
Untersuchung von entzündungsrelevanter interzellulärer Kommunikation nach Bestrahlung in einem 3D-Haut-Modell

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation von Diplom Biologin Julia Wiedemann aus Speyer
Tag der Einreichung: 04.08.2015, Tag der Prüfung: 30.10.2015
Darmstadt, 2016 – D 17

1. Gutachten: Prof. Dr. Marco Durante
2. Gutachten: Prof. Dr. Paul G. Layer



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

GSII

Untersuchung von entzündungsrelevanter interzellulärer Kommunikation nach Bestrahlung in einem 3D-Haut-Modell

Genehmigte Dissertation von Diplom Biologin Julia Wiedemann aus Speyer

1. Gutachten: Prof. Dr. Marco Durante
2. Gutachten: Prof. Dr. Paul G. Layer

Tag der Einreichung: 04.08.2015

Tag der Prüfung: 30.10.2015

Darmstadt, 2016 – D 17

Bitte zitieren Sie dieses Dokument als:

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-54301

URL: <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/5430>

Dieses Dokument wird bereitgestellt von tuprints,

E-Publishing-Service der TU Darmstadt

<http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de>

tuprints@ulb.tu-darmstadt.de



Die Veröffentlichung steht unter folgender Creative Commons Lizenz:

Namensnennung – Keine kommerzielle Nutzung – Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

*Alles Wissen und alle Vermehrung
unseres Wissens endet nicht mit
einem Schlusspunkt, sondern mit
Fragezeichen.*

HERMANN HESSE



Abstract

The skin is the first target to be exposed in any diagnostic or therapeutic radiation treatment. On one hand this can lead to severe side effects for high doses used in therapy. On the other hand the anti-inflammatory effects of low dose irradiation are used clinically for the treatment of chronic inflammatory diseases. Up to now there are only a few data available in the literature dealing with the molecular mechanisms behind this anti-inflammatory low dose effect in human skin. Effects of carbon-ion irradiation on human skin equivalents or human skin explants are not published yet and data for X-ray and UV-B are rare.

In this work a systematic overview of the effects for three different radiation qualities (X-ray, carbon ions and UV-B) on model systems for human skin with a different complexity should be given. Apoptosis, cytokine release and several morphological and structural changes have been investigated in monocultures of keratinocytes, co-cultures of keratinocytes and fibroblasts and human skin equivalents. Furthermore an ethical vote has been approved by the ethical commission and the culture and irradiation of human skin explants was established in our lab.

Apoptosis or necrosis as forms of cell death are not playing a significant role after ionizing radiation in all model systems. Only after UV-B irradiation significant amounts of apoptotic cells are detected in monocultures. The cytokine release shows a pro-inflammatory pattern with enhanced IL-1 α -, IL-6- and IL-8-levels for all radiation qualities and model systems. Only the kinetics differ between the radiation qualities. UV-B shows an early effect within 24 h, X-ray instead results in a long lasting effect visible 24 h and 48 h after irradiation and carbon ions lead to a later effect starting 48 h after irradiation.

Changes in the structure and morphology and also in the differentiation process were observed after irradiation. In this work a quantitative or semiquantitative analysis for the occurrence of parakeratosis, hyperkeratosis, pyknotic nuclei in the vital epidermis and a changed morphology in the basal layer is presented for the first time in comparison for different radiation qualities. For higher X-ray and carbon-ion doses an accelerated differentiation is measurable as hyperkeratosis. Parakeratosis was detected after high carbon-ion doses and UV-B intensities and on a lower level for high X-ray doses. For low X-ray doses a cobblestoned morphology of the basal cells was observed more often than for higher doses and other radiation qualities. In addition an enhanced proliferation and a changed expression pattern of E-cadherin was found after low dose X-ray irradiation.

All the observed changes after irradiation with any radiation quality point to a pro-inflammatory effect which is less pronounced for low doses. A higher efficiency was not detected for the endpoints investigated.

First results for human skin support the observed changes in skin equivalents and reveal that the

presence of Langerhans cells does not change the irradiation effect completely. With the ethical approval, the establishment of the culture and irradiation procedure and the quantitative analysis a first step towards a better understanding of irradiation effects on human skin is done.

Zusammenfassung

Die Haut wird bei der Bestrahlung zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken, wie zum Beispiel der Tumorthherapie, immer mitbestrahlt. Dies kann bei hohen Dosen, wie sie für die Tumorthherapie angewandt werden, zu unerwünschten Nebeneffekten führen, bei niedrigen Dosen aber auch einen positiven, anti-entzündlichen Effekt haben, den man sich bei der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen zu Nutze macht. Es gibt bisher nur sehr wenige aussagekräftige Daten in der Literatur, die Aufschluss über die Wirkmechanismen der Niedrigdosisbestrahlung, insbesondere auf humane Haut, geben. Für die Bestrahlung von Hautäquivalenten oder Hautexplantaten mit Kohlenstoffionen liegen keine publizierten Daten vor und auch für Röntgen- und UV-B-Bestrahlung sind diese meist lückenhaft.

Ziel dieser Arbeit war es, eine systematische Übersicht über die verschiedenen auftretenden Effekte hinsichtlich Zelltod, Zytokinfreisetzung und struktureller und morphologischer Veränderungen nach der Bestrahlung mit ionisierender Röntgen- und Kohlenstoffbestrahlung verglichen zu nicht-ionisierender UV-B-Strahlung zu geben. Hierfür wurden Modellsysteme verschiedener Komplexität verwendet, die von Keratinozyten-Monokulturen über Co-Kulturen bis hin zu humanen Hautäquivalenten reicht. Ausserdem ermöglichte ein, in Zusammenarbeit mit der Hautklinik Darmstadt gestellter, Ethikantrag die Untersuchung humaner Haut *in vitro*.

Zelltod spielt nach ionisierender Strahlung weder in Form von Apoptose noch Nekrose eine Rolle. Lediglich nach UV-B-Bestrahlung konnte in Monokulturen von Keratinozyten klassische, Caspase 3-abhängige Apoptose detektiert werden. Die Zytokinfreisetzung zeigt für alle Strahlenqualitäten und Modellsysteme ein pro-inflammatorisches Muster, welches durch die Erhöhung der IL-1 α -, IL-6- und IL-8-Freisetzung charakterisiert ist. Je nach Strahlenqualität unterscheidet sich die Kinetik der Zytokinfreisetzung. Nach UV-B-Bestrahlung kommt es zu einer sehr schnellen Reaktion, die 48 h nach der Bestrahlung bereits größtenteils abgeschlossen ist, während sie bei Röntgenbestrahlung 24 h und 48 h und bei Kohlenstoffbestrahlung erst 48 h nach der Bestrahlung auftritt.

Durch die Bestrahlung kommt es zu verschiedenen Veränderungen der Struktur und Morphologie als auch der Differenzierung der Hautäquivalente. In dieser Arbeit wurde erstmals Parakeratose, das Auftreten von pyknotischen Kernen in der vitalen Epidermis, Hyperkeratose und die Struktur der Basalzellen nach der Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten quantitativ bzw. semiquantitativ ausgewertet und verglichen. Nach der Bestrahlung mit höheren Dosen Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen kommt es zu einer beschleunigten Differenzierung, die sich als Hyperkeratose äussert. Parakeratose, die durch eine fehlerhafte Differenzierung zustande kommt, tritt vermehrt nach hohen Intensitäten UV-B-Strahlung und höheren Dosen

Kohlenstoffionen und seltener für hohe Dosen Röntgenstrahlung von 10 Gy auf. Insbesondere für niedrige Dosen Röntgenstrahlung tritt ein Polaritätsverlust der Basalzellen auf. Ausserdem ist für diese Dosis sowohl die Proliferation erhöht, als auch das Expressionsmuster von E-Cadherin verändert.

Die hier beobachteten Veränderungen nach Bestrahlung zeigen, dass es für alle Bestrahlungsarten zu einem pro-inflammatorischen Effekt kommt, der für niedrige Dosen lediglich schwächer ausgeprägt ist. Ein Hinweis auf eine höhere Effektivität von Kohlenstoffionen konnte trotz des höheren LETs bei den hier betrachteten Endpunkten ebenfalls nicht gezeigt werden.

Erste Versuche für humane Haut haben die Ergebnisse für Hautäquivalente weitestgehend bestätigt und zeigen, dass die Anwesenheit von Langerhanszellen die Effekte auf Bestrahlung nicht grundlegend verändert. Der im Rahmen dieser Arbeit eingereichte und bewilligte Ethikantrag und die Etablierung der Kultivierung und Bestrahlung humaner Hautexplantate hat hier den Weg für weitere Versuche geebnet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	15
1.1	Zielsetzung und Motivation	15
1.2	Humane Haut	16
1.2.1	Aufbau und Funktion	16
1.2.2	Differenzierung	17
1.2.3	Weitere Zelltypen in der Epidermis	20
1.2.4	Modellsysteme der Haut	21
1.3	Physikalische Grundlagen der Bestrahlung	24
1.3.1	Ionisierende Strahlung	25
1.3.2	Nicht-ionisierende Strahlung	28
1.3.3	Auswirkung von Strahlung auf Zellen und Gewebe	30
1.4	Apoptose	31
1.5	Entzündungsreaktion	33
1.6	Zytokine	35
1.6.1	Pro-inflammatorische Zytokine	35
1.6.2	Anti-inflammatorische Zytokine	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Material	37
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	37
2.1.2	Medien, Zusätze und Reagenzien zur Zell- und Gewebekultur	38
2.1.3	Antikörper	39
2.1.4	verwendete Kits	39
2.1.5	Lösungen und Puffer	40
2.1.6	Verbrauchsmaterial	43
2.1.7	Laborgeräte	44
2.2	Methoden	44
2.2.1	Zellkultur	44
2.2.2	Gewebekultur	46
2.2.3	Bestrahlung	47
2.2.4	Probennahme	48
2.2.5	Zellzyklusanalyse zur Bestimmung des Sub-G1-Anteils	49
2.2.6	Histologie	49
2.2.7	Proteinexpressionsanalyse	54
2.2.8	Messung der Zytokinfreisetzung mit ELISA	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Monokulturen primärer Keratinozyten	59
3.1.1	Apoptose und Nekrose	59
3.1.2	Zytokinfreisetzung	64



3.2	Co-Kulturen aus primären Keratinozyten und Fibroblasten	66
3.2.1	Apoptose und Nekrose	66
3.2.2	Zytokinfreisetzung	68
3.3	Humanes Hautäquivalent EFT400	71
3.3.1	Differenzierung des Hautäquivalents während der Kultivierung	71
3.3.2	Zelltod nach Bestrahlung	72
3.3.3	Effekte der Bestrahlung auf die Struktur und Differenzierung der Epidermis	81
3.3.4	Zytokinfreisetzung	97
3.4	Humane Haut	101
3.4.1	Etablierung eines Kultursystems für humane Haut	101
3.4.2	Bestrahlung humaner Haut	106
3.5	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	117
4	Diskussion	119
4.1	Etablierung einer Co-Kultur aus Keratinozyten und Fibroblasten	120
4.1.1	Eine Co-Kultur von Keratinozyten und Fibroblasten ermöglicht die Kom- munikation der beiden Zelltypen	120
4.2	Etablierung der Kultivierung humaner Haut	121
4.2.1	Die Kultivierung humaner Haut ist <i>ex vivo</i> für bis zu 4 Tage möglich	121
4.2.2	Langerhanszellen bleiben während der Kultivierungsdauer erhalten	122
4.3	Zelltod nach Bestrahlung	124
4.3.1	Nekrose spielt nach der Bestrahlung von Mono- und Co-Kulturen als auch von Hautäquivalenten keine Rolle	124
4.3.2	Monokulturen, Co-Kulturen und humane Hautäquivalente zeigen nach io- nisierender Bestrahlung keine Apoptose	126
4.3.3	Monokulturen zeigen nach UV-B-Bestrahlung Anzeichen von Apoptose . . .	128
4.3.4	Pyknotische Zellen in der Epidermis von humanen Hautäquivalenten tren- nen nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung auf . .	129
4.3.5	Trotz der Anwesenheit von Langerhanszellen in humaner Haut induziert Bestrahlung keine Apoptose	130
4.4	Zytokinfreisetzung nach Bestrahlung	131
4.4.1	Die Bestrahlung mit UV-B-Strahlung kann die IL-6 und IL-8 Freisetzung in Keratinozyten induzieren	132
4.4.2	IL-2 und TGF-beta sind nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung in Monokulturen von Keratinozyten erhöht	133
4.4.3	In Co-Kulturen kommt es nach der Bestrahlung zu einer deutlichen Erhö- hung der IL-6 und IL-8 Freisetzung	134
4.4.4	Die IL-1alpha-Freisetzung ist in Co-Kulturen sowohl nach Röntgen- als auch nach UV-B-Bestrahlung erhöht	135
4.4.5	Die Zytokinfreisetzung von Monokulturen primärer Keratinozyten und Co-Kulturen gibt keinen Hinweis auf einen anti-inflammatorischen Effekt nach Niedrigdosisbestrahlung	136
4.4.6	Die Freisetzung von IL-6, IL-8 und IL-1alpha durch Hautäquivalenten ist nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung erhöht	136
4.4.7	Nach der Bestrahlung von Hautäquivalenten mit Kohlenstoffionen ist die IL-10 und IL-8 Freisetzung erhöht	137

4.4.8	Nach der UV-B-Bestrahlung von Hautäquivalenten kommt es zu einem frühen, transienten pro-inflammatorischen Effekt	138
4.4.9	Die Zytokinfreisetzung aller Modellsysteme zeigt keinen spezifischen Niedrigdosiseffekt und weist nicht auf eine anti-entzündliche Reaktion hin	139
4.4.10	Nach der Bestrahlung von humaner Haut mit niedriger und fraktionierter Röntgenstrahlung ändert sich die Freisetzung der untersuchten Zytokine kaum	139
4.5	Gewebeorganisation und Differenzierung der Epidermis in humanen Hautäquivalenten	140
4.5.1	Parakeratose tritt hauptsächlich nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen oder UV-B auf	141
4.5.2	Pyknotische Kerne in der Epidermis nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen oder UV-B könnten eine Vorstufe der Parakeratose sein	143
4.5.3	Hyperkeratose kommt nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen vor	144
4.5.4	Nach Bestrahlung verändert sich die Struktur der Basalschicht und die Polarität der Basalzellen	144
4.5.5	Nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlung kommt es zu einer erhöhten Proliferation	145
4.5.6	Insbesondere nach der Niedrigdosis Bestrahlung mit Röntgenstrahlung verändert sich die E-Cadherin-Expression	146
4.6	Schlussfolgerung	147
4.7	Ausblick	150

Publikationsliste	iii
Lebenslauf	v
Danksagung	vi
Erklärung	viii

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Querschnitt durch die Haut	17
1.2	Differenzierung der Epidermis	18
1.3	Genexpression in der Epidermis während des Differenzierungsprozess	19
1.4	Übersicht über die Modellsysteme der Haut	22
1.5	Schematische Darstellung der verwendeten Modellsysteme der Haut	23
1.6	Dosis-Verteilung bei einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen im Vergleich zu Kohlenstoffionen	26
1.7	Tiefendosisprofil	27
1.8	Absorption der UV-Strahlen	29
1.9	Eindringtiefe der UV-Strahlen in die Haut	29
1.10	Mechanismen der Apoptose und Nekrose	32
1.11	Apoptosesignalweg in Keratinozyten	33
1.12	Einleitung einer Entzündungsreaktion in humaner Haut	34
3.1	Westernblotanalyse von NHEK-Monokulturen nach Röntgenbestrahlung	61
3.2	Westernblotanalyse von NHEK-Monokulturen nach Kohlenstoffbestrahlung	61
3.3	Westernblotanalyse von NHEK-Monokulturen nach UV-B-Bestrahlung	62
3.4	Sub-G1-Analyse von NHEK-Monokulturen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung	63
3.5	Freisetzung von HMGB1 in NHEK-Monokulturen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung	64
3.6	Zytokinfreisetzung von NHEK-Monokulturen	65
3.7	Westernblotanalyse von Co-Kulturen nach Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung	67
3.8	HMGB1-Freisetzung von Co-Kulturen nach Bestrahlung	67
3.9	Absolute HMGB1 Freisetzung von Mono- und Co-Kulturen	68
3.10	IL-1alpha und TGF-beta Freisetzung von NHEK- und NHDF-Monokulturen und Co-Kulturen	69
3.11	Zytokinfreisetzung von Co-Kulturen nach Bestrahlung	70
3.12	Differenzierung des Hautäquivalents EFT400	72
3.13	Detektion aktiver Caspase 3 nach Röntgenstrahlung im Hautäquivalent EFT400	73
3.14	Detektion aktiver Caspase 3 nach niedrigen Dosen Röntgenstrahlung im Hautäquivalent EFT400	74
3.15	Detektion aktiver Caspase 3 nach Kohlenstoffbestrahlung im Hautäquivalent EFT400	75
3.16	Detektion aktiver Caspase 3 nach UV-B-Bestrahlung im Hautäquivalent EFT400	76
3.17	Westernblotanalyse von Caspase 3 und PARP nach Röntgenbestrahlung im Hautäquivalent EFT400	77
3.18	Westernblotanalyse von Caspase 3 und PARP nach niedrigen Dosen Röntgenstrahlung im Hautäquivalent EFT400	78

3.19 Westernblotanalyse von Caspase 3 und PARP nach Kohlenstoffbestrahlung im Hautäquivalent EFT400	79
3.20 Westernblotanalyse von Caspase 3 und PARP nach UV-B-Bestrahlung im Hautäquivalent EFT400	80
3.21 Mögliche morphologische und strukturelle Veränderungen der Hautäquivalente EFT400	82
3.22 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebsschnitten nach Röntgenbestrahlung	83
3.23 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebsschnitten nach niedrigen Dosen Röntgenstrahlung	84
3.24 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebsschnitten nach Kohlenstoffbestrahlung	85
3.25 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebsschnitten nach UV-B-Bestrahlung	87
3.26 Quantitative Auswertung der Parakeratose in den Hautäquivalenten EFT400	88
3.27 Quantitative Auswertung der Anzahl pyknotischer Zellen in der Epidermis in den Hautäquivalenten EFT400	89
3.28 Quantitative Auswertung der Dicke des <i>stratum corneum</i> s in den Hautäquivalenten EFT400	90
3.29 Quantitative Auswertung der Struktur der Basalzellen in den Hautäquivalenten EFT400	91
3.30 Detektion des Proliferationsmarkers Ki67 in den Hautäquivalenten EFT400 nach Bestrahlung	93
3.31 Quantitative Auswertung der Anzahl der Basalzellen in den Hautäquivalenten EFT400	94
3.32 Quantitative Auswertung der Anzahl der proliferierenden Zellen in der Basalschicht in den Hautäquivalenten EFT400	95
3.33 Detektion von E-Cadherin in den Hautäquivalenten EFT400 nach Bestrahlung	96
3.34 Zytokinfreisetzung von den Hautäquivalenten EFT400 nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung	98
3.35 Zytokinfreisetzung von den Hautäquivalenten EFT400 nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen oder UV-B-Strahlung	99
3.36 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Explantaten humaner Haut zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten	102
3.37 Antikörperfärbung gegen aktive Caspase 3 von Explantaten humaner Haut zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten	103
3.38 Antikörperfärbung gegen Ki67 von Explantaten humaner Haut zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten	104
3.39 Antikörperfärbung gegen CD1a von Explantaten humaner Haut zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten	105
3.40 Antikörperfärbung gegen aktive Caspase 3 von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung	107
3.41 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung I	108
3.42 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung II	109
3.43 Hematoxylin-Eosin-Färbung von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlen	110

3.44 Ki67-Färbung von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung	112
3.45 Quantitative Auswertung der Ki67-Färbung von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung	113
3.46 CD1a-Färbung von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung	114
3.47 Quantitative Auswertung der CD1a-Färbung von Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung	115
3.48 Relative Position von CD1a-positiven Langerhanszellen in Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung	115
3.49 Zytokinfreisetzung humaner Hautexplantate nach Röntgenbestrahlung	116

Tabellenverzeichnis

2.1	Dehydrierung und Paraffinierung von Gewebeproben	50
2.2	Deparaffinierung und Hydrierung von Gewebeschnitten	50
2.3	Dehydrierung von Gewebeschnitten	51
2.4	Erstantikörper für immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten	52
2.5	Zweitantikörper für immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten	52
2.6	Erstantikörper für die Detektion von Proteinen im Westernblot	56
2.7	Zweitantikörper für die Detektion von Proteinen im Westernblot	56
3.1	Konzentrationen der im <i>multiplex bead array</i> gemessenen Zytokinfreisetzungen der Kontrollen in pg/ml	97



1 Einleitung

1.1 Zielsetzung und Motivation

Die Haut ist das erste Organ, welches mit Strahlung, sowohl therapeutischen und diagnostischen aber auch natürlichen Ursprungs, in Berührung kommt. Dies kann bei hohen Dosen, wie sie beispielsweise in der Tumorthherapie eingesetzt werden, zu negativen Effekten wie Ekzemen und anderen entzündlichen Hautreaktionen führen. Andererseits sind jedoch für niedrige Dosen ionisierender Strahlung anti-inflammatorische Effekte bekannt, die klinisch seit vielen Jahrzehnten genutzt werden. Beispielsweise werden Patienten mit rheumatoider Arthritis oder chronisch entzündlichen Hauterkrankungen wie Psoriasis oder Neurodermitis in Radonheilstollen mit niedrigen Dosen Alpha-Strahlung erfolgreich behandelt. Die immunsuppressive Wirkung von UV-B-Strahlung ist klinisch ebenfalls bekannt und wird routinemäßig in der Neurodermitis-Behandlung eingesetzt.

Obwohl diese Verfahren häufig Anwendung finden, sind die Mechanismen der Wirkung insbesondere für die Niedrigdosis-Bestrahlung mit ionisierender Strahlung noch weitestgehend unbekannt. Hinzu kommt, dass viele Ansätze, die sich mit der Aufklärung dieser Mechanismen beschäftigen, hierfür beispielsweise Zellkulturen von Keratinozyten als Modellsystem verwenden. Viele solcher Ergebnisse, die in Monokulturen erzielt wurden, werden dann auf die humane Haut übertragen. Hier wird jedoch die dreidimensionale und insbesondere die sich ständig differenzierende Struktur der Epidermis nicht berücksichtigt. Ausserdem wird das Zusammenspiel zwischen den Keratinozyten der Epidermis und den Fibroblasten der Dermis ausser Acht gelassen, was große Auswirkungen auf Reaktionen der Keratinozyten haben kann.

Ziel dieser Arbeit war es, zum Verständnis von Bestrahlungseffekten auf humane Haut und insbesondere von Effekten der Niedrigdosis-Bestrahlung beizutragen. Hierbei wurden erstmals in einer Arbeit vier verschiedene Modellsysteme unterschiedlicher Komplexität verwendet, die mit ionisierender Röntgen- oder Kohlenstoff-Strahlung, als auch nicht-ionisierender UV-B-Strahlung bestrahlt wurden. Das Spektrum der Modellsysteme reicht von Keratinozyten-Monokulturen und Co-Kulturen von Fibroblasten und Keratinozyten über ein humanes, dreidimensionales Vollhautäquivalent bis hin zu einem Explantatsystem humaner Haut. Dies ermöglicht den direkten Vergleich und dadurch ein besseres Verständnis der Effekte und deren Abhängigkeit vom verwendeten Kultursystem. Ausserdem ermöglicht diese Arbeit einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Strahlenarten und deren Auswirkung auf das jeweilige Modellsystem.

Hinzu kommt, dass in der Literatur zwar Daten für humane Hautäquivalente vorliegen, diese sich jedoch meist auf die Quantifizierung von Apoptose oder Proliferation und die Messung der

Genexpressionen oder Zytokinfreisetzung beschränken. Meist werden in einem Experiment nur wenige Merkmale und nur eine spezifische Strahlenart betrachtet. Teilweise werden einzelne morphologische Aspekte, wie zum Beispiel die Dicke des *stratum corneums* oder die Anzahl der Basalzellen ausgewertet. In dieser Arbeit sollte jedoch erstmals eine Reihe verschiedener Merkmale, die unter anderem Hinweise auf den Differenzierungsstatus des Gewebes geben können, quantitativ ausgewertet und zwischen den verschiedenen Strahlenqualitäten verglichen und gegenübergestellt werden.

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist es, einen systematischen Überblick über die Effekte verschiedener Strahlenarten auf verschiedene Modellsysteme zu geben. Ausserdem können dadurch sowohl die verschiedenen Strahlenqualitäten als auch hohe und niedrige Dosen hinsichtlich ihrer Effektivität miteinander verglichen werden. Diese Ergebnisse sollen ausserdem dazu beitragen, die Mechanismen, die zu einem anti-inflammatorischen Effekt nach Niedrigdosis-Bestrahlung führen, besser zu verstehen und langfristig die Therapiemöglichkeiten von chronisch entzündlichen Erkrankungen zu verbessern und zu optimieren.

1.2 Humane Haut

1.2.1 Aufbau und Funktion

Die Haut ist das größte Organ des Menschen, macht bis zu 15 % des Körpergewichts aus und kann eine Fläche von bis zu 2 m² haben. Ein Quadratzentimeter der Haut besteht aus bis zu 3 Millionen Zellen. Die Hauptaufgabe der Haut ist der Schutz des Körpers vor physikalischen, chemischen und biologischen Einflüssen von außen, wozu beispielsweise mechanische Verletzungen, UV-Strahlung, als auch das Eindringen von Mikroorganismen gehören. Außerdem trägt die Haut zur Aufrechterhaltung vieler Vitalfunktionen, wie zum Beispiel der Thermoregulation und des Wasserhaushaltes bei.

Die Haut besteht aus drei Schichten: der Epidermis, der Dermis und dem subkutanen Gewebe (Abbildung 1.1). Die äußerste Schicht, die Epidermis, besteht hauptsächlich aus Keratinozyten die in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorliegen. Sie enthält aber auch die, für die Epidermis typischen, dendritischen Zellen, die sogenannten Langerhanszellen. Die Hauptfunktion der Keratinozyten ist die Synthese des Proteins Keratin welches maßgeblich zur protektiven Funktion der Haut beiträgt. Die Dicke der Epidermis variiert sehr stark in Abhängigkeit von der Körperregion. Mit 0,1 mm hat das Augenlid die dünnste Epidermis, während die Dicke an den Fußsohlen bis zu 1,5 mm betragen kann [1].

Die Dermis ist von der Epidermis durch die Basalmembran getrennt. Die Basalmembran ist eine Schicht, die hauptsächlich aus Typ IV Kollagen besteht, welches von den basalen Keratinozyten synthetisiert wird. Diese Schicht erlaubt den Austausch von Zellen und Flüssigkeiten zwischen

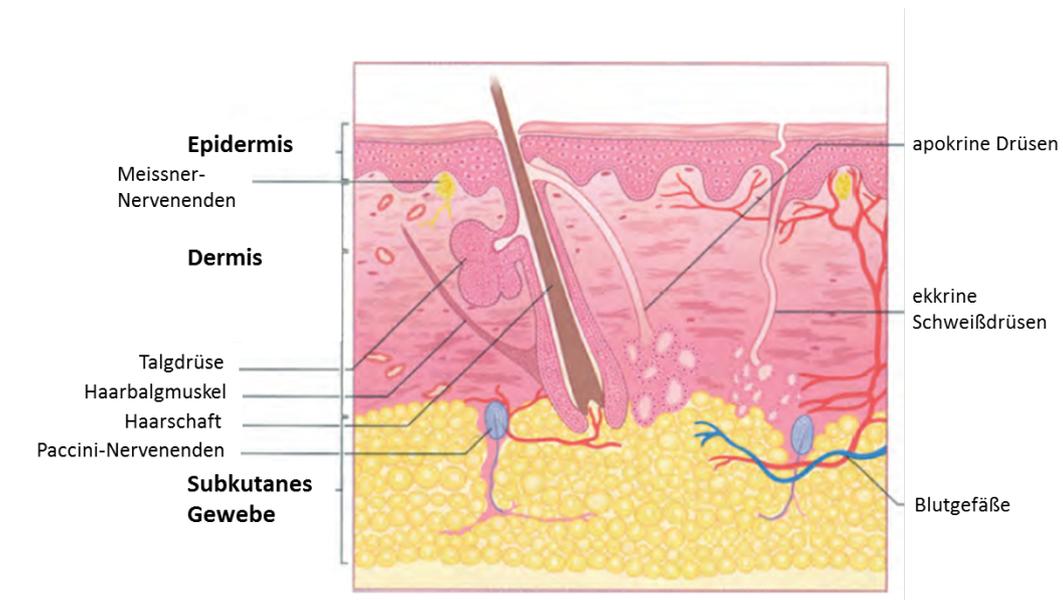


Abbildung 1.1: Schematischen Querschnitt durch die humane Haut. Gezeigt sind die drei Schichten der Haut (Epidermis, Dermis und Subkutangewebe) und die darin liegenden Drüsen; modifiziert nach [1]

Dermis und Epidermis und hält die beiden Schichten zusammen. Die Dermis besteht hauptsächlich aus Kollagen, enthält aber auch Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen. Ausserdem können Lymphozyten, Plasmazellen und andere Leukozyten durch verschiedene Stimuli in die Dermis einwandern. Die Dermis macht den größten Anteil der Haut aus und ist für deren Flexibilität, Elastizität und Druckfestigkeit verantwortlich. Dadurch schützt sie vor mechanischen Verletzungen, bindet aber auch sehr viel Wasser, verhindert so das Austrocknen und trägt zur Thermoregulation des Körpers bei. Unter der Dermis liegt das subkutane Gewebe, welches Ansammlungen von Fettzellen, den Lipozyten, enthält. Ausserdem befinden sich viele epidermale Anhangsorgane in der Haut, dazu gehören Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel. Die Dermis enthält ausserdem Blut- und Lymphgefäße, Nerven und Mechanorezeptoren.

1.2.2 Differenzierung

Die Epidermis besteht zu ca. 80% aus Keratinozyten ektodermalen Ursprungs. Während des Differenzierungsprozesses migrieren die Zellen aus der Basalschicht zur Hautoberfläche, durchlaufen dabei eine Synthese- und eine Degenerationsphase und werden schließlich zu toten Hornzellen, Corneozyten genannt, welche die Hornschicht der Haut bilden [1] (Abbildung 1.2).

In der Basalschicht, dem *stratum basale*, befinden sich pallisadenförmige Keratinozyten, welche Kontakt zur Basalmembran haben. Sie bilden eine einzige Zellschicht und sind über Desmosomen miteinander verbunden. In der Basalschicht befinden sich die mitotisch aktiven Zellen, die dafür sorgen, dass die Epidermis in der Lage ist sich ständig zu erneuern. Es sind jedoch bei Weitem nicht alle Zellen der Basalschicht so genannte epidermale Stammzellen. Die proliferie-

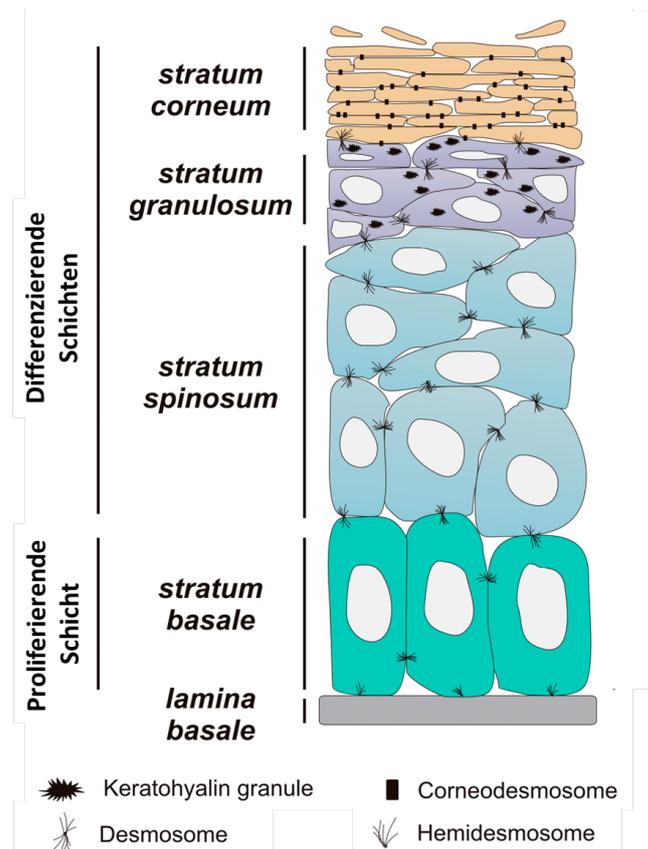


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der differenzierenden Epidermisschichten [2]

renden Zellen durchlaufen unter normalen Bedingungen den Zellzyklus sehr langsam. Durch äußere Einflüsse wie zum Beispiel Verwundung kann die Teilung der epidermalen Stammzellen stimuliert werden, was deren Anzahl erhöht.

Wenn die basalen Keratinozyten aus dem Zellzyklus austreten lösen sie sich von der Basalmembran ab und migrieren in die über dem *stratum basale* liegende Epidermisschicht, das *stratum spinosum*. Zellen dieser Schicht können sich je nach Position deutlich in ihrer Form unterscheiden. In den direkt über dem *stratum basale* liegenden suprabasalen Schichten des *stratum spinosum* sind die Zellen eher rund, während sie in äußeren Schichten bereits eine größere und abgeflachte Form annehmen. Für diese Zellen sind insbesondere Keratinosomen, granuläre, an die Plasmamembran gebundene Organellen, welche Glykoproteine, Glyko- und Phospholipide aber auch hydrolytische Enzyme wie Lipasen und Proteasen enthalten, charakteristisch. In dieser Schicht werden ausserdem die Zell-Zellkontakte durch die vermehrte Ausprägung von Desmosomen verstärkt und das Keratinfilament-Netzwerk des Zytoskeletts wird dichter. Die darüber liegende Schicht der Epidermis wird als granuläre Schicht bzw. *stratum granulosum* bezeichnet. Sie enthält noch lebende, jedoch bereits deutlich abgeflachte Keratinozyten, welche die, für diese Schicht namensgebenden Keratohyalin-Granula enthalten [2].

Die Zelle produziert in diesem Stadium spezielle Proteine, wie Profilaggrin und Loricrin, die in den Granula eingelagert und für die spätere Keratinisierung benötigt werden. Während der

Verhornung werden an der Innenseite der Cytoplasmamembran Proteine mit einander verbunden und Lipide nach aussen gebracht um eine verhornte, wasserabweisende Schicht um die Zelle herum zu bilden. Ausserdem werden weitere lysosomale Enzyme produziert, da die Zelle beim Übergang zum *stratum corneum* einen finalen Differenzierungsprozess zur toten Hornzelle durchläuft und ihre Zellorganellen inklusive des Zellkerns verliert. Diese toten Hornzellen, Corneozyten genannt, schützen die Haut sowohl vor mechanischem Stress als auch vor Wasserverlust und dem Eindringen von fremden Substanzen. Sie wandern im weiteren Differenzierungsprozess der Epidermis in immer weiter aussen liegende Schichten des *stratum corneums*, verändern dabei ihren Protein- und Lipidgehalt und bauen auch ihre Desmosomen proteolytisch ab, was dann letztendlich die Abschuppung der Corneozyten, die *Desquamation*, ermöglicht. Die Differenzierung der Keratinozyten in der Epidermis ist ein Prozess, der auf molekularer Ebene durch die Expression verschiedener spezifischer Genprogramme gesteuert wird (Abbildung 1.3) . Durch die strenge Regulierung der Expressionsmuster wird die Homöostase der Haut aufrecht erhalten und Apoptose und Proliferation in einem Gleichgewicht gehalten.

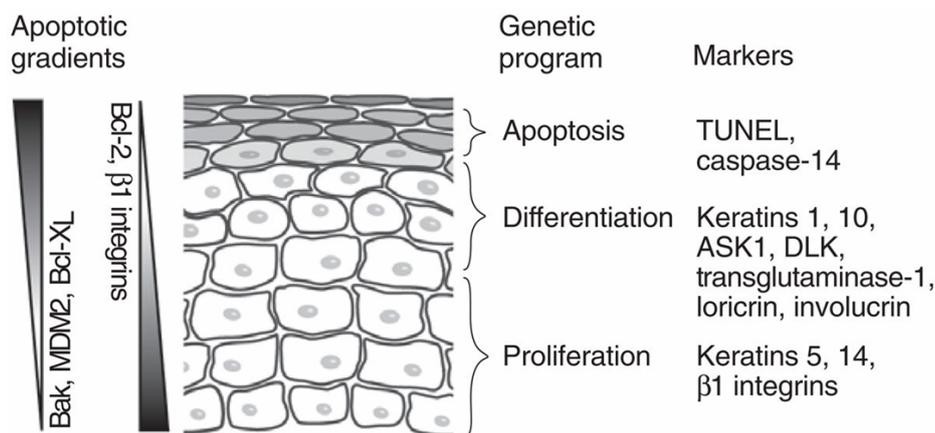


Abbildung 1.3: Charakteristische Genexpressionsprogramme während dem Differenzierungsprozess in der Epidermis [3]

Während die Zellen in der Basalschicht Keratin 5 und 14 exprimieren, wird diese Expression in den differenzierenden Zellen des *stratum spinosum* und *stratum granulosum* reduziert und die Expression der Keratine 1 und 10 wird erhöht. Die Signalmoleküle ASK1 und DLK werden aktiviert und triggern das Differenzierungsprogramm der Keratinozyten. Wenn diese ein bestimmtes Differenzierungsstadium erreicht haben exprimieren sie Marker wie Transglutaminase-1, Loricrin und Involucrin. In den oberen Schichten des *stratum spinosums*, in der die Transition zu Corneozyten stattfindet, ist eine Expression von Caspase 14 charakteristisch, ausserdem sind die bereits toten Zellen TUNEL-positiv. Andere Gene, insbesondere die, die für die Induktion von Apoptose zuständig sind, liegen in Gradienten in der Epidermis vor. Beispielsweise wird das vor Apoptose schützende Gen Bcl-2 stark in der Basalschicht exprimiert und nimmt zu äusseren

Schichten hin ab. Das apoptosefördernde Gen Bak und der p53-Inhibitor MDM2 nimmt von geringen Expressionsleveln in der Basalschicht zu äusseren Schichten hin zu [3].

1.2.3 Weitere Zelltypen in der Epidermis

Den größten Anteil der Zellen in der Epidermis machen die Keratinozyten aus. Jedoch kommen auch andere Zelltypen, wenn auch in deutlich geringerer Anzahl, in der Epidermis vor. Dies sind Melanozyten, Merkelzellen und Langerhanszellen.

Melanozyten sind dendritische, ursprünglich aus der Neuralleiste ausgewanderte Zellen, die hauptsächlich in der Basalschicht lokalisiert sind und dort ca 5-10 % der Zellen ausmachen [4]. Ihre Hauptaufgabe ist die Synthese des Pigments Melanin, welches für die Pigmentierung der Haut verantwortlich ist. Das Melanin wird in runden, membrangebundenen Organellen, die Melanosome genannt werden, synthetisiert. Diese werden in die Fortsätze der Melanozyten transportiert und von dort an die umliegenden Keratinozyten abgegeben [5]. Die Stärke der Hautpigmentierung ist abhängig davon, wieviele Melanosome pro Melanozyt und wieviel Melanin pro Melanosom produziert werden, aber auch davon, wieviele Melanosomen in die Keratinozyten transferiert werden und wie schnell diese dort abgebaut werden. Durch UV-Strahlung wird der Transfer von Melanosomen in die Keratinozyten angeregt, was zu einer intensiveren Pigmentierung der Haut führt. Die Fähigkeit der Keratinozyten Licht und UV-Strahlung zu absorbieren wird dadurch gesteigert, was den Kern und damit die DNA vor Schäden schützt.

Merkelzellen sind insbesondere in den Fingerspitzen, den Zehen, den Lippen, dem Mund und um die Haarfollikel lokalisiert. Es handelt sich um Mechanorezeptoren, die bereits auf sehr geringe Deformationen der umliegenden Keratinozyten reagieren und ein Aktionspotential auslösen können. Ihre hohe Anzahl in bestimmten Körperregionen, wie zum Beispiel den Fingerspitzen, ermöglicht in diesen Bereichen eine taktile Wahrnehmung mit einer sehr hohen Auflösung [6].

Langerhanszellen (LCs) sind die antigen-präsentierenden dendritischen Zellen der Epidermis und machen dort einen Anteil von 2-8 % der Zellen aus [1]. Sie stammen aus dem Knochenmark und wandern in der frühen Embryonalentwicklung in suprabasale Schichten der Haut. Charakteristische für Langerhanszellen sind granuläre, tennisschlägerförmige Organellen, die im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden können und hauptsächlich aus dem Molekül Langerin/CD207 bestehen. Sie sind inaktiv in der Epidermis vorhanden und werden nur nach dem Eindringen von Antigenen aktiv und phagozytieren diese. Danach durchlaufen sie einen Reifungsprozess und differenzieren zu reifen dendritischen Zellen. Die Fähigkeit Antigene zu prozessieren wird aktiv, die Expression von Chemokin-Rezeptoren wird hoch und die E-Cadherin-Expression herunter reguliert, was die Migration zu den Lymphknoten ermöglicht [7]. Dort stimulieren sie T-Lymphozyten, welche dann die Immunantwort einleiten [8]. Ausser Langerin sind auch CD1a und HLA-DR Marker für Langerhanszellen. Ausserdem ist mittlerweile

bekannt, dass Langerin nicht ausschließlich von Langerhanszellen exprimiert wird sondern auch von dermalen und in den Lymphknoten residierenden dendritischen Zellen [9].

1.2.4 Modellsysteme der Haut

Um die Einflüsse von äußeren Faktoren wie Chemikalien, Verwundungen aber auch Strahlung auf die Haut zu untersuchen, können viele verschiedene Modellsysteme verwendet werden. Diese unterscheiden sich je nach Anwendung und Fragestellung sehr stark in ihrer Komplexität. Während für manche Untersuchungen die Verwendung eines einzigen Zelltyps der Haut, beispielsweise den Keratinozyten als Monokultur, ausreichend ist, ist es für andere Untersuchungen wichtig dem *in vivo* System so nahe wie möglich zu kommen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Sensitivität der Zellen gegenüber Stress und Umwelteinflüssen sehr stark davon abhängig ist, ob sie zwei- oder dreidimensional kultiviert werden. Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, integrin-vermitteltes Signaling und die Morphologie der Einzelzellen spielt hierbei eine große Rolle [10].

In dieser Arbeit werden verschiedene Modellsysteme verwendet, die unterschiedlichen Anforderungen entsprechen und sich in ihrer Komplexität sehr stark unterscheiden (Abbildung 1.4). Um die Reaktionen nach einer Bestrahlung besser verstehen zu können, ist es wichtig für erste Versuche ein Modellsysteme zu nutzen, das die Haut, welche *in vivo* ein sehr komplexes System ist, vereinfacht. Aus diesem Grund werden häufig Monokulturen von Keratinozyten verwendet. In der Literatur findet man sehr viele Arbeiten, in denen die immortale Zelllinie HaCaT verwendet wird. Diese Zelllinie geht auf die spontane Immortalisierung von *in vitro* kultivierten humanen Keratinozyten, die aus histologisch unauffälliger adulter Haut isoliert wurden, zurück [11]. Jedoch liegt bei immortalen Zelllinien meist eine p53-Mutation vor [12], was Auswirkungen auf die Induzierbarkeit von Apoptose haben kann. Deshalb ist man in der vorliegenden Arbeit sehr schnell dazu übergegangen primäre Keratinozyten zu verwenden.

NHEK (normal human epidermal keratinocytes) werden aus humaner Haut gesunder Spender isoliert und werden kommerziell vertrieben. Sie können laut Herstellerangabe bis zu einer CPD (*cummulative population doubling*) von 18 kultiviert werden ohne zu differenzieren. Zellen werden häufig als Testsystem verwendet um herauszufinden, ob verschiedene chemische Substanzen, welche zum Beispiel in der Kosmetikindustrie verwendet werden sollen, Hautirritationen hervorrufen [13], [14]. Man versucht so den Bedarf an Tierexperimenten möglichst gering zu halten und diese weitestgehend durch geeignete *in vitro*-Modelle zu ersetzen. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Tests an Monokulturen auch, dass dies nur begrenzt möglich ist. Eine Studie mit verschiedenen Chemikalien zeigte, dass es zwar insgesamt eine gute Korrelation zwischen den Daten aus Tierversuchen und dem *in vitro*-Testsystem gibt, dies jedoch nicht bei allen untersuchten Kriterien der Fall war. Aus diesem Grund wurden Testsysteme entwickelt, die die *in vivo*-Bedingungen besser abbilden sollen. Eine einfache Möglichkeit ist die Co-Kultivierung

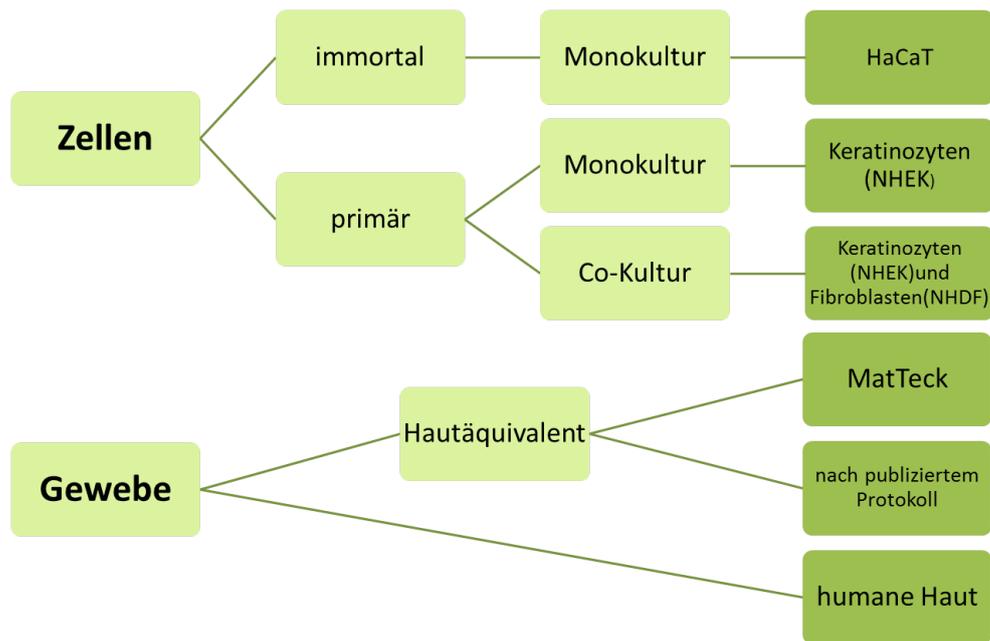


Abbildung 1.4: Übersicht über die *in vitro* Modellsysteme der Haut unterteilt nach Zellkulturen und Gewebekulturen und hierarchisch nach ihrer Komplexität sortiert

von NHEK mit humanen, epidermalen Fibroblasten (NHDF). Hierbei werden Keratinozyten und Fibroblasten entweder so kultiviert, dass sie direkten Kontakt zueinander haben, oder eine Kommunikation über die Freisetzung von Faktoren und Zytokinen in das Medium möglich ist. Dies erreicht man beispielsweise indem eine Zellsorte in Einsätzen für Zellkulturplatten kultiviert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Zell-Zell-Kommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten eine wichtige Rolle, insbesondere hinsichtlich der Zytokinfreisetzung dieser beiden Zelltypen spielt. Beispielsweise wird die TGF-beta als auch die IL-1alpha Freisetzung der Fibroblasten durch die Anwesenheit von Keratinozyten gehemmt [15]. Ausserdem wurde gezeigt, dass Co-Kulturen der beiden Hautzelltypen auf Chemikalien, die Hautirritationen hervorrufen, deutlich weniger sensitiv reagieren, als Monokulturen. Die Unterschiede betragen bis zu einer Größenordnung [16]. Dies zeigt, dass die Co-Kultivierung und die dadurch ermöglichte Kommunikation der beiden Zelltypen eine bedeutende Rolle bei der Reaktion auf äussere Einflüsse spielt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Co-Kultursystem handelt es sich um Monolayerkulturen von Keratinozyten und Fibroblasten, die dadurch in eine Co-Kultur gebracht werden, dass die Keratinozyten auf dem Boden einer 6-well-Zellkulturplatte wachsen, in die ein Zellkulturinsert eingesetzt wird, in das Fibroblasten eingesät wurden (Abbildung 1.5). Dies hat den Vorteil, dass die beiden Monolayerkulturen zu einer Behandlung, beispielsweise der Bestrahlung, wieder getrennt werden können. Allerdings ist bei allen Co-Kultursystemen, die nur auf das räumliche Zusammenbringen von zwei verschiedenen Zelltypen als Monokulturen beruhen, zu bedenken, dass die einzelnen Zellen in diesem Fall trotzdem in einem zweidimensionalen System wachsen.

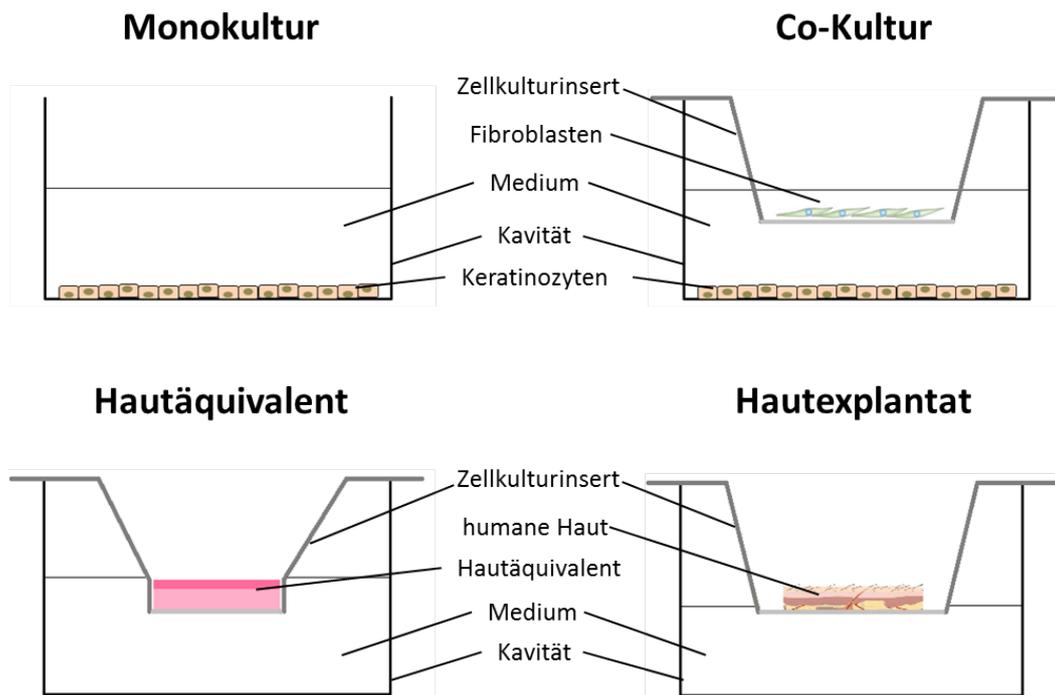


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der verwendeten Modellsysteme der Haut

Da jedoch, wie bereits erwähnt, das Verhalten der einzelnen Zellen sehr unterschiedlich sein kann, abhängig davon, ob sie in einem zwei- oder dreidimensionalen System kultiviert werden [10], wurde in dieser Arbeit ein humanes Vollhautmodell verwendet. Bei diesen Modellen werden die Fibroblasten in eine Matrix aus Kollagen eingesät. Dies ermöglicht nicht nur das dreidimensionale Wachstum und damit eine andere Geometrie der Zellen, sondern sowohl die Migration der Fibroblasten als auch die aktive Modellierung der extrazellulären Matrix [17]. Auf der Kollagenmatrix, die sich in hängenden Zellkulturinserts befindet, werden Keratinozyten kultiviert bis sie eine Konfluenz erreicht haben. Danach wird der Medienspiegel soweit abgesenkt, dass die Keratinozyten an der Oberseite luftexponiert sind, das heisst sich an der sogenannten *air liquid interface (ALI)* befinden. Dies führt dazu, dass die Keratinozyten beginnen zu differenzieren, während dem Differenzierungsprozess nach oben wandern und die verschiedenen Schichten der Haut ausbilden, bis sie schließlich völlig ausdifferenziert das *stratum corneum* bilden. Die Herstellung solcher Hautäquivalente ist sehr zeitaufwendig, sehr schwer zu standardisieren und stark von der Qualität der verwendeten Zellen abhängig. Um diese Schwankungen zu minimieren wurde in dieser Arbeit auf ein kommerziell verfügbares Hautmodell der Firma MatTek zurückgegriffen, welches eine bessere Reproduzierbarkeit der Experimente ermöglicht. Obwohl diese dreidimensionalen Hautmodelle bereits sehr nah an die *in vivo*-Situation herankommen, haben auch diese Modelle Grenzen bei der Nachbildung der in der Haut tatsächlich vorherrschenden Bedingungen. Der größte Nachteil der Modelle ist das Fehlen der in der Epi-

dermis residierenden Immunzellen, den so genannten Langerhanszellen. Dies bedeutet, dass in diesen Modellen lediglich die Reaktion auf äussere Einflüsse beobachtet werden kann, die unabhängig vom Immunsystem ist. Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht in dreidimensionale Hautäquivalente Langerhanszellen oder ähnliche Immunzellen zu integrieren [18], [19], [20]. Jedoch können Langerhanszellen zwar aus der humanen Epidermis isoliert werden, verlieren danach jedoch sehr schnell ihre Viabilität [21]. Humane Zelllinien, die die typischen Eigenschaften der dendritischen Zellen gut widerspiegeln und in ein Hautäquivalent integriert werden könnten sind nicht verfügbar. In verschiedenen Publikationen wird deshalb die MUTZ-3 Zelllinie für Co-Kulturen oder die Integration in ein Hautmodell verwendet. Dabei handelt es sich um eine zytokin-abhängige Leukämie-Zelllinie, die mit Hilfe eines Zytokin-Cocktails, der GM-CSF, TGF-beta und IL-1alpha enthält, zu langerhans-ähnlichen Zellen differenziert werden kann [20]. Diese konnten erfolgreich in dreidimensionale Hautäquivalente integriert werden. Allerdings bleibt fraglich, wie gut diese Zellen das Verhalten humaner Langerhanszellen widerspiegeln, da gezeigt wurde, dass diese langerhans-ähnlichen Zellen beispielsweise bei *in vitro* Versuchen nur auf sehr starke Allergene in hohen Konzentrationen kurz vor der Zytotoxizität reagieren und die für Langerhanszellen typischen Eigenschaften und Reaktionen zeigen [22]. Da in dieser Arbeit insbesondere auch die Reaktionen auf geringe Bestrahlungsdosen untersucht werden sollen, eignen sich die Hautäquivalente mit integrierten dendritischen Zellen nicht für diese Untersuchungen, da man nicht sicher sein kann, dass diese darauf reagieren. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro*-Kultursystem für humane Haut etabliert, mit dessen Hilfe die Haut für vier bis fünf Tage in Kultur gehalten und bestrahlt werden kann. Dies ermöglicht es, die Bestrahlungseffekte an einem System zu beobachten, das der *in vivo* Situation sehr nahe kommt, ohne dass aufwendige und ethisch problematische *in vivo*-Versuche notwendig sind.

1.3 Physikalische Grundlagen der Bestrahlung

Seit der Entdeckung der Radioaktivität wird diese sowohl für diagnostische als auch für therapeutische Zwecke genutzt. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts begann man Radium für die Krebstherapie einzusetzen, hatte aber auch verstanden, dass die Bestrahlung nicht nur medizinischen Nutzen sondern auch Gefahren birgt. Den ersten dokumentierten, biologischen Bestrahlungseffekt musste Becquerel, der ein Behältnis mit Radium in seiner Jackentasche vergessen hatte, am eigenen Leib erfahren. Er dokumentierte ein Erythem und die spätere Bildung eines Geschwürs an der bestrahlten Hautstelle [23]. Obwohl mittlerweile die molekularen Mechanismen, die hinter Bestrahlungseffekten stehen deutlich besser erforscht sind, lassen sich solche Effekte zum Beispiel als unerwünschte Nebeneffekte einer Tumorbstrahlung nicht komplett verhindern. Ungefähr zeitgleich mit der Entdeckung, dass Bestrahlung zur Behandlung von Krebs eingesetzt werden kann, haben Sokoloff und Stenbeck festgestellt, dass die Bestrah-

lung mit niedrigen Dosen zu einer Schmerzlinderung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis führt. Seitdem werden niedrige Dosen verschiedener Strahlungsarten therapeutisch zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen der Gelenke, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis oder Morbus Bechterew, aber auch für die Behandlung chronisch, entzündlicher Hautkrankheiten wie Psoriasis eingesetzt [24]. Insbesondere ist hier die Radon-Therapie in Heilstollen oder Bädern zu nennen, bei welcher der Patient lokal geringe Dosen Alpha-Strahlung erhält [25], [26]. Auch niedrige Dosen Röntgenstrahlung werden für therapeutische Zwecke genutzt [27], [28]. Welche Mechanismen diesen anti-inflammatorischen Effekten jedoch zugrunde liegen ist noch weitestgehend unbekannt.

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die physikalischen Grundlagen und die hier verwendeten Strahlenqualitäten und ihren Eigenschaften gegeben.

1.3.1 Ionisierende Strahlung

Allgemein versteht man unter dem Begriff Strahlung die Ausbreitung von Wellen oder Teilchen im Raum. Wenn Strahlung genügend Energie besitzt, ein oder mehrere Elektronen aus einem Atom oder Molekül zu entfernen, spricht man von ionisierender Strahlung. Der Prozess des Herauslösen eines Elektrons selbst wird als Ionisation bezeichnet. Pro Ionisationsevent wird eine Energie von ca. 33 eV deponiert, was ausreichend ist um starke chemische Bindungen, wie beispielsweise Kohlenstoffdoppelbindungen zu brechen. Die von Strahlung beim Durchgang durch Materie deponierte Energie wird als Dosis bezeichnet, als absorbierte Energie pro Masseneinheit definiert und in der Einheit Gray angegeben (siehe Formel 1.1).

$$1\text{Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}} \quad (1.1)$$

Ionisierende Strahlung kann in elektromagnetische Strahlung und Teilchenstrahlung unterteilt werden. Elektromagnetische Strahlung ist jedoch nur bei kurzen Wellenlängen und hohen Frequenzen, das heißt bei hohen Energien, ionisierend. Die für biologische Experimente am häufigsten verwendeten elektromagnetischen Strahlungsarten sind Röntgenstrahlen und Gamma-Strahlen. Bei beiden handelt es sich um Photonenstrahlungen, die dünn-ionisierend sind. Das heißt, dass die Ionisationsereignisse statistisch gleichmäßig über die bestrahlte Fläche verteilt sind und überall eine mittlere Energiemenge deponiert wird (Abbildung 1.6). Die Atome der Zielmaterie werden im Fall von Photonenstrahlung über Photoeffekt, Comptoneffekt und bei hohen Energien über Paarbildung ionisiert. Die Energie der Photonen wird dabei auf die Elektronen der Zielmaterie übertragen. Durch die Ionisation werden Elektronen frei, die dann wiederum als Sekundärelektronen ihre Energie an andere Elektronen abgeben können, dies erfolgt über Stoßprozesse, die eine mittlere freie Weglänge von einigen Nanometern haben. So kommt die gleichmäßige Verteilung der Ionisationsereignisse bei dünn ionisierender Strahlung

zustande. Im Gewebe wird immer nur ein bestimmter Prozentsatz der einfallenden Strahlung absorbiert. Dies führt dazu, dass die deponierte Energie mit zunehmender Eindringtiefe in das Gewebe oder andere Materie abnimmt (Abbildung 1.7).

