

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
und

Institut für Radiobiologie der Bundeswehr

in Verbindung mit der Universität Ulm

(Leiter: apl. Prof. Dr. V. Meineke)

Modulation der strahleninduzierten zellulären Antwort in humanen Keratinozyten durch Mastzellen (*in vitro*)

Carolina Cäzilia Steger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. V. Meineke

2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 08.03.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.07.2010 angenommen.

Parentibus et marito

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 HINTERGRUND DER ARBEIT	1
1.2 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	6
2. GRUNDLAGEN.....	7
2.1 IONISIERENDE STRAHLUNG.....	7
2.1.1 RÖNTGENSTRAHLUNG	7
2.1.2 WIRKUNG IONISIERENDER STRAHLUNG.....	8
2.1.3 DOSISBEGRIFF	8
2.1.4 AKUTES STRAHLENSYNDROM	8
2.1.5 BIOLOGISCHE STRAHLENWIRKUNG	9
2.2 MASTZELLEN.....	11
2.2.1 DIE ENTDECKUNG DER MASTZELLE	11
2.2.2 HERKUNFT UND ENTWICKLUNG DER MASTZELLEN	11
2.2.3 VORKOMMEN DER MASTZELLEN	12
2.2.4 DIE HETEROGENITÄT DER MASTZELLEN	12
2.2.5 DIE MEDIATOREN DER MASTZELLE.....	14
2.2.6 ALLGEMEINE FUNKTION VON MASTZELLEN UND KLINISCHE BEDEUTUNG	16
2.3. APOPTOSE	18
2.3.1 DEFINITION UND MORPHOLOGIE	18
2.3.2 REGULATION DER APOPTOSE.....	18
2.3.3 STRAHLENINDUZIERTER APOPTOSE.....	19
2.4 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX (EZM).....	20
2.4.1. DEFINITION.....	20
2.4.2 EZM UND IONISIERENDE STRAHLUNG.....	21
2.5 ZYTOKINE.....	21
2.5.1 DEFINITION.....	21
2.5.2 ZYTOKINE UND IONISIERENDE STRAHLUNG.....	22
2.6 ZELL-MATRIX- UND ZELL-ZELL-INTERAKTIONEN.....	23
2.7. INTEGRINE.....	24
2.7.1 INTEGRINE: DEFINITION, AUFBAU UND WIRKMECHANISMUS	24
2.7.2 INTEGRINCLUSTERING	25
2.7.3 INTEGRINE UND IONISIERENDE STRAHLUNG	26
2.8. DIE IMMUNGLOBULINSUPERFAMILIE	27
2.8.1 AUFBAU UND STRUKTUR	27
2.8.2 INTERZELLULÄRE ADHÄSIONSMOLEKÜLE AM BEISPIEL VON ICAM-1	28
2.8.3 ICAM-1-EXPRESSION NACH IONISIERENDER BESTRAHLUNG	29

3. MATERIAL UND METHODEN.....	31
3.1 MATERIAL.....	31
3.1.1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER.....	31
3.1.2 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN REAGENZIEN.....	31
3.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	32
3.1.4 HERSTELLERVERZEICHNIS DER VERWENDETEN GERÄTE	33
3.1.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	34
3.1.6 VERWENDETE SOFTWARE.....	35
3.2 METHODEN	35
3.2.1 VERWENDETE ZELLEN UND ZELLKULTURBEDINGUNGEN	35
3.2.2 BESTRAHLUNG UND BESTRAHLUNGSBEDINGUNGEN	36
3.2.3 ERSTELLEN EINER WACHSTUMSKURVE VON HACAT-ZELLEN	37
3.2.4 KLONOGENITÄTSASSAY.....	38
3.2.5 GENEXPRESSIONSARRAY	39
3.2.6 ISOLATION VON GESAMT-RNA	40
3.2.7 QUANTIFIZIERUNG DER RNA UND ÜBERPRÜFUNG IHRER REINHEIT	41
3.2.8 DURCHFÜHRUNG DES NON-RADIOACTIVE GEARRAY™ SYSTEM	42
3.2.9 AUSWERTUNG DER ARRAYS	44
3.2.10 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON OBJEKTTRÄGERKULTUREN VON HACAT-ZELLEN	46
3.3 STATISTIK	47
4. ERGEBNISSE.....	48
4.1 PROLIFERATIONSKINETIK	48
4.1.1 WACHSTUMSKURVE HACAT-ZELLEN	48
4.1.2 VERGLEICH DER WACHSTUMSKURVEN VON HACAT-ZELLEN IN AN- UND ABWESENHEIT VON MASTZELLEN	49
4.1.3 STRAHLENEFFEKT UNTER EINFLUSS DER MASTZELLEN	53
4.2. KLONOGENITÄTSASSAY VON HACAT-ZELLEN IN KOKULTUR MIT MASTZELLEN	60
4.3 GENEXPRESSIONSARRAY	62
4.3.1 HUMANER APOPTOSIS-1 GEARRAY	62
4.3.2 CHA010919-HUMAN-GEARRAY	68
4.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER HACAT-ZELLEN.....	72
4.4.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR).....	73
4.4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON EGFR (EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR)	75
4.4.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON $\alpha 2\beta 1$ -INTEGRIN UND $\beta 1$ -INTEGRIN	77
4.4.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON TGF β_1 UND TNF α	81
5. DISKUSSION.....	82
5.1 STEIGERUNG DER PROLIFERATION VON KERATINOZYTEN (HACAT) UNTER EINFLUSS VON MASTZELLEN (HMC-1).....	82
5.2 KLONOGENITÄTSASSAY	84
5.3 GENEXPRESSIONSARRAY	88
5.3.1 HUMANER APOPTOSIS-1 GEARRAY	88
5.3.2 MODULATION DER EXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND ZYTOKINEN IN HACAT-ZELLEN	94
5.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE	100
5.4.1 STRAHLENINDUZIERTE MODULATION DES EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) IN HACAT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS.....	101

5.4.2 STRAHLENINDUZIERTE MODULATION DES EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) IN HACAT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS	102
5.4.3 STRAHLENINDUZIERTE MODULATION VON BETA1-INTEGRIN UND ALPHA2 BETA 1-INTEGRIN IN HACAT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS	104
5.4.4 STRAHLENINDUZIERTE MODULATION VON TNF α UND TGF β ₁ IN HACAT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS	107
5.5 AUSBLICK.....	109
6. ZUSAMMENFASSUNG	111
LITERATURVERZEICHNIS	114
ANHANG.....	132
ANHANG 1: ERGEBNISSE DER AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN VON HACAT-ZELLEN	132
ANHANG 2: KOORDINATEN DES GE ARRAY-FORMULARS MIT GENLOKATIONEN.....	133
ANHANG 3: WERTETABELLE DER WACHSTUMSKURVEN.....	136
DANKSAGUNG	137
LEBENS LAUF	138

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung	CED	Caenorhabditis elegans death gene
Ad.mda-7	Adenoviral-mediated delivery of mda-7	cm	Zentimeter
AGF	Angiopoietin-related growth factor	c-myc	myelocytomatosis cancer gene
AIF	Apoptosis inducing factor	Co	Cobalt
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule, synonym mit CD166	CO ₂	Kohlendioxid
AMP	Adenosinmonophosphat	COL4A2	collagen, type IV, alpha 2
AP1	Activator Protein 1, Transkriptionsfaktor	CTMC	connective tissue-type mast cells
APAAP	alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase	CTP	Cytidintriphosphat
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1	DAG	Diacyl-Glycerol
Aqua dest.	Aqua destillata	DAB	3,3' Diaminobenzidine
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	d	Tag
ATP	Adenosin Tri-Phosphat	DD	Death domain
β1	beta-1 Kette der Integrine, synonym mit CD29	DED	Death effector domain
Bad	Bcl2-antagonist of cell death	dH ₂ O	destilliertes Wasser
Bak	Bcl2-antagonist/killer 1	DISC	Death-inducing signaling complex
Bax	Bcl2-associated x protein	DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	DMSO	Dimethylsulfoxid
Bcl2l1	B-cell lymphoma 2-like1, synonym mit Bclx	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Bcl2l2	B-cell lymphoma 2-like2, synonym mit Bclw	E2F-1	E2F transcription factor 1
Bid	BH3 interacting domain death agonist	EB	Ethidiumbromid
Bok	Bcl2-related ovarian killer protein	ECM	Extracellular matrix
Btk	Bruton´s tyrosine kinase	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ca.	circa	EGF	Epidermal growth factor
CAMs	Zelluläre Adhäsionsmoleküle	EGFR	Epidermal growth factor receptor
CARD	Caspase activator recruitment domain	ER	Endoplasmatisches Retikulum
Casp	Caspase	etc.	et cetera
CD	Cluster of differentiation	et al.	et alteri
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	EZM	Extrazelluläre Matrix
		Fa.	Firma
		FAK	Fokale Adhäsionskinase
		FAs	Fokale Adhäsionskomplexe
		FasL	Fas Ligand
		FCS	Fötales Kälberserum
		FGF	Fibroblast growth factor
		FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
		FN1	Fibronektin 1
		g	Gramm
		GADD45A	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 45A
		GFR	Growth factor receptor

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor	MDM2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	µg	Mikrogramm
GTP	Guanosintriphosphat	MHC	Major Histocompatibility Complex
Gy	Gray; SI-Einheit der Energiedosis ($J \times kg^{-1}$)	min	Minute
h	Stunde	MIP-1 α	makrophage inflammatory protein 1-alpha
HaCaT-Zellen	humane immortalisierte Keratinozytenzelllinie	ml	Milliliter
HE	Hämatoxylin-Eosin	µl	Mikroliter
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Patientin Henrietta Lacks)	mm	Millimeter
HL-60	Human promyelocytic leukemia cells	mM	Millimol
HMC-1	Humane Mastzellleukämie-Zelllinie-1	µM	Mikromolar
HR	Homologe Rekombination	MMC	Mucosal Mast Cells
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, synonym mit CD54	MMCP-6	Mouse Mast Cell Protease-6
ICAM-2	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-2, synonym mit CD102	MMP	Matrix-Metalloproteinasen
ICAM-3	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-3, synonym mit CD50	mU	Milliunit
Ig	Immunglobulin	NaCl	Natriumchlorid
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie	NF-AT	Nuclear Factor of Activated T-Cells, Transkriptionsfaktor
IL	Interleukin	NF κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
ILK	Integrin-linked Kinase	NGF	Nerve growth factor
Int	Integrin	NHEJ	Nicht-homologes Endjoining
IP ₃	Inositoltriphosphat	nm	Nanometer
kD	Kilodalton	NOS2A	nitric oxide synthase 2 A
keV	1 kiloelectron volt = $1.60217646 \times 10^{-16}$ joules	o.g.	oben genannt
kg	Kilogramm	OT	Objektträger
kV	Kilovolt	PBS	Phosphate Buffered saline
l	Liter	PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
M	Molar (Mol pro Liter)	PCR	Polymerase chain reaction
mA	milliAmpere	PECAM-1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, synonym mit CD31
Mac-1	member of AAA family binding CED-4	pFA	Paraformaldehyd
MC	Mast Cell	PG	Prostaglandin
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule, synonym mit CD146 oder MUC18	pH	pondus Hydrogenii
		PIG7	LPS-induced TNF-alpha factor
		PIG8	p53-induced protein 8
		PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
		P I3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
		PKC	Proteinkinase C
		PL	Phospholipase
		PPD	Paraphenylendiamin

p.r.	post radiationem	TGF β	Transforming growth factor beta
RB1	Retinoblastoma 1	TGFBR1	Transforming growth factor beta receptor 1
RBW	Relative biologische Wirksamkeit	TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
RGD-Sequenz	Aminosäuresequenz aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure, im Einbuchstaben-Code RGD	TNF α	Tumor necrosis factor alpha
RNA	Ribonukleinsäure	TNF-R1	Tumornekrosefaktorrezeptor 1
ROI	Reactive oxygen intermediates	TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
rpm	rounds per minute	TNFRSF10B	Tumornekrosefaktor receptor superfamily 10B, synonym mit DR5 oder CD262
RT	Raumtemperatur	TNFSF6	Tumornekrosefaktor superfamily member 6, synonym mit Fasligand oder CD95L
RT-PCR	Reverse transkription-polymerase chain reaction	TTP	Thymidintriphosphat
SCF	Stem Cell Factor	U	Unit
SDS	Sodiumdodecylsulfat	UV	Ultraviolett
SEM	Standardabweichung	V	Volt
SIE	Small intestinal epithel	VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1, synonym mit CD106
SSC	Standard Saline Citrat	VEGF	Vascular endothelial growth factor
Sv	Sievert	VIP	Vasointestinales Peptid
T	Time	z. B.	zum Beispiel
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TdT	Terminale Desoxynucleotidyltransferase		
TGF α	Transforming growth factor alpha		

1. EINLEITUNG

Wird humane Haut einer ionisierenden Strahlung ausgesetzt, resultiert dosisabhängig eine Entzündungsreaktion, in deren Folge Keratosen, Fibrosen, Ulzera oder Karzinome entstehen können. Unmittelbar nach Bestrahlung ist in der Haut eine signifikante Vermehrung von Entzündungszellen, wie z.B. von neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen, zu beobachten (Kligman und Murphy 1996, S. 123-127; Gottlöber et al. 2000, S. 567-574).

1.1 HINTERGRUND DER ARBEIT

Das Hautorgan ist bei fast allen denkbaren Expositionsmustern durch ionisierende Strahlung mitbetroffen. Hoch-Dosis-Bestrahlung kann zu Hautkrebs und zur akuten Strahlenkrankheit der Haut führen (Koike et al. 2005, S. 173-184). Unter der Bezeichnung „kutane Strahlenreaktion“, auch bekannt unter dem Begriff „kutanes Strahlensyndrom“ (Peter et al. 1994, S. 719-723, Peter 1996b, S. 237-240), wird die Gesamtheit der durch Strahlenwirkung induzierten pathophysiologischen Reaktionen und klinischen Symptome verstanden, die an der Haut, ihren Anhangsgebilden und den sichtbaren Schleimhäuten in charakteristischer, phasenhafter Abfolge auftreten (Peter 1996b, S. 237-240; Gottlöber et al. 2000, S. 567-574). Das kutane Strahlensyndrom wird durch ionisierende Strahlung ausgelöst. Die genauen Mechanismen der Entstehung von Hautschäden nach Exposition mit ionisierender Strahlung hat in den letzten Jahren wesentliche Erweiterung erfahren. Wurde bisher die Strahlenwirkung im Wesentlichen in der Proliferationsinhibition ansonsten teilungsaktiver Zellen begründet, vergrößern sich zunehmend die Kenntnisse hinsichtlich der modulatorischen Wirkung ionisierender Strahlung auf die Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen (Müller und Meineke 2007, S. 96-104). Ionisierende Strahlung führt zur Ionisation von Biomolekülen. Findet diese an der DNA statt, so sind Mutationen die Folge (Peter 1996a, S. 7-24). In der Literatur wird eine direkte Strahlenwirkung auf die DNA-Moleküle beschrieben und eine indirekte Wirkung, wobei es intrazellulär durch ionisierende Strahlung zur Induktion von freien Radikalen kommen kann, die dann im zweiten Schritt DNA-Schäden verursachen (Peter 1996a, S. 7-24). In der Folge kommt es zur Proliferationshemmung, die entweder unmittelbar oder erst

nach einigen Zellteilungen wirksam wird. Apoptotischen Prozessen kommt hierbei eine große Bedeutung zu. Dem steht die Möglichkeit der Zelle zur Reparatur gegenüber (Peter 1996a, S. 7-24). Hierbei wird eine Reihe von Genen, die eine Regeneration bewirken, angeschaltet. Überwiegt die Strahlenschädigung, zum Beispiel mit Funktionsausfall in strahlenprotektiven regulatorischen Transkriptionsfaktor-, Tumorsuppressor- oder Zytokingenen, so kann es zu schweren Hautspätschäden wie Fibrosierung, Keratosen (Rodemann und Bamberg 1995, S. 83-90; Vozenin-Brotans et al. 1999, S. 332-337), aber auch zu kanzerogenen Folgen kommen. Als Krebsspätfolgen nach Bestrahlung sind in erster Linie Basaliome und Plattenepithelkarzinome (Charles 2001, S. 83-86) zu erwarten. Im Kollektiv der Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki konnte ein verstärktes Auftreten von Hauttumoren beobachtet werden. Bei vielen dieser Fälle spielte jedoch eine Exposition zu UV-Bestrahlung eine zusätzliche, verstärkende Rolle (Yamada et al. 1996, S. 223-226). Aber auch bei Radiotherapiepatienten werden gehäuft sekundäre Hauttumoren beobachtet (Lichter et al. 2000, S. 1007-1011). Inwieweit maligne Melanome als Sekundärfolge nach Bestrahlung entstehen können, ist bis heute noch unklar (Shore 2001, S. 549-554).

Der phasenhafte Verlauf der kutanen Strahlenreaktion wurde als erstes von Holzknecht (1903, S. 71-76) und Miescher (1935, S. 43-64) beschrieben. Es werden ein Prodromalstadium, ein Manifestationsstadium, ein subakutes Stadium, ein chronisches Stadium und ein Spätstadium unterschieden (Kärcher 1979, S. 804-810; Peter et al. 1994, S. 719-723). Während des Prodromalstadiums ist ein vorübergehendes Erythem charakteristisch, eventuell verbunden mit Juckreiz und Brennen. Für das Manifestationsstadium sind klar begrenzte Erytheme an den betroffenen Körperregionen kennzeichnend, die meist ödematös verdickt sind. 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 und akute Strahlenulzera, die scharf begrenzte demarkierte Nekrosezonen darstellen, die entweder von einer ischämischen Randzone oder einem entzündlichen Erythem umgeben sind. Das subakute Stadium zeigt hauptsächlich livide Erytheme, die häufig von Ulzerationen in vermeintlich unbeschädigtem Gewebe begleitet werden. Weniger häufig sind Blasenbildungen anzutreffen. Die chronische Phase

manifestiert sich klinisch mit diffuser Atrophie der Haut mit Erythemen, Hypo- und Hyperpigmentierungen, Teleangiektasien, Keratosen sowie dermalen bzw. subkutanen entzündlichen Fibrosen und Ulzera. Symptome des Spätstadiums sind Ulzera, Teleangiektasien und Neoplasien mit langen Latenzzeiten (Jahrzehnte) (Goldschmidt 1982, S. 183-190; Hopewell 1990, S. 751-773; Gottlöber et al. 2000, S. 567-574). Welche Rolle Mastzellen in der kutanen Strahlenreaktion spielen, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Die Funktion von Mastzellen im Immunsystem ist bis heute in weiten Bereichen ungeklärt. Bekannt ist, dass Mastzellen über ihre Beteiligung an einer Vielzahl von unterschiedlichen chronischen und akut entzündlichen Vorgängen die Immunantwort modulieren können. Ihr Gehalt an multifunktionalen Mediatoren und ihre besondere Lokalisation *in vivo*, die sie zur Interaktion mit vielen anderen Zellen (Fibroblasten, Epi- und Endothelzellen, Nerven, glatte Muskelzellen etc.) befähigt, macht die Mastzelle zu einem funktionell universellen Zelltyp (Galli 1993, S. 257-265). Die ausschließliche Untersuchung der Mastzellen selbst aber ist zum Verstehen ihrer Bedeutung und Funktion nicht mehr ausreichend. Vielmehr erscheint es notwendig, die Rolle der Mastzellen im zellulären Kontext zu klären. In diesem Zusammenhang könnte die potentielle Wechselwirkung von Mastzellen mit anderen Zelltypen von besonderer Bedeutung sein.

Mastzellen nehmen in der Haut vielfältige Funktionen wahr. Über ihren Einfluss auf die Zelldifferenzierung von Keratinozyten ist bisher wenig bekannt (Artuc et al. 2002, S. 411-415). Bekannt ist, dass Mastzellmediatoren die Reepithelialisierung, also die Migration und Proliferation von Keratinozyten beeinflussen (Noli und Miolo 2001, S. 303-313; Vliagoftis et al. 1999, S. 656-662). Der Mastzellmediator Nerve Growth Factor (NGF) z.B. stimuliert das Wachstum humaner Keratinozyten, erhöht die Mitogenität mehrerer Wachstumsfaktoren für Keratinozyten und fördert die Produktion des Vasointestinalen Peptids (VIP) durch Nervenfasern, das seinerseits mitogen auf Keratinozyten wirkt (Sung et al. 1999; S. 435-446; Hermes et al. 2001, S. 387-393). Interleukin-1 induziert in Fibroblasten die Synthese von Wachstumsfaktoren für Keratinozyten (Maas-Szabowski et al. 1999, S. 1843-1853) und der Angiopoietin-related Growth Factor (AGF) fördert die epidermale Proliferation und Regeneration in Keratinozyten (Oike et al. 2003, S. 9494-9499). Auch

Tryptase kann die Proliferation humaner Keratinozyten fördern (Cairns und Walls 1996, S. 275-283). Der Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) stimuliert *in vitro* in einer humanen Keratinozytenkultur die Migration der Keratinozyten nach einer Schnittverletzung (Ozkaptan et al. 1997, S. 2-5). Der Tumornekrosefaktor alpha ($TNF\alpha$) kann Apoptose in Keratinozyten induzieren (Reinartz et al. 1996, S. 334-340). Der Transforming Growth Factor- β (TGF β) spielt vor allem eine Rolle bei der Differenzierung kultivierter humaner Keratinozyten (Staiano-Coico et al. 1990, S. 286-291) und scheint einen modulierenden Effekt auf proliferierende humane Keratinozyten durch Beeinflussung ihrer Integrin-Rezeptoren sowie einen migrationsfördernden Effekt auf Keratinozyten in Richtung auf extrazelluläre Matrixproteine auszuüben (Zambruno et al. 1995, S. 853-865; Hermes et al. 2001, S. 387-393). Als Ergebnis bisher vorliegender Studien zeigte sich, dass Mastzellen direkt die Funktionen der Keratinozyten über die Wachstumsfaktoren Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF) und Nerve Growth Factor (NGF) sowie spezifische Zytokine (IL-1 und TNF) modulieren können (Noli und Miolo 2001, S. 303-313). Andererseits können Mastzellen in direktem Kontakt mit den Keratinozyten auch pathologische Prozesse beeinflussen und verstärken. So bilden die Proteine der Basalmembranzzone, wie z.B. Kollagen IV, normalerweise eine Barriere, durch welche Mastzellen nicht eindringen können. Die durch die Mastzellen exprimierten Matrixmetalloproteinasen können u.a. auch Kollagene proteolytisch spalten. Bei der atopischen Dermatitis scheint die Barriere bei einigen Patienten aufgehoben zu sein und Mastzellen können so durch die zerstörte Basalmembran einwandern und die pathologischen Prozesse weiter verstärken (Di Girolamo und Wakefield 2000, S. 131-142).

Mastzellen können durch UV-Strahlung und ionisierende Strahlung aktiviert werden (Ch`ng et al. 2006, S. 149-159; Albrecht et al. 2007, S. 535-541). Allerdings ist nur der Mechanismus der Aktivierung von Mastzellen in der Haut durch UV-Strahlung vollends bekannt. Durch UVB-Strahlung wird in der Epidermis die Sekretion von Neuropeptiden, besonders von Substanz P und Calcitonin, aus sensorischen Hautnerven stimuliert. Diese Neuropeptide wiederum führen zu einer Sekretion von Mastzellmediatoren, wie z.B. Histamin und damit zu einer Freisetzung von Zytokinen aus Keratinozyten und zu einer Immunsuppression der Keratinozyten (Garssen et al. 1998, S. 167-179; Hart et al. 2002; S. 79-89). Wie

Mastzellen in der Haut durch ionisierende Strahlung aktiviert werden, welche Mastzellmediatoren dabei eine besondere Rolle spielen und wie und ob bestrahlte Keratinozyten durch Mastzellen moduliert werden können, wurde bislang kaum untersucht.

Eine bedeutende Rolle in der kutanen Strahlenreaktion bei der Regulation von Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose spielen adhäsive Kontakte von Zellen. Vermittelt werden diese adhäsiven Kontakte durch Zelladhäsionsrezeptoren. Die bedeutendsten und größten Gruppen der Zelladhäsionsrezeptoren stellen die Integrine und die Immunglobuline dar. In multizellulären Organismen sind sie grundlegend wichtig für den Erhalt und die Neubildung von Gewebe und sind u.a. bei der Embryogenese, Hämostase, Wundheilung, Immunabwehr, Entzündung sowie bei krankhaften neoplastischen Prozessen beteiligt (Brown und Dejana 2003, S.505-508). Eine entscheidende Rolle spielen adhäsive Kontakte zudem bei Signaltransduktionsvorgängen innerhalb und außerhalb der Zelle (Brakebusch et al. 2002, S. 999-1006; Cheresch und Stupack 2002, S. 193-194). Adhäsionsvorgänge sind also nicht nur für die Aufrechterhaltung der morphologischen und funktionellen Integrität von Organen wichtig, sondern sind, da sie auch zur Signalübertragung genutzt werden, grundlegende Bestandteile für die zelluläre Kommunikation und Organisation.

Zellkontakte zur extrazellulären Matrix (EZM) beeinflussen zelluläre Mechanismen, die u.a. *in vitro* zu einem verbesserten Überleben sowohl von normalen Organzellen als auch von Tumorzellen nach Bestrahlung führen können (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344; Cordes und Meineke 2004, S. 327-337; Cordes und Meineke 2005, S. 152-156). Die Interaktion von Zellen mit den physiologischen Integrin-Liganden Fibronectin, Laminin, Collagen-III und Vitronectin fördert also das Überleben der Zellen, verglichen zu Zellkulturen ohne Einwirkung dieser Liganden (Lisiak und Cordes 2004, S. 271-278).

1.2 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit ist es, ein grundlegendes Bild von der Rolle der Mastzellen in der kutanen Strahlenreaktion zu gewinnen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Interaktionen von Mastzellen mit bestrahlten humanen Keratinozyten gelegt. Zur Durchführung der Versuche werden in einem Kokulturmodell die in Suspension wachsende Mastzelleukämie-Zelllinie HMC-1 und die adhärent wachsende humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT verwendet.

Anhand von Wachstumskurven soll der Einfluss der Mastzellen auf die Proliferation von bestrahlten HaCaT-Zellen untersucht werden. Weiterhin soll mittels Klonogenitätsassays geklärt werden, ob Mastzellen auch das Überleben, somit die Strahlensensitivität und Reparaturfähigkeit von bestrahlten Keratinozyten beeinflussen können. Zusätzlich stellt sich die Frage, in welchen Dosisbereichen die Effekte der Mastzellen am größten sind. Mittels Genexpressionsarrays soll dann eine Beteiligung von Mastzellen in der Akutphase der kutanen Strahlenreaktion gezeigt werden. Dazu soll vor allem die Expression von Schlüsselgenen der strahleninduzierten Apoptose in Keratinozyten unter Mastzeleinfluss, wie der Bcl2-Familie, näher untersucht werden. Da adhäsive Kontakte eine bedeutende Rolle in der kutanen Strahlenreaktion bei der Regulation von Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose spielen, sollen in weiteren GeArrays die Einflüsse von Mastzellen auf die Genexpression von Integrinen, interzellulären Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren in bestrahlten Keratinozyten aufgeklärt werden. Um den Einfluss von Mastzellen auf Keratinozyten auch auf Proteinebene nachweisen zu können, werden zusätzlich immunhistologische Untersuchungen mit EGF, EGFR, $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, $\beta 1$ -Integrin, $TNF\alpha$ und $TGF\beta_1$ durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nicht die komplexen Signalwege der Aktivierung der Mastzellen durch ionisierende Strahlung in der Haut aufgeklärt werden. Es sollen aber durch diese Dissertation Grundlagen für weitere experimentelle und klinische Forschungen geschaffen werden. In der Klinik sind Mastzelleffekte mit etablierten Therapieverfahren sehr wirksam zu beeinflussen. Deshalb versprechen Kenntnisse über die Rolle der Mastzellen in der kutanen Strahlenreaktion zusätzliche Therapiemöglichkeiten von strahleninduzierten Erkrankungen der Haut.

2. GRUNDLAGEN

Soweit es zum Verständnis dieser Arbeit notwendig erscheint, wird im nachfolgenden Kapitel jeweils kurz auf die wichtigsten Grundlagen eingegangen.

2.1 IONISIERENDE STRAHLUNG

Zur ionisierenden Strahlung zählen sowohl Photonenstrahlen (Röntgen- und Gammastrahlung) als auch Korpuskularstrahlen (Alpha-, Beta- und Neutronenstrahlung). Atome sind in der Regel elektrisch neutral. Die Anzahl der Elektronen der Atomhülle stimmt in diesem Fall mit der Zahl der Protonen im Atomkern überein. Elektronen bewegen sich um den Atomkern auf sog. Elektronenschalen, auf denen sich jeweils eine bestimmte maximale Anzahl von Elektronen befindet. Jede Schale entspricht einem bestimmten Energieniveau der Elektronen (Richter und Feyerabend 2001, S. 1-462). Merkmal der ionisierenden Strahlung ist, dass sie genügend Energie besitzt, um Atome und Moleküle zu ionisieren, d.h. aus elektrisch neutralen Atomen geladene Teilchen zu erzeugen (Herrmann et al. 2006, S. 1-219). Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Röntgenstrahlung durchgeführt.

2.1.1 RÖNTGENSTRAHLUNG

Röntgenstrahlung ist eine elektromagnetische Wellenstrahlung mit einer Photonenenergie, die höher ist als die des ultravioletten Lichts. Im Gegensatz zur Gammastrahlung, die bei der Kernumwandlung entsteht (Gammazerfall), entsteht Röntgenstrahlung bei starker Beschleunigung von Elektronen in einem elektrischen Feld (Röntgenröhre), die dann in fester Materie (z. B. Wolfram) abrupt abgebremst werden. Ein Teil der kinetischen Energie der Elektronen wird bei diesem Vorgang in Röntgenstrahlung umgewandelt. Diese Strahlung wiederum setzt sich aus Bremsstrahlung und der charakteristischen Röntgenstrahlung zusammen. Bei der charakteristischen Röntgenstrahlung regen die beschleunigten Elektronen Hüllenelektronen der unteren Schalen des absorbierenden Materials an oder schlagen sie heraus. Die dabei entstehenden Fehlstellen werden aus den oberen Schalen aufgefüllt. Die Wellenlänge der dabei emittierten Strahlung ist charakteristisch für das absorbierende Material und bedingt die Durchdringungsfähigkeit der Strahlung (Kaufmann et al. 1996, S. 7-30; Herrmann et al. 2006, S. 1- 219).

2.1.2 WIRKUNG IONISIERENDER STRAHLUNG

Bei der Wirkung ionisierender Strahlung auf biologische Materie sind zwei grundsätzliche Möglichkeiten zu unterscheiden: Die stochastische (zufallsabhängige) und die deterministische, die in Abhängigkeit von inneren oder äußeren Ursachen entstehende Wirkung (Herrmann et al. 2006, S. 1-219). Stochastische Strahleneffekte können durch eine einzige geschädigte Zelle verursacht werden und sich als genetische Defekte in den nachfolgenden Generationen manifestieren. Beispiele dafür sind z.B. die Induktion von Mutationen oder von Krebs. Die Häufigkeit von Mutationen nimmt mit der Dosis zu, die Wirkung erfolgt verzögert und nicht zwingend bei jedem bestrahlten Menschen. Im Strahlenschutz wird die so genannte „Linear Non-Threshold-Hypothese“ angewandt. Sie besagt, dass die Wahrscheinlichkeit eines Effektes linear mit der Dosis zunimmt und dass keine Schwellendosis anzunehmen ist, so dass bereits kleinste Dosen mit einer Wirkung verbunden sein können (Hall 1994, S. 1-478; Higson 2004, S. 47-50; Herrmann et al. 2006, S. 1-219).

Bei deterministischen Strahleneffekten nimmt der Schweregrad mit der Dosis zu. An der Haut z. B. kann in Abhängigkeit von der Dosis eine Rötung, eine Ablösung des Epithels oder eine Nekrose auftreten. Für deterministische Strahleneffekte muss immer eine Schwellendosis angenommen werden, unterhalb derer keine klinischen Konsequenzen zu erwarten sind. Allerdings kann diese Schwelle sehr klein sein, wie z. B. bei den Gonaden, bei Embryonen oder der Augenlinse (Dörr und Herrmann 2006, S.85-91; Herrmann et al. 2006, S. 1-219).

2.1.3 DOSISBEGRIFF

Der für diese Arbeit relevante Dosisbegriff ist die „Energiedosis“ oder „absorbierte Dosis“, d. h. die deponierte Energiemenge (Einheit: Joule) pro Kilogramm Materie, mit der Einheit Gray (Gy) (Herrmann et al. 2006, S. 1-219; Kaufmann et al. 1996, S. 7-30).

2.1.4 AKUTES STRAHLENSYNDROM

Die akute Bestrahlung des Organismus führt zu Syndromen, die von der erhaltenen Dosis abhängen. Hohe Dosen (>20 Gy) führen nahezu sofort zu zentralnervösen Störungen (Bewusstlosigkeit, Krämpfe) durch Gehirnödeme und nach Stun-

den bis wenigen Tagen zum Tod. Bei Dosen im mittleren Bereich (5-20 Gy) stehen Strahleneffekte am Darm (gastrointestinales Syndrom, 3-5 Tage), die durch die Zerstörung der Darmschleimhaut charakterisiert sind, sowie an Haut und Mundschleimhaut (mukokutanes Syndrom, 5-10 Tage) durch Zerstörung der Epithelien, im Vordergrund. Die Prognose ist auch hier schlecht. Das gastrointestinale Syndrom führt in den Wochen nach Bestrahlung zum Tod (Richter und Feyerabend 2001, S. 1-462; Dörr und Herrmann 2003, S. 244-250). Die zeitliche Verzögerung ergibt sich aus der Tatsache, dass durch die Bestrahlung vor allem die Zellneubildung beeinträchtigt wird, während die vorhandenen Zellen entsprechend der normalen Umsatzrate der Gewebe verloren gehen (Dörr und Herrmann 2003, S. 244-250). Bei Ganzkörperdosen > 2-3 Gy werden nach ca. 3 Wochen Blutbildveränderungen (hämatopoetisches Syndrom) aufgrund einer Zerstörung des Knochenmarks (Panzytopenie) mit der Folge von Infektionen und Blutungen beobachtet (Richter und Feyerabend 2001, S. 1-462; Dörr und Herrmann 2003, S. 244-250).

2.1.5 BIOLOGISCHE STRAHLENWIRKUNG

Ionisierende Strahlung kann direkt und indirekt (Reaktionen auf Radiolyseprodukte) auf biologische Moleküle einwirken, insbesondere auf den wichtigsten Bestandteil der Zelle, die DNA (Zaider et al. 1994, S. 459-465; Kaufmann et al. 1996, S. 31-62). Die DNA kann dabei verschiedene Läsionsformen aufweisen. Zu den wichtigsten strahleninduzierten Schäden gehören Basenschäden, DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche, Verbindungen zwischen der DNA und Proteinen, Denaturierungen und Quervernetzungen der DNA.

Eine Schädigung der DNA löst in der Regel die Einleitung effektiver zellulärer Reparaturmechanismen aus (Ward 1988, S. 95-125). Eine ungenügende oder fehlerhafte Reparatur kann zu Zellzyklusarrest, den Verlust der Teilungsfähigkeit, zu Chromosomenaberrationen und Mutationen, zu neoplastischen Transformationen bis hin zur Einleitung des Zelltodes (Apoptose) führen (Vamvakas et al. 1997, S. 155-174; Olive 1998, S. 42-51). DNA-Doppelstrangbrüche sind Hauptursache strahleninduzierter Chromosomenaberrationen (Kaplan und Morgan 1998, S. 382-390) und in einer eukaryonten Zelle kann bereits ein einziger nicht reparierter Doppelstrangbruch eines entscheidenden Gens den Tod der Zelle durch Apoptose

induzieren (Frankenberg et al. 1981, S. 524-532; Ward 1988, S. 95-125; Richter und Feyerabend 2001, S. 1-462). Reparaturmechanismen der DNA haben somit einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben einer Zelle nach Bestrahlung. DNA-Doppelstrangbrüche werden in Säugetierzellen vor allem über zwei Mechanismen repariert, zum einen über das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und zum anderen über die homologe Rekombination (HR) (Hoeijmakers 2001, S. 17-22). Die HR stellt eine sehr exakte Reparatur unter Verwendung von homologer DNA, z. B. in Form von Schwesterchromatiden, dar und ist in der S- und G2-Phase aktiv (Takata et al. 1998, S. 5497-5508). Die weniger exakte Reparatur des NHEJ geht ohne Verwendung homologer DNA-Abschnitte einher und ist vor allem in der G1-Phase des Zellzyklus (Lieber et al. 2003, S. 712-720) aktiv. Der genaue Ablauf dieser Reparaturwege ist ein komplizierter, bislang noch unvollständig verstandener Prozess, an dem zahlreiche Faktoren wie z. B. das Ataxia-Telangiektasia-Gen, das p53-Gen und das Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor-Gen (Kanaar et al. 1998, S. 483-489; Hoeijmakers 2001, S. 17-22) beteiligt sind. 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 (Hall 1994, S. 1-478).

Neben genetischen Abberationen spielen auch epigenetische Regulationsmechanismen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen. Die Epigenetik ist als eine mitotisch oder meiotisch vererbare Modifikation der Genexpression definiert, die nicht mit einer Änderung der primären Nukleinsäuresequenz einhergeht. Die biologischen Funktionen eines Organismus werden also nicht nur durch die bloße DNA-Sequenz seiner Gene kontrolliert, sondern es existieren übergeordnete Regulationsmechanismen und Signalwege, die die Genexpression mitbestimmen. Epigenetische Veränderungen basieren auf einer Vielzahl von Interaktionen beteiligter Mechanismen und Faktoren (Esteller 2007, S. 50-59).

2.2 MASTZELLEN

2.2.1 DIE ENTDECKUNG DER MASTZELLE

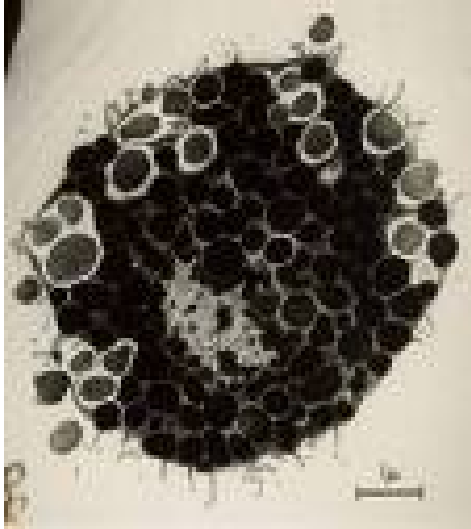


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Darstellung einer degranulierenden, menschlichen Mastzelle (Quelle: <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/FMMastzellen.html>)

Die menschliche Mastzelle wurde erstmals 1878 von Paul Ehrlich beschrieben. Im Rahmen seiner Dissertation entdeckte er diese polymorph, häufig auch oval bis spindelförmig geformten Zellen. Die Gewebszellen enthielten Granula, die er mit Anilinblaufarbstoff behandelte und dabei einen Farbumschlag von blau nach violett feststellte. Diese Färbbeeigenschaft wird als Metachromasie bezeichnet und beruht auf den zahlreich im Zytoplasma vorliegenden basophilen Granula, die wegen ihres sulfatierten Glykosamin-Gehaltes reagieren (Gurish und Boyce 2002, S. 107-118). Diese

Granula waren auch ausschlaggebend für die Namensgebung, da sie so dicht gedrängt um den Zellkern liegen, dass die Zelle wie „gemästet“ erscheint.

2.2.2 HERKUNFT UND ENTWICKLUNG DER MASTZELLEN

Die Herkunft der Mastzelle blieb lange Zeit ein Rätsel. Kitamura und Miyoshi waren als Erste in der Lage, die Herkunft muriner (Maus oder Ratte betreffend) Mastzellen aufzuklären und zeigten, dass sie von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks abstammen (Kitamura u. Miyoshi 1978, S. 1251-1259). 1991 wiesen Kirshenbaum et al. nach, dass die Mastzellen des Menschen von CD34+Progenitoren des Knochenmarks abstammen (Kirshenbaum et al. 1991, S. 1410-1415). Im Gegensatz zu anderen Abkömmlingen der pluripotenten Stammzellen, beenden Mastzellen ihre Differenzierung jedoch nicht im hämatopoetischen Gewebe. Im Blut sind daher auch keine reifen Mastzellen, sondern nur morphologisch nicht identifizierbare Vorläuferzellen der Mastzellen nachweisbar. Diese wandern ins Bindegewebe ein und differenzieren sich dann zu morphologisch identifizierbaren Mastzellen (Kitamura et al. 1987, S. 108-121). Der wichtigste Faktor, der für die Differenzierung der Mastzellen verantwortlich ist, ist der von

Fibroblasten produzierte stem cell factor (SCF) oder c-kit-Ligand (Metcalf et al. 1997, S. 1033-1079). SCF bindet an einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität auf der Mastzelle, den SCF-Rezeptor (c-kit). Unter Einfluss von SCF kommt es zur Proliferation und Differenzierung der reifen Mastzellen (Kitamura et al. 1993, S. 185-191). Der erste Mastzell-Wachstumsfaktor, der in der Maus identifiziert wurde, war Interleukin-3 (IL-3). IL-3 ist dabei neben SCF ein wichtiger Faktor, der eine Differenzierung von Progenitorzellen zu reifen Mastzellen induzieren kann. Als Kofaktoren sind IL-6 und andere Faktoren wie IL-9, IL-10 oder Prostaglandin (PG) E₂ in humanen Mastzellen beschrieben worden. Ein weiterer potenter Kofaktor für Mastzellwachstum und -differenzierung ist Interleukin-4. IL-4 induziert eine Reihe von wichtigen Mastzell-Effektor-Molekülen, einschließlich des high affinity IgE receptors (FcεRI-Rezeptors) und führt so zu einer Aktivierung der Zellen über den klassischen Signaltransduktionsweg (Gurish und Boyce 2002, S. 107-118).

2.2.3 VORKOMMEN DER MASTZELLEN

Mastzellen sind ubiquitär im Organismus verteilt. Man kann sie im Bindegewebe in der Nähe von Blut- und Lymphgefäßen oder Nerven nachweisen und findet sie in hoher Anzahl unterhalb epithelialer Strukturen, welche in besonderem Maße Umweltantigenen ausgesetzt sind, wie zum Beispiel die der Haut, des Gastrointestinal-, Urogenital- oder des Respirationstraktes (Metcalf et al. 1981, S. 23-74; Galli et al. 1984, S. 1-141; Metcalf et al. 1997, S. 1033-1079). In geringerem Ausmaß trifft man sie im Knochenmark und im lymphatischen Gewebe an, und bei einigen Spezies findet man Mastzellen auch in den bindegewebigen Kapseln innerer Organe, sowie in physiologischen Transsudaten, wie zum Beispiel der Peritonealflüssigkeit (Galli 1990, S. 5-33). Die Zelldichte an den verschiedenen anatomischen Lokalisationen variiert zwar von Art zu Art, aber allen Spezies ist gemeinsam, dass reife Mastzellen im Gegensatz zu Basophilen nicht im Blut zirkulieren, also resident sind, aber dennoch nach Stimulierung ins Gewebe einwandern können (Metcalf et al. 1997, S. 1033-1079).

2.2.4 DIE HETEROGENITÄT DER MASTZELLEN

Seit der Entdeckung der Mastzellen ist bekannt, dass diese keine homogene Population repräsentieren. Im Jahre 1960 konnte Enerbäck feststellen, dass sich

Mastzellen histochemisch und in ihrer Funktion beachtlich unterscheiden (Enerbäck 1960, S. 717-719).

Eine erste Unterteilung in verschiedene Subtypen erfolgte in den 60er Jahren. Bei Rattenmastzellen unterscheidet man hinsichtlich der Lokalisationsorte in connective tissue-type mast cells (CTMC) und mucosal mast cells (MMC) (Enerbäck 1966, S. 289-302). Bei humanen Mastzellen wurden aufgrund unterschiedlicher Fixationseigenschaften ebenfalls mehrere Subtypen vermutet. So konnten sowohl „Formalin-sensitive“ als auch „Formalin-resistente“ Mastzellen unterschieden werden; allerdings kommen beide Gruppen sowohl im Intestinaltrakt als auch in der Haut vor, so dass die o.g. gewebsspezifische Einteilung nicht für humane Mastzellen übernommen werden kann (Metcalf et al. 1997, S. 1033-1079). Als vielleicht wichtigster Marker für die Einteilung in verschiedene Subtypen bei humanen Mastzellen dient der Proteasengehalt in den Granula. Danach unterscheidet man Mastzellen, die nur Tryptase enthalten (MC_T) von Mastzellen, die Tryptase und Chymase enthalten (MC_{TC}). Diese beiden Subtypen unterscheiden sich auch hinsichtlich der Ultrastruktur ihrer Granula. Die MC_{TC} findet man überwiegend in der intestinalen Submucosa, der Haut, den Konjunktiven und dem subkutanen Gewebe. Der andere Subtyp (MC_T) ist vor allem in der Mukosa von Darm und Lunge anzutreffen (Metcalf et al. 1997, S. 1033-1079).

Die beschriebene Einteilung lässt sich allerdings nicht auf die Funktionalität der Zellen übertragen. Andere Faktoren wie das Mikromilieu der Mastzelle bestimmen wesentliche Eigenschaften der Mastzelle mit. So zeigte sich, dass sich Hautmastzellen durch Substanz P oder Compound 48/80 aktivieren ließen, während bei Mastzellen aus dem Darm oder der Nasenschleimhaut (beide Subtypen) weder für den Subtyp MC_T noch für den in der Haut aktivierbaren Subtyp MC_{TC} eine Stimulierbarkeit durch die genannten Faktoren beobachtet werden konnte (Lowman et al. 1988, S. 590-597). Wäre dieser Unterschied subtypenspezifisch, müsste wenigstens ein Teil der Mastzellen aus dem Darm und der Nasenschleimhaut reagieren. Die Subtypenklassifikation darf also als vereinfachte Einteilung verstanden werden, die aber nicht die ganze Heterogenität der Mastzellpopulationen widerspiegelt. Ferner konnte gezeigt werden, dass Mastzellen je nach ihrer Umgebung in einen anderen Subtyp wechseln können und durch Um-

setzen der Mastzellen in eine andere Umgebung sich der unterschiedliche Gehalt der Proteasen modifizieren lässt (Kitamura et al. 1987, S. 108-121).

