausgangszellen für die ZO-Generierung wurden in P49 - P50 molekulare Analysen hinsichtlich der Expression der Pluripotenzmarker OCT4, SOX2 und NANOG durchgeführt. Diese werden fast ausschließlich in pluripotenten Stammzellen exprimiert und regulieren die Selbsterneuerung sowie die Pluripotenz der Zellen. Bei OCT4 handelt es sich um einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor der *Pou*-Familie, welcher u.a. in der ICM, im primitiven Ektoderm und in den Keimzellen exprimiert wird [130]. Sowohl eine Suppression als auch eine Überexpression von OCT4 kann zu der Ausdifferenzierung von hESCs in die meso-, endo- oder ektodermale Linie führen [131]. SOX2 ist ein Mitglied der *SOX*-Familie, spielt ebenfalls eine Schlüsselrolle in der frühen embryonalen Entwicklung und ist für die Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz von hESCs unerlässlich [132]. Darüber hinaus spielt SOX2 auch bei der Initiierung der neuralen Differenzierung eine Rolle und stellt somit gleichzeitig einen Marker für multipotente, neurale Stammzellen dar [133]. Der Transkriptionsfaktor NANOG, welcher ebenfalls in der ICM exprimiert wird, bildet zusammen mit OCT4 und SOX2 ein regulatorisches Netzwerk zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz von hESCs [134]. Wie in Abbildung 15 (S. 40) dargestellt, wurde die mRNA-Expression der hESCs mit denen von 66 Tage alten ZOs verglichen. Dabei wurde gezeigt, dass die hESCs, im Gegensatz zu den ZOs, die Pluripotenzmarker OCT4 und NANOG exprimierten. SOX2 wurde in beiden Proben exprimiert, jedoch in den hESCs um ein 1,5-faches höher als in den ZOs. Da SOX2 jedoch auch einen Marker für NSCs darstellt und in den ZOs zudem eine Suppression der OCT4-Expression vorlag, spricht dies für die erfolgreiche, neurale Induktion der hESCs während der ZO-Generierung. Darüber hinaus wurde die Expression aller drei Pluripotenzmarker in den hESCs mittels IFF nachgewiesen und somit deren Pluripotenzerhalt durch eine geeignete, *feeder*-freie Kultivierung in mTeSRTM1-Medium sowie ihre Eignung als Ausgangszellen zur ZO-Generierung bis in P50 bestätigt.

Die aus den hESCs generierten ZOs wiesen, wie in Abbildung 16 (S. 42) dargestellt, ab d7 der Kultivierung ein morphologisch identifizierbares, polarisierendes Neuroektoderm und ab d20 radiale, neuroepitheliale Strukturen auf. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Lancaster et al., 2017 [15] und Giandomenico et al., 2020 [126] überein, sodass von einer erfolgreichen Neurogenese ausgegangen werden konnte. Insbesondere die Ausbildung eines abgegrenzten, polarisierenden Neuroepithels war von Interesse, da sich das Neuroepithel des dorsalen Vorderhirns *in vivo*, unter dem Einfluss der WNT- und BMP- Signalwege, in Strukturen wie den zerebralen Kortex und den Hippocampus entwickelt [44, 135]. Da diese u.a. Orte der Neurogenese und an der Kontrolle von Kognition und Bewegung beteiligt sind [136], stellen sie für die neurale Strahlenantwort relevante Strukturen dar. Die kontinuierliche Generierung multipler, neuroepithelialer Vorderhirn-äquivalenter Strukturen innerhalb der ZOs wurde durch die Expression des Vorderhirnmarkers FOXG1 ab d20 der Kultivierung immunhistochemisch nachgewiesen. Darüber hinaus wurden bereits ab d3 der ZO-Generierung intra- und interexperimentelle, morphologische Unterschiede zwischen den neuralen Aggregaten beobachtet, welche ebenfalls von Lancaster et al., 2017 beschrieben wurden. Dem zugrunde liegt zum einen die Heterogenität und Anzahl der ausgesäten Mikrofilamente und zum anderen die in dem verwendeten Protokoll favorisierte ungerichtete Differenzierung, bei der sich die ZOs individuell und spontan selbst organisieren, was somit zu der Variabilität der ZO-Strukturen beiträgt. Anhand der ZO-Heterogenität wurde jedoch nachgewiesen, dass die länglichen, oval-geformten ZOs, aufgrund des größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, im Laufe der neuralen Reifung deutlich mehr Neuroepithel und weniger nicht-neurales Gewebe bildeten als die kleineren, runden ZOs. Somit führte die Verwendung von Mikrofasern zu Beginn der hESC-Aussaat zu einer verifizierten, verbesserten, kortikalen Differenzierung im Laufe der Organoid-Reifung. Die Problematik der individuellen Variabilität ist zudem in anderen, komplexeren *in vivo* Modellsystemen wie beispielsweise in Tierversuchsstudien ebenfalls gegeben und spiegelt u.a. die Individualität der einzelnen Hirntumorpatienten wider.

Zur Charakterisierung der vorhandenen, neuralen Zelltypen innerhalb der generierten ZOs wurden daraufhin umfassende Expressionsanalysen neuraler Marker durchgeführt. Die molekularen Analysen wiesen ab d20 organspezifisch-lokalisierte, neurale Stamm- und Progenitorzellen nach, welche innerhalb von etwa 7 Wochen in postmitotische Neurone, innerhalb von 11 Wochen in Astrozyten und anschließend in Oligodendrozyten

ausdifferenzierten. Charakterisiert wurden die NSCs/RGs ab d20 der Kultivierung mittels der spezifischen Marker SOX2, PAX6 und Nestin. Dabei wurde anhand von IFF gezeigt, dass es sich bei den proliferierenden, Ki-67-positiven Zellen in den inneren Schichten der PVs um PAX6-positive, apikale NSCs/RGs handelte, welche *in vivo* ebenfalls in der inneren ventrikulären Zone lokalisiert sind (s. Abbildung 58). Diese apikalen NSCs/RGs bilden im Laufe der neuralen Entwicklung durch Migration und Differenzierung basale oRGs der äußeren, subventrikulären Schichten, welche als Gerüst und als Orientierung für unreife, in die kortikalen Schichten migrierende Neurone dienen. Die Migration der NSCs/RGs in die äußeren Schichten der PVs wurde im Laufe der Kultivierung mittels IFF des Markers PAX6 bestätigt. Darüber hinaus wurden die für das humane Gehirn spezifischen, HOPX-positiven, basalen oRGs insbesondere in den äußeren Schichten der PVs detektiert und wiesen, übereinstimmend mit den Beobachtungen von Lancaster et al., 2017, eine typische, längliche und bipolare Morphologie auf. Die aus den NSCs/RGs entstehenden TBR2-positiven, intermediären Progenitorzellen, die zu einer erhöhten Generierung von kortikalen Neuronen aus RGs beitragen [43], wurden in den intermediären und äußeren Schichten der PVs nachgewiesen. Über die Kultivierungszeit von 100 Tagen konnte zudem eine kontinuierliche Abnahme der mRNA-Expression des NSC-Markers PAX6 festgestellt werden. Dies indiziert wiederum eine zunehmende Differenzierung von NSCs in intermediäre Progenitorzellen sowie in un-/reife Neurone, welche mittels IFF der Marker β TUB, MAP2 und SYP bestätigt wurde. Das in den Randbereichen der PVs exprimierte Intermediärfilament Nestin, welches ebenfalls einen Marker für NSCs darstellt, wurde dabei in Übereinstimmung mit [137] im Laufe der neuralen Reifung durch die Filamentproteine β TUB in Neuronen oder GFAP in Gliazellen ersetzt. Darüber hinaus wurde anhand der IFF an reiferen ZOs (\geq d66) gezeigt, dass die neuronalen Marker β TUB und MAP2 koexprimiert wurden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass unreife, β TUB-positive Neuronen im Laufe der Kultivierung zu MAP2-positiven Neuronen reifen. Zudem wurde die Expression der Marker MAP2 und SYP für reife Neurone fast ausschließlich in den Randbereichen der ZOs nachgewiesen, was auf die erfolgreiche Ausbildung einer kortikalen Platte hindeutet. Lancaster et al., 2017 wiesen ab d60 der Kultivierung ebenfalls histologisch eine radiale, MAP2-positive Basalschicht der äußeren Zellschichten nach, welche morphologisch mit der kortikalen Platte *in vivo* übereinstimmte. Somit führt die Zugabe von gelöstem Matrigel™ zum Differenzierungsmedium als Rekonstruktion der Basalmembran ab d40 der Kultivierung erwiesenermaßen zu einer erfolgreichen Ausbildung der kortikalen Platte *in vitro*. An d365 der

Kultivierung wurde zudem wider Erwarten eine stark erhöhte mRNA-Expression von PAX6 beobachtet, die via IFF bestätigt wurde. Dabei wurde PAX6 über den gesamten Schnitt verteilt exprimiert. Zum einen könnte die erhöhte Expression von PAX6 dadurch erklärt werden, dass nach einer größtenteils abgeschlossenen, erfolgreichen Neurogenese eine Art Regenerationspool an adulten NSCs zurückbleibt, zum anderen stellt PAX6 auch einen Marker für postmitotische, dopaminerge Neurone dar, spielt eine Rolle beim Wachstum der Axone und wird zudem in multiplen Vorderhirnregionen exprimiert [138]. Da mittels IFF des Marker TH keine dopaminergen Neurone nachgewiesen wurden, wird angenommen, dass die erhöhte Expression von PAX6 auf die verstärkte neuronale bzw. axonale Reifung der ZOs zurückzuführen ist. Die Generierung von NSC-abgeleiteten, A2B5-positiven, glialen Vorläuferzellen wurde mittels IFF ab d66 der Kultivierung detektiert. Dabei wurden die Vorläuferzellen vorwiegend in den äußeren Schichten der ZOs nachgewiesen und differenzierten im Verlauf der Reifung zunächst in Astrozyten und anschließend in Oligodendrozyten aus. Diese temporäre Gliogenese wurde durch die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen bestätigt, wobei an d66 zunächst GFAP als Marker für Astrozyten und ab d100 MOG als Marker für Oligodendrozyten exprimiert wurde. An d365 wurden diese Marker, verglichen mit den Kontrollen (ABr), stark erhöht exprimiert. Mittels IFF wurden GFAP-positive Astrozyten an d100 und MOG-positive Oligodendrozyten nach einer Kultivierungszeit von einem Jahr detektiert. Die Astrozyten bildeten dabei via multipler, radial vom Zellkörper abgehender Zellfortsätze ein dichtes, verzweigtes Netzwerk innerhalb der äußeren, kortikalen Schichten. MOG-positive Oligodendrozyten wurden ebenfalls in den Randbereichen der ZOs detektiert. Aufgrund der späten postnatalen Entwicklungsexpression von MOG wurde eine Reifung der gebildeten Oligodendrozyten sowie eine Myelinisierung der kortikalen Neurone indiziert. Die zeitlich-gestaffelte Differenzierung der organspezifisch-lokalisiereten, neuronalen Vorläuferzellen in reife Neurone und Gliazellen entspricht somit den zeitlichen und räumlichen Strukturierungsprozesse der humanen Hirnentwicklung *in vivo*. Dabei werden nach einer größtenteils abgeschlossenen Neurogenese, aus NSC-abgeleiteten, glialen Vorläuferzellen zunächst Astrozyten und dann im späteren Verlauf der Gliogenese reife Oligodendrozyten gebildet [47, 139].

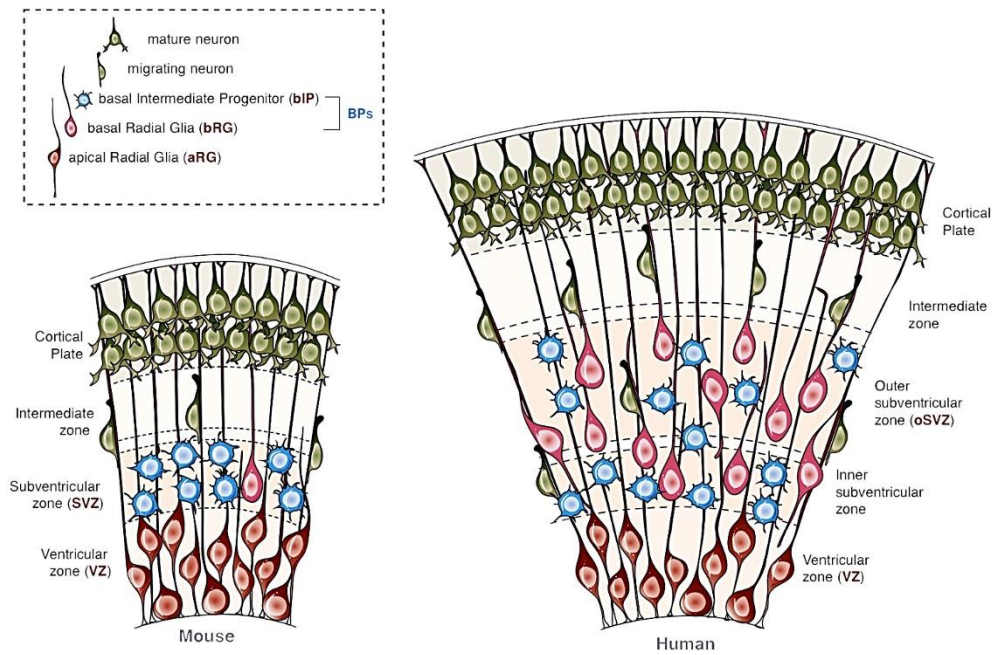


Abbildung 58: Vergleich des reifenden Neocortex von Maus und Mensch. Modifiziert nach [140].

Zusammenfassend wurde ein reproduzierbares, zerebrales Organoid-Modell nach Lancaster et al., 2017 etabliert, welches während der Kultivierungsdauer von 365 Tagen eine zunehmende, neurale Reifung aufwies. Dabei wurden an d20 der Kultivierung auf mRNA- und Proteinebene vorwiegend Marker für neurale Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert. Die naiven NSCs werden *in vivo*, während der embryonalen Neurulation, aus neuroektodermalen Zellen gebildet und vergrößern den Stammzellpool zunächst durch symmetrische Proliferation. Anschließend migrieren die NSCs radial in die äußeren Schichten, um durch Differenzierung weitere neuronale Vorläufer und Neurone zu bilden. Da an d20 mittels IFF proliferierende Stammzellen sowie neurale Vorläufer in den inneren Zellschichten der PVs, jedoch keine reifen Neurone nachgewiesen wurden, imitieren 20 Tage alte ZO die frühe, embryonale Hirnentwicklung und Neurulation. Aufgrund dessen wurde zur Untersuchung der Wirkung von IR auf die Proliferation, Viabilität und Differenzierungsfähigkeit neuraler Stamm- und Vorläuferzellen d20 als früher Bestrahlungszeitpunkt gewählt. Als Endpunkt wurde d66 der Kultivierung gewählt, da zu diesem Zeitpunkt bereits MAP2- und SYP-positive, reife Neurone der kortikalen Platte und erste GFAP-positive Astrozyten nachgewiesen wurden. Dies impliziert eine erfolgreiche Neurogenese sowie eine beginnende Gliogenese. *In vivo* finden diese neuronalen Reorganisations- und Differenzierungsprozesse während der Fetogenese statt. Dabei werden zunächst postmitotische Neurone und anschließend Astrozyten gebildet, während die Generierung myelinisierender Oligodendrozyten und die damit einhergehende, verbesserte axonale Leitgeschwindigkeit und Netzwerkbildung der Neurone weitgehend

postnatale Prozesse darstellen [34]. Da ab d66 bereits reife Neurone und ab d100 Astrozyten gebildet wurden, wurde d80 als später Bestrahlungszeitpunkt gewählt und dem fetalen Reifestadium zugewiesen. Die Bestrahlung an d80 und die darauffolgende Analyse an d100 dienen der Untersuchung der Wirkung von IR auf die differenzierten, neuronalen und astroglialen Zellen des ZNS sowie auf die Neuroregeneration. Somit eignen sich ZOs, durch die in dem Protokoll fokussierte, ungerichtete Differenzierung, insbesondere zur Modellierung der neuronalen Strahlenantwort. Die Analyse postnataler Strahleneffekte ist dagegen aufgrund der limitierten glialen Reifung nur bedingt möglich ist. Demnach wäre eine Optimierung des Protokolls zur effizienteren Generierung reifer Gliazellen nötig, da diese zur Neurogenese beitragen und so zu der Abbildung einer realistischen, neurogenen Mikroumgebung benötigt werden. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle bei neuroinflammatorischen Reaktionen und somit bei der neuronalen Strahlenantwort [141, 142]. Zu den Gliazellen gehören, neben den Astro- und Oligodendrozyten, auch die sogenannten Mikroglia. Dabei handelt es sich um immunkompetente, als Makrophagen fungierende Zellen, die für Regulation von Entzündungsreaktionen verantwortlich sind [143]. Auftretende Strahlenschäden dieser Zellpopulation wären von Interesse, da ihre Dysregulation bereits mit dem Auftreten neurologischer Defizite in Verbindung gebracht wurde [144–146]. Ansätze zur Generierung von Mikrogliazellen im Organoid-Modell bieten die Studien von Abud et al., 2017 [147] und Ormel et al., 2018 [148]. Ein Ansatz zur schnelleren Generierung von reifen Oligodendrozyten im Organoid-Modell wäre beispielsweise der durch Madhavan et al., 2018 [149] oder Marton et al., 2019 [150] beschriebene Einsatz bestimmter Differenzierungsfaktoren. Neben der eingeschränkten Generierung reifer Oligodendrozyten stellt der Mangel an spezifischen Neuronen-Subtypen eine weitere Limitierung der ZOs dar. Zwar wurden sowohl GABAerge Neurone als auch Interneurone durch die Expression der neuronalen Marker GAD2 und CALB1 auf mRNA bestätigt, jedoch wurde keine Expression von GAD2, CALB1- oder dopaminergen, TH-positiven Neuronen auf Proteinebene nachgewiesen. Die Generierung diverser, heterogener Neuronen-Subtypen ist insofern von Relevanz, als dass die komplexe, zelluläre Vielfalt des humanen Gehirns mit einem breiteren Spektrum an individualisierten, neuronalen Aktivitäten korreliert und somit für die höheren, kognitiven Leistungen essentiell ist [51]. Zudem führt die Degeneration diverser Neuronen-Subtypen zur Ausbildung verschiedener, neurologischer Krankheitsbilder [151], weswegen zur Analyse der spezifischen, zugrunde liegenden Mechanismen die Generierung diverser neuronaler

Zelltypen Voraussetzung ist. Zur Generierung unterschiedlicher Neuronen-Subtypen im ZO-Modell wäre wiederum der Einsatz selektiver Wachstumsfaktoren nötig, um eine gerichtete Differenzierung in die unterschiedlichen Neuronen-Subtypen zu gewährleisten [152]. Zur Generierung dopaminerger Neurone werden vor allem SHH, FGF8 und der Wachstumsfaktor *brain-derived neurotrophic factor* verwendet [153, 154], wohingegen zur Generierung cholinergischer Motorneurone im Allgemeinen Retinsäure, bFGF und das Supplement B27 eingesetzt werden [155]. Die durch die Zugabe von extrinsischen Faktoren erzielte, gerichtete Differenzierung führt jedoch unter Umständen zu Störungen des intrinsischen Entwicklungsprogramms und somit zu einer potenziellen Reduktion der Komplexität des ZO-Modells, sodass zur Untersuchung potenzieller Strahleneffekte, relevante Strukturen eventuell nicht ausgebildet würden. Ein alternativer Ansatz zur fortgeschritteneren, kortikalen Differenzierung und neuronalen Funktionalität bei gleichzeitiger Verbesserung der Sauerstoffversorgung und des Zellüberlebens stellt die Kultivierung von Organoid-Schnitten in einer *air-liquid interface* Kultur dar [126, 156]. Auch der Mangel an Endothelzellen und einer Vaskularisierung limitiert, durch die begrenzte Versorgung der Zellen mit Nährstoffen, das Wachstum, die Differenzierung sowie die neokortikale und funktionelle Reifung der generierten ZOs. Ansätze zur Vaskularisierung von Hirn-Organoiden stellen u.a. angepasste Kultivierungsbedingungen und die Transplantation in Nagetiere dar [157–161]. Trotz der aufgezeigten Limitierungen weisen ZOs, im Gegensatz zu den bekannten Zell- und Tiermodellen, elementare Schlüsselmerkmale der humanen Hirnentwicklung *in vivo* auf, welche den höheren, kognitiven Leistungen des Menschen zugrunde liegen. Neben der dreidimensionalen, hierarchischen und zeitlichen Zellstrukturierung, wurden mittels IFF, HOPX-positive, für das humane Gehirn spezifische oRGs in den äußeren Zellschichten der embryonalen ZOs nachgewiesen. Diese Zellpopulation gilt als Hauptpopulation der neuronalen Vorläufer [42, 43] und ist somit entscheidend für die humane, neuronale und gliale Vielfalt und die kortikale Expansion. Folglich ist das Vorhandensein von oRGs im Modellsystem hinsichtlich der Analyse der Strahleneffekte, welche den neurologischen Defiziten zugrunde liegen, von elementarem Interesse. Daher stellen ZOs das bisher realistischste, humane *in vitro* Modell dar und können, ergänzend zu Tiermodellen, genutzt werden, um die Effekte von IR auf das humane Gehirn in einem Zelltyp-spezifischen Kontext zu charakterisieren. Zudem sind ZOs ethisch unumstritten, leicht zugänglich und lassen sich in großer Anzahl generieren, was die Durchführung umfangreicher Studien ermöglicht.

6.2 Effekte ionisierender Strahlung auf ZOs

6.2.1 Effekte von Röntgenstrahlung auf ZOs

Die Röntgenbestrahlung embryonaler ZOs an d20 der Kultivierung führte, neben der Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Kavitäten, zu messbaren, dosisabhängigen Strahlenreaktionen, die sich in einer verringerten Proliferation, Viabilität und Differenzierungsfähigkeit von NSCs und neuralen Progenitorzellen äußerten. Dabei wurde die verminderte Proliferation als eine dosisabhängige Wachstumsinhibierung der exponierten ZOs beobachtet. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der Studie von Acharya et al., 2010 [101] überein, die nach einer Photonenbestrahlung von humanen NSCs im Dosisbereich von 1 - 5 Gy eine dosisabhängige, verminderte Proliferation aufgrund einer inhibierten Zellzyklusprogression feststellten. Dabei konnte die inhibierte Zellzyklusprogression auf eine G2/M Zellzyklus-*Checkpoint*-Verzögerung, zurückgeführt werden. Dieser DNA-Schadens-Kontrollpunkt reguliert während des Zellzyklus die Quieszenz bzw. den Zellzyklusarrest und die Apoptose geschädigter oder fehlerhaft reparierter Zellen [162]. Dies wurde durch Studien von Schneider et al., 2013 [163] bestätigt, die zeigten, dass eine Röntgenbestrahlung von murinen hESCs-abgeleiteten NSCs zu einem Proliferationsstopp der NSCs, ähnlich einem Seneszenz-Stadium, führte. Darüber hinaus führte die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Röntgenbestrahlung embryonaler ZOs mit 8 Gy zu einem starken Zellzerfall. Hierzu wiesen Studien an *in vitro* bestrahlten, humanen NSCs innerhalb von 48 h p.IR bereits eine strahleninduzierte, dosisabhängige Apoptose und somit eine verminderte Viabilität der exponierten, humanen NSCs nach [101–103]. Dies wurde im ZO-Modell mittels eines durchgeführten Caspase3/7-Assays 24 h p. IR bestätigt. Insbesondere nach einer Bestrahlung mit 8 Gy war der Anteil der apoptotischen Zellen in den ZOs signifikant erhöht, was als Grund für den gemessenen Zellzerfall angenommen wird. Während der natürlich vorkommende, apoptotische Zelltod im sich entwickelnden Nervensystem zur Regulation der Zellzahl und dem Entgegenwirken einer Überproduktion an Neuronen dient [164], führt die stark verminderte, proliferative Aktivität und Deletion neuraler Stamm- und Vorläuferzellen nach Bestrahlung embryonaler ZOs hingegen zu einer verminderten Generierung postmitotischer, funktioneller Neurone. Die strahleninduzierte Hemmung der Neurogenese führte in Tiermodellen bereits zu einhergehenden neurologischen Defiziten bzgl. der Lern- und Gedächtnisleistung (zusammengefasst in [98]) und kann somit auch die *in vivo* auftretenden Langzeitfolgen von Hirntumorpatienten begründen. Nach der Röntgenbestrahlung

embryonaler ZOs wurden gravierende Strahleneffekte insbesondere nach einer Exposition mit 8 Gy beobachtet, was die Nutzung von Dosen im Bereich um die 1 bis 2 Gy in der fraktionierten Strahlentherapie begründet. Dennoch wurden sowohl eine verminderte Proliferation als auch ein erhöhter Anteil apoptotischer Stamm- und Vorläuferzellen bereits nach der Bestrahlung mit therapeutisch relevanten Dosen von 1 - 2 Gy festgestellt, was die hohe Strahlensensitivität naiver, neuraler Stamm- und Vorläuferzellen verdeutlicht. Dies unterstreicht zum einen die Effektivität von IR zur Schädigung und Eliminierung von Tumorzellen, zum anderen verdeutlicht sie, bei unbeabsichtigter Bestrahlung des normalen Hirngewebes, das Risiko zur Ausbildung neurologischer Spätfolgen.