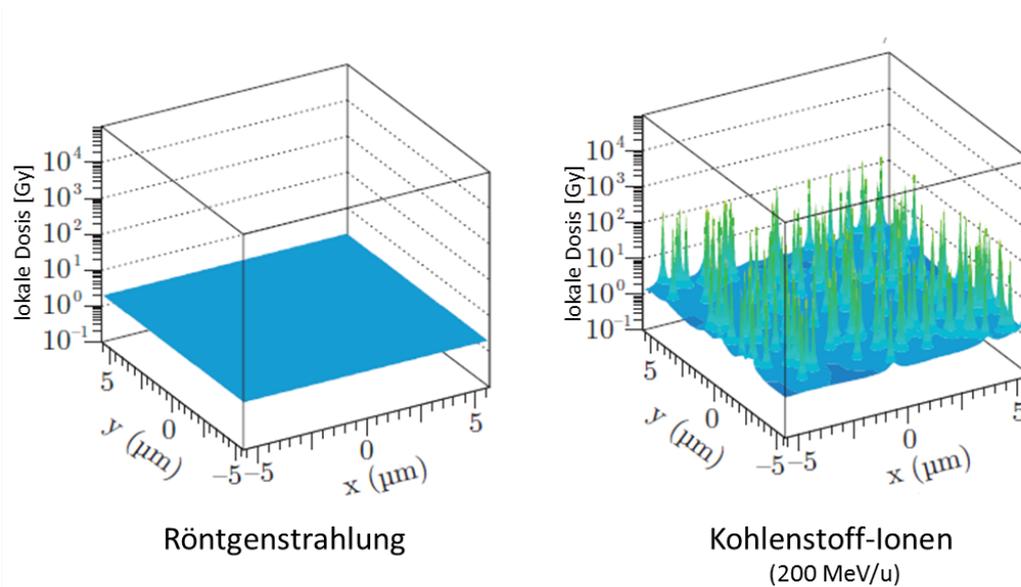


Abbildung 1.6: Dosis-Verteilung bei einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen im Vergleich zu Kohlenstoff-Ionen bei einer gleichen mittleren Dosis von 2 Gy; modifiziert nach [29]

Bei Alpha-, Beta-, Neutronen-, Protonen- und Schwerionenstrahlung handelt es sich um Teilchenstrahlung. Diese ist dicht ionisierend, das heißt es werden über die Bestrahlungsfläche verteilt lokal hohe Energien deponiert. Die geladenen Teilchen wechselwirken über Coulomb-Kräfte direkt mit den Elektronen des Gewebes. Die dabei erzeugten freien delta-Elektronen besitzen nur niedrige Energien und können sich deshalb nicht weit von der Stelle der ersten Ionisation entfernen. Dies führt zu einer lokal sehr hohen Energiedeposition entlang der Teilchenspur. Die Dichte der Ionisationsereignisse ist am Anfang der Flugstrecke, wenn die Ionen in das Gewebe eindringen sehr gering, da die Ionen sehr schnell sind und nur kurze Wechselwirkungen mit der Materie eingehen. Sie verlieren jedoch trotzdem kontinuierlich an Energie und Geschwindigkeit, was dazu führt, dass die Ionisationsereignisse wahrscheinlicher werden. Die Energieabgabe der Ionen entlang einer bestimmten Flugstrecke wird als linearer Energie Transfer (LET) bezeichnet und in keV/µm angegeben. Das Maximum der deponierten Energie und damit die maximale Dosis wird beim völligen Stoppen der Ionen erreicht, was zu dem typischen Tiefen-Dosis-Profil mit dem charakteristischen Bragg-Peak der Ionen führt (Abbildung 1.7).

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Strahlenqualitäten der ionisierenden Strahlung verwendet. Dies sind Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen. Röntgenstrahlen sind von Interesse,

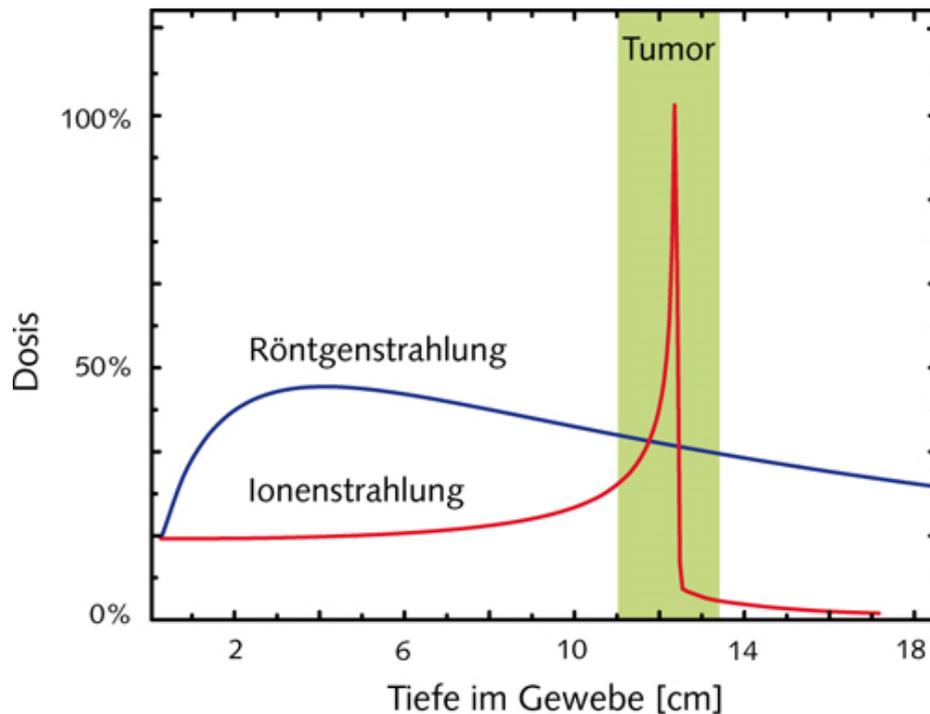


Abbildung 1.7: Tiefendosisprofil von Röntgenstrahlen (blau) und Ionenstrahlen (rot) im Vergleich. In grün ist die mögliche Lage eines Tumors im Gewebe eingezeichnet

da geringe Bestrahlungsdosen klinisch zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen angewendet werden, die Mechanismen die hinter der klinischen Wirkung stehen jedoch nicht komplett verstanden sind. Insbesondere anti-inflammatorische Effekte auf chronische entzündliche Hautkrankheiten sind bisher noch sehr wenig untersucht. Ausserdem können hohe Dosen Röntgenstrahlung bei den Untersuchungen in dieser Arbeit immer als Vergleich dienen. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung konnte an der GSI durchgeführt werden und war im Gegensatz zu Kohlenstoffionen immer verfügbar.

Die Effekte der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen sind unter anderem deshalb sehr interessant, da auch bei der Tumorthherapie mit Kohlenstoffionen die Haut immer mitbestrahlt wird, was insbesondere dann zum Problem werden kann, wenn es sich beispielsweise um einen sehr nahe an der Oberfläche liegenden Tumor handelt. Ausserdem sind die Effekte für ionisierende Strahlung mit hohem LET bisher nur in Ansätzen untersucht. Es gibt nur wenige Arbeiten, die Hautreaktion für die Bestrahlung mit unterschiedlichem LET vergleichen [30], [31].

Chronisch entzündliche Hautkrankheiten, insbesondere Psoriasis, stehen auf der Indikationsliste für die Behandlung mit Radon [24]. Die Patienten durchlaufen die Behandlung in Form einer Kur, die aus mehreren Einfahrten in Radonheilstollen oder Bädern in radonhaltigem Wasser besteht. Die Patienten nehmen dabei das Radon sowohl über die Atemluft als auch über die Haut auf, es verteilt sich über den Blutstrom im Körper und ein Großteil wird direkt abgeatmet. Das hierfür relevante Radon-Isotop ist das Rn-222, welches ein Alphaemitter mit einer Halbwertszeit von 3,8 Tagen ist. Bei der Passage durch den Körper kann ein Anteil des Radons unter

Aussendung von Alphastrahlung in seine Tochternuklide zerfallen. Wie bereits beschrieben, zählt Alphastrahlung zu den dicht-ionisierenden Strahlenarten, welche die Bestrahlungsdosis im Gewebe lokal deponiert. Wird eine Zelle von einem Alphateilchen getroffen, erhält sie eine Dosis von ca. 0,3 bis 0,5 Gy. Da Alphateilchen in Gewebe jedoch eine sehr geringe Reichweite von nur einigen μm haben, ist die Bestrahlung von Hautäquivalenten mit Alphastrahlung sehr schwierig umzusetzen. Auch aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit relativ niedrigen Kohlenstoffdosen von 0,5 Gy bestrahlt. Diese gehören ebenfalls zu den dicht-ionisierenden Strahlungsarten. Man muss jedoch beachten, dass bei der Bestrahlung mit Radon die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle getroffen wird, sehr gering ist, während bei der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen statistisch gesehen fast alle Zellen getroffen werden. Wird eine Zelle jedoch getroffen, so sind Dosis und LET ungefähr vergleichbar mit der Bestrahlung mit Radon bzw. Alphateilchen.

1.3.2 Nicht-ionisierende Strahlung

Neben den beiden vorgestellten ionisierenden Strahlungsarten wird in dieser Arbeit auch UV-B-Strahlung als Vergleichsstrahlung verwendet. Daten die in der Literatur für die Bestrahlung humaner Haut vorliegen beziehen sich meistens auf UV-B-Strahlung oder eine Kombination aus UV-A- und UV-B-Strahlung, da die Haut natürlicherweise dem Sonnenlicht ausgesetzt ist und UV-B den größten Anteil an den Effekten dieser Bestrahlung ausmacht. Bei UV-Strahlung handelt es sich um elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 200-400 nm, das heißt kürzer als die des sichtbaren Lichts, aber länger als die der Röntgenstrahlung. Die Intensität der UV-Strahlung wird in Energie pro Fläche (J/m^2) angegeben. UV-Strahlung wird anhand der Wellenlänge weiter in UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) und UV-C (200-290 nm) unterteilt. Durch Ozon, Sauerstoff und Wasserdampf in der Atmosphäre wird die kurzwellige UV-C Strahlung und ca. 95 % der UV-B Strahlung absorbiert. Die UV-Strahlung, die die Erde erreicht besteht zu 95% aus UV-A und zu ca. 5 % aus UV-B Strahlung (Abbildung 1.8). UV-A kann mit seiner größeren Wellenlänge tiefer in die Haut eindringen, sie durchdringt die komplette Epidermis und einen Teil der Dermis.

UV-B hat kürzere Wellenlängen und kann deshalb nur die Epidermis durchdringen (Abbildung 1.9). Obwohl nur ein relativ geringer Anteil an UV-B-Strahlung die Erdoberfläche erreicht ist sie es, die die Haut am meisten schädigt, da sie deutlich mehr Energie hat als UV-A. Da hierfür relativ viele Daten in der Literatur vorliegen, wird eine hohe Intensität UV-B Strahlung in dieser Arbeit als Referenz genutzt um die Bestrahlungseffekte zu vergleichen. Ausserdem ist für niedrige Intensitäten UV-Strahlung ein immunsuppressiver Effekt bekannt [33], [34]. Dies macht man sich beispielsweise bei der Therapie von Psoriasis, einer chronisch entzündlichen Hautkrankheit, zu nutze. Durch UV-B Bestrahlung kommt es zu einer Immunsuppression und damit zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes [35].

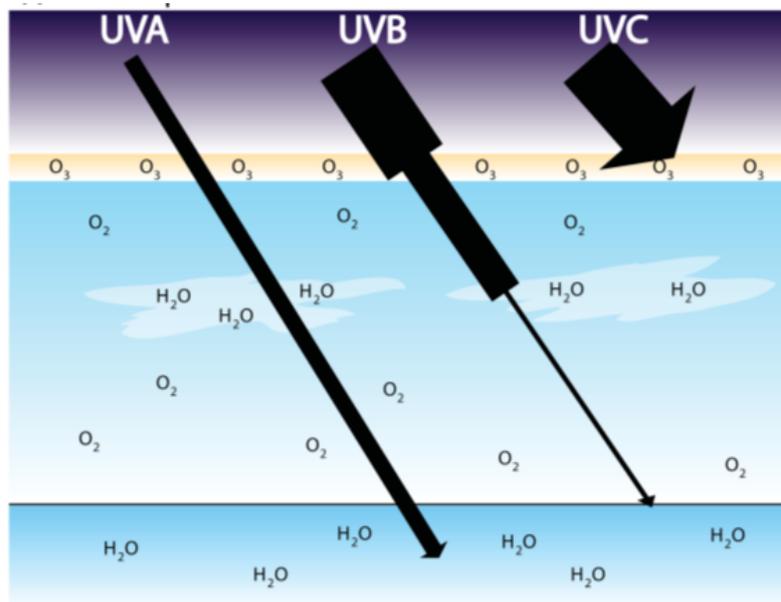


Abbildung 1.8: Absorption der UV-Strahlen verschiedener Wellenlängen in der Atmosphäre, aus [32]

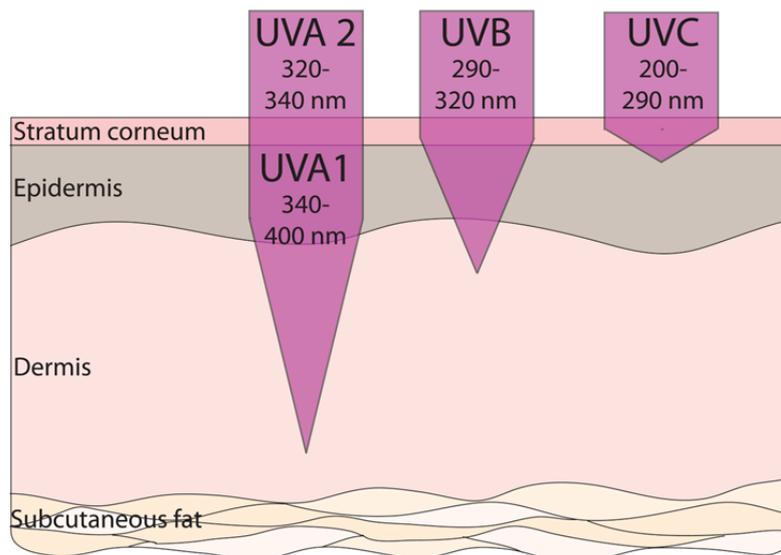


Abbildung 1.9: Eindringtiefe der verschiedenen UV-Strahlen in die Haut, aus [32]

1.3.3 Auswirkung von Strahlung auf Zellen und Gewebe

Obwohl einerseits, wie bereits kurz beschrieben, die Bestrahlung mit niedrigen Dosen einen positiven Effekt auf ein Gewebe bzw. auf einen Organismus haben kann, schädigt Bestrahlung die Zellen und das Gewebe in erster Linie. Die Schädigung geschieht meist auf molekularer Ebene in Form von z.B. Strangbrüchen der DNA. Ob dies Auswirkungen auf den Gewebeverband oder den gesamten Organismus hat, hängt einerseits davon ab, wie schwer die einzelne Zelle geschädigt ist und wie sie damit umgeht, aber andererseits auch davon wie groß die Anzahl der geschädigten Zellen in einem Gewebe ist.

Das Target, welches für ionisierende Strahlung am sensitivsten ist, ist die DNA der Zelle. Diese kann durch Strahlung auf unterschiedliche Weise geschädigt werden. Einerseits kann es direkt zu Ionisationsereignissen im DNA-Molekül selbst kommen, was dann dazu führt, dass Molekülbindungen gebrochen werden. Andererseits kann es zu indirekten Effekten kommen, da es bei der Bestrahlung durch die Radiolyse von Wassermolekülen zur Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen kommt, die einige Nanometer migrieren und dann mit DNA-Molekülen reagieren können. Da der Wasseranteil in Säugerzellen sehr hoch ist und ca. 80% des Zellvolumens ausmacht, ist es wahrscheinlicher, dass Wassermoleküle getroffen werden und die DNA indirekt geschädigt wird.

Wenn einzelne Bindungen innerhalb der DNA-Moleküle gebrochen werden, kann dies zu verschiedenen Schäden führen. Am häufigsten sind Einzelstrangbrüche, aber es kann auch zu Crosslinking zwischen Proteinen oder zur Dimerbildung kommen. Einzelstrangbrüche können von den Zellen meist sehr gut repariert werden, da die entsprechende Information auf dem komplementären DNA-Strang vorhanden ist. Kommt es jedoch zu einem Doppelstrangbruch ist die Reparatur deutlich schwieriger, weshalb diese Art von Schaden generell als kritischer bezeichnet wird. Es gibt verschiedene Mechanismen um diese Schäden zu reparieren. Dies sind im Wesentlichen homologe Rekombination (*homologous recombination; HR*) und nicht-homologes Endjoining (*non-homologous end joining; NHEJ*).

HR ist ein Mechanismus, der einen intakten homologen DNA-Strang als Template benötigt und deshalb hauptsächlich in der späten S/G₂ Phase des Zellzyklus vorkommt, wenn ein solcher vorhanden ist. Dadurch ist die HR ein fast fehlerfreier Prozess.

NHEJ ist ein Reparaturweg, welcher nach einem Doppelstrangbruch vorkommt, wenn kein komplementärer DNA-Strang vorhanden ist, wie es in der G₁-Phase der Fall ist. Dieser Mechanismus ist allerdings fehlerbehaftet, da die notwendige Information für eine korrekte Reparatur fehlt. Es kann zu einem inkorrekten Zusammenfügen der DNA-Enden kommen, was dann zu chromosomalen Abberationen und chromosomaler Instabilität führt. Dies ist letztendlich der erste Schritt der Krebsinduktion.

Wenn die einzelne bestrahlte und geschädigte Zelle mit Hilfe dieser Mechanismen in der Lage ist, den durch die Bestrahlung entstandenen Schaden zu reparieren, durchläuft sie weiter

den Zellzyklus und kann proliferieren. Ist der Schaden zu komplex um repariert zu werden wird der Zelltod eingeleitet oder die Zelle läuft in einen Zellzyklusarrest, das heisst sie wird an einem Checkpoint des Zellzyklus arriert und kann sich nicht weiter teilen. Schaut man sich experimentell die Reaktion von Zellen auf Bestrahlung an, sind meist die Quantifizierung der Doppelstrangbrüche oder des klonogenen Überlebens, also die Fähigkeit einer einzelnen Zelle eine Kolonie zu bilden, die wichtigsten betrachteten Endpunkte. Strahlung kann jedoch auch Auswirkungen auf die Genexpression, die Proteinexpression und die Zytokinfreisetzung der Zellen haben. Dies sind jedoch Effekte, die eher in einem Gewebeverband eine Rolle spielen. In Monokulturen geht man ausserdem davon aus, dass die Strahlensensitivität aller Zellen identisch ist. Wohingegen die Strahlensensitivität in einem Gewebeverband abhängig von dessen Proliferationsaktivität und, insbesondere in der Haut, vom Differenzierungsstatus ist. Gewebe mit einer hohen Proliferationsrate, wie beispielsweise das Knochenmark, sind sehr radiosensitiv und zeigen bereits bei einer Bestrahlung mit 0,5 Gy eine Reaktion, während langsam proliferierende Gewebe, wie beispielsweise die Lunge sehr radioresistent sind und für Dosen von bis zu 50 Gy fast keine Effekte zeigen. In der Haut bedeutet das, dass insbesondere die proliferierenden Basalzellen eine Reaktion auf die Bestrahlung zeigen sollten. Die bereits differenzierten Zellen in den suprabasalen Schichten der Haut sollten demnach strahlenresistenter sein. Programmierter Zelltod (Apoptose) nach Bestrahlung erwartet man deshalb in den Basalzellen, wobei sowohl eine Entzündungsreaktion als auch die Freisetzung von Zytokinen Auswirkungen auf das gesamte Gewebe haben können.

1.4 Apoptose

Die Apoptose ist ein aktiver Prozess des Zelltodes, der hoch koordiniert abläuft. Nach einem externen Stimulus, der die Apoptose einleitet, werden Initiator-Caspasen aktiviert, dies sind insbesondere Caspase 2, 8, 9 und 10. Diese spalten und aktivieren wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7. In ihrer aktiven Form spalten sie weitere Substrate in der Zelle, was einen koordinierten Abbau der Zelle ermöglicht. Das Zytoplasma und der Kern der Zelle werden kondensiert und die Zellbestandteile werden in sogenannte *apoptotic bodies* verpackt und aus der Zelle entlassen. Die apoptotische Zelle als auch die *apoptotic bodies* exponieren Oberflächenmoleküle auf ihrer Zellmembran, die Phagozyten anlocken um die absterbende Zelle zu beseitigen. Während des gesamten Vorgangs bleibt die Integrität der Zellmembran erhalten und es kommt nicht, wie es bei der Nekrose der Fall ist, zuerst zum Anschwellen und später zum Platzen der Zelle, was die Freisetzung des Zellinhaltes und eine Immunreaktion zur Folge hat [36] (Abbildung 1.10). Insbesondere in der Haut spielt Apoptose auch im gesunden Gewebe eine bedeutende Rolle. Die Homöostase der Haut beruht auf dem Gleichgewicht zwischen dem Absterben der differenzierenden Keratinozyten in den suprabasalen Schichten und der Proliferation der Basalzellen. Ausserdem ist das Absterben der Keratinozyten während dem Differenzierungsprozess ein

wichtiger Abwehrmechanismus gegen die Induktion von Krebs. Keratinozyten, die durch UV-Strahlung oder oxidativen Stress relativ viele Mutationen akkumulieren können, werden so aus dem Gewebe entfernt [1].

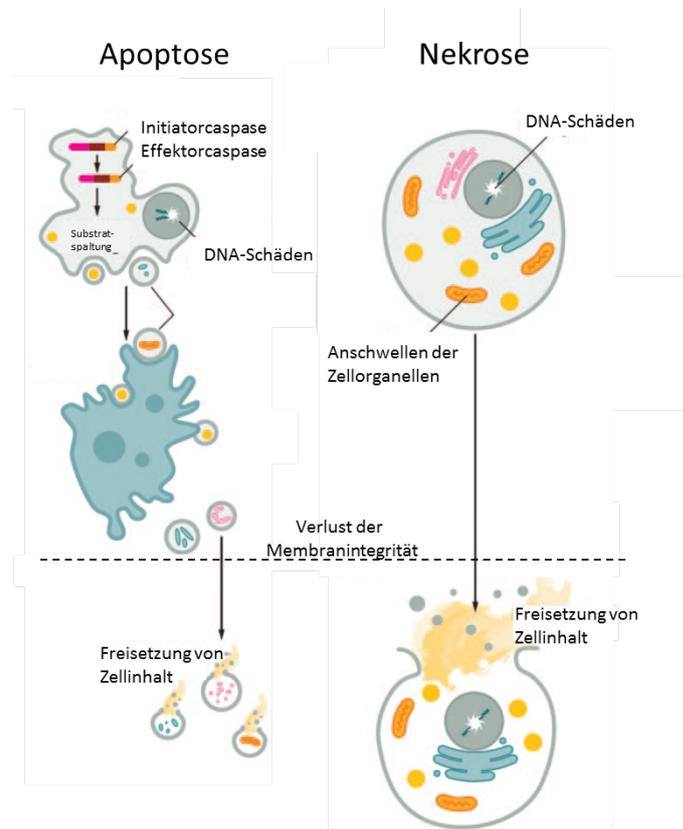


Abbildung 1.10: Vergleich zwischen den beiden häufigsten Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose; modifiziert nach [36]

Differenzierende Keratinozyten weisen sehr viele Merkmale der klassischen Apoptose, wie beispielsweise die Kondensation des Kerns und des Zytoplasmas und die Fragmentierung der DNA auf. Allerdings kann in den, im Laufe der Differenzierung absterbenden Keratinozyten keine aktivierte Caspase 3 nachgewiesen werden [37], [38], während die aktive Form der Caspase 3 in anderen Geweben als sicheres Zeichen der Apoptose gilt [36]. Das heisst, der Differenzierungsprozess läuft über andere molekulare Wege ab als der Prozess der Apoptose.

Trotzdem können äussere Faktoren, wie beispielsweise Bestrahlung, zum Beispiel mit UV-B, oder der Kontakt mit zytotoxischen Substanzen die klassische Apoptose in Keratinozyten auslösen. Dies kann einerseits über einen extrinsischen Signalweg durch die Bindung des Fas-Ligand, TNF oder andere Zytokine an extrazelluläre membranständige Rezeptoren, sogenannte *death receptors* ablaufen, oder über den intrinsischen Signalweg (Abbildung 1.11).

Zytotoxische Substanzen, als auch DNA-Schäden, induzieren meist den intrinsischen Signalweg, wobei die Freisetzung von Cytochrome C aus den Mitochondrien erfolgt. Zusammen mit einem

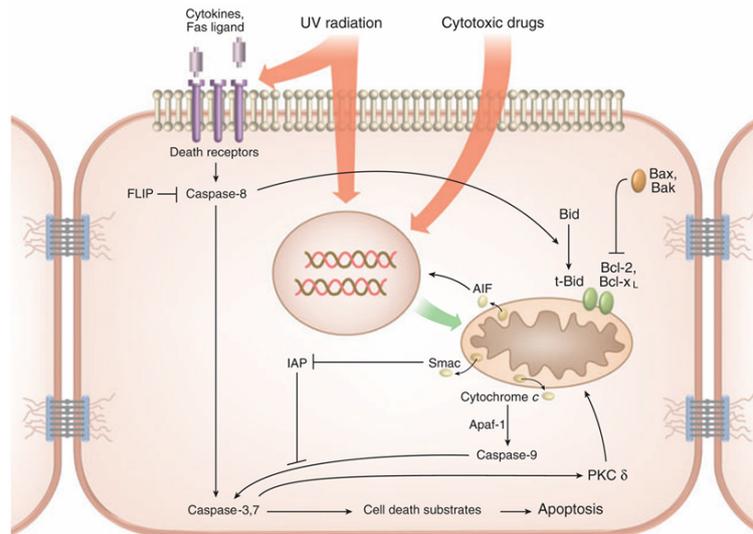


Abbildung 1.11: Signalweg der intrinsisch und extrinsisch aktivierten Apoptose in Keratinozyten; modifiziert nach [3]

Kofaktor und aktivierter Caspase 9 kann so ein Apoptosom gebildet werden. Ausserdem kann aus den Mitochondrien AIF (*apoptosis inducing factor*) freigesetzt werden, welches in den Zellkern wandern und dort caspase-unabhängige Apoptose auslösen kann. Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg führt schließlich zu einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7 die dann gezielt Zellbestandteile spalten und zur Apoptose der Zelle führen. Beide Signalwege werden über die Freisetzung weiterer pro- bzw. anti-apoptotischer Faktoren, wie beispielsweise Proteine der Bcl-2 Familie oder Bax, Bak und Bid, reguliert. Ausserdem sind die beiden Signalwege über einen Verstärkungsloop miteinander verknüpft. Das Protein Bid wird durch Caspase 8 aktiviert, zu den Mitochondrien translokalisiert und regt die Cytochrome C Freisetzung weiter an [3]. Ab dem Zeitpunkt der Aktivierung der Caspase 3 und 7 ist der Prozess der Apoptose nicht mehr umkehrbar, weshalb das Vorkommen der aktivierten Form von Caspase 3 als sicheres Zeichen der Apoptose angesehen und häufig als Marker verwendet wird.

1.5 Entzündungsreaktion

Ist die Homöostase eines Gewebes beispielsweise durch Bestrahlung oder eine andere Art des zytotoxischen Stress gestört, kann es zu einer Entzündungsreaktion kommen, deren Ziel es ist, das bereits beschädigte Gewebe zu entfernen und schließlich die Homöostase des Gewebes wieder herzustellen.

Bei der Schädigung von Gewebe oder durch das Eindringen von Mikroorganismen kommt es zur Aktivierung des Immunsystems (Abbildung 1.12). Die im Gewebe vorkommenden Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen, erkennen eindringende Pathogene oder geschädigte Zellen an speziellen Proteinen und Proteinmustern die diese exprimieren bzw. von ihnen frei-

gesetzt werden. In der Haut handelt es sich hierbei um spezielle Makrophagen, den Langerhanszellen. Dadurch wird NF- κ b aktiviert, welches ein wichtiger Transkriptionsfaktor ist, der dann in den Kern translokalisiert wird und dort die Transkription entsprechender Gene reguliert. Dies führt zu einem weiteren Schritt in der Inflammations-Kaskade, der Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine. Diese Zytokine werden in der Haut ebenfalls von Keratinozyten freigesetzt und wirken bei der Immunreaktion mit. Durch diese Stoffe werden Leukozyten aus dem Blut und dem umliegenden Gewebe zu der Stelle der Entzündung gelockt. Als Leukozyten bezeichnet man Zellen, die alle aus Progenitorzellen des Knochenmarks hervorgehen und mehrere Subpopulationen, wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten, einschließen. Sie wandern zum Ort der Entzündung, Monozyten differenzieren zu Makrophagen, phagozytieren Bakterien, Zelltrümmer und andere Fremdstoffe und setzen danach Zytokine frei, die den Entzündungsprozess wieder herunter regulieren.

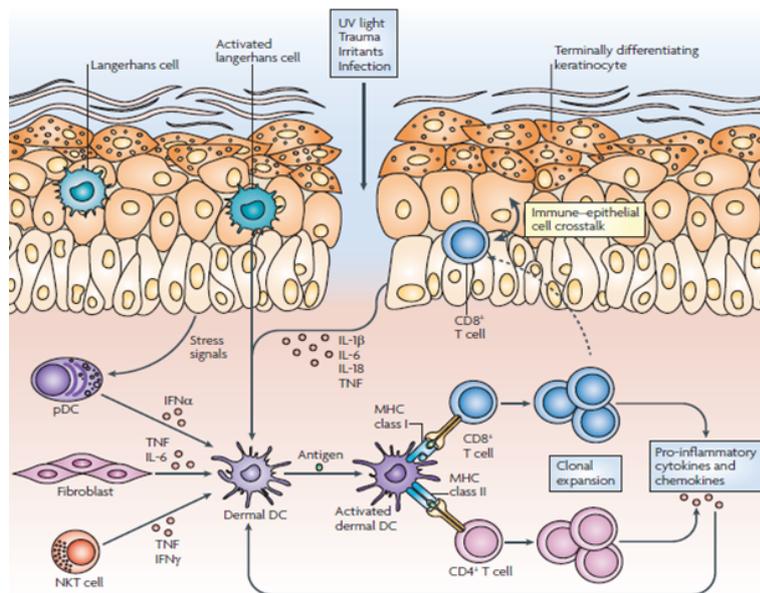


Abbildung 1.12: Einleitung einer Entzündungsreaktion in humaner Haut nach einer Verwundung, Bestrahlung oder dem Eindringen von Mikroorganismen; nach [39]

Bei chronisch entzündlichen Hautkrankheiten wie Psoriasis oder atopischer Dermatitis, auch bekannt als Neurodermitis, kommt es zu einer dauerhaften, nicht korrekt regulierten Aktivierung des Immunsystems und damit zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion. Betroffene Hautareale sind von großen Mengen Immunzellen, wie T-Zellen und dendritischen Zellen infiltriert und es kommt zu einer verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine dieser Zellen, was wiederum die Zytokinfreisetzung anderer Zellen, wie z.B. den Keratinozyten, aktiviert [40], [41], [42]. Regulationsmechanismen, die normalerweise durch die Aktivierung der Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine eine Entzündungsreaktion abschwächen, funktionieren bei diesen Erkrankungen nicht korrekt, sodass es zu einem dauerhaften Entzündungsstatus kommt. Die

Bestrahlung der Haut mit UV-Strahlung kann bei diesen Erkrankungen zu einer Linderung der Symptome führen, da dadurch zu einer Suppression des Immunsystems kommt und die Entzündungsreaktion abgeschwächt wird [34]. Sowohl Neurodermitis als auch Psoriasis stehen auf den Indikationslisten für eine Radontherapie [24]. Es gibt jedoch keine publizierten Daten, die die Wirkung der Radontherapie auf atopische Dermatitis oder Psoriasis beschreiben oder erklären.

1.6 Zytokine

Wie bereits beschrieben spielen Zytokine eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion. Es handelt sich dabei um kleine Proteine, die von Zellen aufgrund von verschiedenen Stimuli sekretiert werden und die Kommunikation zwischen Zellen vermitteln. Sie können Einfluss auf die umliegenden Zellen (parakrin), auf weiter entfernte Zellen (endokrin), aber auch auf die Zelle selbst (autokrin) haben. Ihre Wirkung ist häufig redundant, das heißt verschiedene Zytokine haben ähnliche Effekte. Ausserdem wirken sie häufig in Kaskaden, das heißt sie aktivieren oder inhibieren sich gegenseitig. Während einer Entzündungsreaktion können die beteiligten Zytokine in *pro-inflammatorisch* und *anti-inflammatorisch* unterteilt werden.

1.6.1 Pro-inflammatorische Zytokine

Pro-inflammatorische Zytokine sind für die Einleitung und die Verstärkung einer Entzündungsreaktion verantwortlich. Die wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine sind IL-1beta, IL-6 und TNF-alpha. Sie werden hauptsächlich von Makrophagen bzw. in der Haut von den Langerhanszellen, aber auch von Keratinozyten freigesetzt. Ihre Hauptaufgabe ist die Aktivierung der Immunantwort durch die Regulation der Proliferation und der Differenzierung von weiteren Immunzellen, wie beispielsweise Lymphozyten und T-Zellen und deren Anlockung an die Stelle der Entzündung. Diese Zellen schütten dann wiederum weitere pro-inflammatorische Zytokine aus, was vorübergehend zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führt.

1.6.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Um eine überschießende Entzündungsreaktion zu vermeiden muss es Mechanismen geben, welche die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine regulieren. Dies geschieht durch die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-4, IL-10, IL-11 und IL-13. Diese können zum Beispiel die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine durch Makrophagen inhibieren, aber auch die Ausschüttung spezifischer Zytokininhibitoren und löslicher Zytokinrezeptoren induzieren. Ein weiteres wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin ist TGF-beta. Es reduziert die Zytokinfreisetzung indem es Makrophagen und Th1-Zellen inhibiert.



2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
APS	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
ECL Plus Western Blotting Substrat, Pierce	Thermo scientific, USA
EDTA Titriplex III	Merck, Darmstadt
Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Eosin	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Sigma, Steinheim
Eukitt®	Sigma, Steinheim
Formaldehyd-Lösung, 37 %	Sigma, Steinheim
Glycerin min. 99 %	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂ -Lösung, 30 %	Sigma, Steinheim
HCl 37% rauchend, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Hematoxylin nach Mayer	Roth, Karlsruhe
KOH-Plätzchen	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Methanol ≥99 % zur Synthese	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (fettarm)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma, St. Louis, USA
Natriumfluorid	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt

Name	Hersteller
Natriumorthovanadat	AppliChem,Darmstadt
Octoxinol 9 (NP-40)	Sigma, St. Louis, USA
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺ (Pulver)	Biochrom, Berlin
Page Ruler, Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Paraffin, Erstarrungspunkt 56 – 58 °C	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMSF	Sigma, St. Louis, USA
Rotiphorese Acrylamid/Bis-Lösung 30 %	Roth, Karlsruhe
RotiQuant	Roth, Karlsruhe
SDS ultrapure, für Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
SIGMAFAST®3,3-Diaminobenzidin Tabletten	Sigma, Steinheim
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ ,96 %)	L+S-Labor, Bad Bocklet
TEMED	Sigma, Steinheim
Tris, ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Biochemica AppliChem, Darmstadt
Trypsin 0,05%/EDTA 0,02 %	PAN, Aidenbach
Tween 20	Sigma, Steinheim
Xylol ROTIPURAN ≥99 %, p.a.,ISO	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Medien, Zusätze und Reagenzien zur Zell- und Gewebekultur

Name	Hersteller
EpiDerm™ Full Thickness	MatTek Corporation,Ashland, USA
Maintenance Medium (MM)	
EpiDerm™ Full Thickness	MatTek Corporation,Ashland, USA
Assay Medium (ASY)	
KBM-Gold	Lonza, USA
KGM-Bullet-Kit	Lonza, USA
DMEM	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
FBS Superior	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Biochrom, Berlin

2.1.3 Antikörper

Name	Hersteller	Artikelnummer
Caspase 3	Cell Signaling, Danver USA	#9662
aktive Caspase 3 (Asp175)	Cell Signaling, Danver USA	#9661
Caspase 14	Abcam, Cambridge UK	ab45415
Cytokeratin 10	Abcam, Cambridge UK	ab9026
PARP (46D11)	Cell Signaling, Danver USA	#9532
eCadherin	Abcam, Cambridge UK	ab40772
Vimentin	Abcam, Cambridge UK	ab92547
Ki 67	Abcam, Cambridge UK	ab16667
CD1a	Dako,	M3571
Biotinylated Affinity-purified goat Anti-Rabbit IgG	Thermo Scientific,USA	32054
ECL anti-mouse HRP-linked	GE Healthcare, München	NA931
ECL anti-rabbit HRP-linked	GE Healthcare,München	NA934VS

2.1.4 verwendete Kits

Name	Hersteller	Artikelnummer
Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Rabbit IgG Staining Kit	Thermo Scientific, USA	32054
Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Mouse IgG Staining Kit	Thermo Scientific, USA	32054
ImmPACT®VIP –Peroxidase Substrat Kit	Vector Burlingame, USA	SK-4605
Sigmafast™ 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten	Sigma, St-Louis, USA	D4293-50
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo scientific,USA	32132
Human IL-8 ELISA Ready-SETGo!®	eBioscience, Wien, Österreich	88-8086-22
Human IL-1alpha Platinum ELISA	eBioscience, Wien, Österreich	BMS243/2
Human IL-2 ELISA Ready-SET-Go!™	eBioscience, Wien, Österreich	88-7025
Human IL-10 ELISA Ready-SET-Go!™	eBioscience, Wien, Österreich	88-7106-22
Human IL-13 ELISA Ready-SET-Go!™	eBioscience, Wien, Österreich	88-7439-22
Human/Mouse TGF-β 1 ELISA Ready-SET-Go!™ (2ndGen.)	eBioscience, Wien, Österreich	88-8350-86

2.1.5 Lösungen und Puffer

Lösungen	Zusammensetzung
10% APS-Lösung	0,03 g APS 300 µl Wasser
10% SDS-Lösung	50 g SDS 500 ml Wasser
10% Tritonlösung	10 ml Triton X-100 90 ml Wasser
Blocking-Puffer (Western Blot)	2,5 g fettarmes Milchpulver 50 ml TBST
Block-Lösung	135 µl Ziegen Serum 100 µl Triton X 10 ml PBS
Citrat-Puffer pH 6 10x	14,7 g Natriumcitrat 10,5 g Zitronensäure 500 ml Wasser
EDTA- Lösung 100mM	2,92 g EDTA 100 ml Wasser
Elektrophorese-Laufpuffer 10x	30,3 g Tris 142,6 g Glycin 10 g SDS 1000 ml Wasser
Elektrophorese-Laufpuffer 1x	100 ml Elektrophorese- Laufpuffer 10x 900 ml Wasser
ELISA- Waschpuffer	500 µl Tween-20 1000 ml PBS (1x)
HCl-Lösung 1M	7,29 g HCl 200 ml Wasser
ELISA-Stopplösung (2N H ₂ SO ₄)	5,6 ml Schwefelsäure (96%) 94,4 ml Wasser

Lösungen	Zusammensetzung
KOH-Lösung 0,1 %	1 g KOH 1000 ml Wasser
Lysepuffer (Lyon)	250 μ l NaCl 3M 250 μ l Tris pH8.0 1 ml 10% Triton 200 μ l Proteaseinhibitorlösung C+ (25x) 3,3 ml Wasser
NaCl-Lösung 3M	174,7 g NaCl 1000 ml Wasser
NaOH-Lösung 1M	7,99 g NaOH 200 ml Wasser
Natriumdeoxycholat -Lösung 10%	5 g Natriumdeoxycholat 50 ml Wasser
NP-40 - Lösung	5 g NP-40 50 ml Wasser
PBS (pH 7,4) 10x	160 g NaCl 4 g KCl 28,8 g Na ₂ HPO ₄ 4,8 g KH ₂ PO ₄ 2000 ml Wasser
PBS 1x	100 ml PBS 10x 900 ml Wasser
Probenpuffer für SDS-PAGE	0,035 g Bromphenolblau 7 ml Glycerin 6 ml 10% SDS 1 ml Tris HCl pH 6,7 1M
Proteaseinhibitor-Lösung C+	1 Tablette Complete Protease Inhibitor 2 ml Wasser

Lösungen	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	790 mg Tris 88,5 ml Wasser 900 mg NaCl 10 ml NP-40 10% 2,5 ml Natriumdeoxycholat 10% 1 ml 100mM EDTA
Sammelgel 5 %ig	1,54 ml Wasser 490 μ l Tris pH 6,8 1M 25 μ l 10% SDS-Lösung 420 μ l Rotiphorese NFAcrylamid/Bis-Lösung 30% 2,5 μ l TEMED 25 μ l 10% APS
Stripping-Puffer	714 μ l 2-Mercaptoethanol 6 ml Tris pH 6,7 1M 20 ml 10% SDS 74 ml Wasser
TBST 10x	100 ml Tris HCl pH 8,3 1M 500 ml NaCl 3M 5 ml Tween 20 395 ml Wasser
TBST 1x	100 ml TBST 10x 900 ml Wasser
Transferpuffer	11.27 g Glycin 20 ml Tris HCl pH 8,3 1M 10 ml 10% SDS-Lösung 800 ml Wasser 200 ml Methanol
Trenngel 12 %ig	1,54ml Wasser 490 μ l Tris pH6,8 1M 25 μ l 10% SDS-Lösung 420 μ l Rotiphorese NFAcrylamid/Bis-Lösung 30% 2,5 μ l TEMED 25 μ l 10% APS

Lösungen	Zusammensetzung
Tris HCl pH 6,7 1M	12,12 g Tris 100 ml Wasser
Tris HCl pH 6,8 1M	12,12 g Tris 100 ml Wasser
Tris HCl pH 8,3	12,12 g Tris 100 ml Wasser
Tris HCl pH 8,8 1M	12,12 g Tris 100 ml Wasser

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-well-Zellkulturplatten zur Verwendung mit Einsätzen	BD Falcon, Heidelberg
Coulter Isoton II diluent	Coulter, Krefeld
Einsätze für 6-well-Platten, Porengröße 1 μm	BD Falcon, Heidelberg
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	Brand, Wertheim
Immobilon-P 0,45 μm	Millipore, Billerica, USA
Injektionsnadel 1ml	Braun, Melsungen
Mitrotiterplatte 96-well Maxisorp	NUNC, Langenselbold
Pipettenspitzen 5-10 μl MultiFlex E round tips	Sorenson, Salt Lake City, USA
Plastibrand Pipettenspitzen 10 μl	Brand, Wertheim
Plastibrand Pipettenspitzen 1000 μl	Brand, Wertheim
Plastibrand Pipettenspitzen 200 μl	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen T25	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen T75	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen Nunclon Surface CD35	NUNC, Langenselbold
Zentrifugenröhrchen 15ml	TPP, Edinburgh, GB
Zentrifugenröhrchen 50ml	TPP, Edinburgh, GB

2.1.7 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
4218D PWR SUPL – BioRad Power Pac Hight Current	BioRad, Münschen
Absorptions-Reader für Mikroplatten EL 808	BioTek, Bad Friedrichshall
Analysenwaage H51	Sartorius AG, Göttingen
BBD 6220 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Biolink-BLX-312 Crosslinker	Peqlab, Erlangen
UV-Bestrahlungsgerät	
Elektronisches Dosimeter PTW – SN4	PTW-Freiburg, Freiburg
Fotokamera E-330	Olympus, Hamburg
Paraffinofen UN 30 ^{PLUS}	Memmert GmbH, Schwabach
Heizblock HB-2	Wealtec Corp., Sparks, USA
Lichtmikroskop BX61	Olympus, Hamburg
Mini PROTEAN Tetra Systems	BioRad, Münschen
Mini Trans-Blot cell	BioRad, Münschen
Präzisionswaage	KERN, Münschen
Röntgenröhre Isovolt Titan 320	GE Inspection Technologies, Ahrensburg
Rotationsmikrotom RM2235	Leica Microsystems, Wetzlar
Slide Drying Benche MH6616	Electrothermal, Staffordshire UK
TKA MicroPure	TKA (Thermo Electron LED GmbH), Niederelbert
Wasserbad	VWR, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für alle Versuche mit Mono- oder Co-Kulturen humaner Keratinozyten und Fibroblasten wurden *normal human epidermal keratinocytes* (NHEK) bzw. *normal human epidermal fibroblasts* (NHDF) der Firma Lonza verwendet. Es handelt sich sowohl bei NHEK als auch bei NHDF um primäre Zellen, für die der Hersteller unter geeigneten Kulturbedingungen 18 Teilungen garantiert (CPD=18), ohne dass es zu einer Differenzierung der Zellen kommt. Die Zellen wurden jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Medium (siehe Abschnitt 2.1.2) mit den entsprechenden Zusätzen kultiviert.

Einsaat und Kultivierung von NHEK bzw. NHDF

Die kryokonservierten Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut und in vorbereitete Zellkulturflaschen mit bereits 30 Minuten im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% (Standardbedingungen) äquilibriertem Medium pipettiert. Um die DMSO-Rückstände aus dem Einfriermedium zu entfernen wurde nach der Anheftung der Zellen, ca. 4-6 Stunden nach der Aussaat, ein Medienwechsel durchgeführt. Während der weiteren Kultivierung wurde das Medium alle 2 Tage durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt.

Sowohl zur Vervielfältigung der Zellen als auch zur Aussaat für die Co-Kultur wurden die Zellen passagiert sobald sie einen subkonfluenten Zustand von 70-80 % bedeckter Fläche der Kulturflasche erreicht hatten. Für die Passage der Zellen wurde das Subkultivierungs-Kit der Firma Lonza verwendet. Nach dem Abnehmen des Mediums wurde jede zu passagierende T75-Kulturflasche mit 5 ml HBSS gewaschen um Medienrückstände zu entfernen. Danach wurde für ca. 6 Minuten mit 3 ml Trypsinlösung inkubiert und das Ablösen der Zellen mikroskopisch überprüft. Die Reaktion wurde mit 6 ml TNS-Lösung abgestoppt, die Zellen mit Hilfe einer Glaspipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Aus dieser Zellsuspension wurden 200 µl entnommen, 1:50 mit isotonischer Lösung verdünnt und mit Hilfe des Particle Count&Size Analyzer Z®(Coulter) die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Die restliche Zellsuspension wurde bei 300 g für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die gewünschte Zellzahl mit dem entsprechenden Volumen vorgewärmten Medium eingestellt. Für die Weiterkultivierung und Vervielfältigung der Zellen wurden jeweils ca. 500.000 Zellen je T75-Kulturflasche ausgesät. Für die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung als auch mit Kohlenstoffionen wurden T25-Kulturflaschen verwendet in die jeweils, abhängig vom Untersuchungszeitpunkt 400.000 bzw. 250.000 Zellen ausgesät wurden. Eine Bestrahlung mit UV-B ist aufgrund der Absorption der Strahlung durch Polystyrol nur in Kulturschalen ohne Deckel möglich. Hierzu wurden je 35 mm Petrischale 100.000 Zellen eingesät.

Kultivierung von NHEK und NHDF in einer Co-Kultur

Um die Zell-Zell-Kommunikation zwischen Fibroblasten und Keratinozyten in die Untersuchungen einzubeziehen wurde ein Co-Kultursystem verwendet, welches diese ermöglicht. Hierfür musste ein Medium gefunden werden, welches die Ansprüche beider Zelltypen erfüllt. In Vorversuchen im Rahmen einer Bachelorarbeit [43] wurden verschiedene Medien und Medienkombinationen getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Co-Kultursystem etabliert, welches eine 1:1 Mischung aus KGM (Lonza) und EMEM als Co-Kultivierungmedium und 6-well-Platten mit entsprechenden Einsätzen mit einer Grundfläche von je 4,2 cm² und einer Porengröße von 1 µm verwendet. Beide Zelltypen wurden zuerst einzeln in den Inserts bzw. Kavitäten einer 6-well-Platte kultiviert. Für die Keratinozyten wurde hierfür KGM verwendet, für die Fibroblasten EMEM mit 10 % FCS. Die Fibroblasten wurden in diesem Medium zuerst bis zu einem fast kon-

fluenten Stadium kultiviert, bevor sie für die Co-Kultur verwendet und mit den Keratinozyten zusammengeführt wurden.

Zuerst wurden 100.000 Fibroblasten in die Einsätze der 6-well-Platten eingesät. Hierfür wurden sowohl in das well als auch in das Insert 2 ml Fibroblastenmedium pipettiert und vor der Einsaat im Brutschrank äquilibriert. Drei Tage später erfolgte die Einsaat der Keratinozyten in weitere 6-well-Platten, welche 3 ml KGM enthielten. Pro well wurden 75.000 Zellen eingesät. 24 Stunden später wurden die beiden Zelltypen zur Co-Kultur zusammengeführt indem in die Kavitäten mit den Keratinozyten 2 ml Co-Kulturmedium pipettiert wurde und die Inserts mit den konfluenten Fibroblasten eingesetzt wurden. In die Inserts wurden ebenfalls 2 ml Medium pipettiert. Die Co-Kulturen wurden 24 Stunden nach der Zusammenführung für Bestrahlungsexperimente benutzt. Das zahlenmäßige Verhältnis von Fibroblasten zu Keratinozyten ist zu diesem Zeitpunkt ca. 3:1.

2.2.2 Gewebekultur

Um Untersuchungen durchzuführen, die den Gegebenheiten in der humanen Haut *in vivo* möglichst nahe kommen, wurden zwei verschiedene Modellsysteme der humanen Haut etabliert. Einerseits wurden Hautäquivalente EFT400 der Firma MatTek (Ashland) verwendet. Um die *in vivo* Situation noch besser widerzuspiegeln, wurde ausserdem im Rahmen einer Kollaboration mit der Hautklinik Darmstadt humane Haut *in vitro* als Explantat kultiviert. Hierfür wurde Haut verwendet, die bei plastischen Operationen anfiel und nicht mehr für den Patienten benötigt wurde. Die Verwendung der humanen Haut erfolgte nach Zustimmung des Patienten und im Rahmen des Ethikantrags FF 136/2014 .

Kultivierung des Hautäquivalents EFT400

Die Hautäquivalente befinden sich in entsprechenden Inserts mit einer Membran, welche auch für die weitere Kultivierung verwendet wurden. Zum Transport wurde das Gewebe auf ca. 4 °C gekühlt und befand sich in Inserts in 6-well-Platten, die mit einem speziellen Nähragar gefüllt waren. Nach der Ankunft wurden die Hautäquivalente unter sterilen Bedingungen in Kultur genommen. Hierfür wurden 6-well-Platten mit jeweils 2,5 ml ASY-Medium bestückt und die Hautäquivalente mit ihren Inserts eingesetzt. Die Gewebekulturen wurden im Inkubator unter Standardbedingungen 16 h äquilibriert. Ein Medienwechsel des kompletten Mediums erfolgte am Tag der Bestrahlung. Nach der Bestrahlung wurde jeden Tag 1 ml des Mediums abgenommen und durch neues, vorgewärmtes MM-Medium ersetzt.

Kultivierung von humaner Haut

Humane Haut, die bei geplanten, notwendigen Eingriffen übrig blieb und keinerlei Nutzen für den Patienten hatte, wurde nach dessen für die *in vitro* Kultivierung verwendet. Die humane

Haut wurde im OP unter sterilen Bedingungen in feuchte Gaze gewickelt und in einem Zentrifugenröhrchen luftdicht verschlossen transportiert. Das Hautstück wurde mit Hilfe von Skalpell, Schere und Pinzette in ca. 0,7x 0,7 cm große Quadrate geschnitten. Falls notwendig wurde vorher Fett und Unterhautgewebe wegpräpariert. Das Hautexplantat wurde mit der epidermalen Seite nach oben in Inserts platziert. Hierbei war darauf zu achten, dass die dermale Seite luftblasenfrei auf der Membran auflag und somit in Kontakt mit Medium war. Die Inserts wurden in eine 6-well-Platte, in die jeweils 2 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS superior und 2 % Penicillin/Streptomycin pro well vorgelegt wurden eingesetzt und im Inkubator bei Standardbedingungen für mindestens 16h äquilibriert.

2.2.3 Bestrahlung

Sowohl die Zellkulturen, als auch die Gewebekulturen wurden mit verschiedenen Dosen bzw. Intensitäten Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen oder UV-B-Strahlung bestrahlt. Vor der Bestrahlung wurde das Medium von den jeweiligen Kulturen abgenommen und gegen die entsprechende Menge vorgewärmtes PBS ersetzt. Das abgenommene Medium wurde bei -80°C eingefroren und diente als Kontrollmedium vor Bestrahlung. Bei den Co-Kulturen wurden jeweils nur die Keratinozyten bestrahlt, während die Inserts mit den Fibroblasten in anderen 6-well-Platten mit PBS gelagert wurden. Gewebekulturen wurden immer von der Epidermissseite bestrahlt. Bei allen Bestrahlungen wurden Kontrollen mitgeführt, die genau wie die zu bestrahlenden Proben behandelt wurden, das heißt ebenfalls für die Bestrahlungsdauer in PBS überführt und zum Bestrahlungsplatz transportiert wurden (*sham-irradiated*). Nach der Bestrahlung erhielten alle Proben die jeweilige Menge des entsprechenden frischen, vorgewärmten Mediums.

Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung erfolgte an einer Röntgenröhre des Modells IV320-13 (Seifert, Ahrensburg). Es wurde eine Röhrenspannung von 250 kV, ein Röhrenstrom von 16 mA und eine Dosisleistung von 1 Gy/min verwendet. Die Proben wurden mit Dosen von jeweils 0,5 Gy, 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt, die mit einem elektronischen Dosimeter PTW-SN4 (PTW-Freiburg, Freiburg) gemessen wurden.

Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Die Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoffionen erfolgte am Schwerionensynchrotron (SIS). Aufgrund der Bauweise des Beschleunigers konnten die Proben hier nur in vertikaler Position bestrahlt werden. Für die Bestrahlung von Zellen wurden T25-Zellkulturflschen verwendet, die für die Bestrahlung komplett mit Medium gefüllt wurden. Die Bestrahlung erfolgte mit einem, auf 10 mm ausgedehnten Bragg-Peak, welcher durch eine Energievariation der Ionen erzeugt wird. Der Energiebereich lag hierbei zwischen 120 und 135 MeV/u und der LET bei ca.

100 keV/ μm . Um die Gewebekulturen in 6-well-Platten für die Bestrahlung vertikal aufstellen zu können, wurde in alle wells sterile, mit vorgewärmtem PBS getränkte Gaze gelegt, auf der die Membran der Inserts direkt aufsaß um die Proben während der Bestrahlungsdauer vor dem Austrocknen zu schützen. Ausserdem wurden die Platten mit Parafilm verschlossen. Die 6-well-Platten wurden ebenfalls mit einem ausgedehnten Bragg-Peak von 20 mm bestrahlt. Hier lag der Energiebereich bei 110-145 MeV/u und der LET bei ca. 80-90 keV/ μm . Einige Experimente mit humanen Hautäquivalenten wurden aus Gründen der Verfügbarkeit der Kohlenstoffbestrahlung in Heidelberg am HIT (Heidelberger Ionenstrahl Therapie) mit den gleichen Bestrahlungsmodalitäten bestrahlt. Da ein Transport der humanen Hautäquivalente aufgrund der Gefahr, dass Medium auf die apikale Oberfläche des Äquivalents gelangt, nicht möglich ist, wurde die gesamte Kultivierung in diesem Fall in einem Labor vor Ort durchgeführt.

UV-B-Bestrahlung

Die Bestrahlung mit UV-B erfolgte an einem Biolink-BLX-312 Crosslinker (Peqlab, Erlangen). Das Gerät enthält 5 Leuchtstoffröhren, die UV-Licht mit 280 bis 370 nm aussenden und insgesamt eine Leistung von 109 mJ/cm² pro Minute erbringen. Das Spektrum der Leuchtstoffröhren hat einen Peak bei einer Wellenlänge von 312 nm und sendet hauptsächlich UV-B-Strahlung aus. Es ist aber auch Strahlung mit Wellenlängen größer als 320 nm enthalten, dabei handelt es sich um UV-A-Strahlung. Deren Anteil macht ungefähr 30 % der Gesamtintensität aus. Da das Polystyrol der Kulturplatten einen Großteil der UV-B-Strahlung absorbieren würde, muss die Bestrahlung ohne Deckel der Kulturschalen bzw. -platten erfolgen. Die Proben wurden mit Intensitäten von jeweils 15 mJ/cm², 40 mJ/cm², 60 mJ/cm² und 100 mJ/cm² bestrahlt.

2.2.4 Probennahme

Probennahme für die Herstellung von Proteinlysaten und zur Messung der Zytokinfreisetzung aus Zellkulturen

Sowohl von Monolayer-Zellkulturen als auch von den Co-Kulturen wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Bestrahlung Proben für die Herstellung von Proteinlysaten und für die Zellzyklusanalyse und zur Messung der Zytokinfreisetzung genommen. Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die Keratinozyten bzw. bei den Co-Kulturen die Keratinozyten und Fibroblasten getrennt von einander zuerst mit PBS gewaschen, dann trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss wurde wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben lysiert. Das Medium der Zellkulturen wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Ca. 1 ml des Überstandes wurde abgenommen und bei -80°C für spätere ELISA-Messungen gelagert.

Probennahme für Paraffinschnitte, Proteinlysate und Messung der Zytokinfreisetzung aus Gewebekulturen

Sowohl das Hautäquivalent als auch die humane Haut wurden zu entsprechenden Zeitpunkten nach der Bestrahlung für die weitere histologische Aufarbeitung fixiert bzw. für die Herstellung von Proteinlysaten bei -80°C eingefroren. Hierfür wurden die Proben unter sterilen Bedingungen aus den Inserts entnommen und mit Hilfe eines Skalpells in 2 ungefähr gleichgroße Teile geschnitten. Eine Hälfte wurde für mindestens 4 Stunden in einer 4 %-igen PFA-Lösung fixiert, die andere Hälfte der Probe wurde eingefroren und später wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben lysiert. Bei dem Hautäquivalent war es möglich mit Hilfe von zwei Pinzetten die Epidermis von der Dermis zu trennen und separat für die Lyse zu verwenden. Es wurde ausserdem Medium für die Analyse der Zytokinfreisetzung abgenommen und ebenfalls bei -80°C gelagert. Explantate humaner Haut wurden vor dem Zerteilen gewogen, um später die im ELISA gemessene Zytokinfreisetzung auf das Gewicht der Probe beziehen zu können.

2.2.5 Zellzyklusanalyse zur Bestimmung des Sub-G1-Anteils

Die Zellen wurden wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben trypsiniert und gemeinsam mit dem Wasch-PBS als auch dem Kulturmedium, welches eventuell abgelöste Zellen enthält, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde nach einem Waschschrift in PBS durch die langsame Zugabe von eiskaltem 70 %-igem Ethanol und die Inkubation für 1 h bei 4°C fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte durch die Zugabe von 1 ml DAPI-Färbelösung ($2\ \mu\text{g}/\text{ml}$) und einer Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln. Danach wurde die Probe zentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und die Suspension in Rundbodenröhrchen überführt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer (BD FACSCanto®II Flow Cytometry System) und die anschließende Auswertung mit der Software FlowJo 7.6.5. Der Anteil der Zellen in der Sub-G1-Phase wurde in das Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt, die Ergebnisse verschiedener Experimente gemittelt und der Standardfehler bestimmt

2.2.6 Histologie

Paraffinierung und Einbettung

Die Gewebeproben wurden für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur in PFA fixiert und anschließend mehrfach in PBS und danach in 70 %-igem Ethanol gewaschen, in dem sie bis zur Paraffinierung gelagert werden konnten. Anschließend durchliefen die Proben eine Dehydrierungsreihe (siehe Tabelle 2.1) und wurden anschließend für insgesamt 4 Stunden in flüssigem Paraffin inkubiert, damit dieses vollständig in die Proben eindringen konnte.

Tabelle 2.1: Dehydrierung und Paraffinierung von Gewebeproben

Lösung	Inkubationszeit
Ethanol 95 %	über Nacht
Ethanol 100 % I	90 Minuten
Ethanol 100 % II	90 Minuten
Xylol I	15 Minuten
Xylol II	15 Minuten
Paraffin I	120 Minuten
Paraffin II	120 Minuten

Nach der Inkubation in Paraffin wurden die Proben in Blockformen ausgerichtet und in Paraffin gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Blöcke mit den Proben entsprechend zugeschnitten und mit flüssigem Paraffin auf spezielle Träger geklebt, um anschließend Querschnitte durch das Gewebe herstellen zu können.

Herstellung von Paraffinschnitten

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms RM2235 (Leica, Wetzlar) wurden von den in Paraffin eingebetteten Proben 5 μm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden zuerst auf 37 °C warmes Wasser gelegt um eine Streckung des Schnitts zu ermöglichen und anschließend auf Objektträger aufgenommen. Um eine optimale Anhaftung des Schnittes auf dem Objektträger zu gewährleisten wurden diese für ca. 1 Stunde auf einer Heizplatte bei ca. 37 °C inkubiert. Die Schnitte konnten danach bei Raumtemperatur gelagert werden.

