



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Fakultät für Klinische Medizin Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Mikroinjektion eines monoklonalen Antikörpers gegen HSP 72 in humane Keratinozyten in Kultur zum Studium der Funktion des HSP 72 bei UV - Bestrahlung**

Autor: Hortensia Grema  
Einrichtung: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. Ch. Bayerl

HSP 72 ist ein Protein, das konstitutiv in humanen Keratinozyten vorkommt. Es wird durch verschiedene Umweltfaktoren wie beispielsweise Hitze, Kälte, UV-Licht, Schwermetalle, Anoxie, Glukoseentzug, Zytokine, und andere Mediatoren, die zu zellulärem Streß führen, induziert und vermehrt innerhalb der Zelle exprimiert. In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der Mikroinjektion die Lokalisation der HSP 72 Streßproteine, ihre Induzierbarkeit und Expression in humanen kultivierten Keratinozyten durch UV-Bestrahlung sowie ihre Funktion im Hinblick auf den UV-Schutz der Zelle untersucht werden.

Für die einzelnen Experimente wurden aus gesunden Hautstücken von Hautbiopsien Keratinozyten angezüchtet, um daraus Kulturen zu gewinnen. Ein monoklonaler Antikörper gegen das Streßprotein HSP 72 wurde in den Zellkern von kultivierten Keratinozyten injiziert, um die HSP 72 Proteine zu binden und dadurch zu neutralisieren. Im Anschluß an die Mikroinjektion wurden die Keratinozytenkulturen mit UV-A-, UV-B- oder UV-C-Licht bestrahlt. Mit immunhistochemischen Methoden, der Avidin-Biotin-Methode und der Biotin-Streptavidin-Immunfluoreszenz, wurde die Verteilung des HSP 72 innerhalb der Zelle dargestellt. Die Anti-HSP72-injizierten und bestrahlten Keratinozyten wurden zu definierten Zeitpunkten mit nicht-injizierten und bestrahlten bzw. nicht-injizierten und unbestrahlten Keratinozyten verglichen. Untersucht wurden Unterschiede bezüglich der Zellmorphologie, der Zellüberlebensrate und dem Verteilungsmuster der HSP 72 Proteine innerhalb der Zellen.

Die Verteilung der HSP 72 Moleküle in ungestreßten, nicht injizierten und unbestrahlten Keratinozyten zeigte sich vor allem im Zytoplasma zirkulär um den Nukleus und im Nukleus selbst. Dies spricht sowohl für ihre Aufgabe bei der Reifung und Faltung der Proteine als auch für ihre Schutzfunktion im Zellkern. Morphologisch zeigte sich bei ungestreßten Keratinozyten ein großer runder Zellkern mit deutlich abgegrenztem Nukleolus und ein üppiges, breites Zytoplasma.

In bestrahlten, nicht-injizierten Keratinozyten ließ sich eine verstärkte immunhistochemische Anfärbung der HSP 72 Moleküle im Nukleus und Zytoplasma beobachten, was für eine Induktion der HSP 72 Expression durch UV- Bestrahlung spricht. Einen Unterschied bezüglich der verschiedenen Wellenlängen der Bestrahlung gab es nicht, die Expression der HSP 72 Streßproteine wurde also sowohl durch UV-A- als auch durch UV-B- und UV-C-Strahlen induziert. Morphologisch zeigte sich eine geringe Verdichtung des Zellkerns, als Ausdruck des UV-induzierten Zellstress.

Deutliche Unterschiede zu oben genannten Beobachtungen zeigten sich bei Anti - HSP 72 - injizierten und anschließend UV-bestrahlten Keratinozyten. HSP 72 färbte sich im Zellkern und im Zytoplasma wesentlich geringer an, morphologisch konnte man stark verdichtete und pyknotische Zellkerne sowie ein geschrumpftes und schmales Zytoplasma erkennen. Das konstitutionelle sowie das UV - induzierte, neu synthetisierte HSP 72 wurde durch den injizierten monoklonalen Antikörper gebunden. Dadurch kam es zu einer Neutralisierung der UV-protektiven Wirkung der HSP 72 Streßproteine und zur Schädigung der Keratinozyten durch die UV-Bestrahlung, erkennbar an den morphologischen Veränderungen der Zellen. Bezüglich der histomorphologischen Veränderungen besaß die UV-B- und UV-C-Strahlung gegenüber der UV-A-Strahlung die größere Potenz im Hinblick auf den UV-induzierten Zellschaden. Auf die Überlebensrate der Keratinozyten bei den verschiedenen Bestrahlungsarten hatte UV-A- und UV-B-Strahlung gegenüber UV-C-Strahlung einen stärkeren Effekt. UV-C-bestrahlte Zellen zeigten den größten prozentualen Zellzuwachs, ein signifikanter

Unterschied ergab sich lediglich zwischen UV-A- und UV-C-Bestrahlung ( $p = 0,0098$ ). Möglicherweise hatte die UV-C-Strahlung ein Streßprotein einer anderen Molekulargewichtsklasse induziert, das die Schutzfunktion der Zelle vor UV-C-bedingtem Zellschaden übernahm und nicht durch unseren monoklonalen Antikörper blockiert wurde. Zur Diskussion steht hier das HSP 110, dessen Funktion aber noch ungeklärt ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß HSP 72 durch UV-A-, UV-B- und UV-C-Strahlen in humanen Keratinozyten induziert wird und für den UV-Schutz der Keratinozyten verantwortlich oder zumindest daran beteiligt ist. Die vermehrte Anwesenheit von HSP 72 in Keratinozyten könnte in Zukunft einen nützlichen Indikator für zellulären UV-Streß darstellen. Dies eröffnet besonders im Hinblick auf die chronische UV-Schädigung der Haut und die dadurch bedingte Hautalterung bzw. Entstehung von epitheliale Hautkrebs neue prognostische und präventive Möglichkeiten für die Zukunft, die es *in vivo* noch zu erforschen gilt.