Die hohe Strahlensensitivität von neuronalen Stamm- und Progenitorzellen und die inhibierte Generierung un/reifer Neurone wurde anhand der durchgeführten molekularen Expressionsanalysen bestätigt. Dabei wurden nach der Exposition mit Röntgenstrahlen insbesondere naive Zelltypmarker niedriger exprimiert als in den unbestrahlten Kontrollen. Die durchgeführten Proteinanalysen zeigten weiterhin, dass insbesondere die human spezifischen oRGs nach der Röntgenbestrahlung signifikant niedriger exprimiert wurden. Die Expression von PAX6 war nach der Exposition mit Röntgenstrahlung dosisabhängig erhöht. Dies führt zu der Annahme, dass die Bestrahlung von NSCs, wie bereits von Acharya et al., 2010 [101] beschrieben, zu einem Verlust der Differenzierungsfähigkeit der überlebenden NSCs führt, weswegen die Zellen nach Bestrahlung angereichert vorzufinden sind. Der Verlust der Differenzierungsfähigkeit der überlebenden NSCs erklärt die verminderte Generierung von oRGs, welche aus den neuroepithelialen NSCs bzw. RGs hervorgehen und anschließend in intermediäre Progenitorzellen und abgeleitete unreife und reife Neurone differenzieren [44]. Diese verminderte Differenzierungspotenz bestrahlter NSCs und die verminderte Generierung von oRGs, welche als Hauptpopulation an Vorläuferzellen dienen, trägt folglich größtenteils zu einer strahlenbedingten, gestörten Neurogenese bei. Die strahlenbedingte Abnahme von TBR2-positiven Progenitorzellen und β TUB-positiven, unreifen Neuronen sowie neugebildeter reifer MAP2- und SYP-positiver Neurone wurde mittels der durchgeführten Proteinexpressionsanalysen verifiziert. Da NSCs/RGs somit zur Generierung kortikaler Neurone beitragen, die u.a. die synaptische Plastizität sowie neurologische, sensorische und motorische Funktionen regulieren [44], kann die Schädigung oder der Verlust von neuronalen Stammzellen und Progenitorzellen und die einhergehende, inhibierte Neurogenese zu einer gestörten Hirnentwicklung und somit zu der Ausbildung neurologischer Krankheitsbilder

beitragen. Die Proteinexpressionsanalysen zeigten zusätzlich, dass der gliale Vorläufermarker A2B5 im Dosisbereich von 1 und 2 Gy ebenfalls niedriger exprimiert wurde. Die verminderte Expression der NSC-abgeleiteten, glialen A3B5-positiven Vorläuferzellen verifiziert wiederum die inhibierte Differenzierungspotenz der exponierten, überlebenden NSCs bzw. RGs, was eine gestörte Generierung reifer, glialer Zellen zur Folge hat. Dies wurde durch eine tendenziell verminderte Expression der glialen Marker GFAP und MOG nach Bestrahlung bestätigt. Die verminderte Generierung von Astrozyten und Oligodendrozyten und die somit gestörte Gliogenese führt *in vivo* zu degenerativen Veränderungen der weißen Substanz und pathologischen Gewebsveränderungen, welche wiederum den strahleninduzierten Spätfolgen von Hirntumorpatienten zugrunde liegen können [141, 142]. Die *in vitro* beobachteten proliferativen und degenerativen Reaktionen von neuronalen Stamm- sowie von neuronalen und glialen Progenitorzellen und der einhergehenden inhibierten Generierung reifer ZNS-Zellen, wurden bereits mittels histologischer Analysen im Hippocampus und im Kortex in bestrahlten ZNS-Präparaten von Hirntumorpatienten nachgewiesen [165].

Die Analysen der reiferen, fetalen ZOs, welche an d80 der Kultivierung bestrahlt wurden, ergaben ebenfalls eine dosisabhängige Wachstumsinhibierung der exponierten ZOs. Diese kann durch den strahleninduzierten, dosisabhängig erhöhten Anteil apoptotischer Zellen erklärt werden. Dabei war der Strahleneffekt auf das Wachstum und die Induktion der Apoptose in fetalen ZOs bis zu ein 10-faches geringer als nach der Bestrahlung embryonaler ZOs. Dies spricht für eine höhere Strahlenresistenz von differenzierten, reiferen Zellen im Gegensatz zu den naiven Stammzellen des ZNS. Da die Hirnentwicklung jedoch erst nach dem 20. Lebensjahr weitestgehend abgeschlossen ist [166–168] und eine Bestrahlung nicht nur zu (letalen) Schädigungen reifer Neurone und Gliazellen führt, sondern auch gleichzeitig die Differenzierungsfähigkeit überlebender NSCs und so die neurale Differenzierung und Entwicklung inhibiert, besteht sowohl für pädiatrische Patienten, als auch für Erwachsene durch die Schädigung von adulten, in den neurogenen Nischen des Gehirns verbliebenen und als Regenerationspool dienenden NSCs, ein Risiko für die Ausbildung neurologischer Krankheitsbilder. Im humanen Gehirn wurden proliferative NSCs bereits in der subgranulären Zone des *Gyrus dentatus* im Hippocampus nachgewiesen [169], sodass eine strahleninduzierte Schädigung dieser Zellpopulation die Neuroregeneration in adulten Hirntumorpatienten inhibiert und so zu Hippocampus-abhängigen Lern- und Gedächtnisdefiziten beiträgt. Darüber hinaus zeigten die Expressionsanalysen der exponierten, fetalen ZOs eine strahleninduzierte,

erhöhte Expression reifer neuronaler und glialer Marker. Die Beteiligung des WNT-Signalwegs bei der Regulierung der Differenzierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen ist bereits bekannt [47, 170, 171]. In dem von Lancaster et al., 2017 beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit genutzten Protokoll zur ZO-Generierung dient die Zugabe des WNT-Aktivators CHIR9999021 zur verbesserten kortikalen Differenzierung. Die starke Beteiligung des WNT-Signalwegs an der neuronalen Differenzierung wurde zudem durch Studien von Wie et al., 2012 [172] belegt, die zeigten, dass eine Röntgenbestrahlung von 0,3 und 3 Gy zu einer signifikanten Erhöhung der Wnt1-, Wnt3a- und Wnt5a-Expression in NSCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im murinen Hippocampus führte. Die Aktivierung des WNT-Signalweges ging zudem mit einer erhöhten hippocampalen Neurogenese einher, die sich in einer erhöhten, neuronalen Differenzierung der exponierten NSCs äußerte. Somit könnte die verstärkte Expression neuronaler Marker nach der Bestrahlung fetaler ZOs an d80 durch die strahleninduzierte Aktivierung des WNT-Signalwegs und einer damit einhergehenden, effizienteren Neurogenese erklärt werden. Inwieweit die aus den überlebenden NSCs generierten Neurone zur neuralen Funktionalität befähigt sind, müsste durch funktionelle Analysen z. B. mittels Mikroelektrodenarrays genauer untersucht werden. Die Durchführung und Optimierung elektrophysiologischer Messungen von ZOs wird zurzeit durch die Kooperationspartner der Technischen Hochschule Aschaffenburg vorgenommen. Weiterhin zeigten Schneider et al., 2013 [163] in ihren Studien, dass die Bestrahlung muriner NSCs *in vitro* und *in vivo* zu einer niedrigeren Expression des neuralen Stammzell-Markers PAX6 und zeitgleich zu einer erhöhten Expression des Astrozyten-assoziierten Intermediärfilaments GFAP führte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen der bestrahlten, fetalen ZOs, welche insbesondere nach einer Röntgenbestrahlung mit 15 Gy eine verminderte Expression von PAX6-positiven NSCs und eine erhöhte Expression von GFAP aufwiesen. Da insbesondere die BMP-Signalwege (BMP2, BMP4) bei der gelenkten Differenzierung in die astrogliale Richtung eine entscheidende Rolle spielen [163], kann eine Beteiligung der BMP-Signalwege in der strahleninduzierten, glialen Differenzierung nicht ausgeschlossen werden. Um die Beteiligung der BMP-Signalwege in der neuralen Strahlenantwort genauer zu untersuchen, wären ergänzende Signalweg-Analysen sinnvoll. Die Generierung von Oligodendrozyten findet *in vivo* erst nach der weitestgehend abgeschlossenen Generierung reifer Neurone und Astrozyten statt [55, 56]. Die strahleninduzierte, effizientere Generierung von Neuronen und Astrozyten bedingt somit eine eventuell frühere Generierung von

Oligodendrozyten und könnte als Erklärung für die erhöhte Expression nach der Röntgenbestrahlung fetaler ZO mit 15 Gy dienen. Zudem ist bekannt, dass nach dem Verlust von Myelin bei Patienten mit Multipler Sklerose zur Kompensation eine spontane Remyelinisierung folgt [173–175], bei der die Axone von neuem, dünnen Myelin ummantelt werden. Dabei erfolgt die Remyelinisierung nicht durch überlebende, sondern durch neue, aus Vorläuferzellen generierten Oligodendrozyten. Diese Erkenntnisse könnten ebenfalls als Erklärung der erhöhten Generierung reifer, myelinisierender Oligodendrozyten nach Röntgenbestrahlung dienen.

Zusammenfassend führte die Röntgenbestrahlung embryonaler und fetaler ZO zu Schädigungen diverser ZNS-Zelltypen, die den *in vivo* ausgebildeten, neurologischen Krankheitsbildern von Hirntumorpatienten zugrunde liegen können. Diese Krankheitsbilder gehen i.d.R. mit Symptomen einher, welche denen von Alzheimer Patienten ähneln und äußern sich u.a. in Lern-, Aufmerksamkeits- und Gedächtnisdefiziten [4, 5]. Die durch Alzheimer verursachten neurokognitiven Defizite sind vor allem auf die Degeneration cholinerg und dopaminerg Neurone im Neokortex, Hippocampus und im basalen Vorderhirn zurückzuführen [176]. Zwar wurden mittels IFF keine spezifischen Neuronen-Subtypen innerhalb der ZO nachgewiesen, jedoch lässt die Tatsache, dass eine Bestrahlung zu einer gestörten Neurogenese, sowie zu dem apoptotischen Zelltod diverser, exponierter Zelltypen führt, die Annahme zu, dass durch die Anwendung von IR in der Tumorthherapie dopaminerge Neurone geschädigt werden und keine Neuroregeneration stattfinden kann. Diese neuropathologischen Veränderungen können wiederum die Ausbildung Alzheimer-ähnlicher Symptome bedingen. Um zu überprüfen, welche neuronalen Zelltypen im Besonderen vom strahleninduzierten, apoptotischen Zelltod betroffen sind, wäre demnach eine Doppelfärbung von apoptotischen und unterschiedlichen, neurologischen Markern sinnvoll. Dies war im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da zunächst ein Färbeprotokoll für zerebrales Gewebe etabliert und eine Optimierung hinsichtlich der Einzelfärbungen vorgenommen wurde. Nichtsdestotrotz konnten die den *in vivo* strahleninduzierten, neurologischen Krankheitsbildern zugrundeliegenden, zellulären Mechanismen im ZO-Modell abgebildet werden, was somit die Eignung der ZO zur Analyse der strahleninduzierten Neurotoxizität verdeutlicht.

6.2.2 Effekte von Partikelstrahlen auf ZOs

Aufgrund der effizienten, tumorkonformen Bestrahlung ist die Zahl von Patienten, die einer Partikelbestrahlung unterzogen wurden, in den letzten Jahren stetig gestiegen [114]. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche zur Analyse der Effekte von Partikelbestrahlung auf ZOs durchgeführt. In bereits veröffentlichte Studien wurde die höhere RBW von Kohlenstoffionen im Vergleich zur Photonenstrahlung aufgezeigt [102, 103] und folglich potenziell auftretende Strahleneffekte bereits bei niedrigeren Dosen erwartet. Aufgrund dessen wurde die Kohlenstoffbestrahlung der ZOs an d20 im Dosisbereich von 0,5 - 4 Gy vorgenommen. Die morphologischen Analysen zeigten keinen deutlichen Unterschied in der Strahlenantwort zur Röntgenbestrahlung mit den höheren Dosen von 1 - 8 Gy. Somit wurden für eine gleiche Strahlenantwort geringere Dosen benötigt und die höhere Effektivität und die Eignung hochenergetischer Kohlenstoffionen zur Tumorbehandlung nachgewiesen. Weiterhin wurde die strahleninduzierte Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Kavitäten sowie eine verminderte Proliferation der exponierten ZOs bereits ab Dosen von 0,5 Gy Kohlenstoffbestrahlung beobachtet, was wiederum die Strahlensensitivität naiver Zelltypen verifiziert. Die starke Korrelation zwischen der Ausbildung morphologischer Abnormalitäten und der Strahlendosis legt nahe, dass bei Bestrahlung naiver Zelltypen nicht die Strahlenart, sondern vor allem die applizierte Dosis entscheidend für die nachfolgende Strahlenantwort ist. Um die genauen Wirkmechanismen von Kohlenstoffstrahlen auf die einzelnen ZNS-Zelltypen zu analysieren, sollten in Zukunft ergänzende detaillierte, molekulare Analysen durchgeführt werden, welche aufgrund der limitierten Strahlzeiten und des Zeitrahmens der vorliegenden Arbeit nicht möglich waren. Im Gegensatz zu Schwerionen besitzen Protonen eine niedrigere RBW, welche vergleichbar mit der von Photonen ist (RBW: ~ 1) [177], weswegen die gleichen Dosen für die Röntgen- und Protonenbestrahlung gewählt wurden. Die an d80 bestrahlten ZOs wurden zur Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher Strahlenmodalitäten zum einen zur Imitation der Bestrahlung des Tumorgewebes im SOBP und zum anderen, zur Imitation der Strahlenbelastung des Normalgewebes bei der Tumortherapie, im Plateau bestrahlt. Dabei zeigten die morphologischen Analysen nach der SOBP-Bestrahlung einen stärkeren Strahleneffekt hinsichtlich des Auftretens morphologischer Abnormalitäten verglichen mit der Röntgen- oder Plateaubestrahlung. Dennoch wurden auch nach einer Plateaubestrahlung mit 3 Gy strahleninduzierte, morphologische Abnormalitäten festgestellt. Diese Beobachtungen liefern

somit eine Erklärung für die, trotz einer dosimetrisch-vorteilhafteren Protonenbestrahlung, *in vivo* ausgebildeten, unerklärten Spätfolgen, zu denen die sogenannten Radionekrosen zählen.

6.3 Eignung von ZOs zur Analyse unerklärter Spätfolgen wie der Radionekrose

Die Radionekrose geht, als Spätfolge kranialer Strahlentherapien, *in vivo* mit der Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Ödeme als Folge endothelialer Zellschädigungen einher [178]. Die dosisabhängige Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Kavitäten wurde ebenfalls nach der Bestrahlung der ZOs mit allen Strahlenarten beobachtet. Im Vergleich zu der Plateau- und Röntgenbestrahlung war nach der Protonenbestrahlung fetaler ZOs im SOBP eine erhöhte Kavitäten-Bildung zu beobachten, die mit einem erhöhten Anteil nekrotischer Zellen einherging. Nichtsdestotrotz wurden auch nach einer Protonenbestrahlung im Plateau bereits ab einer Einzeldosis von 3 Gy eine erhöhte Ausbildung strahleninduzierter Kavitäten festgestellt. Somit verdeutlichen diese Ergebnisse die Eignung von ZOs zur Abbildung strahleninduzierter Langzeitfolgen, die auch nach einer dosimetrisch-vorteilhafteren Partikelbestrahlung auftreten. Darüber hinaus wurde eine morphologische Ähnlichkeit der exponierten ZOs zu den von Pellegrini et al., 2020, beschriebenen Choroid Plexus-Organoiden festgestellt. Da es sich bei dem Choroid Plexus um ein Epithelgewebe des ZNS handelt, welches als Blut-Liquor-Schranke eine Barrierefunktion besitzt, wurden die strahleninduzierten Kavitäten hinsichtlich ihrer Barrierefunktion mittels eines Tinten-Tests untersucht. Dieser belegte die epithelialen Barriereeigenschaften der strahleninduzierten Kavitäten, was vermuten lässt, dass es sich dabei um Choroid Plexus-Strukturen handelt. Zur Verifizierung wären ergänzende IFF gegen epitheliale Markerproteine wie z. B. das *Tight-Junction*-spezifische Protein ZO-1 [179] oder bestimmter Choroid Plexus-Transportproteine wie Transthyretin [180] sinnvoll. Der Unterschied in der Generierung von Choroid Plexus-Organoiden nach Pellegrini et al., 2020 zu den ZOs nach Lancaster et al., 2017 liegt in der zusätzlichen Aktivierung des BMP4-Signalwegs. Die aufgrund der strahleninduzierten, erhöhten astroglialen Differenzierung bereits vermutete Aktivierung der BMP-Signalwege könnte folglich auch die Ausbildung von Choroid Plexus-Strukturen induzieren. Somit bieten ZOs die Möglichkeit, bisher unerforschte Langzeiteffekte einer Tumorthherapie abzubilden und deren Ursachen zu analysieren. Darüber hinaus ermöglichen ZOs die Untersuchung der Korrelation zwischen strahleninduzierten Nekrosen und Choroid Plexus-Strukturen, welche durch die Bildung epithelialer Abkapselungen des geschädigten Gewebes als eine Art Heilungsprozess zur Regeneration des ZNS dienen könnten.

6.4 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend wurde ein Vorderhirn-äquivalentes Organoid-Modell nach Lancaster et al., 2017 etabliert, welches die temporären und räumlichen Strukturierungsprozesse der humanen Hirnentwicklung widerspiegelte und die Analyse der Wirkmechanismen von IR auf das ZNS-Gewebe ermöglichte. Anhand der durchgeführten Strahlenexperimente wurde gezeigt, dass eine Strahlenexposition mit Röntgen- und Partikelstrahlen in embryonalen ZOs schädlicher ist als in fetalen. Somit wurde die Strahlensensitivität naiver, neuraler Stammzellen im Vergleich zu den differenzierten, reiferen Zellen des ZNS nachgewiesen. Damit besteht insbesondere für Patienten bis 20 Jahre, deren Hirnentwicklung noch nicht vollends abgeschlossen ist [181–183], durch die Schädigung der neuralen Stammzellpopulation und der einhergehenden gestörten Neuro- und Gliogenese, ein erhöhtes Risiko für strahleninduzierte Spätfolgen. Nichtsdestotrotz stellt eine kraniale Bestrahlung auch für adulte Patienten, aufgrund pathologischer Veränderungen des ZNS-Gewebes durch die Schädigung neuronaler und glialer Zelltypen und einer eingeschränkten Neuroregeneration, ein Risiko für die Ausbildung neurologischer Spätfolgen dar. Zudem war die Strahlenantwort, neben dem Reifegrad der exponierten Zelltypen, von der Dosis und der gewählten Strahlenmodalität abhängig. Dabei wurde bereits ab therapeutisch relevanten Dosen von 0,5 bis 3 Gy Röntgen- und Partikelstrahlung sowie nach einer Bestrahlung im Plateau, zur Imitation der Strahlenbelastung des Normalgewebes, ein Effekt auf die Viabilität der exponierten ZNS-Zelltypen sowie auf die Proliferation und Differenzierungspotenz neuraler Stamm- und Vorläuferzellen festgestellt. Dies bedingt folglich die Ausbildung diverser Hirnschäden, trotz innovativer und verbesserter Strahlenmodalitäten. Die Diversität im Auftreten der neurologischen Krankheitsbilder kann zwar zum einen durch die beschriebene Heterogenität der generierten ZOs repräsentiert werden, zum anderen führt diese jedoch auch zu Unterschieden in der allgemeinen Strahlenantwort. Diese Unterschiede wurden durch die teilweise hohen Standardabweichungen bei der Datenanalyse abgebildet und erschweren statistisch signifikante Ergebnisse. Demzufolge können keine allgemeingültigen Aussagen über die Ausbildung behandlungsbedingter Langzeiteffekte getroffen werden. Eine verbesserte Homogenität der generierten Organoid-Chargen könnte durch den Einsatz biokompatibler Polymer- bzw. Hydrogel-Gerüste erzielt werden, wie sie bereits durch verschiedene Studien beschrieben wurden [184–186]. Neben der Möglichkeit zur Untersuchung der molekularen Wirkweisen von IR auf die verschiedenen neuralen Zellen des

ZNS, wurde die Eignung von ZOs als Modellsysteme zur Imitation strahleninduzierter Langzeitfolgen, wie die Ausbildung von Radionekrosen, aufgezeigt. Darüber hinaus ermöglichen ZOs die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Ausbildung von Radionekrosen und strahleninduzierten, epithelialen Choroid Plexus-Strukturen. Diese wurde bisher in keinem anderen Modell beschrieben und verdeutlichen das Potenzial von ZOs als humanes *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung unerklärter Strahleneffekten in einer klinisch relevanten Mikroumgebung. Darüber hinaus ist es möglich, verschiedene hirnregionsspezifische Sphäroide, wie beispielsweise dorsale und ventrale Vorderhirn-Sphäroide, zu sogenannten *Assembloids* zu fusionieren. Dies ermöglicht die Modellierung der Wechselwirkungen verschiedener Zelltypen zwischen den unterschiedlichen Hirnregionen und so die Auswirkung von IR auf die Ausbildung zellulärer Netzwerke [187–190]. Andere Studien demonstrierten die Generierung von Mikroglia innerhalb eines Organoid-Modells [148, 191], wodurch die Untersuchung der Auswirkungen kombinierter Strahlen- und Immuntherapien auf das menschliche ZNS ermöglicht wird. Auch der additive Einsatz von Chemotherapeutika zur Behandlung von Hirntumorpatienten erhöht das Risiko zur Ausbildung behandlungsbedingter Neurotoxizität [123] und ist bisher weitestgehend unerforscht. Ein weiterer Ansatz ist die Generierung von Hirntumoren in einer realistischen, neuralen Mikroumgebung [192], die ein besseres Verständnis der Reaktionen sowohl des Normal- als auch des Tumorgewebes nach einer Exposition mit IR ermöglichen. Neben der Modellierung der Langzeiteffekte nach einer Strahlentherapie, bieten ZOs die Möglichkeit die Effekte von hochenergetischer Weltraumstrahlung in Bezug auf Langzeitmissionen in der Raumfahrt zu untersuchen. Trotz verbleibender Limitierungen verdeutlichen die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von (zerebralen) Hirn-Organoiden im Gebiet der Strahlenforschung deren wissenschaftliches und therapeutisches Potenzial als bisher realistischstes *in vitro* Modell für das humane Gehirn.