Deparaffinierung

Sowohl für histologische Färbungen, als auch für Immunfärbungen mussten die Schnitte deparaffiniert und anschließend hydriert werden. Hierfür durchliefen die zu färbenden Schnitte eine absteigende Ethanolreihe (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Deparaffinierung und Hydrierung von Gewebeschnitten

Lösung	Inkubationszeit
Xylol I	10 Minuten
Xylol II	10 Minuten
Ethanol 100 % I	5 Minuten
Ethanol 100 % II	5 Minuten
Ethanol 95 %	5 Minuten
Ethanol 70 %	5 Minuten
H ₂ O	5 Minuten

Hematoxylin-Eosin-Färbung

Um die Morphologie des Gewebes untersuchen zu können, wurde eine Hematoxylin-Eosin-Färbung angefertigt. Hämatoxylin ist ein saures Färbereagenz und weist bei einem niedrigen pH-Wert eine positive Ladung auf. Daher färbt es negativ geladene Moleküle innerhalb einer Zelle, wie beispielsweise das Chromatin im Zellkern, blau an. Eosin hingegen dient als Gegenfärbung, da es nicht den Zellkern einer Zelle, sondern die Bindegewebsfasern und Bestandteile des Zytoplasmas pink anfärbt.

Nach der Deparaffinierung und Hydrierung (siehe Tabelle 2.2) der Gewebeschnitte wurden diese für ca. 8 bis 10 Minuten in Hematoxylinlösung nach Mayer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen, was zu einem pH-Umschlag vom sauren ins neutrale Millieu und so zur dunkelvioletten Färbung des Hematoxylins führt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift in Millipore-Wasser gefolgt von einer Inkubation für ca. 30 Sekunden in Eosin-Lösung. Die Schnitte wurden danach zuerst mit 70 %-igem Ethanol abgespült und anschließend durch Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder dehydriert (siehe Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Dehydrierung von Gewebeschnitten

Lösung	Inkubationszeit
Ethanol 70%	5 Minuten
Ethanol 95%	5 Minuten
Ethanol 100% I	5 Minuten
Ethanol 100% II	5 Minuten
Xylol I	10 Minuten
Xylol II	10 Minuten

Nach der letzten Inkubation in Xylol wurden die Gewebeschnitte mit Eukitt überschichtet und mit einem Deckglas möglichst luftblasenfrei eingedeckt. Anschließend konnte die optische und statistische Auswertung am Lichtmikroskop erfolgen. Die gefärbten Schnitte konnten bei Raumtemperatur gelagert werden.

Antikörperfärbung

Um die Expression von bestimmten Proteine und deren Lokalisierung im Gewebe nachzuweisen, wurden Immunfärbungen mit verschiedenen proteinspezifischen Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte zuerst wie in Tabelle 2.2 beschrieben deparaffiniert und rehydriert. Nach der Inkubation in Wasser für 5 Minuten wurden die Schnitte zuerst für 15 Minuten in Citrat-Puffer äquilibriert und anschließend 4 mal für jeweils 5 Minuten in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt um die Demaskierung der Antigene zu gewährleisten. Nach dem Abkühlen wurden die Gewebeschnitte 3 mal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend

in einer Färbebox mit einer 0,3 %-igen H₂O₂-Lösung in PBS überschichtet um das Gewebe zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, mit Blocklösung, welche Ziegen Serum enthält, überschichtet um alle Antikörper-Bindestellen zu besetzen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem, in Blocklösung verdünnten Erstantikörper (siehe Tabelle 2.4), der spezifisch an das Zielprotein bindet über Nacht bei 4 °C.

Tabelle 2.4: Erstantikörper für immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung
aktive Caspase 3	Kaninchen	Mensch, Maus	1:100
Ki 67	Kaninchen	Mensch, Maus	1:100
Cytokeratin 10	Maus	Mensch, Maus	1:100
E-Cadherin	Kaninchen	Mensch	1:500
CD1a	Maus	Mensch	1:100

Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Schnitte drei Mal für ca. 10 Minuten in PBS gewaschen. Der entsprechende biotinylierte Zweitantikörper wurde wie in Tabelle 2.5 angegeben, in Blocklösung verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Tabelle 2.5: Zweitantikörper für immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
biotinylierter anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:100
biotinylierter anti-Maus IgG	Pferd	1:100

Danach wurden die Schnitte drei mal für ca. 10 Minuten in PBS gewaschen, während in der Zwischenzeit das ABC-Reagenz wie im Kit beschrieben angesetzt wurde. Dieses wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Avidin einen Komplex mit der biotinylierten Meerrettichperoxidase bilden konnte. Nach dem Waschen wurde die ABC-Lösung auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten erfolgt die Detektion mit DAB oder dem ImmPACT®VIP Peroxidase Substrat Kit wie im Kit beschrieben. Nach dem Abstoppen der Substrat-Reaktion in Wasser erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für ca. 8 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte für ca. 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen um einen Umschlag des pH-Werts zu erreichen. Nach 5 Minuten Inkubation in Millipore-Wasser wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe wie in Abschnitt 2.2.6 und Tabelle 2.3 beschrieben dehydriert und anschließend mit Eukitt eingedeckt.

Quantitative Auswertung morphologischer und struktureller Veränderungen

Anhand der Hematoxylin-Eosin-Färbungen wurden verschiedene morphologische und strukturelle Veränderungen der Hautäquivalente quantitativ ausgewertet. Hierfür wurden pro Objektträger von zwei möglichst weit auseinander liegenden Gewebeschnitten jeweils 10 mikroskopische Aufnahmen mit einem 40x-Objektiv gemacht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Gewebe im Sichtfeld immer die gleiche Ausrichtung hatte und Sichtfelder gewählt wurden, die nicht zu dicht am Rand des Gewebeschnitts lagen. In diesen 20 Aufnahmen pro Probe wurden jeweils die pyknotischen Kerne in der vitalen Epidermis und im *stratum corneum* gezählt und daraus die durchschnittliche Anzahl an pyknotischen Kernen pro Sichtfeld berechnet. Die Dicke des *stratum corneums* und der vitalen Epidermis wurde mit Hilfe des Programms ImageJ gemessen. Die Dicke des *stratum corneums* wurde in das Verhältniss zur Dicke der vitalen Epidermis gesetzt.

Die Struktur und Morphologie der Basalschicht konnte nur semiquantitativ ausgewertet werden. Hierfür wurde jedes der 20 aufgenommenen Sichtfelder einer Kategorie zugeordnet, indem überprüft wurde, ob die Basalzellen palisadenartig, teilweise pflastersteinartig oder im gesamten ausgewerteten Sichtfeld pflastersteinartig angeordnet waren. So konnte für jede Kategorie ein prozentualer Anteil angegeben werden, der die Anzahl der Bilder die dieses Merkmal aufweisen widerspiegelt.

Diese Messungen und Analysen wurden für mindestens 4 Proben aus 2 unabhängigen Versuchen durchgeführt (n=4, N=2). Für die grafische Darstellung wurden diese 4 Werte gemittelt und der Standardfehler berechnet.

Quantitative Auswertung der Proliferation

Um die Anzahl an proliferierenden Zellen zu bestimmen, wurde zuerst eine Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.6). Von diesen Färbungen wurden ebenfalls, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, 20 mikroskopische Aufnahmen gemacht. In diesen wurde dann die Anzahl an Basalzellen und die Anzahl Ki67-positiver Zellen per Hand gezählt. Anschließend wurde die Anzahl an Ki67 positiven Zellen pro 100 Basalzellen bestimmt und die Werte der bestrahlten Proben in das Verhältniss zu der entsprechenden Kontrolle gesetzt. Auch hier wurden Mittelwerte aus mindestens 4 Proben aus 2 unabhängigen Experimenten gebildet und der Standardfehler angegeben.

Quantitative Auswertung der CD1a-positiven Zellen

Um die Anzahl der Langerhanszellen in humaner Haut zu bestimmen, wurde eine Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen CD1a durchgeführt und wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben 20 mikroskopische Aufnahmen gemacht. In diesen Aufnahmen wurde alle Zellen der vitalen Epidermis und die CD1a-positiven Zellen gezählt. Aus diesen Werten wurde die Anzahl CD1a positiver zellen pro 100 Zellen bestimmt und in das Verhältniss zu dem Wert der

unbestrahlten Kontrolle gesetzt. Die Ergebnisse der verschiedenen Proben wurden gemittelt und der Standardfehler bestimmt.

Bestimmung der Position der Langerhanszellen

Aus den 20 mikroskopischen Aufnahmen der Färbung mit dem Antikörper gegen CD1a wurden zufällig 5 Stück ausgewählt. In diesen wurde die Position von 4 Langerhanszellen ermittelt. Hierfür wurde zuerst die Dicke der vitalen Epidermis von der Basalmembran bis zum *stratum corneum* und dann die Strecke von der Basalmembran bis zur ausgewählten Langerhanszelle gemessen. Diese Strecke wurde durch die Dicke der Epidermis geteilt. So erhielt man einen relativen Wert, der die Position der Langerhanszelle in der Epidermis angibt. Um so näher sich die Zelle am *stratum corneum* befindet, umso weiter nähert sich der Wert der Eins an. Grafisch wird diese Auswertung mit einem Boxplot dargestellt, in den die Werte aller Proben einzeln einfließen. Es werden der Median, das obere und untere Quartil als auch die Extremwerte dargestellt.

2.2.7 Proteinexpressionsanalyse

Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen wurde der Lyon-Lyse-Puffer mit der in Abschnitt 2.1.5 beschriebenen Zusammensetzung verwendet. Nach der in Abschnitt 2.2.4 beschriebenen Probennahme befand sich sowohl das Medium, das Wasch-PBS als auch die Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen. Dieses wurde bei 400 g für 8 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt. Das Wasch-PBS wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Je nach Größe des Pellets wurde dieses in 30-60 μ l Lysepuffer resuspendiert und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zelllyse für 60 Minuten auf Eis. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurde die Zelllyse mechanisch durch mehrfaches auf- und abziehen mit einer Spritze mit dünner Kanüle unterstützt. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde nach der Inkubationszeit bei 13.300 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und konnte bei -20 °C gelagert werden.

Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe wurde RIPA-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.5) verwendet. Die Hautproben bzw. Hautäquivalente wurden aufgetaut und mit 200 μ l Lysepuffer versetzt. Die Lyse erfolgte mechanisch mit Hilfe eines Pistells während die Proben auf Eis gelagert wurden. Nach der mechanischen Lyse erfolgte eine Homogenisierung der Proben im Ultraschallbad für zwei Mal 5 Minuten auf höchster Stufe. Anschließend wurde bei 13.300 g

und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –20 °C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Lysate wird mit der Methode nach Bradford bestimmt, da diese besonders geeignet ist um eine Konzentrationsbestimmung bei einer großen Probenanzahl durchzuführen. Die Methode beruht auf der Änderung des Absorptionsbereichs des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue beim Übergang vom kationischen in den anionischen Zustand nach Bindung an Proteine. Da die damit einhergehende Extinktionsänderung proportional zur Proteinkonzentration ist, kann diese in Kombination mit einer Eichreihe zur Proteinbestimmung verwendet werden.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und 1:200 mit RIPA-Puffer verdünnt. Für die Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) mit RIPA-Puffer hergestellt, deren Konzentrationen von 5 µg/ml bis 40 µg/ml reichten. Jeweils 50 µl des RIPA-Puffer als Blank, der Standardreihe als auch der verdünnten Proben wurden in Doppelbestimmung in die entsprechenden Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Für die Detektion wurde das fertige Bradford-Reagenz Roti-Quant der Firma Roth verwendet, welches 2 Teile zu 5 Teilen mit Millipore-Wasser verdünnt wurde. In jedes Well werden 200 µl der Färbelösung pipettiert und auf dem Schüttler für 10-15 Minuten inkubiert. Die Messung erfolgte bei 540 nm. Mit Hilfe der erhaltenen Absorptionswerte für die Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Steigung und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung konnte die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

Gelelektrophorese und Western Blot

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese können Proteine aufgetrennt werden. Die Laufgeschwindigkeit der einzelnen Proteine ist einerseits abhängig von Größe und Ladung, andererseits aber auch vom Vernetzungsgrad des Gels. Für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 120 kDa wurden in dieser Arbeit 12%ige SDS-Trenn-Gele verwendet. Das Sammelgel hat mit 3,2 % einen wesentlich geringeren SDS-Anteil und dient zum Sammeln der Probe und der Bildung einer einheitlichen Lauffront. Sowohl für das Gießen der Gele als auch für die anschließende Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN Tetra System von Biorad verwendet.

Aus den im Bradford bestimmten Proteinkonzentrationen wurde das für 15 µg Protein benötigte Volumen bestimmt und im Verhältnis 1:2 mit SDS-Proben-Puffer versetzt. Dieser enthält sowohl β-Mercaptoethanol, was sowohl die im Protein vorkommenden Disulfidbrücken spaltet, als auch Natrium-Dodecylsulfat, was dafür sorgt, dass alle Proteine negativ geladen sind. Die mit Proben-Puffer gemischten Proben wurden bei 90 °C für 10 Minuten im Heizblock inkubiert und dadurch vollständig denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufge-

tragen. Zur späteren Bestimmung der Größe der Proteine wird ein Marker ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte je nach Anzahl der Gele bei einer Stromstärke von 16-55 mA (120-60 V) für circa 1,5 Stunden.

Für den Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran wurde das Mini Trans-Blot System von Biorad verwendet. Die Membran wurde zuerst für 15 Sekunden in Methanol aktiviert, mit TBST-Puffer gewaschen und dann auf das Gel gelegt. Gel und Membran wurden zwischen TBST-Puffer getränkten Schwämmen und Filterpapier platziert und in die Transferapparatur eingebaut. Der Transfer selbst erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA (ca. 90 V) für 2 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C.

Antikörperfärbung der Membran und Detektion

Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 5 %-igem Blockingpuffer inkubiert, um alle freien Bindestellen zu besetzen und die unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Die Membranen wurden entsprechend der zu detektierenden Proteine horizontal geschnitten. Die Membranteile wurden in eine Petrischale gelegt, mit dem in Blocklösung verdünnten Erstantikörper (siehe Tabelle 2.6) überschichtet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 2.6: Erstantikörper für die Detektion von Proteinen im Westernblot

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	erwartete Bande (kDa)
Caspase 3	Kaninchen	1:100	35 kDa (ungeschnitten) 17 und 19 kDa (geschnitten)
PARP	Kaninchen	1:1.000	116 kDa (ungeschnitten) 89 kDa (geschnitten)
Tubulin	Maus	1:4.000	50 kDa

Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran drei Mal für jeweils 5 Minuten in TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dieser wurde ebenfalls in Blocklösung verdünnt (siehe Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Zweitantikörper für die Detektion von Proteinen im Westernblot

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Mouse IgG HRP-linked	Schaf	1:10.000
Rabbit IgG HRP-linked	Esel	1:10.000

Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran wieder drei Mal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Zur Detektion wurde Pierce ECL Plus verwendet, ein Acridan-basiertes chemilumineszentes Substrat der Meerrettichperoxidase welches sowohl zur Detektion mit einem Röntgenfilm als auch einer CCD-Kamera geeignet ist. Das Substrat reagiert mit der Meerrettichperoxidase zu Acridinium-Estern welche wiederum mit Peroxid reagieren und ein bis zu 2 Stunden stabiles Chemilumineszenz-Signal erzeugen. Die Membran wurde für 5 Minuten mit ECL-Lösung inkubiert, in eine Folie eingeschweisst und mit einem Röntgenfilm detektiert.

2.2.8 Messung der Zytokinfreisetzung mit ELISA

Um Zytokine zu detektieren, die von Zellen oder von Gewebe ins Medium abgegeben wurden, wurde ein enzymgekoppelter Immunttest gegen verschiedene Zytokine durchgeführt. Hierfür wurde entweder das ELISA Ready-SET-Go!™ oder das Platinum-ELISA Kit der Firma eBioscience verwendet und entsprechend dem jeweiligen Datenblatt durchgeführt. Prinzipiell beruht der verwendete ELISA-Test auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen und eine anschließende Farbreaktion. Das zu detektierende Zytokin bindet an den sogenannten Fänger-Antikörper, mit dem der Boden einer 96-well-Platte beschichtet wurde. Im nächsten Schritt bindet ein biotinylierter Antikörper an eine andere Domäne des zu detektierenden Zytokins. An das Biotin dieses Antikörpers bindet hochaffin ein HRP-gekoppeltes Streptavidin und bildet einen stabilen Komplex. Das zugegebene Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) wird durch die Meerrettichperoxidase oxidiert, wobei ein blauer Farbstoff entsteht welcher proportional zu der ursprünglich vorhandenen Zytokinkonzentration ist. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure abgestoppt wobei es zu einem Farbumschlag von blau zu gelb kommt. Die Absorption kann im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden. Durch das mitführen einer Standardreihe mit bekannten Zytokinkonzentrationen und eines Blanks kann eine Standardkurve ermittelt werden anhand derer die jeweiligen Zytokinkonzentrationen der Proben errechnet werden können. Für Mono- und Co-Kulturen wurden die Zytokinkonzentrationen jeweils auf 10.000 Zellen normiert. Bei humanen Hautexplantaten wurde auf das Gewicht des Hautexplantats normiert, während durch die standardisierte Größe der Hautäquivalente keine Normierung notwendig war. Die Zytokinkonzentrationen der bestrahlten Proben wurden für jeden Versuch auf die entsprechenden Kontrollen bezogen. Diese Werte wurden dann gemittelt und ein Standardfehler berechnet.



3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten die Effekte von ionisierender Strahlung, insbesondere von geringen Dosen Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen, auf humane Haut untersucht werden. Die zentrale Fragestellung war hierbei, ob es für die Bestrahlung mit geringen oder fraktionierten Röntgen- und Kohlenstoffdosen einen spezifischen Effekt gibt, welcher die anti-inflammatorische Wirkung von Niedrigdosisbestrahlung erklären kann. Als Referenzstrahlung, für die am ehesten Vergleichswerte in der Literatur zu finden sind, wurde UV-B-Strahlung verwendet. Um diese Fragestellung möglichst genau untersuchen zu können, wurden Modellsysteme verschiedener Komplexität verwendet. Das einfachste Kultursystem stellen primäre Keratinozyten als Monokulturen dar. Als komplexeres System wurde eine Co-Kultur aus primären Keratinozyten und primären Fibroblasten und schließlich ein humanes, dreidimensionales Hautäquivalent verwendet. Ausserdem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Kultursystem für humane Haut etabliert.

3.1 Monokulturen primärer Keratinozyten

Die ersten Versuche dieser Arbeit wurden mit einem Modellsystem geringer Komplexität, mit Monokulturen primärer Keratinozyten (NHEK), durchgeführt.

3.1.1 Apoptose und Nekrose

Da apoptotische Zellen sowohl durch das Fehlen pro-inflammatorischer Signale, aber auch durch die aktive Freisetzung anti-inflammatorischer Faktoren einer Entzündungsreaktion entgegen wirken können [44] [45], wurde zuerst untersucht, ob und in welchem Ausmaß Apoptose nach den verschiedenen Bestrahlungsarten vorkommt. Hierfür wurde die Expression der Proteine PARP und Caspase 3 mit Hilfe von Western Blot untersucht. Caspase 3 liegt in vitalen Zellen in inaktiver, das heisst ungespaltener, Form vor und hat ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa. In apoptotischen Zellen wird über extrinsische und intrinsische Signalwege die katalytische Spaltung des Proteins in eine 19 und eine 17 kDa große Untereinheit aktiviert. Aus mehreren dieser Untereinheiten kann sich dann das aktive Heterotetramer bilden, welches eine wichtige Rolle im weiteren apoptotischen Signalweg spielt. Das Vorkommen der 19 und 17 kDa großen Untereinheiten gilt als sicheres Zeichen für Apoptose [36] und kann neben der nicht-aktiven Caspase 3 ebenfalls im Western Blot detektiert werden.

PARP ist ein 116 kDa schweres Protein, welches eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur spielt, da es Einzelstrangbrüche detektiert und markiert. Ist die Zelle allerdings apoptotisch, wird PARP von der aktivierten Caspase 3 gespalten und dadurch inaktiv. So wird verhindert, dass Energie in

die Reparatur von DNA-Schäden investiert wird, obwohl in der Zelle bereits Apoptose eingeleitet wurde. Die aktivierte Caspase 3 spaltet PARP in ein 27 und ein 89 kDa großes Fragment, welches im Western Blot detektiert werden kann. Da die Spaltung von PARP im Apoptose-Signalweg nach der Aktivierung der Caspase 3 erfolgt, gilt das Vorkommen des 89 kDa Fragments ebenfalls als ein sicheres Zeichen für eine bereits eingeleitete Apoptose [36].

Für alle hier gezeigten Western Blots wurde eine Positivkontrolle mitgeführt um zu zeigen, dass mit den verwendeten Antikörpern und dem verwendeten Protokoll die entsprechenden Fragmente von Caspase 3 und PARP nachgewiesen werden konnten. Als Positivkontrolle wurden Lysate von HaCaT-Zellen 5 Tage nach Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung verwendet. In allen Blots sind in den Positivkontrollen jeweils deutlich Banden zu erkennen, die aufgrund ihrer Laufhöhe dem 89 kDa schweren Proteinfragment von PARP als auch den 17 und 19 kDa schweren aktiven Untereinheiten von Caspase 3 zuzuordnen sind (Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3). Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet. Da von allen Proben eine identische, mit Hilfe eines Bradford-Tests bestimmte Proteinmenge aufgetragen wurde, geht man davon aus, dass die α -Tubulin Menge in allen Proben gleich ist und somit alle entsprechenden Banden die gleiche Intensität haben. Die hier gezeigten Blots wurden mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert und sind für quantitative Auswertungen nicht geeignet, da man mit dieser Methode keine Aussage über die Sättigung der Banden treffen kann. Die Detektion mit einem Röntgenfilm ist jedoch eine sehr sensitive Methode, die für die qualitative Aussage, ob die beiden Spaltprodukte der Proteine PARP und Caspase 3 vorhanden sind, geeignet ist.

Sowohl nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen mit Dosen von bis zu 10 Gy, als auch nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit Dosen von bis zu 2 Gy kann zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung weder aktivierte Caspase 3 noch das PARP-Fragment detektiert werden (Abbildungen 3.1 und 3.2). Auch die gleichmäßigen Banden, die aufgrund ihrer Größe den ungespaltenen Proteinen PARP bzw. Caspase 3 zuzuordnen sind, geben keinen Hinweis darauf, dass ein Teil des Proteins gespalten wurde.

Bereits 12 h nach der Bestrahlung mit UV-B kann bei Intensitäten von 40 und 60 mJ/cm² gespaltenes PARP als auch aktivierte Caspase 3 nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Es sind deutliche Banden zu erkennen, die aufgrund ihrer Laufhöhe den entsprechenden PARP- und Caspase 3-Fragmenten zugeordnet werden können. Die Banden, die das jeweilige ungespaltene Protein repräsentieren nehmen in ihrer Intensität ab. 72 Stunden nach der Bestrahlung sind bei den Proben, die mit einer Intensität von 60 mJ/cm² bestrahlt wurden, keine Banden mehr sichtbar. Dies kann darauf hindeuten, dass die meisten Zellen apoptotisch waren, der Prozess der Apoptose jedoch schon abgeschlossen und alle Proteine degradiert sind.

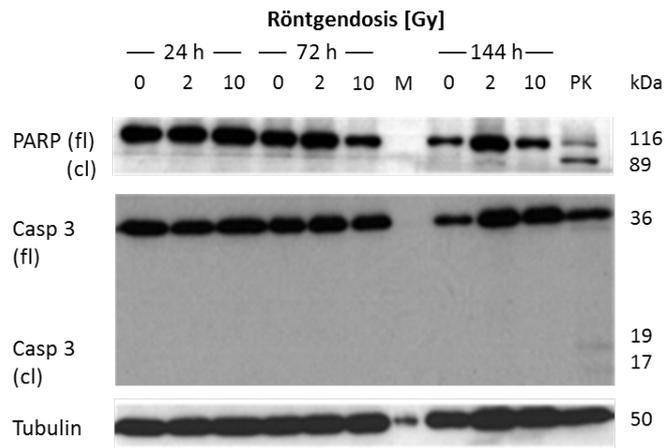


Abbildung 3.1: Westernblotanalyse der Expression von Caspase 3 und PARP in NHEK-Monokulturen nach der Bestrahlung mit 0; 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung; repräsentativer Western Blot aus N=3 unabhängigen Versuchen; PK=Positivkontrolle, fl=ungespaltenes Protein, cl=Proteinfragment, M=Marker

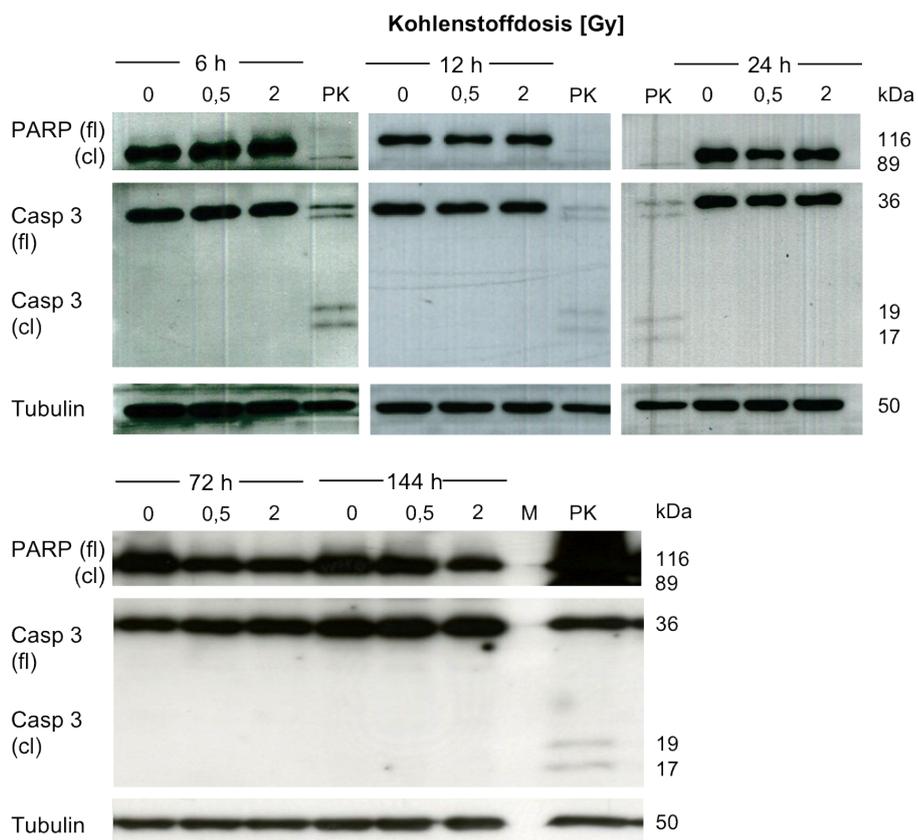


Abbildung 3.2: Westernblotanalyse der Caspase 3 und PARP-Expression von NHEK-Monokulturen nach der Bestrahlung mit 0; 0,5 und 2 Gy Kohlenstoffionen; repräsentativer Western Blot aus N=3 unabhängigen Versuchen; PK=Positivkontrolle, fl=ungespaltenes Protein, cl=Proteinfragment, M=Marker

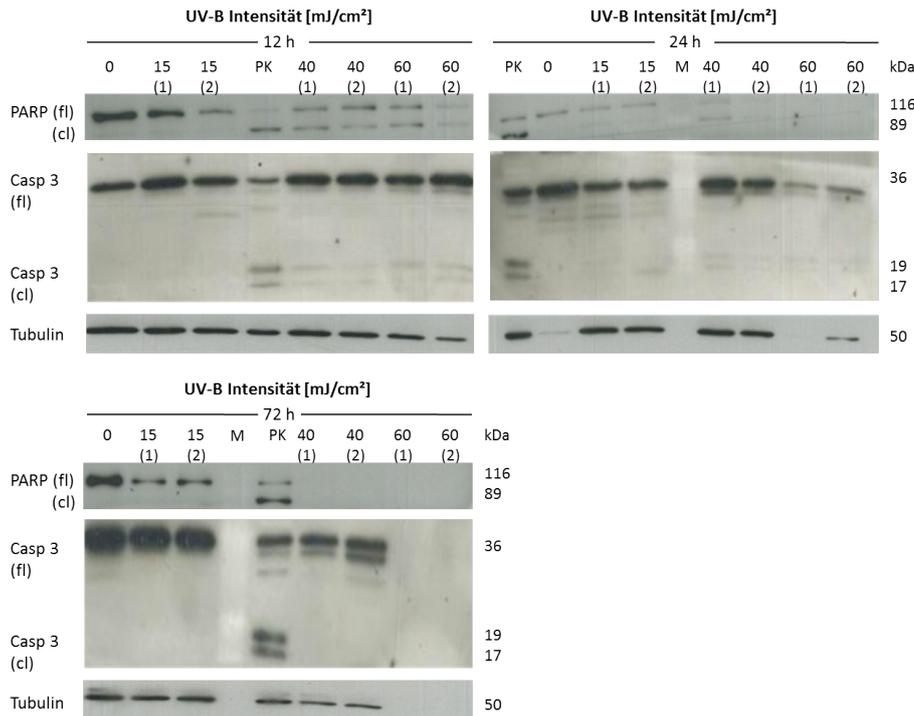


Abbildung 3.3: Westernblotanalyse der Caspase 3 und PARP-Expression von NHEK-Monokulturen nach der Bestrahlung mit 15; 40 und 60 mJ/cm² UV-B-Strahlung; repräsentativer Western Blot aus N=3 unabhängigen Versuchen; PK=Positivkontrolle, fl=ungespaltenes Protein, cl=Proteinfragment, M=Marker

Eine weitere Methode um das Vorkommen von apoptotischen Zellen zu bestimmen ist die Analyse der Sub-G1-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Apoptotische Zellen haben einen geringeren DNA-Gehalt als vitale Zellen, die sich in der G1, S oder G2 Phase des Zellzyklus befinden und weisen daher eine geringere Fluoreszenzintensität nach der Färbung mit DAPI auf. Dies kann vom Durchflusszytometer detektiert und im Verhältniss zur gemessenen Gesamtzellzahl angegeben werden (Abbildung 3.4).

Die Quantifizierung des Anteils der Sub-G1-Zellen bestätigt das Ergebnis des Western Blots, dass nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen keine apoptotischen Zellen vorhanden sind. Der Anteil der Zellen mit Sub-G1-DNA-Gehalt liegt zu allen Zeitpunkten bei weit unter 5 % und zeigt nach der Bestrahlung keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den Kontrollen. Nach der Bestrahlung mit UV-B zeigt sich nach 40 und 60 mJ/cm² ein im Vergleich zu den Kontrollen, deutlich erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen. Dieser Effekt ist bereits 24 h nach Bestrahlung zu erkennen, wird im Laufe der Kultivierung deutlicher und liegt bei ca. 20% .

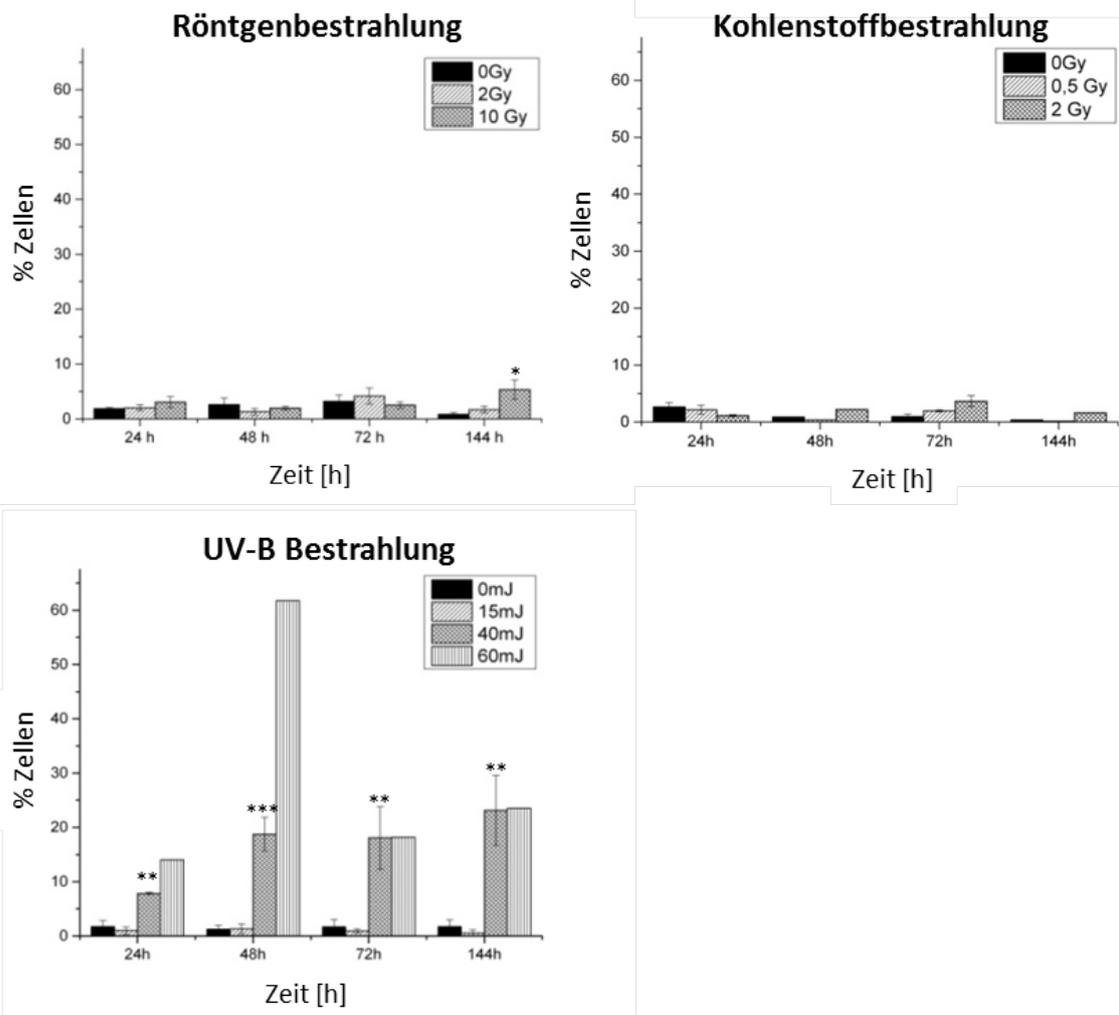


Abbildung 3.4: Sub-G1-Analyse von NHEK-Monokulturen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen in Sub-G1 bezogen auf die gemessene Gesamtzellzahl; N=3, n=4; SEM; $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$, $p \leq 0,001=***$

Neben Apoptose, dem programmierten Zelltod, kann es nach Bestrahlung auch zu Nekrose kommen. Diese Form des spontanen Zelltodes läuft unkontrolliert ab. Der Zellinhalt wird freigesetzt, was einen pro-inflammatorischen Effekt hervorruft [36]. Das *high mobility group 1 (HMGB1) protein* ist in intakten Zellen ein Faktor, welcher während der Interphase und der Mitose an das Chromatin bindet, an der DNA-Organisation und an der Regulierung der Transkription beteiligt ist. Da die Bindung an das Chromatin nicht sehr stabil ist, wird HMGB1, sobald die Membranintegrität verloren geht, sehr schnell in das Medium freigesetzt. Kann das Protein in Medienüberständen gemessen werden, gilt dies als sicheres Zeichen für das Auftreten von Nekrose [46].

In Medienüberständen von Monokulturen primärer Keratinozyten wurde die Freisetzung von HMGB1 24 h nach der Bestrahlung mittels ELISA gemessen (Abbildung 3.5). Nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und Kohlenstoffionen kann keine deutliche Erhöhung der HMGB1-Freisetzung gemessen werden. Nach der Bestrahlung mit UV-B kommt es bei Intensitäten von 40 mJ/cm² zu einer Vervielfachung der HMGB1-Freisetzung. Zu diesem Zeitpunkt und nach der Bestrahlung mit dieser Intensität kommt es bei einem Teil der Zellen zur Ablösung vom Boden der Zellkulturflasche, was ebenfalls darauf hinweist, dass diese Zellen nekrotisch sind.

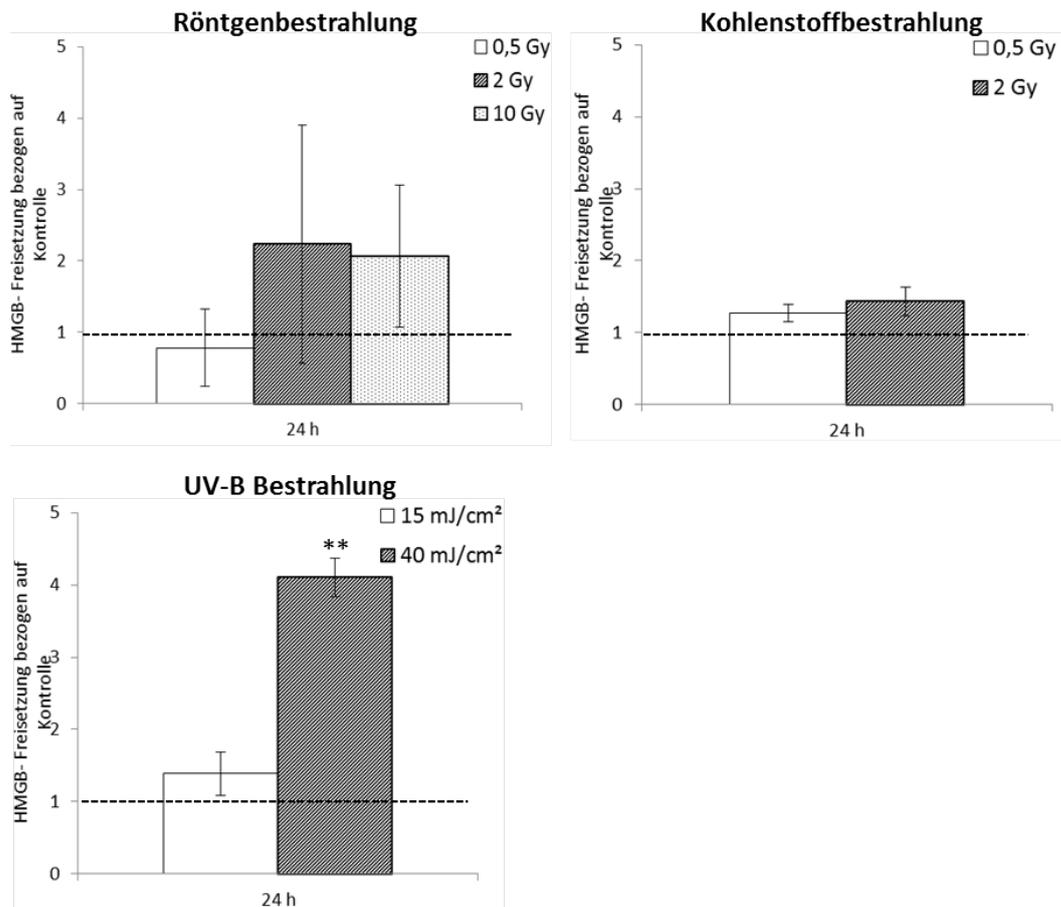


Abbildung 3.5: Freisetzung des Nekrose-Markers HMGB1 nach Bestrahlung von primären Keratinozyten in Monokulturen, gemessen mit Hilfe eines ELISA-Tests. Dargestellt ist die HMGB1-Freisetzung bezogen auf die Kontrolle mit der jeweiligen Standardabweichung; N=2; n=2; SEM, $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$

3.1.2 Zytokinfreisetzung

Neben apoptotischen und nekrotischen Zellen kann auch eine direkt strahleninduziert veränderte Zytokinfreisetzung einen pro- oder anti-inflammatorischen Effekt hervorrufen. Deshalb wurde in Medienüberständen die Freisetzung typischer pro- (IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8) und anti (IL-10, IL-13, TGF- β)-inflammatorischer Zytokine mit Hilfe eines ELISA-Tests gemessen.

Die beiden anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 konnten in den Überständen nicht nachgewiesen werden. Für IL-6 und IL-8 konnte in den Kontrollen keine Freisetzung detektiert werden, während für die bestrahlten Proben eine dosisabhängig ansteigende IL-6-Freisetzung gemessen und die IL-8-Freisetzung nach der Bestrahlung mit 40 mJ/cm² induziert werden konnte. Da diese Messwerte jedoch nicht auf die Freisetzung der Kontrollen bezogen werden können, sind sie in den folgenden Grafiken nicht berücksichtigt. Dies zeigt allerdings, dass die IL-6- und IL-8-Freisetzung von Keratinozyten durch Bestrahlung induziert werden kann. Dieser Effekt ist für die UV-B Bestrahlung stärker ausgeprägt. In Abbildung 3.6 sind die Zytokinfreisetzungen für IL-1alpha, IL-2 und TGF-beta, normalisiert auf die Kontrolle, aufgetragen. Nach Röntgenstrahlung ist nach 0,5 Gy für IL-1alpha eine leicht, aber signifikant niedrigere Freisetzung zu erkennen, nach 2 und 10 Gy bleibt die Freisetzung der Kontrolle gegenüber unverändert. Die IL-2-Freisetzung nimmt für Dosen bis 2 Gy zu, während sie nach einer Bestrahlung mit 10 Gy jedoch der Kontrolle entspricht. Für die TGF-beta-Freisetzung ist ein dosisabhängiger Anstieg bis auf das 6-fache des Kontrolllevels bei 10 Gy zu beobachten. Nach der Bestrahlung mit UV-B Strahlung ist tendenziell eine Abnahme für die hier gemessenen Zytokine zu beobachten, allerdings ist diese nicht sehr ausgeprägt.

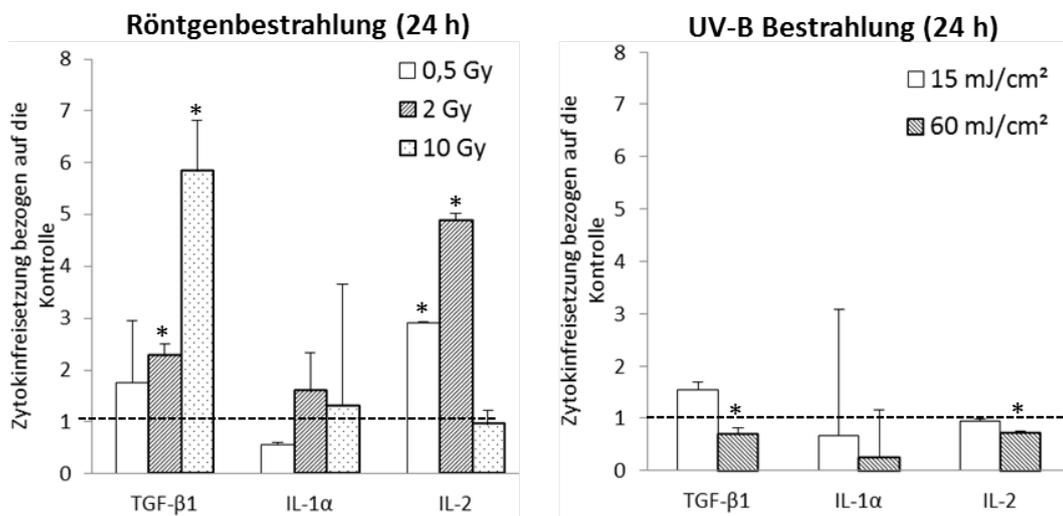


Abbildung 3.6: Freisetzung von pro- (IL-1alpha, IL-2) und anti- (TGF-beta1) inflammatorischen Zytokinen von primären Keratinozyten nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung; dargestellt ist die jeweilige Freisetzung des Zytokins bezogen auf die Kontrolle; N=2, n=3; SEM, $p \leq 0,05 = *$

3.2 Co-Kulturen aus primären Keratinozyten und Fibroblasten

Die Co-Kultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten ermöglicht es, Versuche unter Bedingungen durchzuführen, die einem Gewebe ähnlicher sind als Monokulturen. Durch die räumliche Nähe ist die Kommunikation der beiden Zelltypen über die Freisetzung von Zytokinen in das Medium möglich. Es ist allerdings zu beachten, dass sich die beiden co-kultivierten Zelltypen nicht in einer dreidimensionalen Umgebung befinden und daher die Bedingungen, wie sie in einem Gewebe herrschen, nur bedingt wiedergegeben werden. Ausserdem muss bedacht werden, dass aus technischen Gründen in den Co-Kulturen deutlich mehr Fibroblasten vorhanden sind, als es in einem Gewebe der Fall ist. In den Co-Kulturen ist das Verhältnis von Fibroblasten zu Keratinozyten ca. 3:1, während in der humanen Haut oder dem Hautäquivalent die Fibroblasten deutlich in der Unterzahl sind. Aus Gründen der Verfügbarkeit wurden mit den Co-Kulturen keine Experimente mit Kohlenstoffbestrahlung durchgeführt.

3.2.1 Apoptose und Nekrose

Um aktivierte Caspase 3 und PARP, die auch hier als Apoptosemarker dienen, zu detektieren wurden die Keratinozyten und Fibroblasten aus einer Probe getrennt voneinander lysiert und für einen Western Blot verwendet. Sowohl nach UV-B als auch nach Röntgenstrahlung konnte keine aktivierte Caspase 3 detektiert werden (Abbildung 3.7).

Wie auch in den NHEK-Monokulturen wurde das Auftreten von Nekrose durch die Messung der Freisetzung des Proteins HMGB1 mit Hilfe eines ELISA-Tests gemessen (Abbildung 3.8). Sowohl nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung als auch mit UV-B-Strahlung kommt es zu einer leichten Erhöhung der HMGB1-Freisetzung ins Medium. Dieser Anstieg liegt jedoch deutlich unter einem Faktor von zwei und kann deshalb vernachlässigt werden. Dies wird durch den Vergleich der Absolutwerte für die HMGB1-Freisetzung der Kontrollen der Monokulturen mit denen der Co-Kulturen deutlich (Abbildung 3.9), denn in den Monokulturen wird im Vergleich zu den Co-Kulturen ungefähr die fünffache Menge an HMGB1 pro 10000 Zellen freigesetzt. Selbst wenn man davon ausgehen würde, dass das in den Co-Kulturen gemessene HMGB1 ausschließlich von den Keratinozyten freigesetzt wird und man das Verhältniss von Keratinozyten zu Fibroblasten berücksichtigt, müssten in den Co-Kulturen ca. 8 pg/10.000 HMGB1 gemessen werden. Die Messung zeigt jedoch eine deutlich geringere Freisetzung der Co-Kulturen, was darauf hinweist, dass es sich hierbei um einen Effekt handelt, der durch die Kommunikation von Keratinizyten und Fibroblasten induziert wird.

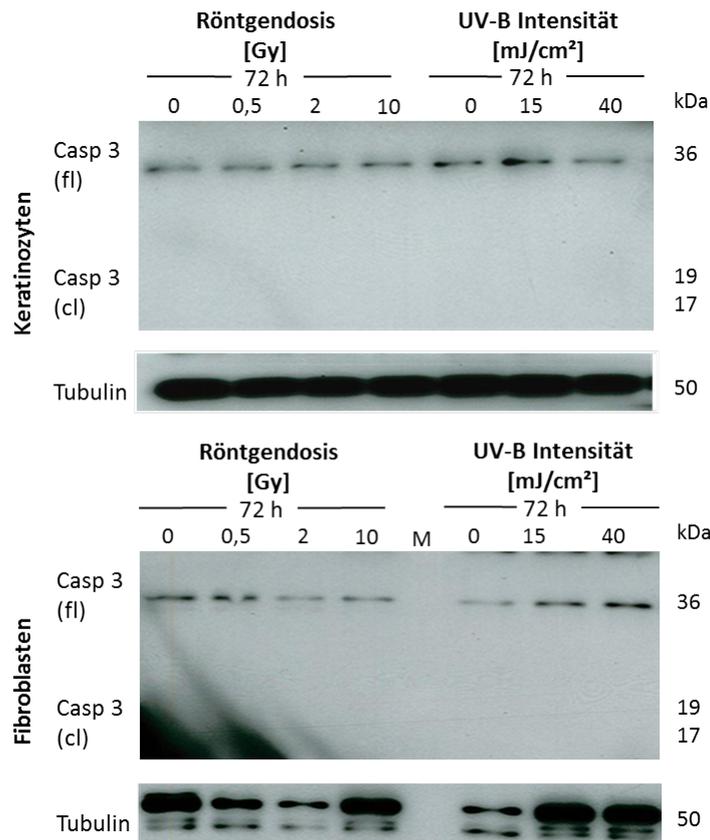


Abbildung 3.7: Westernblotanalyse der Caspase 3-Expression von Co-Kulturen aus Keratinozyten und Fibroblasten nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy, 2 Gy und 10 Gy Röntgenstrahlung bzw. 15 und 40 mJ/cm² UV-B-Strahlung; repräsentativer Western Blot aus N=3 unabhängigen Versuchen

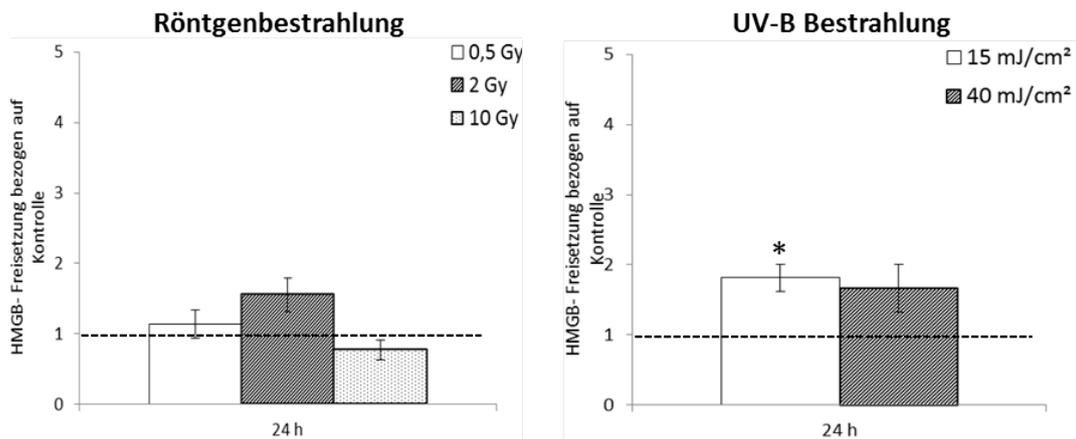


Abbildung 3.8: Messung der Freisetzung des Nekrose-Markers HMGB1 nach Bestrahlung von Co-Kulturen primärer Keratinozyten (NHEK) und Fibroblasten (NHDF) mit Hilfe eines ELISA-Tests; dargestellt ist die HMGB1-Freisetzung bezogen auf die Kontrolle mit der jeweiligen Standardabweichung; $p \leq 0,05 = *$; N=2; n=2

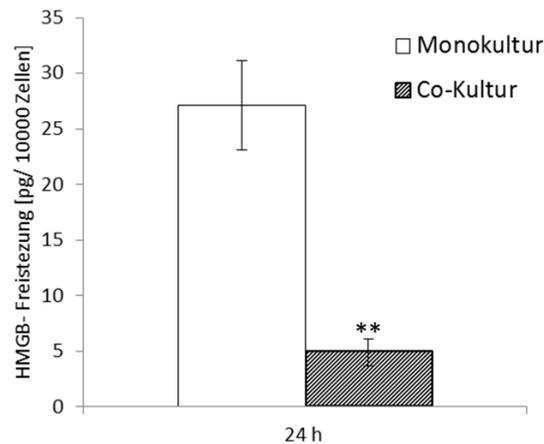


Abbildung 3.9: Vergleich der absoluten HMGB1-Freisetzung der Kontrollen von Monokulturen primärer Keratinozyten (NHEK) und Co-Kulturen aus primären Keratinozyten und Fibroblasten; dargestellt ist die HMGB1-Freisetzung in pg pro 10000 Zellen mit dem jeweiligen Standardfehler; N=3; n=4; $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$

3.2.2 Zytokinfreisetzung

Um herauszufinden, ob die Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen der Co-Kultur wie erwartet stattfindet, wurde die Freisetzung der beiden Zytokine IL-1alpha und TGF-beta genauer untersucht (Abbildung 3.10). Es ist beispielsweise bekannt, dass TGF-beta in Monokulturen von primären Fibroblasten in großen Mengen exprimiert wird, in Co-Kulturen aus Fibroblasten und Keratinozyten jedoch stark herunterreguliert ist [15]. IL-1-alpha wird ebenfalls in Monokulturen aus Fibroblasten oder Keratinozyten in größeren Mengen freigesetzt als dies für die Co-Kultur aus beiden Zelltypen der Fall ist [47]. Es wird hier davon ausgegangen, dass sich die Expressionen der beiden Zytokine in der Co-Kultur gegenseitig regulieren. Um dies auch für das hier verwendete Kultursystem zu bestätigen wurde die Freisetzung von IL-1alpha und TGF-beta jeweils in Monokulturen von primären Keratinozyten und Fibroblasten als auch in Co-Kulturen aus diesen beiden Zelltypen gemessen und jeweils auf 10.000 Zellen bezogen.

Hierbei wird deutlich, dass insbesondere die TGF-beta-Freisetzung, welche in Monokulturen von Fibroblasten sehr deutlich ausgeprägt ist (Abbildung 3.10), in Co-Kulturen deutlich niedriger ist. Berücksichtigt man das Verhältnisses von Keratinozyten und Fibroblasten in den Co-Kulturen und nimmt an, dass es zu keiner Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen kommt, müsste die TGF-beta-Freisetzung rein rechnerisch deutlich höher liegen. Auch bei der IL-1alpha-Freisetzung ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Die Freisetzung des Zytokins liegt bei den beiden Monokulturen jeweils deutlich höher als in der Co-Kultur, bei der man rechnerisch eine Aufaddierung der beiden Zytokinmengen, unter Berücksichtigung des zahlenmäßigen Verhältnisses der Fibroblasten zu den Keratinozyten von 3:1, erwartet hätte.

Die Zytokinfreisetzung der Co-Kulturen wurde auch nach Bestrahlung untersucht (Abbildung 3.11). Nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen kommt es bei den pro-inflammatorischen Zy-

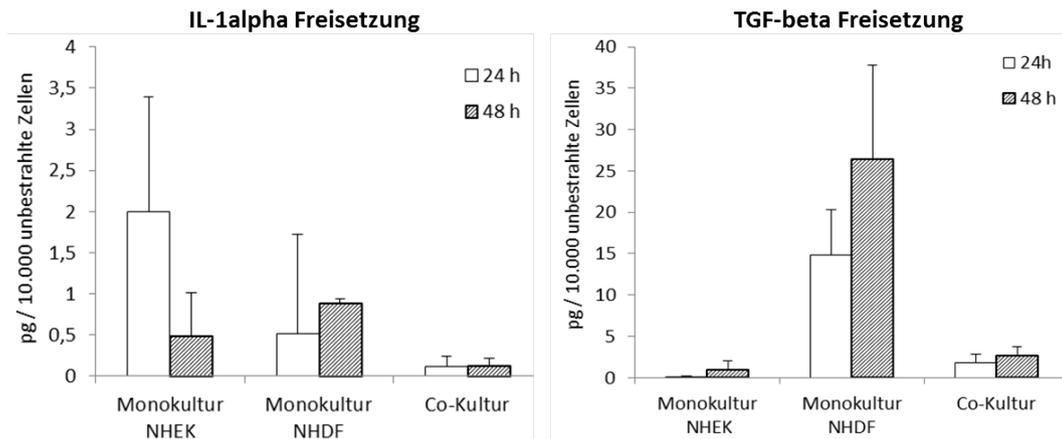


Abbildung 3.10: IL-1alpha und TGF-beta Freisetzung von Monokulturen primärer Keratinozyten, primärer Fibroblasten und Co-Kulturen aus diesen beiden Zelltypen; gezeigt sind die absoluten Werte der Kontrollen; N=2; n=3

tokinen IL-6 und IL-8 zu einer dosisabhängigen Erhöhung, während bei IL-1alpha und IL-2 eine Erhöhung nur für eine Dosis von 2 Gy auftritt, bei 10 Gy jedoch die Freisetzung den Kontrollen entspricht. Die TGF-beta Freisetzung zeigt hingegen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung einen Trend zur Abnahme. Dieses Muster der Zytokinfreisetzung entspricht nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung ungefähr dem der Keratinozyten-Monokulturen. Eine Ausnahme stellt hier die TGF-beta-Freisetzung dar, die in den Monokulturen nach der Bestrahlung im Vergleich zu den Kontrollen eher angestiegen ist, während sie in den Co-Kulturen unverändert bleibt oder einen Trend zur Abnahme zeigt.

Nach der Bestrahlung mit UV-B kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der IL-6- und IL-8-Freisetzung, die sehr viel deutlicher ausgeprägt ist als nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Nach einer höheren Intensität von 60 mJ/cm² kommt es bei IL-6 zu einer 15-fachen, bei IL-8 zu einer circa 35-fachen Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Die IL-1alpha-Freisetzung ist ebenfalls nach einer hohen Intensität erhöht, während die IL-2-Freisetzung unverändert bleibt. Das anti-inflammatorische Zytokin TGF-beta bleibt ebenfalls unverändert, bzw. es nimmt für eine mittlere Intensität von 15 mJ/cm² ab. Eine Freisetzung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 konnte, wie auch in den Monokulturen mit der hier verwendeten ELISA-Technik nicht nachgewiesen werden. Die Veränderungen der IL-6, IL-8 und IL-2 Freisetzungen sind vergleichbar zu denen in den Monokulturen, während die IL-1alpha-Freisetzung in den Co-Kulturen nach der Bestrahlung eher einen Anstieg zeigt und die TGF-beta-Freisetzung abnimmt.

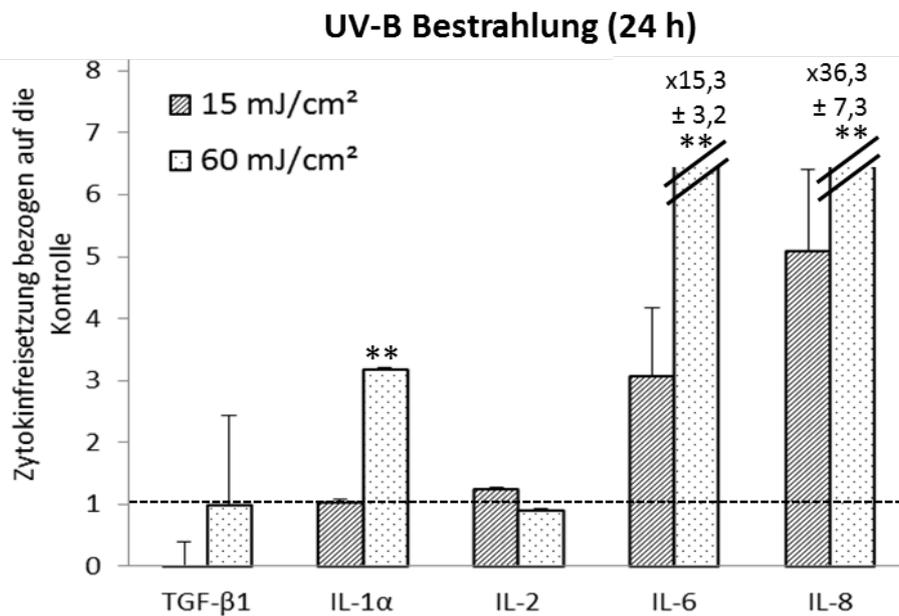
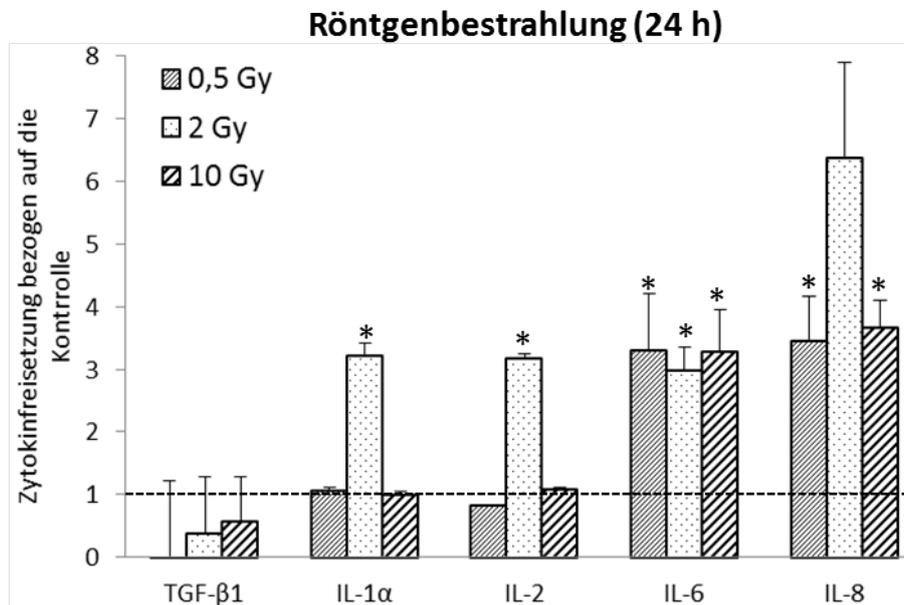


Abbildung 3.11: Freisetzung von pro- (IL-1 alpha, IL-2, IL-6, IL-8) und anti- (TGF-beta1) inflammatorischen Zytokinen von Co-Kulturen aus primären Keratinozyten und Fibroblasten nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung; dargestellt ist die jeweilige Freisetzung des Zytokins bezogen auf die Kontrolle; N=3, n=4; SEM; $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$

3.3 Humanes Hautäquivalent EFT400

Als komplexeres, gewebeähnlicheres Kultursystem wurde für weitere Versuche ein humanes Vollhautäquivalent verwendet. Dieses besteht aus einer Dermis, welche in eine Kollagenmatrix eingebettete Fibroblasten enthält und einer Epidermis, welche aus proliferierenden und differenzierenden Keratinozyten besteht. Durch diese Art der Kultivierung wird ein dreidimensionales Wachstum der Zellen ermöglicht.

