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

Diskussion

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

DISKUSSION

I. Lektine - strukturelle Aspekte:

Aus den Ergebnissen der Lektinexperimente kristallisieren sich 3 grundsätzliche Befunde heraus.

1. Zwischen den Lektinbindungsprofilen der Epidermalzellen von Mensch und Meerschweinchen bestehen nur geringfügige Unterschiede:
   Nur das L-Fuc spezifische UEA I zeigte ein differenzielles Verhalten. Es band an die Zelloberfläche von humanen, nicht aber von Meerschweinchen-K.

2. M und K besitzen bezüglich der D-Gal und GalNAc spezifische Lektine verschiedene Lektinbindungsprofile:
   Diese Zuckerreste sind bei M, im Gegensatz zu K, von Sialinsäure maskiert.

3. Die Lektinbindungsprofile von normalen M und malignen MZ unterscheiden sich nicht:
   Diese Einheitlichkeit blieb sowohl über das breite Spektrum der untersuchten MZ als auch zwischen morphologisch unterschiedlichen Klonen einer Kultur absolut konstant.

Das im Folgenden detailliert diskutierte Lektinbindungsmuster von M - MZ wird durch 3 Eigenschaften charakterisiert:

1. Die Bindung der Lektine, die spezifisch für D-Glc, D-Man, GlcNAc und Sialinsäure sind;
2. Keine Bindung des L-Fuc-spezifischen Lektins und
3. Maskierung der D-Gal- und GalNAc-Reste durch Sialinsäure.

Zu 1:

Die Bindung von ConA, Succ.ConA, LCA und PSA zeigt, daß D-Glc und/oder D-Man auf den Zelloberflächen der M/MZ und der K vorhanden ist. Mit den angewendeten Methoden kann jedoch weder zwischen einer Bindung des Lektins ans D-Glc und D-Man noch an Glykolipide oder an Glykoproteine unterschieden werden. Dennoch werden die möglichen Bindungsstellen für die Lektine auf dem Plasmalemma beschrieben, welche in summa die beobachteten Phänomene ergaben.

D-Glc kommt in den meisten Membranglykolipiden vor. Der Zucker ist direkt an das Lipid (N-acyl-Sphingosin = Ceramid) als erstes Glied der Oligosaccharidkette gekoppelt. Die Kette wird durch wenige (Cerebrosid) oder mehrere (Gangliosid) D-Gal-, GalNAc- und Sialinsäuremoleküle verlängert und/oder verzweigt (Gahmberg 1981, Hakomori 1981). In Glykoproteinen wird D-Glc nur selten gefunden (Sharon und Lis 1982).

D-Man bildet zusammen mit GlcNAc die Kernstruktur aller N-glykosidisch mit Asparagin verbundenen Kohlenhydratanteile von Membranglykoproteinen. Die Mannosemoleküle können mehr oder weniger verzweigte Ketten von gewöhnlich 6-12 Molekülen bilden. D-Man kann endständig sein oder aber die Kette wird von D-Gal, GalNAc, GlcNAc und Sialinsäure verlängert (Gahmberg 1981, Sharon und Lis 1982). Die erwähnten Lektine vermögen sowohl die intern in der Kette lokalisierten, als auch die terminalen Zuckereinheiten zu erkennen (Goldstein und Hayes 1978). Membranglykolipide besitzen in der Regel kein D-Man (Hakomori 1981).

GlcNAc-Reste werden durch WGA und Succ.WGA angezeigt. WGA erkennt GlcNAc und zusätzlich Sialinsäure (Bhavanandan und Katlic 1979); Succ.WGA hingegen ist ausschließlich für GlcNAc spezifisch (Monsigny et al 1979b).Beide Lektine binden sowohl an interne als auch an terminale GlcNAc-Reste (Goldstein und Hayes 1978). GlcNAc, N-glykosidisch mit Asparagin verbunden, baut zusammen mit einem weiteren Molekül-GlcNAc und 3 Molekülen D-Man, wie bereits erwähnt, das Pentasaccharid (Kernstruktur) dieser Klasse von Membranglykoproteinen auf (Sharon und Lis 1982). Auch in anderen Klassen von Membranglykoproteinen und in Glykolipiden (Hakomori 1981) kommt GlcNAc vor. Mit den meisten Polysacchariden der Proteoglykane reagiert WGA nicht. Lediglich von Keratan und Keratansulfat, bestehend aus sechs- bis neunmal sich wiederholenden Gal-GlcNAc Einheiten, wurde Lektinbindung beschrieben (Carlsson et al 1976, Toda et al 1981).

Die Stellung der GlcNAc-Moleküle in den Oligosaccharidketten wurde mit Hilfe von fein zwischen intern und terminal diskriminierenden, GlcNAc spezifischen Lektinen bestimmt. Diese Versuche wurden nur im Humansystem durchgeführt. WGA und Succ.WGA, spezifisch für intern und terminal waren positiv. GSA II, spezifisch für terminales GlcNAc (Stanley et al 1979), war an M/MZ und K negativ. STA, vorwiegend spezifisch für intern stehende GlcNAc (Goldstein und Hayes 1978) war an

M/MZ und K schwach positiv. Daraus kann geschlossen werden, daß dieser Zucker immer im Inneren einer Oligosaccharidkette lokalisiert ist.

Die Befunde mit den eben beschriebenen Lektinen stehen im Einklang mit Ergebnissen aus Fluoreszenz-Lektinbindungsstudien an epidermalen Zellsuspensionen vom Meerschweinchen: K und Langerhanszellen waren für die genannten Lektine reaktiv (Schuler et al 1983). Bestätigend sind auch Befunde an Epidermalzellen, die mit anderen Methoden, wie z.B. autoradiographisch (King et al 1980, Davies und Trotter 1981), fluorimetrisch (Gommans und van den Hurk 1981), sowie fluoreszenzmikroskopisch an Gewebeschnitten (Holt et al 1979, Nemanic und Elias 1979, Nieland 1973) erhoben wurden.

M/MZ und K unterscheiden sich somit bezüglich der beschriebenen Lektine nicht von der überwältigenden Mehrzahl aller bisher untersuchten Zellen. Mögliche quantitative Unterschiede zwischen M und MZ, wie für andere normal/maligne Zellsysteme beschrieben (Nicolson 1980), konnten mit den verwendeten Methoden nicht festgestellt werden.

