





**„Strahlungsinduzierte Mukositis als Risiko der  
Raumfahrt:  
Modelluntersuchungen an Röntgen- und  
Schwerionen-bestrahlten organotypischen  
Mundschleimhaut-Modellen“**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Viktoria Tschachojan, geb. Eckenberger

Geboren am 10.09.1982 in Mukatschewe/Ukraine

Mainz, den 30.06.2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Der Traum von der Raumfahrt .....	1
1.2	Kosmische Strahlung .....	2
1.3	Orale Mukositis .....	6
1.3.1	Die Pathogenese der oralen Mukositis .....	6
1.4	Mukositis-assoziierte Parameter .....	9
1.4.1	$\gamma$ H2AX .....	9
1.4.2	NF- $\kappa$ B .....	10
1.4.3	Zytokine und Chemokine .....	13
1.5	Zusammenspiel zwischen Fibroblasten und Keratinozyten .....	16
1.6	Organotypisches 3D-Modell oraler Mundschleimhaut .....	17
1.6.1	Humane Mundschleimhaut .....	17
1.6.2	<i>In-vivo</i> vs. <i>in-vitro</i> -Modelle .....	19
1.7	Aufgabenstellung .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1	Zellkultivierung .....	22
2.1.1	Zelllinien .....	22
2.1.2	Medien und Zusätze .....	22
2.1.3	Kultivieren und Passagieren .....	23
2.1.4	Zellzahlbestimmung .....	23
2.1.5	Mykoplasmentest (MycoAlert®) .....	24
2.1.6	Einfrieren von Zellen .....	24
2.1.7	Auftauen von Zellen .....	25
2.2	Dreidimensionales organotypisches Mundschleimhaut-Modell .....	25

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.1	Kultivierung von organotypischen Kulturen.....	25
2.2.2	Bestrahlung organotypischer Kulturen.....	26
2.2.3	Kryokonservierung von organotypischen Kulturen und Zellkulturüberständen	27
2.3	Histologie.....	28
2.3.1	Anfertigen von Kryoschnitten.....	28
2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.....	28
2.3.3	Immunhistologische Färbungen.....	29
2.3.4	Immunfluoreszenzfärbungen.....	30
2.3.5	Colorimetrische Apoptose-Färbung mit TdT FragEL Kit.....	31
2.4	Zytokinanalyse mittels ELISA.....	32
2.5	Mikroskopieren und Auswerten.....	34
2.6	Statistik.....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1	Charakterisierung des Mundschleimhaut-Modells.....	37
3.1.1	Immunfluoreszenz-Färbungen von Zytokeratinen.....	37
3.1.2	Immunfluoreszenz-Färbungen von Bindegewebsmarkern.....	41
3.2	Strahlungsinduzierte DNA-Schäden.....	44
3.3	Strahlungsinduzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B.....	48
3.3.1	Strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung.....	48
3.3.2	Strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung.....	53
3.4	Strahlungsinduzierte Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen.....	56
3.4.1	Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung in Röntgen-bestrahlten Monolayern....	56
3.4.2	Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung in organotypischen Mundschleimhaut- Modellen.....	61
3.5	Einfluss von Bestrahlung auf die Kompaktheit.....	66
3.6	Einfluss von Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten.....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>

4.1	Charakterisierung des organotypischen Mundschleimhaut-Modells .....	71
4.1.1	Expression der Differenzierungsmarker im Epithel.....	72
4.1.2	Expression der Differenzierungsmarker im Bindegewebe.....	74
4.2	Strahlungsinduzierte DNA-Schäden.....	74
4.3	Strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	77
4.3.1	Einfluss von Strahlung auf die NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung .....	77
4.3.2	Einfluss von Strahlung auf die NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung .....	77
4.4	Strahlungsinduzierte Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung .....	79
4.4.1	Strahlungsinduzierte Ausschüttung von IL-1 $\beta$ .....	79
4.4.2	Strahlungsinduzierte Ausschüttung von IL-6.....	80
4.4.3	Strahlungsinduzierte Ausschüttung von IL-8.....	81
4.4.4	Strahlungsinduzierte Ausschüttung von TNF- $\alpha$ .....	81
4.5	Strahlungsinduzierter Kompaktheitsverlust .....	82
4.6	Einfluss von Strahlung auf das Proliferationsverhalten .....	83
4.7	Ausblick.....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>89</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	89
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	91
7.3	Tabellenverzeichnis .....	93
7.4	Puffer und Lösungen .....	94
7.4.1	Zellkultur.....	94
7.4.2	Histologie .....	96
7.5	Kits.....	97
7.6	Chemikalien und Zellkulturmedien .....	97



## Inhaltsverzeichnis

---

7.7	Materialien und Geräte .....	99
7.8	Software.....	101
<b>8</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>102</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Traum von der Raumfahrt

Es liegt in der Natur des Menschen, sein Umfeld zu erforschen und neue Lebensräume zu entdecken. Doch nicht nur der Drang nach Erweiterung des Lebensraums animierte die menschliche Vorstellungskraft. Reisen ins Universum sind ein uralter Traum, der seit jeher die Menschen fasziniert und ihre Fantasie beflügelt hat. Die Vorstellung vom Weltall und einer Reise dorthin schlug sich in philosophischen Abhandlungen, fast allen Religionen und in Dichtungen nieder. Bereits in der ältesten überlieferten literarischen Dichtung aus dem 2. Jahrtausend vor Christus, dem Gilgamesch Epos, war die Rede von einer Raumfahrt, in der Gilgamesch über die Erde hinausgetragen wurde und einen Anblick der Erde aus großer Höhe beschrieb. In „Wahre Geschichten“ von Lukian von Samosata, einem syrischen Satiriker aus dem 2. Jahrhundert nach Christus, ist sehr fantasievoll und detailreich eine Reise zum Mond mit einem Segelschiff beschrieben, was einerseits etwas komisch anmuten mag, andererseits aber auf die Neugier und das Verlangen nach Erkundung des Weltraums hinweist.

Mit fortschreitender Zeit wuchs aus Fantasie und Dichtung ernstes Bestreben nach wissenschaftlicher Erforschung der Sternkonstellationen und der Gesetzmäßigkeiten des Weltalls, die trotz der unermesslichen Unterdrückung durch die Kirche essentielle Grundsteine für die heutige Forschung gelegt hat, wie zum Beispiel die von Johannes Kepler definierten „Keplerschen Gesetze“ oder etliche bahnbrechende Entdeckungen von Galileo Galilei.

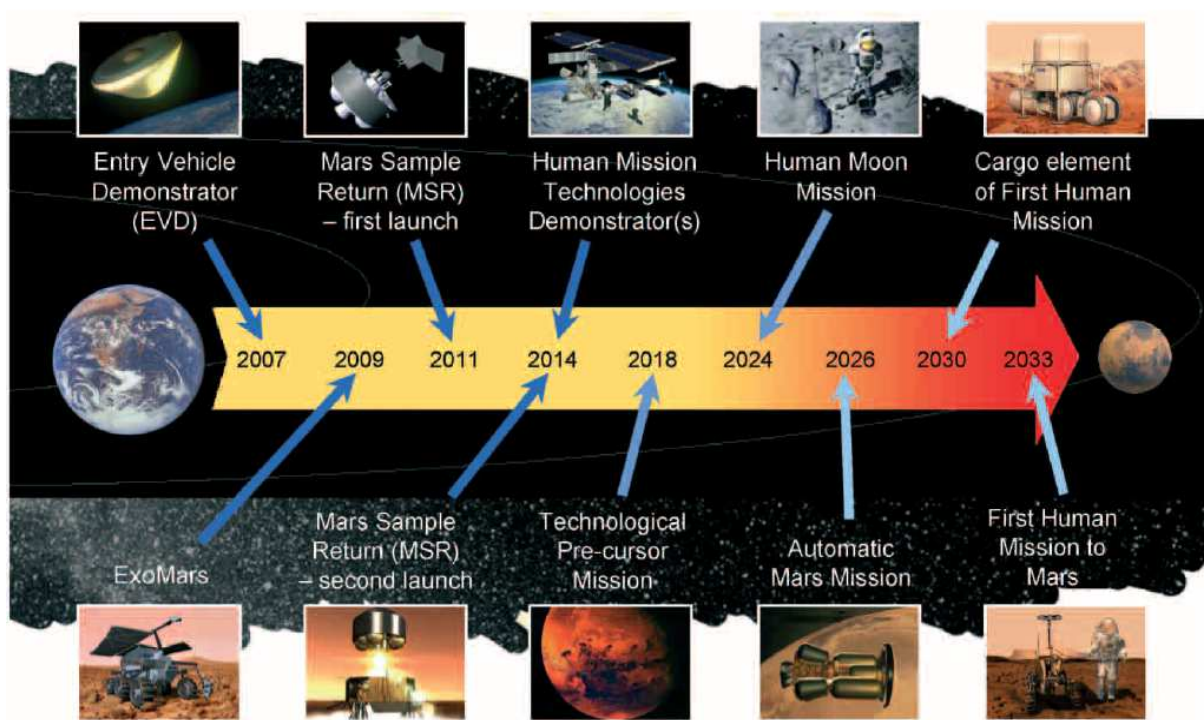
Im frühen 20. Jahrhundert wurden das erste Mal konkrete Versuche zum Bau von Raketen unternommen. Dabei ging es zunächst darum, geeignete Raketenmotoren zu bauen und einen tauglichen Treibstoff zu finden. Im Oktober 1957 erreichte der von dem sowjetischen Ingenieur Sergei Koroljow konstruierte Satellit „Sputnik“ zum ersten Mal die Erdumlaufbahn und im April 1961 konnte Juri Gagarin als erster Mensch in einer Rakete ins All fliegen. Dieses Ereignis entfachte eine große Euphorie, die am 21. Juli 1969 in der Mondlandung von Neil Armstrong gipfelte. Danach folgten noch einige bemannte Weltraum-Missionen, die nach der Apollo 17-Mission im Jahr 1972 eingestellt wurden. Dafür gab es eine Vielzahl von Gründen. Zum einen war die Technik noch nicht vollständig ausgereift und es gab mehrere

Unfälle, die meistens auf technische Fehler beim Startvorgang zurückzuführen waren, zum anderen aber wuchs das Bewusstsein für die vielen Gefahren im Weltraum, denen die Crew auf einer bemannten Mission ausgesetzt wäre. Zu diesen Gefahren gehören neben psychischen isolationsbedingten Belastungen auch die physiologischen Effekte, verursacht zum Beispiel durch die Schwerelosigkeit und die kosmische Strahlung.

## 1.2 Kosmische Strahlung

Auch wenn die letzte bemannte Weltraum-Mission über 40 Jahre zurück liegt, wurde der Traum von weiteren bemannten Flügen ins All nicht aufgegeben. Diverse Raumfahrtbehörden, zu denen ESA und NASA zählen, planen in nicht allzu ferner Zukunft Missionen mit einer menschlichen Besatzung zur weiteren Erkundung des Mondes und des weit entfernten Planeten Mars zu unternehmen. In Abbildung 1 ist die geplante Zeitachse des Aurora-Programms zur weiteren Erkundung des Sonnensystems dargestellt, wonach im Jahre 2033 die erste bemannte Mars-Mission stattfinden wird.

*Aurora Mission Roadmap*



**Abbildung 1: Aurora-Meilensteinplan für Mars-Missionen.**

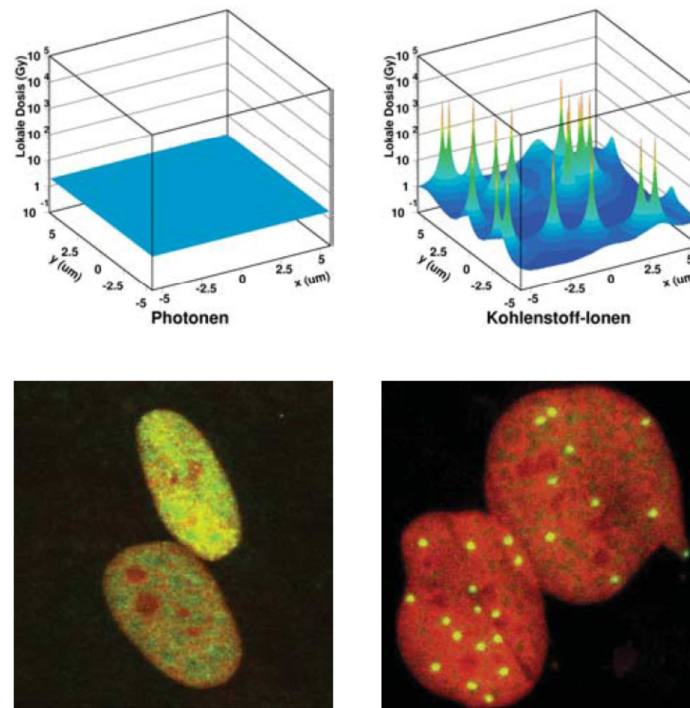
Während heute noch mit Roboter-Techniken auf dem Planeten Mars nach Lebensformen gesucht wird, soll 2033 die erste bemannte Mission zum Mars stattfinden (ESA, 2014).

Eine solche Mission zum Mars muss gründlich geplant werden. Allein der Hinflug wird wegen der großen Entfernung von der Erde auf eine Dauer von ca. 1 Jahr und die gesamte Mission auf ca. 3 Jahre geschätzt. Während dieser gesamten Phase wären die Besatzungsmitglieder der kosmischen Strahlung ausgesetzt. Kosmische Strahlung ist eine hochenergetische Teilchenstrahlung, bestehend aus Solarstrahlung (solar particle events, SPE) und galaktischer Strahlung (galactic cosmic rays, GCR). Die galaktische Strahlung besteht aus 85 % Protonen, 14 % Alpha-Teilchen und 1 % Schwerionen, zu denen auch Eisen- und Kohlenstoffionen gehören (Maalouf et al., 2011). Auch wenn der Anteil der Schwerionen in der galaktischen Strahlung nur bei 1 % liegt, stellen sie trotzdem eine sehr große Gefahr für die Astronauten dar, da sie extrem hohe Energien von über 100 keV/ $\mu\text{m}$  haben (Cucinotta et al., 1996) und es bis jetzt keine ausgereifte Technik gibt, Schwerionen abzuschirmen (Hawkey, 2005). Diese Energie ist als linearer Energietransfer (LET) angegeben und wird definiert als der mittlere Energieverlust  $\Delta E$  über eine mittlere Strecke  $\Delta l$  eines primären ionisierenden Teilchens (Hall und Giaccia, 2012). Sowohl Solarstrahlung als auch galaktische Strahlung beruht auf Spallationsereignissen (aus dem englischen: to spall – absplittern), die auftreten, wenn Partikel mit extrem hoher kinetischer Energie auf Materie, zum Beispiel DNA-Moleküle, treffen. Bei der Spallationsreaktion werden Elektronen oder Neutronen aus dem Atom- oder Molekülverband herausgelöst, und es kommt zu einer Ionisierung. Findet die Ionisierung unmittelbar an der DNA statt, so führt diese direkt zu DNA-Schäden. Bei einer indirekten Ionisierung entstehen zunächst chemische Radikale, die in einer anschließenden Reaktion ebenfalls zu DNA-Schäden führen. Strahlungsinduzierte DNA-Schäden können vielfältig sein, dazu zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Basenschäden und fehlerhafte Gerüstprotein-Verbindungen. Zur ionisierenden Strahlung gehören die Photonenstrahlung (zum Beispiel Röntgenstrahlung) und die Teilchenstrahlung. Die Teilchenstrahlung wiederum besteht zum einen aus ungeladenen Partikeln, wie zum Beispiel den Neutronen, zum anderen aus geladenen Ionen, Elektronen und Protonen, wobei Ionen einfach oder mehrfach geladen sind und schwerer sind als  $^4\text{Helium}$ -Kerne. Diese werden als Schwerionen bezeichnet.

Die Besonderheit der Teilchenstrahlung besteht in der Energiedeposition durch die Emission von Sekundärelektronen (Scholz, 2003). Teilchenstrahlung führt zu dicht lokalisierten Ionisationsereignissen entlang der Trajektorie, während bei der Photonenstrahlung die Ionisationsereignisse statistisch verteilt sind. In Abbildung 2 sind die Energiedepositionen von

# 1 Einleitung

Photonen- und Teilchenstrahlung in dreidimensionalen Diagrammen und in mikroskopischen Aufnahmen bestrahlter Zellkerne veranschaulicht.

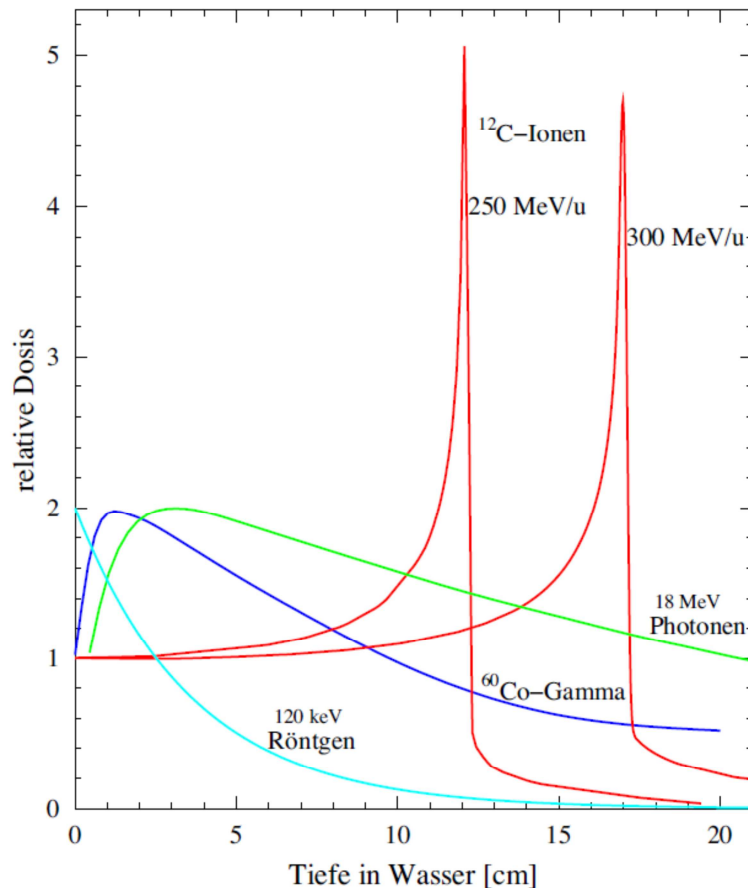


**Abbildung 2: Vergleich Photonen- und Ionenstrahlung.**

Bei Photonenbestrahlung ist die Dosis gleichmäßig verteilt (links oben), während die Teilchenstrahlung zu einzelnen spitzenförmigen Energiedepositionen führt (rechts oben). Unten sind bestrahlte Zellkerne mit markierten DNA-Schäden (gelb) dargestellt, wobei Photonen-bestrahlte Zellkerne eine gleichmäßige Grünfärbung (links unten) und Kohlenstoffionen-bestrahlte Zellkerne nur vereinzelte aber intensive grüne Punkte (rechts unten) aufweisen.

Die unterschiedlichen Arten der Energiedeposition führen dazu, dass bei gleicher Dosis die Teilchenstrahlung lokal viel massivere Schäden verursacht, die kaum repariert werden können (Heilmann et al., 1996).

Ein weiterer Unterschied zwischen Photonen- und Teilchenstrahlung besteht darin, wie sich die Strahlung verhält, wenn sie auf Materie treffen. In Abbildung 3 ist die Tiefendosis-Verteilung unter anderem von Röntgen- und Kohlenstoffionen-Strahlung dargestellt, wobei die relative Dosis gegen die Eindringtiefe in Wasser aufgetragen wurde. Im Gegensatz zur Teilchenstrahlung geben Röntgenstrahlen den Großteil ihrer Energie (Dosis) ab, sobald sie auf Materie treffen und die Dosis verringert sich kontinuierlich mit der Eindringtiefe.



**Abbildung 3: Tiefendosis-Profil unterschiedlicher Strahlungsarten.**

Gezeigt ist die Tiefendosis-Verteilung von Röntgen- (türkis), Gamma- (blau), Photonen- (grün) und Kohlenstoffionen-Strahlung (rot) in Wasser. Sobald Röntgen, Gamma- oder Photonenstrahlung auf das Wasser trifft, fällt die Dosis stetig ab, Kohlenstoffionen-Strahlung dagegen hat erst bei 12 bzw. 17 cm Tiefe ihr Dosismaximum in Form des sogenannten Bragg-Peaks (Kraft, 2005).

Die beiden roten Linien zeigen das Tiefendosis-Profil eines Kohlenstoffionen-Strahls mit unterschiedlichen Energien. Schwerionen verursachen zu Eintrittsbeginn nur wenige Ionisationsereignisse. Erst nach einer bestimmten Eindringtiefe geben sie lokal ihre gesamte Energie ab. Ein solches Dosisprofil bezeichnet man als invertiertes Dosenprofil. Die lokalen Maxima wurden nach William Henry Bragg als „Bragg Peak“ benannt und lassen sich durch Variation der Energie in ihrer Lokalisation in Strahlrichtung verändern. Dank dieser besonderen Eigenschaften, die die Teilchenstrahlung mit sich bringt, wird sie sehr erfolgreich in der Krebstherapie für die Bestrahlung von schwer zugänglichen Tumoren in sehr empfindlicher Umgebung, zum Beispiel im Kopf- und Halsbereich, eingesetzt (Kraft, 2005). Allerdings hat auch diese Radiotherapie bestimmte Nebenwirkungen, zu denen eine Entzündung des mukogingivalen Bereiches gehört (Fleckenstein et al., 2011; Jensen et al., 2011; Schulz-Ertner et al., 2002; Sonis, 2013; Sonis und Fey, 2002; Vissink et al., 2003).

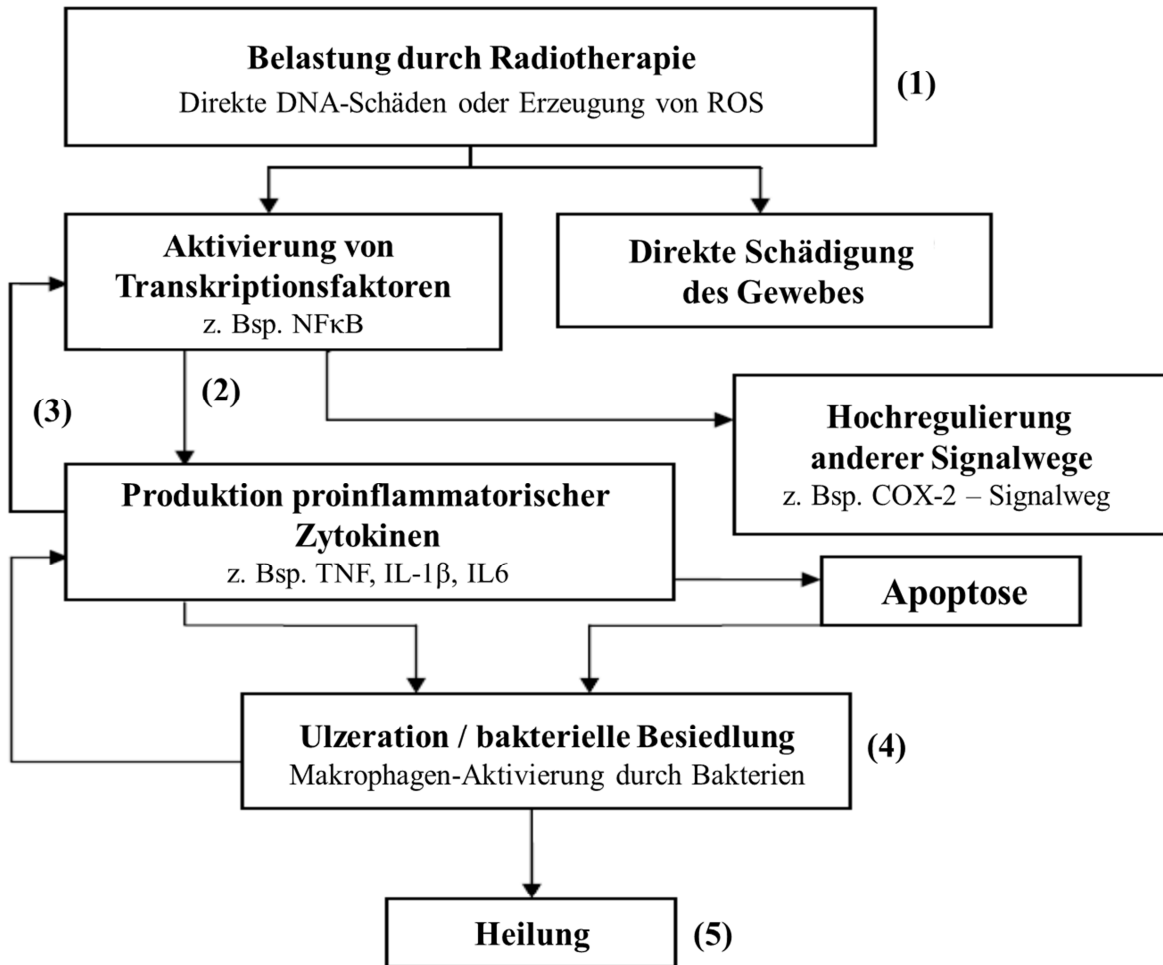
### 1.3 Orale Mukositis

Der Begriff orale Mukositis wurde in den späten 1980er Jahren geprägt (Naidu et al., 2004) und steht für eine äußerst schmerzhaft aber auch am häufigsten verbreitete Nebenwirkung bei der Behandlung von Tumoren mit Chemo- oder Radiotherapie. Die orale Mukositis geht mit großen Schmerzen, Mundtrockenheit, Schluckstörungen, Dehydrierung, Unterernährung, neurokognitiven Veränderungen und Depressionen einher (Naidu et al., 2004). Sollte es zu einer durch kosmische Strahlung verursachten Entzündung der Mundschleimhaut bei einem Astronauten während einer Mond- oder Mars-Mission kommen, kann sich diese aufgrund von eingeschränkten Möglichkeiten zur medizinischen Versorgung zur chronischen oralen Mukositis verschlimmern und im schlimmsten Fall langfristig zur Karzinogenese führen (Karin, 2009; Karin und Greten, 2005; Magne et al., 2006; Porta et al., 2009).

#### 1.3.1 Die Pathogenese der oralen Mukositis

Mukositis lässt sich nach der WHO (World Health Organisation) in 4 Schweregrade einteilen, wobei Grad 4 die schwerste Verlaufsform ist. Patienten mit oraler Mukositis 1. Grades zeigen Reizungen, Schwellungen oder Rötungen der Mundschleimhaut, die aber kaum Schmerzen verursachen, während orale Mukositis des 2. Grades Schwellungen und leichte Geschwürbildung mit mäßigen Schmerzen verursacht, eine Ernährung mit fester Nahrung aber immer noch möglich ist. Bei einer oralen Mukositis des 3. Grades handelt es sich um schwere Mukositis mit schmerzhaften Geschwüren, die nur noch eine Ernährung mit Flüssignahrung erlauben. Orale Mukositis des 4. Grades ist lebensbedrohlich, da sie bei neutropenischen Patienten (Neutropenie: Mangel an neutrophilen Granulozyten im Blut) zu Sepsis führen kann (Sonis und Fey, 2002). Des Weiteren verursacht sie äußerst starke Schmerzen, wodurch die Patienten weder trinken noch sprechen können.

Die Pathogenese oraler Mukositis lässt sich in 5 Stufen einteilen: **(1)** Initiierung, **(2)** Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, **(3)** Signal-Amplifikation, **(4)** Ulzeration und schließlich **(5)** Heilung (Sonis, 1998; Sonis, 2009). In Abbildung 4 sind diese Entwicklungsstufen als ein Diagramm dargestellt, wobei gleichermaßen auftretende Nebenereignisse wie zum Beispiel Apoptose ebenfalls aufgezeigt sind.



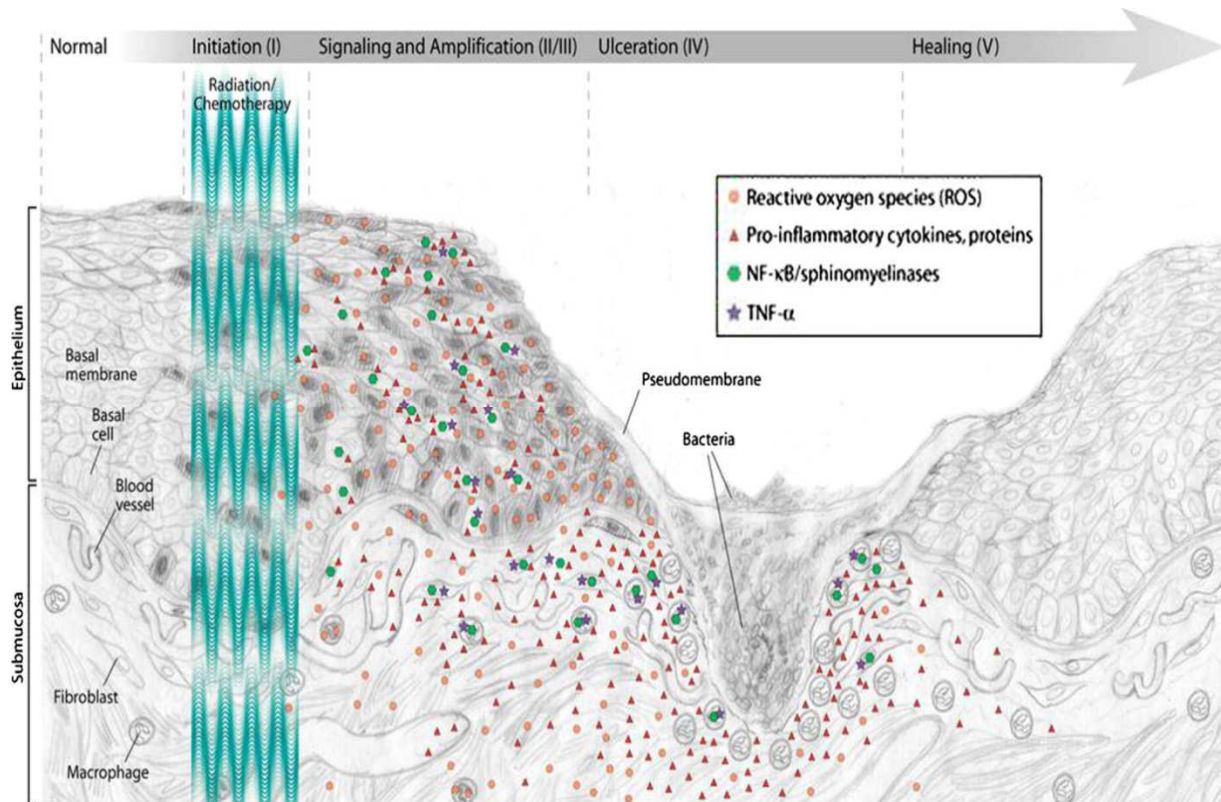
**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pathogenese oraler Mukositis.**

Die in Klammern gesetzten Zahlen stehen für die Stufen des Krankheitsverlaufs, während die Pfeile direkte Zusammenhänge anzeigen. Die Rückpfeile, wie zum Beispiel zwischen den Stufen (2) und (3) stehen für einen positiven Feedback-Mechanismus, der zur Signal-Amplifikation beiträgt. Die Abbildung ist modifiziert nach (Logan et al., 2007).

In der Initiierungsphase erzeugen die direkten und indirekten Ionisationsprozesse DNA-Schäden und Sauerstoffradikale, die sogenannten ROS (aus dem Englischen: reactive oxygen species). Die DNA-Schäden können so gravierend sein, dass diese zum sofortigen Zelltod führen, was in einem direkten Gewebeschaden resultiert. ROS interagiert mit einer ganzen Reihe biologischer Moleküle und kann neben weiteren DNA-Schäden (Cooke et al., 2003) proinflammatorische Signalkaskaden auslösen. In der 2. Stufe beginnt die Aktivierung von bestimmten Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren, allen voran des NFκB-Dimers, bestehend aus p50- und p65-Untereinheiten. Durch positive Rückkopplung findet in der 3. Phase Signal-Amplifikation statt, wodurch in kürzester Zeit in den benachbarten Zellen bis tief in das Endothel hinein ebenfalls Entzündungsprozesse induziert werden. Dies ist sehr



anschaulich in Abbildung 5 dargestellt, wo die Verteilung proinflammatorischer Zytokine bis in die Submukosa reicht.



**Abbildung 5: Verteilung von ROS und Entzündungsmarkern in der Mundschleimhaut.**

Nach der Initiierungsstufe werden Signalkaskaden induziert und amplifiziert, dargestellt durch bunte geometrische Figuren. Durch den Verlust der Gewebeintegrität und bakterielle Besiedlung kommt es zur Ulzeration, um die sich eine Vielzahl Makrophagen sammelt. Bei der Heilungsphase regeneriert sich das Epithel wieder und es bildet sich wieder gesunde Mukosa (Quelle: modifiziert nach (Sonis, 2009)).

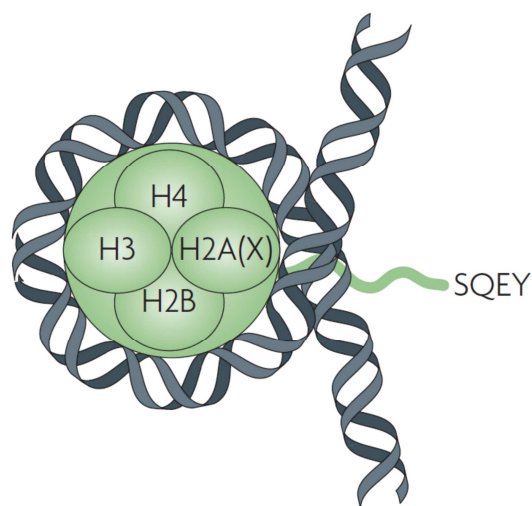
Der Kompaktheitsverlust des Epithels einerseits durch direkte strahlungsinduzierte Gewebeschädigung, andererseits durch die induzierte Apoptose oder Nekrose, führt im Zusammenspiel mit bakteriellem Befall zur Ulzeration, die für die Patienten extrem schmerzhaft sein kann und bei geschwächtem Immunsystem und ungenügender Behandlung zur Sepsis führen kann. Die abschließende Phase bildet die Heilungsphase, bei der die Epithelzellen vermehrt proliferieren und wieder eine Schutzbarriere in der oralen Mukosa bilden. Bei korrekter Behandlung und keinen negativen Nebeneinflüssen kann sich die Mundschleimhaut vollständig regenerieren und die Heilung innerhalb von ca. 14 Tagen abgeschlossen sein (Sonis, 1998).

## 1.4 Mukositis-assoziierte Parameter

Für den Nachweis der frühen Phasen strahlungsinduzierter oraler Mukositis wurden unterschiedliche Mukositis-assoziierte Parameter auf der molekularen Ebene im Zellkern und Zytoplasma (DNA-Doppelstrangbrüche, NF- $\kappa$ B-Aktivierung), extrazellulären Raum (Zytokin- und Chemokinfreigabe) und auf der makroskopischen Ebene des Gewebes (Epithelanteil, Zellintegrität) untersucht.

### 1.4.1 $\gamma$ H2AX

In eukaryotischen Zellen ist die DNA in Nukleosomen gebettet, die ihr eine strukturelle Stabilität geben. Zu den Nukleosomen gehören vier verschiedene Histone: H2A, H2B, H3 und H4 (Foster und Downs, 2005). Während H2B, H3 und H4 sich nur in einigen Aminosäure-Resten unterscheiden, bilden die H2A-Histone eine eigene Subfamilie, zu der H2A1, H2A2, H2AZ und H2AX gehören. In Säugetierzellen beträgt der Anteil von H2AX zwischen 2 und 25 % des gesamten H2A-Proteins (Rogakou et al., 1998). Bei einer Schädigung der DNA wird am C-Terminus von H2AX der Aminosäure-Rest Serin 139 phosphoryliert (Rogakou et al., 1998), wodurch Reparaturmechanismen in Gang gesetzt werden. In Abbildung 6 ist beispielhaft ein Nukleosom mit dem C-Terminus von H2AX dargestellt.



**Abbildung 6: Nukleosom mit einem Histon-Tetramer.**

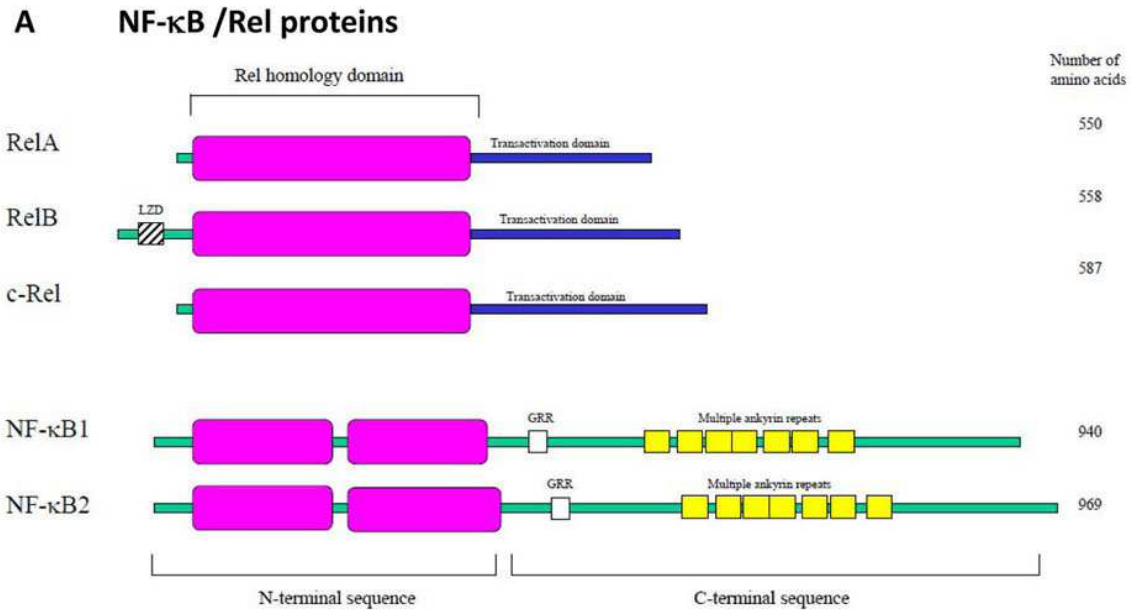
Hier ist ein Histon-Tetramer abgebildet, das beispielhaft aus H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Durch den grünen Fortsatz ist der Aminosäureschwanz von H2AX verdeutlicht, der bei einer Aktivierung am Serin-Rest (S) phosphoryliert und somit zu  $\gamma$ H2AX modifiziert wird. Die Abkürzungen SQEY stehen für Serin-Glutamin-Glutaminsäure-Tyrosin. (Quelle: (Bonner et al., 2008).

Einzelstrangbrüche und Basenschäden werden durch die Basenexzisionsreparatur und Doppelstrangbrüche (DSB) durch nicht-homologes end joining (NHEJ) oder durch homologe Rekombination behoben (Hall und Giaccia, 2012). Die DSB-Reparatur kann wegen der hohen Fehleranfälligkeit zu zahlreichen mehr oder weniger schwerwiegenden Mutationen und dadurch entweder zum Zelltod oder Tumorbildung führen (Hall und Giaccia, 2012).

Eine Quantifizierung von strahlungsinduzierten DSB kann durch Immunfluoreszenz-Markierung der phosphorylierten Histon-Einheiten  $\gamma$ H2AX und die Auszählung dieser als Foci innerhalb des Zellkerns erreicht werden. Eine solche Analyse und Quantifizierung der strahlungsinduzierten DSB ist eine in der Wissenschaft anerkannte Methode zur Beurteilung der Strahlenwirkung (Mah et al., 2010).

### 1.4.2 NF- $\kappa$ B

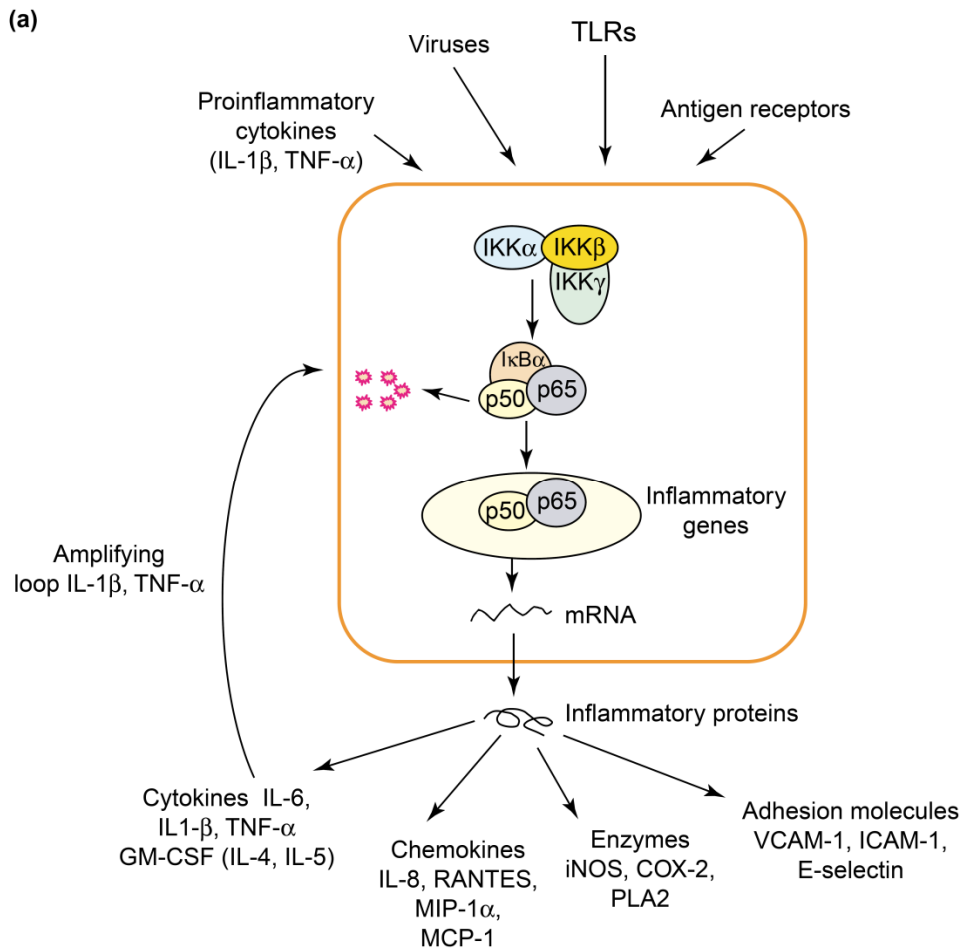
NF- $\kappa$ B (NF steht für nuclear factor) wurde zum ersten Mal 1986 als ein nukleäres Protein beschrieben, das mit der spezifischen DNA-Sequenz innerhalb des intrinsischen Enhancer-Bereichs für die leichte Immunglobulin- $\kappa$ -Kette interagiert (Sen und Baltimore, 1986). Dieser Transkriptionsfaktor liegt entweder als Homo- oder als Hetero-Dimer vor, wobei alle Untereinheiten zu der Rel-Familie gehören. Es gibt fünf verschiedene Rel-Proteine, die eine Rel-Homologie-Domäne gemein haben: p50, p52, RelA (p65), RelB, und c-Rel (Abbildung 7). Die Rel-Homologie-Domäne kodiert für Informationen, die eine Dimerisierung mit anderen Rel-Proteinen, die Interaktion mit dem inhibitorischen Protein I $\kappa$ B im Zytoplasma und die Bindung an die DNA im Zellkern ermöglichen (Ghosh et al., 1998). Bei der Dimerisierung können grundsätzlich entweder Homodimere zwischen zwei gleichen oder Heterodimere zwischen zwei unterschiedlichen Partnern entstehen, wobei p50 oder p52 vorzugsweise mit RelA, RelB oder c-Rel Heterodimere bilden. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B kann durch eine Vielzahl von externen Stimuli erfolgen, wie zum Beispiel bakterielle „Nebenerzeugnisse“ (Lipopolysaccharide, LPS (Sen und Baltimore, 1986)) oder ionisierender Strahlung (Magne et al., 2006).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Rel-Protein Familie.**

Alle fünf Untereinheiten von NF- $\kappa$ B besitzen am N-Terminus eine konservierte Rel-Homologie-Domäne (in pink dargestellt), bestehend aus ca. 300 Aminosäuren (Rangan et al., 2009). NF- $\kappa$ B1 entspricht p50 und RelA entspricht p65.

