universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Vergleichende Untersuchungen der Zelloberfläche der Pigmentzellen von Säugern mit Hilfe spezifischer Markierungstechniken

Romani, Nikolaus

1983

Einleitung

urn:nbn:at:at-ubi:2-12519

EINLEITUNG

I. Biologie der Haut (Dermatologischer Aspekt):

1. Vergleichende Betrachtung des Integuments

Die Haut oder das Integument der Metazoa bildet die Grenzfläche zwischen Organismus und Umwelt. Entsprechend den vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten zwischen Organismus und Umwelt, hat die Körperdecke auch ein breites Spektrum von Funktionen zu erfüllen. Es reicht von allgemeinen Funktionen wie Schutz, Stoffaustausch, Sinnesrezeption bis zu spezialisierten Funktionen wie Skelettfunktion bei Insekten (Chitinpanzer) und Mollusken (Kalkschalen), der Signalgebung durch verschiedenste Färbungen und Muster oder gar der Fortbewegung. Dadurch ergibt sich eine kaum überschaubare Mannigfaltigkeit im Aufbau der Haut.

Gemeinsam ist allen Metazoa ein auf einer Basallamina aufsitzendes Epithelgewebe, die Epidermis. Sie ist bei Vertebraten mehrschichtig, bei Evertebraten besteht sie in der Regel nur aus einer einzigen Zellage.

Die Haut der Vertebraten zeigt zwei deutlich voneinander abgegrenzte Schichten:

- die epitheliale Epidermis oder Oberhaut, deren Zellen zum größten Teil ektodermaler Herkunft sind und die
- bindegewebige Dermis oder Lederhaut, mit Zellen vorwiegend mesodermalen Ursprungs.
- Dazu kommt, sehr unterschiedlich gestaltet, eine Subkutis oder Unterhaut, welche den Übergang zu den tiefer liegenden Geweben schafft. Bei Arten mit konstanter Körpertemperatur (Vögel, Säuger) ist die Subkutis als Fettgewebe ausgebildet.

Besondere Differenzierungen der Haut, die Hautanhangsgebilde, sind bei niederen Wirbeltieren vorwiegend dermaler Entstehung (Placoidschuppen der Haie). Mit zunehmender Organisationshöhe geht der dermale Anteil immer mehr zurück. Von den dermal-epidermalen Reptilienschuppen führt die Entwicklung zu den rein epidermalen Anhangsgebilden der Vögel und Säuger, wie Federn, Haare, Nägel, Hufe, Hörner, sowie Talg- und Schweißdrüsen.

2. Aufbau der Haut bei Säugetieren

A. Epidermis:

Die Epidermis hat den Charakter eines verhornenden Plattenepithels. Sie ist deutlich geschichtet.

- Der Basallamina sitzt das Stratum basale auf, das mehrheitlich aus zylindrischen Zellen besteht, den Keratinozyten (K). Nur in dieser Schicht sind die Epidermalzellen teilungsfähig. Von hier steigen die K in die höheren Zellschichten auf.
- Daran schließt das Stratum spinosum an. Die K sind durch zahlreiche Desmosomen untereinander verbunden. Bei der histologischen Präparation schrumpfen die Zellen, bleiben aber an den Desmosomen aneinander hängen. Dies führt zum stacheligen "spinösen" Aussehen im Lichtmikroskop. Die Zellen haben hier bereits die Fähigkeit zur Teilung verloren.
- Im Stratum granulosum platten die Zellen ab, werden starr, die Zellkerne verschwinden und der Verhornungsprozeß beginnt. Lichtmikroskopisch ist diese Schicht durch die tief basophilen Keratohyalinkörper (Vorläufer der Matrixsubstanz des Keratins) gekennzeichnet.
- Die äußerste Schicht, die Hornschichte oder Stratum corneum besteht aus kernlosen, plättchenartigen, übereinander gestapelten toten K oder Hornzellen, die fast ausschließlich Keratin enthalten.

Die epidermalen Schichten befinden sich in einem dynamischen Fließgleichgewicht: Die im Stratum basale entstehenden Zellen wandern nach außen, bilden die Hornsubstanz aus und werden durch Abschilferung abgestoßen. Somit kann die Epidermis als holokrines Sekretionsorgan betrachtet werden.

Die anderen epidermalen Zellpopulationen werden im nächsten Punkt beschrieben.

B. Dermis (Corium):

Wie schon die Bezeichnung Lederhaut angibt, ist die Dermis ein elastisches Gewebe von hoher Reißfestigkeit. Diese mechanischen Eigenschaften werden durch die fibrillären Proteine Elastin und Kollagen erreicht. Die Fibroblasten liegen in einem Netzwerk der von ihnen erzeugten Kollagenfasern eingebettet. Die Fasern sind im oberen Teil der Dermis (Stratum papillare) lockerer angeordnet als im tieferen Stratum reticulare. Die Lederhaut ist Träger der

Blutgefäße und Nerven, welche die Haut versorgen. Eine Reihe anderer Zellen wie Mastzellen, verschiedene Histiozyten und dermale Langerhanszellen finden sich ebenfalls im Kollagennetzwerk.

C. Subkutis:

In ein Grundgerüst aus bindegewebigen Septen ist Fettgewebe eingelagert. Es dient der Wärmeisolation, als mechanischer Schutzpolster, als Energiespeicher und als Element der Formgebung.

3. Zelltypen der Epidermis

Die Epidermis der Säuger besteht zu über 90% aus K. Der Rest setzt sich aus 3 verschiedenen Zelltypen zusammen: Melanozyten (M), Langerhanszellen und Merkel-Zellen.

