

Untersuchung der Auswirkung von
ionisierender Strahlung und Verwundung
auf die Expression zellularer Adhäsions-
moleküle in einem neuentwickelten
dreidimensionalen *in vitro*-Hautmodell

Tamara Arend

Aus dem Institut für Radiobiologie
der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
Direktor: Prof. Dr. med. D. van Beuningen

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. D. van Beuningen

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Schmahl

Untersuchung der Auswirkung von
ionisierender Strahlung und Verwundung
auf die Expression zellularer Adhäsions-
moleküle in einem neuentwickelten
dreidimensionalen *in vitro*-Hautmodell

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Tamara Arend
aus Gschwend

München 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Schmahl
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. E. Kienzle

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

In Bewegung

Wir Menschen wollen alle
Etwas
Bewegen.
Doch was ist schöner als
Von Etwas
Bewegt zu werden?

Florian Kahl, aus „Es“, 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand der Forschung	3
2.1	Die Haut	3
2.1.1	Aufbau und Organisation der kutanen Epidermis	3
2.1.2	Proliferation	5
2.1.3	Das Ki-67 Protein	6
2.1.4	Strahlungsinduzierte Regulationsstörungen des Zellzyklus'	7
2.2	Organotypische Co-Kulturen	8
2.2.1	Hautäquivalente	8
2.2.2	Techniken zur Kultivierung von Hautäquivalenten	9
2.3	Die Extrazelluläre Matrix (EZM)	11
2.4	Humane adulte Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT)	11
2.5	Zelluläre Interaktionen von Epithelzellen und Fibroblasten	12
2.6	Zytokine	13
2.7	Wundheilung	13
2.7.1	Wundheilung mit Thrombozytenaktivierung	14
2.7.2	Wundheilung ohne Thrombozytenaktivierung	14
2.7.3	Mesenchymale Zellmigration und Proliferation	15
2.7.4	Neoangiogenese	15
2.7.5	Reepithelisation	15
2.7.6	Wundkontraktion und Narbenbildung	16
2.8	Das kutane Strahlensyndrom	16
2.8.1	Stadien der kutanen Strahlenreaktion	16
2.8.2	Pathologie der Strahlenreaktion im Normalgewebe	17
2.9	Transforming Growth Factor- β (TGF β)	18
2.9.1	TGF β als multifunktionaler WF	19
2.10	Der TGF β -Rezeptor (TGF β R)	20
2.10.1	Endoglin (CD 105)	21
2.11	Keratinocyte Growth Factor (KGF)	22
2.11.1	KGF in der Wundheilung	23
2.11.2	KGF und Bestrahlung	25
2.12	Zelluläre Adhäsionsmoleküle	25

2.13	Immunglobulinsuperfamilie	26
2.13.1	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM)	26
2.13.2	ICAM-1 in Entzündungsreaktionen	27
2.13.3	ICAM-1 nach ionisierender Bestrahlung	28
2.14	Integrine	29
2.14.1	Das β 1-Integrin oder CD29	30
2.14.2	Das α 5 β 1-Integrin (CD49e)	31
2.14.3	Das α 2 β 1-Integrin (CD49b)	31
2.15	Zytokeratine (CK)	32
2.15.1	Zytokeratine als Differenzierungsmarker in normaler Epidermis	33
2.15.2	Zytokeratinexpression von HaCaT-Zellen	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Herkunft und Art der Zelllinien und des Biopsiematerials sowie deren Subkultivierung	35
3.1.1	Human Dermal Fibroblasts adult (HDFa)	35
3.1.2	HaCaT-Keratinocyten	35
3.1.3	Spalthaut	36
3.2	Wachstumskurven	36
3.2.1	Präparierung der Zellkulturen	36
3.2.2	Bestrahlung der Zellen	37
3.2.3	Ermittlung der Zellzahl	37
3.2.4	Auswertung der Wachstumskurven (lineare Regression)	37
3.3	Anzüchtung der Zellen in einer Co-Kultur	39
3.3.1	Methodik zur Herstellung des standardisierten Hautäquivalents	39
3.3.2	Methodik zur Herstellung des Hautäquivalents mit erhöhten Zellzahlen	40
3.3.3	Verwundung und Bestrahlung des Hautmodells	41
3.3.4	Gewebefixation	42
3.3.5	Projektspezifische Materialien und Chemikalien mit Bezugsquellen	42
3.3.6	Verwendete Arbeitsgeräte und Labormaterial	43
3.3.7	Verwendete Lösungen	44
3.4	Immunhistochemische Färbung	44
3.4.1	Herstellung und Vorbehandlung der Schnittpräparate	44
3.4.2	Immunhistochemische Färbeverfahren zum Antigennachweis	45
3.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer	48
3.4.4	Projektspezifische Materialien Chemikalien mit Bezugsquellen	49
3.4.5	Verwendete Arbeitsgeräte und Labormaterial	51
3.4.6	Verwendete Reagenslösungen und Puffer	52
3.5	ELISA	53
3.5.1	Vorbereitungen zur Durchführung des ELISAs	53
3.5.2	Durchführung des ELISAs	54
3.5.3	Auswertung des ELISAs	55
3.5.4	Projektspezifische Materialien und Chemikalien mit Bezugsquellen	55
3.5.5	Verwendete Arbeitsgeräte und Labormaterial	55

3.6	Statistik	55
3.6.1	Statistik der Hautmodellansätze	55
3.6.2	Statistik der immunhistochemischen Antigenuntersuchungen	56
3.6.3	Wachstumskurven	56
3.6.4	Einzelversuche	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Proliferationskinetik	57
4.1.1	Wachstumskurven der HaCaT-Zelllinie	57
4.1.2	Wachstumskurven der HDFa-Zelllinie	59
4.2	Beschreibung des organotypischen Hautäquivalents	60
4.2.1	Morphologie einer gut ausdifferenzierten, rekonstruierten Epidermis	60
4.2.2	Strukturelle Auflösungserscheinungen der Kollagenmatrix	61
4.2.3	Morphologie einer mangelhaft ausdifferenzierten, rekonstruierten Epidermis	63
4.3	Mikroskopische Auswertung immunhistochemischer Untersuchungen des Hautäquivalents	64
4.3.1	Panzytokeratin	64
4.3.2	Proliferationsmarker Ki-67	65
4.3.3	β 1-Integrin (CD29)	66
4.3.4	ICAM-1 (CD54)	69
4.3.5	TGF β 3	72
4.3.6	TGF β 1	73
4.3.7	α 5 β 1-Integrin (CD49e)	73
4.3.8	α 2 β 1-Integrin (CD49b)	75
4.3.9	Endoglin (CD105)	76
4.4	ELISA	79
4.4.1	KGF-ELISA	79
4.4.2	TGF β 1-ELISA	79
5	Diskussion	83
5.1	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien HaCaT und HDFa	83
5.2	Organotypische Co-Kulturen	85
5.2.1	Methodische Aspekte bei Züchtung des Hautäquivalents	85
5.2.2	Morphologie und Proliferationskinetik der rekonstituierten Epidermis	86
5.2.3	Anmerkungen zur Methodik der immunhistochemischen Färbemethode APAAP	88
5.3	Antigenstudien am dreidimensionalen Hautäquivalent	89
5.3.1	Panzytokeratin	89
5.3.2	Der Proliferationsmarker Ki-67	89
5.3.3	β 1-Integrin (CD29)	89
5.3.4	ICAM-1 (CD54)	90

5.3.5	TGF β 3	91
5.3.6	TGF β 1	92
5.3.7	α 5 β 1-Integrin (CD49e)	92
5.3.8	α 2 β 1-Integrin (CD49b)	93
5.3.9	Zusammenfassung der Antigenexpression des Hautäquivalents im Vergleich zur humanen Haut	93
5.3.10	Endoglin	95
5.4	Beurteilung der ELISA-Ergebnisse	95
5.4.1	KGF-ELISA	96
5.4.2	TGF β 1-ELISA	97
5.5	Beurteilung der organotypischen Co-Kultur als Modell für die strahlenbiologische Forschung	98
6	Zusammenfassung/Summary	101
	Anhang	105
A	Tabellarische Zusammenfassung der Färbeergebnisse nach Verwundung und Bestrahlung	105
A.1	Qualitative Auswertung der Expressionsinduzierung	105
A.1.1	Expressionsinduzierung des jeweils untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten (F) nach Strahlenexposition	105
A.1.2	Expressionsinduzierung des jeweils untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten (F) nach Verwundung	106
A.1.3	Expressionsinduzierung des jeweils untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten (F) nach Verwundung und Bestrahlung mit 5 Gy	106
	Literaturverzeichnis	119
	Lebenslauf	121
	Danksagung	123

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematischer Aufbau der Epidermis: Darstellung der Epidermisschichten mit ihren charakteristischen Strukturelementen (aus [95]).	4
3.1	Schematischer Querschnitt einer 6-Well-Platte mit eingelegtem Kollagenschwamm.	39
3.2	Die Aufsaat der HaCaT-Keratinozyten auf die Kollagenmatrix erfolgt nach deren Besiedlung durch Fibroblasten.	41
3.3	HaCaT-Zellen bilden eine ausdifferenzierte, mehrschichtige Epidermis. .	41
3.4	Schematische Darstellung des APAAP Enzym-Immun-Komplexes, modifiziert nach [108].	46
4.1	Halblogarithmische Darstellung des Zellwachstums der HaCaT-Zelllinie nach Bestrahlung.	58
4.2	Halblogarithmische Darstellung des Zellwachstums der HDFa-Zelllinie nach Bestrahlung.	60
4.3	Gut ausdifferenzierte, rekonstruierte Epidermis nach fünfwöchiger Kultivierung.	62
4.4	Detailaufnahme der rekonstruierten Epidermis nach fünfwöchiger Kultivierung.	62
4.5	Die Pfeilspitzen markieren positive Zytokeratin-Reaktionen in der normalen, humanen Epidermis, im Str. basale, Str. spinosum und Str. corneum.	65
4.6	Starke Zytokeratin-Expression in der gesamten, rekonstruierten Epidermis.	66
4.7	Die Pfeilspitzen zeigen Ki-67-positive HaCaT-Zellkerne in der rekonstruierten Epidermis des unmanipulierten HM.	67
4.8	Ki-67-Expression der rekonstruierten Epidermis, bevorzugt in basalen und suprabasalen Lagen.	67
4.9	β 1-Integrin-Expression in der gesamten rekonstruierten Epidermis, vor allem in basalen und unteren suprabasalen Schichten.	68
4.10	Membranständige, immunhistochemische β 1-Integrin-Färbungen in epidermalen HaCaT-Zellen.	68
4.11	β 1-Integrin-Expressionsanstieg nach Bestrahlung mit 5 Gy, besonders im dorsalen Epidermisbereich. Die Pfeilspitze markiert „Basalzellen“, welche in Matrixporen abgetropft sind.	69

4.12	Intensive ICAM-1-Expression im oberen Epidermisbereich des rekonstruierten Hautäquivalents.	70
4.13	Die rekonstruierte Epidermis zeigt 48 h nach Strahlenexposition von 5 Gy eine mittlere Induzierung der ICAM-1-Expression.	71
4.14	Induzierte ICAM-1-Expression 48 h nach Verwundung, im unverletzten, basalen Gewebe (siehe Pfeilspitze) und am Wundrand (siehe Pfeil, links oben), sowie in HaCaT-Zellen, welche vermutlich in die Wunde einwandern (Pfeil links unten).	71
4.15	TGF β 3-Expression in der gesamten rekonstruierten Epidermis, v. a. in basalen, abgeplatteten und verhornten Zellschichten.	72
4.16	Geringe α 5 β 1-Integrin-Färbung, bevorzugt in basalen und suprabasalen Schichten der rekonstruierten Epidermis.	74
4.17	Darstellung der stark induzierten α 5 β 1-Integrin-Expression in allen epidermalen Schichten der rekonstruierten Epidermis und am Wundrand, 48 h nach Verwundung.	74
4.18	α 2 β 1-Expression des rekonstruierten Epithels, besonders starke Antikörperreaktionen zeigen basale und untere suprabasale HaCaT-Keratinocyten.	75
4.19	8 Tage nach ionisierender Bestrahlung von 5 Gy kann in oberen epidermalen Schichten des rekonstruierten Epithels eine geringe α 2 β 1-Expressionsinduktion beobachtet werden.	76
4.20	Die rekonstruierte Epidermis zeigt v. a. in basalen und suprabasalen Lagen Endoglin-positive HaCaT-Zellen.	77
4.21	48 h nach Strahlenexposition von 5 Gy induzieren dorsale, epidermale Schichten deutlich ihre Endoglinexpression.	78
4.22	48 h nach Verwundung zeigten basale und untere suprabasale Zellen der Wunde und des unverwundeten Gewebes eine mittlere Induzierung der Endoglinexpression.	78
4.23	KGF-Proteinkonzentrationen im Mediumüberstand der Hautmodelle.	81
4.24	Verhältnis der TGF β 1-Konzentrationen im Mediumüberstand der Hautmodelle bezogen auf das Kulturmedium.	81

Tabellenverzeichnis

4.1	Zellverdopplungszeiten t_2 der HaCaT-Zelllinie nach Strahlenexposition.	58
4.2	Zellverdopplungszeiten t_2 der HDFa-Zelllinie nach Strahlenexposition.	59
A.1	Expressionsinduzierung zum Zeitpunkt 48 h nach Strahlenexposition von 5 Gy, zum Zeitpunkt 7/8 d nach 2,5 Gy und 5 Gy Bestrahlung.	105
A.2	Expressionsinduzierung des untersuchten Antigens 48 h und 7/8 d nach Verwundung.	106
A.3	Expressionsinduzierung des untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten 48h nach Verwundung und Bestrahlung mit 5 Gy.	106

Abkürzungen

AK	Anitkörper
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	basic Fibroblasts Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Proteins
BrdU	Bromodeoxyuridine
CAM	zellulare Adhäsionsmoleküle (Cellular Adhesion Molecules)
CD29	β 1-Integrin
CD49e	α 5 β 1-Integrin, Hauptrezeptor für Fibronectin
CD49b	α 2 β 1-Integrin, Rezeptor für Kollagen I-IV, VI und Laminin
CD54	ICAM-1
CK	Zytokeratin (Cytokeratin)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Da	Dalton
DED	de-epidermalisierte Dermis (De-Epidermized Dermis)
EGF	Epidermal Growth Factor
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FGF	Fibroblasts Growth Factor
FGFR-2IIIb	KGF-Rezeptor
FGF7	Fibroblast Growth Factor 7 oder KGF
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2	Gap 2
HaCaT	immortalisierte Keratinozytenzelllinie
HDFa	primäre humane adulte Fibroblastenzelllinie (Human Derived Fibroblasts adult)
HM	Hautmodell
HPV	Humanes Papilloma Virus
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1)
IgAM	Immunglobulinadhäsionsmolekül
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleukin
INF γ	Interferon- γ
KGF	Keratinocyte Growth Factor

Ki-67	Kernprotein
LAP	Latentes Bindungsprotein (Latent Binding Protein)
LTBP	Latentes TGF β Bindungsprotein (Latent TGF β Binding Protein)
M	Mol
mM	milliMol
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
M-Phase	Mitose
NEK	normale epidermale Keratinozyten (Normal Epidermal Keratinocytes)
Nrf2	NF-E2 related factor 2, genkodierender Transkriptionsfaktor
Nrf3	genkodierender Transkriptionsfaktor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PDECGF	Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PET	Polyethylen Terephthalat
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils (polymorphkernigen Leukozyten)
p.r.	post radiationem (nach Strahlenexposition)
RPM	Rounds Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of Mean
Str.	Stratum
TGF α	Transforming Growth Factor α
TNF α	Tumor necrosis factor α
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGF β R	TGF β Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WF	Wachstumsfaktor

Kapitel 1

Einleitung

Hautmodelle oder Hautäquivalente sind dreidimensionale „Gewebeulturen“, für deren Herstellung in der Regel humane, kutane Zellen sowie animale (Kollagene) oder synthetische Komponenten (Nylonnetze, Polykarbonatauflagen) als Dermismaterial verwendet werden.

In der Literatur ist inzwischen eine Vielzahl von *in vitro* gezüchteten Hautäquivalenten beschrieben. Die Einsatzgebiete von Hautmodellen finden sich vermehrt in der biomedizinischen Grundlagenforschung, der Wundbehandlung von Patienten sowie in der Pharma- und Kosmetikindustrie.

Hier kommt ihnen als Ersatz- und Ergänzungstestobjekte, alternativ zu Tierversuchen, eine immer größere Bedeutung zu. Tierversuche eignen sich, um Erkenntnisse über grundlegende Funktionsabläufe im Organismus und biologische Prinzipien zu gewinnen. Allerdings besteht das generelle Problem der Übertragbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen Spezies.

Der Radiobiologie steht aufgrund der speziesspezifischen Ausprägung des Hautorgans von Säugetieren zur Untersuchung der Strahlenwirkung auf die menschliche Haut kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung (Ausnahme ist mit Einschränkungen das Schwein) [112, 69].

In der Forschung bietet die Verwendung von Hautmodellen als Versuchsobjekte gegenüber Versuchen an Labortieren verschiedene Vorteile:

- Reproduzierbarkeit der Modelle, dadurch Schaffung von standardisierten Versuchsbedingungen
- Möglichkeit der beliebigen Wiederholung von Testversuchen
- Bessere Annäherung an die menschliche Haut durch die Verwendung humaner Zellen
- Vermeidung des ethischen Konflikts beim Einsatz von Versuchstieren

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollen weitgehend unbekannt pathophysiologische Vorgänge des kutanen Strahlensyndroms und der Wundheilung nach Strahlenexposition an einer dreidimensionalen, organotypischen Co-Kultur dargestellt und diskutiert werden.

Das neuentwickelte Hautäquivalent besteht aus folgenden Komponenten, einer bovinen Kollagenmatrix, humane Fibroblasten und Keratinozyten.

Aufgrund neuer Erkenntnisse der Grundlagenforschung sind heute wesentliche zelluläre und biochemische Vorgänge der normalen Wundheilung verstanden. Allerdings sind in Bezug auf die Entstehung und Vermeidung von Wundheilungsstörungen nach Strahlenexposition noch viele Fragen offen. Deshalb werden in dieser Arbeit ausgewählte Faktoren untersucht, die sowohl bei der Frühreaktion nach Strahlentherapie, als auch in der Epithelisationsphase im Heilungsprozess für Keratinozyten und Fibroblasten eine Rolle spielen.

Vorangiges Ziel ist es, Veränderungen der Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Integrinen im Hautmodell, nach dessen Bestrahlung und Verwundung, nachzuweisen. Der Nachweis von Zytokeratin, Ki-67, β 1-Integrin, Kollagen- und Fibronectin-Rezeptoren, ICAM-1 sowie TGF β 1, TGF β 3 und Endoglin erfolgte an Gefrierschnitten mittels immunhistochemischer Färbung. Zusätzlich wurde der Nährmediumüberstand im ELISA auf KGF und TGF β 1 untersucht.

Desweiteren sollen die Ergebnisse unseres Hautmodells mit anderen *in vivo*-Untersuchungen an humaner Haut verglichen werden. Dabei soll geklärt werden, ob das Hautäquivalent eine möglichst reale morphologische und funktionelle *in vivo*-Situation nachbildet und sich als Grundlage für die Expressionsuntersuchung relevanter Faktoren nach Verwundung und Strahlenexposition eignet.

Kapitel 2

Stand der Forschung

2.1 Die Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und begrenzt dessen äußere Oberflächen. Sie besteht aus der Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis) [87]. Sie dient als größtes Sinnesorgan zur Wahrnehmung von Schmerz, Berührung, Hitze und Kälte, reguliert die Körpertemperatur und hat immunologische Funktionen [166]. Unter ihren vielfältigen Aufgaben ist die Schutzfunktion gegen Krankheitserreger, schädliche Umwelteinflüsse, mechanische Einwirkungen und Austrocknung besonders hervorzuheben.

2.1.1 Aufbau und Organisation der kutanen Epidermis

Die Epidermis ist die äußere Schicht der Haut und histologisch gesehen ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithelgewebe. Sie enthält verschiedene Zelltypen: Langerhans-Zellen, Melanozyten, Mastzellen, Merkelzellen, aber vor allem Keratinozyten in verschiedenen Differenzierungsformen. Deren Umwandlung erfolgt gemäß eines genetisch festgelegten Musters, welche den charakteristischen Epidermisaufbau bedingt. Im Verlauf der Differenzierungsprozesse zeigen die Zellen verschiedene, für den Prozesszeitpunkt spezifische Proteinexpression, Lipidvorkommen und Morphologie. Der sich auf diese Weise entwickelnde hierarchische Epithelaufbau kann in fünf charakteristische Zellschichten unterteilt werden (s. Abb. 2.1). Diesen lassen sich funktionell zwei Bereichen zuordnen: das Proliferations- und das Reifungskompartiment.

Die Dicke der Haut ist lokal konstant, schwankt aber stark an verschiedenen Stellen des Körpers. Sie wird durch das Wechselspiel von Zellproliferation der unteren Schichten und dem oberflächlichen Zellverlust reguliert.

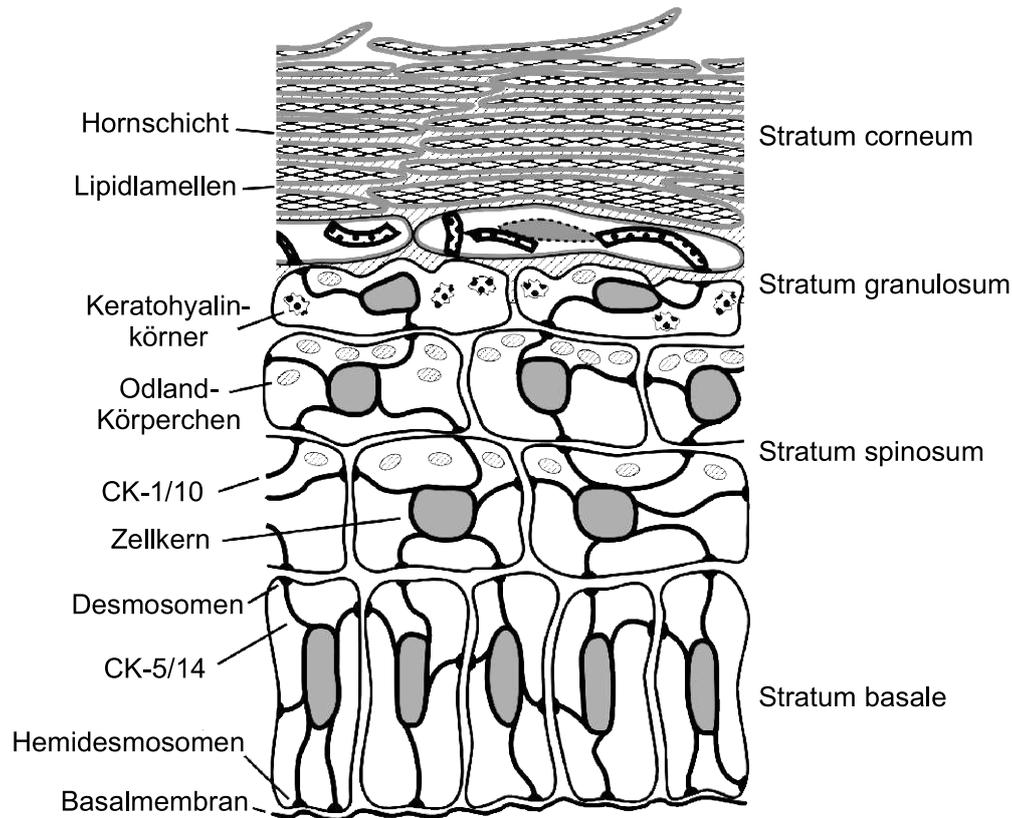


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau der Epidermis: Darstellung der Epidermisschichten mit ihren charakteristischen Strukturelementen (aus [95]).

Dem Proliferationskompartiment sind histologisch das Str. basale und Teile des Str. spinosums zugeordnet. Die übrigen suprabasalen Zellschichten entsprechen dem Reifungskompartiment. Die mitotisch aktiven Zellen des Proliferationskompartiments befinden sich etwa zu zwei Dritteln im Str. basale und einem Drittel im Str. spinosum. Nach der Zellteilung von Stamm- und Transitzellen verbleibt in der Mitte eine Tochterzelle im Proliferationskompartiment und ist weiterhin mitotisch aktiv. Die andere Tochterzelle wandert ins Reifungskompartiment und differenziert sich zur toten Hornzelle. Dieser so genannte asymmetrische Verlauf der mitotischen Teilung ist ein typisches Merkmal normaler Epithelien [19].

Kubische bis zylindrische Zellen mit ovalen Kernen bilden das ein- bis zweilagige Stratum basale [95]. Die Basalzellen stehen über Hemidesmosomen mit der unmittelbar anliegenden Basalmembran fest in Verbindung. Die Basalmembran trennt die Epidermis räumlich von der Dermis und verankert gleichzeitig das Epithel stabil im darunterliegenden Bindegewebe.

Im Str. spinosum bilden die Zellen zahlreiche Zytoplasmafortsätze (sog. Stacheln) aus und sind an deren Enden durch Desmosomen mit ihren Nachbarzellen verbunden. Das Zellvolumen der Keratinozyten nimmt zu. Sie haben eine polygonale Gestalt mit abgerundeten Kernen und flachen zur Hautoberfläche hin ab. In den oberen Zellschichten

des Str. spinosum werden lipid- und enzymreiche Keratinosomen gebildet. Das Str. spinosum oder die Stachelzellschicht besteht gewöhnlich aus fünf bis zehn Zelllagen [95].

Das Reifungskompartiment bildet die epidermale Barriere und gewährleistet die eigentliche Schutzfunktion der Haut. Es besteht aus den Strata granulosa, lucida und cornea. Im Str. granulosum beginnt die Degeneration von Kernen und Zellorganellen, sowie die Vernetzung und Aggregation von Keratinen. Die Zellen sind rautenförmig oder abgeplattet. Hier geben die Keratinozyten zuvor synthetisierte Keratinosomen durch Exozytose in den Intrazellularraum ab, welche zur Barrierefunktion der höheren epidermalen Schichten beitragen. Kennzeichnend für die Körnerzellen des Str. granulosum ist das mit basophilen, polymorphen Keratohyalinkörnchen angefüllte Zytoplasma. Keratohyalinkörnchen sind Vorläufer der Keratinmatrix. In der normalen Haut ist die Dicke des Str. granulosum proportional zur Dicke des Str. corneum. Das Str. granulosum enthält in der Regel ein bis drei Zelllagen, kann aber auch bis zu zehn Zellschichten enthalten [19, 95].

Das Str. lucidum (Glanzzellschicht) ist kernlos und nur in der Leistenhaut an Sohlen, Ballen und Fingerbeeren ausgebildet. In dieser Glanzzellschicht werden Keratohyalinkörnchen zu Eleidin umgewandelt und die Zellorganellen abgebaut [87].

Die Hornzellen des Str. corneum erfahren eine Auflösung von Kernen und Zellorganellen, es bleiben lediglich Filamentbündel und die Zellmembranen erhalten. Diese verbinden sich mit dem Skleroprotein Keratin, das aus dem schwefelreichen Keratohyalin entsteht und bilden zusammen mit Lipiden die resistente, permeable Oberfläche der Haut. Die chemisch und mechanisch resistente Barrierschicht des Str. corneum kann zwischen 10 und 20 Lagen umfassen. Durch Abbau der Keratinmatrix und Zerfall der Dichtsubstanz in oberen Lagen geht die regelmäßige und komprimierte Struktur des Str. corneum verloren. Infolgedessen werden die obersten Zellen abgeschilfert [95]. Dieser kontinuierliche Prozess dient der steten Hauterneuerung.

2.1.2 Proliferation

Steel [143] definiert Proliferation als Produktion von Zellen durch Teilung der Mutterzelle nach identischer Reduplikation ihres Genoms. Die Erhaltung der Gewebekomposition in der kutanen Haut setzt ein ausgewogenes Verhältnis von Proliferation und Zellapoptose voraus. Die Apoptose oder der so genannte programmierte Zelltod ist eine spezielle Form des Zelluntergangs. Zellen zeigen dabei eine charakteristische Schwelung von Organellen, Zellkernkondensation und -zerfall mit fragmentierter DNA.

Grundlage jeder Zellteilung ist der Zellzyklus. Er verläuft nach einer festgelegten Abfolge verschiedener Phasen. Man unterscheidet zunächst die Interphase von der Mitose oder M-Phase. Nach molekularen Ereignissen kann die Interphase in Gap 0 (G0), Gap 1 (G1), S-Phase (Synthese) und Gap 2 (G2) unterteilt werden. In der S-Phase erfolgt die DNA-Replikation. Die G1- und G2-Phasen dienen der Vorbereitung der jeweils folgenden Zyklusphase. In diesen Zeiträumen synthetisiert die Zelle RNA sowie Proteine und wächst. Mit Eintritt in die M-Phase (Mitose) werden diese Stoffwechselaktivitäten eingestellt und die DNA der Mutterzelle sorgfältig auf zwei Tochterzellen verteilt.

Den aktiven Zellzyklus bilden die Phasen G1, S, G2 und M. Die Gesamtheit der Zellen

dieser Phasen stellt die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation dar. Daneben gibt es Zellen, die sich nicht aktiv im Zellzyklus befinden. Diesem Zellkompartiment gehören neben alternden Zellen entweder termininal differenzierte Zellen an, oder Zellen die sich in der G0-Phase befinden. G0 ist eine Ruhephase, in der Zellen temporär verweilen, bis sie erneut in den aktiven Zellzyklus eintreten. Veränderungen der physiologischen Bedingungen, Zellschäden, Zellverlust, Pharmaka und Hormone können bestimmte G0-Zellen zur Proliferation anregen. Diese Zellen sind Stammzellen [45].

Epithelien können mit Hilfe dieser Zellen ihre Zellproliferation flexibel an veränderte Umgebungssituationen anpassen. Die Theorie von Bullough [23] besagt, dass hauptsächlich der oberflächliche Zellverlust des Str. corneums die Proliferation stimulieren kann. Ungefähr 10 % der basalen Zellen sind Stammzellen und besitzen eine uneingeschränkte Proliferationskapazität [117]. Die übrigen, so genannten Transitzellen verfügen nur über eine eingeschränkte Teilungsfähigkeit. Deshalb geschieht die epidermale Zellvermehrung hauptsächlich in basalen Lagen. Jedoch konnte festgestellt werden, dass sich bis zu 30 % der proliferierenden Zellen in suprabasalen Schichten befinden [42]. Darum sagt die Lokalisation und Größe der proliferativen, epithelialen Zellpopulation etwas über deren Differenzierungsgrad aus.

Verschiedene Faktoren modulieren die epitheliale Proliferation, Apoptose und Differenzierung. Die dafür wesentlichen Substanzen in der Haut, die so genannten Wachstumsfaktoren (WF), sind der Epidermal Growth Factor (EGF), der Keratinocyte Growth Factor (KGF) sowie der Transforming Growth Factor β (TGF β). Es handelt sich dabei um Polypeptide, bestehend aus mehr als zehn verknüpften Aminosäuren. Eine detaillierte Behandlung von TGF β und KGF erfolgt in den Abschnitten 2.9 und 2.11.

Ferner sind Stoffe wie Retinol, Vitamin D und Vitamin A-Derivate beteiligt [19, 37]. Es wird vermutet, dass Keratinozyten auf diese Agentien beispielsweise mit der Expression von Involukrin und Zytokeratinen reagieren. Deren Regulierung geschieht wahrscheinlich unter Mitwirkung von Transkriptionsfaktoren, welche möglicherweise auch am Differenzierungsvorgang beteiligt sind [37].

2.1.3 Das Ki-67 Protein

Ki-67 Protein ist ein gut geeigneter Marker zur Bestimmung der Wachstumsfraktion von Zellpopulationen. Antikörper gegen humanes Ki-67 Protein ermöglichten die immunhistologische Untersuchung der Zellproliferation [39]. Ki-67 wird hier zur Untersuchung des Proliferationskompartiments des Hautmodells verwendet.

Ki-67 ist ein Kern- und nukleoläres Protein, welches in allen aktiven Zellzyklusphasen anwesend, aber in ruhenden Zellen der G0-Phase nicht nachweisbar ist. Während der Interphase ist das Protein ausschließlich im Inneren des Kerns lokalisiert, wohingegen das Protein in der Mitose auf der Oberfläche von Chromosomen zu finden ist.

Die Molekularstruktur des Ki-67 Proteins ist inzwischen gut charakterisiert. Dabei fällt auf, dass die Primärstruktur viele Merkmale enthält, welche auch verschiedene, den Zellzyklus regulierende Proteine aufweisen. Dennoch bleibt seine funktionale Bedeutung unklar, und Informationen über seine Aufgabe innerhalb des Proteinnetzwerks, welches den Zellzyklus steuert, sind spärlich [136, 39].

2.1.4 Strahlungsinduzierte Regulationsstörungen des Zellzyklus'

Trifft biologisch wirksame Strahlung (z.B. radioaktive Strahlung (α -, β -, γ -Strahlung) und Röntgenstrahlung) auf Zellen, kann es je nach Art und Energie der Strahlung zu Ionisation von Biomolekülen, Induktion von freien Radikalen oder schwerwiegenden Schädigungen des Gewebes kommen. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde mit Röntgenstrahlung gearbeitet (s. Abschnitt 3.2.2).

Man unterscheidet direkte und indirekte Strahlenwirkungen. Bewirkt die Strahlung unmittelbare Effekte an Molekülen oder werden diese ionisiert, spricht man von einer direkten Strahlenwirkung [62]. Verursachen freie Radikale jedoch Schädigungen an der DNA, werden diese Vorgänge der indirekten Strahlenwirkung zugeordnet. DNA-Schäden haben Proliferationshemmung zur Folge [112, 62]. Strahleninduzierte Zellschäden können auch einen Verlust der Teilungsfähigkeit bedingen. Dieser kann durch terminale Ausdifferenzierung, Apoptose oder den mitotischen Zelltod hervorgerufen werden. Trotzdem sind solche Zellen fähig, Zytokine zu sezernieren und somit auf die Regulation von Umbildungsvorgängen im Gewebe einzuwirken [112].

Die Störung des Zellzyklus ist die hauptsächliche Ursache der Strahlenreaktion an Normalgewebe. Diese äußert sich in pathologischen Veränderungen wie z.B. Nekrose, Fibrose, Fisteln und Gewebeschrumpfungen [30]. Gewöhnlich ist der Ablauf des Zellzyklus nach Bestrahlung blockiert. Zellen verweilen am Übergang von der G1- zur S-Phase für mehrere Stunden bis Tage. Einer Studie von Linke et al [125] zufolge, ist es nicht allen Zellen möglich, weiter im Zellzyklus fortzuschreiten. Nach einer bestimmter Zeit der Hemmung werden die Zellen inaktiviert oder überleben durch terminale Differenzierung ohne weitere Zellteilungen. Verschiedene Gene, vor allem das mutierte Ataxia-Telangiectasia-Gen (Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)), das p53-Gen, das Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor-Gen (cyclin dependent kinase inhibitor (p21cip1)), Retinoblastoma (RB), sowie Cyclin E und die Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase 2 (cdk2)) sind für die Regulation der Zellblockierung verantwortlich [30]. In einem Versuch mit humanen Fibroblasten wurde gezeigt, dass die zu Grunde liegende Extrazellulärmatrix sowohl die Zeitspanne, als auch die Anzahl der Zellen im G1-Arrest beeinflusst [24]. Zellen, denen es gelingt, erneut in den Zellzyklus einzutreten, werden wiederum am Ende der Interphase für mehrere Stunden blockiert. Danach werden sie in der Regel in die M-Phase entlassen. Haben Zellen chromosomale Schäden, scheitern sie in der Mitose meist nach der Metaphase. Andere Zellen durchlaufen noch einige Zellzyklen und sterben dann ab. Dieser Zelluntergang wird Mitosetod genannt [30]. Eine weitere Art des Zelluntergangs nach Bestrahlung ist die Apoptose, die auf bestimmte Gewebearten beschränkt ist. Diese Gewebearten sind meist sehr strahlenempfindlich [30].

Zellen sind fähig, Strahlenschäden zu reparieren. Experimentell kann die Reparaturkapazität von Zellen in exponentiellen Überlebenskurven und Klonierungstests ermittelt werden. In der klassischen Strahlenbiologie wird die Strahlenempfindlichkeit über die Reparaturfähigkeit von Strahlenschäden einer Zelle bestimmt [112, 62]. Die Strahlenempfindlichkeit ist proportional zu ihrer Teilungsfähigkeit.

Die klassische Einteilung der Reaktion von Geweben auf Strahleneinwirkung erfolgt

nach Withers [165] in die „vier R’s“ der Strahlenbiologie: Reparatur des subletalen Strahlenschadens, Redistribution (Umverteilung der Zellen im Zellzyklus), Repopulierung, Reoxygenierung.

In der Haut liegen sehr spezielle Bedingungen vor. 2 bis 5% der Basalzellen in der Epidermis proliferieren aktiv, während sich der Rest als so genannte proliferierende Transitzellen in den Differenzierungsschichten befindet [112]. Potten [118] führte das Konzept der „epidermal proliferative units“ ein, welches sich von Untersuchungsergebnissen an Mäuseepidermis ableitet. Die Basalzellschicht setzt sich zu 10% aus proliferierenden Stammzellen und zu 90% aus Übergangszellen zusammen. Demnach ergibt sich die charakteristische Anordnung: je eine proliferierende Stammzelle wird von neun Übergangszellen umgeben, die mit anderen weiter differenzierenden Zellen eine sechseckige Säule bilden. Die Entwicklung dieses Konzepts war für das strahlenbiologische Verständnis des umfassenden epithelialen Gewebes grundlegend.

2.2 Organotypische Co-Kulturen

Mit reproduzierbaren, dreidimensionalen Co-Kulturen stehen im Vergleich zu Monolayer-Kulturen komplexere Versuchsmodelle zur Verfügung, welche eine weitere Annäherung an die *in vivo*-Situation der Haut darstellen.

2.2.1 Hautäquivalente

Zweilagige organotypische Co-Kulturen, welche dermale und epidermale Elemente kombinieren, werden auch als Hautäquivalente bezeichnet.

Zur Herstellung werden meist humane Komponenten (Zellen, devitalisierte Dermis) und animale Komponenten (Kollagen) verwendet. Die verwendeten Techniken basieren alle auf dem gleichen Prinzip. Epithelzellen werden als Einzel- bzw. Mischsuspension oder als Explantate auf eine künstliche oder devitalisierte Matrix aufgebracht. Die Matrix enthält Fibroblasten als mesenchymale Zellen oder nur deren regulierende Wachstumsfaktoren. Einige Modelle benutzen synthetische Materialien um spezielle Hautlagen (Dermis, Epidermis) zu ersetzen [40].

Durch das Einbringen von Zellen in dreidimensionale „Gewebe-kulturen“ und mit der Kultivierung des entstehenden Epithels an der Luft-Medium-Übergangszone gelang es, eine verbesserte Differenzierung der mehrschichtigen Epidermis zu erzielen [121]. Die so genannte „air-liquid“ Kultivierungsmethode induziert die Reifung und Ausdifferenzierung der Keratinozyten, die Stratifizierung der Epidermis und die Bildung eines Str. corneums. Die physiologische Ausbildung des Str. corneums im Hautäquivalent ist entscheidend, um grundlegende Eigenschaften der normalen Haut, wie beispielsweise die Barrierefunktion, nachzuahmen.

Inzwischen werden verschiedene Modelle kommerziell produziert. Sie werden entweder für die medizinische Wundversorgung, als so genannte interaktive Wundaufgabe bzw. Hautersatz („skin substitutes“), oder als alternative Testsysteme hergestellt und vermarktet [40].

2.2.2 Techniken zur Kultivierung von Hautäquivalenten

Grundsätzlich kann man zwei verschiedene Techniken zur Kultivierung von epidermalen Zellen im Co-Kulturmodell unterscheiden [120]. Die Kultivierung der Keratinozyten auf künstlicher Matrix oder auf de-epidermalisierter Dermis. Im folgenden werden diese Techniken näher beschrieben.

2.2.2.1 Kultivierung von Keratinozyten auf künstlicher Matrix

Die verwendete Methodik basiert auf Forschungsergebnissen von Bell et al [11]. Die Herstellung eines Hautäquivalents kann in zwei Hauptschritte unterteilt werden:

1. Bildung der Dermislage
2. Entstehung und Verhornung der Epidermis.

Als dermales Äquivalent dienen einzelne Komponenten der Extrazellulärmatrix. Sehr häufig findet ausschließlich Kollagen I [139] Anwendung, oder auch in Kombination mit Kollagen III [88] und IV [135]. Das Kollagen I wird u.a. aus Rattensehnen [11], Mäusesehnen [18] oder Rinderhäuten isoliert und meist in einer Konzentration von 1-4 mg/ml verwendet [19]. Kollagenmischungen unterschiedlicher Spezies werden ebenfalls als Unterhautgewebe verwendet [88]. Zur Entstehung des Dermisäquivalents wird das Kollagen mit den Fibroblasten unter Beigabe von verschiedenen Zusätzen vermischt. Die Fibroblasten wandern durch das Kollagen, vermehren sich und produzieren neues Kollagen und andere Matrixproteine. Sie ordnen sich im Fasernetzwerk der Matrix an, kontrahieren die Kollagenfasern und bilden eine stabile Unterhautgewebslage. Sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten sind in der Lage, Kollagenasen zu synthetisieren. Die Stabilisierung der Kollagenmatrix kann mit Kollagenase-Inhibitoren, Hydrokortison oder Glutaraldehyden erreicht werden [19].

Sobald die Kollagenmatrix geliert ist, können die Keratinozyten aufgebracht werden. Die Kultivierung erfolgt an der Luft-Medium-Grenze. Zum Anheben der Co-Kultur werden Metallpodeste, Silikonkammern, verschiedene Filter oder Einsätze in Multiwell-Kulturgefäßen benutzt [19].

Der Vorteil der künstlichen Matrix ist, dass verwendete Komponenten gut standardisierbar sind. Es ist möglich, mesenchymale Zellen (Fibroblasten) direkt in das dermale Äquivalent einzubringen. Variationen der Matrixkomponenten, des Mischverhältnisses und der mesenchymalen Zellen sind möglich. Sowohl Zelltypen gleicher Spezies, als auch die Kombination verschiedener Spezies bilden ein stratifiziertes und differenziertes Epithel [19].

Zur Kultivierung von Keratinozyten in Co-Kulturen wird ein Basiskulturmedium (meist DMEM) mit verschiedenen Supplementen verwendet [19]. Standardzusätze sind fötales Kälberserum, Cholera-toxin, Hydrokortison, Ascorbinsäure, Epidermal Growth Factor (EGF), Adenin, Transferrin und Insulin. Fötales Kälberserum enthält wichtige Bestandteile der Zellnährstoffe, die zur *in vitro*-Kultivierung nötig sind. Es ist reich an Albumin und anderen Plasmaproteinen. Problematisch sind unbestimmte Mengen und Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren, welche starken Chargenschwankungen unterliegen können. Zur Stimulierung des Wachstums, Ausdifferenzierung und Verlänge-

rung der Kultivierungszeit von Keratinozyten, wird dem Medium Cholera toxin zugegeben. Hydrokortison hat ebenfalls eine wachstumsteigernde Wirkung. Darüber hinaus stabilisiert Hydrokortison als Kollagenaseinhibitor die Matrix in Co-Kulturen [19]. EGF wirkt durch Bindung an zellmembranständige EGF-Rezeptoren auf Keratinozyten und anderen Zellen mitogen. Adenin soll das Überwuchern von Fibroblasten in Primärkulturen verhindern und hat keinen hemmenden Effekt auf die Keratinozytenkultur. Die Zugabe von Transferrin kann die Koloniegröße um das Zweifache steigern [19]. Insulin ist für die Glukoseaufnahme der Zelle nötig, allerdings führt eine zu hohe Insulinkonzentration zu einer zellschädigenden Abnahme des Glukosespiegels. Auch Kalzium wirkt konzentrationsabhängig verschieden auf die Keratinozytenpopulation. Niedrige Konzentrationen (0,1 mMol/l) fördern die Basalzellproliferation, hohe Kalziumkonzentrationen (1,0 mMol/l) wirken wachstumshemmend und induzieren die Differenzierung der Zellen. Ascorbinsäure fördert ebenfalls die Differenzierung [19].

Die hohe Anzahl an Variationsmöglichkeiten in der Kombination und Konzentration der Zusätze und der verwendeten Matrixkomponenten gestaltet einen direkten Ergebnisvergleich zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet schwierig.

2.2.2.2 Kultivierung der Keratinozyten auf de-epidermalisierter Dermis (DED)

Verschiedene Ansätze zur Kultivierung von epidermalen Zellen auf devitalisierter und de-epidermalisierter Dermis (DED) als Matrix sind publiziert worden [115, 84].

Die Abtötung von zellularen Anteilen der Haut erfolgt durch zyklisches Einfrieren und Auftauen, eventuell in Kombination mit Bestrahlung. Nach einer fünftägigen Inkubation des Hautstücks in einem Ca^{2+} - und Mg^{2+} - freien Puffer kann die tote Epidermis abgelöst werden [120]. Die entstandene DED kann nun mit ihrer natürlichen Oberfläche oder der Unterseite als Kultivierungsfläche dienen.