3.3.1 Differenzierung des Hautäquivalents während der Kultivierung

Das Hautäquivalent EFT400 wird von der Firma MatTek so hergestellt, dass es sich zum Zeitpunkt der Versendung in einem Differenzierungsstadium befindet, in dem es alle hauttypischen Schichten, inklusive dem *stratum corneum*, enthält. Zum Versand wird es auf ca. 4 °C heruntergekühlt, so dass der Metabolismus der Zellen stark verlangsamt wird. Vor der Bestrahlung wird das Hautäquivalent für mindestens 16 Stunden unter Kulturbedingungen äquilibriert bevor es bestrahlt wird, sodass die Zellen wieder aktiv werden und anfangen zu proliferieren und zu differenzieren.

Abbildung 3.12 zeigt eine Hematoxylin-Eosin-Färbung von unbestrahlten Proben des Hautäquivalents, die bei Bestrahlungsexperimenten als Kontrollen mitgeführt wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Bestrahlung. Das Hautäquivalent differenziert über den Kulturzeitraum von bis zu 5 Tagen deutlich weiter aus. Eine Stunde nach dem Zeitpunkt der Bestrahlung sind die Basalzellen in den unbestrahlten Kontrollen sehr gleichmäßig und palisadenförmig angeordnet. Ihre Kerne sind deutlich mit Hämatoxylin blau gefärbt. Ein Teil der Basalzellen proliferiert, während der andere Teil beginnt zu differenzieren und in höhere Schichten zu wandern. Über der Basalschicht liegt das *stratum spinosum* in dem die Zellen die typische stachelartige Form annehmen. Ausserdem werden die Zellen insgesamt größer und bekommen eine länglichere Form. Über dem *stratum spinosum* liegt das *stratum granulosum*, welches sich dadurch auszeichnet, dass die Zellkerne während dem Differenzierungsprozess kondensieren und eine granuläre Struktur aufweisen. Bevor die Zellen im komplett ausdifferenzierten Stadium zu Korneozyten des *stratum corneums* werden verlieren sie ihren Zellkern [1]. Korneozyten sind die Hornzellen des *stratum corneums*, die keinen Zellkern mehr besitzen und deshalb vom Eosin deutlich pink angefärbt werden.

Im Laufe der Kultivierung, insbesondere nach 3 und 5 Tagen, verändert sich die Struktur in der Basalschicht etwas. Die Zellen verlieren in manchen Gebieten ihre Regelmäßigkeit und sind nicht mehr strikt gleichmäßig und palisadenförmig angeordnet. Ausserdem wird insgesamt die Anzahl der Zellen in der Basalschicht geringer, da kontinuierlich differenzierende Zellen die Basalschicht verlassen, die Proliferationsfähigkeit der Basalzellen jedoch über den Kultivierungszeitraum abnimmt. Dies wird insbesondere nach längerer Kultivierung (5 Tage) auch in

den sich differenzierenden Schichten deutlich. Diese enthalten deutlich weniger Zellen als zu Anfang des Kultivierungszeitraumes. Dies liegt daran, dass immer mehr Zellen ausdifferenzieren, was die zunehmende Dicke des *stratum corneums* erklärt. Ausserdem fehlt in Kultur die mechanische Abschuppung der Kerneozyten (*Desquamation*), die bei der menschlichen Haut für eine ungefähr gleichbleibende Dicke der Hornschicht sorgt.

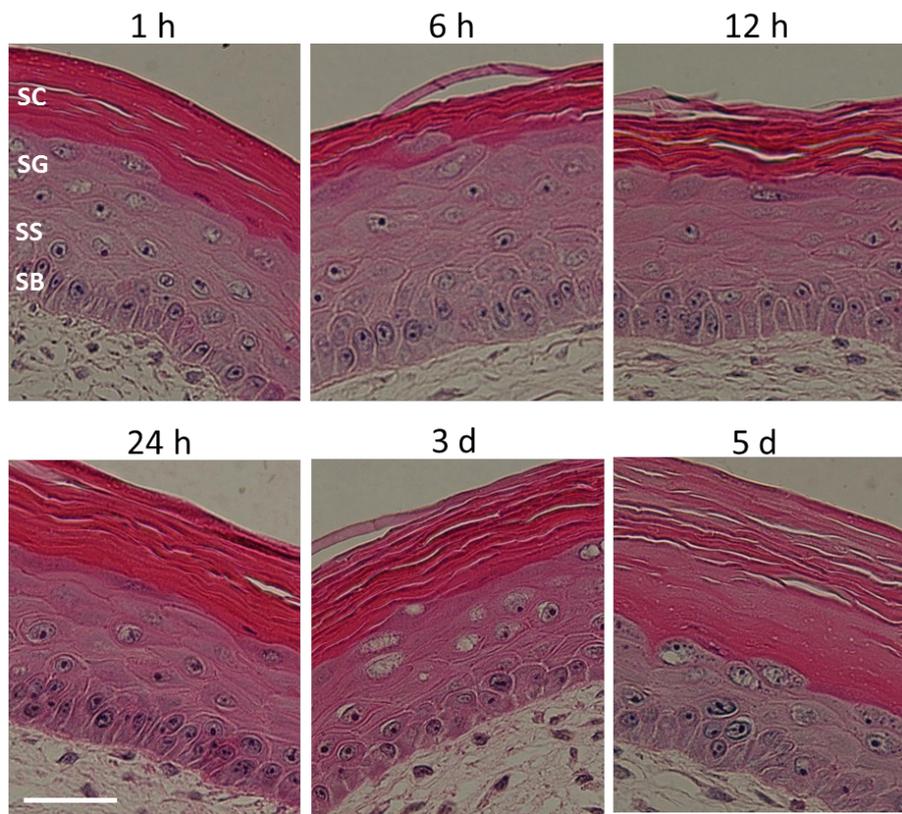


Abbildung 3.12: Differenzierung des Hautäquivalents EFT400 über einen Zeitraum von 5 Tagen nach dem Zeitpunkt einer Bestrahlung; gezeigt sind repräsentative, unbestrahlte Kontrollen aus N=8 und n>10 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

3.3.2 Zelltod nach Bestrahlung

Um in den dreidimensionalen Hautäquivalenten das Vorkommen von Apoptose zu untersuchen, wurde in Gewebsschnitten die aktivierte Form der Caspase 3 mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Um sicherzustellen, dass das Protokoll der Färbung und der Antikörper prinzipiell funktionieren, wurde bei jeder Färbung eine Positivkontrolle mitgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Hautäquivalent, welches über 3 Tage mit Medium auf der apikalen Oberfläche kultiviert wurde. Dadurch, dass die Oberfläche dann nicht mehr luftexponiert ist, gehen die Epidermiszellen in den programmierten Zelltod über. In allen hier gezeigten Positivkontrollen der

Antikörperfärbungen gegen aktivierte Caspase 3 sieht man deutlich, dass die Kerne der Basalzellen kondensiert vorliegen und durch das Hematoxylin stark dunkelblau angefärbt werden. Das Cytoplasma dieser Zellen ist, je nach Detektionsmethode, deutlich pink oder braun gefärbt. Dies zeigt, dass dort die aktivierte Form der Caspase 3 lokalisiert ist (z.B. Positivkontrolle in Abbildung 3.13). Im Gegensatz zu den Positivkontrollen zeigt sich bei den bestrahlten Proben unabhängig von Zeitpunkt und Bestrahlungart, dass keine Apoptose vorliegt (Abbildung 3.13, 3.14, 3.15 und 3.16). Es ist keine Pinkfärbung im Zytoplasma, die auf die aktive Caspase 3 hinweist, zu erkennen. Dies zeigt, dass die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung zu allen hier untersuchten Zeitpunkten keine Apoptose induziert .

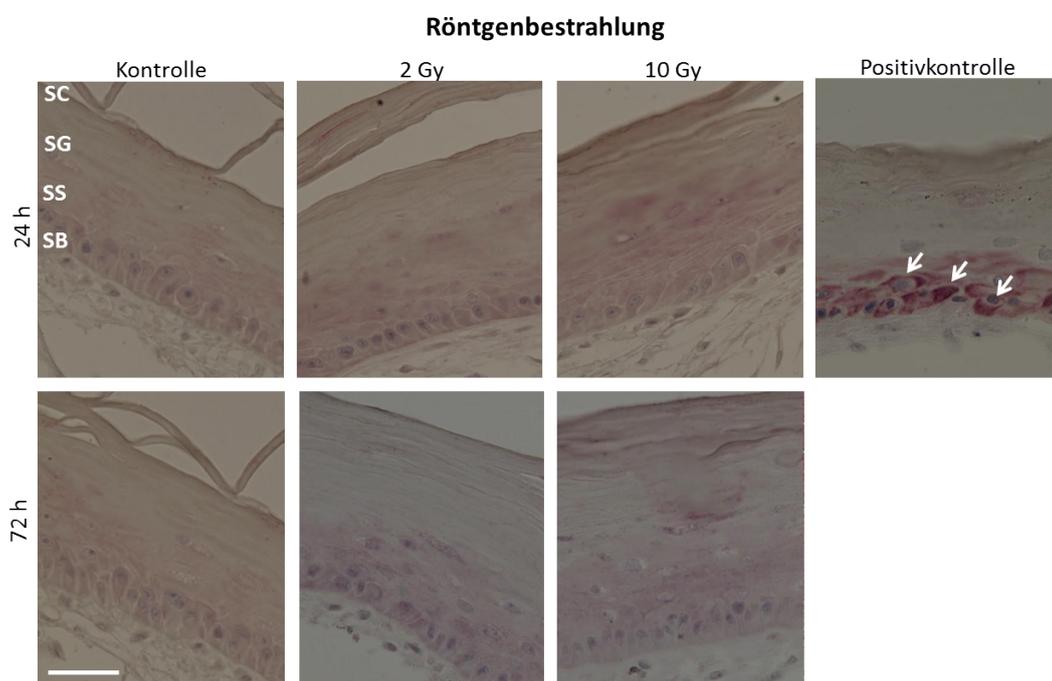


Abbildung 3.13: Detektion des Apoptosemarkers aktivierte Caspase 3 (pink) im Hautäquivalent EFT400 nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen mit Hilfe einer Antikörperfärbung; Pfeile markieren beispielhaft Zellen, die positiv für aktive Caspase 3 sind; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μm

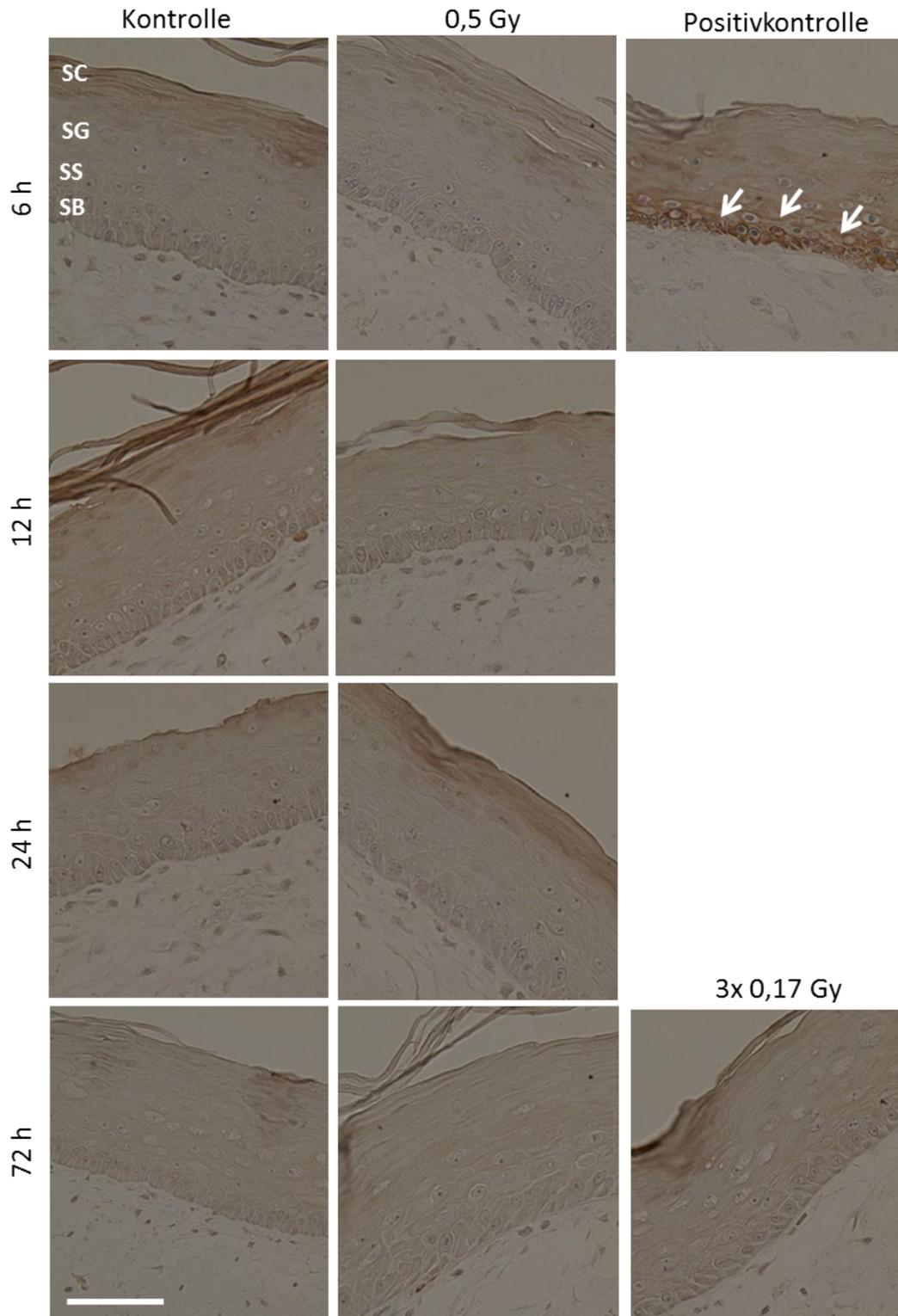


Abbildung 3.14: Detektion des Apoptosemarkers aktivierte Caspase 3 (braun) mit Hilfe einer Antikörperfärbung nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung; Pfeile markieren beispielhaft Zellen, die positiv für aktive Caspase 3 sind; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μm

Insbesondere nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlung (Abbildung 3.16) aber auch nach Kohlenstoffbestrahlung sind in einigen Proben vereinzelt Zellen in suprabasalen Schichten der Epidermis zu erkennen, die einen kondensierten, mit Hematoxylin kräftig blau gefärbten Kern aufweisen, jedoch nicht positiv für aktive Caspase 3 sind. Hierbei kann es sich entweder um sogenannte *sunburn cells* handeln, die vorwiegend für UV-B-Bestrahlung beschrieben sind, aber auch um eine Vorstufe der Parakeratose. Dabei handelt es sich um pyknotische Zellkerne, die während dem Differenzierungsprozess nicht vollständig abgebaut wurden und deshalb im *stratum corneum* verbleiben. Bei den kondensierten Kernen, die hier in der Epidermis beobachtet werden, könnte es sich um Zellen handeln, die einen solchen fehlerhaften Differenzierungsprozess durchlaufen, aber noch nicht im *stratum corneum* angekommen sind. Auf diese Hypothese wird in der Diskussion genauer eingegangen. Klassische Parakeratose in Form von kondensierten Zellkernen im *stratum corneum* ist insbesondere nach der Bestrahlung mit 2 Gy Kohlenstoffionen zu beobachten (Pfeile in Abbildung 3.15). Hier wird in der Antikörperfärbung deutlich, dass diese Zellen im Gegensatz zu apoptotischen Zellen nicht positiv für Caspase 3 sind, jedoch einen kondensierten, mit Hematoxylin blau gefärbten Zellkern aufweisen. Nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung treten solche Zellen nur sehr vereinzelt auf.

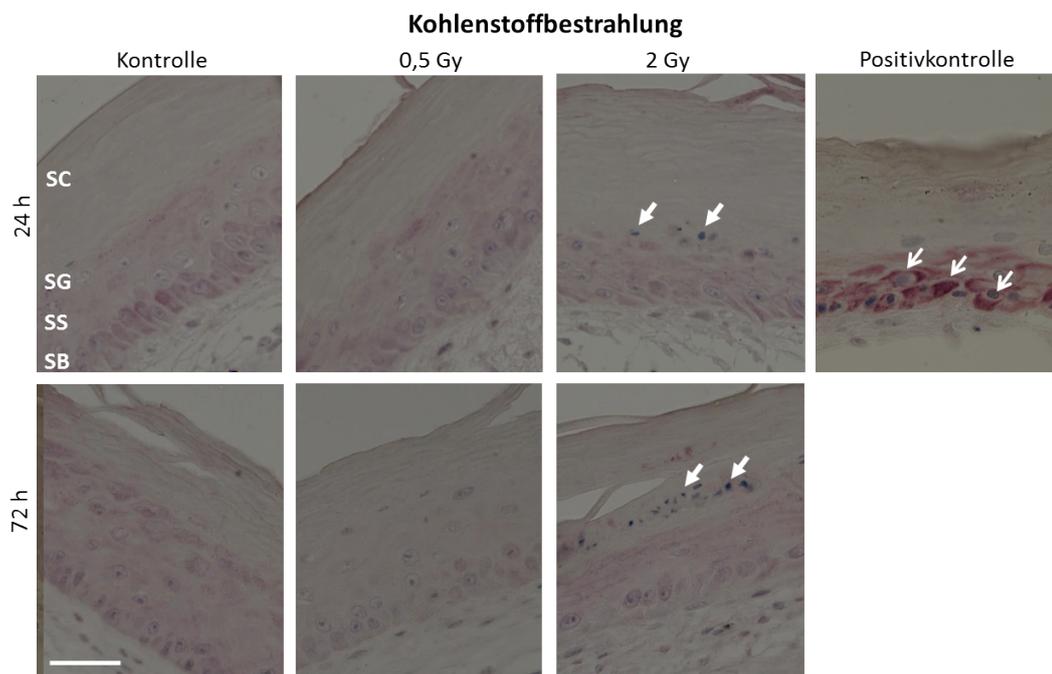


Abbildung 3.15: Detektion des Apoptosemarkers aktivierte Caspase 3 (pink) im Hautäquivalent EFT400 nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit Hilfe einer Antikörperfärbung; geschlossene Pfeile markieren kondensierte Zellkerne im *stratum corneum*, die jedoch negativ für aktive Caspase 3 sind; Pfeile markieren beispielhaft Zellen, die positiv für aktive Caspase 3 sind; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 µm

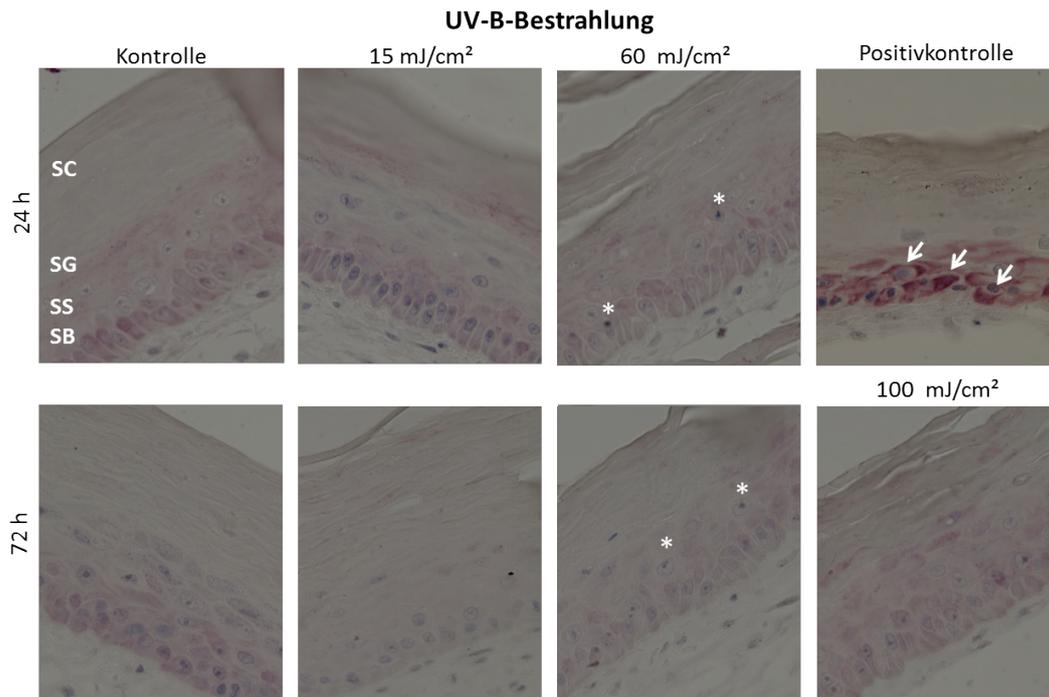


Abbildung 3.16: Detektion des Apoptosemarkers aktivierte Caspase 3 (pink) im Hautäquivalent EFT400 nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlung mit Hilfe einer Antikörperfärbung; Pfeile markieren beispielhaft Zellen, die positiv für aktive Caspase 3 sind; Sterne markieren kondensierte Zellkerne in der Epidermis, die jedoch negativ für aktive Caspase 3 sind; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 µm

Um das mögliche Auftreten von aktivierter Caspase 3 und geschnittenem PARP auf molekularer Ebene nachzuweisen, wurde ein Western Blot mit Lysaten der entsprechenden Proben durchgeführt. Da es bei dem Hautäquivalent EFT 400 möglich ist, die Epidermis mechanisch von der Dermis zu trennen, konnten die beiden Schichten getrennt lysiert werden. Da man das Auftreten von Apoptose in den Basalzellen der Epidermis erwartet wurden Dermis-Proben nur stichprobenartig für bestimmte Zeitpunkte untersucht. Auch hier dienten in allen Western Blots bestrahlte HaCaT-Zellen (10 Gy, 5 Tage) als Positivkontrolle. In den Abbildungen 3.17, 3.18, 3.19 und 3.20 können deutliche Banden in den Positivkontrollen detektiert werden, die aufgrund ihrer Laufhöhe aktivierter Caspase3 und geschnittenem PARP zugeordnet werden können. Ausserdem wird deutlich, dass in allen anderen Proben, unabhängig von der Bestrahlungsart und dem Zeitpunkt nach der Bestrahlung keiner der beiden Apoptosemarker detektiert werden kann. Dies bestätigt das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung, dass in den Proben keine apoptotischen Zellen vorhanden sind.

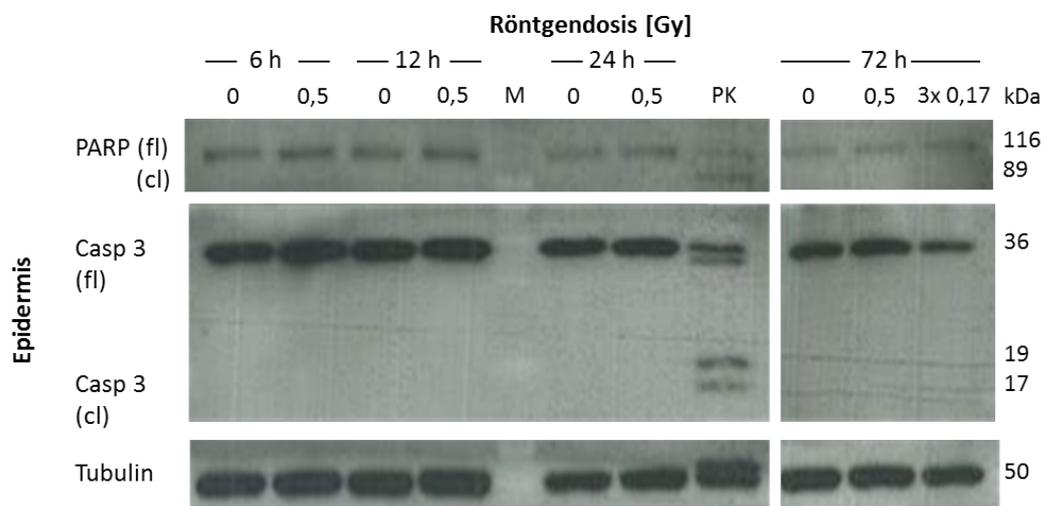


Abbildung 3.18: Detektion der Apoptosemarker aktivierte Caspase 3 und PARP in Lysaten der Epidermis bzw. der Dermis des Hautäquivalents EFT400 nach der Bestrahlung mit niedrigen und fraktionierten Röntgendosen mit Hilfe einer Westernblotanalyse; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; PK= Positivkontrolle, fl= ungespaltenes Protein, cl= Proteinfragment, M= Marker

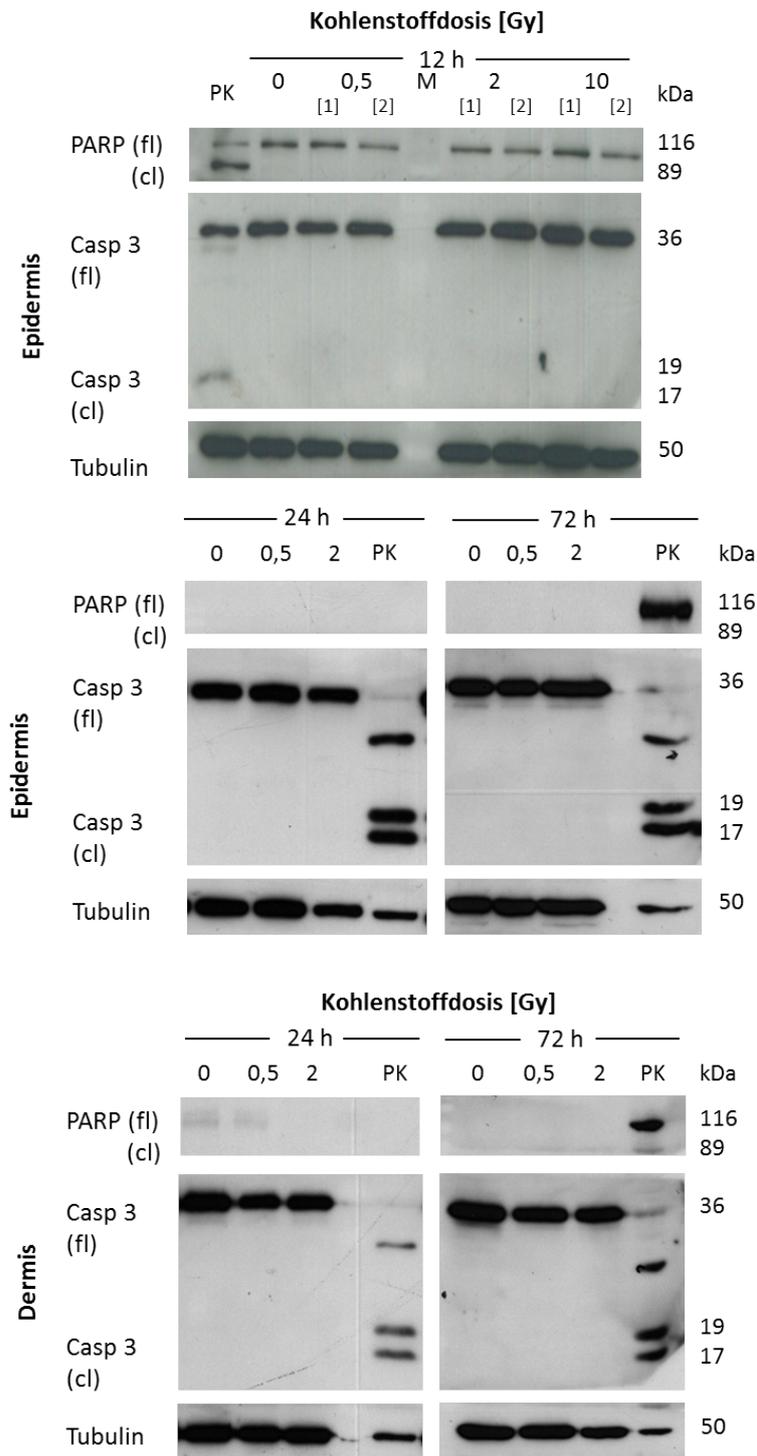


Abbildung 3.19: Detektion der Apoptosemarker aktivierte Caspase 3 und PARP in Lysaten des Epidermis bzw. des Derms des Hautäquivalents EFT400 nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen mit Hilfe einer Westernblotanalyse; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; PK= Positivkontrolle, fl= ungespaltenes Protein, cl= Proteinfragment, M= Marker

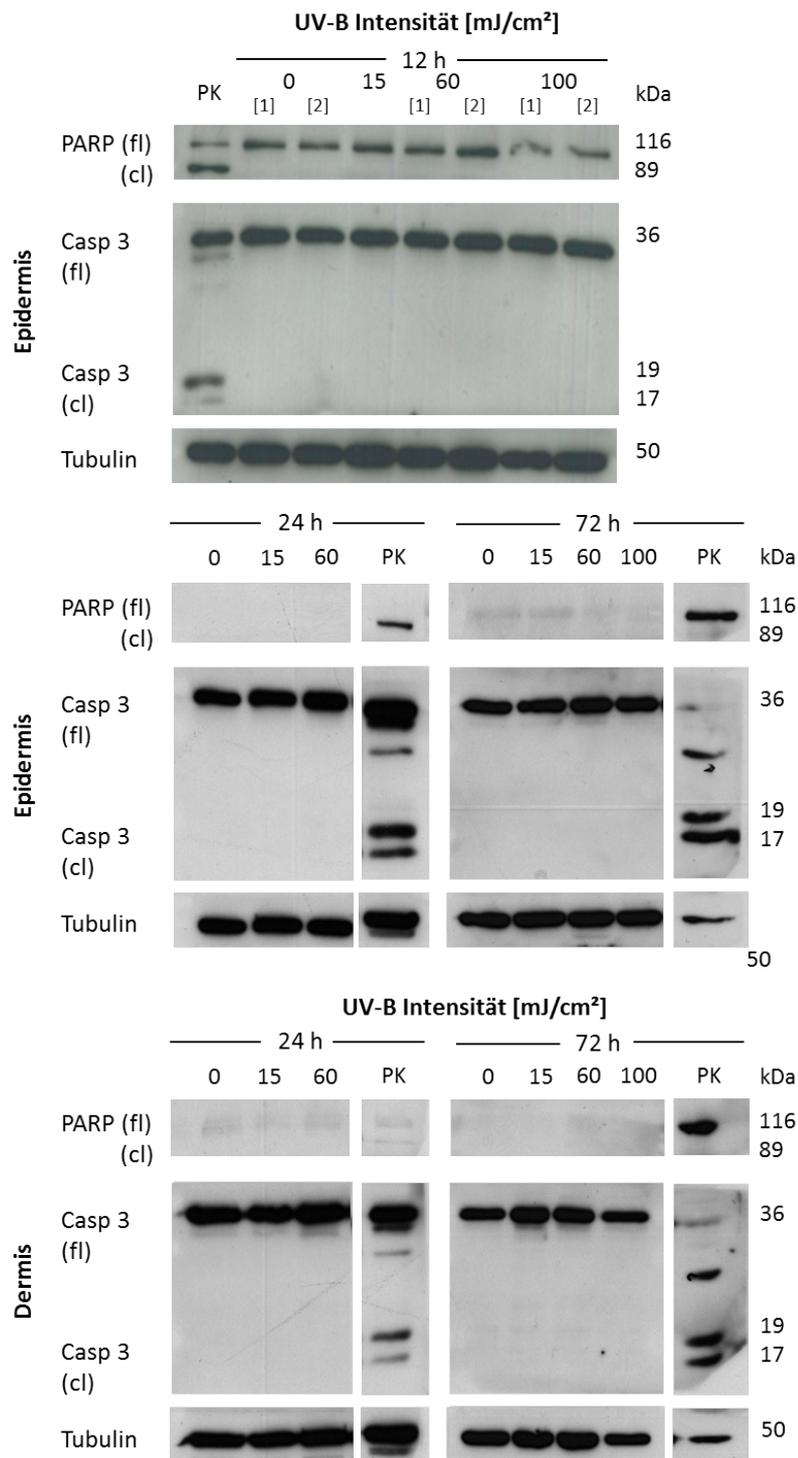


Abbildung 3.20: Detektion der Apoptosemarker aktivierte Caspase 3 und PARP in Lysaten des Epidermis bzw. des Derms des Hautäquivalents EFT400 nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlen mit Hilfe einer Westernblotanalyse; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; PK= Positivkontrolle, fl= ungespaltenes Protein, cl= Proteinfragment, M= Marker

Obwohl es in der Hematoxylin-Eosin-Färbung morphologisch keine Hinweise auf Nekrose im Gewebe gibt, wurde die HMGB1 Freisetzung in das Medium mit Hilfe eines ELISA-Assays gemessen. In den Medienüberständen der Hautäquivalente konnte jedoch kein HMGB1 nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.3.3 Effekte der Bestrahlung auf die Struktur und Differenzierung der Epidermis

Um die Struktur des Gewebes nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden Hematoxylin-Eosin-Färbungen der Gewebeschnitte angefertigt und mikroskopisch ausgewertet. Hierfür wurden die Zeitpunkte 24h und 3 Tage ausgewählt (Abbildungen 3.22-3.25).

Bei der Auswertung dieser Färbungen sind verschiedene Veränderungen in den bestrahlten Hautäquivalenten aufgefallen, die in Abbildung 3.21 unabhängig von der Bestrahlungsart in einer Übersicht gezeigt sind. Wenn Zellen während des Differenzierungsprozesses nicht in der Lage sind ihren Zellkern abzubauen und dieser als pyknotischer, mit Hematoxylin stark dunkelblau anfärbarer Kern im *stratum corneum* zurückbleibt spricht man von Parakeratose. Solche pyknotischen Kerne können auch in der vitalen Epidermis vorkommen. Dort sind sie umgeben von einem eosinophilen, stark pink angefärbten Zytoplasma. Ausserdem kann nach Bestrahlung ein verdicktes *stratum corneum* vorliegen, was auf einen beschleunigten Differenzierungsprozess hinweist (Hyperkeratose). Die Basalzellen sind normalerweise palisadenartig angeordnet und haben Kontakt zur Basalmembran. Nach Bestrahlung konnte beobachtet werden, dass sich diese geordnete Struktur teilweise oder in der gesamten Basalschicht auflöst, die einzelnen Basalzellen eher rund und pflastersteinartig angeordnet sind und sie den Kontakt zur Basalschicht verlieren, was mit einem Polaritätsverlust gleichzusetzen ist.

Alle hier gezeigten mikroskopischen Aufnahmen der Hautäquivalente sind möglichst repräsentativ ausgewählt. Um jedoch eine genauere Aussage für die hier beschriebenen Veränderungen treffen zu können, wurden diese quantitativ ausgewertet (Abbildung 3.26- 3.29). Hierzu wurde die Anzahl der pyknotischen Zellkerne sowohl im *stratum corneum* (Parakeratose) als auch der Epidermis gezählt und die Dicke des *stratum corneums* und der vitalen Epidermis gemessen (Hyperkeratose). Das Auftreten einer veränderten Struktur und der Polaritätsverlust der Basalzellen wurde semi-quantitativ ausgewertet, indem in einer repräsentativen Anzahl an Aufnahmen bestimmt wurde, ob dieses Merkmal beobachtet werden kann.

Nach der Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy Röntgenstrahlen (Abbildung 3.22) sind, insbesondere nach 3 Tagen, strukturelle Veränderungen in den Hautäquivalenten zu beobachten. Im *stratum corneum* sind nach der Bestrahlung vereinzelt pyknotische Zellkerne zu finden (Pfeile in Abbildung 3.22 und quantitative Auswertung in Abbildung 3.26), ausserdem ist insbesondere nach der Bestrahlung mit 2 Gy gegenüber der Kontrolle eine leicht erhöhte Anzahl an pyknotischen Zellkernen in der vitalen Epidermis zu finden (Sterne in Abbildung 3.22 und quantitative Auswertung in Abbildung 3.27). Die Dicke des *stratum corneums* ist gegenüber den Kontrollen

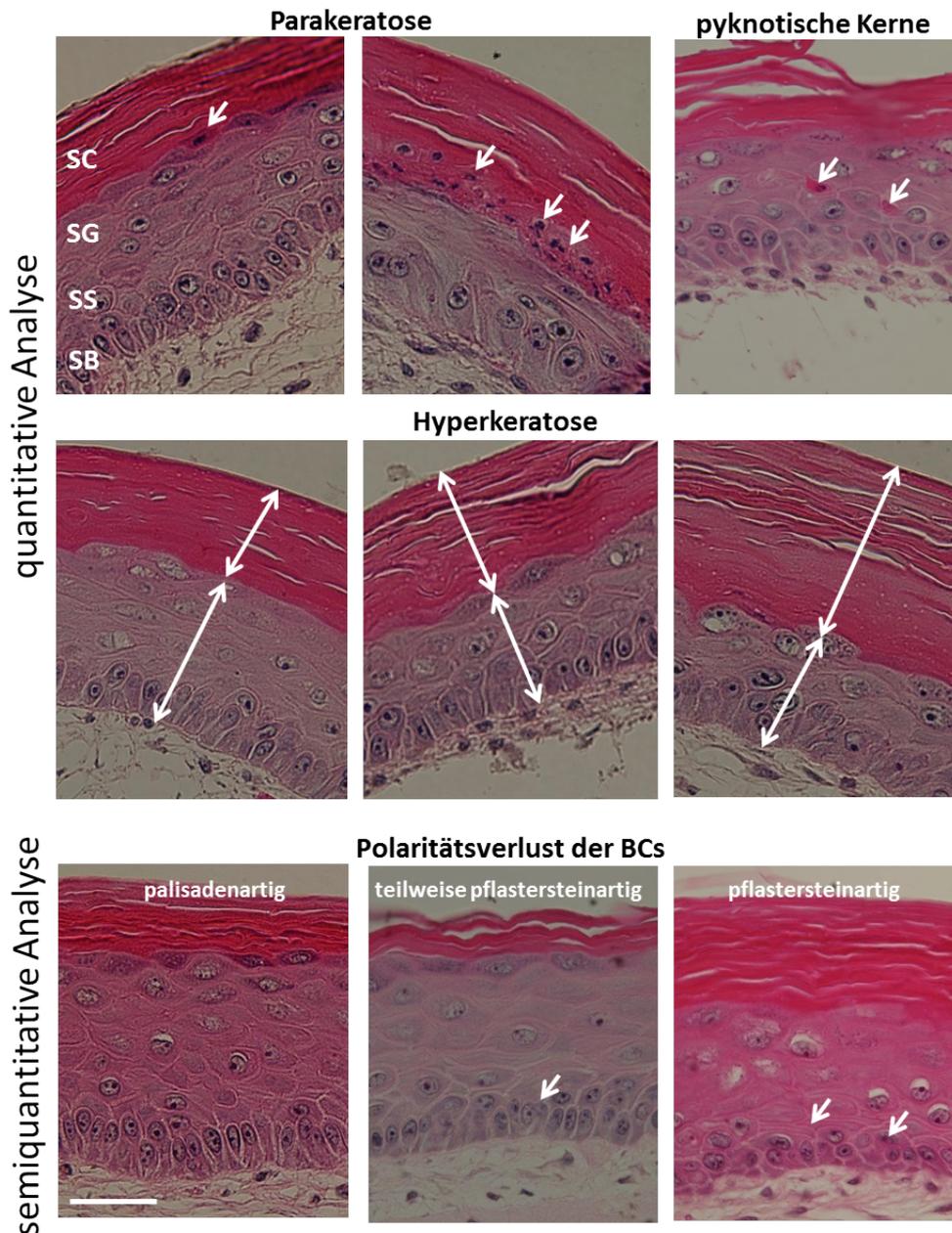


Abbildung 3.21: Mögliche morphologische und strukturelle Veränderungen der Hautäquivalente die in einer Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten beobachtet werden können; Pfeile markieren das jeweilige Merkmal; gezeigt sind exemplarische Beispiele; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μm

signifikant erhöht (Doppelpfeile in Abbildung 3.22 und quantitative Auswertung in Abbildung 3.28). Ausserdem verändert sich nach der Bestrahlung sowohl die Form als auch die Anordnung der Basalzellen, es kommt signifikant häufiger als in den Kontrollen zu einer pflastersteinartigen Anordnung der Zellen (Abbildung 3.29).

Röntgenbestrahlung

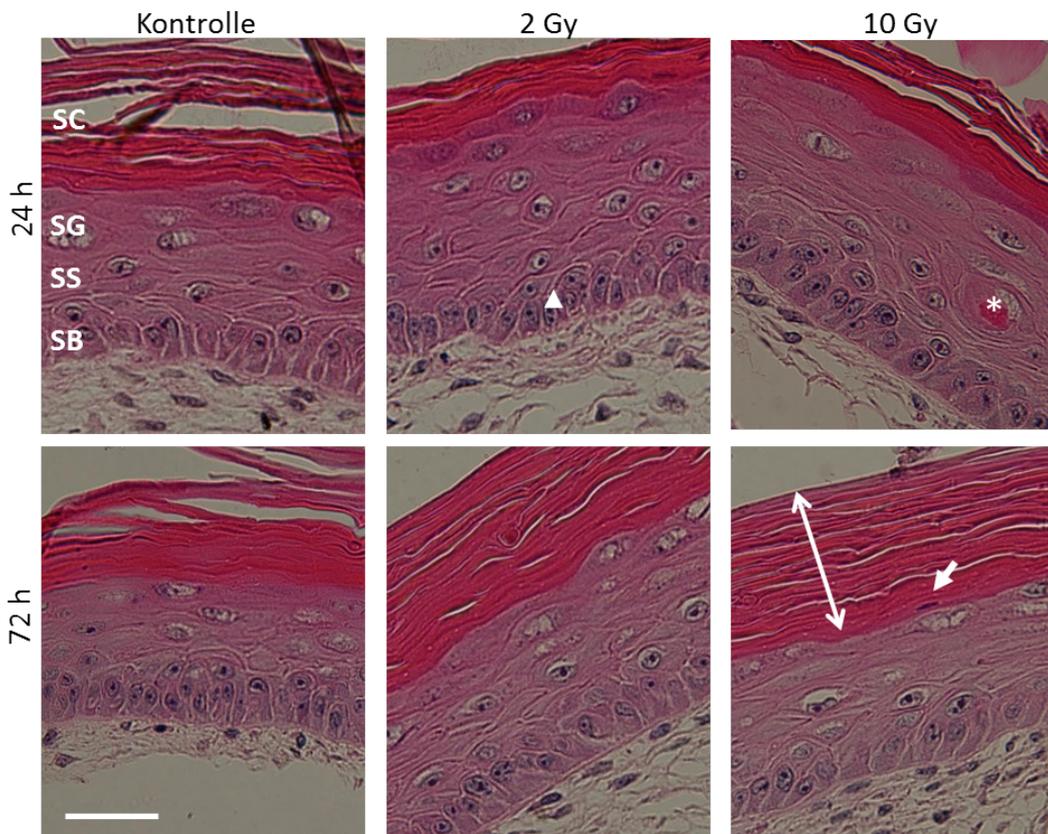


Abbildung 3.22: Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten 24h und 72h nach der Bestrahlung mit 2 Gy oder 10 Gy Röntgenstrahlen; Pfeile markieren Parakeratose, Sterne markieren pyknotische Kerne in der Epidermis, Doppelpfeile markieren die Verdickung des *stratum corneum*, Dreiecke markieren den Verlust der Polarität der Basalzellen; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

Nach der Bestrahlung mit einmaligen oder fraktionierten niedrigen Röntgendosen (Abbildung 3.23) treten weder im *stratum corneum* noch in der vitalen Epidermis pyknotische Kerne auf (Abbildung 3.26 und 3.27). Die Dicke des *stratum corneum*s bleibt gegenüber den Kontrollen unverändert (Abbildung 3.28). Jedoch sind die strukturellen Veränderungen in der Basalschicht deutlicher ausgeprägt als bei höheren Röntgendosen. Die Basalzellen, die in den Kontrollen eine palisadenartige Struktur aufweisen und Kontakt zur Basalmembran haben, sind nach der Bestrahlung eher rund, viele von ihnen haben den Kontakt zur Basalmembran verloren und ändern ihre Polarität (Dreiecke in Abbildung 3.23). Insbesondere 3 Tage nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy oder 3x 0,17 Gy ist der Anteil an ausgewerteten Bereichen, die teilweise oder komplett eine pflastersteinartige Struktur aufweisen signifikant höher als in den Kontrollen (Abbildung 3.29).

Röntgenbestrahlung

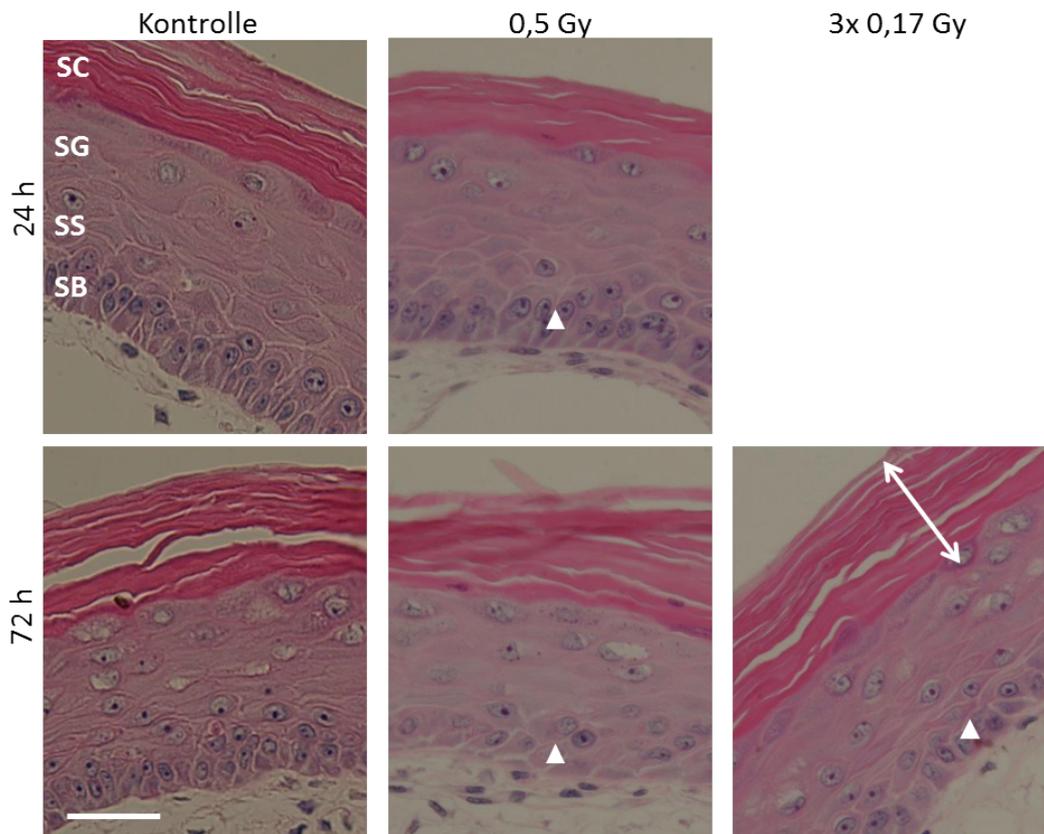


Abbildung 3.23: Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten 24h und 72h nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy oder drei Fraktionen mit jeweils 0,17 Gy Röntgenstrahlen; Dreiecke markieren den Verlust der Polarität der Basalzellen; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=2 und n=4 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μm

Die Bestrahlung der Hautäquivalente mit Kohlenstoffionen hat ebenfalls sehr deutliche Auswirkungen auf den Differenzierungsprozess der Epidermis (Abbildung 3.24).

Während der Differenzierung kommt es zwar zu einer Kondensation des Kerns, die Zellen verlieren ihn jedoch nicht vollständig bevor sie in der Hornschicht ankommen und zu Kerneozyten werden (Sterne in Abbildung 3.24). Dies führt dazu, dass diese kondensierten Kerne im *stratum corneum* verbleiben und Parakeratose auftritt. Dieser Effekt tritt insbesondere nach der Bestrahlung mit 2 Gy, aber 3 Tage nach der Bestrahlung auch bei 0,5 Gy auf (Abbildung 3.26).

Neben der auftretenden Parakeratose können nach der Bestrahlung mit 2 Gy auch pyknotische Kerne in der vitalen Epidermis beobachtet werden. Diese treten ebenfalls vorwiegend nach einer Bestrahlung mit 2 Gy auf (Abbildung 3.27). Bei der gleichen Dosis kommt es 3 Tage nach der Bestrahlung auch zu einer signifikanten Verdickung des *stratum corneums* (Abbildung 3.28).

Kohlenstoffbestrahlung

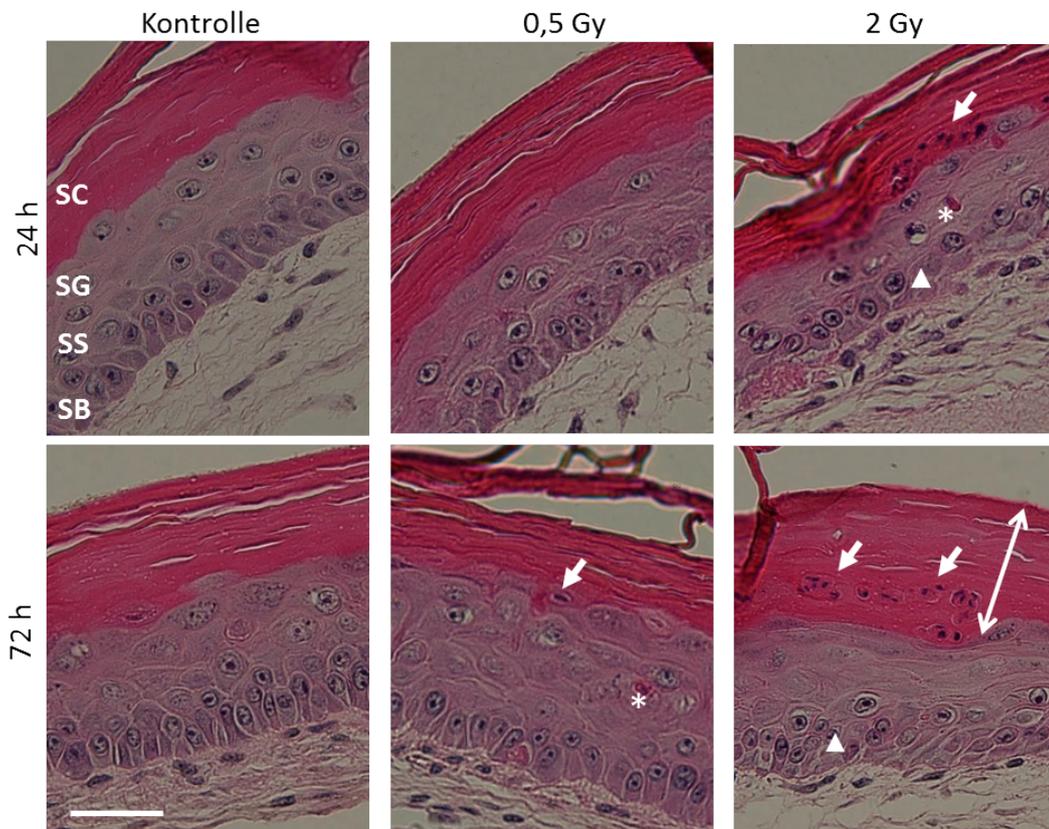


Abbildung 3.24: Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten 24h und 72h nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy oder 2 Gy Kohlenstoffionen; Pfeile markieren Parakeratose, Sterne markieren pyknotische Kerne in der Epidermis, Doppelpfeile markieren die Verdickung des *stratum corneum*, Doppelpfeile markieren die Verdickung des *stratum corneum*, Dreiecke markieren den Verlust der Polarität der Basalzellen; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

Der Verlust der Polarität der Basalzellen deutet sich bereits 24 h nach der Bestrahlung als Trend an und ist 3 Tage nach Bestrahlung sowohl für 0,5 Gy als auch für 2 Gy signifikant (Abbildung 3.29).

Nach der Bestrahlung mit UV-B (Abbildung 3.25) wird deutlich, dass es hier teilweise zu anderen Effekten kommt als nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung. Parakeratose kommt jedoch auch hier, wenn auch nur nach hohen Intensitäten vor (Abbildung 3.26). Insbesondere kann man nach UV-B Bestrahlung pyknotische Kerne in der Epidermis beobachten, die für die UV-B-Bestrahlung von Haut charakteristisch sind. Da für diese Zellen beschrieben ist, dass sie bereits 2 Stunden nach der Bestrahlung auftreten können und nach 24 h bereits in suprabasale Schichten der Epidermis gewandert sein können, wurde für die UV-B-Bestrahlung der Zeitpunkt 12 h nach Bestrahlung ebenfalls untersucht, jedoch nicht statistisch ausgewertet. Die

Hematoxylin-Eosin-Färbung zeigt, dass zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Bestrahlung ebenfalls pyknotische Kerne vorhanden sind, jedoch ungefähr in gleichem Maße wie nach 24 h und diese ebenfalls vorwiegend in suprabasalen Schichten auftreten. Die quantitative Auswertung zeigt, dass 3 Tage nach der Bestrahlung sowohl für 15 mJ/cm² als auch für 60 mJ/cm² eine erhöhte Anzahl pyknotischer Kerne in der vitalen Epidermis vorliegt (Abbildung 3.27). Die Dicke des *stratum corneums* bleibt nach der Bestrahlung mit UV-B fast unverändert, es zeigt sich nur ein leichter Anstieg der Dicke nach der Bestrahlung mit hohen Intensitäten (Abbildung 3.28). Die Struktur der Basalzellen verändert sich nach der UV-B-Bestrahlung ebenfalls nicht so stark. Die quantitative Auswertung zeigt, insbesondere 3 Tage nach der Bestrahlung, einen Trend hin zu einer pflastersteinartigen Struktur, dieser ist jedoch nicht signifikant und schwächer ausgeprägt als nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (Abbildung 3.29).

Vergleicht man für die hier ausgewerteten Veränderungen die verschiedenen Strahlenqualitäten, stellt man fest, dass Parakeratose hauptsächlich bei hohen Kohlenstoffdosen oder UV-B-Intensitäten auftritt, während man pyknotische Kerne in der Epidermis bei hohen Dosen bzw. Intensitäten aller Strahlenqualitäten in unterschiedlichem Ausmaße findet. Eine Verdickung des *stratum corneums* tritt vorwiegend bei hohen Dosen ionisierender Strahlung auf. Die Struktur der Basalzellen ist ebenfalls vorwiegend bei ionisierender Strahlung verändert, dieses Merkmal tritt jedoch verstärkt nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen auf.

