

Klinik für Dermatologie und Venerologie  
Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens

**Einfluss von UV- Licht und extrazellulärer Matrix auf die  
Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle in vitro**

Inauguraldissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von

**Imke Stark**  
aus Bremen

Lübeck 2005

## **1. Berichterstatter**

---

- Priv.-Doz. Dr. med. Heinrich Jürgen Brinckmann

## **2. Berichterstatter**

---

- Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel

## **Tag der mündlichen Prüfung**

---

- 14.12.2005

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.12.2005**

**gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -**

---

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Der Melanozyt .....	1
1.2	UV-Licht .....	2
1.3	Melanozytäre Nävi .....	4
1.4	Das maligne Melanom .....	5
1.4.1	Ätiopathogenese des malignen Melanoms .....	6
1.4.2	Klinik und Histologie des malignen Melanoms .....	7
1.4.3	Prognose des malignen Melanoms .....	8
1.5	Interaktion von Melanozyten mit ihrer Umgebung .....	8
1.5.1	Melanozytäre Adhäsionsmoleküle .....	9
1.5.2	Melanozytäre Adhäsionsmoleküle unter UV-Einfluss .....	11
1.6	Fragestellung .....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1	Zellkultur .....	13
2.1.1	Zellkulturmedien .....	13
2.1.2	Melanozytenkultur .....	14
2.1.3	Passagieren der Melanozyten .....	14
2.1.4	Wegfrieren und Auftauen von Melanozyten .....	15
2.1.5	Beschichtung der Kulturplatten .....	15
2.2	Kokultur aus Keratinozyten und Melanozyten .....	15
2.3	UV-Bestrahlung .....	16
2.3.1	UV-Lichtquelle .....	16
2.3.2	Festlegung der UV-Dosis .....	16
2.3.3	Bestrahlung der Melanozyten .....	17
2.4	Durchflusszytometrie .....	17
2.5	Immunzytochemie .....	19
2.5.1	Kokultur in Chamber-Slides .....	19
2.5.2	Fixieren der Zellen .....	20
2.5.3	Immunzytologische Färbung .....	20
2.6	Statistische Auswertung .....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
3.1	Einfluss von UV-Licht auf Melanozyten .....	22
3.2	Einfluss von UV-Licht auf die Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen .....	23

3.2.1	Einfluss einer UVB-Bestrahlung mit 5 mJ/cm <sup>2</sup> .....	23
3.2.2	Einfluss einer UVB-Bestrahlung mit 20 mJ/cm <sup>2</sup> .....	24
3.2.3	UVB-Dosisabhängigkeit der $\alpha$ 6-Integrin-Herunterregulation .....	24
3.3	Einfluss extrazellulärer Matrixmoleküle auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle .....	26
3.3.1	Einfluss extrazellulärer Matrixmoleküle auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle (unbestrahlte Melanozyten) .....	26
3.3.2	Einfluss extrazellulärer Matrixmoleküle auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle nach Bestrahlung mit UVB 5 mJ/cm <sup>2</sup> .....	26
3.3.3	Einfluss von Laminin-1 auf die Expression von $\alpha$ 6-Integrin nach Bestrahlung mit UVB 10 bzw. 20 mJ/cm <sup>2</sup> .....	27
3.4	Weiterführende Untersuchungen zur Expression von $\alpha$ 6-Integrin .....	28
3.4.1	Kinetik der UVB-dosisabhängige Expression von $\alpha$ 6-Integrin (12, 24 und 48 h p.i.) .....	28
3.4.2	Kinetik der UVB-dosisabhängigen Expression von $\alpha$ 6-Integrin; Einfluss von Laminin-1 .....	29
3.5	Einfluss einer Kokultur mit Keratinozyten auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle .....	32
3.5.1	Einfluss unterschiedlicher Calciumkonzentrationen im Kulturmedium auf die Differenzierung der Keratinozyten .....	32
3.5.2	Einfluss von UVB auf die Expression von Adhäsionsmolekülen in der Kokultur .....	33
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>46</b>
4.1	UV-induzierte Effekte auf Morphologie und Wachstumsverhalten der Melanozyten .....	46
4.2	Einfluss von Extrazellulärmatrix-Komponenten auf Morphologie, Wachstumsverhalten und UV-Empfindlichkeit der Melanozyten .....	48
4.3	Expression von Adhäsionsmolekülen .....	49
4.3.1	Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen .....	49
4.3.2	Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen unter UVB-Bestrahlung .....	50
4.3.3	Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen unter Einfluss von Extrazellulärmatrix .....	51
4.3.4	Einfluss einer Kokultur mit Keratinozyten auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle .....	52
4.4	Bedeutung von $\alpha$ 6-Integrin in vivo .....	54

---

4.5	Ausblick .....	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>70</b>
7.1	Tabelle: Melanozyten (unbeschichtete Kulturplatten), unbestrahlt vs. UVB 5 mJ/cm <sup>2</sup> .....	70
7.2	Tabelle: Melanozyten auf Fibronectin-Beschichtung, unbestrahlt vs. UVB 5 mJ/cm <sup>2</sup> .....	71
7.3	Tabelle: Melanozyten von Laminin-1-Beschichtung, unbestrahlt vs. UVB 5 mJ/cm <sup>2</sup> .....	72
7.4	Tabelle: Melanozyten (unbeschichtete Kulturplatten), unbestrahlt vs. UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup> .....	73
7.5	Tabelle: α6-Integrin Expression auf Melanozyten .....	74
	7.5.1 unbeschichtete Kulturplatten	
	7.5.2 Laminin-1-Beschichtung	
7.6	Tabelle: α6-Integrin Expression auf Melanozyten (mittlerer Fluoreszenzindex [MFI]) .....	75
	7.6.1 unbeschichtete Kulturplatten	
	7.6.2 Laminin-1-Beschichtung	
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>A</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>B</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>C</b>

## Abkürzungen

APAAP	Alkalische Phosphatase Anti- Alkalische Phosphatase
BSA	bovine serum albumine
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F <sub>ab</sub>	antigenbindender Teil eines Antikörpers
FACS	fluorescence- activated cell sorter
FGF-2	fibroblast growth factor- 2
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
g <sub>n</sub>	Normalfallbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde(n)
Hepes	N-2`-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
ICAM	inter cellular adhesion molecule
Keratinocyte-SFM	Serum-free Keratinocyte Medium
kW	Kilowatt
MED	minimale Erythemdosis
MFI	mittlerer Fluoreszenzindex
µg	Mikrogramm
MGM-M2	Melanocyte Growth Medium-M2
min	Minute(n)
mJ/cm <sup>2</sup>	Millijoule pro Quadratcentimeter
ml	Milliliter
mM	Millimol
n	Versuchsanzahl
nm	Nanometer
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphatpufferlösung
PE	Phycoerythrin
p.i.	post irradiationem
s	Standardabweichung
SS	sideward scatter
TNS	trypsine neutralizing solution
TPA	Tetraphorbolazetat
Tris-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan-Puffer
UV	ultraviolett
$\bar{x}$	Mittelwert

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Melanozyt

Melanozyten sind dendritische Zellen der menschlichen Epidermis, die durch die Produktion des Pigments Melanin hauptverantwortlich für die Eigenfarbe der menschlichen Haut sind. Melanozyten sind neuroektodermaler Herkunft; sie entwickeln sich aus Vorläuferzellen in der Neuralleiste und wandern ab der 8. Embryonalwoche in die Epidermis ein (Reedy et al., 1998). Dort finden sie sich in der basalen epidermalen Zellschicht (Stratum basale) und sind jeweils durch mehrere zwischen ihnen liegende basale Keratinozyten getrennt (Herlyn et al., 2000). Bei dem von den Melanozyten produzierten Pigment Melanin werden je nach chemischer Zusammensetzung des Farbstoffs zwei Typen unterschieden: das bräunlich-schwarze Eumelanin und das gelblich-rötliche Phäomelanin (Thody et al., 1991). Die Pigmentsynthese nimmt ihren Ausgang von der Aminosäure L-Tyrosin, welches über Tyrosinase, dem Schlüsselenzym der Melaninsynthese, zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) oxidiert und weiter zu Dopachinon umgewandelt wird. Melanin wird in endosomalen Granula, den dem endoplasmatischen Reticulum entspringenden Melanosomen, gespeichert. Diese wandern während der Reifung peripherewärts, bis schließlich das Pigment über die Dendriten an Keratinozyten weitergegeben und dadurch innerhalb der basalen und suprabasalen Epidermis verteilt wird (Jimbow et al., 1998; Norris et al., 1998). Die funktionelle Einheit aus Melanozyten und Keratinozyten führte zur Prägung des Begriffs der epidermalen Melanin-Einheit, (Fitzpatrick und Breathnach, 1963) welche ein zahlenmäßig relativ festes Verhältnis von Melanozyten und Keratinozyten darstellt (ca. 1:36), das durch äußere Faktoren wenig beeinflusst wird. Die Pigmentierung variiert je nach Herkunft eines Individuums außerordentlich, was jedoch nicht durch quantitative Unterschiede der Melanozytenzahl, sondern durch chemische Unterschiede in der Melaninzusammensetzung (s.o.) und durch die Feinheit und Dichte der Melaninverteilung zu erklären ist. In den letzten Jahren wurde ferner die entscheidende Bedeutung von Genpolymorphismen des Melanocortin-1-Rezeptors (MC1R) für die Ausbildung von unterschiedlichen Pigmentierungstypen erkannt (Sturm et al., 1998). Neben einer direkten Absorption ultravioletter Photonen hat Melanin die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies, die bei der Interaktion zwischen UV-Photonen mit Membranlipiden entstehen, abzufangen (Pathak, 1995; Riley, 1997). Des Weiteren zeigt Melanin innerhalb von Keratinozyten eine charakteristische kappenartige Anordnung oberhalb des Zellkerns, was einen optimalen Schutz der Kern-DNA gewährleistet (Kobayashi et al., 1998).

Die medizinische Bedeutung der individuell unterschiedlichen Pigmentierung besteht in der dadurch bedingten Variabilität der UV-Licht-Empfindlichkeit bzw. des Hautkrebsrisikos. Dabei kann Hautkrebs von verschiedenen Zelltypen ausgehen. Das spinözelluläre Karzinom und das Basalzellkarzinom sind von Keratinozyten ausgehende, maligne Tumoren. Die Inzidenz für Basalzellkarzinome liegt laut einer Schweizer Studie in Mitteleuropa derzeit bei ungefähr 300/100.000 Einwohner pro Jahr und für das spinözelluläre Karzinom bei ca. 150/100.000 Einwohner pro Jahr (Hafner et al., 2002). Melanozyten sind der Ausgangszelltyp für die Entstehung von gutartigen (melanozytäre Nävi) und bösartigen Tumoren (malignes Melanom; Inzidenz in Deutschland 10-12/100.000 Einwohner pro Jahr [Garbe und Blum, 2001]).

## 1.2 UV-Licht

UV-Strahlung ist elektromagnetische Energie und umfasst Wellenlängen von 100 nm bis 400 nm. Dieses Spektrum gliedert sich in ultrakurzwelliges UV-Licht (100 nm – 200 nm) und UVC-Strahlung (200 nm – 280 nm), die beide gänzlich von der Luft bzw. den oberen Schichten der Atmosphäre herausgefiltert werden, sowie in UVB-Strahlung (280 nm – 320 nm) und UVA-Strahlung (320 nm – 400 nm), die zusammen den für den Menschen relevanten Anteil der UV-Strahlung auf der Erdoberfläche darstellen. In einer genaueren Skalierung kann der Bereich der UVA-Strahlung weiter untergliedert werden in UVA<sub>2</sub> (320 nm – 340 nm) und UVA<sub>1</sub> (340 nm – 400 nm). In Richtung kleinerer Wellenlängen schließt sich der UV-Strahlung der Bereich der Röntgenstrahlung an, in Richtung größerer Wellenlängen folgt der blau-violette Teil des sichtbaren Lichts. Obwohl UVA in weitaus größerem Maß als UVB die Erde erreicht (Kaminer, 1995), ist es die UVB-Strahlung, die für den größten Teil der gesundheitlichen Schäden, wie beispielsweise Sonnenbrände, solare Keratosen und Hautkrebs, verantwortlich gemacht werden muss. Dies beruht auf einer 1000mal stärkeren biologischen Aktivität der UVB-Strahlung an der menschlichen Haut. Bei hellen Hauttypen („Kauasiern“) geht die hellere Hautfarbe mit einer deutlich höheren UV-Licht-Empfindlichkeit einher, was sich in einer niedrigeren Schwellendosis zur Auslösung eines Sonnenbrandes äußert. Tabelle 1.1 zeigt die nach Fitzpatrick klassifizierten unterschiedlichen Pigmentierungstypen der menschlichen Haut.

Typ	Charakteristika
I	bräunt nie, immer starker Sonnenbrand rotblonde oder rothaarige, grünäugige, sommersprossige Menschen ("keltischer Typ")
II	bräunt schlecht, schnell Sonnenbrand blonde, blauäugige, hellhäutige Menschen ("germanischer Typ")
III	bräunt gut, selten Sonnenbrand dunkelblonde oder braunhaarige, braunäugige, mittelstark pigmentierte Menschen
IV	bräunt sehr gut, sehr selten Sonnenbrand dunkelhaarige, dunkeläugige, dunkelhäutige Menschen ("mediterrane Typ")
V	praktisch nie Sonnenbrand braune Haut ("indischer Typ")
VI	praktisch nie Sonnenbrand schwarze Haut ("afrikanischer Typ")

**Tab. 1.1: Hauttypen des Menschen nach Fitzpatrick (aus: P. Altmeyer, Th. Dirschka, R. Hartwig: Klinikleitfaden Dermatologie, , 2. Aufl., S. 341, Urban & Fischer, München/ Jena 2003)**

Hinsichtlich der Pigmentierung als Reaktion der Haut auf UV-Exposition werden eine Sofortbräunung (vornehmlich durch UVA) und eine Bräunung vom verzögerten Typ unterschieden (Jimbow et al., 1985). In suberythematischen Dosen steigert UV-Licht die Melanozyten-Proliferation und führt zu verstärkter Melaninsynthese sowie zu einem vermehrten Melanintransfer in die umliegenden Keratinozyten (Thody, 1995). Neben der wichtigen biologischen Funktion im Rahmen der Vitamin-D-Synthese stellt UV-Licht in erster Linie eine potentiell schädigende Noxe dar, vor der der Organismus im Laufe der Evolution durch die Ausbildung Breitengradabhängiger Pigmentierungstypen einen Schutzmechanismus entwickelt hat. Neben dem bereits erwähnten Sonnenbrand mit seinen unangenehmen und bei schwerer Ausprägung durchaus bedrohlichen Folgen stellt aus medizinischer Sicht die UV-induzierte Krebsentwicklung die gefährlichste Folge von UV-Licht dar. Der Zusammenhang zwischen der individuellen UV-Exposition und der Krebshäufigkeit konnte in mehreren epidemiologischen Studien bestätigt werden. Interessanterweise ist dieser Zusammenhang bei den von Keratinozyten ausgehenden Tumoren (spinozelluläres Karzinom, Basalzellkarzinom) linear und korreliert mit der kumulativen Gesamt-UV-Dosis, die ein Mensch zeitlebens erfährt (Elwood, 1992). Bei melanozytären Tumoren (Nävi, Melanom) dagegen stellt wiederholte, intermittierende, starke UV-Exposition den entscheidenden Risikofaktor dar (Holman et al., 1986, Nelemans et al., 1993, Bentham und Aase, 1996). Dies spiegelt sich auch in der Lokalisation der Tumoren und im Zeitpunkt ihres Auftretens wieder: spinozelluläres Karzinom und Basalzellkarzinom betreffen vor allem ältere Menschen und entstehen am häufigsten an Kopf und Handrücken, also an chronisch lichtexponierten Hautarealen. Im Vergleich hierzu entstehen Nävi und Melanome durchaus schon in jüngerem Alter und ohne Bevorzugung dieser Areale. Offenbar stellt die plötzliche UV-Exposition ohne die bei

allmählicher Sonnengewöhnung mögliche vorherige Ausbildung einer UV-induzierten Pigmentierung einen in der Pathogenese melanozytärer Tumoren entscheidenden Faktor dar.

### **1.3 Melanozytäre Nävi**

Melanozytäre Nävi sind gutartige melanozytäre Tumoren, die aus Ansammlungen von Nävuszellen in der epidermalen Junktionszone bzw. der Dermis bestehen. Charakteristisch ist das Vorkommen von aggregiert liegenden Pigmentzellen, den sogenannten Nävuszellnestern. Jeder Mensch hat durchschnittlich 20- 30 Nävi (Grob und Jreissati, 1998). In ihrem klinischen Erscheinungsbild sind melanozytäre Nävi außerordentlich variabel. Zum Teil kann die Unterscheidung vom Melanom schwierig sein. Die überwiegende Mehrzahl aller Pigmentnävi sind erworben, nur selten finden sich Nävi bereits bei Geburt (kongenitale Nävi). Individuell schwankt die Zahl melanozytärer Nävi erheblich. In Studien von MacKie und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass es insbesondere während der Pubertät zu einer deutlichen Zunahme der Nävi kommt (MacKie et al., 1985). Die Bedeutung der Gesamtzahl von melanozytären Nävi eines Individuums besteht darin, dass eine hohe Anzahl von Nävi auf ein erhöhtes Risiko hinweist, an einem Melanom zu erkranken (Krüger et al., 1992). Als ursächlicher Faktor für die Entstehung von Nävi hat neben einer genetischen Disposition insbesondere UV-Licht eine entscheidende Bedeutung. In mehreren Studien konnte eine Korrelation zwischen zahlenmäßiger Zunahme von Nävi und vermehrter Sonnenexposition, Sonnenbränden, heller Hautfarbe und Sommersprossen bestätigt werden (Coombs et al., 1992; Pope et al., 1992; Harrison et al., 1994). Analog zur Melanopathogenese ist auch bei der Nävogenese vor allem die intermittierende Sonnenlichtexposition von vorrangiger Bedeutung (Augustsson et al., 1992). Die wichtigste Differentialdiagnose melanozytärer Nävi ist das Melanom. Zur visuellen Beurteilung eines Pigmentnävus folgt man der ABCD-Regel, mit der systematisch klinisch-makroskopische Auffälligkeiten erfasst werden können (Tabelle 1.2).

<b>A</b>	<b>Asymmetrie</b>	sie spricht für Dysplasie bzw. Malignität; gutartige Tumoren sind zumeist durch ein symmetrisches Wachstum gekennzeichnet
<b>B</b>	<b>Begrenzung</b>	Nävi haben meist eine regelmäßige Form und sind scharf zur umliegenden Haut abgegrenzt; Melanome weisen eine eher unscharfe und unregelmäßige Begrenzung auf
<b>C</b>	<b>Colorit</b>	Nävi sind i.d.R. gleichmäßig pigmentiert, das Vorhandensein mehrerer unterschiedlicher Farbtöne weist auf Dysplasie bzw. Malignität hin
<b>D</b>	<b>Durchmesser</b>	Nävi größer als 5mm gelten als beobachtungsbedürftig, eine Zunahme des Durchmessers ist verdächtig

**Tab. 1.2: ABCD-Regel zur Beurteilung melanozytärer Nävi**

Keines dieser Einzelkriterien besitzt für sich genommen eine ausreichende Spezifität oder Sensitivität für eine exakte Differentialdiagnose zwischen melanozytärem Nävus und Melanom. Erst die Zusammenschau aller Kriterien unter Berücksichtigung auch auflichtmikroskopischer Befunde, anamnestischer Angaben (Wachstum) und ggf. weiterer subjektiver Symptome führt zur Diagnosestellung. Histologisch werden im Wesentlichen vier Typen von Nävi unterschieden: Bei sehr oberflächlichen Tumoren kommt es zu einer umschriebenen Vermehrung einzeln stehender Pigmentzellen in der dermoepidermalen Junctionszone (Nävus incipiens oder Lentigo simplex), bei Aggregation der Melanozyten dieser Schicht zu kleinen Nestern spricht man von junctionalen Nävi. Zeigen sich darüber hinaus zusätzlich Melanozyten in der Dermis, handelt es sich um einen Nävus vom Compound-Typ. Liegen die Pigmentzellen ausschließlich im Korium, spricht man von einem dermalen Nävus. Melanozytäre Nävi sind histologisch gekennzeichnet durch einen in der Regel symmetrischen Aufbau, fehlende Zellatypien, gleichmäßige Nestbildung und eine so genannte Ausreifung der Pigmentzellen (Abnahme der Zellgröße von junctional nach dermal) (Lever und Schaumburg- Lever, 1990; Ackerman et al., 1994). Als Sonderform melanozytärer Nävi wird von vielen Autoren der dysplastische Nävus abgegrenzt (Greene et al., 1980), der sich insbesondere mikroskopisch durch architektonische und zytologische Kriterien von gewöhnlichen Nävi unterscheidet und als möglicher Melanompräkursor beurteilt wird.

## 1.4 Das maligne Melanom

Das Melanom ist der maligne Tumor der Pigmentzellen und entwickelt sich in über 90% der Fälle als Primärtumor an der Haut, ausgehend von den Melanozyten der basalen Epidermis. Daneben können Melanome ihren Ursprung auch von Pigmentzellen der Dermis, der Schleim- und Hirnhäute, der Uvea und Retina, des Innenohrs und des Gastrointestinaltrakts nehmen. Derzeit gilt das Melanom als der Tumor mit der weltweit am schnellsten zunehmenden Inzidenz, wobei diese erheblichen Schwankungen mit einer

Inzidenz von 0,6/ 100.000/ Jahr in Hongkong bis etwa 50/ 100.000/ Jahr in Queensland, Australien, unterliegt (Balch et al., 1992). In Deutschland wird die Inzidenz des Melanoms mit 10- 12/100.000/ Jahr angegeben (Garbe und Blum, 2001). Die meisten Melanome werden in der Altersgruppe der 50- bis 60-jährigen diagnostiziert (Garbe und Blum, 2001).

#### **1.4.1 Ätiopathogenese des malignen Melanoms**

Bei der Ätiopathogenese des Melanoms spielen unterschiedliche Risikofaktoren eine Rolle (aus: Fritsch, P.: Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas, S. 586, Springer Verlag Berlin, 1998)

##### **Dispositionelle Faktoren**

- ethnische Zugehörigkeit (Weiße)
- Hauttyp (helle Hauttypen; keine oder geringe Pigmentierung nach Sonnenexposition; „irisch-keltischer Typ“)
- Haar- und Augenfarbe (blonde, rotblonde Haarfarbe, blaue Augen)
- Geschlecht (weiblich)
- Melanom in der Familienanamnese
- Albinismus
- Gestörte DNA-Reparatur (Xeroderma Pigmentosum)

##### **Erworbene Faktoren**

- Anamnese von Sonnenbränden
- hoher sozio-ökonomischer Status
- Immundefizienz

##### **Vorläuferläsionen**

- Gesamtzahl melanozytärer Nävi
- atypische Nävi
- große kongenitale Nävi

Den weitaus größten Einfluss auf die Melanomentstehung hat nach heutiger Kenntnis das UV-Licht (Weinstock, 1996). Dabei ist weniger die Dauerexposition entscheidend, sondern es scheint die intermittierende Sonnenbestrahlung zu sein, die als wichtigster exogener Faktor bei der Ätiopathogenese des Melanoms von Bedeutung ist (Holman et al., 1986; Nelemans et al., 1993; Bentham und Aase, 1996). Hiermit lässt sich ansatzweise auch das gehäufte Auftreten des Melanoms in sozio-ökonomisch höheren Schichten erklären

(Fernreisen, Strandurlaub). Die geschlechterspezifisch gehäufte Lokalisation des Melanoms an Körperregionen, die nur gelegentlich der Sonne ausgesetzt sind, wurde ebenfalls als Indiz für die Bedeutung intermittierender Sonnenstrahlung aufgeführt: Während sich beim Mann in etwa 55% der Melanome am Stamm und Rücken befinden (freier Oberkörper im Sommer), kommen Melanome bei der Frau insbesondere an der unteren Extremität vor (Röcke im Sommer) (Osterlind et al., 1988; Bentham und Aase, 1996; Berwick, 1998). Es gilt heute als gesichert, dass insbesondere die UV-Belastung im Kindes- und Jugendalter für das Melanomrisiko bedeutsam ist (Elwood, 1992, Garbe et al, 1994, Wiecker et al., 2003). In Studien konnte gezeigt werden, dass fünf oder mehr schwere Sonnenbrände während der Kindheit oder Adoleszenz das Risiko, an einem Melanom zu erkranken, mehr als verdoppeln (Weinstock, 1996).

#### **1.4.2 Klinik und Histologie des malignen Melanoms**

Das histologische Bild des Melanoms ist außerordentlich vielgestaltig. Nach einem gebräuchlichen histologischen Klassifikationssystem werden Melanome in vier Haupttypen eingeteilt, von denen das superfiziell spreitende Melanom (SSM) mit einer relativen Häufigkeit von ca. 60% den größten Anteil ausmacht. Es folgen das noduläre Melanom (20%), das Lentigo maligna Melanom (10%) sowie das akrolentiginöse Melanom (5%). Den Rest bilden unklassifizierbare Melanome, Schleimhautmelanome und Melanome innerer Organe. Bei der mikroskopischen Beurteilung und Diagnosestellung des Melanoms sind eine Vielzahl von Gesichtspunkten zu berücksichtigen, die nach Ackermann et al. (1994) in histoarchitektonische und zytologische Kriterien unterteilt werden können:

##### **Architektur der Pigmentläsion**

- Asymmetrie
- unscharfe Begrenzung im Randbereich
- fehlende Reifung/ Maturation der Pigmentzellen in der tieferen Dermis
- Melanozytennester unterschiedlicher Größe und Form, in ungleichmäßigen Abständen voneinander gelegen
- Konfluenz der Melanozytennester
- Melanozyten in suprabasalen epidermalen Zellschichten
- Überwiegen von melanozytären Einzelzellen gegenüber zu Nestern aggregierten Melanozyten
- Pigmentzellausbreitung innerhalb der epithelialen Adnexstrukturen

### **Zytologische Veränderungen**

- Zellpolymorphie, Kernpleomorphie
- vergrößerte Kern-Plasma-Relation
- nekrotische Melanozyten

### **1.4.3 Prognose des malignen Melanoms**

Eine Vielzahl von Einflussgrößen ist ausschlaggebend für die Prognose des Melanoms. Als wichtigster prognostischer Faktor gilt die maximale Tumordicke nach Breslow (Breslow, 1975; Balch et al. 2001). Die Tumordicke wird am histologischen Schnittpräparat bestimmt und entspricht der Distanz vom Stratum granulosum der Epidermis zum unteren Tumorrand. Prognoseverschlechternd bei gleicher Tumordicke wirkt sich eine Ulzeration des Primärtumors aus (Balch et al., 2001). Daneben erweist sich auch die maximale Eindringtiefe nach Clark als prognostischer Faktor (Clark et al., 1969). Diese drückt aus, welche histologischen Schichten der Haut von der Tumorinvasion erfasst werden, korreliert aber insgesamt weniger gut mit der Prognose als die Tumordicke (Balch et al., 2001). Einen signifikanten Einfluss auf die Prognose hat auch das Geschlecht des Patienten: Männer haben insgesamt eine schlechtere Prognose als Frauen (Garbe et al., 2002; Balch et al., 2001). Als weitere Prognosefaktoren sind das Alter des Patienten und die Lokalisation des Primärtumors anzuführen: Als Risikolokalisationen mit schlechter Prognose gelten oberer Stamm, Oberarme, Hals und Kapillitium, wohingegen Melanomen am unteren Stamm, an den Extremitäten und im Gesicht eine bessere Prognose beigemessen wird (Garbe et al., 1990). Bei Immundefizienz (Chemotherapie, Transplantation, HIV-Infektion) besteht ein erhöhtes Melanomrisiko (Greene et al., 1981, Rasokat et al., 1989) und es werden z.T. raschere Verläufe beobachtet. In Anbetracht dieser Einflussgrößen variiert die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Diagnosestellung zum Teil beträchtlich und reicht von  $94 \pm 2\%$  für Patienten im Tumorstadium T1a ohne Lymphknotenbefall bis  $44 \pm 5,5\%$  im Tumorstadium T4b mit Lymphknotenbefall. Davon abzugrenzen ist das Vorliegen von Fernmetastasen, wobei hier die 1-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit je nach Metastasenlokalisierung nur noch zwischen 59% und 41% liegt (Balch et al, 2001).