2.2.5 DIE MEDIATOREN DER MASTZELLE

Wird die Mastzelle aktiviert, werden verschiedene Mediatorstoffe durch Exozytose in den Extrazellulärraum freigesetzt. Dieser Vorgang wird als „Degranulation“ bezeichnet. Die Mastzell-Mediatoren werden in präformierte, in sekretorischen Granula gelagerte Mediatoren, in Enzyme, Lipidmediatoren und Zytokine eingeteilt (Metcalf et al. 1997, S. 1033-1079). Eine Übersicht über die wichtigsten Mediatoren stellen die nachfolgenden Tabellen 1-3 dar (modifiziert nach Metcalfe et al. 1997, S. 1033-1079; Bischoff 2000, S. 541-566; Hines 2002, S. 149-160). Nachfolgend wird dann auf die Protease Tryptase näher eingegangen:

Tabelle 1: Präformierte Mediatoren und Enzyme

Mediator	Wirkung
Histamin (biogenes Amin)	Vasodilatation Steigert die Permeabilität von Endothelien (Gewebsödem) Induziert die Kontraktion glatter Muskulatur (Bronchokonstriktion) Steigert die Sekretion von Muzinen und Magensäure Granulozyten-Chemokinese
Tryptase (Protease)	Führt zu Bronchokonstriktion Stimuliert die Fibroblastenproliferation Erhöht die Gefäßpermeabilität Abbau von Fibrinogen, Kininogen, Neuropeptiden, VIP Endothelzellregulation
Chymase (Protease)	Abbau von Basalmembransubstanz und Substanz P Schleimsekretion Katalysierung des Umsatzes von AT I und AT II
Carboxypeptidase (Protease)	Abbau von AT I
Heparin (Proteoglykan)	Intrazellulär: Matrixprotein für die in Granula gespeicherten Mediatoren, stabilisiert die Granula Extrazellulär: Antikoagulation und Inhibition der Komplementkaskade
Chondroitinsulfat (Proteoglykan)	Wirkung wie Heparin, jedoch weniger potent

Tabelle 2: Lipidmediatoren

Leukotriene (LTC₄, D₄, E₄)	Schleim- und Elektrolytsekretion Erhöhen die Gefäßpermeabilität Induzieren die Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur Modulieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen
Prostaglandin D₂	Inhibiert die Thrombozytenaggregation Bronchiale Hyperaktivität Wirkung wie Leukotriene

Tabelle 3: Zytokine

TNFα, IL-1, IL-6, IL-16, IL-18	Proinflammatorische Effekte Stimulieren die Bildung von verschiedenen Zytokinen in vielen Zelltypen
IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF	Stimulieren und verstärken die Reaktion von TH2-Zellen Fördern Bildung und Aktivierung von Eosinophilen
IL-10, TGFβ1	Regulatorische Effekte auf Immunzellen Wundheilung, Gewebeumbau
MIP-1α, MCP-1, IL-8	Chemokine
β-FGF, VEGF	Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Endothelzellen

Die Serinprotease Tryptase kommt beim Menschen nahezu ausschließlich in Mastzellen und nur in sehr geringer Konzentration in Basophilen vor, die weniger als 1/100 des Tryptasegehalts von Mastzellen aufweisen. Beim Menschen existieren mindestens 4 Isoenzyme mit einer Sequenzidentität von mehr als 95%, nämlich eine α - sowie drei β -Tryptasen (Ludolph-Hauser et al. 1999, S. 556-561). Die Tryptase entwickelt erst eine enzymatische Aktivität, wenn sich die vier 34 - 37 kD großen Untereinheiten zu einem mit Heparin assoziierten stabilen Tetramer verbunden haben (Harvima et al. 1988, S. 71-80). Tryptase wurde in aktiver Form sowohl im Plasma als auch im Extrazellulärraum nachgewiesen. Die extrazelluläre Inaktivierung erfolgt wahrscheinlich durch den Zerfall des Tryptase-Proteoglykan-Komplexes (Ludolph-Hauser et al. 1999, S. 556-561). Eine Funktion beim Auf- und Umbau von Gewebe wird der Tryptase aufgrund von Zellkulturexperimenten zugeschrieben, in denen sie sich als potenter Wachstumsfaktor für Epithelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten zeigte. Da Tryptase das Wachstum von

Endothelzellen und die Ausbildung von Gefäßstrukturen fördert, spielt sie vermutlich auch eine Rolle bei Vaskularisierungsprozessen (Ludolph-Hauser et al. 1999, S. 556-561).

Die Protease kann die Synthese und Sekretion von Typ-I-Kollagen stimulieren, führt zur Hochregulierung der Prokollagen-mRNA-Synthese humaner dermaler Fibroblasten, Aktivierung von Prokollagenase zu Kollagenase und von Pro-Urokinase sowie Spaltung von Typ-IV-Kollagen, Fibronectin, Elastase und Proteoglykanen (Gruber et al. 1997, S. 2310-2317; Cairns und Walls 1997, S. 1313-1321). Die Tryptase greift auf unterschiedlichste Art und Weise in den Entzündungsmechanismus ein. Sie steigert die Permeabilität der dermalen Kapillaren und inaktiviert neurogene Peptide. Durch die Inaktivierung von Fibrinogen sowie die indirekte Aktivierung von Plasminogen durch Aktivierung der Pro-Urokinase, kann das Enzym eine gerinnungshemmende Wirkung ausüben und erleichtert so den Plasmaeinstrom ins Gewebe. Gleichzeitig ist eine Stimulation der Expression von IL-8 und ICAM-1 beschrieben, welche die Adhäsion bzw. Migration von Leukozyten fördern (Ludolph-Hauser et al. 1999, S. 556-561). Darüber hinaus kann die Tryptase Mitglieder der Familie der Matrix-Metalloproteasen aktivieren, die praktisch alle Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren können und in der Haut durch UV-Strahlung und Zytokine reguliert werden. Im klinischen Alltag ist die Tryptase als Indikator für Mastzellaktivierung in Blut und Körperflüssigkeiten von Bedeutung, da sie eine längere Halbwertszeit als Histamin besitzt (Abe et al. 1998, S. 1509-1517, Ludolph-Hauser et al. 1999, S. 556-561).

2.2.6 ALLGEMEINE FUNKTION VON MASTZELLEN UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Klassischerweise gelten Mastzellen als Effektorzellen immunologischer Reaktionen, wie z.B. Allergien, Parasitosen oder Entzündungsprozessen (Galli 1997, S. 14-22). In der Pathophysiologie findet man die Mastzellen als Vermittler der allergischen Reaktion vom Soforttyp und vom verzögerten Typ (Pawankar 2001, S. 3-6). Neben der maßgeblichen Funktion bei allergischen Erkrankungen spielen Mastzellen auch bei anderen pathologischen Prozessen eine Rolle, deren Bedeutung bis heute noch nicht vollständig geklärt ist. Zu diesen gehören chronisch proliferative und entzündliche Erkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale (Kraneveld et al. 2002, S. 2044-2053) und die rheumatoide Arthritis (Valent et al. 2001, S. 74-

81). Mastzellen werden auch vermehrt im Gewebe von Tumoren wie dem Melanom, Basalzelltumoren und dem Mammakarzinom gefunden, wobei die Bedeutung und Rolle bisher nicht bekannt sind (Demitsu et al. 2002, S. 280-289). Bei vielfältigen fibrosierenden Prozessen in verschiedenen Organen wie Wundheilung, Sklerodermie, Leberzirrhose, Lungenfibrose und Glomerulonephritis wurde ebenfalls ein Anstieg der Mastzellzahlen beobachtet (Yousem 1997, S. 179-182; Artuc et al. 1999, S. 1-16). Bei Sklerodermie und hypertropher Narbenbildung nach Verbrennung fanden sich erhöhte Serum-Histaminspiegel (Tredget et al. 1998, S. 1317-1330).

Die typische Mastzellvermehrung am Ort der Entzündung lässt sich mit einer vermehrten Rekrutierung von Vorläuferzellen und deren Differenzierung, sowie mit einer verstärkten Migration von reifen Mastzellen aus benachbartem Gewebe erklären. Von residenten oder eingewanderten Zellen bei chronischer Entzündung oder nach Trauma freigesetzte Mediatoren können zur Mastzelldegranulation oder -transgranulation führen, bei der über direkten Zell-Zellkontakt Mastzellgranula besonders an Endothelzellen und Fibroblasten weitergegeben werden können (Atkins und Clark 1987, S. 191-193). Die freigesetzten Mediatoren sind wiederum an Fibrosierungsprozessen und an der Wundheilung beteiligt, insbesondere durch Rekrutierung des Entzündungsinfiltrates, Bindegewebs- und Epithelneubildung und Neoangiogenese (Artuc et al. 1999, S. 1-16). Durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren wird die Proliferation verschiedener Zellen, z.B. von Fibroblasten gesteuert (Hermes et al. 2001, S. 387-393). Eine Rolle spielen dabei Tryptase, Heparin, der Vascular endothelial growth factor (VEGF), der Transforming growth factor β (TGF β) und der Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (Huttunen et al. 2000, S. 258-265).

Physiologischerweise kann die Mastzelle Antigene phagozytotisch aufnehmen, und diese auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dabei spielt besonders der Major Histocompatibility Complex (MHC II)-Rezeptor eine wichtige Rolle, der z. B. neben dem MHC I-Rezeptor und den Intercellular Adhesion Molecules (ICAMs) auf Mastzellmembranen vorkommt (Pawankar et al. 1997, S. 1492-1499).

2.3. APOPTOSE

2.3.1 DEFINITION UND MORPHOLOGIE

Während der embryonalen Entwicklung ist die Eliminierung von Zellen ein wichtiger Prozess für die Erhaltung der Gewebshomöostase und der Immuntoleranz. Dieser physiologische Prozess, der auch „programmierter Zelltod“ genannt wird, muss deshalb sehr genau kontrolliert werden. Eine fehlgesteuerte Apoptose kann zur Entstehung verschiedener Erkrankungen führen. Ein Übermaß an Apoptose wurde in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie multipler Sklerose, M. Alzheimer und M. Parkinson, sowie bei Aids und bei anderen viralen und bakteriellen Infektionen beobachtet (Reed 1999, S. 2941-2953). Eine Apoptoseresistenz kann zur Bildung von Neoplasmen und Autoimmunerkrankungen führen (Reed 1999, S. 2941-2953).

Der Begriff Apoptose wurde 1972 zum ersten Mal von Kerr et al. beschrieben, als eine Form des Zelltodes, der sich deutlich von der Nekrose unterscheidet (Kerr et al. 1972, S.239-257). Für diesen zuerst als „schrumpfende Nekrose“ benannten Vorgang wurde 1972 die Bezeichnung „Apoptose“ eingeführt (Kerr et al. 1972, S.239-257). Der Apoptose liegen charakteristische morphologische sowie biochemische Zellveränderungen zugrunde: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass es nach Induktion der Apoptose zur Zellschrumpfung und Kondensation des Chromatins kommt. Das Zytoplasma bildet typische Ausstülpungen aus, ein Vorgang, der als Knospung oder „budding“ bezeichnet wird. Durch Abschnürung entstehen dann Pyknosen, kleine, mit einer intakten Zellmembran versehene Strukturen, die auch „apoptotic bodies“ genannt werden (Wyllie et al. 1980, S. 251-306). Schließlich wird die DNA über eine internukleosomale DNA-Fragmentierung abgebaut (Wyllie et al. 1980, S. 251-306) und der Zellkern löst sich auf (Enari et al. 1998, S. 43-50). In der Endphase der Apoptose werden die apoptotischen Körperchen letztlich von Makrophagen oder anderen phagozytosefähigen Zellen aufgenommen (Fadok und Chimini 2001, S. 365-372).

2.3.2 REGULATION DER APOPTOSE

Das apoptotische Programm unterliegt einer komplexen Regulation durch eine Vielzahl verschiedener Signale und Signalwege. Ein gemeinsames Prinzip dieser

Signalwege ist die Ausbildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes DISC, des „death-inducing signaling complex“, an den sich eine kaskadenartig verstärkte Aktivierung einander nachgeschalteter, die Apoptose fördernder Faktoren anschließt, die ihrerseits wiederum zu einer Aktivierung der Caspasen führen (Krammer 2000, S. 789-795). Der Vorgang der Apoptose lässt sich in 2 Haupt-DISC-Signalwege unterteilen: den extrinsischen, rezeptorvermittelten Signalweg und den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg (Krammer 2000, S. 789-795). Allerdings werden auch Zelltodsignalwege beschrieben, die durch andere funktionelle Strukturen oder Organellen der Zelle aktiviert werden. Neuerdings gibt es Hinweise, dass auch das endoplasmatische Retikulum Apoptose induzieren kann, z.B. bei massiver Akkumulation pathologischer Proteine bei Virusinfektionen oder Amyloid-Protein beim M. Alzheimer (Daniel 2000, S. 42-44).

2.3.3 STRAHLENINDUZIERTER APOPTOSE

Apoptose ist ein normales Ereignis in der Entwicklung der mehrzelligen Organismen, kann aber auch durch zahlreiche exogene Faktoren, wie z.B. γ -Bestrahlung induziert werden (Verheij und Bartelink 2000, S. 133-142). Durch ionisierende Bestrahlung werden DNA-Doppelstrangbrüche und zahlreiche zelluläre Reaktionen, wie auch die Apoptose, induziert. Apoptose nach Bestrahlung wird über den intrinsischen, mitochondrialen Weg eingeleitet (Kaina 2003, S. 1547-1554; Belka et al. 2003, S. 141-151; Norbury und Zhivotovsky 2004, S. 2797-2808). Ein zentraler Signalübermittler vom Schaden der DNA zum zellulären Effekt in diesem Weg ist die Kinase ATM (Shiloh 2003, S. 155-168), deren Substrate u.a. MDM2, CHK2 und p53 (Maya et al. 2001, S. 1067-1077; McGowan 2002, S. 401-403) sind. Über Phosphorylierung dieser Proteine wird eine Stabilisierung des Proteins p53 erreicht und eine Verstärkung der Wirkung als Transkriptionsfaktor (Dumaz und Meek 1999, S. 7002-7010). Außerdem konnte auch für zahlreiche andere Signaltransduktionsmoleküle eine Beteiligung an durch ionisierende Bestrahlung hervorgerufenen apoptotischen Prozessen nachgewiesen werden, wie z.B. die Transkriptionsfaktoren E2F-1 (Shan und Lee 1994, S. 8166-8173), NF κ B (Granville et al. 1998, S. 893-913), das Protoonkogen c-myc (Abend et al. 1998, S. 156-166) und Mitglieder der B-cell lymphoma2 (Bcl2)-Familie (Hockenbery et al. 1993, S. 241-251). Darüber hinaus kann nach Strahleneinwirkung über die Todesrezeptoren mit Hilfe von Caspasen das Apoptoseprogramm induziert werden

(Dragovich et al. 1998, S. 3207-3213). Auch Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie z.B. IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, SCF und NGF sind an der Regulation der Apoptose beteiligt (Abend et al. 1998, S. 156-166). Oxidativer Stress ist ebenfalls als Mediator für Apoptose in verschiedenen Systemen nachgewiesen worden. So führen strahleninduzierte „reactive oxygen intermediates“ (ROI) nach Aktivierung von NF κ B zur Apoptose (Abend et al. 1998, S.156-166). 2003 wurde von Meineke et al. eine Modulation der strahleninduzierten Apoptose durch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nachgewiesen. Vitamin D₃ führt zu einer Herunterregulation zahlreicher vor allem proapoptotischer Gene in HaCaT-Zellen, wie z. B. Caspase 1, Caspase 10, Caspase 3 und p53 (Meineke et al. 2003, S. 427-432).

2.4 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX (EZM)

2.4.1. DEFINITION

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Organell aus sezernierten Proteinen und Kohlenhydraten, das strukturelle und enzymatische Aufgaben besitzt (Aumailley und Gayraud 1998, S. 253-265). Die EZM besteht hauptsächlich aus vier Arten von Makromolekülen: Kollagen, Elastin, Proteoglykan und Glykoprotein. Kollagen und Elastin bilden das fibrinöse Bindegewebe, Proteoglykan und die Glykoproteine füllen das Interstitium zwischen den Zellwänden. Das fibrilläre Netzwerk ist eine Diffusionsbarriere und gibt dem Gewebe seine mechanischen und elastischen Eigenschaften (Labat et al. 1990, S.386-393). Kollagen, von dem bislang 18 Subtypen bekannt sind, ist die häufigste EZM-Komponente und hat neben der passiven Stützfunktion noch andere physiologische Aufgaben, wie z.B. Chemotaxis und Zelladhäsion. In der Haut kommt vor allem Kollagen Typ I und in kleinen Mengen Kollagen Typ III vor. Kollagen Typ I ist im Bindegewebe mit 89 – 99 % am stärksten vertreten. Die am häufigsten gefundene Struktur in Basalmembranen ist Kollagen Typ IV, welches keine Fibrillen, sondern ein zweidimensionales Netz bildet (Aumailley und Gayraud 1998, S. 253-265). Neben den strukturellen Aufgaben reguliert die EZM das Wachstum, die Zelldifferenzierung, die Wundheilung, vermittelt Pathogenabwehr und spielt eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Stresssituationen, sowie bei der Anpassung des Organismus auf Veränderungen in der Umgebung (Aumailley und Gayraud 1998, S. 253-265). Die EZM bindet Wachstumsfaktoren (z.B. TNF α , TGF β) und kann über eine Speicherung dieser Signalmoleküle eine eventuell ausbleibende Proteinsynthese überbrü-

cken und Signale zeitlich versetzt weitergeben. Die Wachstumsfaktoren werden an Heparansulfat, ein Glykoprotein, gebunden. Durch enzymatische Abspaltung mittels Heparanasen und anderen extrazellulären Proteinase ist die schnelle Verfügbarkeit der Faktoren möglich (Lyons et al. 1990, S. 1361-1367).

2.4.2 EZM UND IONISIERENDE STRAHLUNG

Zelluläre Mechanismen werden durch Zellkontakte zur EZM beeinflusst, die u.a. *in vitro* zu einem verbesserten Überleben sowohl von normalen Körperzellen als auch von Tumorzellen nach Bestrahlung führen können (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344; Cordes und Meineke 2004, S. 327-337; Cordes und Meineke 2005, S. 152-156). Ergebnisse zahlreicher experimenteller Untersuchungen zeigten, dass die Anwesenheit von EZM-Proteinen bei normalen und malignen Zellen im Vergleich zu *in vitro* Zellkulturbedingungen ohne EZM-Bestandteile, zu einem höheren Überleben gegenüber zytotoxischen Substanzen führt (Cordes und Meineke 2004, S. 327-337; Cordes und Meineke 2005, S. 152-156). Cordes und Meineke z. B. konnten 2003 aufzeigen, dass diese Effekte in Bezug auf Strahlensensibilität und Radioresistenz durch die Bindung von Integrinen an Fibronectin vermittelt werden können (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344). Interaktionen zwischen verschiedenen Signalketten, wie z. B. der Integrin- und Wachstumsfaktorenabhängigen Signalwege, führen zu einer Modulation der EZM. Diese Modulation findet in vielfältiger Art und Weise statt und kann zur Ausprägung eines Resistenzmechanismus gegenüber ionisierender Strahlung, also zu einer strahleninduzierten Apoptoseinhibition, führen (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344).

2.5 ZYTOKINE

2.5.1 DEFINITION

Zytokine sind im Körper vorkommende lösliche Peptide und Proteine, die als chemische Mediatoren bereits in kleinsten Konzentrationen biologisch wirksam werden. Sie dienen der intra- und extrazellulären Signalübertragung, bzw. der Aktivierung einer Reihe von unterschiedlichen Zellen und Zelltypen, wie z.B. Mastzellen, Fibroblasten, Granulozyten oder Makrophagen. Die Wirkung dieser kleinen Proteine erfolgt über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Membran von Zielzellen. Als Folge kann es zur Aktivierung oder Inhibition dieser Zellen und somit zu einer positiven oder negativen Regulation der Immunantwort kommen (Janeway et

al. 2002, S. 73-75). Dabei können einerseits verschiedene Zytokine gleichartige Effekte vermitteln (Redundanz), andererseits unterschiedliche Effekte durch ein- und dasselbe Zytokin (Pleiotropie) vermittelt werden (Böcker und Denk 2004, S. 129-134).

Nach Baenkler (1995, Kapitel I 5) werden Zytokine in 3 Funktionsbereiche unterteilt:

- Zytokine der natürlichen Immunabwehr und von Entzündungsreaktionen (z.B. IL-6, IL-8, $TNF\alpha$, Interferon- α und - β)
- Zytokine, welche immunregulatorisch wirken und das Wachstum und die Differenzierung von Lymphozyten kontrollieren sowie die Immunantwort des Organismus steuern (z.B. $TGF\beta 1$, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-15 und Interferon- γ)
- Zytokine, die das hämatopoetische System beeinflussen [z.B. IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, SCF (Stem cell factor), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor)]

2.5.2 ZYTOKINE UND IONISIERENDE STRAHLUNG

Nach Einwirkung ionisierender Strahlung auf die Haut kommt es zur Initiierung einer Zytokinkaskade während aller Stadien der kutanen Strahlenreaktion. Diese Kaskade führt an der Haut zu progredienten Spätsymptomen, wie der Fibrose (Müller und Meineke 2007, S. 96-104). Heute vertritt man die Ansicht, dass Fibrose keine passive reparative Reaktion auf eine erfolgte Gewebeschädigung ist, sondern ein eigenständig kontrolliertes und unabhängiges Netzwerk zellulärer Interaktionen mit der Beteiligung zahlreicher Zellen und von ihnen produzierter Zytokine darstellt. Nach Einwirkung von ionisierender Strahlung auf die Haut, wie auch z.B. auf Lungengewebe, konnten ansteigende Konzentrationen von Zytokinen gemessen werden (Finkelstein et al. 1994, S. 621-631, Müller und Meineke 2007, S. 96-104).

Die wichtigsten Zytokine in der Pathophysiologie der kutanen Strahlenreaktion stellen IL-1, IL-6, $TNF\alpha$, $TGF\beta$ und die Chemokine IL-8 und Eotaxin dar (Müller und Meineke 2007, S. 96-104). IL-1, IL-6, IL-8 und $TNF\alpha$ werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet, die vorwiegend von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Endo- und Epithelzellen, Fibroblasten und anderen

Zellen sezerniert werden. Die proinflammatorischen Zytokine wirken chemotaktisch und aktivierend auf gewebständige Zellen und Entzündungszellen und führen so zur Produktion von gewebelysierenden Enzymen (Herskind et al. 1998, S. 12-15). Neben den inflammatorischen Zytokinen waren nach Bestrahlung im Gewebe auch vermehrt profibrotische Zytokine, wie z. B. TGF β und b-FGF (basic fibroblast growth factor), nachweisbar. Diese profibrotischen Faktoren sind in die Vorgänge der Gewebereparatur involviert und wirken chemotaktisch, mitogen und synthesefördernd auf Endothelzellen und Fibroblasten (Vaillant et al. 1996, S.145-152).

2.6 ZELL-MATRIX- UND ZELL-ZELL-INTERAKTIONEN

Unter dem Begriff Zelladhäsion versteht man alle Formen zellulärer Kommunikation, die durch direkten Kontakt von Zellen untereinander (Zell-Zell-Adhäsion) oder durch Wechselwirkung von Zellen mit der sie umgebenden EZM (Zell-Matrix-Adhäsion) gekennzeichnet sind (Brown und Dejana 2003, S. 505-508). Die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden durch Proteine der Zelloberfläche, sog. Zelladhäsionsrezeptoren (Cellular Adhesion Molecules (CAM)) vermittelt. Sie werden derzeit in fünf Molekülfamilien, die sogenannten „Superfamilien“, eingeteilt. 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 (1982 auf dem 1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) in Paris festgelegt).

Die Mehrzahl der CAMs sind transmembrane Glykoproteine. Dazu gehören die Immunglobulin-, die Integrin- und die Homing-CAM-Superfamilien. Diese Glykoproteine werden in drei Domänen untergliedert:

- die extrazelluläre,
- die hydrophobe (transmembranes Segment) und die
- intrazelluläre Domäne, welche mit dem Zytoskelett verbunden ist.

Der extrazelluläre Anteil ist vor allem für die Liganden- und Rezeptorbindung wichtig, wobei die Adhäsionsmoleküle das direkte Binden an andere Zellen und extrazelluläre Matrixmoleküle vermitteln. CAM dienen dem Austausch von Informatio-

nen und können durch Adhäsion eine Änderung der Genexpression und des Zellphänotyps bewirken (Turner 1992, S. 359-377).

2.7. INTEGRINE

2.7.1 INTEGRINE: DEFINITION, AUFBAU UND WIRKMECHANISMUS

Integrine vermitteln hauptsächlich spezifische Interaktionen zwischen Zellen und der EZM. Es ist bekannt, dass Integrine die Zellaktivität, Proliferation und Apoptose entscheidend mitbeeinflussen können (Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid 1999, S. 389-429; Lewis et al. 2002, S. 3627-3632).

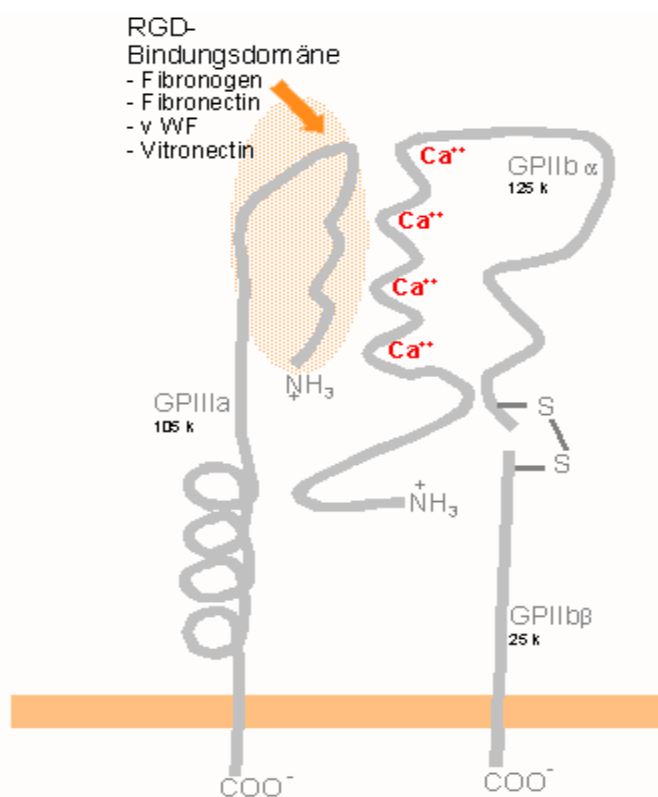


Abbildung 2: Heterodimere Struktur eines Integrins:
Dargestellt sind zwei miteinander verbundene Glykoproteinketten (α β) mit einer längeren extrazellulären Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Verlängerung sowie die RGD-Bindungsdomäne mit der EZM (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Integrine>).

zytoplasmatische Verlängerung (Giancotti und Ruoslahti 1999, S.1028-1032). Bei den Säugetieren sind mittlerweile 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Integrine formen können, wobei die Einteilung nach den β -Untereinheiten stattfindet (Hynes 2002, S. 673-687). Die größte Integrin-Unterfamilie stellt dabei die Klasse der β 1-Integrine dar. Eine weitere Erhöhung der Mannigfaltigkeit ist durch „splicing“ der mRNA, sowohl der extrazellulären als auch der intrazellulären Domäne der Untereinheiten möglich. Dadurch ergeben

Daneben sind Integrine auch in eine Vielzahl pathologischer Prozesse, wie z.B. bei der Tumorigenese oder chronischen Entzündungen involviert.

Integrine sind eine Familie von heterodimeren, transmembranösen, ubiquitär vorkommenden Glykoproteinrezeptoren, die aus nicht kovalent miteinander verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen. Beide Untereinheiten besitzen eine extrazelluläre Domäne sowie eine kurze

sich jeweils hochspezifische Funktionen für zahlreiche Integrinkombinationen. An der Wechselwirkung der Integrine mit Liganden sind beide Untereinheiten beteiligt (Hynes 2002, S. 673-687). Jeder Integrinrezeptor besitzt eine eigene Bindungsspezifität, die von der α -Untereinheit bestimmt wird. Viele Rezeptoren binden den gleichen Liganden oder teilweise überlappende Serien von Liganden, welchen die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) als Integrinbindungsmotiv gemeinsam ist. Deshalb werden von vielen verschiedenen Integrinen wichtige Komponenten des Plasmas wie Fibrinogen und Thrombin sowie wichtige Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen erkannt (Babbitt et al. 2002, S. 431-439). Weiterhin gibt es lösliche Integrinliganden, u.a. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), aber auch xenogene wie Bakterien, Viren oder gerinnungshemmende Disintegrine aus Schlangengiften und Speichel von Zecken oder Blutegel (Pfaff 1997, S. 101-121).

Integrine existieren in zwei allosterischen Hauptformen und können Signale in beide Richtungen durch die Zellmembran vermitteln. Sobald die Integrine sich an die Extrazellulärmatrix binden, ändert sich ihre Konformation und ihre zytoplasmatischen Domänen interagieren mittels Verbindungsproteinen mit dem Zytoskelett und mit Signalproteinen („outside-to-inside signaling“). Integrine können aber auch in einer inaktiven oder teilweise aktiven Konformation existieren und mit einer aktivierenden Änderung der Konformation auf intrazelluläre Signale („inside-to-outside signaling“) antworten, was wiederum eine vermehrte Interaktion mit bereits vorhandenen Liganden zur Folge hat (Giancotti und Ruoslahti 1999, S.1028-1032; Giancotti 2003, S. 149-151). Faktoren, welche die Integrinexpression beeinflussen, sind u.a. Röntgenstrahlung, Zytokine, Hormone und Pharmazeutika (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344).

2.7.2 INTEGRINCLUSTERING

Da die zytoplasmatische Domäne der Integrine sehr kurz ist (20-60 Aminosäuren) und keine intrinsische enzymatische Aktivität besitzt, findet die Signalübertragung mit Hilfe von Adapterproteinen statt, welche die Integrine mit dem Zytoskelett, mit zytoplasmatischen Kinasen und mit Wachstumsfaktoren verbinden (Giancotti 2003, S. 149-151). Die Bindung eines Liganden und eine Anheftung an die extrazelluläre Matrix lösen den Zusammenschluss mehrerer Integrine zu Clustern aus.

Diese Integrinclusterbildung bewirkt eine verstärkte Wechselwirkung zwischen Ligand und Zelle, beeinflusst die Signaltransduktion und führt zu einem positiven Feedbacksystem mit vermehrtem „Integrinclustering“. Dies induziert die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen (FAs), die aus Extrazellulärmatrixproteinen, Integrinen und Proteinen des Zytoskeletts bestehen (Stupack und Cheresch 2002, S. 3729-3738; Giancotti 2003, S. 149-151).

2.7.3 INTEGRINE UND IONISIERENDE STRAHLUNG

In vitro Daten zeigen, dass Zellkontakte zur EZM zelluläre Mechanismen beeinflussen, die u.a. zu einem verbesserten Überleben sowohl von normalen Körperzellen als auch von Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten nach ionisierender Bestrahlung führen können (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344; Cordes und Meineke 2004, S. 327-337; Cordes und Meineke 2005, S. 152-156). Interaktionen zwischen den oben genannten Signalwegen können in vielfältiger Weise die EZM modulieren, was zur Ausprägung eines Resistenzmechanismus gegenüber ionisierender Strahlung führen kann (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344). Der Begriff der zelladhäsionsbedingten Radioresistenz wurde von Cordes und Meineke (2003) geprägt. Die Interaktion von Zellen mit den physiologischen Integrin-Liganden Fibronectin, Laminin, Collagen-III und Vitronectin fördert das Überleben der Zellen, verglichen zu Zellkulturen ohne Einwirkung dieser Liganden (Lisiak und Cordes 2004, S. 271-278). Ionisierende Bestrahlung greift an verschiedenen Punkten in die zytoplasmatischen Signalkaskaden der Integrine ein (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344). Ionisierende Bestrahlung führt nach Meineke et al. 2002 zu einer signifikanten Hochregulation der Expression von β 1-, β 3- und α 5-Integrin an der Zelloberfläche von COLO-320-Zellen nach 48 bis zu 96 Stunden. Dieser Effekt zeigte sich immer Dosis- und Matrix-abhängig (Meineke et al. 2002a, S. 709-714). Durch Bestrahlung kommt es nach vermehrter Expression der β 1-Untereinheit an der Zelloberfläche zu einer verstärkten Adhäsion an EZM-Proteine wie Fibronectin oder Laminin. Im Folgenden wird dann die Integrin-linked-Kinase (ILK) aktiviert (Troussard et al. 2000, S. 5444-5452), die dann über die Aktivierung der Proteinkinase-B/AKT und der Glykogen Synthase Kinase-3 β Überleben und Proliferation reguliert (Cordes 2004, S. 5683-5692). Die Ausprägung dieser Effekte ist von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich stark.

2.8. DIE IMMUNGLOBULINSUPERFAMILIE

2.8.1 AUFBAU UND STRUKTUR

Mit über 100 Mitgliedern ist die Immunglobulinfamilie die umfangreichste Familie der Zelloberflächenmoleküle. Als verbindendes Element besitzen diese Adhäsionsmoleküle Immunglobulin-ähnliche Domänen (Godin et al. 1993, S. 441-452). Dieses Proteinfaltungsmotiv umfasst ca. 100 Aminosäuren und besteht aus zwei übereinander liegenden β -Faltblättern in antiparalleler Anordnung. Die dreidimensionale Struktur dieser Domäne wird häufig durch eine Disulfidbrücke stabilisiert. Von der Grundform der Ig-Domäne existieren zwei Subtypen:

- die IgV-Domäne mit Homologie zu den variablen Domänen der Immunglobuline besteht aus 108 bis 110 Aminosäuren und besitzt in der Mitte der Grundeinheit eine zusätzliche Schleife.
- IgC-Domänen sind mit 86-96 Aminosäuren etwas kleiner, weisen Homologien zu den konstanten Ig-Domänen auf und gehören entweder zum C1-Typ, der dem klassischen Typ einer konstanten Domäne entspricht, oder zum C2-Typ, der ein Faltungsmuster zwischen dem V- und dem C1-Typ aufweist (Bork et al. 1994, S.309-320).

Der extrazelluläre Bereich aller Mitglieder der Immunglobulinfamilie enthält mindestens eine Ig-Domäne. Viele Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie sind Membranproteine, wobei neben Transmembranformen mit zytoplasmatischer Domäne auch Moleküle existieren, die über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Membran angebunden sind. Der intrazelluläre Anteil verknüpft die betreffenden Moleküle mit dem Zytoskelett der Zelle und ermöglicht die Ausübung von Signalfunktionen. Viele Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie haben Erkennungs-, Adhäsions- und Rezeptorfunktionen. Zu dieser Gruppe gehören z.B. der B- und der T-Zellrezeptor, CD4, CD8 und die MHC-Moleküle I und II (Edelmann 1987, S. 11-45). Diese Moleküle sind in die T-Zellproliferation involviert. Es existieren weitere Untergruppen, wobei die C2-Gruppe Moleküle zusammenfasst, die auch an der Leukozytenadhäsion beteiligt sind. Dazu zählen unter anderem das intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54), das intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2, CD102), das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD 106) und das platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) (Adams und Shaw 1994, S. 831-836). Als ein wichtiger Vertreter der

Immunglobulinsuperfamilie wird nachfolgend genauer auf die interzellulären Adhäsionsmoleküle eingegangen.

2.8.2 INTERZELLULÄRE ADHÄSIONSMOLEKÜLE AM BEISPIEL VON ICAM-1

ICAM-1 wird von verschiedenen Zelltypen, z.B. Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Immunzellen exprimiert (Meineke et al. 2002b, S. 577-583). Abhängig vom exprimierenden Zelltyp ist ICAM-1 unterschiedlich glykosiliert, so dass das Molekulargewicht zwischen 80 und 114 kDa variiert (van de Stolpe und van der Saag 1996, S. 13-33). Das Protein besitzt 5 Immunglobulin-ähnliche Domänen.

Bei Entzündungsreizen kommt es in der Haut zum Anstieg der Expression von ICAM-1 (Matsumoto et al. 1997, S. 13-21). ICAM-1 als ein zelltypspezifischer Mediator hat verschiedene Funktionen, dabei stehen zelluläre Interaktionen während der Immunantwort und bei Entzündungsvorgängen im Vordergrund. ICAM-1 bildet vor allem mit Integrinen Rezeptor-Liganden-Paare, aber auch mit anderen Immunglobulin-Adhäsionsmolekülen (IgAM) und CD 43, sowie mit löslichem Fibrinogen, Hyaluronsäure und weiteren Stoffen (Hallahan und Virudachalam 1997, S. 6432-6437; van de Stolpe und van der Saag 1996, S. 13-33). Die wichtigsten Liganden für ICAM-1 stellen die beiden Mitglieder der Integrinfamilie (β 2-Untergruppe) LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) dar (van de Stolpe und van der Saag 1996, S. 13-33). Die Bindungsstelle für das Integrin LFA-1 befindet sich am Ende der ersten Ig-ähnlichen Region von ICAM-1. LFA-1 und Mac-1 müssen aktiviert werden, um eine hohe Affinität für die ICAM-1 Bindungsstelle aufzuweisen. Das Binden von LFA-1 und Mac-1 an ICAM-1 ist abhängig vom Vorhandensein von divalenten Kationen. Die Umwandlung von LFA-1 in ein Stadium der hohen Bindungsstärke (Affinität) für ICAM-1 wird durch die Bindung von ICAM-1, die Querverbindung des T-Zellrezeptors, Aktivierung der Proteinkinase C oder erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration induziert (van de Stolpe und van der Saag 1996, S. 13-33). Einerseits vermittelt ICAM-1 so die Steuerung der Ligand-Rezeptor-Bindung während der Antigenpräsentation und die Ausbildung verschiedener Zellbindungen, andererseits dient ICAM-1 der Zellorientierung sowie der inter- und intrazellulären Signaltransduktion (Hubbard und Rothlein 2000, S. 1379-1386). Über die outside-in-Transduktion werden spezifische Kinasen aktiviert, wel-

che die Erhöhung von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Zellmembranproteinen bedingen, was zu einer Änderung der Expression führt und zur Anregung der Proliferation (Hubbard und Rothlein 2000, S. 1379-1386). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen vermitteln zelluläre Adhäsionsmoleküle die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen bei der Leukozytenextravasation. Dazu gehören u.a. ICAM-1, VCAM, die E-, P- und L-Selektine, CD 31 sowie $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Integrine. Die Adhäsion von Leukozyten an Gefäßendothelien ist der essentielle Schritt für die Migration von Entzündungszellen aus der Blutzirkulation (Hallahan und Virudachalam 1997, S. 6432-6437). Viele Funktionen von ICAM-1 im Entzündungsprozess sind eng an die schnelle Induzierbarkeit des Moleküls durch proinflammatorische Stimuli, wie Interferon- γ , TNF α (Tumornekrosefaktor), IL-1 (Interleukin-1), reaktive Sauerstoffderivate, zellulärer Stress und Retinolsäure gekoppelt (Janssens et al. 1999, S. 64-69). ICAM-1 kann aber auch durch exogene Stimuli wie Virusinfektionen, Substanzen wie Phorbolster und physikalische Noxen (ionisierende und UV-Strahlung) aktiviert werden (Degitz 1996, S. 42-44). Durch Ankoppeln von TNF α und IL-1 an ihre spezifischen Rezeptoren auf Endothelzellen wird die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 induziert (Hallahan und Virudachalam 1997, S. 6432-6437). Nach Ackermann und Harvima (1998) induzieren TNF α und Histamin bei Entzündungen der Haut ICAM-1, was auch ein wichtiger Initiator von Leukozyten/Keratinocyten-Interaktionen ist. Mastzellen psoriatischer und atopischer Dermatitispatienten sind TNF α positiv. Die Degranulation der Mastzellen ist mit einer ICAM-1-Expression in der Epidermis assoziiert (Ackermann und Harvima 1998, S. 353-359).

2.8.3 ICAM-1-EXPRESSION NACH IONISIERENDER BESTRAHLUNG

Es ist bekannt, dass sowohl UV- als auch ionisierende Strahlung die Expression von ICAM-1 beeinflussen können (Cai et al. 1996, S. 7-16; Hallahan und Virudachalam 1997, S. S. 6432-6437; Quarmby et al. 2000, S. 3375-3381). ICAM-1 wird durch ionisierende Bestrahlung in Hepatomzellen verstärkt induziert (Meineke et al. 2002b, S. 577-583). Bei der Expression von ICAM-1 sind zwei wichtige Regulationsparameter zu berücksichtigen. Dies sind der nukleäre Transkriptionsfaktor NF κ B und zum anderen das proinflammatorische Zytokin TNF α . Beide spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der ICAM-1 –Expression (Leung 1999, S. 734-739; Roebuck 1999, S. 223-230). Nach ionisierender Bestrah-

lung entstehen reaktive Sauerstoffderivate. Eine Präinkubation von HaCaT-Zellen mit Antioxidantien blockiert die sonst übliche Induktion der ICAM-1-Expression durch HaCaT-Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass neben NF κ B auch reaktive Sauerstoffderivate an der ICAM-1-Induktion nach Bestrahlung beteiligt sind (Baeuml et al. 1997, S. 127-142). Obwohl ionisierende Bestrahlung bei bestimmten Zellarten (HaCaT und Monozyten) die Produktion von IL-1 und TNF α stimuliert, gelten diese Zytokine nicht als essentielle Mediatoren der strahlungsbedingten ICAM-1-Induktion. Neutralisierende Antikörper gegen IL-1 und TNF α konnten eine Induktion von ICAM-1 auf HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 40 Gy nicht verhindern (Behrends et al. 1994, S. 726-730).

ICAM-1 aber kann wiederum selbst über eine Aktivierung von Kinasen Transkriptionsfaktoren aktivieren, was dann wieder zu einer verstärkten Zytokinproduktion führt (Hubbard und Rothlein 2000, S. 1379-1386). Es handelt sich hierbei um einen sich selbstverstärkenden Regelkreis, bei dem jedoch noch nicht alle Komponenten klar sind. Eine Regulation der Expression von ICAM-1 auf mRNA-Ebene nach ionisierender Strahlung konnten von Behrends et al. (1994, S. 726-730) an HL60-, HaCaT- und HeLa- Zellen, sowie von Hareyama et al. (1998, S. 691-696) an humanen Kolon- und Magenadenokarzinomzellen gezeigt werden. Müller et al. (2006, S. 670-679) konnten eine Hochregulation von ICAM-1 auf mRNA- und Proteinebene in humanen Hautzellen nach Bestrahlung *in vivo* und *in vitro* nachweisen. Versuche mit ICAM-1-defizienten Mäusen zeigten keine Entwicklung einer entzündlichen Reaktion nach Bestrahlung trotz vorhandener inflammatorischer Zytokine (Hallahan und Virudachalam 1997, S. 6432-6437). Die Anwesenheit von ICAM-1 ist daher eine notwendige Voraussetzung für die Migration von Leukozyten in verletzte bzw. entzündete Regionen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER

Antikörper: (Name, Klon, Firma, Firmensitz)

Name	Klon	Firma	Firmensitz
APAAP / Red Maus, 120 ml	K5000	Dako	Hamburg, Deutschland
APAAP-Komplex	D 651	Dako	Hamburg, Deutschland
EGF	E5	Oncogene™	Cambridge, USA
EGFR	E30	Dako	Hamburg, Deutschland
Intβ ₁	K20	Dako	Hamburg, Deutschland
Intα ₂ β ₁	P1E6	Dako	Hamburg, Deutschland
TNF _α	1825.121	Calbiochem	San Diego, USA
TGFβ ₁	9016.2	Oncogene™	Cambridge, USA

3.1.2 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN REAGENZIEN

Reagenzien: (Name, Firma, Firmensitz)

Name	Firma	Firmensitz
Agarose Typ 1-A Low EOO	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
1 mM Biotin-16-dUTP	Roche	Mannheim, Deutschland
Chem Mate™ Detection Kit (APAAP)	Dako	Hamburg, Deutschland
Custom-Array (CHAO10919)	SuperArray Inc.	Bethesda, MD, USA
DNA-Längenstandard (1 kb)	Gibco BRL	Berlin, Deutschland
DNA, MB grade from fish sperm	Roche	Mannheim, Deutschland
DMEM	PAA Laboratories GmbH	Linz, Österreich
1 M DTT (2g)	Roche	Mannheim, Deutschland
dATP	Roche	Mannheim, Deutschland
dCTP	Roche	Mannheim, Deutschland
dGTP	Roche	Mannheim, Deutschland
dTTP	Roche	Mannheim, Deutschland
Entwickler GBX Developer/Replenisher	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
FCS Gold (Fötales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH	Linz, Österreich
Fixierer, GBX Fixer/Replenisher	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Human Apoptosis-1 GEArray Kit	SuperArray Inc.	Bethesda, MD, USA
Kaiser's Glyceringelatine	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Merck Eurolab GmbH,	Hamburg, Deutschland
Mayers Hämalalaunlösung	Merck	Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Monothioglycerol	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
MMLV Reverse Transcriptase 50 units/ μ l	Promega	Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered saline)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
RNase-Inhibitor 40 units/ μ l	Promega	Mannheim, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RPMI-1640	PAA Laboratories GmbH	Linz, Österreich
SDS (Laurylsulfat)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Skin β Tryptase, Human	Promega	Woods Hollow, USA
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (10x)	Gibco BRL	Eggenstein, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution (1x)	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser ange-
setzt.

20% SDS

200 g SDS ad 1000 ml Aqua dest., bei 65 °C auflösen.

20 x SSC

175,3 g NaCl

88,2 g Na₃Citrate x 2 H₂O

ad 1000 ml Aqua dest., pH = 7,0

Waschlösung 1 (GeArray)

aus 2 x SSC und 1%iger SDS

Ansatz von 250 ml Waschlösung:

12,5 ml 20% SDS

25 ml 20 x SSC

ad 212,5 ml Aqua dest.

Waschlösung 2 (GeArray)

aus 0,1 x SSC und 0,5%iger SDS

Ansatz von 250 ml Waschlösung:

6,25 ml 20% SDS

12,5 ml 20 x SSC

ad 231,25 ml Aqua dest.

Fixierer und Entwickler

je 100 ml Konzentrat ad 500 ml Aqua dest.

3.1.4 HERSTELLERVERZEICHNIS DER VERWENDETEN GERÄTE

Gerät	Firma, Firmensitz
Analysenwaage 1265 MP	Fa.: Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bestrahlungseinrichtung Isovolt 320 A	Fa.: Seifert, München, Deutschland
Brutschrank Cytoperm 8080	Fa.: Heareus/Kendro, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer GNA 100	Fa.: LKB Produkter AB, Bromma, Schweden
Filmkassetten Hypercassette	Fa.: Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Fluoreszenzmikroskop TCS NT	Fa.: Leica, Nussloch, Deutschland
Fotoeinrichtung Polaroid	Fa.: Polaroid, Cambridge, Mass., USA
Gelkammer	Fa.: AGS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Herahybrid 230 V	Fa.: Heraeus/Kendro, Hanau, Deutschland
Kühl-Zentrifuge Rotanta / RP Typ 4300	Fa.: Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Land Camera MP-4	Fa.: Polaroid, Cambridge, Mass., USA
Master cycler gradient	Fa.: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Fluovert	Fa.: Leica, Nussloch, Deutschland
Mikrowelle Typ F 1210	Fa.: Siemens, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	Fa.: Superior-Mariendorf, Lauda-Königshofen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Hera HS 12	Fa.: Kendro, Hanau, Deutschland
Spektralphotometer Helios α UVA	Fa.: Unicam, Cambridge England
Stereomikroskop Stemi SV8	Fa.: Zeiss, Jena, Deutschland
Folien-Schweißgerät	Fa.: Hawo, Obrigheim, Deutschland
Thermal Cycler 480	Fa.: Perkin Elmer, Norwalk, USA
Thermomixer 5436	Fa.: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad Bioblock Scientific	Fa.: Illkirch, Cedex, Frankreich
Vortexer VF2	Fa.: IKA-Labortechnik, Staufen im Br., Deutschland
Zeiss EM10	Fa.: Zeiss, Jena, Deutschland
Zentrifuge Sigma 2K 15	Fa.: Christ, Osterode am Harz, Deutschland

3.1.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterial	Firma, Firmensitz
Chromatographie-Papier	Fa.: Whatman, Maidstone, England
Deckgläschen 24x60 mm	Fa.: Menzel-Gläser, Heidesheim, Deutschland
Einmalkanülen 21G 100 Serican	Fa.: Braun, Melsungen, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Fa.: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feindosierungsspritze Omnifix-F 1 ml	Fa.: Braun, Melsungen, Deutschland
GeneAmp Reaktionsgefäße	Fa.: Perkin Elmer, Norwalk., USA
Konische Röhrchen, 15 ml Falcon	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA
Konische Röhrchen, 50 ml Falcon	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA
Lumi-Film chemiluminescent Detection Film	Fa.: Roche, Mannheim, Deutschland
Objektträger (4 Well)	Fa.: Permanox® Slide, Naperville, IL, USA
Präzisionsküvetten	Fa.: Hellma, Mühlheim/Baden, Deutschland
Pipettenspitzen, 10 μ l, cristal	Fa.: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 100 μ l, gelb	Fa.: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 1000 μ l, blau	Fa.: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette, 2 ml Falcon	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA
Serologische Pipette, 5 ml Falcon	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA

Serologische Pipette, 10 ml Falcon	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA
Zellkulturflaschen, 25 cm ² Falcon	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA
Zellkulturflaschen, 75 cm ² Falcon	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA
Zellkulturpetrischalen, 60x15mm	Fa.: Becton Dickinson, NJ, USA

3.1.6 VERWENDETE SOFTWARE

Software	Firma, Firmensitz
SigmaPlot 4.0	Aspire Software International, Charter Oak Drive, Ashburn, VA, USA
SigmaStat 2.0	Aspire Software International, Charter Oak Drive, Ashburn, VA, USA
ScanAlyze Software, Version 2.44	Michael Eisen, Stanford University, CA, USA
MS Excel 2003	Microsoft Deutschland

3.2 METHODEN

3.2.1 VERWENDETE ZELLEN UND ZELLKULTURBEDINGUNGEN

Die Versuche wurden mit HaCaT-Zellen, einer spontan immortalisierten, aneuploiden, humanen Keratinozytenzelllinie durchgeführt. Die HaCaT-Zellen wurden freundlicherweise durch Univ.-Prof. Dr. Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, zur Verfügung gestellt (Boukamp et al. 1988, S. 761-771; Boukamp et al. 1999, S. 5638-5645). Diese Zellen behalten *in vitro* ihre Differenzierungsfähigkeit bei, zeigen kein tumoröses Wachstum und entsprechen damit, bis auf ihre Immortalität, weitgehend normalen humanen Keratinozyten (Boukamp et al. 1988, S. 761-771).