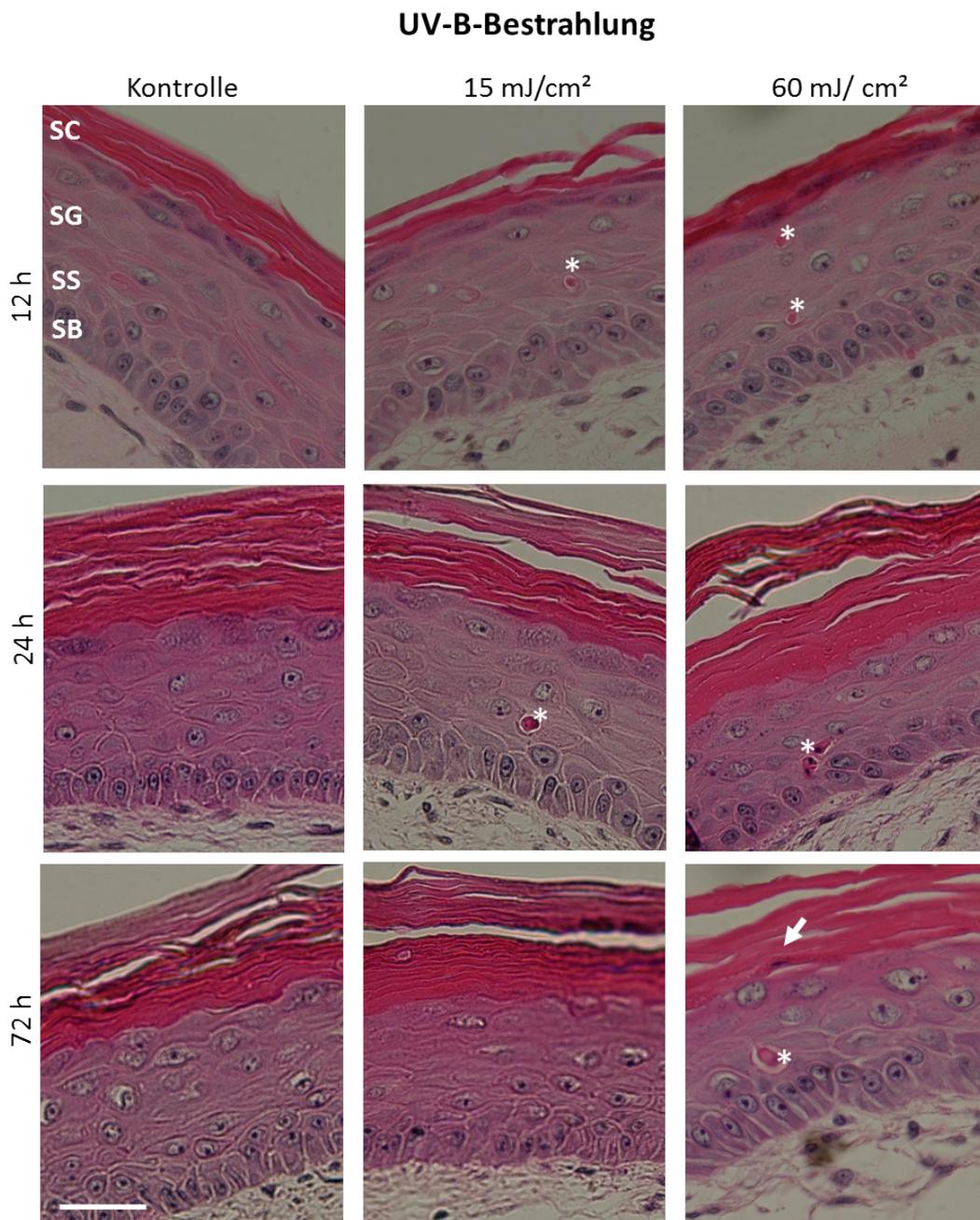
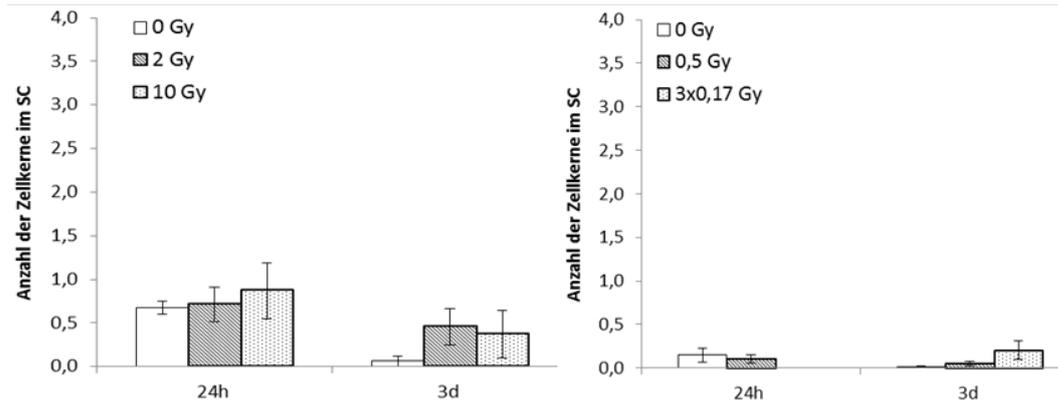
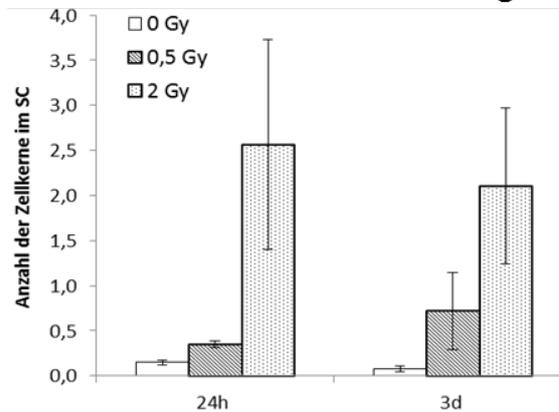


Abbildung 3.25: Hematoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten 12h, 24h und 72h nach der Bestrahlung mit 15 und 60 mJ/cm²; Pfeile markieren Parakeratose, Sterne markieren pyknotische Kerne in der Epidermis; gezeigt sind repräsentative Proben aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μm

Röntgenbestrahlung



Kohlenstoffbestrahlung



UV-B-Bestrahlung

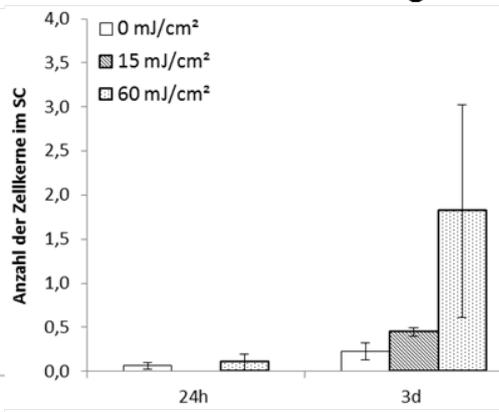
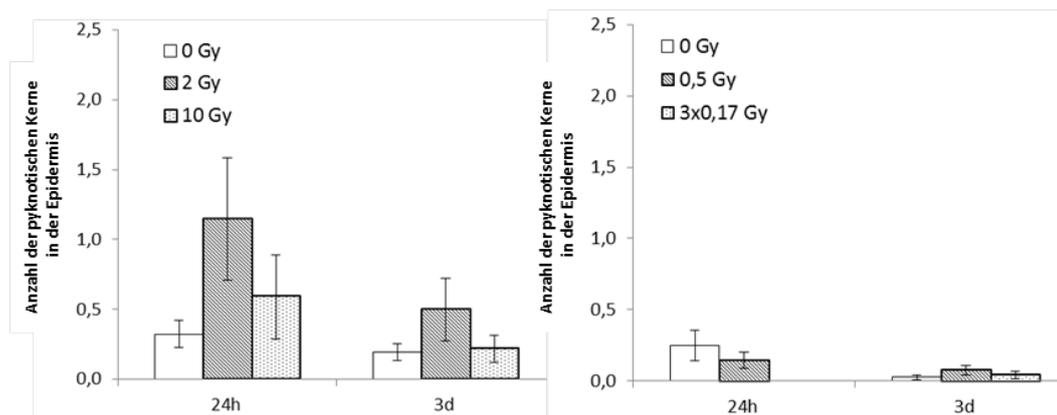
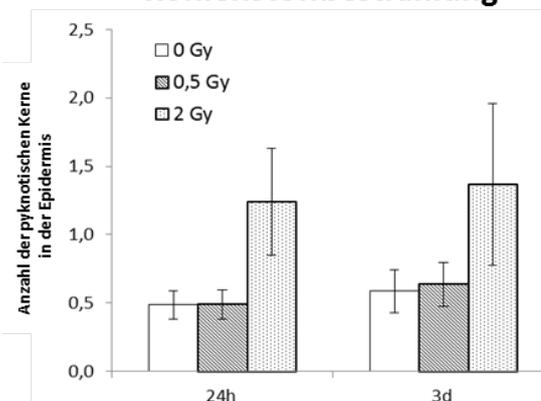


Abbildung 3.26: Quantitative Auswertung der Parakeratose in Hautäquivalenten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung; gezeigt ist die Anzahl an pyknotischen Zellkernen im *stratum corneum* pro Sichtfeld; pro Probe wurden 20 Sichtfelder ausgewertet; N=2, n=4; SEM, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$

Röntgenbestrahlung



Kohlenstoffbestrahlung



UV-B-Bestrahlung

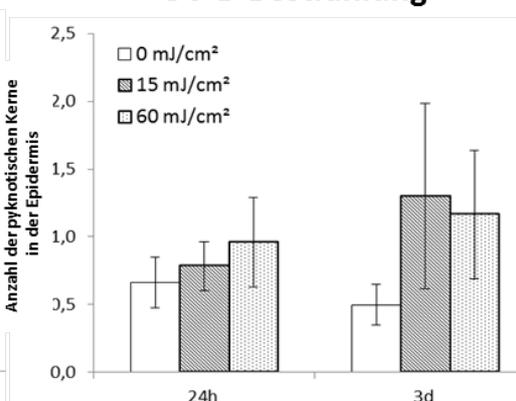
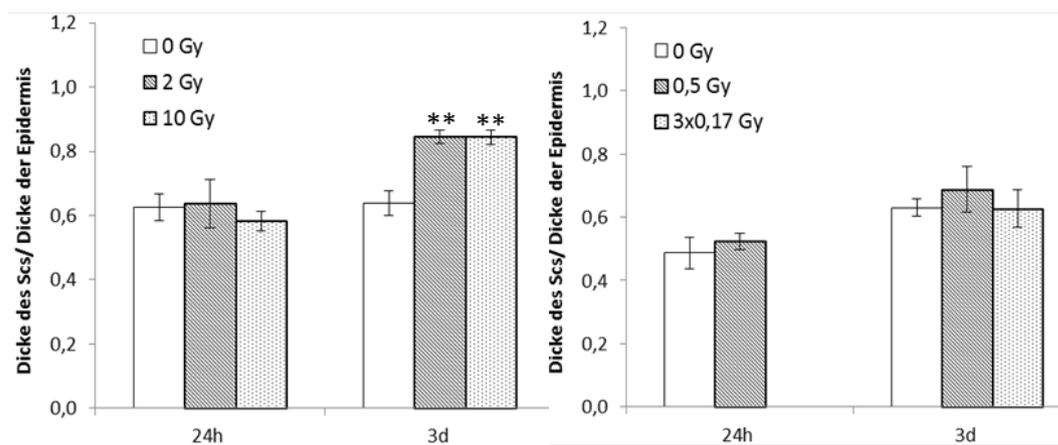
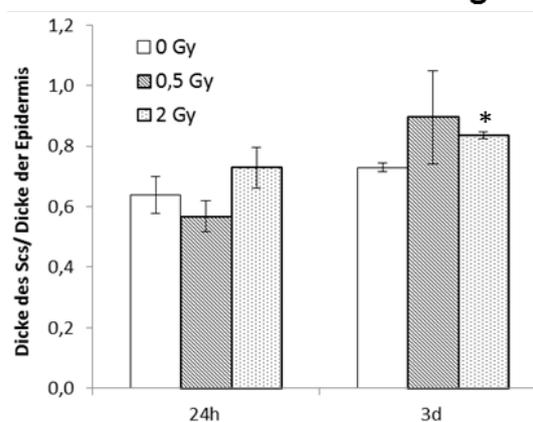


Abbildung 3.27: Quantitative Auswertung pyknotischer Zellen in der Epidermis in Hautäquivalenten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung; gezeigt ist die Anzahl an pyknotischen Zellkernen in der Epidermis pro Sichtfeld; pro Probe wurden 20 Sichtfelder ausgewertet; N=2, n=4; SEM, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$

Röntgenbestrahlung



Kohlenstoffbestrahlung



UV-B-Bestrahlung

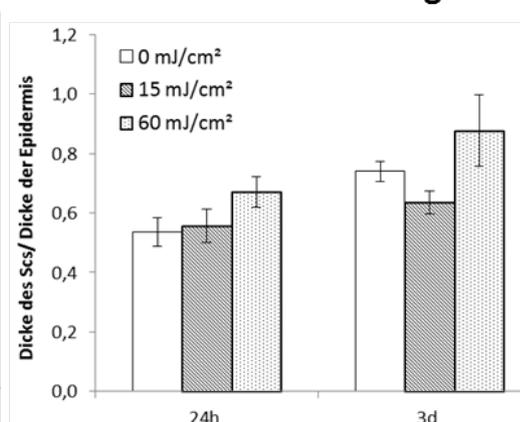


Abbildung 3.28: Quantitative Auswertung der Dicke des *stratum corneum* in Hautäquivalenten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung; gezeigt ist die Dicke des *stratum corneum* im Verhältnis zur Dicke der vitalen Epidermis; pro Probe wurden 20 Sichtfelder ausgewertet; N=2, n=4; SEM, $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$

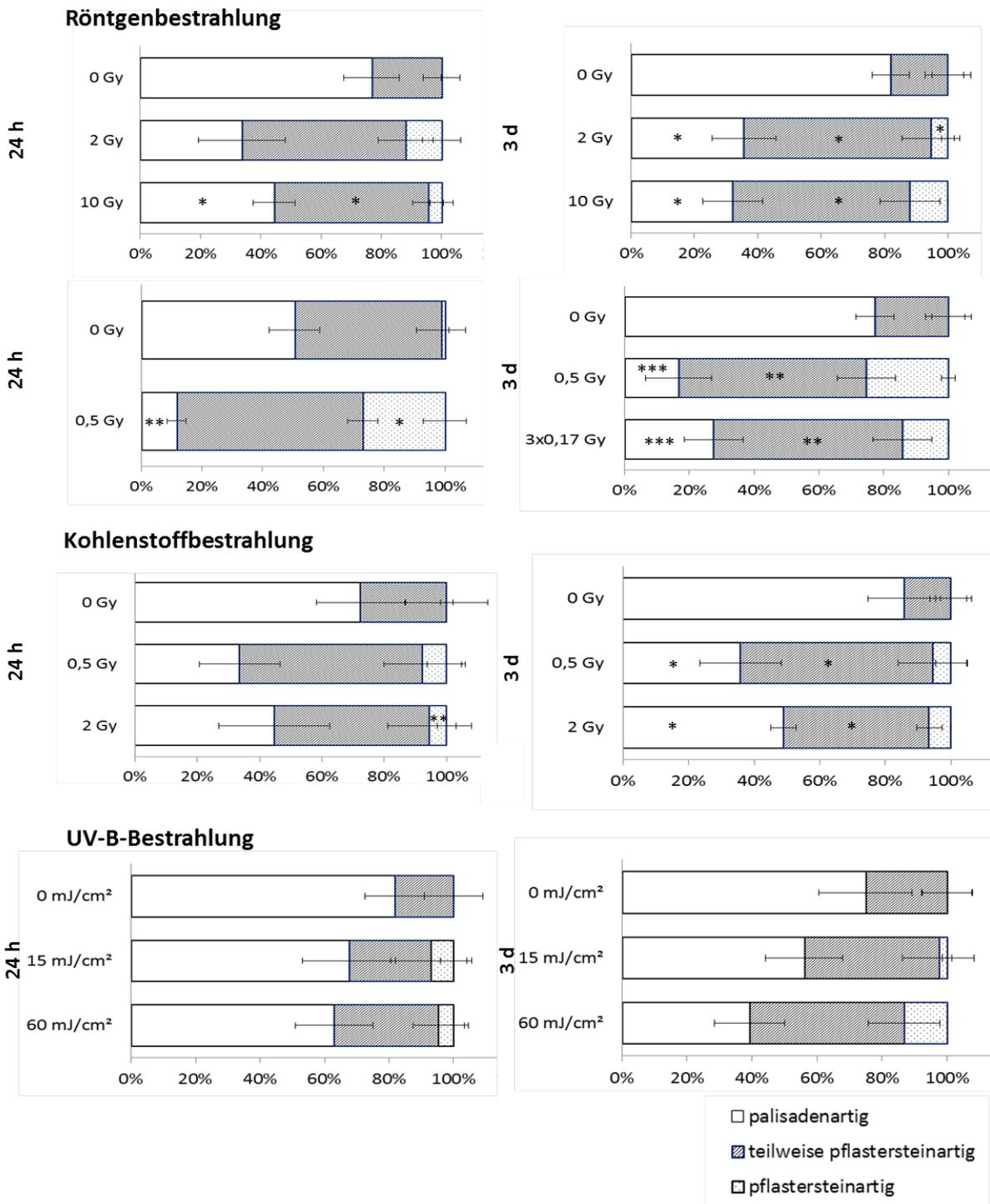


Abbildung 3.29: Semiquantitative Auswertung der Struktur der Basalzellen in Hautäquivalenten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung; gezeigt ist der prozentuale Anteil an Sichtfeldern, in denen palisadenartige, teilweise pflastersteinartige oder pflastersteinartige Basalzellen auftreten; pro Probe wurden 20 Sichtfelder ausgewertet; N=2, n=4; SEM, $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$, $p \leq 0,001=***$; Signifikanzen sind für jedes Merkmal im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle angegeben

Neben den genannten morphologischen und strukturellen Veränderungen der Hautäquivalente wurden mit Hilfe von Antikörperfärbungen die Expressionsmuster verschiedener Proteine und deren Veränderung nach Bestrahlung untersucht. Zuerst wurde die Proliferationsrate in der Basalschicht analysiert. Die proliferierenden Zellen können mit Hilfe eines Antikörpers gegen Ki67 sichtbar gemacht werden. Vergleicht man repräsentative mikroskopische Aufnahmen dieser Färbung (Abbildung 3.30) zeigt sich, dass die Anzahl proliferierender Zellen 3 Tage nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlung zunimmt, während nach einer Bestrahlung mit Kohlenstoffionen die Proliferation eher abnimmt.

Um diesen Effekt zu bestätigen wurde die Anzahl der proliferierenden Zellen quantifiziert. Hierfür wurde zuerst die Gesamtzellzahl in der Basalschicht der Hautäquivalente ermittelt (Abbildung 3.31). Hierbei wird deutlich, dass die Anzahl der Basalzellen auch nach Bestrahlung im Vergleich zu den Kontrollen konstant bleibt. Betrachtet man jedoch die Anzahl der proliferierenden, Ki67-positiven Zellen und bezieht deren Anzahl auf die Anzahl der Basalzellen (Abbildung 3.32), können die Veränderungen, die bereits bei der mikroskopischen Auswertung der Ki67-Antikörperfärbung beobachtet wurden bestätigt werden. Die Anzahl der proliferierenden Zellen nimmt nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlung zu, während nach einer Fraktionierung der gleichen Dosis eine Abnahme zu beobachten ist. In beiden Fällen handelt es sich jedoch nur um einen Trend. Für alle anderen Röntgendosen bleibt die Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung ist tendenziell eine Abnahme zu beobachten, eine Ausnahme bildet hier die Bestrahlung mit 60 mJ/cm^2 , bei der es zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der Proliferationsrate kommt, der jedoch nicht so ausgeprägt ist wie nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlung.

Da in den Hämatoxylin-Eosin-Färbungen Veränderungen in der Basalschicht, wie der Polaritätsverlust der Basalzellen und eine teilweise pflastersteinartige Struktur anstelle einer palisadenartigen Anordnung beobachtet werden konnte, wurden mit einer Antikörperfärbung gegen E-Cadherin die Zell-Zell-Kontakte untersucht. E-Cadherin ist ein epitheliales, transmembranes Glykoprotein, welches mit seinen extrazellulären Domänen an die E-Cadherine anderer Zellen binden kann und so den Zell-Zell-Kontakt stabilisiert und auch an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt ist. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen E-Cadherin können die E-Cadherin vermittelten Zellkontakte sichtbar gemacht werden.

Abbildung 3.33 zeigt eine Antikörperfärbung gegen E-Cadherin von Kontrollen und mit Röntgenstrahlen, Kohlenstoffionen oder UV-B-Strahlung bestrahlten Hautäquivalenten 3 Tage nach der Bestrahlung. In den Kontrollen ist eine deutliche Färbung der Zellen an den Kontaktstellen zu den benachbarten Zellen zu sehen. Während der Differenzierung der Zellen werden die Zell-Zell-Kontakte insbesondere über Desmosomen zuerst verstärkt [1]. Dies ist der Grund für die kräftige Färbung in den Basalzellen und die sogar noch stärkere Färbung in den Schichten, die direkt über der Basalschicht liegen. Während der weiteren Differenzierung werden die Zell-Zell-Kontakte immer weiter abgebaut, was durch die, in höheren Schichten immer schwächer

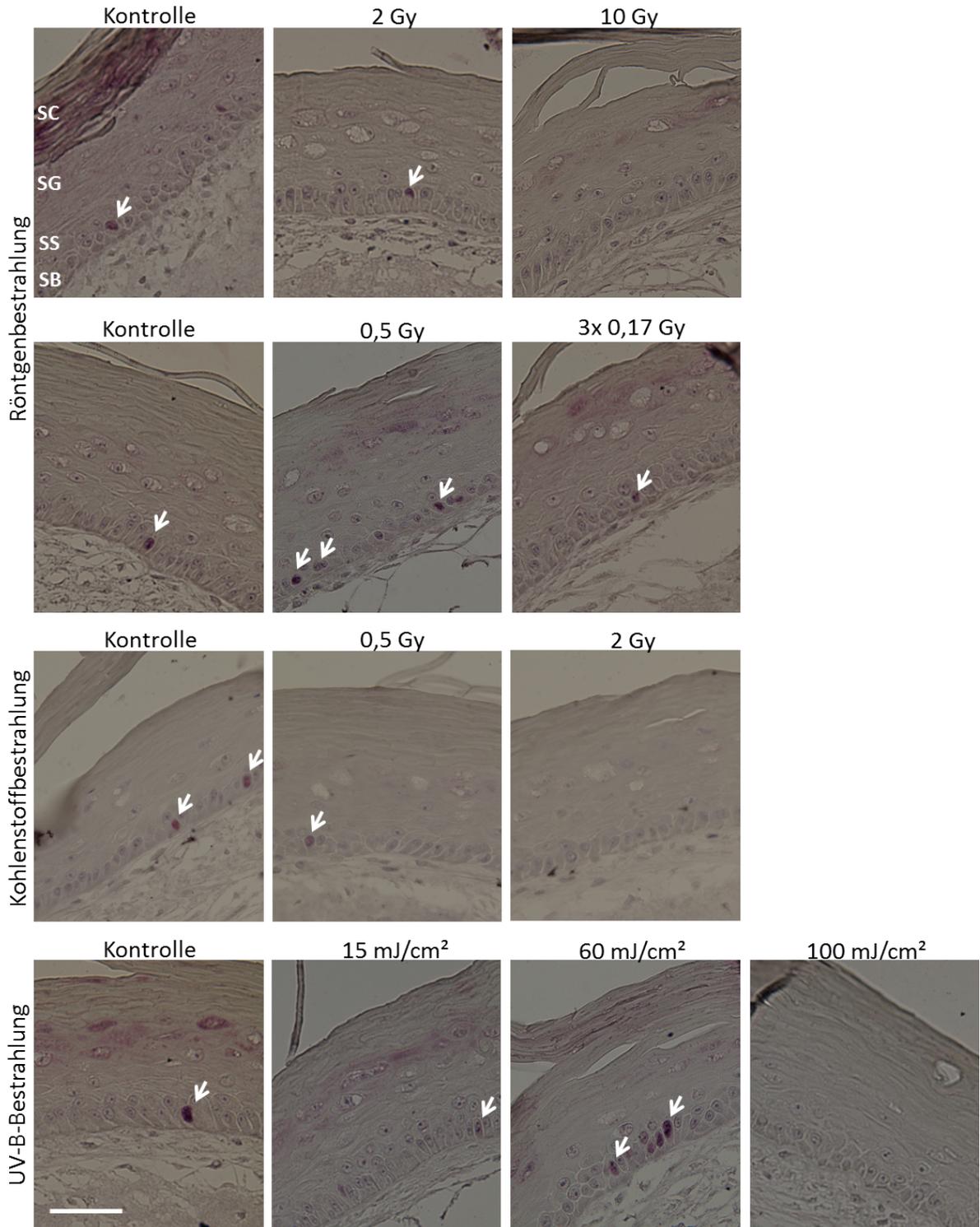


Abbildung 3.30: Detektion des Proliferationsmarkers Ki67 (pink) mit Hilfe einer Antikörperfärbung in Hautäquivalenten 3 Tage nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, Kohlenstoffionen oder UV-B-Strahlen; Pfeile markieren beispielhaft Ki67-positive Zellen; gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen aus N=2 und n=4 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

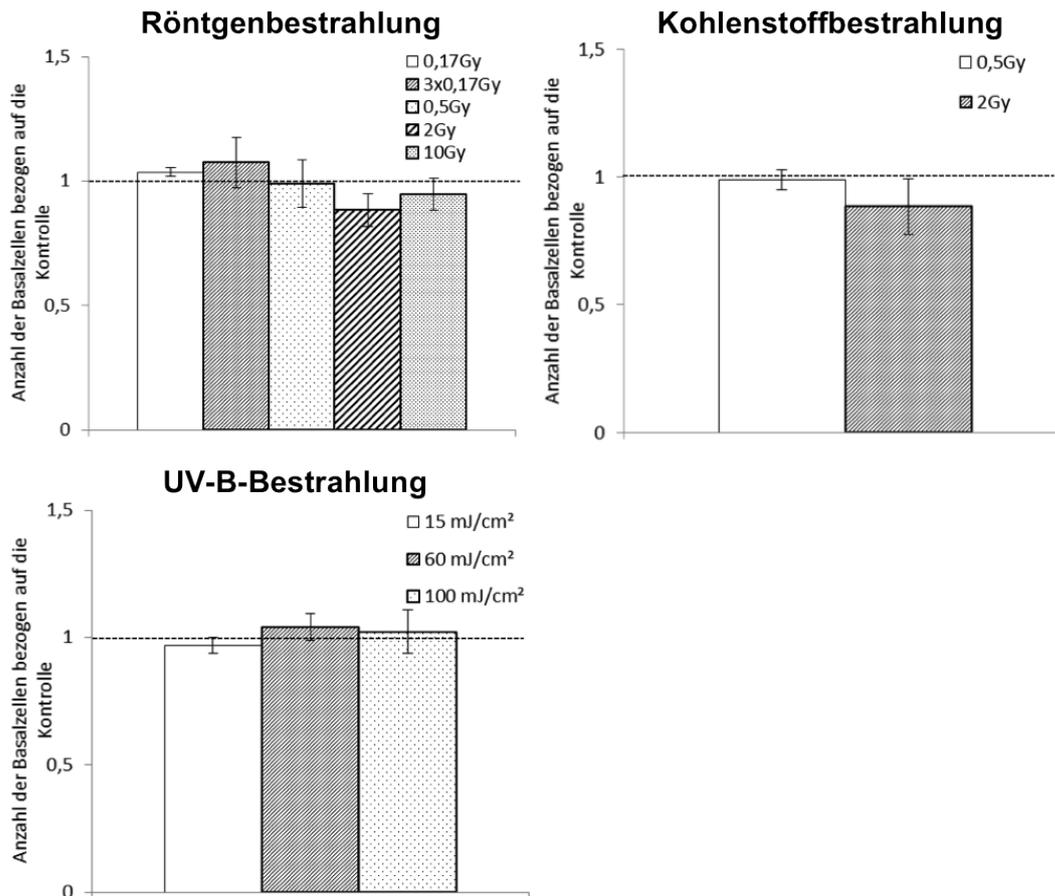


Abbildung 3.31: Anzahl der Basalzellen in Hautäquivalenten 3 Tage nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen und Intensitäten Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen oder UV-B-Strahlen; aufgetragen ist die Veränderung der Anzahl der Basalzellen bezogen auf die Kontrollen; N=2, n=4; SEM

werdende Färbung wiedergespiegelt wird. In den Kontrollen wird jedoch auch deutlich, dass die Färbung zwar schwächer wird, jedoch bis in die Schichten direkt unter dem *stratum corneum* eine Färbung zu sehen ist.

Nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung ist für alle Dosen insgesamt eine leichte Abnahme der E-Cadherin-Expression in allen Schichten zu beobachten. Besonders deutlich wird in den fraktioniert bestrahlten Proben, dass es sich dort nicht nur um eine insgesamt schwächere Expression handelt, sondern auch um eine veränderte Lokalisierung der Expression. In diesen Proben sind die Basalzellen kaum bzw. deutlich schwächer gefärbt als in den Kontrollen. Die Färbung ist nicht mehr in einer scharfen Linie um die Zelle herum lokalisiert, sondern erscheint verwaschen und teilweise auch im Zytoplasma lokalisiert.

Nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy Kohlenstoffionen ist ebenfalls eine Abnahme der Expression in allen Schichten erkennbar, während nach der Bestrahlung mit 2 Gy die Intensität der Färbung der Kontrolle ähnelt. Auch hier ist eine Delokalisierung der Expression in der mit 0,5 Gy bestrahlten Probe zu beobachten. In der Basalschicht der bestrahlten Probe liegt eine deutlich

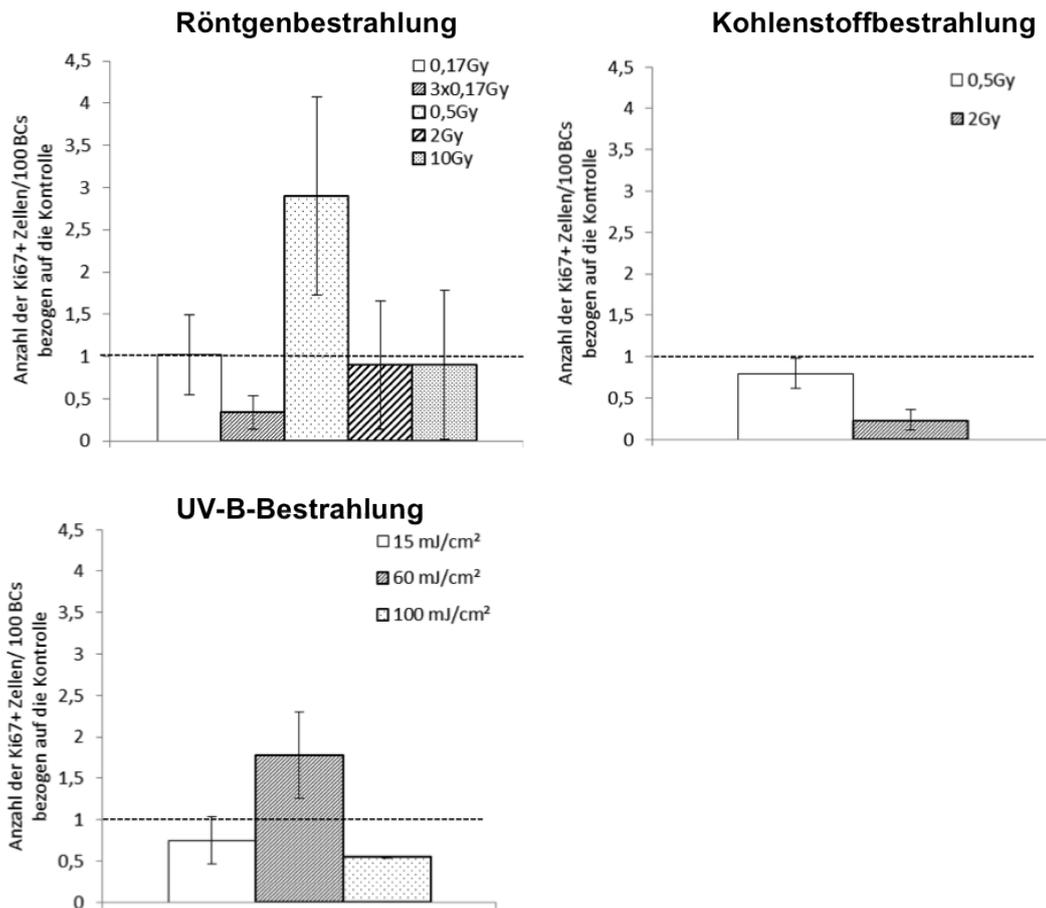


Abbildung 3.32: Quantitative Auswertung der proliferierenden Zellen in der Basalschicht in Hautäquivalenten 3 Tage nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen und Intensitäten Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen oder UV-B-Strahlung; aufgetragen ist die Anzahl der proliferierenden Zellen bezogen auf die Anzahl der Basalzellen normiert auf die Kontrollen; pro Probe wurden 20 Sichtfelder ausgewertet; N=2, n=4; SEM

schwächere Färbung vor als in den Kontrollen.

Ein sehr deutlicher Effekt tritt auch nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlen auf. Die Expression nimmt sowohl nach 15 mJ/cm², insbesondere aber nach 60 mJ/cm² und 100 mJ/cm² in allen Schichten der Epidermis deutlich ab. Ausserdem verändert sich die Lokalisation des Proteins; in den oberen Zellschichten direkt unter dem Stratum corneum, dem *stratum granulosum* ist fast keine Färbung erkennbar. Ausserdem ist auch hier die Färbung in der Basalschicht nur sehr schwach.

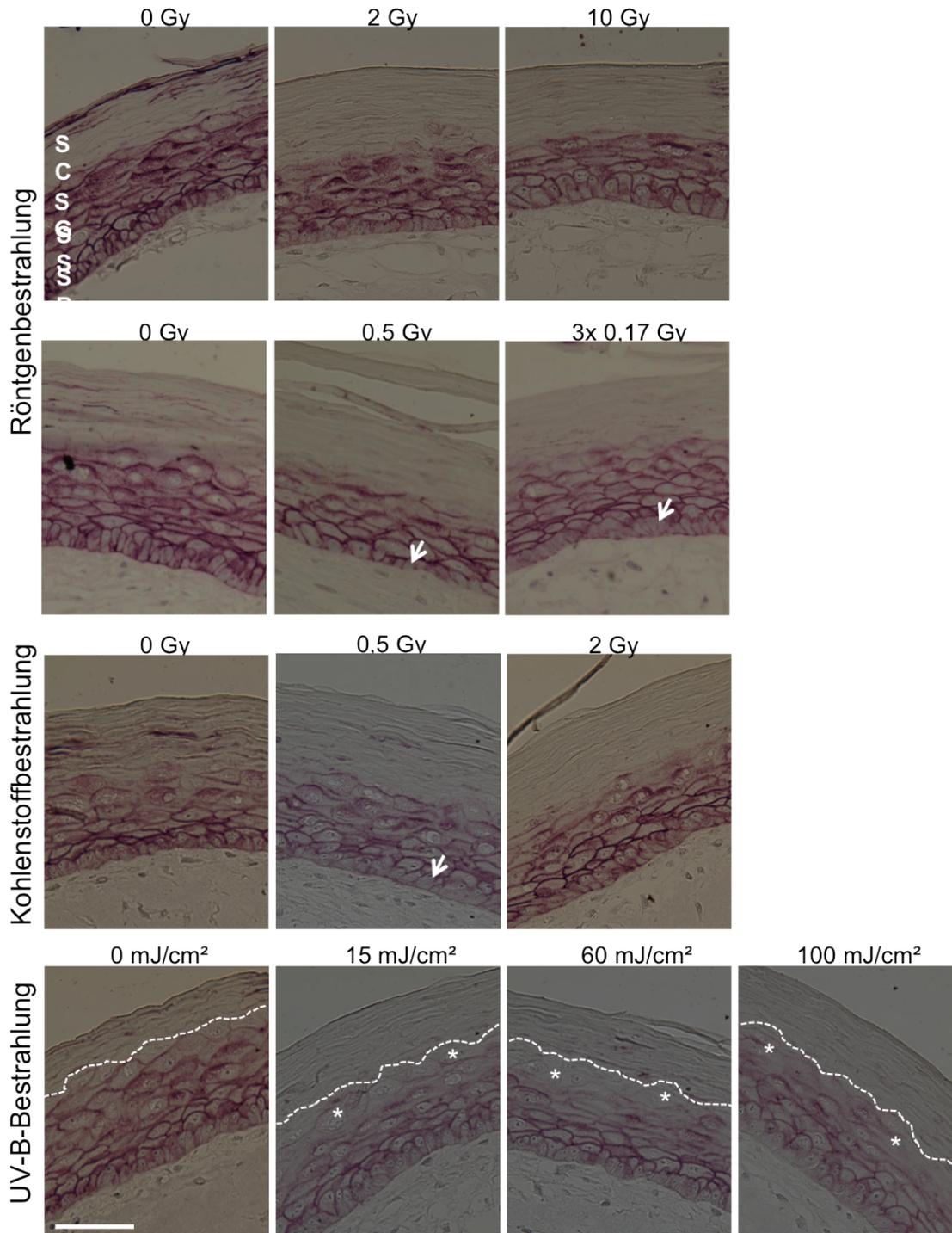


Abbildung 3.33: Detektion des Proteins E-Cadherin (pink) mit Hilfe einer Antikörperfärbung in Hautäquivalenten 3 Tage nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, Kohlenstoffionen oder UV-B-Strahlung; Pfeile zeigen eine verringerte Färbung in der Basalschicht an; gestrichelte Linien markieren den Übergang von *stratum granulosum* zu *stratum corneum*; Sterne markieren die fehlende Färbung im *stratum granulosum*; gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen aus N=3 und n=5 Experimenten; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μm

3.3.4 Zytokinfreisetzung

Neben den histologischen und immunhistochemischen Auswertungen wurde in den 3D-Hautäquivalenten auch die Freisetzung von Zytokinen in das Medium untersucht. Da nur ein begrenztes Volumen an Medium zur Verfügung steht wurden zuerst mit Hilfe eines *multiplex bead arrays* die Konzentrationen von elf entzündungsrelevanten Zytokinen in den Kontrollen gemessen um festzustellen welche Zytokine freigesetzt werden und für genauere Analysen mit Hilfe eines ELISAs gemessen werden können (Tabelle 3.1). IL12p70, IFN-gamma, IL-4 als auch IL-5 konnten in den Medienüberständen der Kontrollen nicht detektiert werden. Anhand des *11-plex bead arrays* wurden IL-2, IL-6, IL-8 und IL-10 für weitere Messungen ausgewählt. Zusätzlich zu diesen Zytokinen wurde auch die Freisetzung von IL-1alpha sowie TGF-beta mit Hilfe eines ELISAs bestimmt.

In allen Proben konnte mit Hilfe des ELISAs kein IL-2 nachgewiesen werden, obwohl es bei der

Tabelle 3.1: Konzentrationen der im *multiplex bead array* gemessenen Zytokinfreisetzungen der Kontrollen in pg/ml

Zytokin	Freisetzung 24h [pg/ml]	Freisetzung 48h [pg/ml]
IL12p70	≤ 0	≤ 0
IFN-gamma	≤ 0	≤ 0
IL-2	1,02	9,11
IL-10	12,1	3,6
IL-8	2488	2181
IL-6	1523	1067
IL-4	≤ 0	≤ 0
IL-5	≤ 0	≤ 0
IL-1beta	≤ 0	≤ 0
TNF-alpha	≤ 0	≤ 0
TNF-beta	5,6	11,4

Messung mit dem *multiplex bead array* in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte und der ELISA eine ähnliche Sensitivität aufweist. Da TNF-alpha ein Zytokin ist, welches in Entzündungsreaktionen eine sehr wichtige und vielseitige Rolle spielt, im *multiplex bead array* jedoch nicht nachweisbar war, wurde dieses nochmal mit einem ELISA mit einer höheren Sensitivität gemessen. Auch mit dieser Messmethode konnte in den Proben kein TNF-alpha nachgewiesen werden.

Nach Bestrahlung mit 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung (Abbildung 3.34) bleibt die Freisetzung der anti-inflammatorischen Zytokine TGF-beta und IL-10 für die untersuchten Zeitpunkte gegenüber den Kontrollen unverändert. Die IL-1alpha-Freisetzung ist, insbesondere 48h nach Bestrahlung deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. Die ebenfalls pro-inflammatorischen Zyto-

kine IL-6 und IL-8 sind insbesondere nach einer mittleren Dosis von 2 Gy signifikant erhöht, für 10 Gy ist keine Veränderung zu beobachten. Wegen den verwendeten Zeitabständen zwischen den einzelnen Fraktionen von jeweils 24 h ist für die fraktionierte Bestrahlung und die Bestrahlung mit einer Einmaldosis von 0,5 Gy auch die Zytokinfreisetzung nach 3 Tagen gezeigt. Nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung bleibt die Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 als auch die der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1alpha und IL-6 sowohl 24 h als auch 3 Tage nach der Bestrahlung weitestgehend unverändert. Es kommt lediglich 24 h nach der Bestrahlung sowohl für die Bestrahlung mit 0,17 Gy als auch mit 0,5 Gy zu einer Erhöhung der IL-8-Freisetzung.

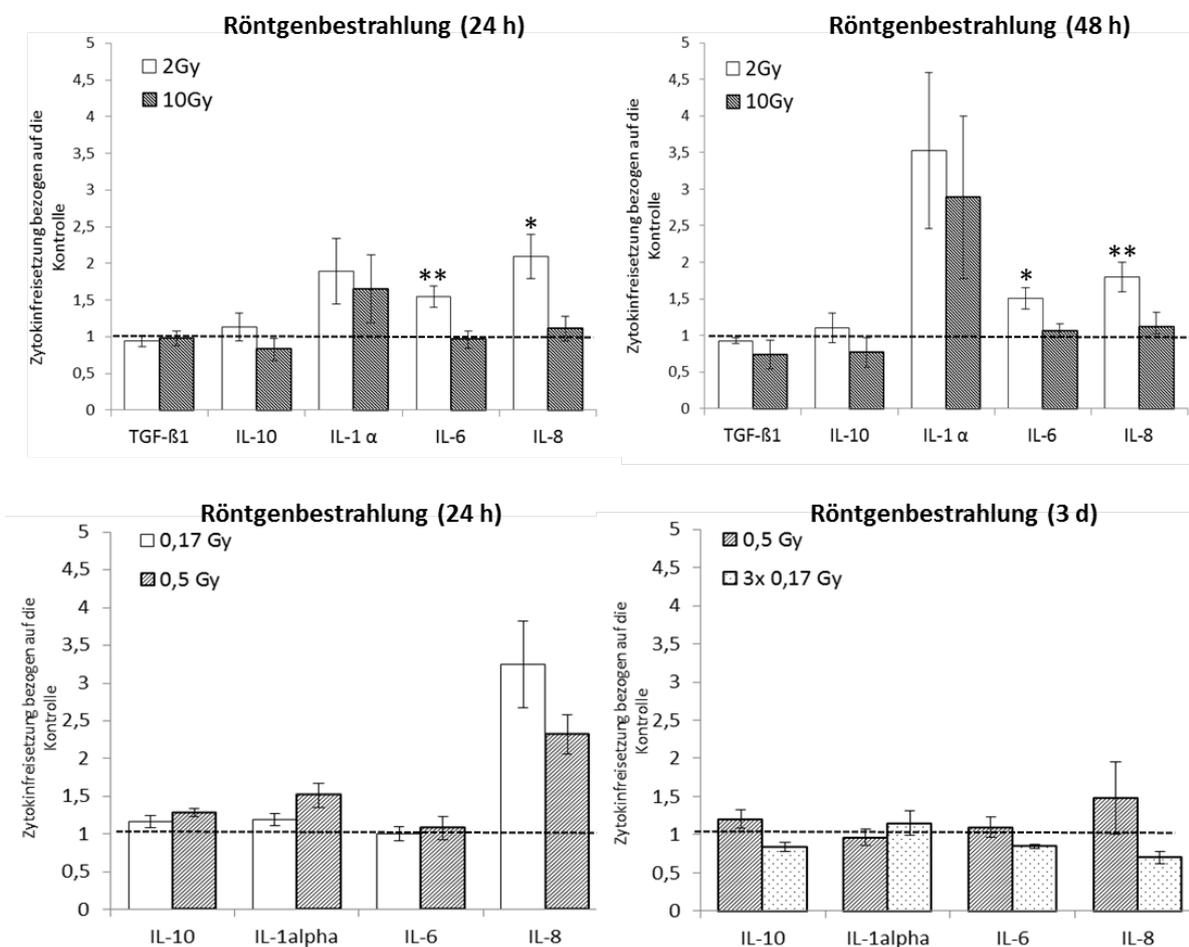


Abbildung 3.34: Zytokinfreisetzung von Hautäquivalenten nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; dargestellt ist die Freisetzung des jeweiligen Zytokins bezogen auf die Kontrolle; N=2-4, n=4-10; SEM, $p \leq 0,05$ =*, $p \leq 0,01$ ** , $p \leq 0,001$ ***

Abbildung 3.35 zeigt die Veränderung der Zytokinfreisetzung nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Insgesamt ist der Effekt im Vergleich zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlen verzögert. Ein leichter, nicht signifikanter Rückgang der IL-1alpha-Freisetzung ist 24 h nach der Bestrahlung messbar, während alle anderen gemessenen Zytokine unverändert bleiben. Nach 48 h ist eine signifikante Erhöhung der IL-10-Freisetzung und ein Trend zu einer erhöhten Freisetzung von IL-1alpha und IL-8 zu beobachten.

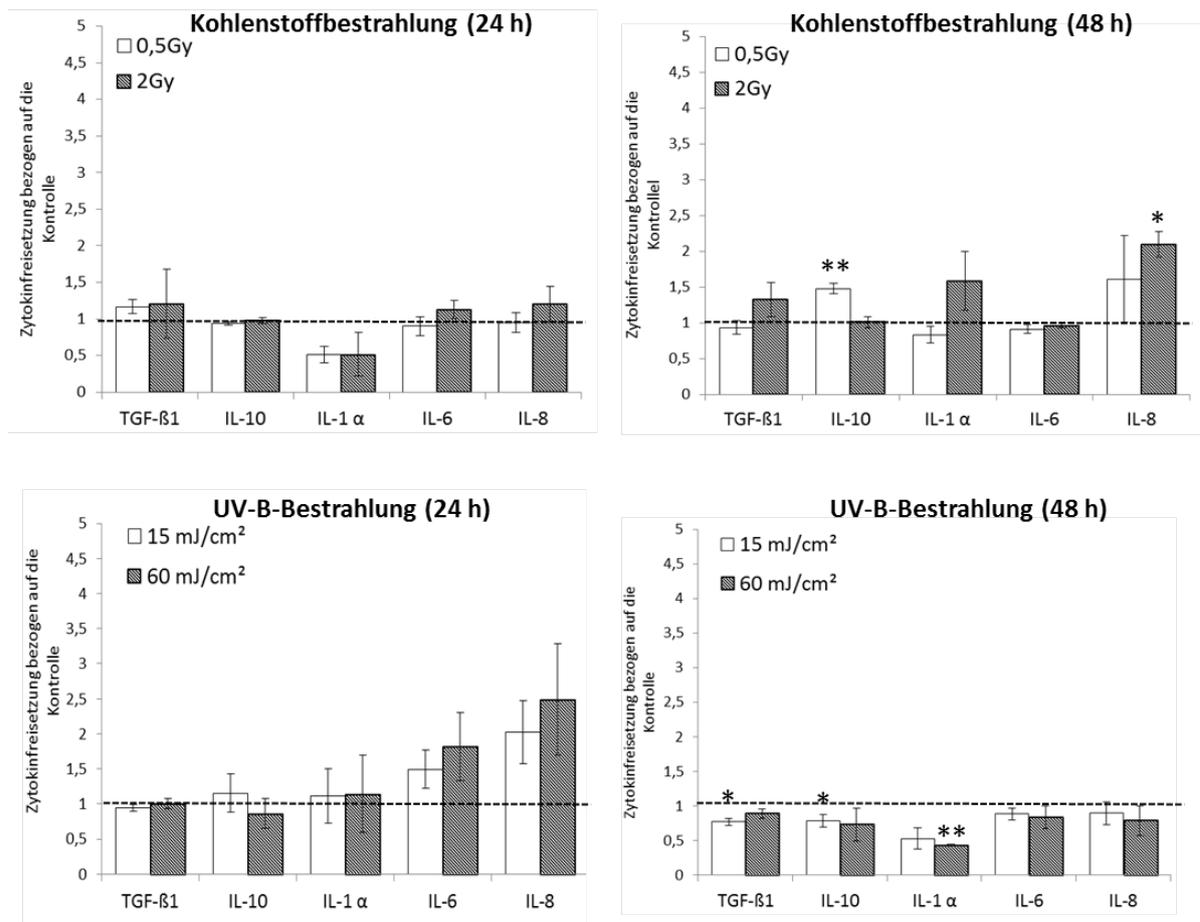


Abbildung 3.35: Zytokinfreisetzung von Hautäquivalenten nach der Bestrahlung mit Kohlenstoff oder UV-Strahlung; dargestellt ist die Freisetzung des jeweiligen Zytokins bezogen auf die Kontrolle; N=2-4, n=4-10; SEM, $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$, $p \leq 0,001=***$

Ebenfalls in Abbildung 3.35 ist der Effekt von UV-B Strahlung auf die Zytokinfreisetzung gezeigt. Dieser unterscheidet sich deutlich von dem nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung. Die Freisetzung der anti-inflammatorischen Zytokine TGF-beta und IL-10 und des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1alpha bleiben 24 h nach der Bestrahlung zwar unverändert, es tritt zu diesem Zeitpunkt jedoch ein deutlicher, intensitätsabhängiger Anstiegs der Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 auf. Nach weiteren 24 h ist der Effekt soweit abgeklungen, dass sich die IL-6- und IL-8-Freisetzung wieder der der Kontrollen angeglichen hat. Die Freisetzung der anti-inflammatorischen Zytokine TGF-beta und IL-10 und des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1alpha ist 48 h nach der Bestrahlung leicht aber signifikant verringert.

3.4 Humane Haut

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kooperation mit der Hautklinik des Klinikums Darmstadt etabliert. Gemeinsam wurde ein Antrag bei der Ethikkommission für die Arbeit mit humaner Haut und deren *ex vivo*-Kultivierung gestellt. Die Bewilligung dieses Antrags ermöglichte es, nach Zustimmung des jeweiligen Patienten, Haut, welche bei Routineeingriffen als Abfallprodukt anfällt, im Labor als Hautexplantat weiter zu kultivieren und für Bestrahlungsexperimente zu nutzen.

3.4.1 Etablierung eines Kultursystems für humane Haut

Um Versuche mit Explantaten humaner Haut durchzuführen, musste zuerst das Kultursystem etabliert und an die Randbedingungen der Versuche angepasst werden. In der Literatur finden sich wenige, sehr unterschiedliche Methoden humane Haut zu kultivieren [48] [49] [50]. Aufgrund der Literaturrecherche und der Erfahrung mit Co-Kulturen und Hautäquivalenten wurde die Kultivierung der Hautexplantate in Zellkulturinserts und die Verwendung von RPMI-Medium mit FCS gewählt. Dieses System hat sich als sehr geeignet erwiesen. Mit dieser Methode ist eine Kultivierung der humanen Haut über 4 Tage nach einer potenziellen Bestrahlung, das heisst für eine Gesamtdauer von ca. 16 h Äquilibrierungszeit plus 4 Tage nach der Bestrahlung möglich. Allerdings zeigen sich nach 4 Tagen morphologische Veränderungen in der Haut, die wahrscheinlich von der *in vitro*-Kultivierung verursacht werden. Die Zellen wirken aufgebläht, es kommt zu einer sehr starken Vakuolisierung und es treten vermehrt kondensierte Zellkerne in der Epidermis auf, welche auf apoptotische Zellen oder einen gestörten Differenzierungsprozess hinweisen. Aus diesem Grund wurden die Explantate nur bis zu maximal 3 Tage, meist jedoch 48 h nach der Bestrahlung für weitere Untersuchungen verwendet.

Um eine Kontrolle über mögliche Kultivierungseffekte zu haben, wurde bei jedem Versuch ein Stück Probe direkt nach Erhalt fixiert und nicht erst kultiviert. Diese wird im Weiteren als "nicht in Kultur" bezeichnet. In Abbildung 3.36 ist die Hematoxylin-Eosin-Färbung einer solchen Probe und von Proben, die über 48 h kultiviert wurden, gezeigt.

Es wird deutlich, dass die humane Haut im Vergleich zu den Hautäquivalenten eine deutlich unregelmäßigere Struktur aufweist. Die Zellen der Basalschicht sind nicht genauso streng palisadenartig sondern etwas unregelmäßiger angeordnet. Dies ist sowohl in den nicht kultivierten Proben als auch zu allen Kultivierungszeitpunkten der Fall. Insgesamt hängt sowohl die Dicke der Epidermis als auch die des *stratum corneums* sehr vom Hauttyp des Spenders aber auch von der Körperregion, aus der die Probe stammt, ab. Die Anzahl der Melanozyten bzw. die Menge des enthaltenen Melanins und die Dichte von Melanosomen kann ebenfalls sowohl zwischen den Spendern als auch abhängig vom Entnahmeort beim selben Spender schwanken. Über die Dauer der Kultivierung verändert sich das Hautexplantat nur wenig, denn die Differenzierung läuft in humaner Haut langsamer ab als im Hautäquivalent. Teilweise tritt eine leichte Vakuoli-

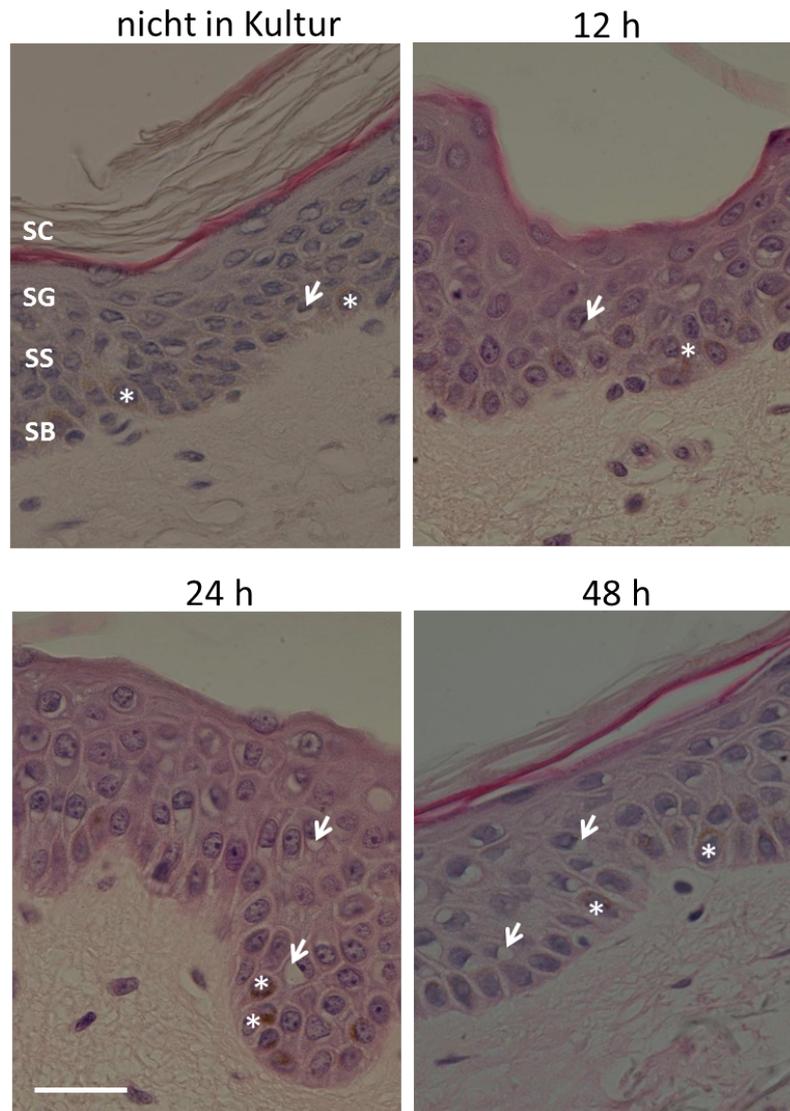


Abbildung 3.36: Hematoxylin und Eosin Färbung humaner Hautexplantate zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten; die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Kultivierungsdauer nach einer möglichen Bestrahlung zum Zeitpunkt 0 h; die Haut wurde vorher für ca. 16 h unter Kulturbedingungen äquilibriert; Pfeile markieren Vakuolisierung; Sterne markieren Melanosomen die Melanin enthalten; N=5 und n=10; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

sierung auf, welche jedoch auch in den nicht kultivierten Proben zu beobachten ist und damit nicht als Effekt der Kultivierung gewertet werden kann.

Über den gesamten Kultivierungszeitraum von 3 Tagen sind keine kondensierten Zellkerne oder andere Veränderungen, die auf Zelltod hindeuten, zu erkennen. Dies wird dadurch bestätigt, dass in der Antikörperfärbung keine aktive Caspase 3 nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.37).

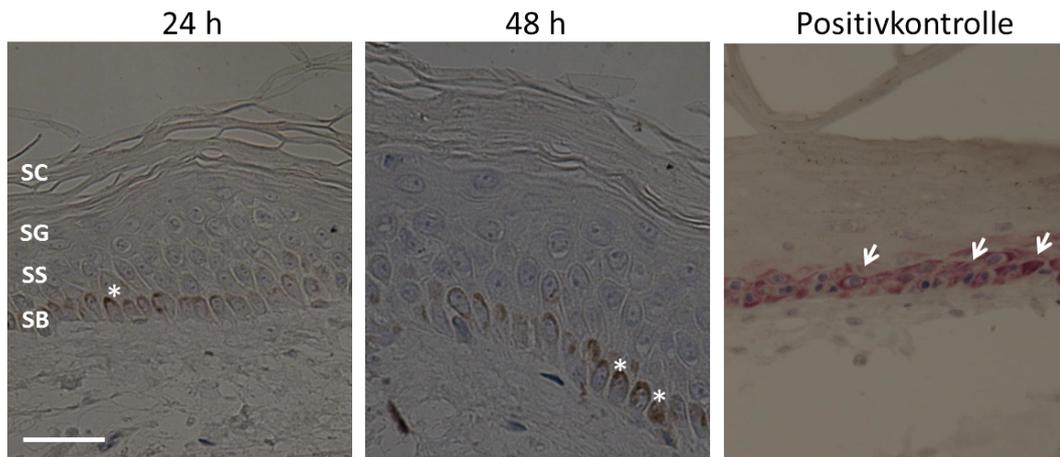


Abbildung 3.37: Antikörperfärbung gegen den Apoptosemarker aktive Caspase 3 (pink) von humanen Hautexplantate zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten; die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Kultivierungsdauer nach einer möglichen Bestrahlung zum Zeitpunkt 0 h; die Haut wurde vorher für ca. 16 h unter Kulturbedingungen äquilibriert; Pfeile markieren beispielhaft apoptotische, für aktive Caspase 3 positive Zellen, Sterne markieren Melanosomen (braun); als Positivkontrolle wurde ein Hautäquivalent (EFT400) verwendet, welches 3 Tage mit Medium auf der apikalen Oberfläche kultiviert wurde und apoptotische Basalzellen aufweist; N=5 und n=10; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, ob die Auswirkungen der Kultivierung der Hautexplantate für die Bestrahlungsexperimente akzeptabel sind, wurden verschiedene Antikörperfärbungen mit den über unterschiedliche Zeiträume kultivierten Explantaten durchgeführt. Zuerst wurde mit einer Antikörperfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 überprüft, ob die *in vitro* kultivierten Explantate weiter proliferieren (Abbildung 3.38). Die Färbung macht deutlich, dass auch in Kultur die Proliferationsfähigkeit der Zellen erhalten bleibt. Insgesamt nimmt die Anzahl der proliferierenden Zellen im Laufe des Kulturzeitraums zwar ab, jedoch sind auch nach 3 Tagen noch proliferierende Zellen vorhanden.

Ein weiterer Hinweis auf Funktion und Vitalität der Hautexplantate ist das Vorhandensein von Langerhanszellen. Es ist bekannt, dass diese in der Epidermis residierenden Immunzellen als Reaktion auf eine *in vitro*-Kultivierung spontan aus der Epidermis auswandern und in das Medium freigesetzt werden können [51]. Mit einer Antikörperfärbung gegen CD1a können die Langerhanszellen in den Gewebeschnitten angefärbt werden (Abbildung 3.39). Langerhanszellen befinden sich in suprabasalen Schichten der Epidermis und sind sehr gut an ihren langen, ebenfalls mit CD1a anfärbbaren Fortsätzen zu erkennen. Ein Vergleich repräsentativer mikroskopischer Aufnahmen der unterschiedlichen Kulturzeitpunkte hat gezeigt, dass die Anzahl der Langerhanszellen ungefähr gleich bleibt. Es ist keine Auswanderung der Zellen über den Kultivierungszeitraum zu beobachten.

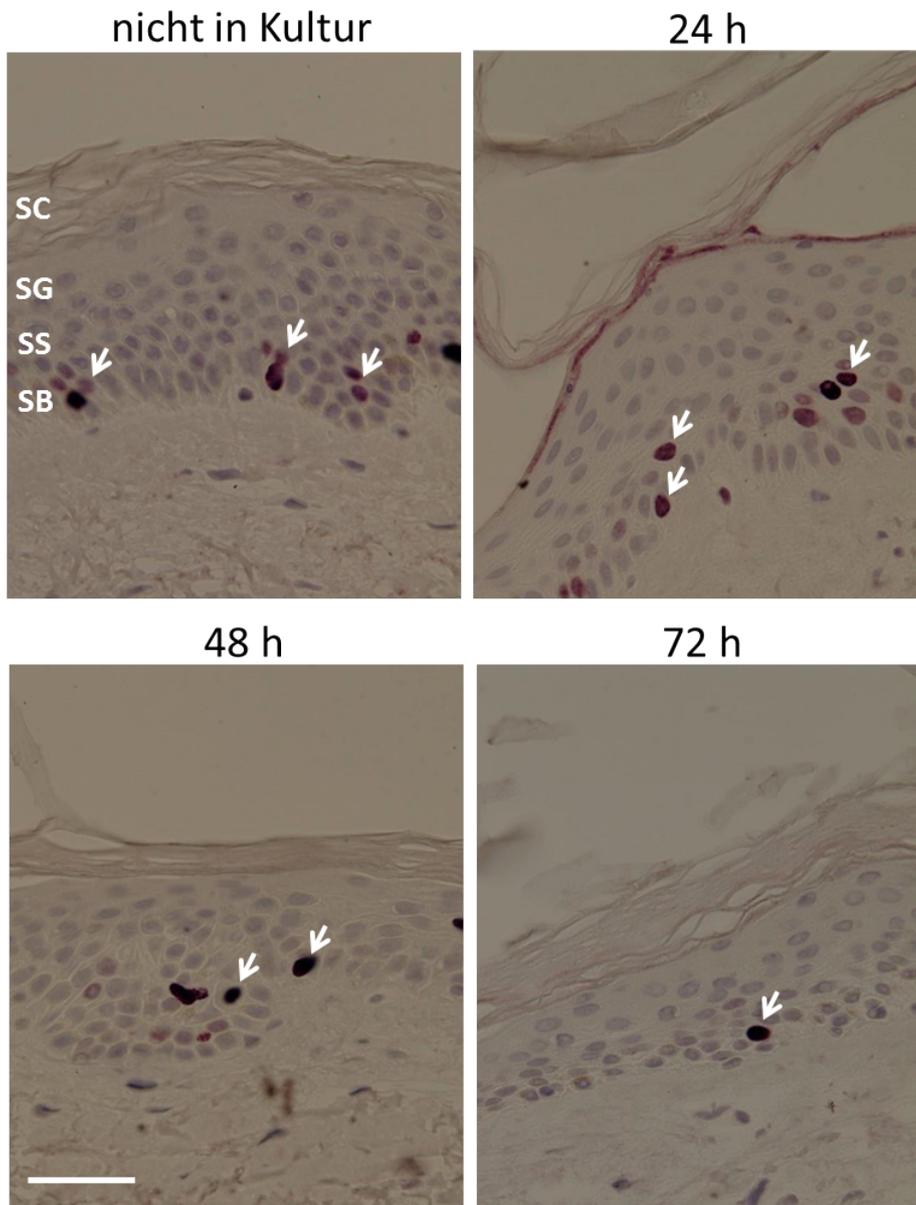


Abbildung 3.38: Antikörperfärbung humaner Hautexplantate zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 (pink); die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Kultivierungsdauer nach einer möglichen Bestrahlung zum Zeitpunkt 0 h; die Haut wurde vorher für ca. 16 h unter Kulturbedingungen äquilibriert; Pfeile markieren beispielhaft Ki67-positive Zellen; N=5 und n=10; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

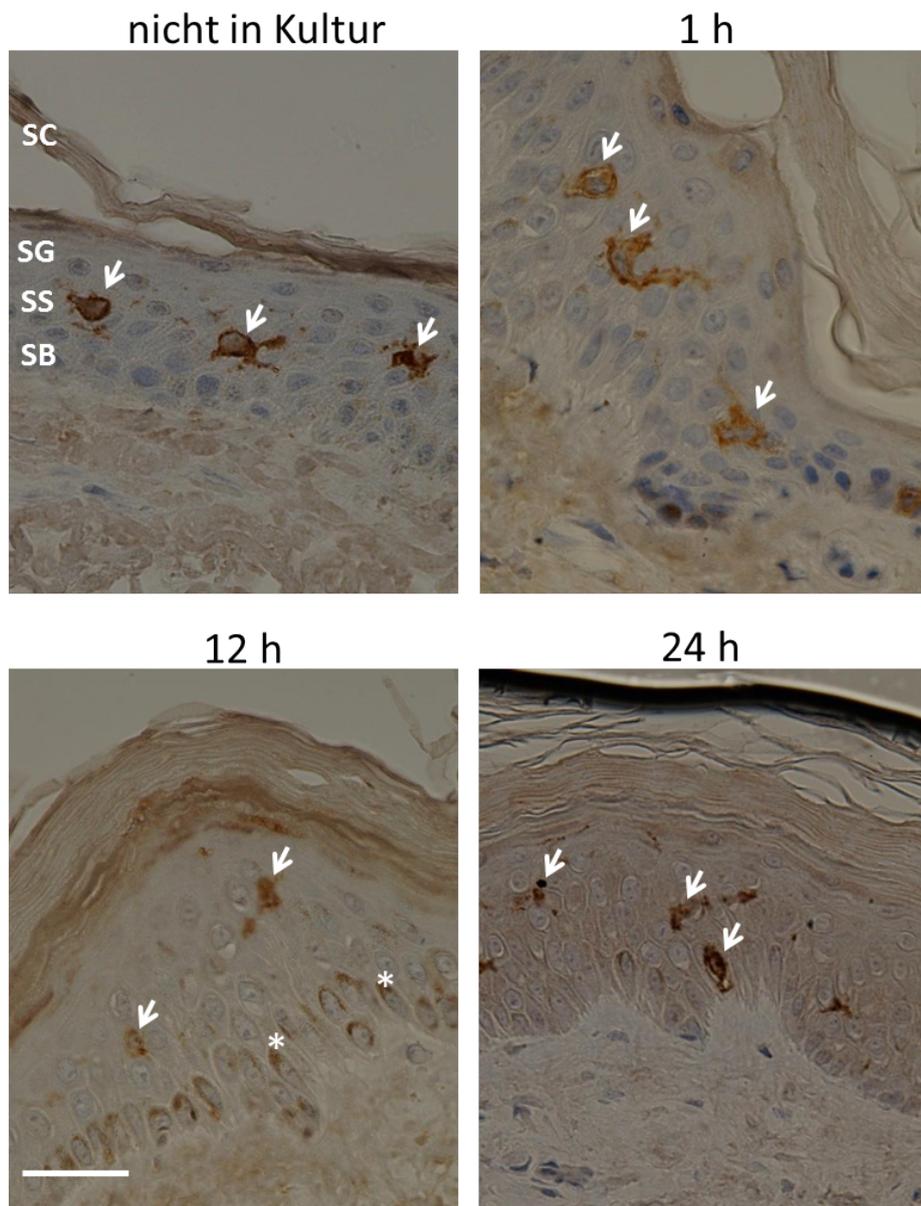


Abbildung 3.39: Antikörperfärbung humaner Hautexplantate zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten mit einem Antikörper gegen CD1a (braun), einem Marker für Langerhanszellen; die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Kultivierungsdauer nach einer möglichen Bestrahlung zum Zeitpunkt 0 h; die Haut wurde vorher für ca. 16 h unter Kulturbedingungen äquilibriert; Pfeile markieren beispielhaft CD1a-positive Zellen; Sterne markieren die natürlicherweise braunen Melanosomen; N=3 und n=6; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

3.4.2 Bestrahlung humaner Haut

Aufgrund der begrenzten Anzahl von verfügbaren Proben und den meist nur mit großer Unsicherheit planbaren Versuchszeitpunkten wurden die Bestrahlungsversuche mit humaner Haut, basierend auf den Ergebnissen für das Hautäquivalent, nur mit ausgewählten Dosen bzw. Intensitäten und Kulturzeitpunkten durchgeführt. Ein Schwerpunkt wurde hier vorerst auf die Röntgenbestrahlung mit einer niedrigen Dosis von 0,5 Gy und deren Fraktionierung in 3 Fraktionen mit jeweils 0,17 Gy gelegt. Bei der Fraktionierung wurden die Hautexplantate aufgrund der begrenzten Kultivierungsdauer alle 12 Stunden bestrahlt (zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h und 24 h) und weitere 24 h später (48 h nach der ersten Bestrahlung) fixiert.