I. Literaturverzeichnis

1. Furtwängler R, Yilmaz U. Pädiatrische Hirntumoren : Basisdiagnostik und Therapieprinzipien. [Pediatric intracranial tumors : Principles of diagnostics and treatment]. *Radiologe*. 2014;54:754–63. doi:10.1007/s00117-014-2665-z.
2. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program: Estimated New Cancer Cases and Deaths for 2021. 2021. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/browse_csr.php?sectionSEL=1&pageSEL=sect_01_table.01. Accessed 21 Jun 2021.
3. National Center for Health Statistics. Deaths and Mortality: Deaths: Leading Causes for 2017. 2017. https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr68/nvsr68_06-508.pdf. Accessed 23 Jun 2021.
4. Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM, Shaw EG, Wheeler KT, Chan MD. Radiation-induced brain injury: A review. *Front Oncol*. 2012;2:73. doi:10.3389/fonc.2012.00073.
5. Roddy E, Mueller S. Late Effects of Treatment of Pediatric Central Nervous System Tumors. *J Child Neurol* 2016;31:237–54. doi:10.1177/0883073815587944.
6. Fouladi M, Gilger E, Kocak M, Wallace D, Buchanan G, Reeves C, et al. Intellectual and functional outcome of children 3 years old or younger who have CNS malignancies. *J Clin Oncol* 2005;23:7152–60. doi:10.1200/JCO.2005.01.214.
7. Radcliffe J, Bunin GR, Sutton LN, Goldwein JW, Phillips PC. Cognitive deficits in long-term survivors of childhood medulloblastoma and other noncortical tumors: Age-dependent effects of whole brain radiation. *International Journal of Developmental Neuroscience* 1994;12:327–34. doi:10.1016/0736-5748(94)90081-7.
8. Girardi F, Allemani C, Coleman MP. Worldwide Trends in Survival From Common Childhood Brain Tumors: A Systematic Review. *J Glob Oncol*. 2019;5:1–25. doi:10.1200/JGO.19.00140.
9. Visser O, Ardanaz E, Botta L, Sant M, Tavilla A, Minicozzi P. Survival of adults with primary malignant brain tumours in Europe; Results of the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer*. 2015;51:2231–41. doi:10.1016/j.ejca.2015.07.032.
10. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* 2017;32:266–77. doi:10.1152/physiol.00036.2016.
11. Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, Smith KA, Barkan ER, Graybuck LT, et al. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature* 2019;573:61–8. doi:10.1038/s41586-019-1506-7.
12. Yang L, Yang J, Li G, Li Y, Wu R, Cheng J, Tang Y. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury. *MN*. 2017;54:1022–32. doi:10.1007/s12035-015-9628-x.
13. Defelipe J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat*. 2011;5:29. doi:10.3389/fnana.2011.00029.
14. Sun N, Meng X, Liu Y, Song D, Jiang C, Cai J. Applications of brain organoids in neurodevelopment and neurological diseases. *J Biomed Sci*. 2021;28:30. doi:10.1186/s12929-021-00728-4.
15. Lancaster MA, Corsini NS, Wolfinger S, Gustafson EH, Phillips AW, Burkard TR, et al. Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nat Biotechnol*. 2017;35:659–66. doi:10.1038/nbt.3906.

16. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and effects of ionizing radiation. 1st ed. New York: United Nations; 2008.
17. Bundesamt für Strahlenschutz. Ionisierende Strahlung: Wie hoch ist die natürliche Strahlenbelastung in Deutschland? 2020. https://www.bfs.de/DE/themen/ion/umwelt/natuerliche-strahlenbelastung/natuerliche-strahlenbelastung_node.html. Accessed 17 May 2021.
18. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012;9:193–9. doi:10.7150/ijms.3635.
19. Combs SE, Kessel KA, Herfarth K, Jensen A, Oertel S, Blattmann C, et al. Treatment of pediatric patients and young adults with particle therapy at the Heidelberg Ion Therapy Center (HIT): establishment of workflow and initial clinical data. *Radiat Oncol.* 2012;7:170. doi:10.1186/1748-717X-7-170.
20. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist. 8th ed. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires: Wolters Kluwer; 2006.
21. Krieger H. Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes. 4th ed. Wiesbaden: Vieweg + Teubner; 2012.
22. Scholz M. Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues. In: Abe A, Albertsson A-C, Cantow H-J, Dušek K, Edwards S, Höcker H, et al., editors. Radiation Effects on Polymers for Biological Use. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003. p. 95–155. doi:10.1007/3-540-45668-6_4.
23. Durante M, Loeffler JS. Charged particles in radiation oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7:37–43. doi:10.1038/nrclinonc.2009.183.
24. Weber U, Kraft G. Design and construction of a ripple filter for a smoothed depth dose distribution in conformal particle therapy. *Phys Med Biol.* 1999;44:2765–75. doi:10.1088/0031-9155/44/11/306.
25. Grant JD, Chang JY. Proton-based stereotactic ablative radiotherapy in early-stage non-small-cell lung cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:389048. doi:10.1155/2014/389048.
26. Richter D. Treatment planning for tumors with residual motion in scanned ion beam therapy 2012.
27. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
28. Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* 2016. doi:10.1101/pdb.prot087205.
29. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, Guevara RL de, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.* 2013;14:32. doi:10.1186/1471-2121-14-32.
30. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73:1907–16. doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
31. Unal Cevik I, Dalkara T. Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. *Cell Death Differ.* 2003;10:928–9. doi:10.1038/sj.cdd.4401250.
32. Edwards JR, Diamantakos EA, Peuler JD, Lamar PC, Prozialeck WC. A novel method for the evaluation of proximal tubule epithelial cellular necrosis in the intact rat kidney using ethidium homodimer. *BMC Physiol.* 2007;7:1. doi:10.1186/1472-6793-7-1.
33. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer.* 2005;104:1129–37. doi:10.1002/cncr.21324.

34. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 2010;20:327–48. doi:10.1007/s11065-010-9148-4.
35. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, Viebahn C. *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik* 2013. 6th ed. München: Elsevier Urban & Fischer.
36. Kelly CM, Caldwell MA. Derivation of Neural Stem Cells from the Developing and Adult Human Brain. *Results Probl Cell Differ*. 2018;66:3–20. doi:10.1007/978-3-319-93485-3_1.
37. Kelava I, Lancaster MA. Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell Stem Cell* 2016;18:736–48. doi:10.1016/j.stem.2016.05.022.
38. Zhang J, Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int* 2015;2015:727542. doi:10.1155/2015/727542.
39. Pollen AA, Nowakowski TJ, Chen J, Retallack H, Sandoval-Espinosa C, Nicholas CR, et al. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell*. 2015;163:55–67. doi:10.1016/j.cell.2015.09.004.
40. Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F. Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci*. 2011;31:3683–95. doi:10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011.
41. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*. 2011;146:18–36. doi:10.1016/j.cell.2011.06.030.
42. Fish JL, Dehay C, Kennedy H, Huttner WB. Making bigger brains-the evolution of neural-progenitor-cell division. *J Cell Sci*. 2008;121:2783–93. doi:10.1242/jcs.023465.
43. Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. 2010;464:554–61. doi:10.1038/nature08845.
44. Andrews MG, Nowakowski TJ. Human brain development through the lens of cerebral organoid models. *Brain Res*. 2019;1725:146470. doi:10.1016/j.brainres.2019.146470.
45. Verreet T, Verslegers M, Quintens R, Baatout S, Benotmane MA. Current Evidence for Developmental, Structural, and Functional Brain Defects following Prenatal Radiation Exposure. *Neural Plast*. 2016;2016:1243527. doi:10.1155/2016/1243527.
46. Sessa A, Mao C-A, Hadjantonakis A-K, Klein WH, Broccoli V. Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron*. 2008;60:56–69. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.028.
47. Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:396. doi:10.3389/fncel.2014.00396.
48. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2003;467:1–10. doi:10.1002/cne.10874.
49. Miyata T, Maeda T, Lee JE. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev*. 1999;13:1647–52. doi:10.1101/gad.13.13.1647.
50. Menezes JR, Luskin MB. Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J Neurosci*. 1994;14:5399–416. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-09-05399.1994.
51. Lake BB, Ai R, Kaeser GE, Salathia NS, Yung YC, Liu R, et al. Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science*. 2016;352:1586–90. doi:10.1126/science.aaf1204.

52. Kim Y, Jang Y-N, Kim J-Y, Kim N, Noh S, Kim H, et al. Microtubule-associated protein 2 mediates induction of long-term potentiation in hippocampal neurons. *FASEB J*. 2020;34:6965–83. doi:10.1096/fj.201902122RR.
53. Duan W, Zhang Y-P, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang C-Q, Yin Q. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *MN*. 2016;53:1637–47. doi:10.1007/s12035-015-9122-5.
54. Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1012–6. doi:10.1073/pnas.022575999.
55. Dietrich J, Noble M, Mayer-Proschel M. Characterization of A2B5+ glial precursor cells from cryopreserved human fetal brain progenitor cells. *Glia*. 2002;40:65–77. doi:10.1002/glia.10116.
56. Rao MS, Mayer-Proschel M. Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev Biol*. 1997;188:48–63. doi:10.1006/dbio.1997.8597.
57. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009;457:675–7. doi:10.1038/457675a.
58. Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*. 2006;209:2304–11. doi:10.1242/jeb.02208.
59. Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 1985;8:203–14. doi:10.1016/S0165-5728(85)80063-1.
60. Barbarese E, Barry C, Chou CH, Goldstein DJ, Nakos GA, Hyde-DeRuyscher R, et al. Expression and localization of myelin basic protein in oligodendrocytes and transfected fibroblasts. *J Neurochem*. 1988;51:1737–45. doi:10.1111/j.1471-4159.1988.tb01153.x.
61. Scolding NJ, Frith S, Linington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DAS. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *Journal of Neuroimmunology*. 1989;22:169–76. doi:10.1016/0165-5728(89)90014-3.
62. Goldman SA, Kuypers NJ. How to make an oligodendrocyte. *Development*. 2015;142:3983–95. doi:10.1242/dev.126409.
63. Ronan JL, Wu W, Crabtree GR. From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet*. 2013;14:347–59. doi:10.1038/nrg3413.
64. Bhaduri A, Andrews MG, Mancina Leon W, Jung D, Shin D, Allen D, et al. Cell stress in cortical organoids impairs molecular subtype specification. *Nature*. 2020;578:142–8. doi:10.1038/s41586-020-1962-0.
65. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2004;37:23–34. doi:10.1111/j.1365-2184.2004.00298.x.
66. Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem* 2003;384:1391–409. doi:10.1515/BC.2003.155.
67. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7. doi:10.1126/science.282.5391.1145.
68. Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2012;3:8. doi:10.1186/scrt99.
69. Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 2007;211:279–86. doi:10.1002/jcp.20978.

70. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–6. doi:10.1038/292154a0.
71. Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006;24:1476–86. doi:10.1634/stemcells.2005-0299.
72. Wang G, Zhang H, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:934–42. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.058.
73. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:971–4. doi:10.1038/nbt1001-971.
74. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci* 2010;28:589–603. doi:10.3233/RNN-2010-0543.
75. Yan Y, Shin S, Jha BS, Liu Q, Sheng J, Li F, et al. Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2:862–70. doi:10.5966/sctm.2013-0080.
76. Schuldt BM, Guhr A, Lenz M, Kobold S, MacArthur BD, Schuppert A, et al. Power-laws and the use of pluripotent stem cell lines. *PLoS ONE* 2013;8:e52068. doi:10.1371/journal.pone.0052068.
77. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287:1433–8. doi:10.1126/science.287.5457.1433.
78. Monni E, Congiu T, Massa D, Nat R, Diana A. Human neurospheres: From stained sections to three-dimensional assembly. *Translational Neuroscience* 2011. doi:10.2478/s13380-011-0007-4.
79. Mayer M, Arrizabalaga O, Lieb F, Ciba M, Ritter S, Thielemann C. Electrophysiological investigation of human embryonic stem cell derived neurospheres using a novel spike detection algorithm. *Biosens Bioelectron.* 2018;100:462–8. doi:10.1016/j.bios.2017.09.034.
80. Jensen JB, Parmar M. Strengths and Limitations of the Neurosphere Culture System. *MN.* 2006;34:153–62. doi:10.1385/MN:34:3:153.
81. Verhaegen F, Granton P, Tryggestad E. Small animal radiotherapy research platforms. *Phys Med Biol.* 2011;56:R55-83. doi:10.1088/0031-9155/56/12/R01.
82. Perlman RL. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health.* 2016;2016:170–6. doi:10.1093/emph/eow014.
83. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* 2014;345:1247125. doi:10.1126/science.1247125.
84. Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, Eiraku M, Sasai Y. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:20284–9. doi:10.1073/pnas.1315710110.
85. Sakaguchi H, Kadoshima T, Soen M, Narii N, Ishida Y, Ohgushi M, et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun.* 2015;6:8896. doi:10.1038/ncomms9896.
86. Pellegrini L, Bonfio C, Chadwick J, Begum F, Skehel M, Lancaster MA. Human CNS barrier-forming organoids with cerebrospinal fluid production. *Science* 2020. doi:10.1126/science.aaz5626.

87. Jo J, Xiao Y, Sun AX, Cukuroglu E, Tran H-D, Göke J, et al. Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell*. 2016;19:248–57. doi:10.1016/j.stem.2016.07.005.
88. Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuelen T, et al. Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8:1144–54. doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.010.
89. Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, et al. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*. 2016;165:1238–54. doi:10.1016/j.cell.2016.04.032.
90. Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 2015;10:537–50. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.051.
91. Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501:373–9. doi:10.1038/nature12517.
92. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. *Mol Med*. 2000;6:88–95. doi:10.1007/BF03401776.
93. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2014;9:2329–40. doi:10.1038/nprot.2014.158.
94. Benito-Kwiecinski S, Lancaster MA. Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020. doi:10.1101/cshperspect.a035709.
95. Otake M, Schull WJ. Radiation-related brain damage and growth retardation among the prenatally exposed atomic bomb survivors. *Int J Radiat Biol*. 1998;74:159–71. doi:10.1080/095530098141555.
96. Crossen JR, Garwood D, Glatstein E, Neuwelt EA. Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy. *J Clin Oncol*. 1994;12:627–42. doi:10.1200/JCO.1994.12.3.627.
97. Hladik D, Tapio S. Effects of ionizing radiation on the mammalian brain. *Mutat Res*. 2016;770:219–30. doi:10.1016/j.mrrev.2016.08.003.
98. Schielke C, Hartel C, Durante M, Ritter S, Schroeder IS. Solving the Issue of Ionizing Radiation Induced Neurotoxicity by Using Novel Cell Models and State of the Art Accelerator Facilities. *Front. Phys*. 2020. doi:10.3389/fphy.2020.568027.
99. Deutsches Krankenhausinstitut e.V. Erfassung der Häufigkeit bildgebender Diagnostik, insbesondere strahlendiagnostischer Massnahmen und der Altersverteilung der Patienten. Düsseldorf.
100. Connell PP, Hellman S. Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective. *Cancer Res*. 2009;69:383–92. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6871.
101. Acharya MM, Lan ML, Kan VH, Patel NH, Giedzinski E, Tseng BP, Limoli CL. Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1846–55. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.021.
102. Isono M, Yoshida Y, Takahashi A, Oike T, Shibata A, Kubota Y, et al. Carbon-ion beams effectively induce growth inhibition and apoptosis in human neural stem cells compared with glioblastoma A172 cells. *J Radiat Res*. 2015;56:856–61. doi:10.1093/jrr/rrv033.
103. Yokota Y, Wada Y, Funayama T. Distinct modes of death in human neural stem and glioblastoma cells irradiated with carbon-ion radiation and gamma-rays. *Int J Radiat Biol*. 2020;96:172–8. doi:10.1080/09553002.2020.1683639.

104. Duman JG, Dinh J, Zhou W, Cham H, Mavratsas VC, Pavešković M, et al. Memantine prevents acute radiation-induced toxicities at hippocampal excitatory synapses. *Neuro-oncology*. 2018;20:655–65. doi:10.1093/neuonc/nox203.
105. Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR. Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res*. 2003;63:4021–7.
106. Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, et al. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat Res*. 2004;162:39–47. doi:10.1667/RR3206.
107. Panagiotakos G, Alshamy G, Chan B, Abrams R, Greenberg E, Saxena A, et al. Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PLoS ONE*. 2007;2:e588. doi:10.1371/journal.pone.0000588.
108. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med*. 2002;8:955–62. doi:10.1038/nm749.
109. Britten RA, Davis LK, Johnson AM, Keeney S, Siegel A, Sanford LD, et al. Low (20 cGy) doses of 1 GeV/u (56)Fe--particle radiation lead to a persistent reduction in the spatial learning ability of rats. *Radiat Res*. 2012;177:146–51. doi:10.1667/rr2637.1.
110. Tada E, Parent JM, Lowenstein DH, Fike JR. X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience*. 2000;99:33–41. doi:10.1016/S0306-4522(00)00151-2.
111. Seegenschmiedt MH, Micke O, Muecke R. Radiotherapy for non-malignant disorders: state of the art and update of the evidence-based practice guidelines. *Br J Radiol*. 2015;88:20150080. doi:10.1259/bjr.20150080.
112. Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, Ottensmeier H, Warmuth-Metz M, Soerensen N, et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med*. 2005;352:978–86. doi:10.1056/NEJMoa042176.
113. Yeo KK, Margol AS, Kennedy RJ, Hung L, Robison NJ, Dhall G, Asgharzadeh S. Prognostic significance of molecular subgroups of medulloblastoma in young children receiving irradiation-sparing regimens. *J Neurooncol*. 2019;145:375–83. doi:10.1007/s11060-019-03307-8.
114. Particle Therapy Co-Operative Group. Statistics of patients treated in particle therapy facilities worldwide. 2019. <https://www.ptcog.ch/index.php/ptcog-patient-statistics>.
115. Morini J, Babini G, Barbieri S, Baiocco G, Ciocca M, Ivaldi GB, et al. A comparison between X-ray and carbon ion irradiation in human neural stem cells. *Radiat Prot Dosimetry*. 2019;183:102–6. doi:10.1093/rpd/ncy231.
116. Sorokina SS, Malkov AE, Shubina LV, Zaichkina SI, Pikalov VA. Low dose of carbon ion irradiation induces early delayed cognitive impairments in mice. *Radiat Environ Biophys*. 2021;60:61–71. doi:10.1007/s00411-020-00889-0.
117. Parihar VK, Pasha J, Tran KK, Craver BM, Acharya MM, Limoli CL. Persistent changes in neuronal structure and synaptic plasticity caused by proton irradiation. *Brain Struct Funct*. 2015;220:1161–71. doi:10.1007/s00429-014-0709-9.
118. Sweet TB, Panda N, Hein AM, Das SL, Hurley SD, Olschowka JA, et al. Central nervous system effects of whole-body proton irradiation. *Radiat Res*. 2014;182:18–34. doi:10.1667/RR13699.1.
119. Schmoll H-J. Indikationen, Therapiekonzepte und spezielle Therapiemodalitäten (aus Teil 2 und Teil 1) ; [Adressen und Links online]. 4th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verl.; 2006.

120. Delanian S, Lefaix J-L. Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol.* 2007;17:99–107. doi:10.1016/j.semradonc.2006.11.006.
121. Lawrence YR, Li XA, el Naqa I, Hahn CA, Marks LB, Merchant TE, Dicker AP. RADIATION DOSE–VOLUME EFFECTS IN THE BRAIN. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76:S20–7. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.02.091.
122. Kofler B, Kerschbaumer J, Scharfetter VH, Posch A, Gizewski ER, Widmann G. Hirnmetastase versus Strahlennekrose nach Kopf-Hals-Karzinom : Hirnläsion nach Kopf-Hals-Karzinom. [Brain metastasis versus radiation necrosis after head and neck cancer : Brain lesion after head and neck cancer]. *Radiologe.* 2017;57:392–6. doi:10.1007/s00117-017-0219-x.
123. Kralik SF, Ho CY, Finke W, Buchsbaum JC, Haskins CP, Shih C-S. Radiation Necrosis in Pediatric Patients with Brain Tumors Treated with Proton Radiotherapy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;36:1572–8. doi:10.3174/ajnr.A4333.
124. Das D, Li J, Cheng L, Franco S, Mahairaki V. Human Forebrain Organoids from Induced Pluripotent Stem Cells: A Novel Approach to Model Repair of Ionizing Radiation-Induced DNA Damage in Human Neurons. *Radiat Res.* 2020;194:191–8. doi:10.1667/RR15567.1.
125. Jüttner J. Rapid Prototyping für Anwendungen im Bereich Life-Sciences mit Hilfe Additiver Fertigung von Polymeren auf Siliziumbasis; 2018.
126. Giandomenico SL, Sutcliffe M, Lancaster MA. Generation and long-term culture of advanced cerebral organoids for studying later stages of neural development. *Nat Protoc* 2020. doi:10.1038/s41596-020-00433-w.
127. Baxter MG, Chiba AA. Cognitive functions of the basal forebrain. *Current Opinion in Neurobiology.* 1999;9:178–83. doi:10.1016/S0959-4388(99)80024-5.
128. Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol.* 1996;180:664–79. doi:10.1006/dbio.1996.0336.
129. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:517–30. doi:10.1038/nrn874.
130. Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 2002;12:321–9. doi:10.1038/sj.cr.7290134.
131. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000;24:372–6. doi:10.1038/74199.
132. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells.* 2014;6:305–11. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.305.
133. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci.* 2004;26:148–65. doi:10.1159/000082134.
134. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007;17:42–9. doi:10.1038/sj.cr.7310125.
135. Harrison-Uy SJ, Pleasure SJ. Wnt signaling and forebrain development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a008094. doi:10.1101/cshperspect.a008094.
136. Dum RP, Levinthal DJ, Strick PL. Motor, cognitive, and affective areas of the cerebral cortex influence the adrenal medulla. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:9922–7. doi:10.1073/pnas.1605044113.

137. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75:2177–95. doi:10.1007/s00018-018-2794-z.
138. Sebastián-Serrano A, Sandonis A, Cardozo M, Rodríguez-Tornos FM, Bovolenta P, Nieto M. P α x6 expression in postmitotic neurons mediates the growth of axons in response to SFRP1. *PLoS ONE.* 2012;7:e31590. doi:10.1371/journal.pone.0031590.
139. Ikenaka K. Gliogenesis. In: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, editors. *Encyclopedia of Neuroscience.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 1735–1737. doi:10.1007/978-3-540-29678-2_2011.
140. Florio M, Borrell V, Huttner WB. Human-specific genomic signatures of neocortical expansion. *Current Opinion in Neurobiology.* 2017;42:33–44. doi:10.1016/j.conb.2016.11.004.
141. Belka C, Budach W, Kortmann RD, Bamberg M. Radiation induced CNS toxicity--molecular and cellular mechanisms. *Br J Cancer.* 2001;85:1233–9. doi:10.1054/bjoc.2001.2100.
142. Greene-Schloesser D, Robbins ME. Radiation-induced cognitive impairment--from bench to bedside. *Neuro-oncology.* 2012;14 Suppl 4:iv37-44. doi:10.1093/neuonc/nos196.
143. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91:461–553. doi:10.1152/physrev.00011.2010.
144. Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* 2018;217:459–72. doi:10.1083/jcb.201709069.
145. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017;169:1276-1290.e17. doi:10.1016/j.cell.2017.05.018.
146. Liu Z, Qiu A-W, Huang Y, Yang Y, Chen J-N, Gu T-T, et al. IL-17A exacerbates neuroinflammation and neurodegeneration by activating microglia in rodent models of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* 2019;81:630–45. doi:10.1016/j.bbi.2019.07.026.
147. Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, Healy LM, Nguyen CHH, Newman SA, et al. iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron.* 2017;94:278-293.e9. doi:10.1016/j.neuron.2017.03.042.
148. Ormel PR, Vieira de Sá R, van Bodegraven EJ, Karst H, Harschnitz O, Sneebouer MAM, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nat Commun.* 2018;9:4167. doi:10.1038/s41467-018-06684-2.
149. Madhavan M, Nevin ZS, Shick HE, Garrison E, Clarkson-Paredes C, Karl M, et al. Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids. *Nat Methods.* 2018;15:700–6. doi:10.1038/s41592-018-0081-4.
150. Marton RM, Miura Y, Sloan SA, Li Q, Revah O, Levy RJ, et al. Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nat Neurosci.* 2019;22:484–91. doi:10.1038/s41593-018-0316-9.
151. Price DL, Cork LC, Struble RG, Kitt CA, Walker LC, Powers RE, et al. Dysfunction and death of neurons in human degenerative neurological diseases and in animal models. *Ciba Found Symp.* 1987;126:30–48. doi:10.1002/9780470513422.ch3.
152. Tao Y, Zhang S-C. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2016;19:573–86. doi:10.1016/j.stem.2016.10.015.
153. Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, Du Z, Werbel B, Valliere C, et al. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2005;23:781–90. doi:10.1634/stemcells.2004-0365.