Zu 2:

L-Fuc kommt auf Säugerzellen, in Glykoproteinen und Glykolipiden vor (Sharon und Lis 1982, Hakomori 1981). Es steht immer am Ende einer Oligosaccharidkette oder einer Seitenkette davon (Gahmberg 1981). Die Proteoglykane der Glykokalyx enthalten keine Fukose.

Das Fehlen von UEA I-bindenden Fukoseresten auf den K von Meerschweinchen stimmt mit eigenen Befunden an epidermalen Zellsuspensionen von Meerschweinchen überein: K und Langerhanszellen waren für UEA I negativ (Schuler et al 1983). Die gleiche Eigenschaft zeigten auch eine Reihe weiterer Zelltypen, wie z.B. Thymozyten von der Maus (Fowlkes et al 1980), embryonale und adulte Pankreaszellen von der Ratte (Maylié-Pfenninger und Jamieson 1979 und 1980) und eine Nierenzellinie vom Hamster (BHK-Zellen = baby hamster kidney cells) (Oppenheimer-Marks und Grinell 1981). Eigene Beobachtungen an Kontrollkulturen von BHK-Zellen, humanen und murinen Fibroblasten bestätigen dies. Da Neuraminidasevorbehandlung zu keiner Änderung des Bindungsmusters führte, kann eine Maskierung von L-Fuc durch Sialinsäure ausgeschlossen werden. Die Aktivität der UEA I-Konjugate

stellte sich in Kontrollexperimenten mit Erythrozyten der Blutgruppe 0 bezüglich Agglutinationsfähigkeit und Fluoreszenzstärke als nicht beeinträchtigt heraus. Daher könnte das Fehlen der UEA I-Bindung an M und K vom Meerschweinchen, sowie an M/MZ vom Menschen als Fehlen von L-Fuc auf der Zellmembran interpretiert werden. Dagegen sprechen jedoch einige Arbeiten, die mit radioaktiven Markierungsmethoden sehr wohl L-Fuc nachweisen konnten: Brysk und Snider (1982) fanden, daß ^{125}J-gelabeltes UEA I nicht an kultivierte Ratten-K band; wurden die gleichen Zellen jedoch in Gegenwart von L-(^{3}H)-Fuc kultiviert, so wurde der radioaktive Zucker in die Zellmembran eingebaut. Letzteres Phänomen wurde auch für Epidermalzellen vom Schwein beschrieben (King et al 1980). UEA I-Labeling an Gefrierschnitten von Meerschweinchenepidermis zeigte deutliche Bindung in den suprabasalen Schichten der Epidermis. Es ist somit wahrscheinlich, daß L-Fuc-Reste entweder in durch Lektinlabeling unentdeckbar geringen Mengen vorkommen (Maylié-Pfenninger und Jamieson 1979, Oppenheimer-Marks und Grinnell 1981) oder, daß sie durch benachbarte Oligo- oder Polysaccharidketten für das Lektin unzugänglich werden (Goldstein und Hayes 1978). Die im Schnitt positiven suprabasalen Zellen (d.h. K und Langerhanszellen) treten im Gewebekultursystem nicht in Erscheinung, weil in vitro nur die höchst vitalen Zellen der Basalschichte anhaften und wachsen (Chung et al 1982). Somit könnte beim Meerschweinchen das UEA I als Differenzierungsmerkmal zwischen basalen und suprabasalen K dienen, ähnlich wie es für die Rattenepidermis angedeutet wurde (Brabec et al 1980, Zieske und Bernstein 1982).

An humanen K wurde L-Fuc mit verschiedenen Methoden nachgewiesen: Mann et al (1980) zeigten, daß L-Fuc in allen lebenden Schichten der Epidermis, also auch in der Basalschicht vorkommt. Gommans und Van den Hurk (1981) bestimmten L-Fuc fluorimetrisch an Zellsuspensionen. Auf den Zelloberflächen von krankhaft veränderten K bei Psoriasis ist dieser Zucker deutlich vermindert (King et al 1981).

Das Fehlen von UEA I-Bindung an allen untersuchten melanozytären Zellen ist im Einklang mit Berichten von B 16 Mausmelanomzellen (Raz et al 1980a). Andererseits konnte, wie bei K, mit Hilfe metabolischer Markierungsverfahren L-(^{3}H)-Fuc in den Zelloberflächenmembranen von humanen M entdeckt werden (Mann et al 1980). In allen anderen oben erwähnten Studien wurden M nicht untersucht.

Auf den Zelloberflächen melanozytärer Zellen von Mensch und Meerschweinchen konnte mit UEA I keine L-Fuc nachgewiesen werden. Dennoch ist die Gegenwart von möglicherweise nur sehr geringen Mengen dieses Zuckers nicht auszuschließen. Dafür spricht auch, daß die auf allen kernhaltigen Zellen des Menschen, also auch auf M, vorkommenden HLA-Antigene u.a. L-Fuc enthalten (Terhorst et al 1976, Parham et al 1977). Die Fucosereste sind offensichtlich durch andere Oligosaccharidketten vor dem "Zugriff" des Lektins geschützt.

Zu 3:
Der wohl interessanteste Befund ist die offensichtliche Maskierung von D-Gal und GalNAc-Resten auf den Zelloberflächen von M/MZ.

An unbehandelte M/MZ band weder das für die ß-anomere Konfiguration des GalNAc-spezifische Lektin SJA, noch die für das α-anomere GalNAc-spezifischen Lektine HPA und DBA. SBA, ebenfalls nicht bindend, erkennt sowohl die α- als auch die ß-Form des GalNAc (Goldstein und Hayes 1978). Dieser Zucker kommt in Glykoproteinen hauptsächlich O-glykosidisch an Serin bzw. Threonin gebunden (Sharon und Lis 1980) und in Glykolipiden innerhalb oder am Ende der Oligosaccharidkette (Gahmberg 1981) vor.