Die HaCaT-Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen mit 12 ml Kulturmedium kultiviert. Als Medium fand Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) Verwendung. Das FCS wurde bei 56°C für 40 min hitzeinaktiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte ohne Zusatz von Antibiotika bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 95%, mit einem CO₂-Anteil von 10%, wobei sich der pH-Wert im Medium auf 7,4 einstellte. Da HaCaT-Zellen adhärent wachsen, bilden sie am Boden der Kulturflaschen einen konfluenten Monolayer. Um eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährmedium

gewährleisten zu können, war ein Umsetzen alle 3 bis 4 Tage notwendig. Dieses „Passagieren“ erforderte zunächst das Absaugen des Mediums in der Sicherheitswerkbank Hera HS 12 und nachfolgend die Gabe von 5 ml des Enzyms Trypsin-EDTA, um die adhärennten Keratinozyten zu lösen. Die Kulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37°C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Anteil von 10% inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen lösten. Dann erfolgte die sofortige Verteilung der HaCaT-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml Medium in 75 cm² Kulturflaschen mit 12 ml DMEM/10 % FCS.

Für die Experimente wurden die exponentiell asynchron wachsenden Kulturen pelletiert (300 x g, 5 min, RT), in frischem Kulturmedium resuspendiert und mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml Medium in neue Kulturflaschen überführt (12 ml Medium in 75-cm²-Kulturflaschen bzw. 5 ml Medium in 25 cm²-Kulturflaschen). Die Bestrahlung der Zellen erfolgte erst 24 h nach Ansatz der Zellkulturen, d.h. zu einem Zeitpunkt, in dem sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Für die Kokultivierungsexperimente wurde als eine weitere Zelllinie die humane Mastzelleukämie-Zelllinie HMC-1 verwendet. Diese Zelllinie wurde von einem Patienten mit Mastzelleukämie gewonnen und freundlicherweise von Dr. J. H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie ist immortal, weist einen ähnlichen Phänotyp auf wie *in vivo* gewonnene humane Mastzellen und reagiert in ähnlicher Weise (Nilsson et al. 1994, S. 489-498). Die Zellen wurden in 40 ml RPMI 1640 Medium gezüchtet, das mit 10% FCS und mit 1,2 mM Monothioglycerol angereichert wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 95%, mit einem CO₂-Anteil von 5%, wobei sich der pH-Wert im Medium auf 7,4 einstellte. Ein Passagieren dieser Zellen erfolgte nach 3 bis 4 Tagen.

3.2.2 BESTRAHLUNG UND BESTRAHLUNGSBEDINGUNGEN

Die Zellen wurden mit 240 kV Röntgenstrahlen (Isovolt 320/10, Seifert, Ahrensburg) mit Filterung durch 3 mm Beryllium bestrahlt. Die Dosisleistung der Röntgenröhre betrug 1 Gy/min bei einem Röhrenstrom von 13 mA und einem Fokus-

Objekt-Abstand von 40 cm. Die absorbierte Strahlung wurde von einem Duplex-Dosimeter (SN4) mit einem Sr-90-Präparat als Referenzstrahler gemessen.

3.2.3 ERSTELLEN EINER WACHSTUMSKURVE VON HACAT-ZELLEN

Zur Abschätzung eines strahleninduzierten Effekts und zur Überprüfung zellbiologischer Parameter dient die Erstellung von Dosiswirkungsbeziehungen in Form von Klonierungstests und Wachstumskurven. Diese stellen gewissermaßen individuelle Eichparameter für Zelllinien dar und sind die klassischen strahlenbiologischen Methoden zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit *in vitro*. Mittels der Wachstumskurve kann die Proliferationskinetik von Zelllinien nach Strahlenexposition beurteilt werden. Das Wachstum einer Zellkultur kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. In der Vorbereitungsphase passen sich die Zellen an die neue Umgebung an und bereiten sich zur ersten Teilung vor. Mit der ersten Zellteilung beginnt die Beschleunigungsphase, die nach Erreichen der maximalen Wachstumsrate endet. Nach dieser Phase treten die Zellen in die exponentielle Wachstumsphase ein. Die vorhandene Zelldichte, Mangel an Nährstoffen, die Anhäufung von Stoffwechselprodukten und Strahlenschäden limitieren dann das Wachstum, was durch einen „plateauähnlichen“ Kurvenverlauf dargestellt wird. Diese Phase wird die Verzögerungsphase genannt. Sobald nun das Zellsterben die Anzahl von Zellteilungen überwiegt, kann ein Zellverlust und das Absinken der Kurve beobachtet werden.

Zum Erstellen der Wachstumskurve wurden HaCaT-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase unter Zugabe von Trypsin abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurden $2,6 \times 10^5$ Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und 30 min später bestrahlt (1, 2,5, 5, 10 Gy). Jeweils 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 h nach Bestrahlung wurden die Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl für jeden Zeitpunkt wurde aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Ansätzen ermittelt. Zur Bestimmung des Einflusses von Mastzellen auf das Wachstumsverhalten bestrahlter Keratinozyten, wurden einem Teil der Ansätze Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den Keratinozyten zugegeben. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die nicht adhärent wachsenden Mastzellen durch mehrmaliges Waschen mit warmen PBS entfernt und die adhärent wachsenden HaCaT-Zellen un-

ter Zugabe von Trypsin abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl der Keratinozyten erfolgte dann mikroskopisch mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Das Zellwachstum wurde anschließend graphisch dargestellt, indem die ermittelten Gesamtzellzahlen gegen die Zeit aufgetragen wurden.

3.2.4 KLONOGENITÄTSASSAY

Als klonogen werden die Zellen bezeichnet, die das Potential besitzen, aus einzelnen Zellen größere Kolonien zu bilden, indem sie mehrere Zellteilungen durchlaufen und dabei Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen bilden. Ein Verlust der reproduktiven Kapazität bedeutet den Tod der Zelle. Trägt man das Überleben von Zellen in logarithmischem Maßstab gegen die Dosis in linearem Maßstab auf, erhält man für jede Zelllinie eine charakteristische Dosis-Effekt-Kurve. Diese Kurven beginnen oft mit einem flach verlaufenden Anteil, der Schulter (Dq), der dann in einen geraden exponentiellen Teil (Do) übergeht (Hall 1994, S. 1-478). Dq und Do sind reziproke Werte der Steigungen des flachen bzw. steilen Teils der Kurve.

3.2.4.1 DURCHFÜHRUNG DES KLONOGENITÄTSASSAYS

Für den Klonierungstest wurden in Petrischalen, die mit 5 ml DMEM (mit 10% FCS) gefüllt waren, folgende Dichten ausgesät:

- 700 HaCaT-Zellen in der Schale der Kontrollkultur
- 700 HaCaT-Zellen in der mit 1 Gy bestrahlten Petrischale
- 1400 HaCaT-Zellen in der mit 2,5 Gy bestrahlten Petrischale
- 5000 HaCaT-Zellen in der mit 5 Gy bestrahlten Petrischale
- 10000 HaCaT-Zellen in der mit 10 Gy bestrahlten Petrischale

Einem Teil der Kulturschalen wurde in verschiedenen Versuchen jeweils variierende Zellzahlen (100, 3000, 8000) von Mastzellen, 1 ml Mastzell-Überstand bzw. 120 mU/ml Trypsin zugesetzt. Es wurden jeweils drei gleiche Kulturschalen angesetzt. Nach 30 min wurden die HaCaT-Zellen bestrahlt und für 14 Tage unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank solange, bis aus den einzeln liegenden Zellen unter dem inversen Mikroskop sichtbare, nicht-konfluierende Klone bestimmter Größe entstanden waren. Die entstandenen Zellklone wurden nach Absaugen des Mediums 30 min in abso-

lutem Ethanol fixiert und mit einer 0,25% Kristallviolett-Lösung für 5 min angefärbt. Klone, die aus mehr als 50 Zellen bestanden, wurden ausgezählt und in Prozent zur eingesäten Zellzahl berechnet. Die Ausbeute an kolonie-bildenden Zellen („plating efficiency“) betrug bei der HaCaT-Zelllinie zwischen 30 - 60%. Diese wurde anhand der unbestrahlten Zellen bei jedem Experiment mitbestimmt, auf 100% gesetzt und die bestrahlten Kulturen dagegen normiert. Das Überleben (Klonogenität) wurde gegen die Strahlendosis halblogarithmisch aufgetragen. Parameter der Strahlensensitivität (D_0 und D_q) wurden graphisch ermittelt (Hall 1994, S. 1-478).

3.2.4.2 HERSTELLUNG DES MASTZELLÜBERSTANDES

15×10^5 Mastzellen wurden in 5 ml RPMI 1640 Medium gezüchtet, das mit 10% FCS und 1,2 mM Monothioglycerol angereichert wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 95%, mit einem CO₂-Anteil von 5%, wobei sich der pH-Wert im Medium auf 7,4 einstellte. Nach drei Tagen Inkubation der Mastzellen wurden die 5 ml entnommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und abzentrifugiert. Von dem Überstand wurde 1 ml in je eine Petrischale zu den HaCaT-Zellen (s.o.) pipettiert.

3.2.5 GENEXPRESSIONSARRAY

cDNA- Mikroarrays stellen ein modernes Untersuchungssystem zum Studium der Genexpression dar und ermöglichen eine vergleichende Analyse des transkriptionellen Zustandes einer Zelle oder eines Gewebes. Eine Vielzahl von Genen kann dadurch simultan in ihrer Expressionsstärke erfasst werden und komplexe genetische Veränderungen werden besonders gut visualisiert (Mantripragada et al. 2004, S. 87-94).

Verwendet wurden der Human Apoptosis-1 GEArray Kit und ein selbst konfektionierter Human GEArray Kit von SuperArray Inc., Bethesda, MD. Jeder Kit besteht aus zwei identischen, positiv geladenen Nylonmembranen, die jeweils mit mehr als 20 cDNA Fragmenten von Genen beschichtet sind (vgl. GEArray™ User Manual). Diese cDNA Fragmente dienen als „Andockstellen“ für mRNA-Moleküle. Wegen der Eigenschaft der komplementären Basenpaarung dockt jedes mRNA-Molekül an der cDNA an, deren Bauplan es gerade übermittelt.

3.2.6 ISOLATION VON GESAMT-RNA

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus HaCaT-Zellen wurde die Methode der sauren Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet. Hierbei wurden die Zellen in Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung homogenisiert und einer zweifachen Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Die RNA aus der wässrigen Phase wurde mit Isopropanol präzipitiert, in 80%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in RNase freiem Aqua bidest. gelöst.

Die Untersuchung der Einflussnahme der Mastzellen auf Wachstum und Überleben der HaCaT-Zelllinie sollte unter verschiedenen Bedingungen erfolgen:

- HaCaT 0 Gy
- HaCaT 5 Gy, Zellernte 30 min nach Bestrahlung
- HaCaT 0 Gy, zwei Stunden Inkubation mit 3 Millionen Mastzellen
- HaCaT 5 Gy, zwei Stunden Präinkubation mit 3 Millionen Mastzellen, Zellernte 30 min nach Bestrahlung

Aus den bestrahlten und den nicht bestrahlten Zellen wurde dann die RNA gewonnen. Die Isolation der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines auf Silica-Gel-Membranen beruhenden Isolationskits über Säulen, wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden).

6 Millionen HaCaT-Zellen wurden 9 min bei 1200 Umdrehungen/min und bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren entfernt und das Pellet in 6 ml PBS resuspendiert. Diese Lösung wurde wiederum unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und auf das gewaschene Pellet wurden 600 µl Buffer RLT mit Zusatz von 0,1% β-Mercaptoethanol aufgetragen. Um die Lösung zu homogenisieren, wurde das Pellet mit einer Spritze ca. 5 bis 10 mal aufgezogen. Dann wurden 600 µl 80%iges Ethanol (Merck, Darmstadt) zugegeben und mit der Pipette gut gemischt und die Lösung in den „RNeasy Minisäulen“ pipettiert. Als nächster Schritt wurde die Lösung für 15 sec mit 10000 Umdrehungen/min bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf die Säule wurden dann nacheinander 700 µl Puffer RW 1 und 2 x je 500 µl Puffer RPE zugegeben. Nach jeder Zugabe der Puffer wurde - wie oben beschrieben – zentrifugiert. Zum Eluieren der fertigen RNA wurde die

Säule abschließend auf ein 1,5 ml Eppendorftube gesetzt, 40 µl RNase freies Wasser zugefügt und für 1 min zentrifugiert. Die RNA wurde bei -70° C aufbewahrt.

3.2.7 QUANTIFIZIERUNG DER RNA UND ÜBERPRÜFUNG IHRER REINHEIT

3.2.7.1 SPEKTRALPHOTOMETRIE

Die Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt, indem bei Wellenlängen von 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) die Extinktion gemessen wird. War der Koeffizient kleiner als 1,8 bis 2 ist die Präparation mit Protein, genomischer DNA und / oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) kontaminiert. In diesem Fall sollte die RNA erneut gereinigt werden. Da eine Optische Dichte = 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl entspricht, lässt sich die RNA-Konzentration photometrisch wie folgt bestimmen:

$$\text{Konzentration [ng/µl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

3.2.7.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren (RNA oder DNA) nach ihrer Größe zu trennen und um ihre Größe durch Vergleich mit Standards bekannter Größe zu bestimmen. In einem elektrischen Feld wandern die Nukleinsäure-Moleküle aufgrund ihrer negativen Nettoladung von der Kathode zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare und abhängig von der Agarosekonzentration des Gels ist (Helling et al. 1974, S. 1235-1244).

Zur Visualisierung der RNA-Proben wurde ein 1%iges Agarose-Gel in 1xTAE-Puffer hergestellt und mit Ethidiumbromid (4 µl/100 ml) versetzt. Als Proben wurden aufgetragen: 1,5 µl DNA Standard und je 2 µl der isolierten RNA, jeweils mit 1,5 µl Ladepuffer und 6 µl Aqua dest. versetzt. Anschließend wurde an das Gel eine Spannung von 80 V für ca. 60 min bei RT angelegt.

Die Proben wurden durch die Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert und fotografiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA

wurden die 28 S- und 18 S- Banden der rRNA beurteilt. Das Verhältnis dieser Banden zueinander (18 S / 28 S) sollte bei 1 zu 1,8 bis 2,5 liegen.

3.2.8 DURCHFÜHRUNG DES NON-RADIOACTIVE GEARRAY™ SYSTEM

Synthese von cDNA aus mRNA („Labeln“): Im ersten Teil dieses Versuchs sollte aus mRNA Biotin-gelabelte cDNA synthetisiert werden. In ein PCR-Röhrchen wurden dafür 5 µg der isolierten RNA gegeben. In jedes Röhrchen wurden dann 2 µl eines GEA primer Mixes (Puffer A) beigemischt und das Volumen mit RNasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden durchgemischt und leicht zentrifugiert. Danach wurden die RNA-Proben in einem Mastercycler gradient bei 70°C für 2 min inkubiert. Die Lösung wurde dann auf 42°C abgekühlt und für 2 min inkubiert.

Nach der Inkubation wurde ein „labeling mix“, bestehend aus Puffer BN, Biotin-16-dUTP, RNase Inhibitor, MMLV Reverse Transcriptase und RNase-freiem Wasser, nach folgenden Rezepten vorbereitet:

Herstellung des Puffers BN:

10 x RT Puffer	50 µl
1 M DTT	1 µl
10 x dNTPs	50 µl
	<hr/>
	101 µl
10 x dNTPs besteht aus:	
dATP	10 µl
dCTP	10 µl
dGTP	10 µl
dTTP	1 µl
H ₂ O DEPC	169 µl
	<hr/>
	200 µl

Die Nukleotide wurden von der Firma Roche Diagnostics, Mannheim bezogen.

„labeling mix“ für zwei RNA-Proben:	
Puffer BN	16 µl
1 mM Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim)	8 µl
RNase-Inhibitor 40 units/µl (Promega, Mannheim)	2 µl
MMLV Reverse Transcriptase 50 units/µl (Promega, Mannheim)	4 µl
RNase freies Wasser	10 µl
	40 µl

Der „labeling mix“ wurde für 2 min bei 42°C inkubiert und je 20 µl wurden zu einer RNA-Probe pipettiert. Die Proben wurden nun bei 42°C 120 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit je 5 µl Puffer C (10 x Stop Solution) gestoppt. Die Proben wurden dann für 5 min bei 94°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

Hybridisierung: Danach konnte mit der Prähybridisierung der Membranen begonnen werden. Bei der Prähybridisierung sollen unspezifische Bindungen durch die denaturierte DNA des Fischspermas blockiert werden.

Zunächst wurde DNA aus Fischsperma für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Membranen wurden ca. 2 min mit dH₂O befeuchtet, zusammengerollt und einzeln in 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Auf jede Membran wurde ein Mix aus 10 ml vorgewärmter GEAhyb Hybridization Solution (68°C) und 100 µg der denaturierten DNA/ml pipettiert. Die Falcon-Röhrchen wurden in Hybridisierungsflaschen gegeben und im Hybridisierungssofen für 1 bis 2 Stunden mit 8 Umdrehungen/min bei 68°C inkubiert.

Nach der Prähybridisierung wurde die Flüssigkeit aus den Falcon-Röhrchen verworfen. Die cDNA-Proben wurden mit je 5 ml der GEAhyb Hybridization Solution auf die Membranen pipettiert. Dann wurden die Membranen über Nacht bei 68°C und 8 Umdrehungen/min hybridisiert.

Am 2. Tag erfolgte das Waschen der Membranen. Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurden die Membranen 2 mal je 20 min mit ca. 50 ml Waschlösung 1 (2 x SSC, 1% SDS) und dann 2 mal je 20 min mit ca. 50 ml Waschlösung 2 (0,1 x SSC, 0,5% SDS) bei 68°C mit 30 bis 40 Umdrehungen/min gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Membranen in eine biotinfreie Wanne gelegt und mit 10 ml der auf 50°C vorgewärmten GEAblocking Solution benetzt. Unter leichtem Schütteln wurden sodann die Membranen für 40 min mit der Lösung inkubiert. Anschließend wurde der GEAblocking Solution AP-Streptavidin (1:5000) zugegeben und diese Lösung in den Wannen für weitere 40 min inkubiert.

Es folgten vier 5-minütige Waschschriffe mit je 10 ml des auf 37°C erwärmtem 1 x Wasch-Puffers F. Als nächster Schritt folgte das zweimalige Waschen der Membranen mit 10 ml 1 x AP-assay Puffer (Puffer G) für je eine Minute zur Detektion mit 5 ml CDP-Star® Substrat (2 min unter leichtem Schütteln inkubieren).

Die Membranen wurden daraufhin auf einem Filterpapier abgestreift und in Frischhaltefolie eingepackt, in eine Röntgenkassette mit Film eingelegt und belichtet.

Das CDP-Star® Substrat erreicht in 2 bis 4 Stunden seine stärkste Lichtemission, die mehrere Tage anhält, was vielfache Filmbelichtungen ermöglicht.

3.2.9 AUSWERTUNG DER ARRAYS

Die Auswertung erfolgte mit einer Spezialsoftware (GeArrayAnalyzer, Superarray), die mit weiterer Software (ScanAlyze 2.44, MS Excel 2003, SigmaPlot 4.0) kombiniert wurde. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und mussten invertiert werden, so dass der Hintergrund schwarz war und die Spots verschiedene Grauintensitäten (Maximalwert weiß) aufwiesen. Dann wurde mit Hilfe der ScanAlyze Software (Version 2.44, Stanford University) ein Koordinatensystem über die Spots gezogen. Die Software konvertierte die Grauwerte der Spots in Summen-Grauwerte einer Grauskala. Diese wurden dann nach Abzug der Hintergrundintensität mit Hilfe der Excel-Software zu Tabellen weiterverarbeitet. Diese derart erhaltenen „Rohwerte“ wurden schließlich mit dem GeArrayAnalyzer bearbeitet.

Um zwei Proben miteinander vergleichen zu können, müssen die durch die Datenanalyse gewonnenen Fluoreszenz-Intensitäten normalisiert werden (Tseng et al. 2001, S. 2549-2557). Das dient dem Zweck, verschiedene störende Einflüsse, wie Unterschiede in der Markierung, variabler Hintergrund, verschiedene Quantenausbeuten der Farbstoffe, Variabilität der Experimente, mathematisch zu kompensieren (Khan et al. 1999, S. 13264-13269; Schuchhardt et al. 2000, S. E47-e47). In dieser Arbeit wurde die Normalisierung gegen die Gesamtgenexpression jeder Probe, unter Abzug des Hintergrundes, gewählt.

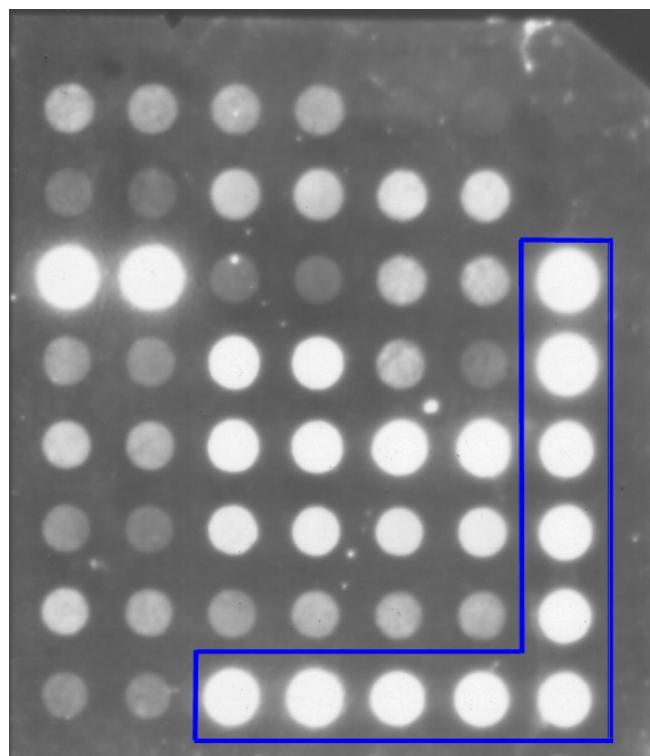


Abbildung 3 : Humaner Apoptosis-1 GEArray (unbestrahlt). Das zugehörige Koordinatensystem mit den jeweiligen Genlokationen findet sich in Anhang 2. Die housekeeping-Gene wurden blau markiert.

Nachdem die Normalisierung erfolgt war, konnten die Grauwerte der Kontrollen zu denen der Proben in Beziehung gesetzt werden. Die verwendeten Kontrollen sollten in Test- und Referenzgewebe gleichstark exprimiert werden und einen stabilen Quotienten um 1,0 haben (Beißbarth et al. 2000, S. 1014-1022). Quotienten > 1 stellen eine Hochregulation der Genexpression, Quotienten < 1 eine Reduktion der Genexpression gegenüber der Kontrolle dar.

3.2.10 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON OBJEKTTRÄGERKULTUREN VON HACAT-ZELLEN

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Objektträgerkulturen mit Hilfe des Chem Mate™ Detection Kit, APAAP gefärbt. Das Prinzip der APAAP-Methode besteht darin, das nachzuweisende Antigen im Schnittpräparat oder an Objektträgerkulturen mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Bindungen und einem Markerenzym-Komplex (alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase) darzustellen. Diese immunenzymatische Färbemethode nützt eine Enzym-Substratreaktion, um farblose Chromogene in ein gefärbtes Endprodukt umzuwandeln. Das Enzym dieser Färbung, die alkalische Phosphatase, hydrolysiert Naphtholphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen und bilden so unlösliche Azofarbstoffe.

Zwei Tage vor der Färbung wurden auf die Objektträger (OT) in jedes Well 3 x 10⁵ Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT für die Zeit von 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert. 6 OT blieben ohne Mastzellzusatz. Nach 2 Stunden Inkubation wurden alle OT jeweils mit 5 Gy bestrahlt. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt: 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h. In jeder Zeitkinetik wurden eine Negativkontrolle sowie eine unbestrahlte Kontrolle angefertigt. Ein Teil der Negativkontrollen sowie der unbestrahlten Kontrollen wurden ebenfalls 2 Stunden mit den Mastzellen inkubiert.

Vor Beginn der Färbung wurde das Medium abgesaugt. Die OT wurden kurz in Aqua dest. gewaschen, in Ethanol fixiert und dann luftgetrocknet. Anschließend wurden die OT in Aqua dest. für 5 min gespült und mit einem geeigneten Maus-Anti-Human-Primärantikörper (1:50 mit Aqua bidest. verdünnt; EGF, EGFR, α 2 β 1-Integrin, β 1-Integrin, TGF β ₁ und TNF α) im Brutschrank bei 37°C für 30 min inkubiert. Es folgte jeweils eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (polyklonales Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin) und dem APAAP-Komplex (gebrauchsfertig) jeweils für 30 min bei RT. Vor Ende der letzten Inkubation wurde eine Substratlösung aus 4 ml AP Substrate Buffer und Chromogen Red 1, 2, 3 (jeweils 160 μ l) hergestellt. Die OT wurden für 15 min mit dieser Lösung inkubiert.

Zwischen jedem dieser Schritte wurden die OT für 5 min in Aqua dest. gespült. Abschließend wurden die OT mit Mayers-Hämalaunlösung gegengefärbt, dann mit Leitungswasser 15 min gespült und mit Kaisers-Glyceringelatine eingedeckelt. Es wurden jeweils 3 Versuche durchgeführt.

3.3 STATISTIK

Jede der geschilderten Versuchsmethoden besteht aus drei unabhängigen, identisch verlaufenden Versuchsreihen, die in zeitlichem Abstand durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils den SEM von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen und entsprechende statistische Tests sind mit der Software SigmaPlot 4.0 bzw. SigmaStat 2.0 ermittelt worden. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ angenommen. Die Signale der Gene-Array-Untersuchungen wurden mit dem GeArrayAnalyzer von Superarray, der ScanAlyze Software 2.44 der Stanford University, MS Excel 2003 und SigmaPlot 4.0 quantifiziert.

4. ERGEBNISSE

4.1 PROLIFERATIONSKINETIK

4.1.1 WACHSTUMSKURVE HACAT-ZELLEN

Am ersten Tag des Wachstums wiesen nur unbestrahlte HaCaT-Zellen eine positive Wachstumsrate auf. Alle bestrahlten Zellkurven zeigten dagegen eine anfängliche Wachstumshemmung. Je höher die Strahlendosis war, desto größer war der Zellverlust. Nach 24 h traten dann die mit 1, 2,5 und 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen in die exponentielle Wachstumsphase ein. Die Wachstumskurve der mit 10 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen zeigte einen zunehmenden Zellverlust, was bedeutet, dass diese Zellen nicht in die exponentielle Wachstumsphase eintraten.

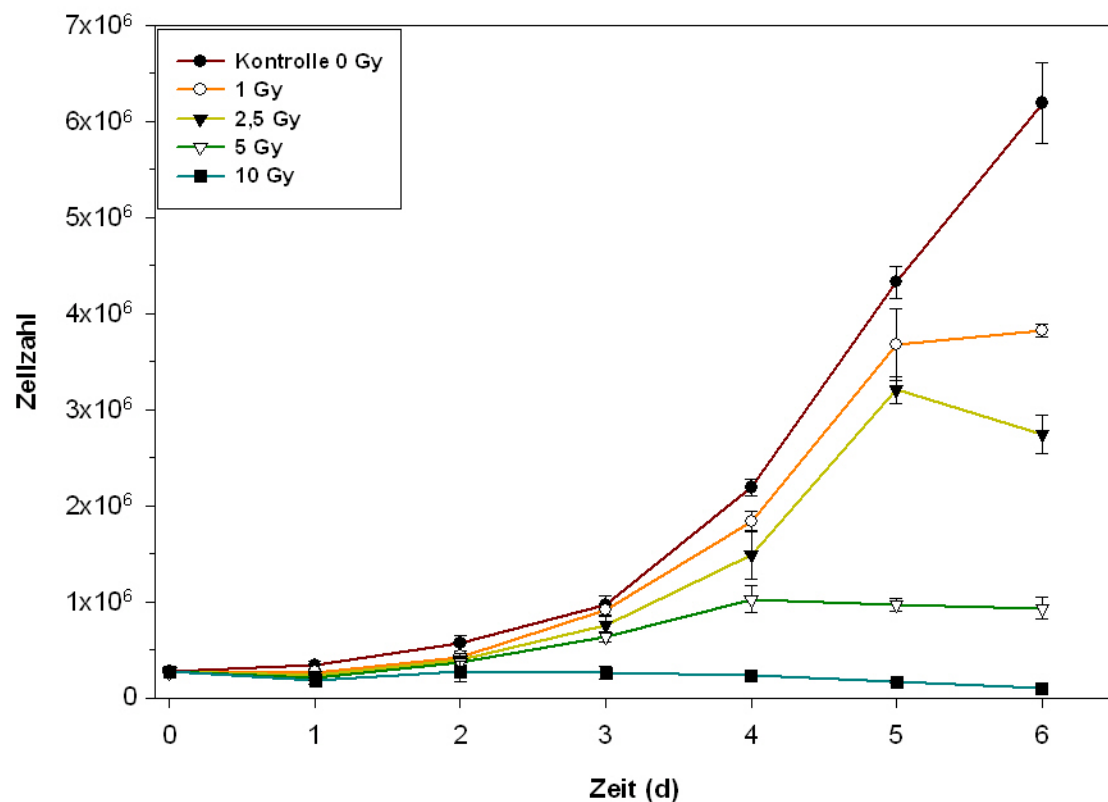


Abbildung 4: Zellproliferation von HaCaT-Zellen nach Bestrahlung

In diesem Experiment wurden jeweils $2,6 \times 10^5$ HaCaT-Zellen in Kulturflaschen ausgesät und 30 min später mit 1, 2,5, 5, und 10 Gy bestrahlt. Nach 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 h p.r. wurden dann die Zellzahlen bestimmt. Die Abbildung zeigt eine dosisabhängige Wachstumshemmung der Zellkurven und eine Verlängerung der Verdopplungszeiten mit steigender Strahlendosis.

Die unbestrahlten HaCaT-Zellen traten auch am 6. Tag nach Anlegen der Kultur nicht in die Verzögerungsphase ein. Bei 1 Gy und 2,5 Gy konnte am 5. Tag nach

Bestrahlung eine relative Sättigungsphase des Zellwachstums (Plateau) beobachtet werden. Bei 5 Gy wurde das Plateau bereits am 4. Tag nach Bestrahlung erreicht (vgl. Abb. 4).

Eine dosisabhängige Wachstumshemmung der Zellen nach Strahlenexposition wird ebenso anhand der Zellverdopplungszeit deutlich. Mit steigender Strahlendosis verlängert sich die Verdopplungszeit kontinuierlich. Die unbestrahlten HaCaT-Zellen wuchsen unter den in Kapitel 3.2.1 angegebenen Kulturbedingungen mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von ca. 32 h bis zu einer Zelldichte von ca. $6 \times 10^6/\text{ml}$, die am 6. Tag nach Anlegen der Kultur erreicht wurde (Abb. 4). Die Verdopplungszeit der mit 1 Gy bestrahlten Kulturen betrug ca. 38 h. Die mit 2,5 Gy bestrahlten Kulturen hatten eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 43 h, bei 5 Gy zeigte sich eine Verdopplungszeit von ca. 74 h.

4.1.2 VERGLEICH DER WACHSTUMSKURVEN VON HACAT-ZELLEN IN AN- UND ABWESENHEIT VON MASTZELLEN

Um den Einfluss von Mastzellen auf die Proliferationskinetik von HaCaT-Zellen nachweisen zu können, wurden Wachstumskurven von unbestrahlten und bestrahlten HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen untersucht.

Die unbestrahlten HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen zeigten eine durchschnittliche Verdopplungszeit von ca. 31 h bis zu einer Zelldichte von ca. $6,5 \times 10^6/\text{ml}$, die am 6. Tag nach Anlegen der Kultur erreicht wurde (vgl. dazu Abb. 5). Bei Bestrahlung mit 1 Gy ergab sich bei den HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen eine Verdopplungszeit von 34 h; bei 2,5 Gy betrug sie ca. 40 h; bei 5 Gy ca. 56 h. Die Verkürzung der Verdopplungszeiten im Vergleich zu den Wachstumskurven ohne Kokultur von Mastzellen spricht für eine Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen unter Mastzell-Einfluss.

Nach 24 h traten die mit 1, 2,5 und 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen in die exponentielle Wachstumsphase ein. Am 5. Tag nach Bestrahlung mit 1, 2,5 und 5 Gy erreichten die HaCaT-Zellen die Verzögerungsphase (Plateau). Nach Bestrahlung mit 10 Gy kam es ebenfalls, wie im Versuch ohne Mastzellen, zu einem zunehmenden Zellverlust der HaCaT-Zellen, d.h., dass auch hier kein Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase stattfand.

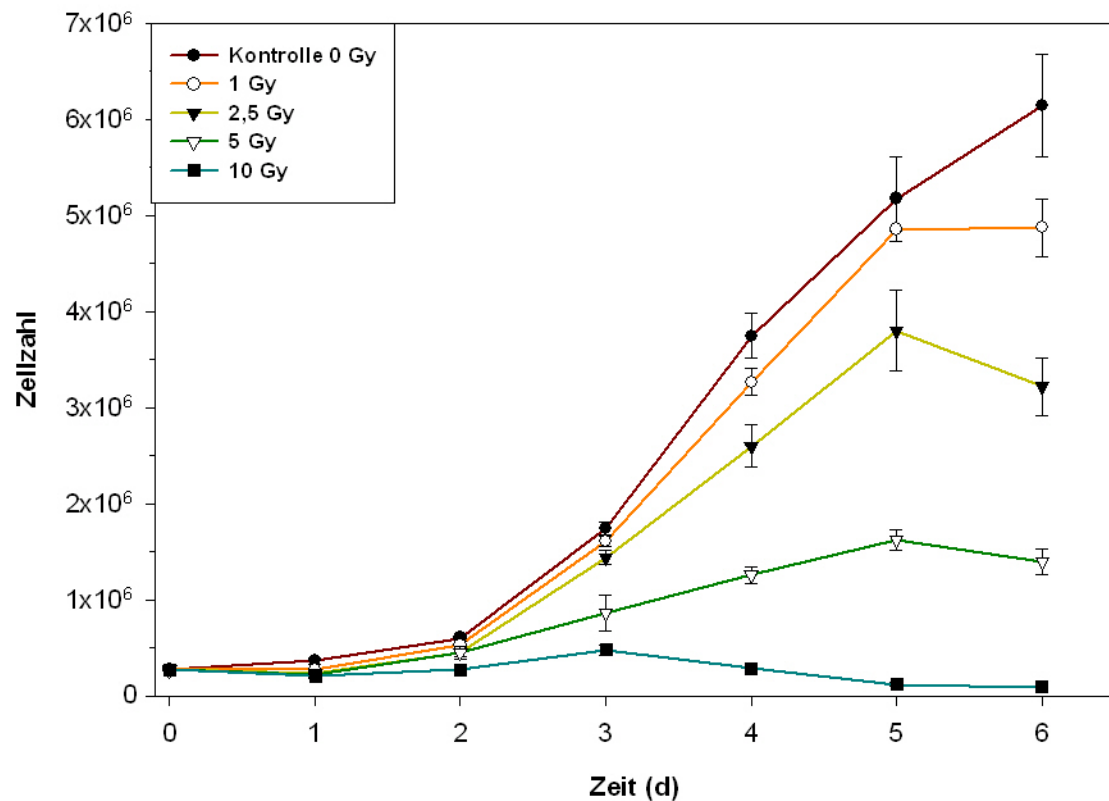


Abbildung 5: Zellproliferation von HaCaT-Zellen nach Bestrahlung in Kokultur mit Mastzellen

In diesem Experiment wurden jeweils $2,6 \times 10^5$ HaCaT-Zellen in Kulturflaschen ausgesät, Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen zugegeben und 30 min später mit 1, 2,5, 5, und 10 Gy bestrahlt. Nach 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 h p.r. wurden dann die Zellzahlen der HaCaT-Zellen unter Einfluss der Mastzellen bestimmt.

Zu den Zeitpunkten d 1 und d 2 zeigte sich keine signifikante Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen in Anwesenheit von Mastzellen. Eine signifikante Proliferationssteigerung ($p < 0,05$) der HaCaT-Zellen durch Mastzeleinfluss konnte zu den Zeitpunkten d 3 und d 4 in den Dosisbereichen von 0, 1 und 2,5 Gy nachgewiesen werden (Abb. 6 und 7). An Tag 5 (d 5) zeigte sich bei 0, 1 und 5 Gy eine signifikante Steigerung der Proliferation in Anwesenheit von Mastzellen (Abb. 8), zum Zeitpunkt d 6 bei 1 Gy (Abb. 9). Bei 10 Gy kam es zu keiner signifikanten Steigerung der Zellzahl unter dem Einfluss von Mastzellen. Um die Proliferationssteigerung der Keratinozyten durch Mastzellen nach Bestrahlung besser vergleichbar zu machen, sind in den Abbildungen 6-9 die Zeitpunkte d 3 bis d 6 der Wachstumskurven in den Dosisbereichen 0, 1, 2,5 und 5 Gy als Säulendiagramme dargestellt.

Tag 3

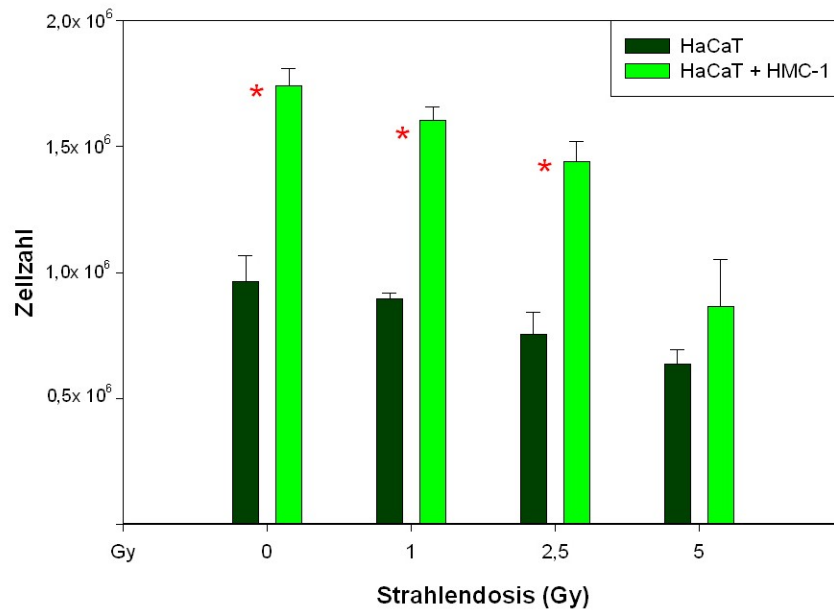


Abbildung 6: Wachstum von HaCaT-Zellen in Monokultur und in Kokultur mit HMC-1 zum Zeitpunkt d 3 nach Bestrahlung. Bei 0, 1 und 2,5 Gy zeigte sich eine signifikante Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen in Anwesenheit von Mastzellen ($p < 0,05$). Signifikante Ergebnisse wurden markiert (*).

Tag 4

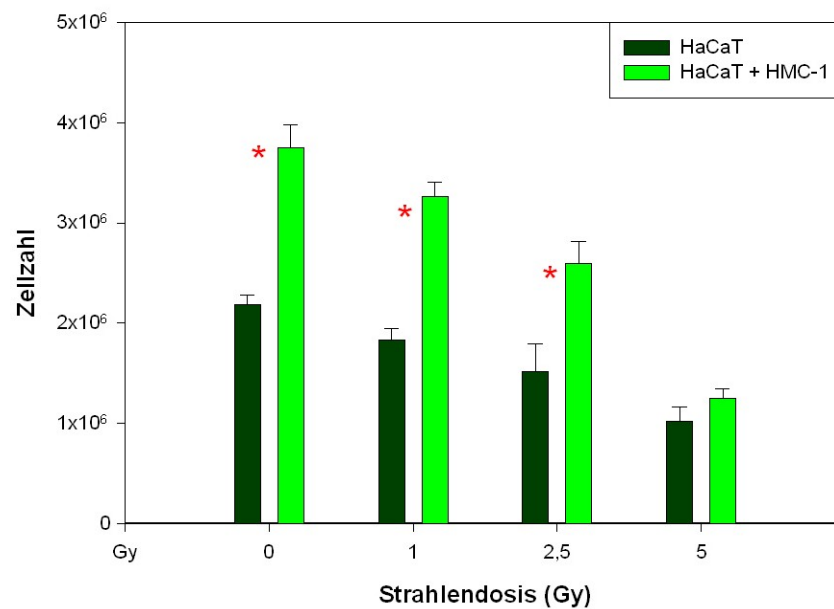


Abbildung 7: Wachstum von HaCaT-Zellen in Monokultur und in Kokultur mit HMC-1 zum Zeitpunkt d 4 nach Bestrahlung. Bei 0, 1 und 2,5 Gy zeigte sich eine signifikante Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen in Anwesenheit von Mastzellen ($p < 0,05$). Signifikante Ergebnisse wurden markiert (*).

Tag 5

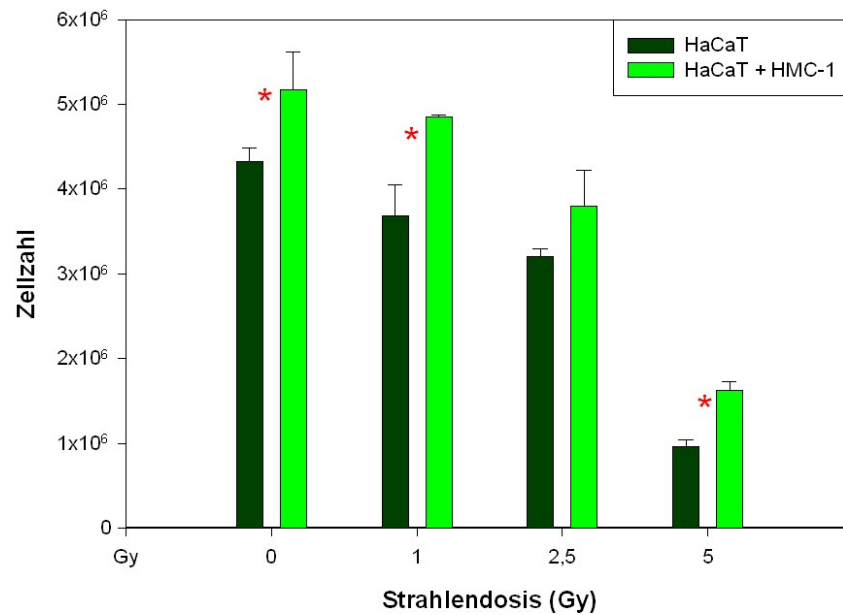


Abbildung 8: Wachstum von HaCaT-Zellen in Monokultur und in Kokultur mit HMC-1 zum Zeitpunkt d 5 nach Bestrahlung. Bei 0, 1 und 5 Gy zeigte sich eine signifikante Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen in Anwesenheit von Mastzellen ($p < 0,05$). Signifikante Ergebnisse wurden markiert (*).

Tag 6

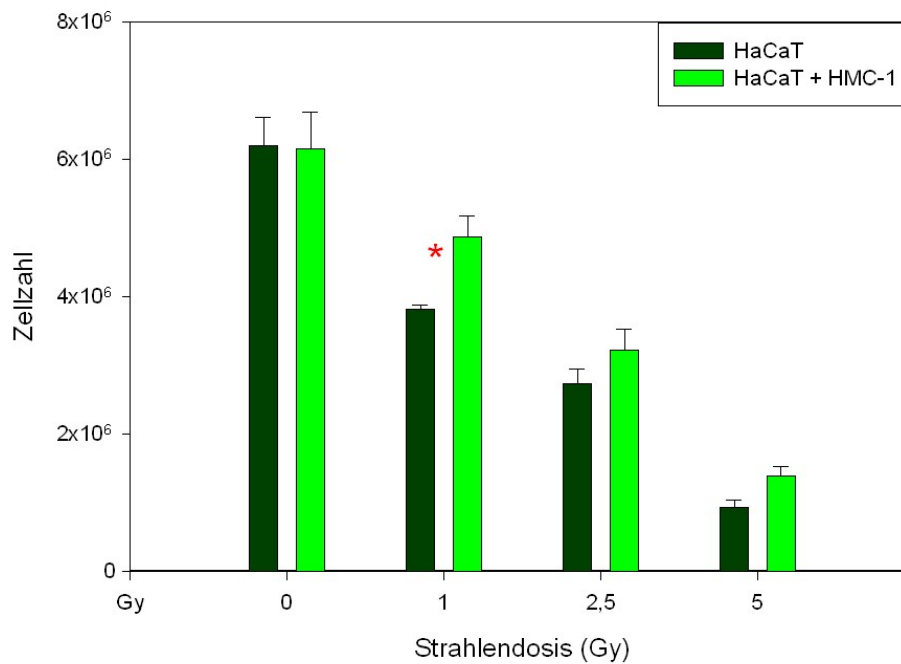


Abbildung 9: Wachstum von HaCaT-Zellen in Monokultur und in Kokultur mit HMC-1 zum Zeitpunkt d 6 nach Bestrahlung. Bei 1 Gy zeigte sich eine signifikante Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen in Anwesenheit von Mastzellen ($p < 0,05$). Signifikantes Ergebnis wurde markiert (*).

Die Ergebnisse aus den Wachstumskurven zeigen eine deutliche Proliferationsinhibition der Keratinozyten in höheren Dosisbereichen ab 5 Gy. Im Dosisbereich von 10 Gy ist kein signifikanter Effekt mehr durch die Mastzellen darstellbar.

4.1.3 STRAHLENEFFEKT UNTER EINFLUSS DER MASTZELLEN

Der Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation der Keratinozyten wird hier als Strahleneffekt bezeichnet. Da in der Probe der Keratinozyten mit Mastzellzusatz die Proliferation der Keratinozyten jedoch nicht nur durch den Strahleneffekt beeinflusst wird, sondern auch durch die Wirkmechanismen der Mastzellen, ist es notwendig, den Mastzelleffekt vom Strahleneffekt zu differenzieren.

Der Mastzelleffekt ergibt sich aus den Quotienten der Zellzahlen (Mittelwerte aus drei Proben) der bestrahlten Proben (vgl. Werte in Anhang 3). Zur Quotientenbildung wurden die Zellzahlen der HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen zu den Zellzahlen der HaCaT-Zellen ohne Kokultur (Mittelwerte) bei Bestrahlung im Zeitraum von d 2 bis d 6 verwendet. Der Zeitpunkt d 2 als Auswertungsbeginn wurde gewählt, da erst zu diesem Zeitpunkt Proliferationseffekte beobachtbar sind.