154. Ochalek A, Szczesna K, Petazzi P, Kobolak J, Dinnyes A. Generation of Cholinergic and Dopaminergic Interneurons from Human Pluripotent Stem Cells as a Relevant Tool for In Vitro Modeling of Neurological Disorders Pathology and Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:5838934. doi:10.1155/2016/5838934.
155. Wang TTH, Jing A-H, Luo X-Y, Li M, Kang Y, Zou X-L, et al. Neural stem cells: isolation and differentiation into cholinergic neurons. *Neuroreport.* 2006;17:1433–6. doi:10.1097/01.wnr.0000227980.06013.31.
156. Qian X, Su Y, Adam CD, Deutschmann AU, Pather SR, Goldberg EM, et al. Sliced Human Cortical Organoids for Modeling Distinct Cortical Layer Formation. *Cell Stem Cell.* 2020;26:766–781.e9. doi:10.1016/j.stem.2020.02.002.
157. Matsui TK, Tsuru Y, Hasegawa K, Kuwako K-I. Vascularization of human brain organoids. *Stem Cells* 2021. doi:10.1002/stem.3368.
158. Shi Y, Le Sun, Wang M, Liu J, Zhong S, Li R, et al. Vascularized human cortical organoids (vOrganoids) model cortical development in vivo. *PLoS Biol.* 2020;18:e3000705. doi:10.1371/journal.pbio.3000705.
159. Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, Kural MH, Parent M, Kang Y-J, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat Methods.* 2019;16:1169–75. doi:10.1038/s41592-019-0586-5.
160. Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, et al. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol.* 2018;36:432–41. doi:10.1038/nbt.4127.
161. Pham MT, Pollock KM, Rose MD, Cary WA, Stewart HR, Zhou P, et al. Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport.* 2018;29:588–93. doi:10.1097/WNR.0000000000001014.
162. Cuddihy AR, O'Connell MJ. Cell-cycle responses to DNA damage in G2. In: : Elsevier; 2003. p. 99–140. doi:10.1016/S0074-7696(02)22013-6.
163. Schneider L, Pellegatta S, Favaro R, Pisati F, Roncaglia P, Testa G, et al. DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT. *Stem Cell Reports.* 2013;1:123–38. doi:10.1016/j.stemcr.2013.06.004.
164. Miller BA, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis in Nervous System Injury. In: *Encyclopedia of Neuroscience*: Elsevier; 2009. p. 523–529. doi:10.1016/B978-008045046-9.00485-X.
165. Monje ML, Vogel H, Masek M, Ligon KL, Fisher PG, Palmer TD. Impaired human hippocampal neurogenesis after treatment for central nervous system malignancies. *Ann Neurol.* 2007;62:515–20. doi:10.1002/ana.21214.
166. Giedd JN. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1021:77–85. doi:10.1196/annals.1308.009.
167. Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:8174–9. doi:10.1073/pnas.0402680101.
168. Sowell ER, Thompson PM, Leonard CM, Welcome SE, Kan E, Toga AW. Longitudinal mapping of cortical thickness and brain growth in normal children. *J Neurosci.* 2004;24:8223–31. doi:10.1523/JNEUROSCI.1798-04.2004.
169. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4:1313–7. doi:10.1038/3305.

170. Lange C, Mix E, Rateitschak K, Rolfs A. Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegener Dis.* 2006;3:76–86. doi:10.1159/000092097.
171. Bengoa-Vergniory N, Kypta RM. Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72:4157–72. doi:10.1007/s00018-015-2028-6.
172. Wei L-C, Ding Y-X, Liu Y-H, Duan L, Bai Y, Shi M, Chen L-W. Low-dose radiation stimulates Wnt/ β -catenin signaling, neural stem cell proliferation and neurogenesis of the mouse hippocampus in vitro and in vivo. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9:278–89. doi:10.2174/156720512800107627.
173. Padhee M, Pal A. Fast DTW and Fuzzy Clustering for Scenario Generation in Power System Planning Problems; 02.07.2020.
174. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain.* 2006;129:3165–72. doi:10.1093/brain/awl217.
175. Itoh T. Neuron-oligodendrocyte interaction in neuroinflammation. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2015;6:232–44. doi:10.1111/cen3.12227.
176. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie & Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012.
177. Kraft G. Tumor therapy with heavy charged particles. *Progress in Particle and Nuclear Physics.* 2000;45:S473-S544. doi:10.1016/S0146-6410(00)00112-5.
178. Jung EW, Choi J, Chao ST, Murphy ES, Suh JH. Principles and Tenets of Radiation Treatment in Glioblastoma. In: *Glioblastoma: Elsevier;* 2016. p. 105–132. doi:10.1016/B978-0-323-47660-7.00008-2.
179. Watson PM, Anderson JM, Vanltallie CM, Doctrow SR. The tight-junction-specific protein ZO-1 is a component of the human and rat blood-brain barriers. *Neuroscience Letters.* 1991;129:6–10. doi:10.1016/0304-3940(91)90708-2.
180. Herbert J, Wilcox JN, Pham KT, Fremeau RT, Zeviani M, Dwork A, et al. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award. *Neurology.* 1986;36:900–11. doi:10.1212/wnl.36.7.900.
181. Giedd JN. The amazing teen brain. *Sci Am.* 2015;312:32–7. doi:10.1038/scientificamerican0615-32.
182. Keverne EB. Understanding well-being in the evolutionary context of brain development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359:1349–58. doi:10.1098/rstb.2004.1517.
183. Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci.* 1999;2:861–3. doi:10.1038/13158.
184. Karzbrun E, Kshirsagar A, Cohen SR, Hanna JH, Reiner O. Human Brain Organoids on a Chip Reveal the Physics of Folding. *Nat Phys.* 2018;14:515–22. doi:10.1038/s41567-018-0046-7.
185. McNulty JD, Marti-Figueroa C, Seipel F, Plantz JZ, Ellingham T, Duddleston LJJ, et al. Micro-injection molded, poly(vinyl alcohol)-calcium salt templates for precise customization of 3D hydrogel internal architecture. *Acta Biomater.* 2019;95:258–68. doi:10.1016/j.actbio.2019.04.050.
186. Ao Z, Cai H, Havert DJ, Wu Z, Gong Z, Beggs JM, et al. One-Stop Microfluidic Assembly of Human Brain Organoids To Model Prenatal Cannabis Exposure. *Anal Chem.* 2020;92:4630–8. doi:10.1021/acs.analchem.0c00205.

187. Bagley JA, Reumann D, Bian S, Lévi-Strauss J, Knoblich JA. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat Methods*. 2017;14:743–51. doi:10.1038/nmeth.4304.
188. Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*. 2017;545:54–9. doi:10.1038/nature22330.
189. Song L, Yuan X, Jones Z, Griffin K, Zhou Y, Ma T, Li Y. Assembly of Human Stem Cell-Derived Cortical Spheroids and Vascular Spheroids to Model 3-D Brain-like Tissues. *Sci Rep*. 2019;9:5977. doi:10.1038/s41598-019-42439-9.
190. Xiang Y, Tanaka Y, Patterson B, Kang Y-J, Govindaiah G, Roselaar N, et al. Fusion of Regionally Specified hPSC-Derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration. *Cell Stem Cell*. 2017;21:383-398.e7. doi:10.1016/j.stem.2017.07.007.
191. Lin Y-T, Seo J, Gao F, Feldman HM, Wen H-L, Penney J, et al. APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types. *Neuron*. 2018;98:1141-1154.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.05.008.
192. Bian S, Repic M, Guo Z, Kavirayani A, Burkard T, Bagley JA, et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *Nat Methods*. 2018;15:631–9. doi:10.1038/s41592-018-0070-7.

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleichende Tiefendosisprofile von Photonen und Protonen	5
Abbildung 2: Schema der in-/direkten Wechselwirkung von IR mit der DNA	6
Abbildung 3: Entwicklung des ZNS <i>in vivo</i>	9
Abbildung 4: Entwicklung des humanen zerebralen Kortex <i>in vivo</i>	11
Abbildung 5: Stammzellhierarchie	12
Abbildung 6: Vergleichende Abläufe der Hirnentwicklung <i>in vivo vs. in vitro</i>	17
Abbildung 7: Feeder-frei kultivierte hESCs.....	25
Abbildung 8: Einbettung der ZOs in Matrigel.....	27
Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der ZO-Generierung	28
Abbildung 10: Schematisches Analyseverfahren nach Bestrahlung der ZOs.....	29
Abbildung 11: Röntgen- und Partikelbestrahlung der ZOs	30
Abbildung 12: Trichterkamera zur Aufnahme der ZOs in T25-Suspensionsflaschen.....	31
Abbildung 13: Experimentelle Durchführung des Tinten-Tests.....	31
Abbildung 14: Eingebettete ZOs in PDMS-Einfrierhilfen.....	34
Abbildung 15: Pluripotenznachweis der hESCs.....	40
Abbildung 16: Stadien der neuralen Differenzierung der generierten ZOs.....	42
Abbildung 17: IFF gegen den Vorderhirnmarker FOXG1 (d20).....	43
Abbildung 18: Detailaufnahmen der PVs	44
Abbildung 19: Genexpression der ZOs (d20)	45
Abbildung 20: IFF gegen den oRG-Marker HOPX (d20)	46
Abbildung 21: IFF gegen den NSC-Marker PAX6 und den Proliferationsmarker Ki-67 (d20) ..	46
Abbildung 22: IFF gegen die NSC-Marker SOX2 und Nestin sowie gegen die neuronalen Marker β TUB und MAP2 (d20)	47
Abbildung 23: Genexpression der ZOs (d66)	48
Abbildung 24: IFF gegen die neuronalen Marker MAP2 und SYP sowie gegen die glialen Marker A2B5, GFAP und MOG (d66).....	50
Abbildung 25: Genexpression der ZOs (d100)	51
Abbildung 26: IFF gegen den Astrozyten-Marker GFAP (d100)	52
Abbildung 27: Genexpression der ZOs (d365)	53
Abbildung 28: IFF gegen den Oligodendrozyten-Marker MOG (d365).....	53
Abbildung 29: Kavitäten-Bildung der ZOs nach X-IR an d20	56
Abbildung 30: Größenmessung der ZOs nach X-IR an d20	57
Abbildung 31: Genexpression der ZOs nach X-IR an d20.....	58
Abbildung 32: Fluoreszenzintensität der neuralen Stammzellmarker HOPX, PAX6 und des IPC-Markers TBR2 der ZOs nach X-IR an d20	59
Abbildung 33: Fluoreszenzintensität der neuronalen Marker β TUB, MAP2, NeuN und SYP der ZOs nach X-IR an d20	60
Abbildung 34: Fluoreszenzintensität des glialen Progenitor-Markers A2B5 sowie der glialen Marker GFAP und MOG der ZOs nach X-IR an d20.....	61
Abbildung 35: Quantifizierung des apoptotischen Zelltods der ZOs nach X-IR an d20.....	62
Abbildung 36: Kavitäten-Bildung der ZOs nach X-IR an d80	64
Abbildung 37: Größenmessung der ZOs nach X-IR an d80	65
Abbildung 38: Genexpression der ZOs nach X-IR an d80.....	66
Abbildung 39: Fluoreszenzintensität der neuralen Stammzellmarker HOPX, PAX6 und des IPC-Markers TBR2 der ZOs nach X-IR an d80	67

Abbildung 40: Fluoreszenzintensität der neuronalen Marker β TUB, MAP2, NeuN und SYP der ZOs nach X-IR an d80	68
Abbildung 41: Fluoreszenzintensität des glialen Progenitor-Markers A2B5 sowie der glialen Marker GFAP und MOG der ZOs nach X-IR an d80.....	69
Abbildung 42: Quantifizierung des apoptotischen Zelltods der ZOs nach X-IR an d80	70
Abbildung 43: Vergleich der Kavitäten-Bildung nach X-IR an d20 und d80.....	72
Abbildung 44: Vergleich der Wachstumsinhibierung nach X-IR an d20 und d80	72
Abbildung 45: Vergleich des apoptotischen Zelltods nach X-IR an d20 und d80.....	73
Abbildung 46: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Marker HOPX, PAX6, TBR2, β TUB, MAP2 und NeuN der ZOs nach X-IR an d20 und an d80.....	74
Abbildung 47: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der SYP, A2B5, GFAP und MOG der ZOs nach X-IR an d20 und an d80.	75
Abbildung 48: Kavitäten-Bildung der ZOs nach ^{12}C -IR an d20	77
Abbildung 49: Größenmessung der ZOs nach ^{12}C -IR an d20.....	78
Abbildung 50: Dosisabhängige Kavitäten-Bildung der ZOs nach ^1H -IR an d80	80
Abbildung 51: Größenmessung der ZOs nach ^1H -IR an d80.....	81
Abbildung 52: Vergleich der Kavitäten-Bildung nach X-IR und ^{12}C -IR an d20.....	83
Abbildung 53: Vergleich der Wachstumsinhibierung nach X-IR und ^{12}C -IR an d20.....	83
Abbildung 54: Vergleich der Kavitäten-Bildung nach X-IR und ^1H -IR an d80.....	84
Abbildung 55: Vergleich der Wachstumsinhibierung nach X-IR und ^1H -IR an d80.	84
Abbildung 56: Quantifizierung des Zelltods nach ^1H -IR an d80	85
Abbildung 57: Choroid-Plexus Analyse mittels Tinten-Test	86
Abbildung 58: Vergleich des reifenden Neocortex von Maus und Mensch	91
Abbildung 59: Fehlgeschlagene Generierung von EBs (d3)	129
Abbildung 60: IFF von ZOs gegen den Vorderhirnmarker FOXG1 (d20)	130
Abbildung 61: IFF gegen den oRG-Marker HOPX, den NSC-Marker PAX6, den IPC-Marker TBR2 sowie gegen den früh-neuronalen Marker β TUB (d66).....	131
Abbildung 62: IFF gegen die Stammzellmarker HOPX und PAX6, den IPC-Marker TBR2 sowie gegen den früh-neuronalen Marker β TUB (d100)	132
Abbildung 63: IFF gegen die neuronalen Marker MAP2 und SYP, gegen den glialen Progenitor-Marker A2B5 und gegen den Oligodendrozyten-Marker MOG (d100)	133
Abbildung 64: IFF gegen den neuronalen Marker PAX6, die neuronalen Marker β TUB und SYP sowie gegen den glialen Progenitor-Marker A2B5 (d365)	134
Abbildung 65: IFF gegen die Marker HOPX, PAX6, TBR2, β TUB, MAP2 und NeuN nach X-IR an d20	135
Abbildung 66: IFF gegen die Marker SYP, A2B5, GFAP und MOG nach X-IR an d20.....	136
Abbildung 67: IFF gegen die Marker HOPX, PAX6, TBR2, β TUB, MAP2 und NeuN nach X-IR an d80	137
Abbildung 68: IFF gegen die Marker SYP, A2B5, GFAP und MOG nach X-IR an d80.....	138
Abbildung 69: IFF des apoptotischen Markers FITC-Annexin V und des nekrotischen Markers EthD-III nach X-IR an d80	139

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des mTeSR TM 1-Mediums.	23
Tabelle 2: Zusammensetzung des EBM.....	26
Tabelle 3: Zusammensetzung des NIM	26
Tabelle 4: Zusammensetzung des IDM-A.....	27
Tabelle 5: Zusammensetzung des IDM+A	28
Tabelle 6: Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermix.....	32
Tabelle 7: Zusammensetzung des qPCR-Mastermix.	33
Tabelle 8: PCR-Programm.	33
Tabelle 9: Herstellung der Sucrose-Lösungen zum Einfrieren der ZOs.....	35
Tabelle 10: Auflistung der Immunkonjugate.....	36
Tabelle 11: Auflistung der primären Antikörper.	36
Tabelle 12: Auflistung der sekundären Antikörper.	37
Tabelle 13: Geräte	121
Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien	121
Tabelle 15: Chemikalien	122
Tabelle 16: Lösungen.....	123
Tabelle 17: Kits	123
Tabelle 18: Medien & Zusätze.....	123
Tabelle 19: Primer	125
Tabelle 20: PC & Software	126
Tabelle 21: Gemittelte Daten der mRNA-Expressionsanalysen un-/bestrahlter ZOs.....	127
Tabelle 22: Kavitäten-Bildung un-/bestrahlter ZOs.	140
Tabelle 23: Größenmessungen der ZOs nach X-IR an d20.....	141
Tabelle 24: Größenmessungen der ZOs nach X-IR an d80.	142
Tabelle 25: Größenmessungen der ZOs nach ¹² C-IR an d20.	143
Tabelle 26: Größenmessungen der ZOs nach ¹ H-IR an d80.	144
Tabelle 27: FITC-Intensitätsmessungen 24 h p. X-IR.	145
Tabelle 28: FITC- und EthD-III-Intensitätsmessungen nach ¹ H-IR im SOBP.	145
Tabelle 29: Fluoreszenzmessungen an d66 nach X-IR an d20	146
Tabelle 30: Fluoreszenzmessungen an d100 nach X-IR an d80	150

IV. Abkürzungsverzeichnis

¹ H-IR	Protonenbestrahlung
¹² C-IR	Kohlenstoffbestrahlung
2/3D	2-/3-dimensional
ABr	Adultes Hirn
ASCL1	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
a.u.	<i>Arbitrary unit</i>
βTUB	βIII-Tubulin
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CALB1	Calbindin 1
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHIR	CHIR9999021
d	<i>Day</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	Embryoidkörperchen
EBM	<i>Embryoid Body Media</i>
ESchG	Embryonenschutzgesetz
EtD-III	<i>Ethidium homodimer III</i>
EtOH	Ethanol
FBr	Fetales Hirn
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein</i>
FOXG1	<i>Forkhead box G1</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAD2	<i>GABAergic neuronal marker 2</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GSI	GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH
Gy	Gray [Energiedosis]
h	Stunden
H ₂ O	H ₂ O _{reinst}
H9	Stammzelllinie
hESCs	Humane embryonale Stammzellen
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum
HOPX	<i>HOP homeobox</i>
ICM	Innere Zellmasse
IDM-/+A	<i>Improved Differentiation Media +/- vitamin A</i>
IFF	Immunfluoreszenzfärbungen
IPCs	Intermediäre Progenitorzellen
IPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen
IQR	Interquartilsabstand
IR	Ionisierende Strahlung
LET	Linearer Energietransfer

MAP2	<i>Microtubule associated protein 2</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NANOG	<i>Nanog homeobox</i>
NEA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
NEUROD1	<i>Neuronal differentiation 1</i>
NIM	<i>Neural Induction Media</i>
NSCs	Neurale Stammzellen
OCT4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
P	Passage
PAX6	<i>Paired box protein 6</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-/-	PBS ohne Calcium und Magnesium
PBS+/+	PBS mit Calcium und Magnesium
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFA	Paraformaldehyd
p. IR	Post-Bestrahlung
PL	Plateau
PLGA	<i>Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)</i>
PROM1	Prominin 1
PS	Petrischale
PVs	Pseudo-Ventrikel
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
(o)RGs	(Äußere) Radiale Gliazellen
(r)RNA	(Ribosomale) Ribonukleinsäure
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SGZ	Subgranuläre Zone
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SOBP	<i>Spread-Out Bragg Peak</i>
SOX2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
StZG	Stammzellgesetz
(i/o)SVZ	(Innere/Äußere) Subventrikuläre Zone
SYP	Synaptophysin
TBR2	<i>T-box brain protein 2</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TH	<i>Tyrosine hydroxylase</i>
TJP1 (ZO-1)	<i>Tight junction protein-1</i>
vs.	<i>versus</i>
VZ	Ventrikuläre Zone
X-IR	Röntgenbestrahlung
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZOs	Zerebrale Organoide

V. Materialverzeichnis

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Lösungen, Medien und Zusätze sowie die zur Datenanalyse benötigte Software tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 13: Geräte

Geräte	Hersteller
Automatischer Zellzähler TC20™	Bio-Rad
CCD Kamera CoolCube4	MetaSystems
Digitalkamera DSC-W220	Sony
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z2	ZEISS
Fluoreszenzmikroskop BX61	Olympus
IF-Färbekammern R64001-E	Pyramid Innovation
Invertiertes Mikroskop Eclipse Ts2	Nicon
Konfokalmikroskop DMI 4000B	Leica
Kryostat CM1860 UV	Leica
Leuchtpad 36145X	Dörr
Nanophotometer Colibri	Titertek Berthold
Orbitalschüttler MaxQ2000	Thermo Scientific™
Orbitalschüttler Orbi-Shaker™CO ²	Benchmark Scientific
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	Thermo Scientific™
Röntgenröhre MXR 320 / 26	Comet
SN4 Dosimeter	PTW
Stereomikroskop Eclipse TS100	Nikon
Stereomikroskop SMZ-171-TLED	Motic
Thermocycler peqSTAR	VWR
Vannas Federschere 2,5 mm	Fine Science Tools
Vortexer MS2 Minishaker	IKA
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific™
Zentrifuge Heraeus Multifuge X1R	Thermo Scientific™

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Referenz-Nr.
24-Well Suspensionsplatte	Sarstedt	83.3922.500
96-Well Suspensionsplatte	Sarstedt	83.3925.500
Aspirationspipetten (2 mL)	Sarstedt	86.1252.001
Deckgläser (rund, Ø 12 mm)	Carl Roth	P231.1
Deckgläser (rechteckig, 24 x 60 mm)	Carl Roth	H878
Filtrierflaschen (500 mL)	Sarstedt	83.3941.001
Filtrierflaschen (1000 mL)	Sarstedt	83.3942.001
Kryomatrix	Leica	14020108926

Objektträger SuperFrost® Plus	Thermo Scientific™	J1800AMNZ
Organoid Embedding Sheets	StemCell™ Technologies	08579
PCR-Folie	Sarstedt	8 365PK
PCR Platte (0,3)	Sarstedt	72.1979.202
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 mL)	Sarstedt	72.735.100
PDMS-Gefäße	TH Aschaffenburg	-
Petrischalen Ø 6 cm	Sarstedt	83.3901
Petrischalen Ø 3,5 cm	Thermo Scientific™	153066
Pipettenspitzen (10 µL)	Starlab	S1110-3700
Pipettenspitzen (100-200 µL)	Starlab	S1113-1706
Pipettenspitzen (1000 µL)	Starlab	S1111-6701
Pipettenspitzen <i>low-binding</i> (2,5 µL)	Sarstedt	70.1130.212
Pipettenspitzen <i>low-binding</i> (10 µL)	Starlab	S1181-3710
Pipettenspitzen <i>low-binding</i> (100-200 µL)	Starlab	S1183-1740
Pipettenspitzen <i>low-binding</i> (1000 µL)	Biozym	770400
Reaktionsgefäße (0,5 mL)	Roth	EA83.1
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Sarstedt	72.691
Reaktionsgefäße (5 mL)	Starlab	E1450-1108/0
Reaktionsgefäße <i>low-binding</i> (0,5 mL)	Sarstedt	72.704.600
Reaktionsgefäße <i>low-binding</i> (1,5 mL)	Sarstedt	72.706.600
Serologische Pipetten (2 mL)	Sarstedt	86.1252.001
Serologische Pipetten (5 mL)	Sarstedt	86.1253.001
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt	86.1254.001
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt	86.1685.001
Serologische Pipetten (50 mL)	Sarstedt	86.1256.001
Suspensionspetrischalen Ø 6 cm	Sarstedt	83.3901.500
T25-Suspensionsflasche	Sarstedt	83.3910.502
Vials CRYO.S™ (2 mL)	Greiner Bio-One	126278
VICRYL® Nahtmaterial	CLS Medizintechnik	V632H
Zählkammern dual TC10	Bio-Rad	145-0011
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Sarstedt	62.554.502
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Sarstedt	62.547.254

Tabelle 15: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Referenz-Nr.
Anti-Adherence Rinsing Solution	StemCell™ Technologies	07010
β-Mercaptoethanol (≥ 99,0 %)	Carl Roth	4227.3
BSA (Albumin Fraktion V, ≥ 98,0 %)	Carl Roth	8076.3
DMSO (≥ 99,5 %)	Carl Roth	A994.1
Ethanol (≥ 99,8 %)	Merck	9065.3
Fluorescent Mounting Medium	Dako	S3023
Gelatine Pulver	NeoLab	9475.0500
Hoechst 33342	Thermo Scientific™	62249
Laminin-521	BioLamina	600962

Nuclease-freies Wasser	Acros Organics	HV-88295-49
Paraformaldehyd (37 %)	Carl Roth	CP10.1
PBS-/-	Life Technologies™	14190-144
PBS+/+	Life Technologies™	14040-091
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN	79306
ReLeSR™	StemCell™ Technologies	05872
Sucrose (≥ 99,5 %)	SIGMA-Aldrich / Merck	S-9378
Triton™ X-100	Fisher Scientific	BP151-100
Trypanblau	SIGMA-Aldrich / Merck	T8154
Trypsin	PAN-Biotech	P10-023500