In Abbildung 8 ist der klassische Signalweg bei einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit den Heterodimeren p50/p65 dargestellt. Die Reizexposition führt zu einer Aktivierung des I $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplexes. Dabei wird I $\kappa$ B an zwei Serin-Resten phosphoryliert, wodurch eine Anlagerung von Ubiquitin ermöglicht wird. Polyubiquitinierung wiederum führt zum Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  während gleichzeitig die Assoziation des Inhibitors mit NF- $\kappa$ B unterbrochen wird. Das dadurch freigesetzte NF- $\kappa$ B-Dimer wandert in den Zellkern, bindet an die bestimmten Promotorstellen in der DNA und aktiviert die Transkription von Zielgenen. Da der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B durch Assoziation mit dem Inhibitor im inaktiven Stadium stets im Zytosol vorliegt, muss bei einem initiiierenden Ereignis das Protein nicht jedes Mal neu synthetisiert werden.



**Abbildung 8: Der klassische Signalweg bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.**

Durch eine Reihe von Initiationsignalen wird der Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes induziert (rote Fragmente), wodurch eine Translokation des Heterodimers p50/p65 in den Zellkern ermöglicht wird. Dieser induziert dort die Expression vieler inflammatorischer Gene. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  aktivieren wiederum NF- $\kappa$ B, und bewirken somit eine positive Signalverstärkung (Bonizzi und Karin, 2004).

Im Laufe der Zeit wurde die Rolle von NF- $\kappa$ B als das Schlüsselprotein bei der inflammatorischen Antwort (Barnes und Karin, 1997), Apoptose (Bours et al., 2000a; Bours et al., 2000b) und Zellproliferation (Karin et al., 2002) erkannt. Gerade wegen dieser Zusammenhänge spielt dieser Transkriptionsfaktor eine große Rolle bei der Karzinogenese (Ben-Neriah und Karin, 2011; Karin, 2009). Die Zusammenhänge zwischen den von NF- $\kappa$ B-induzierten Zytokinen wie TNF, IL-1, IL-6 oder den Chemokinen (zum Beispiel IL-8) und Tumorbildung und Tumorentwicklung sind gut untersucht (Balkwill und Mantovani, 2001) und es häufen sich immer mehr Beweise für eine direkte Verbindung zwischen Inflammation und Karzinogenese (Greten et al., 2004; Karin et al., 2002; Pikarsky et al., 2004).

### 1.4.3 Zytokine und Chemokine

Eine Entzündung ist charakterisiert durch eine erhöhte Durchblutung und Gefäßpermeabilität, verbunden mit einer Ansammlung von Wasser, Leukozyten und proinflammatorischen Markern. Zu den wichtigsten Mediatoren einer inflammatorischen Antwort gehören Zytokine und Chemokine. Gerade in den ersten Phasen einer akuten Entzündung findet durch die Ausschüttung unter anderem von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 die Signal-Amplifikation statt (Feghali und Wright, 1997), wodurch auch eine Kommunikation zwischen den Zellen erfolgen kann.

#### 1.4.3.1 Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der zum Beispiel von Makrophagen und Fibroblasten produziert wird, bindet an die sogenannten TNF-Rezeptoren und löst dadurch lokal eine Entzündung aus. Diese ist durch Fieber, Schmerzen, Rötung und Schwellung charakterisiert (Janeway und Travers, 2009). Darüber hinaus wird das Gefäßendothel aktiviert und die Permeabilität der Gefäßwände erhöht, was zu einem vermehrten Einstrom von IgG ins Gewebe führt (Vassalli, 1992). Durch die Fähigkeit dieses Zytokins die Ausschüttung von anderen Zytokinen wie IL-6 oder Chemokinen wie IL-8 zu stimulieren (Feghali und Wright, 1997), trägt TNF- $\alpha$  sehr viel zu der Signal-Amplifikation bei und induziert so die positiven Feedback-Schleife.

Eine systemische Infektion des gesamten Organismus (Sepsis) führt zur systemischen Freisetzung von TNF- $\alpha$ , wodurch es letztendlich zur vaskulären Gerinnung, Schock und folglich zum Tod kommt.

#### 1.4.3.2 Interleukin-1

Zu der IL-1 Superfamilie gehören 11 Zytokine, die über die Expression von Integrinen auf Leukozyten und Endothelzellen die inflammatorische Antwort regulieren (Dinarello, 2011). Dabei zeigen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die stärksten proinflammatorischen Effekte. Diese werden hauptsächlich von mononuklearen Phagozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, T- und B-Lymphozyten gebildet. Ähnlich wie TNF- $\alpha$  und IL-6, kann IL-1 $\beta$  Fieber auslösen, indem die Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) im Hypothalamus induziert wird. Des Weiteren bewirkt es die Proliferation von T-Zellen und die Histamin-Freisetzung aus den Mastzellen im

entzündeten Bereich, was wiederum zu einer Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität führt. Im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  wird IL-1 $\beta$  als Vorläufer-Protein nach einer NF- $\kappa$ B-Induktion exprimiert und von der Cysteinprotease Caspase-1 zum aktiven IL-1 $\beta$ -Zytokin mit der Fähigkeit, an die entsprechenden Rezeptor zu binden, umgewandelt (Contassot et al., 2012).

### 1.4.3.3 Interleukin-6

Im Organismus wird IL-6 von einer Vielzahl von Zellen sezerniert, wie zum Beispiel den Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, T-Zellen, Mastzellen und einigen Tumor-Zellen (Contassot et al., 2012; Van Snick, 1990). Die Expression von IL-6 wird in unterschiedlichen Zellen von unterschiedlichen Mediatoren induziert. So wird zum Beispiel in Fibroblasten die Produktion von IL-6 hauptsächlich durch IL-1 und in Knochenmark-Zellen von IL-3 und GM-CSF angeregt.

Die Hauptaufgabe von Interleukin-6 besteht darin, das Wachstum von B-Zellen zu stimulieren und deren Reifung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen anzuregen, zudem beeinflusst es die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen. Eine weitere Fähigkeit von IL-6 besteht in seiner Beteiligung an der Hemmung von TNF- $\alpha$ . Dieser Prozess stellt eine Kontrolle der akuten inflammatorischen Antwort durch negative Rückkopplung dar (Feghali und Wright, 1997). Eine Hochregulierung von IL-6 wurde bei einer Vielzahl von chronischen Entzündungen und Autoimmunkrankheiten beobachtet (Hirano, 1992; Tan et al., 1990). Zudem stellt der IL-6- Signalweg eine Verknüpfung zwischen Inflammation und maligner Angiogenese dar (Yin et al., 2013); so wurden erhöhte IL-6-Expressionen im Zusammenhang mit kardialen Myxomen, renalen Karzinomen und Leukämie festgestellt (Hirano, 1992).

### 1.4.3.4 Interleukin-8

IL-8 ist ein chemotaktischer Faktor für Neutrophile und Leukozyten und gehört somit zu der Gruppe der Chemokine. Hauptsächlich wird IL-8 von Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen gebildet, bei vielen Tumorzellen wird es aber auch konstitutiv exprimiert (Xie, 2001). Die inflammatorische Wirkung dieses Chemokins liegt vor allem in seinen chemotaktischen Eigenschaften auf verschiedene Zellen, insbesondere neutrophile Granulozyten, und seiner Fähigkeit, diese zu stimulieren (Huber et al., 1991). Zusätzlich spielt IL-8 zusammen mit IL-6 und TNF eine wichtige Rolle bei der Hochregulierung von

Zelladhäsionsmolekülen, wodurch es zu einer erhöhten Anheftung von Neutrophilen an Endothelzellen kommt und ihr Durchtritt durch die Gefäßwand erleichtert wird (Feghali und Wright, 1997). Erhöhte IL-8-Werte konnten in der Gelenkflüssigkeit von Rheuma-Patienten (Seitz et al., 1992) und in der Schleimhaut von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen detektiert werden (Mahida et al., 1992).

Bei der Strahlen-induzierten IL-8-Bildung gibt es je nach Gewebeart und Dosis unterschiedliche Ergebnisse (Schau et al., 2012). Gerade niedrige Dosen zwischen 3 und 19 cGy von  $\alpha$ -Strahlung induzierten bei Fibroblasten bereits nach 30 min signifikant höhere IL-8-Konzentration (Narayanan et al., 1999), die auf erhöhte IL-8-mRNAs zurückgeführt werden konnte. Auch eine Röntgen-Bestrahlung von dreidimensionalen Haut-Modellen induzierte nur bei einer Dosis von 3 cGy eine signifikante Zunahme von IL-8 (Varnum et al., 2012). Andere Studien zeigten, dass auch hohe Dosen von bis zu 10 Gy  $\gamma$ -Strahlung einen Dosis- und Zeit-abhängigen Anstieg der IL-8-Konzentrationen in Endothelzellen verursachten (Van der Meeren et al., 1997).

Eine wichtige Rolle spielt die Expression von IL-8 in der Karzinogenese. In humanen Pankreas-Krebs-Zellen zum Beispiel wird IL-8 überexprimiert und die Sekretion durch bestimmte Umgebungsbedingungen wie Hypoxie und Übersäuerung als auch durch Stressfaktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst (Xie, 2001). Auf Grundlage dessen wurde in einem *in vivo*-Versuch festgestellt, dass IL-8 sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung des Pankreas-Krebses begünstigt. Eine andere Studie zeigte, dass in Xenograft-Modellen von humanem Kolorektal- und Brustkrebs die IL-8-abhängige Angiogenese und Tumorwachstum durch MCT4-vermittelte Laktat-Freisetzung induziert wird, wodurch die Laktat/NF- $\kappa$ B/IL-8-Verknüpfung als ein wichtiger Signalweg in der Karzinogenese und Metastasierung identifiziert wurde (Vegran et al., 2011). Auch in Hirntumoren konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten IL-8-Konzentrationen und einer Gliom-Entwicklung und Malignität festgestellt werden (Brat et al., 2005).

### 1.4.3.5 Interferon- $\gamma$

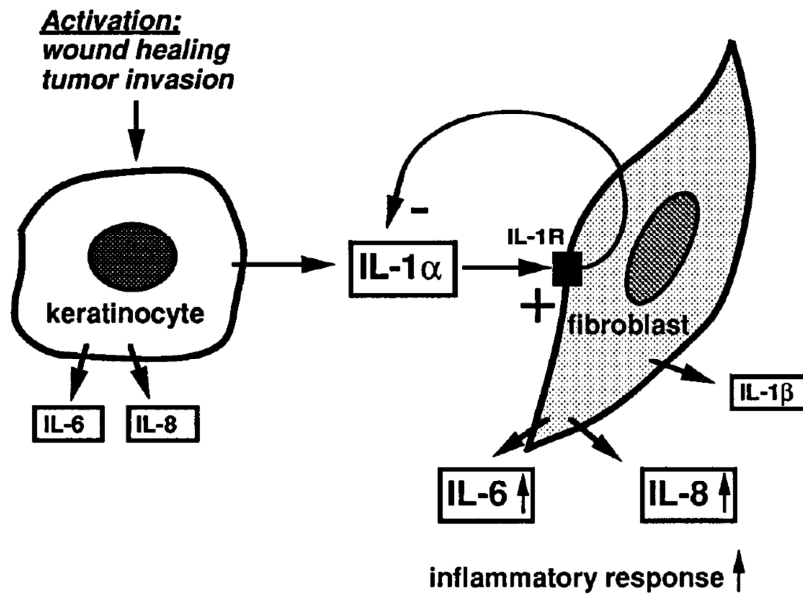
Die Interferone lassen sich in 2 Typen aufteilen. Zu den Interferonen Typ I zählen IFN- $\alpha$ , das von Leukozyten produziert wird und IFN- $\beta$ , das durch Fibroblasten ausgeschüttet wird. IFN- $\gamma$  ist ein Homodimer, gehört zu den Typ II-Interferonen und wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) gebildet. Zu den wichtigsten Eigenschaften



von IFN- $\gamma$  zählen die Inhibierung der viralen Replikation und die Induktion der Expression von MHC-Klasse-I (Haupthistokompatibilitätskomplex, aus dem Englischen: Major Histocompatibility Complex), wodurch die infizierten Zellen als Ziele für zytotoxische Angriffe erkannt werden (Janeway und Travers, 2009). Neben der Beteiligung von IFN- $\gamma$  an einigen chronischen und Autoimmun-Krankheiten (Heremans und Billiau, 1989), spielt es auch in der immunologischen Tumorbekämpfung eine wichtige Rolle. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass NK-Zellen unter anderem durch den IFN- $\gamma$ -vermittelten Signalweg die Tumorzellen supprimieren und somit der Metastasierung entgegenwirken (Smyth et al., 2002).

### **1.5 Zusammenspiel zwischen Fibroblasten und Keratinozyten**

Die Kommunikation zwischen den Zellen ist essentiell für viele physiologische Prozesse. So finden auch viele Interaktionen zwischen Keratinozyten und den darunter liegenden Fibroblasten in der Schleimhaut statt. Bei einer Co-Kultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten zum Beispiel, konnten erhöhte Expressionen von Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 (Sawicki et al., 2005), schnellere Proliferation und gesteigerte Migration der Keratinozyten (Wang et al., 2012) detektiert werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass bei einem in Co-Kulturen induzierten Wundheilungsprozess die Keratinozyten die Fibroblasten zur Synthese von Wachstumsfaktoren stimulieren, die dann wiederum bei den Keratinozyten gesteigerte Proliferation auslösen (Werner et al., 2007). Darüber hinaus spielt die Zytokin-Ausschüttung eine sehr große Rolle, die einen direkten Einfluss auf die Produktion von weiteren proinflammatorischen Markern in Fibroblasten hat. In Abbildung 9 sind schematisch die hypothetischen Interaktion zwischen Keratinozyten und Fibroblasten dargestellt. Nach dieser Hypothese setzten die aktivierten Keratinozyten hohe Konzentrationen von IL-1 $\alpha$  und niedrige Konzentrationen von IL-6 und IL-8 frei. Das sezernierte IL-1 $\alpha$  induziert dann mittels NF-IL-6 (auch CEBPB genannt, CCAAT/enhancer-binding protein beta), einem spezifischen Transkriptionsfaktor für die Immunantwort, und NF- $\kappa$ B in den benachbarten Fibroblasten die deutlich erhöhte IL-6 und IL-8 Produktion (Boxman et al., 1996). Hierdurch kommt es zu einer Signalverstärkung und Initiierung einer allgemeinen inflammatorischen Antwort.



**Abbildung 9: Hypothetisches Zusammenspiel zwischen Keratinozyten und Fibroblasten.**

Während eines Wundheilungsprozesses findet die Signalübertragung zwischen benachbarten Zellen statt, wobei das Zytokin IL-1 $\alpha$ , das von Keratinozyten sezerniert wird, die Fibroblasten zur Ausschüttung von IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$  stimuliert. Auf diese Weise kann eine Signalverstärkung und die inflammatorische Antwort induziert werden. Durch eine rezeptorvermittelte Aufnahme und intrazellulären Abbau von IL-1 können die Fibroblasten diesen Weg regulieren (Boxman et al., 1996).

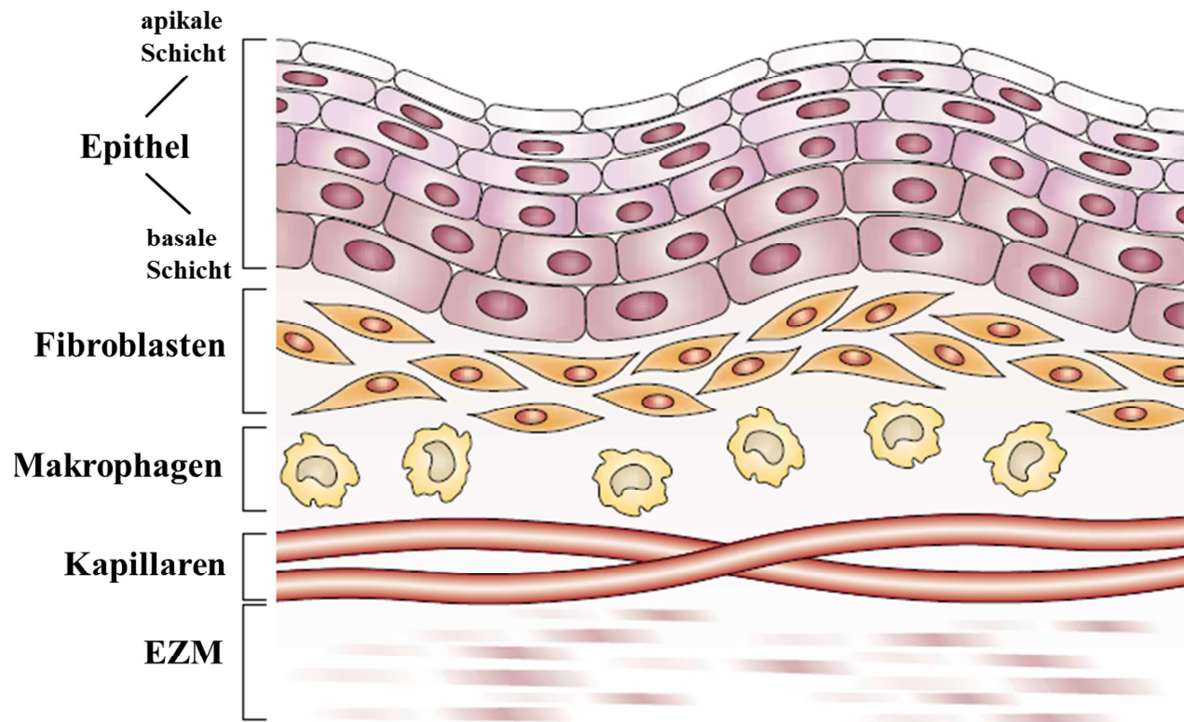
Fernerhin wurde in Co-Kulturen, bestehend aus normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NEK) und dermalen Fibroblasten (HDF), eine gesteigerte Proliferation der Keratinozyten gegenüber Monokulturen nachgewiesen (Maas-Szabowski et al., 1999). Dieser Effekt wurde dadurch erklärt, dass die Epithelzellen in Co-Kulturen vermehrt IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  exprimierten, die bei den Fibroblasten eine gesteigerte Produktion von KGF (keratinocyte growth factor) induzieren. Der Keratinozyten-Wachstumsfaktor wiederum stimuliert die Proliferation der Epithelzellen.

## 1.6 Organotypisches 3D-Modell oraler Mundschleimhaut

### 1.6.1 Humane Mundschleimhaut

Die Mundschleimhaut kleidet die Mundhöhle aus und besteht aus einer bindegewebsartigen Eigenschicht (Lamina propria) mit einzelnen Abwehrzellen (Lymphozyten, Makrophagen), die von einem mehrschichtigen hauptsächlich unverhornten Plattenepithel bedeckt ist. Im Bereich des harten Gaumens, des Zungenrückens und des Zahnfleisches ist das Epithel

verhornt. Das Epithel enthält keine Blutgefäße und ist durch eine Basalmembran klar vom Bindegewebe abgegrenzt. Des Weiteren lässt sich das Epithel aufgrund seiner Polarität in die apikale Seite (nach außen gewandt) und die basale Seite, die über die Basallamina mit dem darunterliegenden Bindegewebe verbunden ist, einteilen. In Abbildung 10 ist der Aufbau der oralen Mukosa schematisch dargestellt.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Mundschleimhaut.**

Die Mundschleimhaut besteht aus einer stratifizierten Epithelschicht, die sich in die apikale und die basale Schicht unterteilen lässt. Unterhalb des Epithels liegt das Bindegewebe, in das die Fibroblasten, Blutgefäße und Immunzellen wie Makrophagen eingebettet sind. Die extrazelluläre Matrix stellt ebenfalls einen wichtigen Bestandteil des Bindegewebes dar (Sonis, 2004).

Histologisch gesehen lässt sich die Mundschleimhaut aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede in drei Bereiche aufteilen: die auskleidende, die mastikatorische und die spezialisierte Mundschleimhaut. Die unverhornte auskleidende Mundschleimhaut findet sich am weichen Gaumen, an der Zungenunterseite und an der Innenseite der Wangen und der Lippen. Die verhornte mastikatorische Mundschleimhaut kleidet den harten Gaumen und den Bereich der Gingiva (Zahnfleisch) aus. Die verhornte spezialisierte Mundschleimhaut befindet sich im Bereich des Zungenrückens und weist Papillen auf, die unter anderem für die Geschmackswahrnehmung verantwortlich sind.

### 1.6.2 *In-vivo* vs. *in-vitro*-Modelle

Zur Untersuchung von inflammatorischen Prozessen in der oralen Mukosa wurden in der vergangenen Zeit einige unterschiedliche Tiermodelle verwendet. Bereits im Jahre 1998 wurde in einem Maus-Modell die dosisabhängige strahlungsinduzierte orale Mukositis untersucht, wobei der Schwerpunkt auf der Veränderung der Zellzahl und des Proliferationsverhaltens des bukkalen und lingualen Gewebes lag (Wardley et al., 1998). Darüber hinaus wurden Mukositis-assoziierte Parameter in Hamstern (Alvarez et al., 2003; Murray et al., 2008; Wilder-Smith et al., 2007; Yoshino et al., 2013), Ratten (Bateman et al., 2013; Shin et al., 2013) und sogar Beagle-Hunden (Watanabe et al., 2011) untersucht. Bei all diesen Studien stellte sich die Frage zu der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus. Bei einigen Studien, wo es lediglich um die morphologischen Veränderungen des oralen Epithels ging, konnten die Ergebnisse auf die menschliche Mundschleimhaut ohne Weiteres übertragen werden (Dorr et al., 2002). Bei der Betrachtung der inflammatorischen Antwort des Immunsystems während der Induktion und Pathogenese der oralen Mukositis sollte allerdings die gravierenden Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen Organismus berücksichtigt werden (Mestas und Hughes, 2004; Wardley et al., 1998). Besonders große Vorsicht ist bei der Untersuchung von proinflammatorischen Markern geboten, zum Beispiel bei den für orale Mukositis charakteristischen Zytokinen und Chemokinen. IL-8 zum Beispiel, ein Chemokin, das sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Inflammation eine große Rolle spielt (Feghali und Wright, 1997; Mestas und Hughes, 2004; Wardley et al., 1998), kann im murinen System nicht gebildet werden (Olson und Ley, 2002; Zlotnik und Yoshie, 2000).

Aus ethischen Gründen können nur sehr wenige Studien direkt am Patienten oder mit humanen Biopsien durchgeführt werden. Um die inflammatorischen Vorgänge trotzdem besser zu untersuchen und dabei die Zahl der Tierversuche so gering wie möglich zu halten, wurden in den vergangenen Jahren einige organotypische Mundschleimhaut-Gewebekulturen entwickelt, wobei deren Beschaffenheit den jeweiligen Aufgabenstellungen angepasst wurden. Es existieren bereits mehrere Studien über Chemotherapie- oder Röntgenstrahlen-induzierte orale Mukositis basierend auf organotypische Gewebekulturen (Colley et al., 2013b; Lambros et al., 2011), allerdings gibt es bis dato keine Studie über Schwerionen-induzierte Mundschleimhautentzündung auf organotypischen Kulturen.

Da dreidimensionale Co-Kulturen die *in vivo*-Situation sehr wirklichkeitsnahe nachahmen können, haben wir uns für dieses Modell entschieden, um die strahlungsinduzierten proinflammatorischen Effekte in den frühen Phasen der oralen Mukositis zu untersuchen. Das von uns verwendete Mundschleimhaut-Modell besteht aus immortalisierten humanen gingivalen (aus dem Zahnfleisch stammend) Keratinozyten (IHGK) und ebenfalls humanen immortalisierten dermalen Fibroblasten (HH4ded).

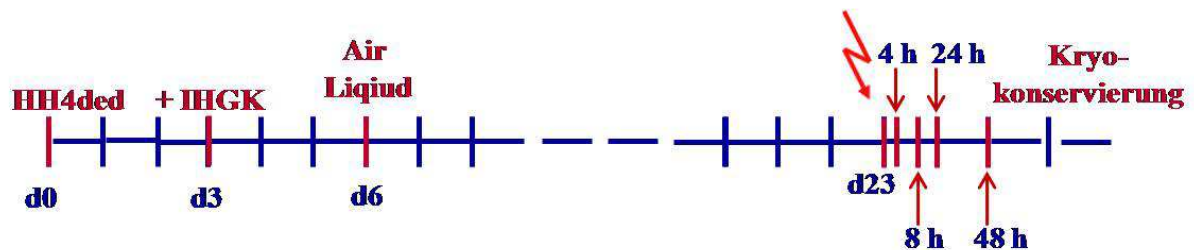
### 1.7 Aufgabenstellung

In der Strahlentherapie von Kopf- und Hals-Tumoren mit Kohlenstoff-Schwerionen wurde orale Mukositis als eine relativ häufig auftretende Nebenwirkung beobachtet (Abe, 2007; Jensen et al., 2011; Mizoe et al., 2004; Schulz-Ertner et al., 2002). Diese Befunde legen nahe, dass Astronauten auf einer Weltraum-Mission durch kosmische Strahlung dem Risiko ausgesetzt sind an oraler Mukositis zu erkranken.

Bisher wurden die meisten Erkenntnisse bezüglich oraler Mukositis entweder aus Versuchen mit Monolayer-Kulturen oder murinen Modellen gewonnen. Leider sind zweidimensionale Modelle sehr weit von der *in vivo*-Situation entfernt und die Ergebnisse aus einem Mausmodell lassen sich nicht ohne weiteres auf den humanen Organismus übertragen (Mestas und Hughes, 2004). Mit dreidimensionalen Mundschleimhaut-Modellen stehen komplexe Versuchsmodelle zur Verfügung, die eine Annäherung an die humane *in vivo*-Situation darstellen. Hier wird die natürliche und biochemische Umwelt besser nachgeahmt und eine *in vivo*-ähnliche Zell-Zell-Interaktion ermöglicht.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte mit Hilfe von Analysen auf unterschiedlichen Ebenen eingeschätzt werden, wie hoch das Risiko für Astronauten auf Weltraum-Mission wäre, an Mukositis zu erkranken. Dazu wurden die unmittelbaren und frühen Marker für die strahlungsinduzierte orale Mukositis in einem dreidimensionalen organotypischen Mundschleimhaut-Modell untersucht. Die Auswirkungen von Schwerionen- und Röntgenstrahlung auf die Kompaktheit des Gewebes, die Differenzierungsmarker des Epithels, den Aktivitätszustand von NF- $\kappa$ B und die Ausschüttung von proinflammatorischen Markern wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 sollte mit unterschiedlichen Methoden analysiert werden. In Abbildung 11 ist schematisch der Versuchsablauf dargestellt. Die Kultivierung des organotypischen Modells erstreckte sich über ca. 23 Tage, je nach

Terminbegebenheiten für die Bestrahlung. An die Röntgen- bzw. Schwerionen-Bestrahlung schloss sich nach bestimmten Inkubationszeiten die Kryokonservierung der Kulturen für immunologische Fluoreszenz- und Histo-Färbungen bzw. der Überstände für ELISA-Analysen.



**Abbildung 11: Schematischer Versuchsablauf**

Die Initiierung der organotypischen Kultur erfolgt durch die Aussaat von Fibroblasten (HH4ded) am Tag 0 (d0). Am Tag 3 (d3) werden die Fibroblasten mit Keratinozyten (IHGK) überschichtet und weitere drei Tage später (d6) wird die Kultur an der Oberfläche des Epithels der Luft ausgesetzt. Nach ca. 23 Tagen der Kultivierung erfolgten die Bestrahlung und die Kryokonservierung nach bestimmten Inkubationszeiten.

Zum Vergleich mit den Ergebnissen aus der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren, wo orale Mukositis zu den häufigsten Nebenwirkung zählt und hauptsächlich Röntgenstrahlung eingesetzt wird, wurden die dreidimensionalen Modelle zum einen mit schweren  $^{12}\text{C}$ -Ionen und zum anderen mit Röntgenstrahlung behandelt. Überdies wurden die Versuchsbedingungen nach Möglichkeit identisch gehalten und die Ergebnisse der beiden Bestrahlungsarten mit einander verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultivierung

#### 2.1.1 Zelllinien

Bei den eingesetzten Zelllinien handelt es sich zum einen um humane dermale Fibroblasten HH4ded und zum anderen um humane gingivale Epithelzellen IHGK HPV 16 GM (immortalized human gingival keratinocytes, im Folgenden IHGK genannt). Die Fibroblasten der Zelllinie HH4ded sind aneuploid, induzieren in Nacktmäusen Tumoren (Dittmann et al., 1998) und wurden uns von Prof. Dr. Rodemann (Radioonkologie, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Universitätsklinik Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Epithelzellen entstammen primären humanen gingivalen Keratinozyten, die mit dem Gen E6/E7 des rekombinanten humanen Papillomvirus Typ 16 (HPV16) immortalisiert wurden (Groger et al., 2008; Roesch-Ely et al., 2006b) und uns von Prof. Dr. Tomakidi (Abteilung für Orale Biotechnologie, Universitätsklinikum Freiburg) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zelllinie exprimiert nachweislich gewebespezifische Differenzierungsmarker ohne malignem Wachstum zu unterliegen (Roesch-Ely et al., 2006a) und eignet sich daher zusammen mit Fibroblasten zum Kultivieren von organotypischen Mundschleimhautmodellen.

#### 2.1.2 Medien und Zusätze

Die Zelllinie HH4ded wurde in DMEM high glucose-Medium mit 4 mM L-Glutamin und 10 % FCS kultiviert. Für die IHGK-Zellen wurde serumfreies Keratinocyte Growth Medium verwendet, welches mit allen mitgelieferten Zusätzen versetzt wurde. Die Kultivierung der organotypischen Kulturen erfolgte in FAD-Medium. Die Rezepturen aller Medien befinden sich im Anhang.

### 2.1.3 Kultivieren und Passagieren

Die Durchführung aller Zellkulturarbeiten erfolgte in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe eins unter einer Sterilbank. Die Kultivierung der beiden Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> für Fibroblasten bzw. 75 cm<sup>2</sup> für Epithelzellen in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, unter Verwendung von 5 bzw. 10 ml Nährmedium. Für die ideale Nährstoffversorgung der Zellen wurde das Medium zweimal pro Woche gewechselt. Alle angefallenen Abfälle wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 90–95 % wurden HH4ded-Zellen in eine neue Flasche passagiert. Dazu erfolgte zunächst ein Waschschrift mit 25 ml EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) gelöst in 1x PBS pH 7,4 (phosphate buffered saline), dann wurden die Zellen durch eine 1-minütige Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion diente das verwendete Kulturmedium (DMEM, 10 % FCS). Das Splitten erfolgte in der Regel im Verhältnis 1:200 in frischem DMEM-Medium (5 ml) für eine Wachstumszeit von einer Woche.

Die IHGK-Zellen wurden analog zu den Fibroblasten passagiert. Da diese Zelllinie in serumfreien Medium wächst, wurden zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion 7 ml IHGK-Medium zuvor mit 1 ml FCS versetzt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 190 g für 5 min und 21 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml frischem IHGK-Medium ohne FCS resuspendiert und im Verhältnis 1:10 für eine Wachstumszeit von einer Woche ausgesät.

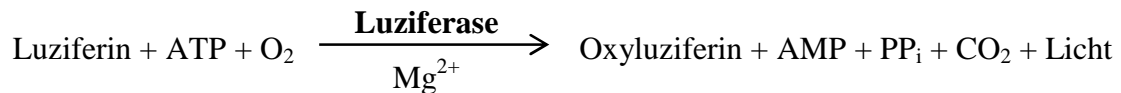
### 2.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe des Zellzählgeräts CASY<sup>®</sup> 1TT. Das Messprinzip basiert auf der Widerstandsmessung der angesaugten Zellen mittels elektronischer Pulsflächenanalyse. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension mit 10 ml Casy<sup>®</sup> ton-Isotonlösung gemischt und diese anschließend vom Gerät mittels einer Kapillare angesaugt und detektiert. Durch manuelle Anpassung des Messbereichs konnten Zellartefakte und tote Zellen ausgeschlossen und die Zellzahl pro ml sowie Durchmesser (µm) und Volumen (fl) der Zellen direkt am Display abgelesen werden.



### 2.1.5 Mykoplasmentest (MycoAlert®)

Eine Kontamination mit Mykoplasmen stellt eine Erschwernis in der Kultivierung von *in vitro*-Kulturen dar und kann diverse Untersuchungsergebnisse stark beeinflussen (Agarwal et al., 2013). Mykoplasmen sind zellwandlose parasitär lebende Bakterien, die sich aufgrund ihrer geringen Größe nicht durch Sterilfilter zurückhalten lassen und lichtmikroskopisch nicht zu erkennen sind. Mit Hilfe des Tests „Mycoplasma Detection Assay MycoAlert®“ lässt sich eine Kontamination mit Mykoplasmen enzymatisch nachweisen. Bei diesem Test bedient man sich der enzymatischen Umsetzung von ATP zu AMP in den Zellkulturüberständen der zu untersuchenden Proben, bei der Lumineszenz entsteht. Im ersten Schritt wurde der ursprüngliche ATP-Gehalt der Probe ermittelt, indem diese mit dem MycoAlert® Reagenz versetzt und 5 min inkubiert wurde. Die Biolumineszenz-Reaktion kann mit folgender Formel beschrieben werden:



Als Nächstes fügte man das spezifische MycoAlert® Substrat hinzu, das nur von mykoplasmenischen Enzymen zu weiteren ATP-Molekülen umgesetzt werden kann und analysierte nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min luminometrisch den daraus resultierenden ATP-Gehalt. Betrug der errechnete Quotient (Messung 2/Messung 1) einen Wert  $< 1$ , so konnte die Probe als negativ für Mykoplasmen eingestuft werden. Bei einem Quotientenwert  $> 1$ , wäre die Probe mit Mykoplasmen kontaminiert, dies kam aber nicht vor. Um Sicherheitsbestimmungen während des Bestrahlungsprozesses an der GSI Darmstadt zu erfüllen, wurden alle Proben zusätzlich von einem externen Anbieter (Minerva Biolabs GmbH, Berlin) auf Mykoplasmen-RNA getestet.

### 2.1.6 Einfrieren von Zellen

Für das optimale Wachstum der organotypischen Kulturen wurden Zellen niedriger Passagen eingesetzt. Dafür mussten frische Zellen mit niedrigen Passagenzahlen eingefroren werden. Das Einfrieren von Zellen begann mit dem Ablösen und Zählen der Zellen. Dem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 190 g folgte die Resuspendierung des Pellets in der entsprechenden Menge kaltem Nährmedium, das mit 10 % DMSO versetzt wurde, um eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml zu erreichen. Durch das zugesetzte DMSO wurde der Eiskristallbildung vorgebeugt. Jedes Kryoröhrchen wurde mit 1 ml befüllt und in einem

Einfrierbehälter, der mit Isopropanol gefüllt war, über Nacht bei  $-80\text{ °C}$  langsam und schonend heruntergekühlt. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

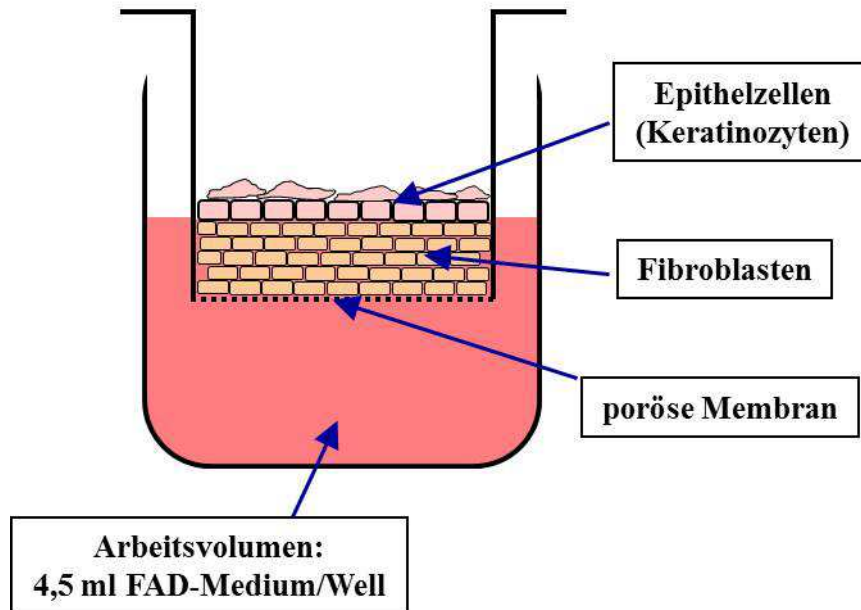
### 2.1.7 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bis zu ihrem Einsatz in Flüssigstickstoff bei  $-196\text{ °C}$  gelagert. Das Auftauen der Zellen begann mit dem Schwenken des Kryoröhrchens in einem  $37\text{ °C}$  warmen Wasserbad. Es folgten die Überführung der Zellsuspension in 9 ml Medium und ein Zentrifugationsschritt für 7 min bei 300 g. Zum Schluss wurde das Pellet in frischem Medium aufgenommen und die Zellsuspension so auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt, dass  $\frac{1}{4}$  der Zellen in die eine und  $\frac{3}{4}$  in die andere gefüllt wurden. Um die restlichen DMSO-Rückstände zu entfernen, wurde 24 h später noch einmal ein Medienwechsel vorgenommen.

## 2.2 Dreidimensionales organotypisches Mundschleimhaut-Modell

### 2.2.1 Kultivierung von organotypischen Kulturen

Für die Kultivierung des Mundschleimhaut-Modells wurden kommerzielle ThinCerts<sup>TM</sup> verwendet. Hierbei handelt es sich um Einsätze für Well-Platten mit einer durchlässigen Membran aus Polyethylen mit Porengröße von  $0,4\text{ }\mu\text{m}$  und einer Fläche von  $1,131\text{ cm}^2$ . Zunächst wurden die Membranen dieser Einsätze mit Gelatine beschichtet, dazu wurden ca. 3 Tropfen einer 0,2 %iger Gelatine-Lösung pro Membran pipettiert, in die entsprechenden Wells einer 12Well-Platte gehängt und anschließend für 30 min bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Die überschüssige Gelatine-Lösung wurde vorsichtig abgesaugt. Anschließend folgte die Aussaat der Fibroblasten mit einer Zellzahl  $4 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  in  $600\text{ }\mu\text{l}$ /Well HH4ded-Medium. In den Wells unter den ThinCerts<sup>TM</sup> wurde jeweils 1 ml desselben Mediums vorgelegt. Drei Tage später wurden die ThinCerts<sup>TM</sup> mit der Fibroblastenschicht in tiefe 12Well-Platten mit  $4,5\text{ ml}$  vorgelegten FAD-Medium umgesetzt, das verbrauchte Medium aus den Einsätzen abgesaugt und durch  $3 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$  Keratinozyten in  $600\text{ }\mu\text{l}$ /Well FAD-Medium ersetzt. Nach drei weiteren Tagen wurde das Medium aus den Einsätzen abgesaugt und die Kulturen dem „Air-Lift“-Zustand ausgesetzt (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des 3D-Modells.**

Während die dreidimensionalen Kulturen im ThinCert<sup>®</sup> oben dem „Air-Lift“-Zustand ausgesetzt sind, werden sie von unten durch die permeable Membran aus dem Medium mit Nährstoffen versorgt, wodurch ein organotypischer Zustand der Durchblutung simuliert wird.

Der Medienwechsel erfolgte zwei Mal pro Woche, wobei das Mundschleimhaut-Modell insgesamt zwischen 21 und 24 Tagen kultiviert wurde, je nach den vorgegebenen Bestrahlungsterminen.

### 2.2.2 Bestrahlung organotypischer Kulturen

Die Bestrahlung der organotypischen Kulturen fand am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH in Darmstadt statt. Für einen schonenden Transport der Zellen wurden die 12Well-Platten mit den Kulturen am Tag des Experiments bis zum oberen Rand mit vorgewärmtem FAD-Medium aufgefüllt, mit einer luftdurchlässigen selbstklebenden Folie versiegelt und in einer Styroporbox mit einem PKW nach Darmstadt transportiert. An die Bestrahlung der Zellen schlossen sich der Rücktransport nach Mainz und die Kryokonservierung an (siehe Kapitel 2.2.3). Während der Bestrahlung wurden die Zellen bei Raumtemperatur gehalten, lediglich bei langen Wartezeiten auf die Schwerionen-Bestrahlung erfolgte eine zwischenzeitliche Lagerung der Kulturen im Brutschrank.