Im Kulturbehältnis wird die DED zunächst (auf ein Metallpodest) „geliftet“ und dann die Keratinozytensuspension aufgetragen. Um das Abfließen der Zellsuspension zu verhindern und die genaue Auftragsfläche der Zellen auf der Dermis definieren zu können, werden Metall- oder Plastikringe verwendet. Die Keratinozyten bilden unter dieser Kultivierungsmethode eine mehrschichtige Epidermis.

Sowohl die Morphologie als auch das Differenzierungsmuster verschiedener Marker (Zytokeratine, Lipide, Involukrin) weisen typische Eigenschaften der natürlichen Epidermis auf [120, 59, 19]. Untersuchungen haben gezeigt, dass in der DED trotz der Devitalisierung genügend Wachstumsfaktoren gebunden sein müssen, die eine bestimmte Zeit einen regulativen Einfluss auf die Epithelzellen ausüben können [19]. Ursprünglich verwendete lebende Dermis als Matrixunterlage erwies sich als ungeeignet, da Schweißdrüsen und Haarfollikel die Keratinozyten überwucherten und eine Unterscheidung zwischen Empfänger- und Spenderzellen unmöglich machten [50].

Verschiedene Arbeitsgruppen verwendeten DED als Matrixkomponente zur Kultivierung von epidermalen Zellen. Poncic beispielsweise züchtet humane Keratinozyten auf azellulärer DED [115]. Schoop et al verwendet DED auf präkultivierten Fibroblasten als Matrixgrundlage für HaCaT-Zellen. Die Arbeitsgruppe Lee et al rekonstruiert eine Epidermis auf de-epidermalisierter Dermis (RE-DED) und einer Kollagenmatrix, die

Fibroblasten enthält [84].

2.3 Die Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM besteht speziesübergreifend hauptsächlich aus vier Arten von Makromolekülen: Kollagen, Elastin, Proteoglykan und Glykoprotein [80]. Die beiden letzteren füllen das Interstitium zwischen den Zellwänden, wogegen Kollagen und Elastin das fibrinöse Bindegewebe bilden. Das fibrilläre Netzwerk ist eine Diffusionsbarriere und gibt dem Gewebe seine mechanischen und elastischen Eigenschaften. Neben strukturellen Funktionen reguliert die EZM Zelldifferenzierung und Proliferation durch matrixassoziierte Wachstumsfaktoren und Rezeptormoleküle (Integrine) [19]. Die EZM bindet WF, beispielsweise TGF β , Fibroblasts Growth Factor (FGF) und Tumor necrosis factor α (TNF α), zur Speicherung dieser Signalmoleküle. Damit kann eine eventuell ausbleibende Proteinsynthese überbrückt oder Signale zeitlich versetzt weitergegeben werden. Die meisten WF binden an das Glykoprotein Heparansulfat. Durch enzymatische Abspaltung, mittels Heparanasen und anderen extrazellulären Proteinasen oder Aktivierung aus der latenten Form (TGF β), ist die schnelle Verfügbarkeit der Faktoren möglich [92]. Die Zell-Matrix-Interaktionen von Integrinen binden EZM-Moleküle direkt an das Zytoskelett der Zellen zu fokalen Komplexen. Diese fokalen Adhäsionen werden als Schaltstelle zwischen Integrin- und Wachstumsfaktor-Signaltransduktionsweg mit der Möglichkeit der gegenseitigen Repopulierung interpretiert [114].

Kollagen als Hauptkomponente der EZM wurde lange Zeit nur passive Stützfunktion zugeordnet. Inzwischen sind noch andere physiologische Aufgaben, wie z.B. Zelladhäsion und Chemotaxis nachgewiesen [19]. Bisher sind 18 verschiedene Kollagene identifiziert [27]. In der Haut kommt bevorzugt Kollagen Typ I und in kleinen Mengen Kollagen Typ III vor [27]. Hautfibroblasten produzieren Kollagen Typ I und Typ III im Verhältnis 5:1 [52]. In der Basalmembran sorgt Kollagen Typ IV für die mechanische Integrität und Stabilität. Kollagen Typ I ist im Bindegewebe quantitativ am stärksten vertreten und verbindet sich in der Haut wie Typ IV zu einem offenen Netz [53].

2.4 Humane adulte Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT)

Die spontan transformierte Zelllinie entstammt einem Primärexplantat, das bei chirurgischer Entfernung eines Melanoms der peripheren, normalen Rückenhaut des Spenders entnommen wurde [18]. Die Bezeichnung „HaCaT“ benennt ihren Ursprung von humanen, adulten Keratinozyten und die anfänglichen Kulturbedingungen, bei niedrigem Ca²⁺-Gehalt (0,2 mM) und erhöhter Temperatur (38,5 °C) [18]. Sie entwickelte sich spontan aus einer Langzeitkultur dieser humanen Keratinozyten [18]. Ab der 10. Passage waren die HaCaT-Zellen vollständig unempfindlich gegenüber Ca²⁺-Konzentrationserhöhungen (1,4 mM) und der Temperatursenkung auf 37 °C. Klonbildungs-Effektivität und Wachstumsrate waren unbeeinträchtigt und veränderten sich auch in nachfolgenden Populationen nicht signifikant. Die Zelllinie gilt für mehr

als 140 Passagen als immortal. Ihre Stammlinie ist heteroploid, sie ist auf festem und halbfestem Untergrund klonbildend und zeigt *in vitro* einen transformierten Phänotyp; die Zelllinie ist jedoch weder kanzerogen noch invasiv. Dies wurde durch subkutane Injektionen und mit sensibleren Transplantationuntersuchungen bis zur 100. Passage überprüft [18].

Da man generell davon ausgeht, dass spontane Immortalisierung in humanen Zellen nicht vorkommt, wurde das DNA-Fingerprintmuster bestimmt, um eine Kreuzkontamination mit anderen humanen Zelllinien auszuschließen und die Identität mit dem Spender sicherzustellen. Trotz beschriebener zytogenetischen Veränderungen während verlängerter Kultivierung der HaCaT-Zelllinie und vielen strukturellen chromosomalen Veränderungen, waren die DNA-Fingerprintmuster bei Untersuchungen von Boukamp et al [18] mit hypervariablen Minisatellit-Sonden der 6.-76. Passage grundlegend übereinstimmend und zu einem hohen Grad mit der DNA-Probe des Spenders identisch. Mykoplasmen und Humanes Papilloma Virus (HPV) sowie SV40 large T-Antigen konnten in HaCaT-Zellen nicht nachgewiesen werden [18].

Die Verwendung der etablierten, immortalisierten, humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT hat viele Vorzüge. Der entscheidende Vorteil dieser kontinuierlichen Zelllinien ist die unbegrenzte Lebensdauer. Durch passagieren der Zelllinie und die Möglichkeit der Kryokonservierung wird ein unlimitiertes Reservoir an Zellen verfügbar. Das gewährleistet eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie Kontinuität und Vergleichbarkeit der Untersuchungen.

Die humane, immortale Zelllinie HaCaT hat trotz der Veränderungen des genetischen Erbguts ihre Fähigkeit zur epidermalen Differenzierung und Gewebeorganisation nicht irreversibel verloren [137]. Sie bildet nach Transplantation eine weitgehend gut strukturierte Epidermis mit einem hohen Differenzierungsgrad der Zellen [18]. HaCaTs können ein breites Spektrum an Keratinen, wie in Abschnitt 2.15.2 ausführlicher besprochen, und andere Differenzierungsmarkern bilden und größtenteils ihre reguläre Expression induzieren [137]. Allerdings kann die Transformation einer Zelllinie natürlich vorhandene Funktionen von normalen Keratinozyten beeinflussen oder verändern. Wie unter Abschnitt 2.15.2 genauer beschrieben, bestätigten beispielsweise irreguläre Zytokeratinexpressionen im mehrschichtigen HaCaT-Epithel diesen Nachteil der Zelltransformation.

Zudem weisen sowohl luftexponierte HaCaT-Kulturen [15] als auch HaCaT-Transplantate [21] deutliche Differenzen in Bezug auf die Zusammensetzung und Mengenanteile der abgesonderten Lipide auf. Dies wiederum deutet auf eine Fettstoffwechselstörung in HaCaT-Zellen hin.

2.5 Zelluläre Interaktionen von Epithelzellen und Fibroblasten

In epithelialen Geweben entstehen Wechselwirkungen zwischen Epithelzellen und Fibroblasten. Es können direkte Interaktionen (Zell-Zell-Kontakt, gap-junctions) und indirekte (lösliche Wachstumsfaktoren) stattfinden. Fibroblasten wirken auf das epitheliale Wachstum und das Differenzierungsmuster regulierend. Studien konnten an

Keratinocyten-Fibroblasten-Co-Kulturen nachweisen, dass primäre, proliferierende Fibroblasten, unter einer porösen Membran kultiviert oder in einer Kollagenmatrix eingebettet, das Keratinocytenwachstum und deren Differenzierung über lösliche Wachstumsfaktoren fördern. Dabei ist der von Fibroblasten synthetisierte KGF nicht ausschließlich für die Stimulation verantwortlich [19]. Es ist vielmehr ein Netzwerk von bisher nicht aufgeklärten Faktoren, welches das epitheliale Wachstum und die Differenzierung organisieren.

2.6 Zytokine

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wird die epithelial-mesenchymale Kommunikation durch Zellmembran-assoziierte Moleküle, die Extrazellulärmatrix und lösliche Faktoren vermittelt. Die letzteren sind lösliche Proteine, man bezeichnet sie als Zytokine [57].

Wachstumsfaktoren (WF) sind eine Untergruppe der Zytokine. Es sind Polypeptide, welche in ihrem chemischen Aufbau untereinander oft große Ähnlichkeiten aufweisen [32]. Je nach Sequenzhomologien und charakteristischen Eigenschaften werden die WF derzeit in 11 Familien eingeteilt [19]. Eine Vielzahl verschiedener Zellen produzieren WF. Sie entfalten ihre Wirkung in der Regel durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren.

Nach Bildung des WF-Rezeptor-Komplexes reagiert die aktivierte Zelle über eine intrazelluläre Signalkaskade. So werden u.a. die Mitose, Transformation, Chemotaxis bestimmter Zellsysteme, Proteinsynthese, Zellmotilität und Proliferation beeinflusst. Sie sind mehrheitlich wundheilungsfördernd, viele von ihnen weisen onkogene Potenzen auf [32]. Nicht an die Zielzelle gebundene WF wirken in nanomolaren Konzentrationen als molekulare Signale auf ihre nächste Umgebung oder regulieren als Mediatoren verschiedene biologische Vorgänge [32].

Nach ihrer bevorzugten Aktivität werden WF weiterhin eingeteilt in [32]

- epithelbildende Faktoren, z.B. Epidermal Growth Factor (EGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF)
- bindegewebbildende Faktoren, z.B. Fibroblasts Growth Factor (FGF), Transforming Growth Factor β (TGF β)
- angiogenetischer Faktoren, z.B. Vascular endothelial Growth Factor (VEGF))
- thrombozytäre, z.B. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)
- osteogenetische Faktoren, z.B. Bone Morphogenic Proteins (BMP)

2.7 Wundheilung

Die kutane Wundheilung ist ein komplexes Geschehen zellulärer, molekularer, physikalischer und biochemischer Ereignisse. Ihre Einteilung erfolgt in die drei klassischen Hauptphasen: Inflammation, Proliferation und Reparatur [32].

Für den ungestörten Ablauf der Gewebereparation sind Wachstumsfaktoren von essentieller Bedeutung. Für die bestmögliche Wiederherstellung von Funktion und Morphologie des verletzten Gewebes ist ein gut koordiniertes Zusammenspiel einzelner Faktoren unabdingbar. Dieser Regelmechanismus ist bei der sekundären Wundheilung sowie in chronischen Wunden gestört [83].

Im folgenden wird auf die Rolle der verschiedenen WF in der Wundheilung näher eingegangen.

2.7.1 Wundheilung mit Thrombozytenaktivierung

Bei Gewebeerletzungen kommt es in der Regel zur Läsion von Blutgefäßen und Extravasation von Blutbestandteilen. Dabei sind Thrombozyten von zentraler Bedeutung. Sie initiieren die Blutgerinnung und schütten durch Degranulation ihrer α -Granula hohe Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in die Wunde aus. α -Granula enthalten TGF α , FGF-2, Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor (PDECGF) und vor allem PDGF und TGF β . Unter diesen WF scheint PDGF der wesentlichste Initiator der Wundheilungskaskade zu sein [83]. Er aktiviert Makrophagen und Fibroblasten, die ihrerseits Wachstumsfaktoren sezernieren und die Reparatur bewirken.

Das Ziel der Blutgerinnung ist die Abdichtung des Defekts durch Bildung eines Fibrinthrombus. Fibrin bildet ein Netz für die Migration von Entzündungszellen sowie mesenchymalen, epithelialen und endothelialen Zellen. Fibrin stimuliert ebenfalls die Angiogenese [83]. Aus dem Serum und von aggregierten Thrombozyten stammendes Fibronectin überzieht das Fibrin und ermöglicht damit das Haften wandernder Zellen auf dem Fibrinnetz. Fibronectin wird von Fibroblasten und epithelialen Zellen produziert und stellt eine enorm wichtige Komponente der frühen Matrix und der reifen Dermis dar [83]. Fibrin und Fibronectin binden verschiedene Zytokine, die zum Verletzungszeitpunkt freigesetzt wurden und bilden ein Faktorenreservoir, welches für spätere Heilungsstadien entscheidend ist.

2.7.2 Wundheilung ohne Thrombozytenaktivierung

Die Reparatur des Wundgewebes kann auch ohne Thrombozytenaktivierung erfolgen. Bakterielle Produkte, verschiedene Wachstumsfaktoren (PDGF, TNF α) und Abbauprodukte etc. locken neutrophile Granulozyten chemotaktisch an. Diese wandern in die Wunde ein, bauen Detritus, Fremdkörper und Bakterien ab und werden anschließend von Makrophagen phagozytiert. Neutrophile Granulozyten sezernieren wiederum proinflammatorische Zytokine, welche die ersten Signale zur Aktivierung von lokalen Keratinozyten und Fibroblasten darstellen. Unter anderem regen fragmentiertes Kollagen, Fibronectin und TGF β die Migration der Makrophagen an. Makrophagen sind als primäre Zytokinquelle für eine normale Wundheilung enorm wichtig. Sie produzieren PDGF, VEGF, TGF α , TGF β , Insulin Growth Factor I (IGF-I), TNF α , Interleukin 1 (IL1) und FGF und fördern die verschiedenen Heilungsprozesse. PDGF und TGF β fördern insbesondere die mitotische und matrix-synthetisierende Aktivität von Fibroblasten [32].

2.7.3 Mesenchymale Zellmigration und Proliferation

Zwischen dem zweiten und vierten Tag der Reparation überwiegen Chemotaxis, Migration und Proliferation mesenchymaler Zellen, Angiogenese und Reepithelisierung. Fibroblasten von umgebendem, unbeschädigtem Gewebe wandern unter dem Einfluß chemotaktischer Anziehung durch Zytokine und anderer Faktoren in die provisorische Matrix ein. Obwohl die Zytokine meistens Entzündungszellen entstammen, können auch Fibroblasten größere Mengen dieser Faktoren produzieren. Möglicherweise geben Fibroblasten selbst chemotaktische Zytokine ab, womit sie ihre eigene Migration fördern [83]. Die Fortbewegung der Zellen in der Matrix wird ermöglicht durch ihre Fähigkeit, sich an die Liganden Fibrin, Fibronectin, Vitronectin binden und von ihnen lösen zu können. Die Bindung geschieht über Zellmembranrezeptoren der Integrinfamilie. PDGF und TGF β regulieren die Integrinexpression in Fibroblasten hoch [83]. Gleichzeitig stimuliert TGF β die Sekretion proteolytischer Proteine durch Fibroblasten. Der enzymatischen Abbau dieser Proteine erleichtert zusätzlich die Zellmigration durch die Matrix [83]. Zwischen dem dritten und fünften Tag sind die Fibroblasten in die Wunde eingewandert und bilden nun die vorherrschende Zellart im Wundgewebe [83]. Sie beginnen mit der Synthese von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykan, die meist weitere zwei bis vier Wochen anhält. Unter den WF ist TGF β der potenteste Stimulus der Kollagensynthese, da er gleichzeitig die Proteaseaktivität vermindern kann. Weiterhin fördern EGF, FGF und PDGF die Kollagenproduktion [83].

2.7.4 Neoangiogenese

Zur Initiation der Angiogenese sind FGF1 und FGF2 die wichtigsten WF, jedoch sind VEGF, TGF β und viele andere WF (PDEC GF, EGF, TGF α) ebenfalls bedeutende Mediatoren. Niedrige O₂-Werte, ein hoher Laktatspiegel und ein saurer pH-Wert im Gewebe induzieren deren Freisetzung u.a. durch aktivierte Makrophagen, Endothelzellen und epidermale Zellen [83, 32].

Man nimmt an, dass die das Zellwachstum nicht direkt beeinflussenden WF sich auf die Reifung des vaskulären Systems positiv auswirken [83]. Beispielsweise wird vermutet, dass TGF β das Wachstum endothelialer Zellen nur nach ihrer phänotypischen Veränderung zu einer eher gebogenen Form stimuliert. Zudem werden die WF höchstwahrscheinlich zeitlich versetzt ausgeschüttet [32].

Am Tag der Verletzung initiiert bFGF die Angiogenese und wird ab dem vierten Tagen von VEGF abgelöst. Unter VEGF kommt es zur Transformation von Fibroblasten zu Endothelzellen und Formation von Kapillaren. Nach Füllung der Wunde mit Granulationsgewebe endet der Prozess der Angiogenese. Viele Gefäße werden durch apoptotische Vorgänge wieder zurückgebildet. Es entsteht ein gefäßarmes Narbengewebe [83].

2.7.5 Reepithelisation

Reepithelisation stellt eine Sequenz von zellularen Ereignissen dar, welche unmittelbar nach Verwundung beginnen. Dazu gehören das Ablösen der Zellen, Migration, Proliferation und Differenzierung [73].

Unter dem Einfluss von KGF machen Keratinozyten eine Metamorphose durch [32].

Zunächst verdickt sich das Str. Basale am Wundrand. Randzellen dehnen sich aus und lösen sich nach Auflösen der Desmosomen aus dem Zellverband. Desweiteren bilden epidermale Zellen Aktinfilamente und exprimieren verschiedene Integrine (Fibronektin-Rezeptor, etc.) zur besseren Fortbewegung. Sie wandern bevorzugt als Monolayer, in der so genannten „leapfrog fashion“ (Bockspringen), in Richtung Wunde [83]. Sobald wandernde epidermale Zellen auf Migrationszellen des gegenüberliegenden Wundrandes treffen, stellen sie ihre Migration aufgrund von Kontaktinhibition ein. Die Keratinozyten differenzieren sich zu basalzellähnlichen Keratinozyten, bilden Desmosomen für interzelluläre Kontakte und eine neue Basalmembran. Ein bis zwei Tage später veranlassen vermutlich KGF und TGF α die Zellteilung der Keratinozyten. Die Proliferation hält solange an, bis eine vielschichtige Epidermis gebildet ist. Nachfolgend keratinisieren die oberflächlichen Zellen. An diesen Prozessen sind außer KGF und TGF α , EGF, Heparinbinding EGF (HB-EGF) und bFGF beteiligt. TGF β kann zwar die Migration von epidermalen Zellen steigern, aber nicht deren Proliferation [83, 32].

2.7.6 Wundkontraktion und Narbenbildung

Unter dem Einfluss von Matrixproteinen, PDGF, FGF, TGF β 1 und TGF β 2 können Fibroblasten im Verlauf der zweiten Woche zu Myofibroblasten mutieren. TGF β scheint als Mediator der Wundkontraktion die Kollagenetzkontraktion zu stimulieren [83]. Mit steigender Anzahl von Myofibroblasten nimmt die Menge an Fibronektin und die Wundkontraktion zu. Die Kontraktion der Wunde beginnt schon am vierten Tag und kann bei primärer Wundheilung für weitere 12-15 Tage anhalten [83]. Im weiteren Verlauf der Narbenentstehung nimmt der Gehalt an Kollagen innerhalb der Wunde ständig ab. Kollagenolytische Enzyme, Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) bauen das Kollagen ab. MMP's werden von Makrophagen, epithelialen und endothelialen Zellen sowie Fibroblasten sezerniert. Die Interaktionen von MMP's und deren Inhibitoren sind für die Qualität des Narbengewebes entscheidend [32].

2.8 Das kutane Strahlensyndrom

Die durch ionisierende Strahlung ausgelösten pathophysiologischen Vorgänge und klinischen Symptome in der Haut, an sichtbaren Schleimhäuten und ihren Anhangsgebilden werden in ihrer Gesamtheit als kutanes Strahlensyndrom bezeichnet [112, 56].

2.8.1 Stadien der kutanen Strahlenreaktion

Kennzeichnend ist ein phasenhafter Verlauf der Strahlenreaktion. Die Reihenfolge der einzelnen Phasen ist nach Gottlöber [56] gesetzmäßig. Ihre Ausprägung und Dauer wird von Strahlendosis, Strahlenqualität und der individuellen Empfindlichkeit bestimmt [56]. Durch die „2nd Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Radiation Injuries“ erfolgte 1993 eine erneuerte internationale Definition und Einteilung der kutanen Strahlenreaktion [56].

Sie wird in folgende Stadien unterteilt:

- Prodromalstadium
- Manifestationsstadium
- subakutes Stadium
- chronisches Stadium
- Spätstadium

Während des Prodromalstadiums ist ein vorübergehendes Erythem charakteristisch, eventuell verbunden mit Juckreiz und Brennen.

Kennzeichnend für das Manifestationsstadium sind klar begrenzte Erytheme an den betroffenen Körperregionen, meistens ödematös verdickt. Bei schwerem Krankheitsverlauf können unmittelbar subepidermale oder hämorrhagische Blasen auftreten. Weitere mögliche Symptome sind sterile Pusteln an Handinnenflächen und Fußsohlen, die als Spannungsblasen in Erscheinung treten, sowie akute Strahlenulzera. Strahlenulzera sind scharf begrenzte demarkierte Nekrosezonen, entweder von einer ischämischen Randzone oder einem entzündlichen Erythem umgeben [56].

Histopathologische Veränderungen in der akuten Phase zeigen sich zunächst durch Anzeichen des Zelluntergangs, es werden Gefäßalterationen sichtbar. Anschließend findet eine Infiltration von Entzündungszellen im Gewebe statt, vor allem eosinophile und neutrophile Granulozyten [56].

Das subakute Stadium zeigt hauptsächlich livide Erytheme. Häufig sind sie von Ulzeration im vermeintlich unbeschädigten Gewebe begleitet. Blasenbildungen sind weniger häufig anzutreffen. Am histologischen Schnitt sind die Merkmale der Strahlenvaskulopathie und häufig eine frühzeitige Kollagenbildung feststellbar.

Die chronische Phase manifestiert sich klinisch als diffuse Atrophie der Haut mit Hypo- und Hyperpigmentierungen, Erythemen, Teleangiektasien, Keratosen sowie dermale bzw. subkutane entzündliche Fibrosen und Ulzera. Histologische Veränderungen sind epidermale Atrophien, Gefäßerweiterungen, lymphozytäre Infiltrate, Hyperkeratosen und eine Vermehrung des kollagenen Bindegewebes, welches gequollen erscheint.

Ulzera, Teleangiektasien und Neoplasien mit langen Latenzzeiten (Jahrzehnte) sind Symptome des Spätstadiums. Auftretende Tumore sind Karzinome, Sarkome, Angiome und Basalzellkarzinome [56].

2.8.2 Pathologie der Strahlenreaktion im Normalgewebe

Erste Anzeichen der Strahlenreaktion sind Schäden an der Endstrombahn des Blutgefäßsystems. In Studien wurde eine erhöhte Permeabilität bei kleinen Blutgefäßen und der endothelialen Auskleidung größerer Gefäße nachgewiesen [22]. Als verursachender Prozess wird die Depolymerisation der mukopolysacchariden Kittsubstanz des Endothels und die Schädigung der Endothelzellen durch Freisetzung von vasoaktiven Aminen, Histamin und Serotonin angenommen [8]. Es folgt eine Ödematisierung der Gefäßwände und des Extrazellularraums nach Transudation von Plasmabestandteilen ins Gewebe. Das Exsudat und die Änderungen des extrazellulären Milieus wirken als Mediatoren für Entzündungszellen. Die Endothelzellen reagieren darauf mit

einer irregulären Proliferation. Die neugebildeten Blutgefäße besitzen einen anormalen Durchmesser sowie eine unregelmäßige Form und sind nur bedingt funktionsfähig. Der fibrinöse Ersatz der geschädigten Gefäßwände erhöht die histochemische Barriere und bedingt eine Mangelversorgung betroffener Organ- bzw. Gewebestrukturen. Daraus ergeben sich die so genannten Spätreaktionen im Gewebe, welche mit Fibrose, Gewebeatrophie, Ulzeration, Obsoleszenz und Teleangiektasie der Endstrombahn einhergehen [8].

2.9 Transforming Growth Factor- β (TGF β)

TGF β konnte erstmals in von Retroviren transformierten Zellen nachgewiesen werden und heißt deshalb Transforming Growth Factor [124]. Als pluripotenter WF kommt TGF β in beinahe allen Geweben und Zellen vor [16, 111].

Die TGF β -Superfamilie besteht derzeit aus über 30 Faktoren. Die Unterteilung erfolgt in die Inhibin/Aktivin-Familie, die Müllerian-Inhibiting-Substance (MIS)-Familie und die Bone Morphogenic Proteins (BMP)-Familie, sowie die DVR-Gruppe (decapentaplegic (dpp) und VG1 verwandte Moleküle) [124, 19, 111].

Bisher sind fünf TGF β -Gene identifiziert und als TGF β 1 bis TGF β 5 bezeichnet worden. TGF β 1-3 sind Isoformen der Säugetiere. Sie weisen Aminosäurehomologien von 70-80% auf [55]. Diese Isoformen werden von fast allen kernhaltigen Zellen synthetisiert. Hauptbildungsort sind Thrombozyten und Knochenzellen. Auch Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen bilden den WF [66].

Faktoren der TGF β -Familie werden als Propeptide synthetisiert und sezerniert. Die Moleküle können in drei Regionen unterteilt werden: die 5'N-terminale Signalsequenz, die Prodomäne und die reife Protein-3'C-Domäne [111]. Die Familienmitglieder können in allen drei Regionen Variationen aufweisen. Die reifen Proteindomänen der TGF β -Isoformen bilden aus zwei Aminosäurenketten Homodimere, gelegentlich Heterodimere [111]. Im Vergleich zu Vorläuferregionen weisen die „reifen“ Regionen der einzelnen TGF β -Isoformen höhere Homologien auf. Allen Faktoren der Superfamilie ist ihre dimeren Molekülstruktur der aktiven Form gemein [124, 19].

TGF β wird als ein inaktives (latentes) Signalmolekül freigesetzt. Zellen synthetisieren zwei verschiedene latente TGF β -Formen, den so genannten kleinen latenten Komplex („small latent complex“) und den großen latenten Komplex („large latent complex“). Den kleinen latenten Komplex bilden ein TGF β -Homodimer und das Latency Associated Peptide (LAP). Das vorläufig assoziierte LAP wird nicht kovalent an das TGF β -Homodimer gebunden [16]. Zusätzlich kann der kleine latente Komplex (TGF β plus LAP) ein weiteres Protein von unterschiedlicher Größe kovalent binden, das Latente-TGF β -Bindungsprotein (LTBP). LTBP und der kleine latente Komplex bilden dann zusammen den großen latenten Komplex. Dieser ist die bevorzugt sezernierte Form. Durch das LTBP kann TGF β , bzw. der kleine latente Komplex, in der Matrix gespeichert werden [16].

Um biologisch aktiv zu werden und an Rezeptoren binden zu können, müssen zunächst beide Proteine, LTBP und LAP, entfernt und das reife TGF β freigesetzt werden. Die

Abspaltung der Proteine sowie deren Aktivierung erfolgt durch die Protease Plasmin [92] oder Thrombospondin-1 [105], bzw. durch den niedrigen pH-Wert im Wundengewebe. Ein weiteres Charakteristikum, das nahezu alle aktiven Familienmitglieder besitzen, ist eine konstante C-terminale Struktur, bestehend aus sieben Cysteinresten, von welchen sechs einen rigiden Cystein-knoten bilden [111]. In ihm verbinden je zwei aktive TGF β -Dimere ihre vier Aminosäureketten über Disulfidbrücken [138]. Diese Besonderheit könnte die große Resistenz des Wachstumsfaktors gegenüber extremen pH-Bedingungen, Hitze und Denaturierung erklären [77].

2.9.1 TGF β als multifunktionaler WF

TGF β 's sind potente parakrin und autokrin wirkende Regulatoren von Zellwachstum, Differenzierung, Morphogenese, Adhäsion, Angiogenese, Immunantwort, Chemotaxis und Apoptose. Ferner induzieren sie die Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM) und wirken auf deren Formation [16, 55, 109]. Zudem stimuliert TGF β in epithelialen und mesenchymalen Zellen (Fibroblasten) die Synthese von Integrinen und ist in seiner aktiven Form für neutrophile Zellen und Makrophagen chemotaktisch [49, 111]. Zwei biologische Hauptfunktionen von TGF β sind die Induktion der Produktion der EZM und deren Formation sowie die Wachstumshemmung vieler Zellarten ektodermalen Ursprungs (Keratinocyten, Lymphocyten, Endothelzellen und Makrophagen) [12, 16]. Die Proliferation von Fibroblasten dagegen stimuliert TGF β parakrin via Induktion von PDGF [55]. TGF β 1 fördert die Produktion von Kollagen und Fibronectin. Gleichzeitig hemmt TGF β 1 die Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) mit Hilfe ihrer Gegenspieler, den MMP-Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP)). Zusätzlich unterstützt TGF β die Kollagenreifung [16, 38, 28, 14].

Im Wundheilungsprozess ermöglicht TGF β 1 nicht nur die Migration von Monozyten, Neutrophilen, Makrophagen und Fibroblasten, sondern spielt auch eine Rolle bei der Bildung des Granulationsgewebes [168]. Migrationskeratinocyten regulieren ihre TGF β 1 Expression hoch [67]. Es wird angenommen, dass TGF β 1 und TGF β 2 primär für exzessive Narbenbildung verantwortlich sind, während TGF β 3 als natürlicher Antagonist die zwei anderen Isoformen herunter reguliert und vermutlich eine hemmende Funktion auf die Narbenbildung hat [79, 111]. Das relative Verhältnis der TGF β Isoformen zueinander in der frühen Wundheilungsphase ist für eine begrenzte Narbenbildung ausschlaggebend [111]. Niedrige Dosen von TGF β verbessern die Wundheilung. Hohe Dosen resultieren in einer signifikanten Wundheilungshemmung ohne eine verminderte Kollagenexpression aufzuweisen [14].

Die TGF β -Immunoreaktivität und Mastzellhyperplasie im Bindegewebe werden gleichermaßen für die spontane und späte Reaktion des enteralen Normalgewebes nach Bestrahlung verantwortlich gemacht [127]. Auch in der normaler Haut und im subkutanen Gewebe konnte beobachtet werden, dass die Co-Expression von TNF α und TGF β 1 an der akuten Strahlenreaktion beteiligt ist [153]. ELISA-Untersuchungen des Kulturmediums nach subkonfluenter Bestrahlung von Lungenfibroblasten (Ratte) konnten nach einer Einzeldosis von 4 Gy eine Erhöhung der TGF β -Spiegels um 60% nachweisen. Man vermutet, dass TGF β 1 eine wichtige Funktion bei der Auslösung der strahlenbedingten Hemmung von Zellproliferation und Induzierung der terminalen Differenzierung

von Ratten-Lungenfibroblasten übernimmt [64]. Verschiedene Theorien vermuten nach Strahlenexposition die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Entzündungszellen, welche die TGF β -Produktion in der humanen Haut auslöst [66]. Andere Theorien gehen davon aus, dass ionisierende Strahlung direkt die Genexpression von fibrogenen Zytokinen (TGF β) via Induktion von AP-1 stimuliert [125].

Eine Prämedikation mit verschiedenen Zytokinen (IL1, TNF α) konnten Mäuse vor lethalen hämatopoetischen Schäden, verursacht durch ionisierende Strahlung schützen [109]. Die Gabe von TGF β dagegen sensibilisiert Mäuse für radioaktive Schäden. TGF β hemmt den Zellzyklus hämatopoetischer Vorgängerzellen und erhöht deren Apoptose.

2.9.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des TGF β 3-Proteins in normaler und verwundeter Haut

In normaler humaner Haut ist TGF β 3 in allen epidermalen Lagen, außer im Str. corneum, zu finden. Auch dermale Fibroblasten exprimieren TGF β 3 [55].

In akuten Brandwunden und chronischen Ulkuswunden kann in Keratinozyten und Fibroblasten keine deutliche Expressionssteigerung von TGF β 3 m-RNA festgestellt werden [111].

2.9.1.2 Nachweis des TGF β 1-Proteins in der Wundflüssigkeit

Die Wundflüssigkeit kutaner, humaner Wunden wurde auf TGF β 1 mittels Sandwich-ELISA untersucht [152]. Nach sieben Tagen waren die Wunden makroskopisch verheilt und hatten nach 11 Tagen ihre Barrierefunktion rekonstruiert. Der endogene TGF β 1-Proteingehalt war von einem hohen initialen Peak (nach 24 h) gekennzeichnet. Am Zeitpunkt der Heilung (6. Tag) sank der TGF β 1-Gehalt zunächst auf die Basiskonzentration ab und war am 8. Tag wieder über den Ausgangswert (24 h) angestiegen. Im Wundheilungsverlauf erreichte die TGF β 1-Konzentration der Wundflüssigkeit nie den Serumspiegel [152].

2.10 Der TGF β -Rezeptor (TGF β R)

TGF β bindet an die drei TGF β -Rezeptoren Typ I, II und III. Rezeptor Typ I und II sind transmembrane, signalübertragende Serin/Threonin-Kinasen [111]. Der konstant aktive Typ II-Rezeptor formiert nach der Ligandenbindung mit dem Typ I-Rezeptor einen heterotetrameren Komplex. Dabei wird Rezeptor Typ I durch Phosphorylierung aktiviert und die Weiterleitung der Signalkaskade ausgelöst. Als nächstes aktiviert der Typ I-Rezeptor Transkriptionsfaktoren, die so genannten Smad-Proteine. Sie stellen eine direkte Verbindung von dem aktivierten Rezeptor zum regulierenden Gen dar. Smad-Proteine wandern in den Zellkern, um dort die Transkription der Zielgene zu regulieren. Es sind drei Gruppen dieser Proteine beschrieben worden, die R-Smads (Receptor regulated, R-Smad1, -2, -3, -5, -8), Co-Smad (Common mediator, Co-Smad4) und I-Smads (Inhibitory, I-Smad6, -7) [141, 103].

Allerdings kann die Zelle auch ohne Beteiligung von Smad-Proteinen Signale weiterlei-

ten. Studien haben bei der Ligandenbindung von TGF β -Rezeptoren die Aktivierung von Smad-unabhängigen Signaltransduktionswegen nachgewiesen [141, 103].

2.10.1 Endoglin (CD 105)

Endoglin ist ein Mitglied der nicht signalübertragenden TGF β -Rezeptor-Familie. Es ist ein homodimeres, transmembranes Glykoprotein vom Typ I [46, 113]. Für den signalübertragenden TGF β R-Komplex stellt Endoglin eine Art Hilfskomponente dar. Gemeinsam mit Betaglycan, einer weiteren Komponente des TGF β R-Komplexes, bezeichnet man Endoglin auch als TGF β R Typ III. Seine Funktion als Rezeptorligand ist jedoch immer noch wenig verstanden [113]. Einerseits ist die Gegenwart des Liganden (TGF β) Voraussetzung für eine Verbindung von Endoglin mit den signalübertragenden Rezeptoren Typ I und II. Andererseits kann Endoglin nur in Verbindung mit dem TGF β R Typ II TGF β 1 und TGF β 3 binden, nicht aber TGF β 2 [16, 46]. Die Bindung an die Rezeptoren Typ I und II erfolgt mit der extrazellulären und zytoplasmatischen Endoglin-domäne. Dabei interagiert TGF β R Typ I, im Gegensatz zu TGF β R Typ II, nur mit der zytoplasmatischen Endoglin-domäne, solange er selbst inaktiv ist [60]. Nach der Vereinigung phosphorylieren beide signalübertragenden Rezeptoren die zytoplasmatische Endoglin-domäne. Daraufhin dissoziiert TGF β R Typ I vom Komplex [60]. TGF β 1 induziert die Expression des Endoglin-kodierenden Gens [46]. Eine Endoglin-Expression verändert den Status der Phosphorylierung von TGF β R Typ I und Typ II, ebenso den der Smad-Proteine [60]. In Myoblasten von Ratten konnte die Expression von Endoglin mit einer vermehrten TGF β -Bindung an den Signalrezeptorkomplex in Verbindung gebracht werden [85]. Möglicherweise modelliert Endoglin durch seine Interaktionen zelluläre Wirkung von TGF β [60]. Studien deuten darauf hin, dass die unterschiedlichen Endoglin-Expressionsspiegel zur komplexen Regulation von Zellreaktionen auf TGF β 1 beitragen. Eine Studie über Myoblasten von Ratten fand heraus, dass die Überproduktion von Endoglin, in Bezug auf Wachstumshemmung und die Synthese von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, eine verminderte TGF β -Zellreaktion bewirkt [85]. Ob beispielsweise ein Gewebe vaskularisiert wird, hängt höchstwahrscheinlich von der erreichten Balance zwischen TGF β 1-Stimulation und der Endoglin-Expression ab [46].

Endoglin wird hauptsächlich auf Endothelzellen, aktivierten Monozyten und Makrophagen expremiert [130]. Vor allem proliferierende Endothelzellen in Zellkulturen und entstehenden Blutgefäßen von benignen und malignen Geweben expremieren Endoglin übermäßig. Deshalb gilt Endoglin auch als optimaler Marker endothelialer Proliferation [46]. In der Haut kommt Endoglin in stromalen Fibroblasten und Melanozyten und aktivierten Makrophagen vor [46]. Nach Bestrahlung wurde in HUVECs (normal human umbilical-vein endothelial cells) eine dosis- und zeitabhängige Induzierung der Endoglinexpression auf der Plasmamembran der proliferierenden und nicht-proliferierenden Endothelzellen festgestellt [155].

2.10.1.1 Immunchemischer Endoglin-Nachweis in normaler, verwundeter Haut

In der normalen Haut lässt sich Endoglin in dermalen Fibroblasten und der Epidermis nachweisen [46]. Bei pathologischen Vorgängen, welche mit Gefäßneubildungen und Hypoxie verbunden sind (z.B. während Entzündungen, in ischämischen Geweben und Tumoren), wird Endoglin stark expremiert [130]. Die molekularen Mechanismen der Induktion sind nicht bekannt. Während Hypoxie allein die Endoglin-Transkription nur moderat steigern konnte, resultierte die zusätzliche Gabe von TGF β in einer markanten Stimulation [131]. Proliferierende Zellen zeigen ebenfalls eine verstärkte Endoglin-Produktion [31].

2.11 Keratinocyte Growth Factor (KGF)

Im Jahre 1989 wurde KGF zum ersten Mal von der Arbeitsgruppe Rubin et al isoliert [129], jedoch erst später als Mitglied der Fibroblast Growth Factor (FGF)-Familie identifiziert, und zwar als FGF-7 [160]. Das Monomerprotein KGF hat ein Molekulargewicht von 26-28 kDa und weist 30-45% Sequenzhomologien mit anderen Mitgliedern der FGF-Familie auf [129, 19].

Der WF wird von verschiedenen mesenchymalen Zellen, beispielsweise Fibroblasten, produziert [160, 17]. KGF kommt ebenso in aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen, epidermalen Melanozyten und Tumorzellen vor [91, 160]. In Zellen epithelialen Ursprungs konnte bisher nie eine FGF-7 Expression nachgewiesen werden [160]. Bezeichnend ist, dass der KGF-Rezeptor (FGFR-2IIIb), an den KGF mit hoher Affinität bindet, auf einer Vielzahl epithelialer Zellarten zu finden ist. Dies lässt darauf schließen, dass KGF vorwiegend parakrin wirkt [160]. Als hochspezifisches Mitogen für epitheliale Zellen regt KGF deren Proliferation und Migration an und unterstützt gleichzeitig den natürlichen Ablauf des Differenzierungsprozesses. Kulturstudien mit humanen Keratinozyten ergaben, dass KGF ein stärkeres Mitogen als EGF ist [129]. Aufgrund seiner Funktionen ist KGF essentiell für die Regulation der epidermalen Gewebshomöostase und normale Epithelerneuerung [160, 159].

Studien an transgenen Mäusen mit dominant negativen KGF-Rezeptoren in normalen, basalen Hautkeratinozyten sind charakterisiert durch epidermale Atrophie, stark reduzierte Haarfollikel mit abnormaler Morphologie und eine dermale Verdickung. Durch ein zu frühes Einsetzen der Verhornung in niederen suprabasalen Lagen, ist die natürliche Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der epidermalen Zellen zerstört [160]. Umgekehrt zeigen transgene Mäuse mit einer Überproduktion von KGF eine epidermale Hypertrophie. Weiterführende Untersuchungen am dreidimensionalen Hautmodell konnten bei einer KGF-Überproduktion die spezifische Proliferationssteigerung suprabasaler Schichten nachweisen [4]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der KGF-Spiegel und die Aktivität des WF die Keratinozyten-Proliferation und somit die epidermale Dicke reguliert [160]. Gleichzeitig kann KGF das für die Differenzierung spezifische Faktormuster von epithelialen Zellen verändern. Es verzögert deren Differenzierung, beispielsweise durch eine vermehrte $\alpha 5\beta 1$ -Expression und eine gehemmte K10- und Transglutaminaseproduktion [4].

Die Funktion von KGF als Mediator in mesenchymalen-epithelialen Interaktionen wird durch die KGF-Expression reguliert. Parakrine Regulatoren dermalen Zellen steuern die KGF-Expression und damit das Keratinozytenwachstum und die Zelldifferenzierung [96, 160, 139]. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren, einschließlich PDGF, TGF α und EGF, erhöhen den KGF-Transkriptionsspiegel in Fibroblasten [94], wobei TGF β keinen Einfluss auf die KGF-Expression hat [160].

Interessant sind auch Ergebnisse von Untersuchungen an KGF-knock-out Mäusen. Obwohl KGF während der Entwicklung der Mäuse und später in der adulten, normalen Haut kontinuierlich exprimiert wird, konnten bei diesen Mäusen nur geringe phänotypische Veränderungen, aber keine histologischen Defekte festgestellt werden. Inzwischen hat Beer et al ein neues Mitglied der FGF-Familie, FGF-10, entdeckt [9]. Es besitzt ähnliche Eigenschaften wie KGF und bindet mit ebenso großer Affinität an den KGF-Rezeptor (FGFR-2-IIIb). FGF-10 kann das fehlende KGF in der Haut kompensieren [160]. Der FGFR-2-IIIb ist eine Splice-Variante des FGFR2. FGFR2 ist ein transmembraner FGF-Rezeptor der Tyrosinkinase-Familie.

Ergebnisse mehrerer Studien lassen darauf schließen, dass KGF eine wichtige Rolle in Entzündungs- und Heilungsprozessen übernimmt [160]. Zudem kann er *in vivo* und *in vitro* als protektiver Faktor für verschiedene epithelialer Zelltypen agieren [51, 160].

2.11.1 KGF in der Wundheilung

Während hämorrhagischen Vorgängen werden WF freigesetzt, welche initiale Induktoren der KGF-Expression sind. Das sind insbesondere die Serumfaktoren PDGF und EGF [160].

In den ersten 24 h wandern Leukozyten und Makrophagen in die Wunde ein und gewährleisten die Aufrechterhaltung der KGF-Expression. Sie produzieren verschiedene proinflammatorische Zytokine, vor allem Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und TNF α [160]. IL-1 gilt als stärkster KGF-Induktor für kutane Fibroblasten, sogar für bestrahlte, postmitotische Fibroblasten. IL-1 wird von Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert [96]. Wissenschaftler vermuten während des Heilungsprozesses eine dermal-epidermale Feedbackschleife, in welcher möglicherweise IL-1 und TGF α involviert sind, die beide von Keratinozyten produziert werden [159]. Diese Vermutung unterstützen Studien an organotypischen Co-Kulturen aus Keratinozyten und Fibroblasten von Smola [139] und Mass-Szabowski [96]. Im Gegensatz zu Monokulturen erhöhen natürliche, epidermale Keratinozyten in humanen Co-Kulturen die Produktion von IL-1a und IL-1b, um über deren Rezeptoren auf dermalen Fibroblasten die KGF-Expression zu stimulieren. Gleichzeitig exprimieren Fibroblasten vermehrt den IL-1-Rezeptor Typ 1 und sezernieren KGF [96].

Während in der normalen Haut nur eine schwache KGF-Expression zu beobachten ist, kommt es nach Verwundung zu einer starken Hochregulierung [13]. Sowohl die Arbeitsgruppe um Werner [160] konnte nach Verwundung muriner Haut eine Hochregulierung des KGF-mRNA-Spiegels in den ersten 24 h feststellen, als auch Marchese et al bei Untersuchungen von humaner Haut [94]. Der KGF-mRNA-Gehalt war in der humanen Haut nach Verletzung um das acht- bis zehnfache des Basalwerts erhöht. In beiden Studien blieb der KGF-Spiegel mehrere Tage post-traumatisch erhöht [94].

