

Anlage 2

(zu Nr. 8.2 NKBF 98)

Schlussbericht zu Nr. 8.2

Projekt 50WB2025 Space_PRICE

Einfluss von physikalischen und biologischen Maßnahmen auf Strahlungs-induzierte Veränderungen des ZNS („space_PRICE“, Protection against Radiation Induced Cognitive Effects)

Laufzeit:

Wissenschaftliche Projektleiterin: Dr. Felicitas Rapp (geb. Merz)

Wissenschaftliche Gruppenmitglieder: M.Sc. Bahar Djouiai

Prof. Dr. Sonja Kallendrusch

Inhalt

1.	Kurze Darstellung zu.....	3
1.1	Aufgabenstellung.....	3
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	4
1.4.1	Neuroinflammation	5
1.4.2	Verringerung der strahleninduzierten Neuroinflammation.....	5
1.4.3	Referenzen	7
1.4.4	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	10
2.	Eingehende Darstellung	10
2.1.	der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	10
2.1.1.	Morphologische Analysen der OHSC.....	13
2.1.2.	Messung der Entzündungsreaktion mittels ELISA	16
2.1.3.	Effekte der Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten auf OHSC	16
2.1.4.	Blockierung der Rezeptoren in OHSC durch RNAi	18
2.1.5.	Einfluss von X-Ray Bestrahlung auf OHSC	18
2.1.6.	Genexpressionsanalysen der bestrahlten und behandelten OHSC.....	22
2.1.7.	Einfluss von Eisen-(Fe-) Ionen- Bestrahlung auf OHSC.....	25
2.1.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse	31
2.2.	Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	32
2.3.	Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	33
2.4.	Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	33
2.5.	Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	34
2.6.	der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11.....	35

1. Kurze Darstellung zu

1.1 Aufgabenstellung

Während bemannter Raumfahrtmissionen außerhalb des *lower earth orbits* (LEO) sind Astronauten der Weltraumstrahlung (*galactic cosmic rays*, GCR, z.B. Eisen- (Fe-), Sauerstoff- (O-) oder Titan- (Ti-) Ionen) ausgesetzt (Zeitlin & LaTessa 2016, Barcellos-Hoff et al. 2015). Zusätzlich können Sonneneruptionen (*solar particle events*, SPE) auftreten, die hauptsächlich aus Protonen bestehen (Norbury et al. 2019). Mit steigender Zeit des Aufenthalts im All wie z.B. bei einer zukünftigen Marsmission wird die Dosis dieser Strahlung steigen, so dass man das Risiko nicht mit vergangenen, relativ kurzen Missionen wie den Apollo-Missionen vergleichen kann (Durante and Bruno 2010). Meist versucht man, über Experimente mit Nagern wie Mäusen oder Ratten, Daten zu erhalten und dadurch Gefahren für Menschen abzuleiten. Abgesehen von möglichen späten Risiken wie Krebsinduktion ist es wichtig zu wissen, wie sich die Exposition durch Weltraumstrahlung auf das Hirn bzw. ZNS und damit auch die kognitiven Fähigkeiten der Astronauten auswirkt.

In diesem Projekt sollte untersucht werden, wie sich Weltraumstrahlung auf Hirngewebe auswirkt. Dazu wurden -aufbauend auf ein Vorgängerprojekt space_brain 50WB1837- organotypische Hirnschnittkulturen von Mäusen (OHSC) eingesetzt. In diesen sind alle Zelltypen wie im Hirn enthalten und verbleiben in ihrem natürlichen Zellverbund. Unser Fokus lag auf der Charakterisierung der Mikroglia-Antwort und der damit verbundenen Neuroinflammation. Mikroglia sind die speziellen Immunzellen im Hirn, die auf externe oder interne Stimuli reagieren und so die Homöostase im Hirn aufrechterhalten.

Zudem sollten zwei Wirkstoffe getestet werden, die potentiell antiinflammatorisch wirken. Diese stammen aus der Gruppe der Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten. Im Gegensatz zu anderen Wirkstoffen aus dieser Gruppe, die z.B. an CB1-Rezeptoren auf Neuronen wirken und damit psychotrop wirken, binden die von uns vorgeschlagenen Wirkstoffe nur an CB2-Rezeptoren, die hauptsächlich auf Mikroglia, peripheren Makrophagen und wenig auf Neuronen exprimiert werden, und beeinflussen somit nicht die Kognition. Durch ihre entzündungshemmende bzw. bezogen auf die Mikroglia anti-reaktive Wirkung könnten somit strahleninduzierte Schäden am Hirngewebe verhindert oder abgemildert werden.

Zusätzlich zu den neuen Fragestellungen haben wir in der aktuellen Förderperiode noch Experimente nachgeholt, die in der vergangenen Förderperiode wegen Beschleuniger-Shutdowns oder Verschiebungen nicht durchgeführt werden konnten.

Ursprünglich wollten wir in diesem Projekt weiterhin nicht nur Gewebekulturen ex vivo testen, sondern auch Mäuse bestrahlen (in vivo). Die ex vivo gefundenen Daten sollten so im Organismus bestätigt werden. In diesen Experimenten sollten auch erstmals Studien zu physikalischem Shielding als Präventionsmaßnahme gegen Weltraumstrahlung zum Einsatz kommen. Dieser Teil des Projekts war zusammen mit Prof. Chiara LaTessa (TIFPA-INFN, Trento, Italien) geplant. Da die Tierversuche jedoch nicht durchgeführt werden konnten, fiel dieser Teil leider weg.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Bei GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH in Darmstadt sind alle Voraussetzungen zur Durchführung strahlenbiologischer Experimente gegeben. Sowohl Ionenbestrahlungen verschiedenster Energien und Teilchen als auch Röntgen-Bestrahlungen als Referenzstrahlung konnten im Rahmen der Strahlzeiten durchgeführt werden. In diesem Projekt wurden die speziell für die ESA eingepplanten Strahlzeiten mit Weltraum-relevanten Ionen und -Energien genutzt.

Da die Labore bei GSI während der COVID-Pandemie sehr eingeschränkt nutzbar waren, wurden die Analysen am Institut für Anatomie, Universität Leipzig, in der Arbeitsgruppe von Prof. Ingo Bechmann durchgeführt. Dort war zunächst auch Frau Dr. Kallendrusch beschäftigt, die somit auch eine enge Betreuung von Fr. Djouiai übernehmen konnte. Nach ihrer Berufung an die Health and Medical University Potsdam zog Fr. Djouiai mit ihr dorthin und arbeitete seit 07/2022 dort an dem Projekt weiter.

Die Expertise der Projektleiterin Dr. Rapp zu Bestrahlungen von OHSC sowie deren Auswertung im Hinblick auf Zelltypen und Zelltod und die tiefgehenden Erfahrungen von Fr. Prof. Kallendrusch zu Mikroglia-Aktivierung und Cannabinoidsystem wurden in diesem Projekt kombiniert. Es fanden regelmäßig virtuelle Treffen und Projektbesprechungen statt, um das Vorgehen zu planen und später die Daten auszuwerten.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die OHSC Kulturen wurden zu Anfang des Projekts noch am Institut für Anatomie/ Leipzig hergestellt und dann nach einer kurzen Inkubationszeit zu GSI transportiert. Dies wurde aber geändert, da der Transportweg sich als zu lang herausstellte. Im Fortgang des Projekts wurden die OHSC im Georg-Speyer-Haus/ Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Fr. Dr. Lisa Sevenich hergestellt, wodurch sich der Transportweg zu GSI deutlich verkürzte und die Kulturen so geschont wurden.

Die Versuche wurden in der Abteilung Biophysik der GSI/Darmstadt durchgeführt. Sowohl die Eisen(Fe)-Ionen-Bestrahlungen als auch die Röntgenbestrahlungen, die zu Vergleichszwecken dienten, konnten dort vorgenommen werden. Später wurden zusätzliche Röntgenbestrahlungen in Leipzig durchgeführt, um Kontrollgewebe für molekulare Analysen zu erhalten.

Die Multiplex Assays wurden in der Core Facility des Fraunhofer Instituts für Zelltherapie und Immunologie (IZI) in Leipzig durchgeführt, da dort die nötige apparative Ausstattung vorhanden war. Die ELISAs wurden im Institut für Anatomie/ Leipzig durchgeführt.

RNA Seq Experimente wurden durch die Firma Azenta Genewiz/ Leipzig getätigt.

„Arbeitsgruppentreffen“ fanden wegen der räumlichen Entfernung der Projektbeteiligten virtuell über z.B. Zoom statt.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die hier angegebene Fachliteratur wurde über die gängigen Portale wie PubMed (ncbi.nlm.nih.gov/) oder Google Scholar recherchiert.

Die Einrichtungen bei GSI mit den genutzten Beschleunigern kann z.B. hier eingesehen werden: <https://www.gsi.de/work/forschung>

Die meisten Daten zur Strahlensensitivität des Hirns wurden im Zusammenhang mit Röntgen-Strahlentherapie erhoben, bei denen ein großer Teil des Hirns mit einer relativ hohen Dosis bestrahlt wurde (Mulhern et al. 2004, Crossen et al. 1994, Soria et al. 2019, Follin et al. 2019, Andrews et al. 2019, Cucinotta und Cacao 2019). Reaktionen des Hirngewebes auf Strahlung beinhalten z.B. Entzündung, mikrovaskuläre Schäden, Beeinträchtigung kognitiver Fähigkeiten oder Verringerung der neuronalen Plastizität (Zhou et al. 2017, Rola et al. 2004). Relevanter für eine Risikoabschätzung z.B. für eine Marsmission sind Studien zu Effekten von GCR, die sich in der biologischen Wirkung und auch hinsichtlich der Dosis und Größe des getroffenen Areals stark von therapeutischen Bestrahlungen

unterscheiden (Britten et al. 2014, Parihar et al. 2015, Cherry et al. 2012, Sokolova et al. 2015, Sweet et al. 2014, Raber et al. 2016). Hierbei werden Missions-relevante Dosen von ca. 5 bis 170cGy eingesetzt.

Je nach untersuchtem Modell (Ratte, Maus) und verwendeten Ionen (Eisen, Protonen) gibt es unterschiedliche Berichte über Effekte, weswegen weitere Experimente sehr wichtig sind.

1.4.1 Neuroinflammation

Aus Untersuchungen zu Strahlentherapie wird zunehmend klar, dass Entzündungsprozesse zu Schädigungen des Hirngewebes beitragen (Yoritsune et al. 2014, Li et al. 2015, Jenrow et al. 2013). Die Haupt-Entzündungszellen im Hirn werden Mikroglia genannt. Sie sind residente mononukleäre Zellen des Immunsystems, die phagozytierende und neuroprotektive Eigenschaften haben (Ginhoux et al. 2013, Kabba et al. 2017). Gesunde Mikroglia im sogenannten Ruhezustand „scannen“ im Hirngewebe mit Hilfe von vielen Fortsätzen ihre Umgebung (ramifizierter Phänotyp), wobei jede Mikroglia-Zelle ein bestimmtes Territorium abdeckt. Werden sie aktiviert, z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion, beobachtet man eine Änderung ihrer Anzahl und Form. Sie runden sich ab und reduzieren die Anzahl ihrer Fortsätze, um mobiler zu sein (amöboider Phänotyp, Kettenmann et al. 2011, Wolf et al. 2017). Tritt eine Schädigung neuronalen Gewebes auf, phagozytieren Mikroglia die beschädigten Zellen. Aber auch wenn die ursprüngliche Verletzung nur lokal und gering war, kann es zu einer weiteren Zerstörung von Gewebe durch Mikroglia kommen (Sekundärschaden). Dieser ist mit einer Entzündungsreaktion (z.B. Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine) und Zellaktivierung assoziiert, was zu anhaltenden klinischen Symptomen und Beeinträchtigungen führen kann (Blight et al. 1985; Signoretti et al. 2010, Dumont et al. 2001; Yakovlev and Faden 2004; Faden and Stoica 2007). Andererseits wurde von uns und anderen auch eine neuroprotektive Wirkung von MG beschrieben (Lalancette- Hebert et al. 2007, Streit et al. 2002, Nakajima et al. 2004, Neumann et al. 2006, Kreutz et al. 2009, Kallendrusch et al. 2013). Neuere Arbeiten zeigen auf, wie komplex die Aktivierung von Mikroglia ist und dass es nicht nur die zwei Zustände ruhend und aktiviert geben könnte (Donat et al. 2017).

Untersuchungen von Mikroglia bei *in vivo* Bestrahlungsexperimenten anderer Gruppen zeigen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der strahleninduzierten Schäden, sowohl nach Xray- (Liu et al 2022) als auch nach (weltraumrelevanten) Ionenbestrahlungen (O'Banion 2022). Ob eine Aktivierung der MG durch Wirkstoffe verhindert werden kann, wurde bislang nicht untersucht. Eine kurzfristige medikamentöse Depletion des vorhandenen Mikroglia-Pools verhinderte im Mausmodell allerdings strahlenbedingte kognitive Beeinträchtigungen (Acharya et al. 2016, Krukowski et al. 2018). Inwieweit sich diese Ergebnisse auf Astronauten und deren Schutz vor neuronalen Schäden übertragen lassen, ist zu untersuchen.

1.4.2 Verringerung der strahleninduzierten Neuroinflammation

In der vergangenen Förderperiode 2018/19 haben wir begonnen, die Auswirkungen von Bestrahlung auf die Entzündungsreaktion zu untersuchen zu testen, ob diese durch Gabe von Wirkstoffen verhindert werden kann. Hierzu haben wir Substanzen ausgewählt, die auf Rezeptoren des (Endo)cannabinoidsystems einwirken. Das Endocannabinoidsystem (ECS) besteht aus Cannabinoid-Rezeptoren, körpereigenen Liganden -den Endocannabinoiden, die zu den Lipiden gehören- und Enzymen, die diese Signalmoleküle auf und abbauen. Zu den bislang bekannten Rezeptoren gehören die CB1, CB2 und vermutlich weitere GPR55- oder GPR18-Proteine (Lu und Mackie 2016, Henstridge et al. 2012, Stella 2010, Zhou et al. 2016, McHugh et al. 2012). Auf die Rezeptoren können ebenso exogene Moleküle wie z.B. die Phytocannabinoide aus der Hanfpflanze *Cannabis sativa* einwirken (Mechoulam et al. 2013). Die bekanntesten Vertreter hierbei sind das Δ -9-THC ((-)-trans- Δ 9-tetrahydrocannabinol; THC) oder auch das Cannabidiol (CBD). Im ZNS spielt das Endocannabinoidsystem eine wichtige Rolle zur Signalübertragung und zur Beeinflussung von

Immunreaktionen (Khuja et al. 2015, Zhou et al. 2016, Ullrich et al. 2007). Im ECS kommen hauptsächlich zwei Rezeptoren (CB1 und CB2) mit ihren spezifischen Liganden vor (e.g. Mechoulam et al. 2013, Lu et al. 2016). CB1 befindet sich hauptsächlich auf Neuronen, CB2 auf Zellen, die dem Immunsystem angehören, also auch Mikroglia; vor allem im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Über eine weitere Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPR), darunter auch GPR55, wird derzeit diskutiert, ob sie ebenfalls zum Endocannabinoidsystem gezählt werden sollten. GPR55 wurde bereits in Hirngewebe und auf Mikroglia nachgewiesen (Kallendrusch et al. 2013, Malek et al. 2015).

Auch CB2- Rezeptor (R)- Agonisten (Abb. 1) zeigen keine psychotrope Wirkung und die damit verbundenen negativen Effekte. Es wurde bereits gezeigt, dass Depressionen bei chronischem Schmerz in Ratten gemildert wurden (Doan et al. 2015). Bei neurodegenerativen oder neuroinflammatorischen Krankheiten wie der Alzheimer'schen Krankheit, Multipler Sklerose (MS) oder Huntington's Chorea werden Wirkungen derzeit auf einem klinischen Level geprüft (Morales et al. 2016). Ein kürzlich entwickelter CB2R-Agonist, Gp1a ((N-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methylindeno [1,2-c]pyrazole-3-carboxamide), Abb. 1) wurde in einem experimentellen MS- Modell angewendet und führte zu einer verringerten Einwanderung von Immunzellen sowie einer reduzierten Mikroglia-Aktivierung (Kong et al. 2014).

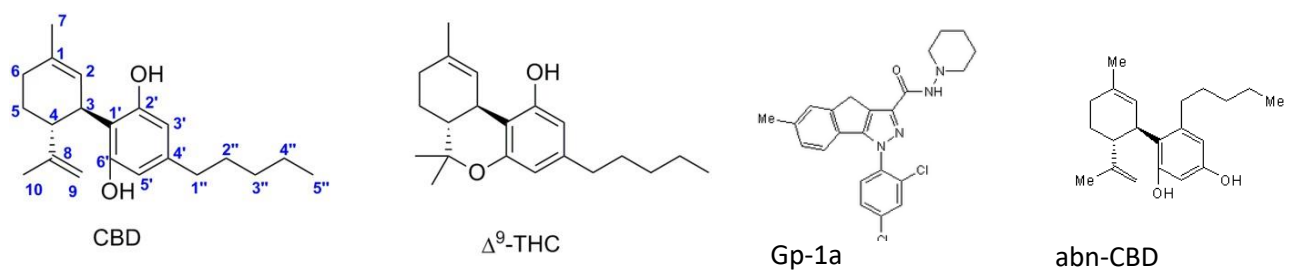


Abb. 1: Struktur der Cannabinoide CBD (Cannabidiol), THC (Δ^9 -THC ((-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Morales et al. 2017) sowie des CB2R-Antagonisten Gp1a und GPR55-Agonisten abn-CBD (abnormal Cannabidiol) (Website Tocris).