Für die Röntgen-Bestrahlung des Mundschleimhaut-Modells kam die Isovolt DS1 Röntgenröhre zum Einsatz mit einer Beschleunigungsspannung von 250 kV und einer

Stromstärke von 16 mA. Der Aufbau der Röhre sah vor, dass die 12Well-Platten mit den organotypischen Kulturen in waagerechter Position bestrahlt wurden, wobei der Abstand der Platten vom Fokus der Röhre über die Strahlungsstärke während des Versuchs entschied. Hier wurde mit einem Abstand von 30 cm gearbeitet, so dass alle Zellen mit etwa 1 Gy/Minute bestrahlt wurden. Die Bestimmung der Dosis erfolgte mit dem Dosimeter SN4. Dieses befand sich während des Versuchs direkt unterhalb der Platten, wodurch eine zuverlässige Dosimetrie gewährleistet war. Die Zellen wurden mit 2, 4, 10 oder 30 Gy bestrahlt.

Ebenfalls an der GSI fand die Bestrahlung der Zellen mit schweren  $^{12}\text{C}$ -Ionen am ehemaligen Patientenstrahlplatz (Cave M) des Schwerionensynchrotrons (SIS) statt. Dort wurden die Kulturen mit einer Strahlenergie  $E_{\text{max}}$  von ca. 155 MeV/u in der Mitte eines 20 mm ausgedehnten Bragg-Peaks (SOBP = Spread Out Bragg Peak, mittlerer LET von 300 keV/ $\mu\text{m}$ ) bestrahlt. Der waagrecht austretende Strahl der Beschleunigeranlage erforderte das aufrechte Aufstellen der 12Well-Platten. Dazu wurden spezielle Plexiglas-Vorrichtungen angefertigt, wo die Platten eingespannt und somit in die aufrechte Position gebracht werden konnten. Da die versiegelnden Folien auf den 12Well-Platten während des Transports eventuell durchgeweicht und dadurch undicht werden konnten, wurden die Folien und die Medien vor der Bestrahlung erneuert. Für die Bestrahlung wurden die eingespannten Platten senkrecht zur Strahlrichtung auf ein Förderband gestellt. Zum Abbremsen des Strahls wurde vor die Probenbehälter eine 20 mm dicke Plexiglasplatte angebracht. Die Dicke der sich vor den Proben befindlichen Plexiglas-Platten der Einspann-Vorrichtungen wurde bei der Berechnung des Bestrahlungsabstandes und des SOBP berücksichtigt. Die zu bestrahlenden Platten wurden anhand eines Laserstrahlensystems so ausgerichtet, dass sich die Einsätze mit den Kulturen in der Mitte des SOBP befanden. Vom Kontrollraum aus konnte dann sowohl der Schwerionenstrahl, als auch das Förderband gesteuert werden. Bestrahlt wurden 8 Proben pro Platte mit Dosen von 2, 4 bzw. 10 Gy.

### 2.2.3 Kryokonservierung von organotypischen Kulturen und Zellkulturüberständen

Die Konservierung der Überstände und Kulturen begann mit der Entnahme der Überstände aus den Wells unter den ThinCerts<sup>TM</sup> und ihrer Zentrifugation bei 4 °C und 430 g für 10 min, um mögliche Zellreste zu entfernen. Die Lagerung der Überstände erfolgte bei -80 °C bis zur Messung der Zytokine.

Die Einsätze mit den Kulturen wurden in einer Petrischale mit 1x PBS von außen und innen vorsichtig gewaschen und das PBS aus den ThinCerts™ wieder abgesaugt. Auf einen -80 °C vorgekühlten Metallblock wurde ein Tropfen TissueTek® gegeben, dann wurde das ThinCert™ darauf gesetzt und direkt mit etwas TissueTek® gefüllt, so dass die Kultur lückenlos bedeckt war. Nach dem vollständigen Durchfrieren der Kulturen bei -80 °C folgte bis zur weiteren Verarbeitung die Lagerung bei -20 °C.

### **2.3 Histologie**

#### **2.3.1 Anfertigen von Kryoschnitten**

Für die histologischen Analysen der Kulturen wurden mit einem Kryostat Kryoschnitte angefertigt. Hierfür wurden die eingebetteten Kulturen mit einer runden Stanze aus dem Einsatz ausgelöst und mit dem Skalpell in der Mitte durchgeschnitten. Eine der Hälften wurde mit TissueTek® auf dem Probenhalter des Kryostats aufgeblockt und bei -60 °C schockgefroren, die andere Hälfte wurde wieder eingelagert. Nach dem Durchfrieren der Probe erfolgte bei einer Temperatur von -20 °C das Anfertigen von 10 µm dicken Kryoschnitten. Diese wurden auf einem Objektträger aufgenommen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur Färbung bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) diente der Beurteilung von allgemeinen morphologischen Aspekten der Kulturen wie Dicke, Beschaffenheit der Epithel- und Fibroblastenschichten und mögliche strahlungsinduzierte Strukturschäden. Dazu wurden zuvor eingefrorene Kryoschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und in Aceton für 7 min fixiert. Nach vollständigem Trocknen der Schnitte unter dem Abzug wurden diese zur Färbung der Zellkerne für 1 min in Hämalaun-Lösung inkubiert. Es folgten ein zweimaliges Schwenken in Leitungswasser, ein kurzes Eintauchen in Ammoniak-Wasser und ein erneutes Schwenken in Leitungswasser. Das nachfolgende Eintauchen in Eosin-Lösung diente dem Anfärben von basischen Zellstrukturen wie Plasmaproteinen. Zum Abwaschen von überschüssigem Eosin wurden die Objektträger einmal in Leitungswasser und dann zweimal

in A. dest. geschwenkt. Zur Entwässerung diente dann eine aufsteigende Alkoholreihe aus 70, 80, 96 und 3x 100%igem Isopropanol. Es folgte ein Schwenken in zwei Xylol-Küvetten, und eine mindestens 30 s lange Inkubation in der 3. Küvette. Anschließend wurden die Schnitte mit Roti-Histokitt II eingedeckt.

### 2.3.3 Immunhistologische Färbungen

Als Marker für proliferierende Zellen wurde das Ki-67-Protein angefärbt (Gerdes et al., 1983). Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches nur während den aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) vorhanden ist und in nicht-proliferierenden Zellen (G0-Phase) fehlt. Die Färbung begann mit der Fixierung der Schnitte für 7 min in Aceton. An das nachfolgende Trocknen der Objektträger schlossen sich die Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift (Dako Pen) und die Rehydrierung für 5 min in 1x PBS an. Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen diente ein einstündiges Blocken mit 3%iger BSA/PBS-Lösung bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in 1x PBS gewaschen. Der Primärantikörper (anti-human Ki-67) wurde 1:50 in 1,5%iger BSA/PBS-Lösung verdünnt, jeder Schnitt mit 60 µl vollständig bedeckt und 1 h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1x PBS und eine 15-minütige Inkubation mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/1x PBS, um endogene Peroxidasen zu deaktivieren. Dem dreimaligen Waschen der Objektträger in 1xPBS schloss sich das Auftragen des sekundären Antikörpers an. Hierbei handelte es sich um einen HRP-gekoppelten Antikörper (donkey anti-rabbit HRP), der 1:100 in 1x PBS verdünnt und 30 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten in einer feuchten Kammer inkubiert wurde. Auf diesen Schritt folgte erneut zweimaliges Waschen in 1x PBS und eine 10minütige Inkubation mit DAB<sup>+</sup>-Lösung (1 Tropfen DAB<sup>+</sup> auf 1000 µl Puffer) an. Die DAB<sup>+</sup>-Lösung wurde anschließend abgeklopft und die Objektträger mit den Schnitten erst kurz in 1x PBS und dann in A. dest. getaucht. Den letzten Schritt bildeten die Färbung der Zellkerne mit Hämalaun, die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol und das Eindecken der Schnitte (siehe HE-Färbung).

## 2.3.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Die für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die eingesetzten Verdünnungen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen mit den entsprechenden Verdünnungen

Antigen	Primärantikörper		Sekundärantikörper	
	Bezeichnung/ Verdünnung	Hersteller	Bezeichnung/ Verdünnung	Hersteller
panZytokeratin (panCK)	mouse anti-human 1:50	Dako	donkey anti-mouse DyLight 488 1:800	Dianova
Zytokeratin 4 (CK4)	rabbit antihuman 1:250	Biomol, Epitomics	donkey anti-rabbit DyLight 594 1:800	Dianova
Zytokeratin 10 (CK10)	rabbit anti-human 1:300	Epitomics	donkey anti-rabbit DyLight 488 1:800	Dianova
Zytokeratin 14 (CK14)	mouse antihuman 1:250	Santa Cruz	donkey anti-mouse DyLight 488 1:800	Dianova
Laminin $\alpha$ -1	mouse anti-human 1:50	Santa Cruz	donkey anti-mouse DyLight 488 1:800	Dianova
Fibronektin	goat anti-human 1:100	Santa Cruz	donkey anti-goat DyLight 594 1:800	Dianova
Kollagen IV (Col IV)	mouse anti-human 1:100	Santa Cruz	donkey anti-mouse DyLight 488 1:800	Dianova
NF $\kappa$ B p50	rabbit anti-human 1:50	Santa Cruz	donkey anti-rabbit DyLight 594 1:800	Dianova
NF $\kappa$ B p65	rabbit anti-human 1:50	CellSignaling	donkey anti-rabbit DyLight 594 1:800	Dianova
$\gamma$ H2AX	mouse anti-human 1:500	Millipore	donkey anti-mouse DyLight 488 1:800	Dianova

Zunächst wurden die Kryoschnitte wie bei immunhistologischen Färbungen 7 min in Aceton fixiert und unter dem Abzug getrocknet. Nach dem Umranden der Kryoschnitte mit dem Fettstift folgte ein 2-minütiges Rehydrieren in 1x PBS. Zum Blocken diente in 1x PBS verdünntes 2%iges Esel-Serum, welches für 45 min inkubiert wurde. Die Einwirkzeit der Erstantikörper, die in 1%igem Esel-Serum verdünnt wurden, betrug 1 Stunde. Es folgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 3 min in 1x PBS. Die Sekundäntikörper waren DyLight-konjugiert, wurden 1:800 in 1x PBS verdünnt und für 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Hieran schloss sich ein erneutes dreimaliges Waschen der Objektträger für 3 min in 1x PBS an. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch den DNA-Farbstoff DAPI, welcher in dem verwendeten Eindeckmedium enthalten war. Den Abschluss bildete die Versiegelung der Ränder mit Nagellack am nächsten Tag. Für die visuelle Darstellung der DSB in der DNA mittels  $\gamma$ H2AX-Fluoreszenzfärbung wurden einige Veränderungen des Standardprotokolls für die  $\gamma$ H2AX-Markierung gemäß einer aktuellen Studie vorgenommen (Crowe et al., 2011). Für eine bessere Auflösung der  $\gamma$ H2AX-foci wurden statt 10  $\mu$ m nun 8  $\mu$ m dicke Kryoschnitte angefertigt, die sofort und ohne Zwischenlagerung bei -20 °C für die Färbung verwendet wurden. Die frischen Kryoschnitte wurden direkt nach der Aufnahme auf einem Objektträger zunächst 10 min in 2,25%iger PFA-Lösung, dann weitere 5 min in eiskaltem 100%igen Methanol fixiert und dann in 1x PBS gespült. Da die Proben für weitere Färbungsschritte mit einem Fettstift umrandet sein mussten, wurde mit einem fusselfreien Tuch um die Schnitte herum trocken gewischt, wobei drauf geachtet wurde, dass die Schnitte nicht austrockneten. Nach einer 10-minütigen Inkubation mit 0,5%iger Triton-X100-Lösung in 1x PBS und anschließendem dreimaligen Waschen in 1x PBS, wurden die Proben 30 min mit 0,5%iger BSA-Lösung in 1x PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 h mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 1) verdünnt in 0,5%iger BSA-Lösung inkubiert und wie bei den anderen Immunfluoreszenzfärbungen fortgesetzt.

### 2.3.5 Colorimetrische Apoptose-Färbung mit TdT FragEL Kit

Zur Beurteilung des apoptotischen Zelltods wurde eine Apoptose-Färbung mit Hilfe des TdT FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kits der Firma Calbiochem® durchgeführt. Dabei bindet das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) an die durch Apoptose freigelegten 3'-OH-Gruppen an den Enden der DNA-Fragmente und katalysiert so die

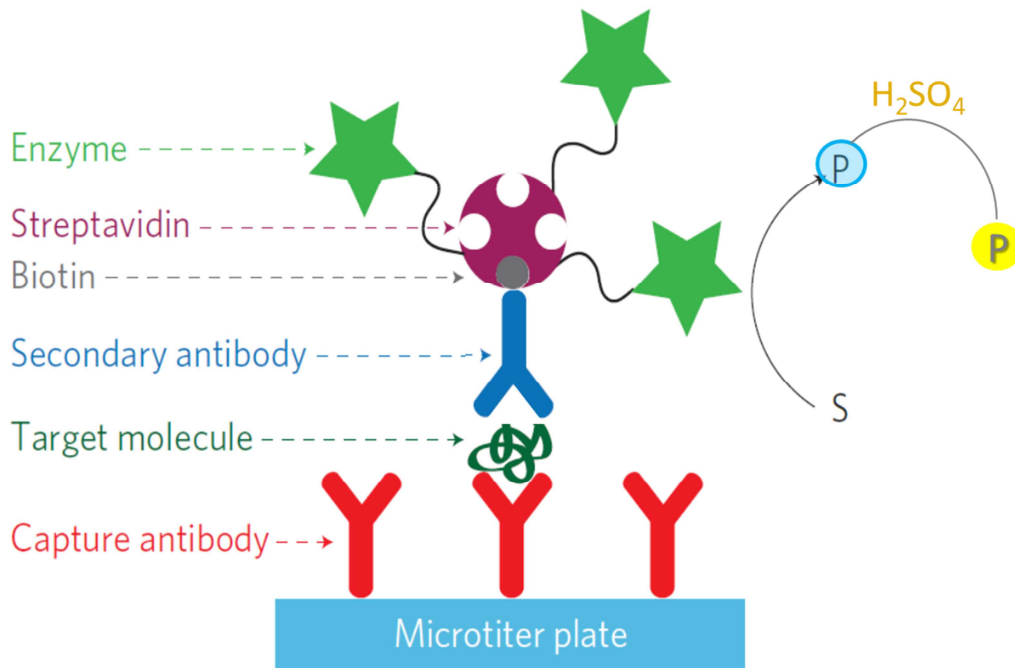


Addition von Biotin-gelabelten Desoxynucleotiden. Biotinylierte Nukleotide binden dann wiederum Meerrettichperoxidase- (HRP) konjugiertes Streptavidin. Anschließend reagiert Diaminobenzidin (DAB) mit der gelabelten Probe und erzeugt ein unlösliches braunes Substrat an der Stelle der DNA-Fragmentierung, welche anschließend detektiert werden kann. Für die Durchführung der Färbung wurden die Objekte zunächst 15 min mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, 15 min in 1x TBS gewaschen und mit Fettstift (ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen) umrandet. Für die Permeabilisierung wurde jedes Objekt für 10 min mit 30 µl Proteinase K (2 mg/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen für 2 min mit 1x TBS. Als Positivkontrolle diente ein Schnitt, welcher für 20 min bei RT mit DNase (1 µg/ml in 1x TBS mit 1 mM MgSO<sub>4</sub>) inkubiert und erneut in 1x TBS gewaschen wurde. Um die endogenen Peroxidasen zu deaktivieren, erfolgte eine Inkubation der Proben mit 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in Methanol für 5 min bei RT. Daran schloss sich die Inkubation der Schnitte mit Äquilibrierungspuffer (1:5 in A. dest. verdünnt) für 15 min bei RT. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Puffer vorsichtig abgeklopft mit unmittelbar sich anschließender Zugabe von 30 µl TdT Reaktionsmix (1:20 TdT-Enzym und TdT-Labeling Reaktionsmix). Danach wurden diese für 90 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um dem Austrocknen der Proben während der Inkubationszeit vorzubeugen, wurde jeder einzelne Schnitt mit Parafilm bedeckt. Als Negativkontrolle diente ein nur mit Aqua dest. bedecktes Objekt. Es folgten ein Waschschrift in 1x TBS, ein Inkubationsschritt für 5 min mit der Abstopplösung und wieder ein Waschschrift mit 1x TBS. Nach dem Abklopfen des restlichen Puffers wurde für 10 min mit Blocking Buffer und anschließend für 30 min mit der Konjugat-Lösung (50X Konjugat verdünnt 1:50 in Blocking Buffer) inkubiert. Daran schloss sich die Inkubation mit der DAB-Lösung (1 DAB- und 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Urea-Tablette in 1 ml Leitungswasser) für weitere 10 min. Nach einem Waschschrift in A. dest. wurden alle Schnitte für die Zellkern-Markierung mit Methylgrün für 3 min gegengefärbt, 3 Mal in 100%igem Isopropanol und 1 Mal in Xylol entwässert und schließlich mit Roti-Histokitt II eingedeckt.

### **2.4 Zytokinanalyse mittels ELISA**

Die quantitative Analyse der Zytokine und Chemokine in Medienüberständen der organotypischen Kulturen nach Bestrahlung und in Kontrollen wurde mittels kommerziellen ELISA MAX<sup>TM</sup> Standard Sets bestimmt, wobei das Protokoll des Herstellers befolgt wurde.

In Abbildung 13 ist das Prinzip des durchgeführten Sandwich ELISA-Tests schematisch dargestellt.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA.**

Bei dieser Technik wird das Zielmolekül zunächst vom Capture Antibody fixiert und dann vom biotinylierten Detection Antibody (Secondary Antibody) gebunden. Danach wird Avidin-HRP hinzugefügt, das an den Sekundärantikörper bindet. Das Enzym HRP bewirkt bei Zugabe von TMB-Substrat (S) dessen Oxidation, wodurch Benzidinblau (P) entsteht, das sich bei Zugabe von  $H_2SO_4$ -Lösung gelb verfärbt. Durch Messung der Extinktion kann dann die in der Probe enthaltene Zytokin-Konzentration anhand einer mitgeführten Standardreihe quantifiziert werden. Abbildung modifiziert nach (de la Rica und Stevens, 2012).

Da die Beschichtung der ELISA-Platte mit dem Capture Antibody über Nacht mit Parafilm abgedeckt bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubieren musste, wurden am Tag vor der Versuchsdurchführung  $100\ \mu\text{l}$  Capture Antibody (1:200 in Coating Buffer verdünnt) pro Well einer MaxiSorp™ 96-Well Platte pipettiert. Der erste Schritt am nächsten Tag bestand aus dem viermaligen Waschen der Platten mit je  $300\ \mu\text{l}$  Waschpuffer pro Well und dem anschließenden Abklopfen auf Papiertücher. Danach wurde jedes Well mit  $200\ \mu\text{l}$  Assay Diluent befüllt, mit Parafilm abgedeckt und 1 h bei RT auf einem Kreisschüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden jeweils in Doppel- oder Dreifachbestimmung  $100\ \mu\text{l}$  Probe bzw. Standard aufgetragen und wieder 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden je  $100\ \mu\text{l}$  Detection Antibody (1:200 in Assay Diluent verdünnt) in jedes Well der Platte gegeben und für 1 h inkubiert. Es folgten viermaliges Waschen der Platte und die Inkubation mit je  $100\ \mu\text{l}$  Avidin-HRP (1:1000 in Assay Diluent verdünnt) für 30 min auf dem Kreisschüttler. Anschließend wurde die Platte fünfmal 1 min mit Waschpuffer gewaschen und auf Papier abgeklopft. Für die TMB-Substratlösung wurden zu gleichen Teilen das  $H_2O_2$ -

haltige Reagenz A und das TMB-haltige Reagenz B zusammengeführt. Nachdem Ansetzen von TMB-Substratlösung wurden je 100 µl pro Well pipettiert mit nachfolgender Inkubation der Platte für 10-25 min bei RT. Der letzte Schritt bestand aus dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von je 100 µl 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und dem Messen der Extinktion mit dem Microplate Reader bei 450 nm. Die Quantifizierung der Zytokin-Konzentrationen in den Proben erfolgte anhand einer linearen Regression der mitgeführten Standards einschließlich eines Leerwertes des Assay Diluenten.

### 2.5 Mikroskopieren und Auswerten

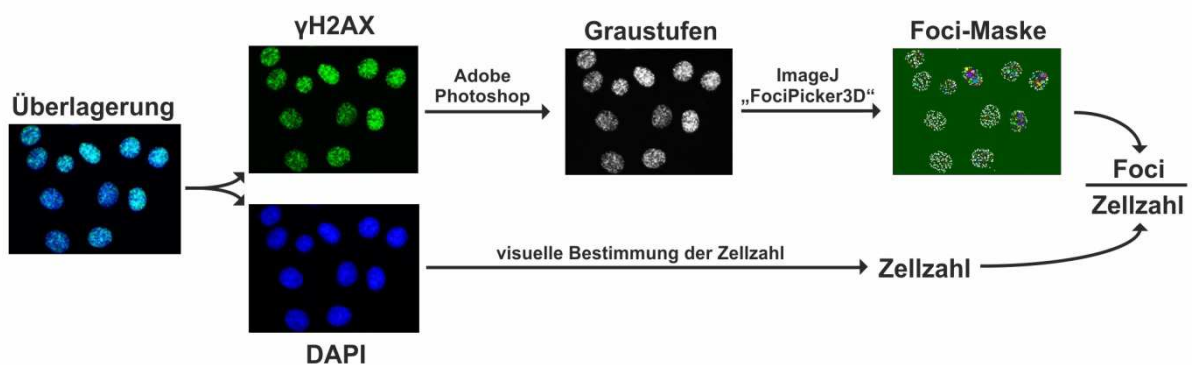
Zur visuellen Darstellung wurden gefärbte Kryoschnitte am Fluoreszenzmikroskop (Keyence GmbH) fotografiert, wobei neben den Durchlichtbildern für Fluoreszenzaufnahmen folgende Polarisationsfilter verwendet wurden: OP-66832 BZ DAPI-BP, OP-66836 BZ GFP-BP und OP-66383 BZ TexasRed (Keyence GmbH).

Um den strahlungsinduzierten Kompaktheitsverlust zu untersuchen, wurden zunächst die Aufnahmen von HE-gefärbten Schnitten mit Hilfe von ImageJ binarisiert, die gesamte Kultur mit „Polygon Selection“ umfahren und anschließend mit Hilfe des Plugins „Live Histogram“ (Autor: Wayne Rasband, modifiziert von Bob Dougherty; Version 8.6) die Anzahl von schwarzen (Schwarzwert S) und weißen Pixeln (Weißwert W) ausgezählt. Für die endgültige Quantifizierung des Kompaktheitsverlustes wurde der Schwarzwert durch den Gesamtpixelwert (schwarze Pixel in der markierten Fläche + weiße Pixel in der markierten Fläche) dividiert. Zur Veranschaulichung wurden exklusiv für jeden Zeitpunkt die unbestrahlten Proben auf 100 % und die bestrahlten Proben in Relation dazu gesetzt.

Für die Auswertung von NF-κB p50-Aktivierung wurden die gefärbten Proben am Laser Scanning Mikroskop LSM 710-NLO mit dem Objektiv Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 (Zeiss GmbH) mikroskopiert, wobei pro Schnitt mindestens 3 verschiedene Stellen fotografiert wurden. Das von der DAPI-Kernfärbung emittierte Licht wurde zur Berechnung der Zellkernfläche herangezogen. Hierzu wurde das DAPI-Bild binarisiert und anschließend mit Hilfe des ImageJ Plugins „Live Histogram“ (Autor: Wayne Rasband, modifiziert von Bob Dougherty; Version 8.6) die Anzahl schwarzer Pixel ausgezählt (Schwarzwert S). Zur Quantifizierung des Zielproteins NF-κB p50 wurde zunächst das binarisierte DAPI-Bild als Maske über das dazugehörige NF-κB p50-Bild gelegt, um die Auswertefläche nur auf die

Zellkernfläche zu beschränken. Danach wurde die Fluoreszenzintensität des maskierten Bildes mittels ImageJ 1.44 unter Verwendung des Plugins „Measure RGB“ (Autor: Wayne Rasband; Version 1) detektiert und als „Rotwert R“ definiert. Abschließend wurde die Proteinexpression, exklusiv für jedes Foto, aus dem Quotient(R/S) der Intensität des Zielproteins (Rotwert R) in Relation zur Zellkernfläche (Schwarzwert S) berechnet.

Um die strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüche der DNA zu quantifizieren, wurden für jedes Foto, das vorher in Graustufen und in ein 16 bit Bildformat mittels Photoshop CS3 (Adobe Co.) umgewandelt wurde, die  $\gamma$ H2AX-Foci durch ImageJ 1.44 unter Verwendung des Plugins „FociPicker3D 3D and 2D particle counter“ (Autor: Guanghua Du; 16.04.2010 erste Version) ausgezählt. Das Prinzip des FociPickers basiert darauf, dass jeder Focus durch ein lokales Maximum repräsentiert ist, das aus einem oder einer Gruppe an Pixeln mit der gleichen Intensität besteht, jedoch die Intensität höher als die aller umliegenden Pixel ist. Die Intensitätstoleranz und die minimale Anzahl an Pixel, die einen Focus definiert, wurden innerhalb einer Strahlungsartgleich gehalten. Im Rahmen der Foci-Analyse wurde pro Foto eine Foci-Maske generiert, die jeden Focus als bunten Punkt auf grünem Hintergrund darstellt. Um eine Aussage über die Zahl der Foci pro Zelle treffen zu können, wurden anhand des dazugehörigen DAPI-Bildes die Zellkerne optisch ausgezählt und ins Verhältnis zur Focus-Zahl gesetzt (Abbildung 14). Apoptotische Zellen wurden generell von der Auswertung ausgeschlossen.



**Abbildung 14: Computergestützte Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen.**

Die mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops erstellten Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-markierten DSBs wurden durch Adobe PhotoshopCS3 in ihrer Auflösung reduziert, in Graustufen und in ein 16 bit Bildformat umgewandelt. Die Auszählung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte mit Hilfe des ImageJ Plugins „FociPicker3D 3D and 2D particle counter“. Ausgehend von dem dazugehörigen Bild der DAPI-Kernfärbung wurden die Zellkerne pro Bild visuell ausgezählt und mit den Foci verrechnet (Fabian, 2013).

### 2.6 Statistik

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurden alle Experimente mindestens dreimal wiederholt und bei den Analysen mindestens Dreifachbestimmungen einer Probe durchgeführt. Die Ausnahmen bildeten Zytokin-Analysen in Zellkultur-Monolayern und die Analysen von Proben, die mit 10 Gy Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, wo es sich jeweils nur um einen einzigen Versuch handelt. Die Anzahl der Strahlzeiten für die Schwerionenbestrahlung an der GSI Darmstadt stellte hierbei einen limitierenden Faktor dar. In den Analyse-Ergebnissen zum Epithelanteil sind relative Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen unter Angabe der Standardabweichung (SD) gezeigt. Alle andere Ergebnisse sind unter Angabe der Standardfehler (SEM, Standard Error of the Mean) dargestellt. Zum Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Proben wurden die Kontrollproben auf 100 % gesetzt und die Änderungen behandelter Proben relativ dazu ausgewertet. Bei der Untersuchung der Doppelstrangbrüche wurden die ermittelten Foci-Zahlen als Absolutwerte dargestellt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit einem zweiseitigen t-Test ( $p < 0,02$ ) in Microsoft Excel überprüft und in den Graphen mit einem Stern (\*) markiert.

## 3 Ergebnisse

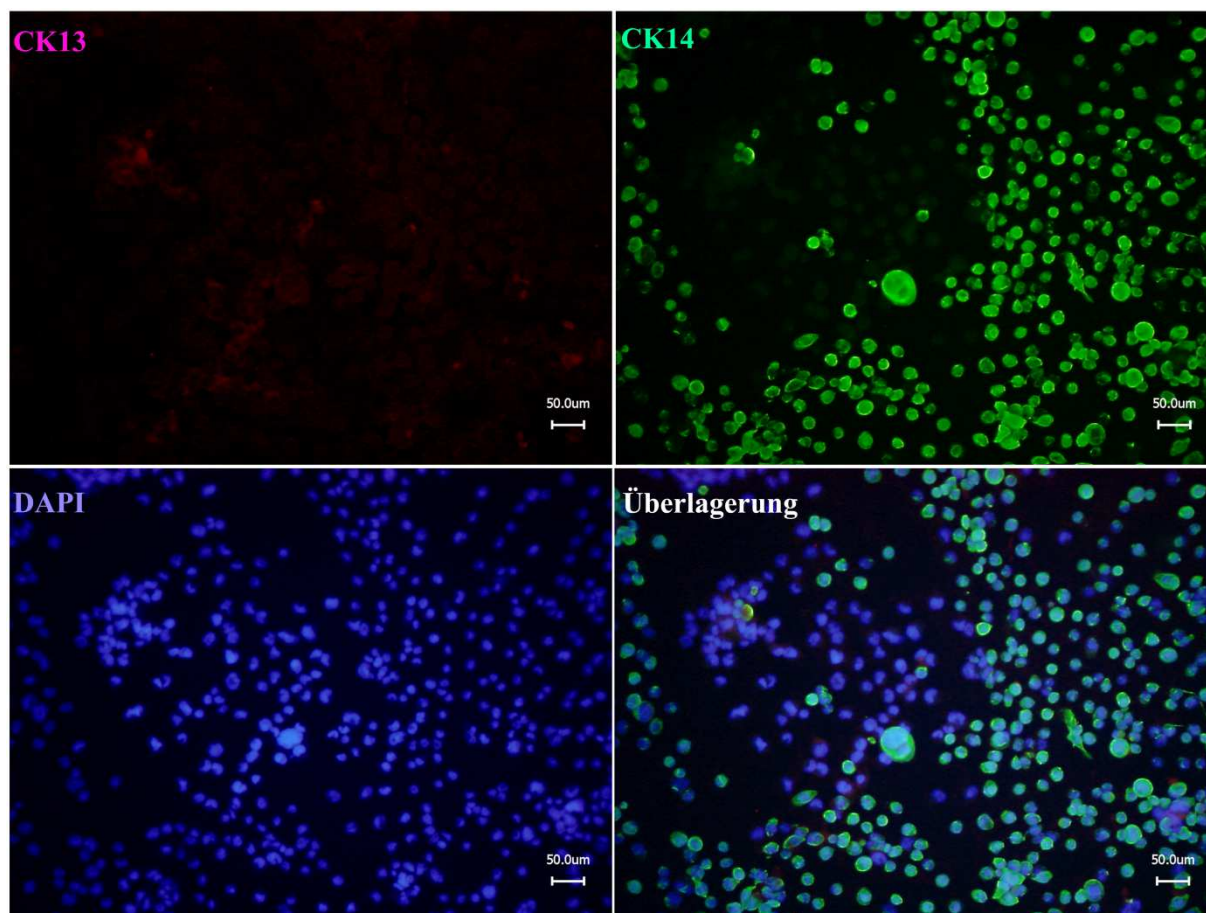
### 3.1 Charakterisierung des Mundschleimhaut-Modells

#### 3.1.1 Immunfluoreszenz-Färbungen von Zytokeratinen

Um das Mundschleimhaut-Modell hinsichtlich seines Differenzierungsstatus zu charakterisieren, wurden bestimmte Differenzierungsmarker des Epithels mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung visualisiert. Dafür mussten die spezifischen, gegen die entsprechenden Proteine gerichteten Antikörper in einer Immunfluoreszenz-Färbung etabliert werden. Zu den wichtigsten Differenzierungsmarkern in Epithelzellen gehören die Zytokeratine, die allgemein zu den Keratinen gehören. Als Keratine bezeichnet man verschiedene wasserunlösliche Faserproteine, die in einer molekularen Konformation als  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt vorkommen. Sie stellen einen Schlüssel-Baustein in Nägeln und Haaren dar, als Zytokeratin ist es aber auch ein wesentliches Strukturprotein in Keratinozyten der Haut und Mundschleimhaut. In diesem Fall bilden Zytokeratine Intermediärfilamente, die der mechanischen Stabilisierung des Zytoskeletts der Epithelzellen dienen. Es werden zwei Arten der Zytokeratine unterschieden: die neutral-basischen Typ A-Subfamilie (CK1 bis CK8) und die saure Typ B-Subfamilie (CK9 bis CK20), wobei die neutral-basischen jeweils mit den sauren einen Heterodimer-Komplex bilden. In dieser Arbeit wurden insgesamt 4 Antikörper gegen Zytokeratine eingesetzt. Dazu gehören Antikörper gegen CK4, CK13, CK14 und panCK, wobei panCK sich unspezifisch gegen alle Zytokeratine richtet. CK4 gehört zur Typ A-Subfamilie und hat somit neutrale Eigenschaften, bildet mit CK13 einen heterodimeren Komplex und ist spezifisch für das mukosale und ösophageale Epithel. Keratin 13 gehört zu den Typ B-Zytokeratinen und findet sich vor allem in den suprabasalen Schichten des unverhornten stratifizierten Epithels. Das ebenfalls saure CK14 liegt normalerweise als ein Heterotetramer mit zwei CK5-Molekülen in der Basalschicht des stratifizierten Epithels vor.

Für die Etablierungsversuche wurden zunächst Färbungen auf Monolayern der verwendeten Zelllinien durchgeführt. In Abbildung 15 sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer CK13/CK14-Doppelfärbung in einer HH4ded/IHGK-Mischkultur

abgebildet. Während sich CK14 eindeutig in den Zellmembranen der Epithelzellen nachweisen ließen, konnte CK13 in keinem Versuch detektiert werden.



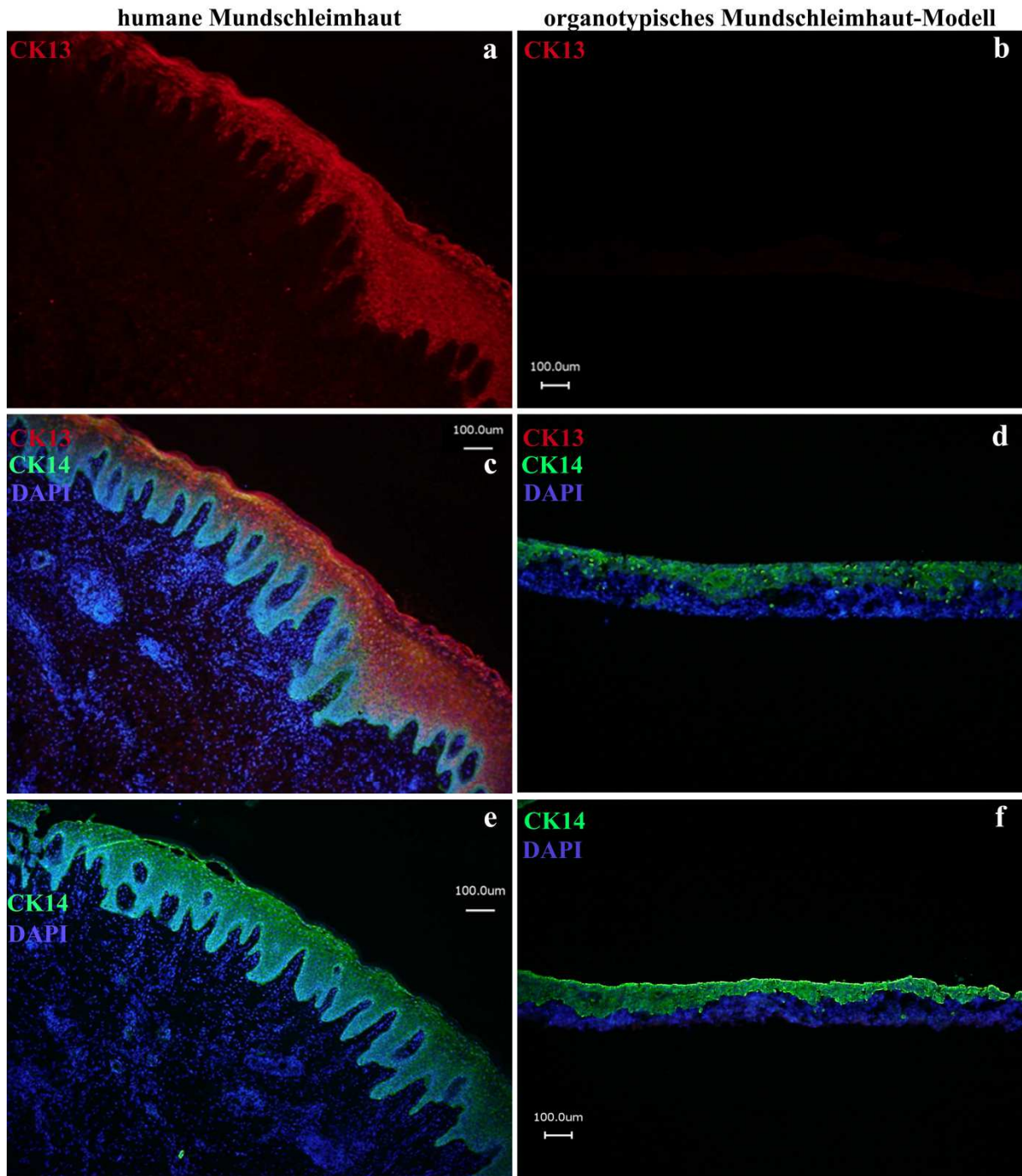
**Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbungen von CK13 und CK14 auf Zellkultur-Monolayern.**

Die Mischkultur aus HH4ded und IHGK wurde im Verhältnis 1:10 auf autoklavierten Objektträgern ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % einmal kurz in 1x PBS gespült, 30 min bei 40 °C getrocknet und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenz-Aufnahmen der CK13 (rot) und CK14 (grün) Doppelfärbung. Die Aufnahmen wurden mit Keyence Mikroskop erstellt. Der Maßstab beträgt 50 µm.

Anschließend wurden CK13/CK14-Färbungen an Proben der humanen Mundschleimhaut und der organotypischen Kultur durchgeführt. Bei der mikroskopischen Betrachtung der organotypischen Kulturen fiel die strukturelle Ähnlichkeit des Epithels mit dem der humanen Mundschleimhaut auf, vor allem das papillenartige Muster der unteren Epithelschicht. Das Expressionsmuster der Zytokeratine war in beiden Proben sehr ähnlich. Beim Vergleich der Expressionen von CK13 in humaner Mundschleimhaut und im Mundschleimhaut-Modell (Abbildung 16) fiel auf, dass das Zytokeratin CK13 sich zwar in der Mundschleimhaut in den oberen Epithelschichten reichlich nachweisen ließ, in den organotypischen Kulturen allerdings überhaupt nicht. Nur anhand der CK14-Färbung konnte man im Mundschleimhaut-



Modell das Epithel identifizieren. Das Zytokeratin CK14 konnte im gesamten Epithel der Mundschleimhaut und des Mukosa-Modells gleichermaßen detektiert werden.



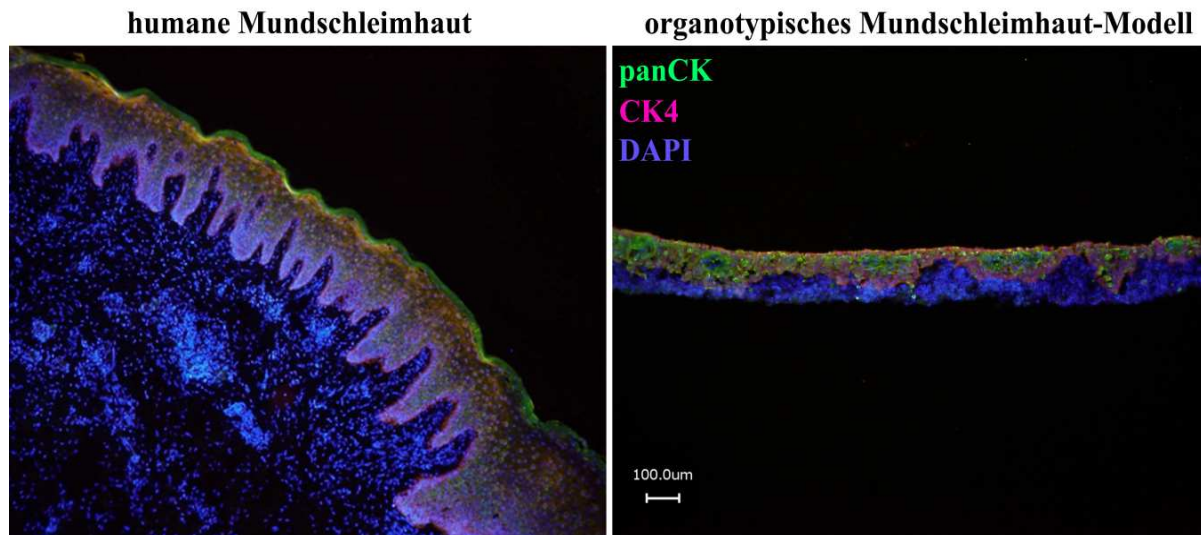
**Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbungen von CK13 und CK14 auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.**

Die Abbildungen a und b zeigen nur den Rotkanal einer CK13 (rot)/CK14 (grün)-Doppelfärbung, c und d zeigen die Überlagerung aller Kanäle. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Abbildungen e und f zeigen eine Einzelfärbung von CK14. Links sind repräsentative Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der humanen Mundschleimhaut und rechts des organotypischen Mundschleimhaut-Modells dargestellt. Die Aufnahmen erfolgten am Keyence-Fluoreszenzmikroskop bei 50facher Vergrößerung, der Maßstab beträgt 100 µm.



Wie man in der Einzelfärbung von CK14 auf humaner Mundschleimhaut (Abbildung 16 e) erkennen kann, wird CK14 hauptsächlich in den apikalen Schichten des Epithels exprimiert, im organotypischen Mundschleimhaut-Modell dagegen findet sich CK14 im gesamten Epithel.

Des Weiteren wurde die Expression von CK4 in der humanen Mundschleimhaut und im organotypischen Mundschleimhaut-Modell untersucht (Abbildung 17). Interessanterweise konnte dieses Zytokeratin eher in den basalen Epithelschichten der humanen Mundschleimhaut detektiert werden. Auffallend war auch die Abwesenheit von CK4 in den kornifizierten Epithelzellen in der oberen Schicht der Mundschleimhaut bzw. bestimmten Bereichen in der Mitte des Modell-Epithels.