Tabelle 16: Lösungen

Lösungen	Ansatz
β-Mercaptoethanol	50 mM in PBS+/+
bFGF	10 µg/mL in 0,1 % BSA in PBS+/+
CHIR99021	10 mM in DMSO
Heparin	500 µg/mL in H ₂ O
Hoechst 33342	5 µg/mL in H ₂ O (1:1000)
ICC-Blockinglösung	5 % BSA in PBS-/-
ICC-Fixierungslösung	3,7 % in PBS-/-
ICC-Permeabilisierungslösung	0,5 % Triton X-100 in 1 % BSA in PBS-/-
Penicillin / Streptomycin-Lösung	0,06 mg/mL Pen. und 10 mg/mL Strep.
Vitamin C-Lösung	56,78 mM in H ₂ O
Y27632 ROCK-Inhibitor	10 mM in PBS+/+

Tabelle 17: Kits

Kits	Hersteller	Referenz-Nr.
CellEvent™ Caspase-3/7 Reagent	Thermo Fisher Scientific	R37111
Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit	PromoCell / PromoKine	CA707-30017
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	Solis Biodyne	08-24-0000S
RevertAid RT Kit	Life Technologies™	K1691
RNase-free DNase Set (50)	QIAGEN	79254
RNeasy Mini Kit (250)	QIAGEN	74106

Tabelle 18: Medien & Zusätze

hESCs:

Kryomedium	Hersteller	Referenz-Nr.
DMSO	Carl Roth	A994.1
FCS	Biochrom / Merck	S0115

mTeSR™1-Medium

mTeSR™1 Basalmedium	StemCell Technologies™	85851
mTeSR™1 5X Supplement	StemCell Technologies™	85852
Penicillin / Streptomycin	Biochrom / Merck	A2213

ZOs:**EBM**

DMEM/F-12 +HEPES	Life Technologies™	31330-038 / 11330-032
KnockOut™ Serum Replacement	Life Technologies™	10828-028
FCS	Biochrom / Merck	S0115
Glutamin 200 mM	Merck	K0302
NEA (100x)	Biochrom / Merck	K0293
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
Recombinant human bFGF	PeproTech	100-18B
Y-27632 ROCK-Inhibitor	Enzo Life Sciences	ALX-270-333

NIM

DMEM/F-12 +HEPES	Life Technologies™	31330-038 / 11330-032
N2-Supplement (100X)	Life Technologies™	17502-048
Glutamin 200 mM	Merck	K0302
NEA (100x)	Biochrom / Merck	K0293
Heparin Stocklösung	SIGMA-Aldrich / Merck	H3149

IDM-A

DMEM/F-12 +HEPES	Life Technologies™	31330-038 / 11330-032
Neurobasal® Medium	Life Technologies™	21103-049
N2-Supplement (100X)	Life Technologies™	17502-048
B-27™ Supplement (- Vitamin A)	Life Technologies™	12587-010
Insulin	SIGMA-Aldrich / Merck	I9278
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
Glutamin 200 mM	Merck	K0302
NEA (100x)	Biochrom / Merck	K0293
Penicillin / Streptomycin	Biochrom / Merck	A2213
CHIR99021	BioVision	1991-1

IDM+A

DMEM/F-12 +HEPES	Life Technologies™	31330-038 / 11330-032
Neurobasal® Medium	Life Technologies™	21103-049
N2-Supplement (100X)	Life Technologies™	17502-048
B-27™ Supplement (+ Vitamin A)	Life Technologies™	17504-044
Insulin	SIGMA-Aldrich / Merck	I9278
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3

Glutamin 200 mM	Merck	K0302
NEA (100x)	Biochrom / Merck	K0293
Penicillin / Streptomycin	Biochrom / Merck	A2213
Vitamin C / Ascorbinsäure	SIGMA-Aldrich / Merck	49752
HEPES Puffer 1M	Merck	L1613
Matrigel™	Corning	354234

Tabelle 19: Primer

Als Referenz für die Standardkurven wurde *Human Fetal Brain Total RNA* für die neuronalen Marker SOX2, PAX6, Nestin, TJP1, ASCL1, NEUROD1, DCX, β TUB und PROM1 sowie *Human Adult Brain Total RNA* für die neuronalen und glialen Marker MAP2, SYP, GAD2, CALB1, GFAP und MBP genutzt.

RNA	Hersteller	Referenz-Nr.
<i>Human Fetal Brain Total RNA</i>	Clontech	636526
<i>Human Adult Brain Total RNA</i>	Clontech	636530

Primer	Sequenz 5'...-3'
18sRNA (s)	ACTCAACACGGGAAACCTCACC
18sRNA (as)	CGCTCCACCAACTAAGAACGG
ASCL1 (s)	CGCCGGTCTCATCCTACTC
ASCL1 (as)	GATCACCTGCTTCCAAAGTC
β -III-Tubulin (s)	CGCCCTCTGCAGTATTTATG
β -III-Tubulin (as)	ACAGAGACAGGAGCAGCTCACA
CALB1 (s)	CGCGAAAGAAGGCTGGATTG
CALB1 (as)	GGGTAATACGTGAGCCAACCTCT
DCX (s)	AAGGACCTGTACCTGCCTCT
DCX (as)	TGAGCACTCTCCCCTCCTTT
GAD2 (s)	CCTCAGCTAAGCCCCCTACT
GAD2 (as)	GCAGAGCCAACACCTACGAT
GFAP (s)	GTACCAGGACCTGCTCAAT
GFAP (as)	CAACTATCCTGCTTCTGCTC
MAP2 (s)	TGCGCTGATTCTTCAGCTTG
MAP2 (as)	TGTGTCGTGTTCTCAAAGGGT
MBP (s)	CTGTGCAACATGTACAAGGACTC
MBP (as)	GGGACAGTCCTCTCCCCTTT
NANOG (s)	AAATCTAAGAGGTGGCAGAAAAACA
NANOG (as)	CTTCTGCGTCACACCATTGC
Nestin (s)	CAGCTGGCGCACCTCAAGATG
Nestin (as)	AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG
NEUROD1 (s)	GAGGCCCCAGGGTTATGAGA
NEUROD1 (as)	TGGTCATGTTTCGATTTCCCTTTGT
OCT4 (s)	ACCCACACTGCAGCAGATCA
OCT4 (as)	CACACTCGGACCACATCCTTCT
PAX6 (s)	GAGCGGTGCATTTGCATGTT

PAX6 (as)	TCTCAGATTCCTCTGTCATCATCC
PROM1 (s)	CCTGGTCCAACAGGGCTATC
PROM1 (as)	TCGTGGTTTGGCGTTGTACT
SOX2 (s)	CACTGCCCTCTCACACATG
SOX2 (as)	CCCATTTCCCTCGTTTTTCTT
SYP (s)	GCAATGGGTCTTCGCCATC
SYP (as)	CGAACTCGACCTCGATGCTG
TJP1 (s)	CTCGCTCTCGGGAGATGTTT
TJP1 (as)	CTCCATTGCTGTGCTCTTGG

Tabelle 20: PC & Software

Software	Hersteller
Metafer5	MetaSystems
NIS-Elements Documentation	Nikon
GIMP 2.10	<i>open source</i> , https://www.gimp.org/
VSViewer	MetaSystems
ImageJ	<i>open source</i> , https://imagej.net/Contributors
OriginLab® 2019	Electronic Arts
Quantstudio™ Design & Analysis v1.4.3	Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific
GraphPad-Prism8™	Graphpad Software, Inc

VI. Ergänzende Daten

Tabelle 21: Gemittelte Daten der mRNA-Expressionsanalysen un-/bestrahlter ZOs.

Markergen	H9 (P49)	SD	ZOs (d66)	SD
OCT4	0,1007221	0,00750845	0,00021787	0,0000072384
SOX2	0,54692861	0,03967105	0,35176971	0,03258573
NANOG	0,0152365	0,00126655	0,000071423	0,0000034715
Markergen	ZOs (d20)	SD	Kontrolle	SD
PAX6	195,026796	24,5779825	3,44499564	0,17454721
Nestin	146,547844	29,1628637	3,47372252	0,23846695
TJP1	133,810896	13,3725091	5,02213228	0,29172
NEUROD1	206,666127	21,1833501	12,7427605	2,59974
DCX	17,4025579	1,95475257	6,942531	0,3081
βTUB	3,34550982	0,35232843	6,34538375	1,24887
MAP2	1,09449091	0,13821707	4,69910074	0,85408146
Markergen	ZOs (d66)	SD	Kontrolle	SD
SOX2	1,081325178	0,1428357	1,71273445	0,08485323
PAX6	8,386684186	0,96158	5,34731326	0,21512
NESTIN	3,528836655	0,37089	5,48827218	0,38748
ASCL1	1,622678272	0,1748	11,0685791	2,21201
TJP1	11,52498099	1,09679	5,02213228	0,29172
NEUROD1	5,654055718	0,95562	12,7427605	2,59974
DCX	2,69036546	0,264	6,942531	0,3081
βTUB	0,638944137	0,08497	0,1817907	0,03251
MAP2	1,162248726	0,12738	6,34538375	1,24887
SYP	1,769162016	0,21111	10,8306115	0,22264
GAD2	0,30302015	0,03091	7,41433455	1,36995
CALB1	1,830714445	0,21369	10,4994777	1,90108
PROM1	2,540358581	0,28926	12,0872516	0,89671
GFAP	0,151824625	0,01687	2,36454767	0,43134
MBP	0,014496557	0,057	2315,36233	416,83686

Markergen	ZOs (d100)	SD	Kontrolle	SD
PAX6	8,67115053	0,86447703	5,34731326	0,2151207
DCX	3,17801871	0,30810421	7,29422991	0,32111272
MAP2	0,86904303	0,12048726	5,43693589	0,23857717
GAD2	1,73815574	0,16459093	6,41705863	0,39974259
CALB1	0,21368828	0,01899089	7,86127248	0,50112231
GFAP	0,13883682	0,01303985	2,424415	0,16233737
MBP	0,84391632	0,10315485	2177,62229	278
Markergen	ZOs (d365)	SD	Kontrolle	SD
PAX6	4943,2394	2591,56126	5,34731326	0,2151207
DCX	1,81314797	0,3746881	7,29422991	0,32111272
MAP2	1793,70965	249,635131	5,43693589	0,23857717
GAD2	3,34e-008	9,74e-009	6,41705863	0,39974259
CALB1	0,0000387	0,0000183	7,86127248	0,50112231
GFAP	87,2288449	12,8518389	2,424415	0,16233737
MBP	495001,955	76033,5192	2177,62229	278
Markergen	XIR d66 0 Gy	SD	XIR d66 1 Gy	SD
PAX6	8,25960124	0,68835505	5,00079921	0,44322718
DCX	2,12346256	0,1697587	1,30894096	0,12236704
MAP2	0,553242	0,04507791	0,36421547	0,03892368
GFAP	0,01990563	0,00132771	0,02010977	0,00186716
MBP	0,00270405	0,00155001	0,00359541	0,0029603
	XIR d66 2 Gy	SD	XIR d66 8 Gy	SD
PAX6	7,12275057	0,80487539	26,214615	3,70443688
DCX	1,39774739	0,11177857	1,64953799	0,25619972
MAP2	0,51664646	0,03989846	0,81701912	0,12404927
GFAP	0,02325593	0,00197241	0,01675454	0,00220296
MBP	0,00383892	0,00109542	0,01171136	0,00260735

Markergergen	XIR d100 0 Gy	SD	XIR d100 3 Gy	SD
PAX6	3,95747365	0,49175494	7,41828231	0,89072975
DCX	1,30349144	0,14631305	0,73814068	0,11867958
MAP2	0,38088738	0,06560096	0,29190008	0,04164984
GFAP	0,15551421	0,01690385	0,11310779	0,01934536
MBP	0,02968299	0,00998917	0,00820042	0,00168508
Markergergen	XIR d100 10 Gy	SD	XIR d100 15 Gy	SD
PAX6	4,19586256	0,63328331	1,33947623	0,17874383
DCX	0,90205771	0,10920892	1,18756351	0,14908102
MAP2	0,67375822	0,07549734	0,48517533	0,06753494
GFAP	0,18111787	0,0247933	0,1813326	0,02232461
MBP	0,0101845	0,00179944	0,0112177	0,00177408

SD: Standardabweichung.

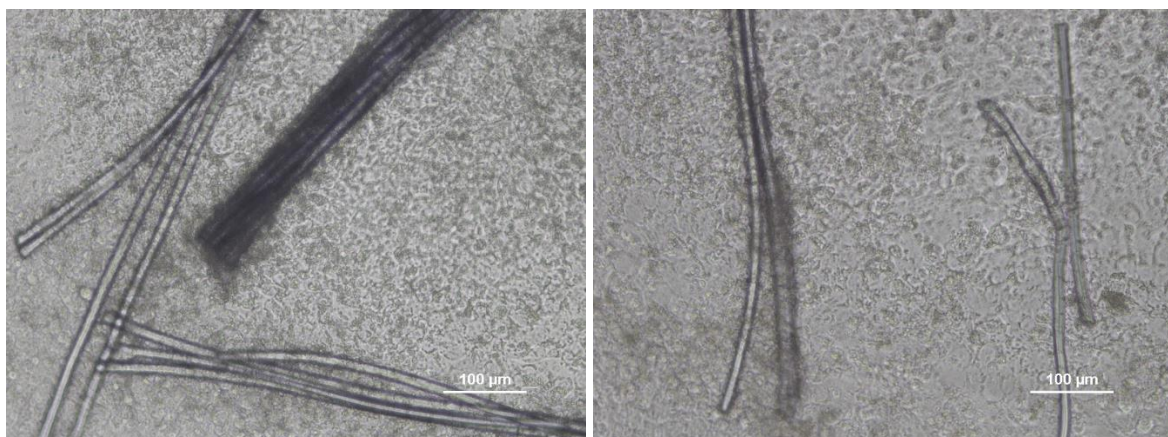


Abbildung 59: Fehlgeschlagene Generierung von EBs (d3). Die Einzelzellen akkumulierten an den Böden der Suspensionsplatten anstatt an den ausgesäten Vicryl-Filamenten. Maßstab: 100 µm.

FOXG1

überlagert mit Hoechst 33342

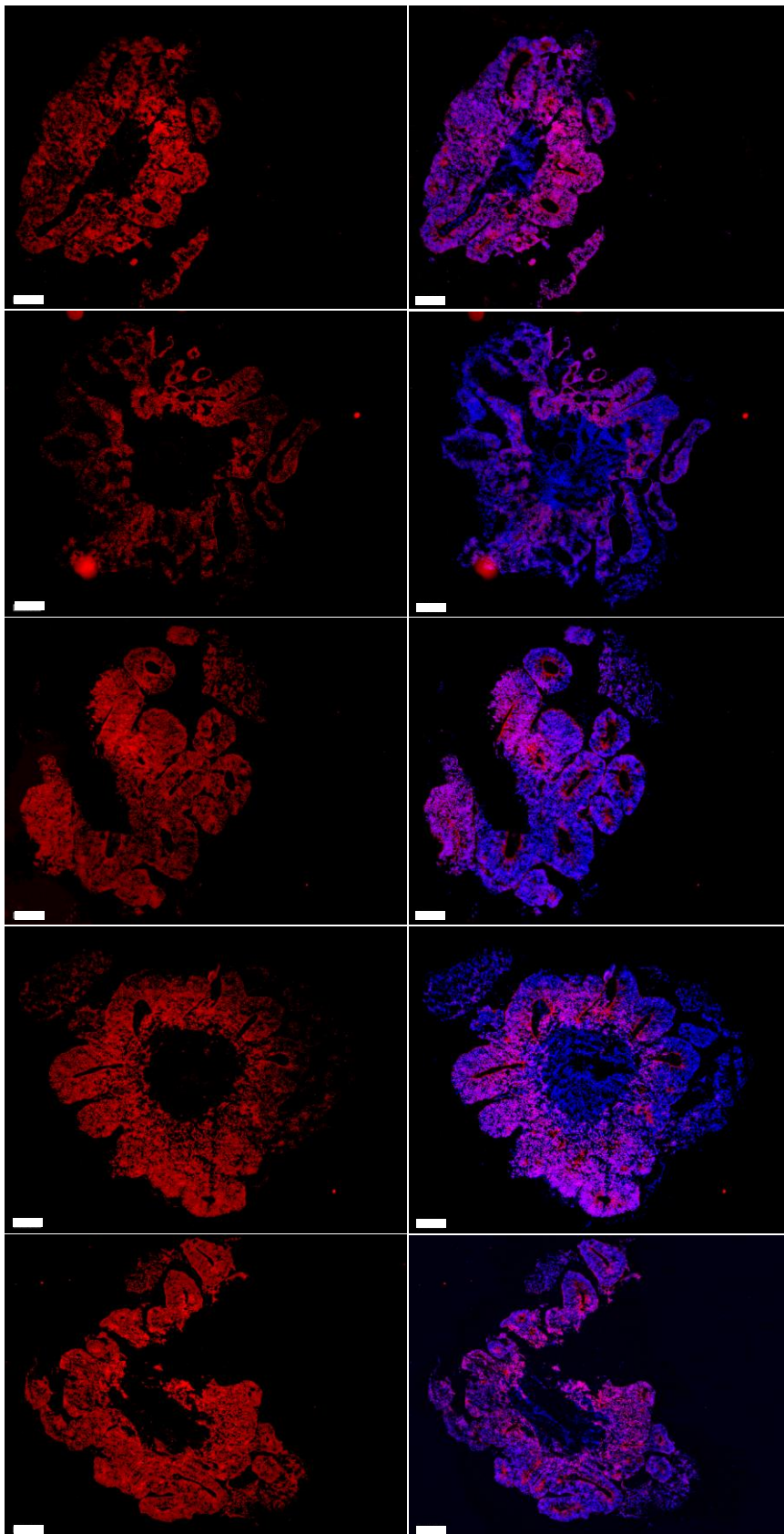


Abbildung 60: IFF von ZOs an d20 gegen den Vorderhirnmarker FOXG1, welcher kontinuierlich in den ZOs exprimiert wurde (n = 5). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 100 μ m.

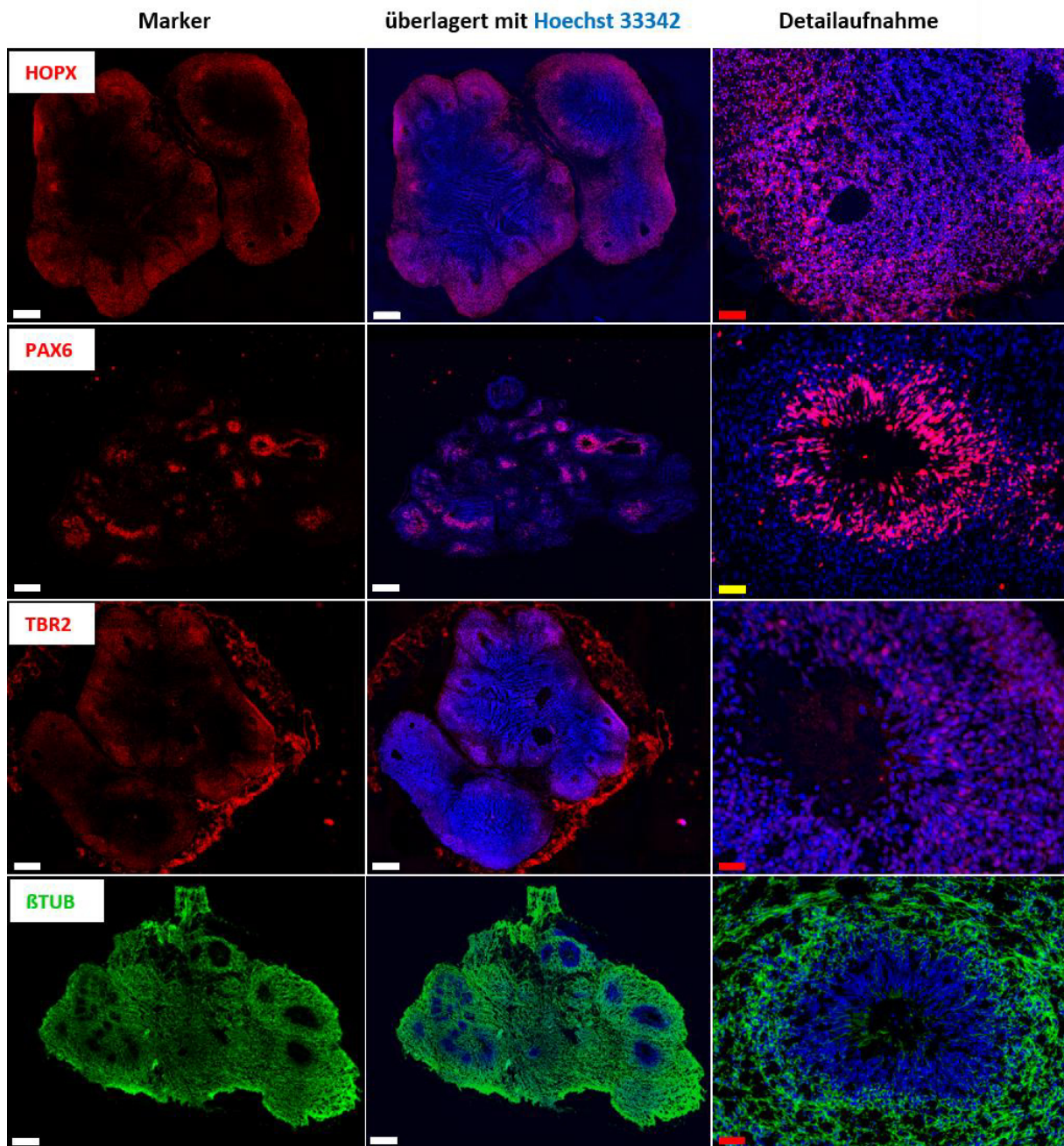


Abbildung 61: IFF von ZOs an d66 gegen den oRG-Marker HOPX, den NSC-Marker PAX6, den IPC-Marker TBR2 sowie gegen den früh-neuronalen Marker β TUB. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μ m, 50 μ m, 20 μ m.

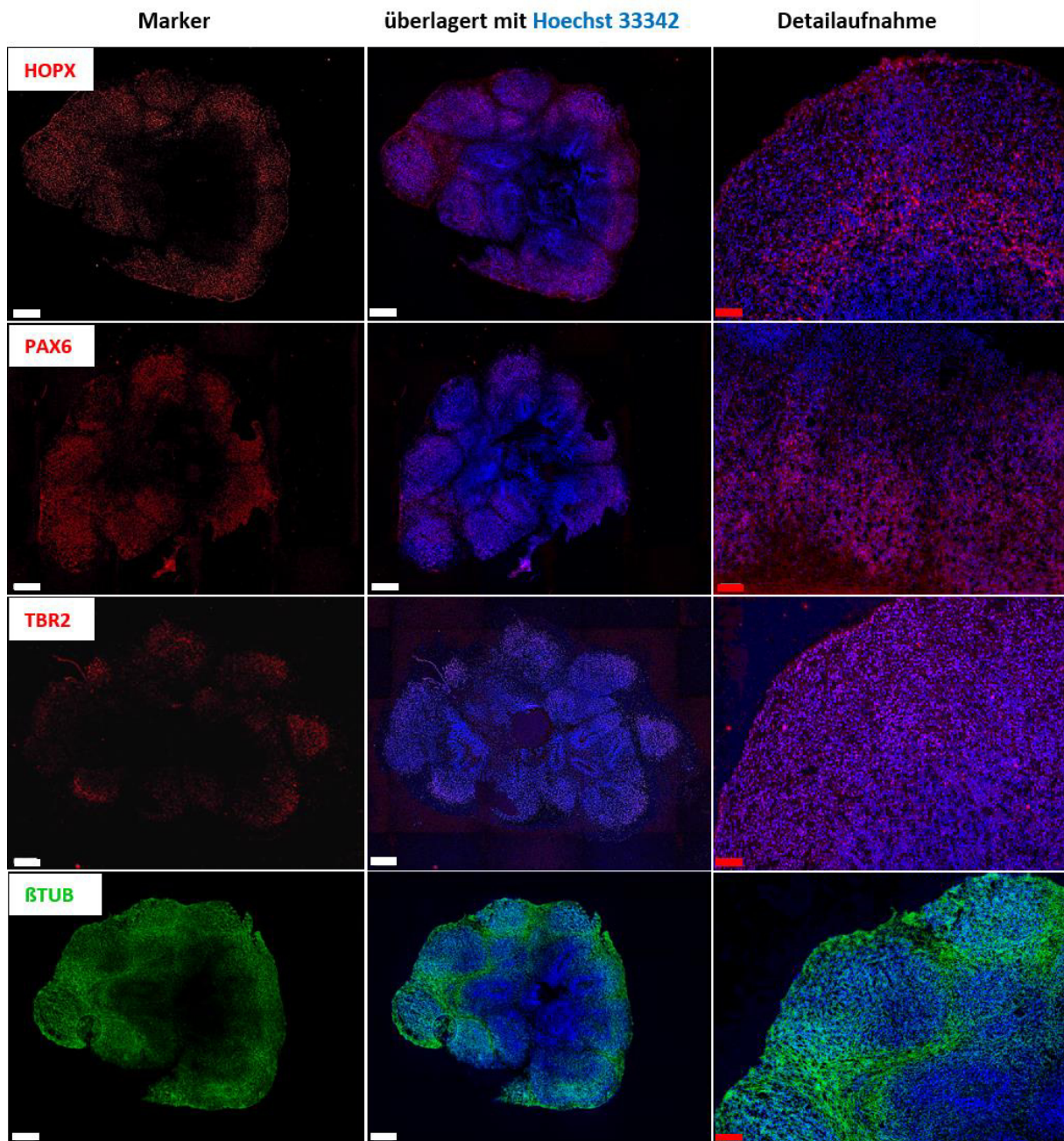


Abbildung 62: IFF von ZOs an d100 gegen die Stammzellmarker HOPX und PAX6, den IPC-Marker TBR2 sowie gegen den früh-neuronalen Marker β TUB. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μ m, 50 μ m.