Diese Vorarbeiten haben uns bestärkt, GPR55- bzw.- CB2R-Agonisten in Bestrahlungs-Experimenten zu testen und eine mögliche positive Wirkung für Astronauten zu ermitteln. Eine durch Strahlung hervorgerufene Neuroinflammation könnte durch die Wirkstoffe abgemildert werden. Im Gegensatz zu einer kompletten Mikroglia-Depletion nach Einmalbestrahlung könnte sich dieser Ansatz bei einer längerfristigen Strahlen-Exposition wie auf der Marsmission eventuell besser zur Prävention eignen.

Zunächst wurde die Bestrahlungsmodalität verändert, um eine Weltraum-relevante Bestrahlung



besser zu simulieren (Abb. 2). Bislang wurden die Slices horizontal (also teilweise hintereinander liegend) bestrahlt, mit dem jetzt angewendeten System kann die Platte aufrecht gestellt werden und die Slices vertikal (also alle auf gleicher Höhe) bestrahlt werden. Das Tränken von steriler Gaze ermöglicht eine Versorgung der Gewebe mit Medium und verhindert gleichzeitig ein Auslaufen des Mediums, was gerade bei der Bestrahlung von genetisch veränderten Mausegeweben sicherheitstechnisch essentiell ist.

Abb. 2: Neu etabliertes Setup für Weltraum-relevante Experimente, bei dem Platten stehend bestrahlt werden.

Anschließend werden zu bestimmten Zeitpunkten Mediumproben genommen und die OHSC nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Danach können sie weiter analysiert werden, z.B. mit immunhistochemischen Färbungen zur Identifizierung von Zelltypen (s. Abb. 3).

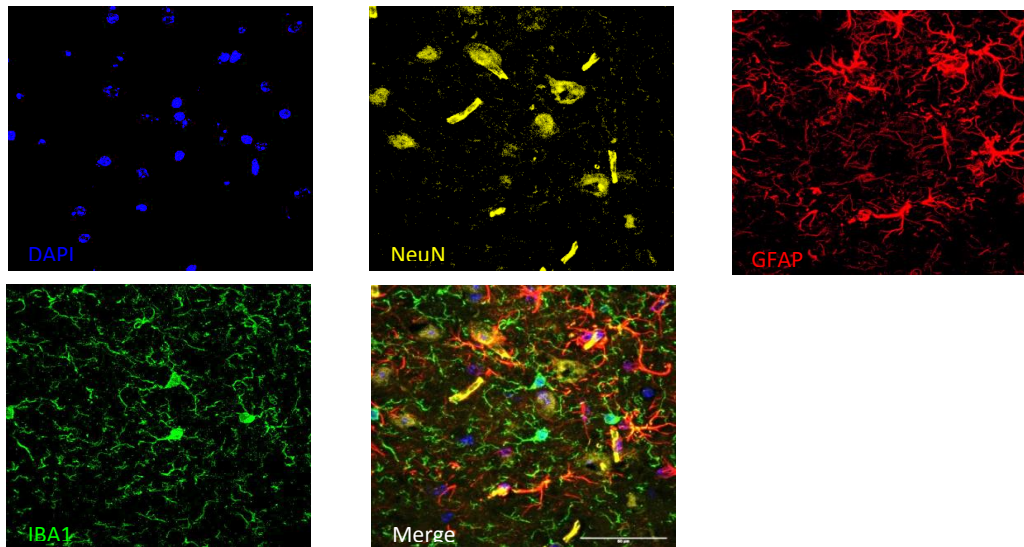


Abb. 3: Immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Mikroglia mit dem Marker IBA-1 (grün), Astrozyten mit dem Marker GFAP (rot), Neurone mit dem Marker NeuN (gelb).

Zusätzlich zu den morphologischen Untersuchungen mittels Antikörperfärbungen haben wir begonnen, die Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand zu messen, um Entzündungsreaktionen quantifizieren zu können. Dazu wurden während der gesamten Kultivierungszeit des Experiments mit Eisen-Ionen sowie während des ersten Röntgen-Experiments Überstände gesammelt und eingefroren. Die erste Messung wurde an einer speziell hergestellten Multiplex-Platte durchgeführt, in der 14 durch Literaturdaten beschriebene Zytokine kombiniert wurden. Nicht alle wurden in unseren Proben auch wiedergefunden, aber einige Marker wie IL-18, IL-10 und MIP1a konnten behandlungsabhängig detektiert werden.

1.4.3 Referenzen

- Acharya MM, Green KN, Allen BD, Najafi AR, Syage A, Minasyan H, Le MT, Kawashita T, Giedzinski E, Parihar VK, West BL, Baulch JE, Limoli CL. Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation. *Sci Rep*. 2016 Aug 12;6:31545. doi: 10.1038/srep31545.
- Andrews RN, Dugan GO, Peiffer AM, Hawkins GA, Hanbury DB, Bourland JD, Hampson RE, Deadwyler SA, Clinea JM. White Matter is the Predilection Site of Late-Delayed Radiation-Induced Brain Injury in Non-Human Primates. *Radiat Res*. 2019 Mar;191(3):217-231. doi: 10.1667/RR15263.1.
- Blight, A. R. (1985). "Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury." *Cent Nerv Syst Trauma* 2(4): 299-315.
- Britten RA, Davis LK, Jewell JS, Miller VD, Hadley MM, Sanford LD, Machida M, Lonart G. Exposure to mission relevant doses of 1 GeV/Nucleon (56)Fe particles leads to impairment of attentional set-shifting performance in socially mature rats. *Radiat Res*. 2014 Sep;182(3):292-8. doi: 10.1667/RR3766.1.
- Cherry JD, Liu B, Frost JL, Lemere CA, Williams JP, Olschowka JA, O'Banion MK. Galactic cosmic radiation leads to cognitive impairment and increased β plaque accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(12):e53275. doi: 10.1371/journal.pone.0053275.
- Crossen JR, Garwood D, Glatstein E, and Neuwelt EA. Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy. *J Clin Oncol*.1994; 12: 627-42.
- Cucinotta FA, Cacao E. Risks of cognitive detriments after low dose heavy ion and proton exposures. *Int J Radiat Biol*. 2019 Jul; 95(7):985-998.
- Doan L, Manders T, Wang J. Neuroplasticity underlying the comorbidity of pain and depression. *Neural Plast* 2015;504691

Donat C, Scott G, Gentleman S, Sastre M. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury Front. Aging Neurosci. 28 June 2017 <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00208>

Dumont, R. J., D. O. Okonkwo, et al. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. Clin Neuropharmacol 24(5): 254-264.

Faden, A. I. and B. Stoica (2007). Neuroprotection: challenges and opportunities. Arch Neurol 64(6): 794-800.

Follin C, Svärd D, van Westen D, Björkman-Burtscher IM, Sundgren PC, Fjalldal S, Lätt J, Nilsson M, Johanson A, Erfurth EM. Microstructural white matter alterations associated to neurocognitive deficits in childhood leukemia survivors treated with cranial radiotherapy - a diffusional kurtosis study. Acta Oncol. 2019 Jul;58(7):1021-1028. doi: 10.1080/0284186X.2019.1571279.

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. Front Cell Neurosci. 2013 Apr 17;7:45.

Henstridge CM Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55. Pharmacology. 2012;89(3-4):179-87. doi: 10.1159/000336872

Jenrow KA, Brown SL, Lapanowski K, Naei H, Kolozsvary A, Kim JH. Selective inhibition of microglia-mediated neuroinflammation mitigates radiation-induced cognitive impairment. Radiat Res. 2013 May;179(5):549-56. doi: 10.1667/RR3026.1.

Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y, Zhang L, Saavedra JM, Pang T. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. Cell Mol Neurobiol. 2017 May 22.

Kallendrusch S, Kremzow S, Nowicki M, Grabiec U, Winkelmann R, Benz A, Kraft R, Bechmann I, Dehghani F, Koch M. The G protein-coupled receptor 55 ligand I- α -lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. Glia. 2013 Nov;61(11):1822-31. doi: 10.1002/glia.22560

Kallendrusch S, Merz F, Bechmann I, Mayr SG, Zink M. Long-Term Tissue Culture of Adult Brain and Spleen Slices on Nanostructured Scaffolds. Adv Healthc Mater. 2017 May;6(9). doi: 10.1002/adhm.201601336

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. Physiol Rev. 2011 Apr;91(2):461-553.

Khuja I, Yekhtin Z, Or R, Almogi-Hazan O. Cannabinoids Reduce Inflammation but Inhibit Lymphocyte Recovery in Murine Models of Bone Marrow Transplantation. Int J Mol Sci. 2019 Feb 4;20(3). pii: E668. doi: 10.3390/ijms20030668.

Kong W, Li H, Tuma RF, Ganea D. Selective CB2 receptor activation ameliorates EAE by reducing Th17 differentiation and immune cell accumulation in the CNS. Cell Immunol. 2014 Jan;287(1):1-17. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.11.002.

Kreutz, S, [Böttger C](#), [Ghadban C](#), [Korf HW](#), [Dehghani F](#), 2-Arachidonoylglycerol elicits neuroprotective effects on excitotoxically lesioned dentate gyrus granule cells via abnormal-cannabidiol-sensitive receptors on microglial cells. Glia 2009 57(3): 286-294.

Krukowski K, Feng X, Paladini MS, Chou A, Sacramento K, Grue K, Riparip LK, Jones T, Campbell-Beachler M, Nelson G, Rosi S. Temporary microglia-depletion after cosmic radiation modifies phagocytic activity and prevents cognitive deficits. Sci Rep. 2018 May 18;8(1):7857. doi: 10.1038/s41598-018-26039-7.

Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. J Neurosci (2007) 27(10):2596–605. doi:10.1523/JNEUROSCI.5360-06.2007

Li MD, Burns TC, Kumar S, Morgan AA, Sloan SA, Palmer TD. Aging-like changes in the transcriptome of irradiated microglia. Glia. 2015 May;63(5):754-67. doi: 10.1002/glia.22782.

Liu Q, Huang Y, Duan M, Yang Q, Ren B, Tang F. Microglia as Therapeutic Target for Radiation-Induced Brain Injury. Int J Mol Sci. 2022 Jul 27;23(15):8286. doi: 10.3390/ijms23158286.

Lu HC, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. Biol Psychiatry. 2016 Apr 1;79(7):516-25. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.028

Malek N, Popiolek-Barczyk K, Mika J, Przewlocka B, Starowicz K. Anandamide, Acting via CB2 Receptors, Alleviates LPS-Induced Neuroinflammation in Rat Primary Microglial Cultures. Neural Plast. 2015;2015:130639. doi: 10.1155/2015/130639.

McHugh D. GPR18 in microglia: implications for the CNS and endocannabinoid system signalling. Br J Pharmacol. 2012 Dec;167(8):1575-82. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02019.x.

Mechoulam R, Parker LA. The endocannabinoid system and the brain. Annu Rev Psychol. 2013;64:21-47. doi: 10.1146/annurev-psych-113011-143739.

Morales P, Hernandez-Folgado L, Goya P, Jagerovic N. Cannabinoid receptor 2 (CB2) agonists and antagonists: a patent update. Expert Opin Ther Pat. 2016 Jul;26(7):843-56. doi: 10.1080/13543776.2016.1193157.

Mulhern RK, Merchant TE, Gajjar A, Reddick WE, and Kun LE. Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood. Lancet Oncol. 2004; 5: 399-408.

Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* (2004) 4(1):65–84. doi:10.2174/1568006043481284

Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* (2006) 20(6):714–6. doi:10.1096/fj.05-4882fje

O'Banion MK. Microglia: Rheostats of space radiation effects in the CNS microenvironment. *Life Sci Space Res (Amst)*. 2022 Nov;35:180-186. doi: 10.1016/j.lssr.2022.08.002.

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 Mar;220(2):1161-71. doi: 10.1007/s00429-014-0709-9.

Parihar VK, Allen B, Tran KK, Macaraeg TG, Chu EM, Kwok SF, Chmielewski NN, Craver BM, Baulch JE, Acharya MM, Cucinotta FA, Limoli CL. What happens to your brain on the way to Mars. *Sci Adv*. 2015 May 1;1(4). pii: e1400256.

Raber J, Weber SJ, Kronenberg A, Turker MS. Sex- and dose-dependent effects of calcium ion irradiation on behavioral performance of B6D2F1 mice during contextual fear conditioning training. *Life Sci Space Res (Amst)*. 2016 Jun;9:56-61. doi: 10.1016/j.lssr.2016.03.002.

Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg SR, Morhardt DR, and Fike JR. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol*. 2004; 188: 316-30.

Signoretti S, Vagnozzi R, Tavazzi B, Lazzarino G, (2010). Biochemical and neurochemical sequelae following mild traumatic brain injury: summary of experimental data and clinical implications. *Neurosurg Focus* 29(5): E1.

Sokolova IV, Schneider CJ, Bezaire M, Soltész I, Vlkolinsky R, Nelson GA. Proton radiation alters intrinsic and synaptic properties of CA1 pyramidal neurons of the mouse hippocampus. *Radiat Res*. 2015 Feb;183(2):208-18. doi: 10.1667/RR13785.1.

Soria B, Martin-Montalvo A, Aguilera Y, Mellado-Damas N, López-Beas J, Herrera-Herrera I, López E, Barcia JA, Alvarez-Dolado M, Hmadcha A, Capilla-González V. Human Mesenchymal Stem Cells Prevent Neurological Complications of Radiotherapy. *Front Cell Neurosci*. 2019 May 16;13:204. doi: 10.3389/fncel.2019.00204

Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*. 2010 Jul;58(9):1017-30. doi: 10.1002/glia.20983.

Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* (2002) 40(2):133–9. doi:10.1002/glia.10154

Sweet TB, Panda N, Hein AM, Das SL, Hurley SD, Olschowka JA, Williams JP, O'Banion MK. Central nervous system effects of whole-body proton irradiation. *Radiat Res*. 2014 Jul;182(1):18-34. doi: 10.1667/RR13699.1.

Ullrich O, Merker K, Timm J, Tauber S. Immune control by endocannabinoids - new mechanisms of neuroprotection? *J Neuroimmunol*. 2007 Mar;184(1-2):127-35.

Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79:619-643.

Yakovlev, A. G. and A. I. Faden (2004). Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx* 1(1): 5-16.

Yoritsune E, Furuse M, Kuwabara H, Miyata T, Nonoguchi N, Kawabata S, Hayasaki H, Kuroiwa T, Ono K, Shibayama Y, Miyatake S. Inflammation as well as angiogenesis may participate in the pathophysiology of brain radiation necrosis. *J Radiat Res*. 2014 Jul;55(4):803-11. doi: 10.1093/jrr/rru017.

Zhou J, Burkovskiy I, Yang H, Sardinha J, Lehmann C. CB2 and GPR55 Receptors as Therapeutic Targets for Systemic Immune Dysregulation. *Front Pharmacol*. 2016 Aug 22;7:264. doi: 10.3389/fphar.2016.00264.

Zhou K, Boström M, Ek CJ, Li T, Xie C, Xu Y, Sun Y, Blomgren K, Zhu C, Radiation induces progenitor cell death, microglia activation, and blood- brain barrier damage in the juvenile rat cerebellum. *Sci. Rep.* 7, 46181; doi: 10.1038/srep46181 (2017).

1.4.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Prof. Dr. Sonja Kallendrusch, Institut für Anatomie, Universität Leipzig
Seit Oktober 2020 Health and Medical University (Potsdam) https://www.health-and-medical-university.de/Team_Fakult%C3%A4t_Medizin/ (Betreuung und fachliche Expertise zum Thema Mikroglia und Neuroinflammation)

Prof. Dr. Lisa Sevenich, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

Dr. Karsten Winter, Institut für Anatomie, Universität Leipzig (Bildverarbeitung und semi-automatisierte Analysen)

Core Facility des Fraunhofer Instituts für Zelltherapie und Immunologie (IZI) in Leipzig (Multiplex ELISAs)

(Prof. Chiara LaTessa, TIFPA-INFN, Trento, Italien; Projektplanung)

2. Eingehende Darstellung

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

Personalmittel waren für eine Doktorandenstelle (50%) beantragt. Diese wurde von Fr. Bahar Djouiai besetzt, die bereits im Vorgängerprojekt (50WB1837, space_brain) mit den Arbeiten begonnen hatte. Aufgrund von Richtlinien für DoktorandInnen seitens GSI durfte die Doktorarbeit nur bis 30.6.2022 (insgesamt 3,5 Jahre) bezahlt werden. Die genaue Aufstellung findet sich in Kap. 2.2.

Fr. Djouiai konnte aber im Anschluss eine Stelle am Institut von Fr. Prof. Kallendrusch antreten, die an die Health and Medical University Potsdam berufen wurde. Hierdurch wurden die Betreuung und Weiterarbeit am Projekt gesichert. Somit wurden die Analysen und Auswertungen auch nach der offiziellen „Doktoranden-Zeit“ bei GSI weiterverfolgt. Sowohl Fr. Djouiai als auch Fr. Dr. Rapp haben seitdem einen Gastwissenschaftler-Vertrag mit GSI, um weiterhin Zugang zu Servern u.ä. zu haben. Auch die Betreuung der Doktorarbeit durch den Doktorvater Prof. Marco Durante ist weiterhin aktiv. Fr. Dr. Rapp wechselte zum 15.1.2022 den Arbeitgeber und ist seitdem an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, Klinik für Hämatologie und Onkologie, tätig. Die Betreuung der Doktorarbeit und Besprechung der Daten je nach Stand der Analysen wurde und wird durch regelmäßige Videokonferenzen mit den Projektbeteiligten sichergestellt.