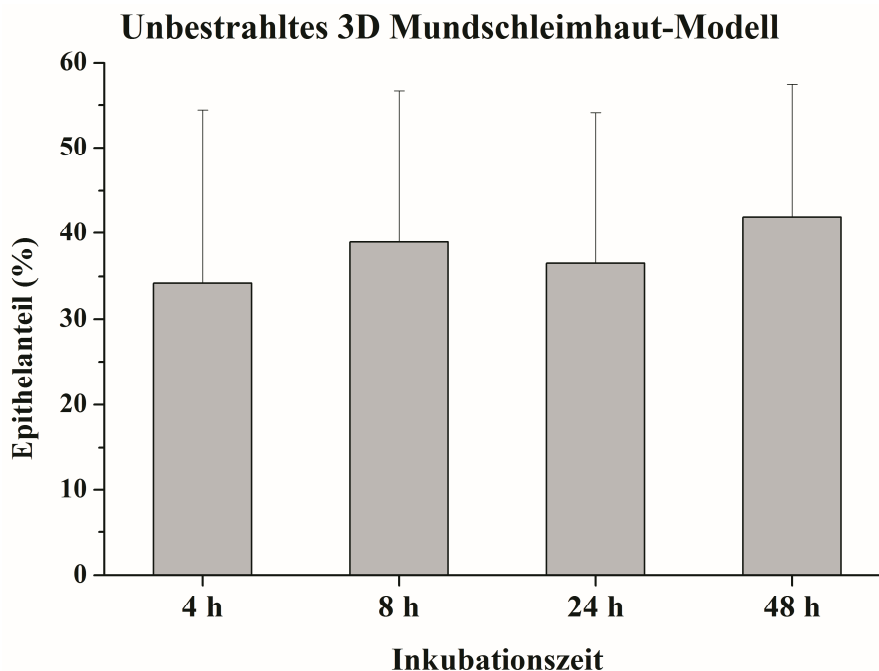


**Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbungen von Zytokeratinen auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.**

Es sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer panCK (grün)/CK4 (rot)-Doppelfärbung der humanen Mundschleimhaut und des organotypischen Mundschleimhaut-Modells gezeigt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Aufnahmen erfolgten am Keyence-Fluoreszenzmikroskop bei 50facher Vergrößerung, der Maßstab beträgt 100 µm.

Für jeden Inkubationszeitpunkt wurde eine unbehandelte Probe mitgeführt, die anschließend für diverse Analysen als Referenzprobe verwendet wurde. So konnte aus den Immunfluoreszenzfärbungen von pan-Zytokeratin mit Hilfe von Adobe Photoshop und ImageJ der Anteil des gesamten Zytokeratins bezogen auf die gesamte organotypische Kultur ermittelt werden. Bei der quantitativen Analyse des Zytokeratinanteils wurde die Gleichmäßigkeit des Epithelanteils in unbestrahlten Kontrollproben bestätigt (Abbildung 18). Innerhalb des Zeitintervalls zwischen 4 und 48 h während der Inkubation von bestrahlten

Proben hat sich das Epithel im Durchschnitt nur geringfügig vergrößert. Der Epithelanteil betrug zwischen 34 und 42 % der gesamten Kultur.

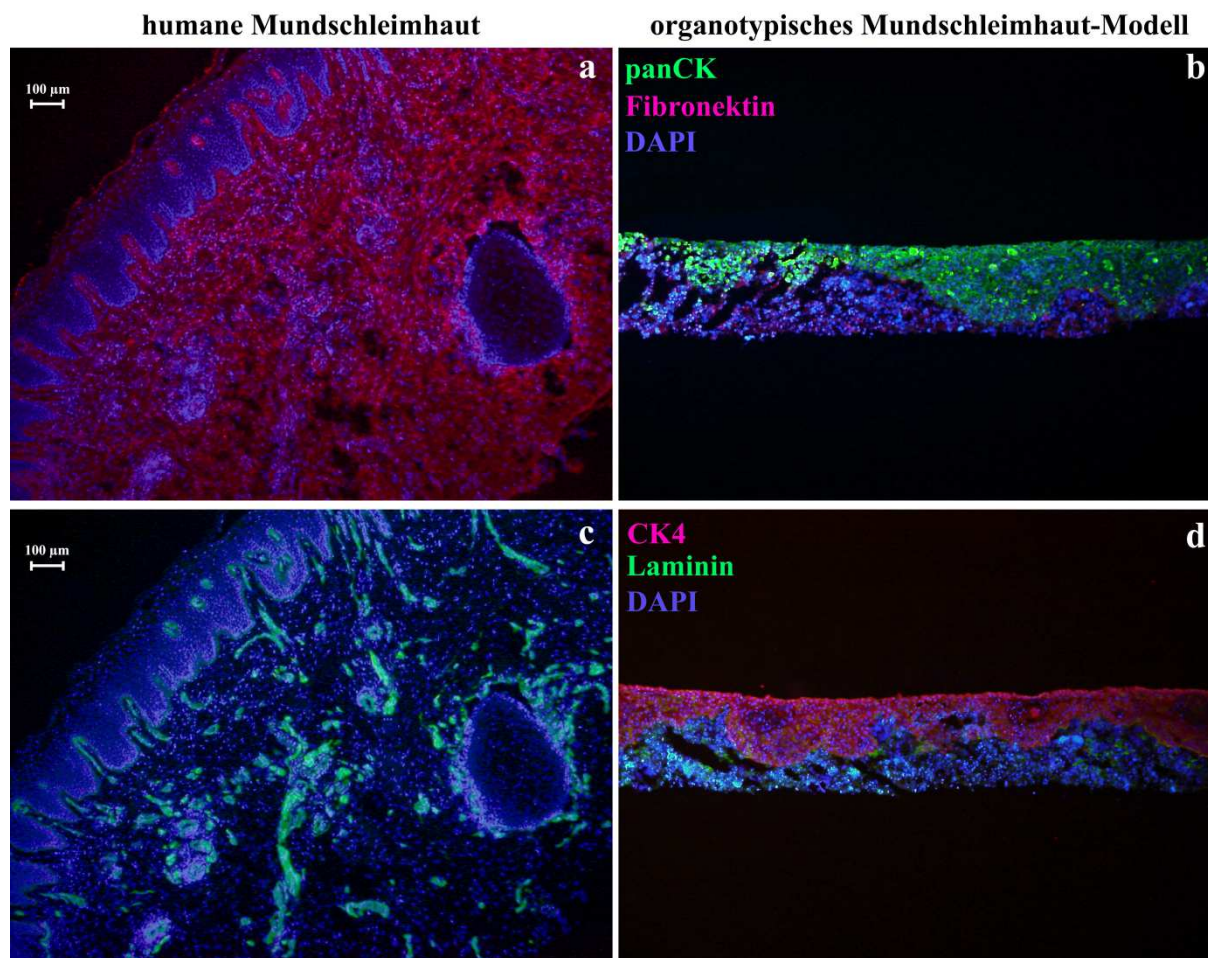


**Abbildung 18: Prozentualer Epithelanteil an der gesamten organotypischen Kultur.**

Der Anteil des Epithels wurde aus den immunfluoreszenten pan-Zytokeratin-Färbungen von mitgeführten unbestrahlten Kontroll-Kulturen errechnet. Die Prozentangabe des Epithels bezieht sich auf die Gesamtfläche der entsprechenden organotypischen Kultur. Die Quantifizierungen wurden aus 6 unabhängig durchgeführten Versuchen ermittelt (n = 6).

#### 3.1.2 Immunfluoreszenz-Färbungen von Bindegewebsmarkern

Um das dreidimensionale Mundschleimhaut-Modell noch etwas detaillierter zu charakterisieren, wurden die organotypischen Kulturen auf einige Differenzierungsmarker der Epithelzellen untersucht und mit humaner Mundschleimhaut verglichen. Zu den untersuchten Differenzierungsmarkern gehören zum einen unterschiedliche Zytokeratine, die im mukosalen Epithel exprimiert werden (siehe Kapitel 3.1.1), und zum anderen bestimmte Strukturproteine der extrazellulären Matrix und des Bindegewebes, wie Laminin, Fibronectin und Kollagen IV. In Abbildung 19 sind Immunfluoreszenz-Aufnahmen der panCK/Fibronectin- (a und b) bzw. CK4/Laminin-Doppelfärbungen (c und d) auf humaner Mundschleimhaut und auf dem Mundschleimhaut-Modell dargestellt. Die Doppelfärbung mit Zytokeratinen diente dazu, in der organotypischer Kultur das Epithel vom Bindegewebe zu unterscheiden.



**Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen von Fibronectin und Laminin auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.**

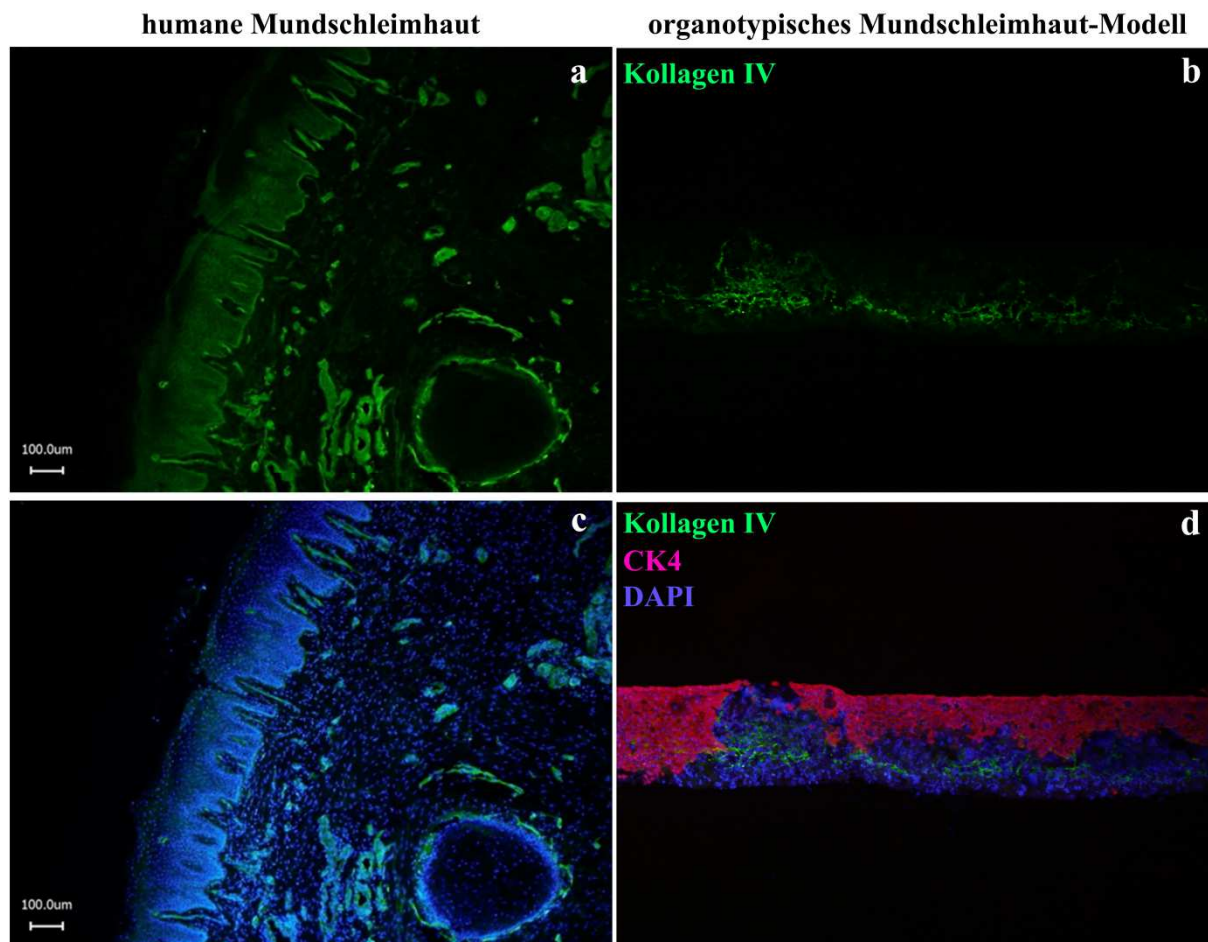
Abbildungen a und b zeigen eine panCK (grün)/Fibronectin (rot), Abbildungen c und d eine CK4 (rot)/Laminin (grün)-Doppelfärbung. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Links sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der humanen Mundschleimhaut und rechts des organotypischen Mundschleimhaut-Modells dargestellt. Die Aufnahmen erfolgten am Keyence-Mikroskop bei 50facher Vergrößerung, der Maßstab beträgt 100 µm.

So findet man zum Beispiel in der panCK/Fibronectin-Doppelfärbung (Abbildung 19 a und b) auf organotypischen Kulturen das Epithel in Grün und in der CK4/Laminin-Doppelfärbung (Abbildung 19 c und d) das Epithel in Rot markiert. Die Bindegewebsmarker Fibronectin und Laminin wurden jeweils unterhalb des Epithels in den Fibroblastenschichten angefärbt. Da in den humanen Mundschleimhaut-Schnitten das Epithel anhand der Struktur gut erkennbar ist, wurde hier auf Doppelfärbungen mit Zytokeratinen zwecks Epithel-Erkennung verzichtet.

In der Mundschleimhaut konnte Fibronectin relativ homogen im gesamten Bindegewebe nachgewiesen werden. In der organotypischen Kultur ergab sich trotz der kompakteren Fibroblasten-Schicht ein ähnliches Bild von gleichmäßig verteilten Fibronectin-Proteinen.

Laminin konnte in der Mundschleimhaut und im Mundschleimhaut-Modell in einer strukturierten und teilweise kumulativen Verteilung detektiert werden.

Ein weiterer wichtiger Bindegewebsmarker ist das Kollagen IV, das in der humanen Mundschleimhaut und im Mundschleimhaut-Modell durch eine Kollagen IV/CK4-Doppelfärbung untersucht wurde (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbungen von Kollagen Typ IV auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.**

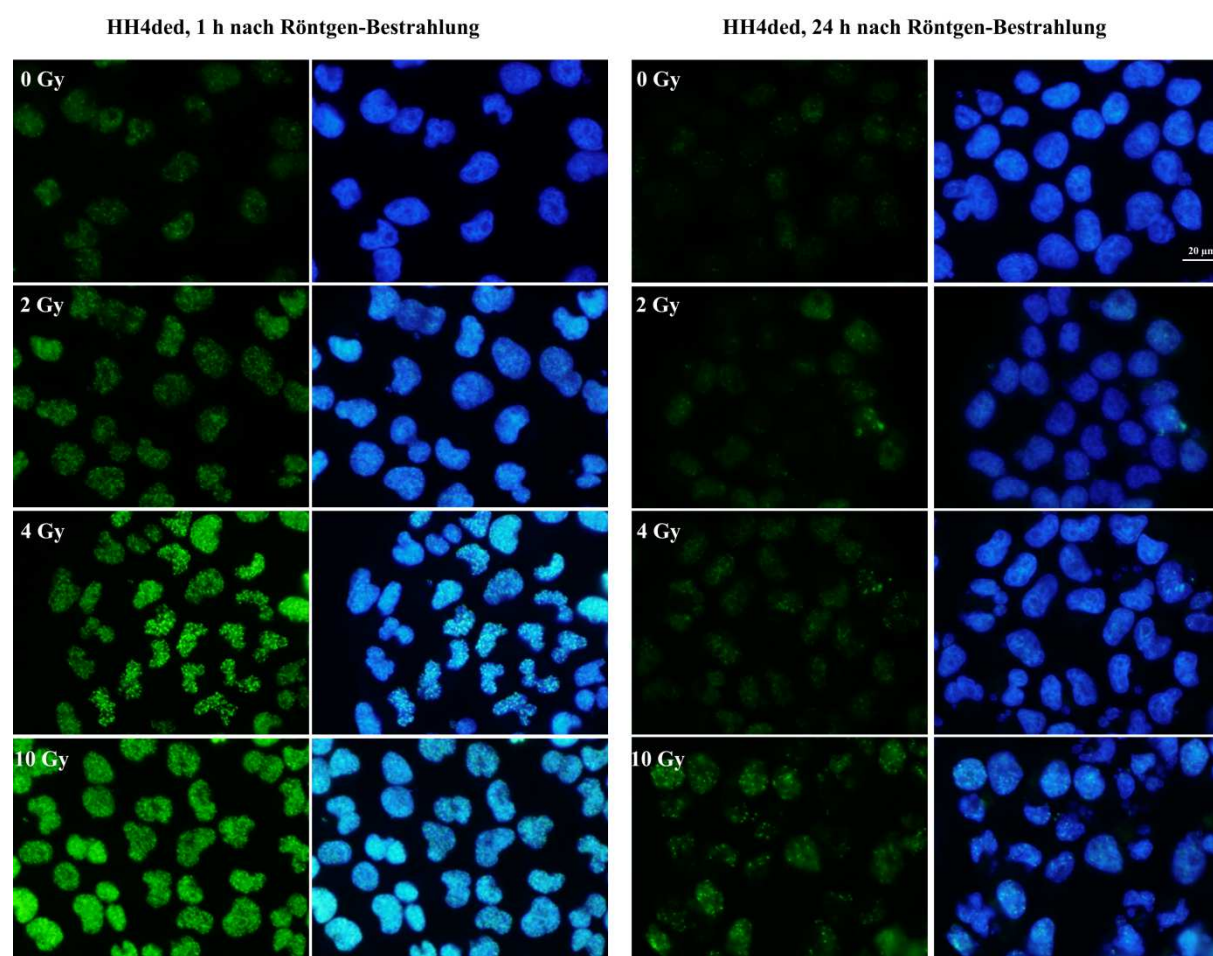
Abbildung a und b zeigen nur den Grünkanal einer Kollagen IV (grün)/CK4 (rot)-Doppelfärbung, Abbildungen c und d zeigen die Überlagerung aller Kanäle. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Links sind repräsentative Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der humanen Mundschleimhaut und rechts des organotypischen Mundschleimhaut-Modells dargestellt. Die Aufnahmen erfolgten am Keyence-Fluoreszenzmikroskop bei 50facher Vergrößerung, der Maßstab beträgt 100 µm.

In der Mundschleimhaut konnte Kollagen IV vor allem rund um Gefäße und Vesikel detektiert werden. Obwohl in dem von uns etablierten Mundschleimhaut-Modell derartige Sekundärstrukturen fehlen, konnte dennoch Kollagen IV detektiert werden.



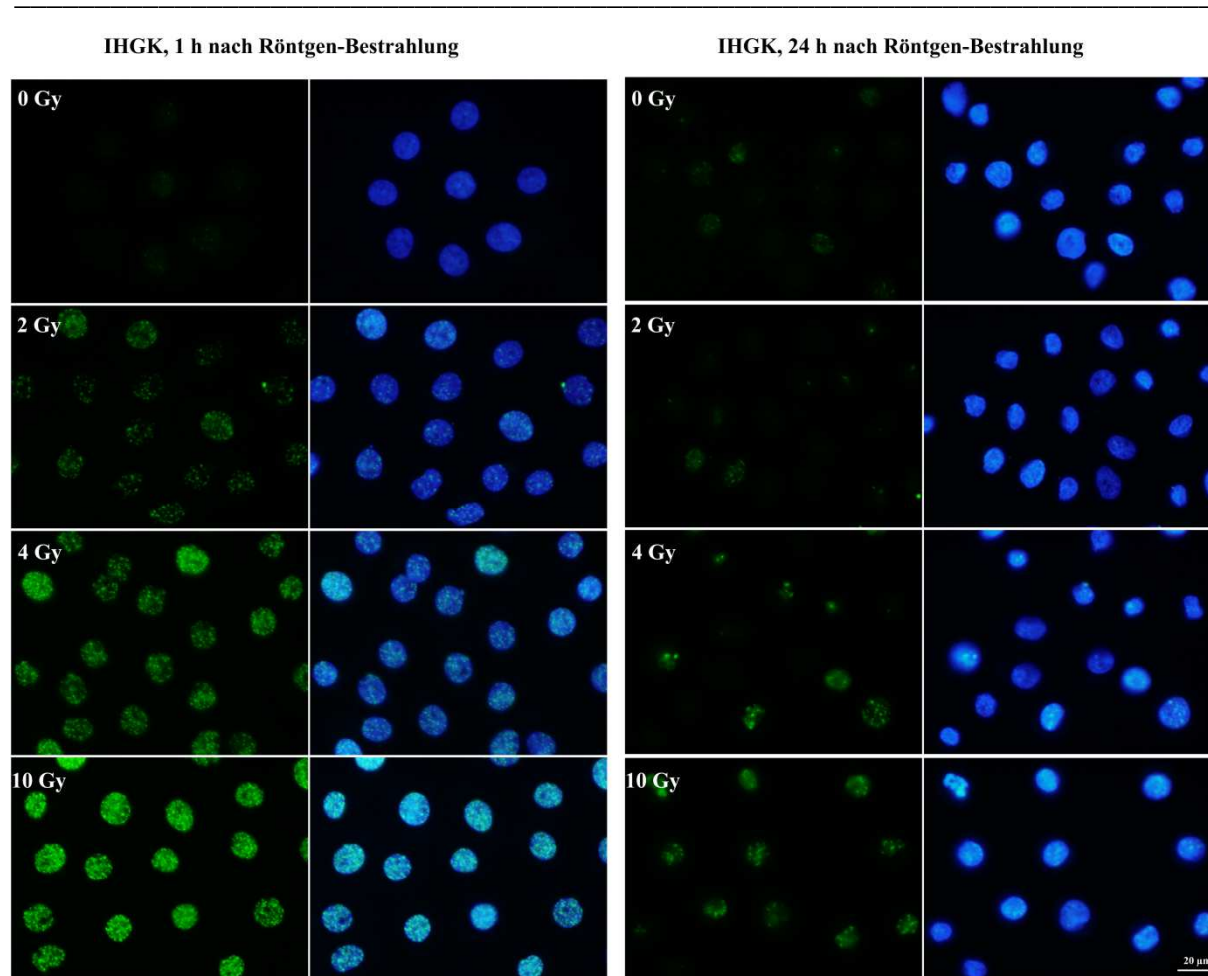
### 3.2 Strahlungsinduzierte DNA-Schäden

Strahlung führt unter anderem zu DNA-Schäden, wie zum Beispiel DSB. Diese resultieren dann in einer Phosphorylierung der Histon-Untereinheit H2AX zu  $\gamma$ H2AX, die immunhistologisch nachweisbar ist. Im Vorfeld wurden  $\gamma$ H2AX-Färbungen auf Röntgen-bestrahlten Zellkultur-Monolayern durchgeführt. In Abbildung 21 und Abbildung 22 sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Färbungen auf HH4ded bzw. IHGK-Monolayern 1 h und 24 h nach Röntgen-Bestrahlung mit 2, 4 und 10 Gy dargestellt.



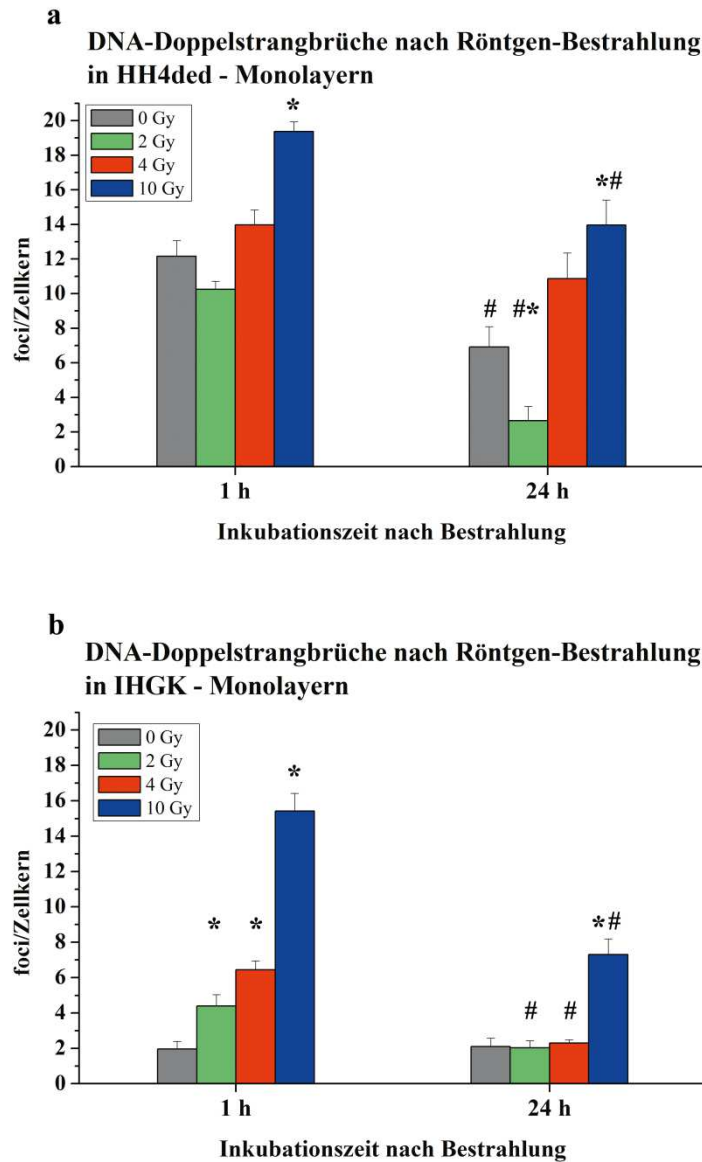
**Abbildung 21:  $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Röntgen-Bestrahlung von HH4ded-Zellkulturen.** Repräsentative Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Färbungen (grün) und entsprechende Überlagerungen mit DAPI-Färbungen (blau) von HH4ded-Monolayern, jeweils 1 h und 24 h nach 0 bis 10 Gy Bestrahlung. Diese Aufnahmen wurden am Keyence-Fluoreszenzmikroskop mit 600facher Vergrößerung erstellt. Der Maßstab beträgt 20  $\mu$ m.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 22:  $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Röntgen-Bestrahlung von IHGK-Zellkulturen.** Repräsentative Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Färbungen (grün) und entsprechende Überlagerungen mit DAPI-Färbungen (blau) von IHGK-Monolayern, jeweils 1 h und 24 h nach 0 bis 10 Gy Bestrahlung. Diese Aufnahmen wurden am Keyence-Fluoreszenzmikroskop mit 600facher Vergrößerung erstellt. Der Maßstab beträgt 20  $\mu$ m.

Durch die Überlagerung mit DAPI-Kernfärbungen wird deutlich, dass die Foci als intensiv grün gefärbte Punkte sich ausschließlich im Zellkern befinden, es gibt also keine unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper. Sowohl für Fibroblasten als auch für Epithelzellen ergab sich ein dosisabhängig wachsendes Signal für  $\gamma$ H2AX. Neben dem Anstieg des Foci-Signals nach Bestrahlung mit höheren Dosen konnte sowohl bei bestrahlten HH4ded-, als auch bei bestrahlten IHGK-Proben jeweils eine deutliche Signalabnahme von 1 h auf 24 h nach Bestrahlung detektiert werden. Für eine quantitative Auswertung wurden die  $\gamma$ H2AX-markierten DSB computergestützt unter Berücksichtigung der Zellzahl ausgezählt. Die Ergebnisse wurden in einem Balkendiagramm in Abbildung 23 dargestellt.



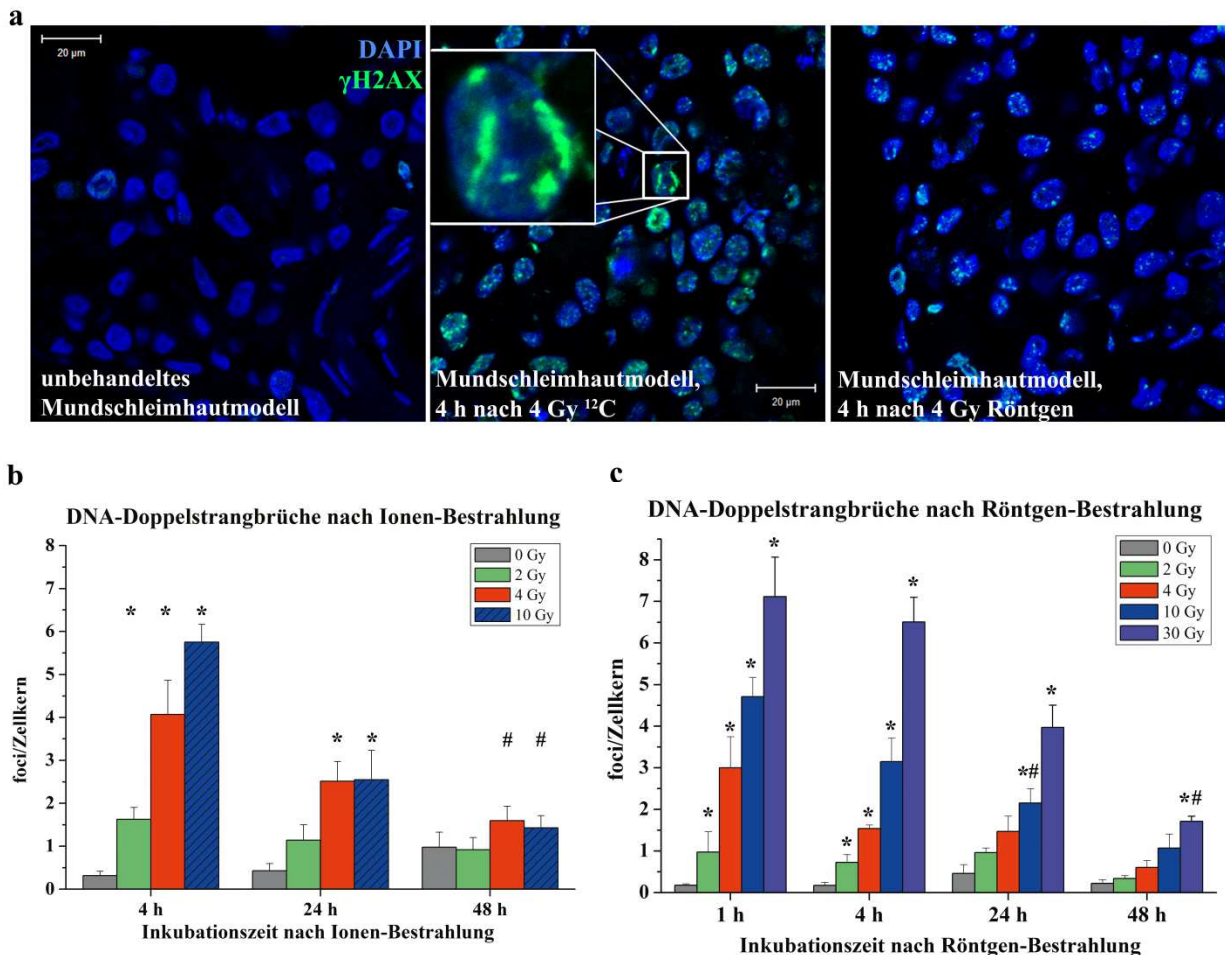
**Abbildung 23: Quantifizierung von Röntgenstrahlen-induzierten DSBs in Monolayer-Zellkulturen anhand  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen.**

Dargestellt sind die Immunfluoreszenz-markierten Foci pro Zellkern in HH4ded- (a) und IHGK-Monolayern (b), 1 h und 24 h nach Röntgen-Bestrahlung mit 2, 4 und 10 Gy. Die Auswertung erfolgte aus mindestens 10 Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Färbungen pro Dosis und Zeitpunkt aus einem Versuch ( $n = 1$ ). <sup>\*#</sup>  $p \leq 0,02$ , wobei \* auf 0 Gy und <sup>#</sup> auf den jeweiligen Wert von 1 h bezogen wurde.

Obwohl auch bei unbehandelten Fibroblasten eine relativ hohe Foci-Anzahl detektiert wurde, zeigten sich nach einer Bestrahlung ab 4 Gy noch mehr  $\gamma$ H2AX-markierte DNA-Schäden. Nach 24 h wurden durchgehend weniger DSB detektiert, als 1 h nach Bestrahlung, was auf Reparatur hindeutet. Bei den Epithelzellen IHGK wurden mit steigenden Dosen mehr DSB detektiert als bei unbestrahlten Proben, wobei eine Bestrahlung mit 10 Gy einen großen Sprung von ca. 7 Foci/Zellkern bei 4 Gy auf fast 16 Foci/Zellkern verursachte. Diese große

Anzahl an DSB konnte, im Gegensatz zu 2 Gy und 4 Gy, auch nach 24 h nicht auf das Niveau der unbestrahlten Proben gebracht werden.

Bei der Auswertung der Röntgenstrahlungs-induzierten DNA-Schäden in Monolayer-Zellkulturen konnten somit dosisabhängige Steigerungen der DSB sowohl in Epithelzellen als auch in Fibroblasten detektiert werden. Um zu überprüfen, ob die Bestrahlung des Mundschleimhaut-Modells gleichartige DNA-Schäden verursacht, wurden in den mit  $^{12}\text{C}$ -Ionen und mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen  $\gamma\text{H2AX}$  gefärbt und die markierten DSB quantifiziert (Abbildung 24). In der Teilabbildung a sind drei repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der  $\gamma\text{H2AX}$ -Färbungen auf unbehandelter (links), mit schweren Kohlenstoffionen (Mitte) und mit Röntgenstrahlen bestrahlten (rechts) 3D Kultur.



**Abbildung 24:  $\gamma\text{H2AX}$ -Färbungen auf organotypischen Kulturen.**

In der Teilabbildung a sind repräsentative Aufnahmen der  $\gamma\text{H2AX}$ -Färbungen von unbehandelten, mit Schwerionen und Röntgenstrahlung bestrahlten Mundschleimhaut-Modellen dargestellt. Die Balkendiagramme in b und c zeigen die Quantifizierungen von strahlungsinduzierten DSBs in den Kulturen anhand der  $\gamma\text{H2AX}$ -Immunfluoreszenzfärbungen aus mindestens 3 Aufnahmen pro Probe und 5 unabhängigen Versuchen ( $n = 5$ ,  $N = 3$ ), wobei die Werte, der schattierten Balken aus einem einzigen Versuch stammen.  $*p \leq 0,02$  ist bezogen auf 0 Gy,  $^{\#}p \leq 0,02$  ist bezogen auf 4 h bei Ionen- und 1 h bei Röntgen-Bestrahlung. Die Aufnahmen wurden am Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Der Maßstab beträgt 20  $\mu\text{m}$ .



In den unbehandelten Kontroll-Kulturen konnten kaum Foci detektiert werden, während eine Röntgen-Bestrahlung mit 4 Gy bereits mehrere Foci pro Zellkern verursachte. Die optische Beurteilung von Schwerionen-bestrahlten Kulturen offenbarte eine große Menge an  $\gamma$ H2AX-markierten DSB und sogar durch die schweren Ionen verursachten Streifen (vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 24).

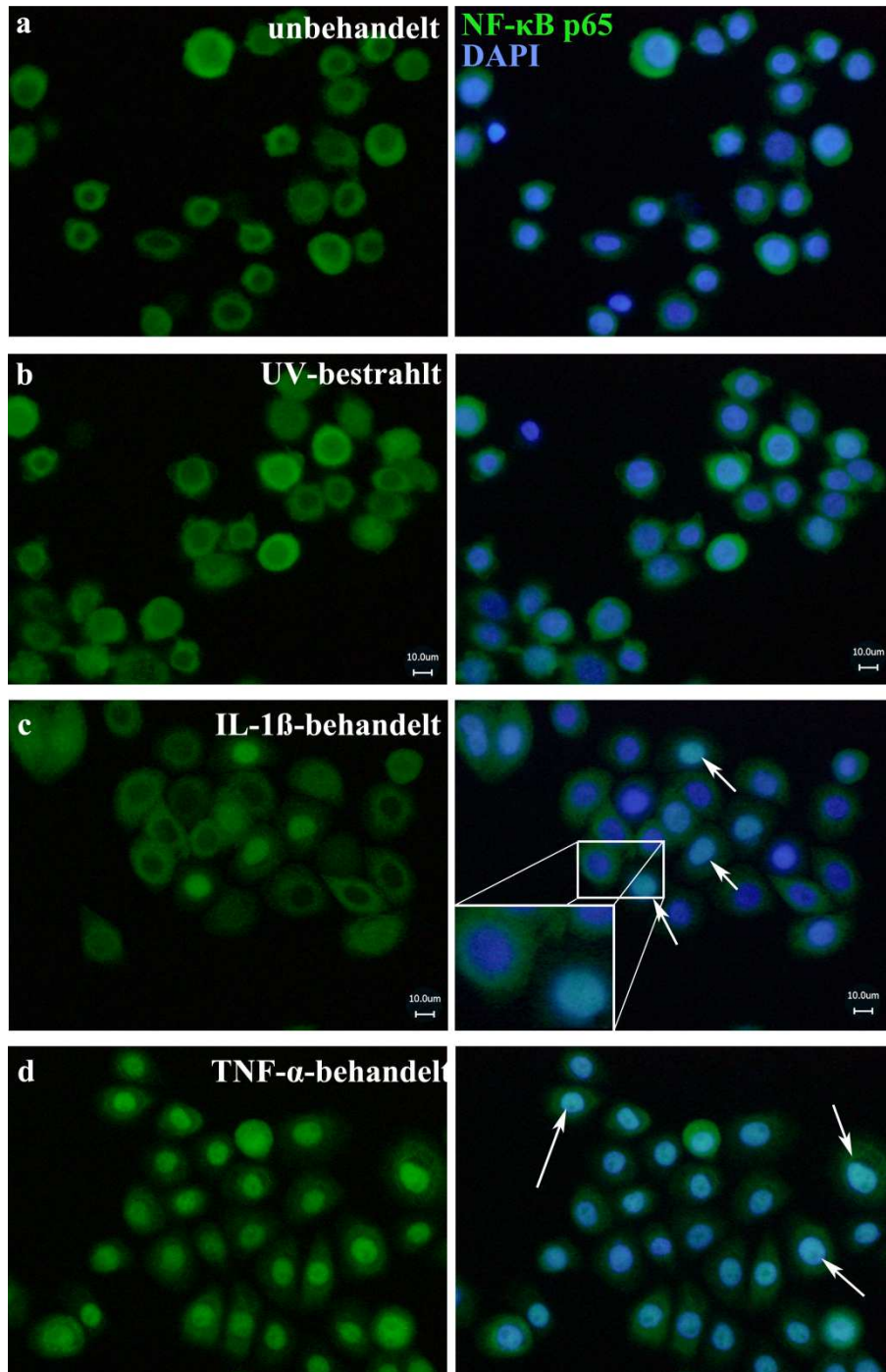
Computergestützte Quantifizierungen der DSB erfolgten aus mindestens drei repräsentativen Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Färbungen und aus fünf unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in den Teilabbildungen b und c der Abbildung 24 als Balkendiagramme dargestellt. Beim Vergleich der Proben 4 h nach Bestrahlung konnten bei allen Dosen doppelt so viele DSB nach Einwirkung von Kohlenstoffionen detektiert werden, wie nach Röntgenbestrahlung. Bei Röntgen-bestrahlten organotypischen Kulturen bis 48 h nach Bestrahlung und bei Schwerionen-bestrahlten Kulturen 4 h nach Behandlung konnten dosis-abhängige Zunahmen der Foci pro Zellkern detektiert werden. Allerdings reduzierte sich die Anzahl der Foci pro Zellkern mit längerer Inkubationsdauer, so dass 48 h nach Röntgenstrahlung die Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben nur noch minimal waren, 48 h nach Schwerionenstrahlung glichen sich die Foci-Niveaus an die der unbehandelten Proben an.

### **3.3 Strahlungsinduzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B**

#### **3.3.1 Strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung**

Um die NF $\kappa$ B p65-Aktivierung zu detektieren, wurden drei verschiedene Antikörper mit mehreren Verdünnungsstufen und mehreren Fixierungsmethoden getestet. Für die Induktion einer NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung zur Generierung einer Positivkontrolle, wurden ebenfalls mehrere Methoden verwendet. Neben einer UV-Bestrahlung der Zellkultur-Monolayer wurde auch eine Inkubation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  vorgenommen. Bei jedem Versuch wurden entsprechende Negativkontrollen mitgeführt. Nach einigen Vorversuchen auf Zellkultur-Monolayern und anschließend auf organotypischen Kulturen fiel die Entscheidung auf einen Antikörper der Firma Cell Signaling. In Abbildung 25 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NF- $\kappa$ B p65-Färbung auf unterschiedlich behandelten IHGK-Monolayern unter Verwendung des NF- $\kappa$ B p65-Antikörpers von Cell Signaling dargestellt. Für die Induktion der NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung kamen neben UV-Bestrahlung (Teilabbildung b) auch

Inkubation mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  (Teilabbildung c) und TNF- $\alpha$  (Teilabbildung d) zum Einsatz.