## **1.5 Interaktion von Melanozyten mit ihrer Umgebung**

Als Ausgangspunkt für die vorliegende Untersuchung dienen Hinweise, dass die molekulare Interaktion von Melanozyten mit ihrer Umgebung eine Rolle bei der Melanompathogenese spielen könnte. Zunächst soll aber zusammengefasst werden, was über die Beziehung von Melanozyten zu ihrer Umgebung bekannt ist.

Wie bereits erwähnt, liegt der Melanozyt nach Abschluss seiner embryonalen Einwanderung im Stratum basale der Epidermis und findet sich hier, umgeben von Keratinozyten, in direkter Nachbarschaft zur Basalmembran. Für die Aufrechterhaltung seiner normalen Funktionen (Homöostase) ist er auf ein konstantes physiologisches Milieu angewiesen, zu dem u.a. lösliche Faktoren (Zytokine) einen wichtigen Beitrag leisten. Keratinozyten regulieren durch parakrin sezernierte Wachstumsfaktoren, v.a. FGF-2 (fibroblast growth factor), die Melanozytenproliferation (Halaban et al., 1988b). Auch ein Einfluss von durch die Basalmembran diffundierenden Signalmolekülen der Dermis ist denkbar. Die unter physiologischen Bedingungen strikte Ortständigkeit der Melanozyten in der epidermalen Basalzellschicht wirft die Frage auf, welche Adhäsionsstrukturen die Zellen in ihrer Umgebung verankern. Direkte molekulare Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte werden durch Adhäsionsmoleküle hergestellt (Edelman und Crossin, 1991). Hierbei handelt es sich in der Regel um Transmembranproteine, die aus einem extrazellulären Anteil für die Bindung an die betreffenden Liganden und einer intrazellulären Domäne, verankert im Zytoplasma, bestehen. Zwei Klassen von Adhäsionsmolekülen sind von besonderer Bedeutung: Cadherine und Integrine. Bei den Cadherinen, die die direkte Zell-Zell-Adhäsion gewährleisten, handelt es sich um homophile calciumabhängige Zelloberflächenglykoproteine (Takeichi, 1991, 1995; Tepass, 1999). Die klassischen Cadherine wie E- (epithelial), P- (placental) und N- (neural) Cadherin bestehen aus fünf extrazellulären Domänen und einem zytoplasmatischen Anteil, der am Aktin- Zytoskelett verankert ist (Takeichi, 1990; Yap et al., 1997). Für die intrazelluläre Bindung an Intermediärfilamente ist die Anwesenheit von Cateninen entscheidend, die den Kontakt zwischen zytoplasmatischer Domäne der Cadherine und Zytoskelett überbrücken und so den Erhalt der Gewebsintegrität ermöglichen (Rubinfeld et al., 1997).

Der Kontakt zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix, z.B. Basalmembran, wird durch Integrine vermittelt. Integrine bilden die größte Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle und sind universell auf allen Körperzellen, mit Ausnahme der Erythrozyten, zu finden. Es handelt sich um heterodimere Transmembranmoleküle, die jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut sind (Hynes, 1992).

### **1.5.1 Melanozytäre Adhäsionsmoleküle**

1994 identifizierten Tang und Mitarbeiter E-Cadherin als das Hauptadhäsionsmolekül zur Interaktion zwischen Melanozyten und Keratinozyten (Tang et al., 1994). Ein weiteres Adhäsionsmolekül, das möglicherweise im Rahmen der melanozytären Tumorentwicklung Einfluss erlangt, ist N-Cadherin (Haass et al. 2004). ICAM-1, ein Adhäsionsmolekül der Immunoglobulin-Superfamilie, ist häufig mit entzündlichen Prozessen assoziiert.

Immunhistochemisch konnte dieses Adhäsionsmolekül nicht in der basalen Epidermis (also auch nicht in normalen Melanozyten) nachgewiesen werden; es kommt jedoch regelmäßig in Nävi wie auch in Melanomen vor (Tronnier et al., 1997).

Der molekulare Kontakt zwischen Melanozyten und Basalmembran ist bislang erst lückenhaft geklärt. Frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten so genannte „dense plates“, die, analog zur hemidesmosomalen Plaque bei Keratinozyten, den Kontakt zwischen Melanozyten und Basalmembran repräsentieren sollen (Odland, 1958; Tarnowski, 1970, Briggaman und Wheeler, 1975). Diese Strukturen wurden in der Folgezeit in der Literatur jedoch nicht mehr erwähnt, ein molekulares Korrelat wurde nicht beschrieben. Lichtmikroskopische immunhistochemische Daten zur Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen sind nur eingeschränkt verwertbar, da die Melanozyten in entsprechenden Färbungen nicht sicher von Keratinozyten zu unterscheiden sind. In immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$  und  $\beta 1$  auf der melanozytären Oberfläche nachgewiesen werden (Zambruno et al., 1991). Zambruno et al. (1993) wiesen auf Melanozyten in vitro  $\alpha 3\beta 1$ -,  $\alpha 5\beta 1$ -,  $\alpha 6\beta 1$ - und  $\alpha V\beta 3$ - Integrin nach. Bei der Bewertung von Zellkulturexperimenten ist allerdings zu bedenken, dass das in vitro nachweisbare melanozytäre Antigenprofil nicht immer der in vivo Situation entspricht. Dies erklärt sich z.T. durch die in vielen Melanozyten- Kulturmedien verwendeten unphysiologischen Mitogene wie Phorbol ester (TPA) (Danen et al., 1996). Andere Autoren wiesen auf Melanozyten in vitro  $\alpha 2\beta 1$ - und z.T. auch  $\alpha 4\beta 1$ - Integrin nach (Danen et al. 1996). Experimente mit nicht-melanozytären Zellen (Chorionkarzinom-Zellen, K562-Zellen) unter Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen Integrin- Untereinheiten zeigten, dass die Integrine  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$  potentielle Rezeptoren für zwei wichtige Lamininisoformen (Laminin-1 und Laminin-5) der epidermalen Basalmembran sind (Sonnenberg et al., 1990, Hall et al., 1990, Delwel et al., 1994).  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin bindet an Kollagen IV (Vanderberg et al., 1991, Kern et al., 1993), einen weiteren Bestandteil der Basalmembran, gleichzeitig ist es aber auch ein Bindungspartner für Laminin und Fibronectin (Kirchhofer et al., 1990). Unklar ist die Rolle der Fibronectin-bindenden Integrine  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha V\beta 3$  in vivo, da Fibronectin innerhalb der epidermalen Basalmembran nicht vorkommt. Der Verbindung zu diesem dermalen Glykoprotein der extrazellulären Matrix könnte möglicherweise eine wichtige Rolle für Wundheilungsprozesse oder melanozytäre Tumoren zukommen, da in diesen Situationen melanozytäre Zellen mit dermalen ECM in direktem Kontakt stehen.

### **1.5.2 Melanozytäre Adhäsionsmoleküle unter UV-Einfluss**

Nur wenige Daten liegen bisher zum Einfluss von UV-Licht auf die Expression melanozytärer Oberflächenmoleküle vor. Dies verwundert angesichts der wichtigen Rolle, die der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion für die Entstehung maligner Tumoren in unterschiedlichen Geweben zugesprochen wird. Den Einfluss von UV-Licht auf die Expression von E-Cadherin auf Melanozyten *in vitro* untersuchten Nakazawa et al. (1995a) und Seline et al. (1996). Nakazawa et al. fanden 24 h nach UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>) keine Änderung der Expression von E-Cadherin. Seline et al. zeigten dagegen eine Abnahme der E-Cadherin-Expression 24 h nach UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>). Eine wichtige neuere Arbeit untersuchte den Einfluss von Endothelin-1, einem neben FGF-2 bedeutsamen physiologischen Mitogen für Melanozyten. Die Produktion dieses Moleküls durch Keratinozyten ist unter UVB-Einfluss deutlich gesteigert, wodurch wiederum E-Cadherin auf Melanozyten indirekt herunterreguliert wird (Jamal und Schneider, 2002).

Den Einfluss von UVB auf die Integrinexpression *in vitro* untersuchten bislang nur Neitmann et al. (1999). Immunhistochemisch konnte hier eine Zunahme der Integrinexpression von  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha V\beta 3$  nachgewiesen werden; durchflusszytometrisch war der Effekt nur für  $\alpha 5\beta 1$  erkennbar, jedoch nicht signifikant. Die Integrine  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und E-Cadherin wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

## 1.6 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation habe ich die Expression von insgesamt zehn wichtigen melanozytären Adhäsionsmolekülen untersucht, die im Rahmen der Melanozyten-Homöostase oder frühen Schritten der melanozytären Tumorentwicklung eine Rolle spielen könnten (Tab. 1.3). Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat UVB-Licht auf die Expression dieser Adhäsionsmoleküle?
2. Welchen Einfluss haben Matrixmoleküle (alleine bzw. zusammen mit UVB-Licht) auf die Expression dieser Moleküle?
3. Welchen Einfluss hat die Kokultur von Melanozyten mit Keratinozyten auf die Expression dieser Moleküle?

Antikörper	Isotyp	Klon	Firma/ Katalog- Nr.
$\alpha$ 2-Integrin	Maus IgG1	16B4	DPC Biermann/ SM1134P
$\alpha$ 3-Integrin	Maus IgG1	ASC- 1	Chemicon/ MAB2056
$\alpha$ 5-Integrin	Maus IgG2b	SAM- 1	DPC Biermann/ SM1131P
$\alpha$ 6-Integrin	Maus IgG2b	4F10	DPC Biermann/ SM1132P
$\alpha$ V-Integrin	Maus IgG1	P3G8	Chemicon/ MAB1953Z
$\beta$ 1-Integrin	Maus IgG1	4B7R	DPC Biermann/ SM1578P
$\beta$ 3-Integrin	Maus IgG1	PM6/13	DPC Biermann/ SM1147P
ICAM-1	Maus IgG1	15.2	DPC Biermann/ SM1156P
E-Cadherin	Maus IgG1	67A4	Chemicon/ MAB3199
N-Cadherin	Maus IgG1	GC- 4	Sigma/ C 2542

Tab.1.3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Primärantikörper

## 2 Material und Methoden

Meine Arbeit lässt sich methodisch im Wesentlichen in zwei Teilbereiche gliedern: Zum einen habe ich an Melanozyten-Monokulturen die Expression von Adhäsionsmolekülen in Abhängigkeit von einer UVB-Bestrahlung sowie in Abhängigkeit von verschiedenen Matrixbeschichtungen durchflusszytometrisch gemessen. Als charakteristischen Vertreter der ECM wurden für die Beschichtung Laminin-1 (Basalmembran) bzw. Fibronectin (dermale ECM) ausgewählt, da diese Moleküle für melanozytäre Funktionen in vitro von besonderer Bedeutung sind (Mortarini et al., 1995; Hedley et al., 1996). Zum zweiten wurde an einem Kokulturmodell, bei dem Keratinozyten und Melanozyten zusammen ausgesät und kultiviert wurden, die UV-abhängige Expression derselben Adhäsionsmoleküle immunzytochemisch untersucht.

Für die Untersuchung der Expression der Adhäsionsmoleküle, die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Verbindungen vermitteln, stellt die Durchflusszytometrie eine geeignete Methode dar. Im Gegensatz zu immunzytochemischen Färbungen, bei denen die Intensität der Farbreaktion lediglich in groben Abstufungen mit der Menge des Antigens proportional ist und so nur richtungsweisende Aussagen über die Stärke der Expression erlaubt, ist die Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse (FACS, fluorescence-activated cell sorter) ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen.

Durchflusszytometrische Untersuchungen an Kokulturen von Melanozyten und Keratinozyten sind dagegen technisch problematisch, da diese im FACS nicht als unterschiedliche Zellpopulationen erkannt werden. Aus diesem Grund erfolgte hier die Untersuchung der zellulären Oberflächenmoleküle mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen.

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zellkulturmedien

##### Melanozytenmedium

Melanocyte- growth- medium- M2, Promocell (Heidelberg): definiertes, serum- und TPA-freies Kulturmedium. Eine genaue Zusammensetzung des Mediums gibt die Firma nicht bekannt, ein Hauptbestandteil ist jedoch der Wachstumsfaktor FGF-2 (fibroblast growth factor-2). Das Medium enthält antibiotische Zusätze.

### Keratinozytenmedium

Keratinocyte-SFM (serum-free medium), Gibco/ Invitrogen (Karlsruhe). Eine genaue Zusammensetzung des Kulturmediums gibt die Firma nicht bekannt.

#### **2.1.2 Melanozytenkultur**

Für die Durchführung unserer Versuche verwendeten wir Melanozyten-Primärkulturen der Firma Promocell (normal human epidermal melanocytes M2, NHEM M2, Promocell, Heidelberg). Es handelte sich hierbei um epidermale, aus neonatalem Vorhautgewebe eines hellhäutigen Individuums („Kaukasier“) extrahierte Melanozyten, die in der ersten Passage in kryokonservierter Form geliefert wurden.

Die Zellen wurden zunächst in 10 ml MGM-M2 (melanocyte growth medium-M2; Promocell, Heidelberg) resuspendiert. Nach 2 Tagen Wachstum bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Greiner, Frickenhausen) wurde das Medium erstmals gewechselt und das Anwachsen der Zellen kontrolliert. Nun wurden die Melanozyten so lange kultiviert, bis eine etwa 80%ige Konfluenz erreicht war, wobei ein Mediumwechsel dreimal wöchentlich stattfand.

#### **2.1.3 Passagieren der Melanozyten**

Die Zellen wurden, sobald sie subkonfluent gewachsen waren, auf jeweils drei neue Flaschen aufgeteilt. Hierfür wurde das Kulturmedium zunächst abgesaugt und durch einmaliges Spülen mit PBS (Phosphate Buffered Saline ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, Cambrex, Verviers, Belgien) ausgewaschen. Nach Zugabe von 7,5 ml 0,025%-igem Trypsin (Trypsin/ EDTA Solution, Sigma, Heidenheim) lösten sich die Melanozyten im Wärmeschrank bei 37°C innerhalb von 5 min nahezu vollständig vom Plattenboden. Durch Zugabe von 7 ml TNS (Trypsine Neutralizing Solution, TNS, Clonetics Cell Systems, Remagen) wurde die proteolytische Aktivität des Trypsins abgesättigt und die Zellsuspension anschließend in ein 50 ml Kunststoffröhrchen (Greiner, Frickenhausen) aufgenommen. Das Abzentrifugieren der Zellen erfolgte bei 96g<sub>n</sub> für 3 Minuten. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt, das Zellpellet in 3 ml Kulturmedium resuspendiert und jeweils 1 ml auf drei neue Kulturflaschen verteilt.

Um in unseren Versuchen möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen, benutzten wir durchweg Melanozyten in ähnlichen Passagen. Hierfür wurden die Zellen nach Expansion zum Teil zunächst weggefroren.

### 2.1.4 Wegfrieren und Auftauen von Melanozyten

Zum Einfrieren der Melanozyten wurden diese zunächst wie oben beschrieben trypsiniert und das Zellpellet abzentrifugiert. Die anschließende Aufschwemmung des Pellets erfolgte mit 1 ml eiskaltem Einfriermedium (Cryoprotective Medium, Bio Whittaker/Cambrex, Apen). Die Zellsuspension wurde dann in auf Eis stehende Einfriercups überführt und die Zellen zunächst bei minus 70 °C tiefgefroren. Nach 48 h erfolgte das Überführen in flüssigen Stickstoff (-196 °C).

Für das Auftauen tiefgefrorener Zellen wurden diese aus dem Stickstoff genommen und durch einmaliges, kurzes Öffnen des Einfriercupdeckels der darin befindliche Überdruck abgelassen. Im 37 °C warmen Wasserbad wurde das Röhrchen mit den gefrorenen Zellen so lange geschwenkt, bis ca. 90% der Melanozyten aufgetaut waren. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette aufgenommen und in das bereits erwärmte Kulturmedium einer 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel; zu diesem Zeitpunkt sollten ungefähr 70% der Zellen angewachsen sein.

### 2.1.5 Beschichtung der Kulturplatten

Um den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Expression von Adhäsionsmolekülen zu untersuchen, kultivierten wir einen Teil der Melanozyten auf mit Laminin-1 bzw. Fibronectin beschichteten Kulturplatten.

Hierfür wurde Laminin-1 (Sigma, Taufkirchen) in Hepes-Puffer (N-2'-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure, Clonetics, Verviers, Belgien) bzw. Fibronectin (Sigma, Taufkirchen) in steril filtriertem destilliertem Wasser angesetzt (20 µg/ml bzw. 30 µg/ml) und von dieser Lösung 1 ml pro Feld (9,5 cm<sup>2</sup>) einer 6-well-Platte (Greiner, Frickenhausen) gegeben. Die so befüllten Platten wurden nun für 24 h im Kühlschrank gelagert. Es folgte das Absaugen und ein einmaliges Waschen mit PBS, bevor die Platten für eine Stunde bei 37°C mit 1 ml 3% BSA (Bovine serum Albumine, Sigma, Taufkirchen) in Hepes überschichtet wurden. Hierdurch wurden unspezifische, d.h. nicht durch Laminin-1 bzw. Fibronectin abgesättigte Bindungsstellen der Plastikoberfläche blockiert. Dann wurde mit PBS das nicht gebundene BSA ausgewaschen und die Melanozyten nun in einer Dichte von etwa 20.000/cm<sup>2</sup> (Kontrolle in Neubauer-Zählkammer) ausgesät. Nach 48-stündiger Kultur erfolgte die UVB-Bestrahlung.

## 2.2 Kokultur aus Keratinozyten und Melanozyten

In diesem Versuchsansatz wurde untersucht, inwieweit eine gemischte Zellkultur, bestehend aus Melanozyten und Keratinozyten, die Expression melanozytärer Oberflächenmoleküle beeinflusst.

Die für unsere Experimente genutzten Keratinozyten wurden in kryokonservierter Form in der ersten Passage bei der Firma Cambrex (Verviers, Belgien) gekauft. Analog zu den Melanozyten wurden auch die Keratinozyten in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen vermehrt, wobei der Mediumwechsel jeden zweiten Tage erfolgte (Serum- Free Keratinocyte Medium K- SFM, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe). Da nach unseren Beobachtungen die Keratinozyten in der Zellkultur im Vergleich zu Melanozyten eine relativ kurze Lebensdauer aufwiesen (8 bis 10 Passagen), verwendeten wir durchweg Zellen früher Passagen (Passage 4-7). Für die Kokultur wurden die Keratinozyten auf Chamberslides verteilt (Falcon, Becton- Dickinson, Heidelberg). Durch Zugabe von Calciumchlorid in das Kulturmedium modifizierten wir die Calciumkonzentration im Keratinozytenmedium (0,09 mM bzw. 1,5 mM). Nach zwei Tagen, in denen das Anwachsen der Keratinozyten gesichert war, wurden die Melanozyten im Verhältnis 1:5 zu den Keratinozyten hinzugesät und die Kokultur bis zum subkonfluenten Wachstum unter Verwendung von Keratinozytenmedium weiterkultiviert. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass Keratinozyten eine „Ammenfunktion“ für die Melanozyten übernehmen, so dass diese ohne spezielles Melanozytenmedium durch von Keratinozyten produzierte Wachstumsfaktoren ernährt werden.

## **2.3 UV-Bestrahlung**

### **2.3.1 UV-Lichtquelle**

Wir führten die Bestrahlung mit einem UV-Monochromator durch. An dem Gerät (Dermolum<sup>®</sup>, Müller Elektronik-Optik, Moosinning) kann mittels einer speziellen Gitterfiltertechnologie die Wellenlänge des austretenden Lichtes, das von einer 1 kW Xenonlampe mit sonnenähnlichem Spektrum emittiert wird, im Bereich von 270 bis 700 nm stufenlos eingestellt werden. Dabei ist die Bandbreite von 5 bis 80 nm variierbar. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Zentralwellenlänge von 297,5 nm mit einer Bandbreite von 35 nm, d.h. mit einem Spektrum von 280 bis 315 nm. Dies entspricht dem unteren UVB-Anteil des Sonnenlichtes. Die UV-Dosis wurde mit einem PRC-Photometer (Photometry, Radiometry, Colorimetry, Krochmann, Berlin) gemessen.

### **2.3.2 Festlegung der UV-Dosis**

In Vorversuchen ließ sich zeigen, dass ab einer Bestrahlungsdosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB nach 24 h zahlreiche Zellen frei im Kulturmedium flottierten. Mittels Trypanblauinklusion konnte der Anteil abgestorbener Zellen in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert werden und stellte sich im untersuchten Dosisbereich in etwa linear dosisabhängig dar (10 mJ/cm<sup>2</sup> 24 h p.i. ca. 15%, 15 mJ/cm<sup>2</sup> 24 h p.i. ca. 18%, 20 mJ/cm<sup>2</sup> 24 h p.i. ca. 30%).

Daraus lässt sich ableiten, dass bereits bei dieser Dosis UV-Effekte wirksam sind und den Anteil adhärenter, d.h. vitaler Zellen, an der Gesamtzellzahl reduzieren. Vor diesem Hintergrund wählten wir eine Bestrahlungsdosis von  $5 \text{ mJ/cm}^2$  für die Basisuntersuchungen an unseren Melanozyten. Bei dieser Dosis ist aufgrund der Vorversuche davon auszugehen, dass eventuelle Änderungen der Immunreaktivität tatsächlich nicht durch Verlust der Zellintegrität beeinflusst werden. Gleichzeitig führten wir jedoch auch für alle zu untersuchenden Oberflächenmoleküle Messreihen mit höheren Bestrahlungsdosen durch ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ ). Hierdurch sollte untersucht werden, ob sublethale UV-Dosen, wie sie in vivo bei einem Sonnenbrand wirksam sein dürften, zu spezifischen Effekten für einzelne Adhäsionsmoleküle führen.

### **2.3.3 Bestrahlung der Melanozyten**

Für die Bestrahlung wurde das Kulturmedium zunächst abgesaugt und durch Spülen mit PBS ausgewaschen. Pro Feld der 6-well-Platte wurde 1 ml PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (130 mg/l; Cambrex/ Biowhittaker, Apen) vorgelegt. Dann erfolgte (bei UV-undurchlässiger Abdeckung der nicht zu bestrahlenden Felder) die UVB-Bestrahlung mit 280- 315 nm zunächst mit  $5 \text{ mJ/cm}^2$ , später auch mit 10 bzw.  $20 \text{ mJ/cm}^2$ . In jedem Versuchsansatz blieb die Hälfte der Kulturplatten zum Vergleich unbestrahlt.

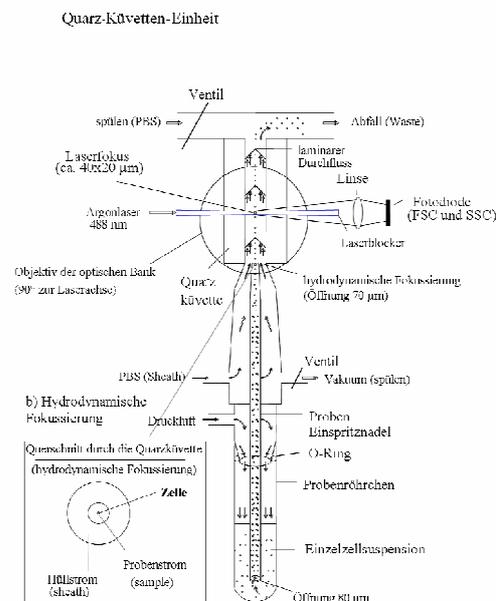
## **2.4 Durchflusszytometrie**

Die durchflusszytometrische Messung der Melanozyten erfolgte in der Regel 24 h nach der UVB- Bestrahlung. Hierfür wurden die Zellen wie folgt vorbereitet: Für die Messung der Integrine und ICAM-1 konnten die Melanozyten wie oben beschrieben mit 0,025%-igem Trypsin abgelöst werden. Für die Messung der Cadherine war eine Ablösung mit calciumhaltigem Puffer ohne EDTA erforderlich, da Cadherine in Abwesenheit von Calcium durch Trypsin rasch abgebaut werden (Takeichi, 1977, 1988). Daher wurde für diese Messungen 2,5%-iges Trypsin ohne EDTA in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  (Cambrex/ Biowhittaker, Apen) verwendet. Die Ablösung erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  in ca. 30- bis 45 min.