Neben den personellen Anpassungen waren aufgrund verschiedener Faktoren erhebliche weitere Änderungen am Projektplan notwendig. Diese waren in der Hauptsache:

- 1) die seit April 2020 in Kraft getretenen Einschränkungen durch die COVID-Pandemie
- 2) die aus organisatorischen Gründen notwendig gewordene Streichung der in vivo Experimente und Verhaltenstests

Wegen der COVID-Pandemie wurde der Zugang zu den Laboren bei GSI erheblich eingeschränkt bzw. auf kurze Präsenzzeiten beschränkt. Dies machte es unmöglich, z.B. Mikroskopanalysen mittels CLSM für alle Proben der Experimente durchzuführen. Dies konnte umgangen werden, indem die Proben am Institut für Anatomie der Universität Leipzig analysiert wurden. Frau Djouiai arbeitete dort seit September 2020 (während der Elternzeit von Fr. Rapp), da dort sowohl die persönliche Betreuung als auch alle notwendigen Geräte und Infrastruktur vorhanden waren (konfokales Mikroskop, Anbindung

an Tierexperimentelles Zentrum, Anbindung zu Fraunhofer Institut mit Core Facility für Multiplex ELISAs usw.).

Für die Durchführung des aktuellen Projekts wurden uns vor der Beantragung seitens GSI zugesichert, dass die Möglichkeiten zur Haltung und Bestrahlung von Mäusen sowie die Räumlichkeiten für die ursprünglich geplanten kognitiven Test zeitnah entstehen würden. Als sich diese verzögerten, wurde von uns vorgeschlagen, eine Kooperation mit einer Arbeitsgruppe an der TU Darmstadt oder im Industriepark Frankfurt-Höchst zu beginnen. Diese hätten ebenfalls die nötige Infrastruktur zur Verfügung gestellt, es wurde uns aber wieder seitens der Abteilung Biophysik kommuniziert, dass die Experimente lieber komplett bei GSI bleiben sollten, trotz der entstehenden Verzögerung. Die Räumlichkeiten wurden letztendlich erst nach dem Ende der Projektlaufzeit in Betrieb genommen, so dass im Rahmen dieses Projekts die *in vivo* Bestrahlungen und Verhaltenstests nicht möglich waren.

Da die *in vivo* Experimente nicht durchgeführt werden konnten, planen wir die gewonnenen Kapazitäten für eine detailliertere, molekular basierte Analyse der Slice (*ex vivo*)- Experimente zu nutzen.

Es wurde eine dritte Eisen- (Fe)-Strahlzeit (statt der geplanten zwei) mit Slices durchgeführt, um eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse zu erhalten. Zusätzlich zu den geplanten morphologischen Auswertungen wurden tiefergehende Analysen gestartet. Hierzu gehören Zytokin-Messungen mittels Multiplex-ELISAs, die in einem Arbeitsschritt mehrere Zytokine in einer Probe erfassen können (in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut IZI, Leipzig). Leider konnten -trotz intensiver Beratung, Hands-on Training und Troubleshooting seitens des Herstellers- keine Daten aus diesen Messungen generiert werden. In Konsequenz daraus wurden einzelne wichtige Analyte wie IL-6 und IL-10 mittels Einzel-ELISAs bestimmt.

Auch wurden zusätzliche Experimente mit Slice-Kulturen durchgeführt, bei denen die Expression der relevanten Rezeptor-Typen, an die unsere Testsubstanzen vermutlich binden, geblockt wurde (siRNA knockdown). Hierbei sollte gezeigt werden, dass die Testsubstanzen spezifisch an die Rezeptoren binden. Dies sind völlig neuartige Erkenntnisse, die bislang nicht publiziert wurden. Sowohl für die Multiplex-Analysen als auch für den siRNA-knockdown waren umfangreiche Vorarbeiten notwendig, da wegen mangelnder verfügbarer Literatur sehr viel Eigenarbeit, z.B. für das Primerdesign, eingesetzt werden musste. Derzeit planen wir ein RNA-Sequencing (NGS) der knockdown-Proben, um möglichst viel Informationen über die Wirkung von Bestrahlung und Behandlung mit Testsubstanzen mit oder ohne Rezeptor-knockdown erhalten zu können. Dies wurde über eine Firma extern (Azenta Genewiz) getätigt, da sowohl die Herstellung/ Messung der RNA Bibliotheken als auch die bioinformatische Auswertung durch Spezialisten getätigt werden muss.

Auch die Reisekosten konnten nicht wie ursprünglich geplant verwendet werden, da viele Kongresse während der Pandemie ausfielen oder virtuell abgehalten wurden.

Eine Aufstellung der Sach- und Reisekosten findet sich ebenfalls in Kap. 2.2.

Zusätzlich wurden im Rahmen der ersten morphologischen Analysen kontinuierlich weitere Aspekte eingearbeitet, z.B. durch Aufnahme von tiefergehenden Klassifizierungen der Mikroglia in Slices oder der Einbeziehung durch *machine learning*- Methoden zur Vermeidung von Bias durch den Auswertenden. Auch die Färbemethoden wurden verfeinert und erweitert, z.B. durch Einbeziehung von Zelltod mittels PI-Färbung. Dies alles dient dazu, möglichst viele Informationen aus den erhaltenen Proben zu gewinnen und mindestens eine Publikation(en) zu erzielen, auf deren Basis weiter an möglichen Gegenmaßnahmen zur Risikominimierung bei der Raumfahrt geforscht werden kann.

Eine genaue Aufstellung der ursprünglich geplanten Meilensteine und die Änderungen sind im Folgenden aufgeführt.

- Ursprüngliche Planung:

2020

<u>Task</u>	<u>eingehalten</u>	<u>Kommentar</u>
Fe Strahlzeit 2 (Slices)	ja	
Auswertung Fe 2	Verzögert, aber mittlerweile abgeschlossen	Auswertungen wurden erweitert, s. unten
H+ Strahlzeit 1? (Slices) (unter Vorbehalt der Verfügbarkeit)	nein	Wurde nicht angeboten
Einreichung TVA	ja	
Röntgen Exp 3 (Xray 3, Slices)	Ja	
Auswertung Xray 3	Verzögert, aber mittlerweile abgeschlossen	Auswertungen wurden erweitert, s. unten
Genehmigung TVA		Rückfragen wurden bearbeitet

2021

<u>Task</u>	<u>eingehalten</u>	<u>Kommentar</u>
Auswertung Xray 3 (cont)	Verzögert, aber mittlerweile abgeschlossen	Auswertungen wurden erweitert, s. unten
Fe Strahlzeit 1 (Mäuse)	nein	Experimente mit Mäusen wegen Verzögerung der Animal Facility verschoben
Publikation eingereicht (Slices)	nein	Ergebnisse noch nicht vollständig

2022

<u>Task</u>	<u>eingehalten</u>	<u>Kommentar</u>
H+ Strahlzeit 1 (Mäuse)	nein	Experimente mit Mäusen wegen Verzögerung der Animal Facility abgesagt
Aufbereitung der Daten/ Mäuse/ Verhalten, Entscheidung über Notwendigkeit der Wiederholung der Versuche oder Aufbereitung zur Publikation	nein	Nicht mehr anwendbar

- Geändertes Arbeitsprogramm:

2021

<u>Task</u>	<u>Beendet/ in Arbeit</u>	<u>Kommentar</u>
Fe Strahlzeit 3 (Slices)	ja	Für einen vollständigen Datensatz/Verbesserung der Statistik für die Analyse wurde ein 3. Experiment mit Slices durchgeführt
Xray	ja	Experiment wurde analog zu Fe Versuchen aufgebaut (Referenzstrahlung); zusätzliche Experimente für Etablierung weiterer Marker (z.B. Zelltod, RNA knockdown)
Multiplex ELISAs Zytokine/ Etablierung	ja	Zur detaillierteren Analyse der inflammatorischen Vorgänge in den (bestrahlten/behandelten) Slices wurden ELISA-Analysen ergänzt, die die Messung mehrerer Zytokine in einer Probe ermöglichen
siRNA Experimente/ Vorbereitung	ja	Zur genaueren molekularen Analyse der Beteiligung der vermuteten Rezeptoren wurden knockdown-Experimente mit Slices durchgeführt
TVA Bearbeitung Rückfragen	nein	TVA wurde gestoppt

2022

<u>Task</u>	<u>Beendet/ in Arbeit</u>	<u>Kommentar</u>
Multiplex ELISAs Zytokine	ja	Zur detaillierteren Analyse der inflammatorischen Vorgänge in den (bestrahlten/behandelten) Slices wurden ELISA-Analysen ergänzt, die die Messung mehrerer Zytokine in einer Probe ermöglichen; führte aber zu keinen Ergebnissen
siRNA Experimente	ja	Zur genaueren molekularen Analyse der Beteiligung der vermuteten Rezeptoren wurden knockdown-Experimente mit Slices durchgeführt
RNASeq Analysen	ja	RNA Seq Experimente wurden vorbereitet und über eine externe Firma durchgeführt
ELISA Zytokine	ja	Da die Multiplex Analyse scheinbar nicht funktioniert, werden einzelne Zytokine mittels Einzel-Analyt-ELISA geprüft
Beendigung der Doktorarbeit B. Djouai	geplant	Vertrag lief zum 30.6.2022 aus; danach noch weitere Analysen und Datenauswertungen im Rahmen der Tätigkeit an der HMU Potsdam
Publikation(en)	geplant	Sobald die Ergebnisse vollständig sind, wird/werden das/die Manuskripte geschrieben

2.1.1. Morphologische Analysen der OHSC

Die verwendeten OHSC wurden intensiv bezüglich ihrer morphologischen Parameter charakterisiert. Vor einem Experiment wurden OHSC lichtmikroskopisch geprüft und schadhafte (z.B. ausgedünnte oder nekrotische) aussortiert. Zu den Parametern zählten z.B. Gesamtzellzahl (Kernfärbung/DNA mittels DAPI) und Anzahl toter Zellen (PI Färbung). Dies ist sehr wichtig, um statistische Aussagen zu ermöglichen. Nach Eisen(Fe-) Ionen Bestrahlung ergab sich ein Unterschied nur am längsten untersuchten Zeitpunkt von 29 d (696h, Abb. 4).

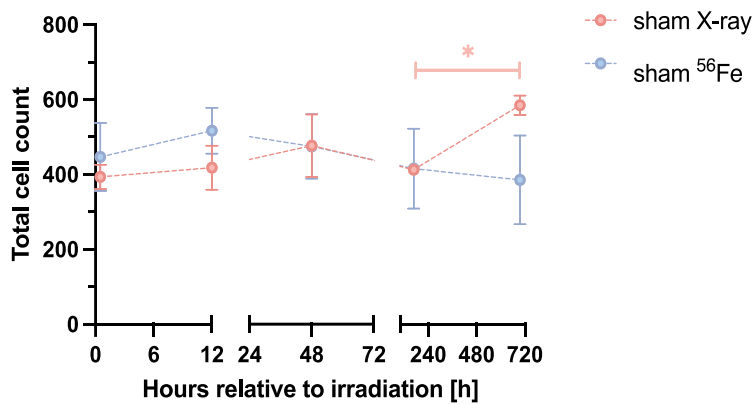


Abb. 4: **Absolut cell number in the dentate gyrus region of OHSC after sham irradiation (X-ray or ⁵⁶Fe).** Cell numbers were determined by DAPI staining (cell nucleus) of 350 μ m whole mount OHSCs and images were taken with an Olympus confocal microscope and analyzed in ImageJ/Fiji. Error bars depict mean with SEM. N = 3, I = 3, s = 9. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing sham Fe to sham X-ray samples at same experimental time points and additionally comparing between the time point within the individual conditions. *p = 0.01

Um die zelluläre Zusammensetzung der Slices zu quantifizieren, wurden immunhistochemische Färbemethoden eingesetzt, deren Etablierung in den Zwischenberichten im Detail beschrieben wurde. Insbesondere die Mikroglia waren für uns von Bedeutung, aber auch die anderen Zellen wie Neurone oder Astrozyten wurden identifiziert. Hierfür wurden zunächst 10 μ m dünne Kryoschnitte der Sliceulturen angefertigt und diese dann gefärbt und mittels CLSM aufgenommen (Abb. 5).

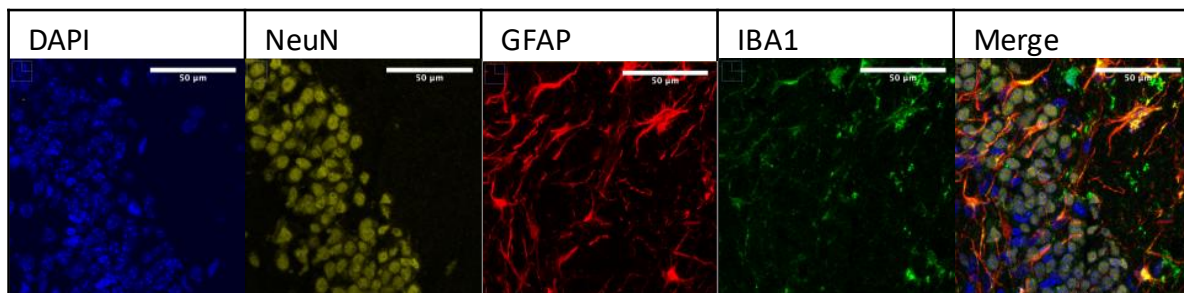


Abb. 5: **Immunofluorescent staining of relevant cell types in murine OHSC.** OHSC cryo-sections with a layer thickness of 10 μ m and immunofluorescence staining with an antibody mix containing: DAPI staining (cells nuclei, blue), NeuN (adult neuronal cell bodies, yellow), GFAP (astrocytes, red) and IBA1 (microglia, green). Images were taken with a Leica Microscope at 40x nominal magnification and a zoom of 1,5. Scale bar represents 50 μ m.

Da aber im Projektverlauf klar wurde, dass die dreidimensionale Vernetzung der Mikroglia mit diesen (zu dünnen) Schnitten nicht mehr dargestellt werden konnte, wurde die Analysemethode geändert. Die Mikroglia wurden von da an in den ganzen OHSC mit Hilfe eines fluoreszenz-markierten Lektins, IB4, aus der Pflanze *Griffonia simplicifolia* angefärbt. Dieses Lektin bindet spezifisch an Oberflächenproteine der Mikroglia, aber auch an Endothelzellen der Blutgefäße. Dies ist in Abb. 6 gezeigt. Für die Analyse der Mikroglia wurden deshalb nur Aufnahmen an Stellen ohne Blutgefäße gemacht, um später eine semi-automatisierte Analyse zu ermöglichen. Bitte die unterschiedlichen Maßstäbe beachten.

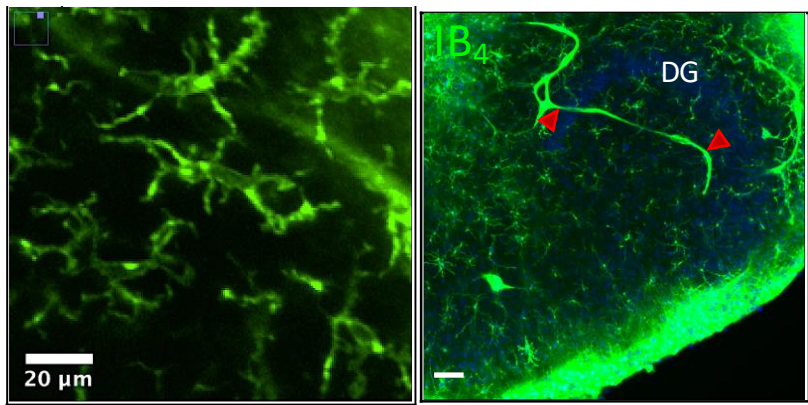


Abb. 6: IB4 staining (microglia, green) in whole mount OHSCs (dentate gyrus) to visualize microglia. The images represent a maximum projection of a total stack thickness of 28 μm . Images were captured using a Leica or Olympus confocal microscope and were overlaid in ImageJ, and the scale is indicated as 20 μm (left). The co-stained blood vessels traverse all relevant hippocampal regions and have a similar color intensity as microglial cells. The red arrows indicate blood vessels that

are incised differently (transversely or longitudinally). Scale is set to 50 μm (right).

Im Anschluss an die konfokalen Aufnahmen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Karsten Winter, Institut für Anatomie, Universität Leipzig, eine Methode entwickelt, die Mikroglia über semi-automatische Bildverarbeitung zu klassifizieren. Die momentan gängigen Parameter zur Einteilung von Mikroglia in ramifiziert, reaktiv und amöboid wurden angewendet (Leyh J, Paeschke S, Mages B, Michalski D, Nowicki M, Bechmann I, Winter K. *Front Cell Neurosci.* 2021 Jun 29;15:701673. doi: 10.3389/fncel.2021.701673.). Hierzu wurden Soma-Fläche (Zellkörper), Anzahl der primären Äste und territoriale Fläche in 5 MG pro „Region of Interest, ROI“ erfasst. Ein Farbschema zur Darstellung der drei Klassen wurde angewendet (ramifiziert: blau; reaktiv: grün; amöboid: rot). Für jede Klasse wurde ein Centroid-Wert berechnet (Median-Wert, schwarzer Punkt im Graph). Danach wurde eine „Nearest Centroid, NC“-Klassifizierung vorgenommen, basierend auf der Distanz der Parameter-Werte zu allen drei Klassen-Centroiden. Diese NC Cluster sind in Abb. 7 C und D dargestellt. In der dreidimensionalen Darstellung wird deutlich, dass alle drei Parameter zu einer eindeutigen Zuordnung notwendig sind.