Die D-Gal-spezifischen Lektine zeigten ein differenzierteres Bindungsverhalten. GSA I und RCA I und II, spezifisch für beide Anomere der D-Gal banden an M/MZ. Die Lektine binden bevorzugt, aber nicht ausschließlich, terminale D-Gal-Reste (Goldstein und Hayes 1978). Dagegen ist die Spezifität des PNA, eines der am besten charakterisierten Lektine, sehr genau umschrieben: das Lektin erkennt ausschließlich terminale, nicht reduzierende ß-D-Gal, vorzugsweise ß-glykosidisch an GalNAc gebunden (Lotan et al 1975). ß-D-Gal findet man häufig in allen Klassen von Membranglykoproteinen und -glykolipiden. Das Disaccharid (D-Gal-ß1-3GalNAc) wird vorwiegend in den O-glykosidisch gebundenen Glykoproteinen und in den Gangliosiden angetroffen. Besonders in der letzteren Gruppe (Gahmberg 1981), aber auch in Glykoproteinen werden D-Gal und GalNAc oft von Sialinsäure gefolgt (Rauvala und Finne 1979). GSA I und die beiden Rizinus-Lektine vermögen offensichtlich auch die subterminal stehenden Zuckerreste zu binden. Das Fehlen von PNA-Bindung an M/MZ kann nur als Fehlen von endständigen, frei für das Lektin zugänglichen ß-D-Gal-Resten interpretiert werden. K hingegen haben in Bezug auf diese Gruppe von Oberflächenzucker eine unterschiedliche Struktur ihres "carbohydrate surface coat".

Maskierungsphänomen beispielsweise bei Makrophagen (Goldmann et al 1976), Neuronen (Pfenninger und Maylié-Pfenninger 1981), Pankreaszellen (Maylié-Pfenninger und Jamieson 1979 und 1980), Endothelzellen (Simionescu et al 1982) und an Gewebsschnitten von menschlichen Skelettmuskeln (Pena et al 1981) nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigten die Lektinexperimente deutliche Unterschiede zwischen M/MZ und K in der Architektur der Glykokalyx. Ob die Verschiedenheiten im Glykolipid-, Glykoprotein- oder Proteoglykananteil lokalisiert sind, konnte mit den angewendeten Methoden nicht geklärt werden. Lektinlabeling nach Vorbehandlung mit einer Palette von Enzymen könnte viele noch offene Fragen beantworten. Proteasen mit einer breiten Substratspezifität, wie z.B. Papain oder Pronase, verdauen den Großteil der Membran(glyko)proteine. Die eventuell noch vorhandene Restmarkierung kann dann dem Lipidanteil zugeschrieben werden. Umgekehrt können die Lipide der Membran mit geeigneten Lösungsmitteln (Chloroform-Methanol) extrahiert werden, sodaß ein Gerüst aus Membran(glyko)proteinen übrig bleibt. Schließlich können mit Hilfe hochspezifischer Exo- und Endoglykosidasen (Galaktosidase, Fukoidase etc.) einerseits die Feinstruktur der Glykoprotein- und Glykolipidanteile weiter erkundet werden, andererseits die langkettigen Proteoglykane der Glykokalyx untersucht werden: verschiedene Chondroitinasen, Heparinase, Heparitinase, Hyaluronidase, Glukuronidase u.a. spalten ganz bestimmte Stellen der Proteoglykane. Je nach Veränderung der Lektinmarkierung kann auf das Vorhandensein und die Struktur von Proteoglykanen geschlossen werden (Fritsch et al 1975). Für die Aussagekraft solcher Versuche ist jedoch entscheidend, daß die verwendeten Glykosidasen frei von Proteasen sind, was bei den derzeit kommerziell erhältlichen Präparaten nicht immer gewährleistet ist (Simionescu et al 1981b). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung nicht weiter bearbeitet.

Der Vergleich der normalen M mit MZ erbrachte keine Unterschiede in der Lektinbindung. Das bedeutet nicht zwangsläufig das Fehlen von Veränderungen der Glykokalyx im Zuge der malignen Transformation. Kleine Veränderungen, sowie Verschiebungen in den Proportionen einzelner Membrankomponenten konnten mit den verwendeten Methoden nicht erfaßt werden. Die topographische Verteilung von Glykokonjugaten auf dem Plasmalemma, analog den Untersuchungen mit kationisiertem Ferritin, kann mit enzymgekoppelten Lektinen nicht studiert werden (Williams 1977). Dazu sind partikuläre Marker erforderlich, wie z.B. kolloidales Gold (Horisberger 1979) oder Ferritin (Nicolson und Singer 1974). Sie können genau lokalisiert und quantifiziert werden (Hixson et al 1979, Pfenninger und Maylié-Pfenninger 1981).

In etlichen Vorversuchen getestete ConA-Ferritin und SBA-Ferritin Konjugate waren jedesmal inaktiv. Deshalb wurden diese Experimente nicht weitergeführt.

Trotz dieser Vorbehalte kann aber mit Sicherheit festgestellt werden, daß es im Zuge der malignen Transformation zu keinen großen Veränderungen in der Struktur der Glykokalyx kommt. Die beobachteten Lektinbindungsmuster scheinen ein universelles Kennzeichen melanozytärer Zellen zu sein.

II. Kationisiertes Ferritin - strukturelle Aspekte:

Die Markierungsversuche mit CF erbrachten 2 grundsätzliche Befunde:

- M und K unterscheiden sich in der Verteilung und Umverteilung der negativ geladenen Zelloberflächenkomponenten.
  Diese waren bei M unter allen Versuchsbedingungen diffus über die ganze Zelloberfläche verteilt. Bei K lagen die anionischen Komponenten in Aggregaten beisammen und veränderten sich als Funktion von Zeit und Temperatur.
- Im Gegensatz zu den Lektinstudien zeigten sich zwischen M und MZ ein Unterschied. MZ tendieren dazu, das außergewöhnlich konstante CF-Bindungsmuster ihrer normalen Vorfahren zu verlieren.

Die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität ergab eine negative Nettoladung an der Oberfläche aller bisher untersuchten Vertebratenzellen (Weiss 1969). Sie setzt sich zu mehr als 90% aus negativ geladenen Komponenten zusammen (Mehrishi 1972). Der Rest sind positiv geladene Aminogruppen der Proteine und Aminozucker (Burry und Wood 1979). Als Träger der negativen Ladung und damit als Bindungsstellen für CF kommen mehrere Molekülgruppen in Frage, in erster Linie die Sialinsäuren der Glykoproteine und Ganglioside (Sherbet 1978, Lloyd 1975). Weitere Bindungsstellen sind die Carboxylgruppen der Asparaginsäure und Glutaminsäure von Membranproteinen (Weiss 1969), die Sulfate und Carboxylgruppen der Polysaccharide der Glykokalyx (Simionescu et al 1981b) und möglicherweise auch saure Phospholipide (Burry und Wood 1979). Manche Zelltypen besitzen zusätzlich noch auf der Zelloberfläche gebundene RNA (Mayhew und Weiss 1981). Fine Charakterisierung der CF-Bindungsstellen auf M/MZ und K kann nur in groben Zügen vorgenommen werden. Neuraminidase-Vorbehandlung reduzierte den CF-Label auf M und K beträchtlich. Daraus kann geschlossen werden, daß die anionischen Stellen zu großen Teilen Sialinsäure-hältige Glykoproteine oder -lipide sind. Fritsch et al (1975)