Der Quotient = 1 zeigt an, dass die Zellzahl in beiden Proben identisch ist. Bei einem Quotienten > 1 ist die Zellzahl der Keratinozyten in Kokultur mit Mastzellen größer als die Zellzahl in der Probe ohne Mastzellzusatz. Ist der Quotient < 1 , so überwiegt die Zellzahl der Keratinozyten in der Kultur ohne Mastzellzusatz.

Um den Strahleneffekt sichtbar machen zu können, müssen weitergehend die Differenzen aus den Quotienten (Mastzelleffekte) der bestrahlten Proben und den Quotienten (Mastzelleffekte) der unbestrahlten Proben für die Zeitpunkte d 2 bis d 6 berechnet werden. Der Wert 0 zeigt, dass sich der Mastzelleffekt und der Strahleneffekt aufheben. Werte - sofern sie positiv sind – zeigen damit auf, dass der Mastzeleinfluss größer ist als der Strahleneffekt; negative Werte zeigen das Überwiegen des Strahleneffekts auf.

4.1.3.1 STRAHLENEFFEKT TAG 2

Tag 2					
Strahlendosis	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy	10 Gy
Mastzelleffekt	1,06	1,25	1,13	1,23	1,01
Differenz zu 0 Gy		0,19	0,06	0,17	-0,06

Strahleneffekt Tag 2

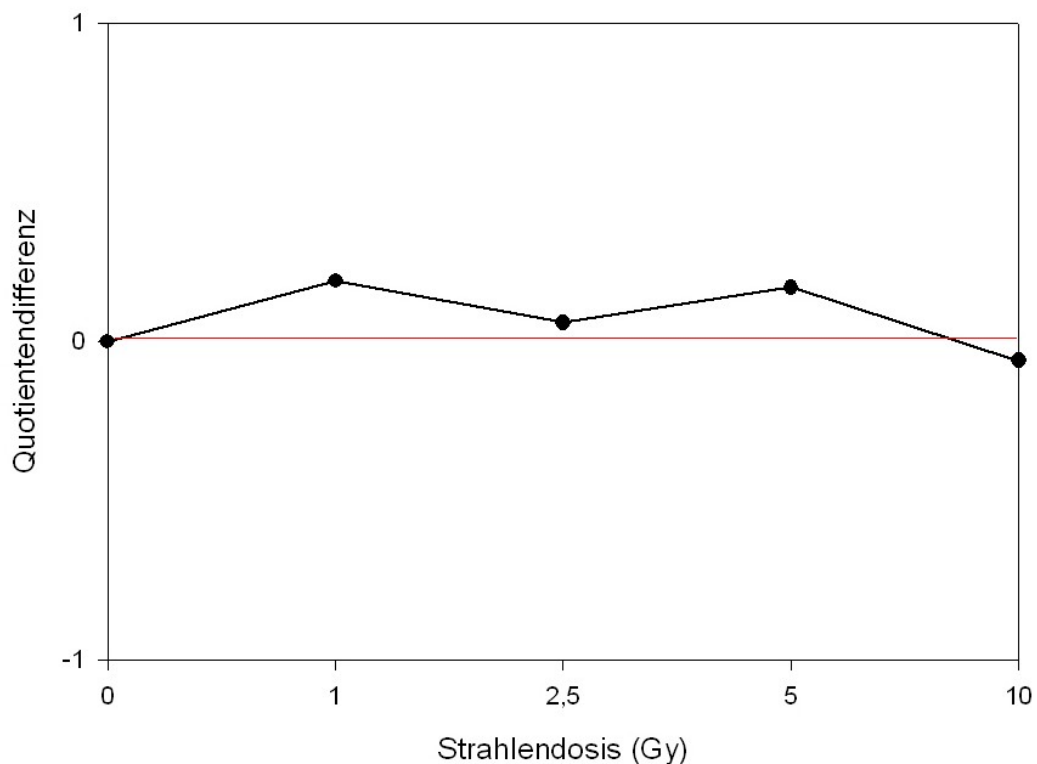


Abbildung 10: Strahleneffekt an Tag 2. Der Mastzelleffekt ergibt sich aus den Quotienten der Zellzahlen (Mittelwerte aus drei Proben) der bestrahlten Proben (vgl. Werte in Anhang 3). Zur Quotientenbildung wurden die Zellzahlen der HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen zu den Zellzahlen der HaCaT-Zellen ohne Kokultur (Mittelwerte) bei Bestrahlung zum Zeitpunkt d 2 verwendet. Um den Strahleneffekt darstellen zu können, wurden die Differenzen aus den Quotienten (Mastzelleffekte) der bestrahlten Proben und den Quotienten (Mastzelleffekte) der unbestrahlten Proben für den Zeitpunkt d 2 berechnet. Der Wert 0 zeigt, dass sich der Mastzelleffekt und der Strahleneffekt aufheben. Positive Werte zeigen damit auf, dass der Mastzeleinfluss größer ist als der Strahleneffekt; negative Werte zeigen das Überwiegen des Strahleneffekts auf.

Wie aus Diagramm und Tabelle zu Tag 2 ersichtlich, überwog bis zu einer Bestrahlungsdosis von 5 Gy der Einfluss der Mastzellen auf die Proliferation der Keratinozyten den Strahleneffekt. Bei 10 Gy jedoch zeigte sich schon ein Strahleneffekt.

4.1.3.2 STRAHLENEFFEKT TAG 3

Tag 3					
Strahlendosis	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy	10 Gy
Mastzelleffekt	1,8	1,75	1,91	1,37	1,19
Differenz zu 0 Gy		-0,05	0,10	-0,43	-0,61

Strahleneffekt Tag 3

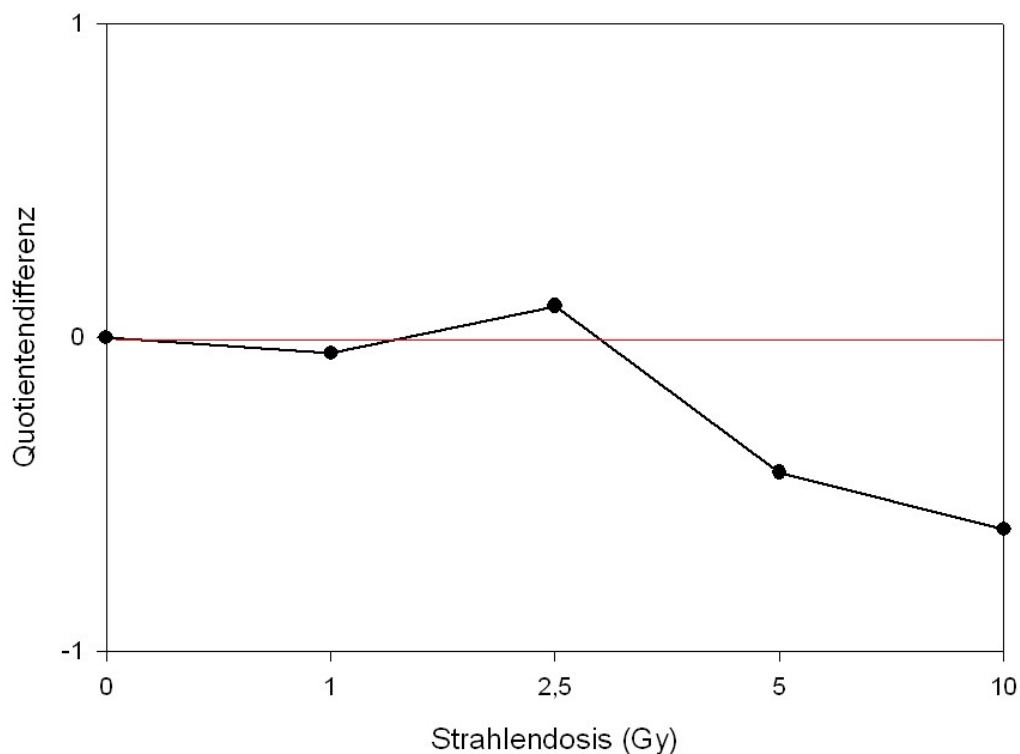


Abbildung 11: Strahleneffekt an Tag 3. Der Mastzelleffekt ergibt sich aus den Quotienten der Zellzahlen (Mittelwerte aus drei Proben) der bestrahlten Proben (vgl. Werte in Anhang 3). Zur Quotientenbildung wurden die Zellzahlen der HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen zu den Zellzahlen der HaCaT-Zellen ohne Kokultur (Mittelwerte) bei Bestrahlung zum Zeitpunkt d 3 verwendet. Um den Strahleneffekt darstellen zu können, wurden die Differenzen aus den Quotienten (Mastzelleffekte) der bestrahlten Proben und den Quotienten (Mastzelleffekte) der unbestrahlten Proben für den Zeitpunkt d 3 berechnet. Der Wert 0 zeigt, dass sich der Mastzelleffekt und der Strahleneffekt aufheben. Positive Werte zeigen damit auf, dass der Mastzeinfluss größer ist als der Strahleneffekt; negative Werte zeigen das Überwiegen des Strahleneffekts auf.

Gegenüber Tag 2 hob sich an Tag 3 der Einfluss der Mastzellen auf die Proliferation der Keratinozyten und der Strahleneffekt bis zu der Dosis 2,5 Gy weitgehend auf. Bei 5 Gy und 10 Gy wurde die Proliferation unter Einfluss der Bestrahlung weiter gehemmt, der Strahleneffekt überwog also den Mastzeinfluss.

4.1.3.3 STRAHLENEFFEKT TAG 4

Tag 4					
Strahlendosis	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy	10 Gy
Mastzelleffekt	1,71	1,78	1,75	1,22	1,24
Differenz zu 0 Gy		0,07	0,04	-0,49	-0,47

Strahleneffekt Tag 4

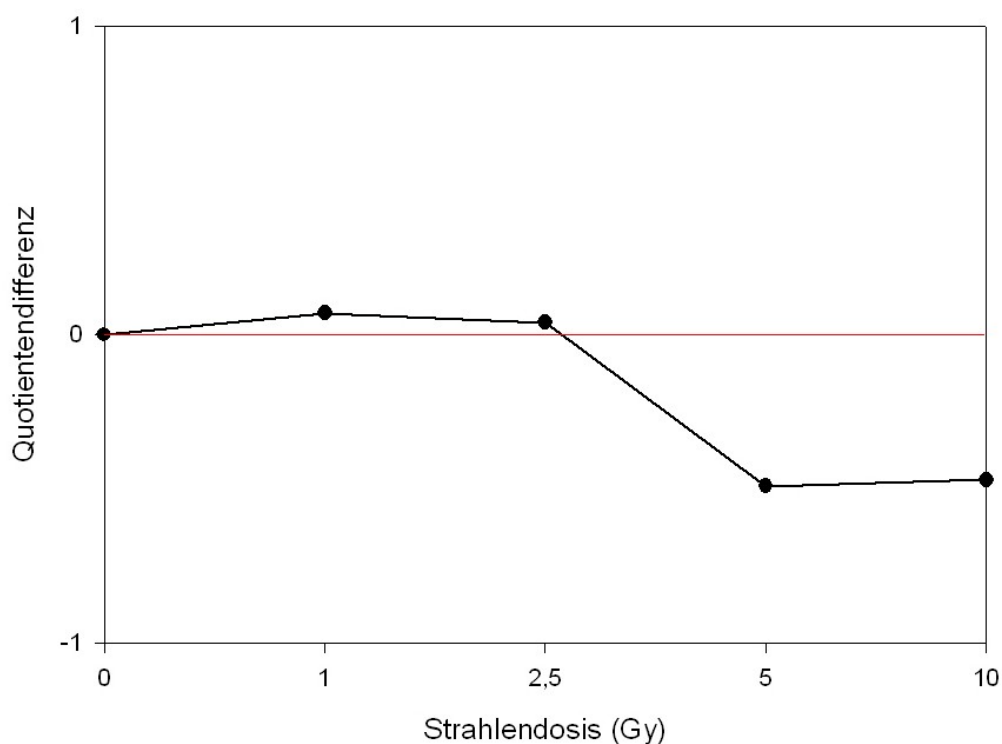


Abbildung 12: Strahleneffekt an Tag 4. Der Mastzelleffekt ergibt sich aus den Quotienten der Zellzahlen (Mittelwerte aus drei Proben) der bestrahlten Proben (vgl. Werte in Anhang 3). Zur Quotientenbildung wurden die Zellzahlen der HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen zu den Zellzahlen der HaCaT-Zellen ohne Kokultur (Mittelwerte) bei Bestrahlung zum Zeitpunkt d 4 verwendet. Um den Strahleneffekt darstellen zu können, wurden die Differenzen aus den Quotienten (Mastzelleffekte) der bestrahlten Proben und den Quotienten (Mastzelleffekte) der unbestrahlten Proben für den Zeitpunkt d 4 berechnet. Der Wert 0 zeigt, dass sich der Mastzelleffekt und der Strahleneffekt aufheben. Positive Werte zeigen damit auf, dass der Mastzeleinfluss größer ist als der Strahleneffekt; negative Werte zeigen das Überwiegen des Strahleneffekts auf.

Wie bei Tag 3 war auch bei Tag 4 zu beobachten, dass sich bis zur Dosis 2,5 Gy die Effekte aufheben. Der Strahleneffekt nahm ab 2,5 Gy bis zur Dosis 5 Gy weiter zu. Der Strahleneffekt hatte hier (bei 5 Gy) seinen maximalen Wert erreicht. Der Wert bei 10 Gy zeigte, dass der Strahleneffekt bei der höheren Dosis nur unwe-

sentlich stärker war als bei 5 Gy. Die Abflachung der Kurve ab 5 Gy weist also auf eine zunehmende Minderung des Strahleneffekts ab dieser Dosis hin.

4.1.3.4 STRAHLENEFFEKT TAG 5

Tag 5					
Strahlendosis	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy	10 Gy
Mastzelleffekt	1,20	1,32	1,20	1,68	0,70
Differenz zu 0 Gy		0,12	0,00	0,48	-0,50

Strahleneffekt Tag 5

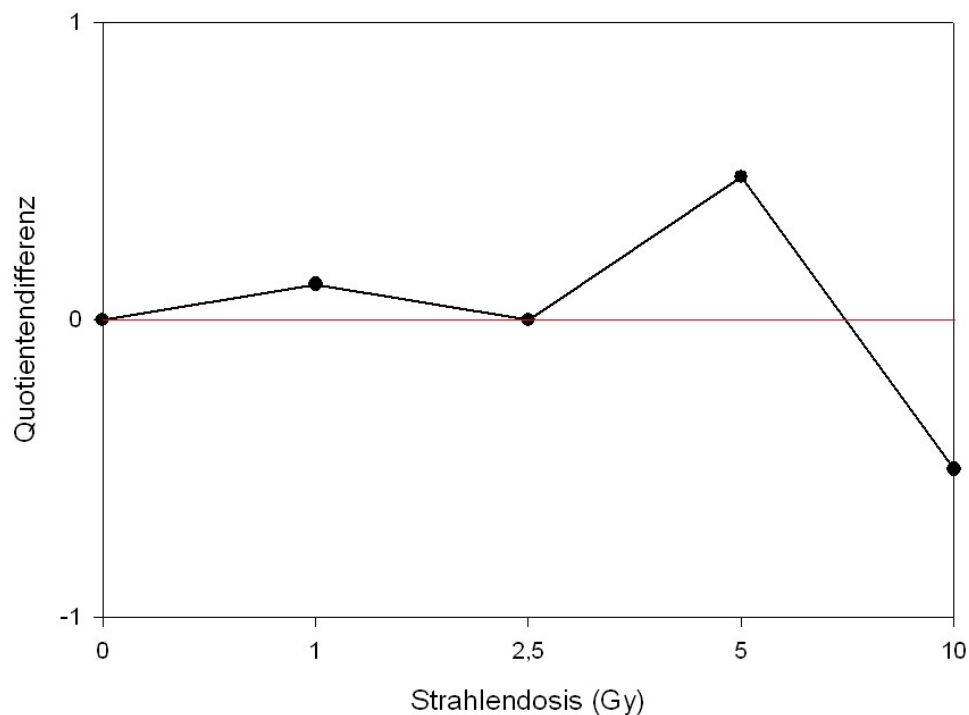


Abbildung 13: Strahleneffekt an Tag 5. Der Mastzelleffekt ergibt sich aus den Quotienten der Zellzahlen (Mittelwerte aus drei Proben) der bestrahlten Proben (vgl. Werte in Anhang 3). Zur Quotientenbildung wurden die Zellzahlen der HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen zu den Zellzahlen der HaCaT-Zellen ohne Kokultur (Mittelwerte) bei Bestrahlung zum Zeitpunkt d 5 verwendet. Um den Strahleneffekt darstellen zu können, wurden die Differenzen aus den Quotienten (Mastzelleffekte) der bestrahlten Proben und den Quotienten (Mastzelleffekte) der unbestrahlten Proben für den Zeitpunkt d 5 berechnet. Der Wert 0 zeigt, dass sich der Mastzelleffekt und der Strahleneffekt aufheben. Positive Werte zeigen damit auf, dass der Mastzeleinfluss größer ist als der Strahleneffekt; negative Werte zeigen das Überwiegen des Strahleneffekts auf.

Bis zur Dosis 5 Gy ließ der Strahleneffekt nach und der Mastzeleinfluss wurde wieder stärker. Auffällig war das Ansteigen des Wertes bei 5 Gy. Bei 10 Gy war der Strahleneffekt unverändert wirksam.

4.1.3.5 STRAHLENEFFEKT TAG 6

Tag 6					
Strahlendosis	0 Gy	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy	10 Gy
Mastzelleffekt	0,99	1,28	1,17	1,50	0,90
Differenz zu 0 Gy		0,28	0,18	0,51	-0,09

Strahleneffekt Tag 6

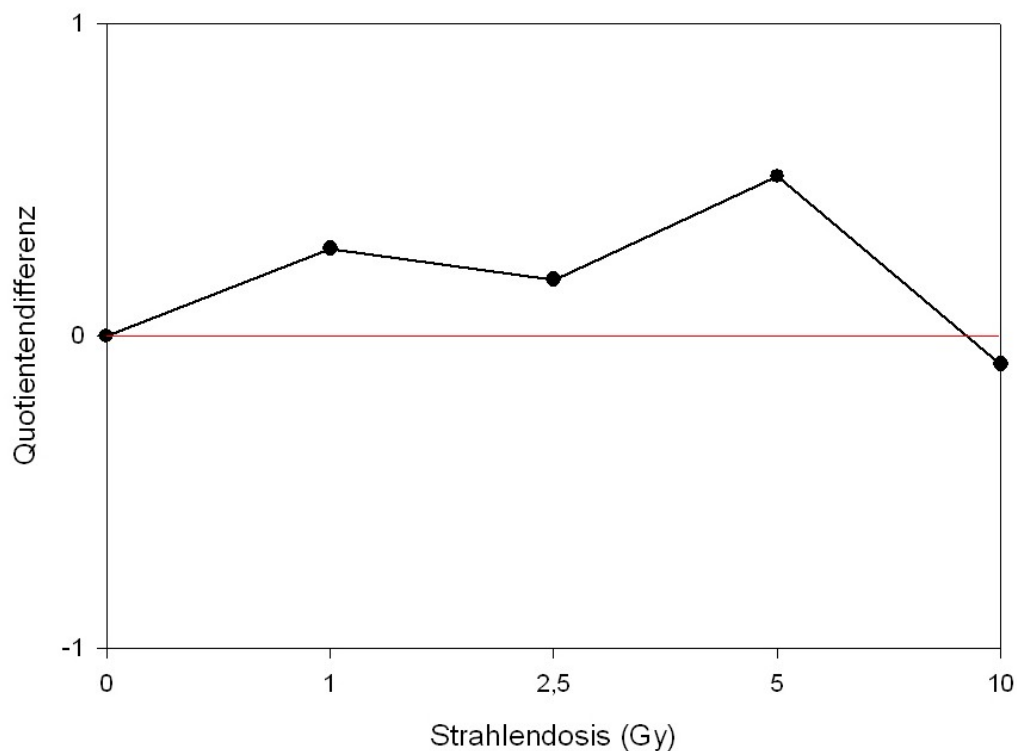


Abbildung 14: Strahleneffekt an Tag 6. Der Mastzelleffekt ergibt sich aus den Quotienten der Zellzahlen (Mittelwerte aus drei Proben) der bestrahlten Proben (vgl. Werte in Anhang 3). Zur Quotientenbildung wurden die Zellzahlen der HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen zu den Zellzahlen der HaCaT-Zellen ohne Kokultur (Mittelwerte) bei Bestrahlung zum Zeitpunkt d 6 verwendet. Um den Strahleneffekt darstellen zu können, wurden die Differenzen aus den Quotienten (Mastzelleffekte) der bestrahlten Proben und den Quotienten (Mastzelleffekte) der unbestrahlten Proben für den Zeitpunkt d 6 berechnet. Der Wert 0 zeigt, dass sich der Mastzelleffekt und der Strahleneffekt aufheben. Positive Werte zeigen damit auf, dass der Mastzelleinfluss größer ist als der Strahleneffekt; negative Werte zeigen das Überwiegen des Strahleneffekts auf.

Der Mastzelleinfluss nahm zwischenzeitlich in allen Dosisbereichen wieder zu. Selbst bei der Dosis 10 Gy war kaum mehr ein Strahleneffekt zu beobachten.

4.1.3.6 STRAHLENEFFEKT GESAMT

Strahleneffekt kumuliert				
	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy	10 Gy
Kumulierte Differenz d 2- d 6	0,61	0,39	0,23	-1,73

Strahleneffekt kumuliert über den Zeitraum d 2 - d 6

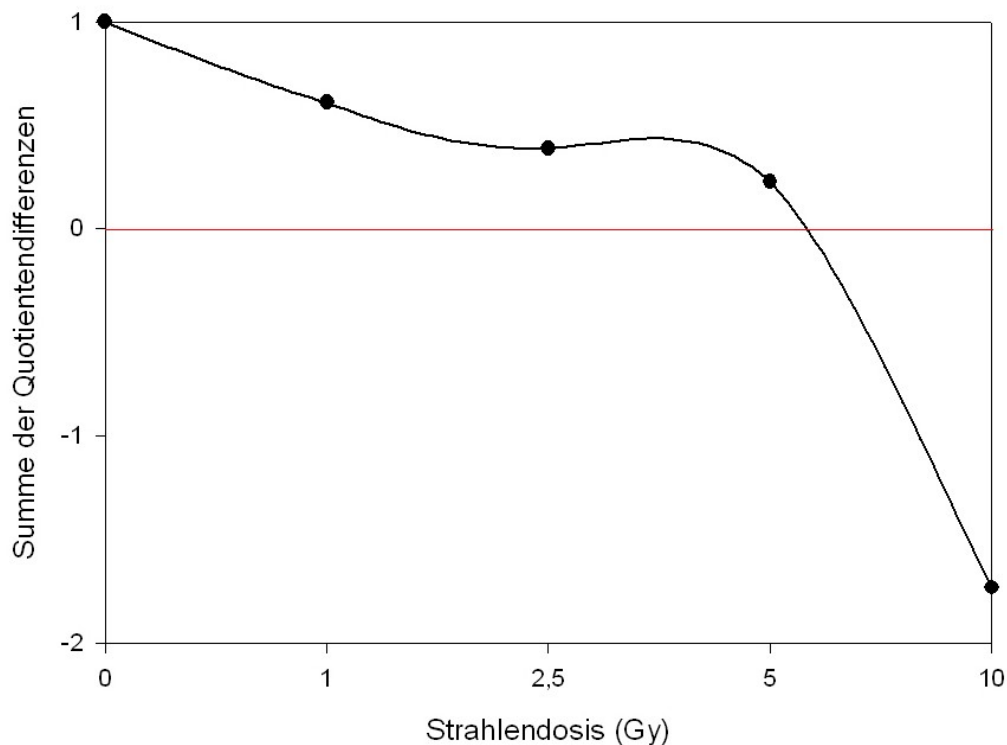


Abbildung 15: Relativer Strahleneffekt versus Mastzelleffekt. Um eine Aussage über den Strahleneffekt insgesamt treffen zu können, wurden die Quotienten der Differenzen zu 0 Gy der Zeitpunkte d 2 – d 6 summiert. Der Wert 0 zeigt, dass sich der Mastzelleffekt und der Strahleneffekt aufheben. Positive Werte zeigen damit auf, dass der Mastzeleinfluss größer ist als der Strahleneffekt; negative Werte zeigen das Überwiegen des Strahleneffekts auf.

Die Darstellung des Strahleneffekts bei kumulierter Quotientendifferenz (Summe der Quotientendifferenzen über den Zeitraum d 2 – d 6) erlaubt eine Aussage über den Strahleneffekt insgesamt. Aus den Werten ist zu entnehmen, dass in niedrigen Dosisbereichen bis 5 Gy der Mastzeleinfluss den Strahleneffekt überwiegt. Bei höheren Dosen ab 5 Gy nimmt der Strahleneffekt stark zu.

4.2. KLONOGENITÄTSASSAY VON HaCaT-ZELLEN IN KOKULTUR MIT MASTZELLEN

Die Klonogenität von HaCaT-Zellen nach Bestrahlung ist in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt. Die Dosiseffektkurve zeigt in der üblichen halblogarithmischen Darstellungsweise einen exponentiellen Verlauf mit einer sog. „Schulter“. In Abbildung 16 werden jeweils die Überlebenskurven von HaCaT-Zellen in Kokultur mit 100, 3000 und 8000 Mastzellen dargestellt. Im Vergleich zu der HaCaT-Kurve ohne Mastzellen konnte ein signifikant höheres Überleben ($p < 0,05$) der HaCaT-Zellen in allen Dosisbereichen in Anwesenheit von 3000 Mastzellen errechnet werden. In Kokultur mit 8000 Mastzellen zeigte sich in den Dosisbereichen 1, 5 und 10 Gy ein signifikant höheres Überleben der Keratinozyten im Verhältnis zu den Keratinozyten ohne Zusatz von Mastzellen. Die HaCaT-Kurve mit Kokultur von 100 Mastzellen ergab kein höheres Überleben im Vergleich zur Kurve der unbestrahlten HaCaT-Zellen. Das höchste Überleben der HaCaT-Zellen zeigte sich in Anwesenheit von 3000 Mastzellen in allen Dosisbereichen.

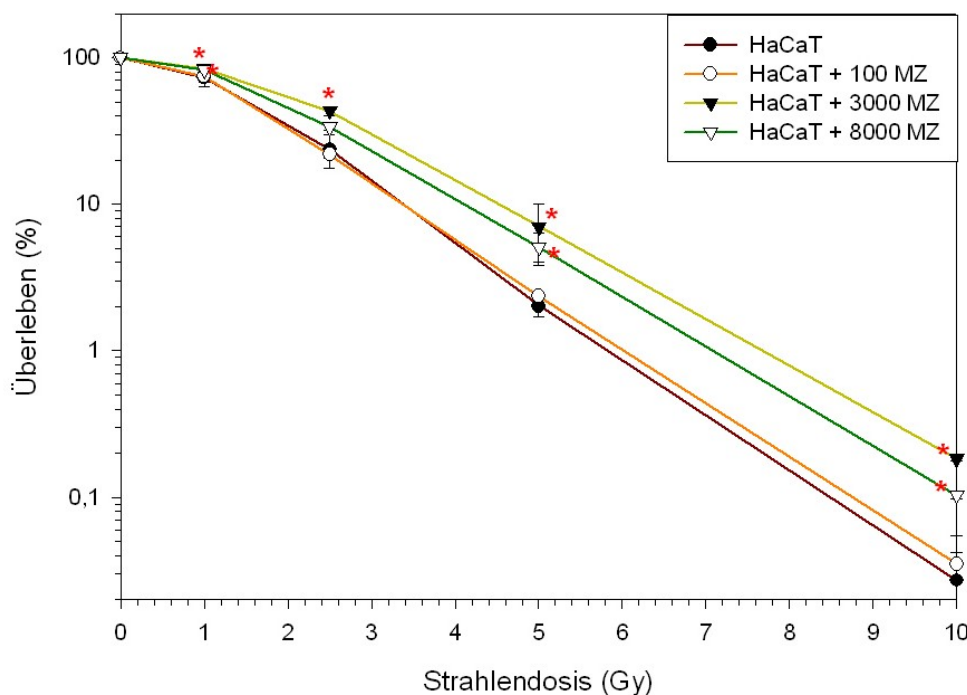


Abbildung 16: Überleben von HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen nach ionisierender Bestrahlung
 In diesem Experiment wurden zu den HaCaT-Zellen jeweils variierende Zellzahlen von Mastzellen (100, 3000 und 8000) zugegeben. Nach 30 min wurden die HaCaT-Zellen dann mit 1, 2,5, 5 und 10 Gy bestrahlt und für 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte das Auszählen der Klone. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden markiert (*).

Die Kenngrößen solcher Schulterkurven, die Werte D_q und D_0 , erhält man durch Extrapolierung des linearen Teils der halblogarithmischen Kurve auf die Dosis 0; der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt die Extrapolationszahlen (Hall 1994, S. 1-478). Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der 100% Abszisse, die Dosis D_q , ist ein Maß für die Breite der Schulter und somit für die Erholungskapazität von Zellen, also ein Maß für die Fähigkeit der Zellen, den Strahlenschaden zu reparieren. Als Maß für den linearen Anteil der Kurve dient der Wert D_0 . Dieser Wert entspricht der Dosis, die im exponentiellen Teil das Überleben auf 37% erniedrigt und wird auch als die wahre Strahlenempfindlichkeit bezeichnet, da in diesem Dosisbereich Erholungsvorgänge eine untergeordnete Rolle spielen. Das D_q der HaCaT-Zellen betrug im Durchschnitt, wie auch in Kokultur mit 100 Mastzellen 2,1 Gy; in Anwesenheit von 3000 Mastzellen ergab sich ein D_q von 2,55 Gy, in Kokultur mit 8000 Mastzellen 2,4 Gy. Der Parameter der Strahlenempfindlichkeit D_0 lag bei den unbehandelten HaCaT-Zellen und bei Kokultur mit 100 Mastzellen bei 1,1 Gy. In der HaCaT-Überlebenskurve in Anwesenheit von 8000 Mastzellen konnte D_0 bei 1,15 Gy, in Kokultur mit 3000 Mastzellen bei 1,2 Gy berechnet werden.

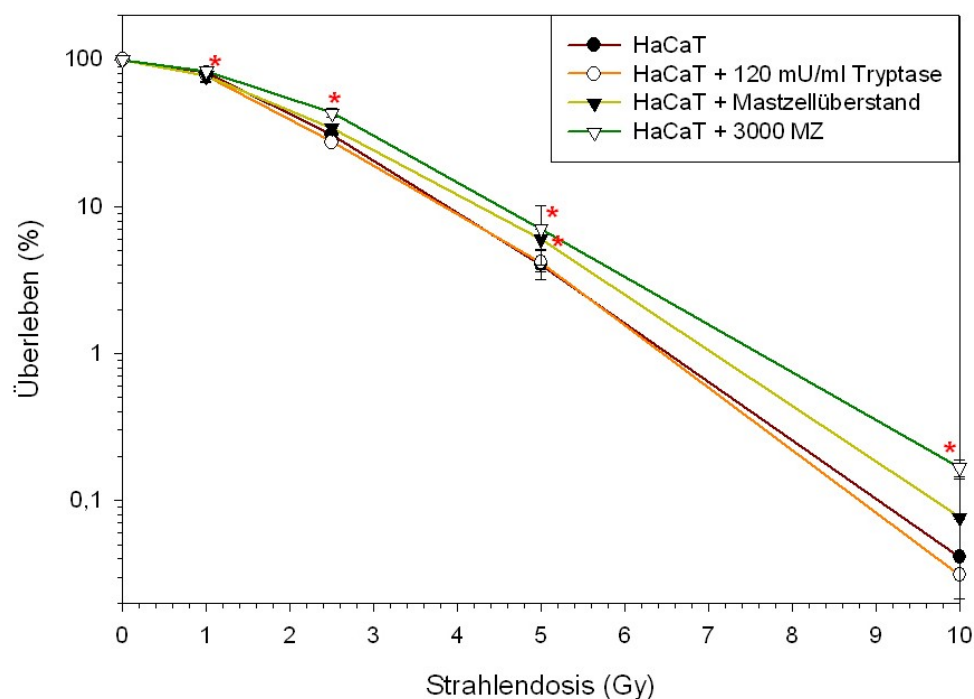


Abbildung 17: Überleben von HaCaT-Zellen nach ionisierender Bestrahlung mit Zusatz von 120 mU/ml Tryptase, 3000 Mastzellen bzw. Mastzellüberstand. In diesem Experiment wurden zu den HaCaT-Zellen jeweils 3000 Mastzellen, 1 ml Mastzell-Überstand und 120 mU/ml Tryptase zugegeben. Nach 30 min wurden die HaCaT-Zellen dann mit 1, 2,5, 5 und 10 Gy bestrahlt und für 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte das Auszählen der Klone. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) wurden markiert (*).

In Abbildung 17 wird das Überleben von HaCaT-Zellen nach ionisierender Bestrahlung mit Zugabe von 3000 Mastzellen (HMC-1), Mastzellüberstand (Mastzelllysate) und 120 mU/ml Tryptase dargestellt.

Die höchste Überlebensrate der HaCaT-Zellen zeigte sich auch hier in Anwesenheit von 3000 Mastzellen in allen Dosisbereichen. Eine signifikante Steigerung des Überlebens im Vergleich zur unbehandelten HaCaT-Kurve konnte unter Zusatz von Mastzellüberstand bei 5 Gy festgestellt werden, wobei sich bei 1, 2,5 und 10 Gy ebenfalls ein höheres, aber nicht signifikant höheres Überleben ergab. Unter Zusatz von 120 mU/ml Tryptase konnte kein höheres Überleben der HaCaT-Zellen erzielt werden. Das D_q der Kurve unter Zusatz von Mastzellüberstand lag bei 2,3 Gy, von Tryptase bei 2,1 Gy.

Der Parameter der Strahlenempfindlichkeit D_0 konnte unter Zugabe von Mastzellüberstand bei 1,15 Gy, von Tryptase bei 1,1 Gy errechnet werden.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen 16 und 17 auf eine Darstellung der Berechnung von D_q und D_0 nach o.g. Modus verzichtet.

4.3 GENEXPRESSIONSARRAY

4.3.1 HUMANER APOPTOSIS-1 GEARRAY

Für diese Versuchsreihe wurde der Human Apoptosis-1 GEArray Kit von SuperArray Inc., Bethesda, MD, USA, verwendet.

4.3.1.1 VERGLEICH DER GENEXPRESSION VON UNBESTRAHLTEN UND BESTRAHLTEN HACAT-ZELLEN MIT HILFE DES APOPTOSE-GEARRAYS

Dieser Versuch wurde zunächst ohne Mastzellen durchgeführt. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde die Reinheit der rRNA bestimmt. In Abb. 18 sind die 18 S- und 28 S-Banden der rRNA dargestellt. Das Verhältnis dieser Banden sollte bei 1 zu 1,8 bis 2,5 liegen. Die 28 S-rRNA-Banden der Proben zeigen sich in Abb. 18 etwa doppelt so intensiv wie die 18 S-rRNA-Banden, was darauf hinweist, dass die RNA vollständig intakt ist.

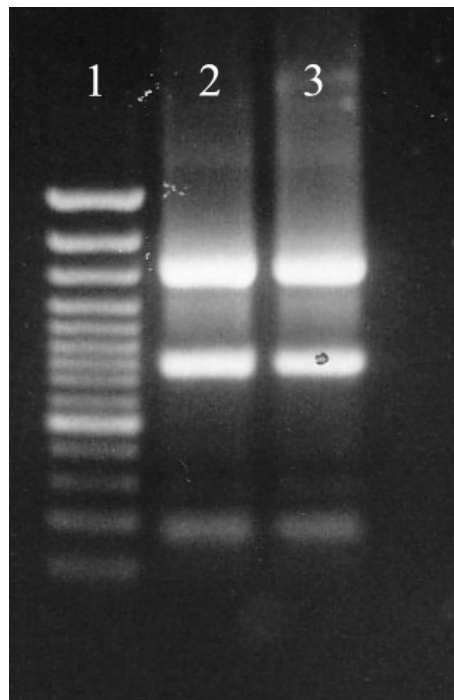


Abbildung 18: Agarose-Gelelektrophorese
 (Spur 1: DNA-Standard / Spur 2: 2 µl RNA
 von unbestrahlten HaCaT-Zellen / Spur 3:
 2µl RNA von bestrahlten HaCaT-Zellen (5 Gy)).

Nach Quantifizierung der rRNA konnte die Genexpression von unbestrahlten und bestrahlten HaCaT-Zellen mit Hilfe des Human Apoptosis-1 GEArrays miteinander verglichen werden. Die mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen zeigten eine Hochregulation von allen 26 Genen, darunter eine signifikante Hochregulation bei 10 Genen (BAD, BAX, CASP3, E2F1, TNFSF6, GADD45A, NFKB1, FIG8, RB1, TNFRSF10B). Durch ionisierende Strahlung wird die Genexpression zahlreicher Apoptose-relevanter Gene in bestrahlten Keratinozyten erhöht (Abb. 19).

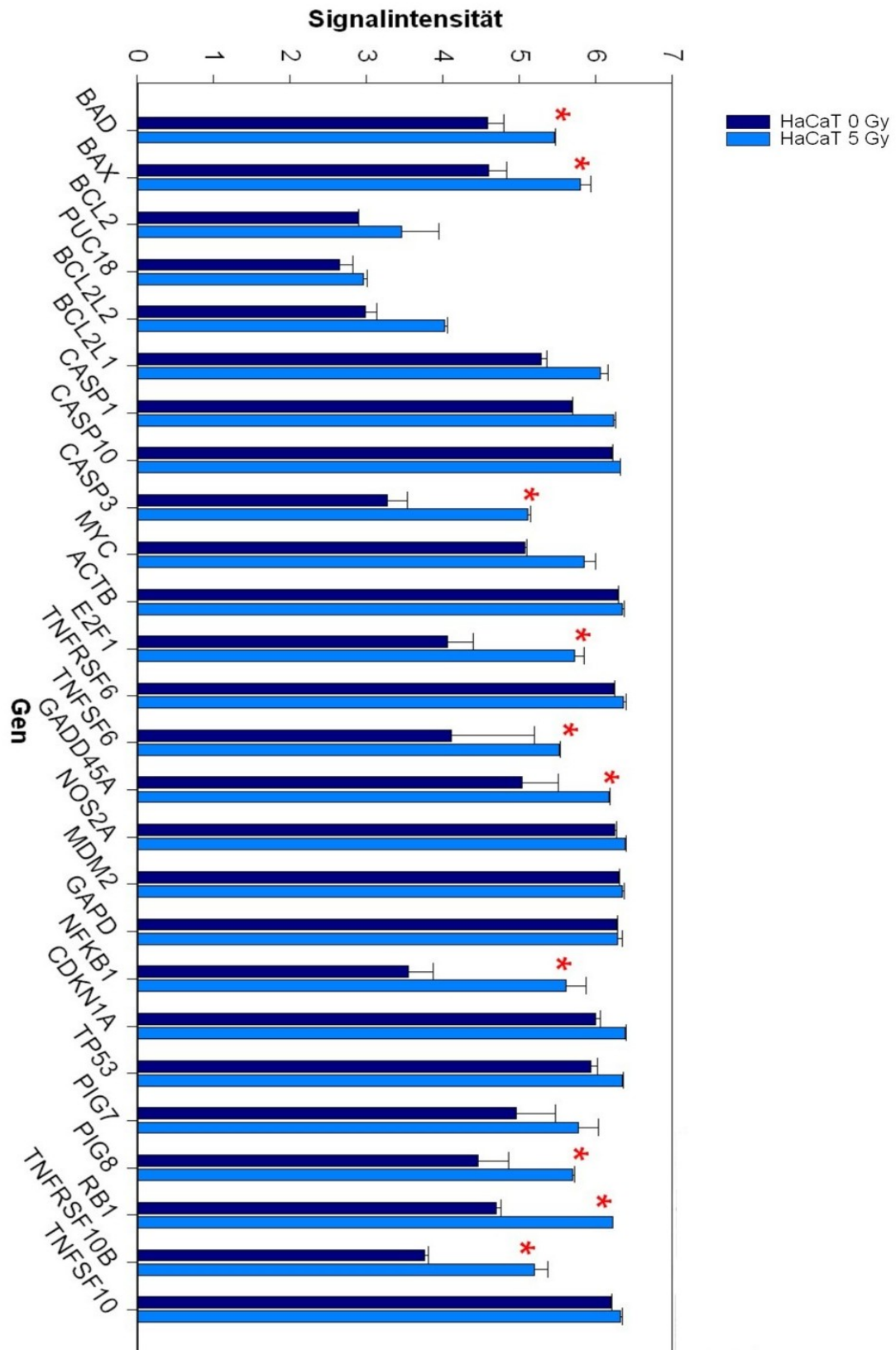


Abbildung 19: Humaner Apoptosis-1 GEArray. Darstellung der Genexpression von unbestrahlten HaCaT-Zellen im Vergleich mit HaCaT-Zellen 30 min nach Bestrahlung mit 5 Gy. Ionisierende Strahlung erhöht die Genexpression zahlreicher Apoptose-relevanter Gene. Signifikante Werte ($*p < 0,05$) wurden in der Abbildung markiert (*).

4.3.1.2 VERGLEICH DER GENEXPRESSION UNBESTRAHLTER HaCaT-ZELLEN IN AN- BZW. ABWESENHEIT VON MASTZELLEN (HMC-1) MIT HILFE DES APOPTOSE-GEARRAYS

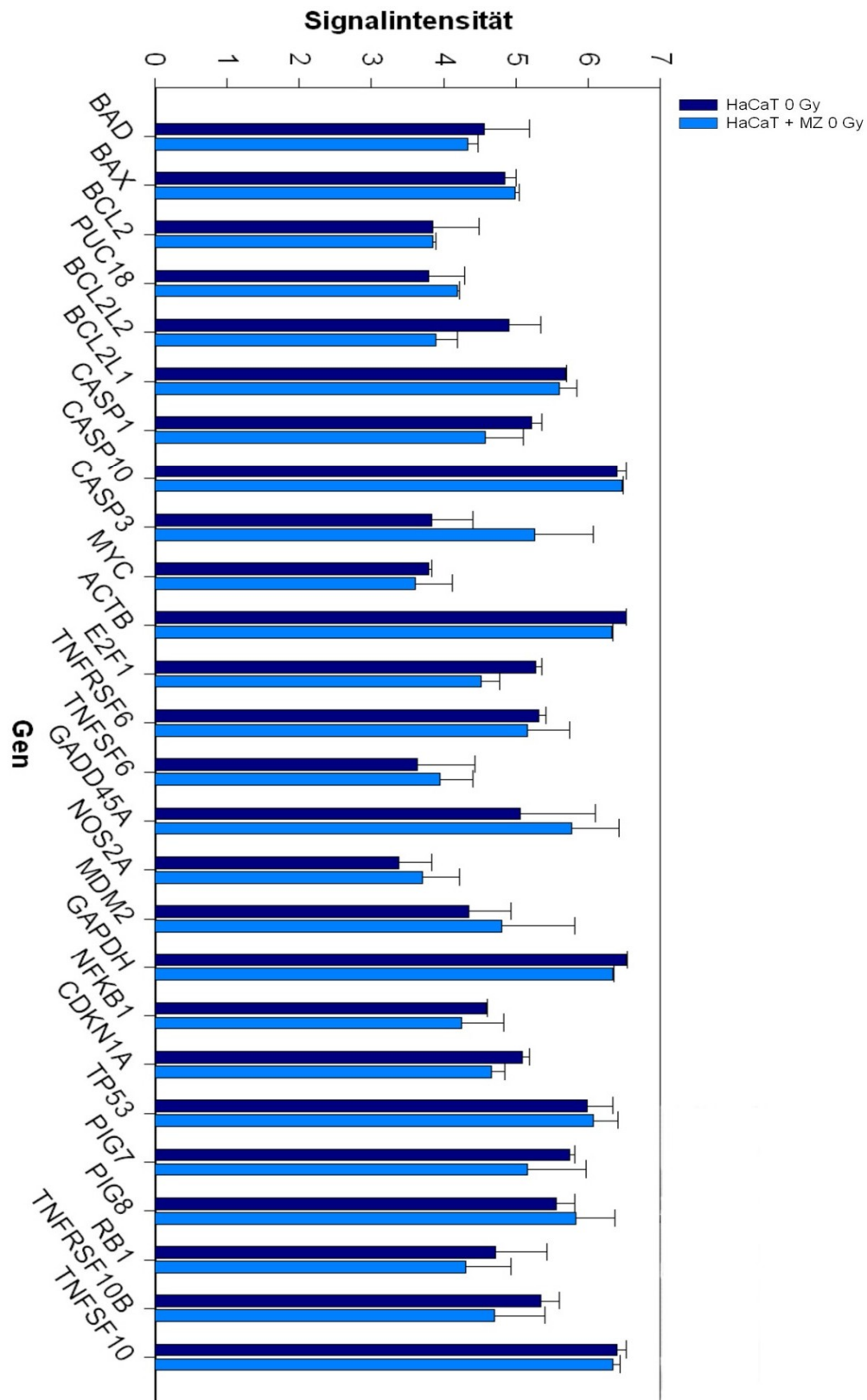


Abbildung 20: Humaner Apoptosis-1 GEArray (HaCaT), unbestrahlt. Darstellung der Genexpression von HaCaT-Zellen in An- und Abwesenheit von Mastzellen (HMC-1). In unbestrahlten HaCaT-Zellen zeigen sich unter Einfluss von Mastzellen Veränderungen, die allerdings nicht signifikant sind.

In einem nächsten Versuch wurde die Genexpression unbestrahlter Keratinozyten ohne und mit Einfluss von Mastzellen verglichen.

Unter dem Einfluss von Mastzellen zeigte sich eine Herunterregulation bei 11 Genen (BAD, BCL2L2, BCL2L1, CASP 1, MYC, E2F1, NFkB1, CDKN1A, PIG7, RB1, TNFRSF10B). Eine Hochregulation konnte bei 7 Genen (BAX, CASP3, TNFSF6, GADD45A, NOS2A, MDM2, PIG8) erkannt werden. Allerdings zeigten sich dabei keine signifikanten Veränderungen (Abb. 20).

4.3.1.3 VERGLEICH DER GENEXPRESSION VON BESTRAHLTEN HaCaT-ZELLEN IN AN- BZW. ABWESENHEIT VON MASTZELLEN (HMC-1) MIT HILFE DES APOPTOSE-GEARRAYS

In dieser Untersuchung wurden die Genexpressionen von HaCaT-Zellen mit Hilfe des Apoptose-Gearrays ohne und mit Einfluss von Mastzellen 30 min nach Bestrahlung mit 5 Gy verglichen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Visualisierung der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-RNA zur Beurteilung der Intaktheit der 28 S- und 18 S-Banden der rRNA.