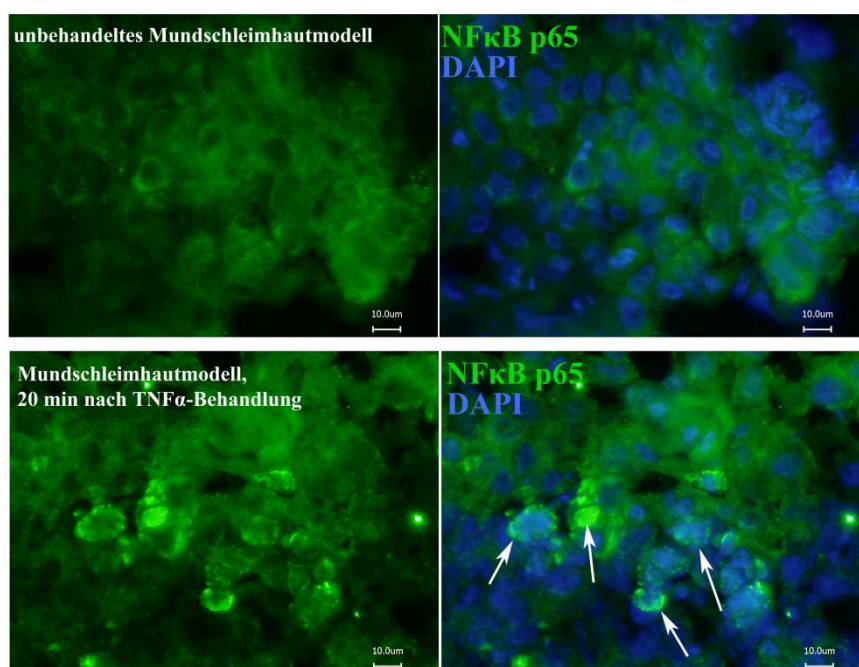


**Abbildung 25: NF- $\kappa$ B p65-Färbung auf IHGK-Monolayern.**

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von NF- $\kappa$ B p65-Färbungen (grün) auf unbehandelten (a), UV-bestrahlten (b), mit IL-1 $\beta$ - (c) bzw. TNF- $\alpha$ -behandelten (d) IHGK-Monolayern. Für die Fixierung wurde PFA verwendet. Die Antikörper-Verdünnung betrug 1:250. Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Weiße Pfeile markieren die Zellen, in denen nukleare Lokalisierung von NF- $\kappa$ B p65 detektiert werden konnte. Im vergrößerten Ausschnitt (c rechts) sind beispielhaft zwei Zellen mit aktivierten NF- $\kappa$ B p65 (unten links, lokalisiert im Zellkern) und nicht aktivierten NF- $\kappa$ B p65 (oben rechts, zytoplasmatisch lokalisiert) dargestellt. Die Aufnahmen wurden am Keyence-Mikroskop bei 400facher Vergrößerung angefertigt, der Maßstab beträgt 10  $\mu$ m.

### 3 Ergebnisse

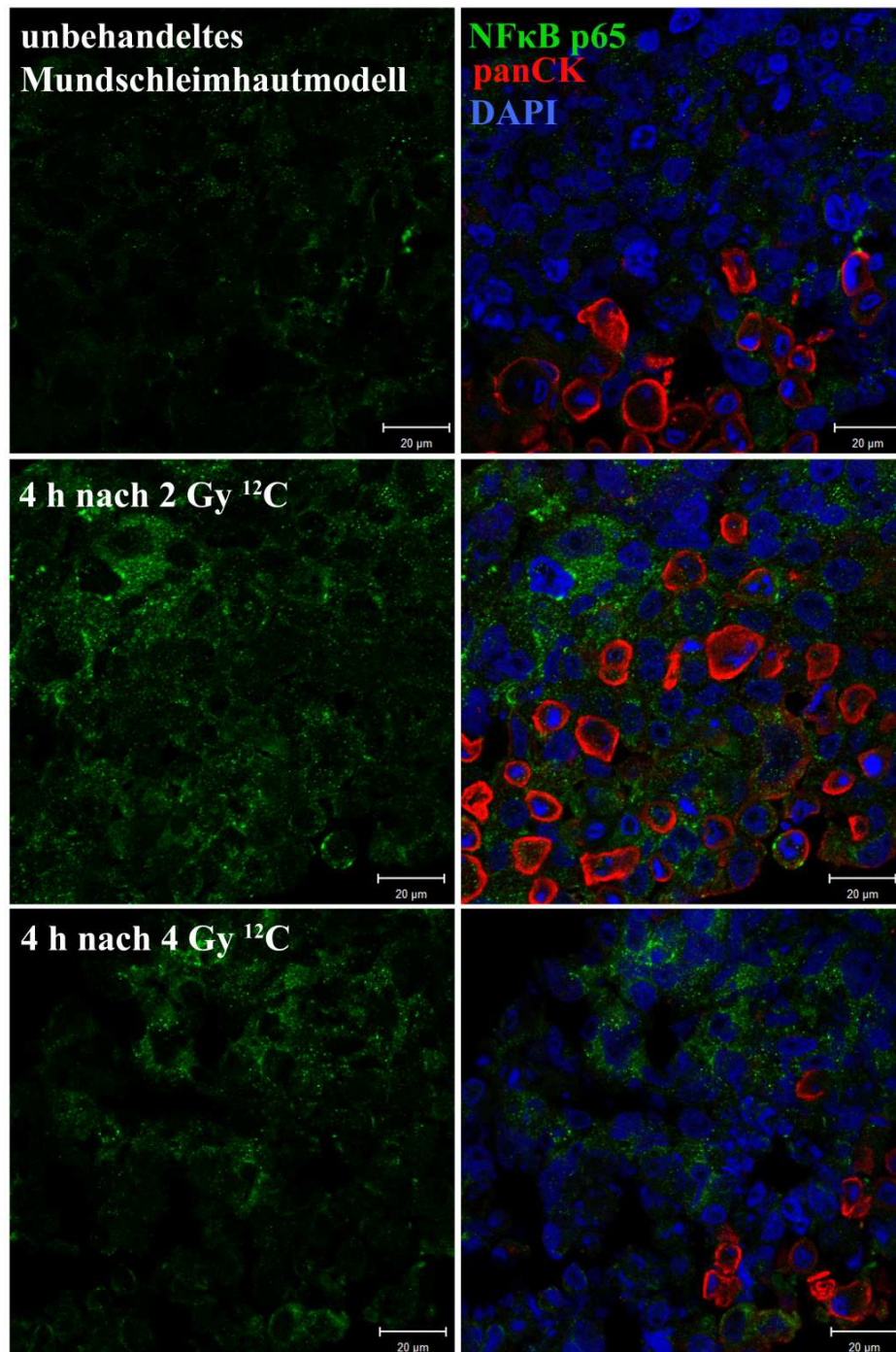
Die effizienteste Aktivierung erzielte die Inkubation der Zellkulturen mit TNF- $\alpha$ , wie in Abbildung 25 durch die Markierung mit weißen Pfeilen verdeutlicht wird. Die Inkubation mit IL-1 $\beta$  induzierte ebenfalls eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors, diese stellte sich aber nicht so intensiv ein, wie mit TNF- $\alpha$ . Für folgende Färbungen an organotypischen Kulturen wurden diese für die Erzeugung von Positivkontrollen ebenfalls mit TNF- $\alpha$  inkubiert und dann wie üblich kryokonserviert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Ergebnisse einer Färbung von organotypischen Kulturen sind in Abbildung 26 dargestellt. Durch die dreidimensionale Struktur des Mundschleimhaut-Modells gestaltete sich eine Analyse am herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskop schwierig, nichts desto trotz ließen sich einige Zellen mit aktiviertem NF- $\kappa$ B p65 detektieren (markiert durch weiße Pfeile in Abbildung 26).



**Abbildung 26: NF- $\kappa$ B p65-Färbung auf unterschiedlich behandelten organotypischen Kulturen.** Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von NF- $\kappa$ B p65-Färbungen (grün) an unbehandelten, bzw. TNF- $\alpha$ -behandelten Kryoschnitten organotypischer Kulturen. Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Weiße Pfeile markieren die Zellen, in denen nukleare Lokalisierung von NF- $\kappa$ B p65 detektiert werden konnte. Die Aufnahmen wurden am Keyence-Mikroskop bei 600facher Vergrößerung angefertigt, der Maßstab beträgt 10  $\mu$ m.

Eine  $^{12}\text{C}$ -induzierte NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung, die durch Akkumulation des Transkriptionsfaktors im Zellkern gekennzeichnet ist, konnte in den organotypischen Kulturen bei keiner Dosis und zu keinem Inkubationszeitpunkt detektiert werden. In Abbildung 27 sind beispielhaft fluoreszenzmikroskopische LSM-Aufnahmen von unbehandelten und  $^{12}\text{C}$ -bestrahlten organotypischen Kulturen dargestellt, wobei es sich hierbei um den frühesten untersuchten Inkubationszeitpunkt handelt.



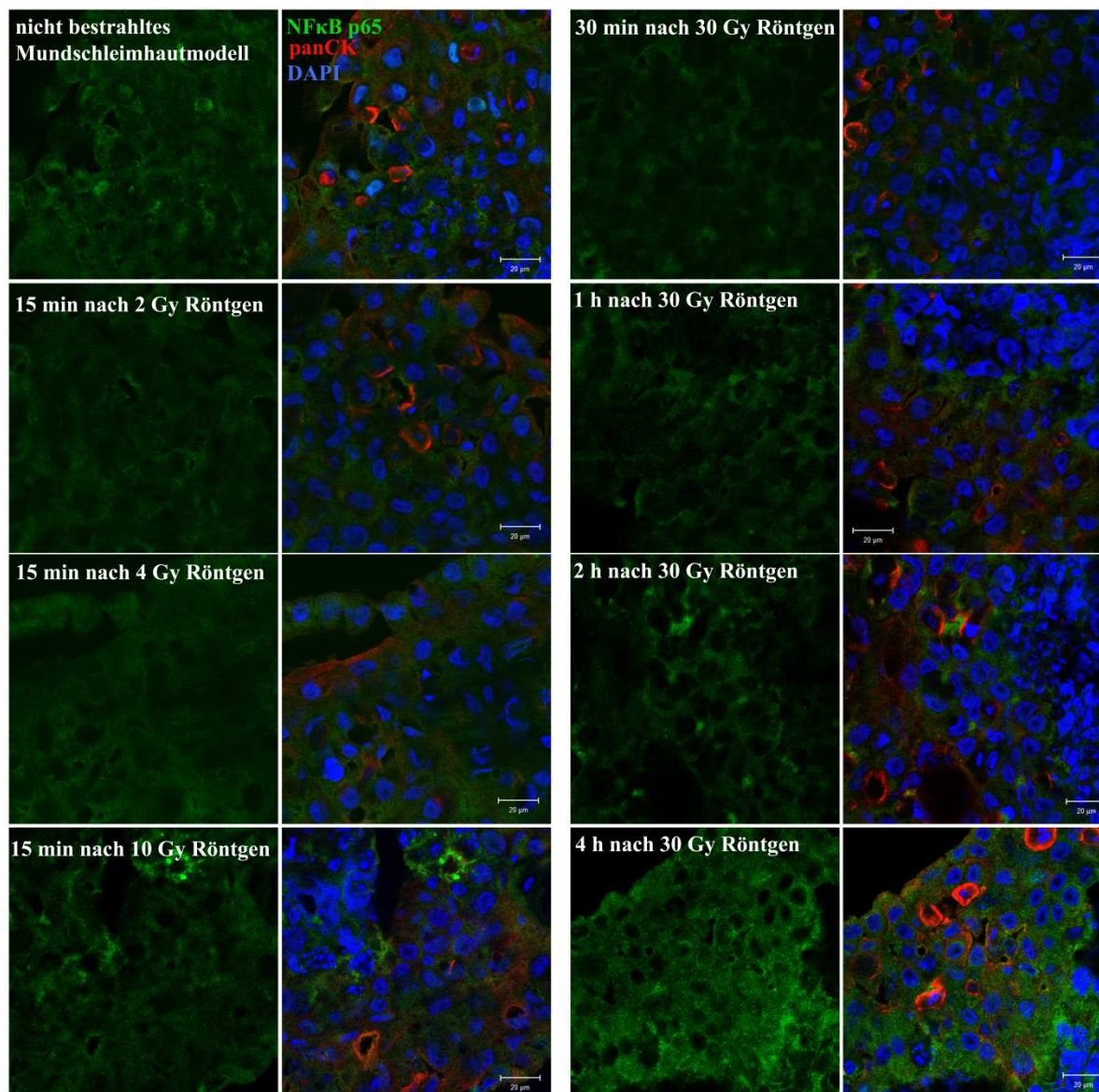


**Abbildung 27: NF-κB p65-Färbungen von  $^{12}\text{C}$ -bestrahlten organotypischen Kulturen.** Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NF-κB p65 (grün)/panCK (rot)-Doppelfärbung von unbehandelten und mit  $^{12}\text{C}$ -Ionen bestrahlten 3D-Kulturen zum Inkubationszeitpunkt von 4 h. Die Aufnahmen entstanden am Laser-Scanning-Mikroskop. Der Maßstab beträgt 20 µm.

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ergab sich bei den bestrahlten Proben mit 2 und 4 Gy insgesamt ein deutlich höheres Signal für NF-κB p65. In den Aufnahmen des isolierten Grünkanals konnten im Bereich der Zellkerne keinerlei Grünfärbungen nachgewiesen werden, das zu detektierende NF-κB p65-Protein befand sich nur im Zytoplasma.

### 3 Ergebnisse

In Abbildung 28 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NF- $\kappa$ B p65-Färbungen von unbehandelten und mit Röntgen bestrahlten 3D Kulturen gezeigt, wobei unter anderem exemplarisch auch der frühestmögliche Inkubationszeitpunkt von 15 min dargestellt ist. Auch hier konnte eine strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung bei keiner Dosis und zu keinem Inkubationszeitpunkt detektiert werden.



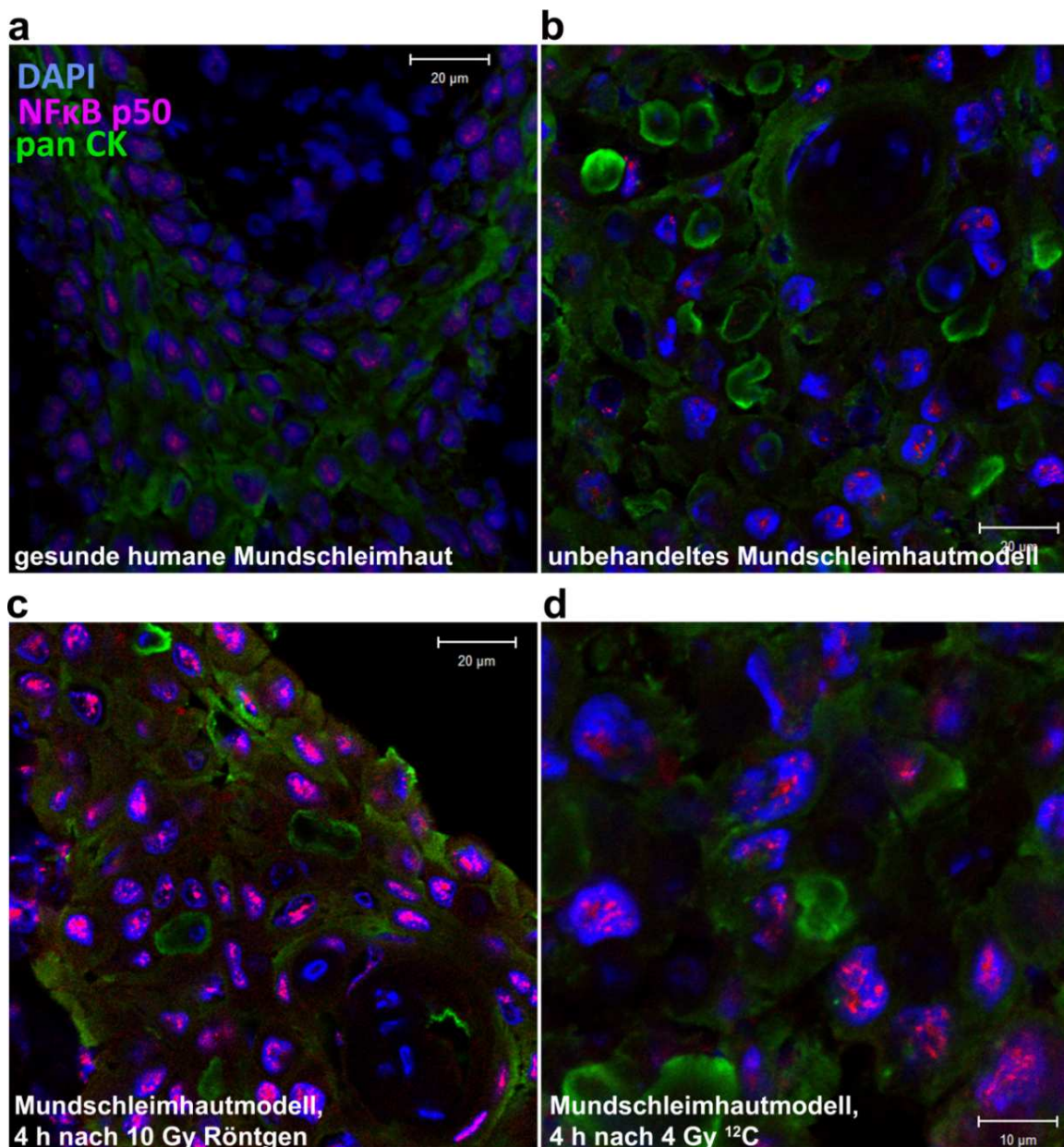
**Abbildung 28: NF- $\kappa$ B p65-Färbungen von Röntgen-bestrahlten organotypischen Kulturen.**

Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NF- $\kappa$ B p60 (grün)/panCK (rot)-Doppelfärbung von unbehandelten und mit Röntgenstrahlung bestrahlten 3D-Kulturen zum Inkubationszeitpunkt von 15 min, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h. Die Aufnahmen entstanden am Laser-Scanning-Mikroskop. Der Maßstab beträgt 20 µm.



### 3.3.2 Strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung

Die Induktion von inflammatorischen Reaktionen verursacht durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder schweren Ionen wurde mit Hilfe von NF- $\kappa$ B p50-Fluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten untersucht. Strahleninduzierte inflammatorische Reaktionen, gekennzeichnet durch vermehrte Akkumulationen des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B p50 im Zellkern, konnten durch die Immunfluoreszenzfärbung und anschließendes Mikroskopieren am Laser-Scanning-Mikroskop sichtbar gemacht werden (Abbildung 29).

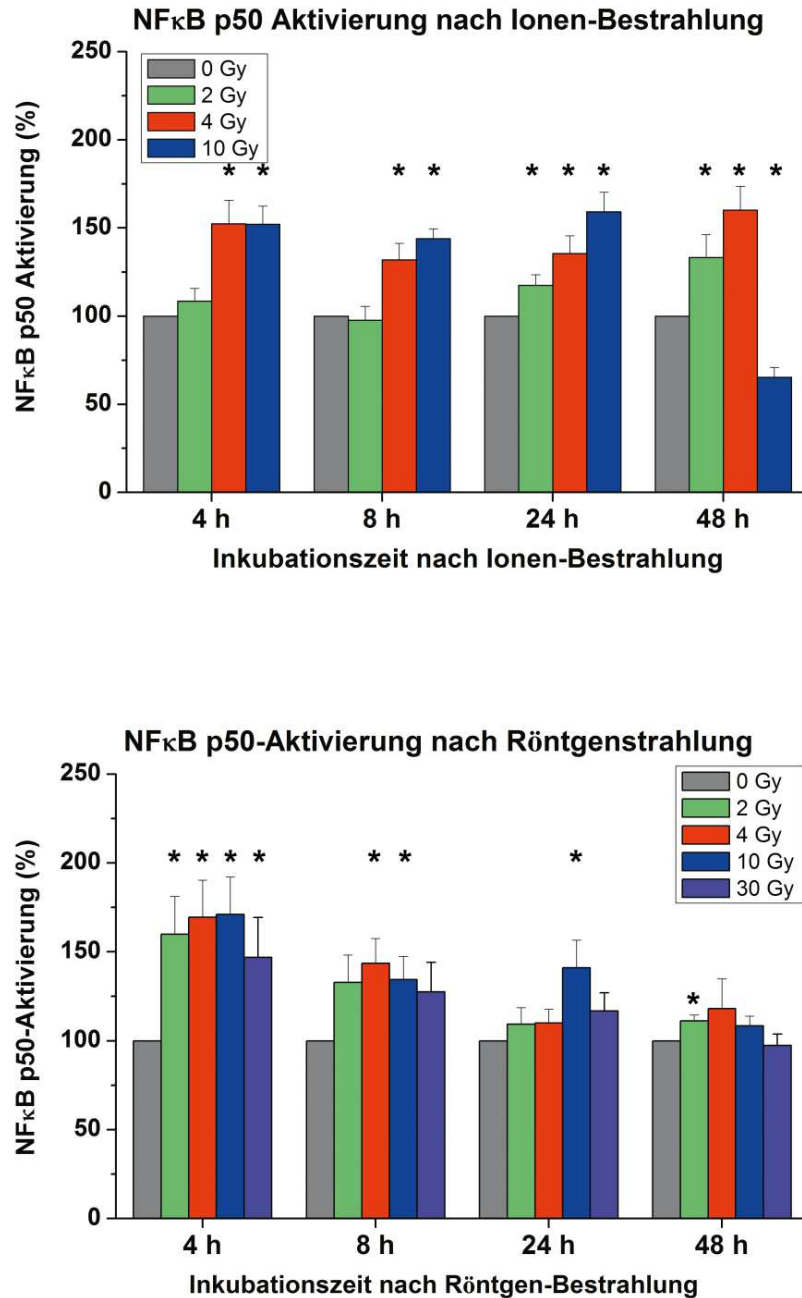


**Abbildung 29: NF- $\kappa$ B p50-Färbungen von gesunder Mundschleimhaut und organotypischen Kulturen.** Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der NF- $\kappa$ B p50 (pink)/panCK (grün)-Doppelfärbung von humaner Mundschleimhaut (a), unbehandeltem Mundschleimhaut-Modell (b) und mit Röntgenstrahlung (c) bzw.  $^{12}\text{C}$ -Ionen (d) bestrahlten 3D-Kulturen zum Inkubationszeitpunkt von 4 h. Die Aufnahmen entstanden am Laser-Scanning-Mikroskop. Der Maßstab beträgt 20  $\mu\text{m}$  (a bis c) bzw. 10  $\mu\text{m}$  (d).

Beim Vergleich zwischen gesunder humaner Mundschleimhaut und unbehandelter 3D-Kultur ergaben sich in Bezug auf NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung keine Unterschiede. Eine gewisse „Grundaktivität“ des Transkriptionsfaktors wurden in den Zellkernen der humanen Proben und der unbehandelten organotypischen Kulturen beobachtet. Bei bestrahlten Proben dagegen konnten bei bestimmten Dosen und Inkubationszeitpunkten deutlich höhere Signale für NF- $\kappa$ B p50 in den Zellkernen detektiert werden. Die Aufnahmen von Röntgen-bestrahlten Proben mit 10 Gy offenbarten, dass nicht nur die Kernlokalisierung von NF- $\kappa$ B p50 intensiver war, sondern dass auch im Zytoplasma ein deutlich höheres Signal für das Protein nachzuweisen war, deutlich erkennbar durch die diffuse Rotfärbung außerhalb der DAPI-markierten Zellkerne. Durch die stärkere Vergrößerung in der Aufnahme der Ionen-bestrahlten 3D-Kultur (Teilabbildung d) ist die Akkumulation von NF- $\kappa$ B p50 in der Mitte der Zellkerne besonders gut erkennbar.

Um die optischen Beobachtungen analytisch darzustellen, wurden die mikroskopischen Aufnahmen zur computergestützten Quantifizierung herangezogen, wobei die Signalintensität von NF- $\kappa$ B p50 nur in Zellkernen berücksichtigt wurde. Bei der Auswertung wurden die Ergebnisse für unbehandelte Kontrollen auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben auf die Kontrollen der jeweiligen Inkubationszeitpunkte bezogen. Die daraus erhaltenen Werte sind in Abbildung 30 als Balkendiagramme dargestellt. Aus den Auswertungen ging hervor, dass ab einer Dosis von 4 Gy bereits 4 h nach Bestrahlung mit  $^{12}\text{C}$ -Schwerionen eine statistisch signifikante Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50 erfolgte. Bei einer Bestrahlung mit 2 Gy konnte erst 24 h nach Bestrahlung eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50 detektiert werden. Des Weiteren konnte 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy eine signifikante Reduzierung der NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung detektiert werden.

Röntgenstrahlen induzierten eine statistisch signifikante Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50 nahezu unmittelbar nach Bestrahlung, ab 8 h ließ diese jedoch stetig nach sodass nach 24 h nur noch bei 10 Gy und nach 48 h bei 2 Gy eine statistisch signifikante Aktivierung nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 30: Quantifizierung der strahleninduzierten NF-κB p50-Aktivierungen.**

Die Balkendiagramme zeigen die Quantifizierungen von Immunfluoreszenzfärbungen von Schwerionen- und Röntgenstrahlen-induzierten NF-κB p50-Aktivierungen in Mundschleimhaut-Modellen aus mindestens 3 Aufnahmen pro Probe und 5 unabhängigen Versuchen für Schwerionen und 3 unabhängigen Versuchen für Röntgenbestrahlung. Lediglich die 10 Gy-Werte der Schwerionen-bestrahlten Proben stammen aus einem einzigen Versuch. \*  $p \leq 0,02$ .



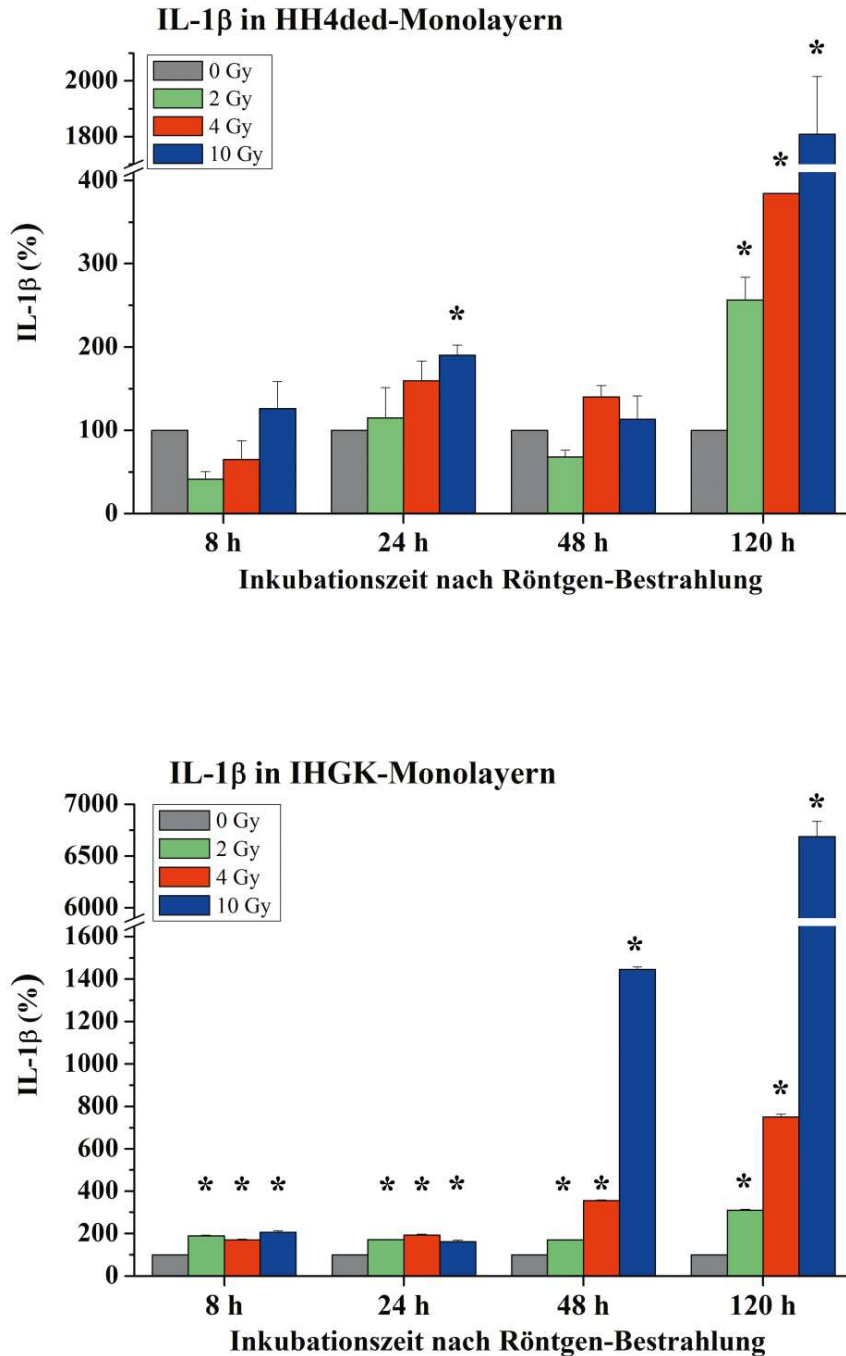
### 3.4 Strahlungsinduzierte Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen

Zu den bekanntesten proinflammatorischen Markern gehören unter anderem die Interleukine, Interferon- $\gamma$  und der Tumornekrosefaktor TNF- $\alpha$ . Um den Einfluss von Strahlung auf die Zytokin-Ausschüttung zu untersuchen, wurden in den Medienüberständen der 3D-Kulturen die Konzentrationen von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, Interleukin-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  analysiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Analysen der Interleukine dargestellt, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  konnten in den Überständen von Röntgen-bestrahlten Zellkultur-Monolayern nicht nachgewiesen werden. IFN- $\gamma$  konnte auch in den 3D-Kulturen weder nach Röntgen- noch nach Schwerionen-Bestrahlung nachgewiesen werden, während TNF- $\alpha$  nur nach Röntgenstrahlung registrierbar war.

#### 3.4.1 Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung in Röntgen-bestrahlten Monolayern

Im Vorfeld wurden die Konzentrationen der besagten Zytokine in den Überständen von Röntgen-bestrahlten Monolayer-Zellkulturen von Fibroblasten und Epithelzellen untersucht. Bei jeder Analyse wurden unbehandelte Kontrollen und Standardreihen mit bekannten Konzentrationen mitgeführt. Die anhand der Kalibrierungsgeraden berechneten Konzentrationen wurden zunächst auf die entsprechenden Zellzahlen normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen. In der Abbildung 31 sind die so erhaltenen Werte für IL-1 $\beta$  in den Zelllinien HH4ded (Fibroblasten) und IHGK (Epithelzellen) als Balkendiagramme dargestellt.

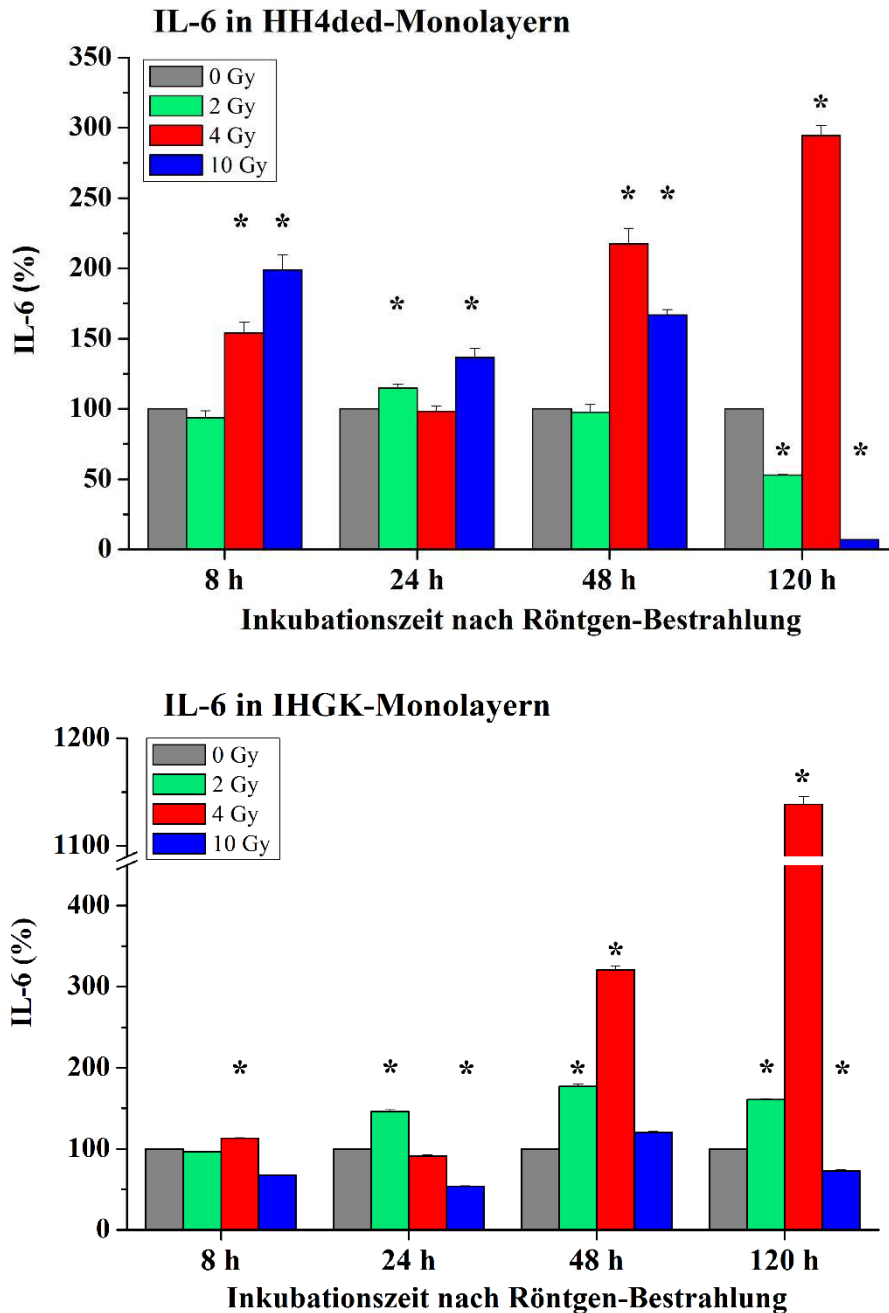
Bei HH4ded konnte erst 24 h nach einer Bestrahlung mit 10 Gy statistisch signifikante Steigerung von IL-1 $\beta$  detektiert werden, 120 h nach Bestrahlung konnte aber bei allen bestrahlten Proben signifikant mehr IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. IHGK-Zellen reagierten dagegen entsprechend bereits nach 8 h auf Bestrahlung bei allen angewandter Dosen.



**Abbildung 31: IL-1β in HH4ded- und IHGK-Monolayern.**

Gezeigt sind ELISA-Ergebnisse von IL-1β in Röntgen-bestrahlten Überständen von HH4ded- und IHGK-Monolayer-Zellkulturen, wobei alle gemessenen Konzentrationen auf die Zellzahl normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen wurden. Die Bestrahlungsdosen betragen 2, 4 und 10 Gy, als Inkubationszeiten wurden 8, 24, 48 und 120 h gewählt. n = 1, N = 3. \*p ≤ 0,02.

Des Weiteren wurden die Überstände auf die Anwesenheit von IL-6 untersucht, wobei teilweise strahlungsinduzierte Zytokin-Ausschüttung detektiert werden konnte (Abbildung 32).



**Abbildung 32: IL-6 in HH4ded- und IHGK-Monolayern.**

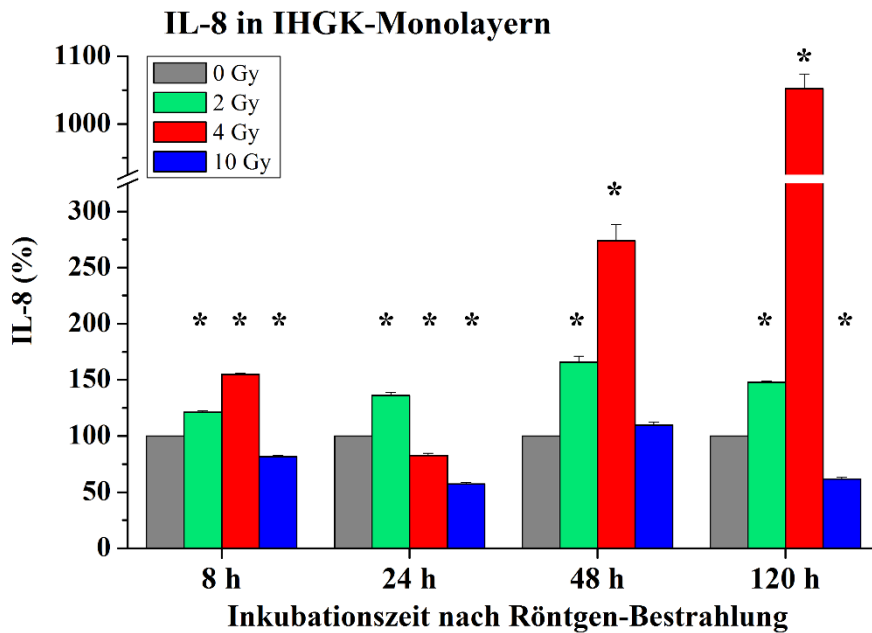
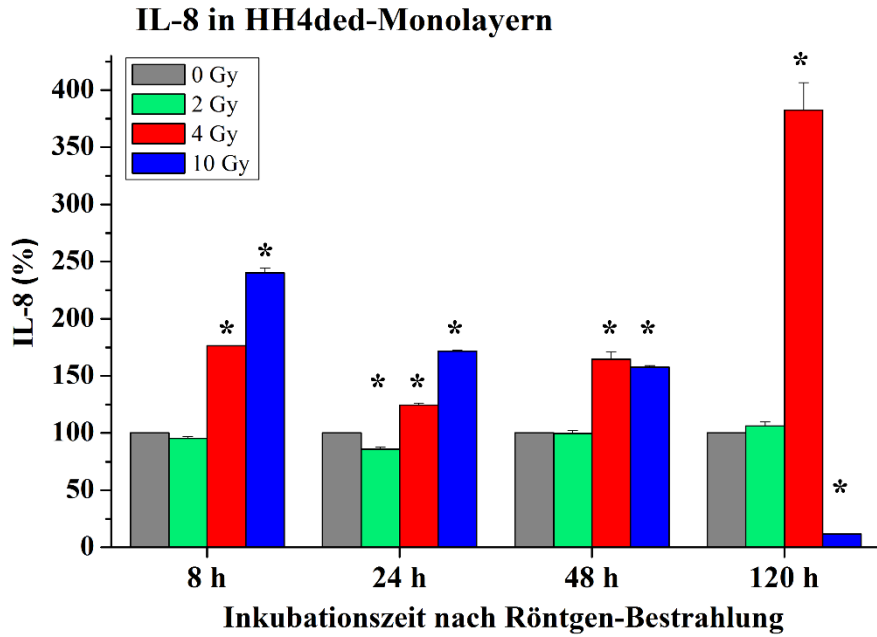
Gezeigt sind ELISA-Ergebnisse von IL-6 in Röntgen-bestrahlten Überständen von HH4ded- und IHGK-Monolayer-Zellkulturen, wobei alle gemessenen Konzentrationen auf die Zellzahl normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen wurden. Die Bestrahlungsdosen betragen 2, 4 und 10 Gy, als Inkubationszeiten wurden 8, 24, 48 und 120 h gewählt.  $n = 1$ ,  $N = 3$ . \* $p \leq 0,02$ .

Eine Bestrahlung mit 4 Gy verursachte sowohl in HH4ded- als auch in IHGK-Zellkulturen nach 8, 48 und 120 h statistisch signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen, wobei 10 Gy nur bei HH4ded zwischen 8 und 48 h Inkubationsdauer zur vermehrten Zytokin-Ausschüttung führte. Interessanterweise fiel die IL-6-Konzentration 120 h nach einer Bestrahlung mit 10 Gy auf einen sehr niedrigen Wert, der nur noch ca. ein Zehntel der unbehandelten Kontrollen

betrug (6,9 %). Auch in den IHGK-Monolayern fiel die IL-6-Konzentration bei 8, 24 und 120 h nach 10 Gy Röntgenstrahlung unter den Wert der unbehandelten Kontrollen. Bei 48 h induzierte eine Bestrahlung mit 10 Gy nur einen leichten nicht signifikanten Konzentrationsanstieg des untersuchten Zytokins. Ab 24 h nach Bestrahlung verursachten 2 Gy Röntgenstrahlung signifikant höhere Konzentrationen von IL-6. Die intensivsten strahlungsinduzierten Effekte wurden bei den Proben detektiert, die mit 4 Gy bestrahlt wurden. Eine signifikante Erhöhung der IL-6-Ausschüttung wurde bei 8, 48 und im höchsten Maße 120 h nach Röntgenstrahlung gemessen.

Ferner wurde auch die Röntgenstrahlungs-induzierte Veränderung der IL-8-Ausschüttung in den beiden Zellkultur-Linien untersucht. Die Ergebnisse der ELISA-Analysen sind als Balkendiagramme in Abbildung 33 dargestellt.

Eine Bestrahlung mit 2 Gy führte bei IHGK-Zellen bereits ab 8 h Inkubationszeit zur vermehrten Ausschüttung von IL-8, während bei HH4ded-Zellen bei 2 Gy zu keinem Inkubationszeitpunkt erhöhte Konzentrationen nachgewiesen wurden. Dort war eine Dosis von 4 Gy nötig, um eine statistisch signifikante Erhöhung der IL-8-Ausschüttung zu induzieren, wobei nach 120 h das Maximum erreicht wurde. Bei der Bestrahlung von HH4ded-Monolayern mit 10 Gy war nach 8 h die IL-8-Konzentration am höchsten und nahm mit längerer Inkubationsdauer stetig ab, bis nach 120 h nur noch eine ganz niedrige Konzentration des Zytokins nachgewiesen wurde. Bei IHGK-Monolayern führten 4 Gy Röntgenstrahlung ebenfalls zu signifikant höheren IL-8-Konzentrationen, bis auf die Inkubationsdauer von 24 h, wo eine statistisch signifikante Abnahme des Chemokins detektiert wurde. Bei IHGK-Zellen induzierte Röntgenstrahlung mit 4 Gy nach einer Inkubation von 120 h die intensivste IL-8-Abgabe. Eine Bestrahlung von IHGK-Zellkulturen mit 10 Gy nach 8, 24 und 120 h führte zu signifikant niedrigeren IL-8-Konzentrationen, während nach 48 h die Chemokin-Konzentration annähernd dem Level der unbehandelten Proben entsprach.



**Abbildung 33: IL-8 in HH4ded- und IHGK-Monolayern.**

Gezeigt sind ELISA-Ergebnisse von IL-8 in Röntgen-bestrahlten Überständen von HH4ded- und IHGK-Monolayer-Zellkulturen, wobei alle gemessenen Konzentrationen auf die Zellzahl normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen wurden. Die Bestrahlungsdosen betragen 2, 4 und 10 Gy, als Inkubationszeiten wurden 8, 24, 48 und 120 h gewählt. n = 1, N = 3. \*p ≤ 0,001.