stellten die Glykokalyx von K mit Hilfe von Rutheniumrot (RR) dar. Dieser ultrastrukturelle Marker erkennt, ähnlich wie CF, anionische Stellen auf der Zellmembran (Luft 1971). Kultivierte Meerschweinchen-K besitzen eine Glykokalyx, die durch Neuraminidase fast völlig entfernt wurde, analog den Resultaten dieser Arbeit. Hyaluronidase führte zu einer teilweisen Umlagerung der Glykokalyx, während Trypsin und Phospholipase C ohne Auswirkungen auf die RR-Markierung blieben. Im Lichte einer möglichen Proteasekontamination der gegenwärtig erhältlichen Glykosaminoglykan-degradierenden Enzyme (Simionescu et al 1981b) kann die Hyaluronidasewirkung nicht schlüssig interpretiert werden. Das Fehlen von Phospholipase C-Wirkung deutet an, daß die von RR erkannten negativen Molekülgruppen hauptsächlich auf Glykoproteinen und/oder Proteoglykanen lokalisiert sind. Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß die negativen Bindungsstellen wahrscheinlich großteils Sialoglykoproteine sind. Ob und in welchem Ausmaß die Proteoglykane mitbeteiligt sind kann nicht entschieden werden.

Deutliche Unterschiede der Glykokalyces von Meerschweinchen M und K wurden erstmals von Schuler et al (1981) mit Rutheniumrot (RR) und CF nachgewiesen. Ähnlich dem CF zeigten die RR-Ablagerungen auf K ein diffuses, etwas ausgefranstes ("fuzzy") Bild mit globulären Anteilen, während M dünn, bandartig diffus gelabelt waren. Die CF-Muster entsprachen den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen.

Obwohl das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung viabler Zellen lag, wurden doch einige Ansätze mit vorfixierten K und M mitgeführt. Die Vorfixierung schien das CF-Muster der K zu "glätten", d.h. es dem M-Muster ähnlicher zu machen. Dieser Einfluß der Glutaraldehydfixierung auf die Verteilung von Oberflächenladungen wurde mehrfach beschrieben (Marikovsky et al 1974, Skutelsky und Hardy 1976, Burry und Wood 1979). Grinnell et al (1976) demonstrierten anschaulich einen ähnlichen "Glättungseffekt" an kultivierten humanen Hautfibroblasten: kleine CF-Aggregate getrennt durch Strecken Label-freier Plasmamembranen vor Glutaraldehydfixation; diffuse Verteilung des CF über die gesamte Plasmamembran nach Glutaraldehydfixation.

Das CF-Muster, das bei 4°C oder bei sehr kurzen Inkubationen gefunden wurde, entspricht höchstwahrscheinlich der "inhärenten" (Borysenko und Woods 1979), ursprünglichen Anordnung der negativen Oberflächenladungen. Ein gewisses Ausmaß

an Umverteilung und Membranveränderungen durch Phasenübergänge in der Lipidschicht kann bei der Abkühlung der Zellen nicht völlig ausgeschlossen werden (Höchli und Hackenbrock 1976, Wunderlich et al 1978). Das diffus einschichtige Muster der M und dessen Konstanz unter verschiedensten Versuchsbedingungen steht im Gegensatz zu den meisten gleichartigen Untersuchungen bisher. Eine inhärente Verteilung in Clusters und regelmäßig gelabelte Membranabschnitte, unterbrochen von CF-freien Bereichen, wurde z.B. für BHK-Zellen (Grinnell et al 1975), humane Hautfibroblasten (Grinnell et al 1976), Mausfibroblasten (Borysenko und Woods 1979) und Endothelzellen von Meerschweinchen (Skutelsky und Danon 1976) und Maus (Simionescu 1981a) beschrieben. Bei diesen Zellen und weiters bei Rattenlymphozyten und Hamsterfibroblasten (Marikovsky et al 1974), Mausmakrophagen (Skutelsky und Hardy 1976), Hepatomzellen von Ratten (Moller und Chang 1978, Leak 1982) kommt es bei längeren Inkubationszeiten zu einer Umverteilung des CF in Form von größeren Clustern, die endozytotisch aufgenommen werden. Auch "shedding" von CF wurde beobachtet. Diese Phänomene wurden bei K nach 5 bzw. 20 Minuten CF-Inkubation bei 37°C ebenfalls beobachtet. Somit entsprechen die K eher dem allgemein vorherrschenden Muster, sowohl bezüglich der inhärenten Verteilung als auch bezüglich der Umverteilung. Die M haben eine Sonderstellung inne.

Die Interaktion zwischen Plasmamembranen und dem Zytoskelett (Mikrotubuli, Mikro- bzw. Actinfilamente, intermediäre Filamente) sind weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß die laterale Beweglichkeit von Membranproteinen von Elementen des Zytoskeletts behindert wird (Edidin 1981). Die Zytoskelett-zerstörenden Substanzen Colchizin, Cytochalasin B und Colcemid schalten einen möglichen Einfluß dieser Strukturen auf das Plasmalemma aus. Das CF-Verteilungsmuster auf M veränderte sich nach Inkubation mit den 3 Substanzen nicht. Das läßt darauf schließen, daß die Immobilität der negativ geladenen Membrankomponenten nicht zytoskelettbedingt ist. Mit der gleichen Methode wurde auch auf anderen Zelltypen die Unabhängigkeit des CF-Musters vom Zytoskelett gezeigt (Grinnell et al 1975, Borysenko und Woods 1979, Thyberg 1980).

Die Umverteilung der Markermoleküle wird durch Quervernetzen der negativen Membrankomponenten durch das Polykation CF herbeigeführt (Grinnell et al 1976, Borysenko und Woods 1979, Skutelsky und Danon 1976). Ähnliche Umverteilungsphänomene werden durch Antikörper (Taylor et al 1971) oder Lektine (Yahara und Edelmann 1975) vermittelt. Die Dimension der Umverteilung kann als Maß für die

Membranfluidität dienen. Nach dem Membranmodell von Singer und Nicolson (1972) sind die Membranproteine sowie auch die Membranlipide in der Ebene der Membran lateral beweglich (Edidin 1981). Aufgrund der präsentierten Resultate scheinen die M im Vergleich mit K eine niedrigere Membranfluidität, d.h. eine steifere Zellmembran, zu besitzen.