Auf eine möglichst große Zellausbeute mit einem Zielwert von etwa 100.000 Zellen pro ml war zu achten (Kontrolle in Neubauer-Zählkammer). Jeweils 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit 10  $\mu\text{l}$  des jeweiligen primären Antikörpers (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 10 min (Raumtemperatur) inkubiert. Die verwendeten Antikörper wurden bereits in Tab. 1.3, S. 12, aufgelistet. Sie wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Bei allen von uns verwendeten Primäantikörpern handelte es sich um unkonjugierte Antikörper, also Antikörper, an die der Fluoreszenzfarbstoff nicht direkt gekoppelt war. In einem weiteren Schritt wurden sie mit einem fluoreszenzmarkierten

Sekundärantikörper (Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- F(ab')<sub>2</sub> Ziege- anti- Maus, Dako, Hamburg) inkubiert (Konzentration 20µg/ml, 10 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit). Zwischen bzw. nach den beiden Inkubationsschritten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Für die Untersuchungen stand uns das Durchflusszytometer EPICS/XL-MCL, Coulter-Immunotech, Hamburg, des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, zur Verfügung, dass wir freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Herrn Privatdozent Dr. P. Schlenke nutzen durften.

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) ist ein Verfahren zur quantitativen Messung von Zelloberflächenmolekülen. Grundlage ist eine Antigen-Antikörper Reaktion mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Als typische Fluorochrome dienen hierbei Fluorescein-Isothiozyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Die Lichtquelle besteht aus einem luftgekühlten Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, dessen Strahl durch Linsensysteme in eine elliptische Form gebracht wird. Soll die Zelle vollständig und gleichmäßig beleuchtet werden, muss sie direkt mittig durch den Laserstrahl fließen, damit die Fluorochrome maximal angeregt und das Licht direkt partikelabhängig gebeugt wird. Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen in Suspension, umgeben von einem inneren Proben- und einem äußeren Hüllstrom, durch die Messzelle des Durchflusszytometers geleitet. Durch den höheren Druck des äußeren Hüllstroms wird der innere Probenstrom zu einem dünnen Faden ausgezogen, in dem die Zellen perlschnurartig hintereinander aufgereiht den Laserstrahl im rechten Winkel kreuzen.



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Prinzips der Durchflusszytometrie (aus: Internet; <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)**

Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese in ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Spezielle Photodetektorsysteme registrieren die ermittelte Photonenkonzentration, die sich proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers pro Zelle verhält. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns) der Zellen gewonnen, die das Durchflusszytometer durch Detektoren für das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht der Zellen erhält.

Es wird nur der Teil der Einzelereignisse zur Fluoreszenzmessung herangezogen, der sich am Bildschirm gezielt anhand der Streulichteigenschaften als vitale Zellpopulation eingrenzen lässt.

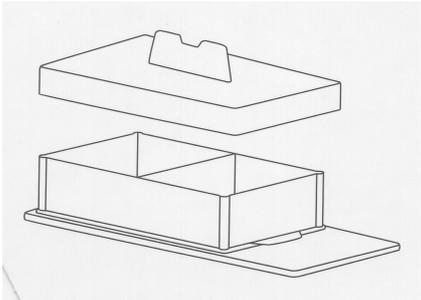
In den vorliegenden Versuchen wurden als Negativkontrollen jeweils Färbungen mit dem Sekundärantikörper allein (als Maß für die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers) und mit einem Isotyp- Antikörper (als Maß für die unspezifische Bindung von Maus- Immunglobulinen) mitgeführt. Diese Kontrollen zeigten eine jeweils sehr schwache Fluoreszenz, deren Ausmaß zur Definition des Schwellenwertes für positive Immunreaktivität (maximal 2% unspezifische Bindung) diene.

## 2.5 Immunzytochemie

### 2.5.1 Kokultur in Chamber-Slides

Für die immunzytologischen Untersuchungen verwendeten wir die unter 2.2

beschriebenen Kokulturen aus Melanozyten und Keratinozyten. Die Kultur der Zellen



erfolgte in diesem Fall statt in Gewebekulturflaschen bzw. 6-well-Platten auf Chamberslides: Hierbei handelt es sich um ein Zwei- Kammersystem aus Polystyrol, das einem Glasobjektträger aufsitzt und mit einem Deckel verschlossen werden kann (Abb. 2.2). Jede Kammer ist etwa  $3,7 \text{ cm}^2$  groß. Die Vorbereitung bzw.

Bestrahlung selbst erfolgte wie unter 2.3.3 beschrieben.

**Abb. 2.2: Chamber-slide (Falcon, Becton- Dickinson, Heidelberg)**

Durch die Kultur in Chamberslides waren die Zellen bei der Bestrahlung sauber getrennt, so dass immer nur eine Kammer des Chamberslides isoliert bestrahlt werden konnte. Die Plastikkammern konnten nach Bestrahlung und Fixierung der Zellen problemlos von den

Objektträgern gelöst werden und diese im Anschluss direkt für die Färbungen genutzt werden. Die Bestrahlung der Kokulturen erfolgte bei 280- 315 nm mit 20 mJ/cm<sup>2</sup>.

### 2.5.2 Fixieren der Zellen

Das Fixieren der Zellen erfolgte in einem Methanol-Aceton-Gemisch (70:30). Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Ränder der Chamberslides gelöst, so dass lediglich die Zellen auf den Objektträgern verblieben. Diese wurden für 5 min in PBS gewaschen und dann für weitere 5 min in Methanol/Aceton fixiert. Die immunzytologischen Färbungen erfolgten jeweils direkt im Anschluss an die Fixierung.

### 2.5.3 Immunzytologische Färbung

Das Prinzip der Immunzytochemie besteht aus einer spezifischen Bindung von Antikörpern an zelluläre Antigene, die dann durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Nachdem der primäre Antikörper an das Antigen gebunden hat, wird er mit einem Sekundärantikörper (Brückenantikörper) markiert. Abbildung 2.3 zeigt schematisch die Komplexbildung aus alkalischer Phosphatase und Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, wie sie der APAAP- Methode (Alkalische Phosphatase- Anti-Alkalische Phosphatase) zugrunde liegt. Die Bindung erfolgt über einen Brückenantikörper, der den Primärantikörper mit dem APAAP-Enzym-Immunkomplex verbindet. Anschließend wird durch eine Enzym-Substrat-Reaktion eine Färbung zum sichtbaren Nachweis erreicht.

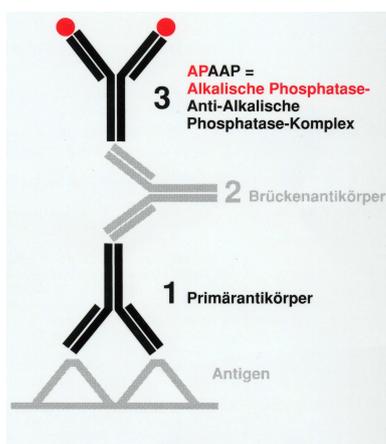


Abb. 2.3: Schematische Darstellung zum Prinzip der APAAP-Methode (aus: Handbuch Immunchemische Färbemethoden, Dako Cytomation, 3. Aufl. 2003)

Nach dem Fixieren der Zellen und zehnmütigem Waschen der Objektträger in Tris-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:50 verdünnt) für 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Die verwendeten Primärantikörper entsprachen den für die in der Durchflusszytometrie verwendeten (Tab. 1.3). Für  $\alpha 6$ -Integrin wurden noch zwei weitere Primärantikörper alternativ angewendet. Dabei handelte es sich um einen monoklonalen Ratte-anti-Mensch-Antikörper gegen das  $\alpha 6$ -

Integrin (Isotyp Ratte IgG2a, Klon NKI-GoH3, Chemicon, Ternecula, Kalifornien/USA) sowie um einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne der Integrin-Untereinheit  $\alpha 6A$  (Isotyp Maus MAB1356, Klon 1A10, Chemicon, Ternecula, Kalifornien/USA). Für diese zwei Antikörper wurde auch ein alternatives Fixierungsprotokoll mit Formalin benutzt (gepuffertes Formalin 4% in PBS).

Zum Abwaschen der überschüssigen Antikörperlösung wurden die Objektträger jeweils nach der Inkubation mit einem Antikörper für 5 min in Tris- Puffer gestellt. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper Kaninchen Anti- Maus (1:25, Dako, Hamburg) für 30 min (Raumtemperatur) und erneutem Spülen in Tris-Puffer wurde der APAAP-Komplex (1:50, Dako, Hamburg) dazugegeben. Für die alternativ verwendete Färbung mit dem Primärantikörper GoH3 (Ratte-anti-Mensch, Chemicon, Ternecula, Kalifornien/USA) wurde ein Sekundärantikörper aus dem Kaninchen verwendet (Dako, Hamburg, Verdünnung 1:50). Um die Intensität der Färbung zu steigern wurden nacheinander der Sekundärantikörper als auch der APAAP-Komplex erneut für jeweils 10 min (Raumtemperatur) aufgetragen. Die anschließende Färbung erfolgte in Neufuchsin für etwa 7 min. Zur Kernfärbung wurden die Objektträger für 5 min mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt und anschließend für 5 - 10 min unter fließendem Leitungswasser nachgebläut. Zum Schluss wurden die Objektträger mit Glyceringelatine eingedeckelt. Die Färbungen wurden im Anschluss lichtmikroskopisch beurteilt.

## 2.6 Statistische Auswertung

Mittelwerte und Standardabweichungen der durchflusszytometrischen Daten werden im Ergebnisteil dargestellt. Zur Berechnung gelangten die Messwerte aus sechs, mindestens jedoch drei unabhängigen Versuchen. Die Versuchsanzahl  $n$  sowie die Standardabweichung sind im Ergebnisteil im Text bzw. in den Diagrammen angegeben. In Einzelfällen wird in den Abbildungen das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs gezeigt und ist dann als solches ausgewiesen. Die Signifikanz nach Mann- Whitney wurde im U-Test, einem nicht-parametrischen Test für ungepaarte Stichproben (Computerprogramm SPSS, Version 12.0) errechnet. Speziell für die Auswertung der  $\alpha 6$ -Integrin-Expression an unbestrahlten Melanozyten kam zusätzlich der Test nach Kruskal-Wallis zur Anwendung (siehe 3.4.1).  $p$ -Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet. Bei der Wahl der statistischen Testverfahren wurde ich freundlicherweise von Herrn Dr. Fröhlich aus dem Institut für medizinische Statistik und Dokumentation beraten.

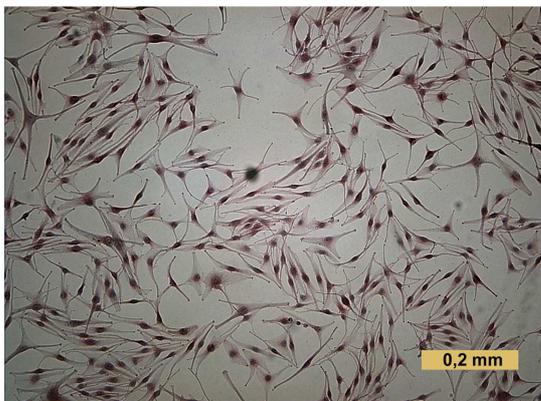
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von UV-Licht auf Melanozyten

Die UVB-Bestrahlung von Melanozyten führte zu dosisabhängigen Auswirkungen auf die Zellmorphologie.

In immunzytochemischen Färbungen fanden wir bei einer Dosis von  $5 \text{ mJ/cm}^2$  24 h p.i. bei mikroskopischer Betrachtung eine vermehrte Pigmentproduktion und eine etwas beschleunigte Vermehrung der Zellzahl im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Diese Effekte von UVB-Licht sind aus der Literatur bekannt und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht quantifiziert (Ranson et al., 1988; Nakazawa et al., 1995b).

Bei Bestrahlungen mit  $10\text{-}20 \text{ mJ/cm}^2$  beobachteten wir zusätzlich einen deutlichen UV-Einfluss auf die Zell-Dendrizität und die Form der Zellkörper. Abbildung 3.1 zeigt vergleichend die Morphologie unbestrahlter (3.1a) und bestrahlter Melanozyten (3.1b). Zu erkennen sind 24 h nach Bestrahlung mit UVB  $20 \text{ mJ/cm}^2$  breite, eher plump wirkende Zellkörper mit sowohl zahlenmäßig verminderten als auch kürzeren, weniger filigranen Dendriten.



**Abb. 3.1a: unbestrahlte Melanozyten-Monokultur**



**Abb. 3.1b: bestrahlte Melanozyten-Monokultur, UVB  $20 \text{ mJ/cm}^2$ , 24 h p.i.**

Neben den beschriebenen Effekten fanden sich bei diesen Bestrahlungsdosen auch zunehmend Zellen, die sich von der Plastikoberfläche der Kulturgefäße gelöst hatten und jetzt frei im Kulturmedium flottierten.

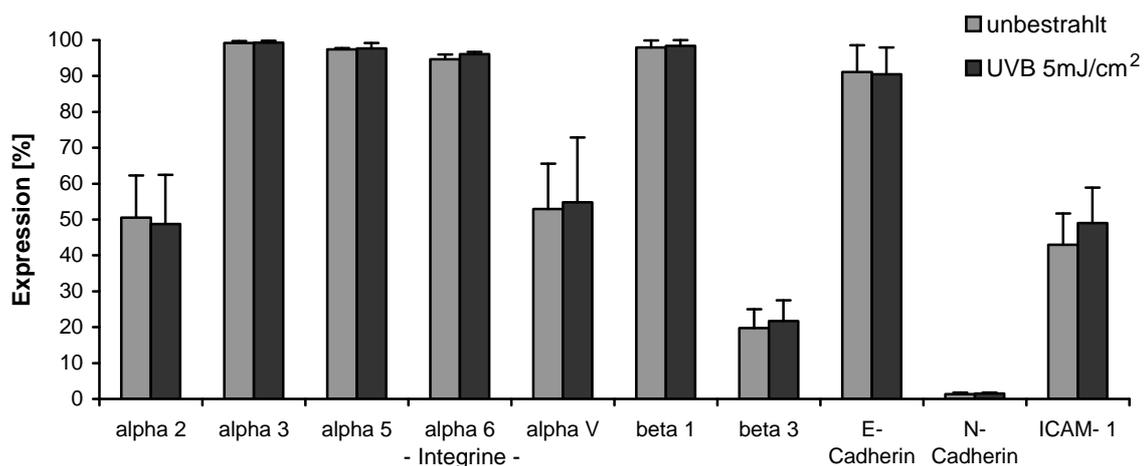
Mittels Trypanblauinklusion in der Neubauer Zählkammer konnte der Anteil abgestorbener Zellen quantifiziert werden und stellte sich im untersuchten Dosisbereich in etwa linear dosisabhängig dar ( $10 \text{ mJ/cm}^2$  24 h p.i. ca. 15%,  $15 \text{ mJ/cm}^2$  24 h p.i. ca. 18%,  $20 \text{ mJ/cm}^2$  24 h p.i. ca. 30%). Die Beschichtung der Kulturplatten mit Laminin-1 führte zu einer höheren Toleranz der Melanozyten gegenüber UVB. 24 h p.i. zeigten die Zellen eine im

Vergleich zu den unbeschichteten Kulturplatten verminderte Ablösung. Auch für Fibronektin war dieser Effekt erkennbar, jedoch in weitaus schwächerem Ausmaß.

## 3.2 Einfluss von UV-Licht auf die Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen

### 3.2.1 Einfluss einer UVB-Bestrahlung mit $5 \text{ mJ/cm}^2$

Die Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen 24 h p.i. mit UVB  $5 \text{ mJ/cm}^2$  zeigte im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen keine signifikanten Unterschiede (s. Anhang, Tab. 7.1). Das Säulendiagramm in Abb. 3.2 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung mit Auftragung der im einzelnen untersuchten Oberflächenmoleküle auf der Abzisse gegenüber der jeweiligen Expressionsstärke in Prozent auf der Ordinate.

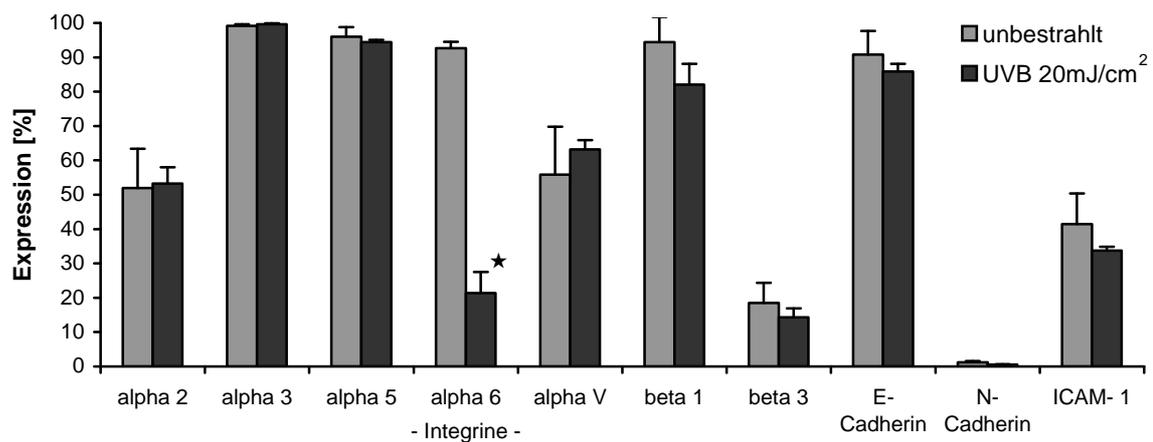


**Abb. 3.2:** Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle; Einfluss einer UVB-Bestrahlung mit  $5 \text{ mJ/cm}^2$  (Messung jeweils 24 h p.i.). Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $n=3$ ; 6 [s.u.]

Bei einigen der untersuchten Adhäsionsmoleküle ( $\alpha 3$ -Integrin,  $\alpha 5$ -Integrin,  $\alpha 6$ -Integrin,  $\beta 1$ -Integrin, N-Cadherin) zeigte sich in drei unabhängigen Messungen eine konstante Expression mit nur geringer Standardabweichung. Andere Adhäsionsmoleküle ( $\alpha 2$ -Integrin,  $\alpha V$ -Integrin,  $\beta 3$ -Integrin, E-Cadherin ICAM-1, ) stellten sich etwas weniger einheitlich dar, so dass hier  $n=6$  Messungen vorgenommen wurden.

### 3.2.2 Einfluss einer UVB-Bestrahlung mit 20 mJ/cm<sup>2</sup>

Um den Einfluss höherer UV-Dosen zu überprüfen erfolgte im Anschluss die durchflusszytometrische Messung melanozytärer Adhäsionsmoleküle bei einer UVB-Bestrahlungsdosis von 20 mJ/cm<sup>2</sup>, 24 h p.i. (Abb. 3.3). Hierbei fanden wir eine signifikante prozentuale Änderung der Expression von  $\alpha 6$ -Integrin ( $p < 0,05$ ). Die Expression aller anderen untersuchten Moleküle blieb auch bei einer UVB-Dosis von 20 mJ/cm<sup>2</sup> weitgehend konstant (s. Anhang, Tab. 7.4).

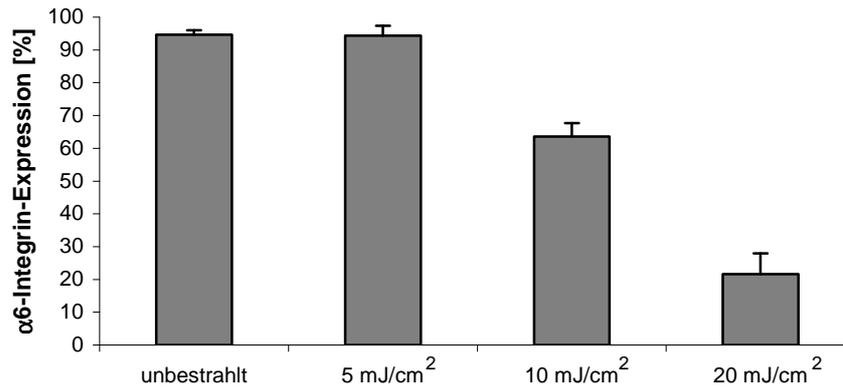


**Abb. 3.3:** Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle; Einfluss einer UVB- Bestrahlung mit 20 mJ/cm<sup>2</sup> (Messung jeweils 24 h p.i.). Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3)

★signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber unbestrahlten Melanozyten

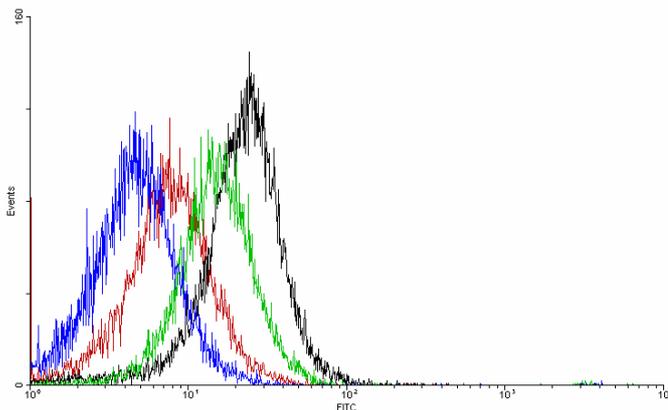
### 3.2.3 UVB-Dosisabhängigkeit der $\alpha 6$ -Integrin-Herunterregulation

Aufgrund der spezifischen Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin wurde nun noch eine mittlere Bestrahlungsdosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> gewählt. Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der  $\alpha 6$ -Integrin-Herunterregulation (Abb 3.4 [Balkendiagramm]).



**Abb. 3.4:**  $\alpha 6$ -Integrin-Expression in Abhängigkeit einer UVB-Bestrahlung (Messung jeweils 24 h p.i.). Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3).

Alternativ zur Darstellung als Balkendiagramm wird hier zusätzlich die Darstellung als sogenanntes Overlay-Diagramm gewählt, die die Dosisabhängigkeit gut veranschaulicht (Abb 3.5).



**Abb. 3.5:** Expression von  $\alpha 6$ -Integrin; unbestrahlt (schwarz, 91,7% positiv), 10 mJ/cm<sup>2</sup> (grün, 67,8% positiv), 20 mJ/cm<sup>2</sup> (rot, 20,9% positiv), Isotypkontrolle (blau, 1% positiv). Originalprotokoll (Histogramm mit WinMDI). Dargestellt ist jeweils das Ergebnis eines repräsentativen Einzelversuches.

### 3.3 Einfluss extrazellulärer Matrixmoleküle auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle

#### 3.3.1 Einfluss extrazellulärer Matrixmoleküle auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle (unbestrahlte Melanozyten)

Weder der Kontakt der Melanozyten zu Laminin- 1 noch der Kontakt zu Fibronectin führte zu einer signifikanten Änderung der Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle bei unbestrahlten Melanozyten (Abb.3.6, siehe auch Anhang, Tab. 7.2 und 7.3).

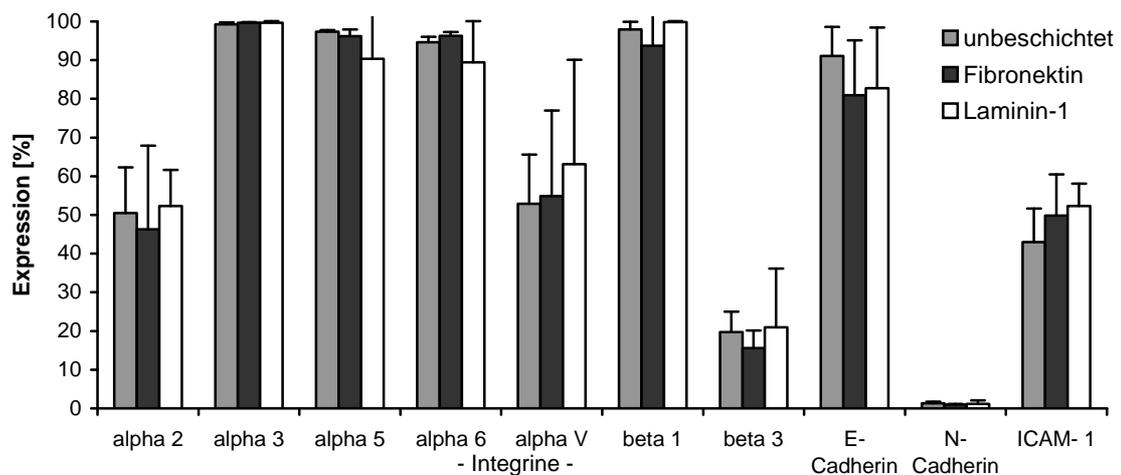
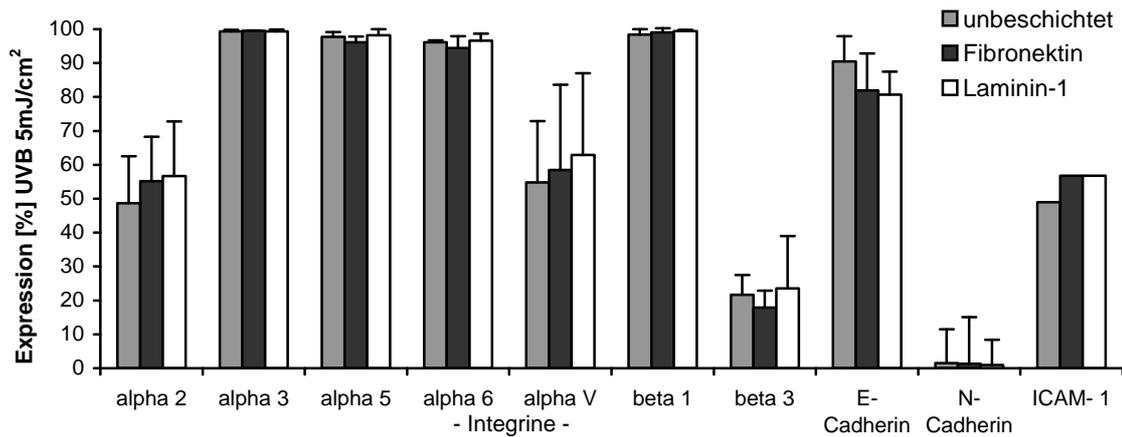


Abb. 3.6: Einfluss der extrazellulären Matrixmoleküle Laminin-1 und Fibronectin auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle. Mittelwerte mit Standardabweichungen (n= 3; 6 [s.o.] )

#### 3.3.2 Einfluss extrazellulärer Matrixmoleküle auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle nach Bestrahlung mit UVB 5 mJ/cm<sup>2</sup>

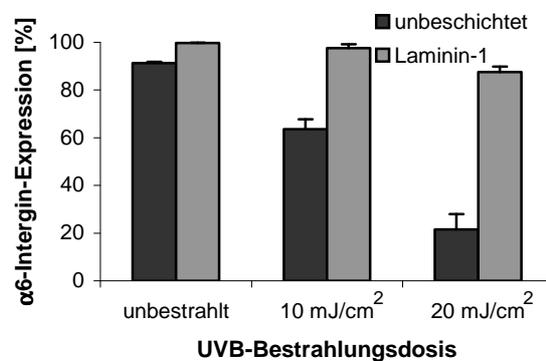
Auch bei Bestrahlung mit UVB 5 mJ/cm<sup>2</sup> führte weder die Beschichtung mit Laminin-1 noch die Beschichtung mit Fibronectin zu einer signifikanten Änderung der Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle (Abb. 3.7; siehe auch Anhang, Tab. 7.2 und 7.3).