Zuerst wurden die bestrahlten Hautproben auf das Vorkommen von Apoptose und Nekrose untersucht. Obwohl in den Hautäquivalenten als auch in den Mono- und Co-Kulturen keine Apoptose auftrat, könnte in den Explantaten der humanen Haut z.B. durch die Anwesenheit der Langerhanszellen oder anderen Immunzellen und deren Beitrag zur Strahlenantwort Apoptose auftreten. Es konnte jedoch beispielhaft für die Dosen 0,5 Gy und 10 Gy mit einer Antikörperfärbung gegen aktive Caspase 3 gezeigt werden, dass nach Röntgenbestrahlung im untersuchten Zeitraum keine apoptotischen Zellen zu finden sind (Abbildung 3.40).

Ausserdem wurden die Proben mit Hilfe eines ELISA-Tests auf die Freisetzung des Nekrosemarkers HMGB1 untersucht. Dieses Protein konnte jedoch sowohl im Medium der Kontrollen als auch in dem der bestrahlten Proben nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um einen Überblick über die Gewebestruktur, den Differenzierungsstatus und mögliche, strahleninduzierte Veränderungen der Hautexplantate zu bekommen, wurden für alle Versuche Hematoxylin-Eosin-Färbungen durchgeführt. Abbildung 3.41 zeigt eine solche Färbung von Hautexplantaten 12 h und 24 h nach der Bestrahlung mit 0,5; 2 und 10 Gy Röntgenstrahlung, als auch eine nicht kultivierte Probe der für das Experiment verwendeten Haut. In allen Proben konnte das Ergebnis der Antikörperfärbung gegen aktive Caspase 3 bestätigt werden. Es konnten keine kondensierten Zellkerne, die auf apoptotische Zellen hinweisen, beobachtet werden. Allerdings tritt 24 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy Röntgenstrahlen Parakeratose auf. Es sind deutlich kondensierte Kerne, welche sich im *stratum corneum* befinden, zu erkennen. Dieser Effekt weist auf eine durch die Strahlung beeinträchtigte Differenzierung hin. Es tritt im Vergleich zu den Kontrollen keine vermehrte Vakuolisierung auf.

In einem weiteren Versuch mit Röntgenstrahlung, der hier exemplarisch gezeigt wird, wurden die Zeitpunkte 24 h und 48 h nach Bestrahlung und eine niedrige Dosis von 0,5 Gy als auch eine Fraktionierung dieser Dosis in 3x 0,17 Gy untersucht. Für den Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung wurde auch eine mit 10 Gy bestrahlte Probe mitgeführt (Abbildung 3.42). Für die Bestrahlung mit 0,5 Gy als auch nach einer fraktionierten Röntgendosis von 3x 0,17 Gy kommt es vermehrt zu einer Vakuolisierung der Zellen. Es bilden sich Hohlräume um den Zellkern, die weder mit Hematoxylin noch mit Eosin angefärbt werden. Zu Parakeratose kommt es nach der Bestrahlung

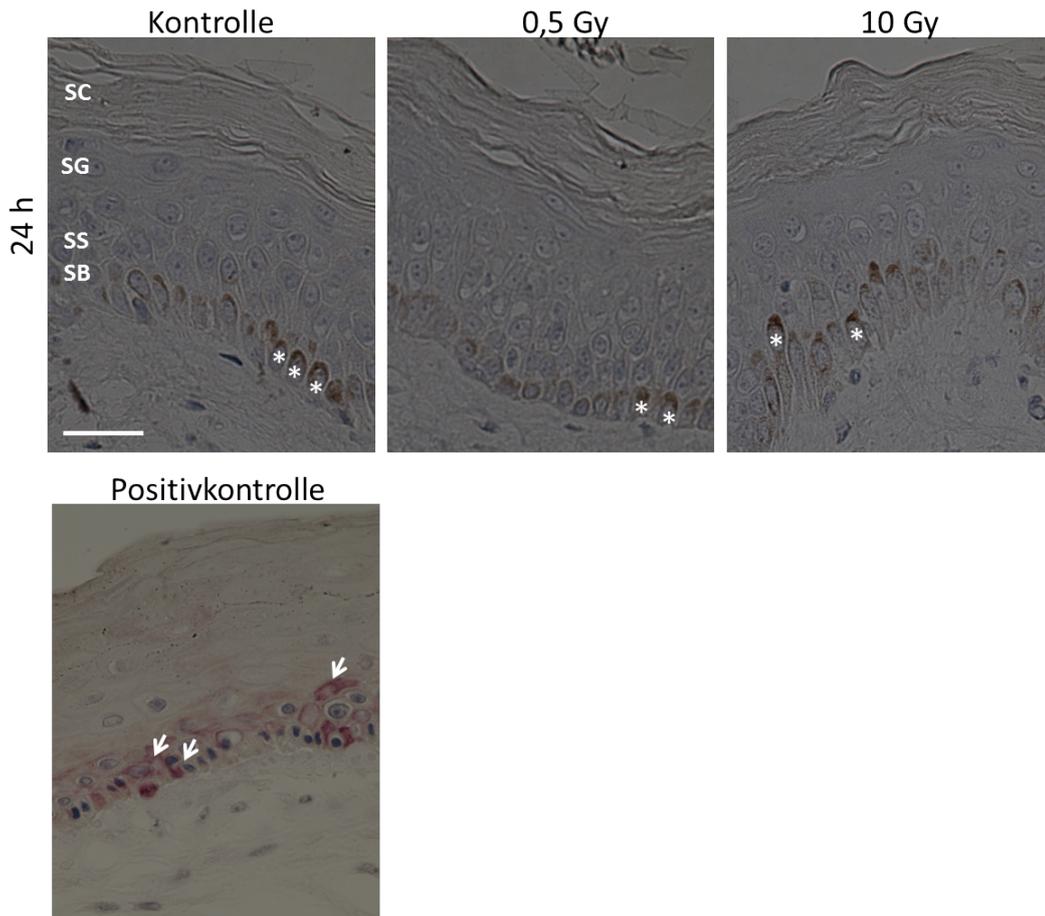


Abbildung 3.40: Antikörperfärbung gegen den Apoptosemarker geschnittene Caspase 3 von humanen Hautexplantate nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung; Pfeile markieren Zellen mit aktivierter Caspase 3, Sterne markieren die natürlicherweise braunen Melanosomen; als Positivkontrolle wurde ein Hautäquivalent (EFT400) verwendet, welches 3 Tage mit Medium auf der apikalen Oberfläche kultiviert wurde und apoptotische Basalzellen aufweist; N=3 und n=6; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μm

mit 10 Gy bei diesem Experiment jedoch nur vereinzelt. Dies zeigt im Vergleich zu dem in Abbildung 3.41 gezeigten Experiment, dass die Ausprägung des Bestrahlungseffekts von Spender zu Spender variieren kann und es sehr wichtig ist, jeweils mit den entsprechenden Kontrollen und nicht kultivierten Proben zu vergleichen. Trotzdem zeigt dieses Ergebnis, dass Parakeratose ein Effekt der Röntgenstrahlung darstellt, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, und nicht nur sporadisch in einzelnen Proben auftritt.

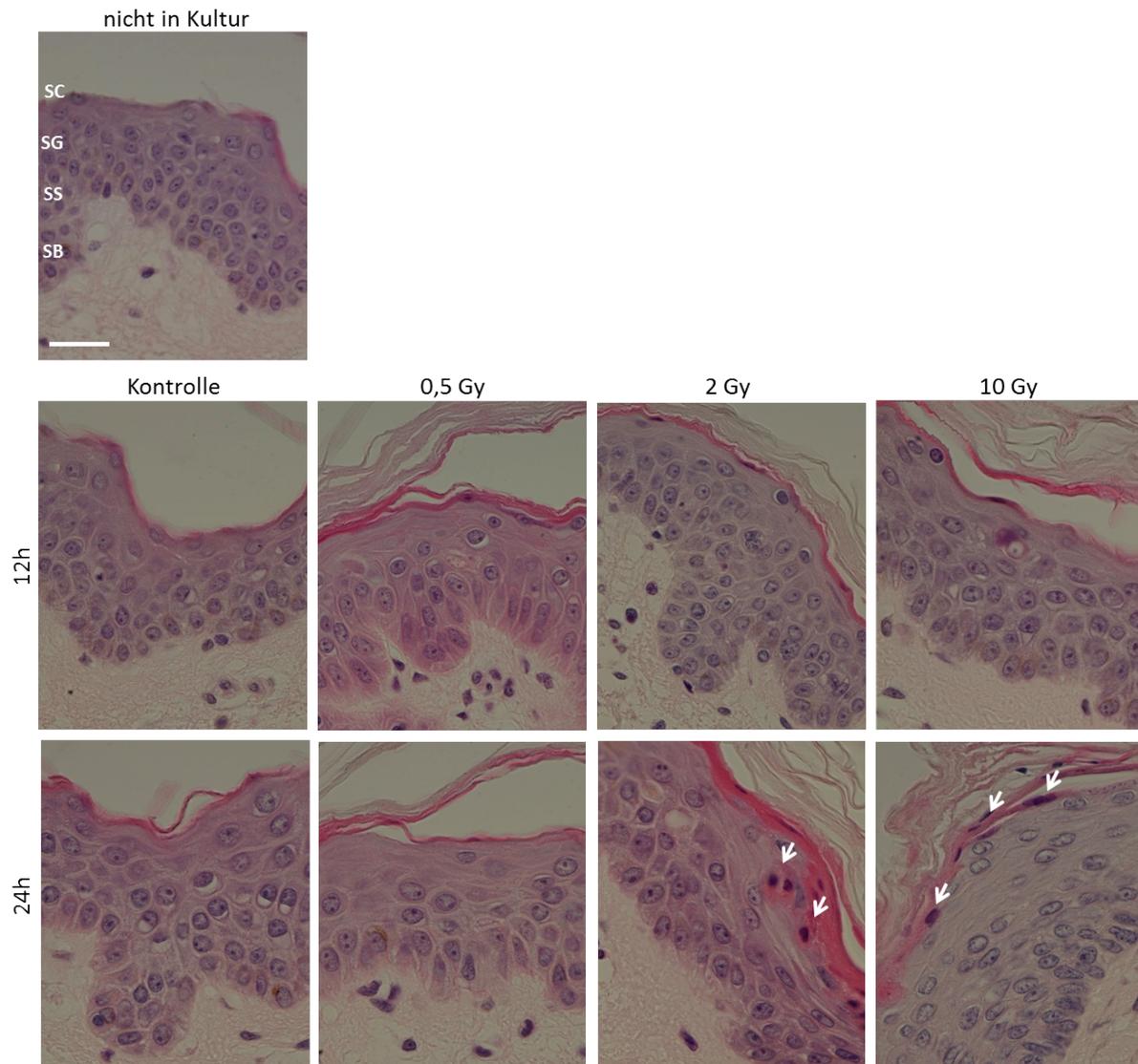


Abbildung 3.41: Hematoxylin-Eosin-Färbung humaner Hautexplantate nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung 12 h und 24 h nach der Bestrahlung; Pfeile markieren Parakeratose; N=1 und n=2; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

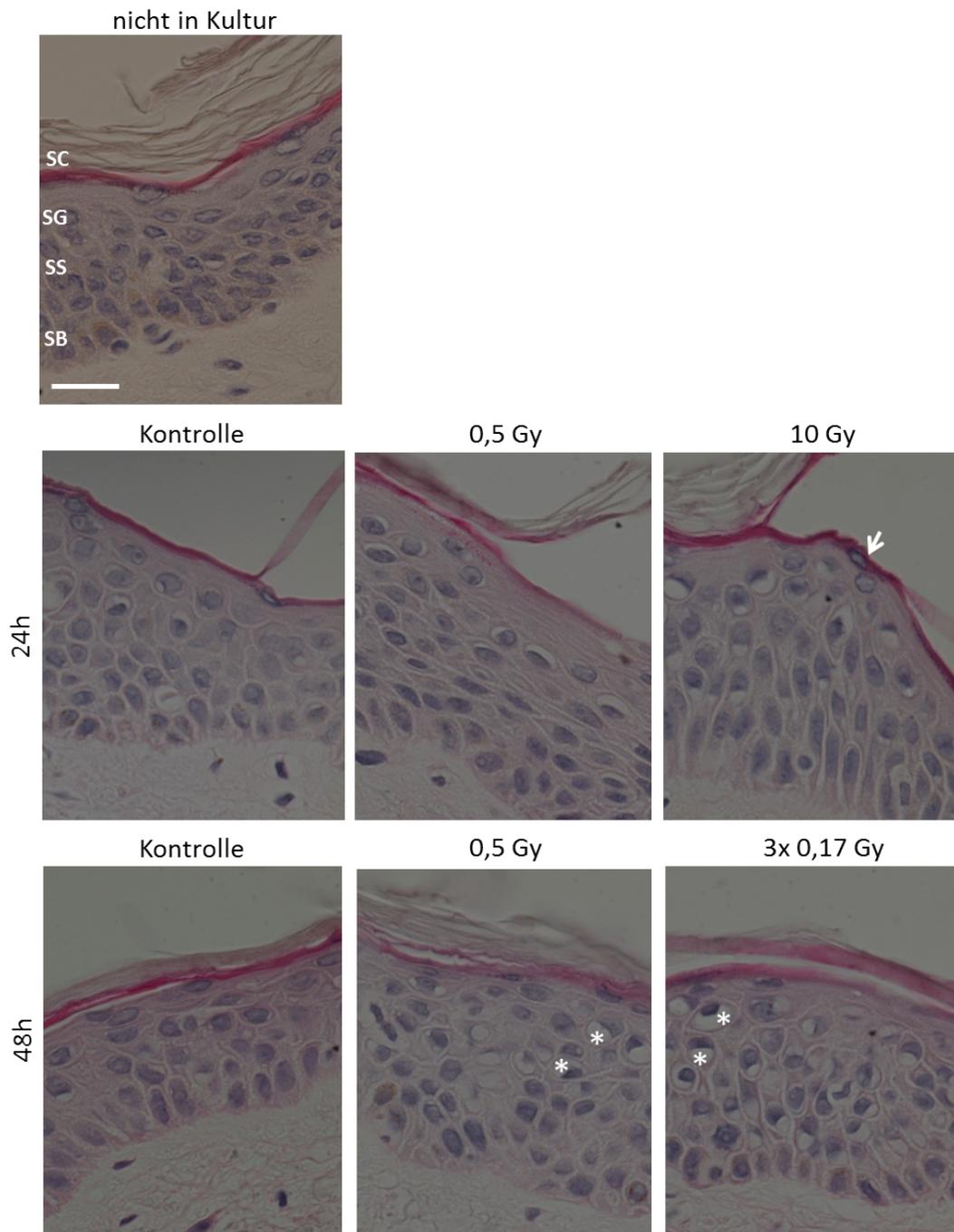


Abbildung 3.42: Hematoxylin-Eosin-Färbung humaner Hautexplantate nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung 12 h und 24 h nach der Bestrahlung; Pfeile markieren Parakeratose, Sterne markieren Vakuolisierung N=1 und n=2; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

Mit humaner Haut wurden im Rahmen dieser Arbeit nur wenige Versuche mit der, in vorangegangenen Versuchen immer als Referenzstrahlung genutzten, UV-B-Bestrahlung durchgeführt, da die Proben nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung standen. Trotzdem wurden zu Vergleichszwecken einige Versuche durchgeführt, da es für diese Strahlenart am ehesten Vergleichsmöglichkeiten mit publizierten Daten gibt.

Nach UV-B-Bestrahlung konnte im Vergleich zur Kontrolle ein deutlich erhöhtes Auftreten von Vakuolisierung beobachtet werden (Abbildung 3.43). Dieser Effekt zeigt sich bereits bei einer Intensität von 15 mJ/cm^2 und wird bei 100 mJ/cm^2 noch deutlicher. In den Kontrollen tritt Vakuolisierung nur in vereinzelt Zellen auf. Nach der Bestrahlung mit UV-B kann keine Parakeratose beobachtet werden.

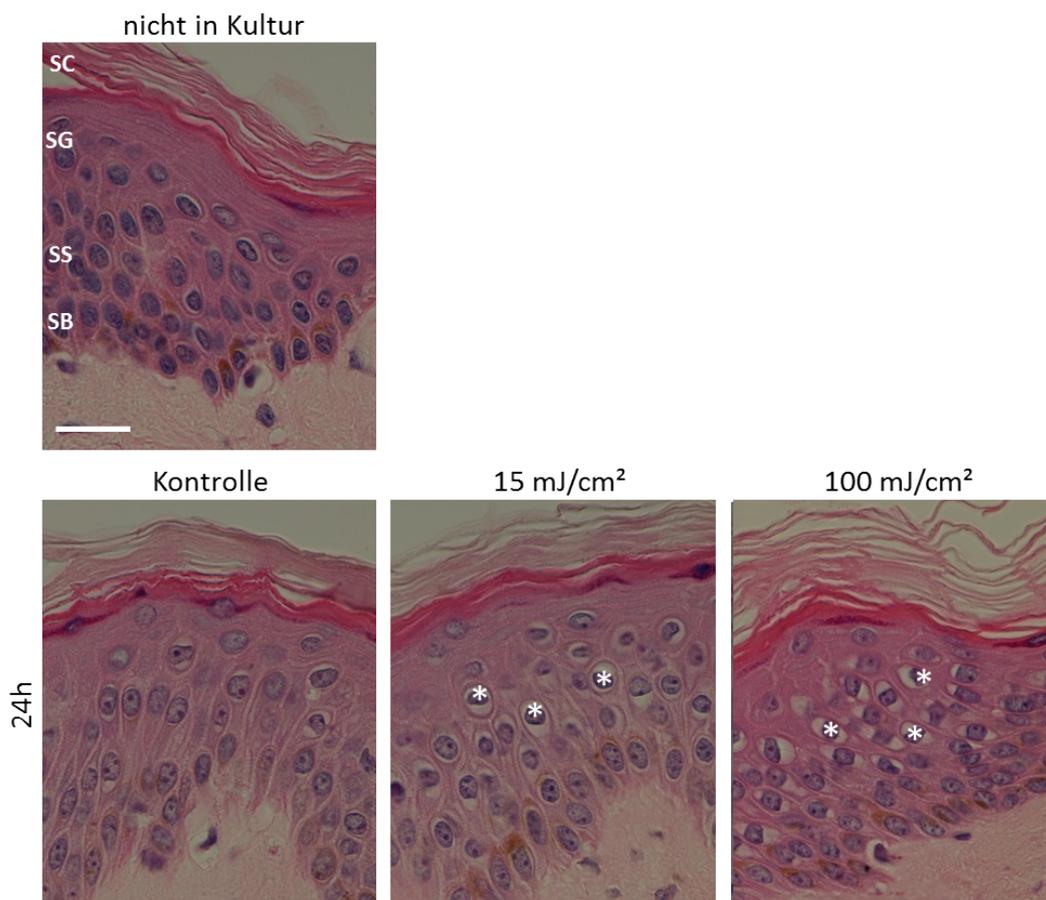


Abbildung 3.43: Hematoxylin-Eosin-Färbung humaner Hautexplantate 24 h nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlung; Sterne markieren Vakuolisierung N=2 und n=4; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= $50 \mu\text{m}$

Um die Anzahl der proliferierenden Zellen in den human Hautexplantaten zu bestimmen, wurde eine Antikörperfärbung gegen Ki67 durchgeführt. Diese wurde sowohl mikroskopisch als auch quantitativ ausgewertet. Da die Auswertung der Proliferationsrate der Hautäquivalente bereits Hinweise darauf gab, dass es insbesondere nach der Röntgenbestrahlung mit 0,5 Gy zu einer Erhöhung der Proliferation kommt, wurde auch hier der Schwerpunkt auf die Auswertung der mit 0,5 Gy bestrahlten Proben gelegt. Die mikroskopische Betrachtung der Ki67-Färbung ergibt, dass sich in allen Proben auch nach Bestrahlung proliferierende Zellen befinden (Abbildung 3.44). Ob sich jedoch die Anzahl nach der Bestrahlung ändert, kann nur durch eine Quantifizierung festgestellt werden (Abbildung 3.45). Hier wird deutlich, dass sich im Vergleich zu den Kontrollen die Proliferationsrate der mit 0,5 Gy bestrahlten Proben sowohl 24 h als auch 48 h nach Bestrahlung um das ca. 2,5-fache erhöht. Die relativ großen Standardfehler zeigen, dass die Proben der humanen Haut sowohl von Experiment zu Experiment als auch innerhalb eines Experimentes relativ stark schwanken. Trotzdem kann man die Erhöhung der Proliferation nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy als Trend betrachten, der durch die Auswertung weiterer Versuche bestätigt werden muss. Die Proliferationsrate nach der Bestrahlung mit 10 Gy oder 3x 0,17 Gy bleibt fast unverändert.

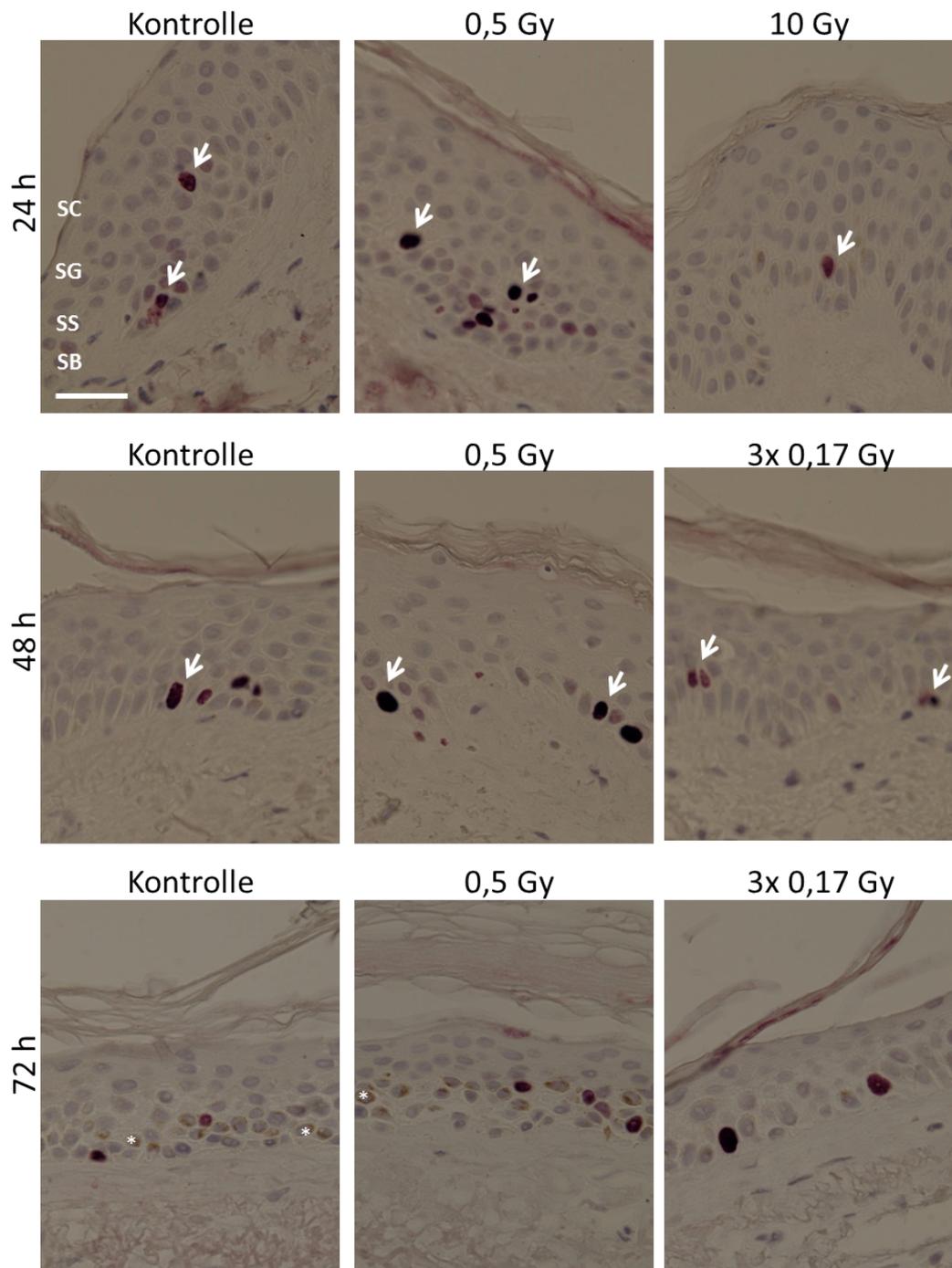


Abbildung 3.44: Proliferierende Basalzellen (pink) humaner Hautexplantate 24 h und 48 h nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen; Antikörperfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki67; Pfeile markieren beispielhaft Ki67-positive Zellen, Sterne markieren die natürlicherweise braunen Melanosomen; N=2 und n=4; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 μ m

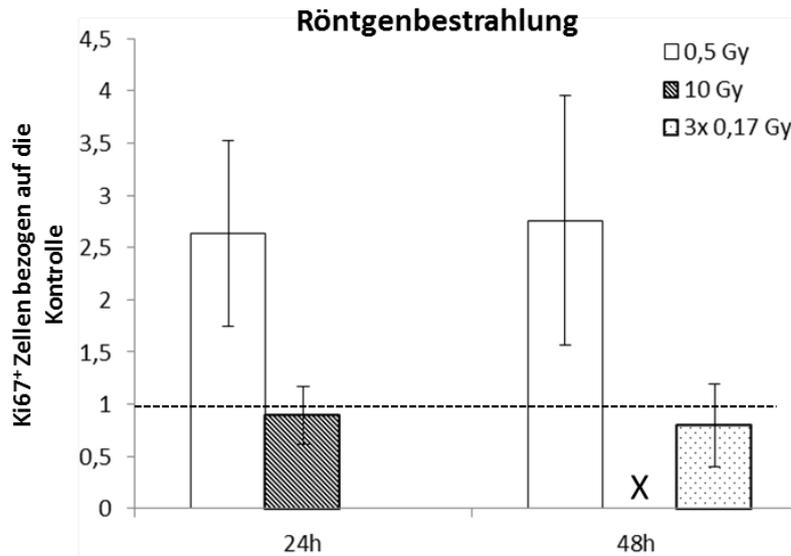


Abbildung 3.45: Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen in humanen Hautexplantaten 24h und 48h nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen; dargestellt ist die Veränderung der Anzahl der proliferierenden Zellen bezogen auf die Kontrolle; N=2 und n=4

Der wichtigste Unterschied der humanen Hautexplantate verglichen mit den Hautäquivalenten ist das Vorhandensein der Langerhanszellen in der Epidermis. Aus diesem Grund ist es besonders interessant, wie diese Zellen sich nach der Bestrahlung in den Hautexplantaten verhalten. Wie bereits in Abbildung 3.39 gezeigt, wandern die Langerhanszellen während der normalen Kultivierung nicht aus dem Gewebe aus.

Es wurde auch überprüft, ob dies durch die Bestrahlung mit Röntgen- oder UV-B-Strahlung induziert werden kann. Die mikroskopischen Aufnahmen der Antikörperfärbung von CD1a zeigen, dass auch nach der Bestrahlung noch Langerhanszellen im Gewebe vorhanden sind (Abbildung 3.46). Um eine quantitative Aussage über die Anzahl der Langerhanszellen treffen zu können, wurde pro Sichtfeld die Gesamtzellzahl der Epidermis bestimmt und darauf die Anzahl der Langerhanszellen bezogen. Dieser Wert wurde in Relation zur nicht kultivierten Probe gesetzt.

Die Ergebnisse (Abbildung 3.47) zeigen deutlich, dass die Anzahl der Langerhanszellen auch zwischen den Proben des gleichen Experimentes sehr stark schwankt und es dadurch zu großen Abweichungen zwischen Proben mit gleicher Dosis kommt. Da die Auswertung sehr zeitaufwendig ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ein Versuch mit jeweils 2 Proben pro Dosis bzw. Intensität ausgewertet werden. Die hohen Abweichungen zwischen diesen beiden Proben legen nahe, dass diese Auswertungsmethode eher ungeeignet ist. In den ausgewerteten Proben ist dennoch ein Trend zu einer Abnahme der Anzahl der Langerhanszellen nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung zu erkennen. Um diesen Trend zu bestätigen, müssten deutlich mehr Versuche ausgewertet werden, als momentan verfügbar sind.

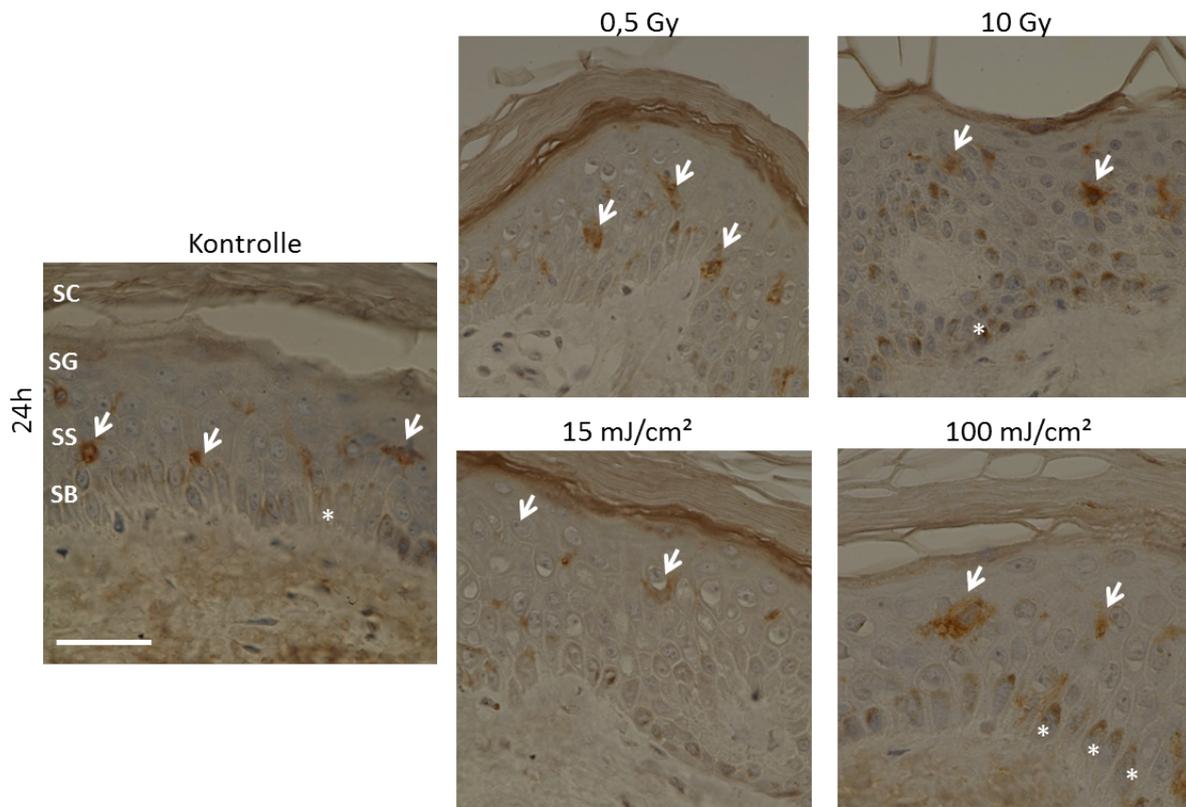


Abbildung 3.46: Antikörperfärbung humaner Hautexplantate 24 h nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung mit einem Antikörper gegen CD1a (braun), einem Marker für Langerhanszellen; Pfeile markieren beispielhaft CD1a-positive Zellen; Sterne markieren die natürlicherweise braunen Melanosomen N=2 und n=4; SC= *stratum corneum*, SG= *stratum granulosum*, SS= *stratum spinosum*, SB= *stratum basale*; Balken= 50 µm

Da die Zeit nach der Bestrahlung mit 24 h relativ kurz gewählt ist und möglicherweise die Langerhanszellen noch nicht aus dem Gewebe ausgewandert sind, sondern nur innerhalb des Gewebes wandern, wurde eine andere Auswertungsmethode, die diese Wanderung erfasst exemplarisch an den Proben eines Versuches durchgeführt. Hierbei wurde die Position der einzelnen Langerhanszellen in einem Hautexplantat bestimmt, indem die Strecke von der Langerhanszelle zur Basalschicht gemessen und in das Verhältnis zu der Dicke der Epidermis von der Basalschicht bis zum *stratum corneum* gesetzt wurde. Hierbei ergibt sich ein relativer Wert, der angibt wo sich die Langerhanszelle in der Epidermis befindet. Je weiter sich der Wert der eins annähert umso näher befindet sich die Langerhanszelle am *stratum corneum*. Auf diese Art wurde die Position von mindestens 20 Langerhanszellen pro Probe bestimmt (Abbildung 3.48). Diese Auswertung zeigt jedoch ebenfalls keinen eindeutigen Effekt. Auch hier müssten deutlich mehr Proben ausgewertet werden um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können.

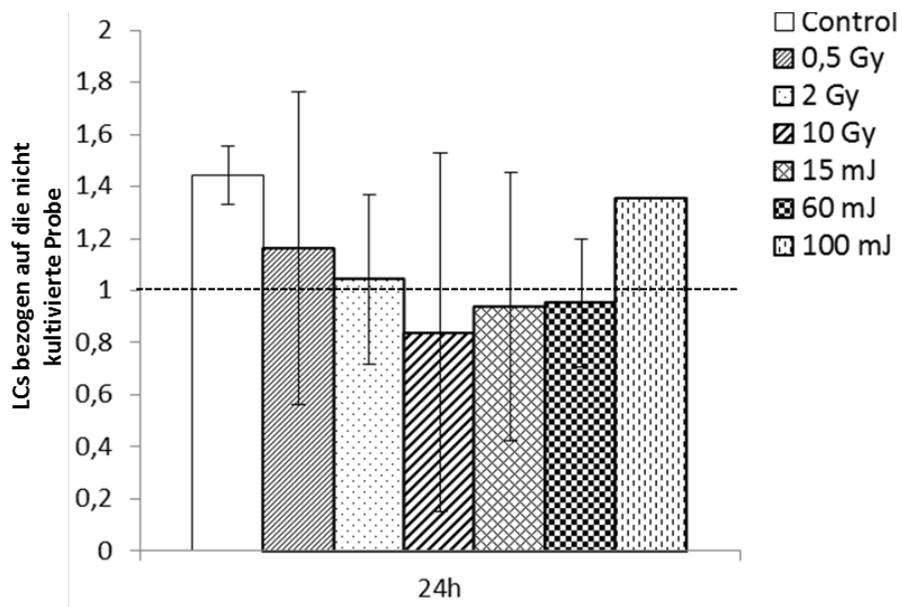


Abbildung 3.47: Quantifizierung der Antikörperfärbung von CD1a in humanen Hautexplantate 24 h nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlen; dargestellt ist die Veränderung der Anzahl der Langerhanszellen pro 100 Epidermiszellen bezogen auf die Kontrolle; N=1 und n=2, SEM

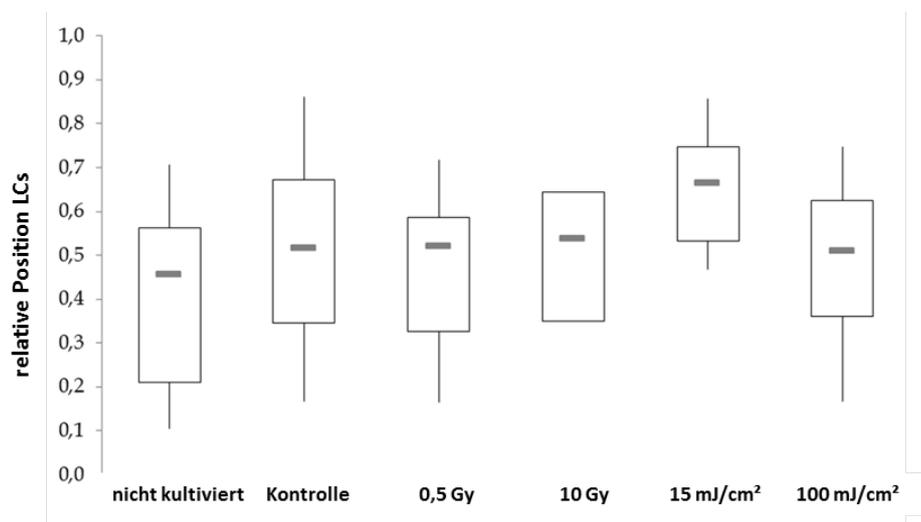


Abbildung 3.48: Relative Position von CD1a-positiven Langerhanszellen in Explantaten humaner Haut nach der Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Bestrahlung; dargestellt ist der Median der Position von mindestens 20 LCs pro Dosis; N=1 und n=2

Für einige ausgewählte Proben wurde die Freisetzung der Zytokine IL-1alpha, IL-6 und IL-8 gemessen. Diese Zytokine wurden ausgewählt, da sich bei der Analyse der Hautäquivalente Veränderungen zeigten. In Abbildung 3.49 ist die Zytokinfreisetzung der humanen Haut nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy und 3x 0,17 Gy Röntgenstrahlung gezeigt. Während die Freisetzung von IL-1alpha und IL-8 unverändert bleibt, kommt es nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy zu einer signifikanten Verringerung der IL-6 Freisetzung, die bei einer Fraktionierung dieser Dosis nicht auftritt.

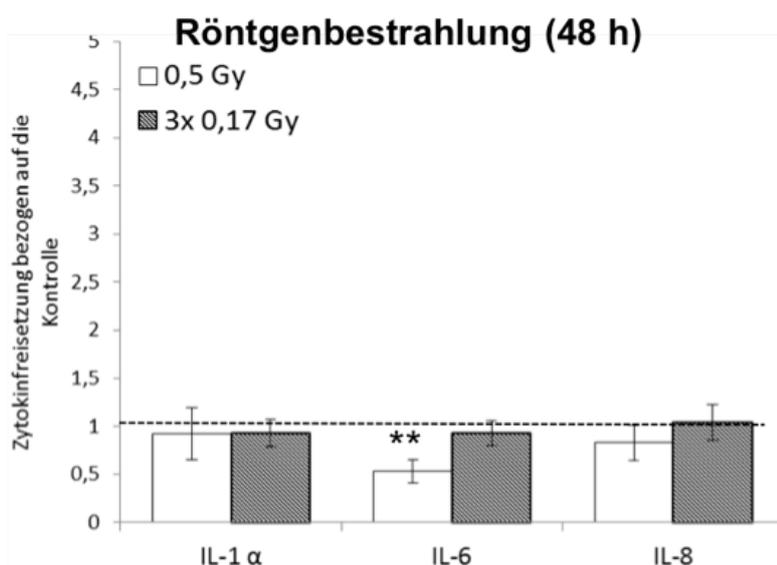


Abbildung 3.49: Freisetzung der Zytokine IL-1alpha, IL-6 und IL-8 von humanen Hautexplantaten nach der Bestrahlung mit niedrigen und fraktionierten Röntgendosen; dargestellt ist die Veränderung der Zytokinfreisetzung bezogen auf die Kontrolle; N=2 und n=4, SEM, $p \leq 0,05=*$, $p \leq 0,01=**$, $p \leq 0,001=***$

Insgesamt ist zu beachten, dass für die Versuche mit humaner Haut sehr viele Methoden, insbesondere die Kultivierung etabliert werden konnten. Aus diesem Grund sind im Rahmen dieser Arbeit nur erste Ergebnisse und Auswertungen gezeigt. Allerdings sind für die meisten Experimente mit humaner Haut weitere Versuche bzw. die Auswertung weiterer Versuche notwendig um statistisch haltbare Aussagen treffen zu können.

3.5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Ergebnisse, die in den verschiedenen Modellsystemen nach der Bestrahlung mit drei unterschiedlichen Strahlenqualitäten gezeigt werden konnten, nochmal kurz zusammengefasst werden:

- **Apoptose** konnte in Mono- und Co-Kulturen lediglich nach der Bestrahlung mit höheren Intensitäten (40 mJ/cm^2) UV-B-Strahlung detektiert werden, während nach ionisierender Strahlung für Dosen bis 10 Gy Röntgenstrahlung oder 2 Gy Kohlenstoffionen keine Apoptose detektiert werden konnte. In Hautäquivalenten und humaner Haut konnte für ionisierende Strahlung ebenfalls keine Apoptose nachgewiesen werden. Nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen oder UV-B konnten jedoch wenige pyknotische Kerne in der Epidermis beobachtet werden.
- **Nekrose** kommt in allen Kultursystemen unabhängig von der Bestrahlungsart und deren Dosis oder Intensität nur in sehr geringen, vernachlässigbaren Anteilen vor. Gernerell war zu beobachten, dass der Anteil an nekrotischen Zellen, der anhand der HMGB1-Freisetzung gemessen wurde, abnahm, je komplexer das Kultursystem wurde. Im Medium von Hautäquivalenten und humaner Haut konnte kein HMGB1 nachgewiesen werden.
- **Strukturelle Veränderungen in Hautäquivalenten** treten nach allen Bestrahlungsarten auf. Je nach Dosis und Bestrahlungsart sind sie unterschiedlich in ihrer Art und Ausprägung. Nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung kommt es zu einer stark ausgeprägten Veränderung der Basalzellstruktur, die für höhere Röntgen- und Kohlenstoffdosen ebenfalls zu beobachten, jedoch schwächer ausgeprägt ist. Nach UV-B-Bestrahlung liegt für die Erhöhung des Auftretens dieses Merkmals lediglich ein Trend vor. Die Verdickung des *stratum corneum* liegt für hohe Röntgen- und Kohlenstoffdosen vor, während Parakeratose ebenfalls nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und hohen UV-B-Intensitäten und in geringerem Ausmaß nach Röntgenstrahlung vorkommt. In den bisher durchgeführten und untersuchten Experimenten mit humaner Haut konnten Hinweise auf ähnliche Effekte, beispielsweise bezüglich der Parakeratose gefunden werden. Diese Versuche sind jedoch noch nicht quantitativ ausgewertet. Hinweise auf eine nach 0,5 Gy Röntgenstrahlung erhöhte Proliferation gibt es sowohl für Hautäquivalente als auch für humane Haut. Ausserdem kommt es insbesondere nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung zu einer veränderten E-Cadherin-Expression in Hautäquivalenten. Insbesondere die veränderte Struktur der Basalzellen, der Anstieg der Proliferation und die veränderte E-Cadherin-Lokalisation scheinen Effekte zu sein, die insbesondere bzw. verstärkt nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung vorkommen.
- Die **Zytokinfreisetzung** ist nach allen Bestrahlungsarten verändert, die Ausprägung und der Zeitpunkt der Veränderung ist jedoch von der Strahlenqualität abhängig. Die IL-6-

und IL-8- Freisetzung war nach der Bestrahlung mit allen Strahlenqualitäten erhöht. Nach der Bestrahlung der Keratinozyten-Monokultur konnte eine IL-8-Freisetzung durch UV-B und eine IL-6-Freisetzung durch UV-B und Röntgenbestrahlung induziert werden, während diese in den Kontrollen nicht vorhanden war. In den Co-Kulturen und Hautäquivalenten war die IL-6- und IL-8-Freisetzung für höhere Dosen und Intensitäten ebenfalls erhöht. Eine erhöhte IL-1alpha-Freisetzung konnte insbesondere in den Hautäquivalenten nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und in Co-Kulturen sowohl nach der Röntgen-, als auch der UV-B-Bestrahlung detektiert werden. Insgesamt fällt auf, dass es nach der UV-B-Bestrahlung von Hautäquivalenten eher zu einer transienten Veränderung der Zytokinfreisetzung kommt, die sich nach 48 h bereits relativiert hat, während nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung der Effekt über 24 h hinaus bestehen bleibt und für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen sogar erst ab 48 h auftritt. Ausserdem kann man festhalten, dass auch hier alle Effekte weniger deutlich ausfallen, je höher die Komplexität des Modellsystems wird.

Insgesamt sind alle beobachteten Veränderungen der Zytokinfreisetzung eher ein Hinweis auf einen, zumindest transienten, pro-inflammatorischen Effekt, da mehrere pro-inflammatorische Zytokine erhöht sind. Ein spezifischer Niedrigdosis-Effekt, die Zytokinfreisetzung betreffend, konnte nach der Bestrahlung von Hautäquivalenten mit niedrigen Röntgendosen nicht festgestellt werden. Für die humane Haut liegen diesbezüglich bis jetzt nur Daten für die fraktionierte oder einmalige Bestrahlung mit 0,5 Gy vor. Hier konnte bis jetzt ein leichter Rückgang der IL-6-Expression gezeigt werden, während die IL-1alpha- und IL-8-Freisetzung unverändert bleibt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass es bei humaner Haut nach Niedrigdosis-Bestrahlung zu einem im Vergleich zum Hautäquivalent eher anti-inflammatorischen Effekt kommen könnte.

4 Diskussion

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und dient hauptsächlich zum Schutz vor äusseren Einflüssen. Bei jeder Strahlenexposition, durch das Sonnenlicht oder zu therapeutischen Zwecken, wird die Haut mit bestrahlt. Dies kann einerseits bei hohen Dosen, wie sie beispielsweise in der Tumorthherapie eingesetzt werden, ein Problem sein, da es zu unerwünschten Nebeneffekten, wie beispielsweise Ekzemen [52], kommen kann. Andererseits wird die Bestrahlung mit niedrigen Dosen ionisierender Strahlung bereits seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen des Bewegungsapparates und der Haut eingesetzt. Eine Therapiemöglichkeit ist hier zum Beispiel die Bestrahlung mit sehr niedrigen Dosen Alphastrahlung in Radonheilstollen oder Radonbädern. Obwohl diese Therapien routinemäßig genutzt werden, sind die molekularen Mechanismen der Wirkung jedoch nur wenig oder gar nicht aufgeklärt [26] .

Ziel dieser Arbeit war es, entzündungsrelevante Effekte von Bestrahlung mit ionisierender Strahlung, insbesondere mit Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung, auf zellulärer und molekularer Ebene genauer zu untersuchen und mögliche Hinweise auf die Ursachen eines hautspezifischen, anti-inflammatorischen Effektes nach Niedrigdosisbestrahlung zu erhalten. Hierfür wurden verschiedene Kultursysteme verwendet und im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Ziel hierbei war es, die Komplexität der verwendeten Systeme schrittweise zu erhöhen und somit die *in vivo*-Situation immer besser abzubilden. Durch eine Kooperation mit der Hautklinik Darmstadt und die Bewilligung eines Ethikantrags war es möglich im letzten Teil dieser Arbeit als komplexestes System die *in vitro*-Kultivierung humaner Haut und deren Bestrahlung zu etablieren und erste Experimente durchzuführen.

Die hier durchgeführten Experimente, die drei unterschiedliche Strahlenqualitäten einschließen und deren zellulären und molekularen Auswirkungen auf vier verschiedene Modellsysteme unterschiedlicher Komplexität untersuchen, geben erstmalig die Möglichkeit eines Vergleichs der Effekte die durch verschiedene Strahlenqualitäten in der Haut ausgelöst werden. Ausserdem erlauben diese Versuche durch die Verwendung verschiedener Modellsysteme mit unterschiedlicher Komplexität eine Aussage zu den beteiligten Faktoren.

Die Ergebnisse, die in diesen verschiedenen Kultursystemen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung sowohl auf zellulärer als auch molekularer Ebene erzielt werden konnten werden im folgenden Kapitel hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit diskutiert.

4.1 Etablierung einer Co-Kultur aus Keratinozyten und Fibroblasten

Sehr viele Daten, die in der Literatur zu finden sind, wurden in Monokulturen von Keratinozyten oder Fibroblasten erhoben, werden aber häufig so interpretiert, als würden sie für humane Haut gelten. Dabei wird oftmals vernachlässigt, dass es ein sehr großer Unterschied ist, ob man Untersuchungen an einer Monokultur von beispielsweise Keratinozyten oder an einer Co-Kultur, in der diese Zellen mit Fibroblasten kommunizieren können, oder gar in einem System macht, in dem die Zellen in ihrer natürlichen dreidimensionalen Umgebung wachsen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass das Verhalten der Zellen und insbesondere ihre Antwort auf externe Reize in den verschiedenen Systemen sehr unterschiedlich und verschieden stark ausgeprägt sein kann.

4.1.1 Eine Co-Kultur von Keratinozyten und Fibroblasten ermöglicht die Kommunikation der beiden Zelltypen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Co-Kultursystem entwickelt, welches die Kommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten während der Kultivierung ermöglicht. Hierbei werden die beiden Zelltypen jeweils als Monokultur auf dem Boden einer Zellkulturplatte bzw. in einem Zellkulturinsert kultiviert. In den Versuchen, die im Rahmen einer Bachelorarbeit [43] durchgeführt wurden, wurde ein Medium gefunden, welches die Kultivierung beider Zelltypen ermöglicht. Durch die Verwendung eines Inserts kann eine Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen über die Freisetzung von Zytokinen und anderen Faktoren in das Medium stattfinden. Um dies zu überprüfen wurde im Medium die Freisetzung der Zytokine IL-1alpha und TGF-beta gemessen (Abbildung 3.10). Für die Freisetzung dieser beiden Zytokine ist eine Regulierung durch den jeweils anderen Zelltyp unabhängig von Bestrahlung in der Literatur bereits beschrieben [15], [53], [54], [55]. In den hier gezeigten Ergebnissen werden in Monokulturen von Fibroblasten ca. 15 pg TGF-beta pro 10.000 Zellen freigesetzt, während von der gleichen Anzahl Keratinozyten nur ca. 2 pg freigesetzt werden. Berücksichtigt man, dass in den Co-Kulturen etwa die dreifache Anzahl an Fibroblasten verglichen zu Keratinozyten vorhanden ist, müsste man rechnerisch für die Co-Kultur eine Freisetzung von ca. 12 pg pro 10.000 Zellen erwarten, wenn man davon ausgeht, dass die beiden Zelltypen sich nicht gegenseitig beeinflussen. Die gemessene Freisetzung liegt jedoch nur bei ca. 3 pg pro 10.000 Zellen. Dies zeigt, dass die TGF-beta Freisetzung der Fibroblasten durch die Anwesenheit von Keratinozyten deutlich verringert wird. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von [15], die ebenfalls gezeigt haben, dass die TGF-beta-Freisetzung in Co-Kulturen hauptsächlich von Fibroblasten ausgeht und durch die Anwesenheit von Keratinozyten deutlich herabgesetzt wird. Die Autoren vermuten, dass von den Keratinozyten ein Botenstoff freigesetzt wird, der eine Aktivierung von NFkappaB und dadurch eine Blockierung von TGF-beta auslöst.

Die Freisetzung von IL-1alpha ist wiederum von der TGF-beta-Freisetzung abhängig [54], [55]. In Monokulturen von primären Keratinozyten oder Fibroblasten werden ca. 0,5 bis 1 pg IL-1alpha pro 10.000 Zellen freigesetzt. In den Co-Kulturen liegt die Freisetzung deutlich niedriger, und zwar bei ca. 0,1 pg. Da bekannt ist, dass TGF-beta die IL-1alpha-Freisetzung negativ reguliert [54], [55] und Fibroblasten in Co-Kulturen TGF-beta freisetzen, kann man davon ausgehen, dass TGF-beta für die Verringerung der IL-1alpha-Freisetzung verantwortlich ist. In Kombination zeigen diese Ergebnisse, dass die Kommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten über die Freisetzung von Zytokinen in das Medium der Co-Kultur stattfindet und mit Hilfe von ELISA-Messungen nachweisbar ist.

4.2 Etablierung der Kultivierung humaner Haut

Alle Modellsysteme, die aus Keratinozyten und Fibroblasten in Co-Kulturen oder auch Hautäquivalenten bestehen, sind zwar eine Annäherung an die Situation in humaner Haut, spiegeln diese jedoch nie komplett wieder. Ein wesentlicher Bestandteil, der in diesen Modellsystemen fehlt, sind die Immunzellen der Epidermis, die Langerhanszellen. Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 erörtert, wurde in verschiedenen Arbeiten versucht, Langerhanszellen in Hautäquivalente zu integrieren, was jedoch nur bedingt gelang [18], [19], [20], [21], [22]. Aus diesem Grund wurde hier ein Modellsystem etabliert, bei dem humane Haut *in vitro* kultiviert wird. Diese enthält die in der Epidermis residierenden Langerhanszellen und bildet damit die *in vivo*-Situation so gut wie möglich nach. Trotzdem ist zu berücksichtigen, dass auch in diesem Modellsystem wichtige Faktoren, wie beispielsweise das vaskuläre System oder Immunzellen, die normalerweise durch bestimmte Signale angelockt werden, nicht mehr funktionell sind bzw. fehlen.

4.2.1 Die Kultivierung humaner Haut ist *ex vivo* für bis zu 4 Tage möglich

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die *in vitro* Kultivierung von humaner Haut für bis zu 4 Tage etabliert werden. Aufgrund der Erfahrungen mit der Co-Kultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten, der Kultivierung der Hautäquivalente, als auch durch Literaturrecherche, konnte mit RPMI und dem Zusatz von 10 % FCS und Antibiotika ein geeignetes Kulturmedium für humane Haut gefunden werden. Die Proben jedes Experiments wurden mit einer nicht kultivierten Probe des gleichen Spenders verglichen (Abbildung 3.36) um tiefgreifende Kultureffekte auszuschließen, aber auch um den Zustand der Hautproben nach dem Transport zu überprüfen. Alle Hautproben in Kultur wurden zuerst für ca. 16 h äquilibriert bevor sie bestrahlt wurden. Dies heisst, dass dem angegebenen Zeitpunkt nach Bestrahlung bereits eine Kultivierungsdauer von 16 h voraus geht. Der Vergleich der Zeitpunkte 12 h, 24 h und 48 h nach einer möglichen Bestrahlung zeigt, dass die Kontrollen ihre Morphologie kaum verändern, die dreidimensionale

Struktur des Gewebes sehr gut erhalten bleibt und kaum Unterschiede zu der nicht kultivierten, sofort nach Entnahme fixierten Probe zu erkennen sind.

Die Basalschicht besteht aus einer palisadenartig angeordneten Zellschicht. Zwischen den Basalzellen befinden sich Melanozyten, welche an ihrer braunen Erscheinung zu erkennen sind. Eine Immunfärbung des Apoptosemarkers aktivierte Caspase 3 (Abbildung 3.37) bestätigte das Ergebnis der Hematoxylin-Eosin-Färbung, dass in den Hautexplantaten keine apoptotische Zellen vorliegen. Ein weiterer Hinweis auf die Viabilität der Hautexplantate ist die Proliferationsfähigkeit. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Explantate bis zu 48 h nach der möglichen Bestrahlung immer noch eine gute Proliferationsfähigkeit aufweisen (Abbildung 3.38). Nach 24 h ist diese sogar vergleichbar mit der der nicht kultivierten Proben, nimmt jedoch nach 72 h merklich ab.

Diese Eigenschaften des Modellsystems zeigen, dass es sich für eine Beobachtung von Bestrahlungseffekten im Rahmen von bis zu 48 h nach einer Bestrahlung sehr gut eignet. Daten aus der Literatur [48] [49] [50] bestätigen die hier beobachteten Eigenschaften der Hautexplantate in Kultur. Dort werden ebenfalls Hautproben von z.B. ästhetischen Eingriffen verwendet, für bis zu 72 h nach einer vorangegangenen über-Nacht-Inkubation kultiviert und als Modellsystem für verschiedene Tests wie z.B. Toxizitätstests verwendet. Morphologisch entsprechen diese Explantate den hier gezeigten sehr gut. Es wird ebenfalls über eine kulturbedingte Abnahme der Proliferationsfähigkeit nach 3 Tagen berichtet, die jedoch keine Auswirkungen auf die Viabilität der Explantate zu früheren Zeitpunkten hat [48]. Ein Vorteil des hier verwendeten Kultursystems ist ausserdem der Einsatz von RPMI-Medium, welches kein Hydrocortison enthält. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung von anti-inflammatorischen Effekten wie z.B. nach Niedrigdosisbestrahlung sehr wichtig, da gezeigt wurde, dass niedrige Dosen Hydrocortison ebenfalls anti-inflammatorische Effekte hervorrufen können [56]. Dies würde einen möglichen Effekt der Bestrahlung verfälschen.

4.2.2 Langerhanszellen bleiben während der Kultivierungsdauer erhalten

Wie bereits erwähnt sind die in der Epidermis residierenden Langerhanszellen eine wichtige Komponente für die Reaktion von humaner Haut auf verschiedene äussere Einflüsse. Diese Zellen sind sehr mobil und können aktiv migrieren, um ihrer Hauptaufgabe, der Vermittlung der primären Immunantwort, gerecht zu werden. Durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel pro-inflammatorische Zytokine, wird *in vivo* die Migration von Langerhanszellen zu den Lymphgefässen und von dort zu den Lymphknoten aktiviert [7]. Hierfür wird die E-Cadherin-Expression, die die Adhäsion zwischen LCs und Keratinozyten vermittelt, inhibiert [57] und die Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen aktiviert. Dies ermöglicht die Passage durch die Basalmembran und die Wanderung durch die Dermis bis zu einem Lymphgefäß. Während reife dendritische Zellen Antigene zu den Lymphknoten transportieren können, transportieren unreife

fe dendritische Zellen sogenannte *self antigens* wie zum Beispiel Melanosomen um die Toleranz des Immunsystems gegen körpereigene Zellen aufrecht zu erhalten [7].