Umgekehrt weisen schlecht heilenden Wunden von Mäusen erniedrigte KGF-Werte auf [160]. In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte die exogene Verabreichung von KGF auf unterschiedliche Wundtypen die Heilung fördern. In den meisten Fällen konnte der Wundschluss beschleunigt und nach Abheilung des Wundgewebes ein dickeres Epithel festgestellt werden. Trotz erhöhter Reepithelisierungsrate war der Differenzierungsprozess von Keratinozyten nicht gehemmt [19]. Neuere Wundheilungsstudien nach KGF-Gen-Transfer zeigen nicht nur eine verbesserte Regenerationsfähigkeit der Epidermis sondern auch der Dermis. Dabei konnte die Förderung der epithelialen Proliferation und eine verminderte Hautzellen-Apoptose nachgewiesen werden. In der Dermis wurden erhöhte Kollagen-Ablagerungen mit verbesserter Morphologie beobachtet. Ebenfalls war die Neovaskularisation beschleunigt und die VEGF-Konzentrationen erhöht. KGF-cDNA stimuliert nicht nur Keratinozyten, sondern auch mesenchymale Zellen durch IGF-I Konzentrationssteigerungen [72, 25].

Die gesteigerte Expression von KGF in Fibroblasten scheint eine wichtige Voraussetzung für die parakrine Stimulation der Reepithelisation während der Wundheilung zu sein. Dabei ist KGF nicht nur für eine normale Epithelerneuerung verantwortlich, sondern sorgt ebenfalls für eine kontrollierte Zellmigration und -proliferation [160, 19]. KGF stimuliert die Zelladhäsion von Keratinozyten an Kollagen und Fibronectin durch Bildung von Integrinrezeptorkomplexen und fördert damit die Migration auf diesen Extrazellulärmolekülen [122]. Diese Ergebnisse könnten zur Annahme verleiten, dass KGF essentiell für die Wundheilung ist. In genetischen knock-out Studien an Mäusen konnte trotz Abwesenheit von KGF eine phänotypisch normale Wundheilung beobachtet werden [160]. Genauso wie FGF-10 in der natürlichen Haut weitestgehend die Funktionen von KGF übernehmen konnte, kann FGF-10 das Fehlen von KGF während der Wundheilung kompensieren. Allerdings führt eine Blockade der KGF-Rezeptoren (bei transgenen Mäusen mit dominant negativen Rezeptoren) zu einer mangelhaften Reepithelisierung. Die Proliferationsrate war um 90% reduziert und vermutlich ebenso die Migration der Keratinozyten [160, 51].

KGF agiert *in vivo* und *in vitro* als protektiver Faktor für verschiedene epitheliale Zelltypen [51, 160]. Zum Beispiel schützt er epitheliale Zellen vor toxischen Effekten reaktiver Sauerstoffderivate [13]. Solche reaktiven Moleküle entstehen in der akuten Heilungsphase durch so genannte oxidative Bursts. Leukozyten erzeugen oxidative Bursts, um eindringende Bakterien abzutöten [160]. In HaCaT-Zellen konnte eine von KGF positiv regulierte Non-Selenium-Gluthathion Peroxidase nachgewiesen werden [160]. Während der kutanen Wundheilung korreliert die Peroxidase-Genexpression mit der KGF-Expression. In KGF-Rezeptor tragenden Keratinozyten waren die höchsten mRNA-Spiegel der korrespondierenden Peroxidase zu finden. Das könnte bedeuten, dass KGF über die Peroxidase Keratinozyten vor oxidativen Bursts schützt und für ihr Überleben entscheidend ist [160].

Bei der Erforschung von KGF-regulierten Genen in Keratinozyten konnte das kodierende Gen des Transkriptionsfaktors NF-E2 related factor 2 (Nrf2) identifiziert werden. Für eine normale Heilungsrate ist die Induktion des mit Nrf2 koexprimierten Transkriptionsfaktors, Nrf3, mit entscheidend. Nrf3 konnte ebenfalls als Zielfaktor von KGF identifiziert werden. Nrf2 ist das Schlüsselprotein in zellularen Reaktionen auf Stress. Das könnte auch im Regenerationsgeschehen von großer Bedeutung sein. Interessanter-

weise war bei Nrf2 knock-out-Mäusen in Wundheilungsstudien die Expression verschiedener Schlüsselfaktoren in der frühen Reparationsphase signifikant reduziert. Die späte Wundheilungsphase war von einer anhaltenden Entzündung gekennzeichnet. Während der kutanen Wundheilung kontrollieren beide Transkriptionsfaktoren die Genexpression und steuern das Entzündungsgeschehen [20].

2.11.2 KGF und Bestrahlung

In Tierversuchen wurde rekombinantes KGF erfolgreich als Prämedikation bei Bestrahlung eingesetzt. Strahleninduzierte Schäden am Darmepithel und die Mortalität der Mäuse waren in der Studie signifikant erniedrigt [75, 43]. Ebenso konnte mit Prämedikation bei Ratten nach Verletzung des Lungengewebes durch intratracheale Installation von Bleomycin in Kombination mit Bestrahlung eine deutlich höhere Überlebensrate von 50% beobachtet werden. Diese Versuchstiere zeigten nach drei Wochen, im Gegensatz zu den Kontrolltieren mit Postmedikation, keine bzw. geringe Anzeichen von Nekrose, Fibrose oder Pneumonitis und verminderte Lungenödeme [167].

Takeoka et al [145] vermutet, dass KGF die DNA-Reparatur-Kapazität in bestrahlten pulmonalen Epithelzellen steigern kann und somit fähig ist, die alveolären Epithelschäden zu vermindern. Diese Versuche könnten möglicherweise auf einen schützenden Effekt von KGF auf Stammzellen von Darmkrypten und Lungenepithelzellen hinweisen.

Slonina ist nach *in vitro*-Untersuchungen der Plating Efficiency (PE) und des Surviving Factor (SF2) an primären neonatalen Keratinozyten anderer Meinung. Seine Ergebnisse zeigten, dass die Therapie mit KGF das Überleben der Zellen nach Bestrahlung nicht beeinflussen kann, sondern nur die Proliferation überlebender Zellen fördert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch immer noch ungeklärt [140].

2.12 Zelluläre Adhäsionsmoleküle

Zelluläre Adhäsionsmoleküle (Cellular Adhesion Molecules (CAM)) werden derzeit in fünf Molekülfamilien, die so genannten „Superfamilien“, eingeteilt [133]. CAM mit genetischen Sequenzhomologien und struktureller Verwandtschaft sind der Integrin-, Immunglobulin-, Selektin-, Cadherin- oder Homing-CAM-Superfamilie zugeordnet. Die international gültige CD-Nomenklatur teilt jedem Zelloberflächenantigen eine spezifische CD-Nummer zu [133].

Die Mehrzahl der CAM sind transmembrane Glykoproteine, dazu gehören die Integrin-, Immunglobulin- und Homing-CAM-Superfamilien. Diese Glykoproteine können in drei Domänen untergliedert werden: die intrazelluläre, welche mit dem Zytoskelett verbunden ist, die hydrophobe (das transmembrane Segment) und die extrazelluläre Domäne. Der extrazelluläre Anteil bildet einen Bestandteil der Glykokalix und ist vor allem für die Liganden- und Rezeptorenbindung wichtig. CAM vermitteln das direkte Binden an andere Zellen und extrazelluläre Matrixmoleküle [110]. Sie dienen dem Austausch von Informationen und können durch ihre Adhäsion eine Änderung der Genexpression und

des Zellphänotyps bewirken [148].

Es ist bekannt, dass Zellen ihre CAM-Expression und ihre Hafteigenschaften entsprechend den physiologischen und pathologischen Prozessen modulieren, bei denen sie beteiligt sind [148]. So bestimmt das Muster der CAM-Expression auf Zelloberflächen während der Gewebeerwicklung das Haften der Zelle an eine spezifische Umgebung und damit die funktionelle Zelldifferenzierung. Nach Turner [148] sind CAM für die Entwicklung, Erhaltung und das Überleben von Gewebestrukturen multizellulärer Organismen grundlegend. Ebenso sind pathologische Vorgänge von der CAM-Expression wesentlich beeinflusst, wie beispielsweise Hämostase, Entzündung, Wundheilung, Immunabwehr und krankhafte neoplastische Prozesse. Die Expression von CAM auf der Zelloberfläche kann chemisch (u.a. durch Zytokine) oder mechanisch durch das Aneinanderhaften von Zellen ausgelöst werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Signaltransduktion [133]. In der Regel findet die Signaltransduktion bidirektional statt. Die Signalübertragung kann über das so genannte „inside-out“ oder das „outside-in signalling“ geschehen. Beim „outside-in signalling“ kommt der Impuls von außen und wird ins Zellinnere weitergeleitet. Sind intrazelluläre Signale der Reaktionsauslöser, spricht man vom „inside-out signalling“ [133].

2.13 Immunglobulinsuperfamilie

Die Immunglobulinfamilie ist mit über 100 Mitgliedern die umfangreichste Familie der Zelloberflächenmoleküle. Als verbindendes Element besitzen diese Adhäsionsmoleküle Immunglobulin-ähnliche Domänen [54]

2.13.1 Interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM)

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)) ist ein Vertreter der Immunglobulinsuperfamilie. Dieses wird von verschiedenen Zelltypen, z.B. Endothelzellen, epidermalen Zellen, Fibroblasten und Immunzellen exprimiert [10, 133, 101, 100, 98]. ICAM-1 (oder auch CD54) ist ein 90 kDa schweres Protein und besitzt 5 Immunglobulin-ähnliche Domänen [54].

2.13.1.1 Immunchemischer ICAM-1-Protein-Nachweis in der natürlichen Haut

Die natürliche Epidermis exprimiert kein ICAM-1 [97]. Immunfluoreszenz-Untersuchungen normaler humaner Haut zeigten regelmäßig eine schwache endotheliale ICAM-1 Expression in einigen Blutgefäßen der Dermis [97, 34].

Bei Entzündungsreizen kommt es in der Haut zum Expressionsanstieg von ICAM-1 [97]. Allerdings konnten auch im unverletzten Gewebe von Patienten mit intravitalem Wunden niedrige ICAM-1-Konzentrationen auf Keratinozyten nachgewiesen werden [34]. Eine Erklärung dafür könnte u. U. die Lokalisation der Probenentnahme geben (eventuell wurde sie zu nahe an der verletzten Hautregion entnommen). Ebensogut könnte eine posttraumatische ICAM-1-Induktion im benachbarten, gesunden Gewebe

physiologisch bedingt sein. Zur genauen Abklärung sind weiterführende Untersuchungen erforderlich.

2.13.2 ICAM-1 in Entzündungsreaktionen

ICAM-1 als ein zelltypspezifischer Mediator hat verschiedene Funktionen, dabei stehen zelluläre Interaktionen während der Immunantwort und bei Entzündungsvorgängen im Vordergrund. Vor allem mit Integrinen bildet ICAM-1 Rezeptor-Liganden-Paare [63], aber auch mit anderen Immunglobulin-Adhäsionsmolekülen (IgAM) und CD43; ferner mit löslichem Fibrinogen, Hyaluronsäure und weiteren Stoffen [150]. Einerseits vermittelt ICAM-1 so die Steuerung der Ligand-Rezeptor-Bindung während der Antigenpräsentation und die Ausbildung verschiedener Zellbindungen [163, 63]. Andererseits dient ICAM-1 der Zellorientierung sowie der inter- und intrazellulären Signaltransduktion [70]. Es aktiviert über die outside-in-Transduktion spezifische Kinasen, welche die Erhöhung von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zellmembranprotein-Expression verändern und die Proliferation anregen können [70, 97]. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen ist ICAM-1 ein bedeutender Signalüberträger bei der Funktion von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) [163]. Nach heutigen Forschungsergebnissen vermitteln zelluläre Adhäsionsmoleküle die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen bei der Leukozytenextravasation. Dazu gehören u.a. ICAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecules (VCAM), die E-, P- und L-Selektine, CD31 sowie die β 1- und β 2-Integrine. Die Adhäsion von Leukozyten an Gefäßendothelien ist der essentielle Schritt für die Emigration von Entzündungszellen aus der Blutzirkulation. Der Adhäsionsvorgang und die transendotheliale Migration wird durch die Interaktion von Molekülen auf der Oberfläche von Endothel- und Entzündungszellen gewährleistet [63]. ICAM-1 ist der entsprechende Rezeptor für die Leukozytenintegrine CD11b/CD18 (Mac-1) und CD11a/CD18 (LFA-1) [63]. ICAM-1 vermittelt auch Leukozytenkontakte zu zahlreichen kutanen Zellarten [33].

Diverse Funktionen von ICAM-1 im Entzündungsprozess sind eng an die schnelle Induzierbarkeit des Moleküls durch proinflammatorische Stimuli gekoppelt. Physiologisch bedeutende Faktoren sind Interferon- γ (INF- γ), TNF α , IL-1, reaktive Sauerstoffderivate, zellulärer Stress und Retinolsäure [71]. Aber auch exogene Stimuli wie bakterielle Antigene (Lipopolysaccharide), Virusinfektionen, Substanzen wie Phorbolster und physikalische Noxen (UV- und ionisierende Strahlung) stimulieren ICAM-1 [33].

2.13.2.1 Zytokininduktion von CAMs in entzündlichen Vorgängen

TNF α und IL-1 vermitteln die Entzündungsreaktion durch das Ankoppeln an ihre spezifischen Rezeptoren auf Endothelzellen. Dadurch wird beispielsweise die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 induziert [63].

Auch bei Entzündungen der Haut wird angenommen, dass TNF α und Histamin ICAM-1 induzieren und dieses ein wichtiger Initiator von Leukozyten/Keratinocyten-Interaktion ist [1]. Untersuchungen zufolge sind Mastzellen psoriatischer und atopischer Dermatitispatienten TNF α -positiv. Ihre Degranulation ist mit einer ICAM-1-Expression

in der Epidermis assoziiert. Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass die Degranulation von Mastzellen die ICAM-1 Expression auf Keratinozyten via $\text{TNF}\alpha$ und Histamin induziert [1].

2.13.2.2 Immunchemischer ICAM-1-Protein-Nachweis während der Wundheilung

Immunhistochemische Untersuchungen von intravitalem humanen Hautwunden belegen eine Korrelation zwischen Entzündungsgrad und ICAM-1-Expression [34, 97]. Innerhalb der ersten zwei Stunden nach Verwundung konnte in 80% der untersuchten Hautproben eine moderat bis stark induzierte ICAM-1-Expression beobachtet werden [34]. Matsumoto [97] weist in Immunfluoreszenz-Untersuchungen von humaner Haut nach Transplantation auf Mäuse eine vorübergehende ICAM-1-Expression am Beginn der Wundheilung nach. An Studien exzisionaler Hautwunden von ICAM-1-defizienten Mäusen konnte eine gehemmte Wundheilung beobachtet werden. Neben der reduzierten Migration von Keratinozyten und Granulationsgewebsbildung, war die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen vermindert. Die daraus resultierende geringere Leukozytenanzahl im Wundgewebe ist wohl der Grund für eine verzögerte Heilung [107].

2.13.3 ICAM-1 nach ionisierender Bestrahlung

ICAM-1 wird durch ionisierende Strahlung verstärkt induziert [98]. Die Induktion von CAMs durch ionisierende Strahlung unterscheidet sich von der, die nach der Zytokin-stimulation beobachtet wird, und zwar darin, dass sich die Induktion der Genexpression auf E-Selectin und ICAM-1 beschränkt [63]. Obwohl ionisierende Strahlung bei bestimmten Zellarten die Produktion von IL-1 (Rattenfibroblasten) und $\text{TNF}\alpha$ (HaCaT und Monozyten) stimuliert, gelten diese Zytokine nicht als essentielle Mediatoren der strahlungsbedingten ICAM-1-Induktion [63, 10]. Neutralisierende Antikörper (AK) gegen $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 konnten eine Induktion von ICAM-1 auf HaCaT-Zellen nach Bestrahlung bis zu 40 Gy nicht verhindern [10]. Nach ionisierender Bestrahlung entstehen reaktive Sauerstoffderivate. Eine Präinkubation von HaCaT-Zellen mit Antioxidantien blockierte die sonst übliche ICAM-1 Induktion auf HaCaT. Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl reaktive Sauerstoffderivate an der ICAM-1-Induktion nach Bestrahlung beteiligt sind, als auch $\text{NF}\kappa\text{B}$, ein prooxidativer Transkriptionsfaktor [7]. Versuche mit ICAM-1-defizienten Mäusen zeigten keine Entwicklung einer entzündlichen Reaktion nach Bestrahlung, trotz vorhandener inflammatorischer Zytokine. Diese Ergebnisse belegen die notwendige Anwesenheit von ICAM-1 als Voraussetzung für das Auswandern der Leukozyten in verletzte bzw. entzündete Regionen [63]. Diese Infiltration von Leukozyten löst wahrscheinlich Atrophie, Fibrose und Nekrose in Organen aus, bzw. beschleunigt diese.

Bisher sind die pathologischen Folgen, die Infiltration und Ansammlung von Leukozyten im bestrahlten Normalgewebe haben, noch nicht vollständig geklärt. In krankhaften Vorgängen, wie zum Beispiel in myokardialen Infarkten, sind Leukozyten von wesentlicher Bedeutung. Es wurde ein Antikörper gegen zelluläre Adhäsionsmoleküle

entwickelt, der die transendotheliale Leukozytenwanderung hemmt und damit eine neutrophile Zellansammlung im Gewebe verhindert. Dadurch konnten Gewebeschäden signifikant vermindert werden [61, 104]. Solche Ergebnisse implizieren die Annahme, daß neben der Strahlenreaktion von Normalgewebe eine Infiltration von Leukozyten zusätzliche Schäden an Parenchymzellen verursacht. Die neutrophile Infiltration bedingt eine Fehlfunktion des Organs, was eine überschießende Regeneration zur Folge hat und in eine funktionelle Organstörung mündet [123].

2.13.3.1 ICAM-1-Protein-Induktion nach Bestrahlung

Sowohl kutane Kurzzeitkulturen (Spalthautproben), als auch die Keratinozytenzelllinie HaCaT und die Fibroblastenzelllinie HDFa reagieren auf ionisierende Bestrahlung mit einer ICAM-1-Induktion [98, 33]. Dabei ist die ICAM-1-Oberflächenexpression in HaCaT-Keratinozyten zeitabhängig und dosisabhängig [101].

2.14 Integrine

Integrine bilden die Superfamilie der Adhäsionsrezeptoren. Sie sind heterodimere Komplexe, welche durch nicht-kovalente Bindungen aus jeweils einer der 1-18 α - und 1-8 β -Untereinheiten entstehen und nach der entsprechenden β -Kette in Subfamilien eingeteilt werden [149].

Beide Integrinuntereinheiten gehören den Typ I transmembranen Glykoproteinen an und stehen intrazytoplasmatisch mit dem Zytoskelett in Verbindung. Die zytoplasmatische β -Untereinheit ist durch eine Reihe von aktinbindenden Proteinen (Talin, Filamin, α -Aktinin, Vinculin und andere Integrin-bindende Zytoskelettproteine) an das Aktinenthaltende Zytoskelett gebunden [26].

Im Menschen konnten bisher 24 verschiedene heterodimere Integrinkomplexe identifiziert werden [149]. Das große Repertoire an dimeren Rezeptoren kann an eine Vielzahl von extrazellulären Liganden binden, beispielsweise Kollagen, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin, etc. sowie andere CAM [133]. Die charakteristische Verhalten eines bestimmten Integrins zum Liganden ist zum einen durch die Kombination der verschiedenen α - und β -Untereinheiten, und zum anderen durch den exprimierenden Zelltyp festgelegt [86].

In ihrer Funktion als Zelloberflächenrezeptoren organisieren die Integrine das Zytoskelett und vermitteln die Adhäsion zur Extrazellulärmatrix (EZM) und anderen Zellen. Bei der Übertragung mechanischer Kräfte, biochemischer und biophysikalischer (z. B. Röntgenstrahlung) Signale zur Plasmamembran [26] sind Integrine gleichzeitig Bindeglied in Signalkaskaden und grundlegende Regulatoren von Signaltransduktion und Zellfunktion [26]. Als Kontrollorgan steuern Integrine verschiedene Stufen der Signalkaskade, welche Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zellmigration, Adhäsion und das Überleben der Zelle reguliert.

Die Ligandenbindung (outside-in signalling) induziert die Genexpression, Zellvermehrung, Differenzierung, Aktinpolymerisation und die Aktivierung von Integrinrezeptoren; ferner suppremiert sie die Zellapoptose. Diese zellulären Reaktionen können teilweise auch durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden [86]. Intrazellulär

re Signale werden vermutlich über zytoplasmatische Komponenten (Integrinbindende Proteine) weitergeleitet, welche beispielsweise die Kopplung von Integrinen an intrazellulären Signalpfaden bewirken [149].

Die Zelle hat verschiedene Möglichkeiten, ihre Integrinexpression zu regulieren. Im besonderen Maße geschieht dies über alternatives Splicing der m-RNA in Transkriptions- und Posttranskriptionsmechanismen [133]. Weiterhin können nur aktivierte Integrinrezeptoren ihre Liganden binden. Die Aktivierung von Integrinen erfolgt über intrazelluläre Signale (inside-out signalling). Die Zelle verfügt vermutlich über drei verschiedene Mechanismen zur Aktivierung der Rezeptoren: 1. Konformationsänderungen, 2. Modifikation der Rezeptoraffinität und 3. Bildung von multimeren Integrinkomplexen aus heterodimeren Komplexen [26].

Faktoren, welche die Integrinexpression beeinflussen, sind u.a. Zytokine (IL1b, TNFa), Hormone, Pharmazeutika und Röntgenstrahlung [133]. KGF fördert die Bildung von Integrinrezeptorkomplexen in Keratinozyten [122]. Vorrätige Integrine aus intrazellulären Pools können an die Zelloberfläche befördert und expremiert werden [133, 98].

2.14.1 Das β 1-Integrin oder CD29

Die β 1-Adhäsionsrezeptoren bilden mit 12 Mitgliedern die größte Unterfamilie der Integrine [5]. Sie werden von einer Vielzahl an Zellarten expremiert und sind Rezeptoren für Fibronectin, Kollagen und Laminin. Insbesondere Fibronectin gilt als Hauptligand des β 1-Integrins.

Die β 1-Kette ist, wie zuvor beschrieben, mit Mikrofilamenten des Zytoskeletts verbunden. Dadurch kann die fokale Zelladhäsion, beispielsweise bei der Ausbildung von Halbdesmosomen oder der Bindung von Keratinozyten an die Basalmembran, gesteuert werden [133]. Durch alternatives Splicen kann die Fähigkeit der intrazellulären Domäne zur Teilnahme an Signaltransduktionen reguliert werden [3]. Für humanes β 1-Integrin sind fünf zytoplasmatische Splicevarianten bekannt: β 1A, β 1B, β 1C-1, β 1C-2 und β 1D. Obwohl die Ligandenspezifität in Splicevarianten erhalten bleibt, können Ansammlungen verschiedener Splicevarianten Signalpfade auslösen, welche zu abweichenden Zellantworten führen [5].

In der Haut sind Integrine sensible Indikatoren für die reguläre Ausbildung epidermaler Kompartimente und möglicherweise ebenso für den Grad des Gewebegleichgewichts [21].

2.14.1.1 Die Funktion von β 1-Integrin in Keratinozyten

Neben den in Abschnitt 2.14.1 beschriebenen Funktionen, reguliert das β 1-Integrin in Keratinozyten die Initiierung der terminalen Differenzierung [86]. Epidermale Stammzellen mit dem größten Proliferationspotential expremieren höhere Mengen an β 1-Integrin als andere Keratinozyten des Str. basale [86]. Die Differenzierung von Keratinozyten geht mit einem Verlust der Integrin-Bindungsfähigkeit einher. Die Reduktion der β 1-vermittelten Adhäsion stimuliert den Austritt der Zellen vom basalen Proliferationskompartiment ins Reifungskompartiment. Eine Zellkultur-Studie von Levy veranschaulicht dieses Zusammenhänge [86]. In Suspension verbrachte Keratinozyten

stimulieren ihre terminale Differenzierung. Die Zugabe extrazellulärer Matrixproteine verhindern diesen Effekt teilweise, woraus gefolgert werden kann, dass zelluläre Adhäsion Differenzierungsprozesse hemmt.

2.14.1.2 Immunchemischer Nachweis von $\beta 1$ -Integrin in mehrschichtigen Plattenepithelien

In der Epidermis ist die Integrinexpression hauptsächlich auf das Str. basale beschränkt [158]. $\beta 1$ -Oberflächenrezeptoren befinden sich in normalen, mehrschichtigen Plattenepithelien der Mundschleimhaut, ebenso vor allem in basalen Keratinozyten, bevorzugt entlang ihrer lateralen Zellmembranen. Auch Fibroblasten im Bindegewebe exprimieren $\beta 1$ -Integrin [169, 81].

Nach ionisierender Bestrahlung konnte sowohl bei HDFa- als auch bei HaCaT-Zellen eine gesteigerte Expression von $\beta 1$ -Integrin nachgewiesen werden [29].

2.14.2 Das $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (CD49e)

$\alpha 5\beta 1$ ist der Hauptrezeptor für Fibronectin, es wird bevorzugt von Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten exprimiert. In epithelialen Zellen korreliert die abnehmende $\alpha 5$ -Integrin-Expression mit einer reduzierten Fibronectinhaftung und einer gesteigerten Involukrinexpression [2].

2.14.2.1 Immunchemischer Nachweis von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin in mehrschichtigen Plattenepithelien

Normale, humane Haut exprimiert kein $\alpha 5\beta 1$ -Integrin [81]. Das Integrin wird von aktivierten Keratinozyten exprimiert. Die Aktivierung der Keratinozyten erfolgt während der Wundheilung oder bei ihrer solitären Kultivierung sowie in Explantatkulturen [27, 58]. In der frühen Reepithelisationsphase (1. bis 3. Tag) konnte in Hautwunden eine Induktion der $\alpha 5\beta 1$ -Expression in Migrationskeratinozyten festgestellt werden [74]. In humanen, peridontalen Wundrändern waren zusätzlich basale Zelllagen immunhistochemisch positiv [81].

Im Gegensatz zu Keratinozyten binden Wundfibroblasten Fibronectin über zwei Integrine, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$. *In vivo*-Untersuchungen konnten in Wundfibroblasten eine maximale $\alpha 5\beta 1$ -Expression erst nach deren Migration und während der Etablierung ihrer Verbindungen zur EZM nachweisen. Nach weiteren Studien kam man zu dem Ergebnis, dass in Fibroblasten-ähnlichen Zelllinien $\alpha 4\beta 1$ -Integrinrezeptor die Migration vermittelt. Die übermäßige $\alpha 5\beta 1$ -Expression supprimierte deren Migration und induzierte ihre Anhaftung [27].

2.14.3 Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (CD49b)

$\alpha 2\beta 1$ -Integrin ist der Rezeptor für Kollagen I-IV, Kollagen VI und Laminin. Er wird auf Leukozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert [106].

Kollagenrezeptoren regulieren eine Vielzahl von zellularen Reaktionen, unter anderem die Integrität kollagener EZM durch Steuerung von Matrixabbau und -erneuerung [151].

2.14.3.1 Immunchemischer Nachweis von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin in mehrschichtigen Plattenepithelien

Immunhistochemisch ist $\alpha 2\beta 1$ primär in der Peripherie basaler, natürlicher epidermaler Keratinozyten (NEK) und Mundschleimhaut-Keratinozyten lokalisiert [169, 82]. In humanen Spalthautproben färben sich zudem das Str. spinosum und fokal das Str. granulosum [101, 100].

Von Wundkeratinozyten wird $\alpha 2\beta 1$ -Integrin konstant expremiert. Während der akuten Wundheilungsphase (1. bis 3. Tag) formieren Mundschleimhaut-Keratinozyten an Wundrändern filopodienartige Membranausläufer und expremieren dort $\alpha 2\beta 1$ -Integrin. Ab dem 3. Tag nach Verwundung sind in der Mundschleimhaut verschiedene epidermale Schichten Integrin-positiv [81].

2.15 Zytokeratine (CK)

Zytokeratine sind intrazelluläre Strukturproteine und bilden mit den Aktin-Mikrofilamenten und röhrenförmigen Mikrotubuli das Zytoskelllet [95]. Sie stellen eine Klasse der Intermediärfilamente dar, von welchen es sieben verschiedene Proteinklassen gibt und deren Vorkommen zelltypspezifisch ist. Intermediärfilamente der Epithelzellen gehören der Zytokeratinklasse an [19]. Diese aus Keratinen gebildeten 10 nm großen Filamente verankern sich in den Punkt-desmosomen und haben außer ihrer strukturgebenden auch spannungstragende Funktion [95].

Die Familie der Zytokeratine besteht aus 30 nah verwandten Proteinen [95]. Aufgrund von Homologievergleichen der Aminosäuresequenzen können die Proteine in saure (Typ I) und basische/neutrale (Typ II) Unterklassen eingeteilt werden. Die sauren Zytokeratine (9-20) haben ein relatives Molekulargewicht von 40-64 kDa, die der Unterklasse Typ II, bestehend aus den Zytokeratinen 1-8, besitzen ein relatives Molekulargewicht von 52-68 kDa [144].

Zytokeratine und alle anderen Proteinvorstufen von Intermediärfilamenten bestehen aus drei Hauptsegmenten: ein nicht helikales Kopf- und Schwanzsegment und dazwischen das stark konservierte α -helikale Mittelsegment. Die zentrale α -helikale Domäne ist charakterisiert durch eine mehrmals wiederkehrende Aminosäuresequenz vom Typ $(abcdefg)_n$ [36]. Dieses Mittelsegment ist die Ursache für hohe Homologien (50-99%) innerhalb der Unterklassen. Dagegen weisen die Typ I- und Typ II- Unterklassen seltener übereinstimmende Strukturen (25-35%) auf [19]. Zytokeratine sind Tetramer-Komplexe, welche aus jeweils zwei Heterodimeren der Typ I- und Typ II- Unterklasse bestehen. Epithelzellen expremieren die Heterodimere der einzelnen Unterklassen in der Regel paarweise [144].

2.15.1 Zytokeratine als Differenzierungsmarker in normaler Epidermis

In der humanen Haut werden entsprechend den Differenzierungsschichten spezifische Zytokeratine expremiert. Das Expressionsmuster kann daher Auskunft über die hierarchische Organisation und den Differenzierungsgrad eines Epithelgewebes geben.

CK-14/5 kommt ausschließlich in der Basalschicht normaler Epidermis vor. In suprabasalen, epidermalen Schichten sind die so genannten Reifungszytokeratine CK-1/10 und CK-1/11 zu finden. Sie kommen in terminal differenzierten und verhornten Zellen vor [95]. Unter physiologischen Bedingungen kommen in der humanen Epidermis keine irregulären Zytokeratine vor. Diese sind beispielsweise CK-4, -6, -7, -8, -13, -16, -17, -18 und -19 [15, 137]. CK-6/16 und CK-17 sind so genannte hyperproliferative Zytokeratine [21]. Irregulär ausdifferenzierte Epithelien synthetisieren CK-6/16, zudem ist das CK-Paar ein Indikator für aktivierte Keratinozyten [142] und wird während der Wundheilung synthetisiert [19]. Die Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 sind typische Markerproteine einfacher, innerer und Wechsel-Epithelien [137].

2.15.2 Zytokeratinexpression von HaCaT-Zellen

In Transplantationsstudien an Nacktmäusen war das expremierte Keratinmuster von HaCaT-Zellen, einschließlich des basalen CK-14/5 und dem suprabasalen CK-Paar 1/10, beinahe identisch mit dem von Transplantaten normaler Keratinozyten [21]. Im Vergleich zur natürlichen Epidermis ergaben Proteinanalysen des rekonstruierten Epithels jedoch abweichende Ergebnisse. Beide Transplantationsmodelle zeigten eine permanente, suprabasale CK-6/16 Produktion [21]. Diese Beobachtungen sind konsistent mit solchen an luftexponierten, humanen (adulten) Keratinozytenkulturen auf DED [115] oder auf einer Kollagenmatrix mit eingebetteten Fibroblasten [142]. Die atypische Expression hyperproliferativer Zytokeratine (CK-6, CK-16) lässt sich mit der generellen hyperplastischen Morphologie von Transplantaten erklären [21] bzw. kann ein durch Xenotransplantation irritiertes und vermehrt dynamisches Gewebestadium andeuten [21]. In organotypischen Co-Kulturen sind möglicherweise suboptimale Wachstumsbedingungen der Grund für hyperproliferative Zytokeratine [115]. Stark [142] vermutet ebenfalls eine regenerative Stimulierung suprabasaler Keratinozyten während ihrer Co-Kultivierung.

In HaCaT-Zellkulturen war die regelmäßige Synthese von CK-6/16 gemeinsam mit CK-14/5 und CK-17 festzustellen. Bei niedriger Zelldichte, subkonfluenter Kultivierung und hohem Vitamin A-Mediumgehalt produzieren HaCaT-Monokulturen vorübergehend die Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 [137, 21]. Diese, für die Epidermis atypischen, Zytokeratine konnten immunhistochemisch in HaCaT-Transplantaten und in luftexponierten, ausdifferenzierten organotypischen Co-Kulturen nicht nachgewiesen werden [137, 21]. Nach Transplantation der HaCaT-Keratinozyten und der Anwesenheit anderen Zellen sowie der Blutversorgung, welche zusätzliche Faktoren bereitstellen, kann eine beinahe reguläre und homogene Zytokeratinexpression erzielt werden [21]. Dennoch, obwohl HaCaT-Zellen Genexpressionen von terminalen Differenzierungsproteinen aufweisen, ist die Kontrolle der Gene anomal. Dieser Mangel kann weder durch verschiedene Nähr-

medien noch durch veränderte Kulturbedingungen beseitigt werden [15].

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Herkunft und Art der Zelllinien und des Biopsiematerials sowie deren Subkultivierung

3.1.1 Human Dermal Fibroblasts adult (HDFa)

Die primären Fibroblasten (Fa. Cascade Biologics, bestellbar über Fa. Tebu, Frankfurt a. M., Deutschland) entstammen der Haut eines 25-jährigen, gesunden, männlichen Spenders. Die Lebensdauer der Normalzelllinie ist auf ca. 17 Generationen begrenzt. Die HDFa-Zelllinie ist auf pathogene Viren (HIV, Hepatits B und Hepatits C), Bakterien und Mycoplasmen untersucht.

Die kryokonservierten HDFa wurden ebenso wie die Keratinozyten in 75 cm²-Kulturgefäßen als Zellsuspension im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Anteil von 5% kultiviert. Als Kulturmedium kamen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FCS (Fetal Calf Serum) und 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung zum Einsatz. Der Mediumwechsel erfolgte im Wechsel nach drei oder vier Tagen. Nach vier bis fünf Tagen konnte der entstandene konfluente Fibroblasten-Monolayer passagiert werden. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und verworfen.

Zur enzymatischen Dissoziation wurde der Zellrasen mit 4,5 ml Trypsin für eine 75 cm²-Kulturflasche im Brutschrank für 6 Minuten inkubiert. Ob sich die Zellen ausreichend von der Kulturflasche gelöst hatten, konnte makroskopisch anhand der Trübung der Trypsinlösung abgeschätzt und mikroskopisch überprüft werden. Nach dem Beschicken der neuen Kulturgefäße mit 12 ml DMEM wurde jeweils 1,5 ml Zellsuspension zur Subkultivierung überführt.

3.1.2 HaCaT-Keratinozyten

Wie zuvor in Abschnitt 2.4 genauer beschrieben, entstammt die spontan transformierte Zelllinie der normalen Rückenhaut eines Spenders [18]. Die immortalisierten HaCaT-Keratinozyten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Fusenig und Dr. Breitkreuz, DKFZ, Heidelberg) sind für ihre Fähigkeit zur Differenzierung bekannt und wurden als epidermale Zellen eingesetzt.

Die unter Abschnitt 3.1.1 beschriebene Kultivierungsmethode wurde für die HaCaT-Keratinocyten adaptiert und dabei wie folgt geringfügig modifiziert: Aufgrund der ausgeprägten Proliferation war eine Passagierung schon nach drei Tagen möglich. Für die enzymatische Dissoziation wurde der Zellrasen für 8-12 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zur Subkultivierung war die Überführung von 1 ml Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen ausreichend. Ansonsten wurde die Passagierung entsprechend dem zuvor beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Beide Zelllinien konnten unter dem Mikroskop auf die Erhaltung ihrer normalen Morphologie überprüft und beurteilt werden.

3.1.3 Spalthaut

Die verwendete Spalthaut wurde nach schriftlicher Aufklärung und Einverständniserklärung von Patienten ohne Altersbegrenzung gewonnen, die sich aufgrund eines malignen Hauttumors (Basaliom, Spinocellularcarcinom, Morbus Bowen) einer Radiotherapie unterzogen. Vor Therapiebeginn wurde die Probebiopsie aus dem Tumorrandbereich unter Lokalanästhesie in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der TU München (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Ring) entnommen. Der Wundschluss erfolgte mit nicht resorbierbaren Fäden.

Unmittelbar postoperativ wurde die Spalthaut in flüssigen Stickstoff transferiert und bei -80°C gelagert. Nach der Fixation des Gewebes im Kryomedium konnten $5\mu\text{m}$ Gefrierschnitte angefertigt werden. Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Methode.

3.2 Wachstumskurven

Um das Wachstumsverhalten der Zelllinien HaCaT und HDFa ohne bzw. nach Bestrahlung zu bestimmen, wurden Kulturen der beiden Zellarten gezüchtet, mit verschiedenen Dosen bestrahlt und die Zellzahlen im Abstand von 24 h ermittelt. Dadurch ließen sich Wachstumsrate μ und Zellverdopplungszeit t_2 für die exponentielle Wachstumsphase bestimmen.

3.2.1 Präparierung der Zellkulturen

Für den Ansatz der Zellkulturen wurden Zellen verwendet, die sich bei Entnahme aus der Stammkultur in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (der Zellrasen der Stammkultur durfte zu diesem Zeitpunkt die Bodenfläche der Kulturflasche nicht vollständig, sondern nur zu etwa 90% bedecken).

Nach Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mit einer äquivalenten Menge an DMEM-Medium inaktiviert und die Zellsuspension in ein Falcon[®]-Gefäß überführt. Durch kräftiges Auf- und Abpipettieren konnte einerseits die Vereinzelung von Zellklumpen, andererseits eine sorgfältige Durchmischung der unverdünnten und verdünnten Stammsuspensionen erzielt werden. Danach erfolgte die Zellzählung eines Aliquots in der Neubauer Zählkammer. Aufgrund hoher Zelldichten in den HaCaT-Kulturen wurde

deren Stammsuspension zunächst 1:10 verdünnt und anschließend die Zellzählung vorgenommen. Die pro Zellkulturflasche benötigte Zellsuspensionsmenge für die erwünschte Zellkonzentration konnte anhand der Zellzahl ermittelt werden.

Für den Gesamtansatz wurden drei Kulturflaschen pro Tag und Bestrahlungsdosis präpariert. Für die Gesamtdauer des Versuchs von sieben Tagen ergab sich bei fünf verschiedenen Dosen (einschließlich der unbestrahlten Kontrolle) eine Anzahl von $5 \times 7 \times 3 = 105$ Zellkulturflaschen.

Im Durchschnitt wurden pro Kulturflasche (25 cm^2) 228333 HaCaT-Zellen und 296000 HDFa-Zellen eingesät und mit einer entsprechenden DMEM-Mediummenge auf insgesamt 6 ml aufgefüllt.

3.2.2 Bestrahlung der Zellen

Die Zellen wurden gleich nach dem Ansetzen mit 1 Gy, 3 Gy, 5 Gy und 7 Gy bei Raumtemperatur bestrahlt, für jeden Untersuchungstag existierten außerdem drei unbestrahlte Kontrollkulturen.

Bei jeder Einzeldosisbestrahlung waren jeweils drei Zellkulturen 240 kV Röntgenstrahlen ausgesetzt (Röntgenröhre: Isovolt 320/10, Fa. Seifert, Ahrensburg, Deutschland), gefiltert durch 3 mm Beryllium. Bei einem Abstand von 38 cm zwischen Fokus der Röhre und Zellkultur, sowie einem Röhrenstrom von 13 mA, betrug die Dosisleistung 1 Gy/min. Mit dem Referenzstrahler Sr^{90} wurde die Röhre geeicht und die absorbierte Strahlung mittels eines Duplex-Dosimeters (SN4, Fa. CPTW, Freiburg) gemessen.

3.2.3 Ermittlung der Zellzahl

Wie oben beschrieben, sind zur Bestimmung von Wachstumsrate und Verdopplungszeit der Zelllinien an sieben aufeinanderfolgenden Tagen die Zellzahlen p.r. ermittelt worden. An den Untersuchungszeitpunkten wurden dazu drei getrennte Kulturflaschen je Strahlendosis ausgewertet.

Für die Zellzählung wurde der Zellkulturüberstand verworfen. Zur vollständigen Ablösung des Zellrasens waren für HaCaT-Zellkulturen 4 ml, für HDFa-Zellen 3 ml Trypsin notwendig. Das weitere Vorgehen bei der Aufbereitung für den Auszählvorgang verlief wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

Da HaCaT-Zellen zur Aggregation neigen, wurde zur besseren Vereinzelnung 1 ml der verdünnten Stammsuspension auf dem Rüttler durchmischt und mit Standardtips von abnehmender Größe (s. 3.4.5) wiederholt pipettiert. Anschließend erfolgte die Auszählung des Alliquots in der Neubauer Zählkammer.

3.2.4 Auswertung der Wachstumskurven (lineare Regression)

In einer idealen, exponentiell wachsenden Zellkultur wird die zeitliche Entwicklung der Zellzahl N beschrieben durch

$$N(t) = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}, \quad (3.1)$$

wobei μ die Wachstumsrate und N_0 die eingesäte Zellzahl ist. Durch Logarithmieren erhält man

$$\ln N(t) = \mu \cdot t + \ln N_0. \quad (3.2)$$

Die ermittelten Zellzahlen $N(t_i)$ wurden halblogarithmisch gegen die Zeitpunkte t_i aufgetragen (vgl. Abb. 4.1, Abschnitt 4.1). Im Bereich des exponentiellen Wachstums läßt sich dann mittels der Gaußschen Methode der kleinsten Quadrate ([146, 157]) die Regressionsgerade

$$\begin{aligned} y(t) &= a \cdot t + b \\ &\stackrel{(3.2)}{=} \mu \cdot t + \ln(N_0) = \ln(N(t)) \end{aligned} \quad (3.3)$$

berechnen. Die Wachstumsrate μ erhält man demnach aus der Geradensteigung. Die Unsicherheiten von Steigung a (bzw. μ) und Achsenabschnitt b ergeben sich zu

$$\Delta a = s_y \cdot \sqrt{\frac{n}{D}} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (x_i a + b)]^2}{n - 2} \right)^{\frac{1}{2}} \cdot \sqrt{\frac{n}{D}} \quad (3.4)$$

$$\Delta b = s_y \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n t_i^2}{D}}, \quad (3.5)$$

wobei $D = \sum_i w_i \sum_i w_i t_i^2 - (\sum_i w_i t_i)^2$ die Koeffizientendeterminante darstellt. Hierbei sind die Wichtungsfaktoren $w_i = (\Delta y_i)^{-2}$ eingeführt, um die Meßpunkte mit kleineren Schwankungen stärker zu berücksichtigen.

Die Anzahl n der Datenpunkte, über die summiert wird, ergibt sich aus dem Bereich der Kurve, in dem exponentielles Wachstum stattfindet. Bevor die Zellkultur in die exponentielle Phase übergeht, durchläuft sie die so genannte lag-Phase ($\mu = 0$) und die Beschleunigungsphase ($\mu < 0$). Deswegen muss der Bereich exponentiellen Wachstums für jede Wachstumskurve je nach Verlauf festgelegt werden.

Die Zellverdopplungszeit t_2 folgt mit $N(t_2) \stackrel{!}{=} 2N_0$ aus Gl. (3.3),

$$t_2 = t_2(\mu) = \frac{1}{\mu} \cdot \ln 2. \quad (3.6)$$

Für die Unsicherheit der Verdopplungszeit Δt_2 erhält man mittels Gaußscher Fehlerfortpflanzung [146]

$$\Delta t_2 = \ln 2 \cdot \left| -\frac{1}{\mu^2} \right| = \ln 2 \cdot \frac{1}{\mu^2}. \quad (3.7)$$

Die Werte von μ und t_2 mit Fehlern für die verschiedenen Zellkulturen sind in den Tab. 4.1 und 4.2 aufgeführt.