**Abb. 3.7:** Einfluss der extrazellulären Matrixmoleküle Laminin-1 und Fibronectin auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle (Messung jeweils 24 h p.i.). Mittelwerte mit Standardabweichungen (n= 3; 6 [s.o.]

### 3.3.3 Einfluss von Laminin-1 auf die Expression von $\alpha 6$ -Integrin nach Bestrahlung mit UVB 10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>

Aufgrund der spezifischen, dosisabhängigen Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin (siehe 3.2.3) wurde der Einfluss einer Matrixbeschichtung auf die Expression dieses Adhäsionsmoleküls auch bei 10mJ/cm<sup>2</sup> und 20 mJ/cm<sup>2</sup> überprüft. Da es sich bei  $\alpha 6$ -Integrin (in heterodimerer Form, d.h. bei Melanozyten als  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin) um ein ausschließlich an Laminin bindendes Molekül handelt, wurde ein eventueller Einfluss von Fibronectin hier nicht weiter verfolgt. Dargestellt ist die Expression von  $\alpha 6$ -Integrin (unbeschichtet vs. Laminin-1-Beschichtung) bei unbestrahlten bzw. bei mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> und 20 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Melanozyten (Abb 3.8). Es zeigt sich, dass die dosisabhängige Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin durch Laminin-1 deutlich abgeschwächt wird.



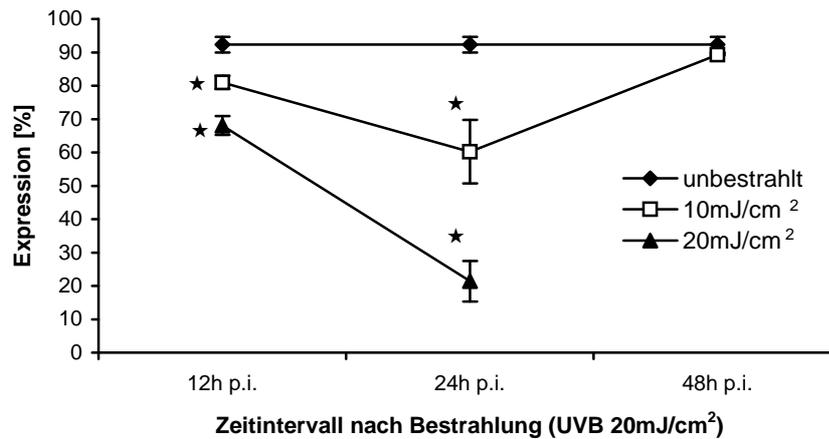
**Abb. 3.8:** Expression von  $\alpha 6$ -Integrin auf unbeschichteten und mit Laminin-1 beschichteten Kulturplatten in Abhängigkeit einer UVB-Bestrahlung (Messung jeweils 24 h p.i.). Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3).

### 3.4 Weiterführende Untersuchungen zur Expression von $\alpha 6$ -Integrin

In den zuvor geschilderten Versuchen konnten wir für  $\alpha 6$ -Integrin eine spezifische UVB-dosisabhängige Herunterregulation zeigen, die durch Laminin-1 abgeschwächt wird. Daher wollten wir jetzt die Kinetik der  $\alpha 6$ -Integrin-Regulation untersuchen (siehe Anhang, Tab. 7.5 und 7.6). Auch der Einfluss von Laminin-1 sollte im zeitlichen Verlauf untersucht werden.

#### 3.4.1 Kinetik der UVB-dosisabhängigen Expression von $\alpha 6$ -Integrin (12, 24 und 48 h p.i.)

An unbestrahlten Melanozyten, die für jeden der drei Messzeitpunkte (12, 24 und 48 h p.i.) als Kontrollen mitgeführt wurden, ließ sich durchflusszytometrisch eine  $\alpha 6$ -Integrin-Expression von durchschnittlich 92,69% nachweisen ( $n= 9$ ,  $SD\pm 1,83\%$ ). Da die unbestrahlten Kontrollen methodisch identisch behandelt wurden, konnten die Einzelergebnisse nach Überprüfung im Kruskal-Wallis-Test zu einer Gesamtpopulation zusammengefasst und auch im Folgenden als Einheit statistisch ausgewertet werden. Hieraus erklärt sich die in Abbildung 3.9 (S. 29) als konstante Linie dargestellte  $\alpha 6$ -Integrin-Expression für unbestrahlte Melanozyten (92,69%). Die Abbildung zeigt die  $\alpha 6$ -Integrin-Expression nach unterschiedlichen Zeitintervallen (12, 24, 48 h p.i.) und UVB-Dosen (0, 10, 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). Die Ergebnisse zeigen, dass die UVB-induzierte Herunterregulation der  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit dosisabhängig und reversibel ist. Bereits 12 h nach Bestrahlung mit UVB 10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  ist die Expression von  $\alpha 6$ -Integrin im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen signifikant ( $p<0,05$ ) herunterreguliert (mittlere Expression 81,0%,  $n= 3$ ,  $SD\pm 1,97\%$ ). Dieser Effekt ist 24 h p.i. noch deutlicher (mittlere Expression 63,57%,  $n=3$ ,  $SD\pm 4,15\%$ ). 48 h p.i. konnten wir wieder eine Heraufregulierung von  $\alpha 6$ -Integrin zeigen (mittlere Expression 89,3%,  $n=3$ ,  $SD\pm 0,25\%$ ). UVB-Dosen von 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  führen zu einer stärkeren Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin. Die Expression war 48 h p.i. bei 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  aufgrund der fortgeschrittenen Schädigung der Melanozyten nicht mehr messbar.

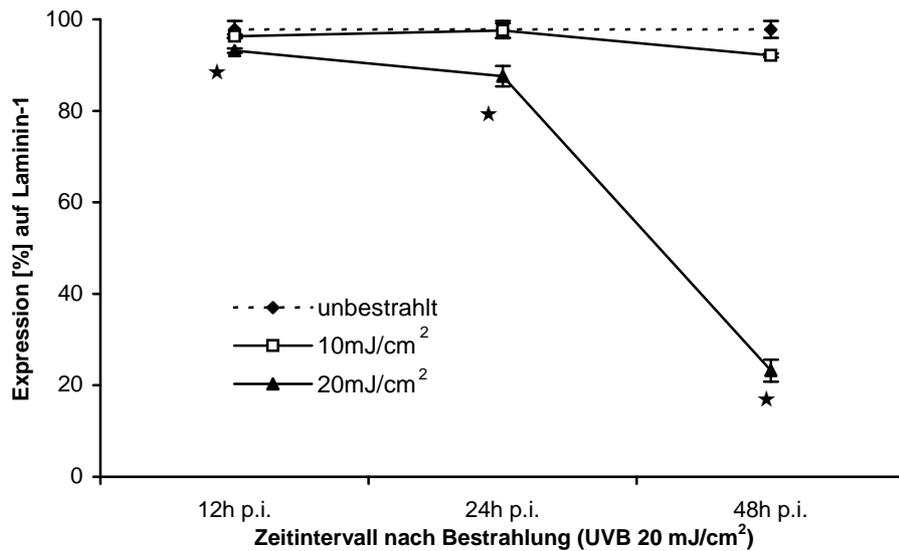


**Abb. 3.9:** Zeitlicher Verlauf der Expression von  $\alpha 6$ -Integrin nach UVB-Bestrahlung. Darstellung des aus 9 Einzelmessungen gemittelten Wertes ( $\pm s$ ) für unbestrahlte Zellen sowie des Mittelwertes ( $\pm s$ ) aus n=3 Messungen für Bestrahlung mit UVB 10 mJ/cm<sup>2</sup> bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>.

★signifikant (p< 0,05) gegenüber unbestrahlten Melanozyten

### 3.4.2 Kinetik der UVB-dosisabhängigen Expression von $\alpha 6$ -Integrin; Einfluss von Laminin-1

Auch für den zeitlichen Verlauf der Expression prüften wir, ob die Immunreaktivität von  $\alpha 6$ -Integrin durch den Kontakt zu Laminin-1 beeinflusst wird. Im Gegensatz zu unbeschichteten Kulturplatten konnten bei Laminin-1-Beschichtung durchflusszytometrische Messungen auch 48 h nach Bestrahlung mit 20 mJ/cm<sup>2</sup> ausgewertet werden, da die Melanozyten zu diesem Zeitpunkt in einem verwertbaren Zustand waren. Auch hieran drückt sich ein melanozytenprotektiver Effekt von Laminin-1 aus. Insgesamt zeigte sich neben der bereits unter 3.3.3 beschriebenen Abschwächung auch eine zeitliche Verzögerung der UVB-induzierten Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin.



**Abb. 3.10** Einfluss unterschiedlicher UVB- Dosen auf die Expression von  $\alpha 6$ -Integrin (Laminin-1-Beschichtung). Darstellung des aus 9 Einzelmessungen gemittelten Wertes ( $\pm s$ ) für unbestrahlte Zellen sowie des Mittelwertes ( $\pm s$ ) aus  $n= 3$  Messungen für Bestrahlung mit UVB 10 mJ/cm<sup>2</sup> bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup>.

★signifikant gegenüber unbestrahlten Melanozyten ( $p<0,05$ )

In Abbildung 3.10 ist zunächst der zeitliche Verlauf der  $\alpha 6$ -Integrin-Expression auf Lamininbeschichtung nach unterschiedlichen UVB-Dosen dargestellt. Im Gegensatz zu den Versuchen ohne Lamininbeschichtung (Abb.3.9) war die Herunterregulation erst bei 20 mJ/cm<sup>2</sup> signifikant im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. In den Abbildungen 3.11 und 3.12 ist der Effekt der Lamininbeschichtung in direktem Vergleich zu den unbeschichteten Ergebnissen erkennbar.

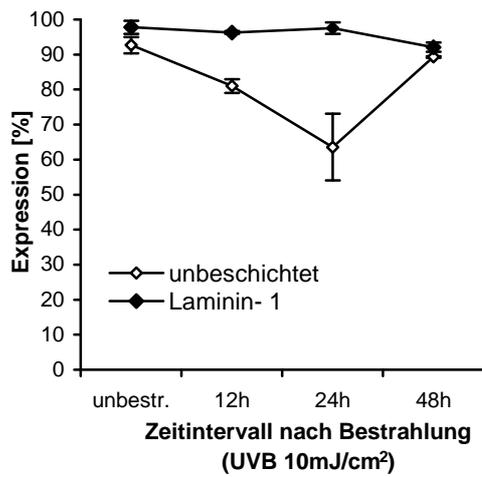


Abb. 3.11

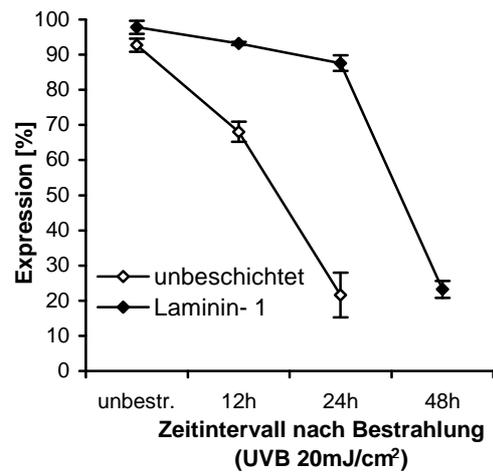


Abb. 3.12

Abb. 3.11 und 3.12: Einfluss der Beschichtung mit Laminin-1 auf die UVB-abhängige Expression von  $\alpha 6$ -Integrin; UVB 10 mJ/cm<sup>2</sup> (Abb. 3.11) bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup> (Abb. 3.12). Mittelwerte mit Standardabweichungen (n= 3)  
 unbestr. = unbestrahlt

### 3.5 Einfluss einer Kokultur mit Keratinozyten auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle

Um zu untersuchen inwieweit die Kokultur von Melanozyten mit ihren natürlichen Nachbarzellen, den Keratinozyten, die Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflusst, wurden beide Zelltypen für 48 h auf Chamberslides kokultiviert und 24 h nach Bestrahlung mit UVB 20 mJ/cm<sup>2</sup> immunzytochemisch gefärbt.

#### 3.5.1 Einfluss unterschiedlicher Calciumkonzentrationen im Kulturmedium auf die Differenzierung der Keratinozyten

Für die Kokulturrexperimente verwendeten wir Keratinozytenmedium unterschiedlicher molarer Calciumkonzentration (0,09 mM bzw. 1,5 mM). Bei niedriger Calciumkonzentration, welche eher den Gegebenheiten in der epidermalen Basalzellschicht entspricht, zeigten die Keratinozyten eine höhere Proliferation. Sie verteilen sich dabei relativ gleichmäßig auf der Oberfläche der Kulturschalen. Eine hohe Calciumkonzentration bewirkt eine verstärkte Differenzierung der Keratinozyten, bei der sie sich analog zu suprabasalen Epidermisschichten zu plattenepithelialen Verbänden zusammenlagern und dabei inselartige Gruppen bilden. Die Melanozyten verteilen sich jeweils relativ gleichmäßig zwischen den Keratinozyten (Abb. 3.13a, b).

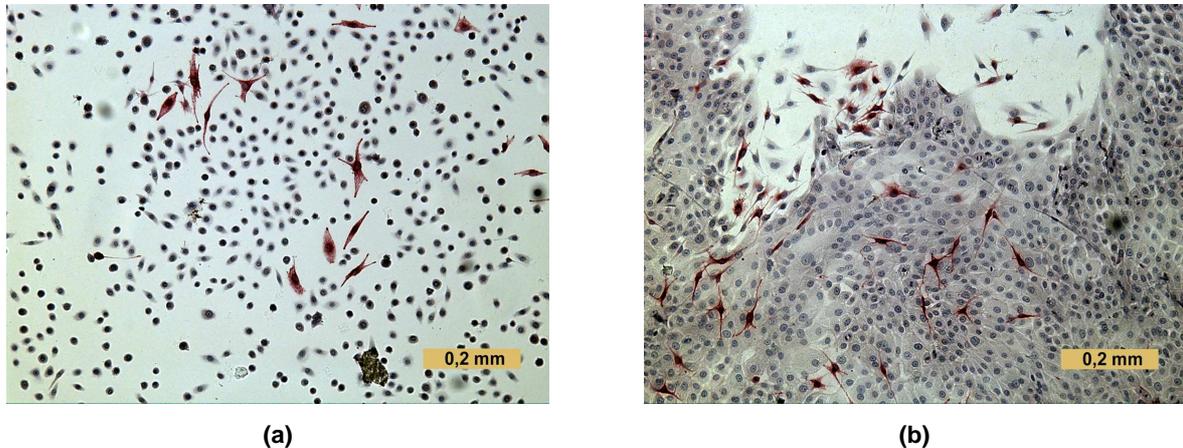


Abb. 3.13: Kokultur aus Melanozyten und Keratinozyten bei 0,09 mM (a) und 1,5 mM (b) Calciumchloridkonzentration. Immunzytochemische Färbung mit dem monoklonalen Antikörper Melan-A (APAAP). Die Melanozyten weisen eine zytoplasmatische Anfärbung auf.

### 3.5.2 Einfluss von UVB auf die Expression von Adhäsionsmolekülen in der Kokultur

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

#### Calciumkonzentration 0,09 mM

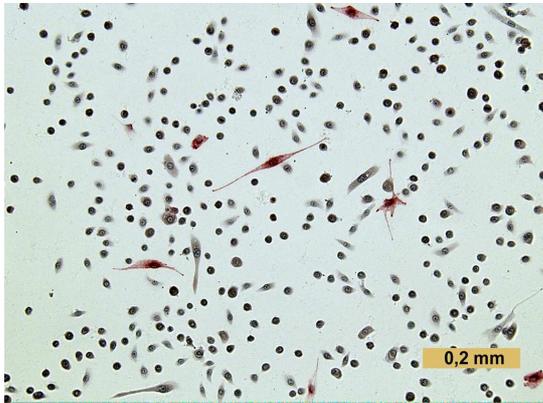
Antikörper	Melanozyten		Keratiinozyten	
	unbestrahlt	UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup> , 24 h p.i.	unbestrahlt	UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup> , 24 h p.i.
Melan A	++	++	-	-
MNF (Pan- Keratin)	-	-	++	++
α2-Integrin	(+)	(+)	+	+
α3-Integrin	(+)	(+)	+	+
α5-Integrin	(+)	(+)	+	+
α6-Integrin	-	-	+	+
αV-Integrin	(+)	(+)	(+)	(+)
β1-Integrin	(+)	(+)	+	+
β3-Integrin	+	+	-	-
ICAM- 1	(+)	(+)	-	-
E-Cadherin	+	+	++	++
N-Cadherin	-	-	-	-

#### Calciumkonzentration 1,5 mM

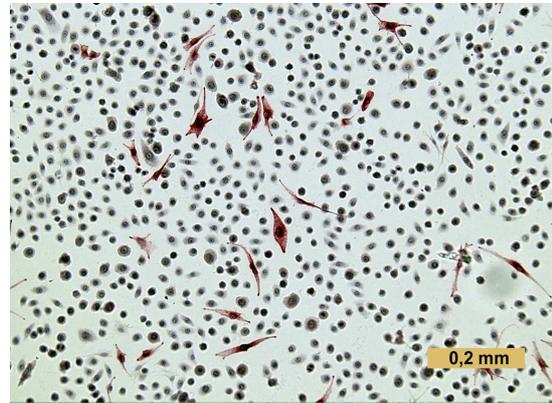
Antikörper	Melanozyten		Keratiinozyten	
	unbestrahlt	UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup> , 24 h p.i.	unbestrahlt	UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup> , 24 h p.i.
Melan A	++	++	-	-
MNF (Pan- Keratin)	-	-	++	++
α2-Integrin	(+)	(+)	+	+
α3-Integrin	(+)	(+)	+	+
α5-Integrin	(+)	(+)	+	+
α6-Integrin	-	-	+	+
αV-Integrin	(+)	(+)	+	+
β1-Integrin	(+)	(+)	(+)	(+)
β3-Integrin	+	+	-	-
ICAM-1	(+)	(+)	-	-
E-Cadherin	+	+	++	++
N-Cadherin	-	-	-	-

- Legende: ++ starke Expression  
 + mittlere Expression  
 (+) schwache Expression  
 - fehlende Expression

In der Folge ist für jeden der untersuchten Antikörper jeweils eine immunhistochemische Färbung der unbestrahlten Melanozyten linksseitig dargestellt, auf der rechten Seite findet sich das entsprechende Korrelat nach Bestrahlung mit UVB 20 mJ/cm<sup>2</sup>, 24 h p.i.



(a)

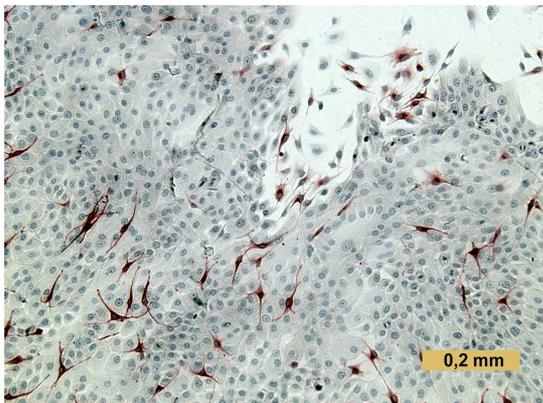


(b)

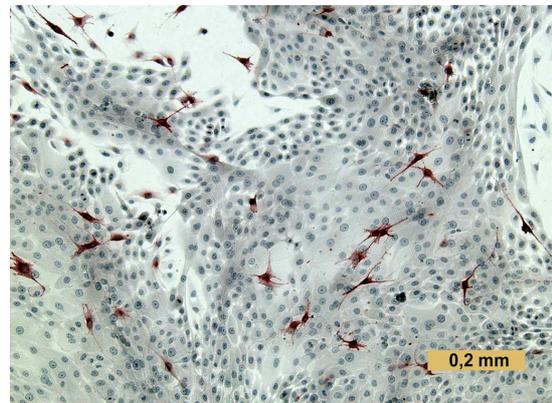
**Abb. 3.14: Melan A; 0,09 mM Ca<sup>++</sup>**

(a) Melanozyten: ++; Keratinozyten: -

(b) Melanozyten: ++; Keratinozyten: -



(a)

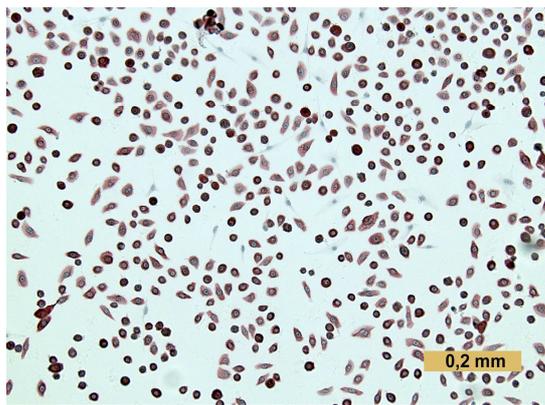


(b)

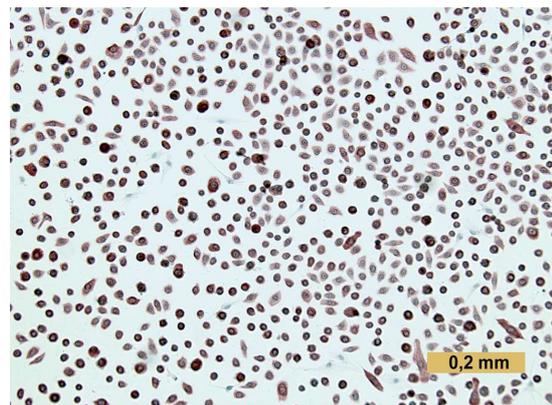
**Abb. 3.15: Melan A; 1,5 mM Ca<sup>++</sup>**

(a) Melanozyten: ++; Keratinozyten: -

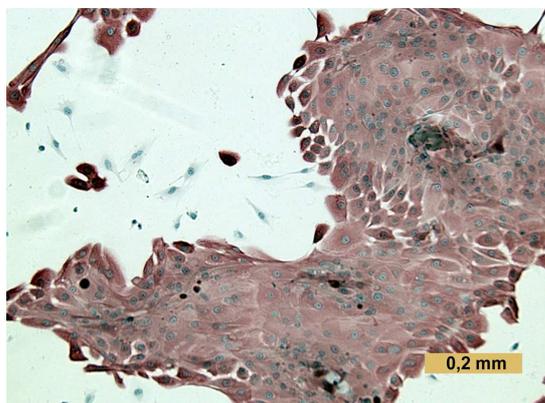
(b) Melanozyten: ++; Keratinozyten: -



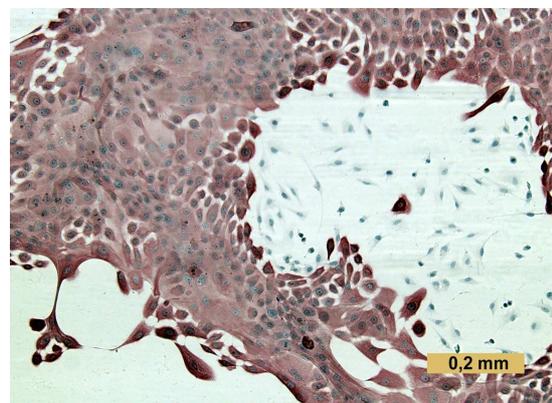
(a)



(b)

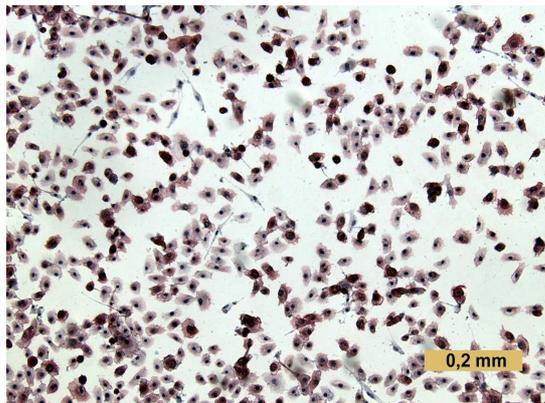
**Abb. 3.16: MNF; 0,09 mM Ca<sup>++</sup>****(a) Melanozyten: -; Keratinozyten: ++****(b) Melanozyten: -; Keratinozyten: ++**

(a)

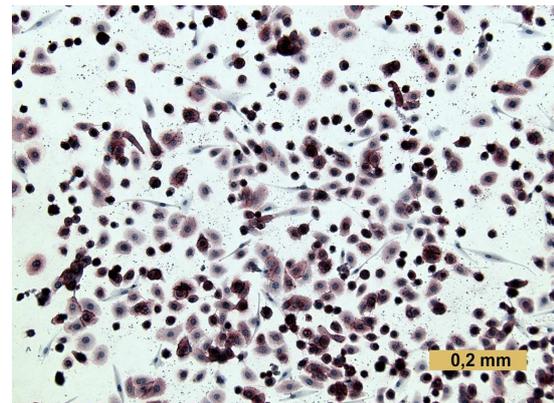


(b)

**Abb. 3.17: MNF; 1,5 mM Ca<sup>++</sup>****(a) Melanozyten: -; Keratinozyten: ++****(b) Melanozyten: -; Keratinozyten: ++**



(a)

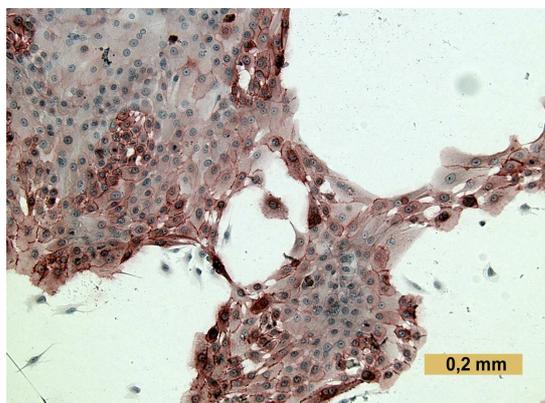


(b)