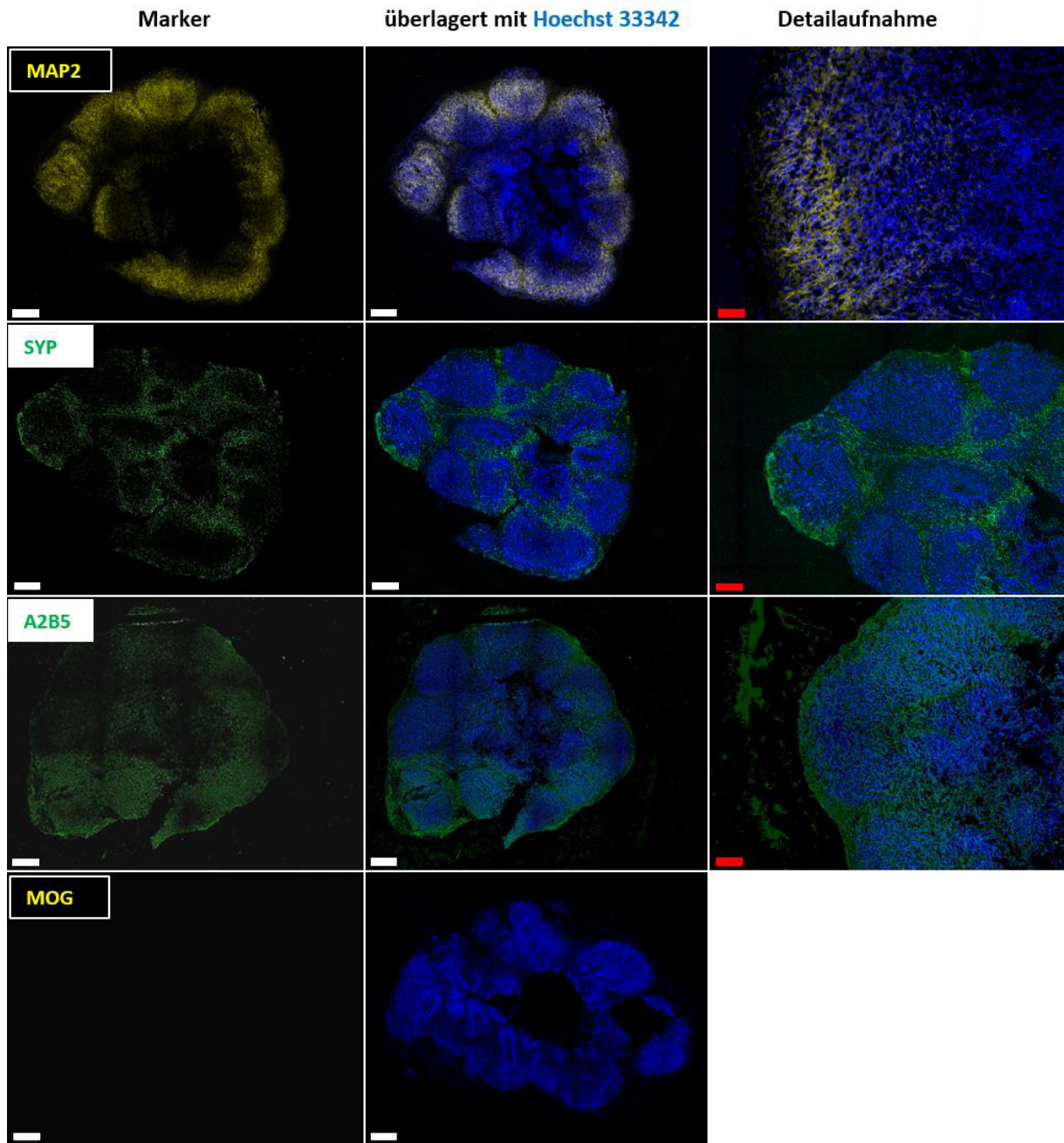


Abbildung 63: IFF von ZOs an d100 gegen die neuronalen Marker MAP2 und SYP, gegen den glialen Progenitor-Marker A2B5 und gegen den Oligodendrozyten-Marker MOG. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μm , 50 μm .

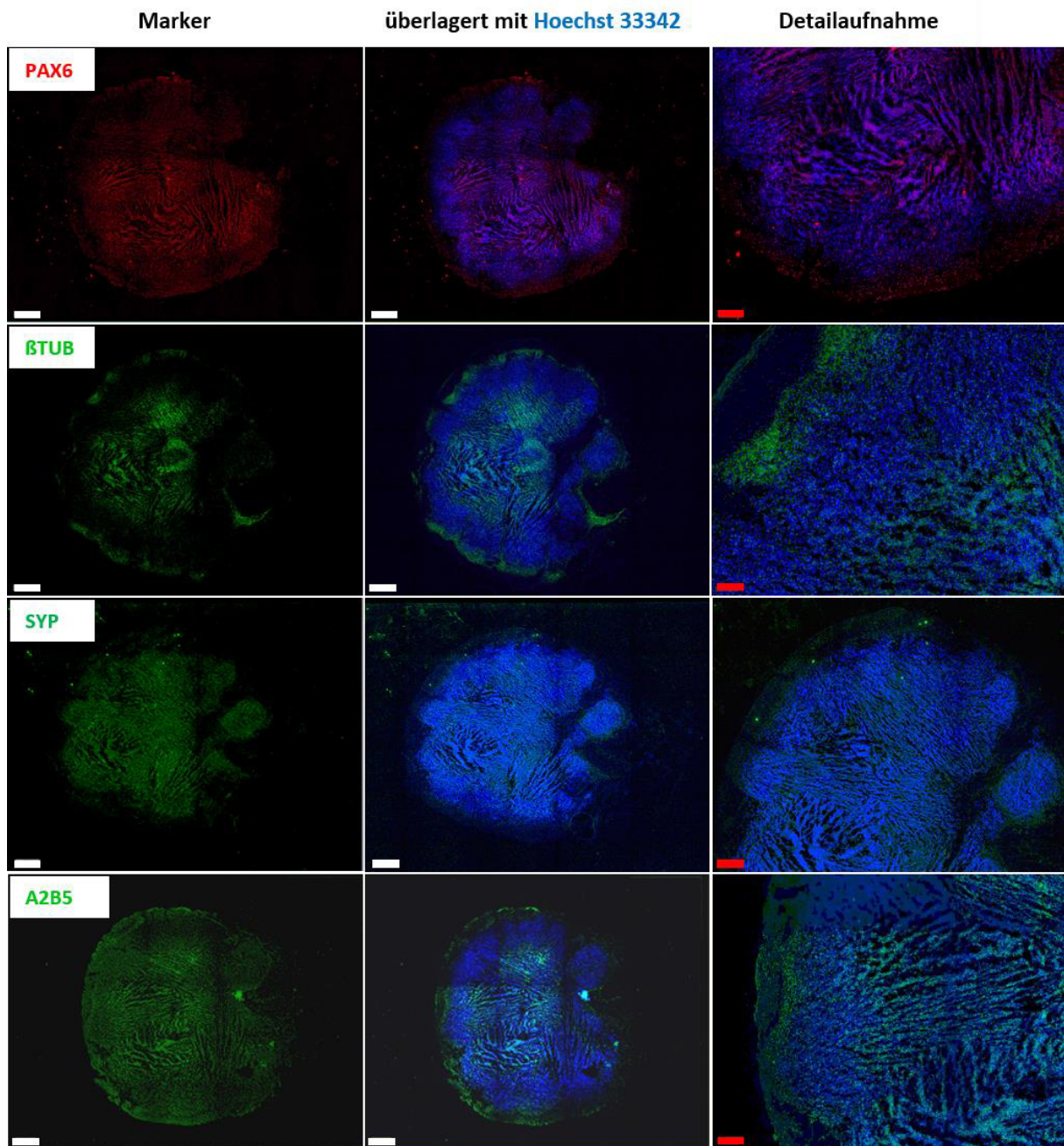


Abbildung 64: IFF von ZOs an d365 gegen den neuronalen Marker PAX6, die neuronalen Marker β TUB und SYP sowie gegen den glialen Progenitor-Marker A2B5. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μ m, 50 μ m.

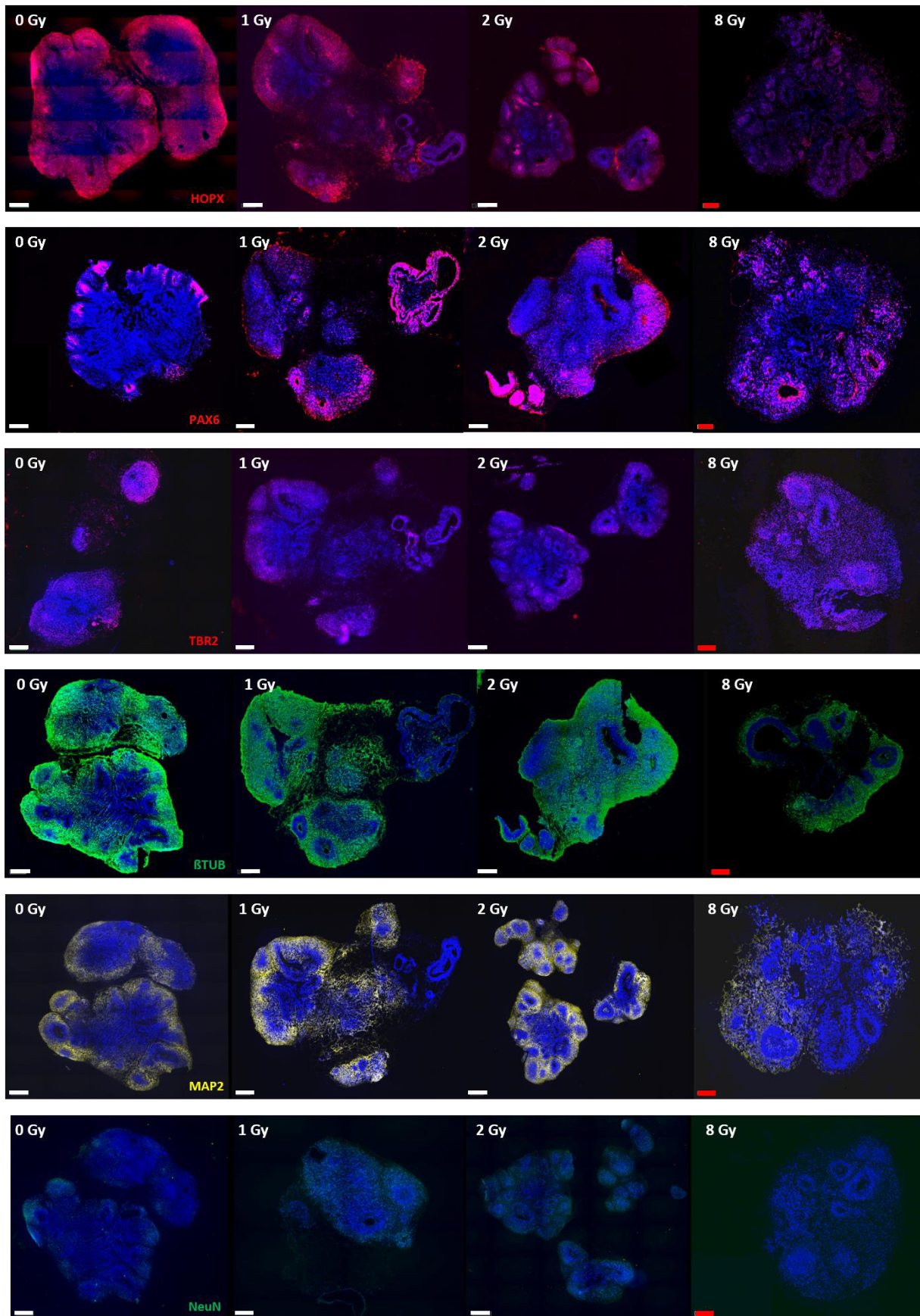


Abbildung 65: IFF von ZO an d66 gegen die Marker HOPX, PAX6, TBR2, β TUB, MAP2 und NeuN nach X-IR an d20. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μ m, 100 μ m.

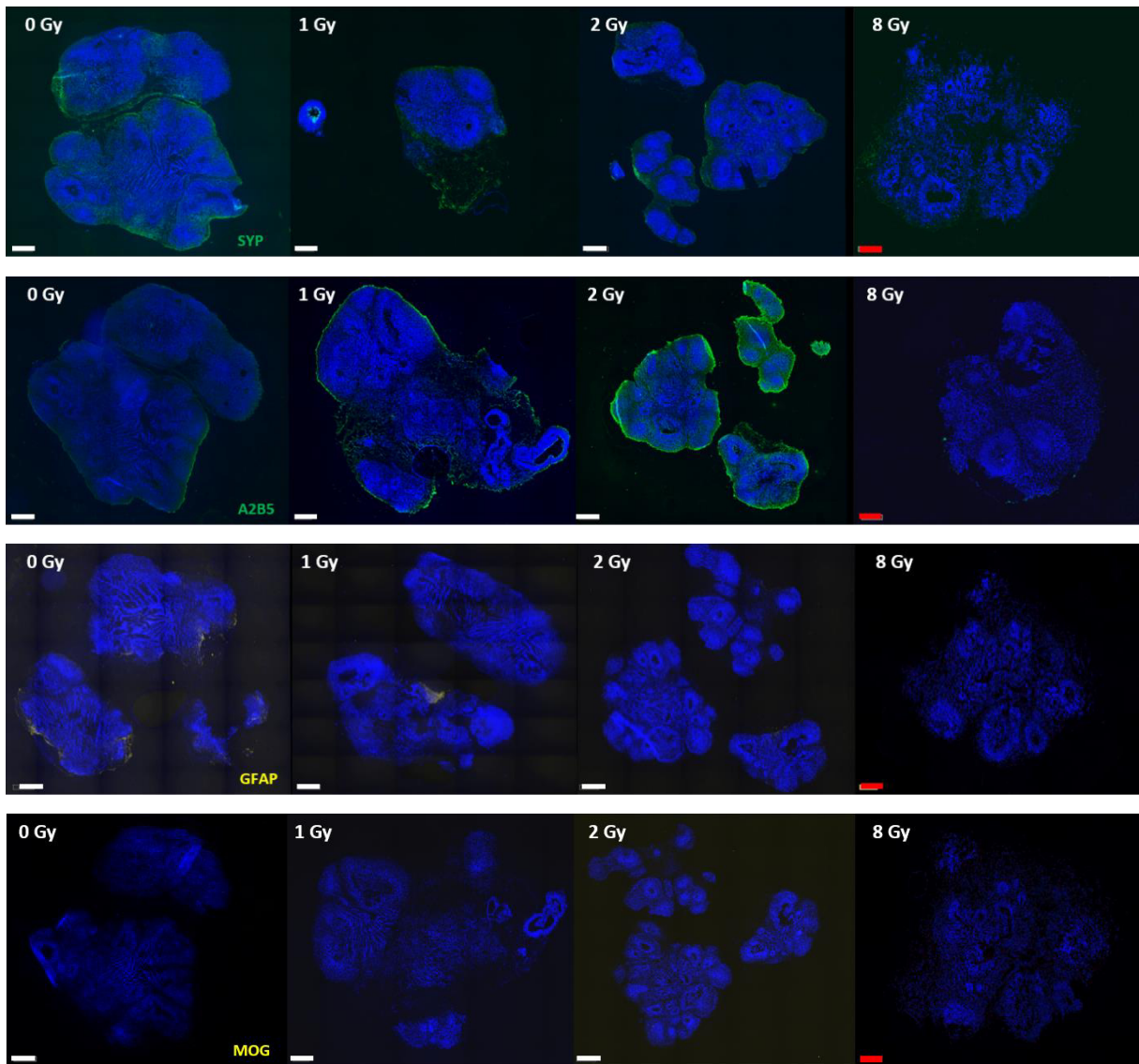


Abbildung 66: IFF von ZO's an d66 gegen die Marker SYP, A2B5, GFAP und MOG nach X-IR an d20. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μm, 100 μm.

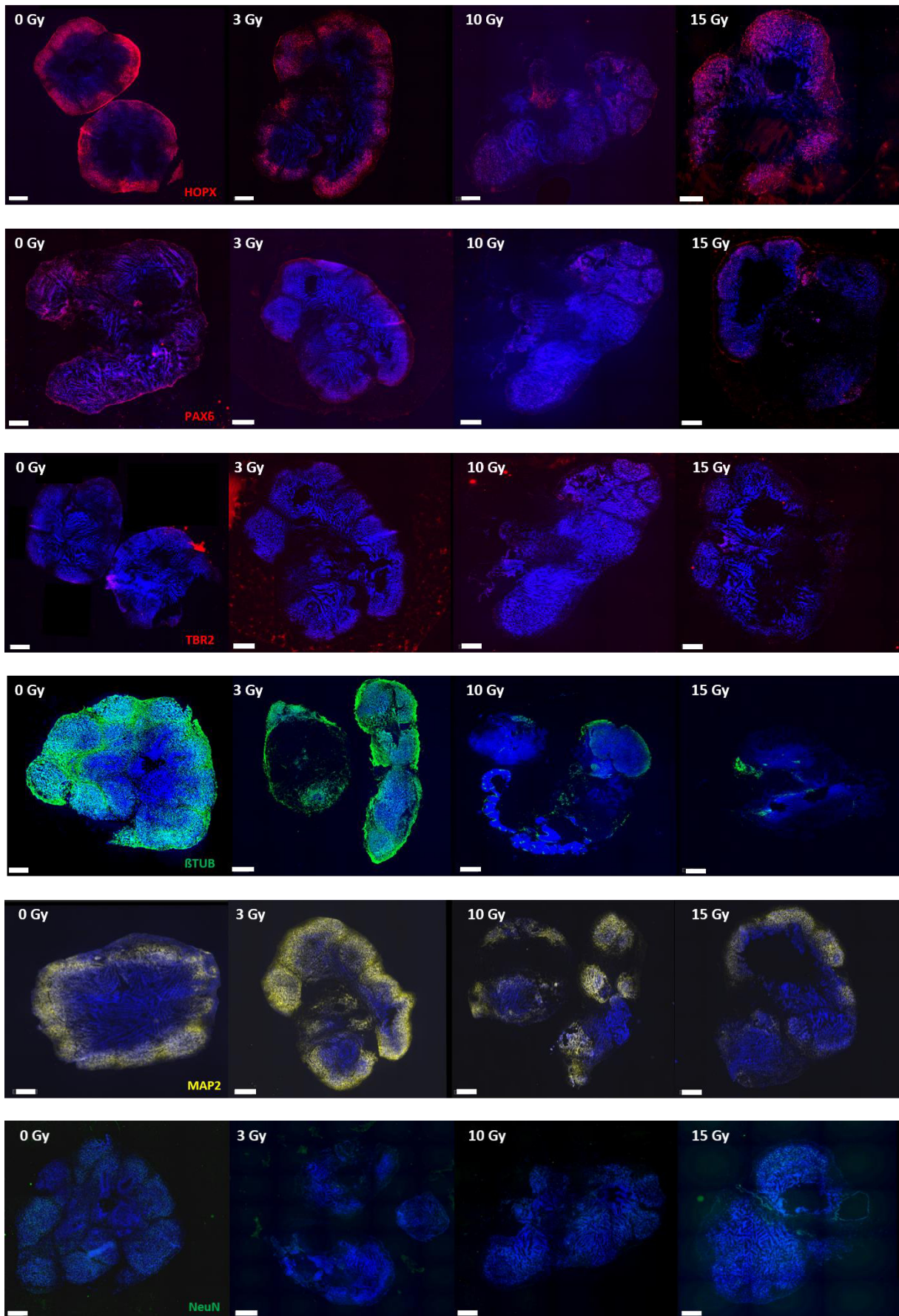


Abbildung 67: IFF von ZO's an d100 gegen die Marker HOPX, PAX6, TBR2, βTUB, MAP2 und NeuN nach X-IR an d80. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μm.

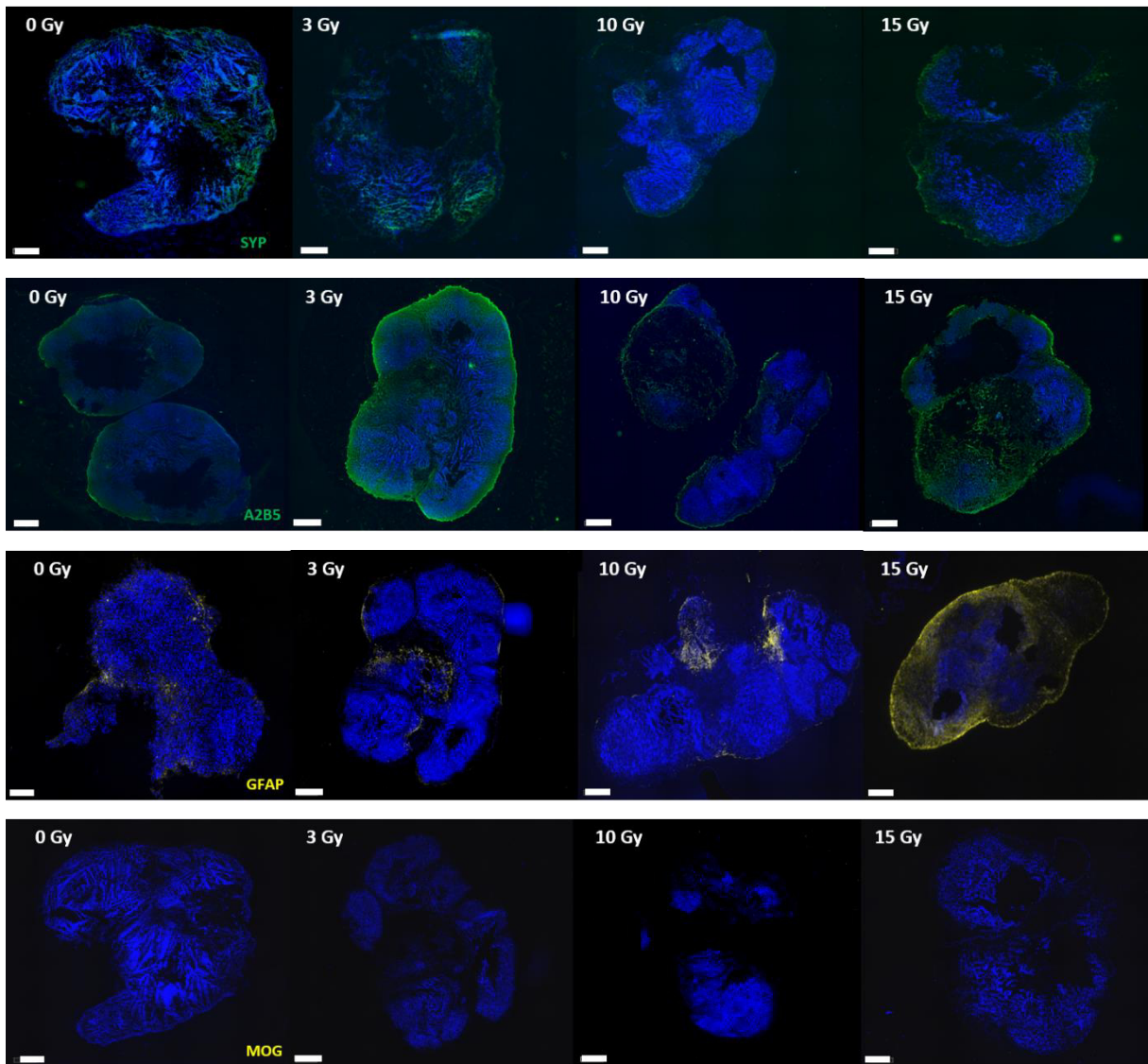


Abbildung 68: IFF von ZO's an d100 gegen die Marker SYP, A2B5, GFAP und MOG nach X-IR an d80. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μ m.