A. Melanozyten (M):

M sind dendritische Zellen, deren Vorkommen in der Epidermis auf die Basalschichte beschränkt ist. Dort ist ihre Dichte sehr variabel. Je nach Körperstelle schwankt die Dichte beim Menschen zwischen 300 und 600 M/mm² bis zu Maximalwerten von 2000 M/mm² im Bereich von lichtexponierten Hautregionen und am Genitale (Fitzpatrick et al, 1979). Dichte und Verteilung der M sind auch speziesabhängig: bei Mäusen verschwinden die aktiven M 2-4 Tage nach der Geburt aus der Epidermis. Der größte Teil der M ist dann in den Haarfollikeln lokalisiert (Quevedo und Fleischmann 1980, Hirobe 1982a). Interfollikuläre, epidermale M verbleiben in hoher Dichte nur an schwach behaarten, pigmentierten Körperstellen (Ohr, Lid, Skrotum, Schwanz). Ähnliche Verhältnisse, wenn auch nicht so ausgeprägte, scheinen auch bei Meerschweinchen vorzuliegen (eigene Beobachtungen). Daneben kommen auch außerhalb der Epidermis M vor, z.B. beim Menschen in der Retina und in den Leptomeningen. Dermale M sind beim Menschen während der Embryonalentwicklung in der Dermis "steckengeblieben" (siehe weiter unten) und bilden dort wahrscheinlich Keime für sogenannte "dermale Melanozytosen", wie z.B. Mongolenfleck oder Blauer Naevus. Bei Mäusen und niederen Vertebraten (Amphibien) sind dermale M normal.

M produzieren das Pigment der Haut der Vertebraten, das Melanin. Die Ausgangssubstanz Tyrosin wird in zwei vom Enzym Tyrosinase katalysierten Schritten

in Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und weiter in Dopaquinon überführt. Weitere Intermediärprodukte entstehen nicht-enzymatisch, polymerisieren und bilden das Eumelanin, ein braun-schwarzes Heteropolymer. Rote und gelbe Farbtöne werden vom schwefelhältigen Phäomelanin verursacht, dessen Biosyntheseweg sich nach dem Dopaquinon von dem des Eumelanins trennt (Prota 1980). Alle Vertebraten bilden Melanin nach diesem Schema aus.

Die Melaninbildung geschieht in eigenen Zellorganellen - den Melanosomen (Seiji et al, 1961), auch Pigmentgranula genannt. Sie sind im Elektronenmikroskop in der Regel oval erscheinende Körperchen, welche in ihrem Reifungsprozeß folgende 4 typischen Stadien durchlaufen (Jimbow und Kukita, 1971) (Abb. 1):

Stadium I: Ein rundes membranbegrenztes Vesikel, welches Tyrosinase (histochemisch nachweisbar) und deutlich regelmäßig angeordnete Filamente (Matrix) enthält.

Stadium II: Das Organell ist oval, zeigt zahlreiche membranartige Filamente mit oder ohne periodisch angeordneten Querverstrebungen.

Stadium III: Die innere Struktur, gleich wie bei Stufe II, ist teilweise durch die Einlagerung von elektronendichtem Melanin verdunkelt.

Stadium IV: Das ovale Organell ist elektronendicht. Eine innere Struktur kann nicht mehr erkannt werden.

Den Verlauf der Melanogenese auf zellulärer Ebene stellt man sich heute folgendermaßen vor (Maul 1969, Maul und Brumbough 1971, Hirobe 1982b): Tyrosinase sammelt sich im sogenannten "golgi assoziierten endoplasmatischen Reticulum und Lysosomen" (GERL). Sie wird in "coated vesicles" in erweiterte Zisternen des glatten endoplasmatischen Reticulums transportiert, wo die Strukturproteine der Melanosomenmatrix bereits gebildet sind. In dieses Gerüst beginnt sich jetzt das mittels der Tyrosinasewirkung gebildete Melanin einzulagern bis das Melanosom vollständig elektronendicht erscheint.

Epidermale M sind sekretorische Zellen. Sie geben das gebildete Pigment an die sie umgebenden K weiter. Dieses symbioseähnliche Zusammenwirken von M und K wird als Pigmentdonation oder -transfer bezeichnet. Erst durch den Melaningehalt der K ergibt sich die bekannte UV-Lichtschutzfunktion der Haut

und die Hautfarbe. Die funktionelle Einheit der Melaninpigmentierung in Säugetieren ist die "epidermale Melanineinheit" (Fitzpatrick und Breathnach 1963). Sie besteht aus einem dendritischen M und etwa 20-30 von diesen M aus mit Melanin belieferten K (Frenk und Shellhorn 1969).

Die M und auch alle übrigen Chromatophoren von Vertebraten sind neuroektodermaler Herkunft (Rawles 1948, Starck 1975). Sie entstammen der Neuralleiste und wandern beim Menschen in der zweiten Schwangerschaftshälfte in die Epidermis ein.

Die Melanophoren der Fische, Amphibien und Reptilien sind im Gegensatz zu den beschriebenen sekretorischen M der Vögel und Säuger "kontinente" M: Die sternförmig verzweigten Melanophoren geben das Pigment nicht ab, sondern können es innerhalb der Zellen verschieben und dadurch raschen Farbwechsel erzeugen (Czihak et al 1978).

B. Langerhanszellen:

Sie bilden die zweite dendritische Zellpopulation in der Epidermis. Im Gegensatz zu den M sind sie jedoch suprabasal angeordnet. Sie machen ca. 3-6% der Epidermalzellen aus. Langerhanszellen sind nicht, wie K und M, ektodermaler Herkunft, sondern sie entstammen höchstwahrscheinlich dem Mesoderm (Stingl 1980). Sie kommen auch in der Dermis und in anderen Geweben vor. Die Expression spezifischer Zelloberflächenmarker, wie Ia-Antigene (Stingl et al 1978) und Rezeptoren für das Fc-Stück von Immunglobulinen und für die dritte Komponente (C3) des Komplementsystems (Stingl et al 1977), weist auf verwandtschaftliche Beziehungen zu den Makrophagen hin. Den Langerhanszellen kommt eine bedeutende Rolle bei epidermalen Immunreaktionen zu (Stingl 1980).