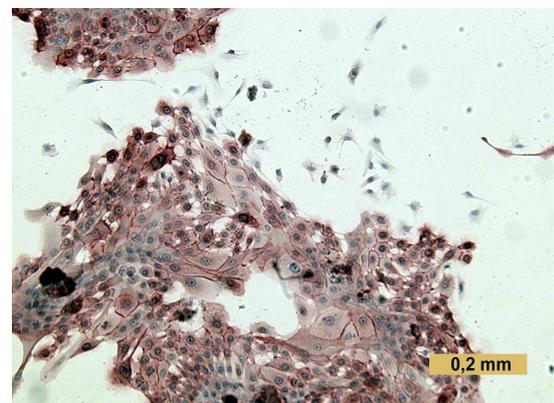
**Abb. 3.18:**  $\alpha 2$ -Integrin; 0,09 mM  $\text{Ca}^{++}$

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

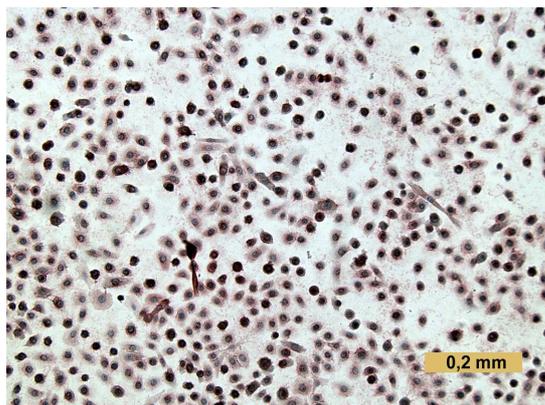


(b)

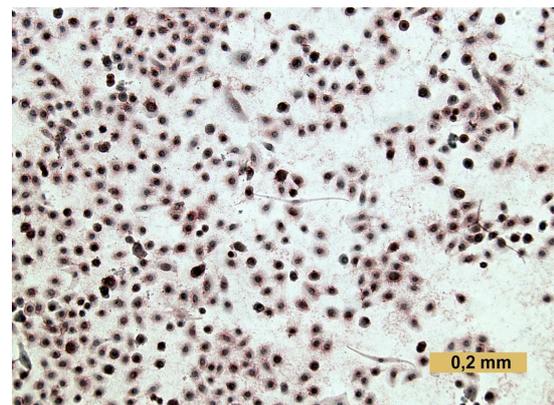
**Abb. 3.19:**  $\alpha 2$ -Integrin; 1,5 mM  $\text{Ca}^{++}$

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

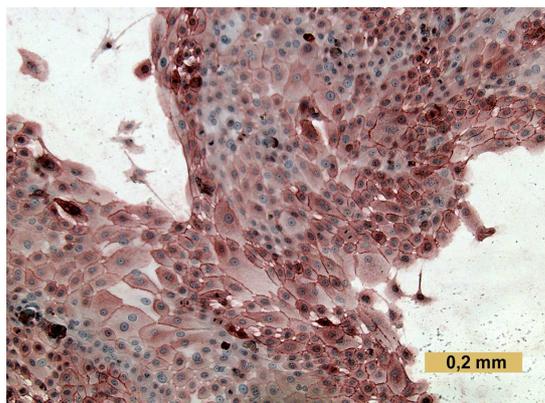


(b)

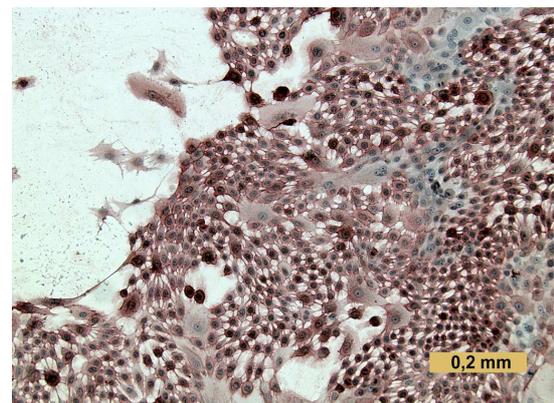
**Abb. 3.20:  $\alpha 3$ -Integrin; 0,09 mM  $\text{Ca}^{++}$**

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

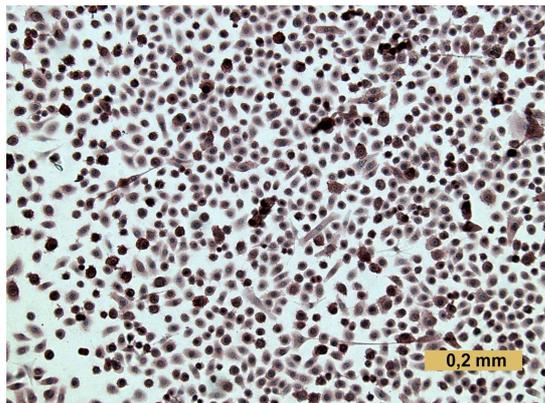


(b)

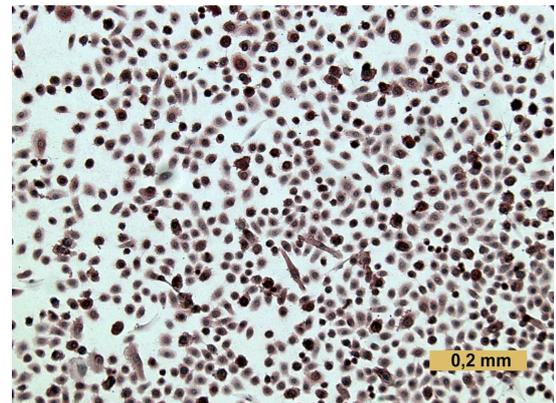
**Abb. 3.21:  $\alpha 3$ -Integrin; 1,5 mM  $\text{Ca}^{++}$**

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

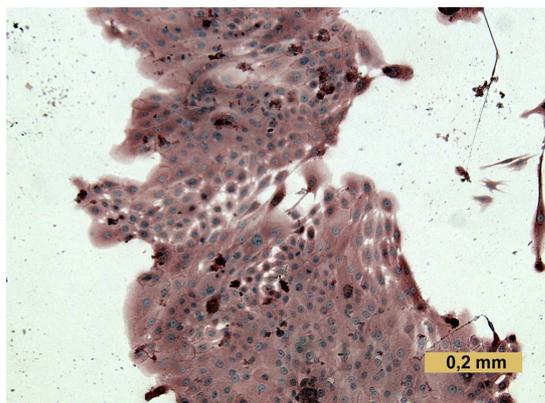


(b)

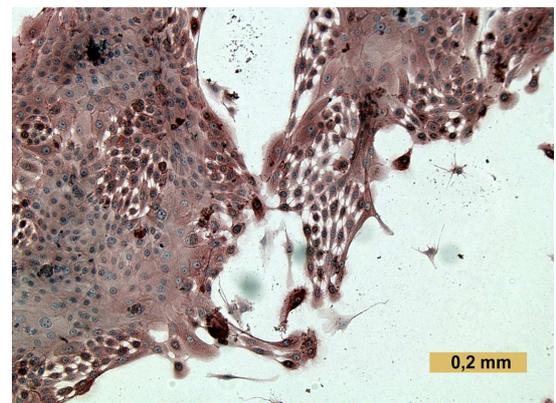
Abb. 3.22:  $\alpha 5$ -Integrin; 0,09 mM  $\text{Ca}^{++}$

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

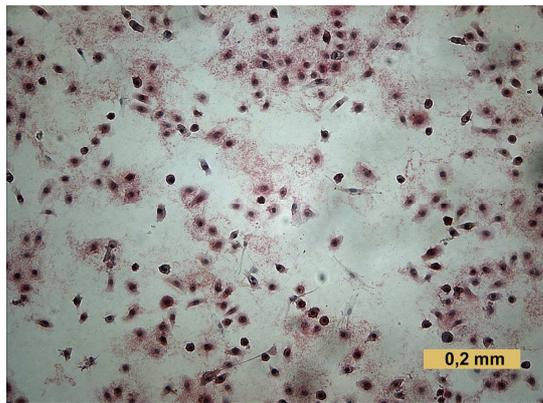


(b)

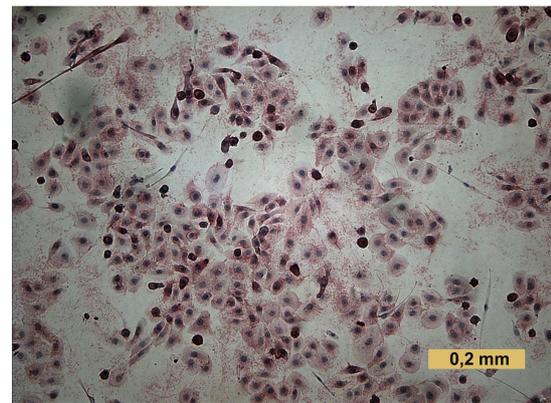
Abb. 3.23:  $\alpha 5$ -Integrin; 1,5 mM  $\text{Ca}^{++}$

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

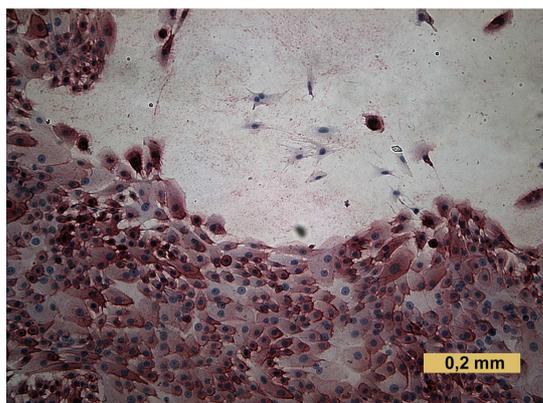


(b)

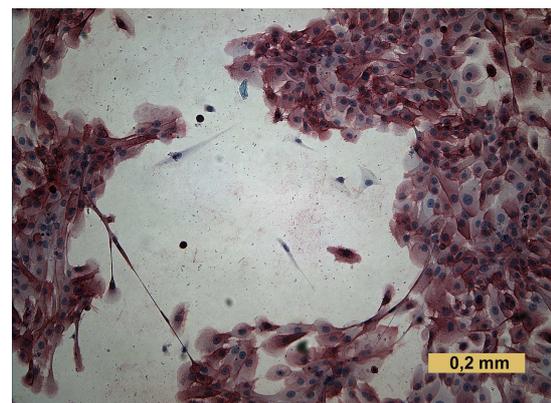
**Abb. 3.24: alpha 6-Integrin; 0,09 mM Ca<sup>++</sup>**

(a) Melanozyten: -; Kerationzyten: +

(b) Melanozyten: -; Keratinozyten: +



(a)

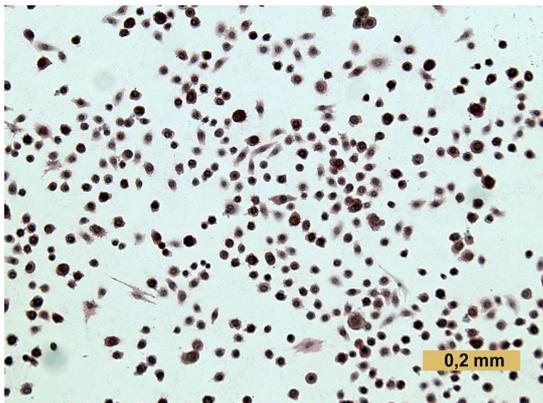


(b)

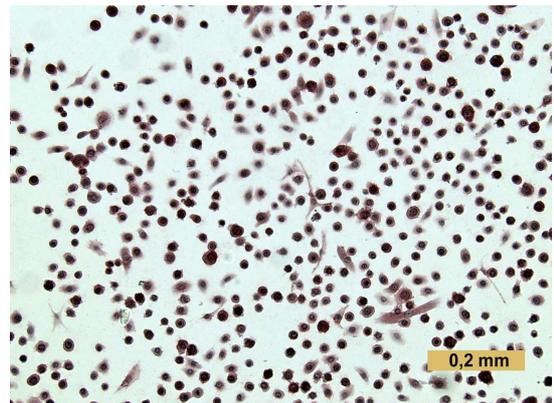
**Abb. 3.25: alpha 6-Integrin; 1,5 mM Ca<sup>++</sup>**

(a) Melanozyten: -; Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: -; Keratinozyten: +



(a)

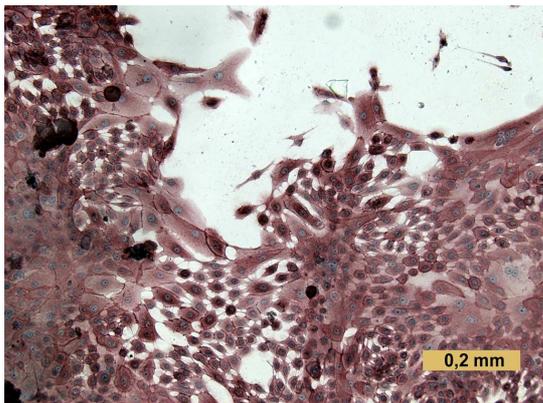


(b)

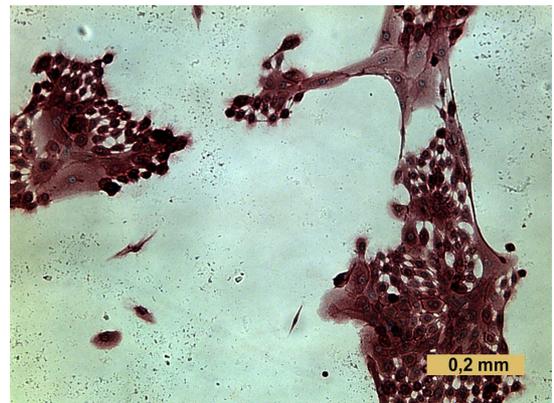
Abb. 3.26:  $\alpha$ V-Integrin; 0,09 mM  $\text{Ca}^{++}$

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

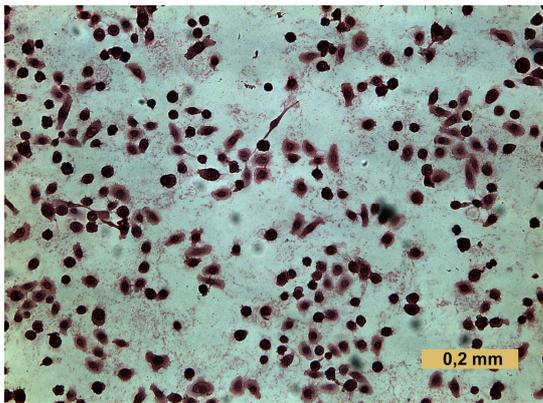


(b)

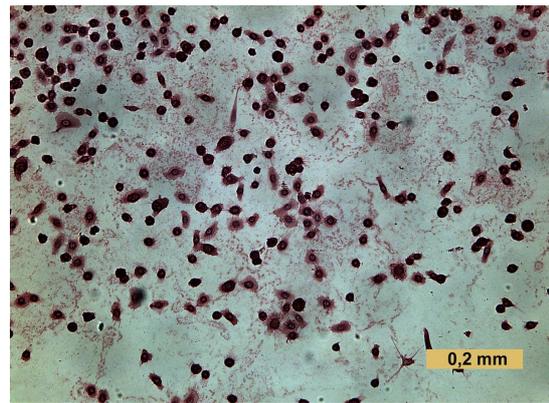
Abb. 3.27:  $\alpha$ V-Integrin; 1,5 mM  $\text{Ca}^{++}$

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: +



(a)

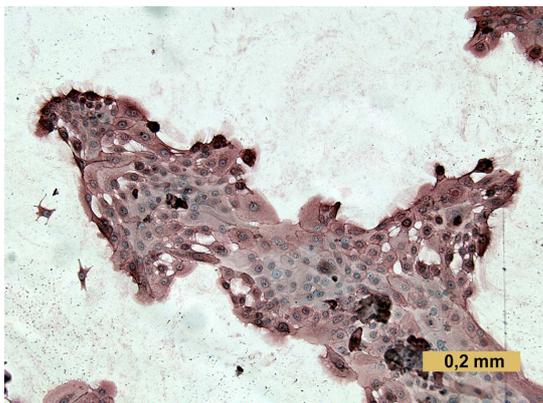


(b)

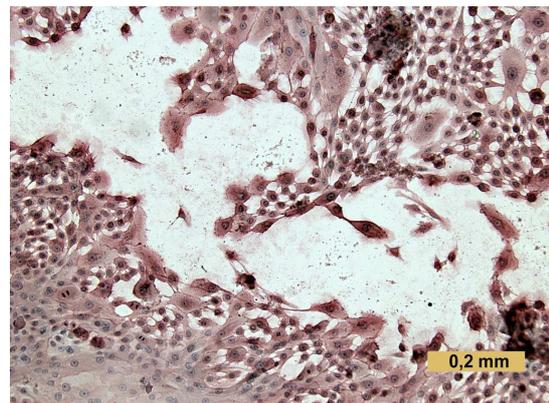
**Abb. 3.28:  $\beta$ 1-Integrin; 0,09 mM  $\text{Ca}^{++}$**

(a) Melanozyten: +; Keratinozyten: (+)

(b) Melanozyten: +; Keratinozyten: (+)



(a)

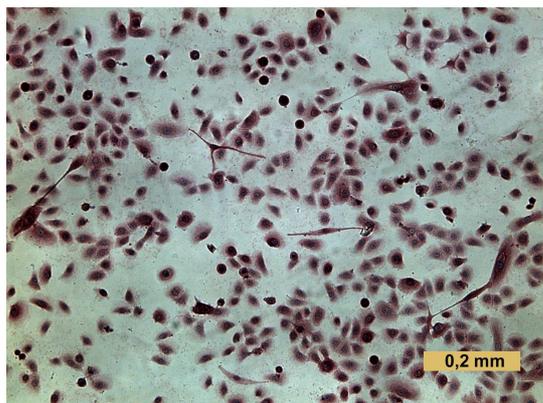


(b)

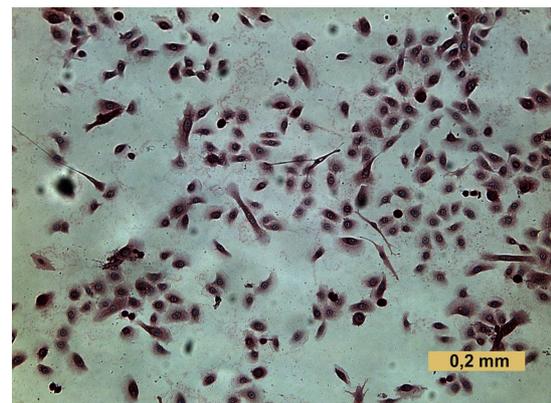
**Abb. 3.29:  $\beta$ 1-Integrin; 1,5 mM  $\text{Ca}^{++}$**

(a) Melanozyten: +; Keratinozyten: (+)

(b) Melanozyten: +; Keratinozyten: (+)



(a)

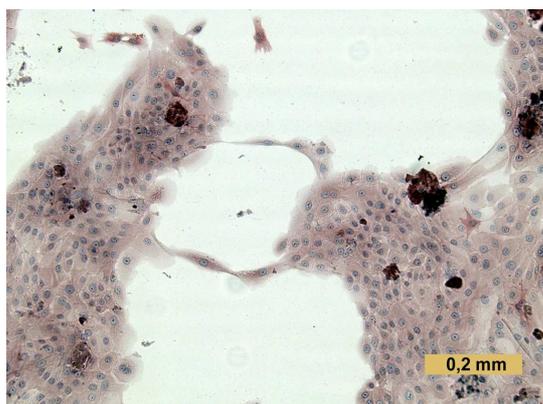


(b)

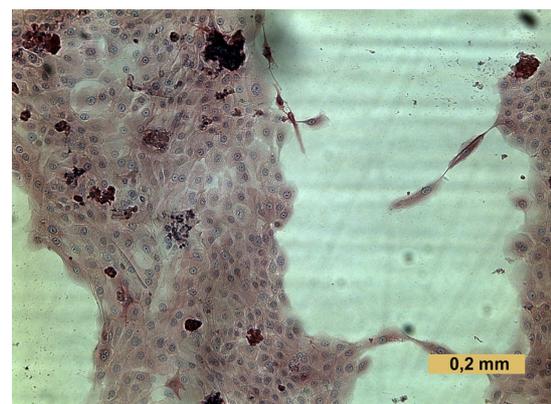
**Abb. 3.30:  $\beta$ 3-Integrin; 0,09 mM  $Ca^{++}$**

(a) Melanozyten: +; Keratinozyten: -

(b) Melanozyten: +; Keratinozyten: -



(a)

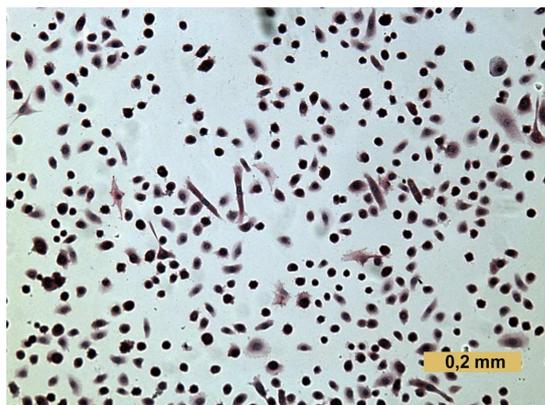


(b)

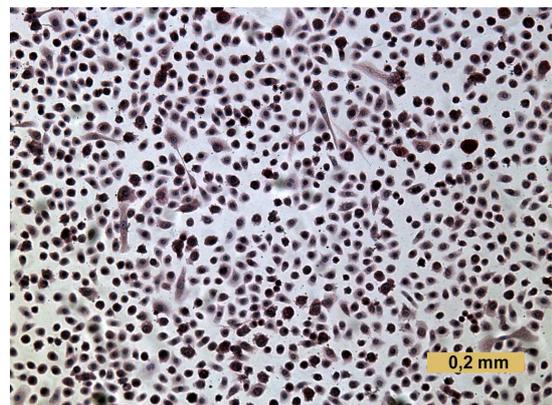
**Abb. 3.31:  $\beta$ 3-Integrin; 1,5 mM  $Ca^{++}$**

(a) Melanozyten: +; Keratinozyten: -

(b) Melanozyten: +; Keratinozyten: -



(a)

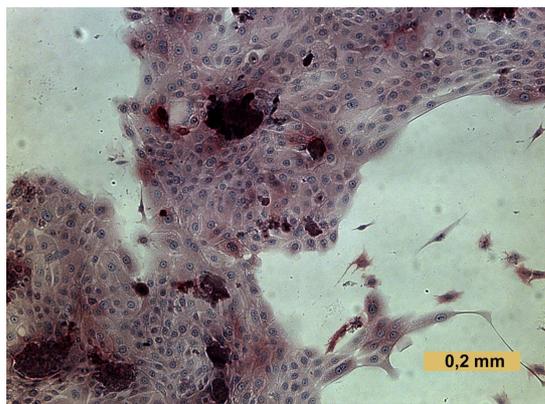


(b)

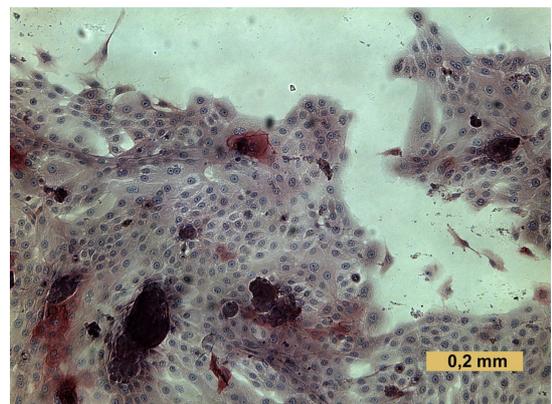
Abb. 3.32: ICAM-1; 0,09 mM Ca<sup>++</sup>

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: -

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: -



(a)



(b)

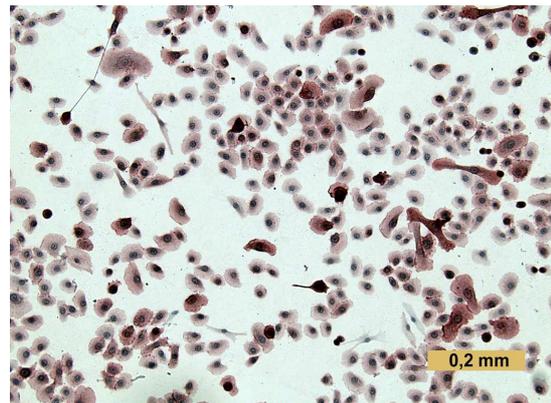
Abb. 3.33: ICAM-1; 1,5 mM Ca<sup>++</sup>

(a) Melanozyten: (+); Keratinozyten: -

(b) Melanozyten: (+); Keratinozyten: -



(a)

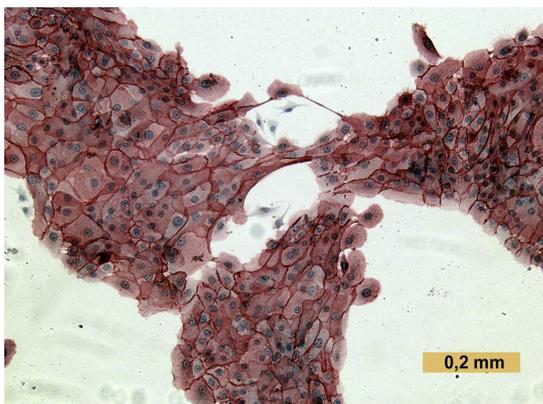


(b)

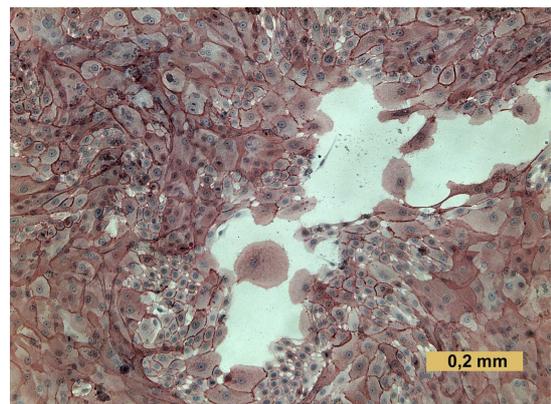
**Abb. 3.34: E-Cadherin; 0,09 mM Ca<sup>++</sup>**

**(a) Melanozyten: +; Keratinozyten: ++**

**(b) Melanozyten: +; Keratinozyten: ++**



(a)