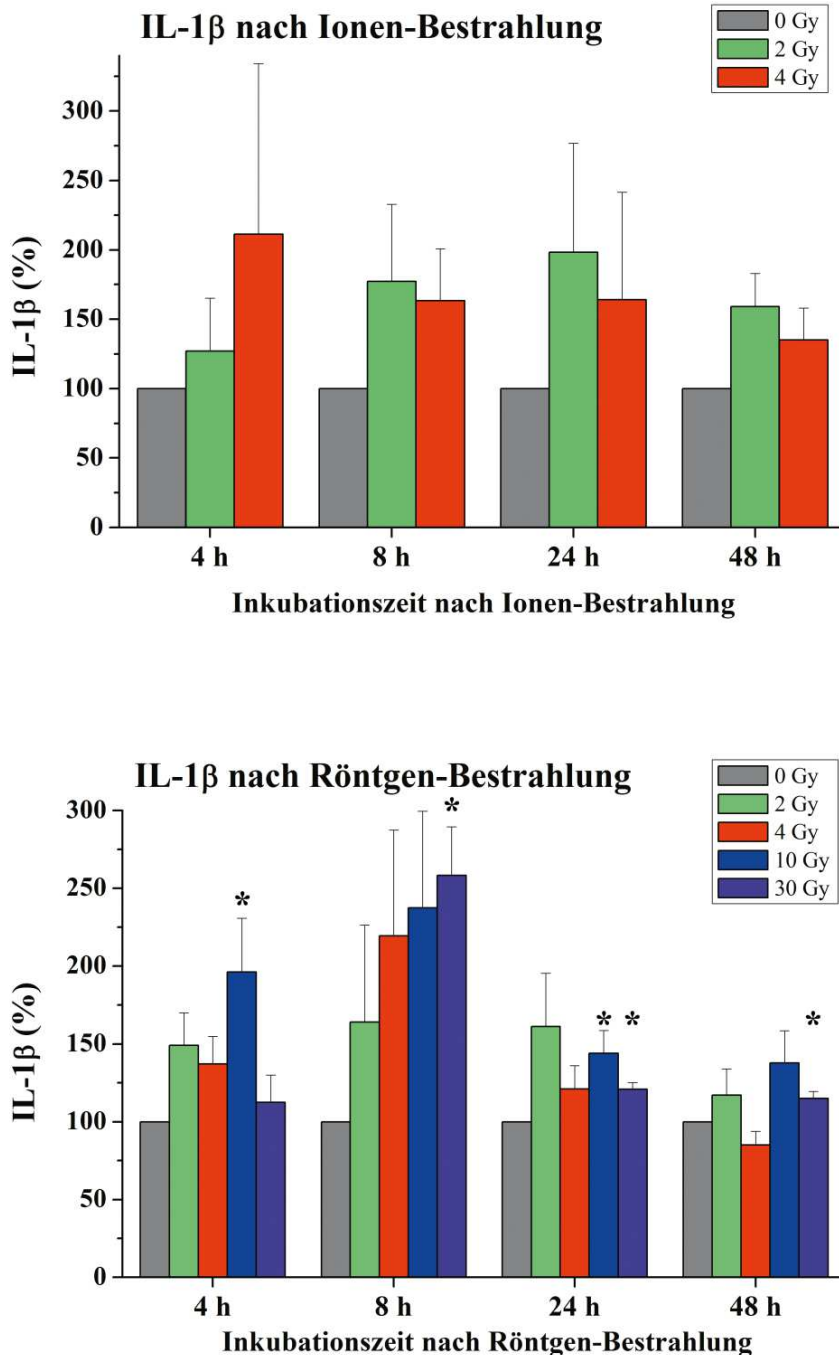
#### 3.4.2 Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen

Nachdem in den Röntgen-bestrahlten Zellkultur-Monolayern Röntgenstrahlungs-induzierte Ausschüttung von einigen Zytokinen und Chemokinen nachgewiesen werden konnte, wurden die Überstände von Röntgen- und Schwerionen-bestrahlten organotypischen Kulturen ebenfalls auf die Anwesenheit der oben genannten Zytokine und Chemokine analysiert. Dabei wurde genauso vorgegangen wie bei der Analyse und Auswertung der ELISA-Ergebnisse für Monolayer, nur mit dem Unterschied, dass die Zytokin- oder Chemokin-Konzentrationen in den Medienüberständen statt auf die Zellzahl bei 3D-Kulturen auf die Kompaktheit der jeweiligen Proben normiert wurden. Die gemessenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  lagen sowohl in Röntgen- als auch in Schwerionen-bestrahlten Kulturen unterhalb der Nachweisgrenzen, und TNF- $\alpha$  konnte nur in den Medienüberständen Röntgen-bestrahlter Kulturen detektiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden als Balkendiagramme mit Standardfehlerangaben und Signifikanz-Markierungen (\*) dargestellt.

In (Abbildung 34) sind die Ergebnisse der ELISA-Analysen von IL-1 $\beta$  in Medienüberständen von Schwerionen- bzw. Röntgenbestrahlten organotypischen Mundschleimhaut-Modellen dargestellt.

Die ELISA-Analysen von IL-1 $\beta$  in Medienüberständen von Schwerionen-bestrahlten organotypischen Mundschleimhaut-Modellen ergaben eine reproduzierbare Tendenz zu vermehrter strahlungsinduzierter Ausschüttung des Zytokins.

Nach Röntgen-Bestrahlung mit höheren Dosen konnten deutlich erhöhte IL-1 $\beta$ -Niveaus detektiert werden. Eine statistisch signifikante Zunahme der IL-1 $\beta$ -Ausschüttung verursachte eine Applikation mit 10 Gy bei 4 und 24 h und mit 30 Gy bei 8 h nach Röntgen-Bestrahlung. Die stärksten Effekte konnten 8 h nach Röntgen-Bestrahlung gemessen werden. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass die gemessenen Absolutwerte für IL-1 $\beta$  sehr niedrig waren, jedoch stets oberhalb der Nachweisgrenzen lagen.

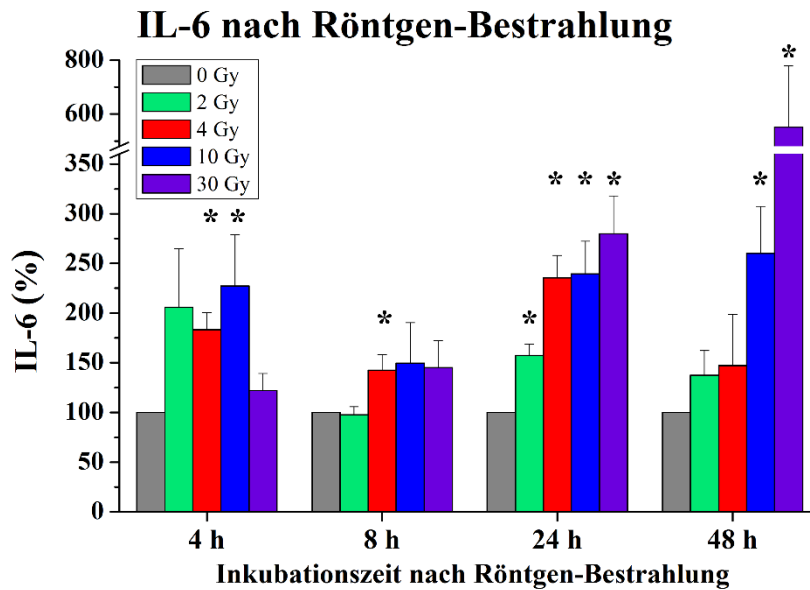
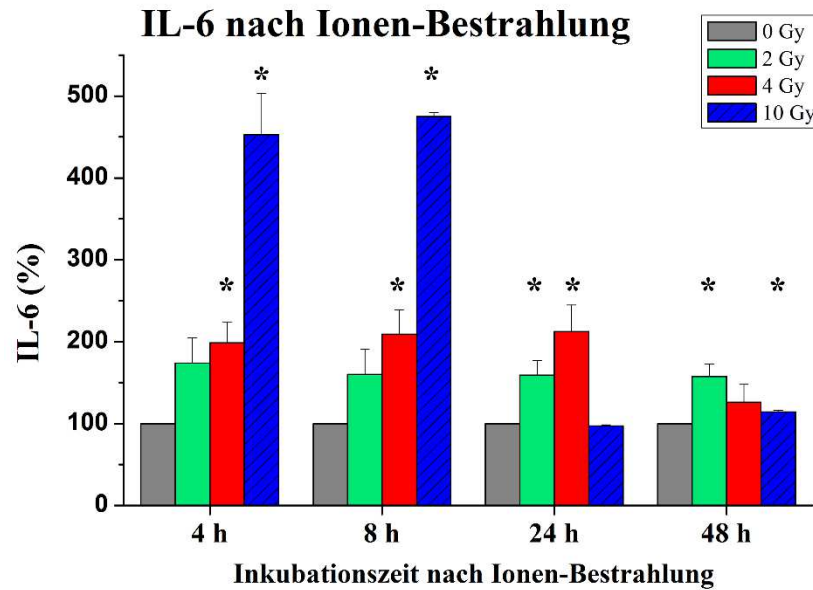


**Abbildung 34: IL-1β in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen.**

Gezeigt sind ELISA-Ergebnisse von IL-1β in Schwerionen- und Röntgen-bestrahlten Überständen von dreidimensionalen organotypischen Kulturen, wobei alle gemessenen Konzentrationen auf die Kompaktheit normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen wurden. Die Bestrahlungsdosen für Schwerionenstrahlung betragen 2 und 4 Gy und für Röntgenstrahlung 2, 4, 10 und 30 Gy, als Inkubationszeiten wurden 4, 8, 24 und 48 h gewählt. <sup>12</sup>C-Bestrahlung: n = 4, N = 3; Röntgen-Bestrahlung: n = 5, N = 3.\*p ≤ 0,02.

Des Weiteren wurde bei der Analyse von IL-6 festgestellt, dass Schwerionenstrahlung vor allem nach 4 und 8 h eine starke dosisabhängige Reaktion mit signifikant höheren Konzentrationen nach 4 und 10 Gy induzierte (Abbildung 35). Der signifikante Anstieg der Zytokin-Ausschüttung nach einer Ionen-Bestrahlung, relativ zu den jeweiligen unbestrahlten

Proben, war bei allen untersuchten Inkubationszeitpunkten annähernd konstant, während bei 4 Gy die IL-6-Konzentration nach 48 h fast auf das Ausgangsniveau fiel.



**Abbildung 35: IL-6 in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen.**

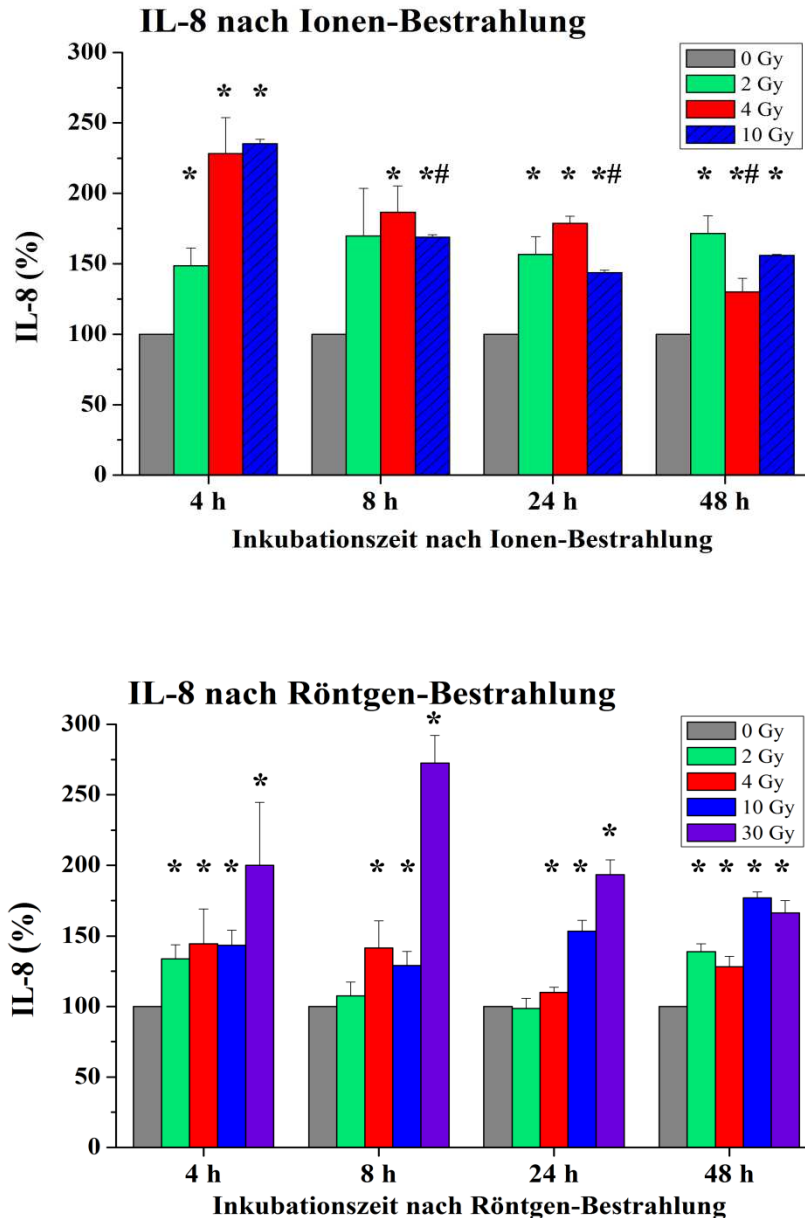
Gezeigt sind ELISA-Ergebnisse von IL-6 in Schwerionen- und Röntgen-bestrahlten Überständen von 3D-Kulturen, wobei alle gemessenen Konzentrationen auf die Kompaktheit normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen wurden. Die Bestrahlungsdosen für Schwerionenstrahlung betragen 2, 4 und 10 Gy, für Röntgenstrahlung 2, 4, 10 und 30 Gy, als Inkubationszeiten wurden 4, 8, 24 und 48 h gewählt. n = 5, N = 3. \*p ≤ 0,02.

Röntgenstrahlung induzierte bei den 3D-Kulturen durchgehend höhere IL-6-Konzentrationen, ausgenommen bei 8 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy. Nach einer Inkubationszeit von 4 h



induzierten 4 und 10 Gy, nach 8 h nur 4 Gy signifikant höhere Konzentrationen des untersuchten Zytokins. Ab 24 h nach Röntgenstrahlung konnten Dosis-abhängige Zunahmen der IL-6-Konzentrationen beobachtet wurden, wobei sich nach 24 h bei allen Dosen und nach 48 h nur bei 10 und 30 Gy Signifikanzen zeigten.

Die intensivsten strahlungsinduzierten Reaktionen mit den höchsten Absolutwerten konnten bei dem Chemokin IL-8 nachgewiesen werden (Abbildung 36).

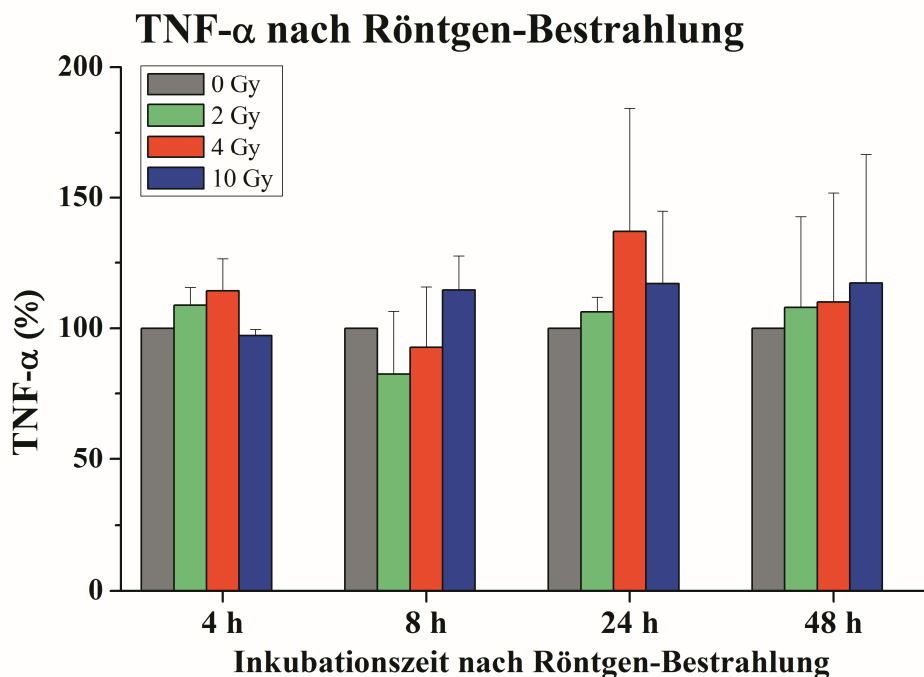


**Abbildung 36: IL-8 in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen.**

Gezeigt sind ELISA-Ergebnisse von IL-8 in Schwerionen- und Röntgen-bestrahlten Überständen von 3D-Kulturen, wobei alle gemessenen Konzentrationen auf die Kompaktheit normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen wurden. Die Bestrahlungsdosen für Schwerionenstrahlung betragen 2, 4 und 10 Gy, für Röntgenstrahlung 2, 4, 10 und 30 Gy, als Inkubationszeiten wurden 4, 8, 24 und 48 h gewählt. n = 5, N = 3. \*p ≤ 0,02 bezogen auf unbehandelte Proben; # p ≤ 0,02 bezogen auf die gleiche Dosis bei 4 h.

Sowohl Schwerionen- als auch Röntgenstrahlung verursachte bei fast allen Dosen und unabhängig von der Inkubationsdauer signifikant höhere IL-8-Konzentrationen. Bei isolierter Betrachtung der 4 und 10 Gy-Balken nach Schwerionen-Bestrahlung, fällt das teilweise statistisch signifikante (markiert durch #) Inkubationszeit-abhängige Absinken der IL-8-Konzentrationen auf, wobei die niedrigsten Werte immer noch deutlich höher waren als die der unbehandelten Proben der entsprechenden Inkubationszeitpunkte. Nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurde bei 8 h und 30 Gy der höchste IL-8-Anstieg detektiert, wobei ab 24 h die Chemokin-Konzentrationen deutlich abfielen, jedoch immer noch signifikant höher waren als in unbehandelten Proben.

Bei den ELISA-Untersuchungen von TNF- $\alpha$  in bestrahlten Überständen lag die Zytokin-Konzentration nach Schwerionenstrahlung bei 3 unabhängigen Versuchen unterhalb der Nachweisgrenze, in den Röntgen-bestrahlten Proben konnte zwar TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden (Abbildung 37), strahlungsinduzierte Veränderungen dagegen waren nicht feststellbar.

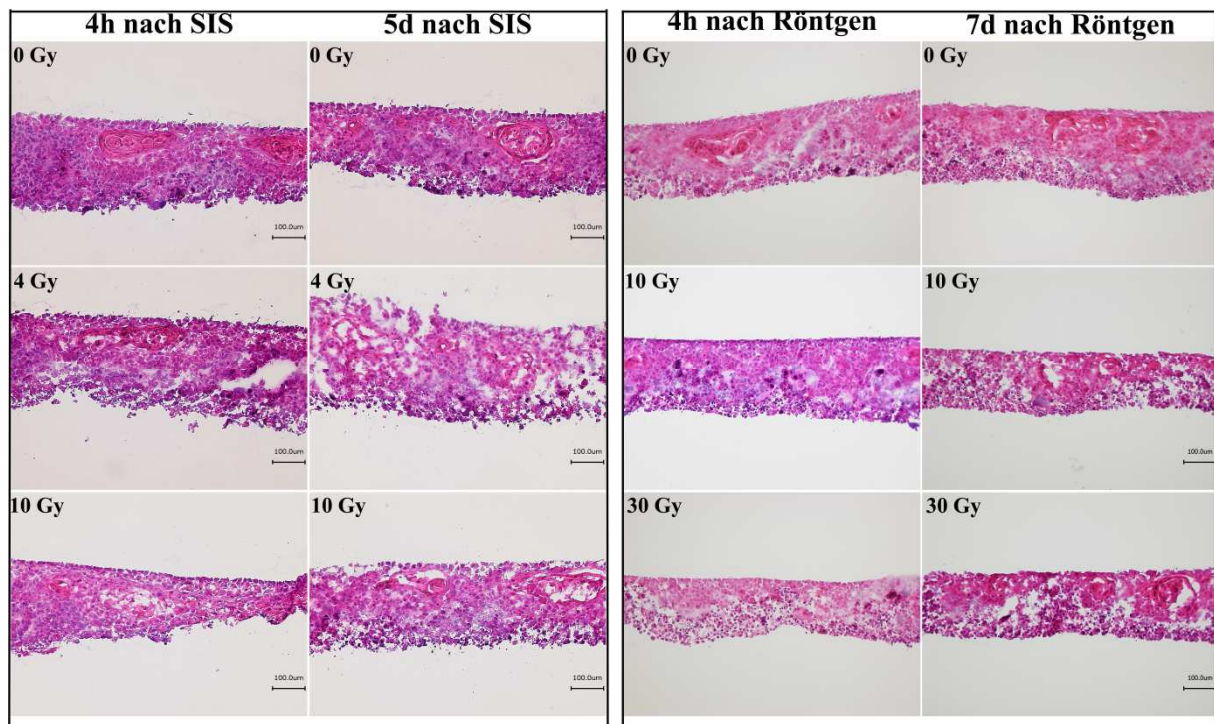


**Abbildung 37: TNF- $\alpha$  in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen.**

Gezeigt sind ELISA-Ergebnisse von TNF- $\alpha$  in Röntgen-bestrahlten Überständen von dreidimensionalen organotypischen Kulturen, wobei alle gemessenen Konzentrationen auf die Kompaktheit normiert, die unbehandelten Proben auf 100 % gesetzt und die bestrahlten Proben darauf bezogen wurden. Die Bestrahlungsdosen betragen 2, 4 und 10 Gy, als Inkubationszeiten wurden 4, 8, 24 und 48 h gewählt.  $n = 3$ ,  $N = 3$ . \* $p \leq 0,02$  bezogen auf unbehandelte Proben.

### 3.5 Einfluss von Bestrahlung auf die Kompaktheit

Um die Wirkung von Strahlung auf die Gewebeintegrität der 3D-Kulturen zu beurteilen, wurde zunächst untersucht, ob es Einwirkungen auf die Struktur der Kulturen gab. Dazu wurden die Strukturen der HE-gefärbten Kryoschnitte erst mit dem Auge und dann computergestützt analysiert. In Abbildung 38 sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Schwerionen- und Röntgen-bestrahlten Kulturen zum frühesten und spätesten untersuchten Zeitpunkt nach Bestrahlung dargestellt. Die gravierenden Schwerionen-induzierten Strukturschäden sogar schon 4 h nach Bestrahlung mit 4 bzw. 10 Gy ließen sich bereits mit dem Auge ganz deutlich erkennen.



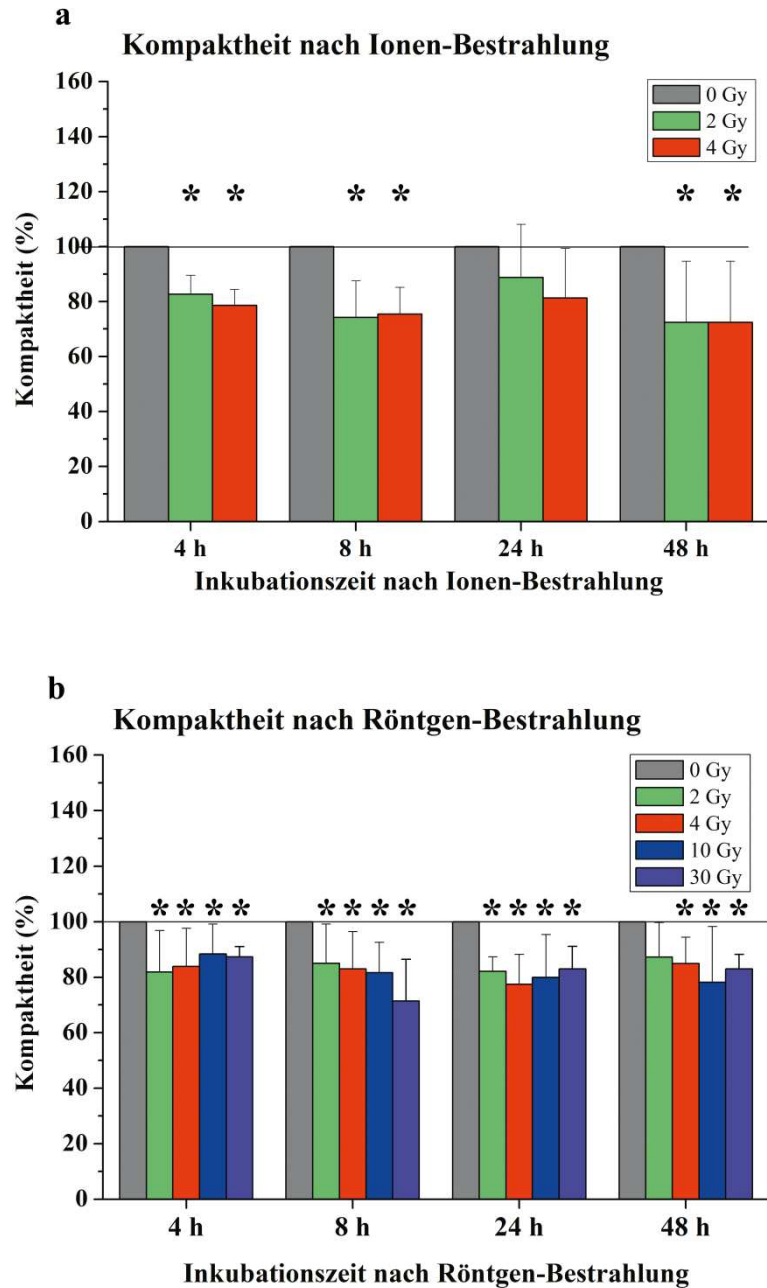
**Abbildung 38: HE-Färbungen von dreidimensionalen Mundschleimhaut-Modellen.**

Gezeigt sind einige repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der HE-Färbungen nach Bestrahlung mit 4 und 10 Gy Schwerionen bzw. 10 und 30 Gy Röntgenstrahlung zum frühesten und zum spätesten Inkubationszeitpunkt. Zum Vergleich sind zu jedem Inkubationszeitpunkt unbehandelte Proben (0 Gy) aufgeführt. Die Aufnahmen wurden am Keyence-Mikroskop bei 100facher Vergrößerung angefertigt. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Bei Röntgenstrahlung konnten bei dem frühen Zeitpunkt von 4 h erst nach einer Bestrahlung mit 30 Gy Strukturschäden beobachtet werden, 7 Tage nach Bestrahlung induzierten aber auch schon 10 Gy Kompaktheitsverlust. In dieser Abbildung sind nur bestimmte ausgewählte Dosen und Zeitpunkte zur Veranschaulichung der Strukturschäden und des Kompaktheitsverlustes gewählt. Um den strahlungsinduzierten Kompaktheitsverlust

### 3 Ergebnisse

quantitativ analysieren zu können, wurden für alle Strahlungs Dosen, (bei Schwerionen bis 4 Gy, bei Röntgen bis 30 Gy) und Inkubationszeitpunkte bis 48 h HE-gefärbte Kryoschnitte Computer-gestützt untersucht. In Abbildung 39 sind die Ergebnisse dieser Auswertung als Balkendiagramm dargestellt.



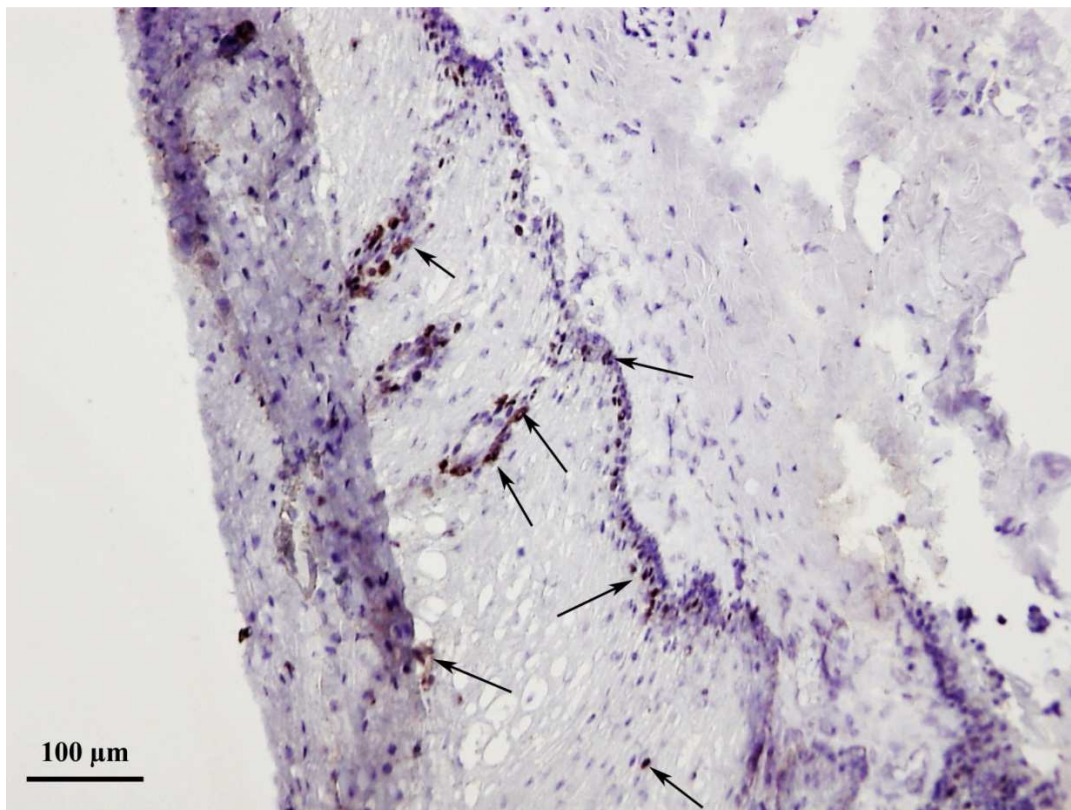
**Abbildung 39: Quantifizierung des Kompaktheitsverlustes nach Ionen- und Röntgen-Bestrahlung.**

Gezeigt ist der strahlungsinduzierte Kompaktheitsverlust als Balkendiagramm. Die Auswertung erfolgte aus 5 unabhängigen Versuchen und mindestens 3 lichtmikroskopischen Aufnahmen pro Probe. Die Kompaktheit der unbehandelten Proben wurde jeweils auf 100 % gesetzt und die Kompaktheit der bestrahlten Kulturen für den jeweiligen Zeitpunkt darauf bezogen. \* $p \leq 0,02$ .

Wie man den mikroskopischen Aufnahmen optisch bereits entnehmen konnte, verursachte eine Schwerionenstrahlung bereits nach 4 h und 2 Gy einen statistisch signifikanten Kompaktheitsverlust, was sich nach 8 h bestätigte. Nach 48 h betrug die Kompaktheit nur noch zwischen 70 und 80 % der unbehandelten Proben. Nach Röntgen-Bestrahlung konnten beinahe durchgehend signifikante Strukturschäden detektiert werden, lediglich die 2 Gy-Proben nach 48 h wiesen keine statistische Signifikanz auf.

### 3.6 Einfluss von Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten

Um proliferierende Zellen in unbehandelten und bestrahlten Kulturen zu markieren wurde eine histologische Ki-67-Färbung durchgeführt. Das nukleäre Protein Ki-67 verlagert sich während der Mitose auf die Oberfläche des Chromosoms und kann mit einer immunologischen Färbung detektiert werden. Zum Vergleich mit der *in vivo*-Situation wurde im Vorfeld diese Färbung auf Kryoschnitten der echten gesunden humanen Mundschleimhaut durchgeführt (Abbildung 40).



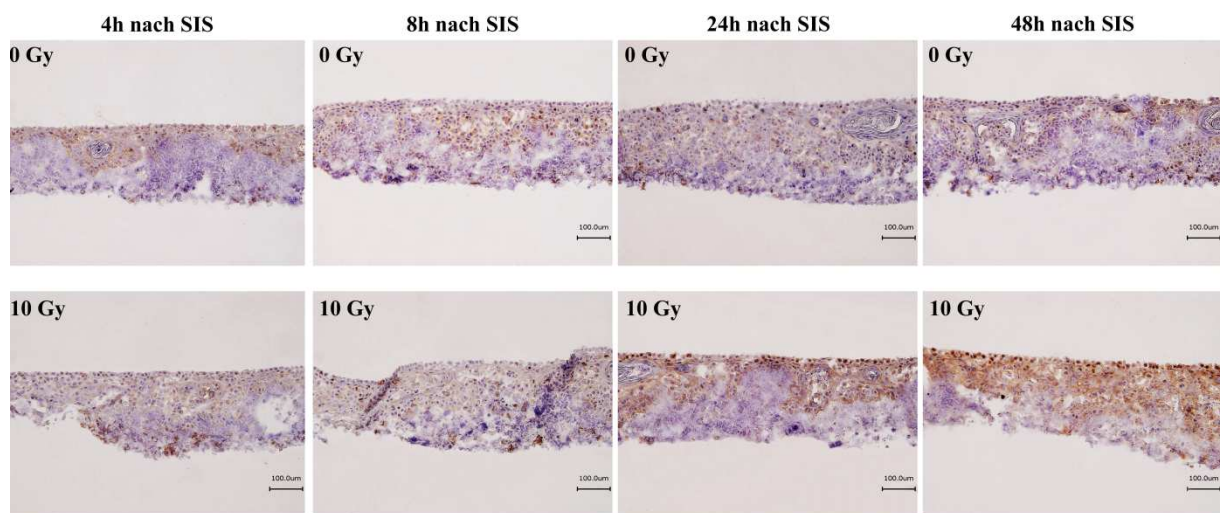
**Abbildung 40: Histologische Ki 67-Färbungen auf gesunder humaner Mundschleimhaut.**

Gezeigt ist eine repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Ki-67-Färbung (braun) auf gesunder humaner Mundschleimhaut. Ki-67-positive Zellen sind durch schwarze Pfeile markiert. Die Aufnahmen wurden am Keyence-Mikroskop bei 100facher Vergrößerung angefertigt. Der Maßstab beträgt 100 µm.



Auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen konnten vor allem im basalen Epithelbereich viele proliferierende Zellen identifiziert werden (markiert durch schwarze Pfeile in Abbildung 40). Die Ki-67-positiven Zellen traten vermehrt im Grenzbereich zum Bindegewebe und in den Papillen auf. Eine solche Lokalisierung der Ki-67-positiven Zellen im Grenzbereich des Epithels wurde bei den organotypischen Kulturen nicht beobachtet (Abbildung 41, Abbildung 42 und Abbildung 43).

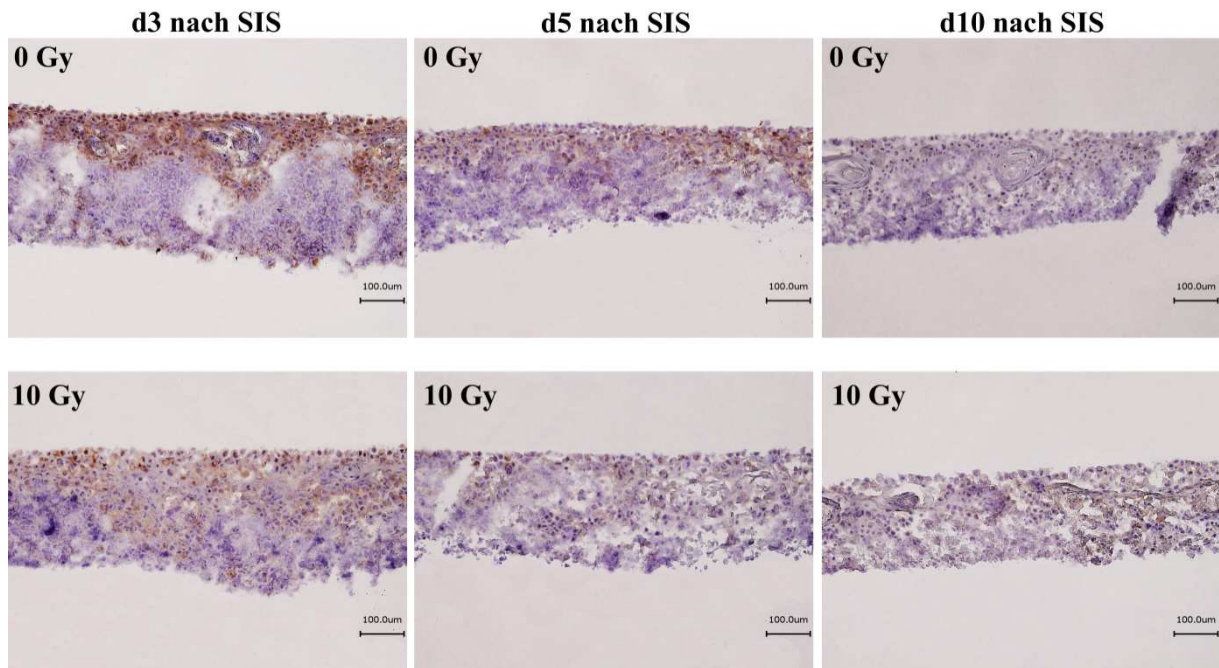
Bei der Ki-67-Färbung von mit schweren Kohlenstoffionen bestrahlten Proben (Abbildung 41) konnten in allen unbehandelten Proben proliferierende Zellen nachgewiesen werden, eine abnehmende Proliferation nach Bestrahlung konnte jedoch nicht detektiert werden. 24 h und 48 h nach Bestrahlung schien die Braunfärbung der Ki-67-positiven Zellen sogar intensiver zu werden.



**Abbildung 41: Histologische Ki-67-Färbungen von Mundschleimhaut-Modellen bis 48 h nach Bestrahlung.**

Gezeigt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Ki-67-Färbungen (braun) von unbehandelten und mit 10 Gy bestrahlten 3D-Kulturen 4, 8, 24 und 48 h nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung. Die Aufnahmen wurden am Keyence-Mikroskop bei 100facher Vergrößerung angefertigt. Der Maßstab beträgt 100 µm.

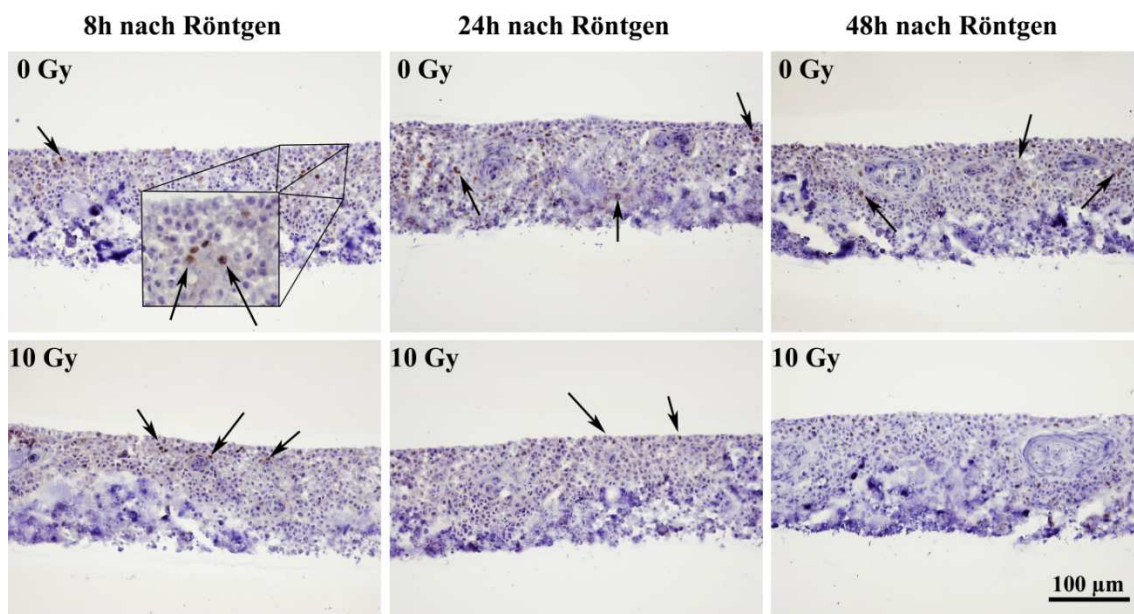
Erst ab 3 Tagen nach Bestrahlung (Abbildung 42) konnte wieder eine Abnahme der Braunfärbung in den bestrahlten Proben detektiert werden, wobei nach 10 Tagen Inkubation auch bei unbehandelten Proben kaum noch proliferierende Zellen nachgewiesen wurden. Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass die organotypischen 3D-Kulturen bereits ab 5 Tagen nach Bestrahlung eine geringere Dicke aufweisen.



**Abbildung 42: Histologische Ki-67-Färbungen von Mundschleimhaut-Modellen 3, 5 und 10 Tage nach Bestrahlung.**

Gezeigt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Ki-67-Färbungen (braun) von unbehandelten und mit 10 Gy bestrahlten 3D-Kulturen 3, 5, und 10 Tage nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung. Die Aufnahmen wurden am Keyence-Mikroskop bei 100facher Vergrößerung angefertigt. Der Maßstab beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

Der Vergleich von Ki-67-Färbungen auf unbehandelten und Röntgen-bestrahlten Proben in Abbildung 43 zeigte kaum Unterschiede im Ki-67-Nachweis. Allein 48 h nach 10 Gy Röntgen-Bestrahlung konnten deutlich weniger proliferierende Zellen detektiert werden.



**Abbildung 43: Histologische Ki-67-Färbungen von dreidimensionalen Mundschleimhaut-Modellen.**

Gezeigt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Ki-67-Färbungen (braun) von unbehandelten und mit 10 Gy bestrahlten 3D-Kulturen 8, 24 und 48 h nach Röntgen-Bestrahlung. Im vergrößerten Ausschnitt sind Ki-67-positive Zellen durch schwarze Pfeile markiert. Die Aufnahmen wurden am Keyence-Mikroskop bei 100facher Vergrößerung angefertigt. Der Maßstab beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

Schwerionen- und Röntgenstrahlung wird heutzutage erfolgreich in der Krebs-Therapie eingesetzt, es gibt jedoch einige gravierende Nebenwirkungen, die den Therapieerfolg erheblich einschränken. Zu diesen Nebenwirkungen gehört auch die strahlungsinduzierte orale Mukositis. Aufgrund der im Weltraum vorherrschenden kosmischen Strahlung könnte orale Mukositis daher ein medizinisches Problem während ausgedehnter Weltraumflüge zum Mond und Mars darstellen, bei denen Astronauten dicht ionisierender Strahlung mit den darin enthaltenen Schwerionen ausgesetzt werden. Um das Risiko strahlungsinduzierter oraler Mukositis einzuschätzen, wurden 3D organotypische Mundschleimhaut-Modelle einer  $^{12}\text{C}$  Schwerionen- bzw. Röntgenstrahlung ausgesetzt.

Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse aus den Bestrahlungsversuchen mit Röntgen- und Schwerionenstrahlung vergleichend diskutiert und mit aktuellen Literaturdaten in Kontext gesetzt. Außerdem soll diese Arbeit zur Risiko-Einschätzung beitragen, während einer Weltall-Mission an einer strahlungsinduzierten oralen Mukositis zu erkranken.

### 4.1 Charakterisierung des organotypischen Mundschleimhaut-Modells

Das dreidimensionale organotypische Mundschleimhaut-Modell stellt im Vergleich zu klassischen zweidimensionalen Zellkulturmodellen eine bessere Nachahmung der *in vivo*-Situation dar. Im Vergleich zu Monolayerkulturen lassen sich an dreidimensionalen Kulturen Erkenntnisse über die Kommunikation und Signal-Weiterleitung zwischen den Zellen innerhalb eines Zellverbands gewinnen. Das hier etablierte Mundschleimhaut-Modell bestand aus gingivalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten. Nerven- und Blutgefäßsystem sowie andere Zellarten der humanen Mundschleimhaut (Immunzellen, Langerhans-Zellen) fehlten in diesem Modell. Umso interessanter ist es, dass sich bei diesen organotypischen Kulturen durch Strahlung und andere Reize dennoch inflammatorische Reaktionen induzieren ließen.



### 4.1.1 Expression der Differenzierungsmarker im Epithel

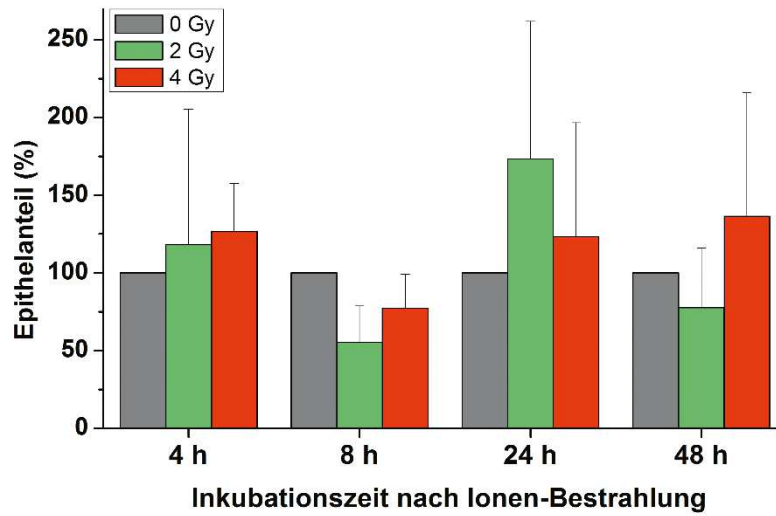
Bei der Untersuchung von Zytokeratin-Expressionen wurden alle untersuchten Zytokeratine (außer CK13) sowohl in Proben der humanen Mundschleimhaut als auch im etablierten Mundschleimhaut-Modell vorgefunden. Es gab dabei Ähnlichkeiten im Expressionsmuster. So wurde zum Beispiel CK4 sowohl in der humanen Mundschleimhaut als auch im Mundschleimhaut-Modell entsprechend der Grundlagenliteratur eher in den basalen und nicht in verhornten Epithelzellen gebildet (Abbildung 17). Das Zytokeratin CK14 dagegen, das in der Kultur im gesamten Epithel exprimiert war, wurde in der humanen Mundschleimhaut hauptsächlich in den apikalen Epithelzellen detektiert (Abbildung 16).

Bei den Quantifizierungsanalysen des Epithelanteils bzw. der Kompaktheit in den Kontrollproben im Verlauf der Inkubationszeit traten keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abbildung 18). Daraus folgt, dass die ermittelten Unterschiede in der Kompaktheit ausschließlich auf die Strahleneinwirkung zurückzuführen sind.

Bei der Untersuchung von strahlungsinduzierten Veränderungen des Epithelanteils anhand der pan-Zytokeratinfärbungen wurden nach Schwerionenbestrahlung keine signifikanten Unterschiede detektiert (Abbildung 44 a). Lediglich in den Röntgen-bestrahlten Kulturen schrumpfte das Epithel, statistische Signifikanz wurde aber erst 48 h nach einer Bestrahlung mit 10 Gy ermittelt (Abbildung 44 b). Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu einer früheren Studie, wonach bei Strahlentherapie-Patienten eine vermehrte Zytokeratin-Expression während der ersten Phasen der oralen Mukositis (4 bis 6 Tage nach Bestrahlung (Sonis, 1998)) beobachtet wurde (Bonan et al., 2006). Dabei wurden den Patienten Biopsien aus der bukkalen Mukosa entnommen, wobei die Patienten bereits eine Gesamtdosis von 36 Gy bekommen haben und an Mukositis 1. Grades erkrankten. Die vermehrte Zytokeratin-Expression wurde auf die gesteigerte Proliferation der Epithelzellen zurückgeführt, die für die Phase I der oralen Mukositis typisch ist. Da es sich zum einen um ein Mundschleimhaut-Modell nach einer Bestrahlung mit bis zu 10 Gy und zum anderen um humanes Material aus dem bukkalen Bereich nach einer Bestrahlung mit bis 36 Gy handelt, ist ein direkter Vergleich nur bedingt möglich. Das Proliferationsverhalten der Zellen im bestrahlten Mundschleimhaut-Modell anhand der Ki-67-Färbungen wird später ebenfalls diskutiert (siehe Kapitel 4.6).

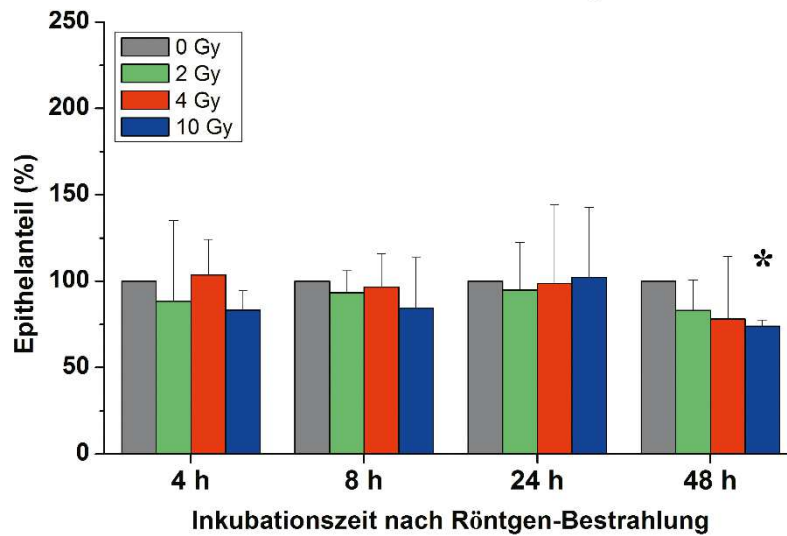
a

3D Mundschleimhautmodell nach Ionen-Bestrahlung



b

3D Mundschleimhaut-Modell nach Röntgen-Bestrahlung



**Abbildung 44: Prozentualer Epithelanteil in bestrahlten Mundschleimhaut-Modellen.**

Der prozentuale Anteil des Epithels wurde aus den pan-Zytokeratin-Färbungen von mit schweren <sup>12</sup>C-Ionen und Röntgenstrahlung bestrahlten Kulturen errechnet. Die Prozentangabe des Epithels bezieht sich auf die Gesamtfläche der entsprechenden organotypischen Kultur. Die Quantifizierungen wurden aus 3 unabhängig durchgeführten Versuchen ermittelt (n = 3, N = 5), \*p ≤ 0,02.

### 4.1.2 Expression der Differenzierungsmarker im Bindegewebe

Die untersuchten Bindegewebsmarker Fibronectin, Laminin und Kollagen IV konnten in allen Mundschleimhaut-Kulturen detektiert werden. Obwohl die Fibroblasten-Schicht im Mundschleimhaut-Modell viel kompakter ist, sind die Expressionsmuster der untersuchten Bindegewebsmarker denen in der humanen Mundschleimhaut sehr ähnlich. In den Proben der humanen Mundschleimhaut war Fibronectin im gesamten Bindegewebe stark präsent und gleichmäßig verteilt, während dieses Protein in den Fibroblasten-Schichten der organotypischen Kulturen zwar nur sehr schwach aber ebenfalls gleichmäßig nachweisbar war. Laminin und Kollagen IV wurden in den humanen Proben stellenweise um die Sekundärstrukturen des Bindegewebes wie Vesikel oder Gefäße lokal detektiert, und obwohl solche Sekundärstrukturen in dem Mundschleimhaut-Modell fehlten, wurde eine ähnliche, lokal kumulierte Expression beobachtet. Dies bestätigt die starke Annäherung des von uns etablierten Mundschleimhaut-Modells an die *in vivo*-Situation.

Die Bildung der Differenzierungsmarker im Bindegewebe wurde auch in Schwerionen- und Röntgen-bestrahlten Proben beobachtet, es wurden aber keine wesentlichen Veränderungen nach Bestrahlung beobachtet. Diese wurden auch nicht erwartet, da die primären Effekte fast ausschließlich im Epithel vermutet werden (Sonis, 2004).

## 4.2 Strahlungsinduzierte DNA-Schäden

Für die Untersuchung der strahlungsinduzierten oralen Mukositis im frühen Stadium war eine Analyse der DNA-Schäden unabdingbar, da zahlreiche Studien einen direkten Zusammenhang zwischen DSB und einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B mittels ATM oder der DNA-abhängigen Proteinkinase belegten (Basu et al., 1998; Lee et al., 1998; Magne et al., 2006; Piret et al., 1999). Dazu wurden zunächst Zellkultur-Monolayer von den im Mundschleimhaut-Modell eingesetzten Zelllinien mit Röntgenstrahlung bestrahlt und nach 1 h bzw. 24 h mittels  $\gamma$ H2AX-Färbungen die DSB visualisiert und analysiert. In den Fluoreszenz-Aufnahmen von  $\gamma$ H2AX-gefärbten HH4ded- und IHGK-Monolayern ließen sich bereits mit bloßem Auge deutlich intensivere Signale nach Bestrahlung mit 4 bzw. 10 Gy feststellen (Abbildung 21 und Abbildung 22). Eine Computer-gestützte Quantifizierung der Foci-Anzahl pro Zellkern ergab bei HH4ded-Monolayern mit Ausnahmen der 2 Gy-Proben steigende Signale für  $\gamma$ H2AX mit steigenden Röntgen-Dosen, wobei nur bei 10 Gy statistisch

signifikante Zunahmen detektiert wurden (in Abbildung 23 gekennzeichnet mit \*). Die relativ hohe Anzahl der DSB in der unbehandelten Probe nach 1 h ließ sich mit der Stresseinwirkung durch den Probentransport zwischen Labor und Bestrahlungseinrichtung erklären; denn nach einer Ruhephase nach dem Transport von 24 h war die Anzahl der Foci pro Zellkern deutlich abgesunken. Im Vergleich der beiden Inkubationszeiten 1 h und 24 h wurde festgestellt, dass 0, 2 und 10 Gy-Proben nach 24 h eine signifikant niedrigere Anzahl von DSB aufwiesen (in Abbildung 23 gekennzeichnet mit #), somit muss eine Reparatur der DSB stattgefunden haben. Beim Vergleich der unbehandelten und der 2 Gy-Proben fällt auf, dass die unbestrahlten Proben sowohl nach 1 h als auch nach 24 h deutlich mehr DSB aufweisen, als die Zellkulturen, die mit 2 Gy bestrahlt wurden. Dieses Ergebnis macht aber nur Sinn, wenn man die Möglichkeit einer Verwechslung der beiden Proben während der logistisch aufwendigen Versuchsdurchführung in Betracht zieht. Die Tatsache, dass es sich hierbei um einen einzigen Versuch handelte, lässt eine Überprüfung leider nicht zu.

In der IHGK-Zellkultur ergaben die  $\gamma$ H2AX-Analysen 1 h nach Bestrahlung einen deutlichen dosis-abhängigen Anstieg der Anzahl an DSB mit statistischen Signifikanzen bei allen Dosen. Die DNA-Schäden nach einer Bestrahlung mit 2 und 4 Gy konnten nach 24 h fast vollständig repariert werden, da die Werte der 2 und 4 Gy-Proben sich nach 24 h an den Wert der unbehandelten Probe angenähert haben. Eine Bestrahlung mit 10 Gy dagegen muss viel gravierende DNA-Schäden verursacht haben, weil auch nach 24 h der Wert der 10 Gy-Probe immer noch signifikant höher war als bei 0 bis 4 Gy, im Vergleich zu der entsprechenden Probe nach 1 h jedoch deutlich niedriger.

Vergleicht man die Ergebnisse der HH4ded- und der IHGK-Zellkulturen, so stellt man fest, dass die Fibroblasten deutlich sensitiver waren gegenüber der Röntgenstrahlung. Insgesamt war die Foci-Anzahl pro Zellkern bei HH4ded durchgehend höher als bei IHGK. Auch die Reparatur-Eigenschaften schienen bei IHGK effizienter zu sein als bei HH4ded. Da bis dato keine uns bekannten Studien bezüglich der Radiosensitivität oder Zellüberleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Schwerionenstrahlung mit den beiden Zelllinien durchgeführt wurden, können die beobachteten Unterschiede zwischen den IHGK- und HH4ded-Zellen nicht mit Referenzdaten verglichen werden.

Da der Vorversuch mit Zellkultur-Monolayern eindeutige Strahlungsantworten auf der DNA-Ebene ergab, wurden auch die mit Röntgenstrahlen und Schwerionen bestrahlten Mundschleimhaut-Modelle auf DSB untersucht. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der  $\gamma$ H2AX-Färbungen in Abbildung 24 a) konnten bereits optisch mehr DSB in

mit Schwerionen bestrahlten Kulturen detektiert werden, als mit Röntgenstrahlen. Die Quantifizierenden Analysen bestätigten diesen optischen Eindruck. Aus den Balkendiagrammen geht hervor, dass Schwerionenstrahlung nach 4 h bei jeder Dosis rund doppelt so viele DSB induzierte wie Röntgenstrahlung. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass 4 h nach  $^{12}\text{C}$ -Bestrahlung die Anzahl der Foci pro Zellkern einen Dosis-abhängigen Anstieg zeigten. Nach 24 h Inkubationszeit hatte sich die Anzahl der DSB nach 10 Gy derjenigen nach 4 Gy angeglichen, wobei beide deutlich niedriger waren als nach 4 h. Die Werte der 2 Gy-Proben haben sich nach 24 h und 48 h nur geringfügig erniedrigt, wobei nach 48 h 0 und 2 Gy-Proben sich auf annähernd gleichem Niveau befanden. Bei Röntgen-bestrahlten Proben wurden durchgehend Dosis-abhängige Steigerungen der Foci-Anzahl pro Zellkern detektiert, wobei 4, 10 und 30 Gy-Proben mit längerer Inkubationszeit wenigen DSB aufwiesen.

Auf den ersten Blick glichen die Quantifizierungsergebnisse der DSB in organotypischen Kulturen denen in Zellkultur-Monolayern. Die sinkenden Werte für Foci-Anzahl pro Zellzahl mit längerer Inkubationszeit konnte zum einen auf Reparaturereignisse zum anderen aber auf eine niedrigere Gesamt-Zellzahl zurückgeführt werden. Sollte nämlich eine Zelle zu viele DSB aufweisen, wird anstatt Reparatur-Mechanismen eher der Zelltod induziert. Diese Erklärung ist für die mit Schwerionen-bestrahlten Kulturen eher wahrscheinlich, da schwere Ionen hoch komplexe DNA-Schäden verursachen, die kaum repariert werden können (Linz, 2012).

Die unmittelbaren strahlungsinduzierten DNA-Schäden stellen die Grundlage für die Induktion inflammatorischen Antworten wie zum Beispiel die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B oder die Ausschüttung von Interleukinen dar. Die mit längerer Inkubationszeit sinkenden Werte für  $\gamma$ H2AX spielen bei der Aktivierung und den Verlauf der Inflammation keine ausschlaggebende Rolle, da die Inzidenz und der Schweregrad der oralen Mukositis nicht zwangsläufig mit DSB-Reparatur zusammenhängt (Fleckenstein et al., 2011). Das bedeutet, dass der Schweregrad der DNA-Schädigung unmittelbar nach Bestrahlung für die Aktivierung der inflammatorischen Signalkaskade und Signalamplifikation ausschlaggebend ist.

### 4.3 Strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung

#### 4.3.1 Einfluss von Strahlung auf die NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung

Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B stellt neben der Induktion oraler Mukositis (Sonis, 2004; Sonis, 2010) auch eine Verknüpfung zwischen Inflammation und Krebsentstehung dar (Ben-Neriah und Karin, 2011; Karin, 2009; Karin und Greten, 2005; Magne et al., 2006; Porta et al., 2009). Aus den Vorversuchen zur NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung auf Zellkultur-Monolayern ging hervor, dass die eingesetzten Epithelzellen nach einer Behandlung mit traditionellen NF- $\kappa$ B-Aktivatoren wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  sehr wohl in der Lage sind, eine Translokation der p65-Untereinheit vom Zytoplasma in den Zellkern vollziehen zu können (Abbildung 25). Eine solche Aktivierung nach TNF- $\alpha$ -Behandlung wurde von anderen Forschern auch in Zellkultur-Monolayern der HEK (human embryonic kidney) Zellen mittels FACS-Analysen detektiert (Hellweg et al., 2003). Auf Zellkultur-Monolayern von HEK-Zellen konnte des Weiteren nukleär lokalisierte NF- $\kappa$ B p65-Untereinheiten nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder schweren Ionen detektiert werden (Hellweg et al., 2011). Auf Grund dessen wurde auch in den bestrahlten Mundschleimhaut-Modellen eine NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung, sprich eine Translokation des Faktors vom Zytoplasma in den Zellkern, erwartet. Immunfluoreszenz-Analysen ergaben jedoch weder nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen noch mit Schwerionen eine NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung (Abbildung 27 und Abbildung 28). Da der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor in den meisten Fällen aus einem Heterodimer von p65 und p50 besteht, wurden bestrahlte Mundschleimhaut-Modelle auch auf die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p50 untersucht (siehe unten).

#### 4.3.2 Einfluss von Strahlung auf die NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung

Anders als bei der Analyse der NF- $\kappa$ B p65-Aktivierung wurde in bestrahlten Mundschleimhaut-Kulturen vermehrte Translokation des NF- $\kappa$ B p50 in den Zellkern nachgewiesen (Abbildung 29). Aus den Quantifizierungsdiagrammen (Abbildung 30) wurde ersichtlich, dass die unterschiedlichen Strahlungsarten das bestrahlte Mundschleimhaut-Modell in unterschiedlicher Weise beeinflussten. Während Röntgenstrahlung eine frühe

NF- $\kappa$ B p50-Aktivierung, also bereits nach 4 h induzierte, konnten nach Schwerionenstrahlung die höchsten Werte erst nach 24 h detektiert werden.

Auf Grund der Tatsache, dass eine strahlungsinduzierte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p50, aber nicht der Untereinheit p65 detektiert wurde, konnte man davon ausgehen, dass p50 entweder als Homodimer oder gepaart mit einem anderen Rel-Protein nach Bestrahlung in den Zellkern transloziert wurde. Ob ein p50-Homodimer eine aktivierende Domäne besitzt, d. h. die Transkription von Zielgenen induzieren kann, wird in der Fachliteratur kontrovers diskutiert. Auf Grund der biochemischen Proteinstruktur, fehlt der p50-Untereinheit im Gegensatz zur p65-Untereinheit zwar die Transaktivierungsdomäne (Verma et al., 1995), was aber nicht bedeutet, dass ein p50-Homodimer nicht in der Lage wäre, an den Promoter zu binden und die Transkription zu initiieren. Eine Induktion inflammatorischer Antworten nur durch die p50-Untereinheit wurde in zahlreichen Studien belegt. In einem Tierversuch mit Ratten konnte zum Beispiel durch die Zugabe des plättchenaktivierenden Faktors, der als Reaktion auf inflammatorische Induktoren eine Thrombozytenaggregation auslöst, eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50 detektiert werden (De Plaen et al., 1998). Eine solche transkriptionische Aktivität kann zum Beispiel durch den Ko-Aktivator Bcl-3 (Fujita et al., 1993) oder durch die Bindung an bestimmte  $\kappa$ B-Motive (Fujita et al., 1992) ermöglicht werden. Bei der quantitativen Auswertung in Abbildung 30 konnte 48 h nach Schwerionenbestrahlung mit 10 Gy ein statistisch signifikantes Absinken der Aktivität auf unterhalb des Ausgangsniveaus detektiert werden. Auf den ersten Blick schien es den Erwartungen zu widersprechen. Berücksichtigt man aber die äußerst hohe Dosis von 10 Gy, so können die beschädigten Zellen nach 48 h vermutlich kaum noch angemessen auf Entzündungsinduktoren reagieren. Auf Grund des kinetischen Unterschieds in den Aktivierungsprofilen der unterschiedlichen Strahlungsquellen kann davon ausgegangen werden, dass sich die dreidimensionalen Kulturen 48 h nach Röntgenstrahlung fast vollständig erholten. Im Gegenteil dazu zeigten die mit Schwerionen bestrahlten Proben nach 48 h immer noch sehr hohe Aktivitäten von NF- $\kappa$ B p50. Dies deutet darauf hin, dass eine Bestrahlung schweren Kohlenstoffionen deutlich destruktivere Effekte hervorruft, als Röntgenstrahlung der entsprechenden Dosen.

## 4.4 Strahlungsinduzierte Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung

Um die Konzentration der ausgeschütteten Zytokine in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen zu detektieren, wurden die ThinCerts<sup>TM</sup> mit den organotypischen Kulturen nach der Bestrahlung von den Platten mit tiefen Wells in Platten mit flachen Wells mit je 1 ml Medium statt 4,5 ml umgesetzt. Dabei ist zu beachten, dass die in den Graphen angegebenen Zeitpunkte sich auf die tatsächliche Zeit nach der Bestrahlung beziehen. Auf Grund des Transports und der anschließenden Inkubation zum Äquilibrieren der Kulturen war der Zeitraum der tatsächlich gemessenen Zytokinabgabe in 1 ml etwa 1,5 bis 2 h kürzer.

Da Zellkultur-Monolayer bereits in flachen 12 Well-Platten kultiviert und bestrahlt wurden, erübrigte sich hier der Umsetzungsschritt, es wurde lediglich das Medienvolumen auf 1 ml pro Well reduziert. Auch hier ist zu beachten, dass der Zeitraum der tatsächlich gemessenen Zytokinabgabe ca. 1,5 bis 2 h kürzer war.

### 4.4.1 Strahlungsinduzierte Ausschüttung von IL-1 $\beta$

Die röntgenbestrahlten HH4ded-Zellkultur-Monolayer zeigten erst ab 120 h Inkubationszeit eine dosisabhängige Steigerung des IL-1 $\beta$ -Signals, bei IHGK-Zellen dagegen wurden bereits zum frühesten untersuchten Zeitpunkt statistisch signifikante und nach 48 h dosisabhängige Steigerungen detektiert. Dieser Unterschied ließe sich dadurch erklären, dass zum einen unterschiedliche Zelltypen auf einen Strahlungsreiz durchaus unterschiedlich reagieren können. Zum anderen ist in primären Keratinozyten die Vorläuferform des IL-1 $\beta$ , das pro-IL-1 $\beta$ , konstitutiv vorhanden und wird nach einem Strahlungsreiz zum reifen IL-1 $\beta$  prozessiert (Contassot et al., 2012), wodurch sezerniertes IL-1 $\beta$  früher nachweisbar ist. In Zellkultur-Monolayer-Studien von  $\gamma$ -bestrahlten Endothelzellen dagegen konnte auch nach einer Dosis von 10 Gy zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zwischen 6 h und 6 Tagen IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden (Van der Meeren et al., 1997).

Frühere Studien zeigten, dass nach einer Bestrahlung sehr hohe Konzentrationen des Zytokins IL-1 $\beta$  im Gewebe nachweisbar waren (Chiang et al., 1997; Chiang et al., 2005). In organotypischen Kulturen induzierte Schwerionenstrahlung kaum IL-1 $\beta$ -Abgabe, obwohl die mit Röntgenstrahlen bestrahlten Proben tendenziell höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen aufwiesen. Dabei wurden relativ hohe Dosen von 10 bzw. 30 Gy benötigt, um bei den organotypischen



Kulturen eine IL-1 $\beta$ -Ausschüttung zu induzieren. Hierbei sollte erwähnt werden, dass die gemessenen Absolutwerte der Konzentrationen im sehr niedrigen Bereich lagen. Da aber dieses Zytokin auch in sehr geringen Konzentrationen wirksam ist (Dinarello, 2011), sollten die dadurch in Gang gesetzten Signalkaskaden der positiven Rückkopplung nicht unberücksichtigt bleiben.

### 4.4.2 Strahlungsinduzierte Ausschüttung von IL-6

Die mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellkultur-Monolayer zeigten teilweise signifikante Veränderungen in der IL-6-Sekretion, wobei eine Bestrahlung mit 4 Gy in den meisten Fällen eine verstärkte Zytokin-Ausschüttung und mit 10 Gy eine niedrigere Zytokin-Ausschüttung verursachte. Beim Vergleich der einzelnen Inkubationszeitpunkte konnten nach 120 h die stärksten Effekte beobachtet werden. Dieser Inkubationszeit-abhängiger Effekt wurde auch in den Medienüberständen Röntgen-bestrahlter organotypischer Kulturen detektiert.

Dieses Ergebnis entspricht den *in vivo* und *in vitro* Studien, die auf diesem Gebiet durchgeführt wurden, bei denen ein strahlungsinduzierter Anstieg in der IL-6-Ausschüttung in vielen unterschiedlichen Gewebearten detektiert wurde. So wurden zum Beispiel in der Dünndarmschleimhaut der Ratte erst 48 h nach einer  $\gamma$ -Bestrahlung mit 10 Gy signifikant höhere IL-6-Konzentrationen detektiert (Linard et al., 2003). Nach einer Ganzkörperbestrahlung von Mäusen konnte des Weiteren neben anderen Zytokinen eine stark anwachsende IL-6-Ausschüttung in der Milz gemessen werden (Zhou et al., 2001).

In vielen weiteren Studien wurden nach Bestrahlung erhöhte, IL-6-Level detektiert, eine Dosis-Abhängigkeit musste dabei nicht unbedingt gegeben sein (Schaue et al., 2012). Dies liegt an der hohen Komplexität der durch NF- $\kappa$ B induzierten Signalkaskade, bei der neben IL-6 viele andere proinflammatorische Marker sezerniert werden. Diese Signalkaskade spielt sich auf mehreren Ebenen parallel oder nacheinander ab, bestehend aus dem klassischen und dem trans-Signalweg (Schaue et al., 2012). Es besteht allerdings kein Zweifel daran, dass IL-6 neben IL-8 zu den proinflammatorischen Zytokinen gehört, die eine essentielle Rolle in der entzündungsassoziierten Karzinogenese spielen (Rose-John und Schooltink, 2007). Dafür gibt es viele Beispiele. In einer Studie aus dem Jahre 2013, um nur eine zu nennen, wurde im Gegensatz zur gesunden Magenschleimhaut eine positive Korrelation zwischen erhöhter NF- $\kappa$ B-Aktivität und gesteigerter IL-6-Ausschüttung in humanem Magenkrebsgewebe bewiesen, was auf eine starke Verknüpfung zwischen erhöhter IL-6-Abgabe und maligner Angiogenese deutet (Yin et al., 2013).

### 4.4.3 Strahlungsinduzierte Ausschüttung von IL-8

Nach einer Bestrahlung der Zellkultur-Monolayern wurden bei beiden Zelllinien für 4 Gy nach 120 h die höchsten Werte an sezernierten IL-8 detektiert. Auffallend waren die stark abfallenden Werten für IL-8 in bestrahlten HH4ded-Monolayern nach 120 h und in bestrahlten IHGK-Monolayern bei fast allen Zeitpunkten nach einer Bestrahlung mit 10 Gy. Dies könnte an der hohen Dosis von 10 Gy liegen, die bei den exponierten Zellen wahrscheinlich zu Apoptose führte und somit eine inflammatorische Antwort verhinderte.

Obwohl IL-8 zu den Zytokinen gehört, die binnen Minuten bis wenigen Stunden ausgeschüttet werden können und keiner Neu-Synthese bedürfen (Schäue et al., 2012), scheint IL-8 eher zu späteren Zeitpunkten nach Strahlungsreiz sezerniert zu werden. Nach einer  $\gamma$ -Bestrahlung von Endothelzellen mit bis zu 10 Gy konnte in den entsprechenden Medienüberständen zu allen untersuchten Zeitpunkten zwischen 6 h und 6 Tagen ein dosisabhängiger Anstieg in der IL-8-Konzentration mittels ELISA detektiert werden, wobei erst ab 3 Tagen die IL-8-Level hoch signifikant waren (Van der Meeren et al., 1997).

Die Bestrahlung von Mundschleimhaut-Modellen sowohl mit schweren Kohlenstoffionen als auch mit Röntgenstrahlen verursachte zu beinahe allen untersuchten Inkubationszeiten und Bestrahlungsdosen statistisch signifikante Zunahmen der IL-8-Konzentrationen in Medienüberständen. Dieses Ergebnis korrespondiert mit anderen Studien von Röntgenbestrahlten organotypischen Kulturen, wo 24 h nach 8 Gy Röntgenstrahlung sich die IL-8-Konzentration im Vergleich zur unbestrahlten Probe mehr als verdoppelte (Tobita et al., 2010).

### 4.4.4 Strahlungsinduzierte Ausschüttung von TNF- $\alpha$

Da TNF- $\alpha$  zu den Schlüssel-Zytokinen bei einer inflammatorischen Induktion zählt, wurde die Ausschüttung dieses Zytokins ebenfalls untersucht. ELISA-Analysen der Medienüberstände ergaben aber, dass TNF- $\alpha$  nur in sehr geringen Mengen vorhanden war, teilweise lagen die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenzen. So konnte nur in mit Röntgenstrahlung bestrahlten organotypischen Kulturen TNF- $\alpha$  detektiert werden, wobei keinerlei strahlungsinduzierten Reaktionen nachweisbar waren. Dieses Ergebnis entspricht einigen anderen Studien von Röntgenbestrahlten organotypischen Kulturen (Colley et al.,

2013a; Varnum et al., 2012). Selbst in Zellkultur-Monolayern von Endothelzellen blieb TNF- $\alpha$  nach einer  $\gamma$ -Bestrahlung mit 10 Gy nicht detektierbar (Van der Meeren et al., 1997).

### 4.5 Strahlungsinduzierter Kompaktheitsverlust

Der Kompaktheitsverlust kommt dadurch zustande, dass geschädigte Zellen den Zelltod entweder durch Apoptose oder Nekrose erfahren und dadurch Gewebeschäden entstehen. Welcher Zelltodmechanismus nach einer Bestrahlung der organotypischen Kulturen genau eintritt, konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, wobei kein eindeutiger Apoptose-Nachweis erbracht werden konnte.

Der strahlungsinduzierte Kompaktheitsverlust war bereits bei der optischen Betrachtung der HE-gefärbten Kulturen feststellbar. Beim Vergleich von Schwerionen- und Röntgenbestrahlten Kulturen fiel auf, dass  $^{12}\text{C}$ -Ionenstrahlung einen viel stärkeren Kompaktheitsverlust verursachte, als Röntgenstrahlung (Abbildung 38). Diese Unterschiede beruhen höchstwahrscheinlich auf den unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der beiden Strahlungsarten (siehe Kapitel 1.2 Kosmische Strahlung). Neben strahlungsinduzierten Schäden von Zellorganellen, Proteinen und Lipiden führen in erster Linie DNA-Schäden den Zelltod herbei. Die Zellen, in denen der DNA-Schaden nicht repariert werden kann, sterben durch den programmierten Zelltod (Apoptose). Falsch reparierte DNA-Schäden führen zu Chromosomenaberrationen, die daraufhin eine viel zu große Chromosomenzahl (Polyploidie) oder andere gravierende Mutationen verursachen. Die mit schweren Kohlenstoffionen bestrahlten Mundschleimhaut-Modelle zeigten bereits 4 h nach Bestrahlung statistisch signifikante Kompaktheitsverluste. Während nach 24 h die Signifikanzen verschwanden, waren die Veränderungen nach 48 h wieder statistisch signifikant. Eine Erklärung könnte die Beobachtung liefern, dass ab einem bestimmten Auflockerungsgrad des Mundschleimhaut-Modells die Kultur zusammenfällt, woraus sich eine scheinbar höhere Kompaktheit errechnen lässt. Ab dem Inkubationszeitpunkt von 48 h erfolgen durch fortschreitendes Absterben der Zellen weitere Gewebeschäden und folglich Kompaktheitsverluste. Die bei der oralen Mukositis entstehenden Gewebe-Läsionen (Sonis, 2004) könnten hier ihren Ursprung haben.

## 4.6 Einfluss von Strahlung auf das Proliferationsverhalten

Einen weiteren Grund für den Kompaktheitsverlust stellt neben dem strahlungsinduzierten Zelltod die durch Strahlung reduzierte Fähigkeit der Zellen zu proliferieren (Scholz, 2003). Frühere Studien belegten bereits einen direkten Zusammenhang zwischen Strahlungsexposition und reduzierter Proliferation (Colley et al., 2013d; Rakhorst et al., 2006; Tobita et al., 2010).

Im Vergleich zwischen der humanen Mundschleimhaut und dem von uns etablierten unbehandelten Mundschleimhaut-Modell zeigte sich ein ähnliches Verhältnis von proliferierenden zu nicht-proliferierenden Zellen. Die Ki-67-positiven Zellen ließen sich, wie in der humanen Probe, eher im Epithel und kaum in der Fibroblastenschicht finden. Der Anteil der proliferierenden Zellen in bestrahlten Proben zeigte je nach Strahlungsart unterschiedliches Verhalten. Während Röntgenstrahlung die Proliferation bereits nach 48 h reduzierte, schien die Proliferationsaktivität 48 h nach Schwerionenbestrahlung stark zu steigen. Erst weitere 24 h später, also nach 3 Tagen, wurden in mit Schwerionen bestrahlten Proben deutlich weniger Ki-67-positive Zellen detektiert, als in den Kontrollen. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie über Röntgen- und Schwerionen-bestrahlte Glioblastom-Proben, wo 24 h nach Röntgenstrahlung deutlich weniger Ki-67-positive Zellen detektiert wurden, als 24 h nach  $^{12}\text{C}$ -Ionen-Strahlung der gleichen Dosis (Merz et al., 2013). Dieser Unterschied resultiert aus den unterschiedlichen Strahlenqualitäten von Röntgen- bzw. Schwerionenstrahlung. Der extreme Rückgang an proliferierenden Zellen auch in unbehandelten Proben nach 10 Tagen hing vermutlich mit dem entstandenen Nährstoffmangel zusammen, der durch den fehlenden Medienwechsel während der gesamten Inkubationszeit verursacht wurde.

## 4.7 Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde die strahlungsinduzierte Initiierung oraler Mukositis im organotypischen Mundschleimhaut-Modell nach Schwerionen- und Röntgenstrahlung untersucht. Daraus folgernd sollte das Risiko für Astronauten eingeschätzt werden, während einer langfristigen Weltraummission an durch kosmische Strahlung verursachter Mundschleimhautentzündung zu erkranken. Die durchgeführten Analysen lieferten eindeutige

Hinweise darauf, dass das bestrahlte organotypische Mundschleimhaut-Modell zum Teil sehr starke inflammatorische Reaktionen zeigte. Es konnten unterschiedliche Reaktionen auf die verschiedenen Strahlenqualitäten detektiert werden. Nicht überraschend war die deutlich höhere DSB-Zahl in den Zellkernen der mit schweren Ionen bestrahlten organotypischen Kulturen. Mit Röntgenstrahlen behandelte Kulturen zeigten zu gleichen Inkubationszeitpunkten und bei gleicher physikalischer Dosis nur halb so viele DSB. Anhand dieser Tatsache lassen sich die detektierten Unterschiede bei den folgenden Analysen erklären. Hierbei sollte aber unbedingt berücksichtigt werden, dass zum einen teilweise mit sehr hohen Strahlungsdosen gearbeitet wurde, zum anderen die *in vitro*-Ergebnisse nicht vorbehaltlos auf den menschlichen Körper übertragen werden können. Da im humanen Organismus Endothelzellen auch eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen spielen (Hallahan et al., 1996; Pober und Sessa, 2007; van Hinsbergh, 2012), sollten humane Endothelzellen in die Kultur integriert werden, um das etablierte Modell noch näher an die *in vivo*-Situation zu bringen. Eine solche Integration von Endothelzellen in ein organotypisches Modell zeigte in einer aktuellen Studie nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung starke Entzündungsreaktionen (Colley et al., 2013c).

Des Weiteren sind mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, die sogenannten PBMC, ebenfalls essentiell für inflammatorische Antworten im humanen Organismus. Im Rahmen eines weiteren Projekts in unserer Arbeitsgruppe wurde die Integration dieser in das organotypische Mundschleimhaut- und Hautmodell erfolgreich etabliert und zeigte nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen sehr intensive Reaktionen auf der Ebene der proinflammatorischen Marker (Schroeder, 2012). Aufgrund der signifikanten Unterschiede zwischen Schwerionen- und Röntgenstrahlen-induzierten Effekten, würde eine Bestrahlung von organotypischen Co-Kulturen mit integrierten Endothelzellen und PBMC mit schweren Kohlenstoffionen viele neue Erkenntnisse liefern.

Bei dieser Arbeit wurde das Dosisprofil absichtlich so gewählt, dass neben geringen Dosen von 2 Gy auch relativ hohe Dosen von 10 Gy für Schwerionen- und 30 Gy für Röntgenstrahlung eingesetzt wurden. Somit wurde ein breites Spektrum an möglichen dosisabhängigen Reaktionen untersucht. Jüngsten Berechnungen zufolge wurde anhand der „Mars Rover Curiosity“-Mission die kumulative Dosis aber auf ca. 1 Sievert (entspricht 1 Gy) geschätzt (Hassler et al., 2014). Diese Dosis erscheint zunächst sehr gering, wenn man aber berücksichtigt, dass zu den häufigsten Folgeerscheinungen nach der chronischen

Strahlungsexposition mit dieser Dosis die Tumorinduktion gehört (Brooks, 2003; Ozasa et al., 2012; Zaider, 2001), erkennt man die gravierende Gefährdung.

Ferner muss bei der Induktion inflammatorischer Effekte der Einfluss der fehlenden Gravitation berücksichtigt werden (Sonnenfeld, 2002; Sonnenfeld und Shearer, 2002). Die Arbeitsgruppe der ehemaligen NASA-Astronautin Millie Hughes-Fulford am Medical Center der University of California in San Francisco fand heraus, dass die Schwerelosigkeit die Expression einer ganzen Reihe von NF- $\kappa$ B-aktivierten Genen vermindert, was eine verminderte T-Zell-Aktivierung zur Folge hat (Boonyaratanakornkit et al., 2005). Somit erscheint es nicht als erstaunlich, dass die fehlende Gravitationskraft dementsprechend einen negativen Einfluss auf die Wundheilung ausübt (Farahani und DiPietro, 2008), was im Falle einer oralen Mukositis auf einer Weltraummission gravierende Folgen hätte.

Trotz der umfangreichen Analysen kann nur anhand dieser Disseration keine exakte Einschätzung des Gesamtrisikos für orale Mukositis während ausgedehnter Weltraummissionen getroffen werden. Sehr viele Anzeichen deuten zwar auf die anfänglichen Phasen oraler Mukositis, die Induktion eines inflammatorischen Prozesses hängt aber von vielen Faktoren ab, wie zum Beispiel der Dosis der kosmischen Strahlung, der die Besatzung ausgesetzt wäre. Durch eine sorgfältige und umsichtige Planung einer solchen Mission ließen sich die intensivsten Strahlungsperioden in Abhängigkeit vom elfjährigen Sonnenfleckenzyklus umgehen.

## 5 Zusammenfassung

Während ausgedehnter Weltraumflüge zum Mond und Mars wäre die Besatzung eines Raumschiffs dicht ionisierender Schwerionenstrahlung, der sogenannten kosmischen Strahlung, ausgesetzt. Da bei vielen Krebspatienten die orale Mukositis als eine gravierende Nebenwirkung bei der herkömmlichen Strahlentherapie auftritt, könnte diese Erkrankung ein medizinisches Problem während ausgedehnter Weltraumflüge darstellen. Allerdings liegen bislang keine Untersuchungen über eine mögliche Mukositis-induzierte Wirkung von Schwerionenstrahlung vor. Um das Risiko strahlungsinduzierter oraler Mukositis durch kosmische Strahlung abzuschätzen, wurden dreidimensionale organotypische Mundschleimhaut-Modelle  $^{12}\text{C}$  Schwerionen- bzw. Röntgenstrahlung ausgesetzt und nach definierten Inkubationszeiten kryokonserviert. Aus dem Material wurden Kryoschnitte gefertigt, mit denen anschließend histologische und immunhistologische Fluoreszenzfärbungen zum Nachweis von zum Beispiel Kompaktheitsverlust, Doppelstrangbrüchen der DNA und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durchgeführt wurden. Die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin  $1\beta$ , Interleukin 6 und Interleukin 8 wurde in Probenüberständen mittels ELISA analysiert. Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag dabei auf den frühen durch Strahlung verursachten Effekten.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein dreidimensionales Mundschleimhaut-Modell etabliert, das verglichen mit humaner Mundschleimhaut viele organotypische Differenzierungsmarker und *in vivo*-ähnliche Reaktionen auf bestimmte Reize zeigte. Nach einer Bestrahlung mit schweren Kohlenstoffionen bzw. mit Röntgenstrahlung wurden strahlungsinduzierte Effekte auf mehreren Ebenen detektiert. Bereits 1 h nach Bestrahlung konnten dosisabhängig vermehrte Doppelstrangbrüche in der DNA detektiert werden, wobei bei gleicher Dosis Schwerionenstrahlung im Durchschnitt doppelt so viele DSB verursachte wie Röntgenstrahlung. Das Mundschleimhaut-Modell reagierte auf beide Strahlungsarten mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B p50, wobei Röntgenstrahlung diese Aktivierung früher induzierte als Schwerionen. Eine strahlungsinduzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B p65 wurde in den organotypischen Kulturen zu den untersuchten Zeitpunkten nicht beobachtet. Im Vergleich zu nicht bestrahlten Kulturen waren die Konzentrationen von Interleukin 6 und Interleukin 8 unabhängig von der Strahlungsqualität nach Bestrahlung signifikant erhöht. Interleukin- $1\beta$  dagegen wurde nur nach Röntgenbestrahlung signifikant

vermehrt ausgeschüttet. In Schwerionen-bestrahlten Proben wurden zwar tendenziell höhere Konzentrationen beobachtet, statistische Signifikanzen ergaben sich aber nicht. Die Analysen zur TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Ausschüttung in bestrahlten organotypischen Kulturen ergaben innerhalb des gewählten Beobachtungszeitraums von 48 h keine strahlungsinduzierten Effekte. Bei den Untersuchungen der Proliferation in den Zellen der bestrahlten organotypischen Kulturen wurde bereits 24 h nach Röntgenstrahlung und 3 Tage nach Schwerionenstrahlung eine deutliche verminderte Proliferation beobachtet. Des Weiteren zeigte das Mundschleimhaut-Modell unabhängig von Strahlungsqualitäten einen eindeutigen Verlust in der Zellintegrität und daraus resultierenden Kompaktheitsverlust des Gewebes, was in der *in vivo*-Situation wahrscheinlich einer Gewebedegeneration entspricht.