Als Parameter für die Membranfluidität kann die laterale Beweglichkeit von Membranlipiden und/oder -proteinen mit Hilfe der "fluorescence photobleaching recovery"-Technik (FPR) gemessen werden (Jacobson et al 1983, Edidin 1981, Gall und Edelman 1981, Cherry 1979, Axelrod et al 1976). Dabei werden die Zellen in situ mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt, welcher entweder an Membranproteine (z.B. FITC oder TRITC gekoppelte Antikörper) oder an Membranlipide (z.B. diI: 3,3'-Dioctadecylindocarbocyanin-jodid) bindet. Die Fluoreszenz wird auf einem kleinen Fleck (Radius ca. 1µm) auf der Plasmamembran durch einen kurzen Blitz eines enggebündelten Laserstrahles irreversibel ausgebleicht ("photobleaching"). Die Wiederherstellung der Fluoreszenz ("recovery") an dieser Stelle beruht daher auf der lateralen Diffusion von ungebleichten Fluorophoren in den Fleck. Der Zeitverlauf der "recovery" wird in einem Photomultiplier gemessen und es können laterale Diffusionskoeffizienten für Membranlipide und/oder -proteine berechnet werden. In einem Erkundungsexperiment wurde versucht, mit dieser Technik die aus den CF-Versuchen vermuteten Unterschiede der Membranfluidität zwischen M und K zu bestätigen. Die Experimente wurden im Hubrecht-Laboratorium der Königlich Niederländischen Akademie der Wissenschaften in Utrecht bei Dr. S. DeLaat durchgeführt. Aus Gründen der leichteren Verfügbarkeit wurden Kulturen von schwarzen Meerschweinchenohren verwendet. Die Zellen wurden mit diI (Lipide) und succinyliertem ConA (vorwiegend Proteine) gelabelt. Aus Zeitgründen wurden nur mit der Lipidprobe längere Messerien gemacht. Dabei ergab sich für die K ein Diffusionskoeffizient D von $1{,}2 \times 10^{-8}$ cm²/sec., der im selben Bereich wie für die meisten anderen Zellen liegt (Edidin 1981). M hingegen zeigten, entgegen allen Erwartungen, eine stark erhöhte Lipidbeweglichkeit (D: $2{,}6 \times 10^{-8}$ cm²/sec.). In einigen Versuchen konnte im Mikroskop ein "Durchbrennen" der M-Membran an den Bleichstellen beobachtet werden. Das läßt darauf schließen, daß durch den Laserstrahl die M-Membran geschädigt wird. Die Melanosomen absorbieren die Strahlungsenergie und wandeln sie in Wärmeenergie um. Dadurch kommt es zur lokalen Aufheizung ("Schmelzen") der Membran, was sich bei hoher Laserenergie als sichtbarer Schaden und bei niedriger Laserenergie als artifiziell erhöhte laterale Lipidbeweg-

lichkeit manifestierte. Auf dieses Problem wurde vereinzelt theoretisch hingewiesen (Shinitzky und Henkart 1979, J. Schlessinger, persönliche Mitteilung), es wurde jedoch nirgends beschrieben.

Weiterführende FPR-Untersuchungen am M-, K-System müßten an Kulturen von Tyrosinase-negativen Albinomeerschweinchen oder von schwach pigmentierter humaner Haut gemacht werden. Diese sensitive Technik könnte Fluiditätsunterschiede zwischen M und K und zwischen normalen und malignen M, wie von Eldridge et al (1980) für normale und transformierte Fibroblasten gezeigt wurde, aufdecken. Sogar Unterschiede zwischen funktionell differenzierten Teilen der Zelle (Zelleib, Dendriten) könnten erfaßt werden, analog den Studien von De Laat et al (1979 und 1980), die an den auswachsenden Neuriten von Neuroblastomzellen eine erhöhte Membranfluidität nachweisen konnten.

III. Lektine und kationisiertes Ferritin:

1. Glykokalyx von Epidermalzellen:

Die frühen histochemischen Untersuchungen wurden an Hautschnitten durchgeführt. Ursprünglich wurde mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) positive epidermale Interzellularsubstanz beschrieben (Wislocki et al 1951). Damit war das Vorhandensein von Polysaccharidsubstanzen in den Zwischenzellräumen erstmals in Diskussion. Es folgten eine Reihe von histochemischen Versuchen (Roe et al 1961), welche die ursprüngliche Beobachtung bestärkten. Braun-Falco und Weber (1958) wiesen histochemisch und biochemisch in der Epidermis Hexosamin (GlcNAc), Hexosen und Uronsäuren nach - das Baumaterial der sauren Mucopolysaccharide. Die erste elektronenmikroskopische Demonstration des interzellulären "Zements" stammte von Komura und Ofuji (1967): Phosphorwolframsäure färbt nach alleiniger Glutaraldehydfixierung bevorzugt die Polysaccharidsubstanzen zwischen den Zellen an. Mercer et al (1968) verwendete eine Perjodsäure-Silber-Methode zur Sichtbarmachung der Polysaccharide auf Zelloberflächen im Elektronenmikroskop. Es war jedoch noch nicht klar, ob die Interzellularräume der Epidermis durch den "Zement" verschlossen sind, oder ob sie ein leeres, lakunäres System bilden.

Wolff und Schreiner (1968 und 1970) machten die entscheidenden Experimente zur Beantwortung dieser Fragen. Mit Lanthan (Revel und Karnovsky 1967) als

spezifischem Marker für die Interzellularräume und Rutheniumrot (Luft 1971) für die Glykokalyx konnten sie zeigen, daß der bisher postulierte interzelluläre "Zement" aus den verschmolzenen Glykokalices von nebeneinanderliegenden Zellen besteht. Dieses Polysaccharidgerüst ist jedoch durchlässig, wie die Lanthan-Färbung der Interzellularspalte und selbst der Desmosomen bewies.

Fritsch et al (1975) führten die ersten Zelloberflächenstudien in Zellkultur durch. Auch in vitro besitzen die Epidermalzellen eine ausgeprägte Glykokalyx, die sich mit Rutheniumrot anfärbte. Der Rutheniumrot-Label war durch Neuraminidase fast völlig, durch Hyaluronidase nur teilweise und durch Phospholipase C überhaupt nicht entfernbar. Die kultivierten Zellen waren in der Lage, die enzymatisch abgespaltene Glykokalyx innerhalb von 24 Stunden wieder völlig zu regenerieren.