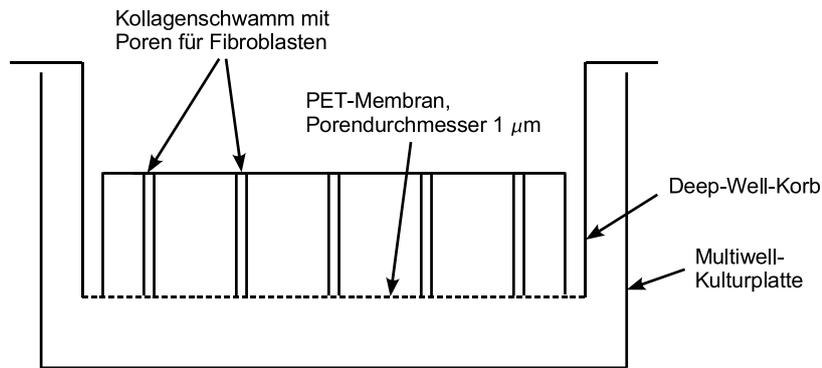


Abbildung 3.1: Schematischer Querschnitt einer 6-Well-Platte mit eingelegetem Kollagenschwamm.

3.3 Anzüchtung der Zellen in einer Co-Kultur

Auf der Grundlage von veröffentlichten Protokollen zur Züchtung organotypischer Co-Kulturen von Smola [139] und Fusenig [50] wurde das neue dreidimensionale Hautäquivalent von Dr. Kehe (Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München) entwickelt [76].

3.3.1 Methodik zur Herstellung des standardisierten Hautäquivalents

Das organotypische Hautmodell besteht aus folgenden Komponenten: einer vorgefertigten Kollagenmatrix, HDFa-Fibroblasten und HaCaT-Keratinocyten.

Die gefriergetrocknete Kollagenmatrix diente als Dermisäquivalent, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rau, Helmholtz-Institut für biomedizinische Technik in Aachen. Die Matrix ist eine aus Rinderhäuten gewonnene Kollagenmischung vom Typ I und Typ IV, welche nach dem in [135] beschriebenen Protokoll hergestellt wird. In diese werden primäre, humane HDFa-Fibroblasten eingebracht. Die immortalisierten HaCaT-Keratinocyten wurden als epidermale Zellen eingesetzt.

Die Anzüchtung des Hautmodells erfolgt in Multiwell-Zellkulturplatten (Deep-Well-Platten) mit Korbeinsätzen. Die Körbe enthalten eine Polyethylen Terephthalat (PET)-Membran mit einem Porendurchmesser von $0.4 \mu\text{m}$, welche die wechselseitige Diffusion von Nährmedium und Zytokinen ermöglicht (s. Abb. 3.1).

3.3.1.1 Vorbereitung der Zellen

Entsprechend dem beschriebenen Protokoll zur Subkultivierung von Zelllinien wurden die Monolayerkulturen der Fibroblasten und Keratinocyten zunächst mit 4,5 ml Trypsin enzymatisch von den Kulturgefäßen gelöst. Zur Schonung der Zellen wurde die Enzymlyösung mit dem gleichen Volumen DMEM-Nährmedium neutralisiert.

Aus der entstandenen Zellsuspension wurde nun dreimal je 1 ml entnommen, mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die darin enthaltenen Zellzahlen bestimmt und anschließend

gemittelt.

Anhand der mittleren ausgezählten Zellzahl konnte nun die benötigte Suspensionsmenge errechnet und aus der Zellkulturflasche entnommen werden. Anschließend wurde die Zellsuspension 9 Minuten lang bei 18 °C und 1100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Das resultierende Zellpellet wurde in der entsprechenden Mediummenge resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren gleichmäßig durchmischt. Dadurch konnte die benötigte Zellanzahl pro Hautmodell auf ein minimales Volumen von 0,5 ml Suspensionslösung konzentriert werden.

3.3.1.2 Tag 1-6: Einlegen der Kollagenmatrix und Einsaat der Fibroblasten

Unter sterilen Bedingungen wurden die vorgefertigten Kollagenschwämme in die Einsatzkörbe der Deep-Well-Platte gelegt. Auf der quaderförmigen Kollagenmatrix mit einer Abmessung von 1,5×1,5 cm², einer Dicke von 0,3 cm und der Porenweite von 10 µm wurden nun etwa 250.000 Fibroblasten pro Hautmodell aufgebracht. Es war darauf zu achten, dass die Fibroblastensuspension gleichmäßig über die Oberfläche der Kollagenmatrix verteilt wurde, damit die Zellen regelmäßig durch die vorhandenen Poren in das Kollagen einwandern konnten (s. Abb. 3.2). Abschließend wurde die Deep-Well-Platte mit 11 ml FAD-10% Kulturmedium befüllt, so dass der Kollagenschwamm bis zu seiner halben Höhe vom Medium umschlossen war. Das Nährmedium wurde abwechselnd jeden dritten oder vierten Tag ersetzt. Zwischen der fünften und sechsten Kultivierungswoche wurde der erhöhte Nährstoffbedarf des Epithels durch einen zweitägigen Mediumwechsel kompensiert.

Die Adaption der Fibroblasten an die neue Umgebung sowie deren Migration und Besiedlung der Kollagenmatrix erfolgte während der siebentägigen Kultivierung im Brutschrank.

3.3.1.3 Tag 7: Aufbringen der Keratinozyten auf die Kollagenmatrix

Pro Hautmodell wurden ca. 500.000 HaCaT-Keratinozyten auf die Oberfläche des Kollagenschwamms aufgetragen (Abb. 3.2). Das Hautäquivalent wurde nun für weitere vier bis fünf Wochen im Brutschrank kultiviert (bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Gehalt). In dieser Zeit differenzierten sich die Keratinozyten am Übergang eines Medium-Luft-Milieus aus und bildeten ein mehrschichtiges Epithel (Abb. 3.3).

Die ausdifferenzierte Epidermis war damit bereit, verwundet und bestrahlt zu werden.

3.3.2 Methodik zur Herstellung des Hautäquivalents mit erhöhten Zellzahlen

In separaten Ansätzen wurden Hautmodelle mit einer erhöhten Ausgangszellzahl angesetzt. Die Vorgehensweise bei der Anzucht dieses Hautäquivalents erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Protokoll. Verändert war lediglich die Anzahl der aufgetragenen Zellen. Pro Hautmodell wurden 400.000 statt 250.000 Fibroblasten in die Kollagenma-

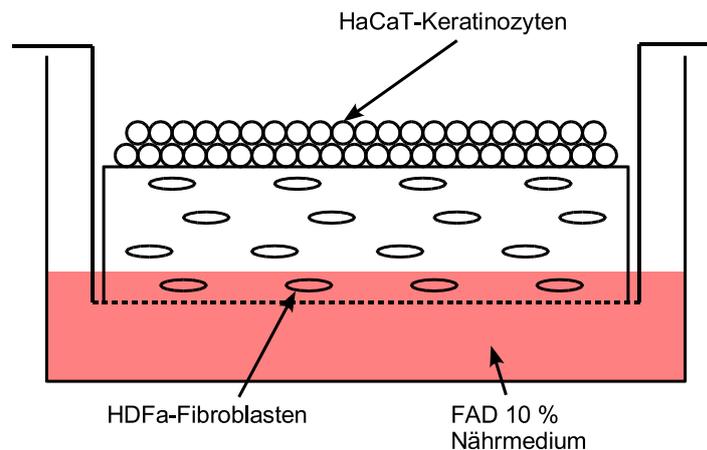


Abbildung 3.2: Die Aufsaat der HaCaT-Keratinozyten auf die Kollagenmatrix erfolgt nach deren Besiedlung durch Fibroblasten.

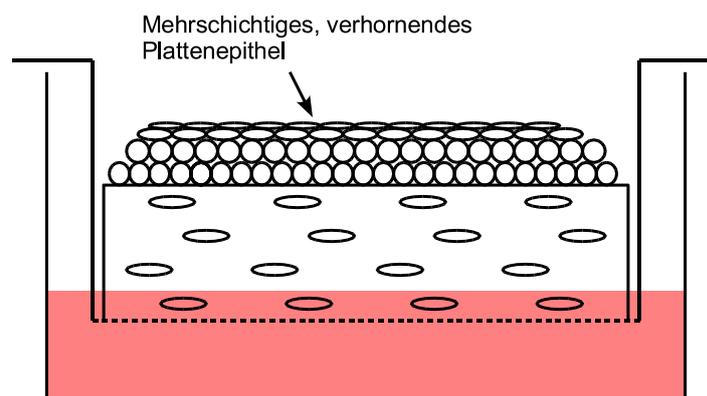


Abbildung 3.3: HaCaT-Zellen bilden eine ausdifferenzierte, mehrschichtige Epidermis.

trix eingebracht und 750.000 anstatt 500.000 Keratinozyten auf die Matrixoberfläche gesät. Das Auftragen von zunächst 500.000 HaCaT-Zellen erfolgte ebenso gemäß dem beschriebenen Protokoll. Nach einer weiteren einwöchigen Kultivierungsdauer wurden die restlichen 250.000 Keratinozyten auf das neugebildete Epithel der Modelle gegeben.

3.3.3 Verwundung und Bestrahlung des Hautmodells

Der Manipulationszeitpunkt am Hautmodell wurde im ersten Versuch nach makroskopischer Beurteilung der Ausdifferenzierung festgelegt. Die Kultivierungsdauer betrug 30 Tage.

Um eine verbesserte Ausdifferenzierung zu erzielen, sollten in den folgenden Hautmodellansätzen die Bestrahlung und Verwundung frühestens mit 42 Tagen vorgenommen werden. Diese Kultivierungszeit konnte allerdings in drei Versuchen nicht eingehalten werden. Am 38. Kultivierungstag setzte bei einigen Hautäquivalenten ein fortschrei-

tender Auflösungsprozess der Kollagenmatrix ein, weshalb der Manipulationszeitpunkt vorgezogen wurde. In den vier folgenden Hautmodellansätze ist die Verwundung und Bestrahlung dreimal nach 38 Kultivierungstagen durchgeführt worden und einmal nach 43 Tagen.

3.3.3.1 Verwundung

Die Verwundung der Epidermis erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Hautmodell wurde den Kultureinsatzkörben entnommen und auf einen umgekehrten Petrischalendeckel gelegt. Während das Epithel von dorsal mit einer feinen, gespreizten Pinzette fixiert wurde, konnte die ca. 1 cm lange Schnittwunde innerhalb der Pinzettenschenkel gesetzt werden.

Ohne direkte Fixierung der Epidermis schob sich das Gewebe beim Schneiden vor der Skalpellklinge aufeinander. Es war weiterhin darauf zu achten, das Skalpell mit angemessenem Druck über das Epithel zu führen, um die Verletzung der Kollagenmatrix möglichst gering zu halten.

3.3.3.2 Bestrahlung

Die 6-Well-Platten mit den Co-Kulturen wurden bei Raumtemperatur (RT) und einem Abstand von 38 cm mit der in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Röntgenröhre bestrahlt. Die Einzelstrahlendosen betragen 2,5 Gy und 5 Gy.

Während der Verwundung und Bestrahlung wurden die übrigen Hautäquivalente aus dem Brutschrank entnommen und bei RT unter der Sterilbank belassen, um möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen. Anschließend wurden die verwundeten und bestrahlten Gewebe für weitere 48 h und 7/8¹ Tage im Brutschrank kultiviert und dann zur Fixierung entnommen.

3.3.4 Gewebefixation

Für die histologische Aufbereitung der Co-Kultur wählten wir die Kryostatpräparation.

Gekühlte Metallformen wurden mit Einbettmedium ausgekleidet, das zu konservierende Gewebe eingelegt und vollständig mit Einbettmedium bedeckt, um eine möglichst komplette Umschließung des Fixativs zu erreichen. Unmittelbar danach wurde der Gewebeblock bei minus 20 °C tiefgefroren und später bei minus 70 °C gelagert.

3.3.5 Projektspezifische Materialien und Chemikalien mit Bezugsquellen

- Ascorbinsäure (ASC), Artikel-Nr. HO135, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

¹Von den zwei verwundeten Hautmodellansätzen wurde ein Ansatz für 7 Tage, der andere für 8 Tage kultiviert. Das gleiche gilt für die bestrahlten Ansätze: der mit 2,5 Gy bestrahlte wurde 7 Tage, der mit 5 Gy bestrahlte 8 Tage kultiviert. Die Notation '7/8' ist im folgenden in diesem Sinne zu verstehen.

- Cholera-toxin (CT), Artikel-Nr. C3012, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Falcon-Multiwell-Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen für 25 mm Zellkultureinsätze, Polystyrol (Falcon Companion TC Plate), Artikel-Nr. 3502, Becton Dickinson, Deutschland
- Falcon-Zellkultureinsätze 0.4 μm Porengröße (Cell Culture Insert, PET, „track-etched“ Membranes), Artikel-Nr. 3090, Becton Dickinson, Deutschland
- Human Dermal Fibroblasts (adult), HDFa, Firma Cascade Biologics, Inc., bestellbar über die Firma TEBU, Artikel-Nr. C-013-5C, Frankfurt a. M., Deutschland
- Hydrokortison (HC), Artikel-Nr. A4034, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Kollagenschwämme mit def. Porenstruktur, Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, Aachen, Deutschland
- Kulturmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Best.-Nr. 41966-029, Gibco BRL, Deutschland
- Nutrient Mixture F-12 (Ham), Best.-Nr. 21765-029, Gibco, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin-Lösung, Artikel-Nr. 1670149 (Gold-Standard, 5000 IU Pen. pro ml, 5 mg Strep. pro ml)
- Trypsin-EDTA Solution (1 \times), Artikel-Nr. 210242, Boehringer, Mannheim, Deutschland
- FCS (Fötale Kälberserum), Artikel-Nr. 210.463, Boehringer, Mannheim, Deutschland

3.3.6 Verwendete Arbeitsgeräte und Labormaterial

- Anatomische Pinzette zum Einlegen des Kollagenplättchens in die Zellkultureinsätze
- Anatomische Pinzette fein zur Verwundung des Epithels
- Automatischer Pipetus Akku, Hirschmann
- Becherglas (150 ml)
- Röntgenröhre: Isovolt 320/10, Fa. Seifert, Ahrensburg, Deutschland
- Cytoperm Brutschrank, Typ 8080/8088, Heraeus, Osterode, Deutschland
- Eppendorf-Pipetten (0,5-10 μl , 10-100 μl , 100-1000 μl)
- Falcon-Zellkulturflaschen, 25 cm^2 , Becton Dickinson, Meylon Cedex, Frankreich

- Falcon-Zellkulturflaschen, 75 cm², Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
- Falcon-Serological Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
- Fluoreszenz-Mikroskop, Typ Fluovert, Leitz, Deutschland
- Neubauer Zählkammer
- Standardtips für Eppendorf-Pipetten (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)
- Sterilbank, Typ Sofiltra, Rewa, Reichertshausen, Deutschland
- Zentrifuge, Typ RP 230/240V/50Hz, Nr. 4300, Hettich, Rotanta

3.3.7 Verwendete Lösungen

3.3.7.1 Kulturmedium für HDFa- und HaCaT- Zellen

Bestandteile von 500 ml Nährmedium:

- 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung
- 50 ml FCS (Fötale Kälberserum)
- 445 ml DMEM

3.3.7.2 Kulturmedium für Co-Kultur (FAD-Medium)

Bestandteile von 555 ml Nährmedium:

- 375 ml DMEM
- 125 ml Ham F-12
- 50 ml FCS
- 5 ml Penicillin-Streptomycin-Suspension
- 10⁻¹⁰ M Cholera toxin
- 0,4 μ g/ml Hydrocortison
- 50 μ g/ml Ascorbinsäure

3.4 Immunhistochemische Färbung

3.4.1 Herstellung und Vorbehandlung der Schnittpräparate

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurde das Hautmodell am Kryostat (Kryostat 1720 digital, Leitz, Deutschland) mit einer Dicke von 9-12 μ m geschnitten.

Die gewonnenen Schnittpräparate wurden aufeinanderfolgend auf selbsthaftende Objektträger (SuperFrost Plus[®]) aufgezogen. Das sorgfältige Aufziehen der Kryoschnitte

ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche immunhistochemische Färbung, welche einen faltenfreien, unkomprimierten Querschnitt des Hautmodells erfordert. Mittels Mikroskop wurden die Kryoschnitte auf ihre Verwendbarkeit überprüft.

Anschließend wurden die Objektträger für mindestens vier Stunden oder über Nacht auf einer Heizplatte bei 37 °C luftgetrocknet. Damit sollte das Abschwimmen der Präparate vom Objektträger während des Färbevorgangs verhindert werden.

Als abschließende Vorbehandlung wurden die Präparate für 5 min. in Aqua dest. belassen, um das restliche Einbettmedium herauszulösen.

3.4.2 Immunhistochemische Färbeverfahren zum Antigennachweis

3.4.2.1 Allgemeine Beschreibung der verwendeten APAAP-Methode

Die Bildung von Immunkomplexen ist das zugrundeliegende Prinzip immunchemischer Färbetechniken. Die spezifische Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ist der Grund für einen präziseren Nachweis mit dieser Methode im Vergleich zu gewöhnlichen histochemischen Techniken [108].

Die bei immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörper entstammen vorwiegend der Immunglobulinklasse G. Das Immunglobulin G (Ig G) hat die Fähigkeit, zwei Antigene gleichzeitig zu binden, und zwar je ein Molekül an jedem monovalenten Fab-Fragment. Die Lokalisierung von nachzuweisenden Antigenen erfolgt mit Hilfe der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode. Es handelt sich um eine immunenzymatische Färbetechnik [108].

Zur Durchführung des Färbeverfahrens wurden benötigt:

- unkonjugierte Primärantikörper
- unkonjugierte Sekundärantikörper
- lösliche Enzym-Anti-Enzymkomplexe
- Substratlösung

Ein monoklonales Mausimmunglobulin als Primärantikörper bindet an das zu detektierende Antigen. Primärantikörper und Enzymimmunkomplex entstammen beide derselben Tierart. Der Brückenantikörper, der entsprechend gegen Immunglobuline dieser Tierart gerichtet ist, hat somit die Möglichkeit, beide Antikörper miteinander zu verbinden. Der Brückenantikörper, auch Sekundärantikörper genannt, muss im Überschuss zugegeben werden, damit eines der beiden Fab-Fragmente an den Primärantikörper bindet und das andere zur Bindung des Fc-Fragments des Enzym-Immunkomplexes frei bleibt.

Enzym-Immunkomplexe setzen sich aus einem bestimmten Enzym und dem entsprechenden Immunglobulin zusammen. Der APAAP-Komplex als Beispiel besteht aus zwei Enzymmolekülen, alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper (s. Abb. 3.4). Diese Methode gewährleistet, bedingt durch die natürliche Affinität der Antikörper zum Antigen, eine gute Sensitivität beim Nachweis von Molekülen [108].

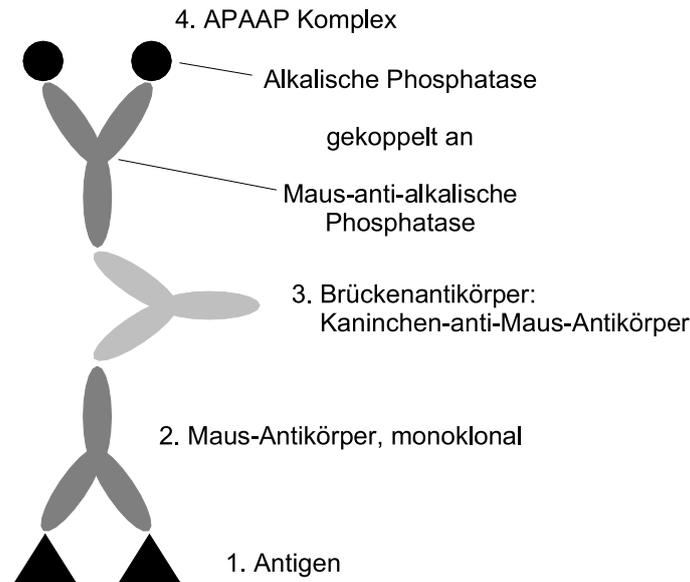


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des APAAP Enzym-Immun-Komplexes, modifiziert nach [108].

Das Enzym Alkalische Phosphatase wirkt als Katalysator und spaltet durch Hydrolyse das Substrat Naphtol-As-Bi-Phosphat in Phenole und Phosphate. Die Phenolkomponenten bilden mit dem Chromogen Neufuchsin ein Diazosalzkomplex, woraus ein farbtintensiver, roter Diazofarbstoff als Reaktionsprodukt entsteht. Dieser photogene, unlösliche Farbstoff macht immunologisch gebundene Moleküle und Zellstrukturen im histologischen Schnitt sichtbar [108].

3.4.2.2 Durchführung der APAAP-Färbemethode

Zur Überprüfung des Färbevorgangs auf unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen wurde jeweils ein Objektträger mit Schnittpräparaten als Negativkontrolle mitgeführt. Die Kontrollpräparate wurden mit Aqua dest. anstelle von Primärantikörpern behandelt. Der weitere Färbelauf erfolgte nach vorgegebenem Färbeprotokoll. Eine positive Reaktion ließe auf unspezifische Reaktionen des Brückenantikörpers bzw. des APAAP-Komplexes schließen.

Primärantikörper: Nach dem Entfernen überstehender Flüssigkeit wurde auf die histologischen Schnitte der jeweilige monoklonale Antikörper aufgetragen.

Die Negativkontrolle wurde mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline (PBS)) benetzt. Generell ist während des gesamten immunhistochemischen Färbevorgangs auf eine vollständige Bedeckung der Kryoschnitte zu achten, um die Austrocknung der Präparate zu vermeiden. Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte mit PBS. Empirisch ermittelte Verdünnungsverhältnisse für die entsprechenden Antigene wurden wie folgt verwendet:

- $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, Fibronektinrezeptor (CD29/CD49e) 1:50

- $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, Kollagenrezeptor (CD29/CD49b) 1:50
- $\beta 1$ -Integrin (CD29) 1:50
- Cytokeratin 1:50
- Endoglin (CD 105) 1:50
- ICAM-1 (CD54) 1:50
- Ki-67 1:70
- TGF β 3 1:50
- TGF β 1 1:50

Die 30-minütige Inkubation der Präparate wurde in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37 °C durchgeführt.

Sekundärantikörper: Dem einmaligen Spülen für 5 Minuten in PBS folgte die Inkubation mit dem Brückenantikörper bei Raumtemperatur für 30 Minuten.

Der Antikörperverdünnung von 1:50 wurde 0,02 ml Humanserum (eigener Spender) pro ml Verdünnungsflüssigkeit zugesetzt. Dadurch sollen unspezifische Kreuzreaktionen mit dem organotypischen Gewebe des Hautmodells verhindert und Hintergrundfärbungen auf ein Minimum reduziert werden.

Beim verwendeten Brückenantikörper handelt es sich um ein polyklonales Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin, das im Überschuss aufgetragen wurde. Durch zweimaliges Spülen mit Aqua dest. wurden nicht gebundene, überschüssige Antikörper ausgewaschen.

APAAP-Komplex: Der APAAP-Komplex wurde in einer Gebrauchsverdünnung von 1:50 aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Präparate für weitere 5 Minuten in Aqua dest. gespült.

3.4.2.3 Immunhistochemische Färbung der Präparate

Während den Inkubationszeiten wurde die Neufuchsin-Entwicklerlösung hergestellt. Zunächst wurden drei Ansätze vorbereitet.

Für die Lösung A wurden 175 ml Entwicklerlösung mit 62,5 ml Propandiol vermischt und auf einen pH-Wert von 9,75 eingestellt. Anschließend wurden 100 mg Levamisol zugegeben und darin gelöst, um die endogene alkalische Phosphatase-Aktivität zu hemmen.

Die Lösung B bestand aus 1,5 ml Dimethylformamide, worin 125 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat gelöst wurden.

Für die Herstellung von Lösung C wurde zunächst 50 mg Natriumnitrit unter Schütteln auf einem Rüttler in 1,25 ml Aqua dest. vollständig gelöst, danach 0,5 ml Neufuchsin zugegeben.

Bei den jeweiligen Ansätzen war unbedingt auf eine vollständige Lösung der festen Substanzen zu achten. Kurz vor Ablauf der letzten Inkubationszeit wurden die 3 Lösungsansätze zusammengemischt, auf einen pH-Wert 8,8 eingestellt und filtriert. Nach korrekter Herstellung der Färbelösung entstand eine klare, bernsteinfarbene Flüssigkeit. Die Objektträger wurden je nach Schnelligkeit der Farbreaktion zwischen 10 und 30 Minuten in der Färbelösung belassen.

Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Mayer: Nach dem Abwaschen der überständigen Färbeflüssigkeit durch das Eintauchen der Präparate in ein Wasserbad erfolgte die Gegenfärbung. Je nach Ausprägung der vorherigen Farbreaktion wurden die Schnittpräparate vier bis sechs Sekunden in der Hämalaulösung belassen. Damit es nicht zu Farbausfällungen während des Färbevorgangs kommt, wurde die Hämatoxilinlösung zuvor filtriert. Nach mehrmaligem Spülen der Schnitte in Leitungswasser erfolgte eine abschließende Bläuung für 10 Minuten im Wasserbad.

Eindecken der Präparate: Zum Eindecken der histologischen Präparate wurde erhitzte Kaisers-Glyceringelatine verwendet. Das Eindecken der Schnittpräparate musste sehr sorgfältig geschehen, um den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden.

Ergebnis der Färbung: Ein positives Färbeergebnis beruht auf der zuvor beschriebenen Enzym-Substratreaktion des APAAP-Komplexes mit Neufuchsin. Es entsteht ein photogener Diazofarbstoff, der die jeweiligen immunologisch gebundenen Zellstrukturen deutlich rot anfärbt. Nach der Gegenfärbung mit Hämatoxilin-Eosin stellen sich nicht markierte Zellkerne und Gewebe bläulich-violett dar.

Zur Vermeidung störender Kristallbildungen in Schnittpräparaten wurden später alle PBS-Anwendungen im obigen Färbeprotokoll durch Aqua dest. ersetzt.

3.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer

Zur Beurteilung der Epidermismorphologie ist eine HE-Färbung geeigneter, da dieses kurze Färbeverfahren die Proben vor Chromatolyse und Verlust von Zellmembranen schützt.

3.4.3.1 Durchführung der HE-Färbemethode

Zunächst wurden die Objektträger mit den Schnittpräparaten 10 Minuten in Aqua dest. gewässert. Nun erfolgte das Färben in Hämalaulösung nach Mayer für ca. 10 Sekunden. Danach wurden die Schnitte 10 Minuten in Leitungswasser gebläut und anschließend mit 0,5%-iger Eosinlösung für zwei bis drei Minuten gegengefärbt. Zur vollständigen Entfernung der überständigen Färbeflüssigkeit wurden die Präparate zwei bis drei Mal in Aqua dest. gespült.

Eindecken der Präparate: Zum Eindecken der histologischen Präparate wurde erhitzte Kaisers-Glyceringelatine verwendet.

Ergebnis der Färbung: Nach der Färbung von kutanem Gewebe stellen sich Zellkerne blau und das Zytoplasma rot dar.

3.4.3.2 Mikroskopische Auswertung

Mit einem Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden die Präparate in mäanderförmiger Vorgehensweise zunächst in Übersichtsvergrößerung (25-fach) untersucht. Die Beschreibung der morphologischen Details und des Färbemusters erfolgte bei 40- bis 60-facher Vergrößerung.

3.4.4 Projektspezifische Materialien Chemikalien mit Bezugsquellen

Antikörper mit Bezugsquellen

- APAAP-Komplex, Artikel-Nr. D0259, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Kaninchen-Anti-Maus Antikörper, Artikel-Nr. Z0259, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Maus-Anti-Human CD29, Klon K20, Artikel-Nr. M0889, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Maus-Anti-Human CD105, Endoglin, Klon SN6h, Artikel-Nr. M 3527, DAKO CORPORATION, CA, USA
- Maus-Anti-Human Cytokeratin, Klon MNF116, Artikel-Nr. M0821, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Maus-Anti-Human ICAM-1 (CD54), Klon 6.5B5, Artikel-Nr. M 7063, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Maus-Anti-Human Integrin $\alpha 5\beta 1$ (CD49e), Klon P1D6, Artikel-Nr. M0604, DAKO CORPORATION, CA, USA
- Maus-Anti-Human Integrin $\alpha 2\beta 1$ (CD49b), Klon P1E6, Artikel-Nr. M0603, DAKO CORPORATION, CA, USA
- Maus-Anti-Human Ki-67, Klon Ki-67, Artikel-Nr. M0722, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Maus-Anti-Human TGF β 1, Klon 134A-2b3, Artikel-Nr. GF06, OncogeneTM Research Products, Cambridge, England
- Maus-Anti-Human TGF β 3, Klon 236-5.2, Artikel-Nr. GF06, OncogeneTM Research Products, Cambridge, England

Chemikalien mit Bezugsquellen

- Aqua dest.
- Eisessig 100%, Artikel-Nr. 818755, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Eosin G für die Mikroskopie, Artikel-Nr. 115935, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol absolut (pro analysi), Artikel-Nr. 1.00974.2511, Merk, Darmstadt, Deutschland
- HCl rauchend 37%, Artikel-Nr. K12428617, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Kaiser's Glyceringelatine, Artikel-Nr. 9242, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Kulturmedium: DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), Artikel-Nr. 41966-029, Gibco BRL, Deutschland
- Levamisol, Artikel-Nr. L 9756, SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
- Mayers Hämalaun, Artikel-Nr. 1.09249.0500, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Mayers Hämalaunlösung für Mikroskopie, Artikel-Nr. 840290886, Merk, Darmstadt, Deutschland
- NaOH, Artikel-Nr. 106498, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Naphtol-As-Bi-Phosphat, Artikel-Nr. N 2250, SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
- Natriumchlorid, Artikel-Nr. 6404, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Natriumnitrit, Artikel-Nr. 6549, Merk, Darmstadt, Deutschland
- Neufuchsin, Artikel-Nr. 4041, Merk, Darmstadt, Deutschland
- N,N-Dimethylformamid, Artikel-Nr. 1.02937.0500, Merk, Darmstadt, Deutschland
- PBS (Phosphate buffered saline), Artikel-Nr. 1000-3, SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
- Tris-Base (Trishydroxymethylaminomethan), Artikel-Nr. T 1503, SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
- Tris-HCL (Trizma-Hydrochlorid), Artikel-Nr. T 3253, SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
- Trypsin-EDTA Solution (1×), Artikel-Nr. 210242, Boehringer, Mannheim, Deutschland

3.4.5 Verwendete Arbeitsgeräte und Labormaterial

Präparation der histologischen Schnitte

- Einbettmedium für Gefrierschnitte, Artikel-Nr. 0201-08926, Reichert Jung, Nußloch, Deutschland
- Heizplatte, W. Pfenning, Kiel, Deutschland
- Mikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Kryostat, Typ 1720 digital, Leitz, Deutschland
- Objektträger Superfrost-Plus, Artikel-Nr. 04/300, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

Färbung der histologischen Schnitte

- Anatomische Pinzette, zum Umsetzen der Objektträger
- Automatischer Pipettus-Akku, Hirschmann Laborgeräte
- Becherglas (150 ml, 250 ml, 600 ml, 1000 ml)
- Cytoperm Brutschrank, Typ 8080/8088, Heraeus, Osterode, Deutschland
- Deckgläser (24×60 mm²), AL, Artikel-Nr. 9.161.060, Mensel, Deutschland
- Dreifuß-Ständer mit Glastrichter
- Elektronische Analysewaage, Typ 1702, Sartorius
- Elektronische Waage, Typ PT 600, Sartorius
- Eppendorf-Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
- Falcon[®]-konische Zentrifugon-Röhrchen (15 ml), Becton Dickinson, Meylan, Cedex, Frankreich
- Falcon[®]-Serological Pipetten (2 ml), Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
- Faltenfilter (240 mm Durchmesser), Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- Feuchte Kammer, ausgelegt mit wassergetränktem Zellstoff
- Rüttler, Typ REAX 2000, Heidolf, Deutschland
- Magnetrührer
- Messzylinder (100 ml, 250 ml)
- Objektträgerkorb

- Safe lock Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Ständer für Mikro- und Megatubes
- Standküvetten aus Glas und Kunststoff
- Standardtips für Eppendorf-Pipetten (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)
- Trockener Zellstoff, zum Entfernen überstehender Flüssigkeiten vom Objektträger

3.4.6 Verwendete Reagenslösungen und Puffer

3.4.6.1 Puffer für die Entwicklerlösung

1000 ml Puffer:

- 1,5 g Tris-HCL
- 4,9 g Tris-Base
- 8,7 g Natriumchlorid
- ad 1000 ml Aqua dest.

3.4.6.2 Propandiollösung

1000 ml Propandiollösung:

- 21 g Propandiol ad 1000 ml Aqua dest.

3.4.6.3 Reagens für die immunhistochemischen Färbeverfahren (Farblösungen)

Lösung A:

- 175 ml Entwicklerlösung
- 62,5 ml Propandiol
- 100 mg Levamisol

Lösung B:

- 1,5 ml Dimethylformamid
- 125 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat

Lösung C:

- 50 mg Natriumnitrit
- 500 μ g Neufuchsin
- 1,25 ml Aqua dest.

3.4.6.4 Reagens für das HE-Färbeverfahren (Farblösungen)

Eosin Stammlösung:

- 1 g Eosin
- 50 ml 96% Alkohol
- 50 ml Aqua dest.

Eosin Gebrauchslösung:

- 50 ml Stammlösung
- 50 ml Aqua dest.
- 2 Tropfen Eisessig

3.5 ELISA

Der ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) gehört zu den immunologischen Nachweismethoden. Dabei werden an ein Trägermaterial spezifische Antigene oder Antikörper gebunden. Nach Inkubation der zu untersuchenden Probe bilden sich Immunkomplexe, an die sich danach zugegebene enzymmarkierte Anti-Antikörper anlagern. Enzym und zugefügtes Substrat ergeben eine Farbreaktion, die eine präzise photometrische Messung ermöglicht.

3.5.1 Vorbereitungen zur Durchführung des ELISAs

Sobald sich alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur erwärmt haben, kann mit der Präparation der Reagenzlösungen begonnen werden.

3.5.1.1 Herstellung der Reagenzlösungen und Standardverdünnungsreihe

Waschpufferlösung:

Falls Kristalle im Konzentrat vorhanden sind, sollten diese zunächst durch vorsichtiges Rühren vollständig aufgelöst werden.

Für 500 ml Waschpufferlösung werden 20 ml Waschpufferkonzentrat in 480 ml destilliertem oder de-ionisiertem Wasser gelöst.

Substratlösung:

Die Farbreagenzien A und B müssen zu gleichen Volumenanteilen vermischt und vor Lichteinfall geschützt werden. Es ist zu beachten, dass die fertige Farblösung innerhalb von 15 Minuten verwendet werden soll.

Standard:

Zur Herstellung der Ausgangslösung werden dem Standardkonzentrat 1 ml destilliertes oder de-ionisiertes Wasser zugegeben.

Danach wird die Ausgangslösung mindestens 15 Minuten leicht bewegt und dann die Verdünnungsreihe angelegt.

Verdünnungsreihe für Standard:

Zur Erstellung der Verdünnungsreihe werden zunächst die vorgegebenen Mengen des Kalibrator-Verdünnungsmittels in die Polypropylengefäße pipettiert. Anschließend wird eine definierte Menge der Ausgangslösung in das erste Polypropylengefäß gegeben und nach gründlicher Durchmischung jeweils derselbe Volumenanteil in das nächste Gefäß überführt. Das Kalibrator-Verdünnungsmittel dient als Nullstandard.

3.5.2 Durchführung des ELISAs

Die folgenden Punkte beschreiben den prinzipiellen Ablauf des ELISAs.

1. Vorbereitung aller Reagenzien und des Standards, Aktivierung der TGF β 1-Probe
2. Zugabe der Eich-Verdünnungslösung in alle Behältnisse der KGF-Mikrotitterplatte
3. Auftragen des Standards bzw. der Probe in äquivalenten Volumenanteilen
4. dreistündige Inkubation bei RT
5. Überstand vollständig dekantieren, die ELISA-Platte mit dem Waschpuffer nach Protokoll mehrmals waschen und Pufferreste sauber entfernen
6. Zugabe des Konjugats in alle Behältnisse der Mikrotitterplatte
7. Inkubation bei RT, Dauer je nach Protokoll
8. Überstand vollständig dekantieren, die ELISA-Platte nach Protokoll mehrmals mit dem Waschpuffer waschen und Pufferreste sauber entfernen.
9. Zugabe der Substratlösung
10. Inkubation bei RT, Dauer nach Protokollvorgaben, Mikrotitterplatte vor Lichteinfall schützen
11. Zugabe der Stopplösung
12. Bestimmung der optischen Dichte innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Wellenlängenkorrektur soll bei 540 nm oder 570 nm vorgenommen werden

Bei der Durchführung des TGF β 1- und KGF-ELISA-Tests war auf die verschiedene Anzahl der Waschvorgänge und die Inkubationsdauer zu achten. Sonstige Abweichungen im Versuchsablauf sind in den Punkten 1. und 2. unter Abschnitt 3.5.2 aufgeführt.

3.5.3 Auswertung des ELISAs

Mittels des ELISAs wurde die zeitliche Entwicklung der Konzentration von TGF β 1 bzw. KGF im Mediumüberstand verschiedener Hautmodelle untersucht, die zuvor den folgenden Behandlungen unterzogen wurden:

- Verwundung
- Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy
- Verwundung mit anschließender Bestrahlung von 5 Gy

Diese Manipulationen wurden nach einer Kultivierungszeit von 43 Tagen durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten über einen Zeitraum von acht Tagen, in Intervallen von 48 h während der ersten vier Tage. Nach der Untersuchung bei 96 h wurde dabei ein Mediumwechsel vorgenommen und danach das Hautmodell für weitere vier Tage wachsen gelassen.

Ferner wurde der TGF β 1- und KGF-Gehalt des Medium bestimmt. Diese Werte dienten bei der Auswertung als Referenz um zu beobachten, ob eine Produktion oder ein Verbrauch des Wachstumsfaktors stattgefunden hat.

Die Bestimmung der Fehlergrenzen der bei der Auswertung bestimmen Größen erfolgte nach den bekannten Fehlerfortpflanzungsgesetzen [157].

3.5.4 Projektspezifische Materialien und Chemikalien mit Bezugsquellen

- Aqua dest.
- Quantikine[®] Human KGF (FGF-7) Immunoassay, Artikel-Nr. DKG00, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
- Quantikine[®] Human TGF β 1 Immunoassay, Artikel-Nr. DB100, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

3.5.5 Verwendete Arbeitsgeräte und Labormaterial

- Mehrhandpipette, Eppendorf 300
- Photometer, Elisa-Reader, Spectra Max 190
- Polypropylentubs,

3.6 Statistik

3.6.1 Statistik der Hautmodellansätze

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Kultivierung fünf unabhängiger Co-Kultur-Ansätze mit jeweils 12 Hautmodellen durchgeführt worden. Jedes Experiment ist mit dem Lichtmikroskop morphologisch untersucht worden.

3.6.2 Statistik der immunhistochemischen Antigenuntersuchungen

Zur Datenerhebung wurden Schnittpräparate von drei verschiedenen Experimente ausgewertet. Die Färbung der spezifischen Antigene für jedes Einzelexperiment erfolgte auf zwei Objektträgern mit jeweils zwei bis vier Schnittpräparaten.

Aufgrund ungenügender Ausdifferenzierung und Verlust morphologischer Details in einzelnen Co-Kulturen des Hautmodellansatzes mit Manipulationszeitpunkt 43 Tage konnten einzelne Modelle entweder gar nicht ausgewertet oder keine Angaben zur Lokalisation der Färbung gemacht werden. Das Färbeergebnis kann lediglich als positiv oder negativ gewertet werden.

3.6.3 Wachstumskurven

Zur Ermittlung von Wachstumsrate und Verdopplungszeit der Zelllinien HaCaT und HDFa sind jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt worden.

3.6.4 Einzelversuche

Für die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen konnte nur ein Experiment durchgeführt oder ausgewertet werden:

- Kultivierung von Hautäquivalenten mit erhöhten HaCaT- und HDFa-Zellzahlen
- KGF- und TGF β 1-ELISA
- Färbungen der Hautäquivalente:
48 h nach Verwundung und 5 Gy Einzeldosisbestrahlung
7/8 d nach 2,5 Gy und 5 Gy Einzeldosisbestrahlung.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Proliferationskinetik

Anhand der semilogarithmischen Darstellung des Zellwachstums kann die Proliferationskinetik der beiden Zelllinien (HDFa und HaCaT) nach Strahlenexposition beurteilt werden.

Das Wachstum einer Satzkultur (Batch-Kultur) wird in folgende Phasen eingeteilt: Zunächst durchlaufen die Zellen die so genannte lag-Phase ($\mu \approx 0$). In dieser Vorbereitungsphase passen sich die Zellen an die neue Umgebung an, induzieren den Enzymapparat zur Verwertung der Substrate und bereiten sich zur ersten Teilung vor. Mit der ersten Zellteilung beginnt die Beschleunigungsphase ($\mu > 0$), die nach Erreichen der maximalen Wachstumsrate endet.

Aufgrund des langen Messabstands von 24 h, ist in den dargestellten Wachstumskurven die lag-Phase von der Beschleunigungsphase nicht zu unterscheiden. Sie wird in der folgenden Ergebnisbeschreibung zusammenfassend besprochen. Nach der Beschleunigungsphase treten die Zellen in die exponentielle Wachstumsphase ein und zeigen unlimitiertes Wachstum. Die Bestimmung der Zellverdopplungszeit t_2 erfolgt im Zeitraum des exponentiellen Zellwachstums. Wie in Abb. 4.1 und Abb. 4.2 ersichtlich, ergibt die semilogarithmische Darstellung des exponentiellen Zellwachstums eine Gerade.

Die Verzögerungsphase beendet das unlimitierte Wachstum. Die vorhandene Zelldichte, Nährstofferschöpfung und die Anhäufung von Stoffwechselprodukten, sowie Strahlenschäden limitieren das Zellwachstum auf eine geringe Zellzunahme, was sich durch einen „plateauähnlichen“ Kurvenverlauf darstellt. Sobald das Zellsterben die Anzahl von Zellteilungen überwiegt, kann ein Zellverlust und das Absinken der Kurve beobachtet werden.

4.1.1 Wachstumskurven der HaCaT-Zelllinie

Während der Vorbereitungs- und Beschleunigungsphase in den ersten 24 h weisen nur unbestrahlte HaCaT-Zellen eine positive Wachstumsrate ($\mu > 0$) auf. Allen bestrahlten Zellen ist eine anfängliche Wachstumsdepression gemeinsam. Je höher die Strahlendosis, desto größer der Zellverlust. Ab den Strahlendosen von 5 Gy bzw. 7 Gy kann eine signifikante Verringerung der Zellzahl von ca. 13% bzw. 19% festgestellt werden.

Dosis [Gy]	Zeitraum des exp. Zellwachstums	t_2 Mittelwert mit SEM (n=3)
0	24 h - 96 h	22.4 h \pm 0.7 h
1	24 h - 96 h	23 h \pm 0.3 h
3	24 h - 72 h	24 h \pm 1.4 h
5	24 h - 72 h	30 h \pm 5.2 h
7	24 h - 72 h	35.8 h \pm 9.1 h

Tabelle 4.1: Zellverdopplungszeiten t_2 der HaCaT-Zelllinie nach Strahlenexposition.

Nach 24 h treten alle HaCaT-Zellen in die exponentielle Wachstumsphase ein. Bei der Kontroll- (0 Gy) und 1 Gy-Kurve hält das unlimitierte Wachstum im Mittel 72 h an. Ab der Einzeldosisbestrahlung von 3 Gy verkürzt sich die exponentielle Wachstumsphase um durchschnittlich 24 h. Eine dosisabhängige Wachstumshemmung der Zellen nach Strahlenexposition wird ebenso anhand der Verdopplungszeiten deutlich. Mit steigender Strahlendosis verlängert sich die Zellverdopplungszeit kontinuierlich (Tab. 4.1).

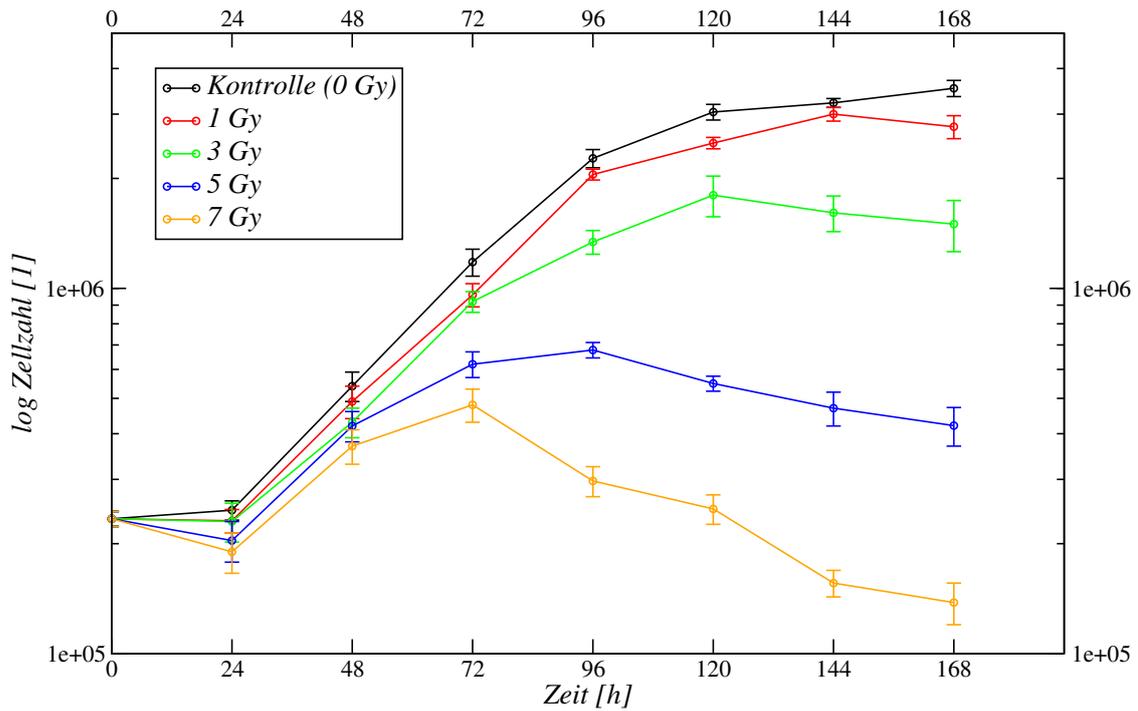


Abbildung 4.1: Halblogarithmische Darstellung des Zellwachstums der HaCaT-Zelllinie nach Bestrahlung.