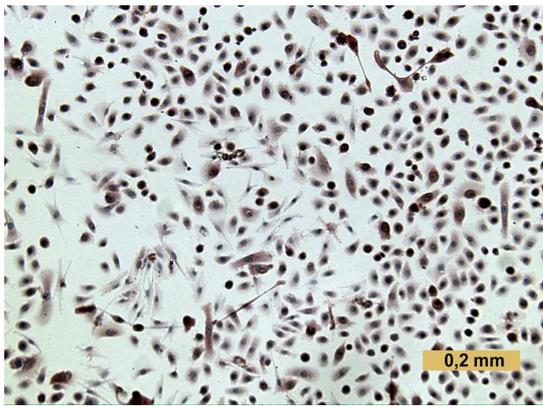


(b)

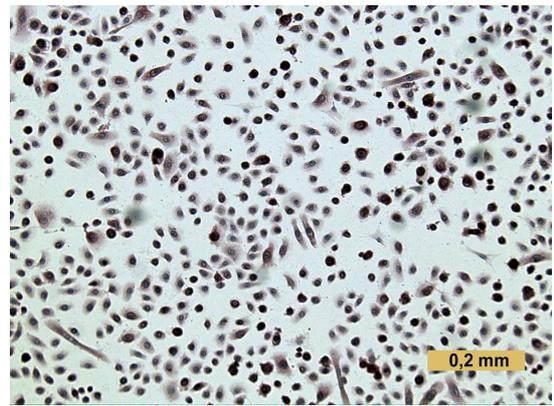
**Abb. 3.35: E-Cadherin; 1,5 mM Ca<sup>++</sup>**

**(a) Melanozyten: +; Keratinozyten: ++**

**(b) Melanozyten: +; Keratinozyten: ++**



(a)

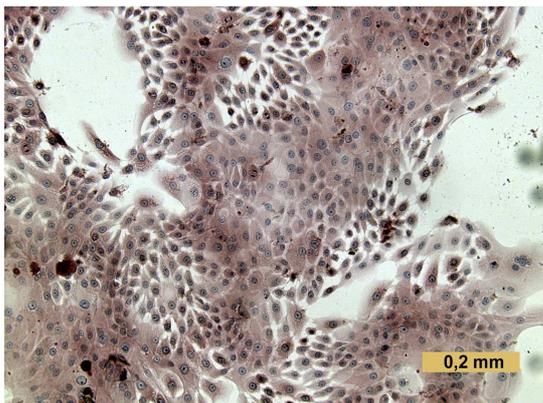


(b)

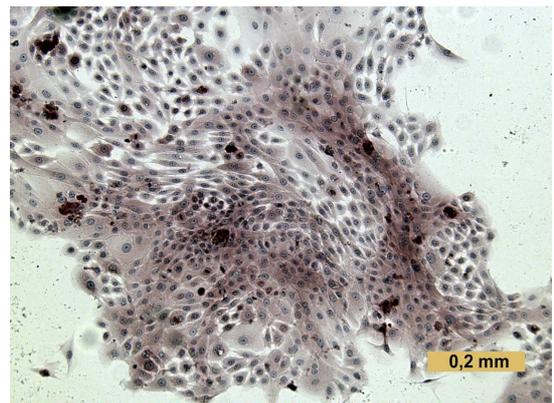
**Abb. 3.36: N-Cadherin; 0,09 mM Ca<sup>++</sup>**

(a) Melanozyten: -; Keratinozyten: -

(b) Melanozyten: -; Keratinozyten: -



(a)



(b)

**Abb. 3.37: N-Cadherin; 1,5 mM Ca<sup>++</sup>**

(a) Melanozyten: -; Keratinozyten: -

(b) Melanozyten: -; Keratinozyten:-

## 4 Diskussion

### 4.1 UV-induzierte Effekte auf Morphologie und Wachstumsverhalten der Melanozyten

Die Bestrahlung von Melanozyten mit UVB führte zu dosisabhängigen Effekten. Bei einer UVB-Dosis von  $5 \text{ mJ/cm}^2$  zeigten sich Veränderungen der Melanozyten 24 h nach Bestrahlung. Diese umfassten nach unserem visuellen Eindruck neben einer vermehrten Pigmentproduktion eine leicht verminderte Dendrizität, verkürzte Dendriten und eine etwas gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Diese Effekte, die für etwa 5- 7 Tage erkennbar blieben, spiegeln die natürliche Funktion epidermaler Melanozyten bei der Anpassung an den Umweltreiz Sonnenlicht wieder. Sowohl eine gesteigerte Pigmentproduktion mit anschließendem Transfer in die umliegenden Keratinozyten als auch eine erhöhte Zellteilungsrate tragen zur Bräunung der Haut bei und helfen so, sie vor schädlichen UV-Effekten zu schützen. Diese Effekte wurden in der Literatur bereits vielfach beschrieben (Friedman und Gilchrest, 1987; Yaar und Gilchrest, 1991; Gilchrest et al., 1998). Die zitierten Arbeiten beschreiben größtenteils Ergebnisse von Zellkulturexperimenten, für die Melanozytenmedien mit Zusatz von Phorbolestern (TPA) verwendet wurden. Diese unphysiologischen Mitogene führen zu einer erhöhten Proliferation der Melanozyten und zu einer Reihe von weiteren Effekten, die u.a. auch die Expression von Adhäsionsmolekülen betreffen (Danen et al., 1996). Das von uns verwendete, TPA-freie Melanozytenmedium führt im Vergleich mit TPA-haltigem Medium zu einer deutlichen Erhöhung der Dendritenzahl als Ausdruck einer höheren melanozytären Differenzierung. Insofern zeigen unsere Ergebnisse, dass es sich bei den oben beschriebenen UV- Effekten nicht um TPA-induzierte Zellkulturartefakte handelt.

Bei Bestrahlungen mit Dosen von  $10\text{-}20 \text{ mJ/cm}^2$  fanden sich ab ca. 12 h p.i. neben den beschriebenen Effekten zunehmend auch frei im Kulturmedium flottierende Zellen. Da Melanozyten in vitro auf die Adhärenz an die Plastikoberfläche der Kulturgefäße angewiesen sind, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um abgestorbene Zellen handelt. Diese konnten mittels Trypanblauinklusion in der Neubauer-Zählkammer quantitativ erfasst werden. Im untersuchten Dosisbereich stellte sich der Anteil abgestorbener Zellen in etwa linear dosisabhängig dar ( $10 \text{ mJ/cm}^2$  24 h p.i. ca. 15%,  $15 \text{ mJ/cm}^2$  24 h p.i. ca. 18%,  $20 \text{ mJ/cm}^2$  24 h p.i. ca. 30%). Somit zeigte sich bei dem verwendeten Versuchsaufbau bereits bei UVB-Dosen  $>5 \text{ mJ/cm}^2$  ein nennenswerter Anteil abgestorbener Melanozyten, bei denen es sich vermutlich größtenteils um apoptotische Zellen handelt. Kim et al. (2000) untersuchten die Apoptoserate von Melanozyten unter UV-Einfluss. Unter Verwendung des Apoptosemarkers Annexin V ermittelten sie eine dosisabhängig gesteigerte Apoptoserate von 10% nach Bestrahlung

mit 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 21% nach Bestrahlung mit 20 mJ/cm<sup>2</sup> und 60% nach einer UVB-Dosis von 30 mJ/cm<sup>2</sup>.

In der Literatur findet sich eine gewisse Spannweite an von Melanozyten bei der Bestrahlung tolerierten UVB-Dosen. Kirnbauer et al. (1992) variierten mit Bestrahlungsdosen zwischen 2,5 - 12,5 mJ/cm<sup>2</sup>, Nakazawa et al (1995a) bestrahlten mit 20 mJ/cm<sup>2</sup>, Neitmann et al (1999) mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> und Valery et al. (2001) mit 100 mJ/cm<sup>2</sup>. Auch hierbei spielen die bereits oben diskutierten methodischen Bedingungen der Melanozyten-Kultur, insbesondere die Zusammensetzung des Kulturmediums, eine wichtige Rolle. Einen großen Einfluss hat auch die Wahl der Lichtquelle und des verwendeten Dosimeters. So findet sich je nach verwendeter Lichtquelle in den meisten Studien, in denen Melanozyten in vitro mit UVB bestrahlt wurden, auch ein unterschiedlich hoher Anteil von längerwelligem (UVA)- Licht. Dieses ist im Vergleich zu UVB wesentlich energieärmer und wirkt sich deshalb auch dosimetrisch weniger stark aus, dennoch ist bei der Angabe der UVB-Dosis der Anteil des UVA-Lichts von der UV-Gesamtdosis abzuziehen. Zudem ist auch die spektrale Verteilung je nach Lichtquelle unterschiedlich, das heißt auch innerhalb des UVB-Spektrums kann entweder der kürzer- oder längerwellige Anteil stärker betont sein. Für die biologische Wirkung kann dies (bei gleicher Dosis) u.U. einen erheblichen Unterschied bedeuten (Kadekaro et al., 2003). Mit Hilfe des für unsere Untersuchungen verwendeten Monochromators konnte eine relativ gleichmäßige spektrale Verteilung im UVB-Bereich erzielt werden. Durch einen speziellen Gitterfilter wurde zudem der UVA-Anteil weitgehend eliminiert und durch Einstellung der Wellenlänge auf 280- 315 nm der oberste Anteil des UVB- Spektrums (315- 320 nm) zusätzlich reduziert. Das so erzielte, relativ reine UVB-Licht könnte erklären, dass die von uns ermittelte Dosistoleranz der Melanozyten im Vergleich mit Angaben aus anderen Studien eher niedrig ist. Neben diesen Einflussgrößen spielt auch die Überschichtung der Zellen während des Bestrahlungsvorgangs eine nicht unwichtige Rolle. In unseren Versuchen wurde pro Feld der 6-well-Platte (ca. 10 cm<sup>2</sup>) eine Überschichtung mit 1 ml PBS gewählt. Dieses Volumen ist erforderlich, um ein Austrocknen der Zellen während des Bestrahlungsvorganges zu vermeiden. Durch den geringen Abstand zwischen dem Zelllayer und dem Meniskus der Flüssigkeit sollte andererseits die Absorption des kurzwelligen UVB-Lichts durch die Flüssigkeit minimiert werden. Da derartige genaue methodische Angaben in der oben genannten Literatur fehlen, ist eine Vergleichbarkeit mit den dort verwendeten UVB-Dosen nur mit Einschränkung möglich. Der Schwellenwert der UV-Dosis-Toleranz muss für einen verwendeten Versuchsaufbau jeweils neu bestimmt werden.

Eine Korrelation mit den in vivo bei Sonnenexposition messbaren UV-Dosen ist nur eingeschränkt möglich. Neben der Polychromasie des Sonnenlichts und der Reflektion

durch die Hautoberfläche ist zu berücksichtigen, dass schon in den suprabasalen Schichten der Epidermis eine Absorption insbesondere von kurzwelligem UVB-Licht stattfindet. Eine etablierte Messgröße für die Bestimmung der von der Haut tolerierten UV-Dosis ist die minimale Erythemdosis (MED), d.h. die UV-Dosis einer jeweiligen Bestrahlungsquelle, die nach 24 h zur Ausbildung eines scharf begrenzten Erythems (Sonnenbrand) führt. Die MED wird routinemäßig bei lichtinduzierten Erkrankungen der Haut zur Quantifizierung der Empfindlichkeit und zur Bestimmung der auslösenden Wellenlänge gemessen (sog. Lichttreppe, z.B. bei Lupus erythematoses, polymorpher Lichtdermatose). Ferner dient sie als Ausgangsuntersuchung vor therapeutischer Anwendung von UV-Licht. Die bei medizinischer UV-Bestrahlung eingesetzten UVB-Dosen (MED) betragen bei vorher ungebräunter Haut je nach Hauttyp ca. 15- 100 mJ/cm<sup>2</sup> (Hauttypen I- III). Die von uns verwendeten Dosen waren mit 5- 20 mJ/cm<sup>2</sup> geringer.

#### **4.2 Einfluss von Extrazellulärmatrix-Komponenten auf Morphologie, Wachstumsverhalten und UV-Empfindlichkeit der Melanozyten**

Eine Beschichtung der Kulturplatten mit typischen molekularen Bestandteilen der ECM der Basalmembran (Laminin-1) bzw. der Dermis (Fibronectin) führte zu Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie der Melanozyten. Dabei wurden jeweils hohe Beschichtungskonzentrationen gewählt, bei denen nach Literaturangaben von einem Sättigungseffekt bezüglich der Auswirkungen auf die Melanozyten auszugehen war (Neitmann et al., 1999). Sowohl Fibronectin- als auch Laminin-1-Beschichtung führten im Vergleich mit unbeschichteten Plastikoberflächen nach unserem visuellen Eindruck zu einer schnelleren Vermehrung der Melanozyten. 48 h nach Aussaat der Zellen auf Lamininbeschichtung zeigten die Melanozyten eine veränderte Morphologie mit breiteren Zellkörpern und leicht verkürzten Dendriten. Diese Eigenschaft wird in der Literatur als „spreading“ („Ausbreitung“) beschrieben (Gilchrest et al., 1985). Bei Beschichtung mit Fibronectin zeigten sich keine deutlicheren morphologischen Veränderungen. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ECM-Proteine in vitro eine Vielzahl melanozytärer Eigenschaften einschließlich Melanozytenmorphologie (Gilchrest, 1985; Ranson, 1988; Zambruno, 1993; Hara, 1994), Adhäsion (Scott et al., 1992; Nakazawa et al 1995b), Proliferation (Ranson et al. 1988) Migration (Morelli et al., 1993) und Pigmentproduktion beeinflussen (Ranson et al., 1988; Nakazawa et al., 1995b; Hedley, 1996). Hedley et al. (1996) zeigten, dass ECM-Beschichtung das Fehlen bestimmter Wachstumsfaktoren im Melanozyten-Kulturmedium z.T. kompensieren kann. Mortarini et al. (1995) konnten zeigen, dass Melanozyten auf Laminin-1-Beschichtung eine erhöhte

Proliferation aufwiesen. Insgesamt zeigten sich bei diesen Studien z. T. erhebliche Einflüsse durch die Zusammensetzung des Kulturmediums, insbesondere mitogener Zusätze wie TPA bzw. Wachstumsfaktoren. Übertragen auf die *in vivo* Situation kann man schlussfolgern, dass der Kontakt zu bestimmten Matrixkomponenten für die Melanozyten-Homöostase eine wichtige Rolle spielt, wobei der Einfluss auf Melanozytenfunktion und –proliferation eher ein fördernder als ein hemmender zu sein scheint.

Die Fähigkeit der ECM, Apoptose zu unterdrücken, wurde für unterschiedliche Zelltypen beschrieben (Frisch und Francis, 1994), u.a. von Scott et al. (1997) für Melanozyten unter Fibronectin-Einfluss. In unseren Versuchen führte die Beschichtung der Kulturplatten mit Laminin-1 zu einer höheren Toleranz der Melanozyten gegenüber UVB. Dies zeigte sich an der im Vergleich zu unbeschichteten Kulturplatten bei visueller Abschätzung deutlich geringeren Rate abgelöster Zellen 24 h p.i. Der Effekt war in geringerem Ausmaß auch bei Fibronectin erkennbar. In der Literatur wurde der Einfluss von ECM auf die UV-Toleranz von Melanozyten bislang nicht untersucht. Es findet sich lediglich eine Untersuchung von Achambault et al. (1995), aus der hervorgeht, dass Melanozyten *in vitro* unter UVB-Bestrahlung auf Dermis-Äquivalenten besser als Monolayer-Melanozyten überleben, vor allem wenn sie in Ko-Kultur mit Keratinozyten wachsen. Der von uns beobachtete Effekt einer erhöhten UV-Toleranz bei Lamininbeschichtung lässt sich, auf die *in vivo* Situation übertragen, dahingehend interpretieren, dass die Bindung an die extrazelluläre Matrix der Basalmembran (Laminin-1) und, geringer ausgeprägt auch an dermale ECM (Fibronectin), bei Melanozyten zu einer erhöhten Apoptoseresistenz gegenüber UV-Licht führt. Dies ist tendenziell gut mit der in den zitierten Arbeiten (Ranson et al, 1988, Mortarini et al, 1995) erwähnten proliferationsfördernden Wirkung von Laminin (und Fibronectin) vereinbar. Schlagwortartig könnte man von Laminin als einem „survival-Faktor“ für Melanozyten sprechen. Auf die hierfür möglicherweise verantwortlichen Mechanismen wird weiter unten näher eingegangen.

## **4.3 Expression von Adhäsionsmolekülen**

### **4.3.1 Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen**

Unsere durchflusszytometrischen Messungen zeigten, dass alle Adhäsionsmoleküle mit Ausnahme von N-Cadherin in unterschiedlichem Ausmaß immunreaktiv waren. N-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül, das in der menschlichen Haut z.T. von Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert wird, nicht jedoch von Keratinozyten und Melanozyten. Auch *in vitro* ist es in normalen Melanozyten negativ (Hsu et al., 1996). Die fehlende Immunreaktivität in unseren Untersuchungen bestätigt diese Ergebnisse. Von einigen Autoren wurde die *de-novo*-Expression von N-Cadherin als bedeutsamer Schritt in der

Melanomprogression beschrieben. Hierbei soll eine gleichzeitige Herunterregulation von E-Cadherin wirksam sein (sog. E-Cadherin-/ N-Cadherin-switch), wobei die Bindungspartner von N-Cadherin und die genauen Mechanismen nicht bekannt sind (Herlyn et al., 2000; Hsu et al., 2000a). N-Cadherin wird in vitro von manchen Melanomzelllinien exprimiert und ist gelegentlich auch in Melanomen in vivo nachweisbar (Hsu et al., 1996; Krengel et al., 2004).

Die durchflusszytometrisch gemessene Immunreaktivität kann näherungsweise als Maß für die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Zellmembran der Melanozyten gelten. In unserer Untersuchung wird die Höhe der Expression durch den Prozentsatz der immunreaktiven Zellen quantitativ ausgedrückt, wobei der Schwellenwert für Immunreaktivität anhand von Negativkontrollen bestimmt wurde (näheres siehe Abschnitt 2.4; Material und Methoden). Alternativ zur Angabe in „Prozent der positiven Zellen“ lässt sich die Immunreaktivität auch als „mittlere Fluoreszenzintensität“ (MFI) ausdrücken. Die Fluoreszenzintensität repräsentiert die Anzahl der Antigenmoleküle auf der Zelloberfläche. Diese Messgröße ist insbesondere dann vorzuziehen, wenn ein Großteil der Zellen Immunreaktivität zeigt und daher die prozentuale Angabe keine Unterschiede aufzeigen kann. Prinzipiell sind Prozentangaben und MFI voneinander abhängige Größen. Mittlere Fluoreszenzintensitäten wurden für einen Teil der Messungen ergänzend zu den prozentualen Angaben berechnet (siehe Tab. 7.4 und 7.6 im Anhang).

Bei der Interpretation der durchflusszytometrischen Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass Zellen, die im negativen Messbereich des Durchflusszytometers liegen, das entsprechende Oberflächenmolekül nicht zwangsläufig überhaupt nicht exprimieren, sondern wahrscheinlich eine geringe Expression aufweisen, die unter der Sensitivitätsgrenze des jeweiligen Primärantikörpers liegt. Mögliche Unterschiede in der Sensitivität der verschiedenen Antikörper beeinträchtigt die Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen. Aus diesem Grund wählten wir Primärantikörper, die nach Herstellerangaben bereits für die Durchflusszytometrie getestet sind und daher als vergleichsweise sensitiv und verlässlich im Sinne der Fragestellung gelten dürfen.

#### **4.3.2 Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen unter UVB-Bestrahlung**

Die zunächst durchgeführten Messreihen mit einer Bestrahlungsdosis von 5 mJ/cm<sup>2</sup> UVB zeigten 24 h p.i. keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmoleküle im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen.

Über den Einfluss von UV-Licht auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle ist wenig bekannt. Neitmann et al. (1999) waren bislang die einzige Arbeitsgruppe, die die Expression melanozytärer Integrine unter UV-Einfluss untersuchten. In immunzytochemischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen ermittelten sie die

Expression der Integrine  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  und  $\beta 1$  unter UVA- und UVB-Bestrahlung. Sie fanden eine leicht erhöhte Immunreaktivität eines  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Antikörpers bei UVB 30 mJ/cm<sup>2</sup>, 48 h p.i., die vor allem immunzytochemisch darstellbar, im FACS jedoch nicht signifikant war. Für die anderen Integrine wurde in dieser Studie durchflusszytometrisch keine Änderung der Expression unter UVB-Bestrahlung gemessen. Für die Expression von E-Cadherin unter UV-Einfluss liegen lediglich zwei Untersuchungen an Melanozyten vor, deren Ergebnisse sich jedoch widersprechen. Seline et al (1996) fanden 24 h p.i. eine leicht reduzierte Expression, während diese bei Nakazawa et al. (1995a) unverändert blieb (jeweils 20 mJ/cm<sup>2</sup>, 24 h p.i.).

In einem nächsten Schritt testeten wir den Einfluss höherer UVB-Dosen auf die Expression. Bei 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB fand sich 24 h p.i. analog zu den Ergebnissen mit niedrigerer Bestrahlungsdosis wiederum bei fast allen Adhäsionsmolekülen keine signifikante Änderung der Expression. Als einziges der untersuchten Moleküle zeigte die  $\alpha 6$ -Integrinuntereinheit nach Bestrahlung eine signifikante Herunterregulation. Dieser Effekt war in mehreren Messungen durchgängig reproduzierbar. Um die Dosisabhängigkeit und Kinetik der  $\alpha 6$ -Regulation zu demonstrieren wurden dann Messungen 12, 24 und 48 h p.i. mit 5, 10 und 20 mJ/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Es zeigte sich, dass  $\alpha 6$  dosisabhängig herunterreguliert wird und dass die Herunterregulation reversibel ist. Allerdings war der Wiederanstieg der Expression nur bei 10 mJ/cm<sup>2</sup> nachweisbar, da bei 20 mJ/cm<sup>2</sup> nach 48 h schon ein erheblicher Teil der Zellen abgelöst war und der noch vitale Anteil offenbar durch die Prozeduren (Trypsinieren, Immunfluoreszenzmarkierungen mit entsprechenden Zentrifugationsschritten) soweit geschädigt wurde, dass durchflusszytometrisch keine verwertbaren Daten mehr erhoben werden konnten.

#### **4.3.3 Expression von melanozytären Adhäsionsmolekülen unter Einfluss von Extrazellulärmatrix**

Der Kontakt von Melanozyten mit Komponenten der extrazellulären Matrix spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung einer Vielzahl melanozytärer Funktionen (u.a. Einfluss auf Morphologie, Pigmentbildung, Proliferation, s.o.). Dieser Kontakt wird größtenteils über membranständige Rezeptoren für Matrixmoleküle aus der Familie der Integrine vermittelt. Um einen eventuellen Einfluss der ECM auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle zu untersuchen wurden die durchflusszytometrischen Messungen mit Laminin-1- und Fibronectin-beschichteten Kulturplatten wiederholt. Hierbei zeigte sich weder für unbestrahlte Melanozyten noch für UVB-bestrahlte Melanozyten (5 mJ/cm<sup>2</sup>, 24 h p.i.) ein signifikanter Einfluss der ECM-Beschichtung auf die Immunreaktivität.

Die signifikante Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin bei höheren UVB-Dosen veranlasste uns, einen möglichen Einfluss der ECM auf diesen Effekt zu untersuchen. Dabei wendeten wir uns gezielt einer möglichen Rolle von Laminin zu.  $\alpha 6$ -Integrin ist als Heterodimer mit  $\beta 1$ -Integrin ein Lamininrezeptor. Die zelluläre Bindung an Laminin konnte in Studien durch Antikörper gegen dieses Integrin blockiert werden (McClenic et al., 1989; Sonnenberg et al., 1990; Hall et al., 1990, Delwel et al., 1994). Unsere Messungen mit Laminin-1-beschichteten Kulturplatten zeigten eine signifikante Verzögerung und Abschwächung der UV-induzierten Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin. Diese wurde bei  $10 \text{ mJ/cm}^2$  erst nach 48 h p.i. signifikant und war auch zu diesem Zeitpunkt noch deutlich höher als bei den unbeschichteten Kontrollen. Bei Bestrahlung mit  $20 \text{ mJ/cm}^2$  war die Herunterregulation bereits nach 12 h signifikant, jedoch in erheblich geringerem Ausmaß als bei den unbeschichteten Kontrollen. 48 h p.i. entsprach die Expression von  $\alpha 6$ -Integrin derjenigen von unbeschichteten Kontrollen nach 24 h, wobei die Melanozyten im Gegensatz zu den unbeschichteten Kontrollen zu diesem Messzeitpunkt überwiegend in einem guten Zustand waren und verwertbare Ergebnisse brachten. Dies deutet auf einen protektiven Effekt von Laminin-1 auf UV-bestrahlte Melanozyten hin.

#### **4.3.4 Einfluss einer Kokultur mit Keratinozyten auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle**

Kokultur-Studien belegen die zentrale Bedeutung von Keratinozyten für die melanozytäre Funktion und Differenzierung (De Luca et al, 1988a, b; Gordon et al., 1989, Haake und Scott, 1991). 1993 zeigten Valyi Nagy et al., dass proliferierende Keratinozyten (basaler Differenzierungstyp) die Proliferation, Morphologie und Antigen-Expression von Melanozyten kontrollieren und dass diese Kontrolle durch direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt wird. Ein Jahr später wurde E-Cadherin als das Hauptadhäsionsmolekül zwischen Melanozyten und Keratinozyten ermittelt (Tang et al., 1994).

Auch zum Einfluss einer Kokultur auf die UV-Reaktion von Melanozyten gibt es interessante Literaturstellen. So zeigen Melanozyten in Kokultur mit Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung einen deutlich stärkeren Anstieg der Pigmentproduktion als in Monokultur (Duval et al., 2001); Achambault et al (1995) zeigten, dass Melanozyten in vitro unter UVB-Bestrahlung auf Dermis-Äquivalenten besser als Monolayer-Melanozyten überleben, vor allem, wenn sie in Kokultur mit Keratinozyten wachsen.