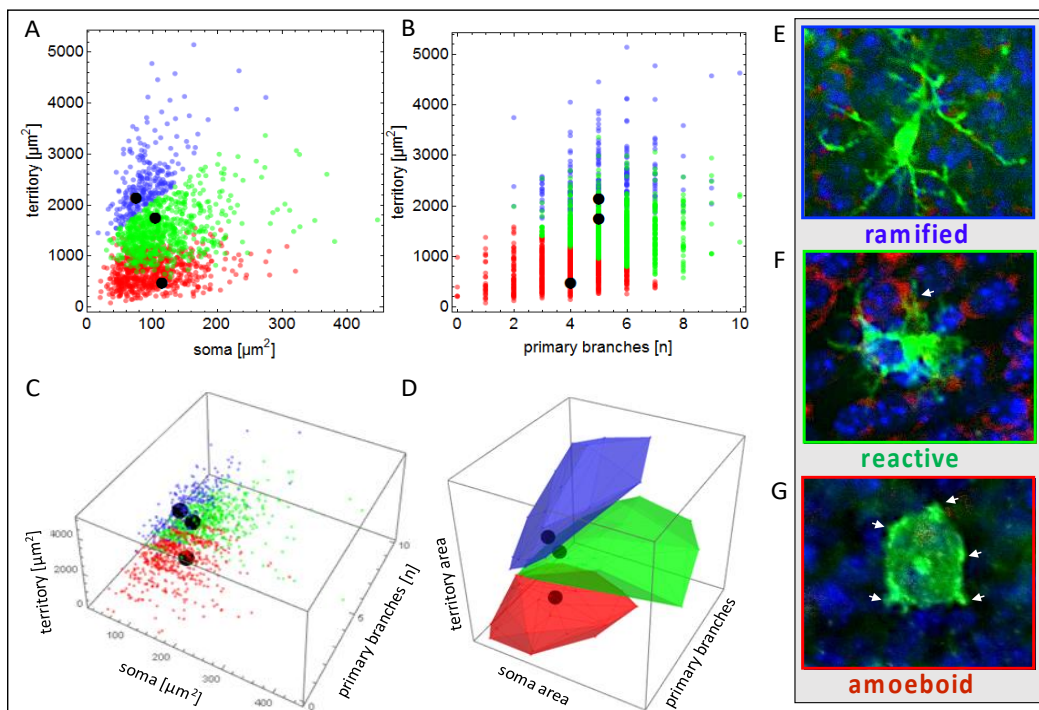


Abb. 7: Nearest centroid analysis of 1647 microglia cells with parameter combinations for differentiation of morphological microglia classes. Scatter plots with respective class centroids (black dots) of all manually selected cells (A, B). 3D representation of all three morphological parameters as scatter plot (C) or 3D cloud (D). Example images of (E) ramified, (F) reactive and (G) amoeboid microglia from immunofluorescent images.

In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Werte zusammengefasst:

Class name	Soma area [μm^2]	Territory area [μm^2]	Primary branches
Ramified	76.438	2152.374	5
Reactive	105.694	1751.998	5
Amoeboid	115.508	408.705	4

Diese Auswertung ist neuartig. Da sie von vielen ForscherInnen, die sich mit Mikroglia-Analysen in verschiedensten Fragestellungen befassen, genutzt werden kann, planen wir diese Daten in Zusammenarbeit mit Dr. Karsten Winter zu publizieren.

2.1.2. Messung der Entzündungsreaktion mittels ELISA

Die eigentlich geplante Messung mehrerer Zytokine und Entzündungsmarker in einer Probe mittels Multiplex-ELISA war leider auch nach hohem Aufwand für eine Etablierung nicht möglich. Eventuell war die Konzentration der Marker trotz der Zusicherungen des Herstellers (Merck Millipore) und Verwendung von High Sensitivity Kits zu niedrig. Aufgrund der Messungen mit den Milliplex Kits wurden für die folgenden Analysen mit Einzel-ELISAs die Zytokine IL-4 und IL-6 ausgesucht. Auch hier wurden nur bei IL-6 Werte sicher über der Nachweisgrenze gemessen, so dass nur diese Werte analysiert werden können. In der folgenden Abbildung (Abb. 8) ist ein Vergleich der unbestrahlten Slice-Kulturen dargestellt, die in je einem X-ray- und einem Fe-Ionen-Experiment verwendet wurden, um einen Basis-Entzündungswert zu erhalten, der eventuell auf Langzeit-Kultivierungseffekte zurückzuführen ist. Die Werte sind insgesamt auf einem sehr niedrigen Level und unterscheiden sich nur etwas an späteren Zeitpunkten nach dem Bestrahlungszeitpunkt.

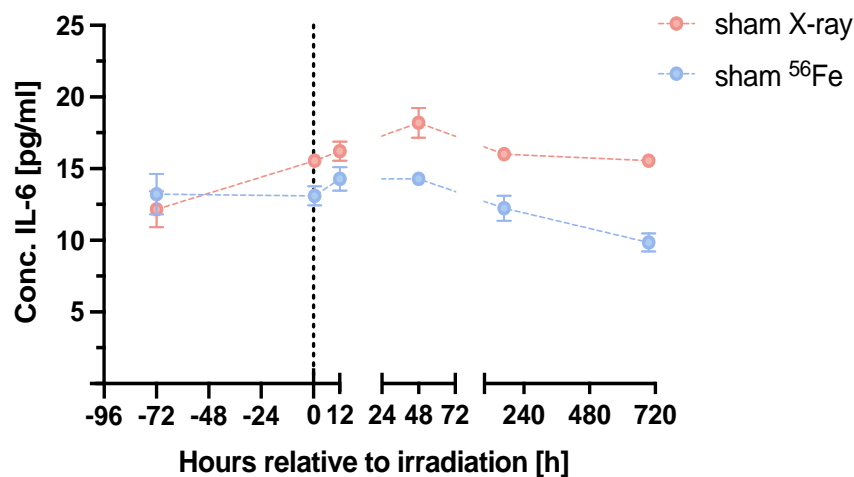


Abb. 8: IL-6 concentration in tissue-culture supernatant of sham (X-ray or ⁵⁶Fe irradiated) OHSC. Pro-inflammatory marker concentration, IL-6, was accumulated over a period of 72 h per sampling time and measured with a High-Sensitivity ELISA Kit. Mann-Whitney t-test, N = 3, i = 3, s = 9. Error bar depict the SEM. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing the conditions at each time point.

2.1.3. Effekte der Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten auf OHSC

Im Rahmen einer Bachelorarbeit (Britta Lipinski, Hochschule Darmstadt, h_da) wurde eine nicht-toxische Konzentration der beiden zu untersuchenden Testsubstanzen (abn-CBD und Gp1a) getestet. Diese betrug für beide Substanzen 10 μM . Vehikelkontrollen wurden mit DMSO durchgeführt. Zunächst

wurde die Mikroglia-dichte und allgemeiner Zelltod in unbestrahlten OHSC ermittelt, um einen reinen Behandlungseffekt der Substanzen zu erhalten (Abb. 9). Die Mikroglia-dichte nahm ca. 48h nach (Sham-) Bestrahlung etwas zu, was eine Reaktion auf den Transport darstellen könnte. Danach nimmt sie kontinuierlich über die Zeit ab, unabhängig von der verwendeten Testsubstanz. Auch der Zelltod stieg zu diesem Zeitpunkt etwas an und wurde dann wieder über die Zeit geringer, mit Ausnahme der OHSC aus dem Xray Experiment, die unter Gp1a-Behandlung erhöhten Zelltod zeigten. Dies kann noch nicht abschließend erklärt werden.

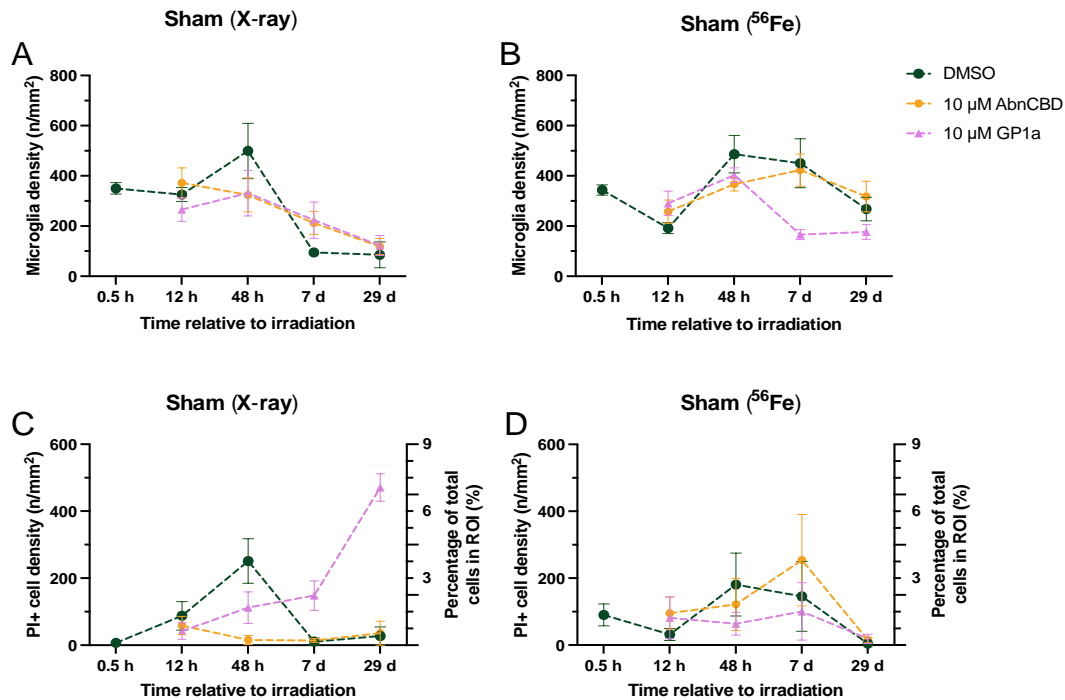


Abb. 9: Microglia and PI+ cell density in dentate gyrus of sham irradiated OHSC treated with 10 μM AbnCBD or GP1a. Cell numbers were measured in immunofluorescent images and correlated to the area (mm²) of the associated dentate gyrus region for density (n/ mm²). Microglia densities for X-irradiated OHSC is depicted in Graph (A) for ⁵⁶Fe-ion irradiation in (B). The density of PI + cells for the corresponding radiation species in (C) for X-rays and (D) for ⁵⁶Fe-ions.

Auch die IL-6-Konzentration zur Messung einer möglichen Entzündung durch die Behandlung mit den Testsubstanzen wurde ermittelt, ebenfalls wieder an unbestrahlten Sham-behandelten Slice-Kulturen. In beiden Experimenten sind keine gravierenden Unterschiede zu sehen (Abb. 10), außer eines kurzzeitigen Anstiegs im Fe-Ionen-Experiment zwischen 12 und 48h nach Sham-Bestrahlung. Hier könnten einzelne Replikate eine Reaktion z.B. auf Transportstress gezeigt haben, da die Fehlerbalken sehr groß sind.

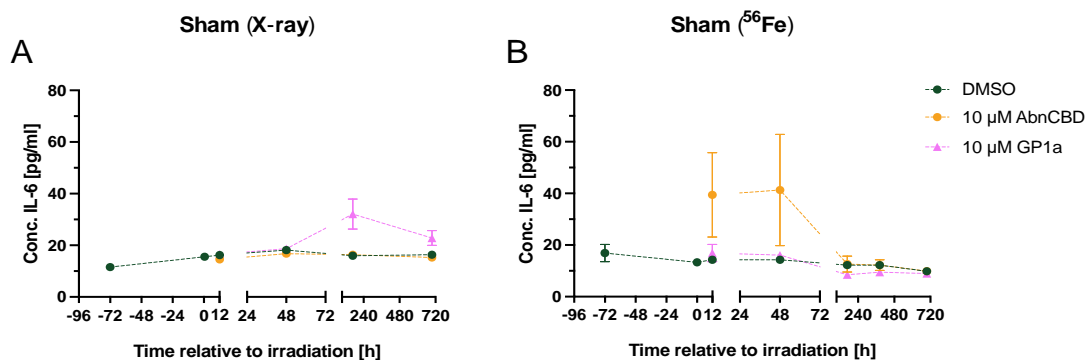


Abb. 10: IL-6 concentrations in sham irradiated OHSCs treated with 10 μ M AbnCBD or GP1a. Pro-inflammatory marker concentration, IL-6, was accumulated over a period of 72 h per sampling time and measured with a High-Sensitivity ELISA Kit. Error bars depict mean with SEM. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to sham irradiated DMSO controls at the associated time point.

2.1.4. Blockierung der Rezeptoren in OHSC durch RNAi

Um die Effekte der Behandlung mit den Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten spezifisch zu testen, sollte außerdem ein Knockdown durch RNAi durchgeführt werden. Durch einen Knockdown kann man eindeutig zeigen, dass die untersuchten Rezeptoren beteiligt sind. Hierfür wurden spezifische siRNA Fragmente designt, die gegen die Sequenzen für die Rezeptoren CB₁, CB₂ and GPR55 gerichtet waren. Leider konnte eine Inhibierung der Rezeptoren nicht gezeigt werden. Aus Zeitgründen wurde eine tiefergehende Fehlersuche nicht durchgeführt und das Experiment nicht weiterverfolgt.

2.1.5. Einfluss von X-Ray Bestrahlung auf OHSC

Zunächst wurde der Effekt der niedrigen Dosis (0,3 Gy) Röntgenstrahlung ermittelt, die auch weltraumrelevant ist. Initial wurde der Zelltod in bestrahlten gegenüber sham-bestrahlten OHSC über die Zeit ermittelt (Abb. 11). Lediglich zum letzten untersuchten Zeitpunkt (29d) war ein leichter Anstieg in beiden Konditionen zu sehen, was auch so zu erwarten war. Dies ist wahrscheinlich eher auf Langzeit-Kultureffekte als auf einen Strahleneffekt zurückzuführen.

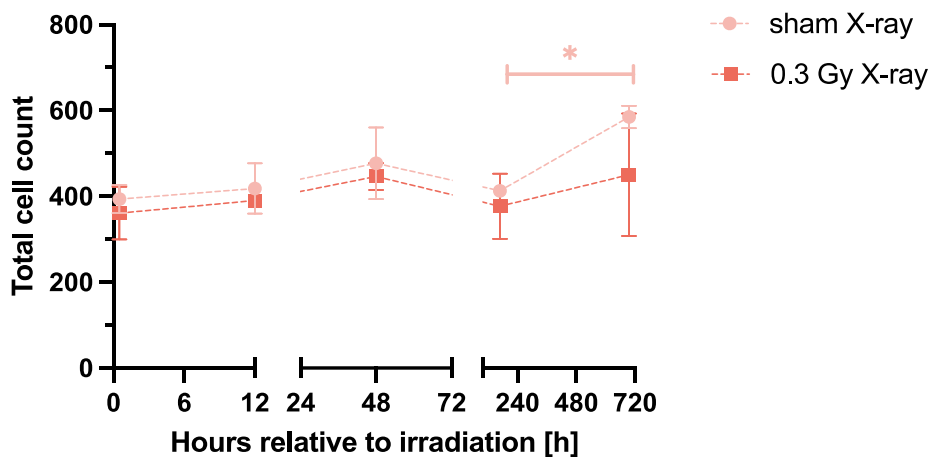


Abb. 11: Total cell number in dentate gyrus of sham and 0.3 Gy X-irradiated OHSC. Cell numbers were determined by DAPI cell nucleus staining of 350 μ m whole mount OHSC and images were taken with Olympus confocal microscope and analyzed in ImageJ/Fiji. Error bars depict mean with SEM. N = 3, i = 3, s = 9. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing irradiated samples at each time point to sham irradiated OHSC at associated experimental time point. *p = 0.01

Weiterhin wurde der Zelltod mittels PI Färbung und die Mikroglia dichte in den OHSC Kulturen bestimmt (Abb. 12). Es wurde wieder der transiente, Transport-assoziierte Anstieg von MGdichte und Zelltod beobachtet (48h), aber auch eine Erhöhung der MGdichte bis zu 7d in den bestrahlten OHSC (D). Nimmt man den Sham-Wert des jeweiligen Zeitpunkts als Basis, zeigen sich Erhöhungen der MGdichte nach 7 und 29d (E) und des Zelltods nach 0,5 und 12h (F).

Auch die Klassifizierung des MG Phänotyps wurde vorgenommen, diese Analysen sind aber noch nicht vollständig und werden deshalb hier nicht gezeigt.

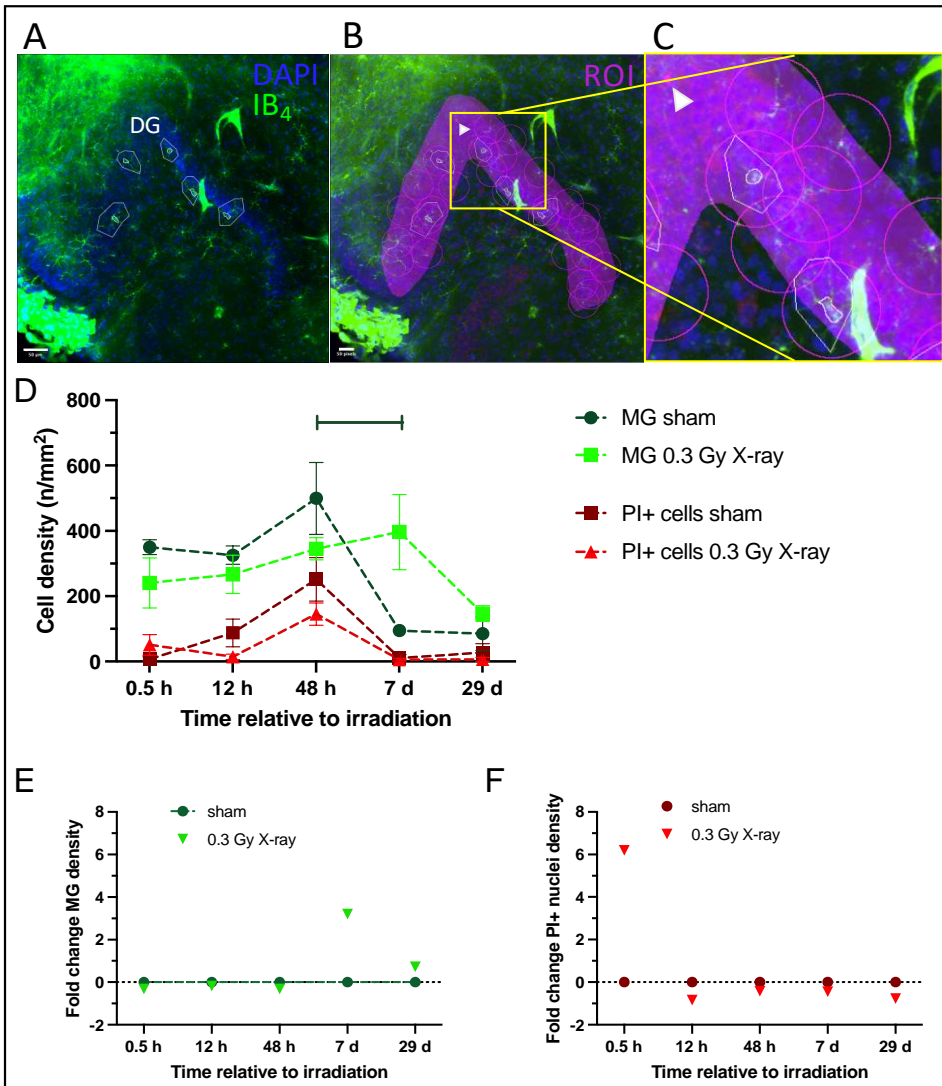


Abb. 12: Microglia (MG) and PI + cell density in dentate gyrus of murine OHSC, (A) which were exposed to sham or 0.3 Gy X-ray radiation and monitored over up to 29 days post exposure. Cell numbers were measured by analysis of immunofluorescent images and correlated with the area (mm²) of the associated dentate gyrus region. (B) Fold change of microglia cell density compared to sham irradiated samples for each time point. (C) Fold change of PI + cell density compared to sham irradiated samples for each time point. Error bars are mean with SEM, N = 3, i = 3, s = 9. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to the DMSO control within one experimental time point. ** p = 0.001

Auch der Entzündungsmarker IL-6 wurde gemessen und ist hier zur besseren Visualisierung in Kurzzeit- (A) und Langzeitmessung (B) aufgeteilt.