C. Merkel-Zellen:

Sie sind eine fast verschwindende Minderheit von epidermalen Zellen, gekennzeichnet durch den Besitz von elektronendichten kleinen Granula. Sie sind Sinneszellen (Mechanorezeptoren).

4. Melanozytäre Tumoren

A. Benigne melanozytäre Tumoren: Naevi pigmentosi (Pigmentmäler, "Muttermäler")

Diese Gruppe umfaßt eine ganze Reihe morphologisch verschiedenartiger, sehr häufiger Läsionen. Alle pigmentierten Naevi stellen umschriebene, begrenzte Vermehrungen von M dar, die allerdings teilweise die Charakteristika dieser Zellart eingebüßt haben und daher als "Naevuszellen" bezeichnet werden (Fritsch 1983).

B. Maligne melanozytäre Tumoren: das Melanom

Das Melanom ist einer der bösartigsten Tumoren des Menschen. Sein Auftreten ist weltweit im Ansteigen begriffen (MacKie und Hunter 1982).

Je nach dem Ausmaß der Dedifferenzierung der Melanomzellen (MZ) zeigt der Primärtumor ein charakteristisches Wachstumsverhalten, welches auch als Grundlage der Einteilung gilt. 2 Kriterien werden beurteilt (Fritsch 1983):

- Die Tendenz der malignen M, ihr angestammtes Biotop zu verlassen.
- Das zeitliche Verhältnis von horizontaler und vertikaler Wachstumsphase zueinander.

Die wenig dedifferenzierte, präinvasive Form, Lentigo maligna genannt, breitet sich lange Zeit nur flächenhaft in der Basalschicht aus und entspricht in ihrem Aussehen daher einem Fleck. Entstehen nach jahre- bis jahrzehntelangem Verlauf aggressive Melanomzellklone wird das natürliche Biotop verlassen und die Basallamina an einzelnen Stellen durchbrochen. Es entstehen Knoten innerhalb des Flecks (Lentigo maligna Melanom), die den Eintritt in die prognostisch ungünstige vertikale Wachstumsphase dokumentieren. Weniger gut differenzierte MZ wachsen von Anfang an nicht nur in der Basalschicht, sondern auch suprabasal und subepidermal. Die hauptsächlich horizontale Ausbreitung gibt diesem Melanom seinen Namen: superficial spreading melanoma. Völlig dedifferenzierte MZ zeigen keine Ähnlichkeit mehr zum Verhalten ihrer normalen Vorgänger, den M. Sie zeigen weder eine Tendenz zum horizontalen Wachstum noch zum Verbleiben in der Basalzone. Diese nodulären Melanome wuchern von Beginn an vertikal in die Dermis ein. Bald nach Eintritt in die vertikale Wachstumsphase kommt es zur Metastasierung. Metastasen treten sowohl in der Haut (cutan, subcutan) als auch an inneren Organen auf.

Neben den M der Haut können selten auch alle anderen M des Körpers maligne entarten. Das führt zu Schleimhautmelanomen, Melanomen des Auges und leptomeningealen Melanomen.

II. Biologie von Membranen (zellbiologischer Aspekt):

1. Aufbau biologischer Membranen

Alle Zellen sind von einer Plasmamembran, dem Plasmalemma umgeben. Diese Membran bildet die Grenzschichte, welche alle Interaktionen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung vermittelt. Im Zellinnern dient ein System von Membranen der Kompartimentierung von Reaktionsräumen (Mitochondrien, Lysosomen, Golgi-Apparat) sowie dem Stofftransport (Endoplasmatisches Reticulum). Plasmamembranen und intrazytoplasmatische Membranen entsprechen demselben Grundbauplan.

Der Membranaufbau kann anschaulich anhand der historischen Entwicklung der verschiedenen Membranmodelle dargestellt werden (Robertson 1981). Die Beschreibung der einzelnen Modelle ist stark vereinfacht.

- Ausgehend von der Beobachtung, daß Öltröpfchen sehr leicht in das Innere der Zelle eindringen, vermutete man schon sehr früh, daß der Hauptbestandteil der Membranen Lipid sein müsse (Overton 1899).
- Gorter und Grendel (1925) versuchten die molekulare Struktur der Lipidmembran zu ergründen. Sie extrahierten die Membranlipide einer genau bestimmten Anzahl von Erythrozyten und ließen sie auf einer Wasseroberfläche schwimmen. Der Lipidfilm nahm eine Fläche ein, die doppelt so groß war, wie die aufgrund der Zellzahl berechnete Gesamtoberfläche der Erythrozyten. Der Schluß daraus war: die Lipide in der Zellmembran sind in einer bimolekularen Doppelschichte angeordnet, bei der die polaren Gruppen der Lipide zur wässrigen Phase weisen, die apolaren Fettsäureketten ins Innere der Membran (siehe unten).
- Es war bekannt, daß neben den Lipiden auch Proteine einen mehr oder weniger großen Anteil an den Membranen haben. Für die räumliche Anordnung der beiden Komponenten entwarfen Danielli und Davson (1935) ein Modell, demzufolge die Lipiddoppelschichte wie in einem Sandwich außen und innen von einer Proteinschichte bedeckt ist.