Die Migration von Langerhanszellen kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet werden [7]. Laut diesen Quellen durchlaufen die Langerhanszellen einen verfrühten Reifungsprozess, der zur Folge hat, dass sie aktiv aus den Hautexplantaten auswandern [58]. Dieser Prozess beginnt bereits 4 h nach Beginn der Kultivierung und wird nach 24 h anhand der Anzahl der LCs in der Epidermis deutlich. Die Migration der Langerhanszellen wird unter anderem durch IL-1beta als auch durch TNF-alpha reguliert. Eine Neutralisierung dieser beiden Zytokine durch die Zugabe von Antikörpern zu dem Medium führt zu einer deutlich verringerten Migration von dendritischen Zellen aus dem Explantat [51].

In dem hier verwendeten Modellsystem wurde untersucht, ob die Langerhanszellen, wie erwartet, nach einer Kultivierung von ca. 24 h bereits aus dem Explantat ausgewandert sind. Zu den Zeitpunkten 1 h, 12 h und 24 h nach einer möglichen Bestrahlung zeigte sich jedoch in den Hautexplantaten, dass die Anzahl der Langerhanszellen im Vergleich zu der nicht kultivierten Probe fast unverändert bleibt (Abbildung 3.39). Eine Quantifizierung wurde nur für den 24 h-Zeitpunkt durchgeführt, bestätigt aber dieses Ergebnis (Abbildung 3.47). In dem Fall der hier ausgewerteten Probe liegt die Anzahl der Langerhanszellen sogar leicht über der Anzahl in den nicht kultivierten Proben. Dies gibt ein Hinweis darauf, dass die Anzahl der LCs innerhalb einer einzigen Hautprobe bereits stark schwanken können. Da jedoch zu allen beobachteten Zeitpunkten keine massive Abnahme der Anzahl der LCs zu beobachten ist, liegt nahe, dass es in dem hier verwendeten Kultursystem im beobachteten Zeitpunkt nicht, oder nur bei sehr wenigen Langerhanszellen zu einer Migration bzw. einer Auswanderung aus dem Hautexplantat kommt. Dies kann auch ein Hinweis darauf sein, dass in dem Kultursystem sehr wenig TNF-alpha und IL-1beta vorhanden ist, da gezeigt wurde, dass es ohne diese beiden Zytokine zu einer verminderten Migration der Langerhanszellen kommt [51].

Die Anwesenheit der Langerhanszellen über einen längeren Kulturzeitraum zeigt jedoch auch, dass das Modellsystem die *in vivo* Bedingungen gut nachstellt. Die im Explantat vorhandenen Langerhanszellen geben keine Hinweise darauf, dass es sich um apoptotische Zellen handelt. Sie weisen keinen kondensierten Kern auf und sind nicht positiv für aktivierte Caspase 3. Ausserdem zeigen sie sehr deutlich die, für diesen Zelltyp typischen langen Fortsätze, die, ebenso wie die ganze Zelle, CD1a-positiv sind. Dies spricht dafür, dass die Hautexplantate über einen Zeitraum von mindestens 24 h vitale Langerhanszellen enthalten, die an einem Strahlungseffekt mitwirken können.

4.3 Zelltod nach Bestrahlung

In der Tumorthherapie werden hohe Dosen ionisierender Strahlung zur gezielten Inaktivierung eines Tumors eingesetzt. Dabei kommt es jedoch zu Hautreaktionen als Nebeneffekt, die klinisch anhand einer Skala beurteilt werden können. Diese reicht von 1 bis 5 wobei 1 für eine leichte Erythembildung und 5 für eine feuchte Abschuppung, die das ganze Bestrahlungsfeld betrifft, steht. In einem 1997 an der GSI durchgeführten Bestrahlungsexperiment mit Schweinen [30] konnte gezeigt werden, dass die Hautreaktionen nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen sich nicht signifikant von denen nach einer äquivalenten Dosis Röntgenbestrahlung unterscheiden. Die beobachteten Hautreaktionen treten nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen nach ca. 30 Tagen und damit wenige Tage früher auf als nach Röntgenbestrahlung. Es gibt jedoch keinen Unterschied in der Stärke der auftretenden Effekte, die sich in der Auswertung mit Hilfe der beschriebenen Skala widerspiegeln würden. Dieses Ergebnis entspricht nicht den für die DNA-Schädigung bekannten Daten, die gezeigt haben, dass Kohlenstoffionen schwerwiegendere Schäden hervorrufen als Photonen, da Kohlenstoffionen geclusterte und deshalb schwerer zu reparierende DNA-Schäden hervorrufen [59]. In dieser Arbeit sollte einerseits überprüft werden, ob die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen ebenfalls einen anderen Effekt als Röntgenbestrahlung hinsichtlich Zelltod, Zytokinfreisetzung, Gewebekomöostase und -organisation haben, andererseits sollte der Frage nach einem spezifischen Niedrigdosis-Effekt sowohl für Röntgen-, als auch für Kohlenstoffbestrahlung nachgegangen werden.

Um dies zu untersuchen, wurde zuerst das Vorkommen von Zelltod in allen verwendeten Modellsystemen betrachtet. Nach Bestrahlung kann es zu Zelltod kommen. Einerseits kann nach hohen Dosen oder Intensitäten Nekrose auftreten, was ein unkontrolliertes Freisetzen von Zellbestandteilen zur Folge hat und meist zu einer Entzündung führt. Andererseits kann es zur programmierten und damit geordneten Form des Zelltodes, der Apoptose kommen, die, wenn sie in geringem Maße auftritt, anti-inflammatorische Effekte haben kann [44]. Um herauszufinden, ob Nekrose oder Apoptose in den hier verwendeten Modellsystemen zu einem pro- oder anti-inflammatorischen Effekt beitragen, wurde deren Auftreten genauer untersucht.

4.3.1 Nekrose spielt nach der Bestrahlung von Mono- und Co-Kulturen als auch von Hautäquivalenten keine Rolle

Insbesondere nach Bestrahlung mit hohen Dosen ionisierender Strahlung oder UV-B-Intensitäten können Zellen so schwer geschädigt werden, dass die Membranintegrität verloren geht, der Zellinhalt freigesetzt wird und die Zelle schließlich abstirbt. Es handelt sich hierbei um einen unkontrollierten Prozess, der meist eine Entzündungsreaktion zur Folge hat. Nekrose kann in Zell- und Gewebekulturen durch das Vorhandensein des Proteins HMGB1 im Kulturmedium nachgewiesen werden. HMGB1 ist ein Protein, welches in vitalen und intakten Zellen an der

DNA-Organisation und der Regulierung der Transkription beteiligt ist. Sobald jedoch die Membranintegrität verloren geht, wird es in das Medium freigesetzt [46].

Um das Auftreten von Nekrose in den hier verwendeten Kultursystemen zu untersuchen, wurde die HMGB1-Freisetzung in das Medium mit Hilfe eines ELISA-Tests gemessen. In Monokulturen von Keratinozyten konnten nach ionisierender Strahlung keine erhöhten HMGB1-Konzentrationen detektiert werden (Abbildung 3.5). Dies deutet darauf hin, dass Nekrose nicht in relevantem Maße induziert wird. Im Medium UV-B bestrahlter Keratinozyten ist nach einer Intensität von 40 mJ/cm^2 die HMGB1-Konzentration um das Vierfache im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. In diesen Proben konnte sowohl im Western Blot als auch in der Analyse der Zellen in der Sub-G1-Phase Apoptose detektiert werden (Abbildung 3.3 und 3.4). In Zellkultursystemen kann es aufgrund der fehlenden Makrophagen, die an der Beseitigung apoptotischer Zellen beteiligt sind zu einer sogenannten "apoptotischen Nekrose" kommen, bei der die Membranintegrität der *apoptotic bodies* verloren geht und deren Inhalt freigesetzt wird [36]. Hierbei wird ebenfalls HMGB1 freigesetzt [46]. Es könnte also sein, dass die hier beobachtete HMGB1-Freisetzung auch durch apoptotische Zellen hervorgerufen wird. Jedoch wäre dies mit 24 h ein sehr früher Zeitpunkt für das Auftreten von apoptotischer Nekrose. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Bestrahlung mit einer solchen, relativ hohen Intensität sowohl Nekrose als auch Apoptose in den bestrahlten Keratinozyten auslöst und die HMGB1-Freisetzung durch beide Prozesse induziert wird.

In einem komplexeren System, den Co-Kulturen aus Keratinozyten und Fibroblasten kommt es sowohl durch Röntgen- als auch UV-B-Bestrahlung nur zu einer leichten Erhöhung der HMGB1-Freisetzung (Abbildung 3.8). Im Medium der Hautäquivalente konnte sowohl in Kontrollen als auch nach Bestrahlung keine HMGB1-Freisetzung gemessen werden. Dies weist darauf hin, dass in den Co-Kulturen durch die Bestrahlung keine Nekrose induziert werden kann und auch in den Hautäquivalenten das Nekroselevel so niedrig ist, dass die HMGB1-Freisetzung mit Hilfe des hier verwendeten ELISA-Tests nicht erfasst werden kann. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Hautäquivalente bestätigen das Ergebnis, dass in dem Gewebe morphologisch keine Hinweise auf nekrotische Zellen zu finden sind.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass der Anteil an nekrotischen Zellen in allen Modellsystemen sehr niedrig ist und auch durch Bestrahlung kein nennenswerter Anteil an nekrotischen Zellen induziert werden kann. Lediglich nach UV-B-Bestrahlung mit einer höheren Intensität kommt es zu einer erhöhten HMGB1-Freisetzung, die auf Nekrose hinweist. Dies zeigt, dass bei den hier verwendeten Strahlungsarten, Zeitpunkten, Dosen und Intensitäten Nekrose keine bedeutende Rolle hinsichtlich strahleninduzierter Effekte spielt und demzufolge als Ursache für mögliche Entzündungsreaktionen weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

4.3.2 Monokulturen, Co-Kulturen und humane Hautäquivalente zeigen nach ionisierender Bestrahlung keine Apoptose

Im Gegensatz zu Nekrose ist Apoptose ein kontrollierter Prozess. Apoptose kann eine Entzündungsreaktion nicht nur durch das Fehlen pro-inflammatorischer Signale, wie z.B. die Freisetzung des Zellinhaltes, verhindern, sondern ihr auch durch die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine aktiv entgegen wirken [44] [45]. Insbesondere die anti-entzündlichen Effekte der Niedrigdosisbestrahlung, wie sie beispielweise bei einer Radontherapie erzielt werden können, werden in manchen Publikationen auf die Apoptose einzelner Zellen zurück geführt [25]. Es wird diskutiert, dass diese Zellen selbst bestimmte Zytokine freisetzen, wodurch die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine von benachbarten Zellen angeregt und ein großflächig wirkendes, entzündungshemmendes Milieu erzeugt wird. Dafür gibt es jedoch keine oder nur sehr wenige, aussagekräftige Daten in der Literatur. Insbesondere ob mit diesem Mechanismus der anti-inflammatorische Effekt in humaner Haut im Rahmen einer Radontherapie bei Psoriasis oder Neurodermitis erklärt werden kann ist unklar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Monokulturen aus Keratinozyten weder durch die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung noch durch die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen Apoptose induziert werden kann. Dies wurde mit Hilfe der Sub-G1-Analyse (Abbildung 3.4) und der Detektion aktivierter Caspase 3 im Westernblot (Abbildung 3.1 und 3.2) nachgewiesen. Während einzelne apoptotische Zellen im Western Blot unter Umständen nicht detektiert werden können, ist die Analyse der Zellen, die sich bei einer FACS-Messung in der Sub-G1-Phase befinden, eine sensitivere Methode. Der Anteil an Zellen, die sich nach der Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung oder 2 Gy Kohlenstoffionen in der Sub-G1-Phase befinden liegt für alle Zeitpunkte zwischen 24 h und 5 Tagen, die hier beobachtet wurden, bei deutlich unter 5 %. Diese Daten stimmen sehr gut mit der Literatur überein. Petit-Frere [60] konnte in primären Keratinozyten (NHEK) ebenfalls keine Apoptose nach Gammabestrahlung mit bis zu 20 Gy induzieren, wohingegen in der häufig verwendeten Keratinozyten-Zelllinien HaCaT und auch in einer Tumorzelllinie (HeLa) Apoptose induziert werden konnte. Die hier vorliegenden Daten ergänzen dieses Ergebnis und zeigen, dass auch durch die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen keine Apoptose in Monokulturen induziert werden kann.

Auch in den Hautäquivalenten wurde weder nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung noch mit Kohlenstoffionen Apoptose beobachtet. Um Apoptose in den Hautäquivalenten zu analysieren wurde aktive Caspase 3, die als klassischer und zuverlässiger Marker für Apoptose gilt, mit Hilfe einer Antikörperfärbung detektiert (3.13, 3.14 und 3.15).

Es gibt in der Literatur wenige Daten, die sich mit den hier gezeigten Daten direkt vergleichen lassen. Die meisten Arbeitsgruppen, die sich mit Bestrahlungseffekten in humaner Haut beschäftigen untersuchen die Effekte von UV-Strahlung, da die Haut dieser am häufigsten ausgesetzt ist. Die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung ist hauptsächlich bei der Strahlentherapie von

Tumoren von Bedeutung. In diesem Zusammenhang werden zum Beispiel in der Haut auftretende Nebeneffekte beobachtet und untersucht [61]. Hierbei handelt es sich jedoch meist um *in vivo*-Versuche, bei denen dem Patienten nach der Bestrahlung Biopsien entnommen werden. Solche Studien sind jedoch nur im Rahmen einer Therapie in einer Klinik möglich und sind aus ethischen Gründen schwierig.

In *in vivo*-Experimenten, bei denen Hautbiopsien eine und 6 Wochen nach der ersten Bestrahlung einer, in 35 Fraktionen mit jeweils 2 Gy durchgeführten, Strahlentherapie von Patienten mit einem Prostatakarzinom entnommen wurden, konnte gezeigt werden, dass Apoptose erst 6 Wochen nach der ersten Bestrahlung auftritt [61]. Dies bedeutet, dass es sich dabei um einen relativ späten Bestrahlungseffekt handelt, der in den hier verwendeten kurzen Kulturzeiträumen unter Umständen nicht beobachtet werden kann. Ausserdem bleibt selbst nach dieser Zeit das Apoptoselevel auf einem relativ geringen Niveau von maximal 1,5 Zellen pro 1 mm Epidermis, während es zu allen früheren Zeitpunkten gegenüber der Kontrolle nicht erhöht ist. Dies ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass Apoptose kein akuter Effekt nach der Bestrahlung ist. Apoptose wurde in diesen Versuchen mit dem Marker γ H2AX detektiert, der jedoch alle Formen von Strangbrüchen in der DNA die z.B. durch Differenzierung entstehen können, markiert und so den gezählten Anteil an apoptotischen Zellen wahrscheinlich höher erscheinen lässt, als er mit einem anderen Apoptosemarker wie z.B. aktive Caspase 3 hätte detektiert werden können. Die Arbeitsgruppe von Su [62] verwendet humane Hautäquivalente der Firma MatTek, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden und bestrahlt diese mit Gammastrahlung von bis zu 5 Gy. Die Proben wurden 24 h und 48 h nach der Bestrahlung mit Hilfe eines TUNEL-Assays untersucht. Hier wird jedoch deutlich, dass bereits in den Kontrollen über 5 % der Zellen TUNEL-positiv sind und sich dieser Wert nach einer Bestrahlung mit 5 Gy auf ca. 40 % erhöht. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass mit Hilfe des TUNEL-Assays freie 3'-Enden der DNA detektiert werden, die bei der DNA-Fragmentierung entstehen, allerdings kommt es in der Haut nicht nur durch Apoptose, sondern auch durch den Differenzierungsprozess der Keratinozyten zu einer Fragmentierung der DNA. In einer anderen Publikation wurde gezeigt, dass diese differenzierenden Zellen ebenfalls TUNEL-positiv sind, obwohl sie keine klassische Apoptose durchlaufen [63]. Ausserdem können auch durch die Bestrahlung freie 3'-Enden in der DNA vorliegen, die zu frühen Zeitpunkten nach der Bestrahlung dann ebenfalls mit angefärbt werden. Zudem zeigt die in dieser Publikation gezeigte Hematoxylin-Eosin-Färbung einer Kontrolle keine normale, für ein vitales Hautäquivalent typische Struktur. Eine solche Vorschädigung kann die erhöhte Apoptoserate nach der Bestrahlung ebenfalls erklären.

Am Besten vergleichbar sind die hier vorliegenden Daten zumindest für eine Dosis von 2 Gy Röntgenstrahlung mit den in [64] erwähnten, jedoch nicht gezeigten Ergebnissen. Hier wird beschrieben, dass sowohl in den nicht bestrahlten Kontrollen als auch in den mit 0,1 Gy und 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Hautäquivalenten weniger als 4 % der Zellen positiv für aktive Caspase 3 waren und deren Anzahl nach Bestrahlung nicht erhöht ist. Dieses Ergebnis wider-

spricht einerseits der im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Ergebnisse von [62], ist aber in guter Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen für das gleiche Hautäquivalent.

Andere Ansätze, die sich mit den Bestrahlungseffekten in den Hautäquivalenten EFT400 beschäftigen, testen nicht, ob in den bestrahlten Kulturen Apoptose auftritt [31], [65]. Jedoch zeigen in diesen Publikationen die Hemtoxylin-Eosin-Färbungen der verwendeten Hautmodelle ebenfalls keine Anzeichen, dass apoptotische Zellen vorliegen.

Weitere Versuche, bei denen Haut mit ionisierender Strahlung bestrahlt wurde, wurden zum Beispiel in Schweinen *in vivo* durchgeführt [63]. Nach der Bestrahlung mit 50 Gy Gammastrahlung wurde nach 3 Tagen eine 17-fache Erhöhung der Caspase 3-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Allerdings entspricht diese Erhöhung, wenn man die Anzahl der Basalzellen anhand der gezeigten Bilder in dieser Publikation auf ca. 50 schätzt, einem Anstieg um durchschnittlich 3,4 Zellen pro ausgewertetem Sichtfeld. Somit ist der Anteil an apoptotischen Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl in der Basalschicht trotz einer Dosis von 50 Gy relativ gering.

Demnach stimmen die hier vorliegenden Ergebnisse, die zeigen, dass für die verwendeten Dosen bis 10 Gy Röntgenstrahlung und bis zu 2 Gy Kohlenstoffbestrahlung und beobachteten Zeiträume von bis zu 3 Tagen keine Apoptose auftritt, mit den in der Literatur verfügbaren Daten im Wesentlichen überein. Trotzdem sind die hier gezeigten Versuche die ersten, die Apoptose nach der Bestrahlung eines Hautäquivalents mit Kohlenstoffionen untersuchen und eine direkte Vergleichbarkeit mit Röntgenstrahlung ermöglichen.

4.3.3 Monokulturen zeigen nach UV-B-Bestrahlung Anzeichen von Apoptose

Für primäre Keratinozyten wurde gezeigt, dass durch die Bestrahlung mit UV-B-Strahlung im Gegensatz zu der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung Apoptose induziert werden kann [60], [66]. Mit einer Intensität von ca. 130 mJ/cm² kann 24 h nach der Bestrahlung eine Apoptoserate von 30% erreicht werden. Dies entspricht den hier gezeigten Daten für die UV-B Bestrahlung von Keratinozyten sehr gut (Abbildung 3.3 und 3.4).

Allgemein zeigt dies, dass die hier verwendeten Keratinozyten in der Lage sind Apoptose zu durchlaufen und die dafür notwendigen Signalwege intakt sind. Für immortalisierte Keratinozyten (HaCaT) konnte gezeigt werden, dass die durch UV-B induzierte Apoptose mit 24 h nach der Bestrahlung früher auftritt als eine von Gammastrahlung induzierte Apoptose, die erst nach 48 h deutlich beobachtet werden konnte [60]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Apoptose durch verschiedene Mechanismen induziert werden muss [60].

In den hier gezeigten Experimenten konnte im Western Blot aktive Caspase 3 nach ca. 12 Stunden nachgewiesen werden, in der Sub-G1-Analyse nach 24 h und deutlicher nach 48 h. Wenn man davon ausgeht, dass ein Effekt der durch ionisierende Strahlung hervorgerufen wird später

auftritt, zeigt dies, dass die hier meist gewählten Zeitpunkte von 24 h, 48 h und 3 Tagen den Bereich, in dem ein Effekt zu erwarten ist, sehr gut abdecken.

4.3.4 Pyknotische Zellen in der Epidermis von humanen Hautäquivalenten treten nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung auf

In Hautäquivalenten können sowohl nach der Bestrahlung mit UV-B, als auch nach Kohlenstoffbestrahlung pyknotische Kerne in der Epidermis beobachtet werden. (Abbildung 3.24 und 3.25). Insbesondere nach UV-B-Bestrahlung sind sogenannte *sunburn cells* als Bestrahlungseffekt beschrieben. Diese Zellen weisen einen kondensierten Kern und ein mit Eosin kräftig pink angefärbtes Cytoplasma auf und sind hauptsächlich in der Basalschicht lokalisiert [67], können aber während des Differenzierungsprozess der Epidermis in höhere Epidermisschichten wandern. Sie werden in der Literatur als klassische, apoptotische Zellen beschrieben, in denen Caspase 3 aktiviert ist [68]. In den hier vorliegenden pyknotischen Kernen in der Epidermis konnte jedoch keine aktivierte Caspase 3 nachgewiesen werden (Abbildung 3.15 und 3.16). Es ist ausserdem auffällig, dass fast alle der beobachteten pyknotischen Zellen nicht in der Basalschicht sondern in suprabasalen Schichten und teilweise direkt unter dem *stratum corneum* liegen. In der Positivkontrolle für die Antikörperfärbung gegen aktivierte Caspase 3 wird deutlich, dass auch dort insbesondere die apoptotischen Zellen in der Basalschicht, nicht jedoch die Zellen in suprabasalen Schichten, die einen pyknotischen Kern aufweisen, angefärbt sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den in den bestrahlten Proben beobachteten Zellen zwar um sogenannte *sunburn cells* handelt, diese jedoch nicht mehr positiv für aktivierte Caspase 3 sind, da die Apoptose bereits zu weit fortgeschritten ist. Es wurden jedoch auch Hematoxylin-Eosin-Färbungen für frühere Zeitpunkte nach UV-B Bestrahlung wie zum Beispiel 12 h, 6 h und 1 h untersucht. Aber auch hier sind keine Zellen, die die morphologischen Merkmale der *sunburn cells* aufweisen in der Basalschicht zu finden. Ausserdem ist es möglich, dass die hier verwendeten UV-B-Intensitäten für das Auftreten von *sunburn cells* in den hier verwendeten Hautäquivalenten zu gering sind. Kandarova [69] kann für die der Firma MatTek nach einer kombinierten Bestrahlung mit 200 mJ/cm^2 UV-B und 30 J/cm^2 UV-A 24h nach Bestrahlung ebenfalls nur wenige *sunburn cells* mit Hilfe einer Hematoxylin-Eosin-Färbung nachweisen. In einem Sichtfeld, welches ca. 25 Basalzellen enthält, sind 4 Zellen als *sunburn cells* gekennzeichnet.

In der in dieser Arbeit verwendeten UV-B Lampe ist zwar auch ein Anteil von ca. 25-30 % UV-A enthalten, dies macht jedoch bei einer Bestrahlung mit 100 mJ/cm^2 nur einen Anteil von ca. $25\text{-}30 \text{ mJ/cm}^2$ aus. Da die *minimal erythema dose (EMD)* für UV-A mit ca. 15 J/cm^2 um das tausendfache höher liegt, kann dieser UV-A-Anteil vernachlässigt werden.

Qin [70] zeigt nach der Bestrahlung eines Epidermisäquivalents mit 100 mJ/cm^2 UV-B-Strahlung einen hohen Anteil apoptotischer Zellen. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass

in diesem Modell keine Fibroblasten vorhanden sind, die mit den Keratinozyten kommunizieren und zum Effekt nach der Bestrahlung beitragen können. Es ist in der Literatur beschrieben, dass ein System durch die Zunahme der Komplexität stabiler und somit auch resistenter gegen Bestrahlungseffekte wird [10].

Es sind in der Literatur keine weiteren Daten zu finden, die Angaben zu den Effekten von UV-B-Strahlung und insbesondere zur Lokalisation aktivierter Caspase 3 auf die hier verwendeten Hautäquivalenten machen. Alle vorliegenden Publikationen verwenden, wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, entweder eine Kombination aus UV-A und UV-B oder untersuchen andere Hautäquivalente, die nicht mit dem hier verwendeten Modell vergleichbar sind.

Die hier gezeigten Daten und bereits publizierte Studien zeigen, dass es nicht eindeutig klar ist, ob eine Bestrahlung der Hautäquivalente mit 100 mJ/cm^2 überhaupt in der Lage ist klassische *sunburn cells*, die mit apoptotischen Zellen gleichzusetzen sind, zu induzieren. Ausserdem ist nicht klar, ob die in einem Epidermisäquivalent gefundenen pyknotischen Kerne [69] tatsächlich positiv für aktive Caspase 3 sind, da dies in dieser Quelle nicht untersucht wird. Das hier gezeigte Ergebnis, dass nach Bestrahlung mit UV-B-Strahlung zwar pyknotische Kerne in der Epidermis zu finden sind, diese jedoch nicht positiv für aktive Caspase 3 sind, widerspricht deshalb nicht direkt den Daten aus der Literatur. Ob es sich bei den in den hier vorliegenden Ergebnissen gefundenen pyknotischen Zellkernen in der Epidermis nach der Bestrahlung mit UV-B tatsächlich um klassische *sunburn cells* handelt, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die Tatsache, dass die hier auftretenden pyknotischen Kerne in höheren Schichten der Epidermis liegen, nicht positiv für aktivierte Caspase 3 sind und sowohl für die Bestrahlung mit UV-B als auch für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung vorkommen, könnte dafür sprechen, dass es sich bei den beobachteten Zellen nicht um klassische, apoptotische *sunburn cells* handelt, sondern zum Beispiel um eine Vorstufe der Parakeratose. Diese Hypothese wird im Zusammenhang mit der auftretenden Parakeratose noch genauer diskutiert.

4.3.5 Trotz der Anwesenheit von Langerhanszellen in humaner Haut induziert

Bestrahlung keine Apoptose

Das Fehlen von Immunzellen in humanen Hautäquivalenten könnte ein Grund für die nicht auftretende Apoptose nach Bestrahlung sein. Es wäre möglich, dass wichtige Faktoren für die Apoptose-Induktion von Immunzellen freigesetzt werden. Die Einleitung der Apoptose nach UV-B Bestrahlung hängt zum Beispiel einerseits von der direkten DNA-Schädigung, dem oxidativen Stress und der Aktivierung von Oberflächenrezeptoren der Keratinozyten, aber auch sehr stark von der Mikroumgebung der Zellen und der dort herrschenden Balance zwischen Überlebens- und Zelltodfaktoren ab [67]. Ausserdem ist es insbesondere für hohe UV-B Intensitäten beschrieben, dass die Langerhanszellen selbst in Apoptose gehen, was den immunsuppressiven Effekt der UV-B Strahlung erklärt. Durch das Fehlern der intakten Langerhanszellen kann es zu keiner

Antigenrepräsentation kommen, was dann zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Kontaktallergenen führt [34].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte für humane Haut stichprobenartig für hohe und niedrige Dosen Röntgenstrahlung gezeigt werden, dass nach Bestrahlung kein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen gefunden werden kann (Abbildung 3.40). Dies zeigt einerseits, dass das Fehlen von Apoptose nach Bestrahlung von Hautäquivalenten nicht auf die Abwesenheit von Langerhanszellen zurückgeführt werden kann und dass die Hautäquivalente auch ohne die Anwesenheit von Immunzellen als Modellsystem für die hier durchgeführten Experimente geeignet sind. Ausserdem zeigen diese Ergebnisse gemeinsam mit dem Befund, dass die Anzahl an Langerhanszellen nach Bestrahlung nicht signifikant abnimmt (Abbildung 3.46) auch, dass durch Bestrahlung mit ionisierender Strahlung die Langerhanszellen selbst nicht in Apoptose gehen.

Donetti [49] verwendet ebenfalls humane Hautexplantate und bestrahlt diese mit 2 Gy Gammastrahlung. Obwohl in dieser Publikation keine Marker für Apoptose verwendet werden, zeigen Hämatoxylin-Eosin-Färbungen, dass keine Apoptose nach der Bestrahlung auftritt. Es wird beschrieben, dass die bestrahlten Proben 24 h nach Bestrahlung vital sind und keine histologischen Veränderungen gegenüber den Kontrollen aufweisen. Dies unterstützt die hier vorliegenden Ergebnisse für die Röntgenbestrahlung humaner Hautexplantate.

4.4 Zytokinfreisetzung nach Bestrahlung

Neben der sekundären Freisetzung von Zytokinen, beispielsweise durch strahleninduzierte Apoptose, kann die Zytokinfreisetzung der Zellen auch direkt moduliert werden. Die Freisetzung sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine kann beispielsweise durch die Bestrahlung erhöht oder erniedrigt, aber auch induziert werden [71]. Während es in Monokulturen eindeutig ist, von welchen Zellen das freigesetzte Zytokin stammt, kann dies bei Co-Kulturen und dreidimensionalen Kultursystemen nicht mehr zugeordnet werden. Allerdings ist insbesondere für die Zytokinfreisetzung die Kommunikation zwischen den verschiedenen Zelltypen von großer Bedeutung, da bereits sehr kleine Mengen eines Zytokins, die von einem Zelltyp freigesetzt werden, Auswirkungen auf die Zytokinfreisetzung der anderen Zelltypen haben kann.

Die Zytokinfreisetzung von Keratinozyten-Monokulturen ist in der Literatur sehr gut charakterisiert. Es liegen für einige Zytokine auch Daten nach der Bestrahlung mit UV-B und Röntgenstrahlung vor [60]. Es ist jedoch auch zu beachten, dass viele Daten für die Zytokinfreisetzung aus Beobachtungen in Keratinozyten-Zelllinien, wie zum Beispiel immortalisierten HaCaT-Zellen, stammen und nicht direkt auf primäre Keratinozyten übertragen werden können. Das es auch nach Bestrahlung Unterschiede hinsichtlich der Zytokinfreisetzung zwischen primären Keratinozyten und der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT gibt, ist ebenfalls in [60] gezeigt.

Für das humane Hautäquivalent EFT400 der Firma MatTek liegen nur wenige Referenzen vor, in

denen die Zytokinfreisetzung beschrieben wird. Breger [72] misst beispielsweise die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-10, IL-12, TNF, IL-1beta, IL-6 und IL-8 von Hautäquivalenten nach der Bestrahlung mit 66 mJ/cm^2 UV-B-Strahlung, vergleicht diese jedoch nicht mit der Freisetzung unbestrahlter Kontrollen, sondern mit der Freisetzung anderer Gewebeäquivalente wie einem Zahnfleischäquivalent (EpiGing; MatTek) und einem Mundschleimhautäquivalent (EpiOral, MatTek). Auch wenn diese Ergebnisse wegen den fehlenden Angaben zu Kontrollen nur bedingt mit den hier vorliegenden Daten verglichen werden können, zeigen sie, dass die absolute Freisetzung der Hautäquivalente im Vergleich zu den anderen Gewebearten selbst nach der Bestrahlung relativ niedrig ist. Das einzige Zytokin in dieser Publikation, für das ein Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle gezogen wird ist IL-8. Hier wird ungefähr eine Vervierfachung der freigesetzten Zytokinmenge im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Ebenfalls für die Bestrahlung mit UV-B liegen Daten von [69] vor. Diese zeigen einen Anstieg für die Freisetzung von IL-6 und IL-8 nach der Bestrahlung mit 200 mJ/cm^2 UV-B und 30 J/cm^2 UV-A, während die IL-1alpha-Freisetzung unverändert bleibt. Die einzige Publikation, die ein weiteres Spektrum an Zytokinen, die mit einer Entzündungsreaktion in Verbindung stehen, untersucht, ist Varnum et al. [65]. Hier werden Hautäquivalente mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung (0,03 bis 2 Gy) bestrahlt und die Zytokinfreisetzung gemessen. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy kann nur für wenige Zytokine eine signifikante Erhöhung gezeigt werden, welche IL-2, IL-10, IL-13, IFNgamma, MIP-1alpha und TNF alpha sind. Für niedrigere Dosen ist nur die Freisetzung der Zytokine IFNgamma, MIP-1alpha und IL-2 erhöht, die der genannten Gruppe angehören, jedoch alle pro-inflammatorisch wirken, während es sich nach der Bestrahlung mit 2 Gy um eine Mischung aus sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokinen handelt. Die Änderungen einzelner Zytokine werden in späteren Abschnitten im Vergleich zu den hier gezeigten Daten genauer diskutiert.

Die genannten Publikationen sind die einzigen, die sich mit der Zytokinfreisetzung der hier verwendeten Hautäquivalenten nach Bestrahlung beschäftigen. Es liegen keine Daten für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen vor und auch die Daten für die UV-B-Bestrahlung sind sehr lückenhaft. In der hier vorliegenden Arbeit werden die Veränderungen in der Zytokinfreisetzung von Hautäquivalenten für ionisierende und nicht-ionisierende Bestrahlung verglichen, was einen Überblick über pro- und anti-inflammatorische Effekte ermöglicht. Ausserdem ermöglichen Daten zu der Zytokinfreisetzung in Mono- und Co-Kulturen ein besseres Verständnis der auftretenden Effekte.

4.4.1 Die Bestrahlung mit UV-B-Strahlung kann die IL-6 und IL-8 Freisetzung in Keratinozyten induzieren

Für Monokulturen von Keratinozyten [73] und Hautäquivalente, die nur aus einer Epidermis bestehen [65], ist beschrieben, dass diese kein oder nur sehr geringe Mengen IL-6 und IL-8 frei-

setzen, da die Interaktion mit Fibroblasten fehlt. Keratinozyten können jedoch auch ohne die Kommunikation mit Fibroblasten während einer Entzündungsreaktion große Mengen sowohl IL-6 als auch IL-8 freisetzen. Dies ist in der Literatur für IL-6 beispielsweise nach einer Stimulierung mit Dichlordiethylsulfid (Senfgas) [73] und für IL-8 nach der Zugabe eines Antikörpers gegen BP180, welcher die Autoimmunkrankheit *Bullous pemphigoid* auslöst bzw. fördert [74] [75] gezeigt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-6 in Keratinozyten nach der Bestrahlung mit UV-B bzw. Röntgenstrahlung induziert werden kann. Die Expression steigt für beide Strahlenarten dosis- bzw. intensitätsabhängig an und erreicht bei 40 mJ/cm² bzw. 10 Gy eine Konzentration von ca. 160 pg/ml. IL-8 kann hingegen nur von einer höheren UV-B-Intensität von 40 mJ/cm² induziert werden, während es bei allen anderen Dosen und Intensitäten nicht nachweisbar ist. Sowohl IL-8 als auch IL-6 sind Zytokine, die im Rahmen einer Entzündungsreaktion eine bedeutende Rolle spielen. Während IL-6 keinen klar pro- oder anti-inflammatorischen Effekt hat, sondern regulierend wirkt, ist IL-8 ein klassisches pro-inflammatorisches, chemotaktisches Zytokin bzw. Chemokin [71]. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Röntgenstrahlung als auch UV-B-Strahlung die Freisetzung dieser Zytokine in Monokulturen primärer Keratinozyten induzieren können. Gemeinsam mit den in [73], [74] und [75] beschriebenen Ergebnissen weist dies auf einen pro-inflammatorischen Effekt der Bestrahlung mit höheren Dosen und Intensitäten hin. Ein spezifischer Niedrigdosiseffekt konnte für die Freisetzung dieser beiden Zytokine in Monokulturen von Keratinozyten nicht beobachtet werden. Ausserdem fällt bei den hier vorliegenden Daten auf, dass IL-1alpha nach der Bestrahlung unverändert bleibt bzw. für 0,5 Gy Röntgenstrahlung sogar eher einen Trend zu einer Abnahme zeigt (Abbildung 3.6). IL-1alpha ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches die Freisetzung von IL-6 und IL-8 induzieren kann. In dem hier vorliegenden Fall ist dies jedoch scheinbar nicht der Fall, da es ohne die Erhöhung der IL-1alpha-Freisetzung zu einer Induktion von IL-6 und IL-8 kommt. Dies weist darauf hin, dass IL-6 und IL-8 auch unabhängig von IL-1alpha durch bestrahlung induziert werden können [71].

4.4.2 IL-2 und TGF-beta sind nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung in Monokulturen von Keratinozyten erhöht

Nach der Bestrahlung von Monokulturen mit Röntgenstrahlung kommt es bei einer Dosis von 0,5 und 2 Gy zu einer Erhöhung der IL-2 Freisetzung, während nach 10 Gy die IL-2 Freisetzung der der Kontrolle entspricht (Abbildung 3.6). IL-2 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet wird. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass dieses Zytokin von primären Keratinozyten freigesetzt wird und beispielsweise bei Pilzinfektionen verstärkt vorhanden ist [76]. TGF-beta wurde klassischer Weise als pro-inflammatorisches Zytokin bezeichnet, welches an der Initiierung eines Entzündungsprozesses beteiligt ist [77]. Es

gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass TGF-beta immunsuppressiv wirken kann [77], [71]. In den vorliegenden Daten ist gezeigt, dass die TGF-beta Freisetzung nach der Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung deutlich erhöht ist (Abbildung 3.6). Dies könnte ein Hinweis auf einen anti-inflammatorischen Effekt sein, was jedoch bei einer relativ hohen Dosis von 10 Gy eher unwahrscheinlich ist. In der Literatur ist beschrieben, dass TGF-beta auch als Wachstums-Inhibitor wirken kann, indem es einen reversiblen Zellzyklus-Arrest induziert [71]. Für die hier verwendeten Monokulturen primärer Keratinozyten konnte in früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe von Zellzyklus-Analysen gezeigt werden, dass es nach der Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung zu einem transienten Zellzyklus-Arrest kommt (Daten nicht gezeigt). Dadurch ließe sich die TGF-beta-Freisetzung für hohe Dosen Röntgenstrahlung erklären. Es muss allerdings auch beachtet werden, dass es sich bei dem hier gemessenen TGF-beta nicht um aktives TGF handelt, sondern der latent vorhandene TGF-Komplex, der zuerst noch aktiviert werden muss, ebenfalls mit in die Messungen eingeht. Um tatsächlich die Wirkung des aktiven TGFs zu messen, müsste man beispielsweise in weiteren Versuchen die Aktivierung von Smad 2 und 3, die an dem TGF-beta-Signaling beteiligt sind, untersuchen.

4.4.3 In Co-Kulturen kommt es nach der Bestrahlung zu einer deutlichen Erhöhung der IL-6 und IL-8 Freisetzung

In Monokulturen konnte die IL-6- und IL-8-Freisetzung, die in den Kontrollen kaum oder teilweise gar nicht nachzuweisen war, durch die Bestrahlung mit Röntgen- und UV-B-Strahlung induziert werden. In den Co-Kulturen ist die IL-6- und IL-8-Konzentration in den Kontrollen bereits deutlich höher (Abbildung 3.11), da diese einerseits von den Fibroblasten direkt stammt und andererseits die IL-6 und IL-8-Freisetzung der Keratinozyten in Gegenwart von Fibroblasten induziert wird. Die hohe IL-6 und IL-8 Freisetzung ist hier auch im zahlenmäßigen Verhältniss der Keratinozyten zu den Fibroblasten in den Co-Kulturen begründet. In den Co-Kulturen, wie sie hier verwendet werden, sind dreimal so viele Fibroblasten wie Keratinozyten vorhanden. Für primäre Fibroblasten (NHDF) ist bereits in der Literatur beschrieben, dass sie relativ hohe Konzentrationen IL-6 [78] und IL-8 freisetzen. Nach Röntgenbestrahlung kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 und IL-8 Freisetzung auf mehr als das Dreifache verglichen zur Kontrolle. Dies ist bereits ab einer Dosis von 0,5 Gy der Fall. Nach der Bestrahlung mit höheren Dosen von 2 Gy oder 10 Gy kommt es nicht zu einem dosisabhängigen Anstieg dieses Effekts, sondern die Zytokinfreisetzung ist nach beiden Röntgendosen um ca. das drei- bis vierfache erhöht. Nach UV-B-Bestrahlung kommt es zu einem deutlichen, intensitätsabhängigen Anstieg der Freisetzung beider Zytokine. Nach der Bestrahlung mit einer Intensität von 60 mJ/cm² ist die IL-6-Freisetzung um das 16-fache und die IL-8 Freisetzung um das 36-fache gegenüber den Kontrollen erhöht. An dem sehr deutlichen Anstieg dieser beiden Zytokine in den hier verwendeten Co-Kulturen kann auch die hohe Anzahl an Fibroblasten beteiligt sein. Sowohl nach Röntgen-

als auch nach UV-B-Bestrahlung weist die erhöhte Freisetzung von IL-6 und IL-8 auf einen pro-inflammatorischen Effekt hin. Für beide Zytokine liegen in der Literatur für die Bestrahlung von Co-Kulturen keine direkten Vergleichsdaten vor.

4.4.4 Die IL-1alpha-Freisetzung ist in Co-Kulturen sowohl nach Röntgen- als auch nach UV-B-Bestrahlung erhöht

Die IL-1alpha Freisetzung ist in den Co-Kulturen sowohl nach der Röntgenbestrahlung mit 2 Gy als auch nach der Bestrahlung mit UV-B Strahlung von 60 mJ/cm² jeweils auf ca. die dreifache Menge der Kontrollen erhöht (Abbildung 3.11). IL-1alpha ist ein Zytokin, welches an den frühen, initialen Schritten einer Entzündungsreaktion beteiligt ist [79] [80] und die Freisetzung anderer Zytokine z.B. IL-6 und IL-8 aktivieren kann. Es wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen aber auch von Keratinozyten und Fibroblasten freigesetzt [71]. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Freisetzung von IL-1alpha direkt durch die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung induziert werden kann [81]. Nach Röntgenstrahlung liegt in den Co-Kulturen nur nach einer Dosis von 2 Gy eine erhöhte IL-1alpha-Freisetzung vor, während nach 10 Gy die Freisetzung der der Kontrollen entspricht. In der Literatur ist für den gleichen Dosisbereich sowohl für Keratinozyten als auch für Fibroblasten eine Erhöhung der IL-1alpha-Freisetzung beschrieben, diese werden jedoch jeweils in Monokulturen kultiviert [82] [83]. Es könnte also sein, dass es bedingt durch die Co-Kultivierung der beiden Zelltypen einen, für höhere Dosen veränderten, Bestrahlungseffekt gibt. Ausserdem konnte in unserer Arbeitsgruppe für die Bestrahlung von Keratinozyten mit 10 Gy Röntgenstrahlung ein Zellzyklusarrest nachgewiesen werden, der in diesem Fall ebenfalls an der Modulation der Zytokinfreisetzung beteiligt sein könnte. Interessant ist ebenfalls, dass es bei der Bestrahlung mit 2 Gy nicht nur zu einer Erhöhung von IL-1alpha kommt, sondern auch zu einer Erhöhung von IL-2, die beide nach 10 Gy nicht auftreten. Bei beiden Zytokinen handelt es sich um pro-inflammatorische Zytokine, die während einer Entzündungsreaktion früh freigesetzt werden. Es könnte deshalb sein, dass der Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung zu spät gewählt ist um die Erhöhung von IL-1alpha und IL-2 noch messen zu können. Durch die relativ hohe Dosis könnte es zu einem sehr schnellen, jedoch nicht lange anhaltenden Anstieg der Zytokinfreisetzung kommen, der bei niedrigeren Dosen wie 2 Gy leicht verspätet auftritt und deshalb 24 h nach Bestrahlung noch messbar ist. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass für IL-6 und IL-8 sowohl nach der Bestrahlung mit 2 Gy als auch nach der Bestrahlung mit 10 Gy erhöhte Zytokinfreisetzung in fast gleichem Ausmaß gemessen werden können. Diese beiden Zytokine können durch IL-1alpha induziert werden, sodass es möglich ist, dass eine IL-1alpha-Freisetzung der IL-6- und IL-8-Freisetzung vorausgeht.

Für die UV-B-Bestrahlung ist nur für eine hohe Intensität eine Erhöhung der IL-1alpha Freisetzung zu beobachten. Dies wird auch in der Literatur beschrieben [84]. Hier wird auch bestätigt,

dass es sich bei der Erhöhten IL-1alpha Freisetzung um einen transienten, sehr schnell nach der Bestrahlung erfolgenden Effekt handelt.

4.4.5 Die Zytokinfreisetzung von Monokulturen primärer Keratinozyten und Co-Kulturen gibt keinen Hinweis auf einen anti-inflammatorischen Effekt nach Niedrigdosisbestrahlung

Die für Monokulturen und Co-Kulturen in den vorangegangenen Kapiteln diskutierten Veränderungen der Zytokinfreisetzung lassen sich insgesamt als ein eher pro-inflammatorischer Effekt beschreiben. Die Freisetzung pro-inflammatorisch wirkender Zytokine nach Bestrahlung überwiegt deutlich. Besonders deutlich wird dies durch die signifikant erhöhte IL-6- und IL-8-Freisetzung in den Co-Kulturen und die Induktion dieser Zytokine in den Monokulturen. Weder in den Monokulturen noch in den Co-Kulturen kommt es zu einem spezifischen Effekt für eine niedrige Röntgendosis von 0,5 Gy.

4.4.6 Die Freisetzung von IL-6, IL-8 und IL-1alpha durch Hautäquivalenten ist nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung erhöht

In den Hautäquivalenten ist, wie für die Co-Kulturen bereits beschrieben, die IL-6- und die IL-8-Freisetzung nach Röntgenstrahlung erhöht (Abbildung 3.34). Eine signifikante Erhöhung liegt nach der Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung sowohl für IL-6 als auch für IL-8 24 h und 48 h nach der Bestrahlung vor, während nach der Bestrahlung mit 10 Gy die Freisetzung ungefähr der der Kontrolle entspricht. Für die Bestrahlung mit niedrigeren Dosen, wie 0,5 und 0,17 Gy ist 24 h nach der Bestrahlung ein Trend zu einer erhöhten IL-8-Freisetzung zu beobachten während IL-6 unverändert bleibt. Obwohl IL-1alpha ein entzündungsförderndes Zytokin ist, welches früh freigesetzt wird und die Freisetzung anderer Zytokine induziert, ist hier 24 h nach der Bestrahlung nur eine leichte Erhöhung der IL-1alpha-Freisetzung sowohl nach der Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 10 Gy zu beobachten. Diese ist 48 h nach der Bestrahlung deutlicher ausgeprägt. Das gleichzeitige Auftreten einer erhöhten Freisetzung von IL-1alpha, IL-6 und IL-8 kann dafür sprechen, dass IL-1alpha die Freisetzung der beiden pro-inflammatorischen Zytokine induziert. Hierfür müsste jedoch IL-1alpha vor IL-6 und IL-8 freigesetzt werden. Diese zeitliche Abfolge kann zu den hier untersuchten Zeitpunkten nicht beobachtet werden. Die Daten 24 h und 48 h nach Bestrahlung weisen aber darauf hin, dass der Peak der IL-1alpha-Freisetzung wahrscheinlich noch nicht erreicht ist. Dies macht eine frühe, ausgeprägte IL-1alpha-Freisetzung, die die Freisetzung anderer Zytokine induziert, eher unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die IL-6 und IL-8-Freisetzung direkt durch die Bestrahlung mit moderaten Dosen (2 Gy) induziert wird. Dafür würde auch sprechen, dass es einerseits trotz einer Erhöhung der IL-1alpha Freisetzung nach der Bestrahlung mit 10 Gy nicht zu einer Erhöhung der IL-6- und

IL-8-Freisetzung kommt, aber andererseits nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen von 0,17 und 0,5 Gy zu einer Erhöhung der IL-8-Freisetzung kommt, obwohl IL-1 α nicht erhöht ist. Dies spricht für eine unabhängige Regulierung der Freisetzung dieser Zytokine.

Die einzigen Daten, die für Röntgenbestrahlung der Hautäquivalente EFT400 hinsichtlich der Zytokinfreisetzung vorliegen, stammen von [65]. Hier konnte nach der Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung zwar überwiegend eine Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-2, IFN-gamma und TNF-alpha gezeigt werden, die Freisetzung von IL-6 und IL-8 als auch von IL-1 α bleibt nach der Bestrahlung in diesen Untersuchungen jedoch unverändert. Interessanterweise wurde jedoch nach der Behandlung der Proben mit TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat), einem Tumor-Promotor und Aktivator der Proteinkinase C, der eine akute inflammatorische Reaktion auslöst, eine Erhöhung der Zytokine IL-1 α , IL-6 und IL-8 gezeigt. Diese Ergebnisse für die Stimulierung einer pro-inflammatorischen Reaktion decken sich mit den in dieser Arbeit für die Bestrahlung dargestellten Ergebnisse sehr gut. Warum jedoch Varnum et al. [65] verschiedene Effekte für die Stimulation einer Entzündungsreaktion durch Bestrahlung oder durch TPA beobachtet, wird in der Publikation nicht weiter diskutiert und bleibt auch im Vergleich zu den hier vorliegenden Daten unklar.

Für die fraktionierte Bestrahlung mit 3x 0,17 Gy wurde die Zytokinfreisetzung 3 Tage nach der ersten Fraktion gemessen. Hier zeigt sich, dass es fast keine Änderungen der Zytokinfreisetzung gibt. Alle gemessenen Zytokinkonzentrationen unterschieden sich kaum von denen der Kontrolle.

Insgesamt wird deutlich, dass die Bestrahlung der Hautäquivalente mit Röntgenstrahlung eine leichte, teilweise aber signifikante Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6 und IL-8 hervorruft. Interessanterweise wird nach der Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung keine Erhöhung für IL-6 und IL-8 gemessen, was auf einen weniger deutlich, oder zeitlich versetzten pro-inflammatorischen Effekt hinweisen kann.

4.4.7 Nach der Bestrahlung von Hautäquivalenten mit Kohlenstoffionen ist die IL-10 und IL-8 Freisetzung erhöht

Für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen konnten nach 24 h keine deutlichen oder signifikanten Unterschiede in der Zytokinfreisetzung beobachtet werden (Abbildung 3.35). Es kommt zu diesem Zeitpunkt lediglich zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Verringerung der IL-1 α -Freisetzung.

Da 48 h nach der Bestrahlung durchaus Änderungen in der Zytokinfreisetzung detektiert wurden, ist dies ein Hinweis auf einen, für die Kohlenstoffbestrahlung verglichen zu der Röntgenstrahlung verspätet auftretenden, Effekt. Zu diesem Zeitpunkt liegt eine leichte, jedoch signifikant erhöhte IL-10-Freisetzung für eine Dosis von 0,5 Gy vor. Für diese Dosis kommt es auch zu einer leicht erhöhten IL-8-Freisetzung, die nach einer höheren Dosis von 2 Gy signifikant ist.

Eine Veränderung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1alpha kann nach Kohlenstoffbestrahlung im Gegensatz zu Röntgenbestrahlung nicht induziert werden. Lediglich nach der Bestrahlung mit 2 Gy Kohlenstoffionen kommt es zu einer leichten IL-1alpha-Erhöhung. Dies zeigt, dass die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen Veränderungen in der Zytokinfreisetzung hervorruft, die nur teilweise, zum Beispiel für IL-8, nicht aber für IL-1alpha und IL-6, mit denen nach Röntgenbestrahlung übereinstimmen. Insgesamt zeigt aber auch die Zytokinfreisetzung nach Kohlenstoffbestrahlung eher ein pro-inflammatorisches Muster, jedoch nicht so ausgeprägt, wie nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Die Effekte sind zu den hier untersuchten Zeitpunkten schwächer ausgeprägt. Unter Umständen gleicht sich dieser Effekt zu späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung dem Effekt nach Röntgenstrahlung an. Dies kann mit den hier vorliegenden Daten jedoch nicht beurteilt werden kann.

4.4.8 Nach der UV-B-Bestrahlung von Hautäquivalenten kommt es zu einem frühen, transienten pro-inflammatorischen Effekt

Nach Bestrahlung mit UV-B-Strahlung kommt es zu einer 24 h nach Bestrahlung deutlich nachweisbaren Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8, während die anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine TGF-beta und IL-10 und das pro-inflammatorische IL-1alpha unverändert bleiben (Abbildung 3.35). Da sich 48 h nach der Bestrahlung auch die IL-6 und IL-8 Freisetzung wieder der Kontrolle angeglichen haben, könnte es sich hierbei um einen schnellen, transienten Effekt handeln, bei dem die IL-1alpha Induktion direkt nach der Bestrahlung erfolgt und der Effekt 48 h nach Bestrahlung schon wieder abgeklungen ist. [60] bestätigt für Monokulturen von Keratinozyten ebenfalls, dass es sich bei der Reaktion auf UV-B-Strahlung um einen schneller eintretenden Effekt als nach ionisierender Strahlung handelt. Kandarova [69] misst die Zytokinexpression in humanen Hautäquivalenten nach einer Bestrahlung mit 200 mJ/cm² UV-B und 30 J/cm² UV-A. Jedoch wird hier nicht die Freisetzung in das Medium gemessen, sondern das Zytokin in Lysaten des Hautäquivalents nachgewiesen. In dieser Publikation wird 24 h nach der Bestrahlung eine Erhöhung der IL-6- und der IL-8-Expression gezeigt, während die IL-1alpha Konzentration der Kontrolle entspricht. Dies deckt sich mit den hier gezeigten Ergebnissen aus dieser Arbeit und bestätigt ausserdem, dass die Messung der Zytokinfreisetzung in das Medium und die Messung in Lysaten vergleichbare Ergebnisse bringt. Zum Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung wird keine erhöhte Zytokinfreisetzung gemessen. Die anti-inflammatorischen Zytokine TGF-beta und IL-10 und das pro-inflammatorische IL-1alpha zeigen jedoch eine leichte, teilweise auch signifikante Abnahme der Zytokinfreisetzung. Dies könnte eine Rückkopplungsreaktion nach der Stimulierung einer Entzündungsreaktion 24 h nach Bestrahlung sein die nach ionisierender Strahlung im beobachteten Zeitraum von 48 h aufgrund der insgesamt später eintretenden Reaktion nicht sichtbar wird.

4.4.9 Die Zytokinfreisetzung aller Modellsysteme zeigt keinen spezifischen Niedrigdosiseffekt und weist nicht auf eine anti-entzündliche Reaktion hin

Die Ergebnisse der Zytokinfreisetzung kann man für alle Modellsysteme nach Bestrahlung, unabhängig von der Bestrahlungsart, als insgesamt eher pro-inflammatorisch zusammenfassen. Nach UV-B-Bestrahlung kommt es zu einer sehr schnellen Reaktion, während es nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen zu einem verzögerten Effekt kommt.

Nach allen Bestrahlungsarten spielen hauptsächlich IL-6 und IL-8 eine Rolle, deren Freisetzung mit Ausnahme von wenigen Dosen/Intensitäten nach der Bestrahlung deutlich erhöht ist. Obwohl die IL-1alpha-Freisetzung oft als erster und initiierender Schritt einer Entzündungsreaktion beschrieben wird, der dann die IL-6- und IL-8-Freisetzung induziert, konnte in den hier vorliegenden Daten nicht immer auch eine IL-1alpha-Erhöhung gemessen werden. Dies kann entweder darauf hinweisen, dass es zu einer sehr frühen IL-1alpha Erhöhung kommt, die mit dem hier gewählten Untersuchungszeitpunkt von 24 h nicht erfasst werden konnte, oder die IL-6- und IL-8-Freisetzung auch unabhängig von einer IL-1alpha-Erhöhung induziert werden kann.

Ausserdem zeigen die Daten, dass es für die Bestrahlung mit niedrigen Dosen, wie 0,5 Gy Röntgenstrahlung oder 0,5 Gy Kohlenstoffionen, zu keinem spezifischen Effekt kommt, der sich grundlegend von der entzündungsfördernden Freisetzung von Zytokinen nach der Bestrahlung mit höheren Dosen unterscheidet. Diese ist lediglich weniger ausgeprägt. Auch Varnum et al. [65] hat beschrieben, dass es sich bei der nach sehr niedrigen Dosen von 0,03 und 0,1 Gy Röntgenstrahlung erhöht freigesetzten Zytokine um eine Untergruppe der bei einer höheren Dosis von 2 Gy freigesetzten Zytokine handelt.

Dies gibt Hinweise darauf, dass die Zytokinfreisetzung nach niedrigen Bestrahlungsdosen in den hier verwendeten Modellen eher eine pro-inflammatorische Wirkung hat und ein anti-inflammatorischer Effekt damit nicht erklärt werden kann. Hier ist allerdings zu bedenken, dass es sich bei den hier gemessenen Werten um die Zytokinfreisetzung in das Medium handelt. Insbesondere bei der dreidimensionalen Struktur der Hautäquivalente könnte es zu lokalen, Zytokinfreisetzung einzelner Zellen kommen, die unter Umständen ein anderes Zytokinprofil, welches beispielsweise lokal anti-inflammatorisch wirkt, aufweisen. Es stellt sich allerdings die Frage, ob solche lokalen Wirkungen ausreichen einen weitreichenden anti-inflammatorischen Effekt zu erklären. Insbesondere dann, wenn offensichtlich deutlich größere Mengen pro-inflammatorische Zytokine in das Medium freigesetzt werden.

4.4.10 Nach der Bestrahlung von humaner Haut mit niedriger und fraktionierter Röntgenstrahlung ändert sich die Freisetzung der untersuchten Zytokine kaum

Für die Zytokinfreisetzung humaner Hautexplantate liegen bis jetzt nur Daten für die Bestrahlung mit 0,5 Gy und 3x 0,17 Gy vor. Da die fraktionierte Bestrahlung humaner Haut alle 12

Stunden erfolgte und die Proben nach der letzten Bestrahlung für 24 h weiter kultiviert werden sollten, wurde die Zytokinfreisetzung nach 48 h untersucht. Dies bedeutet allerdings auch, dass die Zytokinfreisetzung dieser Proben nicht direkt mit der Zytokinfreisetzung der fraktioniert bestrahlten Hautäquivalenten verglichen werden kann, da es sich um einen anderen Zeitpunkt handelt. Für die humane Haut wurden vorerst nur die Zytokine untersucht, für die in den Hautäquivalenten Änderungen gefunden wurden. Dies waren die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1alpha, IL-6 und IL-8. Für die Bestrahlung mit den niedrigen Dosen von 0,5 Gy und 3 Fraktionen mit jeweils 0,17 Gy sind für IL-1alpha und IL-8 keine Veränderungen zu beobachten. Nach 0,5 Gy nimmt die IL-6-Freisetzung signifikant um fast die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollen ab, während sie nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 3x 0,17 Gy unverändert bleibt. Die Abnahme eines pro-inflammatorischen Zytokins kann ebenfalls ein Hinweis auf einen tendenziell anti-inflammatorischen Effekt sein, der unter Umständen gerade beginnt und noch nicht sehr stark ausgeprägt ist. Um diesbezüglich weitere Aussagen treffen zu können, müsste eine Reihe anti-inflammatorischer Zytokine untersucht werden. Ohne diese Daten und ohne Daten für einen Zeitpunkt, der einen Vergleich mit den Hautäquivalenten zulässt, kann man aus den vorliegenden Daten für humane Haut nur vermuten, dass es für die hier gezeigten niedrigen Dosen 48 h nach Bestrahlung keinen pro-inflammatorischen Effekt gibt. Dies entspricht den Daten für das Hautäquivalent, die 3 Tage nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy ebenfalls keine deutlichen Veränderungen zeigen.

4.5 Gewebeorganisation und Differenzierung der Epidermis in humanen Hautäquivalenten

Die Haut ist ein sich ständig erneuerndes Organ. Zelltod durch Differenzierung und Zellerneuerung durch Proliferation der Basalzellen stehen in einem Gleichgewicht, welches für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut und ihrer Barrierefunktion von sehr großer Bedeutung ist. Störungen in diesem Gleichgewicht führen zu einer beeinträchtigten Barrierefunktion und können letztendlich an der Induktion von Hautkrebs beteiligt sein.

Zu diesem Gleichgewicht in der Epidermis tragen die Proliferation der Basalzellen, die Differenzierung und die daraus resultierende Kornifikation der Keratinozyten, aber auch die Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten und die Polarität und Struktur der Basalzellen bei. Nur sehr wenige Arbeiten haben bisher die Veränderung solcher Merkmale nach Bestrahlung systematisch beschrieben. In [31] wird die Proliferation und die Fläche der gesamten vitalen Epidermis in Hautäquivalenten nach Bestrahlung quantifiziert, es wird jedoch nicht auf die Struktur der Basalzellen oder die Dicke des *stratum corneum*s eingegangen. Mezentsev [85] beschreibt für ein nur aus Epidermis bestehendes Hautmodell eine strukturelle Veränderung der Basalzellen nach einer Bestrahlung mit 2,5 Gy Protonen, quantifiziert diese jedoch nicht.