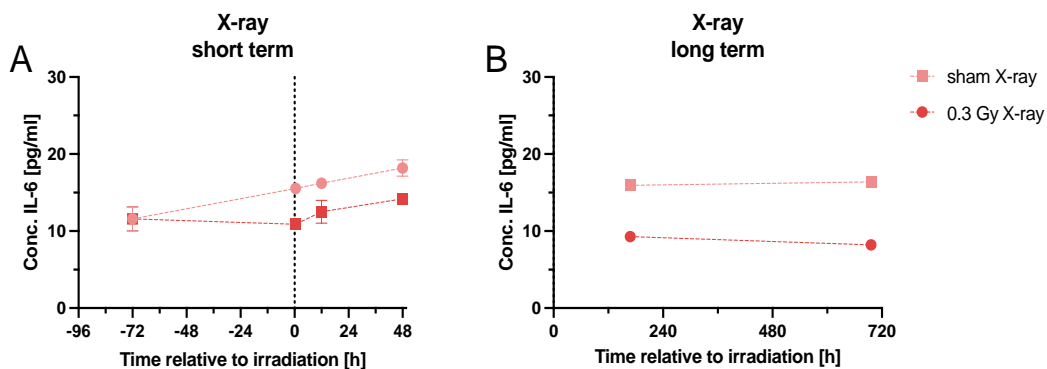


Abb. 13: IL-6 concentration in OHSC supernatant over (A) short term and (B) long term observation period exposed to sham or 0.3 Gy X-irradiation. Pro-inflammatory marker concentration, IL-6, was accumulated over a period of 72 h per sampling time and measured in pg/mL with a High-Sensitivity ELISA Kit. Error bars show SEM. $N = 3$, $i = 3$, $s = 9$. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to 0 Gy, sham irradiation control at the corresponding time * $p = 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Die Fluktuationen der IL-6-Konzentration bewegen sich auf sehr geringem Niveau, weswegen eine biologische Relevanz nicht wirklich interpretiert werden kann, auch wenn sich statistisch signifikante Unterschiede zeigen.

Für den Zeitpunkt 12h war es möglich, ein Experiment mit einer hohen Bestrahlungsdosis von 3 Gy mitzuführen. Diese sollte eine stärkere Reaktion der OHSC hervorrufen. Auch hier sind aber die Unterschiede kaum zu messen, weshalb die Messmethode in diesem System generell zu hinterfragen ist (Abb. 14).

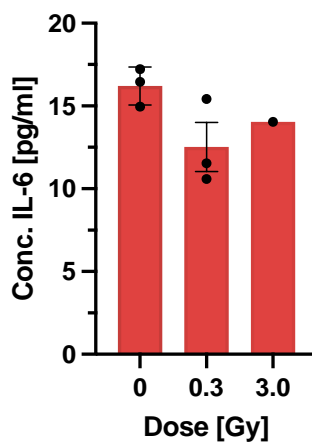


Abb. 14: IL-6 concentration in OHSC supernatant 12 h after irradiation with 0, 0.3 and 3.0 Gy X-ray. OHSC were exposed to sham, 0.3 Gy or 3.0 Gy of X-ray radiation. Pro-inflammatory marker concentration, IL-6, was accumulated over a period of 72 h per sampling time and measured with a High-Sensitivity ELISA Kit. Error bars mark SD. $N = 1-3$, $i = 3$, $s = 9$. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to 0 Gy, sham irradiation controls.

Auch der Einfluss der Testsubstanzen auf OHSC nach 0,3 und 3 Gy X-ray Bestrahlung nach 12h wurde erfasst und die IL-6 Konzentration gemessen (Abb. 15). Hier bestätigt sich der Eindruck, der eben schon beschrieben wurde, da sich alle Werte auf sehr niedrigem Niveau befinden und es nur bei einer Kondition in einigen Replikaten Ausreißer gibt (0,3 Gy AbnCBD).

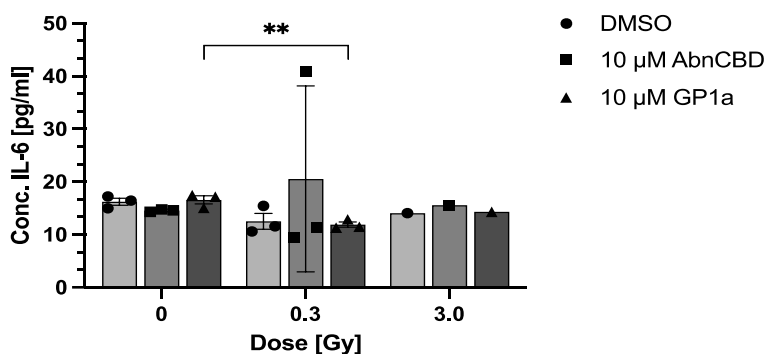


Abb. 15: Dose-dependent IL-6 concentration in tissue culture supernatant of OHSC 12 h post X-ray exposure and subsequent treatment with 10 μM of cannabinoid receptor agonists GP1a and AbnCBD. $N = 1-3$, $i = 1$, $s = 3$; Error bar depict mean with SD. Statistics performed by 2way ANOVA (Sidak's multiple comparison). Comparisons were conducted between sham vs. irradiated groups. ** $p = 0.001$

Nachdem der Effekt der Bestrahlung auf OHSC gezeigt wurde, sollte nun ermittelt werden, ob eine Gp1a-Behandlung, die den CB2 Rezeptor auf den MG beeinflussen sollte, eine Wirkung zeigt. Hierzu wurden wieder MGdichte und allgemeiner Zelltod gemessen (Abb. 16). An Tag 7 ist eine kleine Verringerung der MGdichte durch die Behandlung zu sehen (A, lila Linie und B). An diesem Zeitpunkt

steigt aber auch der Zelltod an, und es muss ermittelt werden, ob es sich bei diesen Zellen um MG handelt.

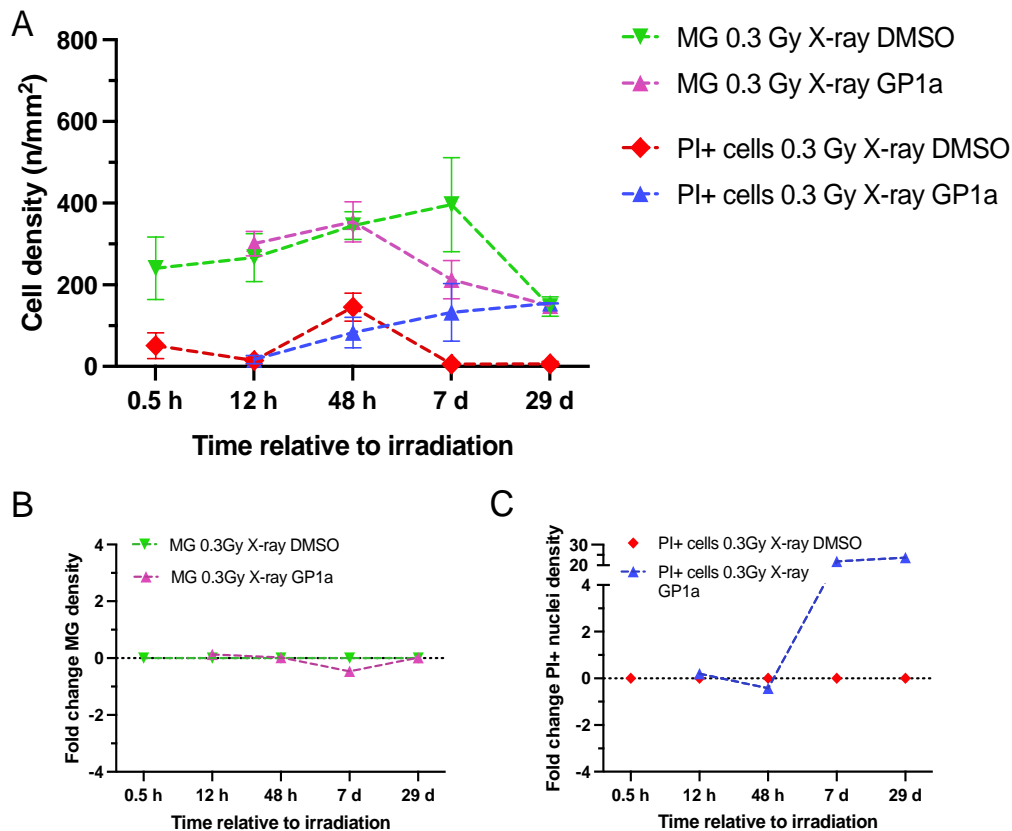


Abb. 16: Microglia (MG) and PI + cell density in dentate gyrus of murine OHSC treated with 10 μ M Gp1a, (A) which were exposed to 0.3 Gy X-ray radiation and monitored over up to 29 days post exposure. Cell numbers were measured by analysis of immunofluorescent images and correlated with the area (mm²) of the associated dentate gyrus region. (B) Fold change of microglia cell density compared to sham irradiated samples for each time point. (C) Fold change of PI + cell density compared to sham irradiated samples for each time point. Error bars are mean with SEM, N = 3, i = 3, s = 9. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to the irradiated DMSO control within one experimental time point. **** p < 0.0001

Auch die zweite Testsubstanz AbnCBD wurde angewendet und die Ergebnisse im Folgenden gezeigt. Auch hier ist eine leichte Verringerung der MGdichte nach 7d zu sehen (Abb. 17 orange Linie, A), jedoch ist der Effekt klein, schaut man sich die normalisierten Werte an (B). Auch hier ist ein Anstieg des Zelltods nach 7d zu beobachten.

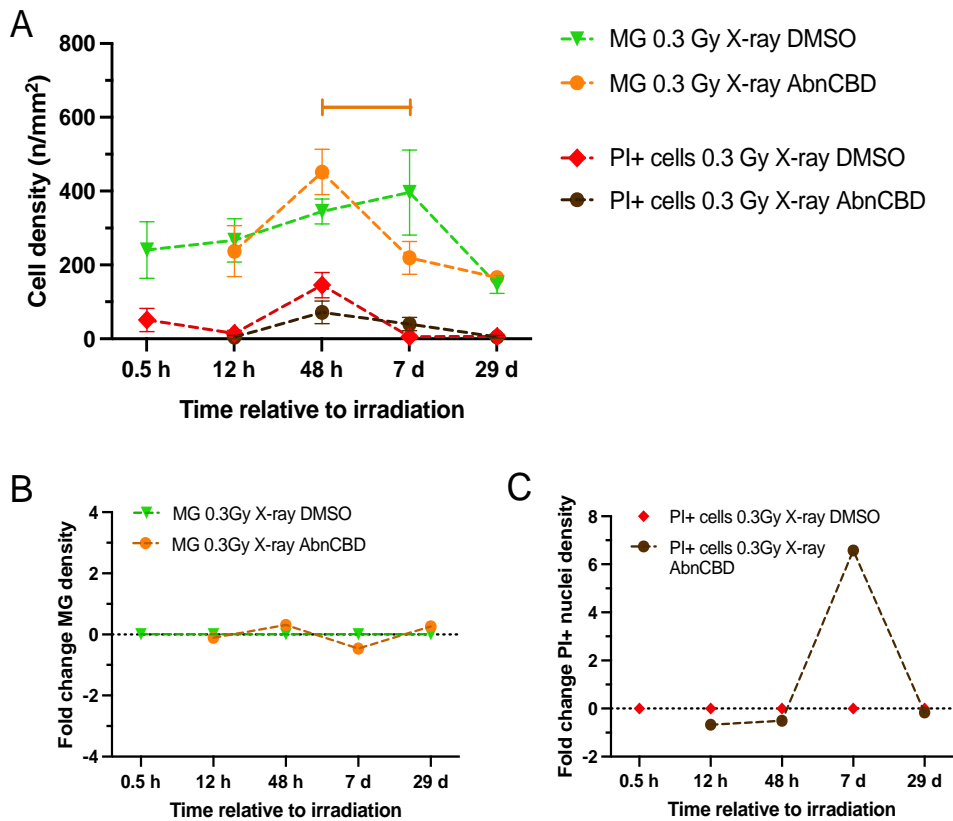


Abb. 17: Microglia (MG) and PI + cell density in dentate gyrus of murine OHSC treated with 10 μ M AbnCBD, (A) which were exposed to 0.3 Gy X-ray radiation and monitored over up to 29 days post exposure. Cell numbers were measured by analysis of immunofluorescent images and correlated with the area (mm²) of the associated dentate gyrus region. (B) Fold change of microglia cell density compared to sham irradiated samples for each time point. (C) Fold change of PI + cell density compared to sham irradiated samples for each time point. Error bars are mean with SEM, N = 3, i = 3, s = 9. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to the irradiated DMSO control within one experimental time point. * p = 0.01

Die Klassifizierung der MG-Aktivierung steht auch hier noch aus.

2.1.6. Genexpressionsanalysen der bestrahlten und behandelten OHSC

Zunächst sollte eine qRT-PCR etabliert werden, um die Cannabinoid Rezeptorgene *cnr1* (CB₁R), *cnr2* (CB₂R), and *gpr55* (GPR55) nachzuweisen. Da es keine Literatur hierzu gibt, wurden mehrere Primer designt und an RNA aus Maus Hirngewebe getestet, aber keines der Primerpaare konnte den Qualitätskriterien genügen, so dass der Ansatz nicht weiterverfolgt wurde.

Stattdessen wurde die isolierte RNA aus den OHSC Experimenten zur RNA Sequenzierung geschickt. Die Analysen wurden über eine externe Firma getätigt, die das notwendige Knowhow für eine solche vielschichtige Analyse besitzt (Azenta Genewiz, Leipzig). Hierfür wurde der Zeitpunkt 12h nach Bestrahlung gewählt, da nach Literaturrecherchen hier bereits Veränderungen auf RNA Ebene stattfinden sollten. Die Behandlung mit Gp1a ist Folgenden links gezeigt; die Behandlung mit AbnCBD rechts (Abb. 18). Gp1a als CB₂-Agonist sollte eigentlich eine Erhöhung der CB₂ Rezeptoranzahl hervorrufen, man sieht aber eine Verringerung der GPR55 Rezeptorgene. AbnCBD als GPR55-Agonist dagegen verändert in unseren Daten die CB₂-Genanzahl und hat keinen Einfluss auf die GPR55-Genanzahl.

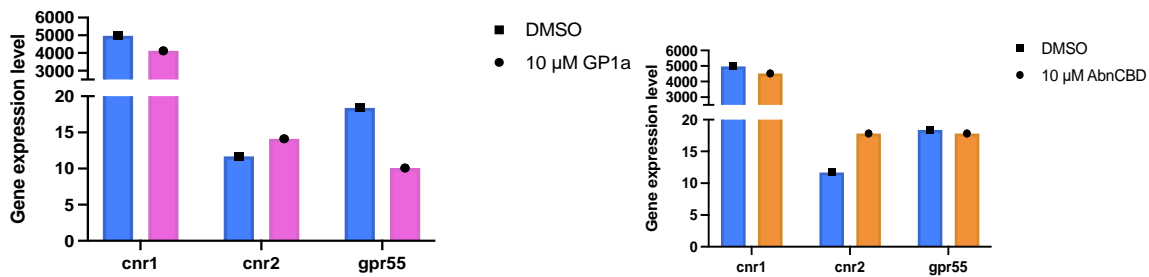


Abb. 18: Gene expression count of CB₁, CB₂ and GPR55 in treated and 0.3 Gy X-irradiated OSHC 12 h post exposure; left: treatment with Gp1a, right: treatment with abnCBD. Gene expression was analyzed with RNA sequencing methods by Azenta Genewiz. N = 1, s = 3.

Da eine ungeheuer große informationsmenge in RNASeq Daten steckt, wurden weitere Analysen zu differentiell exprimierten Genen (DEG) durchgeführt, um Hinweise auf andere beteiligte Signalwege zu erhalten. Es wurden mehrere Haushaltsgene mit in die Analysen einbezogen, um systemische Änderungen auszuschließen und nur behandlungs-induzierte Änderungen zu erfassen.