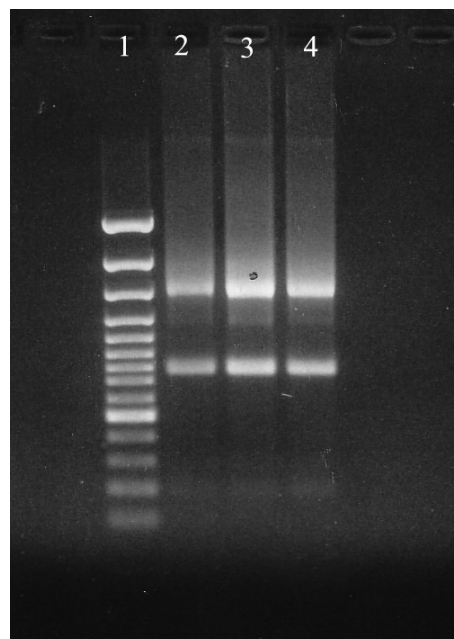


Abbildung 21: Agarose Gelelektrophorese (Spur 1: DNA-Standard / Spur 2: 2 µl RNA von bestrahlten HaCaT-Zellen (5 Gy) / Spur 3: 2 µl RNA von unbestrahlten HaCaT-Zellen mit Kokultur von HMC-1 / Spur 4: 2 µl RNA von bestrahlten HaCaT-Zellen mit Kokultur von HMC-1 (5Gy))

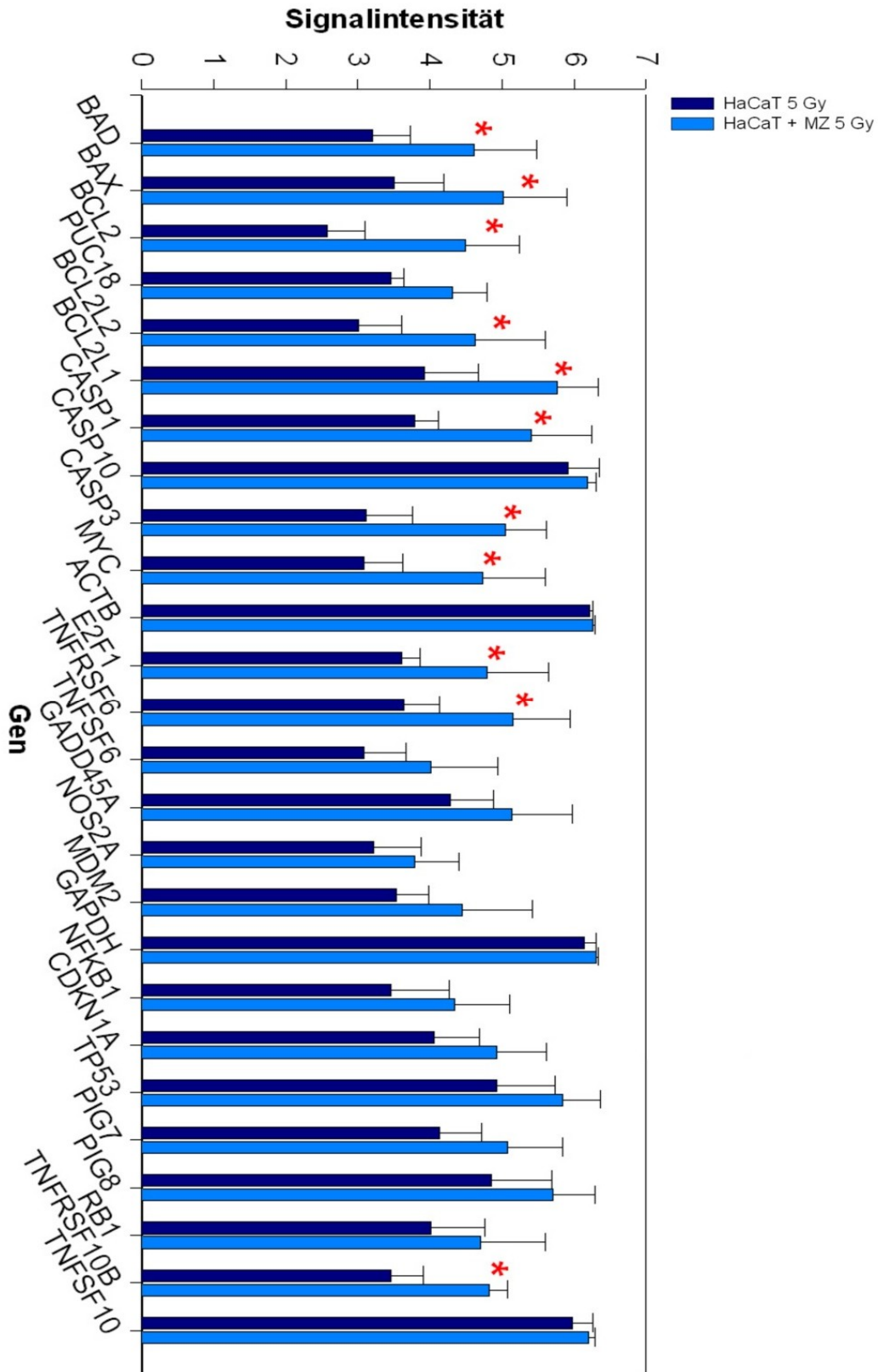


Abbildung 22: Humaner Apoptosis-1 GEMArray (HaCaT), 30 min nach Bestrahlung mit 5 Gy. Darstellung der Genexpression von HaCaT-Zellen in An- und Abwesenheit von Mastzellen (HMC-1). Unter Einfluss von HMC-1 kann eine signifikante Hochregulation (* $p < 0,05$) der Genexpression in HaCaT-Zellen bei 11 Genen festgestellt werden. Signifikante Werte wurden markiert (*).

Als Ergebnis zeigte sich eine Hochregulation aller in Abbildung 22 aufgeführten Gene unter Einfluss von Mastzellen. Eine signifikante Hochregulation ($p < 0,05$) wurde bei 11 Genen (BAD, BAX, BCL2, BCL2L2, BCL2L1, CASP1, CASP3, MYC, E2F1, TNFRSF6, TNFRSF10B) festgestellt. Mastzellen führen zu einer Hochregulation der Genexpression zahlreicher Apoptose-relevanter Gene in bestrahlten Keratinozyten.

4.3.2 CHA010919-HUMAN-GEARRAY

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss von Mastzellen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren untersucht werden. Für das Experiment wurde ein GeArray der Firma SuperArray Inc., Bethesda, MD, USA, verwendet.

4.3.2.1 VERGLEICH DER GENEXPRESSION VON UNBESTRAHLTEN HaCaT-ZELLEN IN AN- BZW. ABWESENHEIT VON MASTZELLEN (HMC-1) MITHILFE DES CHA010919-HUMAN- GEARRAYS

Zunächst wurde der Einfluss von Mastzellen auf die Genexpression unbestrahlter Keratinozyten (HaCaT) untersucht.

Bei 7 Genen konnte eine nicht signifikante Hochregulation (EGFR, α 3-Integrin, COL4A2, VEGF, VCAM-1, MCAM, IL-3) unter Einfluss der HMC-1 beobachtet werden (Abb. 23). Eine nicht signifikante Herunterregulation unter Einfluss von Mastzellen ergab sich bei 11 Genen (CD44, EGF, FN1, α 5-Integrin, TGFBR1, TGF α , TGF β ₁, α 1-Integrin, β 1-Integrin, α 4-Integrin, ICAM-3).

Unter Einfluss der Mastzellen zeigte sich also bei fast allen Genen keine signifikante Veränderung der Genexpression der HaCaT-Zellen. Lediglich bei der Expression von α v-Integrin war eine signifikante Herunterregulation unter dem Einfluss von Mastzellen nachzuweisen (Abb. 23).

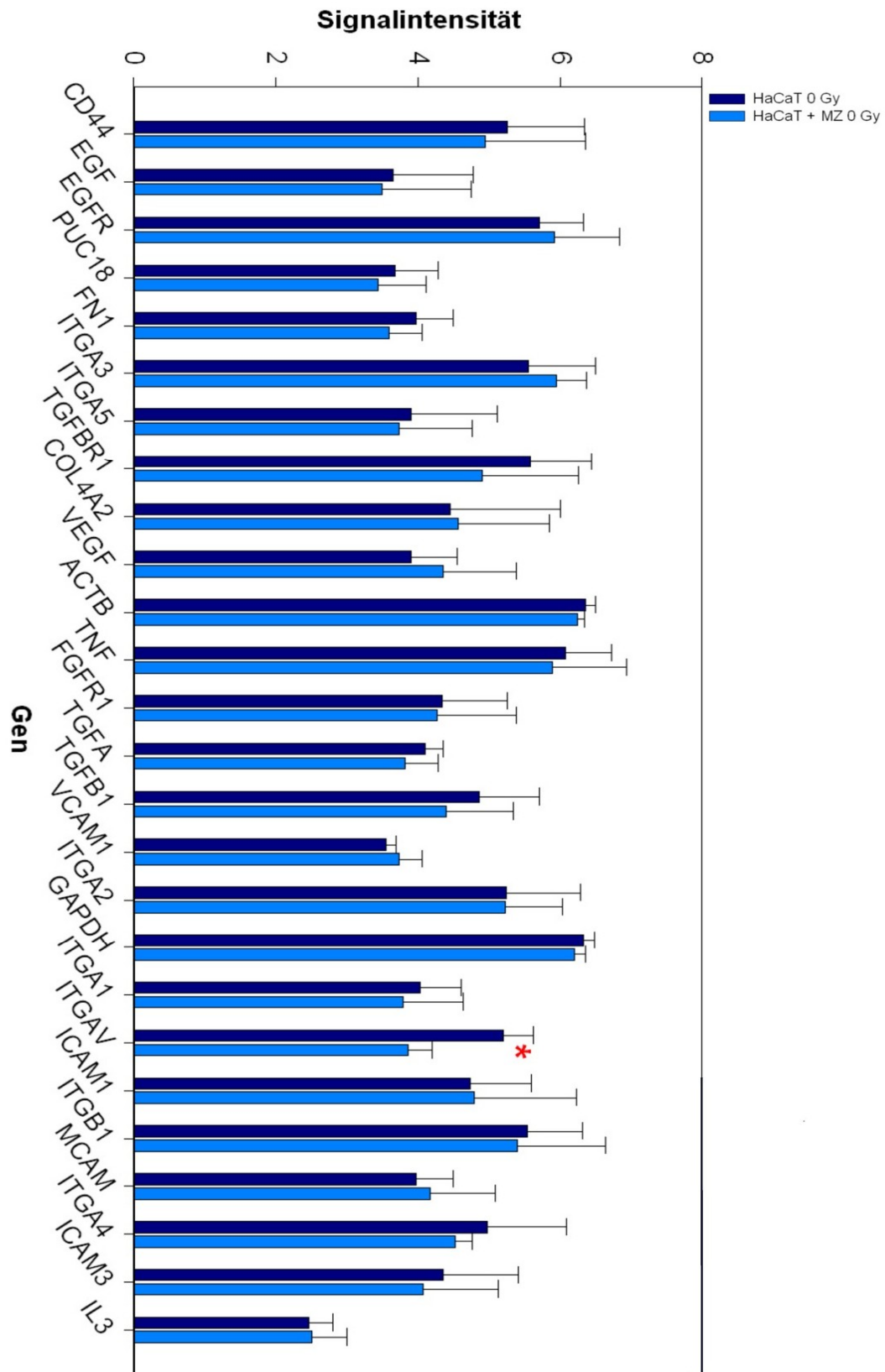


Abbildung 23: CHAO10919-Human (HaCaT), unbestrahlt. Darstellung der Genexpression in An- und Abwesenheit von Mastzellen (HMC-1). In unbestrahlten Keratinozyten konnte eine signifikante Herunterregulation (* $p < 0,05$) der Expression von α v-Integrin durch HMC-1-Einfluss nachgewiesen werden. Signifikantes Ergebnis wurde markiert (*).

4.3.2.2 VERGLEICH DER GENEXPRESSION VON BESTRAHLTEN HaCaT-ZELLEN IN AN- BZW. ABWESENHEIT VON MASTZELLEN (HMC-1) MIT HILFE DES CHA010919-HUMAN- GEARRAYS

Als nächster Versuch wurde wieder der o. g. Array (CHA010919-Human) verwendet und der Einfluss der Mastzellen auf die Genexpression von HaCaT-Zellen 30 min nach Bestrahlung mit 5 Gy untersucht.

Als Ergebnis zeigte sich, wie in Abb. 24 dargestellt, dass fast alle u.g. Gene unter Einfluss von Mastzellen hochreguliert wurden. Eine schwache Hochregulation unter Mastzelleinfluss fand sich bei 8 Genen (CD44, EGF, FN1, TGFBR1, COL4A2, VEGF, FGFR1, VCAM-1). Eine stärkere, wenngleich nicht signifikante Hochregulation ergaben die Auswertungen von zahlreichen Integrinen (α 1-Integrin, α 2-Integrin, α 3-Integrin, α 5-Integrin, α v-Integrin und β 1-Integrin), Immunglobulinen (ICAM-1 und ICAM-3), sowie bei TGF β ₁. Eine diskrete Herunterregulation unter Mastzelleinfluss zeigte sich bei TGF α . Bei EGFR und TNF α waren keine Veränderungen der Genexpression unter Einfluss der Mastzellen zu erkennen, dagegen fanden sich signifikante Hochregulationen ($p < 0,05$) beim Melanoma Adhesion Molecule (MCAM), α 4-Integrin und Interleukin-3 (IL-3).

Als Ergebnis sei festgestellt, dass in dieser Untersuchung Mastzellen in bestrahlten Keratinozyten zu einer Hochregulation der Genexpression von zahlreichen Adhäsionsmolekülen (CD44, VCAM-1, α 1-Integrin, α 2-Integrin, α 3-Integrin, α 4-Integrin, α 5-Integrin, α v-Integrin, β 1-Integrin, ICAM-1, ICAM-3, MCAM, FN1, COL4A2), Zytokinen (TGF β ₁, IL-3, TGFBR1) und Wachstumsfaktoren (VEGF, EGF, TGF β ₁, FGFR1) führen (vgl. Abb. 24).

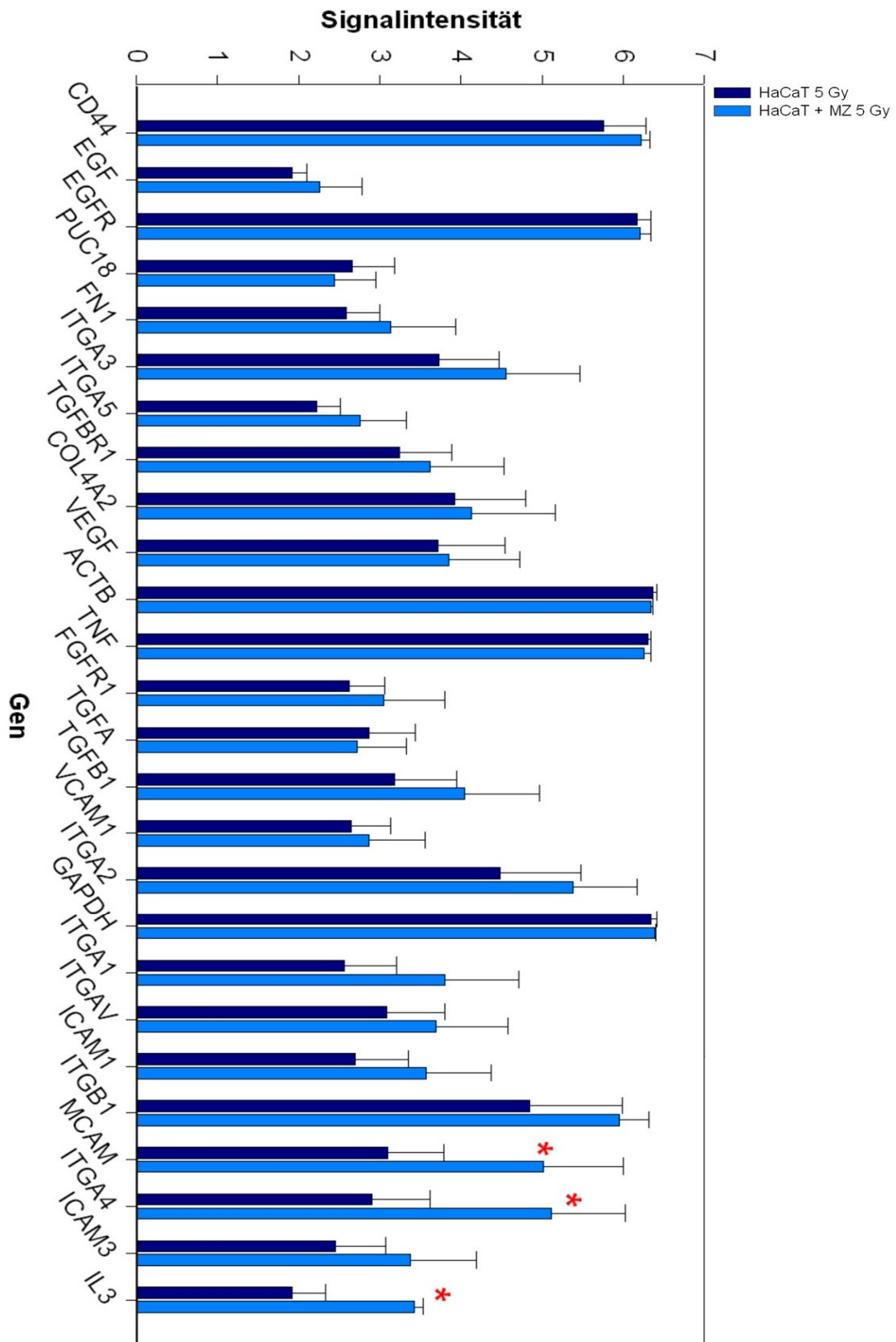


Abbildung 24: CHAO10919-Human (HaCaT), 30 min nach Bestrahlung mit 5 Gy; Darstellung der Genexpression von HaCaT-Zellen in An- und Abwesenheit von Mastzellen (HMC-1).

In bestrahlten HaCaT-Zellen kommt es durch Einfluss von HMC-1 zur signifikanten Hochregulation (* $p < 0,05$) von MCAM, $\alpha 4$ -Integrin und IL3. Signifikante Werte wurden markiert (*).

4.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER HaCaT-ZELLEN

Nun sollte untersucht werden, ob Mastzellen die Protein-Expression von verschiedenen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Integrinen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung modulieren können. Ausgewählt für diese Untersuchungen anhand der Genexpressionsarrays wurden EGF, EGFR, das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (CD49b) und $\beta 1$ -Integrin (CD29), sowie $TGF\beta_1$ und $TNF\alpha$. Dazu wurden HaCaT-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von Mastzellen mit 5 Gy bestrahlt, die Reaktion zu den Zeitpunkten T 0 (unmittelbar nach Bestrahlung), T 1 (nach 60 min), T 2 (nach 180 min), T 3 (nach 360 min) und T 4 (nach 720 min) gestoppt. Danach erfolgte eine immunhistochemische Färbung. Die semiquantitative Auswertung wurde unter dem Mikroskop visuell nach Gesichtsfeldern durchgeführt und das Signal in den Stufen 0-3 nach Intensität quantifiziert (Siehe Anhang 1). Nur ein deutlich rotes APAAP-Signal wurde dabei als positiv gewertet. Bei jedem Färbedurchgang wurden zur Qualitätssicherung neben der Positivkontrolle auch Negativkontrollen mitgeführt. Die Negativkontrolle stellt eine Spezifitätskontrolle der Immunreaktion dar, indem auf einen essentiellen Reaktionsschritt verzichtet wird, was z. B. durch den Ersatz des spezifischen primären Antikörpers durch eine nicht reagiblen Substanz (z. B. hier: PBS) erreicht werden kann. Ohne Primärantikörper findet keine Antigen-Antikörperreaktion statt, folglich kann nach Durchführung der APAAP-Färbung auch keine Rotfärbung der HaCaT-Zellen beobachtet werden. Exemplarisch stehen die beiden nachfolgenden Abbildungen für die durchgeführten Negativkontrollen.

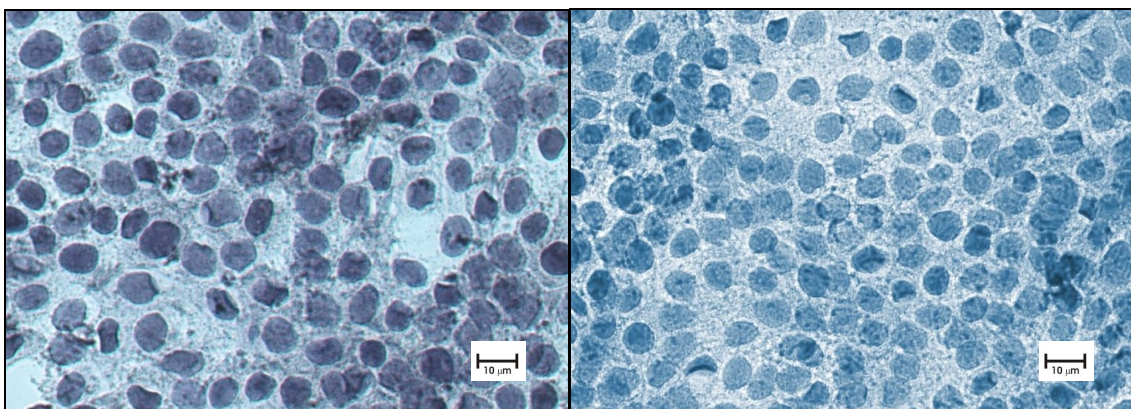


Abbildung 25: Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung von HaCaT-Zellen. Das linke Bild zeigt die Spezifitätskontrolle der Immunreaktion in Abwesenheit von Mastzellen; im rechten Bild in Abwesenheit von Mastzellen. Auf die Objektträger wurden in jedes Well 3×10^5 Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert. Danach wurde die APAAP-Färbung ohne Anwesenheit eines Primärantikörpers durchgeführt.

4.4.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)

In dieser Färbung wurde zunächst untersucht, inwieweit sich die Expression des "Epidermal Growth Factor" (EGF) nach Bestrahlung mit 5 Gy ohne und mit Einfluss von Mastzellen bei HaCaT-Zellen zeitabhängig verändert und inwieweit die Mastzellen die Expression von EGF verändern können. Wie in Abbildung 26 ersichtlich, zeigte sich bei den HaCaT-Zellen ohne Einfluss der Mastzellen eine starke Anfärbung des Zytoplasmas, d.h., EGF lokalisierte sich vor allem im Zytoplasma der Zelle. Unter dem Einfluss der Mastzellen dagegen war die Färbung schwächer, die Expression von EGF folglich geringer und EGF lokalisierte sich vor allem an den Zellmembranen der HaCaT-Zellen.

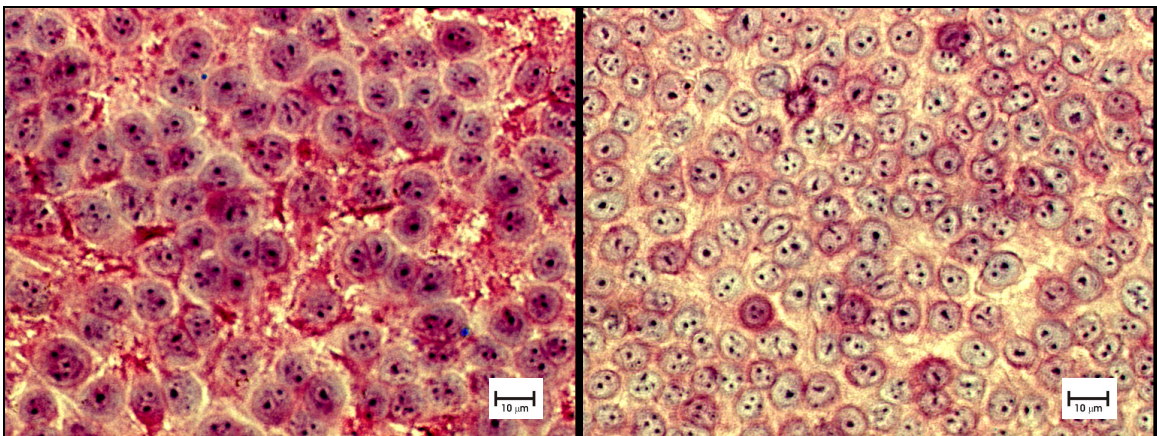


Abbildung 26: EGF-Expression von mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nach 1 Stunde. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Im linken Bild zeigt sich eine deutlich stärkere Anfärbung des Zytoplasmas ohne Kokultur von HMC-1. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3 x 10⁵ Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert und alle OT mit 5 Gy bestrahlt. Nach 1 h p.r. wurden dann die Färbungen mit EGF durchgeführt.

Die höchste Expression von EGF zeigte sich 6 h p.r. jeweils in beiden Versuchsräumen; im weiteren Verlauf fiel die Expression wieder ab. Auch hier ist eine geringere Expression unter Mastzeleinfluss, sowie eine schwächere Anfärbung des Zytoplasmas erkennbar (Abb. 27).

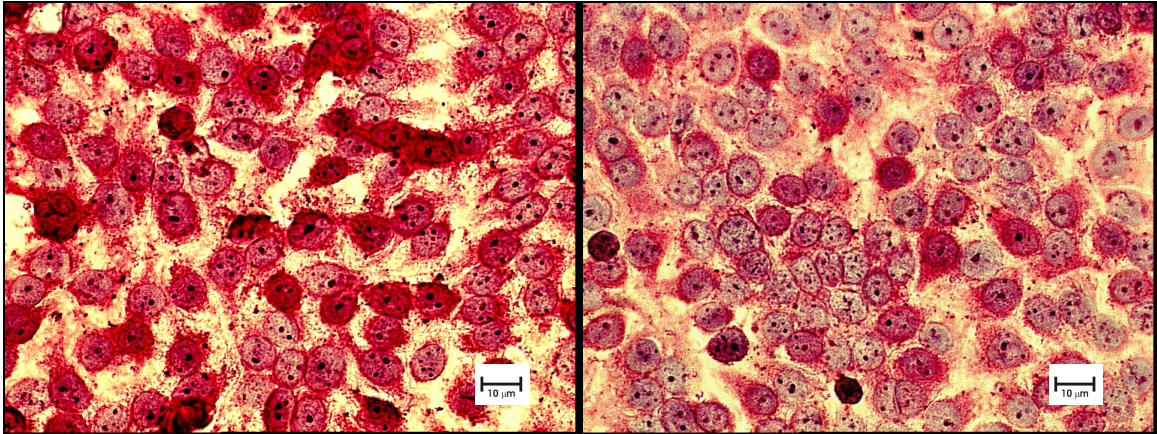


Abbildung 27: EGF-Expression von mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nach 6 Stunden. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Im linken Bild zeigt sich ohne Einfluss der Mastzellen eine stärkere Anfärbung des Zytoplasmas der HaCaT-Zellen. 6 h nach p.r. war die höchste EGF-Expression zu erkennen. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3×10^5 Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert und alle OT mit 5 Gy bestrahlt. Nach 6 h p.r. wurden dann die Färbungen mit EGF durchgeführt.

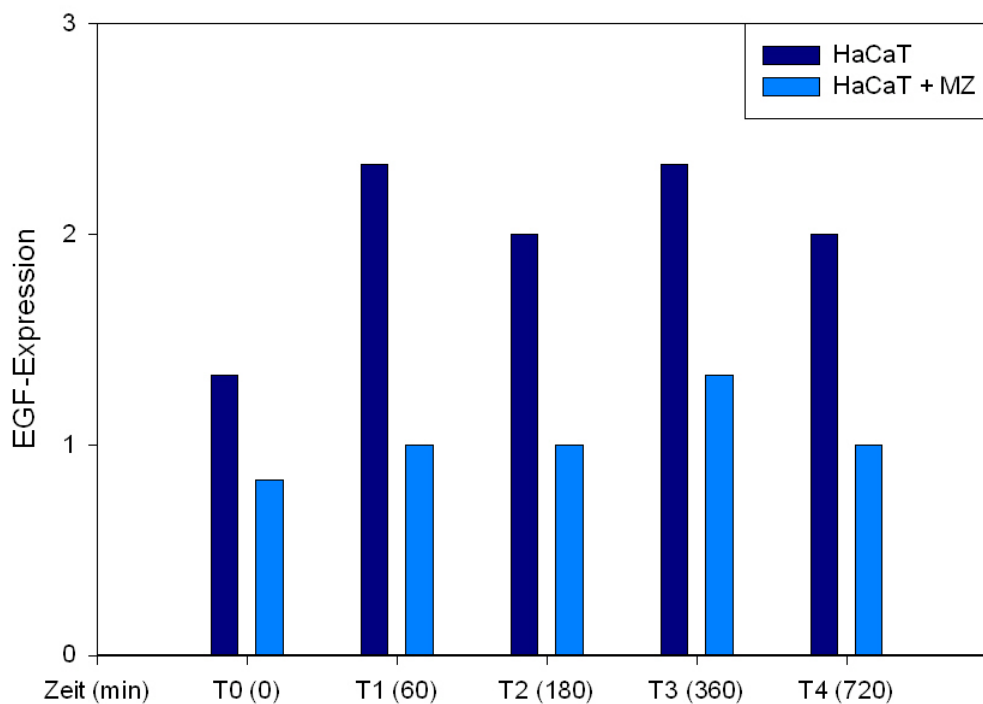


Abbildung 28: Darstellung der EGF-Expression nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 5 Gy in An- und Abwesenheit von Mastzellen. Unter dem Einfluss von Mastzellen zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine schwächere Anfärbung von EGF. Die Auswertung wurde unter dem Mikroskop visuell nach Gesichtsfeldern durchgeführt. Das Signal wurde in den Stufen 0-3 nach Intensität quantifiziert (siehe Anhang 1).

Bei der unbehandelten Kontrolle wie auch bei den bestrahlten HaCaT-Zellen zeigte sich jeweils unter dem Einfluss von Mastzellen, zu allen Zeitpunkten, eine schwächere EGF-Expression (Abb. 28).

4.4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON EGFR (EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR)

Es folgte die Untersuchung der zeitabhängigen Expression des "Epidermal Growth Factor Receptor" (EGFR) nach Bestrahlung mit 5 Gy in An- bzw. Abwesenheit von Mastzellen.

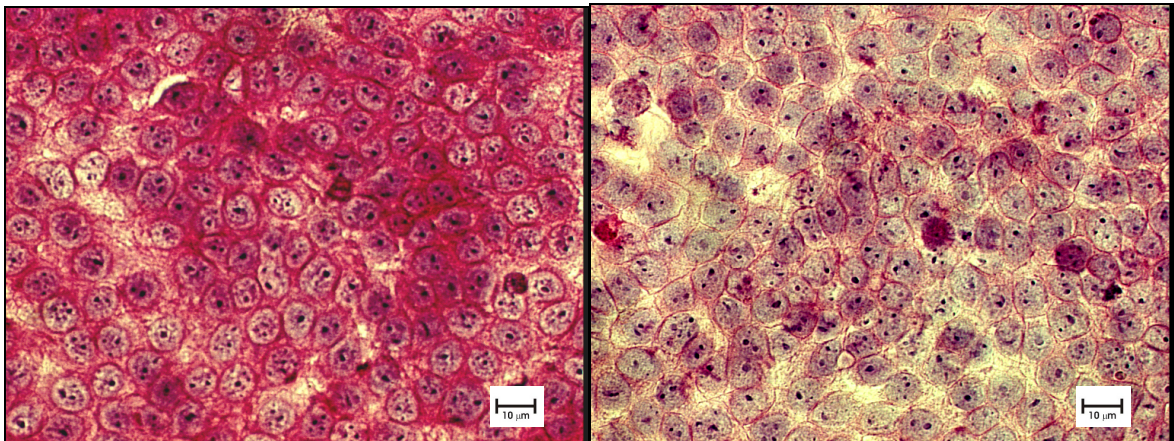


Abbildung 29: EGFR-Expression von mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nach 6 Stunden. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Unter Mastzeleinfluss zeigt sich im rechten Bild eine schwächere Expression des EGF-Rezeptors. Rechts ist EGFR vor allem an der Zellmembran nachzuweisen. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3 x 10⁵ Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert und alle OT mit 5 Gy bestrahlt. Nach 6 h p.r. wurden dann die Färbungen mit EGFR durchgeführt.

EGFR war unter HMC-1-Einfluss vor allem an den Zellmembranen der HaCaT-Zellen nachzuweisen, während eine starke EGFR-Expression ohne Kokultur von Mastzellen im Zytoplasma der HaCaT-Zellen zu sehen war (Abb. 29). Nachzuweisen war der EGF-Rezeptor zu allen Zeitpunkten.

Wie in Abbildung 30 erkenntlich, wurde der EGF-Rezeptor zum Zeitpunkt T 3 nach Bestrahlung maximal exprimiert. Unter Einfluss der Mastzellen zeigte sich zu den Zeitpunkten T 0, T 1, T 2 und T 4 nach Bestrahlung kaum ein Unterschied in der EGFR-Expression. Zum Zeitpunkt T 3 (nach 6 h) fand sich unter Einfluss der HMC-1 eine deutlich schwächere Expression des EGF-Rezeptors (Abb. 29, 30).

Interessanterweise zeigte sich in der unbestrahlten Kontrolle unter Mastzeleinfluss eine stärkere EGFR-Expression in HaCaT-Zellen (Abb. 31).

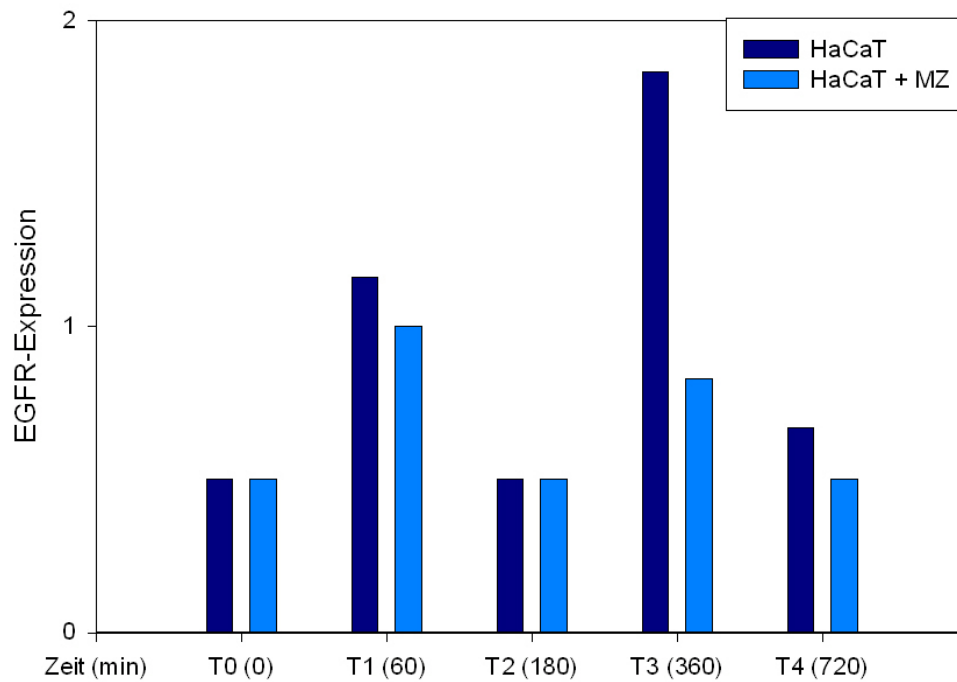


Abbildung 30: Darstellung der EGFR-Expression nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 5 Gy in An- und Abwesenheit von Mastzellen. Ein deutlicher Unterschied der EGFR-Expression ist 6 h nach Bestrahlung zu sehen. Ohne HMC-1-Einfluss wird EGFR zu diesem Zeitpunkt von den HaCaT-Zellen stärker exprimiert. Die Auswertung wurde unter dem Mikroskop visuell nach Gesichtsfeldern durchgeführt. Das Signal wurde in den Stufen 0-3 nach Intensität quantifiziert (siehe Anhang 1).

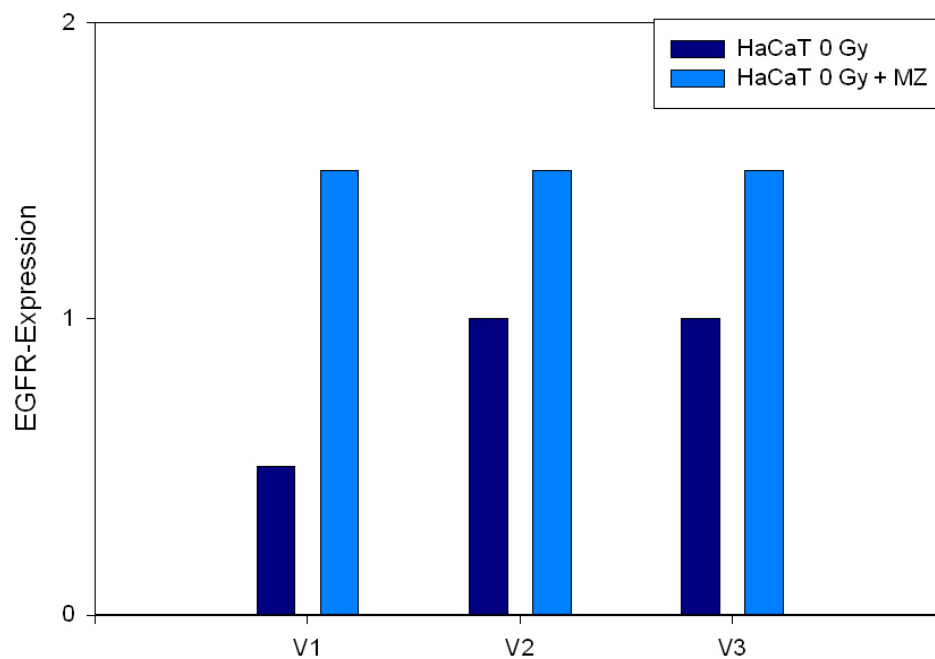


Abbildung 31: Darstellung der EGFR-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen in An- und Abwesenheit von Mastzellen. Unter Mastzeleinfluss ist in der unbestrahlten Kontrolle eine stärkere EGFR-Expression in HaCaT-Zellen nachzuweisen. Die Auswertung wurde unter dem Mikroskop visuell nach Gesichtsfeldern durchgeführt. Das Signal wurde in den Stufen 0-3 nach Intensität quantifiziert (siehe Anhang 1).

4.4.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON $\alpha 2\beta 1$ -INTEGRIN UND $\beta 1$ -INTEGRIN

Unter den in Punkt 4.4 genannten Bedingungen sollte auch die Expression der Adhäsionsmoleküle $\alpha 2\beta 1$ -Integrin und $\beta 1$ -Integrin untersucht werden.

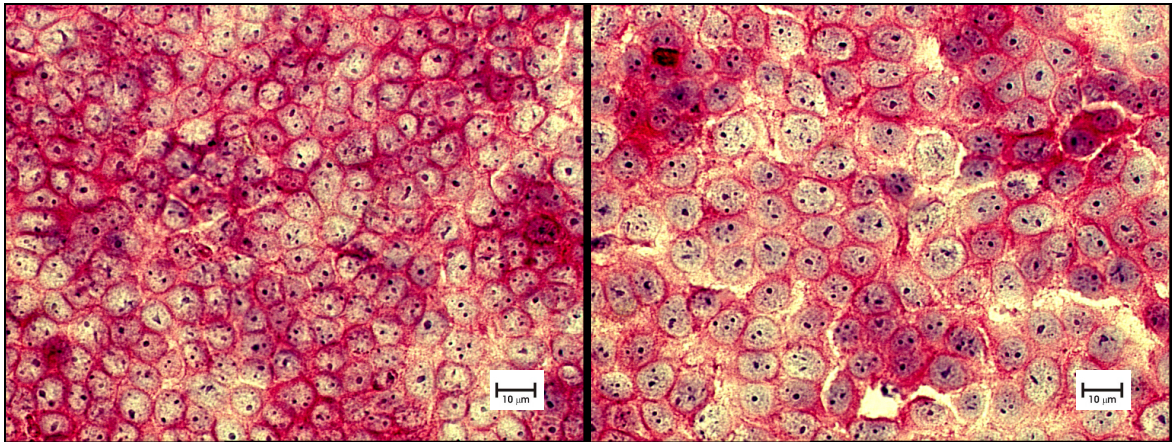


Abbildung 32: $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Im rechten Bild ist unter Mastzeleinfluss eine schwächere $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression in HaCaT-Zellen erkennbar. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3×10^5 Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Färbungen dann mit $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durchgeführt.

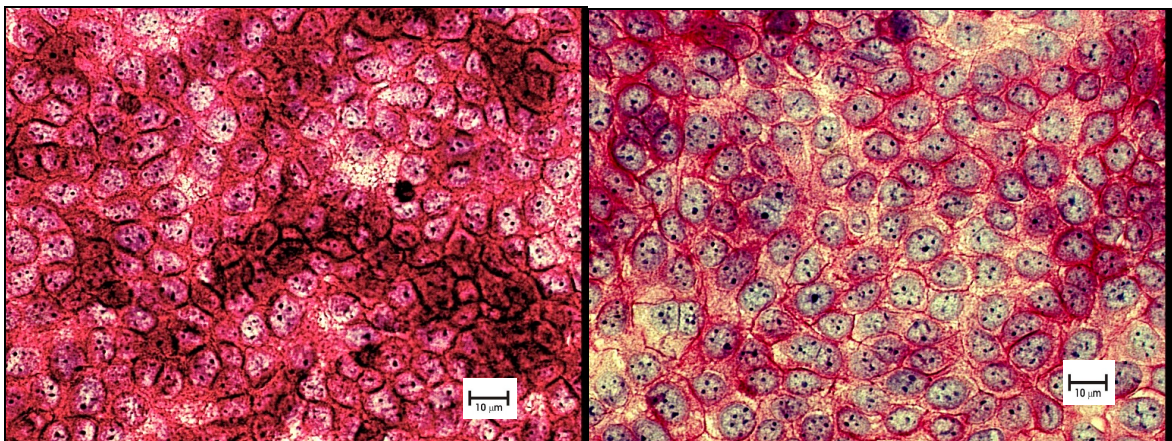


Abbildung 33: $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression von mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nach 3 Stunden. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Im rechten Bild ist unter Mastzeleinfluss eine schwächere $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression in HaCaT-Zellen erkennbar. Drei Stunden nach Bestrahlung mit 5 Gray zeigt sich die stärkste $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3×10^5 Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert und alle OT mit 5 Gy bestrahlt. Nach 3 h p.r. wurden dann die Färbungen mit $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durchgeführt.

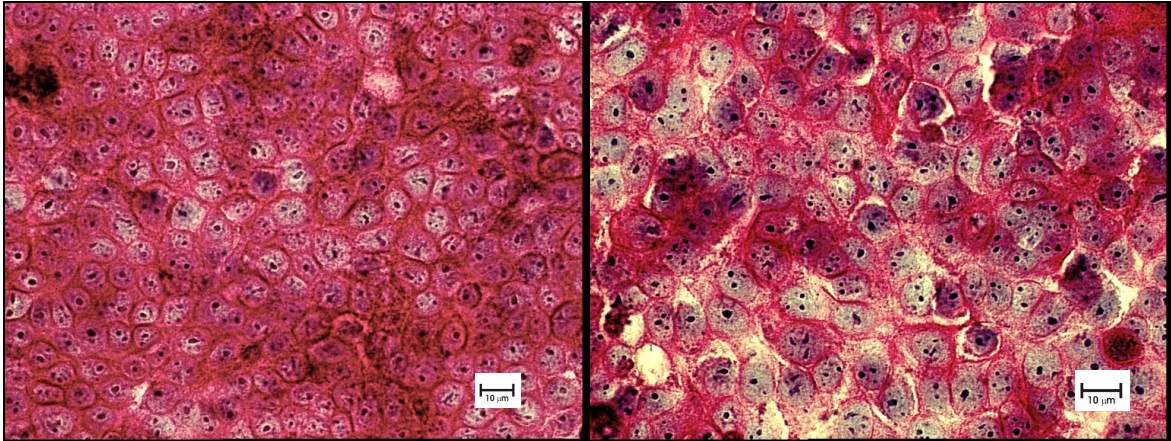


Abbildung 34: $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression von mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nach 6 Stunden. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Im rechten Bild ist unter Mastzeleinfluss eine schwächere $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression in HaCaT-Zellen erkennbar. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3×10^5 Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert und alle OT mit 5 Gy bestrahlt. Nach 6 h p.r. wurden dann die Färbungen mit $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durchgeführt.

In den Abbildungen 32 bis 34 zeigte sich jeweils unter Mastzeleinfluss eine deutlich schwächere Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins. Die maximale Expression zeigte sich in beiden Versuchsreihen nach 3 Stunden. Ohne Einfluss von Mastzellen war wiederum eine deutliche Anfärbung des Zytoplasmas zu erkennen, wobei in Anwesenheit der Mastzellen das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin stärker an den Zellmembranen als im Zytoplasma der Keratinozyten nachzuweisen war.

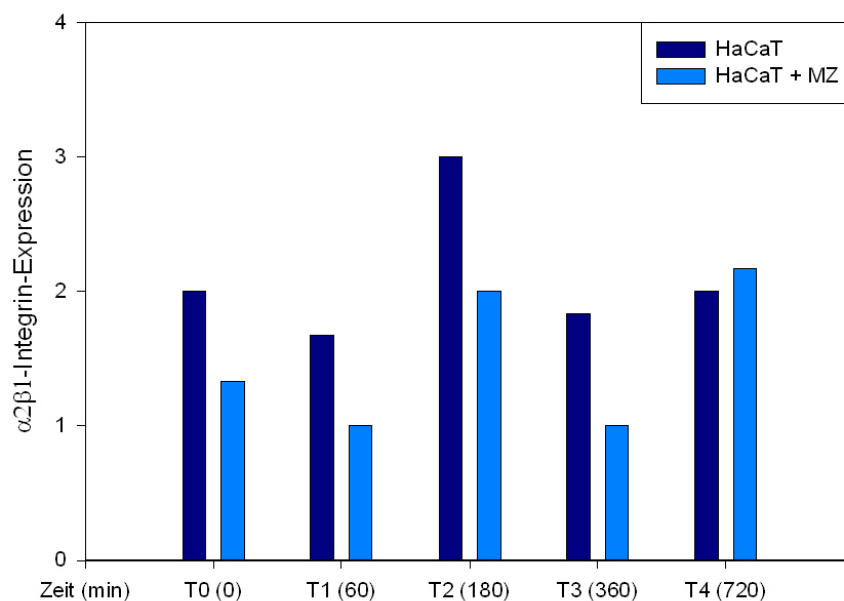


Abbildung 35: Darstellung der $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 5 Gy in An- und Abwesenheit von Mastzellen. Unter Einfluss von Mastzellen zeigt sich eine schwächere $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy mit maximaler Expression des Integrins nach 3 h. Die Auswertung wurde unter dem Mikroskop visuell nach Gesichtsfeldern durchgeführt. Das Signal wurde in den Stufen 0-3 nach Intensität quantifiziert (siehe Anhang 1).

Wie in Abbildung 35 sichtbar wird, zeigte sich nach Bestrahlung mit 5 Gy zum Zeitpunkt T 2 (3 h) p.r. die stärkste Signalintensität bei der Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins. Unter dem Einfluss von Mastzellen fand sich zu fast allen Zeitpunkten eine schwächere Expression des Integrins als in der Vergleichsprobe. Sechs Stunden nach Bestrahlung (Zeitpunkt T 3) ist bei beiden Proben eine zunehmende Abnahme der $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression festzustellen (vgl. Abb. 36, 37). Zum Zeitpunkt T 4 (720 min) konnte kein eindeutiger Unterschied der Signalintensität des Integrins in beiden Versuchsreihen gesehen werden.

In Abbildung 36 und 37 sind Bilder mit Färbungen von HaCaT-Keratinocyten mit $\beta 1$ -Integrin dargestellt. Nach 3 h (Abb. 36) und 6 h konnte das $\beta 1$ -Integrin in HaCaT-Keratinocyten am stärksten nachgewiesen werden. Wiederum fiel besonders unter Mastzeleinfluss eine schwächere Expression des Integrins zu allen Zeitpunkten auf und es war vor allem an den Zellmembranen der Keratinocyten nachweisbar. In den Vergleichsproben ohne Zusatz von Mastzellen zeigte sich eine stärkere Anfärbung des Zytoplasmas der Keratinocyten. Allerdings konnte 12 h nach Bestrahlung (Abb. 37) das $\beta 1$ -Integrin in den Zellmembranen der HaCaT-Zellen nicht mehr regelmäßig nachgewiesen werden, während sich das Integrin in der Probe ohne Mastzeleinfluss in der Zellmembran von mehr HaCaT-Zellen nachweisen ließ.