- Mit dem Aufkommen der Elektronenmikroskopie in den Fünfzigerjahren wurde das typische trilaminäre Bild der Membran in verschiedensten tierischen und pflanzlichen Zellen gefunden. Robertson (1957) schloß auf eine gemeinsame Grundstruktur aller Membranen und prägte den Begriff der "Einheitsmembran" oder "unit membrane".
- Singer und Nicolson (1972) modifizierten dieses Modell zu der im wesentlichen heute gültigen Vorstellung. Ihr "Flüssig-Mosaik-Modell" ("fluid mosaic model") durchbrach die bislang gültige statische Betrachtungsweise. Die Lipiddoppelschichte ist nicht starr, sondern befindet sich in einem fluiden (flüssigen) Zustand: in dieser "schwimmen" die Membranproteine, teils aufgelagert (periphere Membranproteine), teils mehr oder weniger in die Doppelschichte eintauchend oder die ganze Doppelschichte durchmessend (integrale Membranproteine) (siehe Fig. 1). Auf diese Weise bilden sie eine mosaikähnliche Struktur aus. Diese Struktur ist nicht fixiert oder statisch, denn die Membranproteine sind lateral in der Ebene der Membran beweglich (Fryre-Edidin 1970, Taylor et al 1971, Edidin 1981).

Nach den heutigen Vorstellungen bestehen die Plasmamembranen somit aus folgenden 3 Gruppen von Bausteinen:

- Lipide: sie bilden, wie schon erwähnt, eine Doppelschichte ("lipid bilayer") aus, deren Moleküle mit ihren hydrophilen "Köpfen" nach außen und den hydrophoben Fettsäureketten ins Membraninnere angeordnet sind - ein energetisch sehr stabiler Zustand (Jungermann und Möhler 1980, Klima 1975). Hauptbestandteil sind Phospholipide, daneben auch Glykolipide (Glykosphingolipide: Ganglioside, Cerebroside) und Cholesterol.
- Proteine: sie werden je nach ihrer Lage in der Lipiddoppelschichte als integrale bzw. periphere Proteine bezeichnet (Fig. 1), vorwiegend handelt es sich um globuläre Proteine. Abhängig von Anzahl und Lage der hydrophoben Proteinanteile (Häufung von Valin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin) stecken sie mehr oder weniger tief in der flüssigen Lipidschicht. Das Gewichtsverhältnis von Lipiden zu Proteinen kann in biologischen Membranen sehr unterschiedlich sein. Der Proteinanteil reicht von nur 25% in den Myelinscheiden der Nerven bis zu 80% bei inneren Mitochondrienmembranen. In Zelloberflächenmembranen beträgt dieses Verhältnis im allgemeinen 2:1 zugunsten der Lipide.
- Kohlenhydrate.

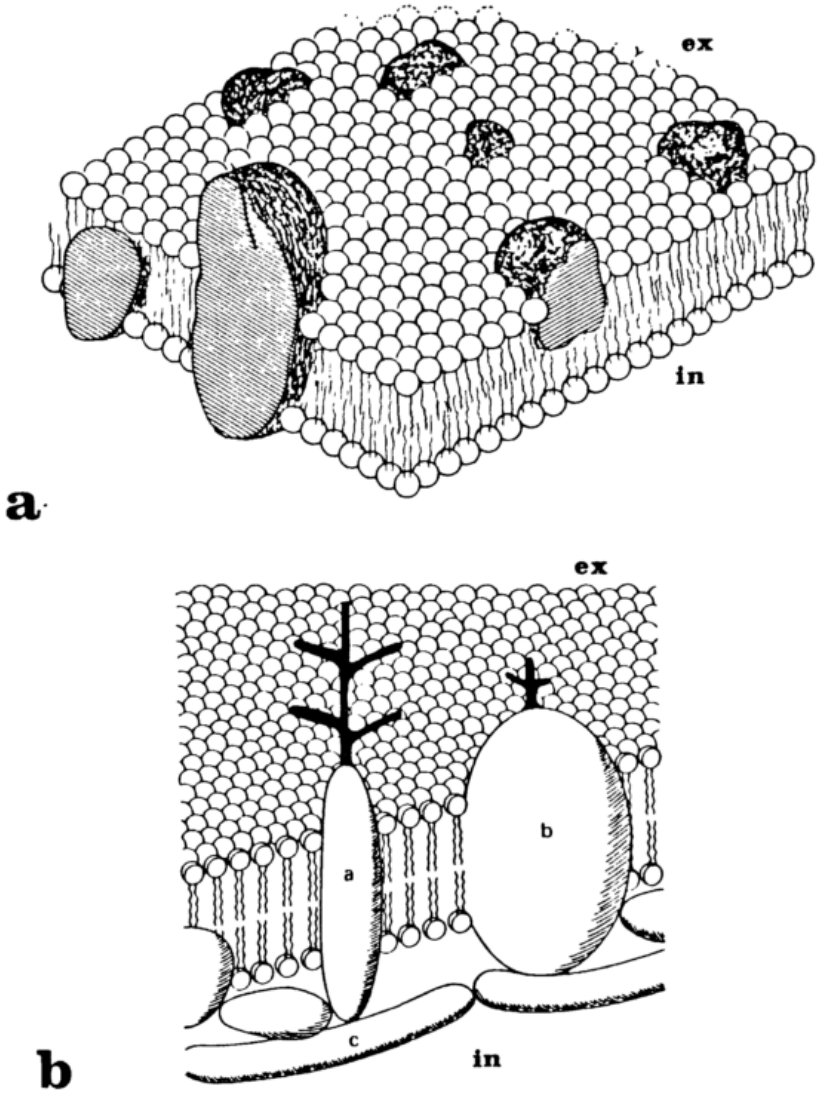

Fig. 1:

a) "Fluid-mosaic-model" der Membranstruktur nach Singer und Nicolson (1972). In der Phospholipid-Doppelschichte ( ) sind die Proteine (grau) unregelmäßig, mosaikartig angeordnet.

b) Ausschnitt aus der Erythrozytenmembran. Integrale Membranproteine (a,b), peripheres Membranprotein (c), Kohlenhydratketten schwarz. Aus Jungermann und Möhler (1980). Extrazelluläre Seite (ex), intrazelluläre Seite (in).