Der exponentiellen Wachstumsphase folgt die Verzögerungsphase. Auffällig ist, dass sich bei den Wachstumskurven 1 Gy (zwischen 96 h und 144 h) und 3 Gy (zwischen 72 h und 120 h) direkt an die erste unlimitierte Proliferation ein zweites exponentielles Wachstum (mit einer reduzierten Geradensteigung) anschließt und erst danach ein pla-

teauähnlicher Verlauf andeutet. HaCaT-Zellen ohne Bestrahlung zeigen bis 168 h nach Aussaat eine geringe Zellzunahme, was am plateauähnlichen Kurvenverlauf ersichtlich wird. Die Wachstumskurve 5 Gy verläuft ebenfalls plateauähnlich, jedoch deutet das Absinken der Kurve ab 96 h einen Zellverlust an. Der Wachstumskurve 7 Gy fehlt diese so genannte Plateauphase. Unmittelbar nach Beenden der exponentiellen Phase fällt die Kurve im Diagramm abrupt ab.

HaCaT-Zellen zeigen nach Strahlenexposition nicht nur eine anfängliche, sondern auch eine späte Wachstumshemmung, die mit steigender Strahlendosis früher einsetzt. Bei jeder Strahlendosiserhöhung setzt das Absinken der Kurven im Mittel 24 h eher ein (s. Abb. 4.1).

4.1.2 Wachstumskurven der HDFa-Zelllinie

Im Gegensatz zu den Wachstumskurven der HaCaT-Zellen zeigen die der HDFa-Zellen während der Vorbereitungs- und Beschleunigungsphase eine anfängliche Wachstumsdepression in den ersten 24 h, infolge des Zellverlusts.

Zwischen Wachstumsdepression und Strahlendosis besteht in den ersten 24 h kein direkter Zusammenhang. Zwar ist der Rückgang der eingesäten Zellzahl in unbestrahlten Zellen am geringsten (10%), allerdings weisen Zellen nach einer Strahlendosis von 7 Gy einen nicht wesentlich höheren Zellverlust von 12% auf. Die Wachstumskurven 1 Gy und 5 Gy folgen mit einem Zellverlust von 25% und 24%. Die größte Wachstumsdepression zeigen HDFa-Zellen bei 3 Gy, hier beträgt der Verlust 40%.

Mit 24 h beginnt, ausser für die Wachstumskurven 3 Gy und 7 Gy, die exponentielle Wachstumsphase. Zellen mit Strahlendosen von 0 Gy und 1 Gy erhalten das unlimitierte Wachstum im Mittel für 48 h. Die exponentielle Wachstumsphase tritt nach der Einzeldosisbestrahlung von 3 Gy erst bei 48 h auf und dauert im Durchschnitt, wie bei 5 Gy, 24 h länger.

Bei einer Strahlenexposition von 7 Gy zeigen die HDFa-Zellen während der gesamten Kultivierungszeit kein exponentielles Wachstum. Die Wachstumshemmung nach Strahlenexposition verdeutlichen die in Tab. 4.2 aufgeführten Zellverdopplungszeiten. Mit Ausnahme von 3 Gy verlängern die Zellen mit steigender Strahlendosis ihre Verdopplungszeit kontinuierlich. Der enorme Anstieg von t_2 sowie der deutliche Zellverlust, welche die Kurven 1 Gy und 3 Gy zeigen, könnten als eine höhere Strahlenempfindlichkeit der HDFa-Zellen im niedrigen Dosisbereich interpretiert werden.

Nach Beenden des Zellwachstums mit der maximalen Wachstumsrate kann bei HDFa-

Dosis [Gy]	Zeitraum des exp. Zellwachstums	t_2 Mittelwert mit SEM (n=3)
0	24 h - 72 h	19.9 h \pm 1.6 h
1	24 h - 72 h	31.3 h \pm 3.3 h
3	48 h - 120 h	77.8 h \pm 3.6 h
5	24 h - 96 h	52.3 h \pm 1.1 h
7	nicht vorhanden	-

Tabelle 4.2: Zellverdopplungszeiten t_2 der HDFa-Zelllinie nach Strahlenexposition.

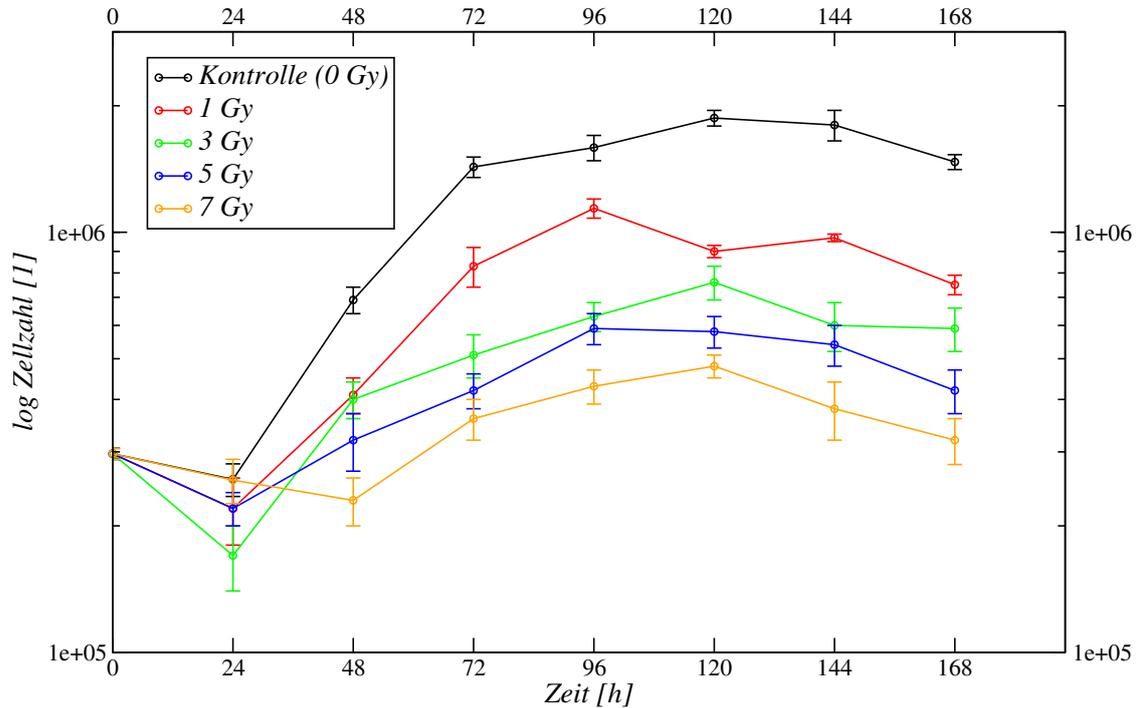


Abbildung 4.2: Halblogarithmische Darstellung des Zellwachstums der HDFa-Zelllinie nach Bestrahlung.

Zellen nach Bestrahlung mit 0 Gy und 7 Gy (zwischen 72 h und 120 h) ein plateauähnlicher Verlauf der Verzögerungsphase beobachtet werden.

Die Wachstumskurve 1 Gy zeigt nach ihrem exponentiellen Wachstum zunächst noch eine geringe Zellzahlzunahme. Anschließend sinkt auch diese Wachstumskurve mehr oder weniger stark ab. HDFa-Zellen mit einer Strahlendosis von 3 Gy und 5 Gy zeigen unmittelbar nach Beenden der exponentiellen Phase einen abfallenden Kurvenverlauf (s. Abb. 4.2).

4.2 Beschreibung des organotypischen Hautäquivalents

4.2.1 Morphologie einer gut ausdifferenzierten, rekonstruierten Epidermis

Die morphologische Beschreibung des rekonstruierten Epithels erfolgte nach fünfwöchiger Kultivierung der HaCaT-Zellen auf einer mit Fibroblasten besiedelten Kollagenmatrix.

In den ersten drei bis fünf Tagen nach Aufsaat der Keratinozyten auf die Matrix wuchsen die HaCaT-Zellen zu einem geschlossenen Monolayer aus. Anschließend bildeten die Zellen ein mehrschichtiges Epithel mit zunehmender Differenzierung und Dicke.

Frühestens nach einer vierwöchiger Kultivierungszeit war die Epidermis in unserem Modell vollständig ausdifferenziert.

Die klassischen Schichten des kutanen Gewebes, Str. basale, Str. spinosum, Str. granulosum und Str. corneum, waren mikroskopisch differenzierbar und mehr oder weniger deutlich ausgebildet. Eine Basalmembran war lichtmikroskopisch nicht sichtbar. Das rekonstruierte „Str. basale“ enthält Zellen, welche zumeist hoch- bis isoprismatische, manchmal rundliche Gestalt, mit ovalen Zellkernen aufweisen. Die ein- bis zweilagige Zellpopulation wies im Vergleich zu anderen Zellschichten eine höhere Zelldichte auf, jedoch ohne einheitliche Anordnung. Größtenteils formierten die untersten „Basalzellen“ auf der Kollagenmatrix eine erste, durchgehende Zellschicht (Abb. 4.3, siehe Pfeilspitze rechts im Bild). Die Anordnung dieser Zellen war jedoch nur gelegentlich hochprismatisch, einzelne Abschnitte zeigten maximal vier nebeneinander gereichte Zellen mit vertikaler Ausrichtung. Dazwischen lagen einzelne Zellen mit horizontaler Ausrichtung oder Zellansammlungen ohne erkennbare Vorzugsrichtung. Basale Keratinozyten wachsen teilweise in die Matrixoberfläche ein, bilden das Kollagen um und verankern sich wellenförmig in der dermisähnlichen Matrix (Abb. 4.3, siehe linker Pfeil). Gelegentlich tropften viele „Basalzellen“ in die vorhandenen Matrixporen ab (Abb. 4.11, siehe Pfeilspitze).

Die suprabasale Schicht („Str. spinosum“) ist 8-14 Zellschichten stark und weist polygone, isoprismatische Zellen auf. Die „Stachelzellen“ enthielten zunächst größere ovale, kubische und runde Zellkerne. In den oberen Schichten kann man das Abflachten der Zellen und Kerne beobachten. Dort ist der Zellverband aufgelockert und weist verbreiterte Interzellularräume auf (Abb. 4.4).

Unabhängig vom Verhornungsgrad der Epidermis bildeten die HaCaT-Keratinozyten zwischen drei bis sieben „Körnenschichten“ aus, wobei basophile Keratohyalin granula im Lichtmikroskop nur in einzelnen Zellen sichtbar waren. Das rekonstruierte „Str. granulosum“ zeigt eine starke Abplattung der Zellen und die Auflösung der flachen Zellkerne und Zellorganellen.

Eine meist kernlose, sehr dünne Hornschicht (etwa zwei bis drei Schichten) bildete den Abschluss der mehrschichtigen Epidermis (Abb. 4.4). Aufgrund der fehlenden Abschilferung der epidermalen Hautmodelloberfläche, lag der Hornschicht zuweilen Zelldetritus auf.

Fibroblasten waren in der Kollagenmatrix vermehrt in der Umgebung von Poren identifizierbar und traten vereinzelt in gleichmäßiger Verteilung im übrigen Kollagenewebe auf.

4.2.2 Strukturelle Auflösungserscheinungen der Kollagenmatrix

Wiederholt zeigten sich während der Anzüchtung des artifiziellen Hautgewebes Auflösungs Vorgänge in der Matrix. Mit Ablauf der fünften Kultivierungswoche (38 Tage) begann in einzelnen Hautmodellen der Matrixabbau. Dieser Prozess war fortschreitend bis hin zur völligen Auflösung der Kollagenmatrix. Das rekonstruierte Gewebe dieser Hautmodelle war entweder sehr instabil oder das Epithel lag direkt der PET-

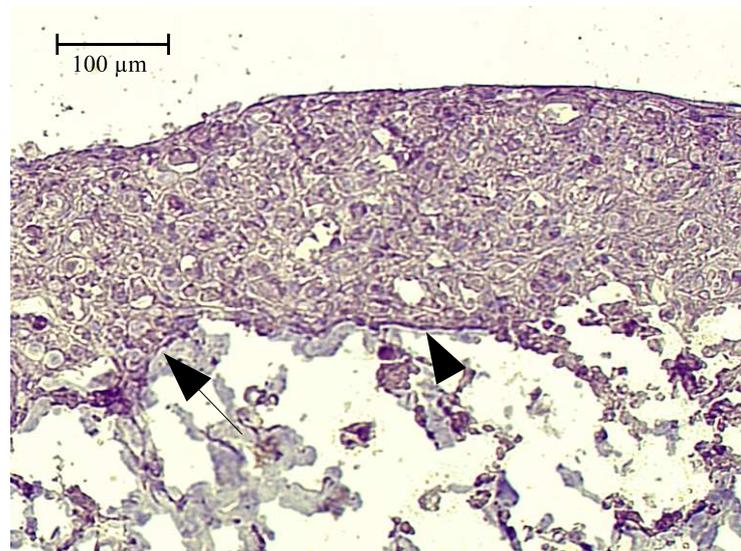


Abbildung 4.3: *Gut ausdifferenzierte, rekonstruierte Epidermis nach fünfwöchiger Kultivierung.*

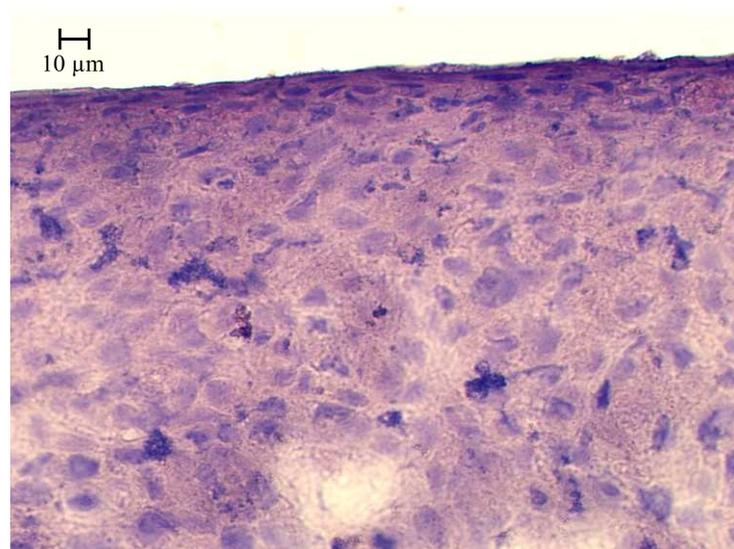


Abbildung 4.4: *Detailaufnahme der rekonstruierten Epidermis nach fünfwöchiger Kultivierung.*

Membran im Kultivierungskorb auf. Eine weitere ordnungsgemäße Behandlung und Auswertung der Gewebe war nicht möglich. Die Auflösung des Kollagens war in den Bereichen beschleunigt, welche von rekonstruierter Epidermis bedeckt waren. Am Tag der Konservierung waren mehr als die Hälfte der angesetzten Hautmodelle nicht oder nur geringfügig vom Matrixabbau betroffen und konnten ausgewertet werden.

Die Probleme traten vermehrt ungefähr zeitgleich mit Veränderung der Herstellung und Zusammensetzung der vorgefertigten Kollagenschwämme auf. Desweiteren wurde der Sterilisierungsprozess von γ -Bestrahlung auf Ethylenoxid umgestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sind diese eventuellen Zusammenhänge oder andere möglichen Ursachen nicht näher untersucht worden. Ein einmaliger Kultivierungsversuch, Hautäquivalente mit erhöhten Fibroblasten- und Keratinozytenzahlen zu züchten, ergaben keine Beschleunigung des Abbauvorgangs. Der Auflösungsprozess setzte zeitgleich mit den standardisierten Modellen ein. Wie beim standardisiertem Versuchsansatz, war im Experiment mit höheren Zellzahlen etwa die Hälfte der der angesetzten Hautmodelle auswertbar.

4.2.3 Morphologie einer mangelhaft ausdifferenzierten, rekonstruierten Epidermis

Die Anzüchtungen der organotypischen Modelle erfolgte in fünf unabhängigen Versuchen. Der Differenzierungs- und Ausbildungsgrad der rekonstruierten Epidermis wies jedoch in den verschiedenen Ansätzen starke Abweichungen auf. Die Reproduzierbarkeit einer vollständig ausdifferenzierten Epidermismorphologie lag bei etwa 35%. In ungenügend ausdifferenzierten Modellen waren trotz übereinstimmender Kultivierungsdauer der HaCaT-Zelllinie teilweise die Epitheldicke reduziert und die Stratifikation undeutlich (bis hin zu einer strukturlosen, mehrschichtigen Keratinozytenansammlung). In Hautäquivalenten mit verminderter Stratifizierung und Epitheldicke waren häufiger größere Mengen an HaCaT-Zellen in die Porenöffnungen des Kollagenschwammes abgetropft. Die Basalzellschicht war zum Teil unterbrochen und nicht zusammenhängend. Die Zellkernform der basalen Zellen war eher rund als oval.

Besonders in der „Stachelzellschicht“ machte sich die Reduzierung der Epitheldicke bemerkbar. In der Regel waren nur fünf bis sechs suprabasale Zelllagen ausgebildet. Diese zellkernhaltige Schicht bildete oft den Abschluss der Epidermis.

Das ein- bis zweilagige „Str. granulosum“ war meist durchgehend ausgebildet. Seine natürliche Lokalisation, apikal der „Stachelzellschicht“, war nicht immer gegeben. Manchmal lagen die abgeplatteten Zellschichten inmitten suprabasaler Zellschichten. Die Hornschicht bedeckte nur abschnittsweise das rekonstruierte Epithel oder fehlte vollständig. Selten fanden sich kernhaltige, polygonale Zellen in der Hornschicht. Kernhaltige Zellen und Zelldetritus lagen vermehrt apikal der epidermalen Oberfläche auf.

Oft war in diesen schlecht ausgebildeten organotypischen Co-Kulturen die gute Ausdifferenzierung und Stratifikation der Epidermis an Randregionen auffällig, welche eine geringere Epitheldicke aufwiesen.

Vermutlich begann nach ca. vierwöchiger Kultivierungsperiode die strukturelle Auflösung in Epidermisbereichen mit höherer Schichtanzahl und Differenzierung. Die Epi-

dermis verlor zunehmend ihre erkennbare Schichtung oder stellte sich als zwar mehrschichtige, aber strukturlose Keratinozytenansammlung dar. In der schichtarmen Epidermis war der Zellverband aufgelockert, die Keratinozytenanzahl reduziert und in höheren Lagen schienen sich die Zellen allmählich aufzulösen. Abgeplattete und verhornte Zellschichten fehlten vollständig.

Mehrschichtige, strukturlose Keratinozytenansammlung zeigten fokal intakte, polygonal geformte Zellkerne, umgeben von einer homogenen Masse mit stark gefärbten, punktförmigen Strukturen. Vermutlich waren dies die Überreste von unvollständig degenerierten Zellkernen, Organellen und Zellmembranen eines unnatürlichen Auflösungsprozesses. Eine Beurteilung der Zellmorphologie war nicht möglich.

4.3 Mikroskopische Auswertung immunhistochemischer Untersuchungen des Hautäquivalents

Um das Vorhandensein und die Lokalisation von WF, CAMs und Rezeptoren im HM bestimmen zu können, wurde ihr Nachweis durch die immunhistochemische APAAP-Färbung (s. Abschnitt 3.4) geführt. Zur Datenerhebung wurden Schnittpräparate (Gefrierschnitte) von zwei bis drei verschiedenen Experimenten ausgewertet. Anhand der Färberegebnisse war es möglich, die Veränderung der Faktorenproduktion nach Bestrahlung und/oder Verwundung mit der des unmanipulierten HM zu vergleichen.

Die Untersuchungszeitpunkte nach Verwundung und Bestrahlung waren 48 h, 168 h (7 Tage) und 192 h (8 Tage). Um die Lokalisation der Färbung eindeutig angeben zu können, wurde die organotypische Epidermis in basale, suprabasale, abgeplattete und verhornte Zellschichten eingeteilt. Nur ein deutlich rotes APAAP-Signal wurde als positiv gewertet. Die Färbung der spezifischen Antigene für jedes Einzelexperiment erfolgte auf zwei Objektträgern mit jeweils zwei bis vier Schnittpräparaten.

Eine Intensivierung der Färbung im Vergleich zum entsprechenden Kontrollpräparat wurde qualitativ mit den Parametern (+), +, ++ und +++ bewertet. Dabei stehen ein Pluszeichen für eine geringe (in Klammern) bzw. eine deutliche, zwei für eine mittlere und drei Pluszeichen für eine starke Zunahme der Farbintensität. Die tabellarische Ergebnisübersicht der qualitativen Farbinduzierung ist im Abschnitt A.1 des Anhangs aufgeführt. In den folgenden Abschnitten werden die Farbreaktionen der untersuchten Antigene besprochen, dort veranschaulichen zumeist Abbildungen die Färbungsreaktionen und deren Lokalisation im HM. Dabei sind von den jeweils zwei bis drei Versuchen die repräsentativsten Schichten ausgewählt.

Um einen direkten Vergleich zwischen dem Antigenmuster im Hautäquivalent und der normaler Haut zu ermöglichen, werden vorhandene immunhistochemische Literaturdaten normaler, kutaner Haut jeweils bei der Einführung des besprochenen Antigens kurz dargestellt.

4.3.1 Panzytokeratin

Der monoklonale Mausantikörper Anti-Zytokeratin vom Klon MNF116 (DAKO, Artikel-Nr. M0821) ist ein Panzytokeratin. Es markiert humane Keratine mit niedrigen und

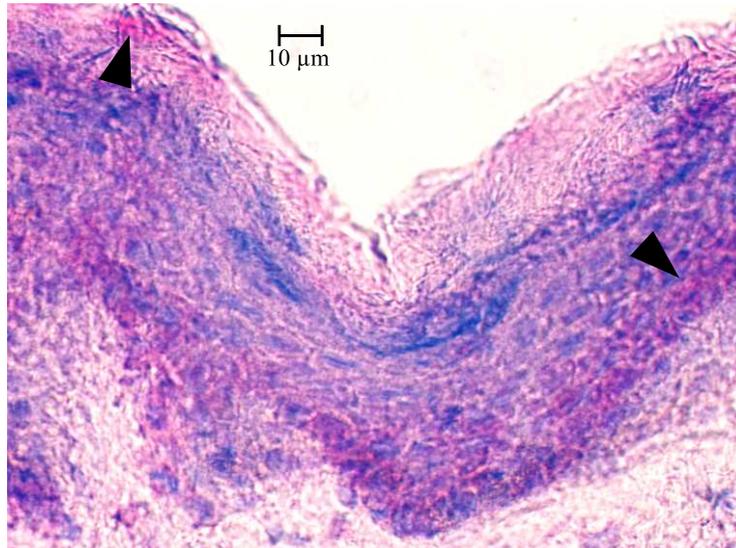


Abbildung 4.5: Die Pfeilspitzen markieren positive Zytokeratin-Reaktionen in der normalen, humanen Epidermis, im Str. basale, Str. spinosum und Str. corneum.

mittleren Molekulargewichten von 40-58 kDa. Die entsprechenden Zytokeratine sind 5, 6, 8, 17 und 19.

Da die Immunreaktivität eines Panzytokeratins keine Aussage über die hierarchische Organisation und den Differenzierungsgrad eines Epithelgewebes erlaubt, wurde als Referenz humane Haut mit demselben Antikörper angefärbt.

4.3.1.1 Panzytokeratinmuster der natürlichen, humanen Haut

Eine diffus positive Zytokeratin-Reaktion konnte nur innerhalb der Epidermis beobachtet werden. Die Färbung war nicht streng auf das Str. basale beschränkt, sondern reichte teilweise bis in mittlere Lagen des Str. spinosums. Während dorsale Schichten im Str. spinosum und das gesamte Str. granulosum überwiegend keine Antikörperreaktionen zeigten, stellten sich Anteile des Str. corneums wiederum positiv dar (Abb. 4.5).

4.3.1.2 Panzytokeratinmuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Im Hautäquivalent zeigten ebenfalls nur Keratinozyten eine stark positive Farbreaktion. Die gesamte Epidermis war diffus positiv, vor allem basale Zellen sind intensiv rot gefärbt (Abb. 4.6).

4.3.2 Proliferationsmarker Ki-67

Ki-67 ist ein Marker der Wachstumsfraktion in epidermalen Geweben. Proliferierende Stamm- und Transitzellen, welche das Ki-67 Protein enthalten [39], sind in der kutanen

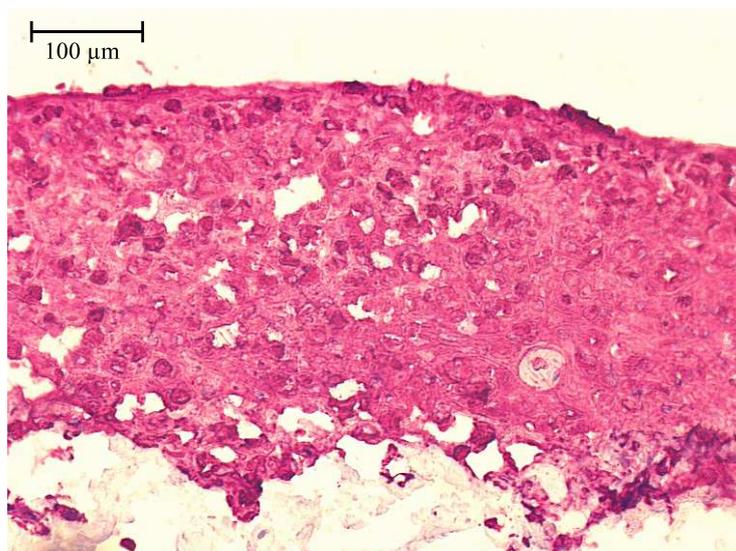


Abbildung 4.6: *Starke Zytokeratin-Expression in der gesamten, rekonstruierten Epidermis.*

Epidermis hauptsächlich im Str. basale und in unteren Schichten des Str. spinosums anzutreffen. Im histologischen Präparat bindet der Ki-67 Antikörper (DAKO, Nr. M0722) das humane Kern- und nukleoläre Ki-67 Protein (Abb. 4.7).

4.3.2.1 Ki-67 Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Ki-67 positive Zellen verteilten sich diffus vor allem in basale und untere suprabasale Zellschichten. In den übrigen suprabasalen und abgeplatteten Schichten war die Ki-67-Expression nur noch fokal in einzelnen Zellen anzutreffen. Verhornte Lagen sind Ki-67 negativ (Abb. 4.8).

4.3.3 β 1-Integrin (CD29)

Im histologischen Schnitt erkennt der CD29-Antikörper vom Klon K20 (DAKO Nr. M0889) humanes, zelluläres β 1-Integrin.

In normalen, mehrschichtigen Plattenepithelien der Glniva sind β 1-Integrine vor allem in basalen Keratinozyten entlang ihrer Zellmembran nachzuweisen. β 1-Integrin wird auch von Fibroblasten im Bindegewebe expremiert [81].

4.3.3.1 Das β 1-Integrin-Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Die gesamte Epidermis zeigt diffus verteilte, positive Antikörperreaktionen. HDFa-Fibroblasten in der Kollagenmatrix sind ebenfalls β 1-Integrin-positiv. Besonders intensiv rot gefärbt sind basale, untere suprabasale und gelegentlich verhornte Zellschichten (Abb. 4.9). In HaCaT-Zellen ist die vorwiegend periphere Markierung des Antigens gut erkennbar (Abb. 4.10).

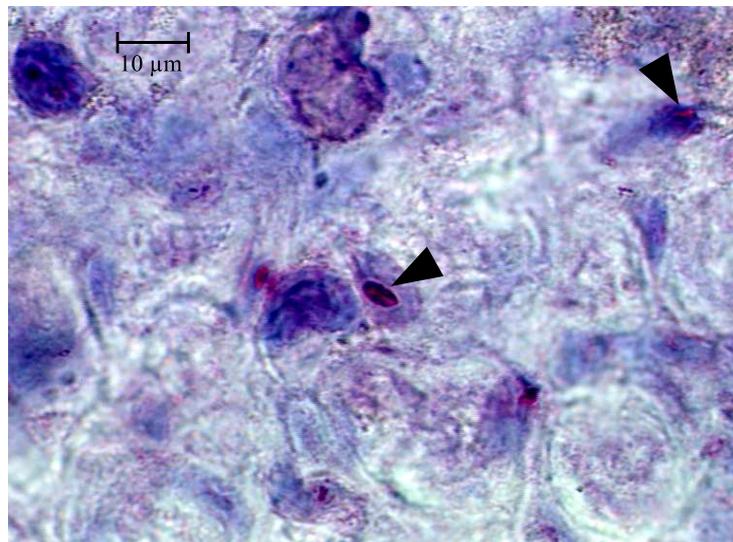


Abbildung 4.7: Die Pfeilspitzen zeigen Ki-67-positive HaCaT-Zellkerne in der rekonstruierten Epidermis des unmanipulierten HM.

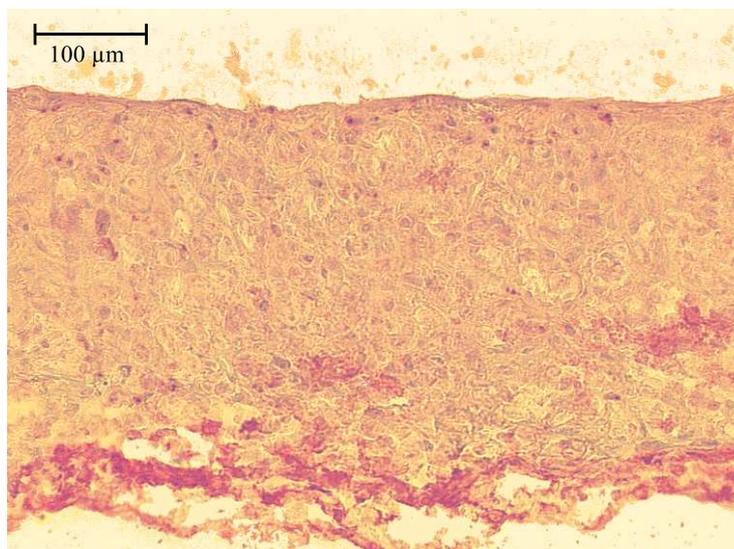


Abbildung 4.8: Ki-67-Expression der rekonstruierten Epidermis, bevorzugt in basalen und suprabasalen Lagen.

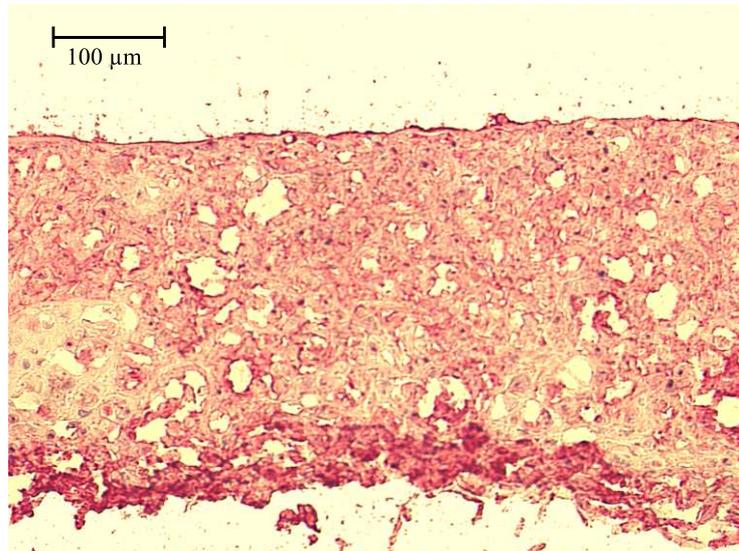


Abbildung 4.9: $\beta 1$ -Integrin-Expression in der gesamten rekonstruierten Epidermis, vor allem in basalen und unteren suprabasalen Schichten.

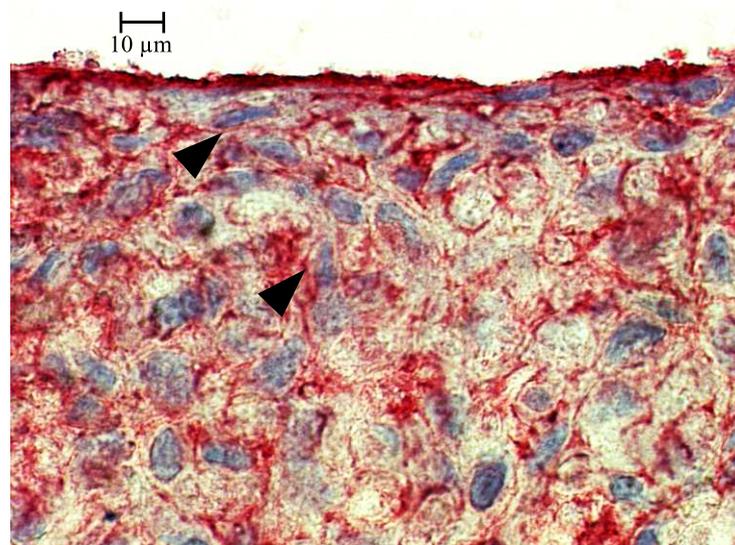


Abbildung 4.10: Membranständige, immunhistochemische $\beta 1$ -Integrin-Färbungen in epidermalen HaCaT-Zellen.

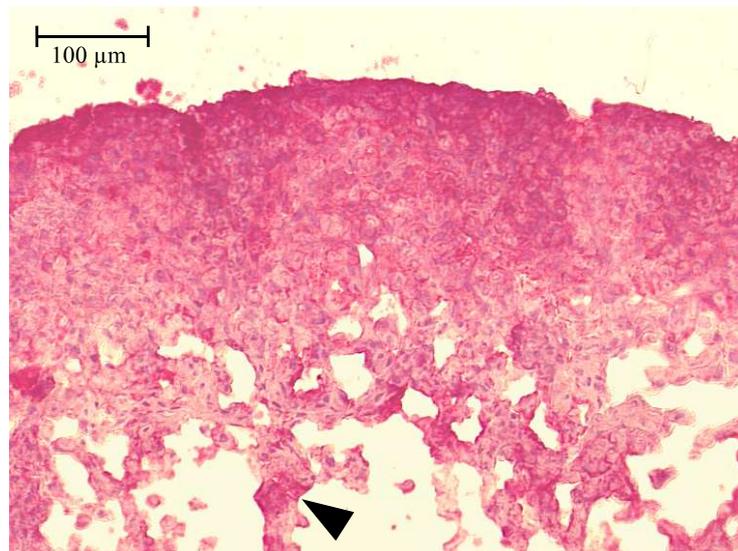


Abbildung 4.11: $\beta 1$ -Integrin-Expressionsanstieg nach Bestrahlung mit 5 Gy, besonders im dorsalen Epidermisbereich. Die Pfeilspitze markiert „Basalzellen“, welche in Matrixporen abgetropft sind.

4.3.3.2 $\beta 1$ -Integrin-Expression nach Strahlenexposition

Nach Bestrahlung mit 5 Gy ist ausschließlich in Keratinozyten eine signifikante Hochregulierung der $\beta 1$ -Integrin-Expression feststellbar. In der organotypischen Epidermis zeigen besonders HaCaT-Zellen der oberen suprabasalen, abgeplatteten und verhornten Schichten eine induzierte $\beta 1$ -Integrin-Produktion. Basale Zelllagen weisen gelegentlich $\beta 1$ -Integrin-Akkumulationen auf. Die Markierung des $\beta 1$ -Integrins ist in HaCaT-Zellen nicht mehr streng peripher, das Antigen scheint auch im Zytoplasma gelagert zu sein (Abb. 4.11).

4.3.4 ICAM-1 (CD54)

Der Mausantikörper ICAM-1 vom Klon 6.5B5 (DAKO, Nr. M 7063) markiert humanes ICAM-1. Normale, humane Epidermis expremiert kein ICAM-1. Entzündungsreize oder ionisierende Strahlung induzieren die zelluäre ICAM-1-Expression [97, 63].

4.3.4.1 ICAM-1-Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Die rekonstruierte Epidermis weist positive ICAM-1-Reaktionen in unterschiedlicher Lokalisation auf. HaCaT-Zellen aller epidermalen Schichten expremieren ICAM-1. Meist ist das rote APAAP-Signal im oberen Epidermisbereich häufiger und intensiver. Das Chromopräzipitat ist sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4.12).

In der Kollagenmatrix können vereinzelt ICAM-1-positive HDFa-Fibroblasten beobachtet werden.

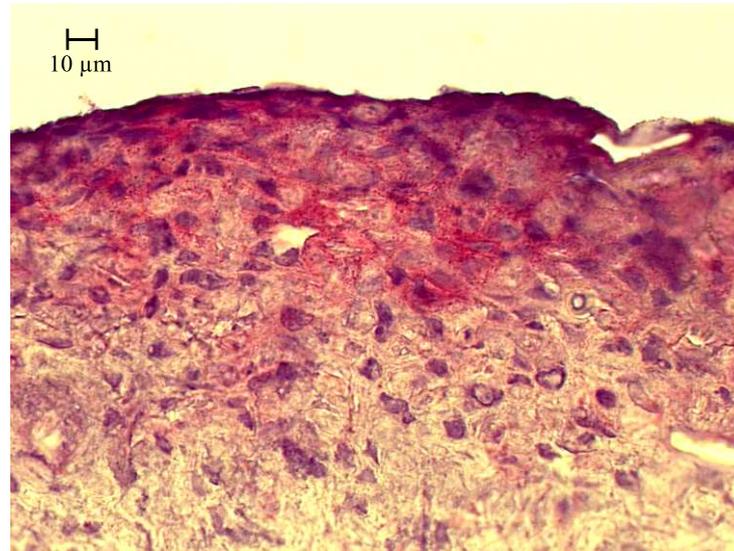


Abbildung 4.12: *Intensive ICAM-1-Expression im oberen Epidermisbereich des rekonstruierten Hautäquivalents.*

4.3.4.2 ICAM-1-Expression nach Strahlenexposition

48 h nach Bestrahlung mit 5 Gy zeigt die organotypische Epidermis einen mittleren Anstieg der ICAM-1-Expression. Der obere Epidermisbereich (höhere suprabasale, abgeplattete und verhornte Zellschichten) weist eine ICAM-1-Akkumulation auf. In den anderen Epithelschichten färben sich ICAM-1 exprimierende Zellen fokal oder in herdförmigen Ansammlungen an (Abb. 4.13).

Am Untersuchungszeitpunkt (48 h) ist die Induktion der ICAM-1-Produktion von HDFa-Fibroblasten von zwei Versuchen nur einmal deutlich induziert. Die ICAM-1-Synthese ist bis 8 Tage p.r. (5 Gy) in Fibroblasten und Epidermis deutlich induziert, eine schichtabhängige, epidermale Akzentuierung der Färbung kann jedoch nicht mehr festgestellt werden.

Bei einer Strahlenexposition von 2,5 Gy kann nach 7 Tagen weder in der Epidermis noch in Fibroblasten eine erhöhte ICAM-1-Expression nachgewiesen werden.

4.3.4.3 ICAM-1-Expression nach Verwundung der Epidermis

48 h nach Verwundung zeigt die rekonstruierte Epidermis kein eindeutiges Ergebnis. Nur einmal konnte eine deutliche Induzierung der ICAM-1-Expression beobachtet werden. Das gesamte unverletzte, epitheliale Gewebe zeigt sich fokal ICAM-1-positiv, wobei die Expression in basalen Lagen durchgehend induziert ist. Keratinozyten am Wundrand und vermutlich in die Wunde migrierende HaCaT-Zellen haben ebenfalls ihre ICAM-1-Produktion erhöht (Abb. 4.14).

Die ICAM-1-Immunreaktivität war 7 Tage nach Wundsetzung ebenfalls widersprüchlich. Im ersten Experiment entsprach die ICAM-1-Immunreaktivität den Kontrollpräparaten und war wiederum bevorzugt im oberen Epidermisbereich zu finden.

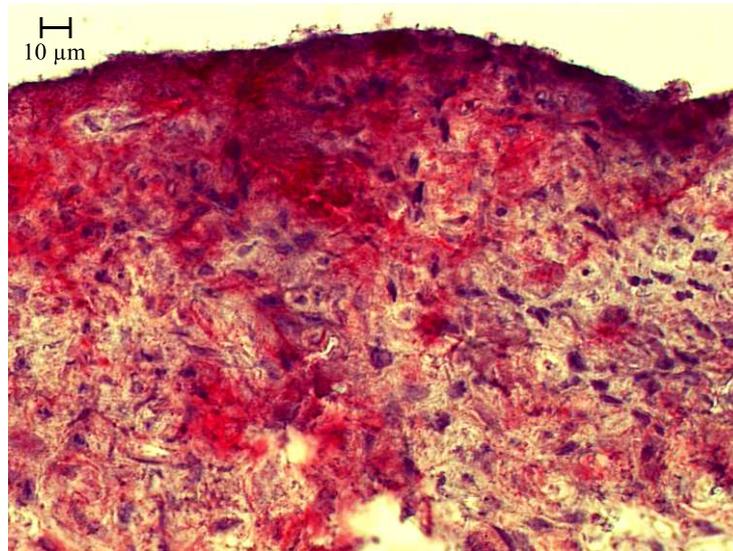


Abbildung 4.13: Die rekonstruierte Epidermis zeigt 48 h nach Strahlenexposition von 5 Gy eine mittlere Induzierung der ICAM-1-Expression.

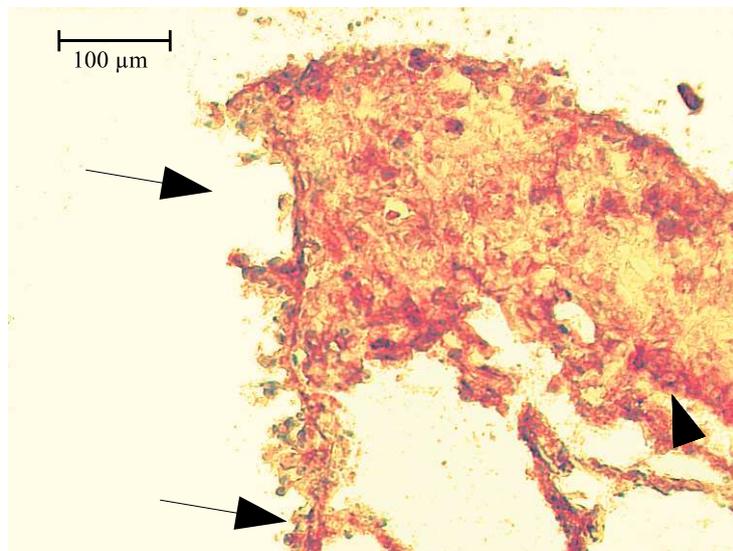


Abbildung 4.14: Induzierte ICAM-1-Expression 48 h nach Verwundung, im unverletzten, basalen Gewebe (siehe Pfeilspitze) und am Wundrand (siehe Pfeil, links oben), sowie in HaCaT-Zellen, welche vermutlich in die Wunde einwandern (Pfeil links unten).

Im nachfolgenden Experiment zeigte in der gesamten Epidermis eine persistent induzierte ICAM-1-Expression. In HDFa-Fibroblasten der Matrix konnte nach Verwundung an beiden Untersuchungszeitpunkten keine erhöhte ICAM-1-Expression festgestellt werden.

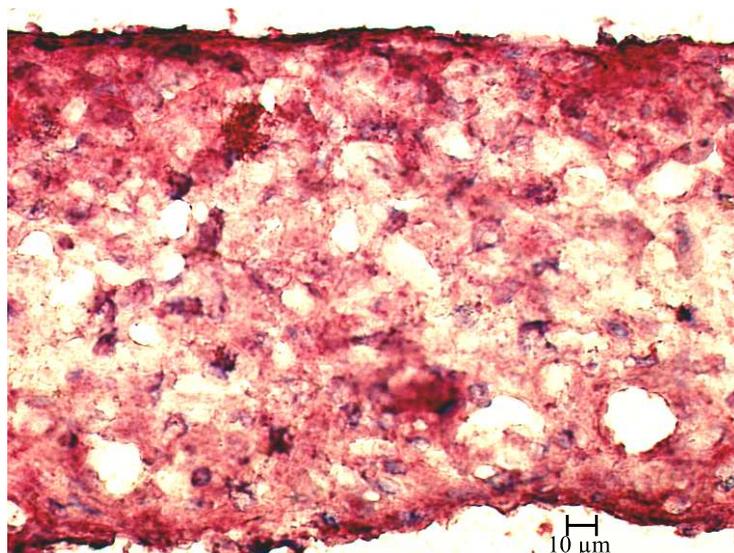


Abbildung 4.15: *TGFβ3-Expression in der gesamten rekonstruierten Epidermis, v. a. in basalen, abgeplatteten und verhornten Zellschichten.*

4.3.5 TGFβ3

Der Mausantikörper vom Klon 236-5.2 (OncogeneTMNr. GF06) markiert humanes TGFβ3. In der normalen Haut ist zytoplasmatisches TGFβ3 in allen epidermalen Lagen, ausser im Str. corneum zu finden. Auch dermale Fibroblasten exprimieren TGFβ3 [55].