Da sich Melanozyten und Keratinozyten in Kokultur durchflusszytometrisch nicht hätten getrennt auswerten lassen, wählten wir für die Kokultur-Untersuchungen die Methode der Immunzytochemie. Die im Verhältnis 1:5 gemeinsam auf chamber-slides ausgesäten Melanozyten und Keratinozyten wurden für einige Tage bis zum Erreichen eines

subkonfluenten Wachstums in Keratinozytenmedium mit unterschiedlicher molarer Calciumkonzentration kokultiviert (0,09 mM bzw. 1,5 mM). Bei niedriger Calciumkonzentration, welche eher den Gegebenheiten in der epidermalen Basalzellschicht entspricht, zeigen die Keratinozyten eine höhere Proliferation. Sie verteilen sich dabei relativ gleichmäßig auf der Oberfläche der Kulturschalen. Eine hohe Calciumkonzentration bewirkt eine verstärkte Differenzierung, bei der sich die Keratinozyten analog zu suprabasalen Epidermisschichten in plattenepithelialen Verbänden zusammenlagern und dabei inselartige Gruppen bilden. Die Kokulturen wurden auf den chamber-slides UVB-bestrahlt, wobei relativ hohe Dosen (20 mJ/cm<sup>2</sup>) ohne nennenswerte Ablösung bzw. morphologisch erkennbare Schädigung der Zellen toleriert wurden. Für die immunzytochemischen Färbungen kamen dieselben Primärantikörper wie für die FACS- Analyse zum Einsatz. Der in der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper gegen  $\alpha 6$ -Integrin war in der Immunzytochemie negativ. Da  $\alpha 6$ -Integrin nach den durchflusszytometrischen Ergebnissen ein besonders interessantes Antigen darstellt, wurden noch immunzytochemische Färbungen an Kokulturen mit anderen  $\alpha 6$ -Integrin-Antikörpern durchgeführt (GoH3 [Abb. 3.24/3.25] und  $\alpha 6A$  [nicht gezeigt]). Bei der Färbung mit GoH3 fand sich bei Methanol-Aceton-Fixierung ebenfalls keine Immunreaktivität; bei einer alternativ verwendeten Fixierung mit Formalin (4%) zeigten die Keratinozyten eine deutlich positive membranöse Färbung (siehe Abb. 3.24 und 3.25), die Melanozyten waren jedoch erneut negativ. Vermutlich wird das durch die jeweiligen Antikörper erkannte Epitop in Melanozyten durch den Fixierungsprozess maskiert. In nach Abschluss der in dieser Dissertation beschriebenen Experimente durchgeführten weitergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe war mit dem GoH3-Antikörper auch in Melanozyten eine Immunreaktivität, allerdings mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, nachweisbar (Krengel et al., akzeptiert im November 2004). Dies zeigt, dass es sich bei den geschilderten Ergebnissen um ein methodisches Problem handelt. Daher kann aus den Ergebnissen keine Aussage zum Einfluss einer Kokultur mit Keratinozyten abgeleitet werden. Im Vergleich mit der Durchflusszytometrie, die durch prozentuale Angaben der Immunreaktivität eine quantitative Auswertung der Ergebnisse ermöglichte, ließen diese Färbungen jedoch lediglich eine semiquantitative Differenzierung zu (fehlende, mäßige oder starke Expression). Insgesamt ließen sich mit dieser Methode weder für unterschiedliche Calciumkonzentrationen noch für die UVB-Bestrahlung deutliche Effekte auf die Immunreaktivität aufzeigen. Der Vergleich der Ergebnisse mit den durchflusszytometrischen Messungen zeigt folgende Unterschiede: Die Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  zeigten in den immunzytochemischen Färbungen eine schwächere

Immunreaktivität als in der durchflusszytometrischen Messung. Auch die Immunreaktivität der Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha V$  sowie von E-Cadherin war in den immunzytochemischen Färbungen etwas geringer. Die Melanozyten stellten sich sowohl in der immunzytochemischen Färbung als auch in der Durchflusszytometrie negativ für N-Cadherin dar; auch ICAM-1 war in beiden Untersuchungsmethoden nur schwach positiv. Melanozyten zeigten in der immunzytochemischen Färbung eine mittlere Immunreaktivität für  $\beta 3$ -Integrin; in durchflusszytometrischen Messungen fanden wir eine geringere Expressionsstärke. Für diese Unterschiede könnten jedoch methodische Ursachen verantwortlich sein, insbesondere ein Einfluss der Fixierung auf die Immunreaktivität ist denkbar.

#### 4.4 Bedeutung von $\alpha 6$ -Integrin in vivo

Welche Rolle spielt  $\alpha 6$ -Integrin in vivo? Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin um einen Lamininrezeptor. Laminin ist ein Basalmembran- Glykoprotein, das sich aus drei Polypeptiduntereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) zusammensetzt (Chung et al., 1979; Timpl et al., 1979, 1989; Sasaki et al., 1988). Untersuchungen mit proteolytischen Fragmenten des Laminins zeigten, dass insbesondere der endständige Teil des langen Arms des kreuzförmigen Laminin-Moleküls, Fragment E8, für die Bindung an Integrinrezeptoren von Zellen verantwortlich ist (Aumailley et al., 1987; Goodman et al., 1987). Durch Variation der Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten entstehen verschiedene Laminin-Isoformen. In der epidermalen Basalmembran liegt Laminin in den Isoformen 1 (Laminin-1:  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ) und 5 (Laminin-5:  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) vor (Sollberg et al., 1992; Burgeson, 1996). Durch Simulation der Basalmembran- Bildung in vitro konnte gezeigt werden, dass Laminin-5 hierbei von Keratinozyten produziert wird, während Laminin-1 überwiegend von Fibroblasten der dermalen Seite der Basalmembran beigesteuert wird (Fleischmajer et al., 1998). Laminin-Bindung von Zellen ist prinzipiell möglich über die Integrine  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 4$  (Wayner und Carter, 1987; Gehlsen et al., 1988, 1989; Ignatius und Reichardt, 1988; Sonnenberg et al., 1988a; Languino et al., 1989; Turner et al., 1989; Elices und Hemler, 1989; Tomaselli et al., 1990). Hiervon wurden  $\alpha 3\beta 1$ - und  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin auf Melanozyten nachgewiesen (Zambruno et al., 1991, 1993). Für  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin ist kein weiterer Bindungspartner bekannt, es handelt sich offenbar um einen spezifischen Laminin-Rezeptor. Die Laminin-bindenden Integrine  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$  besitzen unterschiedliche Affinitäten zu den Laminin-Isoformen:  $\alpha 3\beta 1$  bindet überwiegend an Laminin-5 (Carter et al., 1991; Rouselle und Aumailley, 1994), während  $\alpha 6\beta 1$  an beide Laminin-Isoformen binden kann (Delwel et al., 1994). Die  $\alpha 6$ -Untereinheit kommt auch als

Heterodimer mit  $\beta 4$ -Integrin vor (Sonnenberg et al., 1988b; Hemler et al., 1989; Kajiji et al., 1989).  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin wird von den meisten epithelialen Zellen, z.B. Keratinozyten, exprimiert und ist ein wesentlicher molekularer Bestandteil von Hemidesmosomen.

Integrine als zelluläre Rezeptoren für ECM-Moleküle dienen zum einen der Adhäsion, zum anderen der Signalübertragung. Bei einer Übertragung unserer Ergebnisse auf die in vivo-Situation könnte die Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin in beiderlei Hinsicht von Bedeutung sein. Zunächst zur *Adhäsion*: Es ist bislang nicht eindeutig geklärt, welche molekulare Verbindung in vivo zwischen der Basalmembran und den ihr aufsitzenden Melanozyten besteht. Aufgrund der in der Einleitung zitierten Untersuchungen scheint jedoch eine Interaktion über die Laminin-bindenden Integrine  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$  sowie evtl. über das auch an Kollagen-IV bindende Integrin  $\alpha 2\beta 1$  wahrscheinlich. Sollte die von uns in vitro nachgewiesene  $\alpha 6$ -Integrin-Regulation auch in vivo wirksam sein, so dürfte dies zu einer UV-induzierten Abschwächung der Adhärenz der Melanozyten an der Basalmembran führen. Dies könnte zu dem unter UV-Einfluss beobachteten Aufsteigen melanozytärer Einzelzellen innerhalb der Epidermis in melanozytären Nävi beitragen (Tronnier et al., 1995). Es ist vorstellbar, dass die verstärkte epidermale Proliferation die in ihrer Verankerung gelockerten Melanozyten nach oben, in suprabasale Zellschichten, „mitreißt“. Gegen ein solches Modell spricht allerdings, dass in normaler Haut nach UV-Bestrahlung (z.B. bei einem Sonnenbrand) keine suprabasalen Melanozyten erkennbar sind. Möglicherweise wird die durch  $\alpha 6$ -Integrin-Herunterregulation gelockerte Bindung kompensiert durch die Verankerung über die anderen o.g. Basalmembran-bindenden Integrine sowie über die E-Cadherin-vermittelte interzelluläre Bindung an Keratinozyten (Tang et al., 1994; Hsu et al., 2000b). Darüber hinaus könnte der UV-Effekt der Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin gemäß unserer Ergebnisse zum protektiven Einfluss von Laminin in vivo durch Basalmembran-Bindung ohnehin abgeschwächt sein.

Es ist bekannt, dass Integrine über ihre Eigenschaft als Adhäsionsmolekül hinaus eine außerordentlich wichtige Rolle in der *Signalübertragung* spielen (Juliano und Haskill, 1993). Eine gestörte Basalmembran-Interaktion epithelialer Zellen kann zur Apoptose führen. Dieser spezielle Weg in die Apoptose wird als Anoikis bezeichnet (Frisch und Francis, 1994). Bei intakter Basalmembran-Interaktion fungiert offenbar auf zellulärer Seite eine gegenseitige Beeinflussung („crosstalk“) zwischen Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren als survival-Signal, vermutlich über eine intrazelluläre Aktivierung des ras-Onkogens (Frisch und Screaton, 2001). Ist diese Interaktion durch Zellablösung gestört („detachment“), resultiert apoptotischer Zelltod, der bei Entstehung infolge gestörter Zellverankerung auch als „Ankoisis“ bezeichnet wird. Denkbar ist, dass dieser Mechanismus auch durch Herunterregulation einzelner Integrin-Untereinheiten

ausgelöst werden kann. Interessanterweise wurde für verschiedene Zelltypen (Mammaepithelzellen, Fibroblasten, Oligodendrozyten) insbesondere die Interaktion zwischen Laminin und  $\alpha 6$ -Integrin als entscheidender Survival-Faktor beschrieben (Lin und Bertics, 1995; Farrelly et al., 1999; Corley et al., 2001). Diese Tatsache lässt die UV-induzierte spezifische Regulation der  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit in Melanozyten in einem interessanten Licht erscheinen. Melanozyten sind *in vitro* resistenter gegen UV-induzierte Apoptose als Keratinozyten (Bowen et al., 2003). Möglicherweise ist hierfür eine in Melanozyten erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 verantwortlich (Plettenberg et al., 1995). Des Weiteren ist bekannt, dass Zellen während der DNA-Synthese (S-Phase der Mitose) empfindlich für Apoptose sind. Hierin mag ein weiterer Erklärungsansatz liegen (Danno und Horio, 1987), da basale Keratinozyten einem regen Zellzyklus unterliegen, während Melanozyten *in vivo* nur als Reaktion auf exogene Stimuli wie UV-Bestrahlung oder während des Wundheilungsprozess proliferieren (Valyi Nagy et al., 1993). UV-Resistenz ist für Melanozyten zur Erfüllung ihrer natürlichen Funktion (UV-Schutz) wichtig. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Laminin-Bindung die Melanozyten *in vivo* bis zu einem gewissen Grad vor UV-induzierter Apoptose schützt, es jedoch unter dem Einfluss höherer UV-Dosen (wie sie z.B. bei einem Sonnenbrand wirksam sind) auch in Melanozyten zu einer gestörten Basalmembran-Interaktion mit der Folge des Zelltodes kommt. Lamininbindung und  $\alpha 6$ -Integrin-Regulation könnten somit eine wichtige Rolle bei der Balance zwischen Aufrechterhaltung der Melanozytenfunktion und Schutz vor UV-induzierter Karzinogenese spielen.

Sowohl melanozytäre Nävi als auch Melanome zeigen immunhistochemisch normalerweise sowohl  $\alpha 6$ -Integrin- als auch Laminin-Expression (Schaumburg- Lever et al., 2000). In fortgeschrittenen, invasiven Melanomen nimmt die Expression von  $\alpha 6$ -Integrin tendenziell ab und auch die Lamininexpression wird unregelmäßiger (Albelda et al., 1993; Schadendorf et al., 1993; Van Duinen et al., 1994; Moretti et al., 1993). *In vitro* konnte dagegen in metastasierten Melanomzelllinien eine stärkere Expression von  $\alpha 6$ -Integrin im Vergleich zu weniger aggressiven Melanomzelllinien gezeigt werden (Van Muijen et al., 1995; Ziober et al., 1999). Möglicherweise wird auch von melanozytären Tumoren die  $\alpha 6$ -Laminin-Interaktion als survival-Faktor genutzt, wie dies für andere Malignome (Pankreas- und Leberzell-Karzinom) beschrieben wurde (Nejjari et al, 1999; Sawai et al, 2003). Im Verlauf der Melanomprogression könnten die Melanomzellen von diesem survival-Faktor dann z.B. durch Produktion anderer, autokriner Wachstumsfaktoren zunehmend unabhängig werden. Eine intratumorale Heterogenität der Expression von Adhäsionsmolekülen könnte darüber hinaus zu einer verbesserten Adaptationsfähigkeit an die Umgebungsbedingungen führen.

Schließlich ist denkbar, dass die UV-induzierte Herunterregulation von  $\alpha 6$ -Integrin in Melanozyten eine Bedeutung für initiale Schritte der Tumorphagenese hat. Von Ingber (2002) wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei gestörter Basalmembran-Interaktion, die über einen längeren Zeitraum bzw. wiederholt auftritt, spontan Zellen entstehen könnten, die verankerungsunabhängig lebensfähig sind. Der Hypothese zufolge entwickeln sich solche Zellen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit über klonale Expansion zu epithelialen Tumoren. In diesem Sinne könnten auch bei intermittierender, starker UV-Exposition (Sonnenbrände) Melanozyten selektioniert werden, die zu verankerungsunabhängigem Überleben und Wachstum fähig sind. Die epidemiologischen Beobachtungen bezüglich der Rolle intermittierender Sonnenexposition bei der solaren Nävogenese und der Melanomentstehung wären gut mit diesem Modell in Einklang zu bringen. Eine Voraussetzung zur Ausbildung der Fähigkeit, verankerungsunabhängig zu überleben, wäre die autokrine Produktion von Wachstumsfaktoren. Ein wichtiger Kandidat hierfür ist FGF-2, ein autokriner Wachstumsfaktor, der nicht von Melanozyten, jedoch sowohl von Nävi als auch von Melanomen regelmäßig exprimiert wird (Halaban et al., 1988a; Reed et al., 1994; Alanko et al., 1999). Meier et al (2003) untersuchten den Effekt einer experimentell induzierten Expression von FGF-2 in Melanozyten in einem Haut-Organkulturmodell. Diese führte zu zytologischen Atypien, intraepidermalem Aufsteigen und Clusterbildung und wies damit ein ähnliches histologisches Bild wie frühe Melanomstadien auf. Selbstverständlich sind diese Betrachtungen spekulativ. Sie zeigen jedoch, wie sich unsere Ergebnisse über melanozytäre Adhäsionsmoleküle bzw. deren Änderung unter UV-Einfluss in pathogenetische Szenarien integrieren lassen, deren Gültigkeit in weiterführenden Untersuchungen zu überprüfen ist.

## 4.5 Ausblick

Die hier präsentierten Ergebnisse eröffnen einige interessante Perspektiven, werfen aber noch mehr Fragen auf, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bearbeitet werden konnten. Zunächst wäre es erforderlich, die Auswirkung von höheren UVB-Dosen auf Melanozyten genau zu charakterisieren und quantitativ zu erfassen. Im Rahmen eines Apoptose-Assays sollte hierzu die Expression von Apoptose-Markern (z.B. AnnexinV) auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt werden. Auch muss die Kinetik der  $\alpha 6$ -Integrin-Regulation weitergehend untersucht werden: Hierbei sollten sowohl die Konzentrationen der Lamininbeschichtung variiert werden als auch der Einfluss weiterer Matrixbeschichtungen wie Fibronectin und Kollagen I und IV untersucht werden. Auch für längere Zeitintervalle (72 h, 96 h p.i.) sollte die  $\alpha 6$ -Integrin-Expression bestimmt werden. Die funktionelle Bedeutung der  $\alpha 6$ -Integrin-Regulation für die Adhärenz von Melanozyten an Laminin kann durch photometrische Messungen demonstriert werden (attachment-assay). In derartigen Untersuchungen könnte auch die Bedeutung einzelner Oberflächenmoleküle für die Adhärenz näher bestimmt werden, indem blockierende Antikörper, die gegen die jeweils zu messende Integrin-Untereinheit gerichtet sind, zum Einsatz kommen. Offen bleibt auch die Frage, ob in anderen Zelltypen (Keratinocyten, Melanomzellen) oder aber in Melanozyten unterschiedlicher Hauttypen eine UV-induzierte  $\alpha 6$ -Integrin-Regulation nachweisbar ist. Schließlich ist zu klären, welcher Mechanismus zur Herunterregulation der  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit führt: Handelt es sich hierbei um eine Regulation auf Protein- bzw. mRNA-Ebene? Welche Bedeutung hat der in vitro beobachtete Effekt in vivo? Zur Annäherung an diese Frage wären UV-Bestrahlungen an Haut-Organkulturmodellen denkbar, evtl. auch immunhistologische Untersuchungen an Biopsaten aus UV-bestrahlter Haut.

Die Aufklärung von zellulären Mechanismen eröffnet in vielen Fällen auch Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention. In diesem Zusammenhang wäre es beispielsweise denkbar, dass die Beeinflussung der  $\alpha 6$ -Laminin-Interaktion auch einen potentiellen Anti-Tumor-Mechanismus darstellt. Entsprechende, allerdings noch ausgesprochen experimentelle Bestrebungen, wurden bereits für das Kolonkarzinom beschrieben (Chakrabarty et al., 2001).

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses von UVB-Licht auf melanozytäre Adhäsionsmoleküle ( $\alpha$ 2-,  $\alpha$ 3-,  $\alpha$ 5-,  $\alpha$ 6-,  $\alpha$ V-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 3-Integrin, E-, N-Cadherin, ICAM-1) in vitro. Die Bestrahlung mit UVB führte in Melanozyten zu dosisabhängigen Effekten. Bei einer Dosis von 5 mJ/cm<sup>2</sup> UVB zeigten sich 24 h p.i. in durchflusszytometrischen Messungen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmoleküle im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen. Bei 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB fand sich 24 h p.i. unter allen Adhäsionsmolekülen lediglich bei der  $\alpha$ 6-Integrin-Untereinheit eine signifikante Herunterregulation, die in weiteren Messreihen als dosisabhängig und reversibel charakterisiert werden konnte.

Zur Untersuchung des Einflusses der Zell-Matrix-Interaktion wurden die gleichen Messungen mit Melanozyten durchgeführt, die auf ECM-beschichteten Kulturplatten (Laminin-1, Fibronectin) kultiviert und bestrahlt wurden. Auch hierbei zeigten sich keine signifikanten Effekte bei Bestrahlungsdosen von 5 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. In Melanozyten, die auf Laminin-1-beschichteten Kulturplatten kultiviert wurden, war die UV-induzierte Herunterregulation von  $\alpha$ 6-Integrin jedoch deutlich abgeschwächt und verzögert. Außerdem führte die Lamininbeschichtung zu einer erhöhten Bestrahlungsresistenz der Melanozyten.

In immunhistochemischen Färbungen wurde der Einfluss von direkten Zell-Zell-Kontakten in einem Kokulturmodell mit Keratinozyten untersucht. Bei diesen Untersuchungen waren 24 h p.i. mit Bestrahlungsdosen von 20 mJ/cm<sup>2</sup> die in den FACS-Analysen erzielten Messergebnisse für die Mehrzahl der Antikörper reproduzierbar, ohne dass sich ein Einfluss der Kokultur auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle zeigen ließ.

Die vorgestellten Ergebnisse demonstrieren den Einfluss von UVB-Licht auf die Expression melanozytärer Adhäsionsmoleküle und zeigen insbesondere, dass die  $\alpha$ 6-Integrin-Untereinheit durch UVB herunterreguliert wird. Die Bindung der Melanozyten an Laminin-1 repräsentiert einen UV-protectiven Mechanismus.

## 6 Literatur

- Achambault, M., Yaar, M., Gilchrest, B.A.: Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol.* **104**: 859- 867 (1995)
- Ackermann, A.B., Cerroni, L., Kerl, H.: Pitfalls in histopathologic diagnosis of malignant melanoma. Lea & Fiebiger, Philadelphia, Baltimore, Hong- Kong, London, München, Sydney, Tokio, 1994
- Alanko T., Rosenberg M., Saksela, O.: FGF expression allows nevus cells to survive in three-dimensional collagen gel under conditions that induce apoptosis in normal human melanocytes. *J. Invest Dermatol.* **113**: 111- 116 (1999)
- Albelda, S.M.: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* **68**: 4- 17 (1993)
- Augustsson, A., Stierner, U., Rosdahl, I., Suurküla, M: Regional distribution of melanocytic naevi in relation to sun exposure, and site- specific counts predicting the total number of naevi. *Acta Derm Venereol.* **72**: 123- 127 (1992)
- Aumailley, M.V., Nurcombe, D., Edgar, D., Paulsson, M., Timpl, R.: The cellular interactions of laminin fragments. *J Biol Chem.* **262**: 11532- 11538 (1987)
- Balch, C. M., Soong, S.- J., Shaw, H. M., Urist, M. M., McCarthy, W. H.: An analysis of prognostic factors in 8500 patients with malignant melanoma.  
In: Balch, C. M., Houghton, A. N., Milton, G. W., Sober, A. J., Soong, S.- J.: Cutaneous melanoma. 2. Aufl., 165- 187, JB Lippincott Company, Philadelphia, 1992
- Balch, C. M., Buzaid, A. C., Soong, S.- J., Atkins, M. B., Cascinelli, N., Coit, D. G., Fleming, I. D., Gershenwald, J. E., Houghton, A., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. F., Morton, D. L., Reintgen, D. S., Ross, M. I., Sober, A., Thompson, J. A., Thompson, J. F.: Final version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **19**: 3635- 3648 (2001)
- Bentham, G. und Aase, A.: Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955- 1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. *Int J Epidemiol.* **25**: 1132- 1138 (1996)
- Berwick, M.: Epidemiology: current trends, risk factors and environmental concerns.  
In: Balch, C.M., Houghton, A.N., Sober, A.J., Soong, S.J.: Cutaneous melanoma.  
3. Aufl., 551- 571, Quality Medical Publishing, St. Louis, 1998
- Bowen, A.R., Hanks, A.N., Allen, S.M., Alexander, A., Diedrich, M.J., Grossman, D.: Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol.* **120**: 48- 50 (2003)
- Breslow, A.: Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I melanoma. *Ann Surg.* **182**: 572- 575 (1975)
- Briggaman, R.A. und Wheeler, Jr. C.E.: The epidermal- dermal junction. *J Invest Dermatol.* **65**: 71- 84 (1975)
- Burgeson, R.E.: Laminins in epidermal structures.  
In: Ekblom, P.E. und Timpl, R.:The laminins. 65- 96, Harwood Academic, UK, 1996

- Carter, W.G., Ryan, M.C., Gahr, P.J.: Epiligrin, a new cell adhesion ligand for  $\alpha 3\beta 1$  in epithelial basement membranes. *Cell* **65**: 599- 610 (1991)
- Chakrabarty S., Liu B.R., Rajagopal, S.: Disruption of transforming growth factor  $\beta$ - regulated laminin receptor function by expression of antisense laminin, a chain RNA in human colon cancer cells. *J Cell Physiol.* **186**: 47- 52 (2001)
- Chung, A.E., Jaffe, R., Freeman, I.L., Vergnes, J.P., Braginski, J.E., Carlin, B.: Properties of a basement- membrane- related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma- derived cell line. *Cell* **16**:277- 281 (1979)
- Clark, W.H., From, L., Bernardino, E.A., Mihm, M.C.: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res.* **29**: 705- 729 (1969)
- Coombs, B.D., Sharpels, K.J., Cooke, K.R., Skegg, D.C.G., Elwood, J.M.: Variation and covariates of the number of benign nevi in adolescents. *Am J Epidemiol.* **136**: 344- 355 (1992)
- Corley, S.M., Ladiwala, U., Besson, A., Yong, V.W.: Astrocytes attenuate oligodendrocyte death in vitro through an  $\alpha 6$  integrin- laminin- dependent mechanism. *Glia* **36**: 281- 294 (2001)
- Danen, E.H.J., Jansen, K.F.J., Klein, C.E., Smit, N.P., Ruiter, D.J., van Muijen, G.N.P.: Loss of adhesion to basement membrane components but not to keratinocytes in proliferating melanocytes. *Eur J Cell Biol.* **70**: 69- 75 (1996)
- Danno, K. und Horio, T.: Sunburn cell: factors involved in its formation. *Photochem Photobiol.* **45**: 683- 90 (1987)
- De Luca, M., Franzi, A.T, D`Anna, F., Zicca, A., Albanese, E., Bondanza, S., Cancedda, R.: Coculture of human keratinocytes and melanocytes: differentiated melanocytes are physiologically organized in the basal layer of the cultured epithelium. *Eur J Cell Biol.* **46**: 197- 180 (1988a)
- De Luca, M., D`Anna, F., Bondanza, S., Franzi, A.T., Cancedda, R.: Human epithelial cells induce melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. *J Cell Biol.* **107**: 1919- 1926 (1988b)
- Delwel, G.O., de Melker, A.A., Hogervost, F., Jaspars, L.H., Fles, D.L.A., Kuikman, I., Lindblom, A., Paulsson, M., Timpl, R., Sonnenberg, A.: Distinct and overlapping ligand specificities of the  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$  integrins : Recognition of laminin isoforms. *Mol Biol Cell* **5**: 203- 215 (1994)
- Duval, C., Regnier, M., Schmidt, R.: Distinct melanogenic response of human melanocytes in mono- culture, in co- culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure. *Pigment Cell Res.* **14**: 348- 355 (2001)
- Edelman, G.M. und Crossin, K.L.: Cell adhesion- molecules: Implications for a molecular histology. *Ann Rev Biochem.* **60**: 155- 190 (1991)
- Elices, M.J. und Hemler, M.E.: The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/ laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9906- 9910 (1989)
- Elwood, J.M.: Melanoma and ultraviolet radiation. *Clin Dermatol.* **10**: 41- 50 (1992)