Zunächst wurden alle veränderten Gene in einem Volcano-Plot erfasst, blaue Punkte stellen herunterregulierte Gene und rote Punkte hochregulierte Gene dar (Abb. 19). Es handelte sich hier um 31/17025 veränderten Genen nach 0,3 Gy Xray (12h).

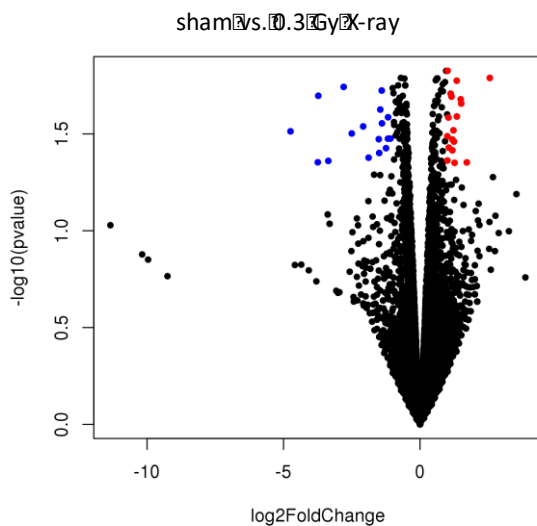


Abb. 19: Significant differentially expressed genes (DEG) between sham (X-ray) and 0.3 Gy X-irradiated OSHC at 12 h post irradiation. The x-axis of the volcano plot represents the log₂ fold change (the difference between the expression level in the irradiated sample and the sham control sample), and the y-axis represents the -log₁₀ of the p-value (the significance of the difference). Genes with high fold changes and low p-values are considered to be differentially expressed. Blue dots are therefore downregulated proportion of genes, red dots the upregulated genes compared to sham control and black dots are non-significant. Generated by Azenta Genewiz BI.

Da uns in diesem Projekt hauptsächlich entzündungsrelevante Vorgänge interessierten, wurde eine Gene Ontology (GO) Suche durchgeführt, um Gene zu finden, die mit Neuroinflammation und Mikrogliaaktivierung assoziiert sind. Diese sind nachfolgend dargestellt (Abb. 20), wobei sich helle Kästchen auf Gene mit wenigen Annotationen und dunkle Kästchen auf Gene mit vielen Annotationen beziehen.

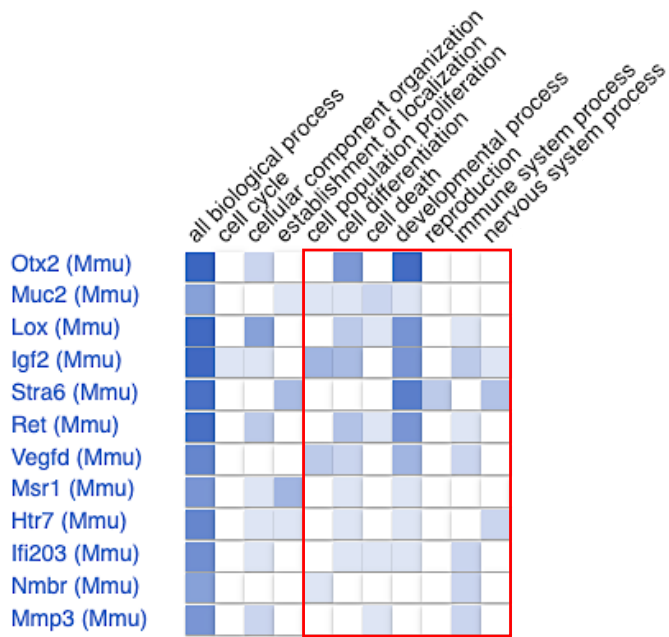


Abb. 20: Annotation summary of significant, differentially expressed genes between sham irradiated and 0.3 Gy X-irradiated OHSC at 12 h post irradiation

Die genaue Bedeutung der identifizierten Gene wird in der nachfolgenden Grafik gezeigt.

Mouse genome informatics (MGI) ID	Gene symbol	Full gene name	Log2 fold change	P-value	Regulation related to control	Relevant gene annotation	Reference
MGI:97451	Otx2	orthodenticle homeobox 2	-3.358	0.044	↓	Axon guidance, cell differentiation, cell fate commitment, neuron fate commitment, neuron fate determination, neuron fate specification, oligodendrocyte differentiation	GO_REF:0000096, PMID:26494787, PMID:15105370, PMID:16339193, PMID:26166575, PMID:19592574, PMID:19592574, PMID:15888661, PMID:26166575, PMID:26166575
MGI:1339364	Muc2	mucin 2	-1.51	0.034	↓	pos. regulation of apoptotic process, neg. regulation of cell migration, neg. regulation of cell population proliferation	PMID:11872843, PMID:11872843, PMID:11872843
MGI:96817	Lox	lysyl oxidase	-1.494	0.040	↓	cellular response to chemokine, reg. of apoptotic process	PMID:18586678, PMID:28538980
MGI:96434	Igf2	insulin-like growth factor 2	-1.402	0.019	↓	memory	GO_REF:0000096
MGI:107742	Stra6	stimulated by retinoic	-1.174	0.033	↓	cognition, learning	GO_REF:0000096, GO_REF:0000096
MGI:97902	Ret	ret proto-oncogene	-1.082	0.033	↓	glial cell-derived neurotrophic factor receptor signaling pathway	GO_REF:0000096
MGI:108037	Vegfd	vascular endothelial growth factor D	1.058	0.037	↑	positive regulation of interleukin-6 production	GO_REF:0000096
MGI:98257	Msr1	macrophage scavenger receptor 1	1.156	0.020	↑	endocytosis	GO_REF:0000004
MGI:99841	Htr7	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	1.348	0.017	↑	dopaminergic neuron differentiation, G protein-coupled receptor activity, neuronal cell body	GO_REF:0000096, GO_REF:0000002, GO_REF:0000096
MGI:96428	Ifi203	interferon activated gene 203	1.512	0.022	↑	activation of innate immune response, pos. regulation of IL-1 beta production	GO_REF:0000096
MGI:1100525	Nmbr	neuromedin B receptor	1.715	0.044	↑	G protein-coupled receptor activity	GO_REF:0000004
MGI:97010	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	2.558	0.016	↑	neg. regulation of hydrogen peroxide metabolic process, pos. regulation of oxidative stress-induced cell death, innate immune response	GO_REF:0000096, PMID:20969476,

2.1.7. Einfluss von Eisen-(Fe-) Ionen- Bestrahlung auf OHSC

Die hier verwendete Fe-Ionen-Strahlung war monoenergetisch mit einer Energie von 1 GeV/n. Eine weltraumrelevante Dosis von 0,3 Gy wurde appliziert. Der Aufbau der Experimente war analog zu den X-Ray-Experimenten, um jeweils eine Referenzstrahlung zu haben.

Zunächst ist die Messung der Gesamtzellzahl über die Zeit dargestellt (Abb. 21). Man erkennt eine generelle leichte Abnahme der Zellzahl über die Kultivierungsdauer, aber keinen strahleninduzierten Effekt, was bei der niedrigen verwendeten Dosis zu erwarten war.

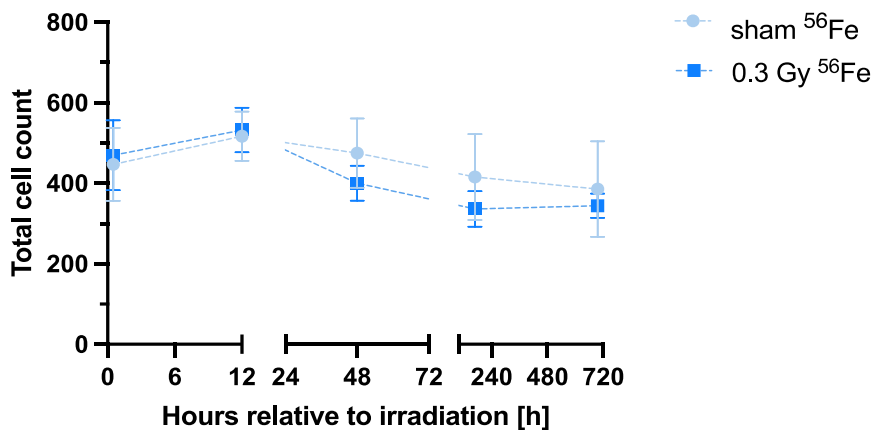


Abb. 21: Total cell number in dentate gyrus of sham and 0.3 Gy ⁵⁶Fe-ion irradiated OHSC. Cell numbers were determined by DAPI cell nucleus staining of 350 μ m whole mount OHSC and images were taken with an Olympus confocal microscope and analyzed in ImageJ/Fiji. Error bars depict mean with SEM. $N = 3$, $i = 3$, $s = 9$. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing irradiated samples at each time point to sham irradiated OHSC at associated experimental time point.

Weiterhin wurde der Zelltod mittels PI Färbung und die Mikroglia-dichte in den OHSC Kulturen bestimmt (Abb. 22). Ein Anstieg der MG-dichte war nach 48h zu sehen, auf den ein Rückgang über den Rest der Kultivierungszeit bis 29d folgte. Auch der Zelltod stieg an 48 h in beiden Konditionen an und sank dann wieder bis zum letzten beobachteten Zeitpunkt auf das Niveau wie vor Bestrahlung. Sowohl die MG-dichte als auch die Zahl toter Zellen ist zu Anfang des Experiments sehr gut vergleichbar mit den X-Ray-behandelten Kulturen. Allerdings stiegen bei den X-Ray behandelten OHSC die MG nach Bestrahlung nach 7d an, während sie nach Fe-Ionen-Bestrahlung am selben Zeitpunkt etwas unter den Sham bestrahlten Proben liegen (A). Diese Beobachtung bestätigt sich auch in den normalisierten Daten (B und C).

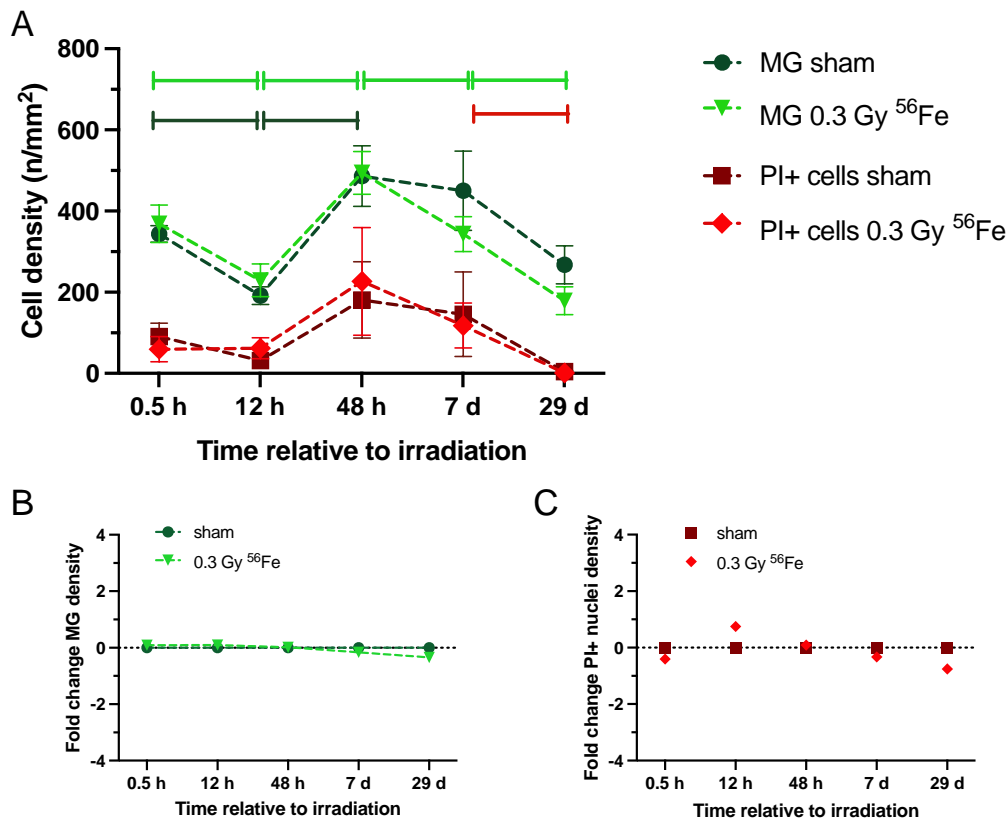


Abb. 22: **Microglia (MG) and PI + cell density in dentate gyrus of murine OHSC, (A)** which were exposed to sham or 0.3 Gy ⁵⁶Fe-ion radiation and monitored over up to 29 days post exposure. Cell numbers were measured by analysis of immunofluorescent images and correlated with the area (mm²) of the associated dentate gyrus region. (B) Fold change of microglia cell density compared to sham irradiated samples for each time point. (C) Fold change of PI + cell density compared to sham irradiated samples for each time point. Error bars are mean with SEM, N = 3, i = 3, s = 9. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to the DMSO control within one experimental time point. * p = 0.01, ** p = 0.001, **** p < 0.0001

Die Klassifizierung der MG steht noch aus.

Der Entzündungsmarker IL-6 wurde auch in Fe-Ionen-bestrahlten Proben gemessen (Abb. 23). In den Kurzzeit-Proben gab es nach 12h eine deutlichere Reaktion als bei Xray, was auf einen stärkeren Effekt der dicht-ionisierenden Strahlung und damit eine vermehrte Entzündungsreaktion hindeuten könnte. Der Anstieg ist bereits nach 0,5h zu erkennen.

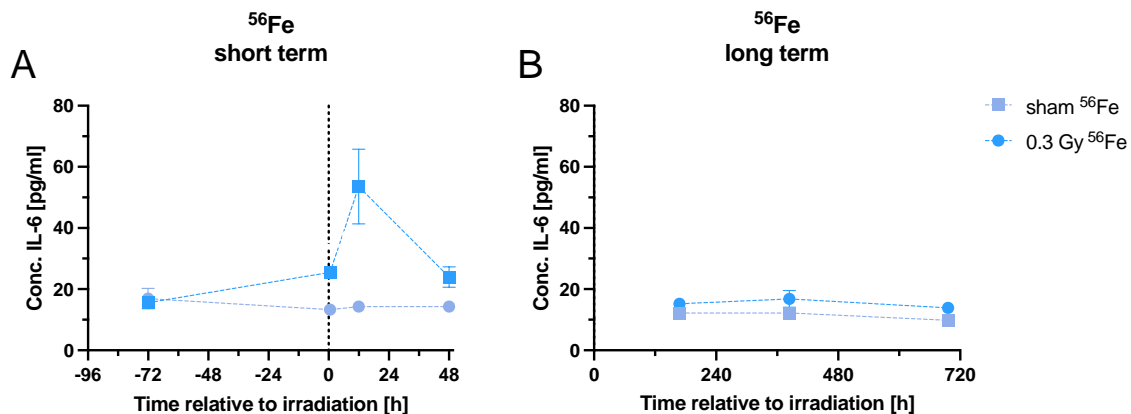


Abb. 23: **IL-6 concentration in OHSC supernatant over (A) short term and (B) long term observation period exposed to sham or 0.3 Gy ⁵⁶Fe-ions.** Pro-inflammatory marker concentration, IL-6, was accumulated over a period of 72 h per sampling time

and measured in pg/mL with a High-Sensitivity ELISA Kit. Error bars show SD. $N = 3, i = 3, s = 9$. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to 0 Gy, sham irradiation control at corresponding time ** $p = 0.001$.

Auch der Einfluss der Testsubstanzen AbnCBD und Gp1a auf OHSC nach 0,3 und 3 Gy Fe-Ionen-Bestrahlung nach 12h wurde erfasst und die IL-6 Konzentration gemessen (Abb. 24). Nach 0,3 Gy lag das IL-6-Level allgemein etwas höher als nach Sham-Bestrahlung. Nach 3 Gy jedoch waren die Werte der mit beiden Testsubstanzen behandelten OHSCs deutlich höher als die sham-bestrahlten. Somit hätte die Behandlung eine Entzündung eher gefördert als verringert. Aufgrund der hohen Fehlerbalken bzw. der fehlenden Replikate bei 3 Gy kann man hier keine gesicherte Aussage treffen. Diese Experimente müssten für die hohe Dosis wiederholt werden.

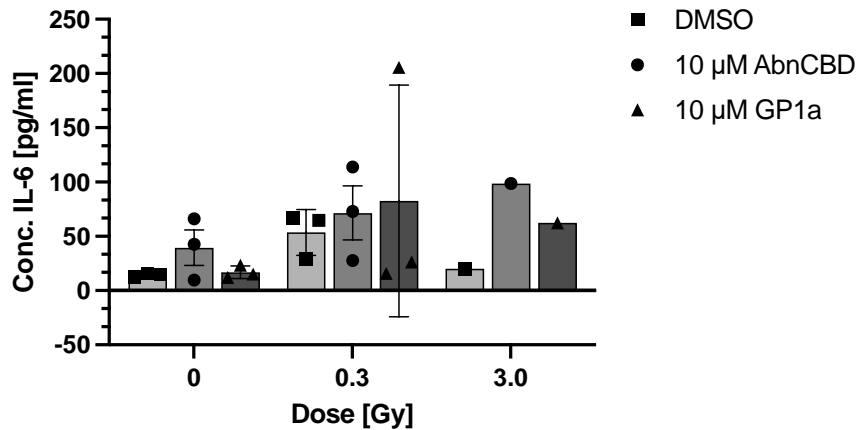


Abb. 24: Dose-dependent IL-6 concentration in tissue culture supernatant of OHSC 12 h post ^{56}Fe -ion exposure and subsequent treatment with 10 µM of cannabinoid receptor agonists GP1a and AbnCBD. Error bar depict mean with SD. $N = 1-3, s = 3$; Statistics performed by 2way ANOVA (Sidak's multiple comparison). Comparisons were conducted between treated sham vs. irradiated groups.