Nach Bestrahlung mit sowohl Röntgenstrahlung als auch schweren Ionen wurden im gewählten Mukosa-Modell innerhalb von 48 h nach Behandlung strahlungsinduzierte proinflammatorische Marker eindeutig und reproduzierbar detektiert. Dies deutet darauf hin, dass während langer extraterrestrischer Expeditionen das Risiko der oralen Mukositis einkalkuliert und mit den daraus folgenden Konsequenzen gerechnet werden muss.



## 6 Summary

Humans in exomagnetospheric space are exposed to highly energetic heavy ion radiation which can be hardly shielded. Since radiation-induced mucositis constitutes a severe complication of heavy ion radiotherapy, it would also implicate a serious medical safety risk for the crew members during prolonged space flights such as missions to Moon or Mars. For assessment of risk developing radiation-induced mucositis, three-dimensional organotypic cultures of immortalized human keratinocytes and fibroblasts were irradiated with a  $^{12}\text{C}$  particle beam at high energies or X-Rays. Immunofluorescence stainings were done from cryosections and radiation induced release of cytokines and chemokines was quantified by ELISA from culture supernatants. The major focuses of this study were on 4, 8, 24 and 48 hours after irradiation.

The conducted analyses of our mucosa model showed many structural similarities with the native oral mucosa and authentic immunological responses to radiation exposure. Quantification of the DNA damage in irradiated mucosa models revealed about twice as many DSB after heavy-ion irradiation compared to X-rays at definite doses and time points, suggesting a higher gene toxicity of heavy ions. Nuclear factor  $\kappa\text{B}$  activation was observed after treatment with X-rays or  $^{12}\text{C}$  particles. An activation of NF  $\kappa\text{B}$  p65 in irradiated samples could not be detected. ELISA analyses showed significantly higher interleukin 6 and interleukin 8 levels after irradiation with X-rays and  $^{12}\text{C}$  particles compared to non-irradiated controls. However, only X-rays induced significantly higher levels of interleukin 1 $\beta$ . Analyses of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  showed no radiation-induced effects. Further analyses revealed a radiation-induced reduction in proliferation and loss of compactness in irradiated oral mucosa model, which would lead to local lesions *in vivo*.

In this study we revealed that several pro-inflammatory markers and structural changes are induced by X-rays and heavy-ion irradiation within an oral mucosa model. This suggests that oral mucositis indeed poses a risk for astronauts on extended space flights.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
A. dest.	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
BSA	bovine serum albumin
CASY	cell counter and analyser system
CK	Cytokeratin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
E	Energie
ELISA	enzyme-linkedimmunosorbentassay
FCS	fetal calfserum
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GSI	Gesellschaft für Schwerionenforschung

---

Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV16	Humaner Papillomvirus 16
HRP	horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IHGK	immortalized human gingival keratinocytes
IKK	I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplex
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
LET	Linearer Energietransfer
Lsg.	Lösung
LSM	laserscanningmicroscope
min	Minute
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	phosphate buffered saline
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung

---

SEM	standarderror oft hemean
SIS	Schwerionensynchrotron
SOBP	Spread-out bragg peak
Strep	Streptomycin
TMB	tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor
z. B.	zum Beispiel

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aurora-Meilensteinplan für Mars-Missionen. ....	2
Abbildung 2: Vergleich Photonen- und Ionenstrahlung. ....	4
Abbildung 3: Tiefendosis-Profil unterschiedlicher Strahlungsarten. ....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pathogenese oraler Mukositis. ....	7
Abbildung 5: Verteilung von ROS und Entzündungsmarkern in der Mundschleimhaut. ....	8
Abbildung 6: Nukleosom mit einem Histon-Tetramer. ....	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Rel-Protein Familie. ....	11
Abbildung 8: Der klassische Signalweg bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. ....	12
Abbildung 9: Hypothetisches Zusammenspiel zwischen Keratinozyten und Fibroblasten. ....	17
Abbildung 10: Schematischer Versuchsablauf .....	21
Abbildung 11: Schematische Darstellung des 3D-Modells. ....	26
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA. ....	33
Abbildung 13: Computergestützte Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen. ....	35

---

Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen von CK13 und CK14 auf Zellkultur-Monolayern. .....	38
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbungen von CK13 und CK14 auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.....	39
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbungen von Zytokeratinen auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.....	40
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbungen von Fibronectin und Laminin auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.....	42
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbungen von Kollagen Typ IV auf humaner Mundschleimhaut und organotypischen Mundschleimhaut-Kulturen.....	43
Abbildung 19: $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Röntgen-Bestrahlung von HH4ded- Zellkulturen.....	44
Abbildung 20: $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Röntgen-Bestrahlung von IHGK- Zellkulturen.....	45
Abbildung 21: Quantifizierung von Röntgenstrahlen-induzierten DSBs in Monolayer- Zellkulturen anhand $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen. ....	46
Abbildung 22: $\gamma$ H2AX-Färbungen auf organotypischen Kulturen.....	47
Abbildung 23: NF- $\kappa$ B p65-Färbung auf IHGK-Monolayern. ....	49
Abbildung 24: NF- $\kappa$ B p65-Färbung auf unterschiedlich behandelten organotypischen Kulturen. ....	50
Abbildung 25: NF- $\kappa$ B p65-Färbungen auf $^{12}$ C-bestrahlten organotypischen Kulturen.....	51
Abbildung 26: NF- $\kappa$ B p65-Färbungen auf Röntgen-bestrahlten organotypischen Kulturen....	52
Abbildung 27: NF- $\kappa$ B p50-Färbungen auf gesunder Mundschleimhaut und organotypischen Kulturen. ....	53
Abbildung 28: Quantifizierung der strahleninduzierten NF- $\kappa$ B p50-Aktivierungen.....	55

Abbildung 29: IL-1 $\beta$ in HH4ded- und IHGK-Monolayern. ....	57
Abbildung 30: IL-6 in HH4ded- und IHGK-Monolayern. ....	58
Abbildung 31: IL-8 in HH4ded- und IHGK-Monolayern. ....	60
Abbildung 32: IL-1 $\beta$ in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen. ....	62
Abbildung 33: IL-6 in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen. ....	63
Abbildung 34: IL-8 in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen. ....	64
Abbildung 35: TNF- $\alpha$ in organotypischen Mundschleimhaut-Modellen. ....	65
Abbildung 36: HE-Färbungen von dreidimensionalen Mundschleimhaut-Modellen. ....	66
Abbildung 37: Quantifizierung des Kompaktheitsverlustes nach Ionen- und Röntgen- Bestrahlung. ....	67
Abbildung 38: Histologische Ki-67-Färbungen von dreidimensionalen Mundschleimhaut- Modellen. ....	70
Abbildung 39: Histologische Ki-67-Färbungen von Mundschleimhaut-Modellen bis 48 h nach Behandlung. ....	69
Abbildung 40: Histologische Ki-67-Färbungen von Mundschleimhaut-Modellen 3, 5 und 10 Tage nach Behandlung. ....	70

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen mit den entsprechenden Verdünnungen. ....	30
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## 7.4 Puffer und Lösungen

### 7.4.1 Zellkultur

#### Medium für IHGK:

Keratinocyte Growth Medium 2 Kit + alle Zusätze (siehe Tabelle Kits):

Bovine Pituitary Extract	0,004 ml / ml
Epidermal Growth Factor (recombinant human)	0,125 ng / ml
Insulin (recombinant human)	5 µg / ml
Hydrocortisone	0,33 µg / ml
Epinephrine	0,39 µg / ml
Transferrin, holo (human)	10 µg / ml
CaCl <sub>2</sub>	0,06 mM

Gebrauchsmedium zum Abstoppen der Trypsinreaktion:

30 ml Gebrauchsmedium + 3 ml FCS gold

#### Medium für HH4ded:

250 ml DMEM high glucose mit 4 mM L-Glutamin + 25 ml FCS gold

#### Ingredienzien für FAD-Medium:

- Adenin-Lsg. (180 mM): 0,6081 g Adenin in 25 ml 0,2 M HCl gelöst und sterilfiltriert
- Cholera-toxin-Gebrauchslösung (8.4 µg/ml): 100 µl (8,4 mg/ml) ad 10 ml DMEM-Medium
- EGF-Lsg. (10 µg/ml): 200 µg in 20 ml sterilem A. dest.
- Hydrocortison-Lsg. (450 µg/ml): 2 mg gelöst in 355,6 µl EtOH+ 4,089 ml DMEM
- Insulin-Lsg. (0,5 mg/ml): 18,05 ml steriles A. dest. + 950 µl Insulin

FAD-Medium:

Für 500 ml Endvolumen:

	Volumen (ml)
DMEM	300
Ham's-F12	100
Cosmic Calf	40
Penicillin/Streptomycin	4,54
Adenin-Lösung	1,27
Choleratoxin-Lösung	1,10
EGF-Lösung	0,41
Hydrocortison-Lösung	0,42
Insulin	4,57

PBS/EDTA zum Waschen von IHGK und HH4ded:

25 mM EDTA in 1xPBS, pH 7,4

Trypsin/EDTA für IHGK und HH4ded:

0,05 %/0,002 % in 1x PBS, pH 7,4

Gelatine-Lösung:

0,2 % Gelatine in A. dest



## 7.4.2 Histologie

### Lösungen für die HE-Färbung:

- Hämalaun-Lösung:  
250 ml Ethylenglycol, 42 g Aluminiumsulfat, 5 g Hämatoxylin, 1,3 g Zitronensäure (wasserfrei), 0,6 g Natriumjodat, ad 1000 ml mit A. dest. aufgefüllt
- Eosin-Lösung (10 % w/v):  
10 g Eosin gelöst in 100 ml A. dest., + 5 Tropfen Essigsäure
- Ammoniak-Wasser: 7 Tropfen 25%ige Ammoniaklösung in 250 ml Leitungswasser
- 75 %, 80 %, 90 %, 100 % Isopropanol

### Lösungen für ELISA:

- Coating Buffer: 8,4 g NaHCO<sub>3</sub>, 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 1000 ml A. dest., pH 9,5
- Assay Diluent: 1x PBS pH 7,4 + 10 % FCS
- Waschpuffer: 1x PBS /0,05 % Tween

### Lösungen für Immunhisto- und Fluoreszenzfärbungen:

- 1x PBS, pH 7,5
- 0,5 % BSA in 1x PBS
- 2,25 % PFA in 1x PBS
- 4,5 % PFA in 1x PBS
- 1x TBS, pH 7,6
- 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0
- 1 µg/ml DNase in 1x TBS/1 mM MgSO<sub>4</sub>
- 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol
- 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 1x PBS
- 0,5 % Triton-X100-Lösung in 1x PBS

## 7.5 Kits

<b>Kit</b>	<b>Vertriebsfirma</b>	<b>Niederlassung</b>	<b>Bestellnummer</b>
Liquid DAB+ Substrate Chromagen System	Dako	Hamburg	K3468
Dako Pen	Dako	Hamburg	S2002
Human IFN-gamma ELISA	Biolegend Biozol	Eching	BLD-430102
Human IL-1 $\beta$ ELISA	Biolegend Biozol	Eching	BLD-437005
Human IL-6 ELISA	Biolegend Biozol	Eching	BLD-430502
Human IL-8 ELISA	Biolegend Biozol	Eching	BLD-431502
Human TNF- $\alpha$ ELISA	Biolegend Biozol	Eching	BLD-430201
Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI	Dianova	Hamburg	SCR-38448
Keratinocyte Growth Medium 2 Kit	PromoCell	Heidelberg	C-20111
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza Rockland Inc.	Rockland, ME, USA	LT07-218
PapPen (ImmEdge Pen)	Vector/Linaris	Wertheim	H-4000
TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit	Calbiochem/Merck Biosciences	Darmstadt	QIA33
TMB OptEIA	BD	Bedford, MA USA	555214

## 7.6 Chemikalien und Zellkulturmedien

<b>Chemikalie/Medium</b>	<b>Vertriebsfirma</b>	<b>Standort</b>
Aceton	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Adenin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ammoniaklösung, 25 %	Merck	Darmstadt, Deutschland
BSA	Roth	Karlsruhe, Deutschland

---

Casy <sup>®</sup> Clean	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Casy <sup>®</sup> ton	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Choleratoxin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Cosmic Calf	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
DMEM high glucose + 4 mM L-Glutamin	GIBCO	Schwerte, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DNase I, RNase-frei	Novagen, Merck	Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eisessig	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Eosin	Merck	Darmstadt, Deutschland
EGF (Epidermal Growth Factor human)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol	Merck	Darmstadt, Deutschland
FBS Gold (entspricht FCS)	PAA	Cölbe, Deutschland
Gelatine	Calbiochem, Merck	Darmstadt, Deutschland
Hämatoxilin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ham's-F12	PAA	Cölbe, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Fluka, Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
IS Mounting Medium DAPI	Dianova	Hamburg, Deutschland
Nagellack (durchsichtig)	Rossmann	Burgwedel, Deutschland
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumjodat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth	Karlsruhe, Deutschland

PBS	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA	Cölbe, Deutschland
Roti-Histokit II	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl), 37 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth	Karlsruhe, Deutschland
TissueTek <sup>®</sup>	Sakura	Torrance, CA, USA
Tris	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton-X100	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin EDTA (1x)	PAA	Cölbe, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Xylol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure, (wasserfrei)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

## 7.7 Materialien und Geräte

<b>Material/Gerät</b>	<b>Vertriebsfirma</b>	<b>Standort</b>
Absauganlage	Neuberger	Freiburg, Deutschland
Casy <sup>®</sup> Zellzähler 1TT	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Deckgläser	VWR	Darmstadt, Deutschland
Dispenserspitzen	Brand	Wertheim, Deutschland
Einfrierbehälter	Nalge Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Einmalpipetten, 25, 10, 5 und 2 ml	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Färbeschiffchen	VWR	Darmstadt, Deutschland
Federpinzette	VWR	Darmstadt, Deutschland
Feuchte Kammer	VWR	Darmstadt, Deutschland
Filterpapier	Whatman	Dassel, Deutschland
Glasgefäße	Schott	Mainz, Deutschland

---

Glas-Pasteurpipetten 150 mm lang	Roth	Karlsruhe, Deutschland
HandyStep <sup>®</sup> electronic	Brand	Wertheim, Deutschland
Inkubator (Heracell 240)	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
Klebefolie breathseal, steril, für Well-Platten	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Nalge Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Kryostat	Slee	Mainz, Deutschland
Küvetten	VWR	Darmstadt, Deutschland
Multiplate Reader DTX 880	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Mikroskope:		
• BZ-8000	Keyence	Neu-Isenburg
• Laser Scanning Mikroskop (LSM)	Zeiss	Deutschland
• Olympus IM	Olympus	Hamburg, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	VWR	Darmstadt, Deutschland
Orbital Schüttler	Thieme Labortechnik	Bensheim, Deutschland
Parafilm	Roth	Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter	Schott Geräte	Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Pipettus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße:		
• 50 ml; 15 ml	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
• 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
• 0,2 ml	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Röntgenröhre Isovolt DS1	Seifert	Ahrensburg, Deutschland
Sterilbank (Flow Safe 2020)	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm	Roth	Karlsruhe, Deutschland
ThinCerts <sup>™</sup> + 12 Well-Platten	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Vortexer	Biometra	Göttingen, Deutschland
Wasserbad (Aqualine AL 5, Aqualine AL 25)	Lauda	Königshofen, Deutschland
Zellkulturgefäße	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugen		

---

• Biofuge 15; Rotor 3042	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
• Megafuge 1,0R; Rotor 2252	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
• Fresco 17; Rotor 3424	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland

## 7.8 Software

<b>Programm</b>	<b>Version</b>	<b>Verwendung</b>
Adobe Photoshop	CS5	Bildbearbeitung, Bildanalyse
ImageJ 1.46	1.40	Bildbearbeitung, Bildanalyse
Microsoft Office	2010	Textverarbeitung, Statistik
Origin	8G	Erstellung von Diagrammen
Reference Manager	11	Referenzverwaltung
Zen	2009 (Light Edition)	Bildbearbeitung (LSM)

---

## 8 Referenzen

- Abe, M (2007). Charged particle radiotherapy at the Hyogo Ion Beam Medical Center: Characteristics, technology and clinical results. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* **83**; 6:151-163.
- Agarwal, P, Srivastava, RK, Puri, SK und Srivastava, K (2013). Management of mycoplasma contamination in in vitro culture of Plasmodium falciparum without antibiotic treatment - a preliminary report. *Research in Microbiology* **164**; 3:211-215.
- Alvarez, E, Fey, EG, Valax, P, Yim, Z, Peterson, JD, Mesri, M, Jeffers, M, Dindinger, M, Twomlow, N, Ghatpande, A, LaRoche, WJ, Sonis, ST und Lichenstein, HS (2003). Preclinical characterization of CG53135 (FGF-20) in radiation and concomitant chemotherapy/radiation-induced oral mucositis. *Clinical Cancer Research* **9**; 9:3454-3461.
- Balkwill, F und Mantovani, A (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**; 9255:539-545.
- Barnes, PJ und Karin, M (1997). Mechanisms of disease - Nuclear factor-kappa b - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* **336**; 15:1066-1071.
- Basu, S, Rosenzweig, KR, Youmell, M und Price, BD (1998). The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **247**; 1:79-83.
- Bateman, E, Bowen, J, Stringer, A, Mayo, B, Plews, E, Wignall, A, Greenberg, N, Schiffrin, E und Keefe, D (2013). Investigation of Effect of Nutritional Drink on Chemotherapy-Induced Mucosal Injury and Tumor Growth in an Established Animal Model. *Nutrients* **5**; 10:3948-3963.
- Ben-Neriah, Y und Karin, M (2011). Inflammation meets cancer, with NF-kappa B as the matchmaker. *Nature Immunology* **12**; 8:715-723.
- Bonan, PRF, Kaminagakura, E, Pires, FR, Vargas, PA und de Almeida, OP (2006). Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **101**; 2:207-213.
- Bonizzi, G und Karin, M (2004). The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* **25**; 6:280-288.
- Bonner, WM, Redon, CE, Dickey, JS, Nakamura, AJ, Sedelnikova, OA, Solier, S und Pommier, Y (2008). Gamma H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer* **8**; 12:957-967.
- Boonyaratanakornkit, JB, Cogoli, A, Li, CF, Schopper, T, Pippia, P, Galleri, G, Meloni, MA und Hughes-Fulford, M (2005). Key gravity-sensitive signaling pathways drive T-cell activation. *Faseb Journal* **19**; 12:2020-+.

- Bours, V, Bonizzi, G, tires-Alj, M, Bureau, F, Piette, J, Lekeux, P und Merville, MP (2000a). NF-kappa B activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment. *Toxicology* **153**; 1-3:27-38.
- Bours, V, tires-Alj, M, Hellin, AC, Viatour, P, Robe, P, Delhalle, S, Benoit, V und Merville, MP (2000b). Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. *Biochemical Pharmacology* **60**; 8:1085-1089.
- Boxman, ILA, Ruwihof, C, Boerman, OC, Lowik, CWGM und Ponc, M (1996). Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Archives of Dermatological Research* **288**; 7:391-398.
- Brat, DJ, Bellail, AC und Van Meir, EG (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncology* **7**; 2:122-133.
- Brooks, AL (2003). Developing a scientific basis for radiation risk estimates: Goal of the low dose research program. *Health Physics* **85**; 1:85-93.
- Chiang, CS, Hong, JH, Stalder, A, Sun, JR, Withers, HR und McBride, WH (1997). Delayed molecular responses to brain irradiation. *International Journal of Radiation Biology* **72**; 1:45-53.
- Chiang, CS, Liu, WC, Jung, SM, Chen, FH, Wu, CR, McBride, WH, Lee, CC und Hong, JH (2005). Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: Strain differences. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **62**; 3:862-871.
- Colley, HE, Eves, PC, Pinnock, A, Thornhill, MH und Murdoch, C (2013c). Tissue-engineered oral mucosa to study radiotherapy-induced oral mucositis. *International Journal of Radiation Biology* **89**; 11:907-914.
- Colley, HE, Eves, PC, Pinnock, A, Thornhill, MH und Murdoch, C (2013b). Tissue-engineered oral mucosa to study radiotherapy-induced oral mucositis. *Int J Radiat Biol*
- Colley, HE, Eves, PC, Pinnock, A, Thornhill, MH und Murdoch, C (2013a). Tissue-engineered oral mucosa to study radiotherapy-induced oral mucositis. *Int J Radiat Biol*
- Colley, HE, Eves, PC, Pinnock, A, Thornhill, MH und Murdoch, C (2013d). Tissue-engineered oral mucosa to study radiotherapy-induced oral mucositis. *Int J Radiat Biol*
- Contassot, E, Beer, HD und French, LE (2012). Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Medical Weekly* **142**;
- Cooke, MS, Evans, MD, Dizdaroglu, M und Lunec, J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb Journal* **17**; 10:1195-1214.
- Crowe, SL, Tsukerman, S, Gale, K, Jorgensen, TJ und Kondratyev, AD (2011). Phosphorylation of Histone H2A.X as an Early Marker of Neuronal Endangerment following Seizures in the Adult Rat Brain. *Journal of Neuroscience* **31**; 21:7648-7656.
- Cucinotta, FA, Wilson, JW, Shinn, JL, Badavi, FF und Badhwar, GD (1996). Effects of target fragmentation on evaluation of LET spectra from space radiations: Implications for space radiation protection studies. *Radiation Measurements* **26**; 6:923-934.



- 
- de la Rica, R und Stevens, MM (2012). Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology* **7**; 12:821-824.
- De Plaen, IG, Tan, XD, Chang, H, Qu, XW, Liu, QP und Hsueh, W (1998). Intestinal NF-kappa B is activated, mainly as p50 homodimers, by platelet-activating factor. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* **1392**; 2-3:185-192.
- Dinareello, CA (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* **117**; 14:3720-3732.
- Dittmann, KH, Gueven, N, Mayer, C, Ohneseit, P, Zell, P, Begg, AC und Rodemann, HP (1998). The presence of wild-type TP53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in normal fibroblasts. *Radiation Research* **150**; 6:648-655.
- Dorr, W, Hamilton, CS, Boyd, T, Reed, B und Denham, JW (2002). Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **52**; 4:911-917.
- ESA (2014). <http://www.aee.odu.edu/nvportal/aurora.php>.
- Fabian, C (2013). Untersuchungen zur Wechselbeziehung zwischen Proteom, Energiestoffwechsel, Redoxstatus und Radiosensibilität von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*. *Dissertation im Fachbereich Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz*
- Farahani, RM und DiPietro, LA (2008). Microgravity and the implications for wound healing. *International Wound Journal* **5**; 4:552-561.
- Feghali, CA und Wright, TM (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* **2**;d12-d26.
- Fleckenstein, J, Kuhne, M, Seegmuller, K, Derschang, S, Melchior, P, Graber, S, Fricke, A, Rube, CE und Rube, C (2011). The Impact of Individual *in Vivo* Repair of Dna Double-Strand Breaks on Oral Mucositis in Adjuvant Radiotherapy of Head-And-Neck Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **81**; 5:1465-1472.
- Foster, ER und Downs, JA (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *Febs Journal* **272**; 13:3231-3240.
- Fujita, T, Nolan, GP, Ghosh, S und Baltimore, D (1992). Independent Modes of Transcriptional Activation by the P50-Subunit and P65-Subunit of Nf-Kappa-B. *Genes & Development* **6**; 5:775-787.
- Fujita, T, Nolan, GP, Liou, HC, Scott, ML und Baltimore, D (1993). The Candidate Protooncogene Bcl-3 Encodes A Transcriptional Coactivator That Activates Through Nf-Kappa-B P50 Homodimers. *Genes & Development* **7**; 7B:1354-1363.
- Gerdes, J, Schwab, U, Lemke, H und Stein, H (1983). Production of A Mouse Monoclonal-Antibody Reactive with A Human Nuclear Antigen Associated with Cell-Proliferation. *International Journal of Cancer* **31**; 1:13-20.

- Ghosh, S, May, MJ und Kopp, EB (1998). NF-kappa B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* **16**;225-260.
- Greten, FR, Eckmann, L, Greten, TF, Park, JM, Li, ZW, Egan, LJ, Kagnoff, MF und Karin, M (2004). IKK beta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**; 3:285-296.
- Groger, S, Michel, J und Meyle, J (2008). Establishment and characterization of immortalized human gingival keratinocyte cell lines. *Journal of Periodontal Research* **43**; 6:604-614.
- Hall und Giaccia (2012). Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams & Wilkins, 7th edition.
- Hallahan, D, Kuchibhotla, J und Wyble, C (1996). Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Research* **56**; 22:5150-5155.
- Hassler, DM, Zeitlin, C, Wimmer-Schweingruber, RF, Ehresmann, B, Rafkin, S, Eigenbrode, JL, Brinza, DE, Weigle, G, Bottcher, S, Bohm, E, Burmeister, S, Guo, JN, Kohler, J, Martin, C, Reitz, G, Cucinotta, FA, Kim, MH, Grinspoon, D, Bullock, MA, Posner, A, Gomez-Elvira, J, Vasavada, A und Grotzinger, JP (2014). Mars' Surface Radiation Environment Measured with the Mars Science Laboratory's Curiosity Rover. *Science* **343**; 6169:
- Hawkey, A (2005). Physiological and biomechanical considerations for a human Mars mission. *Jbis-Journal of the British Interplanetary Society* **58**; 3-4:117-130.
- Heilmann, J, TaucherScholz, G, Haberer, T, Scholz, M und Kraft, G (1996). Measurement of intracellular DNA double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **34**; 3:599-608.
- Hellweg, CE, Baumstark-Khan, C und Horneck, G (2003). Generation of stably transfected mammalian cell lines as fluorescent screening assay for NF-kappa B activation-dependent gene expression. *Journal of Biomolecular Screening* **8**; 5:511-521.
- Hellweg, CE, Baumstark-Khan, C, Schmitz, C, Lau, P, Meier, MM, Testard, I, Berger, T und Reitz, G (2011). Activation of the Nuclear Factor kappa B pathway by heavy ion beams of different linear energy transfer. *International Journal of Radiation Biology* **87**; 9:954-963.
- Heremans, H und Billiau, A (1989). The Potential Role of Interferons and Interferon Antagonists in Inflammatory Disease. *Drugs* **38**; 6:957-972.
- Hirano, T (1992). Interleukin-6 and Its Relation to Inflammation and Disease. *Clinical Immunology and Immunopathology* **62**; 1:S60-S65.
- Huber, AR, Kunkel, SL, Todd, RF und Weiss, SJ (1991). Regulation of Transendothelial Neutrophil Migration by Endogenous Interleukin-8. *Science* **254**; 5028:99-102.
- Janeway und Travers (2009). Immunologie.

- Jensen, AD, Nikoghosyan, AV, Ecker, S, Ellerbrock, M, Debus, J und Munter, MW (2011). Carbon ion therapy for advanced sinonasal malignancies: feasibility and acute toxicity. *Radiation Oncology* **6**;
- Karin, M (2009). NF-kappa B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**; 5:
- Karin, M, Cao, YX, Greten, FR und Li, ZW (2002). NF-kappa B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer* **2**; 4:301-310.
- Karin, M und Greten, FR (2005). NF kappa B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology* **5**; 10:749-759.
- Kraft (2005). Tumortherapie mit schweren Ionen. Verein zur Förderung der Tumortherapie mit schweren Ionen e.V.
- Lambros, MP, Parsa, C, Mulamalla, H, Orlando, R, Lau, B, Huang, Y, Pon, D und Chow, M (2011). Identifying cell and molecular stress after radiation in a three-dimensional (3-D) model of oral mucositis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **405**; 1:102-106.
- Lee, SJ, Dimtchev, A, Lavin, MF, Dritschilo, A und Jung, M (1998). A novel ionizing radiation-induced signaling pathway that activates the transcription factor NF-kappa B. *Oncogene* **17**; 14:1821-1826.
- Linard, C, Ropenga, A, Vozenin-Brotons, MC, Chapel, A und Mathe, D (2003). Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappa B in rat ileal muscularis layer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **285**; 3:G556-G565.
- Linz (2012). Ion Beam Therapy.
- Logan, RM, Stringer, AM, Bowen, JM, Yeoh, ASJ, Gibson, RJ, Sonis, ST und Keefe, DMK (2007). The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews* **33**; 5:448-460.
- Maalouf, M, Durante, M und Foray, N (2011). Biological Effects of Space Radiation on Human Cells: History, Advances and Outcomes. *Journal of Radiation Research* **52**; 2:126-146.
- Maas-Szabowski, N, Shimotoyodome, A und Fusenig, NE (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *Journal of Cell Science* **112**; 12:1843-1853.
- Magne, N, Toillon, RA, Bottero, V, Didelot, C, Van Houtte, P, Gerard, JP und Peyron, JF (2006). NF-kappa B modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Letters* **231**; 2:158-168.
- Mah, LJ, El-Osta, A und Karagiannis, TC (2010). gamma H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**; 4:679-686.

- Mahida, YR, Ceska, M, Effenberger, F, Kurlak, L, Lindley, I und Hawkey, CJ (1992). Enhanced Synthesis of Neutrophil-Activating Peptide-I Interleukin-8 in Active Ulcerative-Colitis. *Clinical Science* **82**; 3:273-275.
- Merz, F, Gaunitz, F, Dehghani, F, Renner, C, Meixensberger, J, Gutenberg, A, Giese, A, Schopow, K, Hellwig, C, Schafer, M, Bauer, M, Stocker, H, Taucher-Scholz, G, Durante, M und Bechmann, I (2013). Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro-Oncology* **15**; 6:670-681.
- Mestas, J und Hughes, CCW (2004). Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology* **172**; 5:2731-2738.
- Mizoe, J, Tsujii, H, Kamada, T, Matsuoka, Y, Tsuji, H, Osaka, Y, Hasegawa, A, Yamamoto, N, Ebihara, S und Konno, A (2004). Dose escalation study of carbon ion radiotherapy for locally advanced head-and-neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **60**; 2:358-364.
- Murray, LA, Kramer, MS, Watkins, B, Fey, E, Hesson, DP und Sonis, ST (2008). Serum amyloid P inhibits radiation-induced mucositis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **72**; 1:S698-S698.
- Naidu, MUR, Ramana, GV, Rani, PU, Mohan, IK, Suman, A und Roy, P (2004). Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis - Complicating the treatment of cancer. *Neoplasia* **6**; 5:423-431.
- Narayanan, PK, Larue, KEA, Goodwin, EH und Lehnert, BE (1999). Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. *Radiation Research* **152**; 1:57-63.
- Olson, TS und Ley, K (2002). Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **283**; 1:R7-R28.
- Ozasa, K, Shimizu, Y, Suyama, A, Kasagi, F, Soda, M, Grant, EJ, Sakata, R, Sugiyama, H und Kodama, K (2012). Studies of the Mortality of Atomic Bomb Survivors, Report 14, 1950-2003: An Overview of Cancer and Noncancer Diseases. *Radiation Research* **177**; 3:229-243.
- Pikarsky, E, Porat, RM, Stein, I, Abramovitch, R, Amit, S, Kasem, S, Gutkovich-Pyest, E, Urieli-Shoval, S, Galun, E und Ben-Neriah, Y (2004). NF-kappa B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**; 7007:461-466.
- Piret, B, Schoonbroodt, S und Piette, J (1999). The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappa B following DNA damage. *Oncogene* **18**; 13:2261-2271.
- Pober, JS und Sessa, WC (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology* **7**; 10:803-815.
- Porta, C, Larghi, P, Rimoldi, M, Totaro, MG, Allavena, P, Mantovani, A und Sica, A (2009). Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* **214**; 9-10:761-777.

- Rakhorst, HA, Tra, WMW, Posthumus-Van Sluijs, ST, Hovius, SER, Levendag, PC, Kanaar, R und Hofer, SOP (2006). Quantitative analysis of radiation-induced DNA break repair in a cultured oral mucosal model. *Tissue Engineering* **12**; 12:3395-3403.
- Rangan, G, Wang, YP und Harris, D (2009). NF-kappaB signalling in chronic kidney disease. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **14**;3496-3522.
- Roesch-Ely, M, Steinberg, T, Bosch, FX, Mussig, E, Whitaker, N, Wiest, T, Kohl, A, Komposch, G und Tomakidi, P (2006a). Organotypic co-cultures allow for immortalized human gingival keratinocytes to reconstitute a gingival epithelial phenotype in vitro. *Differentiation* **74**; 9-10:622-637.
- Roesch-Ely, M, Steinberg, T, Bosch, FX, Mussig, E, Whitaker, N, Wiest, T, Kohl, A, Komposch, G und Tomakidi, P (2006b). Organotypic co-cultures allow for immortalized human gingival keratinocytes to reconstitute a gingival epithelial phenotype in vitro. *Differentiation* **74**; 9-10:622-637.
- Rogakou, EP, Pilch, DR, Orr, AH, Ivanova, VS und Bonner, WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **273**; 10:5858-5868.
- Rose-John, S und Schooltink, H (2007). Cytokines are a therapeutic target for the prevention of inflammation-induced cancers. *Recent Results in Cancer Research* **174**;57-66.
- Sawicki, G, Marcoux, Y, Sarkhosh, K, Tredget, E und Ghahary, A (2005). Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and-9 and their inhibitors. *Molecular and Cellular Biochemistry* **269**; 1-2:209-216.
- Schae, D, Kachikwu, EL und McBride, WH (2012). Cytokines in Radiobiological Responses: A Review. *Radiation Research* **178**; 6:505-523.
- Scholz, M (2003). Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues. *Radiation Effects on Polymers for Biological Use* **162**;95-155.
- Schroerer, H (2012). Etablierung organotypischer Co-Kulturen unter Beteiligung von humanen Abwehrzellen. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz*
- Schulz-Ertner, D, Haberer, T, Scholz, M, Thilmann, C, Wenz, F, Jakel, O, Kraft, G, Wannemacher, M und Debus, J (2002). Acute radiation-induced toxicity of heavy ion radiotherapy delivered with intensity modulated pencil beam scanning in patients with base of skull tumors. *Radiotherapy and Oncology* **64**; 2:189-195.
- Seitz, M, Dewald, B, Ceska, M, Gerber, N und Baggiolini, M (1992). Interleukin-8 in Inflammatory Rheumatic Diseases - Synovial-Fluid Levels, Relation to Rheumatoid Factors, Production by Mononuclear-Cells, and Effects of Gold Sodium Thiomalate and Methotrexate. *Rheumatology International* **12**; 4:159-164.
- Sen, R und Baltimore, D (1986). Inducibility of Kappa-Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein Nf-Kappa-B by A Posttranslational Mechanism. *Cell* **47**; 6:921-928.

- Shin, YS, Shin, HA, Kang, SU, Kim, JH, Oh, YT, Park, KH und Kim, CH (2013). Effect of Epicatechin against Radiation-Induced Oral Mucositis: In Vitro and In Vivo Study. *Plos One* **8**; 7:
- Smyth, MJ, Hayakawa, Y, Takeda, K und Yagita, H (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**; 11:850-861.
- Sonis, ST (1998). Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncology* **34**; 1:39-43.
- Sonis, ST (2004). The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer* **4**; 4:277-284.
- Sonis, ST (2009). Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncology* **45**; 12:1015-1020.
- Sonis, ST (2010). New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Diseases* **16**; 7:597-600.
- Sonis, ST (2013). Oral mucositis in head and neck cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 236-240.
- Sonis, ST und Fey, EG (2002). Oral complications of cancer therapy. *Oncology-New York* **16**; 5:680-686.
- Sonnenfeld, G (2002). The immune system in space and microgravity. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **34**; 12:2021-2027.
- Sonnenfeld, G und Shearer, WT (2002). Immune function during space flight. *Nutrition* **18**; 10:899-903.
- Tan, PLJ, Farmiloe, S, Yeoman, S und Watson, JD (1990). Expression of the Interleukin-6 Gene in Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *Journal of Rheumatology* **17**; 12:1608-1612.
- Tobita, T, Izumi, K und Feinberg, SE (2010). Development of an in vitro model for radiation-induced effects on oral keratinocytes. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **39**; 4:364-370.
- Van der Meeren, A, Bertho, JM, Vandamme, M und Gaugler, MH (1997). Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators of Inflammation* **6**; 3:185-193.
- van Hinsbergh, VWM (2012). Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Seminars in Immunopathology* **34**; 1:93-106.
- Van Snick, J (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* **8**;253-278.
- Varnum, SM, Springer, DL, Chaffee, ME, Lien, KA, Webb-Robertson, BJM, Waters, KM und Sacksteder, CA (2012). The Effects of Low-Dose Irradiation on Inflammatory Response Proteins in a 3D Reconstituted Human Skin Tissue Model. *Radiation Research* **178**; 6:591-599.
- Vassalli, P (1992). The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annual Review of Immunology* **10**;411-452.

- Vegran, F, Boidot, R, Michiels, C, Sonveaux, P und Feron, O (2011). Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF-kappa B/IL-8 Pathway that Drives Tumor Angiogenesis. *Cancer Research* **71**; 7:2550-2560.
- Verma, IM, Stevenson, JK, Schwarz, EM, Vanantwerp, D und Miyamoto, S (1995). Rel/Nf-Kappa-B/I-Kappa-B Family - Intimate Tales of Association and Dissociation. *Genes & Development* **9**; 22:2723-2735.
- Vissink, A, Jansma, J, Spijkervet, FKL, Burlage, FR und Coppes, RP (2003). Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **14**; 3:199-212.
- Wang, ZX, Wang, Y, Farhangfar, F, Zimmer, M und Zhang, YX (2012). Enhanced Keratinocyte Proliferation and Migration in Co-culture with Fibroblasts. *Plos One* **7**; 7:
- Wardley, AM, Booth, D, Roberts, SA, Scarffe, JH und Potten, CS (1998). A quantitative histometric murine in vivo model of radiation-induced oral mucositis. *Archives of Oral Biology* **43**; 7:567-577.
- Watanabe, E, Yamato, M, Shiroyanagi, Y, Tanabe, K und Okano, T (2011). Bladder Augmentation Using Tissue-Engineered Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets Grafted on Demucosalized Gastric Flaps. *Transplantation* **91**; 7:700-706.
- Werner, S, Krieg, T und Smola, H (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* **127**; 5:998-1008.
- Wilder-Smith, P, Hammer-Wilson, MJ, Zhang, J, Wang, Q, Osann, K, Chen, ZP, Wigdor, H, Schwartz, J und Epstein, J (2007). In vivo imaging of oral mucositis in an animal model using optical coherence tomography and optical Doppler tomography. *Clinical Cancer Research* **13**; 8:2449-2454.
- Xie, KP (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **12**; 4:375-391.
- Yin, YF, Si, XL, Gao, Y, Gao, L und Wang, JN (2013). The nuclear factor-kappa B correlates with increased expression of interleukin-6 and promotes progression of gastric carcinoma. *Oncology Reports* **29**; 1:34-38.
- Yoshino, F, Yoshida, A, Nakajima, A, Wada-Takahashi, S, Takahashi, S und Lee, MCI (2013). Alteration of the Redox State with Reactive Oxygen Species for 5-Fluorouracil-Induced Oral Mucositis in Hamsters. *Plos One* **8**; 12:
- Zaider, M (2001). The risk of leukemia from low doses of low-LET radiation. *Mathematical and Computer Modelling* **33**; 12-13:1307-1313.
- Zhou, DH, Yu, T, Chen, G, Brown, SA, Yu, ZF, Mattson, MP und Thompson, JS (2001). Effects of NF-kappa B1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF-kappa-B activation and TNF alpha, IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-6 mRNA expression in vivo. *International Journal of Radiation Biology* **77**; 7:763-772.
- Zlotnik, A und Yoshie, O (2000). Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**; 2:121-127.

## Kongressbeiträge

**Viktoria Tschachojan**, Henrike Schroeer, Nicole Averbeck, Wolfgang Mueller-Klieser, „Heavy ions or X-rays induced oral mucositis in 3D organotypic cultures and co-cultures containing PBMC”, 59th Annual Meeting of the Radiation Research Society September 14–18, **2013**; New Orleans, USA

**Viktoria Tschachojan**, Ulrike G. A. Sattler, Nicole Averbeck, Wolfgang Mueller-Klieser, „Three-dimensional organotypic cultures as an in vitro model for heavy ion-induced oral mucositis”, 58th Annual Meeting of the Radiation Research Society September 30th–October 3rd, **2012**; San Juan, Puerto Rico, USA

**Viktoria Tschachojan**, Ulrike G. A. Sattler, Nicole Averbeck, Wolfgang Mueller-Klieser, „Three-dimensional organotypic cultures as an in vitro model of heavy ion-induced mucositis due to extended space flights”, 14th International Congress of Radiation Research August 28th–September 1st, **2011**, Warsaw, Poland



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Mainz, den 30.06.2014

---

Viktorija Tschachojan