2. Kohlenhydratanteil biologischer Membranen:

Dieser mengenmäßig unbedeutende Anteil (bis zu 10% des Membrangewichtes; 8% bei Erythrozyten) ist hauptsächlich auf die Plasmamembranen und dort hauptsächlich auf die dem extrazellulären Milien zugewandte Seite beschränkt. Er bildet die die Zelle umhüllende Kohlenhydratschicht ("carbohydrate surface coat") aus. Sie ist in klassischer Ausprägung am Bürstensaum des Darmepithels elektronenmikroskopisch darstellbar (Ito 1965, Fawcett 1981). Bennett (1963) führte dafür den Begriff der "Glykokalyx" ein. Es handelt sich um Oligo- und Polysaccharidketten, die Bestandteil von Glykoproteinen, Glykolipiden und Proteoglykanen sind. Von über 150 Monosacchariden, die in der Natur vorkommen, sind für gewöhnlich nur 10 am Aufbau der Glykokalyx beteiligt (Sharon und Lis 1982, Gahmberg 1981) (Tab. 1). Diese 10 Bausteine werden verschieden kombiniert (Fig. 2): kurze unverzweigte Ketten (maximal 30-40 Zuckermoleküle) werden oft in neutralen Glykolipiden angetroffen, dagegen sind die Ganglioside häufig verzweigt (Gahmberg 1981, Hakomori 1981). Der Kohlenhydratanteil der Membranglykoproteine ist in der Regel eine verzweigte Kette, bestehend aus 5-30 Zuckermolekülen (Gahmberg 1981, Sharon und Lis 1982). Bei den zelloberflächengebundenen Proteoglykanen setzen sich die langen unverzweigten Polysaccharidketten aus sich maximal bis zu 3000 mal wiederholenden Disaccharideinheiten zusammen. Diese wiederum bestehen bei den sauren Mucopolysacchariden aus carboxylierten und/oder sulfatierten Monosacchariden (Lindahl und Höök 1978).

3. Funktion des Kohlenhydratanteils:

Kohlenhydratanteile von Proteinen und Lipiden beeinflussen unspezifisch deren physikochemische Eigenschaften, wie Hydrophobizität, elektrische Ladung, Empfindlichkeit gegenüber Enzymen (Sharon und Lis 1982, Olden 1982). Daneben gibt es sehr spezifische Funktionen der Zelloberflächenkohlenhydrate. Kohlenhydrate können, wie Aminosäuren und Nukleotide, eine große Zahl spezifischer Strukturen ausbilden und dienen deshalb als Träger biologischer Information. Zelloberflächenglykokonjugate sind bekannt als Rezeptoren für gewisse Viren (Paulson et al 1979), Bakterien (Ofek et al 1978), Hormone (Mullin et al 1976), Toxine (Cuatrecasas 1973, Holmgren et al 1975) und Antikörper

Monosaccharid	Glykoproteine	Glykolipide	Proteoglykane	Bemerkungen
D-Glukose	±	+	-	
D-Mannose	+	±	-	
D-Galaktose	+	+	+	
L-Fukose	+	+	-	
D-Xylose	-	-	+	
Sialinsäuren	+	+	-	hauptsächlich als N-Azetyl-Neuraminsre
D-Glukosamin	+	+	+	haupts. N-azetyliert
D-Galaktosamin	+	+	+	in Proteoglykanen auch sulfatiert
D-Glukuronsäure	-	-	+	
L-Iduronsäure	-	-	+	

Tab. 1:

Wichtigste Monosaccharide in Membranglykokonjugaten tierischer Zellen. Vorkommen häufig (+), selten (±); in der Regel fehlend (-).