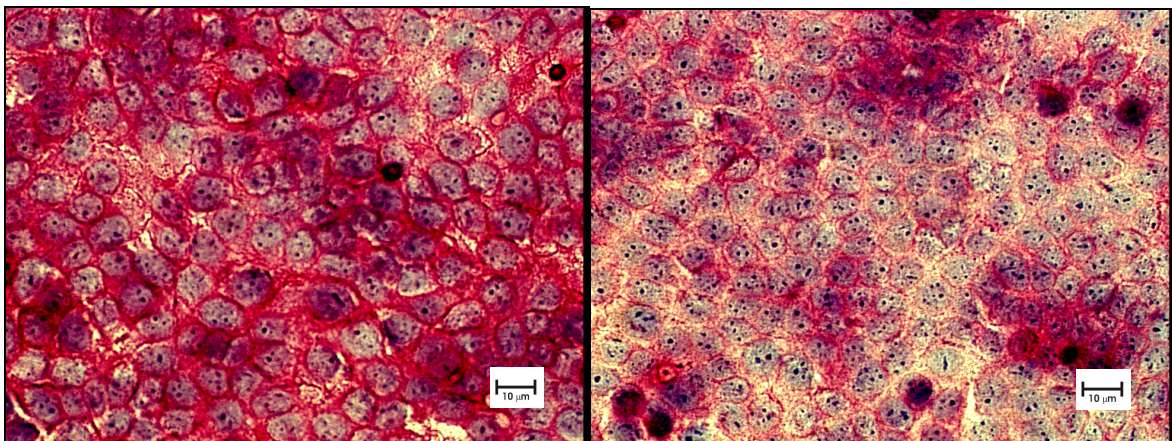


Abbildung 36: $\beta 1$ -Integrin-Expression von mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nach 3 Stunden. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Im rechten Bild zeigt sich 3 h nach Bestrahlung mit 5 Gy eine deutlich schwächere Expression des $\beta 1$ -Integrins in HaCaT-Zellen unter Mastzeleinfluss. Für die immunohistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3×10^5 Keratinocyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert und alle OT mit 5 Gy bestrahlt. Nach 3 h p.r. wurden dann die Färbungen mit $\beta 1$ -Integrin durchgeführt.

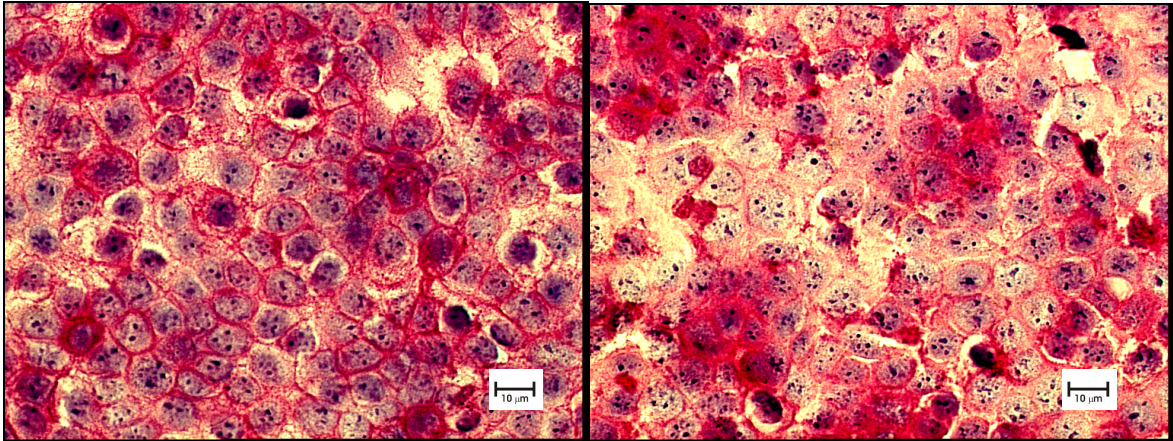


Abbildung 37: β 1-Integrin-Expression von mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nach 12 Stunden. Linkes Bild: Färbung (APAAP-Färbung) ohne Einfluss der Mastzellen; rechtes Bild: Färbung unter Einfluss von Mastzellen. Im rechten Bild zeigt sich 12 h nach Bestrahlung mit 5 Gy unter Mastzeleinfluss eine schwächere β 1-Integrin-Expression in HaCaT-Zellen. Das Integrin lässt sich im rechten Bild nicht mehr regelmäßig um die Zellmembranen nachweisen. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden auf die Objektträger in jedes Well 3×10^5 Keratinozyten in je 1 ml Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der OT 2 Stunden mit je 1 ml Mastzellen im Verhältnis 1:5 zu den HaCaT-Zellen inkubiert und alle OT mit 5 Gy bestrahlt. Nach 12 h p.r. wurden dann die Färbungen mit β 1-Integrin durchgeführt.

Wie in Abbildung 38 dargestellt, zeigte die Expression von β 1-Integrin in HaCaT-Zellen 180 (T 2) und 360 (T 3) min nach Bestrahlung die stärkste Signalintensität. Zu diesen Zeitpunkten war unter dem Einfluss von Mastzellen in Keratinozyten eine eindeutig schwächere Expression des β 1-Integrins zu sehen. Zu den Zeitpunkten T 0, T 1 und T 4 zeigte sich ebenfalls eine schwächere Expression des Integrins in den Keratinozyten unter Mastzeleinfluss (Abb. 38).

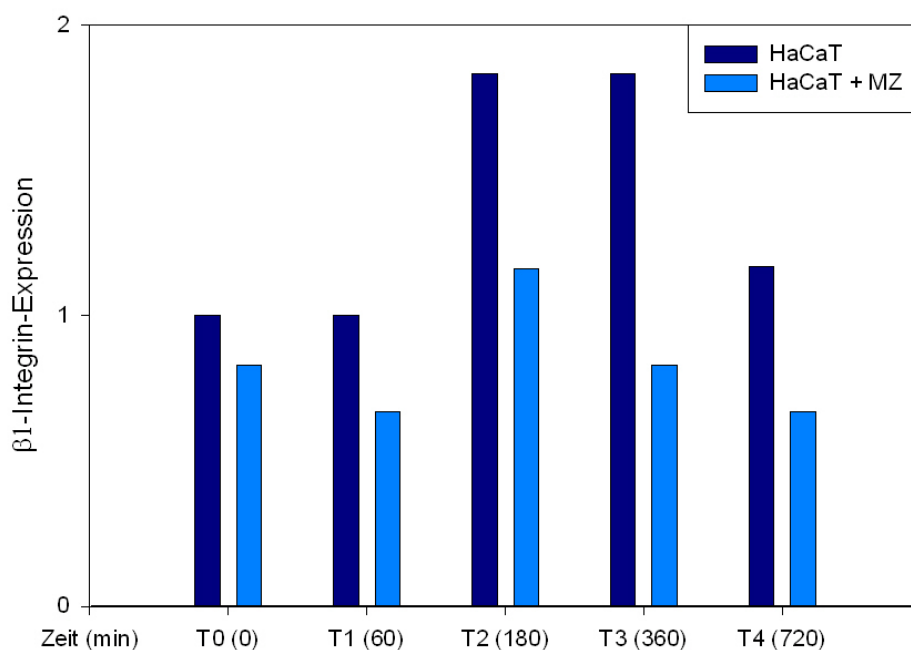


Abbildung 38: Darstellung der β 1-Integrin-Expression nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 5 Gy in An- und Abwesenheit von Mastzellen. Zu allen Zeitpunkten zeigt sich eine schwächere β 1-Integrin-Expression in HaCaT-Zellen unter Mastzeleinfluss. Die Auswertung wurde unter dem Mikroskop visuell nach Gesichtsfeldern durchgeführt. Das Signal wurde in den Stufen 0-3 nach Intensität quantifiziert (siehe Anhang 1).

4.4.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON TGF β_1 UND TNF α

Im Rahmen der Untersuchung wurden auch Immunfärbungen von Transforming Growth Factor TGF β_1 und Tumornekrosefaktor TNF α durchgeführt. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt in An- bzw. Abwesenheit von Mastzellen ohne und mit Bestrahlung eine Expression beider Faktoren in HaCaT-Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

5. DISKUSSION

Die Rolle der Mastzellen in der kutanen Strahlenreaktion und ihre Beteiligung an der Pathogenese der Strahlenreaktion in der Haut wurde bislang noch wenig erforscht. So sah diese Arbeit ihren Schwerpunkt darin, die Zellinteraktion und die regulatorischen Einflüsse von Mastzellen auf bestrahlte und unbestrahlte humane Keratinozyten zu untersuchen und mit Hilfe der durchgeführten Experimente die strahlenbiologischen Kenntnisse über die Bedeutung, die Funktion und die Zellinteraktion von Mastzellen in der kutanen Strahlenreaktion zu vertiefen.

5.1 STEIGERUNG DER PROLIFERATION VON KERATINOZYTEN (HaCaT) UNTER EINFLUSS VON MASTZELLEN (HMC-1)

Bisher gab es keine Untersuchungen über den direkten Einfluss von Mastzellen auf die Proliferation von bestrahlten Keratinozyten. In der vorliegenden Arbeit konnte daher erstmalig nachgewiesen werden, dass Mastzellen die Proliferation von bestrahlten HaCaT-Zellen signifikant erhöhen können. Unter Einfluss der Mastzellen konnte im Dosisbereich 1 Gy zu den Zeitpunkten d 3 bis d 6 eine signifikante Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen im Vergleich zu den Proben ohne Kokultur von Mastzellen nachgewiesen werden. Bei 2,5 Gy ergab sich eine signifikante Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen unter Mastzelleinfluss zu den Zeitpunkten d 3 und d 4. Zum Zeitpunkt d 5 zeigte sich bei 5 Gy eine signifikante Proliferationssteigerung der Keratinozyten unter Mastzellzusatz. Im Dosisbereich 10 Gy, sowie zu den Zeitpunkten d 1 und d 2 konnte keine signifikante Steigerung der Zellzahl nachgewiesen werden. Aus der Wachstumskurve der unbestrahlten Keratinozyten konnte zu den Zeitpunkten d 3 bis d 5 eine signifikante Proliferationssteigerung unter Mastzelleinfluss im Vergleich zu den unbestrahlten Keratinozyten ohne Mastzelleinfluss errechnet werden.

Bisher war über den Einfluss von Mastzellen auf die Zelldifferenzierung unbestrahlter Keratinozyten wenig bekannt (Artuc et al. 2002, S. 411-415). In einigen neueren Studien wurde gezeigt, dass Mastzellmediatoren die Reepithelialisierung, also die Migration und Proliferation von Keratinozyten beeinflussen können und so zur Bildung eines neuen Epithels führen (Noli und Miolo 2001, S. 303-313; Vliagoftis et al. 1999, S. 656-662) und Mastzellen direkt die

Funktionen der Keratinozyten über die Wachstumsfaktoren EGF, TGF und NGF sowie spezifische Zytokine (IL-1 und TNF) modulieren können (Noli und Miolo 2001, S. 303-313). NGF z.B. stimuliert das Wachstum humaner Keratinozyten, erhöht die Mitogenität mehrerer Wachstumsfaktoren für Keratinozyten und fördert die Produktion von VIP (Vasointestinales Peptid) durch Nervenfasern, das seinerseits mitogen auf Keratinozyten wirkt (Sung et al. 1999, S. 435-446; Hermes et al. 2001, S.387-393). TGF β spielt eine Rolle bei der Differenzierung kultivierter humaner Keratinozyten (Staiano-Coico et al. 1990, S. 286-291) und scheint einen modulierenden Effekt auf wachsende humane Keratinozyten durch Beeinflussung ihrer Integrin-Rezeptoren auszuüben (Zambruno et al. 1995, S. 853-865; Hermes et al. 2001, S.387-393). AGF (Oike et al. 2003, S. 9494-9499) fördert die epidermale Proliferation und Regeneration in Keratinozyten.

In einer Studie von Artuc et al. (2002, S. 411-415) konnte in einem *in vitro* Hautmodell ebenfalls nachgewiesen werden, dass Mastzellen auf die Neubildung einer Epidermis, also auf die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten, einen Einfluss haben. Andererseits konnte dagegen in zwei früheren Studien dargestellt werden, dass Mastzellen über ihre spezifischen Mediatoren Tryptase und Chymase (Nadel 1991, S. 319-331; Algermissen et al. 1999, S. 193-198) die Proliferation der Keratinozyten behinderten, sowie TGF β die Keratinozytenmigration unterdrückte (Tsuboi et al. 1992, S. 652-653). Diese widersprüchlichen Effekte könnten durch unterschiedliche Differenzierungsstadien der Keratinozyten oder durch unterschiedliche Kulturbedingungen entstanden sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen also nicht nur unter Mastzeleinfluss eine signifikante Proliferationssteigerung unbestrahlter Keratinozyten, sondern auch bestrahlter Keratinozyten. Eine signifikante Proliferationssteigerung unter Mastzeleinfluss bei den bestrahlten Keratinozyten ließ sich in den Dosisbereichen von 1, 2,5 und 5 Gy nachweisen. Im höheren Dosisbereich konnte keine signifikante Steigerung der Proliferation festgestellt werden. Der Mastzeleinfluss auf bestrahlte Keratinozyten scheint also vor allem in den Dosisbereichen bis 5 Gy eine Rolle zu spielen. Diese Ergebnisse werden auch durch die Darstellung des Strahleneffektes in der vorliegenden Arbeit unterstrichen. Ab 5 Gy nimmt der Strahleneffekt zu und die Mastzellen zeigen einen nur noch geringen Einfluss auf

die Proliferation der Keratinozyten (vgl. Abb. 15). Bei 5 Gy scheint sich somit ein Wendepunkt in der Mastzellwirkung abzuzeichnen. Ausschlaggebend dafür dürfte sein, dass Mastzellen in Bezug auf die Reparaturfähigkeit der Keratinozyten ab diesem Dosisbereich ihre Wirksamkeit verlieren. Bemerkenswert ist, dass ein Einfluss der Mastzellen auf die bestrahlten Keratinozyten erst zeitversetzt zu erkennen ist, da sich eine signifikante Proliferationssteigerung erst ab dem dritten Tag zeigte. Ab Tag 4 zeigte sich ein zunehmender Einfluss der Mastzellen auf die HaCaT-Zellen, ab Tag 5 der Wachstumskurve verstärkte sich sogar der Mastzeleinfluss auch in den höheren Dosisbereichen ab 5 Gy. Der Strahleneffekt ließ dabei deutlich nach (vgl. Abb. 13 und 14). Da eine Mastzellwirkung auf Keratinozyten in dieser Untersuchung erst zeitversetzt einsetzt, ist anzunehmen, dass Mastzeleffekte im chronischen Stadium der kutanen Strahlenreaktion eine wichtige Rolle spielen könnten. Typische Spätschäden nach Strahlenexposition sind die Entwicklung von fibrotischen Veränderungen (Peter 1999 et al. S. 147-152), aber auch von kanzerogenen Folgen im Spätstadium. Als Krebsspätfolgen nach Bestrahlung sind in erster Linie Basaliome und Plattenepithelkarzinome zu erwarten (Gottlöber et al. 1999, S. 383-385). Durch diese radioprotektive Wirkung könnten durch die oben beschriebenen Mastzeleffekte Strahlenschädigungen der Haut, vor allem in Dosisbereichen bis 5 Gy, verringert oder sogar verhindert werden, wenn die Mastzellkonzentration an den negativ affizierten Körperregionen erhöht werden könnte. Durch Gabe, beispielsweise von Interleukinen, könnte über eine immunogene Reaktion eine Erhöhung der Mastzellkonzentration erreicht werden. Durch z. B. IL-10, IL-3 und IL-4 werden Mastzellen in ihrem Wachstum stimuliert. IL-4 induziert eine Reihe von wichtigen Mastzell-Effektor-Molekülen und führt so zu einer Aktivierung der Mastzelle über den klassischen Signaltransduktionsweg (Gurish und Boyce 2002, S. 107-118).

5.2 KLONOGENITÄTSASSAY

Um zu erkennen, ob Mastzellen nicht nur einen Einfluss auf die Proliferation von bestrahlten Keratinozyten, sondern auch auf das Überleben von bestrahlten HaCaT-Zellen haben, wurden in dieser Arbeit Klonierungstests mit HaCaT-Zellen und HaCaT-Zellen in Kokultur mit Mastzellen (HMC-1) durchgeführt. Bislang gab es keine Untersuchungen über den Einfluss von Mastzellen auf das Überleben von bestrahlten Keratinozyten.

Der Strahlenparameter D_q lag bei den untersuchten HaCaT-Zellen ohne Mastzell-Zugabe im Durchschnitt bei 2,1 Gy. Dieser Parameter stellt ein Maß für die Breite der Schulter dar und somit für die Erholungskapazität und die Fähigkeit der Zellen, Strahlenschäden reparieren zu können (Hall 1994, S. 1-478). Die D_q -Werte vieler Säugetierzellen liegen zwischen 0,6 Gy (Knochenmark der Maus) und max. 3,4 Gy (Kryptzellen der Maus) (Hall 1994, S. 1-478), d.h. die verwendete HaCaT-Zelllinie war im Mittelfeld dieses Spektrums angesiedelt und zeigte damit eine insgesamt gute Reparaturfähigkeit.

Das Maß für den linearen Anteil der Kurve, der Wert D_0 , der als die wahre Strahlenempfindlichkeit bezeichnet wird, lag bei den HaCaT-Zellen ohne Einfluss der Mastzellen bei 1,1 Gy. Der D_0 -Wert für die meisten *in vitro* Kulturen von Säugetieren schwankt um etwa 1 Gy (Hall 1994, S. 1-478). Die HaCaT-Zelllinie lag also mit 1,1 Gy im Durchschnitt.

Im Vergleich zu der HaCaT-Kurve ohne Mastzellen konnte ein signifikant höheres Überleben ($p < 0,05$) der HaCaT-Zellen in allen Dosisbereichen in Anwesenheit von 3000 Mastzellen errechnet werden (D_q 2,55; D_0 1,2 Gy). In Kokultur mit 8000 Mastzellen zeigte sich ein signifikant höheres Überleben der Keratinozyten in den Dosisbereichen 1, 5 und 10 Gy im Vergleich zu den HaCaT-Zellen ohne Zugabe von Mastzellen (D_q 2,4 Gy; D_0 1,15 Gy). In Anwesenheit von 100 Mastzellen ergab sich keine Veränderung der Überlebenskurve im Vergleich zur HaCaT-Kurve ohne Mastzellzusatz (D_q 2,1 Gy; D_0 1,1 Gy).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Überlebensrate der HaCaT-Zellen und der Anzahl der Mastzellen besteht. Bei der Probe mit 100 Mastzellen war die Zellzahl offensichtlich zu gering, da kein Effekt zu beobachten war. Bei 3000 Mastzellen ergab sich die höchste Überlebensrate in allen Dosisbereichen; bei 8000 Mastzellen war kein weiterer positiver Effekt beobachtbar, sondern im Gegenteil lag hier die Überlebenskurve in allen Dosisbereichen unterhalb der Überlebenskurve der HaCaT-Zellen mit 3000 Mastzellen. In Bezug auf die Überlebensrate der HaCaT-Zellen konnte also festgestellt werden, wie auch die Parameter D_0 und D_q erkennen lassen, dass bei einem Zusatz von etwa

3000 Mastzellen Reparaturfähigkeit und Überlebensrate der Keratinozyten signifikant erhöht werden und die Strahlenempfindlichkeit vermindert wird. Bei der Zugabe von 8000 Mastzellen scheint dagegen der Sättigungsgrad an Mastzellen in der *in vitro* Probe überschritten zu sein.

Weiter konnte erkannt werden, dass – im Gegensatz zu der Proliferationskinetik – der Mastzeleinfluss auf die Überlebensrate der HaCaT-Zellen auch in den höheren Dosisbereichen von 5 Gy und 10 Gy nachweisbar war. Dieser Einfluss war schon beim Strahleneffekt ab Tag 4 (vgl. Abb. 12 - 14) ersichtlich und schon zu diesem Zeitpunkt nachweisbar. Bei den Klonierungstests, die über einen Zeitraum von 14 Tagen inkubiert wurden, spielt dann offensichtlich der Zeitfaktor eine noch bedeutendere Rolle. Ab Tag 4 lässt der Strahleneffekt nach; Mastzellen und Keratinozyten können sich zwischenzeitlich augenscheinlich etwas erholen, so dass unter Mastzeleinfluss sich die Reparaturfähigkeit der Keratinozyten erhöht und sich damit auch die Überlebensrate verbessert.

Bei den weiteren Untersuchungen mit Mastzellüberstand (Mastzellzentrifugat) und 120 mU/ml Tryptase konnte der Strahlenparameter D_q beim Mastzellüberstand bei 2,3 Gy gemessen werden, bei der Kokultur mit Tryptase bei 2,1 Gy. Bei den Versuchen mit dem Mastzelllysat betrug der Strahlenparameter D_0 1,15 Gray und durch den Einfluss der Tryptase 1,1 Gy. Eine signifikante Steigerung des Überlebens der HaCaT-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten HaCaT-Zellen zeigte sich unter Zusatz von Mastzellüberstand im Dosisbereich von 5 Gy. Auch in den anderen Dosisbereichen von 1, 2,5 und 10 Gy konnte ein höheres, aber nicht signifikant höheres Überleben der Keratinozyten unter Einfluss des Mastzellüberstandes festgestellt werden. Durch Zusatz von Tryptase konnte kein Effekt erzielt werden.

Eine signifikante Steigerung des Überlebens der HaCaT-Zellen unter Zusatz von Mastzellüberstand zeigte sich nur im Dosisbereich von 5 Gy. Damit lag die Überlebenskurve unter Zusatz des Mastzellüberstandes unter der Kurve der HaCaT-Zellen in Anwesenheit von 3000 bzw. 8000 Mastzellen. Aus diesem Umstand kann die Folgerung gezogen werden, dass zwar eine höhere Reparaturfähigkeit der

HaCaT-Zellen durch die Anwesenheit von Mediatoren der Mastzelle erzielt werden kann, eine optimale Wirkung aber die Anwesenheit der ganzen Zelle notwendig macht. Für diese Folgerung spricht auch das Ergebnis, dass auch durch Zusatz von Tryptase allein keine Steigerung des Überlebens von HaCaT-Zellen erzielt werden konnte.

Bisher sind einige Mediatoren bekannt, die direkt die Migration und Proliferation der Keratinozyten in der Wundheilung beeinflussen (Noli und Miolo 2001, S. 303-313). EGF, TGF, NGF sowie spezifische Zytokine wie IL-6, IL-1, TNF α und die Protease Histamin haben einen direkten Einfluss auf die Funktion und Proliferation der Keratinozyten (Galli et al. 1994, S. 1-96; Noli und Miolo 2001, S. 303-313). Ebenfalls war schon bekannt, dass die Serinprotease Tryptase Einfluss auf Keratinozyten hat, ihre biologischen Funktionen aber immer noch weitgehend ungeklärt sind. Bei anderen Zellkulturexperimenten zeigte sich die Tryptase als potenter Wachstumsfaktor für Epithelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten (Cairns und Walls 1996, S. 275-283; Ruoss et al. 1991, S. 493-499) und in einer Studie von Cairns und Walls (1996, S. 275-283) konnte Tryptase die Proliferation humaner Keratinozyten fördern. In einer *in vitro* Studie von Huttunen et al. (2001, S. 184-192) wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Mastzellen das Keratinozytenwachstum über ihre Mediatoren beeinflussen können. Allerdings wurde in dieser Studie die 3H-Thymidin-Inkorporation der Keratinozyten, also das epitheliale Wachstum *in vitro* durch Histamin dosisabhängig inhibiert, durch Heparin in einer niedrigen Dosis (2 $\mu\text{g/ml}$) inhibiert und in einer höheren Dosis (200 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert, wobei die Haut-Tryptase keinen Einfluss auf das Wachstum der Keratinozyten zeigte. Weller et al. (2006, S. 2366-2368) wiesen dagegen nach, dass die Wundheilung der Haut mastzellabhängig ist und je näher die Mastzellen an der Hautwunde lokalisiert sind, desto mehr Aktivität und Degranulation zeigten sie. Die Reepithelisation wurde durch Abwesenheit von Mastzellen und Histamin verzögert. Auch in früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass H1-Rezeptor-Blocker die kutane Wundheilung verzögern können (Bairy et al. 1991, S. 398-399) und die Mastzell-Produkte Histamin und Serotonin die Proliferation von epidermalen Keratinozyten stimulieren (Maurer et al. 1997, S. 79-84), somit die Aktivität von Histamin und der Mastzellen für eine normale Wundheilung notwendig sind (Weller et al. 2006, S. 2366-2368). In einer neueren Studie von Purwar et

al. (2006, S. 4444-4450) konnte wiederum eine Induktion von Komplement Fragment-3a (C3a) in epidermalen Keratinozyten, das eine wichtige Rolle bei allergischen und entzündlichen Hauterkrankungen spielt, durch die Mastzell-Tryptase nachgewiesen werden. Über den Einfluss ionisierender Bestrahlung auf Mastzellen, insbesondere auf die Tryptase, ist bisher nur wenig bekannt. Albrecht et al. jedoch konnten 2007 (Albrecht et al. 2007, S. 535-541) aufzeigen, dass ionisierende Strahlung zu einer verstärkten Degranulation von Tryptase führt.

Als Ergebnis der Untersuchungen lässt sich zusammenfassen, dass Mastzellen und auch ihre Mediatoren *in vitro* zwar positive Effekte auf das Überleben von bestrahlten Keratinozyten haben und somit zu einer Erhöhung der Strahlenresistenz und Reparaturfähigkeit von HaCaT-Zellen führen, dass aber intakte oder ganze Mastzellen in allen Dosisbereichen in Bezug auf Überlebensrate, Strahlenresistenz und Reparaturfähigkeit weitaus wirksamer sind. So steht auch zu vermuten, dass auch *in vivo* diese Erkenntnisse auf die Therapie der kutanen Strahlenreaktion über eine Aktivierung von Mastzellen und Erhöhung ihrer Konzentration in betroffenen Hautarealen übertragen werden könnten.

5.3 GENEXPRESSIONSARRAY

5.3.1 HUMANER APOPTOSIS-1 GEARRAY

Um strahleninduzierte Krankheiten des Organs Haut besser verstehen und therapieren zu können, ist es wichtig, den Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Haut auch auf molekularer Ebene zu untersuchen (Koike et al. 2005, S. 173-184). Bei der Therapie von Hautschäden am Patienten liegen Erkenntnisse in erster Linie zur Therapie der fibrotischen Spätschäden vor, z.B. mit Interferon-gamma (Gottlöber et al. 2001, S. 156-166). Bei der Therapie von Akutschäden bestehen große Lücken in validierten Therapieverfahren (Meineke 2002, S. 1-139). In der Literatur liegen *in vitro* Daten vor, welche einen positiven Effekt von Steroiden (Beetz et al. 1997, S. 33-43) oder von Strahlenschutzsubstanzen (Cordes et al. 2002, S. 17-27) auf dermale Zellen in der Zellkultur nach Bestrahlung zeigen. Allerdings gibt es in der Praxis für die *in vivo* Behandlung jedoch noch kaum geprüfte Therapieansätze (Meineke 2002, S. 1-139). Deshalb könnten Untersuchungen

über Mastzellen in der Akutphase der kutanen Strahlenreaktion für eine Therapie wertvolle Ansätze liefern.

5.3.1.1 MODULATION VON APOPTOSE-RELEVANTEN GENEN IN HaCaT-ZELLEN DURCH IONISIERENDE BESTRAHLUNG

Bei der Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 5 Gy konnte im Apoptose-GeArray eine Hochregulation von allen 26 Genen beobachtet werden. Eine signifikante Hochregulation nach Bestrahlung zeigte sich – im Gegensatz zu der unbestrahlten Probe - bei 10 Genen (BAD, BAX, CASP3, E2F1, TNFSF6, GADD45A, NF κ B1, PIG8, RB1, TNFRSF10B). Die Genexpressionsanalyse ergab, dass ionisierende Bestrahlung die Genexpression von den o.g. apoptose-relevanten Genen in HaCaT-Keratinocyten modulieren kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine Hochregulation der proapoptotischen Gene Bad und Bax in bestrahlten HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Bis heute wurde eine große Zahl von Bcl2-homologen Proteinen beschrieben, von denen einige vor Apoptose schützen, andere dagegen den programmierten Zelltod auslösen (Strasser et al. 2000, S. 541-548). Die Mitglieder dieser Familie werden nach ihrer Funktion in anti- und proapoptotische Proteine eingeteilt. Zu den proapoptotischen Proteinen gehören Bad (Yang et al. 1995, S. 285-291) und Bax (Oltvai et al. 1993, S. 609-619). Die Aktivierung von Bax ist bislang noch nicht geklärt, allerdings konnte nach Schädigung der DNA durch ionisierende Bestrahlung mit 8 Gy eine verstärkte Bax-Expression in Lymphoid-Zellen und SIEs (small intestinal epithelial) gezeigt werden (Kitada et al. 1996, S. 187-192). Bad und Bax spielen eine zentrale Rolle in der Modulation der Apoptose (Dhanalakshmi et al. 2004, S. 99-106) und kontrollieren den programmierten Zelltod auf mitochondrialer Ebene. Mithin wurde in dieser Arbeit der Nachweis geführt, dass Bax durch ionisierende Strahlung in HaCaT-Zellen aktiviert werden kann. Die Tatsache, dass durch ionisierende Bestrahlung vor allem proapoptotische Bcl2-Mitglieder signifikant in HaCaT-Zellen hochreguliert wurden, spricht dafür, dass der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, also die Apoptose, ungehindert eingeleitet werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurden durch Bestrahlung auch antiapoptotische Bcl2-Moleküle in HaCaT-Zellen hochreguliert, allerdings nicht signifikant. Bcl2 kann zwar den programmierten Zelltod auf ver-

schiedenen Ebenen blockieren, aber es sind wesentlich mehr antiapoptotische als proapoptotische Bcl2-Moleküle notwendig, um den tödlichen Effekt aufzuheben (Bouillet et al. 1999, S. 1735-1738). Durch die fehlende Inhibition der Apoptose könnten zudem die nicht behobenen DNA-Schäden weiter existieren und in der nächsten Mitose nach Akkumulation von Folgeschäden den Zelltod einleiten.

Eine ebenfalls signifikante Hochregulation durch ionisierende Bestrahlung konnte im Rahmen dieser Arbeit auch von cysteine-dependent aspartate specific protease 3 (Caspase 3) in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Caspasen spielen bei der Apoptose eine wichtige Schlüsselrolle (Belka et al. 2003, S. 141-151). Durch Aktivierung der Caspasen-Signalkaskade wird eine lawinenartige Verstärkung des initialen Signals erreicht, wodurch die irreversible Zerstörung der Zelle eingeleitet wird. Caspasen sind Cysteinproteasen und werden nach ihrer Funktion in 3 Klassen eingeteilt, in die Initiatorcaspasen (Caspase 2, 9, 8, 10), die Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7) und die inflammatorischen Caspasen, die an der Zytokin-Aktivierung beteiligt sind (Strasser et al. 2000, S. 541-548). Caspase 3 gehört zur Klasse der Effektorcaspasen, die nach Aktivierung die Apoptose einleiten (Sagan et al. 2007, S. 753-767) und das Apoptoseprogramm induzieren (Dragovich et al. 1998, S. 3207-3213). Zudem können Caspasen durch proteolytische Spaltung auch antiapoptotische Proteine zu proapoptotischen Faktoren aktivieren. So kann Caspase 3 Bcl-xL zu einem Molekül mit Bax-ähnlicher Wirkung aktivieren (Adams und Cory 1998, S. 1322-1326). Im Rahmen dieser Arbeit konnte also die Hochregulation eines Schlüsselgens (Caspase 3) der Apoptose in bestrahlten Keratinozyten nachgewiesen werden. Wie oben erwähnt, wird die Endstrecke des apoptotischen Zelltods über die aktivierten Effektorcaspasen vermittelt, welche weitere Proteasensysteme aktivieren und so zur Zerstörung von lebenswichtigen Strukturen der Zelle führen (Lauber et al. 2003, S. 717-730). Durch das Zusammenspiel der proapoptotischen Bcl2-Moleküle und der Caspasen ohne ausreichende Gegenregulation durch antiapoptotische Moleküle wird also die irreversible Zerstörung der HaCaT-Zellen durch ionisierende Bestrahlung eingeleitet.

Auch beim E2F transcription factor 1 (E2F1) wurde in dieser Arbeit eine signifikante Hochregulation durch ionisierende Bestrahlung in HaCaT-Keratinozyten sichtbar. E2F1 gehört zur E2F-Familie, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des

Zellzyklus, sowie eine wichtige Rolle bei der p53-abhängigen und –unabhängigen Apoptose spielt (Müller und Helin 2000, M1-12). Auch E2F-1 ist an der Einleitung der strahleninduzierten Apoptose beteiligt. E2F-1-Überexpression durch ionisierende Bestrahlung führt zur Induktion der Apoptose (Shan und Lee 1994, S. 8166-8173; Shu et al. 2000, S. 16-21). Als weiteres Ergebnis dieser Untersuchung ergab sich eine ebenfalls signifikante Überexpression von TNF superfamily member 6 (TNFSF6) unter ionisierender Bestrahlung in HaCaT-Keratinocyten. TNFSF6 ist auch unter dem Namen Fasligand oder CD95L bekannt. CD95 und CD95L sind transmembranöse Proteine, werden in vielen verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert und sind in die Induktion der Apoptose involviert (Heinzelmann et al. 2006, S. 1248-1251). Erst kürzlich beschrieb eine Studie von Yang et al. (2006, S. 643-648), dass CD95L eine wichtige Rolle in der p53-unabhängigen strahleninduzierten Apoptose spielt. Seit kurzem ist auch bekannt, dass über dieses System eine Bestrahlungs-induzierte Pneumonitis bei Mäusen vermittelt werden kann (Heinzelmann et al. 2006, S. 1248-1251). Auch ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, TNFRSF10, welches auch u.a. unter den Namen Trail-R2, DR5 oder CD262 bekannt ist, kann unter ionisierender Bestrahlung ebenfalls zur Induktion von Apoptose führen, wie z. B. in *in vitro* Studien an Humane Leukämie-60 Zellen (HL-60) nachgewiesen werden konnte (Rezacova et al. 2005, S. 889-895). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals auch eine signifikante Hochregulation der proapoptotisch wirkenden Gene Growth Arrest and DNA damage-inducible gene 45A (GADD45A), PIG 8 oder Etoposide Induced 2.4 mRNA (EI24) und dem Tumorsuppressorgen Retinoblastoma 1 (RB1) (vgl. Daino et al. 2006, S. 458-469; Wendt et al. 2006, S. 972-980) unter ionisierender Bestrahlung in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Durch Bestrahlung mit 5 Gy kam es in dieser Untersuchung also vor allem zu einer Hochregulation von proapoptotischen Genen in Keratinocyten. Ohne ausreichende antiapoptotische Gegenregulation wird die irreversible Zerstörung der bestrahlten Keratinocyten eingeleitet.

Der einzige signifikant hochregulierte antiapoptotische Faktor in dieser Untersuchung war der „nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells“ NFκB1, dessen Aktivierung in vielen verschiedenen Zellsystemen vor diversen apoptotischen Stimuli (Miraglia et al. 2007, S. 2735-2744) schützt. In Übereinstimmung mit einer Studie von Baeuml et al. (1997, S. 127-142) und Jung und

Dritschilo (2001, S. 346-351) konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Induktion des Transkriptionsfaktors durch ionisierende Bestrahlung beschrieben werden. Damit zeigte sich, dass durch ionisierende Bestrahlung, die vor allem zu einer Hochregulation von zahlreichen proapoptotischen Genen in HaCaT-Zellen, also zur Induktion der Apoptose führt, auch NFκB signifikant hochreguliert wird und damit antiapoptotische Signalkaskaden durch Bestrahlung mit 5 Gy aktiviert werden. Diese Hochregulierung von NFκB wirkt zwar der Apoptose entgegen, allerdings überwiegt die signifikante Hochregulation von proapoptisch wirkenden Genen, was zu einer irreversiblen Zerstörung der bestrahlten HaCaT-Zellen führt. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass bei einer Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 5 Gy vor allem proapoptotisch wirkende Gene, die die Einleitung der Apoptose induzieren, hochreguliert werden.

5.3.1.2 MODULATION DER EXPRESSION APOPTOSE-RELEVANTER GENE IN HaCaT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS

Nach Auswertung des Human-1-Apoptosis GeArrays konnte festgestellt werden, dass sich unter Mastzelleinfluss eine signifikante Hochregulation ($p < 0,05$) von 11 Genen (BAD, BAX, BCL2, BCL2L2, BCL2L1, CASP1, CASP3, MYC, E2F1, TNFRSF6, TNFRSF10) in mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen zeigte. Im Apoptose-Gearray der unbestrahlten HaCaT-Zellen konnte dagegen keine eindeutig signifikante Veränderung der Genexpression unter HMC-1-Einfluss nachgewiesen werden.

Neben der Hochregulation von proapoptotisch wirkenden Genen (BAD, BAX, CASP1, CASP3, E2F1, TNFRSF6 und TNFRSF10) zeigte sich nach Bestrahlung mit 5 Gy unter Einfluss der Mastzellen eine starke Überexpression von Bcl2, Bcl2l2 (Bcl2-like 2, Bclw) und Bcl2l1 (Bcl2-like 1, Bclx). Bcl2, Bclw und Bclx gehören zu antiapoptotisch wirkenden Proteinen der Bcl2-Familie, die den programmierten Zelltod auf mitochondrialer Ebene regulieren. Sie verhindern dort den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie die assoziierte Freisetzung von proapoptotischen Molekülen aus dem Intermembranraum ins Zytosol, wo diese dann helfen, die Caspasenkaskade zu aktivieren (Du et al. 2000, S. 33-42; Verhagen et al. 2000, S. 43-53). Auffällig war in unserer Untersuchung, dass die Überexpression der antiapoptotischen Gene prozentual stärker war, im Vergleich zu den proapoptotischen Genen. Diese Beobachtung könnte zum Schluss

führen, dass Mastzellen nach Bestrahlung über die Aktivierung von Bcl2 inhibierend in die mitochondriale Apoptose eingreifen können und über Freisetzung von antiapoptotisch wirkenden Bcl2 die Caspasenaktivierung als Endstrecke des Apoptosesignalweges effizient inhibieren. Bcl2 kann den programmierten Zelltod auf verschiedenen Ebenen blockieren. Bcl2 und Bclx können durch Assoziation mit proapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie diese neutralisieren (Bouillet et al. 1999, S. 1735-1738). Eine verstärkte Expression, vor allem eine Überexpression von Bcl2 dagegen, kann die strahleninduzierte Apoptose sowie die mitochondriale Depolarisation fast vollständig hemmen (Chanan-Khan 2004, S. 21-24). An welcher Stelle Mastzellen in diese Signalkaskade eingreifen, ist bisher nicht bekannt und müsste in weiteren Studien untersucht werden. Bisher wurden allerdings nur wenige Arbeiten über Bcl2 zur Regulierung der Strahlensensitivität veröffentlicht. In einer Studie von Rehemtulla et al. (1999, S. 63-70) konnte an Bclx-überexprimierenden Jurkat-Zellen keine Verbesserung des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung festgestellt werden, dagegen konnte in einer Studie von Strasser et al. (1994, S. 329-339) eine erhöhte Radioresistenz in Bcl2-überexprimierenden Lymphom-Zellen aus p53-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Radioresistenz wurde auch in Ad.mda-7-(Adenoviral-mediated delivery of mda-7/IL-24) resistenten und Bcl2- und Bclx-überexprimierenden Prostatakarzinomzellen beschrieben (Su et al. 2006, S. 2339-2348). Dieser Weg könnte eine Erklärung für das in dieser Studie nachgewiesene erhöhte klonogene Überleben der HaCaT-Keratinocyten unter Bestrahlung und unter Mastzeleinfluss sein. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass Bcl2 allein nicht für diesen Effekt verantwortlich ist, denn in einigen Studien konnte an Mäusen gezeigt werden, dass Bcl2 allein ein schwach transformierendes Onkogen ist, dagegen in Kombination mit anderen Onkogenen, wie z.B. c-myc, starke synergistische Effekte in der Tumorgenese aufweist (Strasser et al. 1990, S. 331-333; Jäger et al. 1997, S. 1787-1795). Das Protoonkogen c-myc zeigte sich auch in unserer Untersuchung signifikant erhöht. C-myc ist für das normale Zellwachstum essentiell. Das Gen kann aber auch bei unregelmäßiger Expression als Onkogen wirken. Sowohl eine zu hohe als auch eine zu niedrige Expressionsrate von c-myc kann Apoptose hervorrufen (Sommer et al. 2003, S. 4266-4280). Bucci et al. (2005, S. 2756-2767) konnten nachweisen, dass eine Herunterregulation von c-myc zu einer höheren Radiosensitivität von Melanomzellen führte.

Im Genexpressionsarray unbestrahlter Keratinozyten konnte in dieser Arbeit keine eindeutige Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss der Mastzellen beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass Mastzellen erst durch Bestrahlung und über eine strahleninduzierte Veränderung der Zell-Zell-Kontakte zu einer verstärkten Degranulation induziert werden. An welcher Stelle Mastzellen in den Signalweg der strahleninduzierten Apoptose eingreifen, ist bisher nicht bekannt und müsste in weiteren Studien untersucht werden. Sicher ist, dass Mastzellen nicht nur über die Regulation der oben genannten Faktoren in das komplexe Netzwerk der strahleninduzierten Apoptose eingreifen (Meineke et al. 2003, S. 427-432; Müller et al. 2006b, S. 2735-2741).

5.3.2 MODULATION DER EXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND ZYTOKINEN IN HACAT-ZELLEN

Für viele Vorgänge, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Zellaggregation, die für die Bildung und Aufrechterhaltung funktionsfähiger Gewebe und Organe notwendig sind, spielt die Zelladhäsion eine zentrale Rolle. Diese wird im adulten Organismus, sowohl bei physiologischen (z.B. Wundheilung, Lymphozytenwanderung), als auch bei pathologischen (z.B. Tumorentstehung, Metastasierung) Prozessen moduliert (Hynes und Lander 1992, S. 303-322). Da somit Adhäsionsmoleküle und Zytokine eine wichtige Rolle in der kutanen Strahlenreaktion spielen (Müller und Meineke 2007, S. 96-104; Meineke et al. 2002a, S. 709-714) wurde auch der Einfluss von Mastzellen auf die Expression dieser Moleküle in Keratinozyten auf molekularer Ebene untersucht.

Als Ergebnis zeigte sich 30 min nach Bestrahlung der HaCaT-Zellen mit 5 Gy unter Mastzeleinfluss eine Erhöhung der Expression fast aller in Abbildung 24 dargestellten Gene. Eine signifikante Hochregulation ($p < 0,05$) fand sich dabei bei 3 Genen, beim Melanoma Cellular Adhesion Molecule (MCAM), $\alpha 4$ -Integrin und IL-3. MCAM, auch als CD146 oder MUC18 bezeichnet, ist ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulinsuperfamilie. Die MCAM-Expression wird in Melanomzellen, im cerebellären Kortex, in Trophoblasten, glatten Muskelzellen, aktivierten T-Zellen, Gefäßendothelzellen, Brustepithel und HaCaT-Keratinozyten gefunden (Weninger et al. 2000, S. 219-224). Eine Transfektion von MCAM in nichttumoröse Zellen

fürte zum Anstieg der Kollagenase-Genexpression und zum Ansteigen der Tumorigenität (Satyamoorthy et al. 2001, S. 4676-4684). MCAM spielt, wie auch andere Adhäsionsmoleküle- und -rezeptoren eine wichtige Rolle in der Tumorprogression, also in der Zell-Zell-Kommunikation für Wachstum, Überleben und Invasion von Melanomzellen und anderen malignen Zellen (Schön et al. 2005, S. 353-363). Daten über den Einfluss von ionisierender Bestrahlung und den Einfluss von Mastzellen auf die Expression von MCAM liegen bislang nicht vor. Bekannt ist, dass die MCAM-Expression von exogenen Faktoren wie Phorbol ester und cyclischem AMP moduliert und in Melanozyten, Nervenzellen und Melanomzellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit Keratinozyten reguliert werden kann (Li und Herlyn 2000, S. 163-169). Allerdings ist der Mechanismus der Regulation bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit zeigte sich, dass Mastzellen die MCAM-Expression unter Einfluss von ionisierender Bestrahlung in humanen Keratinozyten modulieren können und zu einer signifikanten Hochregulation von MCAM führen. Bisher ist wenig über die Expression von MCAM in Keratinozyten normaler und kranker Haut bekannt. Bekannt ist, dass MCAM beständig von Keratinozyten in Primärkultur exprimiert wird, in normaler Epidermis nicht nachgewiesen wird und vor allem in suprabasalen Keratinozyten bei entzündlichen Hauterkrankungen heraufreguliert wird (Weninger et al. 2000, S.). Besonders bei hyperproliferativen Hauterkrankungen wie Psoriasis, Lichen planus oder einer Akanthose der Epidermis konnte eine Induktion von MCAM nachgewiesen werden (Weninger et al. 2000, S. 219-224). Andererseits konnten Shih et al. (1997, S. 745-751) demonstrieren, dass eine Transfektion von MCAM in Brustkarzinomzellen zu einer Ausbildung von kleineren Tumoren in Mäusen, verglichen mit Kontrollen, führte und dass sich diese Tumoren kohäsiver und weniger infiltrativ zeigten. Daraus schlossen die Autoren, dass MCAM auch eine Rolle als ein Tumorsuppressor im Brust-Epithel spielen könnte. Ob dies auch für die Haut zutrifft, konnte bislang nicht geklärt werden.

Einerseits könnten die hier erzielten Ergebnisse wiederum eine Erklärung für die gesteigerte Proliferation und das Überleben der HaCaT-Zellen nach Bestrahlung unter Mastzeleinfluss sein, da MCAM besonders in hyperproliferativen Hauterkrankungen hochreguliert wird (Schön et al. 2005, S. 353-363), andererseits könnten Mastzellen über eine Induktion von MCAM auch eine wichtige Rolle bei der

Entstehung von Hauttumoren spielen. Ob Mastzellen allerdings durch diese Hochregulation zu verstärktem Tumorwachstum führen oder über eine Induktion von MCAM eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum ausüben können, müsste in weiteren Studien geklärt werden.

Eine starke, wenn auch nicht signifikante Hochregulation in bestrahlten Keratinozyten unter Mastzeleinfluss zeigte sich bei weiteren Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie, bei ICAM-1 und ICAM-3. Es gibt zahlreiche Studien darüber, dass sowohl UV- als auch ionisierende Strahlung die Expression von ICAM-1 beeinflussen können (Cai et al. 1996, S. 7-16; Hallahan und Virudachalam 1997, S. 6432-6437; Quarmby et al. 2000, S. 3375-3381). ICAM-1 wird durch ionisierende Bestrahlung verstärkt induziert (Meineke et al. 2002b, S. 577-583). Müller et al. (2006, S. 670-679) beschrieben eine Hochregulation von ICAM-1 auf mRNA- und Proteinebene in humanen Hautzellen nach Bestrahlung *in vivo* und *in vitro*.

ICAM-1 als ein zelltypspezifischer Mediator hat verschiedene Funktionen, dabei stehen zelluläre Interaktionen während der Immunantwort und bei Entzündungsvorgängen im Vordergrund. Nach Ackermann und Harvima (1998, S. 353-359) induzieren TNF α und Histamin bei Entzündungen der Haut ICAM-1, was auch ein wichtiger Initiator von Leukozyten/Keratinozyten-Interaktionen ist. Mastzellen psoriatischer und atopischer Dermatitispatienten sind TNF α positiv. Die Degranulation der Mastzellen ist mit einer ICAM-1-Expression in der Epidermis, also in Keratinozyten, assoziiert (Ackermann und Harvima 1998, S. 353-359). Auch in dieser Arbeit konnte eine Induktion von ICAM-1 durch Mastzellen und Bestrahlung nachgewiesen werden. In der Therapie der kutanen Strahlenreaktion könnte die Hochregulation von ICAM-1 aufgrund der Initiation einer Entzündungsreaktion nachteilig sein.