Der Einfluss von Gp1a über die Zeit nach Fe-Ionen-Bestrahlung ist in der folgenden Abbildung gezeigt. Zunächst wurde die Gesamtzellzahl ermittelt (Abb. 25). Es sind keine Unterschiede zwischen nur bestrahlten oder bestrahlt und behandelten OHSC zu sehen. Auch der Unterschied zu sham-bestrahlten Zellen war nicht zu messen (Abb. 21).

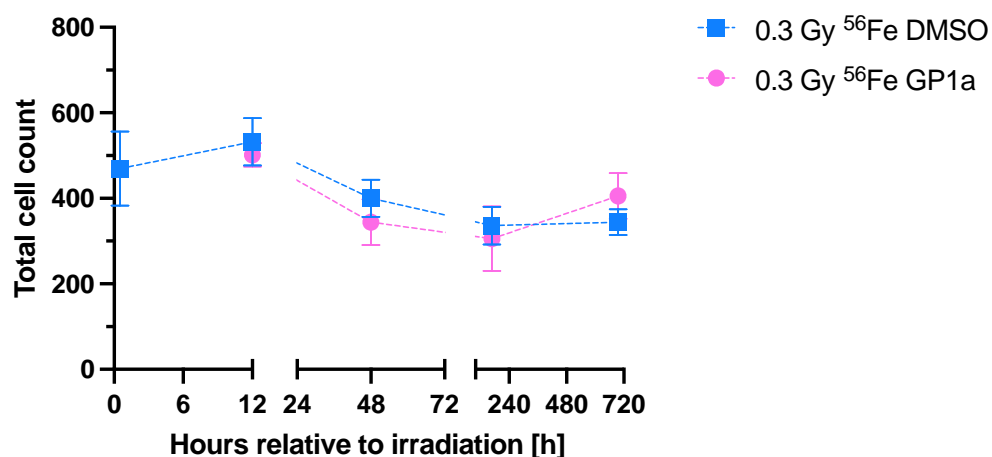


Abb. 25: Total cell number in dentate gyrus of sham and 0.3 Gy ^{56}Fe -ion irradiated OHSCs treated with 10 µM GP1a over the entire cultivation time. Cell numbers were determined by a 1:2000 DAPI cell nucleus staining of 350 µm whole mount OHSC and images were taken with an Olympus confocal microscope and analyzed in ImageJ/Fiji. Error bars depict mean with SEM. $N = 3, i = 1, s = 3$. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing irradiated samples at each time point to sham irradiated OHSC at associated experimental time point.

Im nächsten Schritt wurden die Mikroglia nach Bestrahlung und Behandlung mit Gp1a charakterisiert und der Zelltod quantifiziert (Abb. 26). Die MGdichte nimmt zum Zeitpunkt 48h bei beiden Konditionen zu und nimmt dann wieder über die weitere Kultivierungsdauer langsam ab. Es ist jedoch in der normierten Darstellung eine kleine Erhöhung der MGdichte nach 29d unter Gp1a Behandlung zu erkennen (B). Der Zelltod sinkt über die Kultivierungsdauer auf einen sehr geringen Wert, wodurch sich in der normierten Darstellung (C) ein überproportional erhöhter Wert an toten Zellen unter Gp1a-Behandlung ergibt, der aber nicht real ist. Nach 48h sind sogar weniger tote Zellen unter Gp1a Behandlung gemessen.

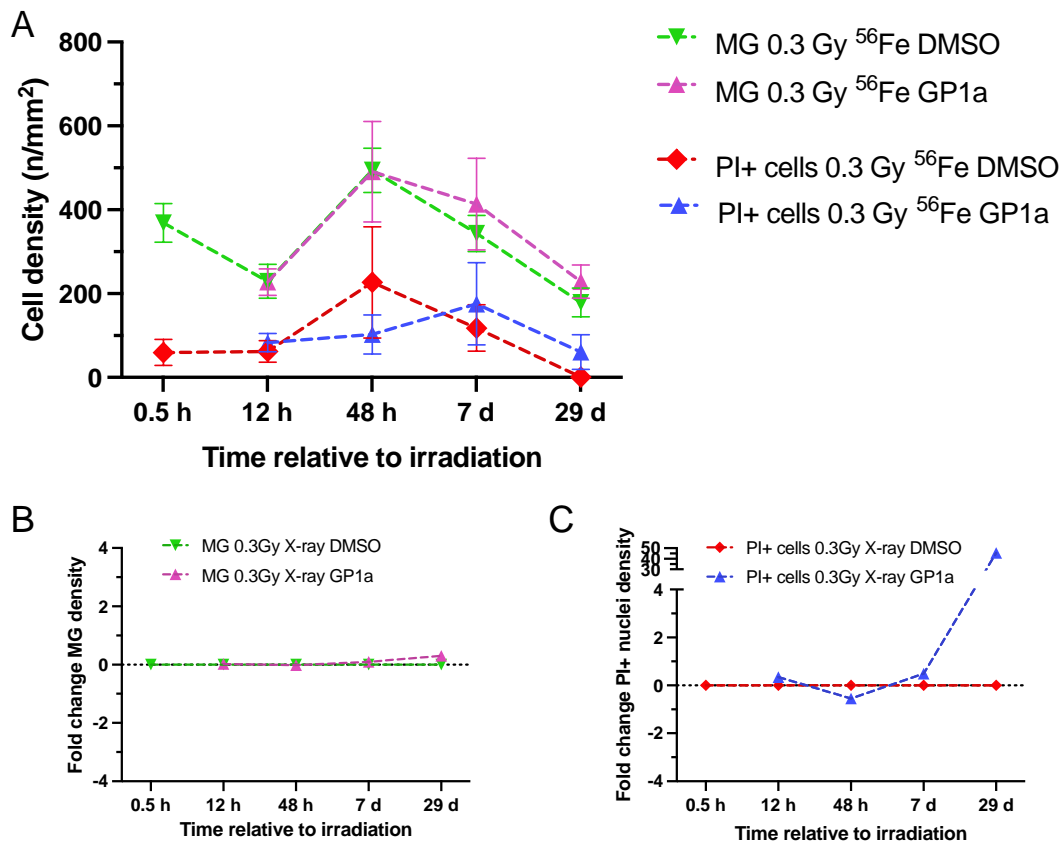


Abb. 26: Microglia (MG) and PI + cell density in dentate gyrus of murine OHSC treated with 10 μ M Gp1a, (A) which were exposed to 0.3 Gy ⁵⁶Fe-ion radiation and monitored over up to 29 days post exposure. Cell numbers were measured by analysis of immunofluorescent images and correlated with the area (mm²) of the associated dentate gyrus region. (B) Fold change of microglia cell density compared to sham irradiated samples for each time point. (C) Fold change of PI + cell density compared to sham irradiated samples for each time point. Error bars are mean with SEM, N = 3, i = 3, s = 9. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to the DMSO control at the experimental time point.

Hier ist ebenfalls die Klassifizierung der MG noch in Arbeit.

Die Entzündungsreaktion wurde über den Marker IL-6 per ELISA nach 0,3 Gy Fe-Ionen und Behandlung mit Gp1a quantifiziert (Abb. 27). Im Kontrast zu den röntgenbestrahlten Kulturen ist hier ein kurzzeitiger ca. 5-7facher Anstieg der IL-6 Konzentration zu sehen, der auf eine unterschiedliche Reaktion der OHSC auf die dichtungisierende Ionenstrahlung hinweisen könnte. Die Entzündung wird aber an späteren Zeitpunkten wieder herunterreguliert, und es ist kein Unterschied zwischen nur bestrahlten oder bestrahlt und behandelten Proben zu erkennen.

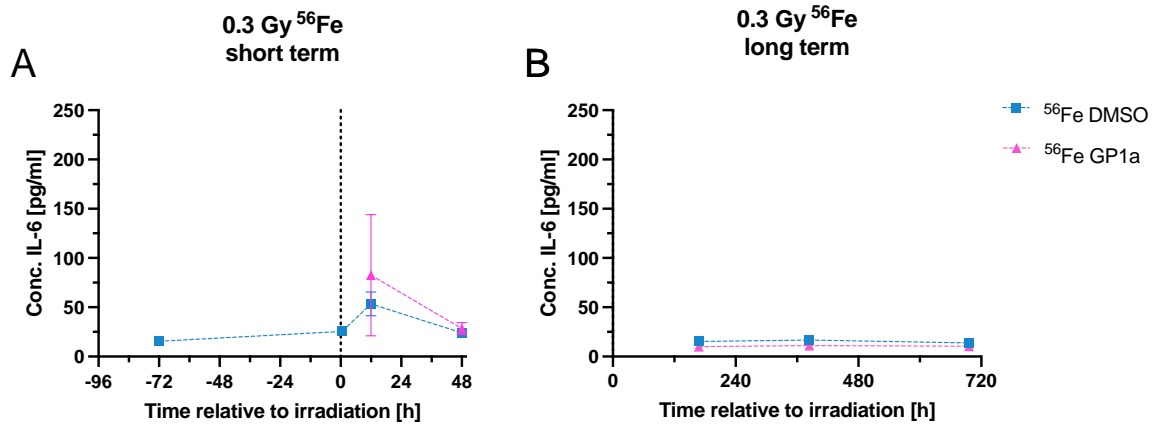


Abb. 27: IL-6 concentration in 0.3 Gy to ⁵⁶Fe -ion radiation samples with and without 10 μM of CB2 receptor agonist GP1a. Pro-inflammatory marker concentration, IL-6, was accumulated over a period of 72 h per sampling time and measured in pg/mL with a High-Sensitivity ELISA Kit. The data presented for -72 hours and 0.5 hours DMSO were collected during the same experimental procedure but recurring in this figure. N = 3, i = 3, s = 9. Error bar depicts mean with SEM. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to 0.3 Gy DMSO controls at corresponding time. * p = 0.01.

Die zweite Testsubstanz, abnCBD, scheint auch keine gravierenden Unterschiede in der Gesamtzellzahl auszumachen (Abb. 28). Es zeigt sich ein leichter Trend zu einer etwas erhöhten Zellzahl unter abnCBD Behandlung.

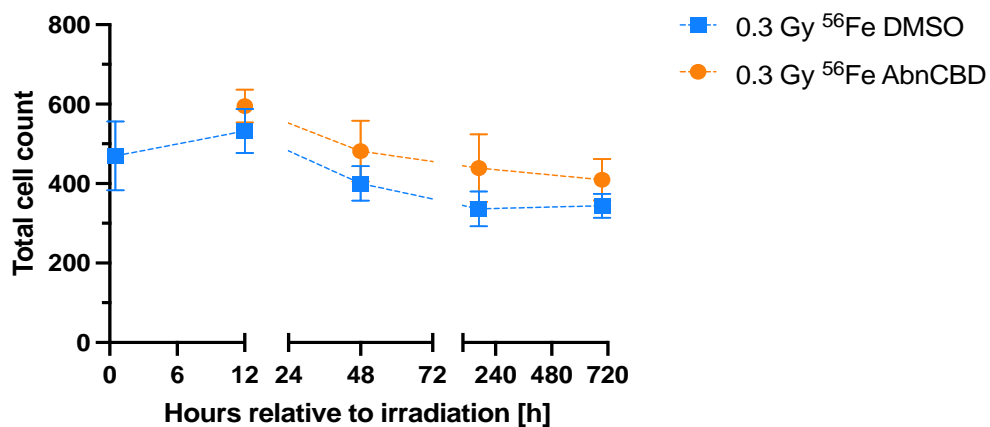


Abb. 28: Total cell number in dentate gyrus of sham and 0.3 Gy ⁵⁶Fe-ion irradiated OHSCs treated with 10 μM AbnCBD over the entire cultivation time. Cell numbers were determined by a 1:2000 DAPI cell nucleus staining of 350 μm whole mount OHSC and images were taken with an Olympus confocal microscope and analyzed in ImageJ/Fiji. Error bars depict mean with SEM. N = 3, i = 1, s = 3. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing irradiated samples at each time point to sham irradiated OHSC at associated experimental time point.

Die Analyse der Mikroglia und des Zelltods ergab zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen nur bestrahlt und bestrahlt und behandelten Kulturen (Abb. 29), jedoch schienen unter abnCBD Behandlung weniger tote Zellen aufzutreten (C).

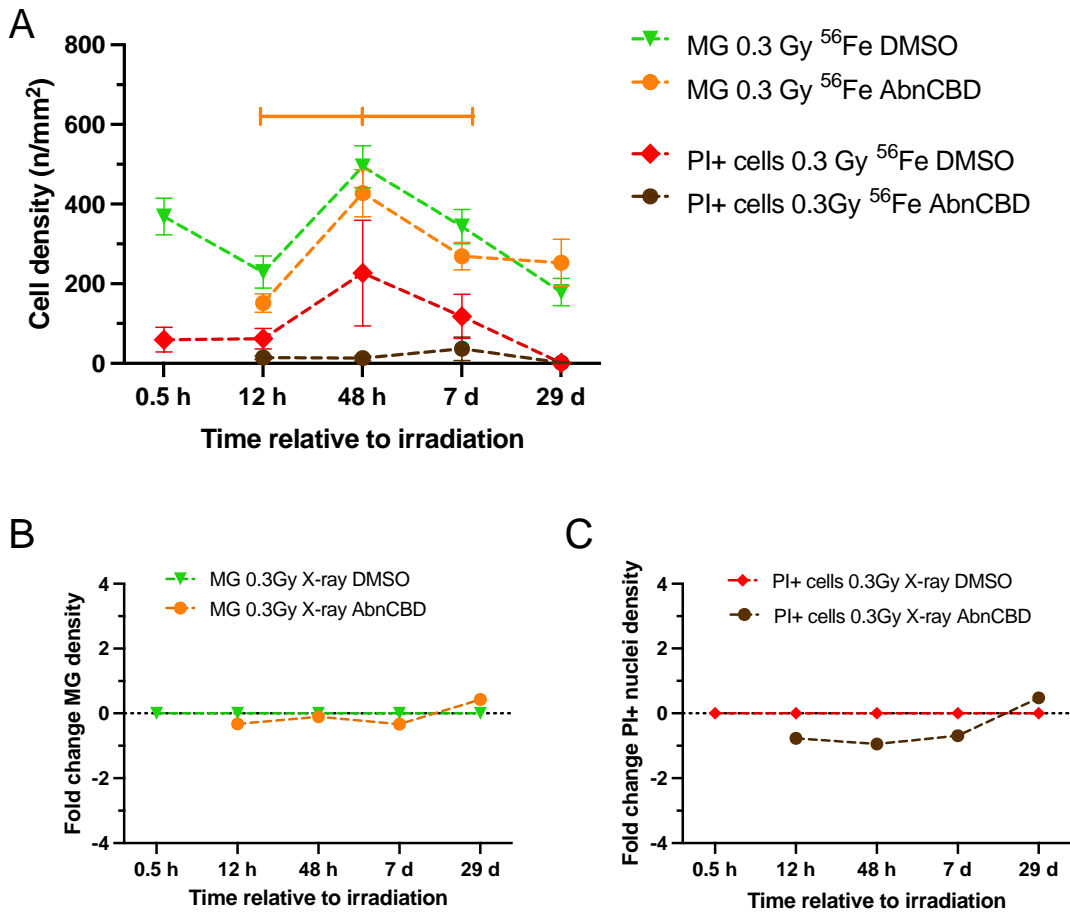


Abb. 29: Microglia (MG) and PI + cell density in dentate gyrus of murine OHSC treated with 10 μ M AbnCBD, (A) which were exposed to 0.3 Gy 56 Fe-ion radiation and monitored over up to 29 days post exposure. Cell numbers were measured by analysis of immunofluorescent images and correlated with the area (mm^2) of the associated dentate gyrus region. (B) Fold change of microglia cell density compared to sham irradiated samples for each time point. (C) Fold change of PI + cell density compared to sham irradiated samples for each time point. Error bars are mean with SEM, $N = 3$, $i = 3$, $s = 9$. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to the DMSO control at the experimental time point.

Die Quantifizierung der Entzündung über IL-6 im Kulturmedium ergab ein ähnliches Bild wie bei der Gp1a Behandlung, jedoch schienen hier bei 48h die abnCBD-behandelten OHSC deutlich stärker zu reagieren als die nur bestrahlten (ca. 6facher Anstieg, Abb. 30). Bei späteren Zeitpunkten war aber keine Entzündung mehr zu messen.

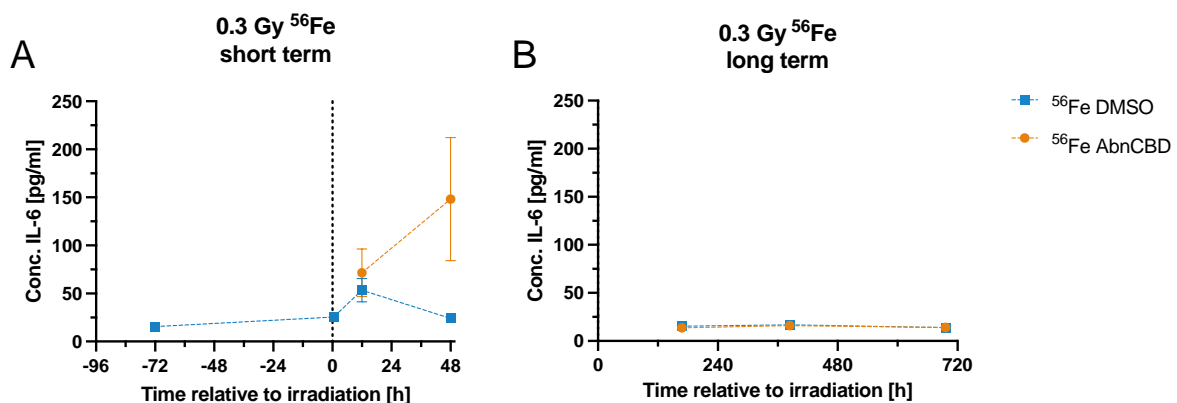


Abb. 30: IL-6 concentration in 0.3 Gy to 56 Fe -ion radiation samples with and without 10 μ M of CB2 receptor agonist AbnCBD. Pro-inflammatory marker concentration, IL-6, was accumulated over a period of 72 h per sampling time and measured in pg/mL with a High-Sensitivity ELISA Kit. The data presented for -72 hours and 0.5 hours DMSO were collected

during the same experimental procedure but recurring in this figure. $N = 3$, $i = 3$, $s = 9$. Error bar depict mean with SEM. Statistics performed by unpaired t-test with Welch's correction, comparing each group to 0.3 Gy DMSO controls at corresponding time.