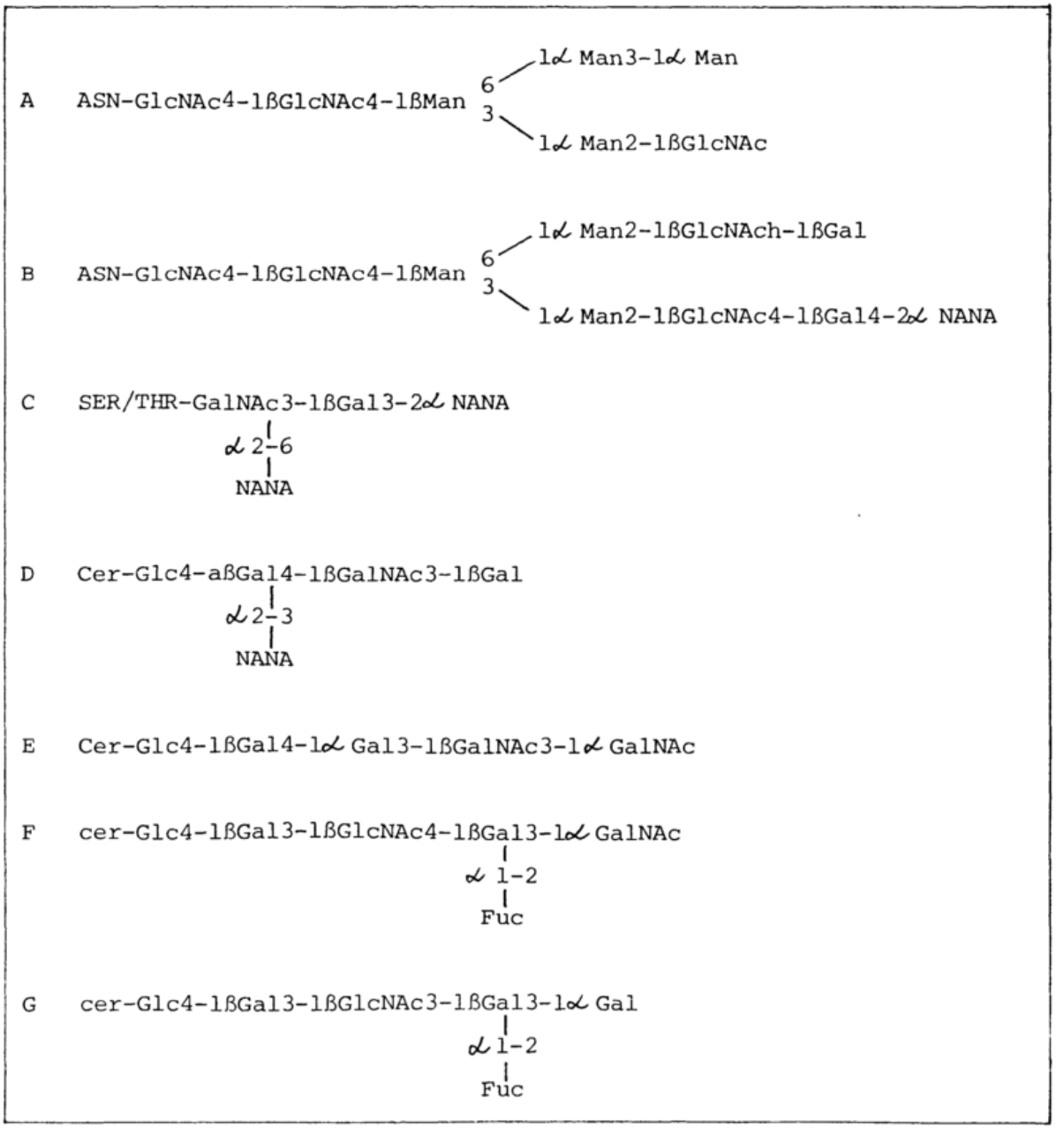

Fig. 2:

Beispiele für die Struktur des Kohlenhydratanteils von Glycoproteinen (A,B,C) und Glycolipiden (D-G). Mannosereiches Oligosaccharid (OS) aus bovinem Rhodopsin (A); komplexes OS des Fibronectins (B); OS des Glycophorin A (C); Ganglioside GM1 (D); niedermolekulares neutrales Glykolipid (E); humane Blutgruppendeterminanten A_1 (F) und B_1 (G). Asparagin (ASN), Serin (SER), Threonin (THR), N-acyl-sphingosin (cer). Nach Gahmberg (1981).

(Yeh et al 1982, Imai et al 1982). Als antigene Determinanten der Blutgruppen Antigene A und B auf Erythrozyten wurden Gal bzw. GalNAc tragende Kohlenhydratketten von Membranglykoproteinen und -lipiden nachgewiesen (Watkins 1972).

Vor allem spielt der "carbohydrate surface coat" eine Rolle im "sozialen Verhalten" von Zellen. Zellerkennungs-, Zelladhäsions- und Zellaggregationsprozesse müssen von Molekülen vermittel werden, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Da die beschriebenen Oligo- und Polysaccharidketten am weitesten in den extra- bzw. interzellulären Raum reichen, müssen sie als erste Kandidaten bei Zell-Zell oder Zell-Substrat-Kontakten angesehen werden (Wieser und Brunner 1982). Die Kombinationsmöglichkeiten der Monosaccharidbausteine zu verschiedensten Kettenstrukturen schafft die Voraussetzung für hochspezifische Erkennungsmechanismen im Sinne eines Schlüssel-Schloß-Prinzips (Gahmberg 1981, Weir 1981). Der "Kohlenhydratschlüssel" (Membranglykoprotein oder -lipid) der einen Zelle paßt genau in das "Proteinschloß" (spezifisch zuckerbindendes Membranprotein, "Membranlektin") auf dem Plasmalemma der anderen Zelle (Fig. 3).

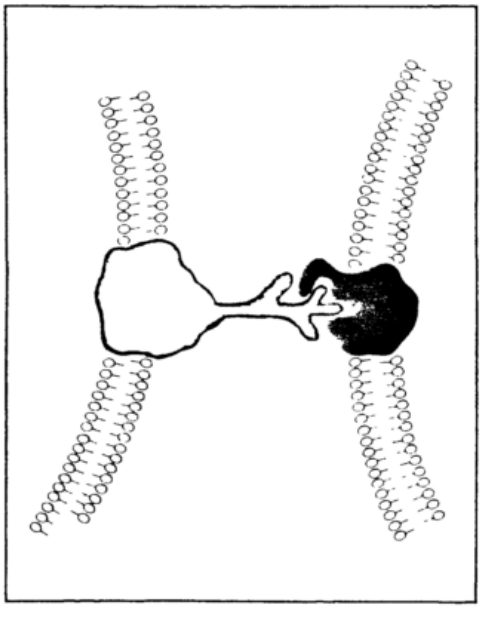

Fig. 3:
Spezifischer Zell-Zell-Kontakt nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip. Phospholipid-Doppelschichte ( ), Membranglykoprotein (weiß), zuckerbindendes Membranprotein = "Membranlektin" (schwarz).

Die Zellaggregation bei Schwämmen und Schleimpilzen beruht teilweise auf diesem Prinzip (Barondes 1982, Garrod und Nicol 1981, Frazier und Glaser 1979). In Säugern ist es für die Interaktion von Kupfferzellen der Leber ("Schloß": Asialoglycoproteinrezeptor) mit alten und veränderten Erythrozyten ("Schlüssel": Asialoglycoprotein) nachgewiesen worden (Kolb et al 1979, Schlepper-Schäfer et al 1980).