4.3.5.1 TGFβ3-Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Zellen aller epidermalen Lagen sind fokal deutlich TGFβ3-positiv und diffus in der Epidermis verteilt. TGFβ3-Antikörperreaktionen treten gehäuft im oberen Epidermisbereich (abgeplattete und verhornte Zellschichten) und in basalen Zelllagen auf (Abb. 4.15). HDFa-Fibroblasten exprimieren ebenso TGFβ3.3

4.3.5.2 TGFβ3-Expression nach Strahlenexposition

7/8 Tage nach ionisierender Bestrahlung von 2,5 Gy oder 5 Gy sind alle epidermalen Lagen durchgehend schwach, und diffus gefärbt. Besonders in basalen, abgeplatteten und verhornten Zellschichten sind TGFβ3-positive Zellen zu finden. Im Gegensatz zu HaCaT-Keratinocyten ist TGFβ3-Expression in HDFa-Fibroblasten deutlich erhöht.

4.3.5.3 TGFβ3-Expression nach Verwundung der Epidermis

Das TGFβ3-Expressionsmuster unterscheidet sich in der akuten Phase, 48 h nach Verwundung, nicht wesentlich vom dem des normalen, organotypischen Gewebes. Untersuchungen am 7. Tag zeigen eine diffuse TGFβ3-Immunreaktivität der ganzen Epidermis. Eine Akzentuierung in speziellen epidermalen Lagen ist nicht mehr nachvollziehbar. Die

TGF β 3-Expression von HaCaT- und HDFa-Zellen war nach Verwundung an beiden untersuchten Zeitpunkten nicht signifikant erhöht.

4.3.5.4 TGF β 3-Expression nach Verwundung und Bestrahlung

Die positiven TGF β 3-Antikörperreaktionen sind in der Epidermis willkürlich verteilt. Wiederum war die TGF β 3-Immunreaktivität in HDFa-Fibroblasten deutlich induziert. HaCaT-Keratinocyten zeigten eine geringe Induzierung der TGF β 3-Expression.

4.3.6 TGF β 1

In Gefrierschnitten mehrerer Versuche konnte TGF β 1 immunhistologisch mit dem Mausantikörper vom Klon 134A-2b3 (OncogeneTM, Nr. GF06) nicht nachgewiesen werden. Zum Nachweis des Proteins wurde mit einer Antikörperverdünnung von 1:50 gearbeitet.

4.3.7 α 5 β 1-Integrin (CD49e)

Der Mausantikörper, Klon P1D6 (DAKO Nr. M0604) bindet an das humane α 5 β 1-Integrin. Immunhistochemische Studien weisen in der normalen, humanen Haut kein α 5 β 1-Integrin nach [82, 101].

4.3.7.1 α 5 β 1-Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen sind widersprüchlich. Minderwertig differenzierte und geschichtete Modelle zeigen keine Anfärbung der Epidermis und Fibroblasten, weder nach solitärer Bestrahlung mit 5 Gy oder Verwundung, noch bei Kombination der genannten Noxen. In normal differenzierten Hautäquivalenten sind basale und suprabasale Keratinocyten schwach α 5 β 1-positiv. In den höheren epidermalen Lagen nehmen die positiven Zellen ab und sind dort fokal vorhanden, wobei die Fokalfpunkte gleichmäßig verteilt sind (Abb. 4.16).

Auch Fibroblasten der Kollagenmatrix zeigen positive α 5 β 1-Antikörperreaktionen.

4.3.7.2 α 5 β 1-Integrin-Expression nach Verwundung der Epidermis

48 h nach Wundsetzung sieht man eine stark induzierte Integrinexpression an den Wundrändern und in HaCaT-Zellen aller epidermalen Schichten. Wie im normalen Hautäquivalent kann wiederum in basalen und unteren suprabasalen Lagen des unverletzten Epithels eine α 5 β 1-Akkumulation beobachtet werden (Abb. 4.17). Die hochregulierte Integrinexpression in der verwundeten Epidermis (48 h) konnte am 7. Tag nicht mehr nachgewiesen werden. Schwach positive Keratinocyten sind nur noch fokal in basalen und suprabasalen Lagen zu beobachten. Eine α 5 β 1-Akzentuierung weisen hier abgeplattete Zellschichten auf.

HDFa-Fibroblasten der Kollagenmatrix zeigen nach Verwundung keine induzierte Integrinexpression.

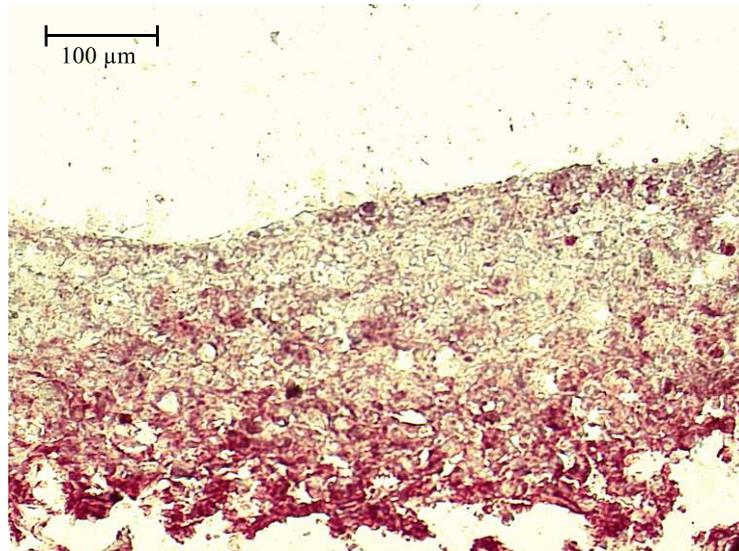


Abbildung 4.16: Geringe $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-Färbung, bevorzugt in basalen und suprabasalen Schichten der rekonstruierten Epidermis.

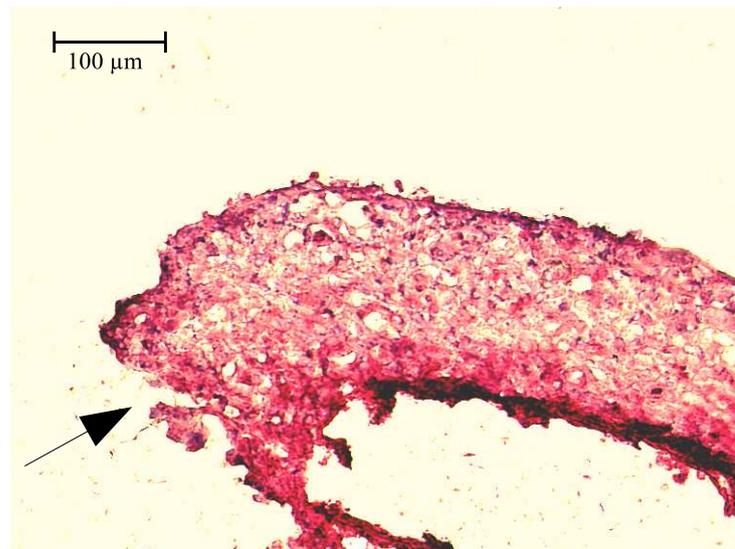


Abbildung 4.17: Darstellung der stark induzierten $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-Expression in allen epidermalen Schichten der rekonstruierten Epidermis und am Wundrand, 48 h nach Verwundung.

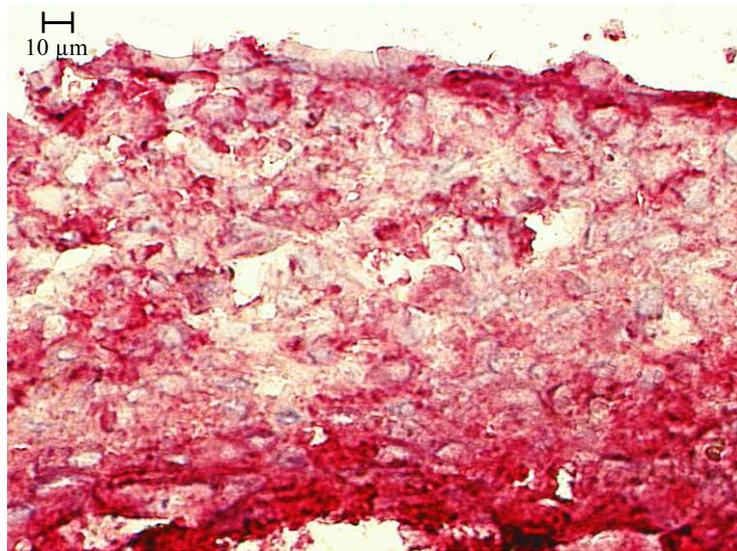


Abbildung 4.18: $\alpha 2\beta 1$ -Expression des rekonstruierten Epithels, besonders starke Antikörperreaktionen zeigen basale und untere suprabasale HaCaT-Keratinocyten.

4.3.8 $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (CD49b)

Der Mausantikörper vom Klon P1E6 (DAKO Nr. M0603) markiert das humane $\alpha 2\beta 1$ -Integrin. Immunhistochemisch ist dieses primär in der Peripherie basaler NEK und Mundschleimhautkeratinocyten lokalisiert [169, 82]. Humane Spalthautproben weisen zusätzlich $\alpha 2\beta 1$ -positive Keratinocyten im Str. spinosum sowie fokal im Str. granulosum auf [101].

4.3.8.1 $\alpha 2\beta 1$ -Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Alle epidermalen Schichten im Hautmodell zeigen positive Antikörperreaktionen. Entsprechend der natürlichen, epidermalen $\alpha 2\beta 1$ -Lokalisation exprimieren vor allem basale und untere suprabasale HaCaT-Keratinocyten das Integrin. In höheren Zelllagen nimmt die Expression ab. Allerdings färben sich regional ebenso verhornte Zelllagen an (Abb. 4.18).

HDFa-Fibroblasten der Kollagenmatrix sind ebenfalls $\alpha 2\beta 1$ -positiv.

4.3.8.2 $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression nach Strahlenexposition

7/8 Tage nach Strahlenexposition von 2,5 und 5 Gy entsprach das $\alpha 2\beta 1$ -Färbemuster weitestgehend dem des normalen Hautäquivalents. Beide Strahlendosen von 2,5 Gy und 5 Gy bewirkten eine jeweils gleiche, geringe Farbintensivierung in Keratinocyten oberer Epidermisschichten und in Fibroblasten (Abb. 4.19).

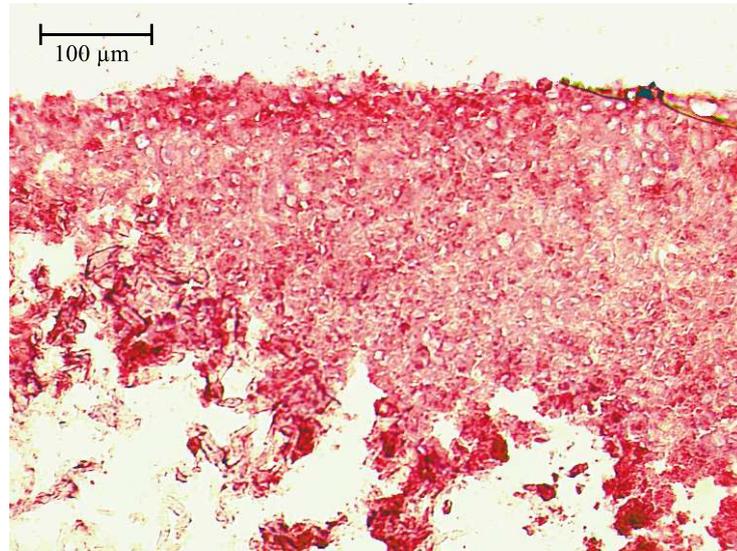


Abbildung 4.19: 8 Tage nach ionisierender Bestrahlung von 5 Gy kann in oberen epidermalen Schichten des rekonstruierten Epithels eine geringe $\alpha 2\beta 1$ -Expressionsinduktion beobachtet werden.

4.3.8.3 $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression nach Verwundung

Während der akuten Phase, 48 h nach Wundsetzung, sind im rekonstruierten Epithel mehrere epidermale Schichten $\alpha 2\beta 1$ -positiv. Die Integrinexpression ist hauptsächlich basal anzutreffen. Verhornte Lagen weisen nur noch einzelne positive Antikörperreaktionen auf.

7 Tage nach Wundsetzung konnte im Epidermisäquivalent eine angedeutete, aber noch unvollständige Umverteilung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins in obere Bereiche des Epithels festgestellt werden. Deshalb zeigen auch Keratinozyten der übrigen epidermalen Schichten eine schwache und diffuse Integrinexpression. Weder HaCaT-Keratinozyten noch HDFa-Fibroblasten induzierten ihre Integrinexpression nach Verwundung.

$\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression 48 h nach Verwundung und Bestrahlung (5 Gy)

Die organotypische Epidermis ist diffus $\alpha 2\beta 1$ -positiv. Der Vergleich mit dem Kontrollpräparat lässt eine deutliche induzierte $\alpha 2\beta 1$ -Expression epidermaler HaCaT-Zellen und HDFa-Fibroblasten erkennen.

4.3.9 Endoglin (CD105)

Der Endoglin-Antikörper, Klon SN6h (DAKO, Nr. M 3527) weist das humane Glykoprotein Endoglin nach. Es ist ein TGF β -Rezeptor-Komplex assoziiertes Protein und wird in dermalen Fibroblasten der Haut und vermehrt in proliferierenden Zellen exprimiert [31].

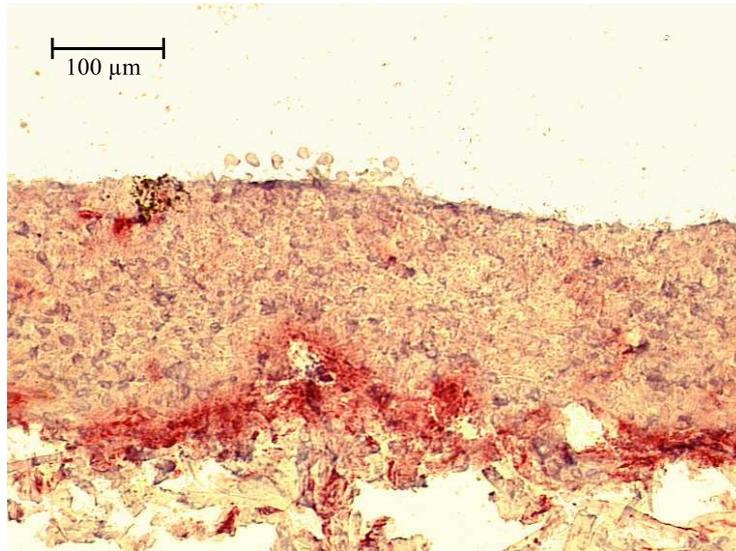


Abbildung 4.20: Die rekonstruierte Epidermis zeigt v. a. in basalen und suprabasalen Lagen Endoglin-positive HaCaT-Zellen.

4.3.9.1 Endoglin-Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent

Im Hautmodell sind Fibroblasten und vermutlich vor allem proliferierende basale und suprabasale Keratinozyten Endoglin-positiv. Einzelne Endoglin exprimierende Zellen sind fokal in suprabasalen und zum Teil auch in abgeplatteten Schichten sichtbar (Abb. 4.20).

4.3.9.2 Endoglinexpression nach Strahlenexposition

Nachdem das Hautäquivalent bei einer Bestrahlung von 2,5 Gy keine Stimulierung der Expression zeigte, war nach 5 Gy in dorsalen, epidermalen Schichten die Proteinsynthese deutlich induziert (Abb. 4.21). In abgeplatteten und verhornten Zellschichten und zum Teil in der Basalschicht war eine Akzentuierung der Endoglinexpression festzustellen.

Auch HDFa-Fibroblasten erhöhten deutlich ihre Endoglin-Produktion.

4.3.9.3 Endoglinexpression nach Verwundung

In zwei Versuchen konnte 48 h nach Verwundung nur einmal eine mittlere Induzierung der Endoglinexpression in basale und suprabasale Zellen der Wunde und der unverwundeten Epidermis gezeigt werden. Die Anzahl der positiven HaCaT-Keratinozyten war, im Vergleich zum normalen rekonstruierten Gewebe, in höheren Lagen der Epidermis reduziert (Abb. 4.22).

7 Tage nach Verwundung entsprach das Färbemuster dem des normalen organotypischen Gewebes. Eine erhöhte Endoglin-Synthese war nicht mehr nachzuweisen.

Fibroblasten zeigen sowohl 48 h als auch 7 Tage nach Verwundung keine erhöhte Endoglinexpression.

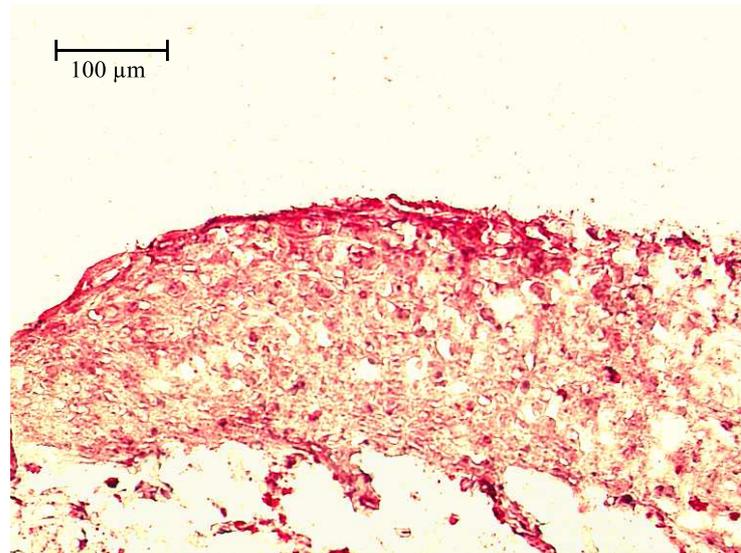


Abbildung 4.21: 48 h nach Strahlenexposition von 5 Gy induzieren dorsale, epidermale Schichten deutlich ihre Endoglinexpression.

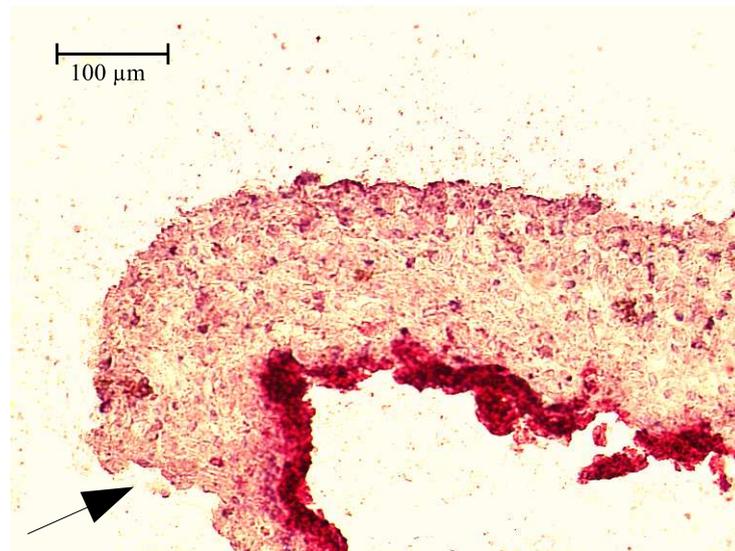


Abbildung 4.22: 48 h nach Verwundung zeigten basale und untere suprabasale Zellen der Wunde und des unverwundeten Gewebes eine mittlere Induzierung der Endoglinexpression.

Endoglinexpression 48 h nach Verwundung und Bestrahlung Das Endoglin-Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent entsprach dem nach solitärer Bestrahlung von 5 Gy.

4.4 ELISA

In den Abb. 4.23 und Abb. 4.24 ist die zeitliche Entwicklung der Konzentration von TGF β 1 bzw. KGF im Mediumüberstand verschiedener Hautmodelle gegen die Zeit aufgetragen. Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

Nach der Untersuchung bei 96 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Hautmodelle ‘Kontrolle’, ‘Verwundet’, ‘Verwundet 192 h’ und ‘Bestrahlt (5 Gy)’ (s. Bezeichnungen in den Abbildungen) beider Versuchsreihen wurden für weitere vier Tage kultiviert und nach 192 h abschließend untersucht.

Zu den Punkten ohne Fehlergrenzen im Graphen lagen keine Fehlerinformationen der einzelnen Messwerte vor.

4.4.1 KGF-ELISA

Im verwendeten FAD-Kulturmedium konnte kein KGF nachgewiesen werden.

Die höchsten KGF-Protein-Konzentrationen wies der Mediumüberstand des unbestrahlten und unverwundeten Kontrollmodells auf. Nach 96 h erreicht der KGF-Spiegel des Kontrollmodells seinen Maximalwert und ist am Untersuchungszeitpunkt 192 h (77% des Maximalwerts) ungefähr wieder auf die KGF-Konzentration bei 48 h (66% des Maximalwerts) abgesunken.

Bestrahlte und verwundete Modelle enthielten zu allen Untersuchungszeiten, mit Ausnahme von 192 h, ein ca. um den Faktor 2 erniedrigten KGF-Gehalt des Kontrollmodells. Im Überstand des Hautmodells ‘Verwundet und bestrahlt (5 Gy)’ war KGF ca. um den Faktor 3 im Vergleich zum Kontrollmodell erniedrigt. Die Proteinkonzentration nach 192 h des verwundeten und des bestrahlten Modells (5 Gy) waren im Vergleich zu den bei 96 h gemessenen KGF-Konzentrationen im wesentlichen unverändert. Dagegen wies der Überstand des Kontrollmodells eine deutlich niedrigere KGF-Konzentration auf, wie in Abb. 4.23 zu sehen ist.

4.4.2 TGF β 1-ELISA

Im nicht kultivierten FAD-Kulturmedium waren 30 pg/ml TGF β 1-Protein vorhanden. Die TGF β 1-Proteinkonzentrationen des Mediumüberstands verschiedener Hautmodelle wurden mit dem zeitlich entsprechenden TGF β 1-Wert des Kulturmediums ins Verhältnis gesetzt. Dies geschah um zu beobachten, ob eine Produktion oder ein Verbrauch des Wachstumsfaktors stattgefunden hat. Ein im Überstand gegenüber dem im Kulturmedium reduzierter TGF β 1-Gehalt wurde als Verbrauch gewertet. Entsprechend wurde eine im Mediumüberstand erhöhte TGF β 1-Konzentration als Eigenproduktion des Hautmodells gewertet.

Im Vergleich zum TGF β 1-Gehalt im FAD-Kulturmedium, wies ausschließlich der Mediumüberstand des mit 5 Gy bestrahlten Hautmodells nach 48 h tendenziell höhere

und bei 96 h bzw. 192 h annähernd gleiche Proteinkonzentrationen auf. Dabei sind allerdings die großen Fehlergrenzen zu beachten.

Alle Überstände der anderen Modelle zeigen zum Untersuchungszeitpunkt 48 h stark erniedrigte und im weiteren Zeitverlauf gegen Null absinkende TGF β 1-Werte.

Am Untersuchungszeitpunkt 48 h war der höchste Verbrauch an TGF β 1 (99%) im verwundeten und bestrahlten (5 Gy) Hautmodell (blaue Kurve) festzustellen, gefolgt vom Kontrollmodell (96%, rote Kurve). Im Verlauf der weiteren Tage sank der Proteinspiegel im Kontrollmodell gegen Null, der prozentuale Faktorenverbrauch blieb weitestgehend konstant.

Solitär verwundete Modelle weisen höhere TGF β 1-Konzentrationen auf. Zum Untersuchungszeitpunkt 48 h enthalten die verwundeten Hautmodelle (grüne und orangefarbene Kurve) durchschnittlich 44% der entsprechenden Proteinkonzentration im Kulturmedium. Die jeweiligen Mittelwerte der TGF β 1-Konzentration der beiden Modelle sind allerdings deutlich voneinander abweichend. Zu beachten ist aber, dass sich die Fehlergrenzen der Messwerte beider Modelle überschneiden.

Im weiteren Untersuchungsverlauf bei 96 h und 192 h sinkt der TGF β 1-Gehalt des verwundeten Hautmodells zunächst auf 13% des Gehalts des Kulturmediums ab, am Endzeitpunkt der Messung kann TGF β 1 nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.24).

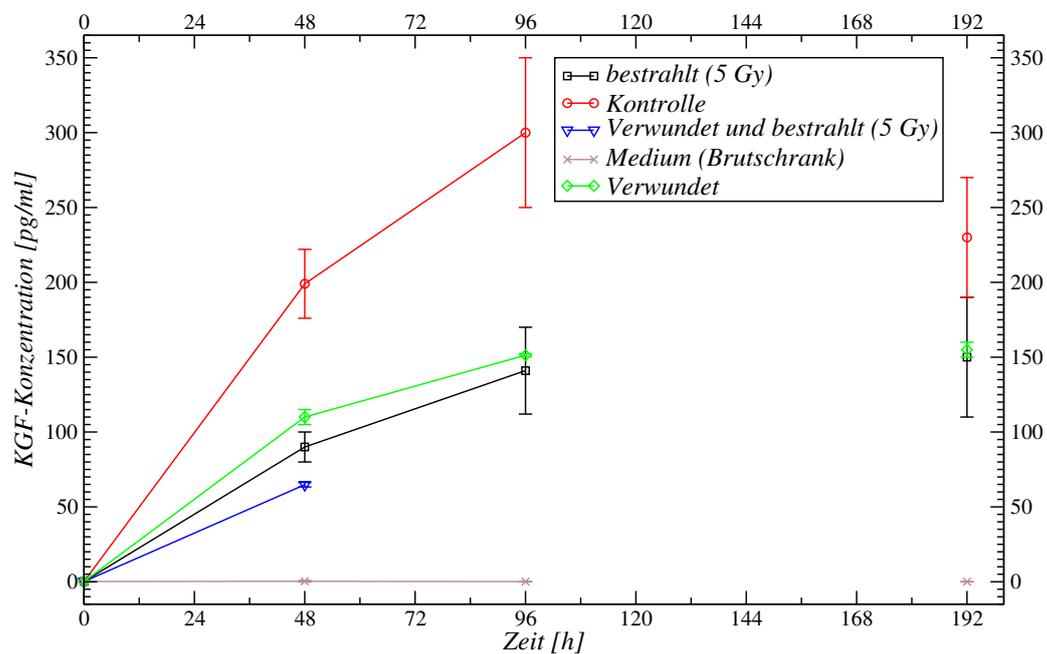


Abbildung 4.23: KGF-Proteinkonzentrationen im Mediumüberstand der Hautmodelle.

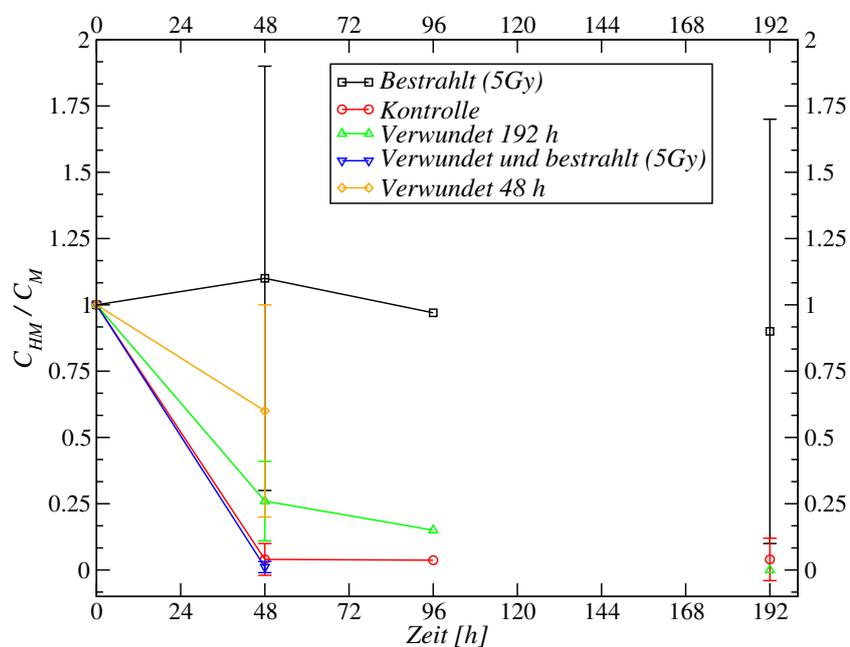


Abbildung 4.24: Verhältnis der TGF β 1-Konzentrationen im Mediumüberstand der Hautmodelle bezogen auf das Kulturmedium.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien HaCaT und HDFa

Die Studien der Proliferationskinetik dokumentieren anhand von Wachstumskurven die zeitabhängige Entwicklung der Zellzahl einer Zellkolonie nach unterschiedlicher Strahlenexposition. Strahleninduzierte Zellschäden, welche in Abschnitt 2.1.4 genauer beschrieben sind, bedingen nicht nur eine zeitlich begrenzte Proliferationshemmung, sondern können auch einen Verlust der Teilungsfähigkeit durch terminale Differenzierung, Apoptose oder den mitotischen Zelltod hervorrufen [30]. Allerdings sind Zellen fähig, subletale Strahlenschäden zu reparieren (vgl. [112] und Abschnitt 2.1.4). Diese Zellen können nach der Reparatur und der Umverteilung im Zellzyklus erneut proliferieren.

In den ersten 24 h verhält sich der Zellverlust von HaCaT-Keratinocyten proportional zur steigenden Strahlendosis. Erst ab einer Strahlendosis von 5 Gy zeigten die HaCaT-Keratinocyten einen signifikanten Zellverlust von ca. 13% (19% bei 7 Gy). Bei HDFa-Fibroblasten kann während der ersten 24 h kein direkter Zusammenhang zwischen Zellverlust und Strahlendosis festgestellt werden. Zudem sinkt die Zellzahl von unbestrahlten Zellen ebenfalls um 10% gegenüber der eingesäten Zellzahl ab.

Signifikante Zellverluste zeigen die Wachstumskurven 1 Gy, 3 Gy und 5 Gy, dies kann als ein Indiz für eine höhere Strahlensensitivität der HDFa-Zellen im niedrigen Dosisbereich gewertet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass aus Gründen, welche einleitend genannt wurden, die Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen und ihre maximale Populationsgröße mit zunehmender Strahlendosis abnimmt und Zellabsterbeprozesse tendenziell zunehmen. Das bedeutet, dass bestrahlte Zellen vor ihrem exponentiellen Wachstum eine geringere Zahl proliferationsfähiger Zellen aufweisen, und nach der exponentiellen Wachstumsphase die Populationsgröße rapider abnimmt als bei einer nicht-manipulierten Population. Das bestätigen verschiedene Kurvenparameter: die verminderte Proliferationsfähigkeit kann an der zunehmenden Abflachung der Geradensteigung und der daraus resultierenden verlängerten Zellverdopplungszeit beobachtet werden. In diesem Punkt unterscheiden sich die HaCaT-Zellen von den HDFa-Fibroblasten

deutlich. Während sich bei den Keratinozyten eine bemerkenswerte Verlängerung von t_2 erst nach einer Bestrahlung von 5 Gy einstellt, sind HDFa-Zellen strahlenempfindlicher. Im Vergleich zu unbestrahlten HDFa-Fibroblasten hat sich t_2 schon bei einer Strahlendosis von 3 Gy verdoppelt.

Im Gegensatz zu HaCaT-Zellen, welche ihre exponentielle Wachstumsphase ab einer Strahlendosis von 3 Gy um 24 h verkürzen, ist diese bei gleicher Strahlenexposition von HDFa-Zellen um 24 h verlängert. Jedoch zeigen HaCaT-Zellen bei Strahlendosen von 1 Gy und 3 Gy nach ihrer ersten Wachstumsphase ein zweites exponentielles Wachstum, mit geringerer Steigung (also geringerer Wachstumsgeschwindigkeit). Die Reparatur subletaler Strahlenschäden könnte das verlängerte exponentielle Wachstum der HDFa-Zellen und die zweite exponentielle Proliferationsphase der HaCaT-Zellen im niedrigen Dosisbereich bis 120 h p.r. erklären. Zudem sind geringere Zelldichten nach Bestrahlung und die damit verminderte Nährstofferschöpfung und Anhäufung von Stoffwechselprodukten ebenfalls für das Zellwachstum förderlich. Eventuell regen niedrigere Strahlendosen von 1 Gy und 3 Gy die Zellvermehrung der HaCaT-Zellen sogar an.

Höhere Strahlendosen (5 Gy und 7 Gy) bedingen vermutlich vermehrt den Mitosetod der Zellen, welcher die Aufrechterhaltung des exponentiellen Wachstums unmöglich macht. Aus wahrscheinlich denselben Gründen setzt in HaCaT-Kurven (mit größer werdenden Strahlendosen) das Absinken der Zellzahlen nach der Verzögerungsphase im Mittel 24 h eher ein. Die HDFa-Kurven fallen bereits nach 1 Gy und 3 Gy sehr stark ab. Daraus kann geschlossen werden, dass Bestrahlung dosisabhängig die Lebenszeit der HaCaT-Zellen verkürzt, und dass das Verhalten der HDFa-Zellen für eine höhere Strahlenempfindlichkeit im niedrigen Dosisbereich spricht.

Das Wachstumsverhalten der mit 7 Gy bestrahlten HDFa-Zellkultur weicht von dem der anderen Kulturen (0 Gy bis 5 Gy) ab, wie die 7 Gy-Kurve zeigt. Die anfängliche Zellabnahme ist zwar geringer als bei allen anderen bestrahlten Zellen, allerdings hält sie bis 48 h p.r. an. Im weiteren Verlauf überwiegen die Zellabsterbeprozesse die vorhandene Proliferations- und Reparaturfähigkeit in einem Maße, dass ein exponentielles Wachstum nicht mehr stattfinden kann.

Die HDFa-Zellen scheinen im höheren Dosisbereich (7 Gy) während der ersten 24 h weniger empfindlich zu sein, als im niedrigeren (geringere Absterberate, aber längere Phase der Proliferationshemmung). Gleichzeitig ist aber, wie oben beschrieben, im weiteren Verlauf die Proliferations- und Reparaturfähigkeit herabgesetzt und ein exponentielles Wachstum findet nicht mehr statt. Dieser Widerspruch würde ein sehr ungewöhnliches Verhalten der Zellen bedeuten. Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass hier, trotz mehrfacher Wiederholung des Versuchs, ein einmaliger, nicht erkannter systematischer Fehler der Messung vorliegt und der Messwert bei 24 h mit Vorbehalt zu bewerten ist.

5.2 Organotypische Co-Kulturen

Die Entwicklung und Erhaltung eines rekonstruierten, kutanen Gewebes mit der Fähigkeit zur regulären, epidermalen Differenzierung und einer normalen Morphologie ist die Zielsetzung bei der Herstellung von organotypischen Hautäquivalenten. Wie in Kapitel 1 ausführlicher besprochen, bedeutet ein gut ausdifferenziertes Hautäquivalent mit humanen Zellen für die strahlenbiologische Grundlagenforschung eine große Annäherung an die Verhältnisse der *in vivo*-Situation.

Bisher war das am häufigsten verwendete *in vitro*-Modell in der radiobiologischen Forschung die Monolayerkultur. Diese geben vor allem Aufschluß über die Reaktion kolonogener Zellen auf zytotoxische Insulte und Dosiswirkungsbeziehungen, man erhält aber keine Informationen über das Zellverhalten innerhalb eines Verbandes [19]. Dreidimensionale, organotypische Co-Kulturen gewährleisten einen mehrschichtigen, epidermalen Zellverband in Verbindung mit einer dermisähnlichen Matrix, welche Fibroblasten enthält. Dennoch reproduzieren experimentelle Hautmodelle das Verhalten normaler, verwundeter und/oder bestrahlter humaner Haut stets nur in gewisser Annäherung. Es fehlt das Blutgefäßsystem sowie andere kutane Zellarten. Der humanen Situation am nächsten kommen Xenotransplantationen. Der bewusste Verzicht auf die *in vivo*-Komplexität dient jedoch der besseren Überschaubarkeit eines Systems, der konkreten Kontrolle von Wachstums- und Behandlungsbedingungen und bietet die Möglichkeit der quantitativen Evaluierung zellulärer Reaktionen und Wirkungen [19].

Im Gegensatz zu anderen Modellen werden zur Konstruktion des für diese Arbeit verwendeten Hautäquivalents ausschließlich humane Zelllinien angewendet, um eine höhere Reproduzierbarkeit des Hautäquivalents zu erhalten und von Spendern unabhängig zu sein. Desweiteren können dadurch die bekannten interindividuellen Reaktionsunterschiede auf ionisierende Strahlung vermieden werden. Die Abwesenheit des Nerven- und Blutgefäßsystems, sowie anderer Zellarten der Haut (Melanozyten, Langerhanszellen) ermöglicht die fokussierte Untersuchung der drei Hauptkomponenten der kutanen Haut: Keratinozyten, Fibroblasten und der Matrix, sowie deren Wechselwirkungen.

Dadurch kann ein umfassenderes Verständnis physiologischer zellulärer Interaktionen, Funktionen und Wechselwirkungen dieser Hauptkomponenten und deren pathophysiologischer Hautreaktionen nach Verwundung und Bestrahlung erworben werden. Die molekulare Charakterisierung humaner Wunden vor und nach Bestrahlung, beispielsweise die verschiedenen Faktorenexpressionen, sind für das Verständnis zur Entstehung von Wundheilungsstörungen nach Strahlenexposition grundlegend. Daraus können neue Ansätze zur Vermeidung und Therapie von Wundheilungsstörungen bei Radiotherapie von Krebspatienten entwickelt werden [154].

5.2.1 Methodische Aspekte bei Züchtung des Hautäquivalents

Ausgehend von der Technik von Smola, Fusenig und Kehe zur Herstellung einer organotypischen Co-Kultur wurde dieses Hautäquivalent teilweise modifiziert und entsprechend angepasst.

Im Gegensatz zu Smola und Kehe wurde dem FAD-Medium 5 ml Penicillin-Streptomycin-Suspension als Schutz vor Infektionen zugegeben. Eine nachteilige Wirkung konnte

nicht festgestellt werden. Weiterhin wurde ein vorgefertigter Kollagenschwamm verwendet, bestehend aus einer bovinen Kollagenmischung vom Typ I und Typ IV mit durchgehenden Matrixporen. Smola und Kehe stellen Kollagengele vom Typ I aus Rattenschwanzsehnen her. Die vorgefertigte Kollagenmatrix erleichterte die Züchtung von artifiziellen Geweben durch Reduzierung der Arbeitsschritte und Verminderung der Kontaminierungsgefahr. Die Matrixporen erwiesen sich jedoch als nachteilig, da einerseits vermutlich weniger Fibroblasten in die Matrix einwanderten und andererseits basale Keratinozyten in diese Poren abtropften. Das von Smola verwendete Zellverhältnis (Keratinozyten zu Fibroblasten pro cm^2) wurde von 5:1 auf 2:1 zugunsten der HDFa-Fibroblasten verändert. Damit konnte eine verbesserte Ausdifferenzierung erreicht werden.

Die Kultivierung des Modells wurde ausschließlich an der Luft-Medium-Grenze durchgeführt. Abweichend vom ursprünglichen Protokoll wurde die Kollagenmatrix mit eingesäten Fibroblasten für sieben Tage kultiviert, bevor die HaCaT-Zellen zugegeben wurden (statt einer 24-stündigen, subkonfluenten Kultivierung). Damit sollte den Fibroblasten Zeit zur Adaption, Migration und Besiedlung der Kollagenmatrix gegeben werden. Gleichzeitig konnte dadurch die epidermale Morphogenese und Differenzierung verbessert werden.

Die Einsatzkörbe der verwendeten Deep-Well-Platte (Fa. Becton Dickinson, Deutschland), in denen sich das Hautmodell befand, waren so konzipiert, dass die regelmäßigen Mediumwechsel an zwei Seiten des Korbes leicht durchzuführen waren. Zudem verhinderte der Einsatzkorb das versehentliche Berühren des Gewebes mit der Pipette und verringerte dadurch die Kontaminationsgefahr. Die standardisierte Zugabe von 11 ml Nährmedium umschloss die untere Hälfte der Kollagenmatrix. Damit war die Ernährung des Epithels, entsprechend der *in vivo*-Situation, ausschließlich von seiner Unterseite und per Diffusion garantiert. Aus Erfahrung mit minderwertiger Epithelausbildung bei Temperatur-, Luftfeuchtigkeits- und CO_2 -Schwankungen wurde die Anzüchtung des Epithel nur dann vorgenommen, wenn die anderweitige Nutzung des Brutschanks die konstanten Kulturbedingungen nicht beeinträchtigte.

5.2.2 Morphologie und Proliferationskinetik der rekonstituierten Epidermis

Die Ausbildung einer beinahe morphologisch korrekten und differenzierten Epidermis konnte in unserem Hautäquivalent frühestens nach einer vierwöchigen Kultivierungsdauer der HaCaT-Zellen erreicht werden. Die Verzögerung von ein bis zwei Wochen bis zur Ausbildung der normalen Gewebearchitektur ist konsistent mit Studienergebnissen von Schoop [137] von organotypischen HaCaT-Co-Kulturen mit entsprechender Fibroblastenanzahl und von HaCaT-Transplantaten auf Nacktmäusen [18]. Schoop konnte in Experimenten mit der doppelten Fibroblastenzahl die Ausbildung einer normalen Gewebearchitektur um eine Woche verkürzen. Dennoch ist die Gewebeorganisation von HaCaT-Zellen auch bei optimierter Fibroblastenzahl verzögert und unvollständig, verglichen mit normalen Keratinozyten [139]. Das könnte eine reduzierte Sensibilität der HaCaT-Zellen gegenüber differenzierungsspezifischen Faktoren und Entwicklungssignalen zeigen [18].

Im Vergleich zu Kulturen normaler Keratinozyten waren die Interzellularspalten verbreitert, vermutlich aufgrund einer reduzierten Desmosomenbildung zur Matrix und zu benachbarten Zellen. Das könnte auch der Grund für die unregelmäßige Anordnung der HaCaT-Zellen im Str. basale und die kaum vorhandenen stachelförmigen Ausläufer der Keratinozyten im Str. spinosum sein.

Ebenso war die Anzahl der Keratohyalingranula im Str. granulosum vermindert und die Degradation der Hornzellen unvollständig. Schoop vermutet, dass die verwendeten immortalen HaCaT-Zellen, im Vergleich zu normalen humanen Keratinozyten, Veränderungen im morphogenetischen Potential aufweisen [137].

Problematisch war die wiederholt auftretende strukturelle Auflösung der Kollagenmatrix nach Ablauf der 5. Kultivierungswoche. Die Selbstverdauung des Kollagenkissens war in den Bereichen beschleunigt, welche von rekonstruierter Epidermis bedeckt waren. Es handelt sich hierbei vermutlich um epitheliale und mesenchymale Kollagenasen, welche die α -Kette des fibrillären Kollagens spalten. Die sogenannten Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind wahrscheinlich *in vivo* bei ihrer natürlichen Modellierung in ein homöostatisches Gleichgewicht der extrazellulären Matrix eingebunden. Dem *in vitro*-Modell fehlen wohl die für die Inhibitionsmechanismen verantwortlichen Faktoren, beispielsweise Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP) und TGF β 1, die Gegenspieler der MMP. In allen durchgeführten Experimenten konnte TGF β 1-Protein immunhistologisch im Hautäquivalent nicht nachgewiesen werden. Eventuell könnte ein Zusammenhang zwischen dem Kollagenabbau und der fehlenden TGF β 1-Expression in der Co-Kultur bestehen [19]. Auflösungserscheinungen der Matrix konnten in früheren Versuchen mit dünneren Kollagenschwämmen nicht beobachtet werden. Fibroblasten sind, im Vergleich zu anderen Hautzellen, die Hauptquelle von TGF β 1 [116]. Vermutlich war die HDFa-Anzahl in der dickeren Kollagenmatrix nicht ausreichend, um genügend matrixstabilisierendes TGF β 1 zu produzieren.