In der hier vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal ein weites Spektrum an strukturellen und morphologischen Merkmalen herangezogen und für die Bestrahlung mit drei verschiedenen Strahlenarten quantitativ oder semiquantitativ ausgewertet. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Effekte für die unterschiedlichen Strahlenarten und gibt einen Überblick über die bei der jeweiligen Strahlenart vorkommenden Veränderungen. Für diese Auswertung wurde die Anzahl pyknotischer Kerne in der Epidermis bzw. dem *stratum corneum* (Parakeratose), die Dicke des *stratum corneums* im Verhältnis zur vitalen Epidermis (Hyperkeratose) und die Anzahl der Basalzellen quantitativ bestimmt. Die Struktur der Basalzellen wurde semiquantitativ ausgewertet, indem für jedes ausgewertete Sichtfeld bestimmt wurde, ob die Basalzellen palisadenförmig angeordnet sind oder eine runde, eher pflastersteinartige Form aufweisen.

4.5.1 Parakeratose tritt hauptsächlich nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen oder UV-B auf

Nach der Bestrahlung mit 2 Gy Kohlenstoffionen oder 60 mJ/cm^2 UV-B-Strahlung kommt es in den Hautäquivalenten zu Parakeratose (Abbildung 3.24, 3.25 und 3.26). Es handelt sich dabei um Zellkerne, die aufgrund einer unvollständigen oder fehlerhaften Differenzierung im *stratum corneum* verbleiben. Parakeratose wird auch mit einem beschleunigten Differenzierungsprozess in Verbindung gebracht und ist ein typisches Merkmal vieler sowohl gutartiger als auch bösartiger Hauterkrankungen. Es gibt Vermutungen und klinische Beobachtungen, dass Morphologie und Erscheinungsbild der Parakeratose eine Vorraussage darüber zulassen, ob es sich um eine bösartige Erkrankung wie beispielsweise ein Plattenepithelkarzinom handelt [86].

Für die Bestrahlung mit UV-B-Strahlung ist das Auftreten von Parakeratose sowohl in Explantaten humaner Haut als auch in Hautäquivalenten erstmals in [87] beschrieben. In diesen Versuchen treten einzelne Zellkerne in einem Zeitraum zwischen 1,5 und 4 Tagen nach einer Bestrahlung mit 50 mJ/cm^2 im *stratum corneum* auf. Dieser Effekt wird hier als Beeinträchtigung des Differenzierungsprozesses beschrieben, der sich jedoch ca. 10 Tage nach der Bestrahlung wieder normalisiert hat. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellkerne im *stratum corneum* wieder verschwunden und die Differenzierung hat sich wieder normalisiert. Dies zeigt sich durch das Verschwinden der Parakeratose, einer verbesserten Gewebeorganisation und einer höheren Anzahl an Zellschichten. Die Autoren gehen davon aus, dass hier zur Wiederherstellung der Gewebemöostase andere Mechanismen beteiligt sind als beispielsweise bei der Wundheilung. Eine Wunde ist durch die lokale komplette Zerstörung der Epidermis charakterisiert und die Heilung und Verschlussung der Wunde geht von der Proliferation der umliegenden Basalzellen aus. Nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlung kommt es hingegen zu einer großflächigen aber spezifischeren Schädigung, die andere Mechanismen, wie beispielsweise Proliferation anregt. Mezentsev [85] zeigt in seinen Versuchen mit einem Epidermisäquivalent einen, der Parakeratose ähnlichen, Effekt nach der Bestrahlung mit Protonen mit niedrigem LET. In den gezeigten

Hematoxylin-Eosin-Färbungen sind ebenfalls kondensierte Zellkerne im *stratum corneum* zu sehen. Diese werden zwar nicht direkt als Parakeratose, aber als *nucleated corneocytes*, die eine verfrühte und fehlerhafte Kornifikation durchlaufen, bezeichnet.

In den hier durchgeführten Versuchen tritt Parakeratose hauptsächlich nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung auf. Nach der Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung ist nur ein leichter Anstieg der Anzahl an parakeratotischen Zellen zu beobachten (Abbildung 3.22 und 3.26). Hierbei ist jedoch auffällig, dass nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen die Zellkerne im *stratum corneum* hauptsächlich in Gruppen auftreten, während nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung immer nur einzelne Kerne zu beobachten sind (Abbildung 3.22). Dies weist darauf hin, dass die Bestrahlung mit 2 Gy Kohlenstoffionen lokal einen größeren Effekt hat und es dadurch in einem bestimmten Bereich, zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Differenzierungsprozesses kommt, während nach der Bestrahlung mit 10 Gy Röntgenstrahlung ein eher gleichmäßiger Effekt auftritt, der dazu führt, dass einzelne Zellen während des Differenzierungsprozesses ihren Kern behalten und in das *stratum corneum* wandern. Dadurch kann auch die deutlich höhere Anzahl an parakeratotischen Zellen nach der Kohlenstoffbestrahlung in der quantitativen Auswertung erklärt werden. Es handelt sich hierbei um wenige, kleinere Bereiche, in denen sehr viele pyknotische Kerne im *stratum corneum* auftreten. Eine solche, sogenannte fokale Parakeratose ist typisch für eine Unterform der Psoriasis vulgaris, der *Psoriasis guttata* [88]. Für die häufiger auftretende Form der *Plaque-Psoriasis* ist eine konfluente Parakeratose, bei der die pyknotischen Zellen gleichmäßig über große Flächen des *stratum corneums* verteilt sind, typisch [88]. Dies entspricht der hier beobachteten Parakeratose nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, die jedoch schwächer ausgeprägt ist, als bei *Plaque Psoriasis*.

Die in humaner Haut auftretende Parakeratose wurde im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht quantifiziert, es konnte aber auch hier nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung eine erhöhte Anzahl an pyknotischen Kernen im *stratum corneum* beobachtet werden (Abbildung 3.41 und 3.42). In den beiden unabhängig durchgeführten Versuchen für humane Haut mit Röntgenbestrahlung wird deutlich, dass es abhängig vom Spender zu relativ großen Unterschieden hinsichtlich der Parakeratose kommt. Bei beiden Experimenten ist in der Kontrolle keine Parakeratose sichtbar, nach einer Bestrahlung mit 10 Gy kommt es jedoch im ersten Versuch zu einer beträchtlichen Anzahl an pyknotischen Kernen im *stratum corneum*, die auch in kleinen Gruppen auftreten (Pfeile in Abbildung 3.41), während im zweiten Versuch nur vereinzelt Kerne zu finden sind (Pfeile in Abbildung 3.42). Diese unterschiedliche Reaktion auf die gleiche Bestrahlungsdosis kann vom Hauttyp des Spenders und von der Vorschädigung der Haut, zum Beispiel durch Sonnenstrahlung, abhängig sein. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass in der humanen Haut ähnliche Effekte auftreten, wie sie für das Hautäquivalent gezeigt werden konnten. Um genauere Aussagen treffen zu können, muss auch in der humanen Haut die Anzahl an pyknotischen Kernen quantifiziert werden. Ausserdem sind Experimente notwendig bei der Haut mit Kohlenstoffionen bestrahlt wird um die Wirkung der unterschiedlichen Strahlenqualitäten

auf die humane Haut vergleichen zu können und herauszufinden, ob sich humane Haut nach Kohlenstoffbestrahlung vergleichbar zu dem Hautäquivalent verhält.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Auftreten von Parakeratose in Hautäquivalenten zeigen, dass nach der Bestrahlung das Gleichgewicht des Differenzierungsprozesses beeinträchtigt ist und die Differenzierung fehlerhaft abläuft. Es wird auch deutlich, dass dies sowohl für hohe Intensitäten nicht-ionisierender UV-B-Strahlung, als auch für ionisierende Strahlung auftritt. Die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen ist hier nicht generell effektiver, löst jedoch in einem bestimmten Bereich einen deutlich größeren Schaden aus, der dann zu einem Gebiet mit einer fokal sehr heftig auftretenden Parakeratose führt.

4.5.2 Pyknotische Kerne in der Epidermis nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen oder UV-B könnten eine Vorstufe der Parakeratose sein

Ebenfalls nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung treten in der Epidermis pyknotische Zellkerne, umgeben von einem stark eosinophilem Zytoplasma auf. Diese werden klassisch als *sunburn cells* bezeichnet und werden in der Literatur als apoptotisch und somit positiv für aktive Caspase 3 beschrieben.

Die hier gefundenen pyknotischen Zellen in der Epidermis erfüllen all diese morphologischen Merkmale, sind jedoch nicht positiv für aktive Caspase 3. Wie bereits im Zusammenhang mit Apoptose in den Hautäquivalenten diskutiert, könnte bei den UV-B bestrahlten Proben der Zeitpunkt mit 24 h nach der Bestrahlung bereits zu spät [70], oder die UV-B-Intensität zu niedrig [69] gewählt sein. Dies erklärt jedoch nicht das Auftreten der pyknotischen Kerne in der Epidermis nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung.

Betrachtet man diese pyknotischen Kerne in der Epidermis genau, so ist auffällig, dass sie insbesondere zu späteren Zeitpunkten häufig sehr nah am *stratum corneum* zu finden sind. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Zellen nach der Bestrahlung eine sehr schnelle und dadurch fehlerhafte Differenzierung durchlaufen und dann im Laufe der Kultivierung Richtung *stratum corneum* wandern um dort zu verbleiben. Dies würde bedeuten, es handelt sich bei diesen Kernen um eine Art Vorstufe der Parakeratose.

In den Ergebnissen von Qin [70] ist auffällig, dass 48 h nach einer Bestrahlung mit 100 mJ/cm^2 in einem Bereich mit einer sehr hohen Anzahl an pyknotischen Kernen nahe dem *stratum corneum* bei einem Teil der Zellen aktive Caspase 3 vorliegt, aber dennoch manche Zellen mit gleicher Morphologie in diesem Bereich ungefärbt sind. Diese Beobachtung wird in der Publikation jedoch nicht beschrieben oder diskutiert. Man könnte hier vermuten, dass es nach der Bestrahlung mit UV-B für die Zellen zwei mögliche Reaktionswege gibt. Es kann einerseits zur Apoptose kommen, was in pyknotischen, Caspase 3 positiven Zellen resultiert, oder es kommt zu einer beschleunigten Differenzierung, die zum Beispiel über die Aktivierung von Caspase 14

ablaufen könnte. Wäre dies der Fall, wäre das ein Hinweis darauf, dass in den hier vorliegenden Experimenten der Reaktionsweg der beschleunigten Differenzierung überwiegt.

4.5.3 Hyperkeratose kommt nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen vor

Insbesondere 3 Tage nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffbestrahlung kommt es zur Hyperkeratose, das heisst zu einer Verdickung des *stratum corneums*, die hier im Verhältnis zur Dicke der vitalen Epidermis angegeben ist (Abbildung 3.28). Hierbei ist anzumerken, dass nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen Hyperkeratose in Kombination mit Parakeratose auftritt. Nach der Röntgenbestrahlung ist nur sehr wenig Parakeratose, die nur einzelne Zellen betrifft, zu beobachten, die Hyperkeratose ist jedoch fast genauso ausgeprägt. Hyperkeratose wird hauptsächlich in Zusammenhang mit Psoriasis beschrieben. Hier kommt es durch eine erhöhte Proliferation und eine beschleunigte Differenzierung zu einer Verdickung der Hornschicht der Epidermis. Aber auch für Hautäquivalente wird dieser Effekt, wenn auch indirekt, beschrieben [31]. In dieser Publikation wird nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen Ionenstrahlung eine Abnahme der Dicke der für Cytokeratin 10 positiven Zellschichten beschrieben, was mit einer Beschleunigung der Differenzierung und mit einer Verdickung des *stratum corneums* einhergeht.

In den hier vorliegenden Ergebnissen kommt es hauptsächlich nach der Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy Röntgenstrahlung zu einer Hyperkeratose. Bei diesen Dosen kommen lediglich einzelne parakeratotische Zellen vor. Dies weist darauf hin, dass Röntgenstrahlung die Differenzierung zwar beschleunigt, sie jedoch in den meisten Fällen noch korrekt abläuft. Dadurch kommt es zur Bildung eines verdickten *stratum corneums*, in dem höchstens vereinzelt pyknotischen Kerne, aber hauptsächlich korrekt differenzierte Korneozyten vorhanden sind. Nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen ist die Differenzierung so stark beeinflusst, dass sie nicht nur beschleunigt abläuft, was dann zu einer Hyperkeratose führt, sondern so sehr gestört, dass es gleichzeitig auch zu Parakeratose kommt. Das gemeinsame Auftreten von Hyperkeratose und Parakeratose ist ebenfalls von der chronisch entzündlichen Hautkrankheit Psoriasis bekannt [88],[40], [41] .

4.5.4 Nach Bestrahlung verändert sich die Struktur der Basalschicht und die Polarität der Basalzellen

Hyperkeratose und Parakeratose sind Effekte die offensichtlich eher bei höheren Dosen und Intensitäten auftreten. In Hämatoxylin-Eosin-Färbungen fiel jedoch auf, dass insbesondere bei niedrigen Röntgendosen die Struktur der Basalzellen gegenüber den Kontrollen verändert ist. Die Zellen verändern ihre palisadenartige Anordnung, verlieren teilweise den Kontakt zur Basal-

membran und weisen eine eher rundliche Form auf. Solche Veränderungen sind in der Literatur zwar teilweise für Protonen mit niedrigem LET beschrieben [85], sie sind jedoch nicht quantifiziert oder werden für verschiedene Strahlungsarten verglichen. In dieser Arbeit wurde eine semiquantitative Auswertungsmethode etabliert um diese strukturelle Veränderung der Basalzellen zu erfassen (Abbildung 3.29). Diese zeigt, dass insbesondere nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung die Basalzellstruktur beeinträchtigt ist, während nach der Bestrahlung mit UV-B-Strahlung geringfügige, aber nicht signifikante Zunahmen der Bereiche mit veränderter Basalzellstruktur beobachtet werden können. Ausserdem wird nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung deutlich, dass die veränderte Struktur der Basalzellen nach niedrigen Dosen von 0,5 Gy am häufigsten vorkommt und am ausgeprägtesten ist.

Man kann spekulieren, dass die Veränderungen in der Basalschicht eine Vorstufe zu weitreichenderen Beeinträchtigungen der Differenzierung wie beispielsweise der Parakeratose und Hyperkeratose sind. Da diese nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen jedoch im hier beobachteten Zeitraum nicht vorkommen, könnte es sich nach der Niedrigdosisbestrahlung entweder um einen verzögerten Effekt oder um einen frühen transienten Effekt handeln, bei dem es nach der Bestrahlung kurzzeitig zu einer Beeinträchtigung des Differenzierungsprozess und einer Auflösung der Struktur der Basalschicht kommt, diese sich jedoch wieder regeneriert.

4.5.5 Nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlung kommt es zu einer erhöhten Proliferation

Nach Bestrahlung kommt es ausserdem zu einer Veränderung der Proliferation (Abbildung 3.30 und 3.32). Insbesondere nach der Bestrahlung mit 0,5 Gy Röntgenstrahlung kommt es zu einer Erhöhung der Anzahl an proliferierenden Zellen. Diese unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Kontrolle und kann nur als Trend betrachtet werden. Da die entsprechenden Daten für humane Haut jedoch den gleichen Trend zeigen, kann hier vorerst von einem Niedrigdosis-effekt ausgegangen werden, der jedoch in weiteren Versuchen bestätigt werden muss.

Von Neubeck [64] zeigt in humanen Hautäquivalenten für eine Bestrahlung mit sehr niedrigen Röntgendosen nach 3 Tagen eine Abnahme der Proliferation für 0,1 Gy und 2 Gy, während es für 0,5 Gy zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Proliferation kommt. Spezifische Effekte für eine Bestrahlung mit 0,5 Gy, die sich im Vergleich zu niedrigen und höheren Dosen nicht linear verhalten, konnten auch schon in anderen Publikationen z.B. für die Bestrahlung von Zellen beobachtet werden [89], [90]. Für niedrige Dosen im Bereich von 0,03 bis 0,1 Gy schwerer Ionen wie Sauerstoff (LET: 18 keV/ μm), Neon (LET: 35 keV/ μm) und Silizium (LET: 60 keV/ μm) konnte von Neubeck [31] drei Tage nach Bestrahlung unabhängig vom verwendeten LET tendenziell eine Erhöhung der Proliferation feststellen.

Gemeinsam mit der im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Beeinträchtigung der Basalzellstruktur nach Niedrigdosisbestrahlung und der hier diskutierten Erhöhung der Proliferation

nach der selben Dosis ist es möglich, dass es sich hierbei um eine kompensatorische Proliferation handelt. Um die geordnete Struktur der Basalschicht wieder herzustellen, werden neue Zellen gebraucht. Damit könnte ebenfalls eine transiente beschleunigte Differenzierung einhergehen.

4.5.6 Insbesondere nach der Niedrigdosis Bestrahlung mit Röntgenstrahlung verändert sich die E-Cadherin-Expression

Die E-Cadherin-Expression und -Lokalisierung ist insbesondere nach der Bestrahlung mit niedrigen Dosen ebenfalls verändert (Abbildung 3.33). Während in den Kontrollen die Zellen der Basalschicht eine deutliche, zelumrandende Färbung aufweisen, die die E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte sichtbar macht, ist dies nach einer Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung nicht mehr so deutlich. Einerseits nimmt die Färbekonzentration über die gesamte Epidermis ab, andererseits ist in den Basalzellen eine veränderte Lokalisation der Färbung zu beobachten. Die Zellen sind nicht klar von einer E-Cadherin-positiven Linie umrandet, sondern die Färbung erscheint diffus um die Zelle verteilt. Dies gibt Hinweise darauf, dass die Zell-Zell-Kontakte in der Basalschicht dieser Proben verändert sind. Dieses Ergebnis passt sehr gut zu der Tatsache, dass, wie bereits diskutiert, nach diesen Bestrahlungsdosen die Morphologie der Basalzellen verändert ist. Das weist darauf hin, dass durch die Bestrahlung die Zell-Zell-Kontakte aufgelöst oder geschädigt werden, sodass es kurzfristig zu einer beschleunigten Differenzierung kommen kann, die die beschriebene strukturelle Veränderung der Basalschicht zur Folge hat. Ausserdem müssen die Zell-Zell-Kontakte zumindest teilweise aufgelöst werden, damit die Zelle proliferieren kann. Man muss an dieser Stelle jedoch beachten, dass die Anzahl an proliferierenden Zellen im Hautäquivalent insgesamt relativ gering ist, und das Fehlen der E-Cadherin-Färbung nicht allein dadurch begründet sein kann, dass es sich bei Zellen mit veränderter Färbung um proliferierende Zellen handelt. Eine Verringerung der E-Cadherin-Expression ist ausserdem auch für eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschrieben, bei der Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und die Fähigkeit der Migration erlangen [91]. Dies geht mit einem Polaritätsverlust der Zellen und einem Verlust des Kontakts zur Basalmembran einher [92]. Ob die hier beobachtete Verringerung und Delokalisierung der E-Cadherin-Expression und der Verlust der Basalzellpolarität im Zusammenhang mit EMT steht, wird momentan und in zukünftigen Experimenten zum Beispiel anhand der Expression der Transkriptionsfaktoren Slug und Snail, weiter untersucht.

4.6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit sollten die entzündungsrelevanten Effekte verschiedener Strahlenqualitäten in Modellsystemen unterschiedlicher Komplexität untersucht werden. Hierfür wurden Monokulturen von primären Keratinozyten, Co-Kulturen von Keratinozyten und Fibroblasten, humane Hautäquivalente und humane Hautexplantate verwendet. Diese Modellsysteme wurden mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlung behandelt. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss einerseits die Komplexität des Modellsystems und andererseits die Strahlenqualität hat. Ausserdem sollte untersucht werden, ob es für die Bestrahlung mit niedrigen Dosen Röntgenstrahlung oder Kohlenstoffionen von 0,5 Gy einen spezifischen Niedrigdosiseffekt gibt, der einen möglichen anti-inflammatorischen Effekt bei diesen Dosen erklären kann. Die wichtigsten Ergebnisse und Diskussionsansätze aus dieser Arbeit werden im Folgenden nochmals kurz zusammengefasst und mögliche Schlussfolgerungen daraus gezogen:

- In der hier vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Modellsysteme, einschließlich Explantate humaner Haut für die Bestrahlung etabliert werden. Humane Hautäquivalente haben sich als geeignetes System erwiesen um frühe Bestrahlungseffekte zu untersuchen. Mit entsprechenden histologischen und immunhistochemischen Färbungen, Westernblotanalysen und ELISA-Messungen konnten Aussagen über das Vorkommen von Apoptose, der Zytokinfreisetzung und der Lokalisierung verschiedener Proteine getroffen werden. Ausserdem eignen sich die Hautäquivalente mit ihrer sehr gleichmäßigen und geordneten Struktur für die Untersuchung strahleninduzierter Veränderungen der Morphologie. Mit den ersten Ergebnissen aus Versuchen mit humanen Hautexplantaten zeigte sich, dass sich die beobachteten Effekte zum Beispiel hinsichtlich der Apoptose nicht grundlegend unterscheiden. Trotzdem bieten Hautexplantate ein vollständigeres Bild der induzierten Effekte, da sie die in der Epidermis residierenden Langerhanszellen mit einbeziehen. Dies ist für manche Versuche ein Vorteil im Vergleich zu den Hautäquivalenten. Die Struktur der humanen Haut ist jedoch nicht so gleichmäßig, wie sie es in Hautäquivalenten ist, da in humaner Haut Haarfollikel vorkommen und die Haut unterschiedlich dick sein kann. Aus diesem Grund sind humane Hautexplantate für Untersuchungen, die die Struktur der Haut und die Morphologie einzelner Zellen betreffen nur bedingt geeignet. Trotzdem wurde in humaner Haut nach der Bestrahlung Parakeratose detektiert.
- Es konnte gezeigt werden, dass während dem in dieser Arbeit beobachteten Zeitraum Apoptose und Nekrose nach ionisierender Bestrahlung keine Rolle hinsichtlich einer Entzündungsreaktion spielen. Dies konnte in allen Kultursystemen für Dosen von bis zu 10 Gy Röntgenstrahlung und bis zu 2 Gy Kohlenstoffionen bestätigt werden. Auch nach niedrigen Dosen wie zum Beispiel 0,5 Gy kommt es nicht zu Apoptose einzelner Zellen. Dies zeigt, dass Apoptose und Nekrose weder hinsichtlich einer pro- noch einer anti-inflammatorischen

Wirkung eine Rolle spielen.

Für Röntgen- und Gammastrahlung werden diese Ergebnisse in der Literatur sowohl für das hier verwendete Hautäquivalent, als auch für *in vivo*-Experimente sowohl an Schweinen als auch im Rahmen einer Strahlentherapie an Menschen bestätigt. Für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen gibt es hingegen nur wenige klinische Daten aus Patientenstudien und für Hautäquivalenten gibt es gar keine Daten. Klinisch sind die Nebeneffekte zu denen es bei der Bestrahlung der Haut bei einer Strahlentherapie mit Kohlenstoffionen kommt als nicht signifikant höher als für Photonen beschrieben [30], [93], obwohl beispielsweise für die Zellinaktivierung von Monokulturen für Kohlenstoffionen eine erhöhte Effektivität im Vergleich zu Photonen beschrieben ist [94]. Hinsichtlich Apoptose und Nekrose konnte in den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls keine gesteigerte Effektivität für Kohlenstoffionen beobachtet werden.

- In allen Modellsystemen wurde durch die Bestrahlung, unabhängig von der Strahlungsart, die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1alpha, IL-6 und IL-8 erhöht. Die Effekte für die verschiedenen Strahlenqualitäten sind großteils ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrer Kinetik. Für UV-B ist ein sehr früher Effekt zu beobachten, der 48 h nach der Bestrahlung bereits abgeklungen ist, während für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen erst 48 h nach der Bestrahlungen Änderungen auftreten. Für die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung sind sowohl 24 h als auch 48 h nach Bestrahlung Änderungen zu beobachten. Der frühere Effekt nach UV-B-Bestrahlung im Vergleich zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung ist bekannt und kann durch Literaturdaten bestätigt werden [60]. Die zeitliche Einordnung der Effekte der Kohlenstoffbestrahlung in diese Kinetik konnte durch die hier vorliegenden Daten erstmals erfolgen.

Auch die Ausprägung der Zytokinfreisetzung ist für Kohlenstoffbestrahlung im Vergleich zu Röntgenbestrahlung gleich oder schwächer. Ausserdem kommt es nach ionisierender Strahlung nicht zu einer kontinuierlichen, linearen Dosisabhängigkeit, sondern insbesondere für Röntgenstrahlung bei 2 Gy und 10 Gy zu ähnlichen oder sogar für 2 Gy stärker ausgeprägten Änderungen. Dies zeigt, dass Kohlenstoffionen auch hinsichtlich der Induktion einer Entzündungsreaktion keinen größeren, sondern einen mit Röntgenstrahlung vergleichbaren Effekt haben und es ein Plateau hinsichtlich der freigesetzten Zytokinmenge gibt.

- In den Hautäquivalenten spielt nach der Bestrahlung die Struktur des Gewebes, der Differenzierungsstatus, die Morphologie der Zellen und die Proliferationsfähigkeit eine große Rolle hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase. In der hier vorliegenden Arbeit wurden erstmals strahleninduzierte strukturelle und morphologische Veränderungen quantitativ oder semi-quantitativ erfasst und können so für verschiedene Strahlenqualitäten verglichen werden. Für hohe Intensitäten UV-B Bestrahlung und die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen treten Effekte auf, die auf eine veränderte Differenzierung hinweisen.

Dies ist einerseits die Hyperkeratose, die einer beschleunigten Differenzierung entspricht und Parakeratose, die durch einen fehlerhaften Differenzierungsprozess zustande kommt. Für Röntgenbestrahlung kommt es ebenfalls zu einer beschleunigten Differenzierung, die sich in Form von Hyperkeratose widerspiegelt, jedoch größtenteils korrekt abläuft, da nach Röntgenbestrahlung nur wenig Parakeratose zu beobachten ist. Dies zeigt, dass hinsichtlich der Beschleunigung und insbesondere der Veränderung des Differenzierungsprozesses die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen im Vergleich zu Röntgenstrahlung einen deutlicheren Effekt hat.

Veränderungen in der Morphologie und Polarität der Basalzellen und der Struktur der Basalschicht wurden vorwiegend und am ausgeprägtesten für niedrige Dosen, insbesondere 0,5 Gy Röntgenstrahlung, beobachtet. Es kann sich hierbei um einen Niedrigdosiseffekt handeln. Die Basalzellstruktur verändert sich, was die Homöostase der Haut beeinträchtigen kann, unter Umständen aber nur ein transienter Effekt ist, der im Laufe der weiteren Proliferation und Differenzierung wieder ausgeglichen werden kann. Bei hohen Dosen kommt es ebenfalls zu einer Veränderung in der Basalschicht, diese ist jedoch nicht so ausgeprägt, da die Zellen eine beschleunigte Differenzierung durchlaufen, was letztendlich zu einer Verdickung des *stratum corneum* führt. In diesem Fall läuft die Differenzierung zwar schneller, jedoch korrekt ab. Bei einer weiteren Erhöhung der Dosis bzw. bei der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen kommt es zu einer so starken Beschleunigung des Differenzierungsprozesses, dass dieser nicht mehr korrekt ablaufen kann und es zur Parakeratose kommt.

Dies würde bedeuten, dass in diesem Fall die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen einen höheren Effekt hat als die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Eine beschleunigte und fehlerhaft ablaufende Differenzierung stört die Homöostase der Haut und könnte deren Barrierefunktion beeinträchtigen, was zu einer unter Umständen später auftretenden Entzündungsreaktion beitragen kann.

- Für niedrige Dosen, insbesondere für 0,5 Gy, konnte sowohl eine veränderte E-Cadherin-Expression und Lokalisierung als auch eine erhöhte Proliferation beobachtet werden. Hierbei kann es sich ebenfalls um eine schwache Form des veränderten Differenzierungsprozesses, der bei höheren Dosen zu Hyperkeratose und Parakeratose führt, handeln. Durch die erhöhte Proliferation könnte die Homöostase des Gewebes aufrecht erhalten werden, indem die korrekte palisadenartige Struktur der Basalschicht mit Hilfe von neuen Zellen wieder hergestellt wird. Auch hier kommt es durch die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen nicht zu einem ausgeprägteren Effekt.
- In den vorliegenden Ergebnissen wird ausserdem deutlich, dass die jeweiligen Merkmale wie zum Beispiel die Freisetzung von HMGB1 oder pro- bzw. anti-inflammatorischen Zytokinen nach mit zunehmender Komplexität des Modellsystems schwächer ausgeprägt sind.

Dies ist sowohl in den Kontrollen der jeweiligen Modellsysteme als auch nach Bestrahlung der Fall. Dies zeigt, dass Systeme, die eine dreidimensionale Struktur aufweisen und die Zellkommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten ermöglichen deutlich stabiler sind, als eindimensionale Systeme und legt nahe, dass für das Verständnis von Bestrahlungseffekten auf die humane Haut dreidimensionale Modellsysteme, wie Hautäquivalente und Hautexplantate notwendig sind, um die *in vivo* so gut wie möglich nachzustellen und ein möglichst realistisches Bild der Effekte zu bekommen.

4.7 Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Modellsysteme etabliert und für die Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, Kohlenstoffionen und UV-B-Strahlen optimiert. Hierbei hat sich gezeigt, dass das humane Hautäquivalent EFT400 geeignet ist, um frühe Bestrahlungseffekte in der Haut zu untersuchen. Es konnten viele quantitative und semiquantitative Auswertungsmethoden für verschiedene Merkmale etabliert werden. In den hier gezeigten Proben konnte auch eine Veränderung der E-Cadherin-Expression beobachtet werden. Um diese ebenfalls quantitativ erfassen zu können wird im Moment im Rahmen einer Bachelorarbeit eine Auswertemethode für E-Cadherin-Färbungen etabliert, mit der sowohl die Färbeintensität der Epidermis als auch der Basalschicht erfasst werden kann. Mit Hilfe dieser Methode konnte bereits für ein Experiment bestätigt werden, dass die Intensität der E-Cadherin-Färbung nach der Bestrahlung mit UV-B signifikant abnimmt. Die Auswertung wird im Rahmen der Bachelorarbeit für weitere Experimente und Strahlenqualitäten durchgeführt.

Die Kultivierung humaner Hautexplantate konnte erfolgreich etabliert und erste Bestrahlungsexperimente durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur ein Teil der mit humaner Haut durchgeführten Versuche ausgewertet werden. Ausserdem sollen die für die Hautäquivalente etablierten Methoden zur quantitativen Auswertung verschiedener Merkmale für die Auswertung der Experimente mit humaner Haut optimiert werden.

Mit Hilfe dieser Daten kann ein recht vollständiger Überblick über die Effekte aller drei verwendeten Strahlungsarten auf die verschiedenen Modellsysteme gegeben werden, der so vorher in publizierten Daten nicht zur Verfügung stand. Diese sind insbesondere für die Optimierung der Strahlentherapie hilfreich, da in diesem Fall ebenfalls gesunde Haut des Patienten bestrahlt wird.

Um jedoch die anti-inflammatorischen Effekte der Niedrigdosisbestrahlung besser verstehen zu können, wäre es wünschenswert ein Modellsystem für humane Haut zu etablieren, welches Merkmale einer chronischen Entzündung aufweist. Eine Möglichkeit hierfür wäre humane Hautexplantate mit pro-inflammatorischen Zytokinen zu kultivieren und so eine Entzündungsreaktion zu stimulieren [48]. Im nächsten Schritt soll ein weiterer Ethikantrag gestellt werden, der es ermöglicht Biopsien humaner Haut von Psoriasis- oder Neurodermitis-Patienten zu kul-

tivieren. Bei diesen Krankheiten liegt eine dauerhafte Stimulierung des Immunsystems und daraus resultierende chronische Entzündung vor. Beide Erkrankungen stehen auf der Indikationsliste für eine Radonbehandlung [24], und sorgen erfahrungsgemäß für eine Linderung der Symptome bei den betreffenden Patienten. Es gibt jedoch weder für die Behandlung von Psoriasis noch für Neurodermitis bzw. atopische Dermatitis aussagekräftige Daten in der Literatur in denen dieser Effekt beschrieben oder gar erklärt wird. Aus diesem Grund wäre es sehr aufschlussreich ein Modellsystem für diese Erkrankungen zu etablieren und dieses unter definierten Bedingungen in der Radonkammer der GSI zu bestrahlen. Diese Daten könnten Aufschluss über die Wirkung niedriger Dosen Alphastrahlung geben und zur Aufklärung und dem Verständnis der anti-inflammatorischen Wirkung niedriger Bestrahlungsdosen beitragen.



Literaturverzeichnis

- [1] P. Kolarsick, M. A. Kolarsick, and C. Goodwin. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4):203–213, July 2011.
- [2] G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele, and W. Declercq. Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of Cell Biology*, 180(3):451–8, February 2008.
- [3] D. Raj, D. Brash, and D. Grossman. Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Development and Disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(2):243–257, 2006.
- [4] D. Chu. Overview of biology, development, and structure of skin. *Fitzpatrick's Dermatology in general Medicine*, 7th ed.:57–73, 2008.
- [5] A.R. Haake and K. Hallbrook. The structure and development of skin. *Fitzpatrick's Dermatology in general Medicine*, 5th ed.:70–111, 1999.
- [6] I. Moll. Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. *Cell and Tissue Research*, 277(1):131–138, 1994.
- [7] P. Stoitzner, K. Pfaller, H. Stoessel, and N. Romani. A Close-Up View of Migrating Langerhans Cells in the Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 118(4):117–125, 2002.
- [8] M. C. Udey. Cadherins and Langerhans cell immunobiology. *Clinical and Experimental Immunology*, 123(1):6–8, 1997.
- [9] N. Romani, B. E. Clausen, and P. Stoitzner. Langerhans cells and more : langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Annual Review of Immunology*, 234(1):120–141, 2010.
- [10] I. Eke and N. Cordes. Radiobiology goes 3D: how ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 99(3):271–8, June 2011.
- [11] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology*, 106(March):761–771, 1988.
- [12] T. A. Lehman, R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W. Bennett, J. A. Welsh, R. A. Metcalf, M. R. Stampfer, N. Fusenig, E. M. Rogan, and C. C. Harris. p53 Mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, 14(5):833–839, 1993.
- [13] L. Segal, D. Riedel, and L. Ritter. Evaluation of normal human Epidermal Keratinocyte Cultures as a Test System for the Assessment of the dermal Irritancy of Pesticides. *Toxicology in Vitro*, 4(4/5):277–279, 1990.
- [14] R. K. Ward, S. Agrawalla, and R. H. Clothier. Investigation of an in vitro Cytotoxicity Assay for Prediction of Skin Irritation. *Toxicology in Vitro*, 8(4):659–660, 1994.
- [15] I. Poole and S. T. Boyce. Keratinocytes suppress transforming growth factor-beta1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes. *British Journal of Dermatology*, 140:409–416, 1999.

-
- [16] R. Osborne and M. A. Perkins. In Vitro Skin Irritation Testing with Human Skin Cell Cultures. *Toxicology in Vitro*, 5(5/6):563–567, 1991.
- [17] F. Grinnell. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in Cell Biology*, 13(5):264–269, 2003.
- [18] M. Schreiner, M. Peiser, D. Briechle, R. Stahlmann, T. Zuberbier, and R. Wanner. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy*, 62(13):1419–1428, 2007.
- [19] K. Ouwehand, S. W. Spiekstra, T. Waaijman, R. J. Scheper, T. D. de Gruijl, and S. Gibbs. Technical Advance : Langerhans cells derived from a human cell line in a full-thickness skin equivalent undergo allergen-induced maturation and migration. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(November):1027–1033, 2011.
- [20] V. Laubach, N. Zöller, M. Rossberg, K. Görg, S. Kippenberger, J. Bereiter-Hahn, R. Kaufmann, and A. Bernd. Integration of Langerhans-like cells into a human skin equivalent. *Archives Dermatological Research*, 303:135–139, 2011.
- [21] M. Peiser, R. Wanner, and G. Kolde. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking.pdf. *Journal of Leukocyte Biology*, 76:616– 622, 2004.
- [22] P. Azama, J.-L. Peiffera, D. Chamousseta, M.-H. Tissiera, P.-A. Bonneta, L. Vianb, I. Fabrea, and J.-C. Ourlina. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212(1):14–23, 2006.
- [23] E. H. Hall and A. J. Giaccia. Radiobiology for the Radiologist. *Lippincott Williams & Wilkins*, Sixth Edit:ISBN-13: 978-0-7817-4151-4, 2006.
- [24] Gasteiner Kur- Reha- und Heilstollen Betriebsges.m.b.H. Indikationen zur Radon-Therapie und der Heilstollentherapie. www.gasteiner-heilstollen.com, Stand: 30.07.2015.
- [25] P. Deetjen, A. Falkenbach, D. Harder, H. Jöckel, A. Kaul, and H. von Philipsborn. Radon als Heilmittel. *Verlag Dr. Kovac, Hamburg*, 2005.
- [26] A. Falkenbach, J. Kovacs, A. Franke, K. Jörgens, and K. Ammer. Radon therapy for the treatment of rheumatic diseases-review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Rheumatology International*, 25(3):205–210, 2005.
- [27] B. Frey, S. Hehlhans, F. Rödel, and U.S. Gaipl. Modulation of inflammation by low and high doses of ionizing radiation: Implications for benign and malignant diseases. *Cancer Letters*, 2015.
- [28] F. Rödel, B. Frey, K. Manda, G. Hildebrandt, S. Hehlhans, L. Keilholz, M. H. Seegenschmiedt, U. S. Gaipl, and C. Rödel. Immunomodulatory properties and molecular effects in inflammatory diseases of low-dose X-irradiation. *Frontiers in Oncology*, 2(September):1–9, 2012.
- [29] M. Scholz. Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues. *Advances in Polymer Science*, 162, 2003.

-
- [30] T. Zacharias, W. Dorr, W. Enghardt, T. Haberer, M. Kramer, R. Kumpf, H. Rothig, M. Scholz, U. Weber, G. Kraft, and T. Herrmann. Acute Response of Pig Skin to Irradiation with 12C-ions or 200 kV X-rays. *Acta Oncologica*, 36(6):637–642, 1997.
- [31] C. von Neubeck, M. J. Geniza, P. M. Kauer, R. J. Robinson, W. B. Chrisler, and M. B. Sowa. The effect of low dose ionizing radiation on homeostasis and functional integrity in an organotypic human skin model. *Mutation Research*, 775:10–18, May 2015.
- [32] E. Maverakis, Y. Miyamura, M. P. Bowen, G. Correa, and H. Goodarzi. Light, Including Ultraviolet. *Journal of Autoimmunity*, 34(3):J247– J257, 2010.
- [33] F. Aubin. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *European Journal of Dermatology*, 13(December):515–523, 2003.
- [34] T. Schwarz. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *The Keio Journal of Medicine*, 54(4):165–171, 2005.
- [35] K. R. Stein, D. Pearce, and S. R. Feldman. Targeted UV therapy in the treatment of psoriasis. *Journal of Dermatological Treatment*, 19:141–145, 2008.
- [36] S. L. Fink and B. T. Cookson. Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73(4):1907–1916, 2005.
- [37] S. Lippens, G. Denecker, P. Ovaere, P. Vandenabeele, and W. Declercq. Death penalty for keratinocytes : apoptosis versus cornification. *Cell Death and Differentiation*, 12:1497–1508, 2005.
- [38] M. Rendl, J. Ban, P. Mrass, C. Mayer, B. Lengauer, L. Eckhart, W. Declercq, and E. Tschachler. Caspase-14 Expression by Epidermal Keratinocytes is Regulated by Retinoids in a Differentiation-associated Manner. *The Society for Investigative Dermatology*, 119(5):1150–1155, 2002.
- [39] F. O. Nestle, P. D. Meglio, J. Z. Qin, and B. J. Nickoloff. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(10):679–691, 2009.
- [40] L. M. Johnson-Huang, M. A. Lowes, and J. G. Krueger. Putting together the psoriasis puzzle : an update on developing targeted therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 5:423–433, 2012.
- [41] M. A. Lowes, A. M. Bowcock, and J. G. Krueger. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature Reviews*, 445(February):866–873, 2007.
- [42] K. Kim. Influences of Environmental Chemicals on Atopic Dermatitis. *Toxicological research*, 31(2):89–96, June 2015.
- [43] M. Stange. Morphologische und biochemische Analyse entzündungsmodulierender Effekte in Co- Kulturen von Hautzellen nach ionisierender und nicht-ionisierender Strahlung. *Bachelorarbeit; Hochschule Darmstadt Fachbereich Chemie- und Biotechnologie und GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung*, 2012.
- [44] R. E. Voll, M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, and J. R. Kalden. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390:360–361, 1997.
-

-
- [45] W. J. Chen, M. E. Frank, W. Jin, and S. M. Wahl. TGF- β Released by Apoptotic T Cells Contributes to an Immunosuppressive Milieu. *Immunity*, 14(6):715–725, June 2001.
- [46] C. W. Bell, W. Jiang, C. F. Reich, and D. S. Pisetsky. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *American Journal of Physiology*, 291(6):C1318–25, December 2006.
- [47] S. Werner, T. Krieg, and H. Smola. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 127(5):998–1008, May 2007.
- [48] E. Donetti, L. Cornaghi, A. Gualerzi, F. W. Baruffaldi Preis, and F. Prignano. An innovative three-dimensional model of normal human skin to study the proinflammatory psoriatic effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-17. *Cytokine*, 68(1):1–8, July 2014.
- [49] E. Donetti, M. Bedoni, E. Boschini, E. Bertelli, C. Sforza, and N. Gagliano. Early epidermal response after a single dose of gamma-rays in organotypic culture of human breast skin. *The British Journal of Dermatology*, 153(5):881–6, November 2005.
- [50] R. Hofmann-Wellenhof, A. Smolle, A. Roschger, D. Strunk, M. Hubmer, F. Quehenberger, M. Horn, H. Kerl, and P. Wolf. Sunburn Cell Formation , Dendritic Cell Migration , and Immunomodulatory Factor Production After Solar-Simulated Irradiation of Sunscreen-Treated Human Skin Explants In Vitro. *The Journal of Investigative Dermatology*, pages 781–787, 2004.
- [51] P. Stoitzner, M. Zanella, U. Ortner, M. Lukas, A. Tagwerker, K. Janke, M. B. Lutz, G. Schuler, B. Echtenacher, B. Ryffel, F. Koch, and N. Romani. Migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures : augmentation by TNF-alpha and IL-1beta. *Journal of Leukocyte Biology*, 66:462–470, 1999.
- [52] F. J. Berkey. Managing the Adverse Effects of Radiation Therapy. *American Academy of Family Physicians.*, 82(4):381–388, 2010.
- [53] N. Maas-Szabowski, È. Stark, and N. E. Fusenig. Keratinocyte Growth Regulation in Defined Organotypic Cultures Through IL-1-Induced Keratinocyte Growth Factor Expression in Resting Fibroblasts. *The Society for Investigative Dermatology*, 11(6):1075–1084, 2000.
- [54] T. Matsumura, H. Hayashi, T. Takii, C. F. Thorn, A. S. Whitehead, J. Inoue, and K. Onozaki. TGF-beta down-regulates IL-1alpha-induced TLR2 expression in murine hepatocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 75:1056–1061, 2004.
- [55] Lian. L-1alpha is a potent stimulator of keratinocyte tissue plasminogen activator expression and regulated by TGF-beta1. *Archives Dermatological Research*, 300(4):185–193, 2008.
- [56] D. Keh, T. Boehnke, S. Weber-Cartens, C. Schulz, O. Ahlers, S. Bercker, H. Volk, W.-D. Doecke, K. J. Falke, and H. Gerlach. Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(4):512–20, February 2003.

-
- [57] T. Jakob and M. C. Udey. Regulation of E-Cadherin-Mediated Adhesion in Langerhans Cell-Like Dendritic Cells by Inflammatory Mediators That Mobilize Langerhans Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*, 1998.
- [58] C. P. Larsen, R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris, and J. M. Austyn. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(November):1483–1493, 1990.
- [59] C. Allen, TB Borak, H. Tsujii, and JA Nickoloff. Heavy charged particle radiobiology: using enhanced biological effectiveness and improved beam focusing to advance cancer therapy. *Mutation Research*, 711(1-2):150–157, 2011.
- [60] C. Petit-Frere, E. Capulas, D. A. Lyon, C. J. Norbury, J. E. Lowe, P. H. Clingen, E. Riballo, M. H. Green, and C. F. Arlett. Apoptosis and cytokine release induced by ionizing or ultraviolet B radiation in primary and immortalized human keratinocytes. *Carcinogenesis*, 21(6):1087–1095, 2000.
- [61] Ingela Turesson, Jan Nyman, Fredrik Qvarnström, Martin Simonsson, Majlis Book, Ingegerd Hermansson, Sunna Sigurdardottir, and Karl-Axel Johansson. A low-dose hypersensitive keratinocyte loss in response to fractionated radiotherapy is associated with growth arrest and apoptosis. *Radiotherapy and Oncology*, 94:90–101, 2010.
- [62] Y. Su, J. A. Meador, C. R. Geard, and A. S. Balajee. Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system. *Experimental Dermatology*, 19(8):1–14, 2010.
- [63] E. Ahmed, D. Agay, G. Schrock, M. Drouet, V. Meineke, and H. Scherthan. Persistent DNA damage after high dose in vivo gamma exposure of minipig skin. *PLoS one*, 7(6):e39521, January 2012.
- [64] C. von Neubeck, H. Shankaran, N. J. Karin, P. M. Kauer, W. B. Chrisler, X. Wang, R. J. Robinson, K. M. Waters, S. C. Tilton, and M. B. Sowa. Cell type-dependent gene transcription profile in a three-dimensional human skin tissue model exposed to low doses of ionizing radiation: implications for medical exposures. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(4):247–259, 2012.
- [65] S. M. Varnum, D. L. Springer, M. E. Chaffee, K. Lien, B. M. Webb-Robertson, K. Waters, and C. Sacksteder. The effects of low-dose irradiation on inflammatory response proteins in a 3D reconstituted human skin tissue model. *Radiation Research*, 178(6):591–9, December 2012.
- [66] E. R. Lee, J.-H. Kim, Y.-J. Kang, and S.-G. Cho. The Anti-apoptotic and Anti-oxidant Effect of Eriodictyol on UV-Induced Apoptosis in Keratinocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(1):32–37, 2007.
- [67] S. Lippens, E. Hoste, P. Vandenabeele, P. Agostinis, and W. Declercq. Cell death in the skin. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 14(4):549–69, April 2009.
- [68] F. Lin, J. Lin, R. D. Gupta, J. A. Tournas, J. A. Burch, A. M. Selim, N. A. Monteiro-Riviere, J. M. Grichnik, J. Zielinski, and S. R. Pinnell. Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins

-
- C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, (125):826–832, 2005.
- [69] H. Kandarova, A. Armento, G. Stolper, C. Cooney, M. Li, and P.J. Hayden. PARP-1 Activity is involved in the Solar UV-Induced Cutaneous Inflammatory Response in the EpiDerm-FT In Vitro Human Skin Model. *SOT 2011*, Abstract #:1–4, 2011.
- [70] J. Qin, V. Chaturvedi, M. Denning, P. Bacon, J. Panella, D. Choubey, and B. J. Nickolo. Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis , psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene*, 21:2991–3002, 2002.
- [71] K. Mueller and V. Meineke. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Experimental Hematology*, 35:96–104, 2007.
- [72] J. Breger, L. Baeva, A. Agrawal, E. Shindell, and D. E. Godar. UVB-Induced Inflammatory Cytokine Release, DNA Damage and Apoptosis oh Human Oral Compared to Skin Tissue Equivalents. *Photochemistry and Photobiology*, 89(3):665–70, 2013.
- [73] C. M. Arroyo, D. L. Burman, R. E. Sweeney, C. A. Broomfield, M. C. Ross, and B. E. Hackley. Neutralization effects of interleukin-6 (IL-6) antibodies on sulfur mustard (HD) -induced IL-6 secretion on human epidermal keratinocytes . *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17:87–94, 2004.
- [74] E. Schmidt, S. Reimer, N. Kruse, S. Jainta, E.-B. Bro, M. P. Marinkovich, G. J. Giudice, and D. Zillikens. Autoantibodies to BP180 Associated with Bullous Pemphigoid Release Interleukin-6 and Interleukin-8 from Cultured Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 115:842–848, 2000.
- [75] E. Schmidt, S. Reimer, N. Kruse, E.-B. Bröcker, and D. Zillikens. The IL-8 release from cultured human keratinocytes , mediated by antibodies to bullous pemphigoid autoantigen 180 , is inhibited by dapsone. *Clinical and Experimental Immunology*, 124:157–162, 2001.
- [76] Y. Shiraki, Y. Ishibashi, M. Hiruma, A. Nishikawa, and S. Ikeda. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during Trichophyton tonsurans and Arthroderma benhamiae infections. *Journal of Medical Microbiology*, 55:1175–1185, 2006.
- [77] G. Han, F. Li, T. P. Singh, P. Wolf, and X. Wang. The Pro-inflammatory Role of TGF β 1 : A Paradox ? *International Journal of Biological Science*, 8(2):228–235, 2012.
- [78] A. Gruchlik, M. Jurzak, and E. W. A. Chodurek. Effect of GLY-GLY-HIS , GLY-HIS-LYS and their Copper Complexes on TNF- α -dependent IL-6 Secretion in Normal Human Dermal Fibroblasts. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(6):1303–1306, 2012.
- [79] C. Gabay, C. Lamacchia, and G. Palmer. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(April), 2010.
- [80] C. A. Dinarello, A. Simon, and J. W. van der Meer. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(8):633–652, 2013.

-
- [81] P. Rubin, C. J. Johnston, J. P. Williams, S. McDonald, and J. N. Finkelstein. A perpetual Cascade of Cytokines postirradiation leads to pulmonary Fibrosis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 33(1):99–109, 1995.
- [82] M. Koike, T. Shiomi, and A. Koike. Identification of Skin Injury-related Genes Induced by Ionizing Radiation in Human Keratinocytes using cDNA Microarray. *Journal of Radiation Research*, 46(2):173–184, 2005.
- [83] G. E. Woloschak, P. S. Jones, and C. A. Jones. Modulation of Gene Expression in Syrian Hamster Embryo Cells following Ionizing Radiation1. *Cancer Research*, 50:339–344, 1990.
- [84] S. Kondo, D. N. Sauder, T. Kono, K. A. Galley, and R. C. McKenzie. Differential modulation of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human epidermal keratinocytes by UVB. *Experimental Dermatology*, 1:29–39, 1994.
- [85] A. Mezentsev and S. Amundson. Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model. *Radiation Research*, 175(6):677–88, June 2011.
- [86] J. Song and C. R. Shea. Benign versus malignant parakeratosis: a nuclear morphometry study. *Modern Pathology*, 23(6):799–803, June 2010.
- [87] F. Bernerd and D. Asselineau. Successive Alteration and Recovery of Epidermal Differentiation and Morphogenesis after Specific UVB-Damages in Skin Reconstructed in Vitro. *Developmental Biology*, 138:123–138, 1997.
- [88] P. E. Elsner. Psoriasis: Diagnostisches und therapeutisches Management. *Thieme Verlag*, 1. Auflage:ISBN-13: 978-3131477118, 2009.
- [89] M. Large, S. Reichert, S. Hehlhans, C. Fournier, C. Rödel, and F. Rödel. A non-linear detection of phospho-histone H2AX in EA.hy926 endothelial cells following low-dose X-irradiation is modulated by reactive oxygen species. *Radiation Oncology*, 9(80):1–8, 2014.
- [90] M. Large, S. Hehlhans, S. Reichert, U. S. Gaipf, C. Fournier, C. Rödel, C. Weiss, and F. Rödel. Study of the anti-inflammatory effects of low-dose radiation. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2015.
- [91] T. Bhatt, A. Rizvi, S. Prakash, R. Batta, S. Kataria, and C. Jamora. Signaling and Mechanical Roles of E-cadherin. *Cell Communication and Adhesion*, pages 1–11, 2013.
- [92] S. Etienne-Manneville. Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene*, 27:6970–6980, 2008.
- [93] J. G. Rieber, K. A. Kessel, O. Witt, W. Behnisch, A. E. Kulozik, J. Debus, and S. E. Combs. Treatment tolerance of particle therapy in pediatric patients. *Acta Oncologica*, 54(7):1049–55, 2015.
- [94] W. Weyrather, S. Ritter, M. Scholz, and G. Kraft. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *International Journal of Radiation Biology*, 75(11):1257–64, 1999.

Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
Caspase	zytosolische aspartat-spezifische Cysteinprotease
cl	Proteinfragment (<i>cleaved</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CPD	Geamtzahl der Populationsverdopplungen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
ELISA	enzym-linked immuno-sorbent assay
EMEM	Eagle's minimal essential medium
eV	Elektronenvolt
FBS	fötale Kälberserum
fl	ungespaltenes Protein (<i>full length</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h	Stunde
H&E-Färbung	Hematoxylin-Eosin-Färbung
HaCaT	immortale Keratinozyten-Zelllinie
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HRP	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
J	Joule
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LET	linearer Energietransfer
m	Meter
mA	Milliampere
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minute
mJ	Millijoule
μm	Mikrometer
N	Anzahl der unabhängigen Experimente
n	Gesamtzahl der Proben aus allen unabhängigen Experimenten
NHDF	primäre humane Hautfibroblasten

NHEK	primäre humane Keratinozyten
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PK	Positivkontrolle
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIS	Schwerionensynchrotron
UV	ultraviolett
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

Publikationsliste

Veröffentlichungen

- 2015 Influence of charged particle irradiation on cell death and proliferation of epidermal cells investigated in different model systems of human skin; Simoniello P., Wiedemann J., Zink J., Stange M., Thoennes E., Kovacs M., Podda M., Durante M., Fournier C.; *Frontiers in Oncology*; (Abstrakt angenommen; Manuskript in Vorbereitung, Einreichung bis 31.08.15)
- 05/2015 Radiation response related to inflammation and differentiation in human skin; Wiedemann J., Simoniello P., Thoennes E., Benzer A., Durante M., Kovacs M., Podda M., Fournier C.; *GSI Scientific report 2014*
- 05/2014 Inflammation-related response to irradiation in different human skin culture systems; Wiedemann J., Simoniello P., Madl L., Thoennes E., Durante M., Podda M., Fournier C.; *GSI Scientific report 2013*
- 05/2013 Apoptotic response to ionizing radiation in human skin cells; Simoniello P., Wiedemann J., Stange M., Zink J., Durante M., Fournier C.; *GSI Scientific report 2012*
- 05/2013 Testing of a 3D-human skin equivalent for radiation experiments; Wiedemann J., Simoniello P., Madl L., Durante M., Fournier C.; *GSI Scientific report 2012*

Konferenzbeiträge

- 10/2015 Influence of charged particle irradiation on cell death, proliferation and differentiation in different model systems of human skin; Wiedemann J., Simoniello P., Thoennes E., Benzer A., Petschick K., Kovacs M., Durante M., Podda M., Fournier C.; 18th Annual Meeting of the GBS; Dresden; (Abstrakt eingereicht)
- 05/2015 Radiation response related to inflammation and differentiation in the human skin; Simoniello P., Wiedemann J., Thoennes E., Benzer A., Durante M., Podda M., Fournier C.; 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan
- 09/2014 Inflammation-related response to irradiation in different model systems of skin; Wiedemann J., Simoniello P., Thoennes E., Durante M., Podda M., Fournier C.; 17th Annual Meeting of the GBS; Tübingen; (Poster)
- 09/2014 Inflammation-related response to irradiation in different human skin culture systems; Simoniello P., Wiedemann J., Thoennes E., Durante M., Podda M., Fournier C.; European Radiation Research Society, 41st Annual Meeting, Rhodos (Poster)
- 09/2013 Inflammation-related response to ionizing irradiation studied in a 3D human skin model; Wiedemann J., Simoniello P., Stange M., Madl L., Durante M., Fournier C.; 16th Annual Meeting of the GBS; Darmstadt; (Poster)

-
- 03/2013 Inflammation related response to ionizing irradiation in human skin cells; Wiedemann J., Zink J., Simoniello P, Stange M., Alphonse G., Rodriguez-Lafrasse C., Durante M., Fournier C.; 17th International AEK Cancer Congress; (Poster)
- 09/2012 Inflammation related response to ionizing irradiation in human skin cells; Wiedemann J., Zink J., Simoniello P, Stange M., Alphonse G., Rodrigue-Lafrasse C., Durante M., Fournier C.; 15th Annual Meeting of the GBS; München; (Poster)

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Julia Wiedemann
Geburtsdatum	13.03.1986
Geburtsort	Speyer

Ausbildung und Berufserfahrung

Seit 04/2012	TU Darmstadt, GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung Promotion am Fachbereich Biologie als Stipendiatin des GRK 1657 zu dem Thema: "Untersuchung von entzündungsrelevanter Kommunikation nach Bestrahlung in einem 3D-Haut-Modell"
03/2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Entwicklungsbiologie und Neurogenetik (Prof. Dr. P. G. Layer)
01/2011-10/2011	Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie und Neurogenetik der Technischen Universität Darmstadt zu dem Thema: "Der Einfluss von BDNF auf die Retinogenese im Huhn"
2005-2011	Diplomstudium Biologie Technische Universität Darmstadt
2002-2005	Carl-Theodor-Schule Schwetzingen, Wirtschaftsgymnasium Abschluss: Abitur
1996-2002	Theodor-Heuss-Realschule Hockenheim Abschluss: Mittlere Reife
1992-1996	Albert-Schweitzer Grund- und Hauptschule Altlußheim

Danke!

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 2012 bis Juli 2015 in der Abteilung Biophysik an der GSI Darmstadt im Rahmen des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 1657 durchgeführt und wurde außerdem vom BMBF geförderten Projekt *GREWIS* (02NUK017A) unterstützt. Für die Möglichkeit diese Arbeit an der GSI durchführen zu können und für die Übernahme des Erstgutachtens möchte ich Herrn Prof. Dr. Marco Durante recht herzlich danken.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Paul Layer nicht nur dafür, dass er sich als Zweitgutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat, sondern auch für die Vermittlung an die GSI, für das Interesse an dieser Arbeit, für die seit meinem Studium anhaltende Unterstützung und dafür, dass ich mich in der "AG Layer" noch sehr lange zuhause fühlen durfte.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Claudia Fournier einerseits für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Möglichkeit im Rahmen des GRKs promovieren zu können und andererseits für die kompetente Betreuung dieser Arbeit und für die immerwährende Diskussionsbereitschaft, die immer für neue Ideen und Ansätze für dieses Projekt sorgte.

Für die direkte Betreuung und Zusammenarbeit im Labor, die Einweisung in die Geheimnisse des Westernblots und die vielen hilfreichen Diskussionen möchte ich mich bei Frau Dr. Palma Simoniello bedanken. *Grazie mille, Palmina!*

Außerdem geht ein herzliches Dankeschön an alle Bachelor- und MasterstudentInnen und PraktikantInnen, die zeitweise mit an diesem Thema gearbeitet haben und somit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Dies sind namentlich Joana Zink, Maike Stange, Lorenz Mardl, Eva Thönnies, Aylin Benzer, Kristin Petschick und Cosima Caliendo. Besonders bedanken möchte ich mich bei Eva Thönnies, die sowohl als Bachelorstudentin als auch als TA in unserer Arbeitsgruppe dieses Projekt tatkräftig unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich ausserdem bei der Hautklinik Darmstadt, insbesondere bei Herrn PD Dr. Podda und Herrn Kovacs, für die Zusammenarbeit und die Überlassung der Hautproben.

Für die Organisation der Strahlzeiten und vorallem für die Berücksichtigung unserer vielen Sonderwünsche geht ein besonderer Dank an Herrn Dr. Michael Scholz und Herrn Dr. Thomas Friedrich. Außerdem möchte ich mich beim gesamten Team des HITs in Heidelberg dafür bedanken, dass wir dort bestrahlen durften.

Für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei der ganzen *Entzündungsgruppe*, als auch bei allen Kollegen aus dem Annex-Gebäude bedanken. Es hat Spaß gemacht mit euch zu arbeiten!

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Dr. Andreas Maier für das Korrekturlesen dieser Arbeit und insbesondere dafür, dass er mich die letzten Monate ertragen hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken und dafür, dass sie mir dieses ermöglicht haben.

Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 04.08.2015