Alle Zellen sind an ihrer Oberfläche negativ geladen (Weiss 1969). Diese anionischen Stellen sind in erster Linie die Kohlenhydrate des Plasmalemmas. Von Stärke, topographischer Verteilung und Mobilität der Oberflächenladung wird das Verhalten von Zellen mitbestimmt (Sherbet 1978).

Bisher hat sich noch kein einheitliches Bild über die Funktion des Kohlenhydratanteils biologischer Membranen abgezeichnet (Gahmberg 1981). Aus der Vielzahl beschriebener Funktionen in den unterschiedlichsten Zellsystemen geht jedoch die entscheidende Bedeutung des "carbohydrate surface coat" bei wichtigen zellulären Interaktions- und Regulationsprozessen hervor. Aus diesem Grund ist für das Verständnis der zellulären Wechselwirkungen eine genaue Kenntnis über die Struktur der Oberflächenzucker notwendig.

III. Problemstellung

1. Ziel der Arbeit:

Ziel der Arbeit ist es, die strukturellen Grundlagen zweier spezifischer Phänomene in der Epidermis vom membranbiologischen Standpunkt aus experimentell zu untersuchen:

- Die physiologischen Interaktionen von K und M in der Epidermis im Zuge des Pigmenttransfers.
- Die pathologischen Interaktionen maligne entarteter MZ untereinander und mit ihrem Substrat bei der Entwicklung des Melanoms und seiner Metastasen.

2. Vergleich zwischen Melanozyten und Keratinozyten:

M und K liegen in der Basalschicht der Epidermis eng aneinander. Die M senden Dendriten aus, welche auf eine noch nicht eindeutig geklärten Weise das im M gebildete Pigment an die benachbarten K übergeben: es sind 3 Möglichkeiten des Prozesses denkbar (Garcia et al 1979).

- Das erste Modell nimmt an, daß der M die Melanosomen zuerst in den Interzellularraum entläßt, von wo sie von K durch Phagozytose aufgenommen werden. Wolff und Mitarbeiter haben ultrastrukturell nachgewiesen, daß K die Fähigkeit besitzen, Melanosomen oder ähnliche artifizielle Partikel (Latexkügelchen) zu phagozytieren (Wolff und Konrad 1972, Wolff 1973, Wolff et al 1974). Bei dieser Art des Pigmenttransfers wäre zu erwarten, daß man hin und wieder extrazelluläre freie Melanosomen antrifft. Das ist jedoch so gut wie nie der Fall.
- Das zweite Modell postuliert eine direkte "Injektion" der Melanosomen in den K. Dazu müssen für die Dauer des Vorgangs die Plasmamembranen von M und K fusionieren, um einen zytoplasmatischen Verbindungskanal herzustellen. Solche Fusionskanäle wurden in vitro (Cohen und Szabó 1968) und in vivo (Garcia et al 1979) gefunden.
- Dem dritten Modell zufolge werden die Dendritenspitzen der M vom K als ganzes inkorporiert. Die Melanosomen in K sind dann von 2 Membranen umgeben, der ursprünglichen M-Membran und der K-Membran. Dieses Phänomen der "Zytophagozytose" wurde dokumentiert (z.B. Cohen und Szabo 1968, Klaus 1969, Prunieras 1969). Neuere Untersuchungen mit ultrastruktureller Lanthanmarkierung des Interzellularraums haben jedoch gezeigt, daß die von Doppelmembranen begrenzten Melanosomen wahrscheinlich quergeschnittene Teile des M-Dendriten sind, die vollständig vom K eingehüllt, mit ihm aber nicht verbunden sind (Garcia et al 1979).

Welcher dieser 3 sich gegenseitig nicht ausschließenden Mechanismen in vivo angewendet wird ist nicht ganz klar. Die experimentellen Befunde sprechen an ehesten für das zweite Modell. Es muß aber in jedem Fall zu einem spezifischen Zellkontakt zwischen M und K kommen. Man kann annehmen, daß der Kohlenhydratanteil der Zellmembran beim Erkennungsvorgang eine wichtige Rolle spielt. Ein Schlüssel-Schloß-Mechanismus, wie in II.3. beschrieben, wäre theoretisch auch für die Interaktion von M-Dendriten mit K vorstellbar. Die Erhebung der Zelloberflächenglykokonjugate von M und K soll einen ersten Teilschritt zur Klärung dieses Problems bilden.

3. Vergleich zwischen normalen Melanozyten und Melanomzellen:

Die maligne entartete Form des M bildet einen der aggressivsten Tumoren des Menschen aus. Eines der Hauptziele der Tumorforschung ist es, Unterschiede

zwischen normalen und malignen Zellen herauszufinden. Etwaige signifikante Unterschiede können dazu dienen, Tumorzellen von normalen Zellen, oder aggressive Klone von weniger aggressiven Klonen auseinanderzuhalten. Das könnte in bestimmten Fällen für die Früherkennung bedeutsam sein. Neben diesem direkt verwertbaren Aspekten gibt es 2 grundlegende Fragen, an deren Klärung verschiedenste Gruppen aus verschiedensten Teilgebieten der Tumorbiologie arbeiten:

- Gibt es irgendwelche allgemeingültige strukturelle Veränderungen in der Zelle beim Übergang vom normalen in den malignen Zustand?
  Wie drückt sich das veränderte genetische Programm einer Tumorzelle strukturell, insbesondere auf der Ebene des Plasmalemmas, aus?
  Aus dem bekannten Verhalten in vivo und aus Beobachtungen in Gewebekultur nimmt man an, daß strukturelle Veränderungen im Bereich des Plasmalemmas von entscheidender Bedeutung sind: Zellen in Gewebekultur zeigen das Phänomen der Kontaktinhibition, d.h. die Zellen vermehren sich nur solange, bis sie aneinanderstoßen. Ist diese Dichte erreicht, so werden die Teilungen eingestellt. Tumorzellen hingegen zeigen dieses Verhalten nicht. Sie proliferieren unkontrolliert über die erwähnte Dichte hinaus. Die Kontaktinhibition in vitro beruht wahrscheinlich auf einer interzellulären molekularen Wechselwirkung von Membrankomponenten (Wieser und Brunner 1982, Frazier und Glaser 1979). Parallel zum Verlust der Kontaktinhibition wurden in vitro Veränderungen der Membranglykolipidmuster (Hakomori 1980, Hakomori 1981), der Membranglykoproteinmuster (Nicolson 1976, Warren et al 1978, Hynes et al 1979), sowie der Proteoglykanmuster (Alitalo und Vaheri 1982).