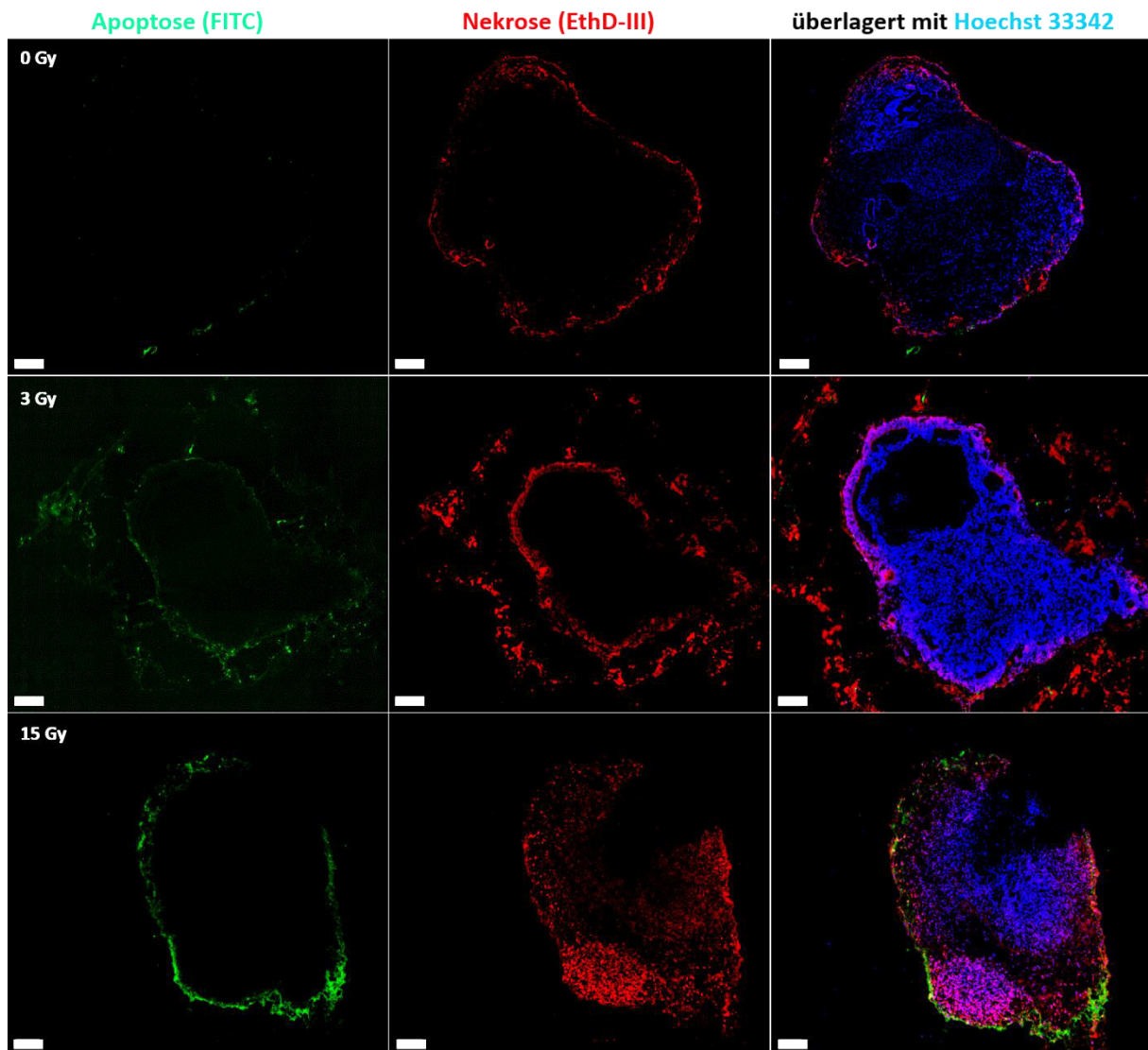


Abbildung 69: IFF von ZOs an d100 mittels des apoptotischen Markers FITC-Annexin V und des nekrotischen Markers EthD-III nach X-IR an d80 mit 3 und 15 Gy im Vergleich zu der Kontrolle (0 Gy). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33342. Maßstab: 200 μm .

Tabelle 22: Kavitäten-Bildung un-/bestrahlter ZOs.

Experiment #	Dosis [Gy]	Bestrahlung		Analyse	Kavitäten [n]	Kavitäten [%]
23	0	X-IR	d20	d40	0/10	0
	1	X-IR	d20	d40	4/10	40
	2	X-IR	d20	d40	5/10	50
	8	X-IR	d20	d40	7/10	70
54	0	X-IR	d20	d47	0/10	0
	1	X-IR	d20	d47	3/10	30
	2	X-IR	d20	d47	5/10	50
	8	X-IR	d20	d47	8/10	80
56	0	X-IR	d20	d47	1/10	10
	1	X-IR	d20	d47	3/10	30
	2	X-IR	d20	d47	6/10	60
	8	X-IR	d20	d47	8/10	80
603	0	X-IR	d80	d91	0/10	0
	3	X-IR	d80	d91	1/10	10
	10	X-IR	d80	d91	2/10	20
	15	X-IR	d80	d91	3/10	30
65	0	X-IR	d80	d100	1/9	11
	3	X-IR	d80	d100	2/8	25
	10	X-IR	d80	d100	2/10	20
	15	X-IR	d80	d100	3/8	37
66	0	X-IR	d80	d100	0/10	0
	3	X-IR	d80	d100	2/10	20
	10	X-IR	d80	d100	3/10	30
	15	X-IR	d80	d100	4/10	40
20	0	¹² C-IR	d20	d68	0/10	0
	0,5	¹² C-IR	d20	d68	4/10	40
	1	¹² C-IR	d20	d68	6/10	60
	4	¹² C-IR	d20	d68	7/10	70
58	0	¹² C-IR	d20	d47	1/10	10
	0,5	¹² C-IR	d20	d47	3/10	30
	1	¹² C-IR	d20	d47	5/10	50
	4	¹² C-IR	d20	d47	6/10	60
HIT3 PL	0	¹ H-IR	d80	d100	0/10	0
	3	¹ H-IR	d80	d100	2/10	20
	10	¹ H-IR	d80	d100	3/10	30
	15	¹ H-IR	d80	d100	3/9	33
HIT3 SOBP	0	¹ H-IR	d80	d100	0/10	0
	3	¹ H-IR	d80	d100	3/10	30
	10	¹ H-IR	d80	d100	5/11	45
	15	¹ H-IR	d80	d100	8/14	57

Tabelle 23: Größenmessungen [mm²] der ZO's nach X-IR an d20.

d20	d61	d20	d61	d20	d61	d20	d61
0 Gy	0 Gy	1 Gy	1 Gy	2 Gy	2 Gy	8 Gy	8 Gy
1,51111	21,69778	1,78667	11,12889	2,84	5,40889	1,85778	1,34667
2,14667	10,85778	2,72889	13,70667	1,60444	6,51556	1,51111	1,22667
2,78222	12,06222	1,30667	8,46222	0,97778	6,50667	1,88889	2,02667
1,86667	13,53778	1,91111	14,02222	2,14667	11,61333	1,71111	1,45333
1,2	15,84889	2,55556	12,22222	1,94222	9,24444	1,57778	1,56444
2,36889	13,05778	1,92889	9,84889	1,70222	6,43111	2,08	1,36
1,70667	15,99556	1,50667	6,02667	1,24	6,79556	1,11556	1,20889
2,06222	19,68889	0,54667	7,64444	2,99556	8,63556	2,38222	1,68444
1,27111	17,20889	2,29778	14,42222	1,89333	6,71111	2,34667	1,16889
1,31111	15,92444	2,18667	16,26667	2,13778	8,34222	1,81778	1,25778
2,14222	16,23111	2,51556	17,00889	2,57333	9,36444	2,08889	1,36444
2,6	10,09778	1,24	13,04	2,39556	9,03111	2,60444	0,41333
2,02222	10,06222	1,77778	12,89778	1,51556	9,72889	1,76444	0,66667
	6,43556	1,08444	5,44444		7,58667		0,18667
	7,07556		8,07111		10,56		0,86222
	10,03111		10,08		6,26667		0,37333
	7,70667		4,56889		10		0,41333
	6,10222		10,72444		6,85333		0,4
	11,64889		2,59111		10,32444		0,35111
	14,38667		3,07111		4,74222		0,44444
	3,06667		6,67111		2,32889		0,51111
	10,78222		9,96444		5,37333		0,26222
	8,39556		9,61333		2,56889		0,84
	6,91556		7,43111		3,28		0,92
	10,93778		6,48889		0,82222		0,78222
	10,81333		8,25778		2,04444		0,32444
	12,68889		8,96444		2,24		
			2,73333		2,30667		
			2,59556		2,38667		
			3,99111		2,45333		
			3,67111		5,08889		
			4,53778		1,08889		
			4,65333		1,23556		
			5,64		3,25778		
			2,34667		5,35111		
			3,51556		3,81778		
					1,88889		

Tabelle 24: Größenmessungen [mm²] der ZO's nach X-IR an d80.

d80	d100	d80	d100	d80	d100	d80	d100
0 Gy	0 Gy	3 Gy	3 Gy	10 Gy	10 Gy	15 Gy	15 Gy
17,57333	31,68	16,95111	55,45333	19,31111	55,04	18,66667	51,4
15,80444	38,10667	34,06222	45,54667	32,06222	47,90667	22,08889	25,28
22,73778	41,30667	20,16889	49,37333	28,16889	26,78667	34,62222	36,93333
16,03556	65,21333	28,25778	75,93333	18,25778	48,93333	27,52	37,54667
17,68	23,88	12,39111	39,08	14,71111	48,66667	16,14222	27,94667
10,32889	75,71556	22,79111	48,94667	23,57111	20,50667	17,07556	52,18667
39,38667	57,02667	20,34667	53,46667	22,24667	12,25333	21,14667	45,66667
27,68	39,77333	27,59111	21,46667	25,27111	89,44	8,26667	37,54667
7,68	40,93333	40,12444	35,72	37,12444	50,44	19,43111	35,77333
27,02222	49,53333	32,43556	61,78667	36,75156	47,53333	42,50667	50,84
37,57333	70,83556	21,89333	42,93333	19,49333	35,84	39,86667	27,62667
19,44	64,14222	20,26667	41,77778	23,06667	32,06222	19,05778	38,12444
16,53333	29,58222	10,51556	14,62222	15,11556	29,62667	33,82222	48,08889
18,64	45,84	21,52889	38,98667	19,92889	27,2	23,50222	36,82667
11,16444	46,61333		29,38667		38,17778		36,21333
	51,68		55,63556		24,96		18,41778
	63,21778		53,18222		19,25333		16,87111
	42,02667		40,8		37,22667		18,24
	37,44		45,89333		38,10667		11,49333
	52,73778		48,14222		33,06667		44,23111
	32,31111		62,51556		25,97333		51,73333
	34,21333		31,19111		51,31556		29,85778
	32,72		14,46222		30,48889		33,87556
	59,78667		38,94222		26,21333		8,21333
	36,21333		43,6		46,87111		23,22667
	65,16		39,60889		59,08		34,6
	85,34667		58,68		55,22667		32,8
	70,34667		36,68		33,82667		28,16
	67,17333		53,4		31,30667		19,2
	31,74667		61,45333		74,12		27,10667
	39,56		34,24		45,93333		45,16
	54,43111		35,55556		65,64		36,77333
	82,64		35,48		32,70667		34,94667
	62,60444		124,32		104,44		18,88
	81,97333		38,30667		17,69778		37,98667
	93,41333		38,97333		27,45333		64,6
	49,32889		80,21333		15,75111		18,49333
	46,54222		109,37333		88,72889		61,25333
	42,79111		38,38667		39,92		82,16
	89,32444		112,74667		37,32444		48,38667
	18,93333		28,96				37,8
	28,51556		61,29333				38,42667
			46,68				38,42667
			42,72				49,85333

Tabelle 25: Größenmessungen [mm²] der ZOs nach ¹²C-IR an d20.

d20	d61	d20	d61	d20	d61	d20	d61
0 Gy	0 Gy	0,5 Gy	0,5 Gy	1 Gy	1 Gy	4 Gy	4 Gy
1,38039	20,05841	0,83529	9,56475	0,64706	6,90539	1,32549	2,0165
1,10588	3,03077	0,7098	4,73072	0,71765	5,17982	0,70588	1,80138
0,83529	6,56649	0,32941	6,16959	0,50196	2,56621	0,51373	2,2571
0,7098	30,96039	0,75294	9,37427	0,56863	2,85443	0,96471	2,70886
0,32941	10,4826	0,98824	8,81593	0,53725	3,82874	0,56863	1,98517
1,38039	13,01546	0,7451	5,9883	0,43529	7,39822	0,53725	3,85443
1,10588	9,75668	0,67451	7,09969	0,76471	5,66562	0,43829	4,75501
	4,82888		4,30214		2,54344	0,77471	8,07749
	7,48768		2,60791		2,33312		2,53363
	10,46415		4,91507		4,61007		2,9718
	30,38431		18,22745		3,27339		2,04706
	32,18039		14,16471		3,80994		1,81176
	14,95686		9,96078		15,6006		1,27059
			14,37255		12,7451		1,42353
			25,20392		13,69412		1,37647
					15,52941		
					11,69412		
					10,96078		

Tabelle 26: Größenmessungen [mm²] der ZO's nach ¹H-IR an d80.

d80	d100	d80	d100	d80	d100	d80	d100
0 Gy	0 Gy	3 Gy	3 Gy	10 Gy	10 Gy	15 Gy	15 Gy
7,68	39,77333	22,79111	48,94667	23,57111	20,50667	17,07556	52,18667
27,02222	40,93333	20,34667	53,46667	22,24667	12,25333	21,14667	45,66667
37,57333	49,53333	27,59111	21,46667	25,27111	89,44	8,26667	37,54667
19,44	70,83556	40,12444	35,72	37,12444	50,44	19,43111	35,77333
16,53333	64,14222	32,43556	61,78667	36,75156	47,53333	42,50667	50,84
18,64	29,58222	21,89333	42,93333	19,49333	35,84	39,86667	27,62667
11,16444	45,84	20,26667	41,77778	23,06667	32,06222	19,05778	38,12444
	46,61333	10,51556	14,62222	15,11556	29,62667	33,82222	48,08889
	51,68	21,52889	38,98667	19,92889	27,2	23,50222	36,82667
			29,38667		38,17778	14,86222	36,21333
			55,63556		24,96	10,37333	18,41778
			53,18222		19,25333		16,87111
			40,8		37,22667		18,24
			45,89333		38,10667		11,49333
			48,14222		33,06667		44,23111
			62,51556		25,97333		51,73333
			31,19111		51,31556		29,85778
			14,46222		30,48889		33,87556
			38,94222		26,21333		8,21333
			43,6		46,87111		23,22667
			39,60889		59,08		34,6
			58,68		55,22667		32,8
			36,68		33,82667		28,16
			53,4		31,30667		19,2
			61,45333		74,12		27,10667
			34,24		45,93333		45,16
			35,55556		65,64		36,77333
			35,48		32,70667		34,94667
			124,32		104,44		18,88
			38,30667		17,69778		37,98667
			38,97333		27,45333		64,6
			80,21333		15,75111		18,49333
			109,37333		88,72889		61,25333
			38,38667		39,92		82,16
			112,74667		37,32444		48,38667
			28,96				37,8
			61,29333				38,42667
			46,68				49,85333
			42,72				66,72
			48,48889				78,22667
			16,58667				33,54667
			47,78667				42,48
			68,77778				16,12444
			42,86667				28,51556

Tabelle 27: FITC-Intensitätsmessungen [a.u.] zur Quantifizierung der strahleninduzierten Apoptose 24 h p. X-IR.

Experiment #	Dosis [Gy]	Bestrahlung		Hoechst	FITC	FITC/Hoechst
70	0	X-IR	d20	14773375	80431	0,01
	1	X-IR	d20	6113741	96560	0,02
	2	X-IR	d20	13694027	912729	0,07
	8	X-IR	d20	38420802	3734033	0,10
72	0	X-IR	d20	13763271	60531	0,00
	1	X-IR	d20	18727120	482857	0,03
	2	X-IR	d20	20301032	1265240	0,06
	8	X-IR	d20	9510699	892101	0,09
73	0	X-IR	d20	33269005	208442	0,01
	1	X-IR	d20	86258833	2.943.358	0,03
	2	X-IR	d20	27231248	1.097.644	0,04
	8	X-IR	d20	35062020	2929226	0,08
65	0	X-IR	d80	32257653	17892657	0,55
	3	X-IR	d80	39389379	28211515	0,72
	10	X-IR	d80	24701497	24482190	0,99
	15	X-IR	d80	40252188	40281601	1,00
66	0	X-IR	d80	9262279	3.257.438	0,35
	3	X-IR	d80	7.483.854	3.373.494	0,45
	10	X-IR	d80	6246139	3.601.462	0,58
	15	X-IR	d80	4657443	2917652	0,63
73	0	X-IR	d80	36.101.357	25.828.747	0,72
	3	X-IR	d80	54.727.185	43.269.749	0,79
	10	X-IR	d80	52.263.900	46.653.002	0,89
	15	X-IR	d80	32071840	30706558	0,96

Tabelle 28: FITC- und EthD-III-Intensitätsmessungen [a.u.] zur Quantifizierung des strahleninduzierten Zelltods (A: Apoptose, N: Nekrose) nach ¹H-IR im SOBP.

Experiment #	Dosis [Gy]	Bestrahlung		Hoechst	FITC	FITC/Hoechst
HIT3	0	¹ H-IR	d80	1.625.108	4.123.545	0,39
	3	¹ H-IR	d80	5.137.182	8.848.602	0,58
	15	¹ H-IR	d80	7545622	15.285.778	0,49
74	0	¹ H-IR	d80	1.625.108	5.223.545	0,31
	3	¹ H-IR	d80	5.137.182	10.548.602	0,49
	15	¹ H-IR	d80	7545622	7.685.778	0,98
Experiment #	Dosis [Gy]	Bestrahlung		Hoechst	EthD-III	EthD-III/Hoechst
HIT3	0	¹ H-IR	d80	4.273.734	11.207.987	0,38
	3	¹ H-IR	d80	10.381.776	13.848.602	0,75
	15	¹ H-IR	d80	11.038.364	15.285.778	0,72
74	0	¹ H-IR	d80	4.273.734	5.407.987	0,79
	3	¹ H-IR	d80	10.381.776	10.548.602	0,98
	15	¹ H-IR	d80	11.038.364	7.685.778	1,44

Tabelle 29: Fluoreszenzmessungen an d66 [a.u.] nach X-IR an d20 zur Quantifizierung der Proteinexpression.

Experiment	Dosis	Hoechst-Intensität	Marker- Intensität	Marker/Hoechst
HOPX				
e67	0 Gy	4.134.884.000	4.070.320.000	0,984385535
e67	0 Gy	7.646.992.000	5.233.454.000	0,684380734
e68	0 Gy	5.800.500.000	5.518.131.000	0,951319886
e68	0 Gy	7.012.195.000	6.037.075.000	0,860939406
e69	0 Gy	6.054.533.000	4.277.185.000	0,70644342
e69	0 Gy	10.202.709.000	8.831.696.000	0,86562265
e67	1 Gy	7.367.124.000	4.422.618.000	0,600318116
e67	1 Gy	6.246.518.000	3.365.572.000	0,538791692
e67	1 Gy	2.453.581.000	2.578.544.000	1,050930864
e68	1 Gy	28.311.904.000	20.099.949.000	0,709946918
e69	1 Gy	16.300.043.000	11.426.266.000	0,700996065
e67	2 Gy	10.673.599.000	5.107.372.000	0,478505142
e67	2 Gy	13.371.256.000	9.216.684.000	0,689290819
e68	2 Gy	24.192.354.000	14.859.392.000	0,614218525
e69	2 Gy	41.033.436.000	16.144.169.000	0,393439365
e63	8 Gy	50.268.290.000	19.593.987.000	0,389788214
e75	8 Gy	5.956.115.000	2.041.640.000	0,342780487
e75	8 Gy	7.750.959.000	2.324.178.000	0,299856831
PAX6				
e67	0 Gy	11.788.814.000	5.228.314.000	0,443497879
e68	0 Gy	14.515.700.000	6.666.944.000	0,459291939
e69	0 Gy	10.047.117.000	3.460.364.000	0,344413626
e67	1 Gy	11.143.026.000	4.862.422.000	0,436364593
e67	1 Gy	4.884.376.000	3.253.210.000	0,666044137
e67	1 Gy	9.262.074.000	3.268.590.000	0,352900441
e68	1 Gy	42.743.917.000	28.972.789.000	0,677822507
e69	1 Gy	15.207.967.000	10.631.346.000	0,699064247
e67	2 Gy	28.994.846.000	23.550.925.000	0,812245218
e67	2 Gy	26.251.441.000	26.376.229.000	1,004753568
e68	2 Gy	16.485.987.000	7.633.428.000	0,463025235
e69	2 Gy	45.984.624.000	26.202.447.000	0,569808878
e63	8 Gy	20.462.192.000	23.191.453.000	1,133380676
e75	8 Gy	8.509.592	4.641.227	0,545411225
e75	8 Gy	4.057.867	2.387.473	0,588356642
e75	8 Gy	4.384.427	2496903	0,569493574
TBR2				
e67	0 Gy	4.472.311.000	2.197.363.000	0,491326073
e67	0 Gy	3.163.300.000	2.381.133.000	0,752737015
e68	0 Gy	12.695.914.000	8.593.757.000	0,676891557
e68	0 Gy	11.298.487.000	6.626.831.000	0,586523753
e69	0 Gy	10.758.563.000	6.411.503.000	0,59594418
e69	0 Gy	14.498.805.000	10.706.150.000	0,738416028
e67	1 Gy	5.077.880.000	1.983.515.000	0,390618723
e67	1 Gy	6.166.505.000	3.003.362.000	0,487044444
e67	1 Gy	2.335.012.000	1.593.350.000	0,682373367

e68	1 Gy	30.310.694.000	11.701.359.000	0,386047215
e69	1 Gy	9.517.091.000	4.863.929.000	0,511073079
e67	2 Gy	12.768.121.000	4.549.829.000	0,356342879
e67	2 Gy	7.170.335.000	3.175.184.000	0,442822267
e68	2 Gy	27.843.237.000	11.287.978.000	0,405411842
e69	2 Gy	22.667.646.000	9.087.184.000	0,400887856
e63	8 Gy	40.342.815.000	16.028.308.000	0,397302667
e75	8 Gy	7.320.874.000	2.918.809.000	0,398696795
e75	8 Gy	3.046.517.000	1.338.139.000	0,439235691
e75	8 Gy	3.980.083.000	1.488.402.000	0,373962553
BTUB				
e67	0 Gy	11.679.584.000	41.320.242.000	3,537817957
e68	0 Gy	3.335.402.000	13.656.958.000	4,094546325
e68	0 Gy	4.711.694.000	22.606.877.000	4,798035908
e69	0 Gy	10.163.299.000	29.626.096.000	2,915007814
e69	0 Gy	14.807.167.000	40.086.945.000	2,707266353
e67	1 Gy	11.233.422.000	10.747.521.000	0,95674506
e67	1 Gy	5.678.494.000	5.030.721.000	0,885925212
e67	1 Gy	13.838.951.000	13.651.334.000	0,986442831
e68	1 Gy	42.466.390.000	40.865.279.000	0,962296984
e69	1 Gy	15.113.234.000	21.019.837.000	1,390823235
e67	2 Gy	31.670.589.000	34.783.988.000	1,098305687
e67	2 Gy	35.491.418.000	41.244.978.000	1,162111303
e68	2 Gy	19.037.693.000	43.897.812.000	2,305836742
e69	2 Gy	46.821.013.000	46.174.739.000	0,986196924
e63	8 Gy	20.293.690.000	767.845.000	0,037836638
e75	8 Gy	5.278.790.000	1.538.123.000	0,291377948
e75	8 Gy	7.268.501.000	492.337.000	0,0677357
e75	8 Gy	5.505.303.000	394.844.000	0,071720666
MAP2				
e67	0 Gy	4.434.802.000	7.351.439.000	1,657670173
e67	0 Gy	5.409.301.000	5.848.911.000	1,08126928
e68	0 Gy	8.302.080.000	12.493.106.000	1,504816383
e68	0 Gy	10.677.537.000	9.884.370.000	0,925716296
e69	0 Gy	7.667.513.000	7.036.991.000	0,917767078
e69	0 Gy	10.219.961.000	11.638.274.000	1,13877871
e67	1 Gy	5.902.520.000	5.787.585.000	0,980527808
e67	1 Gy	2.955.902.000	3.435.953.000	1,162404234
e67	1 Gy	5.506.191.000	5.702.059.000	1,035572322
e68	1 Gy	30.471.755.000	32.648.009.000	1,071418729
e69	1 Gy	23.982.234.000	28.648.188.000	1,194558772
e67	2 Gy	10.830.327.000	13.625.858.000	1,258120646
e67	2 Gy	10.005.529.000	11.296.693.000	1,129045051
e68	2 Gy	33.105.249.000	41.461.352.000	1,252410214
e69	2 Gy	79.640.458.000	83.004.850.000	1,04224476
e63	8 Gy	60.054.877.000	17.981.365.000	0,299415566
e75	8 Gy	3.979.941.000	8.032.406.000	2,018222381
e75	8 Gy	11.391.576.000	8.116.335.000	0,7124857
e75	8 Gy	7.590.939.000	5.895.193.000	0,776609192
NeuN				