Neben der regelmäßigen Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels variierte die Ausdifferenzierung von Keratinozyten in höheren Zelllagen der unterschiedlichen Hautäquivalente. Die Reproduzierbarkeit einer vollständig ausdifferenzierten Epidermismorphologie lag bei etwa 35%. In mangelhaft differenzierten Modellen setzten nach ca. vierwöchiger Kultivierungsperiode der HaCaT-Keratinozyten strukturelle Auflösungsvorgänge in der rekonstruierten Epidermis ein. Die sich aus den Epidermis- und Matrix-Auflösungen ergebenden Probleme beim Schneiden des noch auswertbaren rekonstruierten Gewebes, konnten nur über eine höhere Schnittdicke zwischen 7 und 12 μ m bewältigt werden. Die Ursachen für diese morphologische Alterung in der Epidermis sind noch nicht bekannt. Sie traten ebenfalls gehäuft nach Veränderung der Herstellung und Zusammensetzung der vorgefertigten Kollagenschwämme auf. Möglicherweise könnte noch vorhandenes Ethylenoxid im Kollagenschwamm eine Schädigung der Zellen bewirken. Untersuchungen konnten gentoxische Wirkungen von Ethylenoxid auf Keim- und somatische Zellen nachweisen. Ethylenoxid wird perkutan absorbiert, vor allem bei verschlossener Oberfläche. Ethylenoxid alkyliert viele organische Substanzen im menschlichen Körper und wirkt dadurch toxisch [161, 89].

Wie schon in Abschnitt 2.3 und Abschnitt 2.5 genauer beschreiben, könnte die unnatürliche Zusammensetzung der Matrix, vor allem das Fehlen von Heparansulfat, veränderte Speicherfähigkeiten von WF (z.B. FGF, latentes TGF β) verursachen und

die Erhaltung des epithelialen Gewebes und der Matrix ebenfalls negativ beeinflussen. Höchstwahrscheinlich tragen auch suboptimale Kulturbedingungen zur verfrühten Involution des Modells bei. Eine Optimierung der Kulturbedingungen könnte die Perfusionsskammer darstellen, denn die ständige Erneuerung des Mediums ermöglicht die kontinuierliche Zufuhr von Nährstoffen [19].

Ferner könnte die geeignete Zugabe von Lipiden, Ceramiden, Vitamin D, verschiedenen Zytokinen [132] und anderen Hautzellen [19], sowie die Erhöhung der Fibroblastenzahl die Ausdifferenzierung des epidermalen Gewebes in Co-Kulturen weiter fördern und Alterungsprozesse im Epithel verzögern bzw. verhindern [19].

5.2.3 Anmerkungen zur Methodik der immunhistochemischen Färbemethode APAAP

Die spezifische Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ist der Grund für einen präziseren Nachweis mit immunchemischen Färbemethoden im Vergleich zu gewöhnlichen histochemischen Techniken [108]. Die APAAP-Methode zeichnet sich durch die hohe Haltbarkeit fotogener Präparate aus. Im Vergleich zu direkten und indirekten Immunperoxidase-Färbemethoden ist die Empfindlichkeit bei exakter Durchführung der Technik bedeutend höher [35]. Monoklonale Antikörper sind immunchemisch identisch und reagieren nur mit einem spezifischen Antigen. Dennoch variiert die Affinität von monoklonalen Antikörpern verschiedener Firmen.

Jedes immunhistochemische Protokoll muss auf das untersuchte Probenmaterial angepasst werden, denn eine Vielzahl von Einflussgrößen kann das Färbeergebnis beeinflussen. Das Mitführen von Negativkontrollen kann die Frage nach dem Vorhandensein des Antigens im histologischen Schnitt eindeutig beantworten. In Gefrierschnitten sind Oberflächenantigene noch lokalisierbar, während sie durch andere Fixationsmethoden, beispielsweise Paraffineinbettung, zum Großteil zerstört werden. Deshalb sind Gefrierschnitte Präparate der Wahl für die histologische Auswertung. Allerdings kann die unvollständige Konservierung störende Veränderungen morphologischer Details verursachen. In längerdauernden immunchemischen Färbeverfahren zeigen die Präparate oft Chromatolyse und Verlust von Zellmembranen [108]. Da die Durchführung der APAAP-Färbung maximal fünf Stunden beanspruchte, war dieser Nachteil von untergeordneter Bedeutung.

Aufgrund der Erfahrung mit der nicht zufriedenstellenden Erhaltung der morphologischen, epidermalen Strukturen wurde das zu konservierende Gewebe zunächst bei minus 20 °C tiefgefroren und später bei minus 70 °C gelagert. Desweiteren wurden die Objektträger mit Kryostatschnitten nach Probefärbungen nicht nur bei Raumtemperatur, sondern generell über Nacht auf einer Heizplatte bei 37 °C luftgetrocknet. Damit konnte das Abschwimmen der Präparate vom Objektträger während des Färbeprozesses verhindert werden.

Neben der Fixierung des Gewebes und der Antikörperkonzentration, beeinflusst die Temperatur die Antikörperreaktionszeit [108]. Um eine verbesserte Antigenbindung zu erreichen, wurde die Inkubation nach Zugabe des Primärantikörpers nicht bei Raumtemperatur sondern im Brutschrank bei 37 °C durchgeführt. Zur Vermeidung störender Kristallbildungen in Schnittpräparaten sind später alle PBS-Anwendungen im APAAP-

Färbeprotokoll durch Aqua dest. ersetzt worden.

5.3 Antigenstudien am dreidimensionalen Hautäquivalent

5.3.1 Panzytokeratin

Die Lokalisation der Zytokeratinexpression in basalen, suprabasalen und verhornten Schichten der organotypischen Epidermis unseres HMs stimmt mit der der humanen Haut überein. Abweichend davon traten zusätzliche positive Farbreaktionen in dorsalen, suprabasalen Schichten und abgeplatteten Lagen auf, sie sind ein Hinweis auf eine atypisch induzierte Keratinexpression. Wie in Abschnitt 2.15.2 genauer beschrieben, ergaben auch Zytokeratinanalysen anderer Arbeitsgruppen an organotypischen Co-Kulturen mit HaCaT-Keratinocyten abweichende Ergebnisse im Vergleich zur natürlichen Epidermis. Als mögliche Gründe werden die regenerative Stimulierung suprabasaler Keratinocyten [142] angeführt oder suboptimale Wachstumsbedingungen [115], welche zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt in einen anomalen Differenzierungsprozess führen [15]. Boelsma vermutet eine anomale Kontrolle der Genexpression von terminalen Differenzierungsproteinen in HaCaT-Zellen. Dieser Mangel kann weder durch verschiedene Nährmedien, noch mit veränderten Kulturbedingungen aufgehoben werden [15].

5.3.2 Der Proliferationsmarker Ki-67

Das Expressionsmuster von Ki-67 in der rekonstruierten Epidermis stimmt weitgehend mit der *in vivo*-Situation überein und zeigt eine reguläre Proliferationslokalisation in basalen und unteren suprabasalen Lagen. Das Färbemuster zeigt, dass das Ziel einer physiologischen Lokalisation der Keratinocytenproliferation in diesem Hautäquivalent nach vierwöchiger Kultivierungszeit erreicht ist.

Da keine vergleichende Untersuchung an normaler humaner Haut durchgeführt wurde, kann anhand dieses Ergebnisses keine Aussage über den Proliferationsstatus basaler Zellen getroffen werden. Andere Arbeitsgruppen beobachten nach BrdU-Untersuchungen in organotypischen Co-Kulturen mit HaCaTs, welche auf einem Kollagengel Typ I mit eingebetteten, primären humanen Fibroblasten kultiviert wurden, regelmäßig ein hyperproliferatives Str. basale im Gegensatz zu Co-Kulturen mit normalen Keratinocyten [137]. Jedoch erfolgten, aufgrund einer schnelleren Ausdifferenzierung, die Proliferationsstudien in der Regel schon nach drei Kultivierungswochen. Dieser frühe Untersuchungszeitpunkt könnte die hyperproliferativen, basalen HaCaT-Zellen in diesen Co-Kulturen erklären.

5.3.3 β 1-Integrin (CD29)

Die Expression von β 1-Integrin in Fibroblasten, die membranständige Lokalisation in Keratinocyten und die starke, basale β 1-Produktion stimmen mit denen der humanen

Haut überein. Die wenig reduzierte β 1-Integrin-Reaktion in den übrigen epidermalen Schichten zeigt jedoch wiederum, dass die terminale Differenzierung suprabasaler HaCaT-Keratinocyten nur unzureichend induziert ist.

Nach der Bestrahlung mit 5 Gy war in den Gefrierschnitten eine signifikante Hochregulierung der β 1-Integrin-Expression in suprabasalen Keratinocyten feststellbar. Diese Untersuchungen konnten zum ersten Mal eine durch Bestrahlung induzierte β 1-Integrin-Produktion in einem dreidimensionalen Hautäquivalent belegen. Die Beobachtung sind übereinstimmend mit anderen immunhistochemischen Untersuchungen von normaler humaner Haut nach 48 h und gleicher Strahlendosis [101, 100]. Während die humane Epidermis eine Intensivierung der Färbung bis einschließlich des Str. spinosums zeigt, sind im Hautmodell vor allem auch obere suprabasale, abgeplattete und verhornte Schichten der Epidermis intensiviert. Die Farblokalisation weicht wie im unbestrahlten, epidermalen Gewebe von der *in vivo*-Situation ab, vermutlich aus den zuvor genannten Gründen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die stimulierte β 1-Expression auf Keratinocyten im rekonstruierten Epithel entscheidend zur Vermittlung der strahlenbedingten kutanen Entzündungsreaktion beiträgt [98]. Wie in Abschnitt 2.14 ausführlicher beschrieben, sind Integrine bei der Übertragung biophysikalischer Signale (Röntgenstrahlung) zur Plasmamembran grundlegende Regulatoren der Signaltransduktion und Zellfunktion [26]. Die Ligandenbindung (outside-in signalling) kann zum Beispiel die Zellapoptose suppremierem. In diesem Zusammenhang könnte die Stimulierung der β 1-Expression nach Bestrahlung eine Art Selbstschutzreaktion der Zellen darstellen [98].

5.3.4 ICAM-1 (CD54)

Im Gegensatz zur humanen Haut, wird ICAM-1 in der rekonstruierten Epidermis und von HDFa-Fibroblasten produziert. Auch mittels FACScan-Untersuchungen konnte im HDFa-Monolayer eine Grundfluoreszenzintensität von ICAM-1 nachgewiesen werden [101]. Vermutlich regen nicht-optimale Kulturbedingungen die Zellen zur ICAM-1 Expression an.

Die Strahlenexposition von 5 Gy bedingte in allen Fällen eine Induktion der ICAM-1-Expression in der rekonstruierten Epidermis, mit Akzentuierung in dorsalen Lagen und teilweise auch in dermalen Fibroblasten. Die epidermale ICAM-1-Induktion ist konsistent mit APAAP-Untersuchungen von Spalthautproben 48 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy in [10, 101]. Eine erhöhte ICAM-1-Immunreaktivität von dermalen Fibroblasten in Spalthautproben wurde dort jedoch nicht beschrieben. Die Untersuchungen 7/8 Tage nach Bestrahlung von 2,5 Gy und 5 Gy scheinen die These einer dosisabhängigen Induzierung der ICAM-1-Expression [101] zu bestätigen. Nur bei einer Strahlendosis von 5 Gy konnte eine signifikant induzierte ICAM-1-Immunreaktivität nachgewiesen werden.

In zwei Versuchen, bei denen das HM solitär verwundet wurde, ist jeweils die ICAM-1-Färbung nach 48 h und nach 7 Tagen untersucht worden. Dabei ist eine deutliche Intensivierung der ICAM-1-Färbung nach 48 h sowie ein Rückgang der Färbungsintensität auf das Niveau des Kontrollpräparats nach 7 Tagen beobachtet worden, allerdings nur in einem der beiden Ansätze. Das entspricht den Ergebnissen von Untersuchungen

an transplantierte, menschlicher Haut auf Mäusen [97]. Vermutlich war aufgrund der schlechter ausdifferenzierten Epidermis im zweiten Versuch dort dieser Verlauf nicht mehr nachvollziehbar.

Abweichend von der natürlichen ICAM-1-Expression, zeigen HaCaT-Zellen und HDFa-Zellen der Co-Kultur auch 7 Tage nach Verwundung eine diffuse ICAM-1-Expression, wahrscheinlich ebenfalls bedingt durch nicht optimale Kulturbedingungen. Während der Wundheilung veränderten die HDFa-Fibroblasten, entsprechend humaner Fibroblasten nach Verwundung, ihre ICAM-1 Expression nicht [97].

Für ICAM-1, als zelltypspezifischer Mediator, stehen zelluläre Interaktionen während der Immunantwort und bei Entzündungsvorgängen im Vordergrund. ICAM-1 vermittelt auch Leukozytenkontakte zu zahlreichen kutanen Zellarten [33]. Wie unter Abschnitt 2.13.3 ausführlich beschrieben, belegen Studien von Hallahan [63] die notwendige Anwesenheit von ICAM-1 als Voraussetzung für das Auswandern der Leukozyten in verletzte bzw. entzündete Regionen. Diese Infiltration von Leukozyten bedingt eine funktionelle Organstörung [123]. Andererseits kann durch Zugabe von mit Antikörpern gegen zelluläre Adhäsionsmoleküle die Leukozytenansammlung im Gewebe verhindert und Gewebeschäden signifikant vermindert werden [61, 104].

Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche am Hautmodell (s. Abschnitt 4.3.4.2) implizieren die dosisabhängige Induzierung der ICAM-1-Expression. Dies kann zum Verständnis dieser pathophysiologischen Vorgänge beitragen und neue Therapiemöglichkeiten zur Vermeidung unerwünschter kutaner Strahlenreaktionen nach Radiotherapie erschließen.

5.3.5 TGF β 3

Die TGF β 3-Immunreaktivität unseres Hautäquivalents ist beinahe identisch mit der normalen kutanen Haut. Obwohl HDFa-Fibroblasten und alle epidermale Lagen TGF β 3 exprimierten, waren, anders als in der natürlichen Haut, auch verhornte Zellschichten der rekonstruierten Epidermis TGF β 3-positiv (s. Abschnitt 4.3.5.1). Dies könnte ebenfalls als Ausdruck eines verzögert differenzierten, parakeratotischen oder hyperplastischen Gewebes gewertet werden. Auch in gut organisierten und differenzierten HaCaT-Oberflächentransplantaten (21 Tage) auf Mäusen unterschied sich die TGF β 3-Färbung von der *in vivo*-Situation. TGF β 3 war ausschließlich in den oberen Lagen der Epidermis anzutreffen. Diese transplantierten HaCaT-Zellkulturen auf Kollagen Typ I wurden zum Untersuchungszeitpunkt ebenso als parakeratotisch und hyperplastisch beschrieben [55].

Nach Bestrahlung ist die TGF β 3-Immunreaktivität in HDFa-Fibroblasten im Gegensatz zu der in HaCaT-Keratinozyten deutlich erhöht. Das Ergebnis könnte auf eine höhere Strahlenempfindlichkeit der Fibroblasten hindeuten. Uns sind keine Veröffentlichungen zu kutaner TGF β 3-Proteinexpression im Untersuchungszeitraum von 2-8 Tagen und einer Strahlenexposition von 5 Gy bekannt. Untersuchungen von Rattendünndarmepithel konnten zwei Wochen nach lokaler Röntgenbestrahlung (12 Gy und 21 Gy) im regenerativen Epithel für TGF β 3 nur eine minimale Überexpression nachweisen [156]. Eventuell war eine einmalige Strahlendosis von 5 Gy zur Induktion der TGF β 3-Expression für HaCaT-Zellen nicht ausreichend oder der Untersuchungszeitpunkt zu

früh, um eine stimulierte Synthese feststellen zu können. Zudem besitzt die organotypische Epidermis kein Blutgefäßsystem, welches während der akuten Strahlenreaktion das Gewebe mit Entzündungszellen versorgt. Die Bestrahlung regt Entzündungszellen zur Produktion proinflammatorische Zytokine an, die ihrerseits die Produktion von TGF β fördern [66].

Nach Verwundung kann in Keratinozyten und Fibroblasten des Hautmodells keine Expressionssteigerung von TGF β 3 festgestellt werden. m-RNA-Untersuchung von akuten und chronischen Brandwunden der humanen Haut konnten eine hohe Immunoreaktivität von TGF β 3 nachweisen [111]. Da uns keine TGF β 3-Protein Untersuchungen bekannt sind, ist ein Vergleich mit der humanen Haut nicht möglich.

Nur nach kombinierter Verwundung und Bestrahlung zeigen neben den Fibroblasten auch die HaCaT-Zellen nach 48 h ein geringe Hochregulierung ihrer TGF β 3-Synthese. Dieses Ergebnis überrascht, da weder nach Verwundung, noch 7/8 Tage nach Bestrahlung eine Induzierung der TGF β 3-Expression in der Epidermis nachgewiesen werden konnte. Dieser Nachweis kann als Hinweis auf eine vorübergehende Induzierung interpretiert werden.

5.3.6 TGF β 1

In Gefrierschnitten des organotypischen Hautgewebe konnte TGF β 1 immunhistologisch, mit dem entsprechenden Antikörper (OncogeneTM, Art. Nr. GF06), nicht nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass Zytokine immunhistologisch schwer nachzuweisen sind. Ebenso weisen monoklonale Antikörper verschiedener Firmen das entsprechende Antigen unterschiedlich gut nach.

Zum Nachweis von TGF β 1 wurde mit einer Antikörperverdünnung von 1:50 gearbeitet. Bei dieser hohen Antikörperkonzentration kann jedoch davon ausgegangen werden, dass im Schnittgewebe zum Zeitpunkt der Färbung kein Antigen vorhanden war. Um eine endgültige Aussage machen zu können, ob das Hautmodell kein TGF β 1 produziert, sollten Antikörper anderer Firmen und weitere Proteinuntersuchungsmethoden (Western Blot, FACScan, ELISA von rekonstruiertem Gewebe etc.) durchgeführt werden.

5.3.7 α 5 β 1-Integrin (CD49e)

In epithelialen, humanen Hautzellen korreliert die abnehmende α 5-Integrin-Expression mit einer reduzierten Fibronektinhaftung und einer gesteigerten Involukrinexpression [2], welche Keratinozyten in oberen Schichten des Str. spinosums und im Str. granulosum zeigen. Dementsprechend zeigt das Hautmodell eine geringe α 5 β 1-Expression bis in suprabasale Lagen. Fokale Anfärbungen in abgeplatteten und verhornten Schichten deuten wiederum auf eine unvollkommene Ausdifferenzierung hin. Im rekonstruierten Hautmodell bewirken wohl von der *in vivo*-Situation abweichende Kultivierungsbedingungen die Aktivierung der suprabasalen HaCaT-Zellen und die daraus folgende Integrinexpression.

Wie schon in Abschnitt 2.14.2 beschrieben, werden Keratinozyten u. a. während der Wundheilung aktiviert und exprimieren α 5 β 1-Integrin [27]. Während die Stimulie-

rung, zum Zeitpunkt 48 h, besonders an den Wundrändern mit *in vivo*-Verhältnissen übereinstimmt [82, 6], zeigen aber auch alle epidermalen Schichten im unverletzten Gewebe des Hautmodells eine stark induzierte Integrinexpression. Der zusätzliche Reiz durch Verwundung könnte diese überschießende Integrinsynthese der schon zuvor (durch die Kulturbedingungen) aktivierten, normalen Keratinozyten eventuell begründen. Die hochregulierte Integrinexpression war, wie im humanen, verwundeten Plattenepithel, vorübergehend [82] und konnte am 7. Tag nicht mehr nachgewiesen werden. Im Hautäquivalent war noch eine schwache Farbreaktion in der Epidermis zu beobachten, mit Akzentuierung in abgeplatteten Schichten. Diese $\alpha 5\beta 1$ -Akzentuierung in abgeplatteten Zellschichten kann nicht erklärt werden.

Entsprechend dem natürlichen Verhalten humaner, dermaler Fibroblasten, welche nicht in die Wunde einwandern [27], zeigten die HDFa-Fibroblasten keine gesteigerte Integrinexpression.

5.3.8 $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (CD49b)

Das $\alpha 2\beta 1$ -Färbemuster im rekonstruierten Hautäquivalent stimmt beinahe vollständig mit dem der normalen humanen Haut überein. Abweichend davon zeigen auch verhornte Zellen regional positive Antikörperreaktionen.

Das Färbemuster nach Bestrahlung war übereinstimmend mit dem bestrahlter humaner Spalthaut (48 h nach 5 Gy) [101, 100]. Allerdings konnte nach 7/8 Tagen bei 2,5 Gy und 5 Gy in Fibroblasten und Keratinozyten beidesmal nur eine geringe Farbtintensivierung festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind konsistent mit durchflusszytometrischen Untersuchungen, welche bis 5 Tage nach Bestrahlung mit 2,5 Gy und 5 Gy eine annähernd gleiche $\alpha 2\beta 1$ -Expressionsdichte von HDFa-Fibroblasten zeigen [101, 100]. Das könnte wiederum ein Hinweis auf eine höhere Strahlenempfindlichkeit der HDFa-Fibroblasten im niedrigeren Strahlendosisbereich sein.

Das Expressionsverhalten nach Verwundung im rekonstruierten Epithel ist überwiegend konsistent mit dem von verwundeter Mundschleimhaut (Gaumenepithel) [82]. Entsprechend der *in vivo*-Situation induzierten weder HaCaT-Keratinozyten noch HDFa-Fibroblasten ihre Integrinexpression nach Verwundung. Es erfolgte lediglich eine Umverteilung der Expression der Rezeptors.

Nach Kombination von Verwundung und Bestrahlung zeigten epidermale HaCaT-Zellen und HDFa-Fibroblasten eine deutlich induzierte Expression. Die $\alpha 2\beta 1$ -Expression des Hautäquivalents verhält sich erwartungsgemäß ähnlich wie humane Spalthaut nach solitärer Bestrahlung mit 5 Gy.

5.3.9 Zusammenfassung der Antigenexpression des Hautäquivalents im Vergleich zur humanen Haut

Insgesamt zeigte unser nicht-manipuliertes Hautmodell für den Proliferationsmarker Ki-67 eine vollkommen identische Lokalisation, für Zytokeratin, $\beta 1$ -Integrin, $\alpha 2\beta 1$ -Integrin und TGF $\beta 3$ ist das Expressionsmuster teilweise mit der natürlichen, kutanen Haut übereinstimmend. Ihnen allen sind zusätzliche Farbreaktionen in der dorsalen, rekonstruierten Epidermis gemeinsam.

Die Unterbrechung der rechtzeitigen und regulären Expression der Faktoren (Zytoke-
ratin, $\beta 1$ - und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, TGF $\beta 3$) zeigt, dass die terminale Differenzierung supra-
basaler HaCaT-Keratinocyten nur unzureichend induziert ist und weist, wie Schoop
[137] beschreibt, auf eine unvollkommene Ausdifferenzierung hin.

Anomales Expressionsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und Fibroblasten könnte
auch durch die suboptimalen Wachstumsbedingungen erklärt werden. Diese haben ei-
ne regenerative Stimulierung suprabasaler Keratinocyten und einen anomalen Differen-
zierungsprozess in organotypischen Co-Kulturen zur Folge [142, 115, 15]. Vermutlich
aus denselben Gründen zeigte das normale Hautäquivalent abweichend von der huma-
nen Haut regelmäßig in der rekonstruierten Epidermis und in HDFa-Fibroblasten eine
schwache ICAM-1- und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Immunreaktivität.

Nach Strahlenexposition entsprach das Expressionsverhalten der Adhäsionsmoleküle
ICAM-1 und $\beta 1$ -Integrin den Untersuchungsergebnissen humaner Spalthaut [101, 100].
HDFa-Fibroblasten zeigten nach Bestrahlung von 2,5 und 5 Gy eine unveränderte
TGF $\beta 3$ - und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Immunreaktivität. Das könnte als ein Hinweis auf eine
höhere Strahlenempfindlichkeit der Fibroblasten im niedrigeren Strahlendosisbereich
interpretiert werden und würde in diesem Fall die Ergebnisse der HDFa-Wachstums-
kurven bestätigen. In HaCaT-Zellen konnte bei Strahlenexposition von 2,5 und 5 Gy
nach 7/8 Tagen keine TGF $\beta 3$ -Expression nachgewiesen werden. Vermutlich waren die
Strahlendosen zur Induktion der TGF $\beta 3$ -Expression nicht ausreichend oder aber der
Untersuchungszeitpunkt zu früh gewählt.

Nach Verwundung reagiert das organotypische Hautäquivalent weitgehend entspre-
chend den veröffentlichten Ergebnissen der normalen humanen Haut bezüglich ICAM-
1, $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin. Im Gegensatz zur humanen Mundschleimhaut zeigte
das unverwundete, rekonstruierte epidermale Gewebe ebenfalls eine induzierte $\alpha 5\beta 1$ -
Integrinexpression. Der zusätzliche Verwundungsreiz könnte eventuell eine übermäßige
Aktivierung und Integrinsynthese im unverletzten Gewebe bedingen.

Bei Kombination der Noxen Bestrahlung und Verwundung zeigte das Expressionsver-
halten von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin bei 48 h erwartungsgemäß eine ähnliche Tendenz, wie man
sie bei solitärer Strahlenexposition von humaner Spalthaut findet, da nach solitärer
Verwundung keine erhöhte $\alpha 2\beta 1$ -Expression festgestellt werden konnte.

Überraschend war der Nachweis einer geringen Hochregulierung der TGF $\beta 3$ -Synthese
in HaCaT-Zellen. Das könnte eventuell als ein Hinweis auf eine vorübergehende Indu-
zierung gewertet werden.

Da es sich sowohl bei den solitär bestrahlten Hautmodellen (7/8 d nach 2,5 Gy und
5 Gy) und den bestrahlten und verwundeten um Einzelversuche handelte, zeigen die-
se Ergebnisse allenfalls eine Tendenz auf. Für eine eindeutige Aussage sind weitere
Versuche nötig. Desweiteren sind uns keine Publikationen über die kutane Expression
der untersuchten Faktoren nach Verwundung und Bestrahlung in der humanen Haut
bekannt. Für einen Vergleich mit der *in vivo*-Situation sollten Untersuchungen dieser
Faktoren an verwundeten Spalthautproben nach Bestrahlung durchgeführt werden.

5.3.10 Endoglin

Bisher sind uns keine Beschreibungen der Endoglinexpression in epidermalen Keratinozyten bekannt. Bekannt ist aber, dass Endoglin in proliferierenden Zellen expremiert wird [31]. Dementsprechend war die Immunreaktivität im normalen Hautäquivalent immer streng auf das Proliferationskompartiment der rekonstruierten Epidermis beschränkt.

Auf solitäre Bestrahlung oder in Kombination mit Verwundung reagieren HDFa-Fibroblasten und HaCaT-Keratinozyten aller epidermalen Schichten mit einer deutlich erhöhten Endoglinexpression. Vermutlich aufgrund der schlechteren Ausdifferenzierung des anderen Hautmodells, konnte nur einmal nach Verwundung vorübergehend eine mittlere Induzierung der CD105 Expression im Proliferationskompartiment festgestellt werden.

Bei pathologischen Vorgängen, welche mit Gefäßneubildungen und Hypoxie verbunden sind, wird Endoglin stark expremiert [130]. Wahrscheinlich spielen beide Vorgänge in unserem Hautmodell mangels eines Gefäßsystems keine Rolle. Vermutlich bedingt der Reiz zur Reepithelisierung der Wunde eine Aktivierung der Proliferation von basalen und suprabasalen Zellen im Hautmodell, welche mit einer vermehrten Endoglinexpression einhergeht. Ein weiterer Grund könnte die stimulierte TGF β 1-Expression in Migrationskeratinozyten während der akuten Wundheilung sein [67]. Unsere ELISA-Untersuchungen des Mediumüberstands von verwundeten Modellen konnten gegenüber dem normalen Hautmodell einen reduzierten Verbrauch von TGF β 1 feststellen. Diese Ergebnisse könnten als eine stimulierte Eigenproduktion des TGF β 1-Proteins gedeutet werden, welche, wie man weiß, die Expression des Endoglin-kodierenden Gens vermehrt [46] und vielleicht auch die Endoglinprotein-Produktion fördert. Diese Zusammenhänge könnten möglicherweise die Ursache einer induzierten Endoglinexpression nach ionisierender Bestrahlung sein. Studien konnten, wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben, eine dosis- und zeitabhängige Induzierung der Endoglinexpression auf der Plasmamembran von proliferierenden und nicht-proliferierenden Endothelzellen nachweisen. Das könnte die Induktion in allen epidermalen Schichten erklären. Eine dosisabhängige Expressionssteigerung war auch im Hautmodell nachvollziehbar, nicht jedoch eine Zeitabhängigkeit. Dies kann jedoch nur unter Vorbehalt behauptet werden, da die Anzahl der Versuche allenfalls ein tendenzielles Verhalten aufzeigt.

5.4 Beurteilung der ELISA-Ergebnisse

Die ELISA-Daten vom Mediumüberstand belegen, dass das organotypische Hautäquivalent auf verschiedene Manipulationen (Bestrahlung und Verwundung) reagiert und die Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen modelliert. Diese Ergebnisse verdeutlichen weiterhin, dass HDFa-Fibroblasten und HaCaT-Zellen im Hautäquivalent trotz Bestrahlung funktionell aktiv bleiben [96].

5.4.1 KGF-ELISA

Die nachgewiesenen KGF-Proteinkonzentrationen des Kontrollmodells im Zeitraum von acht Tagen zeigen, entsprechend der normalen humanen Haut, eine kontinuierliche KGF-Expression. Allerdings weist dieses Modell keine konstante KGF-Synthese wie die natürlichen Haut auf, wohl aufgrund der veränderten Bedingungen während der Kultivierung.

Der um das zwei- bis dreifache erhöhte Proteinspiegel im Überstand des Kontrollmodells, bezogen auf verwundete und bestrahlte Hautmodelle, könnte auf einen reduzierten Bedarf der Keratinozyten im normalen, organotypischen Gewebe und/oder auf weniger aktivierte KGF-Rezeptoren hinweisen. Daraus folgt, dass das Gewebe weniger KGF bindet und vermehrt in den Überstand abgibt.

Gemäß Untersuchungen von Marchese [94] zeigen KGF-Rezeptoren (KGFR) in kutanen Wunden eine Stimulierung der KGFR-Transkriptionsexpression bis 8 Tage nach Wundsetzung, begleitet von einem deutlichen Rückgang der Proteinexpression. Inzwischen ist auch bekannt, dass Rezeptoren auf die akute oder chronische Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, beispielsweise KGF, einerseits mit ihrer Aktivierung und andererseits mit negativen Rückkoppelung reagieren. Diesen Ergebnissen zufolge würde man erwarten, dass die KGF-Konzentrationen im Mediumüberstand verwundeter Modelle höher sind als die beim Kontrollmodell. In unserer Studie ist der KGF-Spiegel im Überstand verwundeter Modelle jedoch deutlich niedriger. Ursachen dafür können ein erhöhter KGF-Bedarf der HaCaT-Keratinozyten nach Verwundung, die gleichzeitige Aktivierung der Rezeptoren und die Bindung großer KGF-Mengen im rekonstruierten, epidermalen Gewebe sein. Ausserdem könnte die von uns in der organotypischen Co-Kultur verwendete Zellzahl für die verminderte KGF-Synthese der Fibroblasten und den erniedrigten KGF-Spiegel im Überstand der verwundeten Modelle eine Rolle spielen: der KGF-produzierenden HDFa-Population steht die doppelte Keratinozytenanzahl gegenüber. Vermutlich können die eingesäten HDFa-Fibroblasten den KGF-Bedarf der HaCaT-Keratinozyten nicht ausreichend decken.

Desweiteren fehlt im Hautmodell die Blutgefäßversorgung, die, wie in Abschnitt 2.11.1 genauer beschrieben, im frühen Wundheilungsgeschehen große Mengen initialer Induktoren bereitstellt, weiterhin Leukozyten und Makrophagen, welche für die Aufrechterhaltung der KGF-Expression sorgen [160, 159]. Das verwundete Modell, das solitär bestrahlte und das verwundete und bestrahlte Modell enthielten in der genannten Reihenfolge absteigende KGF-Konzentrationen im Mediumüberstand. Reduzierte KGF-Mengen in den bestrahlten Modellen könnten wiederum auf einen erhöhten Bedarf und/oder auf eine nicht ausreichende Expression des Wachstumsfaktors durch die vorhandenen HDFa-Fibroblasten hinweisen. Wie schon in Abschnitt 2.11.2 beschrieben, kann die Prämedikation von rekombinantem KGF bei Bestrahlung strahleninduzierte, epitheliale Schäden reduzieren [75, 43]. KGF verhindert als so genanntes „Zytokin-schutzschild“ [93] die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und wirkt dadurch antiinflammatorisch [119]. Die Mehrzahl der Wissenschaftler vermutet, dass KGF als protektiver Faktor epitheliale Zellen vor toxischen Effekten reaktiver Sauerstoffderivate schützt [13]. Slonina [140] behauptet dagegen, dass KGF das Überleben der Zellen nach Bestrahlung nicht beeinflussen kann, sondern nur die Proliferation überlebender Zellen

fördert. Beide Theorien deuten jedoch auf einen gesteigerten KGF-Bedarf bestrahlter, epithelialer Zellen hin. Im Gegensatz zur Verwundung schädigt die Strahlenexposition das gesamte, rekonstruierte epidermale Gewebe. Dadurch ist der KGF-Bedarf und -Verbrauch der bestrahlten Modelle im Vergleich zum solitär verwundeten Modell erhöht. Dieses Ergebnis könnte in Zusammenhang mit der hochgradigen Verschlechterung der Prognose von Strahlenschäden bei kombinierter Verwundung stehen [102]. Um eindeutige Aussagen über das Verhalten des Hautmodells machen zu können, sind weitere Versuche notwendig. Es sollten nicht nur der Mediumüberstand, sondern auch das entsprechende Hautmodellgewebe auf die Expression von KGF- bzw. KGFR-Protein untersucht werden.

5.4.2 TGF β 1-ELISA

Poole et al [116] untersuchte die TGF β 1-Expression verschiedener Zellen in Mono- und Co-Kulturen. Die Studien an Monolayern humaner Fibroblasten, Melanozyten und Keratinozyten zeigten in der angegebenen Reihenfolge absteigende Expressionsmengen von TGF β 1-mRNA und -Protein. Zur Herstellung der Co-Kultur von Poole wurden 10^6 Keratinozyten pro cm^2 auf einer mit 10^6 Fibroblasten pro cm^2 beimpften Kollagen-Glykosaminoglykanmatrix kultiviert. Die separaten ELISA-Untersuchungen des epidermalen und dermalen Gewebes der Co-Kultur erfolgten nach zwei, acht und vierzehn Tagen. Die nachgewiesene TGF β 1-Synthese dieses Hautsubstituts aus Fibroblasten und Keratinozyten mit begleitenden Melanozyten, stammte hauptsächlich von den Fibroblasten. Während einer 14-tägigen Kultivierungszeit senkte die dermale Komponente der Co-Kultur mit zunehmender epidermaler Stratifizierung und Differenzierung kontinuierlich ihre TGF β 1-Proteinexpression. Der TGF β 1-Gehalt der epidermalen Komponente, welche zumindest zum Teil von den Melanozyten gebildet wurde, war niedrig und blieb während der Co-Kultivierung relativ konstant. Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass Keratinozyten die TGF β 1-Expression von Fibroblasten in Co-Kulturen unterdrücken [116].

Im Vergleich zum zuvor beschriebenen Hautsubstitut enthält unser Hautmodell nur ca. 17% der oben angegebenen Fibroblasten/ cm^2 und ca. 34% an Keratinozyten/ cm^2 . Es kann vermutet werden, dass die um den Faktor zwei höhere Keratinozytenzahl die Eigenproduktion der HDFa-Fibroblasten im normalen Hautäquivalent so stark unterdrückt oder verhindert hat, dass TGF β 1 weder immunhistochemisch in Gefrierschnitten, noch durch ELISA-Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Die TGF β 1-Synthese der HaCaT-Keratinozyten lag wahrscheinlich unter dem nachweisbaren Minimalwert. Zudem ist in dieser Arbeit nur der Mediumüberstand und nicht das gesamte Gewebe auf TGF β 1-Protein untersucht worden. Diese Gründe könnten den fehlenden TGF β 1-Nachweis im Überstand des unbestrahlten und unverwundeten Hautmodell erklären. Allerdings deuten die Daten des ELISAs darauf hin, dass die Hautäquivalente das mit dem Kulturmedium zugeführte TGF β 1 verwerten.

Nach Verwundung ist der Verbrauch von TGF β 1 reduziert. Erhöhte TGF β 1-Mengen im Überstand dieser Modelle könnten auf einen verminderten Verbrauch oder einen unveränderten, bzw. gesteigerten Bedarf mit gleichzeitig stimulierter Eigenproduktion des Wachstumsfaktors hinweisen. Die in Abschnitt 2.9.1 beschriebene humane Hautstudie

zeigt zum Wundheilungsbeginn eine vorübergehende, leichte Erhöhung der TGF β 1-Expression in mesenchymaler Zellen und Migrationskeratinozyten. Auch in unserem Modell ist ein verminderter Verbrauch des Wachstumsfaktors vor allem 48 h nach Verwundung nachzuweisen, welcher im weiteren Verlauf erneut ansteigt, so dass nach 192 h im Mediumüberstand kein TGF β 1 mehr nachweisbar ist.

Als einziges Modell produziert das mit 5 Gy bestrahlte am Untersuchungszeitpunkt 48 h geringe TGF β 1-Mengen. Auch im weiteren Untersuchungsverlauf entspricht der TGF β 1-Überstandgehalt der Mediumkonzentration, erst am Zeitpunkt 192 h liegt die TGF β 1-Konzentration unter dem entsprechenden Mediumgehalt.

Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien von Vonenzin [153] und Hakenjos [64], die in Abschnitt 2.9.1 ausführlicher besprochen sind, überein. Verschiedene Theorien vermuten nach Strahlenexposition entweder die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Entzündungszellen, welche die TGF β -Produktion in der humanen Haut auslöst [66], oder eine direkte Genexpression fibrogener Zytokine (TGF β) [125]. Da jedoch unserem Hautmodell die Entzündungszellen fehlen, und das ungünstige Verhältnis von Keratinozyten zu Fibroblasten einer deutlichen Induzierung der TGF β -Synthese entgegen stehen, kann nur eine verminderte Stimulation der TGF β -Expression im Hautmodell nach Bestrahlung oder Verwundung erwartet werden. Man vermutet, dass TGF β 1 eine wichtige Funktion bei der Auslösung der strahlenbedingten Hemmung von Zellproliferation und der Induzierung der terminalen Differenzierung von Ratten-Lungenfibroblasten übernimmt [64]. Das könnte eine weitere Ursache für die niedrige und zum Teil fehlende Expressionssteigerung nach Bestrahlung sein. Dennoch kann die Tendenz einer induzierten TGF β -Expression, zumindest nach der solitären Strahlenexposition, im entsprechenden Modell nachvollzogen werden.

Weshalb der TGF β -Spiegel im Mediumüberstand des bestrahlten und verwundeten Modells unterhalb des Kontrollmodells lag und nicht erwartungsgemäß oberhalb des solitär bestrahlten bzw. verwundeten Modells, kann nicht vollständig plausibel erklärt werden. Untersuchungen bestrahlter Fibroblasten zeigen eine Beeinträchtigung ihrer Proliferationsfähigkeit und Migration. Die synthetisierte Kollagenmenge ist reduziert und in seiner Struktur anomal [44]. Bernstein et al [14] hat durch die Behandlung bestrahlter, linearer Schnittwunden mit niedrigen TGF β -Dosen eine verbesserte Wundspannung und erhöhte Kollagenexpression erreicht. Er vermutet, dass die in Fibroblasten gelagerten Bestrahlungsschäden möglicherweise nach Verwundung forciert zum Ausdruck kommen [14]. Dies könnte vielleicht der Grund für die fehlende Expression des Wachstumsfaktors der wenigen Fibroblasten im verwundeten und bestrahlten Modell sein.

5.5 Beurteilung der organotypischen Co-Kultur als Modell für die strahlenbiologische Forschung

Der physiologische Gewebeaufbau der Epidermis erfordert ein ausgewogenes Gleichgewicht folgender Prozesse: Zellproliferation, Differenzierung und Zellaoptose. Nach vier bis fünf Wochen beschränkte sich die epitheliale Proliferation weitgehend auf das Str. basale und das untere Str. suprabasale. Trotz des meist gut ausgebildeten Str.

corneums und der weitestgehend normalen Zelldifferenzierung, sind pygnotische Kerne und unvollständig degenerierte Zellorganellen Anzeichen für Mängel der Keratinisierung. Die unnatürliche Expressionen in oberen Epidermisbereichen bestimmter Keratine, Integrinrezeptoren und Wachstumsfaktoren verdeutlichen die unvollständige Ausdifferenzierung der HaCaT-Zellen. Dennoch haben zytogenetischen Veränderungen in der spontan transformierten HaCaT-Zelllinie, im Gegensatz zu viral transformierten, humanen Zellen, das Differenzierungsprogramm der HaCaT-Zellen nicht signifikant beeinträchtigt [137]. Auch wenn das Ziel einer physiologischen Gewebemöostase noch nicht erreicht worden ist, haben HaCaT-Zellen ihre Fähigkeit konserviert, *in vitro* und *in vivo* eine weitgehend regulär strukturierte Epidermis mit einem hohen Differenzierungsgrad der Zellen zu bilden.

Die Co-Kultur erwies sich insgesamt als geeignet zur Anzucht eines organotypischen Hautäquivalents und dessen kinetischer und morphologischer Charakterisierung. Abgesehen von der Parakeratose und der unvollständigen Ausdifferenzierung der HaCaT-Zelllinie im Hautäquivalent, und unter Berücksichtigung des Modellcharakters dieser organotypischen Co-Kultur, waren die Ergebnisse dennoch überzeugend. Insgesamt kann gesagt werden, dass das Expressionsverhalten der kutanen Zellen im Hautäquivalent überwiegend übereinstimmend mit der natürlichen Haut war. Die Daten belegen eine spezifische Faktorenexpression der Zellen nach Verwundung und Strahlenexposition.

Das Hautäquivalent ist ein adäquates Modell zur zellularen und molekularen Charakterisierung von humanen Wunden vor und nach Strahlenexposition, von zellularen Funktionen und Interaktionen, sowie deren Wechselwirkungen mit der Kollagenmatrix. Zur quantitativen Evaluierung von Faktoren epidermaler Keratinozyten (HaCaT) und dermaler Fibroblasten (HDFa), sollte in zukünftigen Untersuchungen das Wachstumsverhalten und die Zellanzahl der HDFa-Zellen zum Untersuchungszeitpunkt festgestellt werden.

Da der radiobiologischen Wissenschaft wenig humanes Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht, kann dieses Modell als bedeutender Schritt in Richtung der artifiziellen Herstellung von Versuchsmaterial zur Simulierung von *in vivo*-Verhältnissen der Haut gedeutet werden.

Kapitel 6

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der dreidimensionalen, organotypischen Co-Kultur auf seine Verwendbarkeit zum Studium von pathophysiologischen Vorgängen des kutanen Strahlensyndroms und der Wundheilung überprüft.

Das Hautmodell besteht aus einer bovinen Kollagenmatrix mit primären, humanen Fibroblasten (HDFa) und humanen, immortalen Keratinozyten (HaCaT). Die gesamte Kultivierung erfolgte an der Luft-Medium-Grenze. Mit vier Wochen konnte die Ausbildung einer beinahe morphologisch korrekten und differenzierten Epidermis erreicht werden. Die Reproduzierbarkeit lag bei etwa 35%. Mittels Ki-67-Markierung konnte in der fünften Woche immunhistologisch eine reguläre Lokalisation des Proliferationskompartiments in basalen und unteren suprabasalen Lagen nachgewiesen werden. Mit zunehmender Schichtanzahl und Differenzierung setzen nach ca. vierwöchiger Kultivierungsperiode zum Teil strukturelle Auflösungsvorgänge in der rekonstruierten Epidermis und Kollagenmatrix ein.

Immunhistochemische Studien an Gefrierschnitten des nicht manipulierten Hautmodells zeigten die Expression von Zytokeratin, $\beta 1$ -, $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, TGF $\beta 3$, ICAM-1 und Endoglin. Mit Ausnahme von ICAM-1, $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und Endoglin war die Lokalisation der Hauptexpression dieser Faktoren beinahe identisch mit der der natürlichen Haut. Allen Faktoren waren zusätzliche Farbreaktionen in der dorsalen, rekonstruierten Epidermis gemeinsam, bedingt durch die unzureichend induzierte und unvollkommene terminale Ausdifferenzierung suprabasaler HaCaT-Keratinozyten. Im Gegensatz zur humanen Haut produziert das Hautmodell Endoglin, ICAM-1 und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin. Dagegen konnte das in der natürlichen kutanen Epidermis vorhandene TGF $\beta 1$ in den entsprechenden Bereichen des Modells immunhistologisch nicht nachgewiesen werden.

Die Strahlenexposition von 5 Gy bewirkte nach 48 h eine induzierte epidermale Expression von $\beta 1$ -Integrin, ICAM-1 und Endoglin. Fibroblasten erhöhen p.r. die Endoglin- und teilweise die ICAM-1-Produktion. Dabei wird die Expression dieser Substanzen im Hautäquivalent vermutlich dosisabhängig induziert. Eine erhöhte TGF $\beta 3$ -Synthese konnte ausschließlich in Fibroblasten beobachtet werden. Die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Synthese in Fibroblasten und Keratinozyten war 7/8 Tage p.r. bei Strahlendosen von 2,5 Gy und 5 Gy jeweils gleich. Diese Daten deuten auf eine höhere Strahlenempfindlichkeit

der Fibroblasten im niedrigeren Strahlendosisbereich hin.