Die Untersuchungen dieser Arbeit gehen auch dieser Frage nach. Im Gegensatz zu fast allen bisherigen Arbeiten auf Melanomgebiet wird hier ein Untersuchungssystem verwendet, welches einen direkten Vergleich von normalen und maligne entarteten Zellen zuläßt (siehe Material und Methoden).

- Die zweite tumorbiologisch entscheidende Frage ist nach der Entstehung von Metastasen. Bei diesem Prozeß lösen sich aus dem primären Tumor Zellen ab und werden über Blut und Lymphe im ganzen Körper verstreut (Fidler et al 1978, Nicolson 1982). Die Entscheidung ob und wo diese abgesonderten Zellen sich niederlassen, hängt von der Fähigkeit der Zellen zur Substratadhäsion

ab (Nicolson und Winkelhake 1975, Fogel et al 1983). Diese Fähigkeit ist eine Funktion der Zellmembraneigenschaften. Beispielsweise kann durch die Art der Ladungsverteilung auf Zelloberflächen die Substratadhäsion unspezifisch beeinflußt werden (Sherbet 1978). Auch spezifische Adhäsionsmechanismen zwischen bestimmten Oberflächenkohlenhydraten und Kohlenhydrat-bindenden Proteinen oder Rezeptoren am Substrat sind denkbar. Ein solches Verhalten wurde für Tumorzellinien in vitro beschrieben (Brunner et al 1982).

Die erwähnten Membraneigenschaften, Ladungsverteilung, Oberflächenkohlenhydrate, werden in dieser Arbeit im Vergleich zwischen Zellen von primären Melanomen und Metastasen untersucht.

- Ein drittes Forschungsgebiet, welches vor allem in der letzten Zeit stark in den Vordergrund tritt, ist die Tumorimmunologie (Ferrone und Reisfeld 1982, Houghton et al 1981, Old 1981). Wie reagiert das Immunsystem auf maligne Zellen? Besitzen neoplastische Zellen spezifische, ausschließlich dem malignen Zustand zukommende Antigene auf der Zelloberfläche, welche dem körpereigenen Immunsystem als Angriffspunkt dienen können? Dieses sich mit sehr spezifischen Zelloberflächeneigenschaften beschäftigende Gebiet wird in dieser Arbeit nicht behandelt.

4. Konkrete Fragestellung und prinzipieller Versuchsansatz:

Entsprechend dem vorher geschilderten können 3 Kategorien von Zelloberflächenstrukturen mit 3 Klassen von zytochemischen Markierungssubstanzen untersucht werden (Temmink 1979).

- An Anionische, negativ geladene Stellen, binden kationische, positiv geladene Markermoleküle, wie kationisiertes Ferritin, kolloidales Eisen oder Rutheniumrot (vgl. Material und Methoden II.1.) auf relativ unspezifische Weise. Diese Marker sind im Elektronenmikroskop direkt sichtbar.
- Die verschiedenen Kohlenhydrate werden mit Lektinen nachgewiesen. Lektine sind Proteine mit der Fähigkeit, bestimmte Mono- oder Oligosaccharide spezifisch zu binden (Goldstein und Hayes 1978, Lis und Sharon 1981). Dadurch dienen sie als geeignetes Instrumentarium zur Untersuchung von Kohlenhydratdeterminanten (Sharon und Lis 1975, Roth 1978, Monsigny et al 1978). In

Verbindung mit fluoreszenz- oder elektronenmikroskopisch sichtbaren Markierungssubstanzen können so verschiedene Oberflächenzucker erkannt werden (vgl. Material und Methoden II).

- Genau definierte Zelloberflächenmoleküle werden als antigene Determinanten von gegen sie gerichteten Antikörpern erkannt. Diese Bindung ist höchst spezifisch. Zelloberflächen können so biochemisch genau charakterisiert, bei Verwendung von monoclonalen Antikörpern förmlich "seziert" (Mitchell et al 1980) werden.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden Methoden aus den beiden ersteren Kategorien gewählt. Folgende konkrete Fragestellungen sollten damit behandelt werden.

- Untersuchung der Zusammensetzung der Zelloberflächenkohlenhydrate von Pigmentzellen. Mehrere vergleichende Aspekte wurden diesbezüglich berücksichtigt:
  Vergleich zwischen M und K,
  Vergleich zwischen M und MZ,
  Vergleich zwischen Mensch und Meerschweinchen.
  Diese Frage wurde durch Einsatz von Lektinen bearbeitet.
- Untersuchung der Verteilung von anionischen Stellen auf der Zelloberfläche von Pigmentzellen. Dieselben vergleichenden Aspekte wie für die Untersuchung der Oberflächenzucker wurden berücksichtigt. Neben der inhärenten topographischen Verteilung wurde auch die dynamische Umverteilung als Funktion von Zeit und Temperatur studiert. Als negativ geladener zytochemischer Marker wurde das kationisierte Ferritin (Danon et al 1972) verwendet.

Alle Untersuchungen werden an Zellkulturen von humanen und Meerschweinchenepidermalzellen und von humanen Melanomzellen durchgeführt (siehe Material und Methoden).