Schuler et al (1981) führten CF und die Lektine (ConA, WGA) als Oberflächenmarker bei kultivierten Epidermalzellen ein. Diese 2 Marker wurden in der vorliegenden Arbeit in einem breiten Spektrum von Versuchsansätzen zur weiteren Charakterisierung der Epidermalzellen eingesetzt. Es änderte sich, im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen, auch der Blickwinkel: ermöglicht durch die Verbesserung der Kulturmethoden wurde den melanozytären Zellen das Hauptaugenmerk geschenkt.

Unter Einbeziehung der eben geschilderten Daten kristallisiert sich folgendes Bild der melanozytären Glykokalyx heraus:

- Ihre Struktur scheint nicht artspezifisch zu sein.
- Sie wird durch 2 Eigenschaften charakterisiert, welche sie grundlegend von K und vielen anderen Zelltypen unterscheiden: zum einen durch die Maskierung der D-Gal- und GalNAc-Reste durch Sialinsäure und zum anderen durch die diffus einschichtige Verteilung der negativ geladenen Membrankomponenten.
- Das Fehlen von Umverteilung des kationisierten Ferritins läßt für die M eine außergewöhnlich niedrige Membranfluidität vermuten.
- Die Oligosaccharidketten der Glykoproteine und Ganglioside sind in hohem Maße sialisiert.

Über die proportionale Bedeutung von Glykolipiden, Glykoproteinen und Proteoglykanen beim Aufbau der Glykokalyx kann keine Aussage getroffen werden.

2. Vergleich M - K: Funktionelle Aspekte:

Das Phänomen des Pigmenttransfers in der Haut der Säuger wurde auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene in vitro und in vivo bereits eingehend studiert (Cruickshank 1964, Cohen und Szabó 1968, Klaus 1969, Wolff und Konrad 1972, Wolff et al 1974, Prunieras et al 1976). Es wurden 3 Hypothesen über den zellulären Mechanismus aufgestellt (vgl. Einleitung III.2.). Es erscheint als wahrscheinlich, daß die Zellmembranen von M und K miteinander fusionieren und so einen Kanal bilden, durch welchen die Melanosomen in die K übertreten können (Garcia et al 1979). Andere Variationen des Pigmenttransfers können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Voraussetzung für den Pigmenttransfer ist in diesem Fall eine unmittelbare Kontaktaufnahme zwischen M und K. Über die molekulare Basis dieses Vorganges ist nichts bekannt. In anderen Zellsystemen gibt es jedoch schon zahlreiche Hinweise darauf, daß der Kohlenhydratanteil des Plasmalemmas für die interzelluläre Erkennung verantwortlich ist (Olden et al 1982). Leberzellen besitzen an ihren Zelloberflächen Rezeptoren für D-Gal und GalNAc (Ashwell und Harford 1982). Mit deren Hilfe können sie (vor allem die Hepatozyten) sowohl desialisierte Glykokonjugate des Plasmas binden und aufnehmen, als auch (vor allem die Kupffer-Zellen) desialisierte seneszente und/oder pathologische Zellen erkennen, binden und in weiterer Folge phagozytieren (Kolb et al 1979). Ähnliche Erkennungssysteme wurden bei der zellulären Interaktion zwischen den Wurzelhaaren von Leguminosen mit ihren symbiontischen Rhizobien und für Kontaktvorgänge bei Schleimpilzen diskutiert (Barondes 1981). Die genannten Beispiele funktionieren nach dem "Schlüssel-Schloß-Prinzip" (vgl. Einleitung II. 3. und Fig. 3). Ein Membranglykokonjugat auf dem einen Zellpartner wird von einem "Membranlektin" (Monsigny 1979a,Simpson et al 1978) auf dem anderen Zellpartner gebunden und/oder umgekehrt. Diesen Mechanismus könnte man sich auch für den Zellkontakt zwischen M und K vorstellen.

Direkte Hinweise auf Membranlektine bei M oder K fehlen. Jedoch wurde auf der Zellmembran von MZ ein Galaktose-spezifisches Membranlektin gefunden

(Raz und Lotan 1981), dessen Funktion noch unbekannt ist. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit können keine Schlüssel-Schloß-Mechanismen postuliert werden. Dennoch können einige Beobachtungen spekulativ in diese Richtung interpretiert werden und somit als Grundlage für eine weiterführende Versuchsplanung dienen.

Im Elektronenmikroskop zeigten sich an Stellen des unmittelbaren Kontaktes (Dendriten und Zelleib) zu den K die M für SBA und PNA reaktiv. Der Rest der Zelle war negativ. Man kann daraus schließend, daß M im Kontaktbereich D-Gal und GalNAc exprimieren. Die Aufdeckung von Gal- und GalNAc-Resten wird durch eine Abnahme der Sialinsäure erreicht. Diese, auf den Kontaktbereich beschränkte Abnahme der Sialinsäure-bedingten "anti-adhäsiven" Eigenschaften der Zellmembran (Lloyd 1975) könnte den Zellkontakt erleichtern oder ermöglichen. In einer rezenten Mitteilung beschreiben Wallis et al (1982), daß auf der präsynaptischen Membran die Dichte der RCA I und II-Bindungsstellen gegenüber der übrigen Nervenzellmembran erhöht ist. An embryonalen, sprossenden Axonen machten Pfenninger und Maylié-Pfenninger (1981) eine ähnliche Beobachtung: die Autoren glauben, daß die im (künftigen) Kontaktbereich verstärkt auftretenden D-Gal- und GalNAc-Glykokonjugate die wahrscheinlichsten Partner einer Schlüssel-Schloß-Interaktion mit der Zielzelle seien. Eine Interpretation des Befundes an M als Diffusionsartefakt kann nicht völlig ausgeschlossen werden. HRP-Reaktionsprodukt kann über kurze Strecken hinweg diffundieren (Williams 1977, Novikoff et al 1972). Eine Klärung könnte durch eine Markierung mit partikulären Markern, d.h. mit Ferritin- oder Gold-gekoppelten Lektinen erreicht werden, so wie in den beiden oben erwähnten Arbeiten. Diffusionsartefakte kommen bei diesen Methoden nicht vor. In Verbindung mit Replikatechniken könnte so die Verteilung der Lektinrezeptoren in Aufsicht auf die Zelloberfläche studiert werden (Mannweiler et al 1982). Versuche mit SBA-Ferritin waren erfolglos, da alle verwendeten Konjugate inaktiv waren.