Auf Verwundung reagierte das organotypische Hautäquivalent mit einer vorübergehend induzierten ICAM-1-, Endoglin- und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin Expression nach 48 h. Die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Synthese wurde nicht stimuliert, sondern andeutungsweise von der basalen Lage in die oberen Bereiche der Epidermis umverteilt. Das Expressionsverhalten dieser Faktoren entsprach dem humaner Wunden, mit Ausnahme von Endoglin. Die Endoglinexpression von Keratinozyten ist unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden. Desweiteren blieb die TGF $\beta 3$ -Produktion unverändert.

Nach Bestrahlung (5 Gy) und Verwundung konnte in der organotypischen Epidermis (48 h) erstmals eine erhöhte TGF $\beta 3$ -Synthese nachgewiesen werden. Das Expressionsverhalten von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, ICAM-1 und Endoglin in der Co-Kultur war bei Bestrahlung und Verwundung im Vergleich zu solitärer Strahlenexposition unverändert.

Weiterhin wurde der Nährmediumüberstand im ELISA auf KGF und TGF $\beta 1$ untersucht. Entsprechend der humanen Haut konnte im Kontrollmodell eine kontinuierliche KGF-Expression nachgewiesen werden. Ein im Vergleich zu verwundeten und bestrahlten Hautmodellen höherer KGF-Proteinspiegel im Überstand des Kontrollmodells weist auf einen reduzierten Bedarf der Keratinozyten im normalen organotypischen Gewebe und bzw. oder auf eine geringere Anzahl aktivierter KGF-Rezeptoren hin. Eine geringe TGF $\beta 1$ -Eigenproduktion konnte ausschließlich das bestrahlte Modell (5 Gy) am Untersuchungszeitpunkt 48 h aufweisen. Die TGF $\beta 1$ -Konzentrationen der anderen Hautäquivalente deuten darauf hin, dass das mit dem Kulturmedium zugeführte TGF $\beta 1$ verwertet wird. Dabei war eine eindeutige Bilanzierung von TGF $\beta 1$ -Produktion und -Verbrauch jedoch nicht möglich.

Insgesamt zeigen die ELISA-Daten, dass das Hautmodell auf Manipulationen (Verwundung und Bestrahlung) spezifisch reagiert. Humane Zellen bleiben, trotz Bestrahlung, funktionell aktiv und können auch ihre Zytokin-Sekretion modulieren [96]. Desweiteren veranschaulichen diese Ergebnisse zelluläre Interaktionen in der Co-Kultur.

Die deutliche Depression der TGF $\beta 1$ -Synthese in HDFa-Fibroblasten des normalen Hautmodells, vermutlich hervorgerufen durch HaCaT-Zellen, ist übereinstimmend mit früheren Co-Kultur-Studien. Die Co-Kultur erwies sich insgesamt geeignet zur Anzucht eines organotypischen Hautäquivalents und dessen kinetische und morphologische Charakterisierung. Für weitere strahlenbiologische Studien sollten die spontane Involution und niedrige Reproduktivität des Modells überwunden werden. Die Expressionslokalisation stimmt prinzipiell mit der der humanen Haut überein, bis auf die unnatürliche dorsale Ausdehnung der Expression aufgrund der Parakeratose und unvollständigen Ausdifferenzierung der HaCaT-Zelllinie. Lösungsansätze könnten die Erhöhung der Matrix-Fibroblastenzahl, die Kultivierung in der Perfusionskammer oder die Co-Inkubation mit Lipiden, Ceramiden, Vitamin D und Zytokinen bzw. anderen Hautzellen darstellen.

Abschließend kann gesagt werden, dass dieses Hautäquivalent die natürliche, kutane Expressionscharakteristik verschiedener Faktoren nach Verwundung und Bestrahlung fast vollständig reproduzieren kann und sich deshalb zum Studium der kutanen Strahlenreaktion eignet. Für die radiobiologische Grundlagenforschung kann dieses Ergebnis als wesentlicher Schritt in Richtung der Realisierung von *in vivo*-Verhältnissen in einem artifiziellen Hautmodell gedeutet werden.

Investigation of the effect of ionising irradiation and wounding on the expression of cellular adhesion molecules in a newly developed three-dimensional *in vitro* skin model

Summary

In the dissertation on hand the model of the three-dimensional, organotypic co-culture was examined for its usefulness for studying pathophysiological procedures of the cutaneous irradiation syndrome and wound healing.

The skin model consists of a bovine collagen matrix containing primary, human fibroblasts (HDFa) and immortalised, human keratinocytes (HaCaT). The entire cultivation took place at the air-medium border. After four weeks the formation of an almost morphologically correct and differentiated epidermis could be achieved. The reproducibility was approximately 35%. By means of Ki-67 marking a regular localisation of proliferating keratinocytes in basal and lower suprabasal layers could be immune-histologically verified in the fifth week. With increasing number of layers and differentiation, structural disintegration processes partially began in the reconstructed epidermis and collagen matrix after a cultivation period of approximately four weeks.

Immune-histochemical studies at frozen sections of the none-manipulated skin model showed the expression of cytokeratin, β 1-, α 5 β 1-, α 2 β 1-integrin, TGF β 3, ICAM-1 and endoglin. With exception of ICAM-1, α 5 β 1-integrin, and endoglin the localisation of the main expression of these factors was almost identical to that in the natural skin. All factors showed an additional colour reaction in the dorsal, reconstructed epidermis, caused by the insufficiently induced and imperfect terminal differentiation of the suprabasal HaCaT keratinocytes. In contrast to human skin, the skin model produces endoglin, ICAM-1 and α 5 β 1-integrin. On the other hand, TGF β 1, which exists in the natural cutaneous epidermis, could not be proven immune-histologically in the respective parts of the model.

A radiation exposure of 5 Gy caused an induced epidermal expression of β 1-integrin, ICAM-1, and endoglin after 48 h. Fibroblasts increase p.r. the endoglin and partly the ICAM-1 production. Here the expression of those substances in the skin equivalent is probably induced dose-dependently. An increased TGF β 3 synthesis could be observed exclusively in fibroblasts. The α 2 β 1-integrin synthesis 7/8 days after irradiation with doses of 2,5 Gy and 5 Gy was the same in fibroblasts and keratinocytes. These data imply a higher radiation-sensitiveness of fibroblasts within the lower dose range.

To wounding the organotypical skin equivalent reacted with a temporarily induced ICAM-1, endoglin, and α 5 β 1-integrin expression after 48 h. The α 2 β 1-integrin synthesis was not stimulated, but partly shifted from the basal layer into the upper parts of the epidermis. The expression behaviour of these factors corresponded to that of

human wounds, with exception of endoglin. To our knowledge the endoglin expression of keratinocytes has not been described so far. Furthermore the TGF β 3 production remained unchanged.

For the first time an increased TGF β 3 synthesis 48 h after irradiation (5 Gy) and wounding could be proven in the organotypic epidermis. The expression behaviour of α 2 β 1-integrin, ICAM-1, and endoglin in the co-culture was unchanged after irradiation and wounding compared with solitary radiation exposure.

Further on the growth medium supernatant was examined with respect to KGF and TGF β 1 by means of ELISA. Analogue to the situation in human skin a continuous KGF expression could be proven in the control model. A higher KGF protein level in the control model, compared to wounded and irradiated skin models, indicates a reduced demand of the keratinocytes in the normal organotypic tissue and/or a smaller number of activated KGF receptors. Only the irradiated model (5 Gy) showed a small intrinsic TGF β 1 production after 48 h. The TGF β 1 concentration in the other skin equivalents indicates that the TGF β 1 supplied with the culture medium is consumed. However, a definite evaluation of TGF β 1 production and consumption was not possible.

Altogether the ELISA data show that the skin model reacts specifically to manipulations (wounding and irradiation). Despite irradiation human cells remain functionally active and can also modulate their cytokin secretion [96]. Furthermore these results illustrate cellular interactions in the co-culture.

The distinct depression of the TGF β 1 synthesis within HDFa fibroblasts of the normal skin model, probably caused by HaCaT cells, is in agreement with earlier co-culture studies. Altogether the co-culture proved suitable for the rearing of an organotypic skin equivalent and its kinetic and morphologic characterisation. For further radio-biological studies the problems of spontaneous involution and low reproducibility of the model should be solved. In principle the localisation of the expression matches that of the human skin, except for the unnatural dorsal extension of the expression due to parakeratosis and incomplete differentiation of the HaCaT cell line. Possible solutions could be the increment of the number of fibroblasts within the matrix, cultivation in the perfusion chamber or the co-incubation with lipids, ceramides, vitamin D and cytokines or other skin cells.

Concluding it can be said that this skin equivalent can reproduce the natural, cutaneous expression characteristics of different factors after wounding and irradiation nearly completely and is therefore suited for the study of cutaneous radiation reactions. For the basic radio-biological research this result could be interpreted as a substantial step towards the realisation of *in vivo* conditions in an artificial skin model.

Anhang A

Tabellarische Zusammenfassung der Färbeergebnisse nach Verwundung und Bestrahlung

A.1 Qualitative Auswertung der Expressionsinduzierung

A.1.1 Expressionsinduzierung des jeweils untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten (F) nach Strahlenexposition

Antigen	Hautmodell	5 Gy, 48 h E/F	2,5 Gy, 7 d E/F	5 Gy, 8 d E/F
ICAM-1	V1	++/+	-/-	
	V2	++/-		
	V5			+/+
$\beta 1$	V1	+/-		
	V2	+/-		
	V4	+/-		
$\alpha 2\beta 1$	V1		(+)/(+)	
	V5			(+)/(+)
TGF β 1	V5		neg.	neg.
TGF β 3	V1		-/+	
	V5			-/+
Endoglin	V1		-/-	
	V5		-/-	+/+

Tabelle A.1: Expressionsinduzierung zum Zeitpunkt 48 h nach Strahlenexposition von 5 Gy, zum Zeitpunkt 7/8 d nach 2,5 Gy und 5 Gy Bestrahlung.

A.1.2 Expressionsinduzierung des jeweils untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten (F) nach Verwundung

Antigen	Hautmodell	verw., 48 h E/F	verw., 7/8 d E/F
ICAM-1	V2	+/-	
	V3		-/-
	V5	-/-	+/-
$\alpha 5\beta 1$	V2	++/+	
	V3		-/-
$\alpha 2\beta 1$	V2	-/-	
	V3		-/-
	V5	-/-	-/-
TGF β 1	V2	neg.	
	V3		neg
	V5	neg.	neg.
TGF β 3	V2	(+/-)/-	
	V3		(+/-)/-
	V5	-/-	(+/-)/-
Endoglin	V2	++/-	
	V3		-/-
	V5	-/-	-/-

Tabelle A.2: Expressionsinduzierung des untersuchten Antigens 48 h und 7/8 d nach Verwundung.

A.1.3 Expressionsinduzierung des jeweils untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten (F) nach Verwundung und Bestrahlung mit 5 Gy

Antigen	Hautmodell	verw., 5 Gy, 48 h E/F
ICAM-1	V5	+/(+)
$\alpha 2\beta 1$	V5	+(+)/+
TGF β 1	V5	neg.
TGF β 3	V5	(+)/+
Endoglin	V5	+/+

Tabelle A.3: Expressionsinduzierung des untersuchten Antigens in der Epidermis (E) und in HDFa-Fibroblasten 48h nach Verwundung und Bestrahlung mit 5 Gy.

Literaturverzeichnis

- [1] Ackermann L., Harvima I.T., *Mast cells of psoriatic atopic dermatitis skin are positive for TNF-alpha and their degranulation is associated with expression of ICAM-1 in the epidermis.* Arch Dermatol Res 290, 353–359, 1998.
- [2] Adams J.C., Watt F.M., *Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha5 beta1 integrin loss from the cell surface.* Cell 63, 425–435, 1990.
- [3] Akiymama S.K., *Integrins in cell adhesion and signaling.* Hum Cell 9, 181–186, 1996.
- [4] Andreadis S.T., Hamoen K.E., Yarmush M.L., Morgan J.R., *Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system.* J FASEB 15, 898–906, 2001.
- [5] Armulik A., *Splice variants of human beta 1 integrins: origin, biosynthesis and function.* Front Biosci 1, 219–227, 2002.
- [6] Aukhil Ikramuddin *Biology of wound healing.* Periodontology 22, 44–50, 2000.
- [7] Baeuml H., Behrends U., Peter R.U., Mueller S., Kammerbauer C., Caughman S.W., Degitz K., *Ionizing radiation induces, via generation of reactive oxygen intermediates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene transcription and NF kappa B-like binding activity in the ICAM-1 transcriptional regulatory region.* Free Radic Res 27, 127–142, 1997.
- [8] Baker D.G., Krochak R.J., *The response of the microvascular system to radiation: a review.* Cancer Invest 7, 287–294, 1989.
- [9] Beer H-D., Florence C., Dammeier J., McGuire L., Werner S., Duan D.R., *Mouse fibroblasts growth factor 10: cDNA cloning protein characterization and regulation of mRNA expression.* Oncogene 15, 2211–2218, 1997.
- [10] Behrens U., Peter R.U., Hintermeier-Knabe R., Eißner G., Holler E., Bornkamm G.W., Caughman S.W., Degitz K., *Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 in vitro.* J Invest Dermatol 103, 726–730, 1994.
- [11] Bell E., Parenteau N., Gay R., Nolte D., Kemp P., Bilbo P., Eckstein B., Johnson E., *The living skin equivalent: its manufacture, its organotypic properties and its responses to irritants.* Toxic in Vitro 5, 591–596, 1991.

- [12] Benett N.T., Schultz S., *Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors*. Am J Surg 165, 728–737, 1993.
- [13] Beer H.D., Gassmann M.G., Munz B., Steiling H., Engelhardt F., Bleuel K., Werner S., *Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair*. J Investig Dermatol Symp Proc 5, 34–39, 2000.
- [14] Bernstein E.F, Salomon G.D., Harisiadis L., Talbot T., Harrington F., Russo A., Uitto J., *Collagen gen expression and wound strength in normal and radiation-impaired wounds*. J Dermatol Surg Oncol 19, 564–570, 1993.
- [15] Boelsma E., Verheoven M.C.H., Ponc M., *Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line*. J Invest Dermatol 112, 489–498, 1999.
- [16] Bonewald L.F., *Regulation and regulatory activities of Transforming growth factor β* . Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression 9, 33–44, 1999.
- [17] Boismenu R., Havran W.L., *Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial γ , delta T cells*. Science 266, 1253–1255, 1994.
- [18] Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreuz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. The Journal of Cell Biology 106, 761–771, 1988.
- [19] Brandes K., *Untersuchungen zur Wachstumsmodulation und Strahlenwirkung an Plattenepithelkarzinomzellen in der organotypischen Co-Kultur*. Dissertation im Fachbereich Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät, LMU München, 1999.
- [20] Braun S., Hanselmann C., Gassmann M.G., auf dem Keller U., Born-Berclaz C., Chan K., Kan Y.W., Werner S., *Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound*. Mol Cell Biol 22, 5492–5505, 2002.
- [21] Breitkreuz D., Schopp V.M., Mirancea N., Baur M., Stark H.J., Fusenig N.E., *Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants*. Eur J Cell Biol 75, 273–283, 1998.
- [22] Brinkmann R., Lamberts H.B., *Radiopathology of extracellular structures*. In Current Topics in Radiation Research, edited by M. Ebert, A. Horward. North Holland Publishing Co., Amsterdam 2, 279–302, 1966.
- [23] Bullough W.S., *The control of epidermal thickness*. Br J Dermatol 87 347–354, 1972.
- [24] Dimitrijevic-Bussod M., Balzaretta-Mangi V.S., Gadbois D.M., *Extracellular Matrix and Radiation G1 Cell Cycle Arrest in Human Fibroblasts*. Cancer Res 59, 4843–4847, 1999.

- [25] Byrnes C.K., Khan F.H., Nass P.H., Hatoum C., Duncan M.D., Harmon J.W., *Success and limitations of a naked plasmid transfection protocol for keratinocyte growth factor-1 to enhance cutaneous wound healing*. Wound Repair Regen 9, 341–346, 2001.
- [26] Calderwood D.A., Shattil S.J., Ginsberg M.H., *Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signalling*. J Biol Chem 275, 22607–22610, 2000.
- [27] Clark R.A.F., *The molecular and cellular biology of wound healing repair*. Second Edition, edited by Clark R.A.F., Plenum Press, New York, 1996.
- [28] Clark R.A.F., *Biology of dermal wound repair*. Wound Healing 1, 647–666, 1993.
- [29] Cordes N., Meineke V., *Cell adhesion -mediated radioresistance (CAM-RR): In-vitro examination of extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells*. Strahlenther Radiolog Onkol (in press), 2002.
- [30] Dahm-Daphi J., Dikomey E., Brammer I., *DNA-repair, cell killing and normal tissue damage*. Strahlenther Onkol, Suppl III 74, 8–11, 1998.
- [31] DAKO CORPORATION *Specification Sheet monoclonal mouse anti-human, CD105, Endoglin SN6h*. PL 1304-08.15.96-M3527, DAKO CORPORATION, Carpinteria, CA, USA.
- [32] Debus E.S., Schmidt K., Ziegler U.E., Thiede A., *Die Rolle der Wachstumsfaktoren in der Wundheilung*. Zentralbl Chir, Suppl 1 125, 49–55, 2000.
- [33] Degitz K., *Induktion des immunologischen Adhäsionsmolekül ICAM-1 durch ionisierende Strahlen*. Ralf Uwe Peter, Gerd Plewig (Hrsg.) (Berlin Wien [u.a.]), Blackwell Wissenschafts-Verlag, 42–44, 1996.
- [34] Dressler J., Bachmann L., Kasper M., Hauck J.G., Muller E., *Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD54) in human skin wounds*. Int J Legal Med 110, 299–304, 1997.
- [35] Duncker K.J., Kneißler U., Quander D., *Immunhistologie mit APPAP*. mta 9, 268–271, 1994.
- [36] Eckert R.L., Rorke E.A., *Molecular biology of keratinocyte differentiation*. Environ Health Perspect 80, 109–116, 1989.
- [37] Eckert R.L., Welter F.J., *Epidermal keratinocytes-genes and their regulation*. Cell Death Differ 3, 373–383, 1996.
- [38] Edwards D.R., Murphy G., Reynolds J.J., Whitham S.E., Docherty A.J., Angel P., Heath J.K., *Transforming Growth Factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor*. J EMBO 6, 1899–1904, 1987.

- [39] Endl E., Gerdes J., *The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function.* Exp Cell Res 257, 231–237, 2000.
- [40] van de Sandt J., Roguet R., Cohen C., Esdaile D., Ponc M., Corsini E., Barker C., Fusenig N., Liebsch M., Benford D., de Brugerolle de Fraissinette A., Fartasch M., *The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation.* <http://altweb.jhsph.edu/science/pubs/ECVCAM/ecvam38.htm>, ATLA 27, 723–743, 1995.
- [41] el-Ghalbzouri A., Gibbs S., Lamme E., Van Blitterswijk C.A., Ponc M., *Effect of fibroblasts on epidermal regeneration.* Br J Dermatol 147, 230–243, 2002.
- [42] Farmer E.R., Hood A.F., *Pathology of the skin.* edited by Farmer E.R., Hood A.F., ISBN 0-8385-7715-6, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut/San Mateo, California 1990.
- [43] Farrell C.L., Bready J.V., Rex K.L., et al *Keratinocyte Growth Factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality.* Cancer Res 58, 933–939, 1998.
- [44] Ferguson P.C., Boynton E.L., Wunder J.S., Hill R.P., O’Sullivan B., Sandhu J.S., Bell R.S., *Intradermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin.* Journal of Surgical Research 85, 331–338, 1999.
- [45] Finzel A., *Proliferationskinetik und p53-Expression in humanen Ösophaguskarzinomen und benachbartem Normalgewebe.* Dissertation im Fachbereich Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät, LMU München, 1999.
- [46] Fonsatti E., Del Vecchio L., Altomonte M., Sigalotti L., Nicotra M.R., Coral S., Natali P.G., Maio M., *Endoglin: an accessory component of the TGF- β -binding Receptor-Complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies.* Journal of Cellular Physiology 188, 1–7, 2001.
- [47] J. F. Fowler., *Dose response curves for organ function or cell survival.* Radiol 56, 497–500, 1983.
- [48] Frank J., Barker J.H., Marzi I., Mutschler W., *Modern therapy of chronic wounds with respect to radiation.* Strahlenther Onkol, Suppl III 174, 69–73, 1998.
- [49] Frank S., Madlener M., Werner S., *Transforming growth factor β 1, β 2, β 3 and their receptors are differentially regulated during normal wound healing.* J Biol Chem 271, 10188–10193, 1996.
- [50] Funsenig N.E., Breitkreutz D., Boukamp P., Bohnert A., Mackenzie I.C., *Epithelial-mesenchymal interactions in tissue homeostasis and malignant transformation.* In „Oral Cancer: Detection of Patients and Lesions at Risk“, edited by Johnson N.W., Cambridge University Press, Cambridge, 218–256, 1991.

- [51] Gassmann M.G., Werner S., *Caveolin-1 and -2 expression is differentially regulated in cultured keratinocytes and within the regenerating epidermis of cutaneous wounds*. Experimental Cell Research 258, 23–32, 2000.
- [52] Gay S., Martin G.R., Muller P.K., Timpl R., Kuhn K., *Simultaneous synthesis of types I and III collagen by fibroblasts in culture*. Proc Natl Acad Sci USA 73, 4037–4040, 1976.
- [53] Gay S., Miller E.J., *What is collagen, what is not*. Ultrastruct Pathol 4, 365–377, 1983.
- [54] Godin C., Caprani A., Dufaux J., Kluad P., *Interactions between neutrophils and endothelial cells*. J Cell Sci 106, 441–452, 1993.
- [55] Gold L.I., Jussila T., Fusenig N.E., Stenbäck F., *TGF β isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis*. J Pathol 90, 579–588, 2000.
- [56] Gottlöber P., Krähn G., Peter R.U., *Das kutane Strahlensyndrom*. Hautarzt 51, 567–574, 2000.
- [57] Greenhalgh D.G., *The role of growth factors in wound healing*. The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care 41, 159–167, 1996.
- [58] Grinnell F., Toda K., Takashima A., *Activation of keratinocyte fibronectin receptor function during cutaneous wound healing*. J Cell Sci Suppl 8, 199–209, 1987.
- [59] Grinnell F., Toda K., Lamke-Seymour C., *Reconstitution of human epidermis in vitro is accompanied by transient activation of basal keratinocyte spreading*. Exp Cell Res 172, 439–449, 1987.
- [60] Guerrero-Esteo M., Sanchez-Elsner T., Letamendia A., Bernabeu C., *Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II*. J Biol Chem 277, 29197–29209, 2002.
- [61] Gumina R.J., *Antibody to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury*. Circulation 94, 3327–3333, 1996.
- [62] Hall E.J., *Radiobiology for the radiologist*. J B Lippincott Co, Philadelphia, 1–521, 1988.
- [63] Hallahan D.E., Virudachalam S., *Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation*. Medical Sciences 94, 6432–6437, 1997.
- [64] Hakenjos L., Bamberg M., Rodemann H.P., *TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype*. Int J Radiat Biol 76, 503–509, 2000.

- [65] Hellmann S., Botnick L.E., *Stem cells depletion: an explanation of the late effects of cytotoxins*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2, 181–184, 1977.
- [66] Herskind C., *The role of cytokines in the development of normal-tissue reaction after radiotherapy*. Strahlenther Onkol 174, Suppl. III, 12–15, 1998.
- [67] Hofstädter F., *Pathologie der Wundheilung*. Der Chirurg 66, 174–181, 1995.
- [68] Hopewell J.W., *The importance of vascular damage in the development of late radiation effects in normal tissue*. In Radiation Biology in Cancer Research, edited by Meyn, Withers, Raven Press, New York, 449–459, 1980.
- [69] Hopewell J.W., *The skin: its structure and response to ionizing radiation*. Int J Radiat Biol 57, 751–773, 1990.
- [70] Hubbard A.K., Rothlein R., *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades*. Free Radic Biol Med 28, 1379–1386, 2000.
- [71] Janssens S., Bols L., Vandermeeren M., Daneels G., Borgers M., Geysen J., *Retinoic acid potentiates TNF-alpha-induced ICAM-1 expression in normal human epidermal keratinocytes*. Biochem Biophys Res Commun 255, 64–69, 1999.
- [72] Jeschke M.G., Richter G., Hofstader F., Herndorn D.N., Perez-Polo J.R., Jauch K.W., *Non-viral liposomal keratinocyte growth factor (KGF) cDNA gene transfer improves dermal and epidermal regeneration through stimulation of epithelial and mesenchymal factors*. Gene Ther 9, 1065–1074, 2002.
- [73] Johnson F.R., McMinn R.M., *The cytology of wound healing of body surface in mammals*. Biol Rev 35, 1965.
- [74] Juhasz I., Murphy G.F., Yan H.C., Herlyn M., Albelda S.M., *Regulation of extracellular matrix proteins and integrin cell substratum adhesion receptors on epithelium during cutaneous human wound healing in vivo*. Am J Pathol 143, 1458–1469, 1993.
- [75] Khan W.B., Shui C.X., Ning S.C., Knox S.J., *Enhancement of murine intestinal stem cell survival after irradiation by keratinocyte growth factor*. Rad Res 148, 248–253, 1997.
- [76] Kehe K., Abend M., Kehe K., Ridi R., Peter R.U., van Beuningen D., *Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line*. Arch Dermatol Res 291, 600–605, 1999.
- [77] Kingsley D.M., *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*. Genes Dev 8, 133–146, 1994.
- [78] Kovas E.J., Di Pietro L.A., *Fibrogenic cytokines and connective tissue production*. J FASEB 8, 854–861, 1994.

- [79] Komarcevic A., *The modern approach to wound treatment*. Med Pregl 53, 363–368, 2000.
- [80] Labat Robert J., Bihari Varga M., Robert L., Chakrabarty S., Fan D., Varani J., *Extracellular matrix modulation of differentiation and proliferation in human colon carcinoma cells by transforming growth factor beta 1 and beta 2*. FEBS Lett 268, 386–393, 1990.
- [81] Larjava H., Zhou C., Larjava I., Rahemtulla F., *Immunolocalization of $\beta 1$ integrin in human gingival epithelium and cultures keratinocytes*. Scand J Dent Res 100, 266–273, 1992.
- [82] Larjava H., Salo T., Haapasalmi K., Kramer R.H., Heino J., *Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes*. J Clin Invest 92, 1425–1435, 1993.
- [83] Lawrence W.T., *Physiology of the acute wound*. Wound Healing 25, 321–340, 1998.
- [84] Lee D.-Y., Ahn H.-T., Cho K.-H., *A new skin equivalent model: dermal substrate that combines de-epidermized dermis with fibroblast-populated collagen matrix*. J Dermatol Sci 23, 132–137, 2000.
- [85] Letamendia A., Lastres P., Botella L.M., Raab U., Langa C., Velasco B., Attisano L., Bernabeu C., *Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan*. J Biol Chem 273, 33011 – 33019, 1998.
- [86] Levy L., Broad S., Diekmann D., Evans R.D., Evans F., Watt M., *$\beta 1$ Integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms*. Mol Biol Cell 11, 453–466, 2000.
- [87] Liebich H-G., *Funktionelle Histologie* Schattauer, Stuttgart-New York 1990
- [88] Lille J.H., MacCallum D.K., Jepsen A., *Growth of stratified squamous epithelium on reconstituted extracellular matrices: long-term culture*. J Invest Dermatol 90, 100–109, 1988.
- [89] Lin T.J., Ho C.K., Chen C.Y., Tsai J.L., Tsai M.S., *Two episodes of ethylene oxide poisoning- a case report*. Kaohsiung J Med Sci 7, 372–376, 2001.
- [90] Linke S.P., *p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation*. Cancer Res 57, 1171–1179, 1997.
- [91] Lyakhovick A., Aksenow N., Pennanen P., Miettinen S., Ahonen M.H., Syvl H., Ylikomi T., Tuohimaa P., *Vitamin D induced up-regulation of Keratinocyte growth factor (FGF-7/KGF) in MCF-7 human breast cancer cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications 273, 675–680, 2000.

- [92] Lyons R.M., Gentry L.E., Purchio A.F., Moses H.L., *Mechanism of activation of latent recombinant transforming Growth Factor β 1 by plasmin*. J Cell Biol 110, 1361–1367, 1990.
- [93] MacDonald K.P., Hill G.R., *Keratinocyte Growth Factor (KGF) in hematology and oncology*. Curr Pharm Des 8, 395–403, 2002.
- [94] Marchese C., Chedid M., Dirsch O.R., Csaky K.G., Santanelli F., Latini C., LaRochelle W.J., Torrisi M.R., Aaronson S.A., *Modulation of Keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin*. J Exp. Med 182, 1369–1376, 1995.
- [95] Marenholz I., *Molekulargenetische Charakterisierung des Epidermalen Differenzierungs-komplex (EDC) auf Chromosom 1 des Menschen*. Marenholz I., Dissertation im Fachbereich Biologie Chemie Pharmazie der Freien Universität Berlin, 2001.
- [96] Maas-Szabowski N., Stark H.J., Fusenig N.E., *Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced Keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts*. J Invest Dermatol 114, 1075–1084, 2000.
- [97] Matsumoto K., Robb E., Warden G., Nordlund J., *The expression of cytokines, growth factors and ICAM-1 in the healing of human cutaneous xenografts on nude mice*. Exp Dermatol 6, 13–21, 1997.
- [98] Meineke V., Moede T., Gilberts K.P., Mayerhofer A., Ring J., Köhn F-M., van Beuningen D., *Protein kinase inhibitors modulate time dependent effects of UV and ionizing irradiation on ICAM-1 expression on human heptoma cells*. Int J Radiat Biol 78, 577–583, 2002.
- [99] Meineke V., Gilberts K.P., Schilperoort K., Cordes N., Sandler A., Moede T., van Beuningen D., *Ionizing radiation modulates cell surface integrin expression and adhesion of COLO-320 cells to collagen and fibronectin in vitro*. Strahlenther Radioonkol 178, 709–714, 2002.
- [100] Meineke V., *Molekulare Diagnostik und Therapie von Strahlenschäden*. Habilitationsschrift im Fachbereich Humanmedizin, TU München, 2003.
- [101] Meineke V., Müller C., Köhn F-M., Mayerhofer A., Hoffmann H., Cordes N., Ring J., van Beuningen D., *Adhesion behavior cells - Comparison between an artificial skin model, human skin biopsies and monolayer cells*. Mol Radiat Biol Onkol 2, edited by S. Bodis, E. Dikomey, H.P. Rodemann, 2001.
- [102] Messerschmidt O., *Combined effects of radiation and trauma*. Adv Space Res 9, 197–201, 1989.
- [103] Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C-H., *Smad regulation in TGF-beta signal transduction*. J Cell Sci 114, 4359–4369, 2001.

- [104] Murohara T., Delyani J.A., Albelda S.M., Lefer A.M., *Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats*. J Immunol 156, 3550–3557, 1996.
- [105] Murphy-Ulrich J.E., Schultz-Cherry S., Hook M., *Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin*. Mol Biol Cell 3, 181–188, 1992.
- [106] Mutsaers S.E., Bishop J.E., McGrouther G., Laurent G.J., *Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol 29, 5–17, 1997.
- [107] Nagaoka T., Kaburagi Y., Hamaguchi M., Hasegawa M., Takehara K., Steeber D.A., Tedder T.F., Sato S., *Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression*. Am J Pathol 157, 237–247, 2000.
- [108] Naish S.J., *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden* DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, <http://www.dako.com>, 3. überarbeitete Auflage 08/97, 22–36, 1998.
- [109] Neta R. *Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action*. Envir Health Perspect Suppl 106, 1463–1465, 1997.
- [110] www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/lab/adhesion.htm#emigration
- [111] O’kane S., Ferguson M.W.J., *Transforming growth factor β 's and wound healing*. Int J Biochem Cell Biol 29, 63–78, 1997.
- [112] Peter R.U., *Das kutane Strahlensyndrom nach Strahlenunfällen*. Habilitationsschrift im Fachbereich Humanmedizin, LMU München, 1994.
- [113] Pierelli L., Bonanno G., Rutella S., Marone M., Scambia G., Leone G., *CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells*. Leuk Lymphoma 42, 1195–1206, 2001.
- [114] Plopper G.E., McNamee H.P., Dike L.E., Bojanowski K., Ingber D.E., *Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex*. Mol Biol Cell 6, 1349–1365, 1995.
- [115] Ponc M., *Reconstruction of human epidermis on de-epidermized dermis: Expression of differentiation-specific protein markers and lipids composition*. Toxic in Vitro 5, 597–606, 1991.
- [116] Le Poole I.C., Boyce S.T., *Keratinocytes suppress transforming growth factor- β 1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes*. Br J Dermatol 140, 409–416, 1999.
- [117] Potten C.S., Morris R.J., *Epithelial stem cells in vivo*. J Cell Sci Suppl 10, 45–62, 1988.
- [118] Potten C.S., Allen T.D., *The fine structure cell kinetics of mouse epidermis after wounding*. J Cell Sci 17, 143–147, 1997.

- [119] Prince L.S., Karp P.H., Moninger T.O., Welsh M.J., *KGF alters gene expression in human airway epithelia: potential regulation of the inflammatory response*. *Physiol Genomics* 17, 81-89, 2001.
- [120] Pruniéras M., Régnier M., Woodley D., *Methods of cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface*. *J Invest Dermatol* 81, 28-33, 1983.
- [121] Pruniéras M., Régnier M., Schlotterer M., *Nouveau procédé de culture des cellules épidermiques humaines sur derme homologue ou hétérologue: préparation de greffons recombinés*. *Ann Chir Plast* 24, 375-362, 1979.
- [122] Putnins E.E., Firth J.D., Lohachitranont A., Uitto V-J., Larjava H., *Keratinocyte growth factor (KGF) promotes keratinocyte cell attachment and migration on collagen and fibronectins*. *Cell Adhesion and Communication* 7, 211-221, 1999.
- [123] Quarmby S., Kumar P., Kumar S., *Radiation-induced normal tissue injury: Role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions*. *Int J Cancer* 82, 385-395, 1999.
- [124] Roberts A.B., Anzano M.A., Lamb L.C., Smith J.M., Sporn M.B., *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 5339-5343, 1981.
- [125] Rodemann H.P., Bamberg M., *Cellular basis of radiation-induced fibrosis*. *Radiother Oncol* 35, 83-90, 1995.
- [126] Rosen E.M., Fan S., Rockwell S., Goldberg I.D., *The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation*. *Cancer Invest* 17, 56-72, 1999.
- [127] Richter K.K., Langberg C.W., Sung C.C., Hauer-Jensen M., *Increased transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity is independently associated with chronic injury in both consequential and primary radiation enteropathy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39, 187-195, 1997.
- [128] Richter K.K., Langberg C.W., Sung C.C., Hauer-Jensen M., *Association of transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity with histopathological lesions in subacute and chronic experimental radiation enteropathy*. *Radiother Oncol* 39, 243-251, 1996.
- [129] Rubin J.S., Osada H., Finch P.W., Taylor W.G., Rudikoff S., Aaronson S.A., *Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 802-806, 1989.
- [130] Rulo H.F.C., Westphal J.R., van de Kerkhof P.C.M., de Waal R.M.W., van Vlijmen I.M.J.J., Ruiten D.J., *Expression of endoglin in psoriatic involved and uninvolved skin*. *J Dermatol Sci* 10, 103-109, 1995.

- [131] Sanchez-Elsner T., Botella L.M., Velasco B., Langa C., Bernabeu C., *Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways*. J Biol Chem 277, 43799–43808, 2002.
- [132] Schfer-Korting M., *Nutzen und Grenzen knstlicher Hautmodelle aus der Sicht der Dermatopharmakologie*. www.zet.or.at/publikationen/buecher/band-iv/schafer.htm - 89k
- [133] Schilperoort K., *Wirkung ionisierender Strahlung auf die Expression zellularer Adhäsionsmoleküle auf Tumorzellen und deren Adhäsionsverhalten in vitro*. Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, 1999.
- [134] Schultz-Cherry S., Lawler J., Murphy-Ullrich J.E., *The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta*. J Biol Chem 269, 26783–26788, 1994.
- [135] Schoof H., Apel, Heschel, Rau *Control of pore structure und size in freeze-dried collagen sponges*. J Biomed Mater Res 58, 71–94, 2001.
- [136] Scholzen T., Gerdes J., *The Ki-67 protein: from known and the unknown*. J Cell Physiol 182, 311–322, 2000.
- [137] Schoop V.M., Mirancea N., Fusenig N.E., *Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic cocultures with human dermal fibroblasts*. J Invest Dermatol 112, 343–353, 1999.
- [138] Schlunegger M.P., Grutter M.G., *An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta2*. Nature 358, 430–434, 1992.
- [139] Smola H., Thiekötter G., Fusenig N.E., *Mutual induction of Growth Factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction*. J Cell Biol 122, 417–429, 1993.
- [140] Slonina D., Hoinkis C., Dorr W., *Effect of keratinocyte growth factor on radiation survival and colony size of human epidermal keratinocytes in vitro*. Radiat Res 156, 761–766, 2001.
- [141] Souchelnytskyi S., Rnnstrand L., Heldin C.-H., ten Dijke P., *Phosphorylation of smad signaling proteins by receptor serine/threonine kinases*. Methods Mol Biol 124, 107–20, 2001.
- [142] Stark H.J., Baur M., Breitkreuz D., Mirancea N., Fusenig N.E., *Organotypic keratinocyte Cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation*. J Invest Dermatol 112, 681–691, 1999.
- [143] Steel G.G., *Growth kinetics of tumor*. Clarendon press, Oxford, 1977.

- [144] Sun T-T., Eichner R., Schermer A., Cooper D., Nelson W.G., Weiss R.A., *Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: an unifying model*. In „The Transformed Phenotype, Cancer Cell“, edited by Laboratory C.S.H., Cold Spring Harbor, New York 1, 169–176, 1984.
- [145] Takeoka M., Ward W.F., Pollack H., Kamp D.W., Panos R.J., *KGF facilitates repair of radiation-induced DNA damage in alveolar epithelial cells*. Am J Physiol 272, 1174–1180, 1997.
- [146] Teubner B.G., *Teubner-Taschenbuch der Mathematik*. B.G. Teubner Verlagsgesellschaft Leipzig, 1996.
- [147] Tibbs M.K., *Wound healing following radiation therapy: a review*. Radiother Oncol 42, 99–106, 1997.
- [148] Turner M.L., *Cell adhesion molecules: a unifying approach to topographic biology*. Biol Rev 67, 359–377, 1992.
- [149] Van der Flier A., Sonnenberg A., *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res 305, 285–298, 2001.
- [150] van der Stolpe A., van der Saag P.T., *Intercellular adhesion molecule-1*. J Mol Med 74,13 –33, 1996.
- [151] Vogel W.F., *Collagen-receptor signaling in health and disease*. Eur J Dermatol 11, 506–514, 2001.
- [152] Vogt P.M., Lehnhardt M., Wagner D., Jansen V., Krieg M., Steinau H.U., *Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion*. Plast Reconstr Surg 102, 117–123, 1998.
- [153] Vozenin-Brotans M.C., Gault N., Sivan V., Tricaud Y., Dubray B., Clough K., Cosset J-M., Lefaix J-L., Martin M., *Histopathological and cellular studies of a case of cutaneous radiation syndrome after accidental chronic exposure to a cesium source*. Radiat Res 152, 332–337, 1999.
- [154] Wagner S., Kimmerle E., Coerper S., Becker H.D., *Nachweismöglichkeiten von Wachstumsfaktoren in chronischen Wunden RNA- und Protein-Nachweis im Wundgewebe*. Zentralbl Chir, Suppl 1 125, 60–62, 2000.
- [155] Wang J.M., Kumar S., van Agthoven A., Kumar P., Pye D., Hunter R.D., *Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells*. Int J Cancer 62, 791–796, 1995.
- [156] Wang J., Zhen H., Sung C.C., Richter K.K., Hauer-Jensen M., *Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy*. Am J Pathol 153, 1531–1540, 1998.
- [157] Walcher W., *Praktikum der Physik*. B.G. Teubner Stuttgart, 3. Aufl., 1974.

- [158] Watt F.M., Boukamp P., Hornung J., Fusenig N.E., *Effect of growth environment on spatial expression of involucrin by human epidermal keratinocytes*. Arch Dermatol Res 279, 335–340, 1987.
- [159] Wearing H.J., Sherratt J.A., *Keratinocyte growth factor signalling: a mathematical model of dermal-epidermal interaction in epidermal wound healing*. Mathematical Biosciences 165, 41–62, 2000.
- [160] S. Werner., *Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes*. Cytokine Growth Factor Rev 9, 153–165, 1998.
- [161] Wester R.C., Hartway T., Serranzana S., Maibach H.I., *Human skin in vitro percutaneous absorption of gaseous ethylene oxide from fabric*. Food Chem Toxicol 35(5), 513–515, 1997.
- [162] Wheldon T.E., Michalowski A.S., Kirk J., *The effect of irradiation on function in self-renewing normal tissues with differing proliferation organisation*. Br J Radiol 55, 759–766, 1982.
- [163] Williams M.A., Solomkin J.K., *Integrin mediated signaling in human neutrophil functioning*. J Leukol Biol 65, 725–736, 1999.
- [164] Winkles J.A., Alberts G.F., Chedid M., Taylor W.G., Dermatino S., Rubin J.S., *Differential expression of the keratinocyte Growth Factor (KGF) and KGF receptor genes in human vascular smooth muscle cells and arteries*. J Cell Physiol 173, 380–386, 1997.
- [165] Withers H.R., *The four R's of radiotherapy*. Advances Radiat Biol 5, 241–271, 1975.
- [166] Wysocki A.B., *Skin anatomy, physiology and pathology*. Nurs Clin Norh Am 34, 777–797, 1999.
- [167] Yi E.S., Williams S.T., Lee H., Malicki D.M., Chin E.M., Yin S., Tarpley J., Ulich T.R., *Keratinocyte Growth Factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality*. Am J Pathol 149, 1963–1970, 1996.
- [168] Ono I. *Roles of cytokines in wound healing processes*. Nippon Geka Gakkai Zasshi 100, 522–528, 1999.
- [169] Zhang Z., Monteiro-Riviere N.A., *Comparison of integrins in human skin, pig skin, and perfused skin: an in vitro skin toxicology model*. J Appl Toxicol 17, 247–253, 1997.

Lebenslauf

Personalien	Name	Tamara Arend, geb. Rost
	Geburtsdatum	23.12.1971
	Geburtsort	Gschwend (Ostalbkreis), Baden-Württemberg
	Familienstand	Verheiratet seit Februar 2001 mit Nikolas Arend, Dipl. Physiker
Schulbildung	1978-1982	Grundschule Gschwend
	1982-1986	Hauptschule Gschwend
	1986-1988	Realschule Gaildorf Abschluss: Mittlere Reife
	1988-1991	Wirtschaftsgymnasium Schwäbisch Gmünd Abschluss: Allgemeine Hochschulreife: „Gut“
Berufsausbildung	1991-1993	Landwirtschaftslehre im Betrieb Friedrich und Matthias Rost GbR, Gschwend Abschluss: Landwirtin
Hochschulbildung	1993-1999	Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München Abschluss: Veterinärmedizinerin, Gesamtergebnis der tierärztlichen Prüfungen: „Gut“
	Juli 1998-Mai 2000	Tätigkeit als studentische Hilfskraft an der II. Medizinischen Tierklinik München
	Januar 2000	Approbation als Tierärztin
Promotion	Beginn Januar 2000	Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München Leiter: Prof. Dr. med. D. van Beuningen Doktorvater: Prof. Dr. W. Schmahl, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, LMU München
	Eingereicht	Oktober 2003

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. W. Schmahl aussprechen, für seine hilfreichen und liebenswürdigen Ratschläge zur Anfertigung dieser Arbeit und die Vertretung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.

Herrn Prof. Dr. D. van Beuningen danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des gut ausgestatteten Arbeitsplatzes und das Ermöglichen der Studie im Institut für Radiobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr. Seine angenehme Art und das Interesse am Fortgang der Arbeit habe ich sehr geschätzt.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. habil. V. Meineke, möchte ich für seine stets freundliche und geduldige Unterstützung der Arbeit danken. Trotz seines vollen Terminkalenders hat er immer Zeit gefunden, sich meiner Fragen und Probleme anzunehmen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Radiobiologie, besonders Herrn R. Ridi, Frau Dr. C. Müller, Herrn T. König, Frau D. Leipert, Herrn Priv. Doz. Dr. M. Abend, Herrn Dr. K.-P. Gilbertz und Frau Merci Katipoglu. Für die bereitwillig geleistete Unterstützung möchte ich vielmals danken. Ganz herzlich danke ich auch meiner Freundin Angelika Maier für die Durchsicht der Arbeit.

Die großzügige und liebevolle Unterstützung meiner Schwester Elisabeth und meiner Familie (Fam. Rost und Fam. Arend) hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, dafür möchte ich allen ganz besonders danken.

Deine außergewöhnlich liebevolle Unterstützung und Dein Beistand, lieber Nikolas, gaben mir den nötigen Raum und die Zeit, Durststrecken während der Erstellung dieser Arbeit durchzuhalten. Dein Engagement, vor allem in EDV-Belangen, und Deine Kritik waren immer sehr wertvoll. Dafür möchte ich Dir von Herzen danken.