e67	0 Gy	3.222.001	1.596.262	0,495425669
e68	0 Gy	14.269.946.000	4.763.580.000	0,333819063
e69	0 Gy	8.880.068.000	110.681.000	0,012463981
e69	0 Gy	13.828.535.000	394.282.000	0,028512203
e67	1 Gy	4.679.624	761.521	0,162731237
e67	1 Gy	3.191.382	473531	0,148378038
e67	1 Gy	6786838	1085797	0,159985696
e68	1 Gy	12.172.099.000	1.736.284.000	0,142644584
e69	1 Gy	20.595.103.000	3.272.472.000	0,158895637
e67	2 Gy	5.111.321	963.796	0,188561039
e67	2 Gy	7.080.613.000	1.193.756.000	0,168595007
e68	2 Gy	16.630.485.000	2.460.908.000	0,14797572
e69	2 Gy	27.064.978.000	5.203.357.000	0,192254248
e63	8 Gy	31.554.289	3.672.603	0,116389978
e75	8 Gy	8.583.350.000	8.583.350.000	1
e75	8 Gy	3.433.228.000	64.000	1,86413E-05
e75	8 Gy	4.880.554.000	64.000	1,31133E-05
SYP				
e67	0 Gy	11.086.133.000	3.773.739.000	0,340401743
e68	0 Gy	16.637.738.000	4.625.850.000	0,278033588
e69	0 Gy	9.920.914.000	2.039.325.000	0,205558177
e69	0 Gy	18.032.973.000	3.680.897.000	0,204120363
e67	1 Gy	7.920.966.000	1.939.316.000	0,244833269
e67	1 Gy	3.920.294.000	1.207.422.000	0,307992717
e67	1 Gy	6.106.348.000	1.354.004.000	0,221737117
e68	1 Gy	10.749.703.000	3.351.752.000	0,311799498
e69	1 Gy	20.546.198.000	6.518.382.000	0,3172549
e67	2 Gy	8.534.811.000	2.008.515.000	0,2353321
e67	2 Gy	10.099.639.000	3.020.633.000	0,299083264
e68	2 Gy	7.652.532.000	2.390.812.000	0,312421039
e69	2 Gy	22.504.269.000	6.254.601.000	0,277929534
e63	8 Gy	52.026.609.000	7.483.223.000	0,143834533
e75	8 Gy	6.806.642.000	1.319.829.000	0,193903102
e75	8 Gy	9.189.509.000	1.354.894.000	0,147439216
A2B5				
e67	0 Gy	6.168.035.000	48.926.000	0,007932186
e67	0 Gy	5.656.907.000	172.464.000	0,030487332
e68	0 Gy	9.994.586.000	146.714.000	0,014679347
e68	0 Gy	10.935.646.000	146.416.000	0,013388875
e69	0 Gy	26.257.897.000	96.200.000	0,00366366
e67	1 Gy	5.769.706.000	1.606.864.000	0,278500152
e67	1 Gy	3.481.053.000	1.480.494.000	0,42530062
e67	1 Gy	6.701.509.000	3.646.505.000	0,544131926
e68	1 Gy	37.304.114.000	5.026.771.000	0,134751116
e69	1 Gy	17.531.209.000	3.548.816.000	0,202428481
e67	2 Gy	9.458.349.000	6.055.944.000	0,640274957
e67	2 Gy	11.065.703.000	9.464.089.000	0,85526324
e68	2 Gy	17.145.820.000	1.911.378.000	0,111477783
e69	2 Gy	34.071.903.000	2.877.773.000	0,084461763
e63	8 Gy	28.393.813.000	3.904.741.000	0,137520839

e75	8 Gy	6.528.984.000	120.406.000	0,018441767
e75	8 Gy	6.766.566.000	1.374.000	0,000203057
e75	8 Gy	7.589.424.000	2.818.000	0,000371306
GFAP				
e67	0 Gy	10.564.864.000	5.533.137.000	0,523730074
e67	0 Gy	6.783.609.000	5.923.087.000	0,873146875
e68	0 Gy	8.946.114.000	4.881.368.000	0,545641158
e68	0 Gy	10.230.685.000	6.283.901.000	0,614220944
e69	0 Gy	10.648.141.000	1.862.292.000	0,174893627
e69	0 Gy	15.799.356.000	3.102.738.000	0,196383827
e67	1 Gy	8.190.743.000	2.558.341.000	0,312345412
e67	1 Gy	12.754.591.000	3.632.765.000	0,284820187
e67	1 Gy	3.175.992.000	1.733.801.000	0,545908491
e68	1 Gy	31.589.211.000	11.081.269.000	0,350792839
e69	1 Gy	12.944.566.000	5.359.161.000	0,41400855
e67	2 Gy	10.789.504.000	3.238.679.000	0,300169405
e67	2 Gy	14.031.543.000	6.296.535.000	0,448741453
e68	2 Gy	26.020.919.000	6.398.638.000	0,245903613
e69	2 Gy	60.206.698.000	17.009.821.000	0,282523732
e63	8 Gy	35.244.003.000	7.870.736.000	0,223321284
e75	8 Gy	7.097.681.000	1.090.185.000	0,153597351
e75	8 Gy	5.062.819.000	816.382.000	0,161250481
e75	8 Gy	7.446.314.000	1.130.511.000	0,151821559
MOG				
e67	0 Gy	7.092.570.000	8.470.512.000	1,194279648
e68	0 Gy	6.289.353.000	5.114.546.000	0,813207018
e68	0 Gy	8.970.910.000	6.271.514.000	0,699094518
e69	0 Gy	4.560.297.000	2.914.732.000	0,639153985
e69	0 Gy	8.260.751.000	5.157.429.000	0,624329313
e67	1 Gy	8.503.251.000	4.154.926.000	0,488627938
e67	1 Gy	2.609.987.000	1.947.634.000	0,74622364
e67	1 Gy	6.057.053.000	2.640.356.000	0,435914297
e68	1 Gy	35.730.042.000	16.119.679.000	0,451151975
e69	1 Gy	15.289.735.000	10.028.905.000	0,655924056
e67	2 Gy	9.257.170.000	3.498.734.000	0,377948552
e67	2 Gy	11.434.297.000	6.153.046.000	0,538121933
e68	2 Gy	24.216.577.000	9.060.976.000	0,374164193
e69	2 Gy	23.549.954.000	9.690.128.000	0,411471207
e63	8 Gy	39.731.730.000	10.734.985.000	0,2701867
e75	8 Gy	6.366.520	5.032.548	0,790470775
e75	8 Gy	10.791.127	10534019	0,976174129
e75	8 Gy	10269879	1570196	0,15289333

Tabelle 30: Fluoreszenzmessungen an d100 [a.u.] nach X-IR an d80 zur Quantifizierung der Proteinexpression.

Experiment	Dosis	Hoechst-Intensität	Marker- Intensität	Marker/Hoechst
HOPX				
	0 Gy	14.423.851.000	17.199.930.000	1,192464481
e38	0 Gy	7.834.802.000	9.041.437.000	1,154009635
e65	0 Gy	7.729.467.000	7.877.888.000	1,019201971
e66	0 Gy	11108467	13741675	1,23704513
e73	3 GY	6.805.554.000	5.101.400.000	0,749593641
e65	3 GY	4.619.889.000	6.569.750.000	1,422057976
e65	3 GY	30.112.459	12.344.161	0,409935336
e66	3 GY	16.662.376.000	10.378.531.000	0,622872212
e73	10 Gy	13.724.864.000	13.258.404.000	0,966013507
e38	10 Gy	10.701.557	12.524.153	1,170311292
e66	10 Gy	13.666.423.000	10.471.439.000	0,766216515
e73	15 Gy	16.403.097.000	22.344.230.000	1,36219581
e38	15 Gy	4.104.181.000	4.876.572.000	1,188196135
e65	15 Gy	7.896.538.000	7.889.778.000	0,999143929
e65	15 Gy	10.217.406	11.805.553	1,15543544
e66	15 Gy	8.894.210.000	6.696.891.000	0,752949503
e73	15 Gy	4.770.258.000	17.465.595.000	3,661352279
e73	0 Gy	14.423.851.000	17.199.930.000	1,192464481
PAX6				
e38	0 Gy	23.348.180.000	17.246.458.000	0,738663913
e65	0 Gy	10.146.190	4.929.879	0,485884751
e66	0 Gy	33.218.440.000	44.673.124.000	1,344829077
e73	0 Gy	10.608.186.000	8.932.434.000	0,842032182
e65	3 GY	6.248.554.000	6.930.974.000	1,109212467
e65	3 GY	12.141.494.000	6.196.822.000	0,510383813
e66	3 GY	17.752.805.000	5.829.229.000	0,328355378
e73	3 GY	33.180.667.000	16.314.757.000	0,491694667
e38	10 Gy	36.666.976.000	8.540.192.000	0,232912362
e66	10 Gy	24.848.908.000	12.419.467.000	0,499799307
e73	10 Gy	11.385.237.000	13.708.661.000	1,204073398
e38	15 Gy	25.560.474.000	11.343.605.000	0,443794783
e65	15 Gy	4.816.020.000	2.910.086.000	0,604251228
e65	15 Gy	10.517.136.000	4.552.749.000	0,432888669
e66	15 Gy	11.367.947.000	6.375.386.000	0,560821228
e73	15 Gy	9.874.484.000	6.007.313.000	0,608367283
e73	15 Gy	6.589.152.000	5.676.846.000	0,861544247
TBR2				
e38	0 Gy	12.445.851.000	13.053.283.000	1,048805984
e65	0 Gy	9.551.500.000	3.404.243.000	0,356409255
e65	0 Gy	10.481.235.000	3.454.162.000	0,329556775
e66	0 Gy	23.329.487.000	11.410.391.000	0,489097381
e73	0 Gy	15.968.088.000	6.300.417.000	0,394563018
e65	3 GY	7.626.230.000	2.857.998.000	0,374758957
e65	3 GY	3.416.939.000	1.715.431.000	0,50203735
e66	3 GY	18.437.653.000	6.155.318.000	0,333844986
e73	3 GY	22.895.233.000	8.961.133.000	0,391397327

e38	10 Gy	18.789.121.000	5.774.533.000	0,307333856
e66	10 Gy	13.335.801.000	7.188.398.000	0,539030089
e73	10 Gy	9.866.312.000	5.255.908.000	0,532712527
e38	15 Gy	23.159.412.000	15.260.395.000	0,65892843
e65	15 Gy	3.999.292.000	2.343.448.000	0,585965716
e65	15 Gy	12.384.326.000	4.449.185.000	0,359259357
e66	15 Gy	10.498.252.000	4.996.736.000	0,475958855
e73	15 Gy	8.590.946.000	5.070.042.000	0,590161084
e73	15 Gy	4.567.053.000	2.718.051.000	0,595143301
BTUB				
e38	0 Gy	23.218.869.000	24.158.746.000	1,040479017
e65	0 Gy	7.614.722.000	25.728.804.000	3,37882381
e65	0 Gy	6.943.595.000	25.925.889.000	3,733784733
e66	0 Gy	29.075.105.000	70.784.528.000	2,434540752
e73	0 Gy	10.656.512.000	576.481.000	0,054096594
e65	3 GY	13.187.847.000	3.802.001.000	0,288295807
e65	3 GY	6.926.984.000	5.363.278.000	0,774258754
e66	3 GY	18.352.480.000	22.410.073.000	1,221092354
e73	3 GY	33.116.294.000	3.194.215.000	0,096454482
e38	10 Gy	17.378.665.000	16.651.838.000	0,958177052
e66	10 Gy	6.165.956.000	3.989.883.000	0,647082626
e73	10 Gy	11.547.119.000	2.358.917.000	0,204286195
e38	15 Gy	26.214.572.000	28.480.210.000	1,086426664
e65	15 Gy	4.097.808.000	3.070.640.000	0,749337207
e65	15 Gy	10.719.884.000	8.266.147.000	0,771104146
e66	15 Gy	12.433.660.000	11.070.639.000	0,890376526
e73	15 Gy	10.808.367.000	640.936.000	0,059299985
e73	15 Gy	6.668.890.000	12.081.363.000	1,811600281
MAP2	0 Gy	21.362.182.000	32.703.536.000	1,530908032
e38	0 Gy	11.641.518.000	13.805.792.000	1,185909947
e65	0 Gy	12.092.672.000	15.640.483.000	1,293385201
e65	0 Gy	41.317.764.000	19.875.073.000	0,481029733
e66	0 Gy	12.096.157.000	7.853.613.000	0,649265134
e73	3 GY	12.899.850.000	13.558.292.000	1,051042609
e65	3 GY	9.839.333.000	6.784.234.000	0,689501412
e65	3 GY	11.271.019.000	22.785.987.000	2,021643917
e66	3 GY	24.814.353.000	11.669.031.000	0,470253284
e73	10 Gy	20.736.164	15.294.620	0,737581937
e38	10 Gy	12.545.560.000	19.158.949.000	1,527149765
e66	10 Gy	21.897.108.000	8.318.457.000	0,379888385
e73	15 Gy	10.666.227.000	10.744.062.000	1,007297332
e38	15 Gy	2.559.594.000	5.994.116.000	2,341822961
e65	15 Gy	4.624.618.000	8.533.681.000	1,845272626
e65	15 Gy	14.809.216.000	15.669.285.000	1,058076606
e66	15 Gy	5.145.762.000	4.998.416.000	0,971365563
e73	15 Gy	3.490.173.000	5.865.978.000	1,680712675
e73	0 Gy	21.362.182.000	32.703.536.000	1,530908032
NeuN				
e38	0 Gy	23.937.097.000	3.033.481.000	0,126727188
e65	0 Gy	6.571.828.000	79.510.000	0,012098612

e65	0 Gy	7.291.555.000	117.670.000	0,016137847
e66	0 Gy	26.166.375.000	359.946.000	0,013756051
e73	0 Gy	12.817.807.000	14.658.000	0,001143565
e65	3 Gy	6.060.448.000	650.980.000	0,107414501
e65	3 Gy	5.328.271.000	884.051.000	0,165917049
e66	3 Gy	12.876.926.000	1.282.692.000	0,099611662
e73	3 Gy	12.569.409.000	2.280.473.000	0,181430408
e38	10 Gy	24.849.203.000	4.360.286.000	0,175469853
e66	10 Gy	13.554.642.000	1.909.079.000	0,140843189
e73	10 Gy	15.798.559.000	3.624.472.000	0,229417886
e38	15 Gy	19.131.045.000	2.543.076.000	0,132929278
e65	15 Gy	3.646.073.000	485.990.000	0,133291352
e65	15 Gy	2.887.195.000	444.868.000	0,154083115
e66	15 Gy	18.284.120.000	2.735.268.000	0,149598012
e73	15 Gy	10.241.304.000	2.425.157.000	0,236801583
e73	15 Gy	1.482.170.000	425.047.000	0,286773447
SYP				
e38	0 Gy	16.682.802.000	5.892.545.000	0,35321075
e65	0 Gy	8.291.233.000	2.703.625.000	0,326082381
e65	0 Gy	12.008.584.000	3.429.495.000	0,28558696
e66	0 Gy	47.929.093.000	5.593.383.000	0,116701207
e73	0 Gy	11.260.902.000	3.417.663.000	0,303498157
e65	3 Gy	9.472.902.000	2.858.751.000	0,301781967
e65	3 Gy	5.225.868.000	2.991.827.000	0,572503362
e66	3 Gy	15.733.751.000	6.223.622.000	0,395558694
e73	3 Gy	19.711.072.000	6.098.042.000	0,309371403
e38	10 Gy	19.210.394.000	3.921.851.000	0,204152554
e66	10 Gy	10.761.069.000	4.600.548.000	0,427517749
e73	10 Gy	17.658.476.000	12.534.373.000	0,709821901
e38	15 Gy	10.032.600.000	4.258.704.000	0,424486574
e65	15 Gy	4.906.243.000	1.885.117.000	0,384228217
e65	15 Gy	3.597.576.000	2.326.216.000	0,646606493
e66	15 Gy	12.931.593.000	5.475.843.000	0,423446902
e73	15 Gy	9.741.085.000	3.112.810.000	0,319554752
e73	15 Gy	869.433.000	552.949.000	0,635988052
A2B5				
e38	0 Gy	19.556.211.000	552.566.000	0,028255269
e65	0 Gy	5.174.245.000	256.350.000	0,04954346
e65	0 Gy	6.699.512.000	193.397.000	0,028867326
e66	0 Gy	29.046.963.000	566.709.000	0,019510095
e73	0 Gy	5.434.469.000	35.983.000	0,006621254
e65	3 Gy	6.036.799.000	339.057.000	0,056165031
e65	3 Gy	5.079.897.000	515.900.000	0,101557177
e66	3 Gy	14.921.086.000	2.514.485.000	0,1685189
e73	3 Gy	17.767.097.000	896.041.000	0,050432606
e38	10 Gy	8.528.928.000	1.018.266.000	0,119389682
e66	10 Gy	4.513.252.000	1.001.529.000	0,221908504
e73	10 Gy	12.868.938.000	708.471.000	0,055052795
e38	15 Gy	17.240.140.000	667.104.000	0,038694813
e65	15 Gy	9.245.380.000	760.406.000	0,082247133

e66	15 Gy	9.600.098.000	1.813.081.000	0,188860676
e73	15 Gy	3.419.559.000	96.524.000	0,028227032
GFAP				
e38	0 Gy	20.298.641.000	30.809.027.000	1,517787669
e65	0 Gy	3.156.530.000	1.941.747.000	0,615152398
e65	0 Gy	6.995.107.000	2.561.705.000	0,366213841
e66	0 Gy	36.479.745.000	7.814.650.000	0,214218877
e73	0 Gy	18.724.701.000	8.742.262.000	0,46688393
e65	3 GY	7.023.737.000	3.621.217.000	0,515568422
e65	3 GY	7.816.266.000	4.577.722.000	0,585666097
e66	3 GY	13.786.141.000	8.445.036.000	0,612574324
e73	3 GY	20.006.183.000	10.864.003.000	0,543032272
e38	10 Gy	39.287.408	17.458.053	0,444367646
e66	10 Gy	14.084.149.000	11.975.077.000	0,850252081
e73	10 Gy	11.095.652.000	5.448.458.000	0,49104442
e38	15 Gy	13.301.470.000	9.448.398.000	0,710327355
e65	15 Gy	8.424.035.000	7.835.899.000	0,930183576
e66	15 Gy	20.746.057.000	11.394.394.000	0,549231789
e73	15 Gy	4.883.130.000	4.671.012.000	0,956561058
e73	15 Gy	3.751.458.000	6.316.999.000	1,683878375
MOG				
e38	0 Gy	20.172.234.000	11.309.710.000	0,560657288
e65	0 Gy	11.456.268.000	6.279.649.000	0,548140895
e65	0 Gy	14.976.980.000	7.539.253.000	0,503389402
e66	0 Gy	38.751.461.000	13.593.444.000	0,350785329
e73	0 Gy	5.326.699.000	5.079.981.000	0,953682759
e65	3 GY	4.095.272	2.455.147	0,599507676
e65	3 GY	5.063.629	2.761.000	0,545261116
e66	3 GY	10.605.761.000	9.612.778.000	0,906373244
e73	3 GY	12.811.744.000	9.106.552.000	0,710797219
e38	10 Gy	16.011.874.000	9.677.261.000	0,604380287
e66	10 Gy	11.946.432.000	9.940.745.000	0,832109956
e73	10 Gy	21.673.727.000	8.423.854.000	0,38866661
e38	15 Gy	12.007.582.000	9.046.936.000	0,753435288
e65	15 Gy	7.102.496.000	7.184.593.000	1,011558894
e66	15 Gy	17.621.880.000	9.944.327.000	0,564317031
e73	15 Gy	8.332.876.000	5.721.887.000	0,686664124
e73	15 Gy	2.888.662.000	2.998.946.000	1,038178229

LEBENS LAUF

▪ PERSÖNLICHES

Name: Celine Katharina Schielke

▪ BILDUNGSWEG

- 04/2018 - 07/2021 **Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**
Kooperierende Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin
am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt
- *Stem Cell Differentiation and Cytogenetics Group*
Titel: „Effekte ionisierender Strahlung auf humane zerebrale
Organoide“.
- 02/2016 - 03/2018 **Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**
Studiengang Biologie
Spezialisierungen: Neurobiologie und molekulare Zellbiologie
- 31/03/2018 **Master of Science**
Masterthesis am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung
GmbH, Darmstadt - *Stem Cell Differentiation and Cytogenetics Group*
Titel: „Differenzierung von neuronalen Stammzellen in neurale
Vorläuferzellen und Neurone“.
- 10/2012 - 10/2015 **Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt am Main**
Studiengang Biowissenschaften
Spezialisierungen: Neurobiologie und Zellbiologie
- 15/07/2015 **Bachelor of Science**
Bachelorthesis am Fachbereich Psychologie - AG *Cognitive Neuroscience*
Titel: „Emotions-Kognitions-Interaktionen. Wie beeinflussen aufgaben-
irrelevante Emotionen die Präzision unseres Arbeitsgedächtnisses?“
- 2003 - 2012 **Justus-Liebig-Gymnasium in Darmstadt**
05/06/2012 **Abitur**
Leistungskurse Deutsch und Biologie

▪ **KONFERENZBEITRÄGE:**

Schielke, C., Durante, M., Ritter, S., & Schroeder, I. (2019). Ionizing radiation alters cerebral organoid generation. Young Scientists' GSI-FAIR Poster Colloquium, Darmstadt. (Poster-Präsentation; *Best Poster Award*)

Schielke, C., Durante, M., Ritter, S., & Schroeder, I. (2019). Effects of ionizing radiation on cerebral organoids. DeGBS 22nd Annual Meeting, Mannheim. (Poster-Präsentation)

Schielke, C., Durante, M., Ritter, S., & Schroeder, I. (2020). Effects of X-rays on cerebral organoid formation and neurogenesis. EMBO I EMBL Symposia: Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture - virtual. (Poster-Präsentation)

▪ **PUBLIKATIONEN:**

Schielke, C., Arrizabalaga, O., Mayer, M., Thielemann, C., Ritter, S., & Schroeder, I. (2017): Generation of neural stem cells for the analysis of radiation-induced impairment of neurogenesis and neuroregeneration-BrainRadiationAssay. *GSI-FAIR SCIENTIFIC REPORT*.

Schielke, C., Hartel, C., Durante, M., Ritter, S., & Schroeder, I. (2020). Solving the issue of ionizing radiation induced neurotoxicity by using novel cell models and state of the art accelerator facilities. *Frontiers in Physics*, 8, 417.

▪ **BETREUTE ABSCHLUSSARBEITEN:**

Nguyen, Lan Vi. (2019): Biocompatible polymer scaffolds for the optimization of differentiation protocols. (Masterarbeit, Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Ilmenau)

Knorr, Kim. (2020): Vergleich von zerebralen Organoiden mit Oligodendrozyten-Sphären auf mRNA- und Proteinebene. (Bachelorarbeit, Fachbereich Chemie- und Biotechnologie der Hochschule Darmstadt)

***„Nicht am Ziel wird der Mensch groß,
sondern auf dem Weg dorthin.“***

-Ralph Waldo Emerson