Auch die unterschiedliche Verteilung der Oberflächenladungen auf M und K scheint für die Interaktionen beim Pigmenttransfer bedeutungsvoll zu sein. Da alle Zellen eine negative Gesamtladung tragen (Weiss 1969), ist zu erwarten, daß es bei der gegenseitigen Annäherung zweier Zellen zu elektrostatischer Abstoßung kommt. Es wurde jedoch gezeigt, daß nicht die Gesamtladung, sondern die örtliche Ladungsverteilung auf der Zelloberfläche entscheidend ist (Maslow und Harlos 1981, Weiss und Harlos 1972). Der Abstoßung wirken - entfernungsabhängig - die Van der Waals'schen und London'schen Anziehungs-

kräfte entgegen (Sherbet 1978). Das biophysikalische Geschehen bei der Annäherung zweier Zellen ist also recht komplex. Die K besitzen große Strecken der Membran, die frei von negativer Ladung sind. Im Zusammenspiel mit der relativ guten Lateralbeweglichkeit von Membrankomponenten wird der Kontakt mit M mit Sicherheit erleichtert und möglicherweise auch reguliert. Ein "Kontaktphänomen", so wie für SBA und PNA an M beschrieben, wurde beim CF nicht beobachtet. Das typische CF-Muster der M blieb auch im unmittelbaren Kontaktbereich unverändert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere der Lektinexperimente bilden die Grundlage für weiterführende Studien: mit Hilfe von "glykosylierten Markern" (Kieda et al 1977) und "Neoglykoproteinen" (Lee et al 1976), das sind an HRP, Ferritin, BSA, BSA-FITC u.a. gekoppelte Zucker, wird versucht, zuckerbindende Proteine (=Membranlektine, "lectin-like-receptors") in den Plasmamembranen von M, K oder Langerhanszellen aufzuspüren. Angesichts sich häufender Berichte über Membranlektine erscheint dieses Vorhaben sehr interessant (Kieda et al 1979, Baenziger und Fiete 1980, Decker 1980, Koszinowski und Kramer 1981, Raz und Lotan 1981, Shepherd et al 1981, Stahl und Gordon 1982, Wall und Hubbard 1981, Weir et al 1982, Jungery et al 1983).

3. Vergleich M - MZ: Funktionelle Aspekte:

Die Lektin-Labeling-Experimente brachten keine Unterschiede zwischen normalen und malignen M zutage. Das kann bedeuten, daß die Glykokalyx beider Zelltypen identisch aufgebaut ist, und es zu keinen Tumor-spezifischen Veränderungen der Zelloberfläche kommt. Andererseits wären solche Veränderungen durchaus mit den präsentierten Ergebnissen vereinbar. Die Versuche mit FITC-, TRITC- und HRP-gekoppelten Lektinen konnten nicht quantitativ ausgewertet werden. Deshalb fallen mögliche feine Unterschiede oder Veränderungen der Proportionen von Bausteinen der Glykokalyx nicht auf. Mit Sicherheit jedoch geschehen bei der malignen Transformation von M keine großen Umschichtungen in der Zusammensetzung des Kohlehydratanteils. Diese Aussage wird dadurch bekräftigt, daß die Identität der Lektinbindungsmuster in einigen Fällen an normalen M und malignen MZ vom selben Patienten im selben Experiment beobachtet wurde.

Mit radioaktiver Oberflächenmarkierung stellten Lloyd et al (1979) und Albino et al (1981) ebenfalls ein Maskierungsphänomen fest: humane MZ konnten mit Galaktoseoxidase-(^{3}H)-Borohydrid nur nach vorhergehender Neuraminidasebehand-

lung gelabelt werden. Darin unterschieden sich die Melanomzellen von zahlreichen anderen untersuchten neoplastischen Zellen, sogar von den ontogenetisch nahestehenden Astrozytomen (Gliazelltumoren). Die Vermutung der Autoren, daß das Phänomen melanomspezifisch sein könnte, ist nicht richtig. Es scheint im Gegenteil ein universeller Marker für melanozytäre Zellen zu sein.

Eines der bestuntersuchten Modellsysteme der Tumorforschung ist das B-16 Mausmelanom. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, wo hauptsächlich normale M mit MZ verglichen werden, werden dort MZ mit unterschiedlichen Metastasierungspotential (Fidler et al 1978) verglichen. Die Maskierung und die Neuraminidase-bedingte Aufdeckung von SBA-Bindungsstellen wurde beschrieben (Raz et al 1980a). Auch die oben erwähnte Galaktose-(^{3}H)-Borohydrid-Methode führte nur nach vorausgehender Neuraminidasebehandlung zu einer Markierung von Membranglykokonjugaten (Warren et al 1978, Yogeeswaran et al 1978, Raz et al 1980a).

Die Studien an MZ, sowie an verschiedenen anderen Tumorzellen zeigten in vivo immer eine Zunahme der Sialinsäure auf Zelloberflächenglykokonjugaten. In vitro ist diese Korrelation nicht so eindeutig (Yogeeswaran 1980, Yogeeswaran und Salk 1981). Ein höherer Sialisierungsgrad von Glykokonjugaten kann antigene Determinanten maskieren. Damit könnten die Tumorzellen dem Zugriff des Immunsystems entzogen werden (Yogeeswaran 1980). Ebenso können die Adhäsionseigenschaften von Tumorzellen verändert werden: Fogel et al (1983) zeigten, daß schwach metastasierende, PNA- und SBA-positive Zellvarianten eines T-Zell-Lymphoms gut am Plastiksubstrat des Kulturgefäßes hafteten, im Gegensatz dazu aber die stark metastasierenden, erst nach Neuraminidasevorbehandlung PNA- und SBA-positiven Zellvarianten, nicht adhärierten.

Der hohe Sialisierungsgrad der MZ-Oberflächen, ausgedrückt durch die Maskierung der PNA-, SBA- und HPA-Rezeptoren (=D-Gal- und GalNAc-Reste), stimmt somit mit den Berichten in der Literatur überein. Ob jedoch die Menge der Sialinsäure gegenüber den auch schon hoch sialisierten normalen M erhöht ist, konnte mit den verwendeten Methoden nicht bestimmt werden. Die Befunde deuten aber eher darauf hin, daß die quantitativen Unterschiede gering sind.