Für die Strahlentherapie wäre es aber wichtig, eine mögliche Herunterregulation der zellulären ICAM-1-Expression im Zusammenhang mit der Bestrahlung zu verhindern, um das Ablösen von Tumorzellen und damit vielleicht eine Metastasierung im Rahmen der Therapie zu vermeiden. In einer Arbeit von Maruo et al. (2002, S. 486-490), zeigte sich, dass eine Progredienz bzw. Metastasierung von

Magenkarzinomen mit einer Erhöhung des löslichen ICAM-1 im Serum einhergeht - was auch eine Herunterregulation auf zellulärer Ebene bedeuten könnte - und dieser Effekt auch durch ionisierende Strahlung erzielt wird. Deshalb müsste dieser durch Mastzellen ausgelöste Effekt in weiteren Studien kritisch überdacht und überprüft werden.

ICAM-3 spielt wie ICAM-1 eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von immunologischen Prozessen und interagiert wie ICAM-1 mit LFA1 (Song et al. 2005, S. 3366-3371). In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass ICAM-3 eine verstärkte Proliferation von Krebszellen induzieren kann (Kim et al. 2006, S. 103-110) sowie eine Überexpression von ICAM-3 mit einer erhöhten Radioresistenz in Zervixkarzinomzellen assoziiert ist (Chung et al. 2005, S. 194-201). ICAM-3 könnte daher ein Biomarker für die Radioresistenz in Zervixkarzinomzellen sein, die während einer Radiotherapie auftritt (Chung et al. 2005, S. 194-201). Über eine Expression von ICAM-3 in der Haut lagen bislang keine Studien vor. Sollten sich aber die o.g. Ergebnisse auch an HaCaT-Zellen bestätigen lassen, könnte eine Überexpression von ICAM-3 in der Haut zu einer erhöhten Radioresistenz der Keratinozyten führen und somit ein wichtiger Therapieansatz in der Behandlung der kutanen Strahlenreaktion sein. Allerdings könnte die Hochregulation von ICAM-3 aber auch zu einer Induktion von Hauttumoren führen. Weitere Studien an HaCaT-Zellen sind deshalb notwendig. Die in dieser Arbeit erstmals nachgewiesene ICAM-3-Hochregulation in HaCaT-Zellen könnte aber eine weitere Erklärung für die verstärkte Proliferation der Keratinozyten sowie eine Erklärung für die Erhöhung der Radioresistenz der Keratinozyten unter Mastzeleinfluss sein.

In dieser Arbeit konnte auch eine signifikante Hochregulation des α 4-Integrins und eine starke, aber nicht signifikante Hochregulation von β 1-Integrin, α V-Integrin, α 1-Integrin, α 3-Integrin und α 2 β 1-Integrin in Keratinozyten nach Bestrahlung mit 5 Gy unter Mastzeleinfluss nachgewiesen werden. Wie bereits in Kapitel 2.7.1 erwähnt, können Integrine die Zellaktivität, Proliferation und Apoptose entscheidend mitbeeinflussen (Lewis et al. 2002, S. 3627-3632) und sind auch in eine Vielzahl pathologischer Prozesse involviert. Allerdings gibt es eine große Anzahl von Studien, die sowohl positive als auch negative Korrelationen zwischen Tumor-

progression, -wachstum, -resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen und Integrinexpression darstellen und nach wie vor werden bereits vorhandene und neu gewonnene Ergebnisse kontrovers diskutiert. So wiesen Grzesiak et al. (2007, S. 804-814) beispielsweise nach, dass eine $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 6\beta 1$ -Integrin-vermittelte Adhäsion von Laminin-1 zu einer Hochregulation von CXCR4 und IL-8 in Pankreas-Karzinom-Zellen führt und damit die Ausbildung eines maligneren Phänotyps in Pankreas-Krebs-Zellen und die Metastasierung des Pankreaszellkarzinoms fördert, während Schirner et al. (1998, S. 427-435) sogar einen entgegengesetzten Befund zur Abhängigkeit einer Metastasierung von der Integrinexpression beschrieben. Sie wiesen nach, dass bei höherer $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Expression in einem tierischen Metastasierungsmodell der Lunge weniger menschliche Kolonkarzinomzellen (HT-29) zirkulierten. Eine Erklärung für diese kontroversen Befunde könnte zum einen auf der großen Heterogenität der Tumoren beruhen, zum anderen darauf, dass Änderungen im Expressionsniveau einzelner Integrin-Untereinheiten immer vor dem Hintergrund der Expression aller Integrine gesehen werden müssen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass verschiedene Integrine für die Initiierung einer Fibronectinmatrix verantwortlich sind (Wu et al. 1996, S. 149-158).

Bekannt ist, dass ionisierende Strahlung an verschiedenen Punkten in die zytoplasmatischen Signalkaskaden der Integrine eingreifen kann (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344). Ionisierende Strahlung kann zu einer signifikanten Hochregulation der Expression von $\beta 1$ -, $\beta 3$ - und $\alpha 5$ -Integrin an der Zelloberfläche von COLO-320-Zellen nach 48 bis zu 96 Stunden führen (Meineke et al. 2002a, S. 709-714). Dieser Effekt zeigte sich immer Dosis- und Matrix-abhängig. Auch in HaCaT-Zellen zeigte sich nach einer Bestrahlung mit 5 Gy eine Hochregulation des Integrins $\beta 1$ (Meineke et al. 2004, S. 102-108). Über den Einfluss von Mastzellen auf die Integrinexpression in Keratinozyten unter ionisierender Bestrahlung lagen bislang keine Studien vor.

In dieser Arbeit konnte durch den Einfluss von Mastzellen eine Hochregulation von zahlreichen Integrinen 30 min nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 5 Gy gezeigt werden. In Keratinozyten oder anderen normalen Zellen könnte dieser Effekt zu einer erhöhten Radioresistenz und Proliferation der Zellen führen, was eventu-

ell ein wichtiger Therapieansatz in der Behandlung der kutanen Strahlenreaktion sein könnte. Allerdings müssten diese Ergebnisse nochmals in der Anwesenheit von z.B. Fibronectin überprüft und validiert werden, da die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrixproteine neben Zellverhalten und Zellentwicklung auch ein erhöhtes Zellüberleben nach Bestrahlung im Sinne einer zelladhäsionsbedingten Radioresistenz vermittelt (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344; Cordes und Meineke 2004, S. 327-337). Dies gilt sowohl für normale Zellen als auch für transformierte Zellen, wobei die Integrin-vermittelte Signaltransduktion eine essentielle Rolle spielt (Cordes und Meineke 2003, S. 337-344; Cordes und Meineke 2004, S. 327-337). Von Cordes und Meineke (2003, S. 337-344) wurde für diesen überlebensfördernden Einfluss der Integrin-vermittelten Zell-EZM-Interaktionen nach Exposition mit ionisierender Strahlung der Begriff der „cell adhesion-mediated radio resistance“ (CAM-RR) geprägt. Durch die Anwesenheit von EZM könnte eine bessere Simulation des physiologischen Milieus bei *in vitro* Studien erzielt werden.

Ein kontroverser Befund zeigt sich auch in dieser Arbeit. Auf mRNA-Ebene konnte unter Mastzeleinfluss nach Bestrahlung mit 5 Gy eine Hochregulation der Integrine gezeigt werden, während auf Proteinebene nach Bestrahlung eine Herunterregulation von $\beta 1$ -Integrin und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin beobachtet wurde. Eine Erklärung dafür könnten die unterschiedlich gewählten Zeitpunkte der Untersuchungen oder unterschiedliche experimentelle Bedingungen sein.

Eine signifikante Hochregulation unter Einfluss der Mastzellen nach Bestrahlung mit 5 Gy zeigte sich auch bei dem Zytokin Interleukin-3. Das Glykoprotein ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der von T-Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen, Granulozyten und Mastzellen sezerniert wird und ähnlich wie GM-CSF Überleben, Proliferation und Differenzierung der unterschiedlichen blutbildenden Zell-Linien fördert (Möller et al. 1998, S. 289-295; Sigounas et al. 1997, S. 141-147). Für die murine Mastzelle gilt IL-3 als ein wesentlicher Wachstumsfaktor. IL-3 beeinflusst auch Immun- und Entzündungsreaktionen und verstärkt die Mediatorfreisetzung aus Eosinophilen und Basophilen (Brunner et al. 1993, S. 605-611). Rhesusaffen z.B. reagierten auf IL-3-Injektionen mit einem generalisierten Hautausschlag, histologisch fielen zahlreiche Mastzellen auf (Volc-Platzer et al. 1991, S. 557-566). Zytokine wie IL-3, die von T-Zellen in psoriatischen Läsionen freige-

setzt wurden, führten zu einer Induktion der Keratinozyten-Proliferation (Strange et al. 1993, S. 695-700). Die Induktion der IL-3-Expression in dieser Arbeit durch Mastzellen könnte ebenfalls eine Erklärung für die gesteigerte Proliferation von Keratinozyten unter ionisierender Bestrahlung sein. Allerdings wird durch eine gesteigerte IL-3-Produktion auch die Entzündungsreaktion in der Haut verstärkt, was sich in der Pathogenese der kutanen Strahlenreaktion nachteilig auswirken könnte.

Interessanterweise zeigten in dieser Arbeit unbestrahlte HaCaT-Zellen unter Mastzelleinfluss fast keine Veränderungen in der Genexpression. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass eine Mastzelldegranulation erst durch ionisierende Bestrahlung induziert wird, da ja auch bekannt ist, dass Mastzellen durch exogene Faktoren wie z.B. ionisierende Bestrahlung aktiviert werden können (Lowman et al. 1988, S. 590-597). Die Ergebnisse aus den Genexpressionsanalysen zeigen, dass Mastzellen über die Modulation von zahlreichen apoptoserelevanten Genen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen in Keratinozyten in der Akutphase der kutanen Strahlenreaktion eine wichtige Rolle spielen. Durch Hochregulation der Genexpression vor allem antiapoptotischer Gene, sowie von zahlreichen Adhäsionsmolekülen in bestrahlten HaCaT-Zellen könnten Mastzellen daher auch als Akuttherapie nach Strahlenschädigung der Haut eingesetzt werden.

5.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE

Anhand der Ergebnisse aus den oben beschriebenen GeArrays wurden für die immunhistochemischen Färbungen Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren ausgewählt, die wichtige Regulatoren des Zellwachstums, der Differenzierung, der Morphogenese, Adhäsion, Immunantwort und Apoptose für Keratinozyten darstellen. Anhand der Färbungen sollte der Einfluss von Mastzellen auf die Proteinexpression von EGF, EGFR, $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, $\beta 1$ -Integrin, $TNF\alpha$ und $TGF\beta_1$ in bestrahlten und unbestrahlten HaCaT-Zellen untersucht werden.

5.4.1 STRAHLENINDUZIERTE MODULATION DES EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) IN HACAT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei den mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen jeweils unter dem Einfluss von Mastzellen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine schwächere Anfärbung der HaCaT-Zellen, also eine geringere EGF-Expression in Keratinozyten unter Mastzelleinfluss. Lokalisiert war EGF ohne Einfluss der Mastzellen vor allem im Zytoplasma der HaCaT-Zellen, während unter Einfluss der Mastzellen die EGF-Expression an den Zellmembranen der Keratinozyten verstärkt war. Die maximale Expression von EGF zeigte sich 360 min nach Bestrahlung in beiden Versuchsreihen. Bisher gab es keine Studien, die den Einfluss von Mastzellen auf die EGF-Expression von bestrahlten Keratinozyten untersucht haben.

EGF ist ein Polypeptid mit 53 Aminosäuren und in vielen Säugetier-Spezies vertreten. EGF gehört zu den Wachstumsfaktoren, die das Potential besitzen, den Heilungsprozess beschleunigen zu können (Nimni 1997, S. 1201-1225). Es wurde bisher in verschiedenen Studien gezeigt, dass EGF die Keratinozytenteilungen *in vitro* stimuliert und die epidermale Regeneration *in vivo* fördert (Schultz et al. 1987, S. 350-352). Weitere Studien (Shirakata et al. 2005, S. 2363-2370; Hashimoto 2000, S. 46-50) belegten, dass die Mitglieder der Epidermal Growth Factor Familie die wichtigsten Wachstumsfaktoren sind, die die Epithelialisation während der kutanen Wundheilung beeinflussen. Shirakata et al. konnten 2005 nachweisen, dass Heparin-binding EGF-like Growth factor (HB-EGF), ein Mitglied der EGF-Familie, die Keratinozyten-Migration, die Proliferation der Keratinozyten und die kutane Wundheilung beschleunigt. Zuletzt konnte S100A11, ein kleines Protein, das von humanen Chondrozyten produziert wird, als Trigger für die Produktion von EGF und somit als Mediator für die Regulation des Wachstums von humanen Keratinozyten nachgewiesen werden (Sakaguchi et al. 2008, S. 78-85). Da EGF ein potenter Wachstumsfaktor für Keratinozyten ist, spricht die schwächere EGF-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen unter Mastzelleinfluss auf Proteinebene nicht dafür, dass Mastzellen die Proliferation und das Überleben von humanen Keratinozyten in der kutanen Strahlenreaktion über eine Modulation von EGF beeinflussen. In unbestrahlten Keratinozyten zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung, wie auch im Genexpressionsarray, eine

Herunterregulation von EGF. Nach Bestrahlung mit 5 Gy konnte unter Mastzelleinfluss jedoch im GeArray eine nicht signifikante Hochregulation von EGF in HaCaT-Zellen, im Gegensatz zu den immunhistochemischen Ergebnissen, nachgewiesen werden. Die EGF-Expression in Keratinozyten unter Einfluss von Mastzellen scheint also sehr zeit- und bestrahlungsabhängig zu sein. Eine weitere Erklärung für die kontroversen Befunde könnten unterschiedliche experimentelle Bedingungen und unterschiedlich gewählte Zeitpunkte der Untersuchungen sein.

5.4.2 STRAHLENINDUZIERTE MODULATION DES EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) IN HACAT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS

In der vorliegenden Arbeit konnte der EGF-Rezeptor zu allen untersuchten Zeitpunkten in mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Eine maximale Expression konnte 6 Stunden nach Bestrahlung mit 5 Gy nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich unter Einfluss der Mastzellen eine deutlich schwächere Expression des EGF-Rezeptors in den HaCaT-Zellen. Ohne Anwesenheit von Mastzellen war EGFR vor allem im Zytoplasma der HaCaT-Zellen, mit Einfluss der Mastzellen vor allem an den Zellmembranen der Keratinozyten zu sehen.

Der EGF-Rezeptor wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert und bindet über seine extrazelluläre Domäne den Epidermal Growth Factor, den Transforming Growth Factor α und den Vaccinia Virus Growth (VGF). Die vom EGF-Rezeptor gesteuerten Signalwege spielen auch eine Rolle bei der Transformation, der Proliferation und bei der Apoptose (Quesnelle et al. 2007, S. 311-319). Die Keratinozytenmigration in der kutanen Wundheilung ist ebenfalls von den vom EGF-Rezeptor gesteuerten Signalwegen abhängig. Ein Fehlen von EGFR führt zu einer verzögerten Reepithelialisierung und einer fehlerhaften Migration der Keratinozyten (Koivisto et al. 2006, S. 2791-2805; Tokumaru 2000, S. 209-220). Bekannt ist auch, dass der EGF-Rezeptor in Lungen-, Mamma-, Ösophagus-, und Blasenkarzinomen sowie epithelialen Karzinomen überexprimiert wird (Shepard et al. 2008, S. 3574-3581; Tan et al. 2009, S. 31; Katzel et al. 2009, S. 2). In einer Studie von El-Abaseri et al. (2006, S. 225-231) zeigte sich, dass über UV-Strahlung der EGF-Rezeptor aktiviert wird, was für die UV-vermittelte Induktion zur Entstehung von einigen epithelialen Tumoren kausal ist. Der Einfluss von ionisie-

render Strahlung auf die Expression des EGF-Rezeptors *in vivo* und *in vitro* in humanen epidermalen Keratinozyten wurde bereits in einer Studie von Peter et al. (1993, S. 65-70) untersucht. In dieser Studie konnte ein Ansteigen der Expression von EGFR 24 h nach Bestrahlung mit 4 und 6 Gy, mit einer weiteren Steigerung nach 48 Stunden, nachgewiesen werden. Eine gesteigerte EGF-Rezeptorexpression kann noch Jahre nach einer akzidentiellen Überexposition mit ionisierenden Strahlen nachgewiesen werden. Dies könnte eine mögliche Ursache für die Induktion von Strahlenkeratosen und einen möglichen Kofaktor für eine maligne Transformation darstellen (Peter et al. 1993, S. 65-70). Aufgrund dieser Studie darf postuliert werden, dass es möglich wäre, dass Mastzellen durch eine Herunterregulation der strahleninduzierten Expression des EGF-Rezeptors in Keratinozyten auch in der Langzeitperspektive einen positiven Einfluss auf den Verlauf der kutanen Strahlenreaktion ausüben. Andererseits könnte eine Herunterregulation von EGFR zu einer fehlerhaften Keratinozytenmigration, zu einer verzögerten Reepithelialisierung und so zu einer beeinträchtigten Wundheilung in der Haut führen.

Im Genexpressionsarray konnte keine Veränderung in der Genexpression der Keratinozyten unter Mastzeleinfluss nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die strahleninduzierte EGFR-Expression in Keratinozyten sehr zeitabhängig zu sein scheint. Wie auch in der Studie von Peter et al. (1993) war ein Ansteigen der Expression von EGFR erst einige Stunden nach Bestrahlung festzustellen. Für die EGFR-Expression im Genexpressionsarray im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde, den Ergebnissen der Studie von Peter et al. folgend, das Zeitfenster (30 min nach Bestrahlung) zu früh gewählt.

Eine Hochregulation von EGFR in unbestrahlten Keratinozyten unter Mastzeleinfluss konnte dagegen in der immunhistochemischen Kontrolle, sowie im Genexpressionsarray nachgewiesen werden. Es darf auch hier angenommen werden, dass über eine Hochregulation von EGFR in unbestrahlten Keratinozyten Mastzellen einen positiven Einfluss auf die Proliferation, Reepithelialisierung und Migration der Keratinozyten haben.

5.4.3 STRAHLENINDUZIERTE MODULATION VON BETA1-INTEGRIN UND ALPHA2 BETA1-INTEGRIN IN HaCaT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS

Für die vorliegende Untersuchung wurden das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (CD49b) und das $\beta 1$ -Integrin (CD29) ausgewählt. Unter Einfluss der Mastzellen fand sich gleich nach Bestrahlung, sowie 1, 3, und 6 Stunden nach Bestrahlung eine schwächere $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Expression in HaCaT-Zellen. Nach 12 Stunden konnte kein Unterschied mehr in der Expression von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin unter Mastzelleinfluss festgestellt werden. Die maximale Signalintensität von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin in den HaCaT-Zellen zeigte sich 3 Stunden nach Bestrahlung mit 5 Gy.

Unter Mastzelleinfluss konnte ebenfalls eine schwächere Expression des $\beta 1$ -Integrins in mit 5 Gy bestrahlten HaCaT-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden. Drei und sechs Stunden nach Bestrahlung konnte in beiden Versuchsreihen die maximale Expression von $\beta 1$ -Integrin festgestellt werden, wobei sich nach 12 Stunden bereits wieder eine deutliche Abnahme der Expressionsstärke des Integrins zeigte. Wie auch in den oben beschriebenen Färbungen mit EGF und EGFR konnte auch hier - bei beiden Integrinen - unter Mastzelleinfluss eine stärkere Anfärbung der Zellmembranen als des Zytoplasmas der Keratinozyten beobachtet werden.

Während der Wundheilung der Haut oder einer Karzinom-Invasion der Haut, können Änderungen der extrazellulären Matrix zur Anoikis (Sonderform der Apoptose aufgrund des Verlustes der Zelladhäsion) von epithelialen Zellen und zu einer Störung der Rezeptor-Matrix-Interaktionen führen (Manohar et al. 2004, S. 4043-4054). Laminin-5 ist der Hauptligand für die Keratinozyten-Adhäsion in der Epidermis, der das Überleben der Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* fördert. $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und $\alpha 6\beta 4$ -Integrin sind die Hauptrezeptoren für Laminin-5 (Manohar et al. 2004, S. 4043-4054). Für Keratinozyten sind $\beta 1$ -Integrine von besonderer Bedeutung. So kann ein Mangel an $\beta 1$ -Integrinexpression dazu führen, dass die Keratinozytenausdifferenzierung gestört ist (Bagutti et al. 2001, S. 321-333). Die zytoplasmatische Domäne von $\beta 1$ -Integrin bindet eine große Vielzahl von Signal- und Struktur-Proteinen, wie die „Integrin-Linked-Kinase“ (ILK) und die „Fokale Adhäsions Kinase“, sowie Paxillin und α -Actinin (Cordes 2004, S. 5683-5692).

Kollagen bindende Integrine spielen ebenso eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel im Rahmen entzündlicher Reaktionen (Quarby et al. 1999, S. 385-395). Hierbei sind die $\beta 1$ -Integrine bei den kaskadenartigen Ereignissen des "Rollings" essentiell, des Anhaftens von Leukozyten und schließlich der Diapedese durch die Gefäßwand (Quarby et al. 1999, S. 385-395 und 2000, S. 3375-3381). Die Rolle des $\beta 1$ -Integrins in der Onkologie wird durch Daten von Masumoto et al. (1999, S. 68-74) und Arao et al. (2000, S. 129-137) unterstrichen. Beide Forschungsgruppen konnten zeigen, dass das Einwandern von Krebszellen in die extrazelluläre Matrix entscheidend durch das $\beta 1$ -Integrin mitvermittelt wird. Grzesiak et al. (2007, S. 804-814) wiesen nach, dass eine $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 3\beta 1$ - und $\alpha 6\beta 1$ -Integrin-vermittelte Adhäsion von Laminin-1 zu einer Hochregulation von CXCR4 und IL-8 in Pankreas-Karzinom-Zellen führt und damit die Ausbildung eines maligneren Phänotyps in Pankreas-Krebs-Zellen fördert. Diese Integrin-vermittelte Laminin-1 Adhäsion spielt auch eine wichtige Rolle bei der Metastasierung des Pankreaszellkarzinoms. Wichtige sekundäre Mechanismen, wie eine Metastasierung können also auch durch Integrine beeinflusst werden (Ura et al. 1998, S. 1001-1006). Bekannt ist auch, dass ionisierende Strahlung einen Einfluss auf die Expression von Integrinen haben kann (Handschele et al. 1999, S. 475-481). Integrin-vermittelte Adhäsion der Zellen auf Proteine der Extrazellulärmatrix können die Zellantwort auf ionisierende Bestrahlung *in vitro* modulieren. Dieser Mechanismus könnte zumindest teilweise ursächlich für bestrahlungs- und chemoresistente Phänotypen bei Tumorzellen sein (Sandfort et al. 2007, S. 1-6). Von Cordes und Meineke (2003, S. 337-344) wurde bei humanen Tumorzellen und normalen Zellen, auch bei HaCaT-Zellen, *in vitro* nachgewiesen, dass bestrahlte Zellen in der Anwesenheit von Fibronectin einen signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der Expression des $\beta 1$ -Integrins an der Zelloberfläche zeigen und es somit zu einer bestrahlungsabhängigen Verstärkung der Zelladhäsion an Fibronectin und einer Verbesserung des Überlebens der Zellen kommt. In humanen Lungentumor-Zelllinien (A549 und SKMES1) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass ionisierende Bestrahlung die Expression von $\beta 1$ -Integrin und der Integrin-Linked Kinase induziert (Cordes und Meineke 2003, 337-344). Erst kürzlich wurde aufgezeigt, dass eine Unterbrechung der Interaktionen von Caveolin-1, einem integralen transmembranösen Protein, mit $\beta 1$ -Integrin und der fokalen Adhäsionskinase das Überleben und die Proliferation von Pankreaskarzi-

nomzellen beeinflussen können und die Tumorzellen dadurch radiosensitiver wurden (Cordes et al. 2007, S. 6851-6862). Meineke et al. (2004, S. 102-108) wiesen auch eine Hochregulation von β 1-Integrin in HaCaT-Zellen und in einem Hautmodell nach einer Bestrahlung mit 5 Gy nach.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Nachweis einer Modulation von β 1-Integrin und α 2 β 1-Integrin auf Proteinebene durch Mastzellen in bestrahlten Keratinozyten erbracht werden. Durch Inhibition dieser Integrine in Keratinozyten durch Mastzellen, könnten eine Reihe von pathogenetischen Faktoren und Nebenwirkungen in der Haut, die durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden, durch Mastzellen positiv beeinflusst werden. So könnte eine Herunterregulation von Kollagen bindenden Integrinen, die eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel im Rahmen entzündlicher Reaktionen (Quarby et al. 1999, S. 385-395) spielen, zu einer geringeren entzündlichen Reaktion in der Haut durch ionisierende Strahlung führen. Andererseits kann sich eine Inhibition der Integrine durch Mastzellen auch negativ auswirken. Eine Herunterregulation von β 1-Integrin würde die Keratinozytenausdifferenzierung in bestrahlter Haut und die Zelladhäsion an die EZM stören. Eine Inhibition der Zelladhäsion an Fibronektin könnte zu einem geringeren Überleben der Keratinozyten, also zu einer Erhöhung der Strahlensensitivität der Keratinozyten führen. Dieses Ergebnis zeigt sich also widersprüchlich zu der Steigerung der Proliferation und des Überlebens der HaCaT-Zellen durch Mastzellen in den Wachstumskurven und den Klonierungstests. In den Genexpressionsanalysen konnte dagegen eine deutliche Hochregulation von α 2 β 1-Integrin und β 1-Integrin in HaCaT-Zellen unter Mastzelleneinfluss festgestellt werden. Eine Hochregulation dieser Integrine in der Akutphase der kutanen Strahlenreaktion wiederum könnte durch verstärkte Zelladhäsion an Fibronektin zu einem gesteigerten Überleben, zu einer höheren Proliferation und somit zu einer höheren Strahlenresistenz der HaCaT-Keratinozyten führen. Hier scheint der Zeitfaktor wieder eine bedeutende Rolle zu spielen. Aufgrund dieser Ergebnisse scheinen Mastzellen kurz nach Bestrahlung vor allem eine radioprotektive Wirkung auf Keratinozyten auszuüben, während einige Stunden nach Bestrahlung die Verringerung einer entzündlichen Reaktion im Vordergrund zu stehen scheint.

Sollte sich eine geringere Integrinexpression durch Mastzelleinfluss auch in Tumorzellen nachweisen lassen, könnten Mastzellen eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese spielen. Durch Herunterregulation der untersuchten Integrine, könnten Mastzellen z.B. eine Einwanderung von Krebszellen in die EZM inhibieren und somit eine Metastasierung verhindern. Inhibition der Integrine könnte zur Erhöhung der Radiosensitivität von Tumorzellen führen, was einen wichtigen Faktor für die Strahlentherapie von Tumoren darstellt; aber eine schwächere Expression von Integrinen könnte dagegen auch zu einem Loslösen der Zellen und damit zu einer Metastasierung führen. Zudem scheinen Mastzellen vor allem in der Akutphase der Strahlenreaktion eine radioprotektive Rolle zu spielen, was für eine strahlentherapeutische Behandlung von Tumoren ebenfalls von Nachteil wäre. Die Wirkung der Integrine und eine Modulation durch Mastzellen sollte also kritisch überdacht und überprüft werden. Natürlich gilt es dabei, eine Vielzahl von anderen Faktoren und Wechselwirkungen zusätzlich zu berücksichtigen. Wechselwirkungen, die über eine gestörte Integrin-Signaltransduktion pathologische Prozesse, inklusive einer Tumorangiogenese und Tumoringression beeinflussen (Hannigan und Dedhar 1997, S. 35-44).

5.4.4 STRAHLENINDUZIERTER MODULATION VON $TNF\alpha$ UND $TGF\beta_1$ IN HACAT-ZELLEN UNTER MASTZELLEINFLUSS

Obwohl bekannt ist, dass $TNF\alpha$ und $TGF\beta_1$ in HaCaT-Zellen auf Proteinebene exprimiert werden (Xia et al. 2008, S. 730-734; Cho et al. 2004, S. 853-858), konnten im Rahmen dieser Arbeit diese Zytokine immunhistochemisch trotz verschiedener Antikörperverdünnungen nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnten methodische Fehler, zu hohe Antikörperverdünnungen, die verwendeten Antikörper oder die gewählten Zeitpunkte der Untersuchungen sein. Im Gegensatz dazu konnten $TNF\alpha$ und $TGF\beta_1$ auf mRNA-Ebene im Genexpressionsarray in den HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich bei $TNF\alpha$ keine Veränderung der Genexpression unter Mastzelleinfluss. Das bedeutet, dass Mastzellen zum Zeitpunkt der Untersuchung auf die Expression von $TNF\alpha$ in HaCaT-Zellen keinen Einfluss hatten. Analog dazu konnten Müller et al. (2006, S. 670-679) keine Veränderung der $TNF\alpha$ -Expression auf mRNA- und Proteinebene in humanen Hautzellen nach Bestrahlung nachweisen.

Dagegen konnte im GeArray eine nicht signifikante Hochregulation von TGF β_1 in HaCaT-Zellen unter Mastzelleinfluss beobachtet werden. TGF β ist ein potenter parakrin und autokrin wirkender Regulator von Zellwachstum, Differenzierung, Morphogenese, Adhäsion, Angiogenese, Chemotaxis, Apoptose und Immunantwort (Bonewald 1999, S. 33-44). In epithelialen und mesenchymalen Zellen stimuliert TGF β die Synthese von Integrinen und ist in seiner aktiven Form für neutrophile Zellen und Makrophagen chemotaktisch (Frank et al. 1996, S. 10188–10193). Eine ansteigende TGF β -Immunreaktivität und Mastzellhyperplasie im Bindegewebe werden gleichermaßen für die akute und späte Reaktion des normalen enteralen Gewebes nach Bestrahlung verantwortlich gemacht (Richter et al. 1997, S. 187-195). Auch in normaler Haut sollen die Co-Expression von TNF α und TGF β_1 an der akuten Strahlenreaktion beteiligt sein (Vozenin-Brotans et al. 1999, S. 332-337). Nach Bestrahlung von Lungenfibroblasten der Ratte mit 4 Gy konnte in ELISA-Untersuchungen eine Erhöhung des TGF β_1 -Spiegels um 60 % nachgewiesen werden. TGF β_1 scheint deshalb eine wichtige Rolle bei der Auslösung der strahlenbedingten Inhibition der Zellproliferation von Ratten-Lungenfibroblasten zu spielen (Hakenjos et al. 2000, S. 503-509). Durch Strahlenexposition soll es zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Entzündungszellen kommen, was wiederum zu einer Induktion der TGF β -Produktion in der humanen Haut führt (Herskind et al. 1998, S. 12-15). Andere Studien gehen davon aus, dass ionisierende Strahlung direkt die Genexpression von fibrogenen Zytokinen, wie z.B. TGF β , über eine AP1-Induktion stimuliert (Rodemann und Bamberg 1995, S. 83-90). Eine Prämedikation mit IL-1 und TNF α konnte Mäuse vor letalen hämatopoetischen Schäden, die durch ionisierende Bestrahlung verursacht wurden, schützen. Durch Gabe von TGF β dagegen wurden die Mäuse für radioaktive Schäden sensibilisiert (Neta 1997, S.1463-1465).

In der vorliegenden Arbeit konnte lediglich im Genexpressionsarray eine leichte Hochregulation von TGF β_1 in HaCaT-Zellen unter Mastzelleinfluss nachgewiesen werden. Durch eine Hochregulation von TGF β_1 unter Mastzelleinfluss könnte in Keratinozyten die Synthese von Integrinen stimuliert werden, was wiederum zu einer verstärkten Zelladhäsion an Fibronectin und zu einem gesteigerten Überleben, also zu einer höheren Strahlenresistenz der HaCaT-Keratinozyten führen könnte. Andererseits könnten Mastzellen durch die Hochregulation von TGF β_1 zu

einer erhöhten Produktion und Induktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie zu einer höheren Strahlensensitivität der Keratinozyten führen, was für die Pathogenese der kutanen Strahlenreaktion nachteilig wäre. Um auch eine Aussage über den Einfluss der Mastzellen auf eine TGF β_1 -Proteinexpression in HaCaT-Zellen treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen (z.B. Western Blot, Elisa etc.) durchgeführt werden.

5.5 AUSBLICK

Die Untersuchungen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass Mastzellen die strahleninduzierte zelluläre Antwort in humanen Keratinozyten modulieren. Erstmals konnte aufgezeigt werden, dass Mastzellen die Proliferation und das Überleben, somit die Radioresistenz bestrahlter Keratinozyten steigern können. Auf Protein- und mRNA-Ebene konnte eine Modulation zahlreicher wichtiger Schlüsselproteine der Apoptose und der Zelladhäsion in bestrahlten Keratinozyten durch Mastzellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass Mastzellen in der Pathogenese der kutanen Strahlenreaktion eine wichtige Rolle spielen.

Im Gegensatz zu bisherigen Studien, die lediglich Einzelkulturen betrachteten und diese zu einzelnen Zeitpunkten mit Einzeldosen bestrahlten, wurden hier Keratinozyten in Kokultur mit Mastzellen dem Strahleneffekt unterschiedlicher Dosen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgesetzt. So konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Zeit und Dosis eine entscheidende Rolle bei der Mastzellwirkung auf bestrahlte Keratinozyten spielen. Für diese Effekte sind intakte Mastzellen und eine definierte Mastzellkonzentration erforderlich. Um für die Untersuchungen eine bessere Simulation des physiologischen *in vivo* Milieus erzielen zu können, war es notwendig, ein eigenes multiparametrisches Kokulturmodell anzuwenden. Zur Sicherung der vorliegenden Ergebnisse sollten dennoch weitere experimentelle Studien an Keratinozyten auch im Beisein einer extrazellulären Matrix (z. B. Fibronectin) durchgeführt werden. Dadurch wäre eine noch bessere *in vivo* Simulation bei *in vitro* Studien zu erwarten.

Als weiteres Ergebnis zeigte sich eine Änderung der Genexpression in Keratinozyten durch Mastzellen vor allem unter Einfluss von ionisierender Strahlung, während sich die Genexpression in unbestrahlten Keratinozyten durch Mast-

zelleinfluss kaum veränderte. Deshalb erscheint es angebracht, in weiteren Studien nicht nur die Interaktion zwischen Keratinozyten und Mastzellen zu untersuchen, sondern den Einfluss ionisierender Strahlung auf dermale Mastzellen eigens zu untersuchen. Bislang ist nur der Mechanismus der Aktivierung von Mastzellen in der Haut durch UV-Strahlung vollends bekannt.

In der Behandlung der akuten und chronischen Radiodermatitis könnten Mastzellen zu einem bedeutenden Therapiefaktor werden. Derzeit zählen Glukokortikoide und Antiphlogistika zu den Standardverfahren der Behandlung, die zwar akute Linderung bringen, meistens jedoch einen Übergang in ein chronisches Krankheitsstadium nicht verhindern können. Als Folge entstehen nach einer Latenzzeit von zwei bis zehn Jahren Röntgenfibrosen, Keratosen und Ulzera, die oft Vorboten eines Röntgenkarzinoms sein können. Offene Ulzera und Exzisionen von Karzinomen stellen für den Patienten eine große Belastung dar und sind schwierig zu behandeln. Deshalb ist die Einschätzung von Spätfolgen der kutanen Strahlenreaktion von besonderer klinischer Relevanz. Inwieweit Mastzellen auch bei der Behandlung der chronischen Radiodermatitis eine therapeutisch wirksame Rolle spielen könnten, bedarf daher weiterer Untersuchung. Bisher wurde Mastzellen eine Rolle bei der Entstehung fibrotischer Krankheiten zugewiesen. Durch eine indirekte oder direkte Stimulierung der fibroblastären Kollagensynthese sollen Mastzellen an der Fibroseentwicklung beteiligt sein (Levi-Schaffer und Piliponsky 2003, S. 158-161). In welchem Umfang aktivierte Mastzellen an fibrotischen Umbauvorgängen beim Menschen beteiligt sind, ist bislang noch wenig erforscht. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint es möglich, dass Mastzellen auch *in vivo* bis zu einem Dosisbereich von 5 Gy einen positiven Einfluss in Bezug auf den Verlauf der kutanen Strahlenreaktion auf bestrahlte Keratinozyten ausüben. Um eine Aussage über den Einfluss von Mastzellen auf Fibroblastenüberleben und -proliferation, somit auch auf Spätfolgen der kutanen Strahlenreaktion treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen mit Fibroblasten durchgeführt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mastzellen sind ubiquitär im Bindegewebe vorkommende Zellen, welche an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. Nach Exposition der Haut mit ionisierender Strahlung ist eine signifikante Vermehrung von Mastzellen im bestrahlten Areal zu beobachten. Dieses Phänomen wurde zum Anlass genommen, im Rahmen dieser Arbeit, die Rolle der Mastzellen in der kutanen Strahlenreaktion näher zu analysieren. Über die Bedeutung der Mastzellen in der kutanen Strahlenreaktion ist bisher noch wenig bekannt. Ziel der Untersuchungen war es daher, den Einfluss der in Suspension wachsenden humanen Mastzelleukämie-Zelllinie HMC-1 auf adhärent wachsende HaCaT-Zellen, einer spontan immortalisierten, aneuploiden, humanen Keratinozytenzelllinie in einem Kokulturmodell zu erforschen.

Mittels Wachstumskurven und Klonogenitätsassays sollte untersucht werden, inwieweit Mastzellen auf die Proliferation und das Überleben bestrahlter Keratinozyten Einfluss nehmen können. Auf Genebene wurden vergleichende Untersuchungen des Mastzeleinflusses auf die Genexpression in unbestrahlten und bestrahlten Keratinozyten anhand von Genexpressionsarrays und Genexpressionsanalysen mit Schlüsselproteinen der Apoptose und der Zelladhäsion durchgeführt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Bcl2-Familie und die Caspasen gelegt, die eine zentrale Rolle bei der Exekution der Apoptose spielen. Da Adhäsionsmoleküle bei der Regulation von Zellüberleben, Proliferation, Zelldifferenzierung, Zellzyklus und Apoptose entscheidend beteiligt sind, wurden für die Untersuchungen einige wichtige Vertreter aus der Gruppe der Integrine und Immunglobulinsuperfamilie ausgewählt. Zudem sollte die Wirkung von Mastzellen auf die Proteinexpression in Keratinozyten untersucht werden. Dazu wurden immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen EGF, EGFR, TNF α , TGF β_1 , $\alpha_2\beta_1$ -Integrin und β_1 -Integrin durchgeführt.

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit eine durch Mastzellen bedingte signifikante Steigerung der Proliferation von bestrahlten Keratinozyten im Dosisbereich bis 5 Gy nachgewiesen werden. In den Klonogenitätsassays zeigte sich im Dosisbereich bis 10 Gy, damit auch im höheren Dosisbereich, eine signifikant ge-

steigerte Überlebensrate der Keratinozyten unter Einfluss von Mastzellen und ihrer Mediatoren, ein Hinweis damit auf eine höhere Reparaturfähigkeit und Strahlenresistenz der bestrahlten Keratinozyten. Mittels des Apoptose-Genexpressionsarray konnte in bestrahlten HaCaT-Zellen eine signifikante Hochregulation vor allem proapoptotischer Gene (Bad, Bax, Caspase 3, E2F1, TNFSF6, GADD45A, PIG8, RB1, TNFRSF10B) nachgewiesen werden. Unter Mastzeleinfluss zeigte sich dagegen neben der Hochregulation von proapoptotischen Genen (BAD, BAX, CASP1, CASP, E2F1, TNFRSF6, TNFRSF10) auch eine signifikante Hochregulation von Mitgliedern der Bcl2-Familie mit einer Überexpression im antiapoptotischen Bereich (Bcl2, Bclw und Bclx). Erstmals konnte zudem in Genexpressionsanalysen eine Hochregulation zahlreicher Adhäsionsmoleküle wie MCAM, ICAM-1, ICAM-3, α 4-Integrin, β 1-Integrin, α V-Integrin, α 1-Integrin, α 3-Integrin und α 2 β 1-Integrin und Zytokinen wie IL-3, EGF und TGF β ₁ in HaCaT-Zellen unter Einfluss von Mastzellen nachgewiesen werden. Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben dagegen eine Herunterregulation von EGF, EGFR, α 2 β 1-Integrin und β 1-Integrin in bestrahlten Keratinozyten unter Mastzeleinfluss.

Wie die Interpretation dieser Daten zeigt, führen Mastzellen, vor allem in Dosisbereichen bis 5 Gy, zu einer signifikanten Steigerung von Proliferation und Überlebensrate bei Keratinozyten. Somit konnte der Nachweis geführt werden, dass Mastzellen, die die Reparaturfähigkeit und Radioresistenz von bestrahlten Keratinozyten erhöhen, radioprotektiv wirken können. Die Ergebnisse aus den Genexpressionsanalysen zeigen darüber hinaus, dass Mastzellen über die Hochregulation von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie, Zytokinen, Integrinen und interzellulären Adhäsionsmolekülen in Keratinozyten in der kutanen Strahlenreaktion aufgrund ihrer radioprotektiven und proliferationssteigernden Wirkung eine wichtige Rolle spielen. Durch eine Herunterregulation von α 2 β 1-Integrin und β 1-Integrin können Mastzellen zudem antiinflammatorisch wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also nachgewiesen werden, dass Zeit und Dosis eine entscheidende Rolle bei der Mastzellwirkung auf bestrahlte Keratinozyten spielen und für diese Effekte intakte Mastzellen sowie eine definierte Mastzellkonzentration notwendig sind.

Aufgrund der antiapoptotischen, der radioprotektiven, der proliferationssteigernden und der antiinflammatorischen Wirkung von Mastzellen könnten diese Zellen Ausgang und Grundlage zur Entwicklung von innovativen Therapieansätzen in der Behandlung der kutanen Strahlenreaktion sein.

LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann L., Harvima I.T., Mast cells of psoriatic and 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)

Abe M., Kurosawa M., Ishikawa O., Miyachi Y., Kido H., Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clin Exp Allergy* 28:1509-17 (1998)

Abend M., van Beuningen D., Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie. Teil 1. *Strahlentherapie und Onkologie* 3:156-166 (1998)

Adams J.M., Cory S., The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326 (1998)

Adams D.H., Shaw S., Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* 343:831-836 (1994)

Albrecht M., Müller K., Köhn F.M., Meineke V., Mayerhofer A., Ionizing radiation induces degranulation of human mast cells and release of tryptase. *Int J Radiat Biol* 83:535-541 (2007)

Algermissen B., Hermes B., Feldmann-Boeddeker I., Bauer F., Henz B.M., Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on *in vitro* mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars. *Exp Dermatol* 8:193-198 (1999)

Arao S., Masumoto A., Otsuki M., Beta1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* 20:129-137 (2000)

Artuc M., Hermes B., Steckelings U.M., Grützkau A., Henz B.M., Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing – active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 8:1-16 (1999)

Artuc M., Steckelings U.M., Grützkau A., Smorodchenko A., Henz B.M., A long-term coculture model for the study of mast cell-keratinocyte interactions. *J Invest Dermatol* 119:411-5 (2002)

Atkins F.M., Clark R.A., Mast cells and fibrosis. *Arch Dermatol* 123:191-3 (1987)

Aumailley M., Gayraud B., Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76:253-65 (1998)

Babbitt C.J., Shai S.Y., Harpf A.E., Pham C.G., Ross R.S., Modulation of integrin and integrin signaling molecules in the pressure-loaded murine ventricle. *Histochem Cell Biol* 118:431-9 (2002)

Baenkler H.W., Medizinische Immunologie. I 5 Regulation der Immunantwort. Ecomed, Landsberg (1995)

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)

Bagutti C., Hutter C., Chiquet-Ehrismann R., Fassler R., Watt F.M., Dermal fibroblast-derived growth factors restore the ability of beta(1) integrin-deficient embryonal stem cells to differentiate into keratinocytes. *Dev Biol* 231:321-333 (2001)

Bairy K.L., Rao C.M., Ramesh K.V., Kulkarni D.R., Effects of antihistamines on wound healing. *Indian J Exp Biol* 29:398-399 (1991).

Barkham A.M., Radiotherapy skin reactions and treatments. *Prof Nurse* 8:732-6 (1993)

Beißbarth T., Fellenberg K., Brors B., Arribas-Prat R., Boer J.M., Hauser N.C., Scheideler M., Hoheisel J.D., Schütz G., Poustka A., Vingron M., Processing and quality control of DNA array hybridization data. *Bioinformatics* 16: 1014-1022 (2000)

Beetz A., Messer G., Oppel T., van Beuningen D., Peter R.U., Kind P., Induction of interleukin 6 by ionizing radiation in a human epithelial cell line: control by corticosteroids. *Int J Radiat Biol* 72:33-43 (1997)

Belka C., Betsch A., Marini P., Jendrossek V., Bamberg M., Budach W., Death inducing ligands in combination with ionizing radiation: objective and current knowledge. *Strahlentherapie Onkologie* 179:141-151 (2003)

Behrends 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)

Bischoff S.C., Regulation and function of human intestinal mast cells. In *Mast cells and basophils*. Marone G., L.M. Lichtenstein, Galli S.J. eds Academic Press, pp 541-566 (2000)

Böcker W., Denk H., Heitz Ph.U. (Hrsg.), Pathologie. 3. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, S. 129-135, München (2004)

Bonewald L.F., Regulation and regulatory activities of Transforming growth factor. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression* 9:33-44 (1999).