2.1.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier gezeigten Daten sind sehr komplex bezüglich Art der Bestrahlung (dünn ionisierend, X-ray bzw. dicht ionisierend; Fe Ionen) und der zusätzlichen Behandlungsart mit Testsubstanzen (Gp1a und abnCBD). Zusätzlich sind alle Messungen in verschiedenen Bereichen der Hippocampusregion aufgenommen worden (Hilum, Gyrus dentatus, Cornu ammonis-Region), um eventuell noch Unterschiede in der Strahlensensitivität z.B. der Stammzellregion im Gyrus dentatus zu erhalten (Darstellung der Ergebnisse noch in Arbeit). Deshalb haben wir begonnen, ein Schema zu entwickeln, mit dem man eine Übersicht über die Konditionen und die daraus erhaltenen Ergebnisse zu haben. Bislang wurde allerdings nur ein Durchschnittswert der Werte aus allen Zeitpunkten berücksichtigt, so dass diese Schemata noch überarbeitet und besser aufgeschlüsselt werden für alle Zeitpunkte.

	X-ray	⁵⁶Fe-ion
	0.3 Gy	0.3 Gy
	DMSO (ctrl)	DMSO (ctrl)
Total cell number DG	↔	↔
Microglia cell density	↓	↔
PI + cell density	↓	↔
Amoeboid microglia	↔	↔
Reactive microglia	↓	↑
Ramified microglia	↔	↓
IL-6	↓	↑

Abb. 31: Simplified summary of biological changes in dentate gyrus of OHSCs exposed to 0.3 Gy X-ray or ⁵⁶Fe-ion radiation compared to sham irradiated controls.

	X-ray	⁵⁶Fe-ion
	0.3 Gy	0.3 Gy
	10 μM AbnCBD	10 μM AbnCBD
Total cell number DG		↔
Microglia cell density	↔	↓
PI + cell density	↓	↓
Amoeboid microglia	↔	↑
Reactive microglia	↔	↔
Ramified microglia	↑	↔
IL-6	↔	↔

Abb. 32: Simplified summary of biological effects in dentate gyrus of OHSCs exposed to 0.3 Gy X-ray or ⁵⁶Fe-ion radiation with a subsequent AbnCBD treatment compared to irradiated, DMSO controls.

	X-ray	⁵⁶ Fe-ion
	0.3 Gy	0.3 Gy
	10 µM GP1a	10 µM GP1a
Total cell number DG		↔
Microglia cell density	↔	↔
PI + cell density	↑	↑
Amoeboid microglia	↑	↑
Reactive microglia	↓	↓
Ramified microglia	↓	↓
IL-6	↑	↓

Abb. 33: Simplified summary of biological effects in dentate gyrus of OHSCs exposed to 0.3 Gy X-ray or ⁵⁶Fe-ion radiation with a subsequent GP1a treatment compared to irradiated, DMSO controls.

Die letzten fehlenden Auswertungen sowie die Arbeiten an der Publikation sind derzeit wegen einer längeren Erkrankung von Fr. Djouiai pausiert, werden aber bald wieder aufgenommen.

2.2. Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Aufgrund der verschiedenen Faktoren, die das Projekt beeinflussten und erschwerten (wie die COVID-Pandemie und die Notwendigkeit der Streichung der in vivo Experimente) wurden nicht alle Mittel wie beantragt ausgegeben.

Im Folgenden ist zusammengefasst, wie sich die Änderungen im Vergleich zum Antrag darstellen.

Ausgaben	ZN2020	ZN2021	2022	2023	Gesamt	Differenz zum Antrag
Material	6.594,03 €	7.477,01 €	20.532,23 €	- €	34.603,27 €	15.548,85 €
Personal	38.303,62 €	49.241,29 €	24.769,82 €	- €	112.314,73 €	25.919,03 €
Reisen	3.196,65 €	1.108,78 €	- €	- €	4.305,43 €	1.584,57 €
Summe	48.094,30 €	57.827,08 €	45.302,05 €	- €	151.223,43 €	43.052,45 €

Die Ersparnisse bei den Sachkosten von 15.548,85€ ergeben sich aus den weggefallenen in vivo Experimenten.

Die nicht abgerufenen Personalkosten kamen daher, dass der Vertrag von Fr. Djouiai seitens GSI wegen der Richtlinien für Doktoranden nach insgesamt 3,5 Jahren nicht mehr verlängert werden durfte. Wie oben beschrieben konnte sie aber eine Stelle im Institut von Fr. Prof. Kallendrusch beginnen, die sie auch derzeit noch innehat.

Antrag	2020	2021	2022	2023	Gesamt	
Personal	38.398,27 €	46.077,92 €	46.077,92 €	7.679,65 €	138.233,76 €	
Ausgaben	ZN2020	ZN2021	2022	2023	Gesamt	Differenz zum Antrag
Personal	38.303,62 €	49.241,29 €	24.769,82 €	- €	112.314,73 €	25.919,03 €

Somit ergeben sich eingesparte Kosten von 25.919,03€ im Vergleich zum Antrag.

Reisekosten konnten wegen der COVID-Pandemie und des damit verbundenen Ausfalls vieler Kongresse nicht wie geplant ausgegeben werden. Es wurden 1584,57€ eingespart.

Insgesamt ergibt sich so eine Ersparnis von 43.052,45€.

2.3. Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die hier durchgeführten Arbeiten waren wichtige Grundlagen zur Ermittlung einer potentiellen Mitigation strahleninduzierter Schäden an neuronalem Gewebe. Im Rahmen unserer technischen und räumlichen Möglichkeiten wurden die Experimente so angelegt und durchgeführt, dass die Proben zu maximalen Erkenntnissen genutzt werden konnten (z.B. Verwendung von Kulturmedien und Geweben aus denselben Proben). So wurde auch die Anzahl der Tiere, die zur Herstellung der OHSC nötig war, minimiert, was den gängigen „3R- Prinzipien“ (Reduce, Refine, Replace) entspricht. Die hier durchgeführten Experimente können als Grundlage für weitere Arbeiten genutzt werden, da neue Methoden etabliert wurden (z.B. die Klassifizierung der Mikroglia über machine learning Ansätze) und erste Daten erhoben wurden, die auf eine Beteiligung des Endocannabinoidsystems bei der Neuroinflammation hindeuten. Auch die von uns mittels RNA Seq gefundenen Signalwege nach Bestrahlung können für weitere Experimente zugrunde gelegt werden.

2.4. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Da es weiterhin von hoher Relevanz ist, Astronauten bei längeren Aufenthalten im All vor Strahlenschäden zu schützen, sind diese Arbeiten als Grundlage zur Entwicklung einer pharmakologischen Methode zur Verhinderung kognitiver Schäden zu werten. Auf Basis dieser Arbeit kann in weiteren Experimenten -auch in vivo- getestet werden, ob die hier untersuchten Substanzen wirksam sind. Mittlerweile suchen auch andere Arbeitsgruppen nach Möglichkeiten, kognitive Defizite nach Weltraumstrahlung pharmakologisch abzumildern, es gibt aber noch keine Erfolge. So ist z.B. ein Wirkstoff nur bei männlichen Mäusen wirksam (Weber-Boutros et al 2021), ein anderer konnte generell keine Wirkung zeigen (Kiffer et al 2022). Die generelle Bedeutung der Mikroglia bzw. deren Depletion wurde aktuell auch nochmals betont (Krukowski et al 2021). Die potentielle Schädigung des ZNS durch niedrigere Dosen Weltraumstrahlung wurde auch kürzlich in einem Review beleuchtet (Britten RA, Limoli CL. 2023).

Außerdem werden zurzeit vermehrt Arbeiten publiziert, in denen das Endocannabinoidsystem im Rahmen der anti-inflammatorischen Antwort in anderen Erkrankungen untersucht wird, was die Relevanz dieser Arbeit unterstreicht. Da Neuroinflammation nicht nur nach Exposition durch Strahlung auftritt, sondern auch z.B. bei der Alzheimer'schen Erkrankung oder auch Strahlentherapie, können die hier erhaltenen Erkenntnisse auch auf andere Krankheiten übertragen werden (Xiang et al 2022, Visvanathar et al 2021; Lalkovicova et al 2022, Capozzi et al 2022). Ebenso wird die Rolle bei chronischem Schmerz oder Autismus untersucht (van den Hoogen et al 2022; Su et al 2021), was eine breitere Anwendung der von uns getesteten Substanzen ermöglichen könnte.

Referenzen:

Britten RA, Limoli CL. New Radiobiological Principles for the CNS Arising from Space Radiation Research. *Life* (Basel). 2023 May 31;13(6):1293. doi: 10.3390/life13061293.

Capozzi et al "Anti-Inflammatory Activity of a CB2 Selective Cannabinoid Receptor Agonist: Signaling and Cytokines Release in Blood Mononuclear Cells" *Molecules*. 2021 Dec 23;27(1):64. doi: 10.3390/molecules27010064.

Kiffer et al „Effects of a 33-ion sequential beam galactic cosmic ray analog on male mouse behavior and evaluation of CDDO-EA as a radiation countermeasure" *Behav Brain Res*. 2022 Feb 15;419:113677. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113677.

Krukowski et al „The impact of deep space radiation on cognitive performance: From biological sex to biomarkers to countermeasures" *Sci Adv*. 2021 Oct 15;7(42):eabg6702. doi: 10.1126/sciadv.abg6702.

Lalkovicova et al „ Neuroprotective agents effective against radiation damage of central nervous system" *Neural Regen Res*. 2022 Sep;17(9):1885-1892. doi: 10.4103/1673-5374.335137.

Su et al "Endocannabinoid System Unlocks the Puzzle of Autism Treatment via Microglia" Front Psychiatry 2021 Oct 22;12:734837. doi: 10.3389/fpsy.2021.734837.

van den Hoogen et al „Cannabinoids in Chronic Pain: Therapeutic Potential Through Microglia Modulation" Front Neural Circuits. 2022 Jan 7;15:816747. doi: 10.3389/fncir.2021.816747.

Visvanathar et al "Hippocampal Cb 2 receptors: an untold story" Rev Neurosci. 2021 Oct 29. doi: 10.1515/revneuro-2021-0109.

Weber Boutros et al „Amifostine (WR-2721) Mitigates Cognitive Injury Induced by Heavy Ion Radiation in Male Mice and Alters Behavior and Brain Connectivity" Front Physiol. 2021 Nov 16;12:770502. doi: 10.3389/fphys.2021.770502

Xiang et al „Activation of GPR55 attenuates cognitive impairment, oxidative stress, neuroinflammation, and synaptic dysfunction in a streptozotocin-induced Alzheimer's mouse model" Pharmacol Biochem Behav. 2022 Jan 25;214:173340. doi: 10.1016/j.pbb.2022.173340.

2.5. Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Cardinal von Widdern J, Hohmann T, Dehghani F. Abnormal Cannabidiol Affects Production of Pro-Inflammatory Mediators and Astrocyte Wound Closure in Primary Astrocytic-Microglial Cocultures. *Molecules*. **2020**;25(3):496. doi:10.3390/molecules25030496.

In dieser aktuellen Arbeit wird beschrieben, dass die abn-CBD Behandlung von Mikroglia-Astrozyten Kokulturen keinen Einfluss auf die IL-6, aber auf die TNF- α Ausschüttung hat und, dass die Wundschließung nach Behandlung mit abn-CBD in Anwesenheit von Mikroglia herabgesenkt ist.

Allen BD et al. Mitigation of helium irradiation-induced brain injury by microglia depletion. *J Neuroinflammation* 2020 May 19;17(1):159. doi: 10.1186/s12974-020-01790-9.

Hier wurde gezeigt, dass Mikroglia an der strahleninduzierten kognitiven Beeinträchtigung beteiligt sind. Wurden sie in den Mäusen depletiert, hatten die Mäuse nach der Strahlenexposition (Helium-Ionen in weltraumrelevanter Dosis) weniger Folgeschäden.

Kiffer et al. „Effects of a 33-sequential beam galactic cosmic ray analog on male mouse behavior and evaluation of CDDO-EA as a radiation countermeasure.“ Preprint, 2021 Juli. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.07.15.451917>

In dieser Studie wurden 6 Monate alte C57Bl/6J Mäuse mit „Galactic cosmic Radiation“ also einem Gemisch aus weltraumrelevanten Schwerionen bestrahlt und auf ihr Verhalten getestet. Es zeigten sich vor allem soziale Erinnerungsverluste zwischen den Tieren. Auch die Behandlung mit CDDO-EA, einem Antioxidant, zeigte keine relevante Verbesserung des Gedächtnisverlusts.

Burket et al. "Exposure to Low (≤ 10 cGy) Doses of 4He Particles Leads to Increased Social Withdrawal and Loss of Executive Function Performance." *Radiat Res*. 2021 Juli doi: 10.1667/RADE-20-00251.1. Epub ahead of print. PMID: 34270762.

Diese Studie, welche zeitgleich zur oben genannten publiziert wurde, bestätigt den Verlust sozialer und kognitiver Flexibilität, allerdings bei Ratten, nach Niedrigdosisbestrahlung.

Su et al "Endocannabinoid System Unlocks the Puzzle of Autism Treatment via Microglia" Front Psychiatry 2021 Oct 22;12:734837. doi: 10.3389/fpsy.2021.734837.

Mikroglia exprimieren Endocannabinoid-Rezeptoren; relevant für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Hirn; evtl. Therapie für Autismus

van den Hoogen et al „Cannabinoids in Chronic Pain: Therapeutic Potential Through Microglia Modulation" Front Neural Circuits. 2022 Jan 7;15:816747. doi: 10.3389/fncir.2021.816747.

Review über die Rolle der Mikroglia und CB2 Rezeptoren bei Schmerz

Weber Boutros et al „Amifostine (WR-2721) Mitigates Cognitive Injury Induced by Heavy Ion Radiation in Male Mice and Alters Behavior and Brain Connectivity“ *Front Physiol.* 2021 Nov 16;12:770502. doi: 10.3389/fphys.2021.770502. eCollection 2021.

Wirkstoff (Amifostin) wurde getestet zur Radioprotektion im Hirn; scheint nur bei männlichem Geschlecht zu wirken

Kiffer et al „Effects of a 33-ion sequential beam galactic cosmic ray analog on male mouse behavior and evaluation of CDDO-EA as a radiation countermeasure“ *Behav Brain Res.* 2022 Feb 15;419:113677. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113677.

Test eines Wirkstoffs zur Radioprotektion gegen Weltraumstrahlung; nicht erfolgreich

Krukowski et al „The impact of deep space radiation on cognitive performance: From biological sex to biomarkers to countermeasures“ *Sci Adv.* 2021 Oct 15;7(42):eabg6702. doi: 10.1126/sciadv.abg6702. Rolle der Mikroglia(-Depletion) bei simulierter Weltraumstrahlung

Xiang et al „Activation of GPR55 attenuates cognitive impairment, oxidative stress, neuroinflammation, and synaptic dysfunction in a streptozotocin-induced Alzheimer's mouse model“ *Pharmacol Biochem Behav.* 2022 Jan 25;214:173340. doi: 10.1016/j.pbb.2022.173340.

GPR55 Rezeptoren sind an Neuroinflammation beteiligt; ein GPR55-Agonist kann kognitive Beeinträchtigungen lindern

Feng et al *Effects of 3-Methyladenine on Microglia Autophagy and Neuronal Apoptosis After Radiation-Induced Brain Injury.* *Dose Response.* 2022 May 20;20(2):15593258221100593. PMID: 35615570 doi: 10.1177/15593258221100593.

Young et al *The microglial endocannabinoid system is similarly regulated by lipopolysaccharide and interferon gamma* *J Neuroimmunol.* 2022 Sep 15;372:577971. doi: 10.1016/j.jneuroim.2022.577971. PMID: 36150252

M Kerry O'Banion “Microglia: Rheostats of space radiation effects in the CNS microenvironment” *Life Sci Space Res (Amst)* 2022 Nov;35:180-186. doi: 10.1016/j.lssr.2022.08.002.

Papa A “Development of potent and selective FAAH inhibitors with improved drug-like properties as potential tools to treat neuroinflammatory conditions” *Eur J Med Chem.* 2023 Jan 15;246:114952. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114952.

2.6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11.

Vorträge:

COSPAR Committee on Space Research (digital), 28.01.-4.2.2021)

GRAVI Meeting April 2022 “Weltraumstrahlen-induzierte Schäden und potenzielle Gegenmaßnahmen im murinen Hippocampusmodell”

Poster:

PhD Day “Effects Of Ionizing Space Radiation On The Immune Cells of the Brain” GSI
Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Darmstadt, 8.-9.3.2022

EMBO Workshop Microglia 2021 (digital) “Effects of Ionizing Space Radiation on Microglia in Murine
Brain Slice Cultures” 28.-29.10.2021

Abschlussarbeiten:

Britta Lipinski, Studiengang Biotechnologie (B.Sc), h_da Hochschule Darmstadt (Okt 2020)

Bahar Djouiai, Dissertation (Technische Universität Darmstadt), geplante Einreichung Anfang 2024