Ebenso haben die qualitativen Differenzen, die zwischen M und MZ mit CF-gefunden wurden, funktionelle Bedeutung. Da einerseits bekannt ist, daß die

Sialinsäuren den größten Teil der negativen Zelloberflächenladungen stellen (Sherbet 1978), und andererseits Neuraminidasevorbehandlung den CF-Label auf M weitgehend entfernte, können die CF-Bindungsmuster hauptsächlich den Sialinsäuren der Glykoproteine und -lipide zugeschrieben werden. Das diffus einschichtige CF-Bindungsmuster, welches sich bei M als nahezu unveränderlich herausgestellt hatte, wurde in manchen MZ durchbrochen. Darin spiegelt sich das abnorme Verhalten der Tumorzellen wider. Wie bereits im vorigen Punkt diskutiert, wird die Zell-Zell-Adhäsion von der Ladungsverteilung auf der Zelloberfläche moduliert (Sherbet 1978). Das Adhäsionsvermögen wird von den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Zellen und dem Substrat mitbeeinflußt (Sugimoto 1981, Grinnell und Hays 1978). Raz et al (1980b) haben an vorfixierten murinen B-16 MZ CF-Markierungsexperimente durchgeführt: die Zellvarianten mit relativ geringer Metastasierungskapazität zeigten über weite Strecken ein ähnliches Muster wie in dieser Arbeit für M beschrieben, sowie eine geringe Neigung zur homotypischen Aggregation. Hohe Metastasierungskapazität hingegen war mit dem gehäuften Auftreten von CF-Clustern und einer starken homotypischen Aggregationsneigung korreliert. Untersuchungen an normalen/maligne transformierten Zellpaaren zeigten eine niedrigere Dichte der negativen Bindungsstellen auf malignen Lymphozyten und Fibroblasten (Marikovsky et al 1974). Pauli et al (1982) fanden auf normalen Epithelialzellen der Harnblase in Kultur ein gleichmäßiges CF-Bindungsmuster. Die malignen Blasenkarzinomzellen dagegen wiesen freie Membranstrecken zwischen CF-Aggregaten auf. Eine Auflockerung der anionischen Stellen könnte die Adhäsion an das Substrat erleichtern. Diese Eigenschaft ist für die Invasion der Tumorzellen ins umliegende Gewebe und die Bildung von Metastasen von entscheidender Bedeutung (Nicolson 1982, Fidler et al 1978).

Innerhalb der untersuchten MZ-Kulturen, die ein gestörtes CF-Bindungsmuster zeigten, fanden sich in einigen Fällen sowohl Zellen mit veränderter CF-Bindung, als auch solche mit dem ursprünglichen M-Muster. Diese Heterogenität ist Ausdruck dafür, daß in einem malignen Gewebe Zellklone mit unterschiedlichen Eigenschaften (Morphologie, Stoffwechsel, Antigenität, Wachstumsverhalten, Zelloberflächeneigenschaften u.a.) vorkommen (Dexter und Calabresi 1982, Nicolson 1982, Fidler et al 1978, Albino et al 1981). Neben der klonalen Heterogenität innerhalb eines Tumors wurden auch Unterschiede zwischen verschiedenen Zellinien oder Primärkulturen von Melanomen bezüglich der Muster der

Oberflächenproteine (Roberts 1978), sowie des Adhäsionsverhaltens (Hakim 1981) demonstriert. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß die verschiedenen MZ-Kulturen verschiedene CF-Muster aufwiesen. Umgekehrt wird dadurch deutlich, daß die Maskierung von D-Gal und GalNAc, d.h. die hohe Sialisierung ein ungewöhnlich stabiles Merkmal melanozytärer Zellen zu sein scheint.

Die für die Lektinexperimente verwendeten Methoden waren nicht geeignet, geringe quantitative oder qualitative Unterschiede zwischen M und MZ zu erfassen. Mit Agglutinationstechniken, radioaktiv markierten Lektinen, Rosettierungstechniken u.a. wurden zahlreiche Veränderungen der Glykokalyx von neoplastischen Zellen beschrieben. Dabei ergaben sich einige Befunde, die auf die meisten der untersuchten Zelltypen zutrafen, wie z.B. die leichtere Agglutinierbarkeit von Tumorzellen durch Lektine, das verstärkte Auftreten fukosehältiger Glykoproteine oder die unvollkommene Ausbildung von Oligosaccharidketten (zusammengefaßt in Nicolson 1980). Dennoch zeichnet sich kein einheitliches Bild tumorspezifischer Zelloberflächenveränderungen ab: "Es scheint also keine einfache Beziehung zwischen Malignität und gewissen Lektinrezeptoren auf Tumorzellen zu bestehen, was recht einleuchtend ist, wenn man die Diversität der Zelloberflächenkomponenten bedenkt, die in den einzelnen zellulären Systemen gefunden wurden" (Nicolson 1982).

Die Untersuchungen am malignen Melanom konnten bisher nur im Vergleich mit anderen Zelltypen oder mit anderen Melanomen bewertet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals MZ direkt mit normalen M verglichen. Die Tatsache, daß ein relativ unspezifischer Marker, wie das CF, Unterschiede zwischen normalen und malignen Zellen aufspüren konnte, rechtfertigt die Untersuchung von Zelloberflächen mit solchen Methoden, auch in einer Zeit, wo mit monoklonalen Antikörpern ein viel feineres Instrumentarium zur Verfügung steht. Damit können einzelne Glykoproteine (Brown et al 1981, Imai et al 1982), Glykolipide (Yek et al 1982) oder Proteoglykane (Bumol und Reisfeld 1982) der Glykokalyx herausgegriffen und untersucht werden. Zahlreiche Gruppen beschäftigen sich mit der "Kartierung" der Antigene auf den Oberflächen von humanen MZ (vgl. Second Workshop on monoclonal antibodies to melanoma, NIH-NCI, 1982 in: Hybridoma 1:379-482, 1982). Die "Suche nach der Spezifität" (Old 1981) der Antigene für die neoplastischen MZ wird immer noch durch das Fehlen von geeigneten Vergleichsmöglichkeiten mit normalen M behindert. Solange die Ge-

winnung von M in großen Mengen nicht möglich ist, bietet einzig das in dieser Arbeit verwendete zytochemische Untersuchungssystem die Gelegenheit, die verschiedenen Antigene auf ihre Melanomspezifität hin zu überprüfen. Nach der beschriebenen Erkundung der Zelloberfläche mit Lektinen und kationisiertem Ferritin beginnt nun die vergleichende Erforschung der Feinstruktur der M/MZ-Oberflächen mit monoklonalen Antikörpern.