Bork P., Holm L., Sander C., The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* 242:309-20 (1994)

Bouillet P., Metcalf D., Huang D.C., Tarlinton D.M., Kay T.W., Köntgen F., Adams J.M., Strasser A., Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286:1735-1738 (1999)

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-771 (1988)

Boukamp P., Popp S., Bleuel K., Tomakidi E., Bürkle A., Fusenig N.E., Tumorigenic conversion of immortal human skin keratinocytes (HaCaT) by elevated temperature. *Oncogene* 18:5638-5645 (1999)

Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F., Sakai T., Fässler R., Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 109:999-1006 (2002)

Brown E., Dejana E., Cell-to-cell contact and extracellular matrix. Editorial overview: Cell-cell and cell-matrix interactions – running, jumping, standing still. *Curr Opin in Cell Biol* 15:505-508 (2003)

Brunner T., Heusser C.H., Dahinden C.A., Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med* 177:605-611 (1993)

Bucci B., D'Agnano I., Amendola D., Citti A., Raza G.H., Miceli R., De Paula U., Marchese R., Albini S., Felsani A., Brunetti E., Vecchione A., Myc down-regulation sensitizes melanoma cells to radiotherapy by inhibiting MLH1 and MSH2 mismatch repair proteins. *Clin Cancer Res* 11:2756-2767 (2005)

Cai J.P., Harris K., Falanga V., Taylor J.R., Chin Y.H., UVB therapy decreases the adhesive interaction between peripheral blood mononuclear cells and dermal microvascular endothelium, and regulates the differential expression of CD54, VCAM-1, and E-selectin in psoriatic plaques. *Br J Dermatol* 134:7-16 (1996)

Cairns J.A., Walls A.F., Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol* 156:275-83 (1996)

Cairns J.A., Walls A.F., Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 99:1313-21 (1997)

Chanan-Khan A.A., Bcl-2 antisense therapy in multiple myeloma. *Oncology* 18:21-24 (2004)

Charles M., UNSCEAR report 2000: sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *J Radiol Prot* 21:83-6 (2001)

Cheresh D.A., Stupack D.G., Integrin-mediated death: an explanation of the integrin-knockout phenotype? *Nat Med* 8:193-4 (2002)

Ch'ng S., Wallis R., Yuan L., Davis P.F., Tan S.T., Mast cells and cutaneous malignancies. *Modern Pathology* 19:149-159 (2006)

Cho H.R., Hong S.B., Kim Y.I., Lee J.W., Kim N.I., Differential expression of TGF-beta isoforms during differentiation of HaCaT human keratinocyte cells: implication for the separate role in epidermal differentiation. *J Korean Med Sci.* 19:853-858 (2004)

Chung Y.M., Kim B.G., Park C.S., Huh S.J., Kim J., Park J.K., Cho S.M., Kim B.S., Kim J.S., Yoo Y.D., Bae D.S., Increased expression of ICAM-3 is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Int J Cancer* 117:194-201 (2005)

Cordes N., Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity. *Cancer Res* 64:5683-92 (2004)

Cordes N., Integrin-mediated cell-matrix interactions for prosurvival and antiapoptotic signalling after genotoxic injury. *Cancer Lett* 242:11-9 (2006)

- Cordes N., Plasswilm L., Bamberg M., Rodemann H.P.**, Ukrain, an alkaloid thiophosphoric acid derivative of *Chelidonium majus* L. protects human fibroblasts but not human tumour cells *in vitro* against ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 78:17-27 (2002)
- Cordes N., Meineke V.**, Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR): extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells *in vitro*. *Strahlenther Onkol* 179: 337-344 (2003)
- Cordes N., Meineke V.**, Integrin signalling and the cellular response to ionizing radiation. *J Mol Histol* 35:327-37 (2004)
- Cordes N., Meineke V.**, Modification of the cellular radiation survival and proliferation response by cell-matrix interactions: Implications for integrin targeting in therapeutic approaches for radiation accident patients. *Brit J Radiol* 27:152-156 (2005)
- Cordes N., Seidler J., Durzok R., Geinitz H., Brakebusch C.**, Beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene* 25:1378-1390 (2006)
- Cordes N., Frick S., Brunner T.B., Pilarsky C., Grützmann R., Sipos B., Klöppel G., McKenna W.G., Bernhard E.J.**, Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene* 26:6851-6862 (2007)
- Daino K., Ichimura S., Nenoï M.**, Both the basal transcriptional activity of the GADD45A gene and its enhancement after ionizing irradiation are mediated by AP-1 element. *Biochim Biophys Acta* 1759:458-469 (2006)
- Daniel P.T.**, Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 14:2035-44 (2000)
- Degitz K.**, Induktion des immunologischen Adhäsionsmolekül ICAM-1 durch ionisierende Strahlen. Ralf Uwe Peter, Gerd Plewig (Hrsg.), Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin – Wien, 42-44 (1996)
- Demitsu T., Inoue T., Kakurai M., Kiyosawa T., Yoneda K., Manabe M.**, Activation of mast cells within a tumor of angiosarcoma: ultrastructural study of five cases. *J Dermatol* 29:280-9 (2002)
- Dhanalakshmi S., Mallikarjuna G.U., Singh R.P., Agarwal R.**, Dual efficacy of silibinin in protecting or enhancing ultraviolet B radiation-caused apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. *Carcinogenesis* 25:99-106 (2004)
- Di Girolamo N., Wakefield D.**, *In vitro* and *in vivo* expression of interstitial collagenase/MMP-1 by human mast cells. *Dev Immunol* 7:131-42 (2000)
- Dörr W., Herrmann T.**, Akute Strahlenveränderungen der Gewebe. In: Bamberg M., Molls M., Sack H., Radioonkologie Band 1: Grundlagen. Germering/München, S. 244-250 (2003)
- Dörr W., Herrmann T.**, Ionisierende Strahlung: Ursprung, Wirkung, Nutzen, Risiko. *Wissenschaftliche Zeitschrift der TU Dresden* 55: 85-91 (2006)
- Dragovich T., Rudin C.M., Thompson C.B.**, Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 17:3207-13 (1998)

- Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.**, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42 (2000)
- Dumaz N., Meek D.W.**, Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* 18:7002-10 (1999)
- Edelmann G.M.**, CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol Rev* 100:11-45 (1987)
- Ehrlich P.**, Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Dissertationsschrift der Universität Leipzig (1878)
- El-Abaseri T.B., Putta S., Hansen L.A.**, Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis* 27:225-231 (2006)
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S.**, A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50 (1998)
- Enerbäck L.**, Influence of adrenalectomy on urinary excretion of 5-hydroxyindole acetic acid in the rat. *Endocrinology* 67:717-719 (1960)
- Enerbäck L.**, Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. *Acta path microbiol scand* 66:289-302 (1966)
- Esteller M.**, Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 1:R50-59 (2007)
- Fadok V.A., Chimini G.**, The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol* 13:365-72 (2001)
- Finkelstein J.N., Johnston C.J., Baggs R., Rubin P.**, Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 28:621-631 (1994)
- Frank S., Madlener M., Werner S.**, Transforming growth factor 1, 2, 3 and their receptors are differentially regulated during normal wound healing. *J Biol Chem* 271:10188–10193 (1996)
- Frankenberg D., Frankenberg-Schwager M., Blöcher D., Harbich R.**, Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions. *Radiat Res.* 88:524-532 (1981)
- Galli S.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F.**, Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. *Prog Allergy* 34:1-141 (1984)
- Galli S.J.**, New insights into “the riddle of mast cells”: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 62:5-33 (1990)
- Galli S.J.**, New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 328:257-65 (1993)
- Galli S.J., Zsebo K.M., Geissler E.N.**, the kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 55:1-96 (1994)

Galli S.J., The Paul Kallos Memorial Lecture. The mast cell: a versatile effector cell for a challenging world. *Int Arch Allergy Immunol* 113:14-22 (1997)

Garssen J., Norval M., el-Ghorr A., Gibbs N.K., Jones C.D., Cerimele D., De Simone C., Caffieri S., Dall'Acqua F., De Gruijl F.R., Sontag Y., Van Loveren H., Estimation of the effect of increasing UVB exposure on the human immune system and related resistance to infectious diseases and tumours. *J Photochem Photobiol B.* 42:167-79 (1998)

Giancotti F.G., Ruoslahti E., Integrin signaling. *Science* 285:1028-32 (1999)

Giancotti F.G., A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* 4:149-51 (2003)

Godin C., Caprani A., Dufaux J., Flaud P., Interactions between neutrophils and endothelial cells. *J Cell Science* 106:441-452 (1993)

Goldschmidt H., Dermatologische Röntgentherapie und Radiokarzinogenese. *Hautarzt* 33:183-190 (1982)

Gonzalez-Amaro R., Sanchez-Madrid F., Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol* 19:389-429 (1999)

Gottlöber P., Bezold G., Krähn G., Peter R.U., Multiple basal cell carcinomas after accidental exposure to ionizing radiation. *Br J. Dermatol* 141:383-385 (1999)

Gottlöber P., Krähn G., Peter R.U., Cutaneous radiation syndrome: clinical features, diagnosis and therapy. *Hautarzt* 51:567-74 (2000)

Gottlöber P., Steinert M., Bahren W., Weber L., Gerngross H., Peter R.U., Interferon-gamma in 5 patients with cutaneous radiation syndrome after radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:159-66 (2001)

Granville D.J., Carthy C.M., Hunt D.W., McManus B.M., Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78:893-913 (1998)

Grzesiak J.J., Smith K.C., Burton D.W., Defetos L.J., Bouvet M., Integrin-mediated laminin-1 adhesion upregulates CXCR4 and IL-8 expression in pancreatic cancer cells. *Surgery* 141:804-814 (2007)

Gruber B.L., Kew R.R., Jelaska A., Marchese M.J., Garlick J., Ren S., Schwartz L.B., Korn J.H., Human mast cell activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol* 158:2310-7 (1997)

Gurish M.F., Boyce J.A., Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin Rev Allergy Immunol* 22:107-18 (2002)

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)

Hall E.J., *Radiobiology for the Radiologist.* (4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia), S. 1-478 (1994)

Hallahan D.E., Virudachalam S., Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94:6432-6437 (1997)

Handschel J., Prott F.J., Sunderkotter C., Metze D., Meyer U., Joos U., Irradiation induces increase of adhesion molecules and accumulation of β -2-integrin-expressing cells in humans. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45:475-81 (1999)

Hannigan G.E., Dedhar S., Protein kinase mediators of integrin signal transduction. *J Mol Med* 75:35-44 (1997)

Hareyama M., Imai K., Oouchi A., Takahashi H., Hinoda Y., Tsujisaki M., Adachi M., Shonai T., Sakata K., Morita K., The effect of radiation on the expression of intercellular adhesion molecule-1 of human adenocarcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40:691-696 (1998)

Hart P.H., Townley S.L., Grimbaldston M.A., Khalil Z., Finlay-Jones J.J., Mast cells, neuropeptides, histamine, and prostaglandins in UV-induced systemic immunosuppression. *Methods* 28:79-89 (2002)

Harvima I.T., Schechter M.N., Harvima R.J., Fraki J.E., Human skin tryptase: purification, partial characterization and comparison with human lung tryptase. *Biochim Biophys Acta* 957:71-80 (1988)

Hashimoto K., Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci* 24:S46-50 (2000)

Heinzelmann F., Jendrossek V., Lauber K., Nowak K., Eldh T., Boras R., Handrick R., Henkel M., Martin C., Uhlig S., Köhler D., Eltzschig H.K., Wehrmann M., Budach W., Belka C., Irradiation-induced pneumonitis mediated by the CD95/CD95-ligand system. *J Natl Cancer Inst* 98:1248-1251 (2006)

Heissig B., Rafii S., Akiyama H., Ohki Y., Sato Y., Rafael T., Zhu Z., Hicklin D.J., Okumura K., Ogawa H., Werb Z., Hattori K., Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *J Exp Med* 202:739-750 (2005)

Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W., Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14:1235-1244 (1974)

Hermes B., Welker P., Feldmann-Böddeker I., Krüger-Krasagakis S., Hartmann K., Zuberbier T., Henz B.M., Expression of mast cell growth modulating and chemotactic factors and their receptors in human cutaneous scars. *J Invest Dermatol* 116:387-93 (2001)

Herrmann T., Baumann M., Dörr W., *Klinische Strahlenbiologie*. 4. Auflage München, Urban und Fischer, S. 1-219 (2006)

Herskind C., Bamberg M., Rodemann H.P., The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 174:12-15 (1998)

Higson D. J., The bell tolls for LNT. *Health Physics* 87:47-50 (2004)

- Hines C.**, The diverse Effects of Mast Cell Mediators. *Clin Rev Allergy Immunol* 22:149-60 (2002)
- Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Milliman C.L., Korsmeyer S.J.**, Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-51 (1993)
- Hoeijmakers J.H.**, DNA repair mechanisms. *Maturitas* 38:17-22 (2001)
- Holzknacht G.**, Fieberhafte Allgemeinerkrankung mit Exanthem bei Röntgendermatitis. *Arch Dermatol Syph*;66:71-76 (1903)
- Hopewell J.W.**, The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 57:751-773 (1990)
- Hubbard A.K., Rothlein R.**, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 28:1379-1386 (2000)
- Huttunen M., Aalto M.L., Harvima R.J., Horsmanheimo M., Harvima I.T.**, Alterations in mast cells showing tryptase and chymase activity in epithelializing and chronic wounds. *Exp Dermatol* 9:258-65 (2000)
- Huttunen M., Hyttinen M., Nilsson G., Butterfield J.H., Horsmanheimo M., Harvima I.T.**, Inhibition of keratinocyte growth in cell culture and whole skin culture by mast cell mediators. *Exp dermatol* 10:184-192 (2001)
- Hynes R.O., Lander A.D.**, Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68:303-322 (1992)
- Hynes R.O.**, Integrins: bi-directional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-87 (2002)
- Jäger R., Herzer U., Schenkel J., Weiher H.**, Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene* 15:1787-1795 (1999)
- Janeway C., Travers P., Walport M., Shlomchik M.**, *Immunologie*. 5. Auflage, S. 73-75, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin (2002)
- 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)
- Jung M., Dritschilo A.**, NF-kappa B signaling pathway as a target for human tumor radiosensitization. *Semin Radiat Oncol* 11:346-351 (2001)
- Kaina B.**, DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signalling. *Biochem Pharmacol* 66:1547-54 (2003)
- Kanaar R., Hoeijmakers J.H., van Gent D.C.**, Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* 8:483-9. Review (1998)
- Kaplan M.I., Morgan W.F.**, The nucleus is target for radiation-induced chromosomal instability. *Radiat Res* 150:382-390 (1998)

- Katzel J.A., Fanucchi M.P., Li Z.**, Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2:2 (2009)
- Kauffmann G., Moser E., Sauer R.**, Radiologie: Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und und Nuklearmedizin, 1. Auflage, S. 1-80, Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore (1996)
- Kärcher W.H.**, Die Strahlenreaktionen an der Haut und Schleimhaut und ihre Behandlung. *Strahlenther* 155:804-810 (1979)
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.**, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57 (1972)
- Khan J., Bittner M.L., Saal L.H., Teichmann U., Azorsa D.O., Gooden G.C., Pavan W.J., Trent J.M., Meltzer P.S.**, cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13264-13269 (1999)
- Kim Y.G., Kim M.J., Lim J.S., Lee M.S., Kim J.S., Yoo Y.D.**, ICAM-3-induced cancer cell proliferation through the PI3K/Akt pathway. *Cancer Lett* 239:103-110 (2006)
- Kirshenbaum A.S., Kessler S.W., Goff J.P., Metcalfe D.D.**, Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 146:1410-5 (1991)
- Kitada S., Krajewski S., Miyashita T., Krajewska M., Reed J.C.**, Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. *Oncogene* 12:187-192 (1996)
- Kitamura Y., Miyoshi I.**, Development and differentiation of mast cells and basophils. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 41:1251-9 (1978)
- Kitamura Y., Kanakura Y., Fujita J., Nakano T.**, Differentiation and transdifferentiation of mast cells; a unique member of the hematopoietic cell family. *Int J Cell Cloning* 5:108-21 (1987)
- Kitamura Y., Kasugai T., Arizono N., Matsuda H.**, Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci* 306:185-91 (1993)
- Kligman L.H., Murphy G.F.**, Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochem Photobiol* 63:123-127 (1996)
- Koike M., Shiomi T., Koike A.**, Identification of skin injury-related genes induced by ionizing radiation in human keratinocytes using cDNA microarray. *J Radiat Res* 46:173-184 (2005)
- Koivisto L., Jiang G., Häkkinen L., Chan B., Larjava H.**, HaCaT keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3alpha. *Exp Cell Res* 312:2791-2805 (2006)
- Krammer P.H.**, CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-95 (2000)
- Kraneveld A.D., van der Kleij H.P., Kool M., van Houwelingen A.H., Weitenberg A.C., Redegeld F.A., Nijkamp F.P.**, Key role for mast cells in nonatopic asthma. *J Immunol* 169:2044-53 (2002)

Labat R.J., Bihari V.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)

Lauber K., Bohn E., Kröber S.M., Xiao Y.J., Blumenthal S.G., Lindemann R.K., Marini P., Wiedig C., Zobywalski A., Baksh S., Xu Y., Autenrieth I.B., Schulze-Osthoff K., Belka C., Stuhler G., Wesselborg S., Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113:717-730 (2003)

Leung K.H., Release of soluble ICAM-1 from human lung fibroblasts, aortic smooth muscle cells, dermal microvascular endothelial cells, bronchial epithelial cells, and keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 260:734-739 (1999)

Lewis J.M., Truong T.N., Schwartz M.A., Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3627-32 (2002)

Levi-Schaffer F., Piliponsky A.M., Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends Immunol* 24:158-161 (2003)

Li G., Herlyn M., Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 6:163-169 (2000)

Lichter M.D., Karagas M.R., Mott L.A., Spencer S.K., Stukel T.A., Greenberg E.R., Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. The New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Arch Dermatol* 136:1007-11 (2000)

Lieber M.R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K., Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:712-20. Review (2003)

Lisiak E., Cordes N., Integrins and the cellular radiation response. *Cancer Therapy* 2: 271-278 (2004)

Lowman M.A., Rees P.H., Benyon R.C., Church M.K., Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol* 81:590-7 (1988)

Ludolph-Hauser D., Rueff F., Sommerhoff C.P., Pryzbilla B., Tryptase, a marker for the activation and localization of mast cells. *Hautarzt* 50:556-61 (1999)

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)

Maas-Szabowski N., Shimotoyodome A., Fusenig N.E., Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci* 112:1843-53 (1999)

Manohar A., Shome S.G., Lamar J., Stirling L., Iyer V., Pumiglia K., DiPersio C.M., Alpha 3 beta 1 integrin promotes keratinocyte cell survival through activation of a MEK/ERK signaling pathway. *J Cell Sci* 117:4043-4054 (2004)

Mantripragada K.K., Buckley P.G., de Stahl T.D., Dumanski J.P., Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet* 20:87-94 (2004)

Maruo Y., Gochi A., Kaihara A., Shimamura H., Yamada T., Tanaka N., Orita K., ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer* 100:486-490 (2002)

Masumoto A., Arao S., Otsuki M., Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 29:68-74 (1999)

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)

Maurer M., Opitz M., Henz B.M., Paus R., The mast cell products histamine and serotonin stimulate and TNF-alpha inhibits the proliferation of murine epidermal keratinocytes in situ. *J Dermatol Sci* 16:79-84 (1997)

Maya R., Balass M., Kim S.T., Shkedy D., Leal J.F., Shifman O., Moas M., Buschmann T., Ronai Z., Shiloh Y., Kastan M.B., Katzir E., Oren M., ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15:1067-77 (2001)

McGowan C.H., CHK2: a tumor suppressor or not? *Cell Cycle* 1:401-3 (2002)

Meineke V., Molekulare Diagnostik und Therapie von Strahlenschäden, Habilitationsschrift der TU München (2002)

Meineke V., Gilbertz 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 Onkol* 178:709-14 (2002a)

Meineke V., Moede T., Gilbertz 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 hepatoma cells. *Int J Radiat Biol* 78:577-583 (2002b)

Meineke V., Pfaffendorf C., Schinn M., Tilgen W., Mayerhofer A., Dimitrijevic N., van Beuningen D., Reichrath J., Modulation of X-ray-Induced Apoptosis in Human Keratinocytes (HaCaT) by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Recent Results in Cancer Research* 164:427-432 (2003)

Meineke V., Müller K., Ridi R., Cordes N., Köhn F.M., Mayerhofer A., Ring J., van Beuningen D., Development and evaluation of skin organ model for the analysis of radiation effects. *Strahlenther Onkol* 180:102-108 (2004)

Metcalfe D.D., Kaliner M., Donlon M.A., The mast cell. *Crit Rev Immunol* 3:23-74 (1981)

Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y.A., Mast cells. *Physiol Rev* 77:1033-79 (1997)

Miescher G., Röntgenbiologie der gesunden und kranken Haut. *Arch Dermatol Syph* 172:43-64 (1935)

Miraglia A.G., Travaglione S., Meschini S., Falzano L., Matarrese P., Quaranta M.G., Viora M., Fiorentini C., Fabbri A., Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol Biol Cell* 18:2735-2744 (2007)

Möller A., Henz B.M., Grützkau A., Lippert U., Aragane Y., Schwarz T., Krüger-Krasagakes S., Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology* 93:289-295 (1998)

Müller H., Helin K., The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1470:M1-12 (2000)

Müller K., Köhn F.M., Port M., Abend M., Molls M., Ring J., Meineke V., Intercellular adhesion molecule-1: a consistent inflammatory marker of the cutaneous radiation reaction both *in vitro* and *in vivo*. *Br J Dermatol* 155:670-679 (2006)

Müller K., Meineke V., Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol* 35:96-104 (2007)

Müller K., Schinn M., Reichrath J., Meineke V., 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates the response of human keratinocytes to ionizing radiation exposure. *Anticancer Res.* 26:2735-41 (2006b)

Nadel J.A., Biology of mast cell tryptase and chymase. *Ann N Y Acad Sci* 629:319-331 (1991)

Neta R., Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action. *Envir Health Perspect Suppl* 106:1463-1465 (1997)

Nilsson G., Blom T., Kusche-Gullberg M., Kjellen L., Butterfield J.H., Sundström C., Nilsson K., Hellman L., Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol* 39:489-498 (1994)

Nimni M.E., Polipeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 18:1201-1225 (1997)

Noli C., Miolo A., The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol* 12:303-313 (2001)

Norbury C.J., Zhivotovsky B., DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23:2797-2808 (2004)

Oike Y., Yasunaga K., Ito Y., Matsumoto S., Maekawa H., Morisada T., Arai F., Nakagata N., Takeya M., Masuho Y., Suda T., Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:9494-9499 (2003)

Olive P. L., The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res.* 150:42-51. Review. (1998)

Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J., Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619 (1993)

Ozkaptan Y., Gerek M., Simsek S., Deveci S., Effects of fibroblast growth factor on the healing process of tympanic membrane perforations in an animal model. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254:S2-5 (1997)

Pawankar R., Mast cells as orchestrators of the allergic reaction: the IgE-IgE receptor mast cell network. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1:3-6 (2001)

Pawankar R., Okuda M., Yssel H., Okumura K., Ra C., Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest* 99:1492-9 (1997)

Peter R.U., Pathophysiologie kutaner Strahlenreaktionen. In: Peter R.U., Plewig G. (Hrsg.), *Strahlentherapie dermatologischer Erkrankungen*. Blackwell, Berlin Wien, S. 7-24 (1996a)

Peter R.U., The Cutaneous Radiation Syndrome. *Advances in the Biosciences* 94:237-240 (1996b)

Peter R.U., Beetz A., Reid C., Michel G., van Beuningen D., Ruzicka T., Increased expression of the epidermal growth factor receptor in human epidermal keratinocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiation Research* 136: 65-70 (1993)

Peter R.U., Braun-Falco O., Birioukov A., Hacker N., Kerscher M., Peterseim U., Ruzicka T., Konz B., Plewig G., Chronic cutaneous damage after accidental exposure to ionizing radiation: the Chernobyl experience. *J Am Acad Dermatol* 30 (5 Pt 1):719-23 (1994)

Peter R.U., Gottlöber P., Nadeshina N., Krähn G., Braun-Falco O., Plewig G., Gamm-interferon in survivors of the Chernobyl power plant accident-new therapeutic option for radiation induced fibrosis. *Int J Radiat Oncology Biol Phys* 45:147-152 (1999)

Peter R.U., Gottlöber P., Management of cutaneous radiation injuries: diagnostic and therapeutic principles of the cutaneous radiation syndrome. *Mil Med* 167(2 Suppl):110-2 (2002)

Pfaff M., Integrin-ligand interaction. Ed.: J.A. Eble, Springer Verlag, Heidelberg, 101-121 (1997)

Purwar R., Wittmann M., Zwirner J., Oppermann M., Kracht M., Dittrich-Breiholz O., Gutzmer R., Werfel T., Induction of C3 and CCL2 by C3a in keratinocytes: a novel autocrine amplification loop of inflammatory skin reactions. *J Immunol* 177:4444-4450 (2006)

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)

Quarmby S., Hunter R.D., Kumar S., Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. *Anticancer Res* 20:3375-3381 (2000)

Quesnelle K.M., Boehm A.L., Grandis J.R., STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem*.102:311-9 (2007)

Reed J.C., Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17:2941-53 (1999)

Rehemtulla A., Hamilton A.C., Taneja N., Fridman J., Juan T.S., Maybaum J., Chinnaiyan A., Acaspase-resistant form of Bcl-X(L), but not wild type Bcl-X(L), promotes clonogenic survival after ionizing radiation. *Neoplasia* 1:63-70 (1999)

Reinartz J., Bechtel M.J., Kramer M.D., Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is counteracted by transforming growth factor-alpha. *Exp Cell Res*. 228:334-40 (1996)

- Rezacova M., Vavrova J., Vokurkova D., Tichy A., Knizek J., Psutka J.,** The importance of abrogation of G2-phase arrest in combined effect of TRAIL and ionizing radiation. *Acta Biochim Pol* 52:889-895 (2005)
- Richter E., Feyerabend T.,** Grundlagen der Strahlentherapie. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin, S. 1-462 (2001)
- 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)
- Rodemann H.P., Bamberg M.,** Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol.* 35:83-90 (1995)
- Roebuck K.A.,** Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Int J Mol Med* 4:223-230 (1999)
- Ruoss S.J., Hartmann T., Caughey G.H.,** Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 88:493-499 (1991)
- Sagan D., Mörtl S., Müller I., Eckardt-Schupp F., Eichholtz-Wirth H.,** Enhanced CD95-mediated apoptosis contributes to radiation hypersensitivity of NBS lymphoblasts. *Apoptosis* 12:753-767 (2007)
- Sakaguchi M., Sonogawa H., Murata H., Kitazoe M., Futami J., Kataoka K., Yamada H., Huh N.H.,** S100A11, an dual mediator for growth regulation of human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 19:78-85 (2008)
- Sandfort V., Koch U., Cordes N.,** Cell adhesion-mediated radioresistance revisited. *Int J Radiat Biol* 19:1-6 (2007)
- Satyamoorthy K., Muylers J., Meier F., Patel D., Herlyn M.,** Mel-Cam-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication. *Oncogene* 20:4676-4684 (2001)
- Schirner M., Herzberg F., Schmidt R., Streit M., Schöning M., Hummel M., Kaufmann C., Thiel E., Kreuser E.D.,** Integrin alpha5beta1: a potent inhibitor of experimental lung metastasis. *Clin Exp Metastasis* 16:427-435 (1998)
- Schön M., Kähne T., Gollnick H., Schön M.P.,** Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM). *J Invest Dermatol* 125:353-363 (2005)
- Schuchhardt J., Beule D., Malik A., Wolski E., Eickhoff H., Lehrach H., Herzel H.,** Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 28:E47-e47 (2000)
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E.,** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254:439-59 (1998)
- Schultz G.S., White M., Mitchell R., Brown G., Lynch J., Twardzik D.R., Todaro G.J.,** Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor. *Science* 235:350-352 (1987)

- Shan B., Lee W.H.**, Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol* 14:8166-73 (1994)
- Sharma B.B., Apgar J.R., Liu F.T.**, Mast Cells. Receptors, Secretagogues, and Signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* 22:119-148 (2002)
- Shepard H.M., Brdlik C.M., Schreiber H.**, Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest.* 118:3574-81 (2008)
- Shih L.M., Hsu M.Y., Palazzo J.P., Herlyn M.**, The cell-cell adhesion receptor Mel-CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma. *Am J Pathol* 151:745-751 (1997)
- Shiloh Y.**, ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3:155-68 (2003)
- Shirakata Y., Kimura R., Nanba D., Iwamoto R., Tokumaru S., Morimoto C., Yokota K., Nakamura M., Sayama K., Mekada E., Higashiyama S., Hashimoto K.**, Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* 118:2363-2370 (2005)
- Shore R.E.**, Radiation-induced skin cancer in humans. *Med Pediatr Oncol* 36:549-54 (2001)
- Shu H.K., Julin C.M., Furman F., Yount G.L., Haas-Kogan D., Israel M.A.**, Overexpression of E2F1 in glioma-derived cell lines induces a p53-independent apoptosis that is further enhanced by ionizing radiation. *Neuro Oncol* 2:16-21 (2000)
- Sigounas G., Steiner M., Anagnostou A.**, Synergism of hemopoietic growth factors on endothelial cell proliferation. *Angiology* 48:141-147 (1997)
- Sommer K.W., Schamberger C.J., Schmidt G.E., Sasgary S., Cerni C.**, Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene* 22:4266-4280 (2003)
- Song G., Yang Y., Liu J.H., Casasnovas J.M., Shimaoka M., Springer T.A., Wang J.H.**, An atomic resolution view of ICAM recognition in a complex between the binding domains of ICAM-3 and integrin alphaLbeta2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3366-3371 (2005)
- Staiano-Coico L., Khandke L., Krane J.F., Sharif S., Gottlieb A.B., Krueger J.G., Heim L., Rigas B., Higgins P.J.**, TGF-alpha and TGF-beta expression during sodium-N-butyrate-induced differentiation of human keratinocytes: evidence for subpopulation-specific up-regulation of TGF-beta mRNA in suprabasal cells. *Exp Cell Res.* 191:286-91 (1990)
- Stolpe van de A., Saag van der P.T.**, Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74:13-33 (1996)
- Strange P., Cooper K.D., Hansen E.R., Fisher G., Larsen J.K., Fox D, Krag C., Voorhees J.J., Baadsgaard O.**, T-lymphocyte clones initiated from lesional psoriatic skin release growth factors that induce keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 101:695-700 (1993)
- Strasser A., Harris A.W., Bath M.L., Cory S.**, Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348:331-333 (1990)

Strasser A., Harris A.W., Jacks T., Cory S., DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p3-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79:329-339 (1994)

Strasser A., Puthalakath H., Bouillet P., Huang D.C., O'Connor L., O'Reilly L.A., Cullen L., Cory S., Adams J.M., The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci* 917:541-548 (2000)

Stupack D.G., Cheresh D.A., Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 115:3729-38 (2002)

Su Z.Z., Lebedeva I.V., Sarkar D., Emdad L., Gupta P., Kitada S., Dent P., Reed J.C., Fisher P.B., Ionizing radiation enhances therapeutic activity of mda-7/IL-24: overcoming radiation- and mda-7/IL-24-resistance in prostate cancer cells overexpression the antiapoptotic proteins bcl-xL or bcl-2. *Oncogene* 25:2339-2348 (2006)

Sung K.J., Chang S.E., Paik E.M., Lee M.W., Choi J.H., Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the proliferation of HaCaT cell via TGF- α . *Neuropeptides* 33:435-46 (1999)

Takata M., Sasaki M.S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S., Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17(18):5497-508 (1998)

Tan H., Zhong Y., Pan Z., Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor- α in estrogen receptor- α -positive breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 9:31 (2009)

Tokumar S., Higashiyama S., Endo T., Nakagawa T., Miyagawa J.I., Yamamori K., Hanakawa Y., Ohmoto H., Yoshino K., Shirakata Y., Matsuzawa Y., Hashimoto K., Taniguchi N., Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol* 151:209-220 (2000)

Tredget E.E., Shankowsky H.A., Pannu R., Nedelec B., Iwashina T., Ghahary A., Taerum T.V., Scott P.G., Transforming growth factor- β in thermally injured patients with hypertrophic scars: effects of interferon α -2b. *Plast Reconstr Surg* 102:1317-30 (1998)

Troussard A.A., Costello P., Yoganathan T.N., Kumagai S., Roskelley C.D., Dedhar S., The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene* 19:5444-52 (2000)

Tseng G.C., Oh M.K., Rohlin L., Liao J.C., Wong W.H., Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 29:2549-2557 (2001)

Tsuboi R., Sato C., Shi C.M., Ogawa H., Stimulation of keratinocyte migration by growth factors. *J Dermatol* 19:652-653 (1992)

Turner M.L., Cell adhesion molecules: a unifying approach to topographic biology. *Biol Rev* 67:359-377 (1992)

Ura H., Denno R., Hirata K., Yamaguchi K., Yasoshima T., Separate functions of alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma. *Surg Today* 28:1001-1006 (1998)

Vaillant P., Menard O., Vignaud J.M., Martinet N., Martinet Y., The role of cytokines in human lung fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis* 51:145-152 (1996)

Vamvakas S., Vock E.H., Lutz W.K., On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 27:155-74. Review. (1997)

Valent P., Scherthaner G.H., Sperr W.R., Fritsch G., Agis H., Willheim M., Bühring H.J., Orfao A., Escribano L., Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. *Immunol Rev* 179:74-81 (2001)

Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L., Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53 (2000)

Verheij M., Bartelink H., Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 301:133-42 (2000)

Vliagoftis H., Hutson A.M., Mahmudi-Azer S., Kim H., Rumsaeng V., Oh C.K., Moqbel R., Metcalfe D.D., Mast cells express connexins on their cytoplasmic membrane. *J Allergy Clin Immunol* 103:656-62 (1999)

Volc-Platzer B., Valent P., Radaszkiewicz T., Mayer P., Bettelheim P., Wolff K., Recombinant human interleukin 3 induces proliferation of inflammatory cells and keratinocytes *in vivo*. *Lab Invest* 64:557-566 (1991)

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)

Ward J.F., DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35:95-125 (1988)

Weller K., Foitzik K., Paus R., Syska W., Maurer M., Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J* 20:2366-2368 (2006).

Wendt J., Radetzki S., von Haefen C., Hemmati P.G., Güner D., Schulze-Osthoff K., Dörken B., Daniel P.T., Induction of p21^{CIP/WAF-1} and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* 25:972-980 (2006)

Weninger W., Rendl M., Mildner M., Mayer C., Ban J., Geusau A., Bayer G., Tanew A., Majdic O., Tschachler E., Keratinocytes express the CD146 (Muc18/S-endo) antigen in tissue culture and during inflammatory skin diseases. *J Invest dermatol* 115:219-224 (2000)

Wu C., Hughes P.E., Ginsberg M.H., McDonald J.A., Identification of a new biological function for the integrin alpha v beta 3: initiation of fibronectin matrix assembly. *Cell Adhes Commun* 4:149-158 (1996)

Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R., Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306 (1980)

Xia L.X., Xiao T., Chen H.D., Li P., Wang Y.K., Wang H., Regulation of haptoglobin expression in a human keratinocyte cell line HaCaT by inflammatory cytokines and dexamethasone. *Chin Med J (Engl)*. 121:730-734 (2008)

Yamada M., Kodama K., Fujita S., Akahoshi M., Yamada S., Hirose R., Hori M., Prevalence of skin neoplasms among the atomic bomb survivors. *Radiat Res* 146:223-6 (1996)

Yang J.Y., Xia W., Hu M.C., Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *Int J Oncol* 29:643-648 (2006)

Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J., Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285-291 (1995)

Yousem S.A., The potential role of mast cells in lung allograft rejection. *Hum Pathol* 28:179-82 (1997)

Zaider M., Bardash M., Fung A., Molecular damage induced directly and indirectly by ionizing radiation in DNA. *Int J Radiat Biol*. 66:459-65 (1994)

Zambruno G., Marchisio P.C., Marconi A., Vaschieri C., Melchiori A., Riannetti A., De Luca M., Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induce the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol* 129:853-65 (1995)

ANHANG

ANHANG 1: ERGEBNISSE DER AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN VON HACAT-ZELLEN

		Bestrahlung mit 5 Gy - Abstoppen der Reaktion nach:																	
		0 Gy			60 min(T1)			180 min(T2)			360 min(T3)			720 min(T4)					
		V1	V2	V3	V1 _{T0}	V2 _{T0}	V3 _{T0}	V1 _{T1}	V2 _{T1}	V3 _{T1}	V1 _{T2}	V2 _{T2}	V3 _{T2}	V1 _{T3}	V2 _{T3}	V3 _{T3}	V1 _{T4}	V2 _{T4}	V3 _{T4}
AK		2	2	2	1,5	1	1,5	2	2,5	2	2	2	2	2,5	2,5	2	2	2	2
EGF		1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1,5	1	1	1	1
EGF+Mz		1	1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1,5	1	1	1	1

		Bestrahlung mit 5 Gy - Abstoppen der Reaktion nach:																	
		0 Gy			60 min(T1)			180 min(T2)			360 min(T3)			720 min(T4)					
		V1	V2	V3	V1 _{T0}	V2 _{T0}	V3 _{T0}	V1 _{T1}	V2 _{T1}	V3 _{T1}	V1 _{T2}	V2 _{T2}	V3 _{T2}	V1 _{T3}	V2 _{T3}	V3 _{T3}	V1 _{T4}	V2 _{T4}	V3 _{T4}
AK		0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	1,5	1	1	0,5	0,5	0,5	1	2	2	0,5	1	0,5
EGFR		1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5
EGFR+Mz		1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5

		Bestrahlung mit 5 Gy - Abstoppen der Reaktion nach:																	
		0 Gy			60 min(T1)			180 min(T2)			360 min(T3)			720 min(T4)					
		V1	V2	V3	V1 _{T0}	V2 _{T0}	V3 _{T0}	V1 _{T1}	V2 _{T1}	V3 _{T1}	V1 _{T2}	V2 _{T2}	V3 _{T2}	V1 _{T3}	V2 _{T3}	V3 _{T3}	V1 _{T4}	V2 _{T4}	V3 _{T4}
AK		2	2	2	2	2	2	2	1,5	1,5	3	3	3	2	1,5	2	2	2	2
Int. α ₂ β ₁		1	1	1	1,5	1,5	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2,5	2
Int. α ₂ β ₁ -Mz		1	1	1	1,5	1,5	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2,5	2

		Bestrahlung mit 5 Gy - Abstoppen der Reaktion nach:																	
		0 Gy			60 min(T1)			180 min(T2)			360 min(T3)			720 min(T4)					
		V1	V2	V3	V1 _{T0}	V2 _{T0}	V3 _{T0}	V1 _{T1}	V2 _{T1}	V3 _{T1}	V1 _{T2}	V2 _{T2}	V3 _{T2}	V1 _{T3}	V2 _{T3}	V3 _{T3}	V1 _{T4}	V2 _{T4}	V3 _{T4}
AK		0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5	2	2	2	2	1,5	1	1,5	1
Int. β ₁		0,5	0,5	1	0,5	1	1	1	0,5	0,5	1,5	1,5	1	1	1	0,5	0,5	1,5	0,5
Int. β ₁ -Mz		0,5	0,5	1	0,5	1	1	1	0,5	0,5	1,5	1,5	1	1	1	0,5	0,5	1,5	0,5

		Bestrahlung mit 5 Gy - Abstoppen der Reaktion nach:																	
		0 Gy			60 min(T1)			180 min(T2)			360 min(T3)			720 min(T4)					
		V1	V2	V3	V1 _{T0}	V2 _{T0}	V3 _{T0}	V1 _{T1}	V2 _{T1}	V3 _{T1}	V1 _{T2}	V2 _{T2}	V3 _{T2}	V1 _{T3}	V2 _{T3}	V3 _{T3}	V1 _{T4}	V2 _{T4}	V3 _{T4}
AK		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TGFβ ₁		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TGFβ ₁ +Mz		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		Bestrahlung mit 5 Gy - Abstoppen der Reaktion nach:																	
		0 Gy			60 min(T1)			180 min(T2)			360 min(T3)			720 min(T4)					
		V1	V2	V3	V1 _{T0}	V2 _{T0}	V3 _{T0}	V1 _{T1}	V2 _{T1}	V3 _{T1}	V1 _{T2}	V2 _{T2}	V3 _{T2}	V1 _{T3}	V2 _{T3}	V3 _{T3}	V1 _{T4}	V2 _{T4}	V3 _{T4}
AK		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0	0
TNFα		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0	0
TNFα+Mz		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0	0

Human-Apoptose 1	
Gene name	GEA Location
BAD	(1,A) (1,B)
BAX	(1,C) (1,D)
BCL2	(1,E) (1,F)
BCL2L2	(2,A) (2,B)
BCL2L1	(2,C) (2,D)
CASP1	(2,E) (2,F)
CASP10	(3,A) (3,B)
CASP3	(3,C) (3,D)
MYC	(3,E) (3,F)
E2F1	(4,A) (4,B)
TNFRSF6	(4,C) (4,D)
TNFSF6	(4,E) (4,F)
GADD45A	(5,A) (5,B)
NOS2A	(5,C) (5,D)
MDM2	(5,E) (5,F)
NFKB1	(6,A) (6,B)
CDKN1A	(6,C) (6,D)
TP53	(6,E) (6,F)
PIG7	(7,A) (7,B)
PIG8	(7,C) (7,D)
RB1	(7,E) (7,F)
TNFRSF10B	(8,A) (8,B)
GAPD	(8,C) (8,D)
ACTB	(3,G) (4,G)
GAPD	(5,G) (6,G) (7,G) (8,E) (8,F) (8,G)
PUC18	(1,G) (2,G)

CHAO10919-Human	
Gene name	GEA Location
CD44	(1,A) (1,B)
EGF	(1,C) (1,D)
EGFR	(1,E) (1,F)
fibronectin-1	(2,A) (2,B)
Integrin a3	(2,C) (2,D)
Integrin a5	(2,E) (2,F)
TGFBR1 (ALK-5)	(3,A) (3,B)
COL4A2 (collagen 4 A2)	(3,C) (3,D)
VEGF	(3,E) (3,F)
TNFa	(4,A) (4,B)
FGFR1 (FLG)	(4,C) (4,D)
TGF-a	(4,E) (4,F)
TGFb1	(5,A) (5,B)
VCAM-1	(5,C) (5,D)
Integrin a2/LFA1b	(5,E) (5,F)
Integrin a1	(6,A) (6,B)
Integrin aV	(6,C) (6,D)
ICAM-1	(6,E) (6,F)
Integrin b1	(7,A) (7,B)
MCAM	(7,C) (7,D)
Integrin a4 (VLA-4)	(7,E) (7,F)
ICAM-3	(8,A) (8,B)
IL-3	(8,C) (8,D)
β -actin	(3,G) (4,G)
GAPDH	(5,G) (6,G) (7,G) (8,E) (8,F) (8,G)
pUC18	(1,G) (2,G)

ANHANG 3: WERTETABELLE DER WACHSTUMSKURVEN

Wertetabelle des Wachstums von HaCaT-Zellen ohne Mastzellzusatz																													
Zellzahlen zu den Tagen in Mio																													
Tag	d 0				d 1				d 2				d 3				d 4				d 5				d 6				
Versuch	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	
Dosis	0 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,300	0,390	0,330	0,340	0,645	0,480	0,570	0,565	0,915	0,900	1,080	0,965	2,235	2,250	2,085	2,190	4,500	4,170	4,305	4,325	5,925	5,970	6,675	6,190
	1 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,285	0,270	0,240	0,265	0,465	0,360	0,450	0,425	0,975	0,900	0,870	0,915	1,830	1,950	1,725	1,835	3,480	4,110	3,450	3,680	3,750	3,840	3,870	3,820
	2,5 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,180	0,240	0,270	0,230	0,330	0,420	0,450	0,400	0,825	0,660	0,780	0,755	1,200	1,680	1,575	1,485	3,105	3,300	3,105	3,170	2,535	2,745	2,940	2,740
	5 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,180	0,240	0,195	0,205	0,360	0,350	0,390	0,367	0,650	0,675	0,570	0,632	1,155	1,050	0,870	1,025	0,930	1,050	0,930	0,970	1,050	0,915	0,825	0,930
	10 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,165	0,150	0,210	0,175	0,210	0,390	0,210	0,270	0,300	0,180	0,285	0,255	0,210	0,210	0,270	0,230	0,180	0,150	0,165	0,165	0,090	0,105	0,105	0,100

Wertetabelle des Wachstums von HaCaT-Zellen mit Mastzellzusatz																													
Zellzahlen zu den Tagen in Mio																													
Tag	d 0				d 1				d 2				d 3				d 4				d 5				d 6				
Versuch	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	V1	V2	V3	MW	
Dosis	0 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,345	0,405	0,345	0,365	0,585	0,645	0,570	0,600	1,725	1,815	1,680	1,740	3,750	3,510	3,975	3,745	4,950	4,890	5,685	5,175	6,750	5,737	5,940	6,142
	1 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,240	0,330	0,240	0,270	0,570	0,525	0,495	0,530	1,650	1,620	1,545	1,605	3,105	3,315	3,375	3,265	4,875	4,860	4,830	4,855	5,220	4,725	4,680	4,875
	2,5 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,225	0,240	0,240	0,235	0,495	0,435	0,420	0,450	1,350	1,500	1,470	1,440	2,850	2,475	2,475	2,600	3,390	3,780	4,230	3,800	2,970	3,555	3,127	3,217
	5 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,195	0,210	0,255	0,220	0,525	0,435	0,390	0,450	0,675	1,050	0,870	0,865	1,170	1,245	1,350	1,255	1,635	1,725	1,515	1,625	1,485	1,462	1,237	1,395
	10 Gy	0,268	0,268	0,268	0,268	0,210	0,225	0,180	0,205	0,270	0,260	0,285	0,272	0,285	0,315	0,310	0,303	0,240	0,330	0,285	0,285	0,120	0,135	0,090	0,115	0,090	0,090	0,090	0,090

Mastzelleffekt (Quotienten aus den Mittelwerten der HaCaT-Zellen mit Mastzellzusatz und ohne Mastzellzusatz)												
Dosis	d 2	d 3	d 4	d 5	d 6							
0 Gy	1,06	1,80	1,71	1,20	0,99							
1 Gy	1,25	1,75	1,78	1,32	1,28							
2,5 Gy	1,13	1,91	1,75	1,20	1,17							
5 Gy	1,23	1,37	1,22	1,68	1,50							
10 Gy	1,01	1,19	1,24	0,70	0,90							

Strahleneffekt (Quotientendifferenz bestrahlter und unbestrahlter Proben)												
Dosis	d 2	d 3	d 4	d 5	d 6							
1 Gy	0,19	-0,05	0,07	0,12	0,28							
2,5 Gy	0,06	0,10	0,04	0,00	0,18							
5 Gy	0,17	-0,43	-0,49	0,48	0,51							
10 Gy	-0,06	-0,61	-0,47	-0,50	-0,09							

Kumulierte Quotientendifferenz (Summe der Quotientendifferenzen des Strahleneffekts)												
	1 Gy	2,5 Gy	5 Gy	10 Gy								
	0,61	0,39	0,23	-1,73								

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Oberstarzt Prof. Dr. med Viktor Meineke, meinem ganz besonderen Dank für die Betreuung dieser Arbeit aussprechen. Er gab mir die thematische Anregung, inspirierte mit vielen Hinweisen und Ratschlägen, lenkte und korrigierte und ließ mich jederzeit an seinem profunden Wissen partizipieren, was mir Orientierung und Leitschnur gab. Durch sein freundliches, kollegiales Entgegenkommen gab er mir auch die emotionale Basis und Plattform für die umfangreiche Arbeit im Labor ebenso wie für eine zielgerichtete Auswertung und Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit.

Ganz herzlichen Dank auch Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Ring für die Bereitschaft, meine Arbeit vor der Technischen Universität München zu vertreten.

In gleicher Weise danke ich Frau Dr. rer. nat. Kerstin Müller, die mir in den Jahren ihrer wissenschaftlichen Betreuung dieser Arbeit zur Freundin wurde. Ihr fachkundiger Rat, ihre Hilfe bei speziellen Methoden der Molekularbiologie, Ihre Anleitung und Unterstützung insgesamt, waren für mich grundlegende Voraussetzung für ein Gelingen dieser Arbeit. Ich danke ihr auch für die viele Zeit, in der sie geduldig meine Probleme anhörte, mir immer wieder auch neue Wege aufzeigte, in deren Verlauf ich diese Arbeit dann weiter entwickeln konnte.

Herrn Roland Ridi danke ich sehr für die exzellente Einführung in die Methoden der Arbeit im Labor sowie für seine freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Tests und bei der Anlage der Arbeit. Herrn Thomas Müller danke ich für seine große Hilfe bei diversen Computerproblemen und für seine Einführung in die verwendeten Auswertungsprogramme.

Zu großem Dank bin ich der Bundeswehr verpflichtet, die mir mit ihrem Institut für Radiobiologie und dem Team des Instituts hervorragende Arbeitsbedingungen bot.

Ein großes „Dankeschön“ auch meinem Mann und meinen Eltern, die mir beim Schreiben dieser Arbeit den Rücken freihielten und die mich über all die Jahre immer liebevoll unterstützten!

LEBENS LAUF

ANGABEN ZUR PERSON

Name: Carolina Cäzilia Steger
geb. Pfaffendorf

Geburtsdatum: 29.07.1977

Geburtsort: Augsburg

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

SCHULBILDUNG

1984 – 1988 Grundschule Rain am Lech

1988 – 1997 St. Bonaventura Gymnasium Dillingen an der Donau

1997 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

STUDIUM

1997 – 1998 Diplomstudium im Fach Violine bei Prof. Ernő Sebestyén an der Hochschule für Musik und Theater München

1998 – 2000 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

August 2000 Ärztliche Vorprüfung

Oktober 2000 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München

August 2001 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

August 2003 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

November 2004 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation

DISSERTATION

ab Januar 2002 Doktorvater: Oberstarzt Prof. Dr. med. V. Meineke, Leiter des Instituts für Radiobiologie der Bundeswehr, München

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

seit Januar 2005 Assistenzärztin im Klinikum Memmingen in der Abteilung für Gastroenterologie bei Prof. Dr. med. A. Pfeiffer