- Farely, N., Lee, Y.-J., Oliver, J., Dive, C., Streuli, C.: Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol.* **144**: 1327- 1347 (1999)
- Fitzpatrick, T. B. und Breathnach, A. S.: the epidermal melanin unit system. *Dermatol Wochenschr* **147**: 481- 489 (1963)
- Fleischmajer, R., Utani, A., MacDonald II, E.D., Perlish, J.S., Pan, T.-C., Chu, M.-L., Nomizu, M., Ninomiya, Y., Yamada, Y.: Initiation of skin basement membrane formation at the epidermo- dermal interface involves assembly of laminins through binding to cell membrane receptors. *J Cell Science* **111**: 1929- 1940 (1998)
- Friedman, P.S. und Gilchrest, B.A.: Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J Cell Physiol.* **133**: 88- 94 (1987)
- Frisch, S.M. und Francis, H.: Disruption of epithelial cell- matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* **124**: 619- 26 (1994)
- Frisch, S.M. und Sreaton, R.A.: Anoikis mechanisms. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **13**: 555- 562 (2001)
- Garbe, C., Büttner, P., Burg, G., d'Hoedt, B., Drepper, H., Guggenmoos- Holzmann, I., Lechner, W., Lippold, A., Orfanos, C.E., Peters, A., Rassner, G., Schwermann, M., Stadler, R., Stroebe, W.: Die Prognose des primären malignen Melanoms. In: Orfanos, C.E. und Garbe, C.: Das maligne Melanom der Haut. 41- 59, W. Zuckschwerdt, München, Bern, Wien, San Francisco, 1990
- Garbe, C., Büttner, P., Weiss, J., Soyer, H.P., Stocker, U., Krüger, S., Roser, M., Weckbecker, J., Panizzon, R., Bahmer, F., Tilgen, W., Guggenmoos- Holzmann, I., Orfanos, C.E.: Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentiginos : Multicenter case- control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol.* **102**: 700- 705 (1994)
- Garbe, C. und Blum, A.: Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14**: 280- 290 (2001)
- Garbe, C., Ellwanger, U., Tronnier, M., Brocker, E.B., Orfanos, C.E.: The new american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma: a critical analysis based on data of the german central malignant melanoma registry. *Cancer* **94**: 2305- 2307 (2002)
- Gehlsen, K.R., Dillner, L., Engvall, E., Ruoslahti, E.: The human laminin receptor is a member of the integrin family of cell adhesion receptors. *Science* **241**: 1228- 1229 (1988)
- Gehlsen, K.R., Dickerson, K., Argraves, W.S., Engvall, E., Ruoslahti, E.: Subunit structure of a laminin- binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J Biol Chem.* **264**: 19034- 19038 (1989)
- Gilchrest, B.A., Albert, L.S., Karasik, R.L., Yaar, M.: Substrate influences human epidermal melanocyte attachment and spreading in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* **21**: 114- 120 (1985)
- Gilchrest, B.A., Park, H.-Y., Eller, M.S., Yaar, M.: The photobiology of the tanning response. In: Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A., Ortonne, J.-P.: The pigmentary system: physiology and pathophysiology. 359- 372, Oxford University Press, New York, 1998

- Goodman, S.L., Deutzmann, R., von der Mark, K.: Two distinct cell-binding domains in laminin can independently promote nonneuronal cell adhesion and spreading. *J Cell Biol.* **105**: 589- 598 (1987)
- Gordon, P.R., Mansur, P.C., Gilchrist, B.A.: Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte-derived factors. *J Invest Dermatol.* **92**, 565-572 (1989)
- Greene, M.H., Clark, W.H.Jr., Tucker, M.A., Elder, D.E., Kraemer, K.H., Fraser, M.C., Bondi, E.E., Gurrey, D.P., Tuthill, R., Hamilton, R., LaRossa, D.: Precursor naevi in cutaneous malignant melanoma: a proposed nomenclature. *Lancet* **2**: 1024 (1980)
- Greene, M.H., Young, T.I., Clark, W.H. Jr.: Malignant melanoma in renal-transplant recipients. *Lancet* **1**: 1196- 1199 (1981)
- Grob, J.J. und Jreissati, M.: Physiopathologie des naevus et du naevocyte. *Ann Dermatol Venerol.* **125** : 860- 867 (1998)
- Haake, A.R. und Scott, G.A.: Physiological distribution and differentiation of melanocytes in human fetal and neonatal skin equivalents. *J Invest Dermatol.* **96**: 71- 77 (1991)
- Haass, N.K., Smalley, K.S., Herlyn, M.: The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol* **35**: 309- 318 (2004)
- Hafner, J., Kempf, W., Hess-Schmid, M., Kurz, M., Urosevic, M., Dummer, R., Burg, G.: Epitheliale Hauttumore: eine interdisziplinäre Aufgabe für Grundversorger und Spezialisten. *Curr Schweiz Med Forum* **15** (2002)
- Halaban, R., Kwon, B.S., Ghosh, S., Delli, B.P., Baird, A.: bFGF as an autocrine growth factor of human melanomas. *Oncog Res* **3**: 177- 186 (1988a)
- Halaban R., Langdon, R., Birchall, N., Cuono, C., Baird, A., Scott, G., Moellmann, G., McGuire, J.: Paracrine stimulation of melanocytes by keratinocytes through basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* **548**: 180- 190 (1988b)
- Hall, D.E., Reichardt, L.F., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A., Damsky, C.H.: The  $\alpha 1/\beta 1$  and  $\alpha 6/\beta 1$  integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol.* **110**: 2175- 2184 (1990)
- Hara, M., Yaar, M., Tang, A., Eller, M.S., Reenstra, E., Gilchrist., B.A.: Role of integrins in melanocyte attachment and dendricity. *J Cell Sci* **107**: 2739- 2748 (1994)
- Harrison, S.L., MacLennan, R., Speare, R., Wronski, I.: Sun exposure and melanocytic naevi in young Australian children. *Lancet* **344**: 1529- 1532 (1994)
- Hedley, S., Gawkrödger, D.J., Weetman, A.P., Macneil, S.: Investigation of the influence of extracellular matrix proteins on normal human melanocyte morphology and melanogenic activity. *Br J Dermatol.* **135**: 888- 897 (1996)
- Hemler, M.E., Crouse, C., Sonnenberg, A.: Association of the VLA-  $\alpha 6$  subunit with a novel protein. *J Biol Chem.* **264**: 6529- 6535 (1989)
- Herlyn, M., Berking, C., Li, G., Satyamoorthy, K.: Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res.* **10**: 303- 312 (2000)

- Holman, C.D.J., Armstrong, B.K., Heenan, P.J.: Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight exposure habits. *J Natl Cancer Inst.* **76**: 403- 414 (1986)
- Hsu, M.-Y., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Herlyn, M.: Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* **1**: 188- 194 (1996)
- Hsu, M.Y., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J.L., Herlyn, M.: Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* **113** (Pt 9): 1535- 1542 (2000a)
- Hsu, M.-Y., Meier, F.E., Nesbit, M., Hsu, J.-Y., Van Belle, P., Elder, D.E., Herlyn, M.: E-Cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol.* **156**: 1515- 1525 (2000b)
- Hynes, R.O.: Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11- 25 (1992)
- Ignatius, M.J. und Reichardt, L.F.: Identification of a neuronal laminin receptor: an Mr 200k/120k integrin heterodimer that binds laminin in a divalent cation-dependant manner. *Neuron* **1**: 713- 725 (1988)
- Ingber, D.E.: Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation. *Differentiation* **70**: 547- 560 (2002)
- Jamal, S. und Schneider, R.: UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-Cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin Invest.* **110**: 443- 452 (2002)
- Jimbow, K., Fitzpatrick, T.B., Quevedo, W.C. Jr.: Cascade of melanogenesis in epidermal melanin pigmentation: the melanosome as a programmed organelle.  
In: Jimbow, K.: Structure and function of melanin. 2. Aufl., 71- 82, Fuji-Shoin, Sapporo, 1985
- Jimbow K, Quevado WC, Fitzpatrick TB, Szabo G.: Biology of melanocytes.  
In: Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M., Austen, K.F.: Dermatology in general medicine. 4. Aufl., 123- 133, Oxford University Press, New York, 1998
- Juliano, R.L. und Haskill, S.: Signaltransduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* **120**: 577- 585 (1993)
- Kadekaro, A.L., Kavanagh, R.J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M.A., Abdel-Malek, Z.A.: Cutaneous Photobiology. The Melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res* **16**: 434- 447 (2003)
- Kajiji, S., Tamura, R.N., Quaranta, V.: A novel integrin ( $\alpha E\beta 4$ ) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *EMBO J.* **8**: 673- 680 (1989)
- Kaminer, M.S.: Photodamage: magnitude of the problem.  
In: Gilchrest, B.A.: Photodamage. 1- 11, Blackwell Science, Massachusetts, USA, 1995
- Kern, A., Eble, J., Golbik, R., Kühn, K.: Interaction of type IV collagen with the isolated integrins  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$ . *Eur J Biochem.* **215**: 151- 159 (1993)

- Kim, Y.G., Kim, H.J., Kim, D.S., Kim, S.D., Han, W.S., Kim, K.H., Chung, J.H., Park, K.C.: Up-regulation and redistribution of Bax in ultraviolet B- irradiated melanocytes. *Pigment Cell Res.* **13**: 352- 357 (2000)
- Kirchhofer, D., Languino, L.R., Ruoslathi, E., Pierschbacher, M.:  $\alpha 2\beta 1$  integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem.* **265**: 615- 618 (1990)
- Kirnbauer, R., Charvat, B., Schauer, E., Köck, A., Urbanski, A., Förster, E., Neuner, P., Assmann, I., Luger, T.A., Schwarz, T.: Modulation of intercellular adhesion molecule- 1 expression on human melanocytes and melanoma cells: evidence for a regulatory role of IL-6, IL-7, TNF $\beta$  and UVB light. *J Invest Dermatol.* **98**: 320- 326 (1992)
- Kobayashi, N., Nakagawa, A., Muramatsu, T., Yamashina, Y., Shirai, T., Hashimoto, M.W., Ishigaki, Y., Ohnishi, T., Mori, T.: Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J Invest Dermatol.* **110**: 806- 811 (1998)
- Krengel, S., Grotelüschen, F., Bartsch, S., Tronnier, M.: Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. *J Cutan Pathol.* **31**: 1- 7 (2004)
- Krengel, S., Stark, I., Geuchen, C., Knoppe, B., Scheel, G., Schlenke, P., Gebert, A., Wunsch, L., Brinckmann, J., Tronnier, M.: Selective downregulation of the  $\alpha 6$ -integrin subunit in melanocytes by UVB-light. *Exp.Dermatol.*, akzeptiert im November 2004
- Krüger, S., Garbe, C., Büttner, P., Stadler, R., Guggenmoos- Holzmann, I., Orfanos, C.E.: Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* **26**: 920- 926 (1992)
- Languino, L.R., Gehlsen, K.R., Wayner, E., Carter, W.G., Engvall, E., Ruoslathi, E.: Endothelial cells use  $\alpha 2\beta 1$ - integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol.* **109**: 2455- 2462 (1989)
- Lever, W.F. und Schaumburg- Lever, G.: Histopathology of the skin. 7. Aufl. JB Lippincott Company, Philadelphia, Grand, Rapids, New York, St. Louis, San Francisco, London, Sydney, Tokio, 1990
- Lin, M.L., Bertics, P.J.: Laminin responsiveness is associated with changes in fibroblast morphology, motility, and anchorage- independent growth: cell system for examining the interaction between laminin and EGF signaling pathways. *J Cell Physiol.* **164**: 593- 604 (1995)
- MacKie, R.M., English, J., Aitchison, T.C., Fitzsimons, C.P., Wilson, P.: The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic naevi) in a healthy British population. *Br J Dermatol.* **113** : 167- 174 (1985)
- McClenic, B.K., Mitra, R.S., Riser, B.L., Nickoloff, B.J., Dixit, V.M., Varani, J.: Production and utilization of extracellular matrix components by human melanocytes. *Exp Cell Res.* **180**: 314- 325 (1989)
- Meier, F., Caroli, U., Satyamoorthy, B., Bauer, J., Berking, C., Möller, H., Maczey, E., Rassner, G., Herly, M., Garbe, C.: Fibroblast growth factor-2 but not Mel- CAM and/ or  $\beta 3$  integrin promotes progression of melanocytes to melanoma. *Exp Dermatol.* **12**: 296- 306 (2003)
- Morelli J.G., Yohn J.J., Zekman Z., Norris, D.A.: Melanocyte movement in vitro: Role of matrix proteins and integrin receptors. *J Invest Dermatol.* **101**: 605- 608 (1993)

- Moretti, S., Martinin, L., Berti, E., Pinzi, C., Gianotti, B.: Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesion. *Melanoma Res.* **3**: 235- 239 (1993)
- Mortarini, R., Gismondi, A., Maggioni, A., Santoni, A., Herlyn, M., Anichini, A.: Mitogenic activity of laminin on human melanoma and melanocytes: different signal requirements and role of  $\beta 1$  integrins. *Cancer Res.* **55**: 4702- 4710 (1995)
- Nakazawa, K., Nakazawa, H., Bonnard, M., Damour, O., Collombel, C.:  $Ca^{2+}$  and UVB radiation have no effect on E- cadherin- mediated melanocyte- keratinocyte adhesion. *Pigment Cell Res.* **8**: 255- 262 (1995a)
- Nakazawa K., Nakazawa H., Collombel C., Damour O.: Keratinocyte extracellular matrix-mediated regulation of normal human melanocyte functions. *Pigment Cell Res* **8**: 10- 18 (1995b)
- Neitmann, M., Alexander, M., Brinckmann, J., Schlenke, P., Tronnier, M.: Attachment and chemotaxis of melanocytes after ultraviolet irradiation in vitro. *Br J Dermatol.* **141**: 794- 801 (1999)
- Nejjari, M., Hafdi, Z., Dumortier, J., Bringuier, A.F., Feldmann, G., Scoazec, J.Y.:  $\alpha 6\beta 1$  integrin expression in hepatocarcinoma cells: regulation and role in cell adhesion and migration. *Int. J. Cancer* **83**: 518- 525 (1999)
- Nelemans, P.J., Groenendal, H., Kiemeney, L.A., Rampen, F.H., Ruiter, D.J., Verbeek, A.L.: Effect of intermittent exposure to sunlight on melanoma risk among indoor workers and sun- sensitive individuals. *Environ Health Perspect* **101**: 252- 255 (1993)
- Norris, D.A., Morelli, J.G., Fujita, M.: Melanocyte interactions in the skin.  
In: Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A., Ortonne, J.-P.: The pigmentary system: physiology and pathophysiology. 123- 133, Oxford University Press, New York, 1998
- Odland, G.F.: The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *J Biophys Biochem Cytol.* **4**: 529- 538 (1958)
- Osterlind, A., Hou- Jensen, K., Moller- Jensen, O.: Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978- 1982: anatomic site distribution, histologic types and comparison with non- melanoma skin cancer. *Br J Cancer* **58**: 385- 391 (1988)
- Pathak, M.A.: Functions of melanin and protection by melanin.  
In: Zeise, L., Chedekel, M.R., Fitzpatrick, T.B.: Melanin: its role in human photoprotection. 125- 134, Valdemar Publishing, Overland Park, Kans, 1995
- Plettenberg, A., Ballaun, C., Pammer, J., Mildner, M., Strunk, D., Weninger, W., Tschachler, E.: Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the bcl2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol.* **146**: 651- 659 (1995)
- Pope, D.J., Sorahan, T., Marsden, J.R., Ball, P.M., Grimley, R.P., Peck, I.M.: Benign pigmented nevi in children. Prevalence and associated factors: the West Midlands, United Kingdom Mole Study. *Arch Dermatol.* **128**: 1201- 1206 (1992)
- Ranson, M., Posen, S., Mason, R.S.: Extracellular matrix modulates the function of human melanocytes but not melanoma cells. *J Cell Physiol.* **136**: 281- 288 (1988)
- Rasokat, H., Steigleder, G.K., Bendick, C., Müller, S., Meller, M.: Malignes Melanom und HIV- Infektion. *Z Hautkr* **64**: 581- 582 (1989)

- Reed, J.A., McNutt, N.S., Albino, A.P.: Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization: Implications for tumor progression. *Am J Pathol.* **144**: 329- 336 (1994)
- Reedy, M.V., Parichy, D.M., Erickson, C., Mason, K.A., Frost- Mason, S.K.: Regulation of melanoblast migration and differentiation.  
In: Nordlund J.J., Boissy R.R., Hearing, V.J., King, R.A., Ortonne, J.-P.: The pigmentary system: physiology and pathophysiology. 75- 95, Oxford University Press, New York, 1998
- Riley, P.A.: Melanin. *Int J Biochem Cell Biol.* **29**: 1235- 1239 (1997)
- Rousselle, P. und Aumailley, M.: Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J Cell Biol.* **125**: 205- 214 (1994)
- Rubinfeld, B., Robbins, P., El- Gamil, M., Albert, I., Porfiri, R., Polakis, P.: Stabilization of  $\beta$ -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**: 1790- 1792 (1997)
- Sasaki, M., Kleinman, H.K., Huber, H., Deutzmann, R., Yamada, Y.: Laminin, a multidomain protein. *J Biol Chem.* **263**: 16536- 16544 (1988)
- Sawai, H., Funahashi H., Yamamoto M., Okada, Y., Hayakawa T., Tanaka, M., Takeyama H., Manabe T.: Interleukin-  $1\alpha$  enhances integrin  $\alpha 6\beta 1$  expression and metastatic capability of human pancreatic cancer. *Oncology* **65**: 167- 173 (2003)
- Schadendorf, D., Gawlik, C., Haney, U., Ostmeier, H., Suter, L., Czarnetzki, B.M.: tumor progression and metastatic behaviour in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumours. *J Pathol.* **170**: 429- 434 (1993)
- Schaumburg Lever, G., Lever, I., Fehrenbacher, B., Möller, H., Bischof, B., Kaiserling, E., Garbe, C., Rassner, G.: melanocytes in nevi and melanomas synthesize basement membrane and basement membrane- like material. An immunohistochemical and electron microscopic study including immunoelectron microscopy. *J Cutan Pathol.***27**: 67- 75 (2000)
- Scott, G., Ryan, D. H., McCarthy, J.B.: Molecular mechanisms of human melanocyte attachment to fibronectin. *J Invest Dermatol* **99**: 787- 794 (1992)
- Scott, G., Cassidy, L., Busacco, A.: Fibronectin suppresses apoptosis in normal human melanocytes through an integrin dependent mechanism. *J Invest Dermatol.* **108**: 147- 153 (1997)
- Seline, P.C., Norris, D.A., Horikawa, T., Fujita, M., Middleton, M.H., Morelli, J.G.: Expression of E- and P- cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol.***106**: 1320- 1324 (1996)
- Sollberg, S., Peltonen, J. Uitto, J.: Differential expression of laminin isoforms and  $\beta 4$  integrin epitopes in the basement membrane zone of normal human skin and basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol.* **98**: 864- 870 (1992)
- Sonnenberg, A., Modderman, P.W., Hogervorst, F.: Laminin receptor on platelets is the integrin VLA- 6. *Nature (Lond)* **336**: 487- 489 (1988a)
- Sonnenberg, A.F., Hogervorst, A., Osterop, A., Veltman, F.E.M.: Identification and characterization of a novel antigen complex on mouse mammary tumor cells using a monoclonal antibody against platelet glycoprotein Ic. *J Biol Chem* **263**: 14030- 14038 (1988b)

- Sonnenberg, A., Linders, C.J.T., Modderman, P.W., Damsky, C.H., Aumailley, M., Timpl, R.: Integrin recognition of different cell-binding fragments of Laminin (P1, E3, E8) and evidence that  $\alpha 6\beta 1$  but not  $\alpha 6\beta 4$  functions as a major receptor for fragment E8. *J Cell Biol.* **110**: 2145- 2155 (1990)
- Sturm, R.A., Box, N.F., Ramsay, M.: Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* **20**: 712- 721 (1998)
- Takeichi, M.: Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol.* **75**: 464- 474 (1977)
- Takeichi, M.: The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**: 639- 655 (1988)
- Takeichi, M.: Cadherins, a molecular family important in selective cell adhesion. *Ann Rev Biochem* **59**: 237- 252 (1990)
- Takeichi, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**: 1451- 1455 (1991)
- Takeichi, M.: Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* **7**: 619- 627 (1995)
- Tang, A., Eller, M.S., Hara, M., Yaar, M., Hirohashi, S., Gilchrist, B.A.: E-Cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci.* **107**: 983- 992 (1994)
- Tarnowski, W.M.: Ultrastructure of the epidermal melanocyte dense plate. *J Invest Dermatol* **55**: 265- 268 (1970)
- Tepass, U.: Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 540- 548 (1999)
- Thody, A.J., Higgins, E.M., Watamatsu, K., Ito, S., Burchill, S.A., Marks, J.M.: Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J Invest Dermatol.* **97**: 340- 344 (1991)
- Thody, A.J.: Epidermal melanocytes: their regulation and role in skin pigmentation. *Eur J Dermatol.* **5**: 558- 565 (1995)
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.-M., Martin, G.R.: Laminin: a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* **254**: 9933- 9937 (1979)
- Timpl, R.: Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem.* **180**: 487- 502 (1989)
- Tomaselli, K.J., Hall, D.E., Reichardt, L.T., Flier, L.A., Gehlsen, K.R., Turner, D.C., Carbonetto, S.: A neuronal cell line (8PC12) expresses two  $\beta 1$ - class integrins-  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$ - that recognize different neurite outgrowth promoting domains in laminin. *Neuron* **5**: 651- 662 (1990)
- Tronnier, M., Smolle, J., Wolff, H.H.: Ultraviolet irradiation induces acute changes in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol.* **104**: 475- 478 (1995)
- Tronnier, M., Alexander, M., Wolff, H.H.: Adhesion molecule expression in normal skin and melanocytic lesions. *J Cutan Pathol.* **24**: 278- 285 (1997)

- Turner, D.C., Flier, L.A., Carbonetto, S.: Identification of a cell- surface protein involved in PC12 cell- substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collgagen. *J Neurosci.* **9**: 3287- 3296 (1989)
- Valery, C., Grob, J.J., Verrando, P.: Identification by cDNA microarray technology of genes modulated by artificial ultraviolet radiation in normal human melanocytes: relation to melanocarcinogenesis. *J Invest Dermatol.* **117**: 1471- 1482 (2001)
- Valyi- Nagy, I., Hirka, G., Jensen, P.J., Shih, I.-M., Juhasz, I., Herlyn, M.: Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology and antigen expression of normal melanocytes through cell- cell contact. *Lab Invest* **69**: 152- 159 (1993)
- Vanderberg, P., Kern, A., Ries, A., Luckenbill- Edds, L., Mann, K., Kühn, K.: Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the  $\alpha 1\beta 1$  and the  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *J Cell Biol.* **113**: 1475- 1483 (1991)
- Van Duinen, C.M., Van den Broek, L.J.C.M., Vermeer, B.J., Fleuren, G.J., Bruijn, J.A.: The distribution of cellular adhesion molecules in pigmented skin lesions. *Cancer* **73**: 2131- 2139 (1994)
- Van Muijen, G.N.P., Danen, E.H.J., de Vries, T.J., Quax, P.H.A., Verheijen, J.H., Ruiter, D.J. : Properties of metastasizing and non- metastasizing human melanoma cells. *Recent Results in Cancer Res.* **139**: 105- 122 (1995)
- Wayner, E.A. und Carter, W.G.: Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique  $\alpha$  and common  $\beta$  subunits. *J Cell Biol.* **105**: 1873- 1884 (1987)
- Weinstock, M.A.: Controversies in the role of sunlight in the pathogenesis of cutaneous melanoma. *Photochem Photobiol.* **63**: 406- 410 (1996)
- Wiecker, T.S. Luther, H., Büttner, P., Garbe, C.: Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1.812 kindergarten children. *Cancer* **97**: 628- 638 (2003)
- Yaar, M. und Gilchrest, B.A.: Human melanocyte growth and differentiation: a decade of new data. *J Invest Dermatol.* **97**: 611- 617 (1991)
- Yap, A.S., Brieher, W.M., Gumbiner, B.M.: Molecular and functional analysis of cadherin- based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **13**: 119- 146 (1997)
- Zambruno, G., Manca, V., Santantonio, M.L., Soligo, D., Giannetti, A.: VLA protein expression on epidermal cells (keratinocytes, Langerhans Cells, melanocytes): a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Br J Dermatol.* **124**: 135- 145 (1991)
- Zambruno, G., Pier, C.M., Melchiori, A., Bondanza, S., Cancedda, R., De Luca, M.: Expression of integrin receptors and their role in adhesion, spreading and migration of normal human melanocytes. *J Cell Sci.* **105**: 179- 190 (1993)
- Ziober, B.L., Chen, Y.Q., Ramos, D.M., Waleh, N., Kramer, R.H.: Expression of the  $\alpha 7\beta 1$  laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential. *Cell Growth Differ.* **10**: 479- 490 (1999)

## 7.1 Melanozyten (unbeschichtete Kulturplatten), unbestrahlt vs. UVB 5mJ/cm<sup>2</sup>

Messung	$\alpha 2$ -Integrin		$\alpha 3$ -Integrin		$\alpha 5$ -Integrin		$\alpha 6$ -Integrin		$\alpha V$ -Integrin	
	unbestrahlt	bestrahlt								
1	35,40%	34,90%	99,80%	99,80%	97,80%	99,30%	93,40%	96,50%	49,90%	49,90%
2	35,90%	34,10%	99,00%	99,30%	97,30%	96,40%	94,50%	90,90%	66,30%	72,80%
3	53,00%	57,80%	98,90%	98,90%	97,10%	97,40%	96,10%	95,70%	40,60%	49,80%
4	60,30%	65,30%							70,50%	74,90%
5	59,70%	59,60%							41,30%	36,30%
6	58,70%	40,60%							48,80%	40,10%
$\bar{x}$	50,50%	48,72%	99,23%	99,30%	97,40%	97,70%	94,67%	94,36%	52,90%	53,97%
s	11,79%	13,76%	0,49%	0,50%	0,36%	1,47%	1,36%	3,03%	12,66%	16,31%

Messung	$\beta 1$ -Integrin		$\beta 3$ -Integrin		E-Cadherin		N-Cadherin		ICAM-1	
	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt
1	99,60%	99,80%	29,10%	25,00%	97,20%	97,80%	1,04%	1,40%	38,60%	44,00%
2	98,50%	98,70%	20,70%	17,40%	96,30%	98,30%	1,37%	1,37%	36,30%	39,20%
3	95,80%	96,70%	17,80%	21,90%	96,10%	85%	1,64%	1,85%	38,00%	49,70%
4			20,60%	24,80%	93,50%	95,50%			39,00%	39,90%
5			16,10%	28,50%	84,40%	83,90%			46,80%	57,10%
6			14,20%	12,40%	79,20%	82,20%			59,10%	64,00%
$\bar{x}$	97,97%	98,40%	19,75%	21,67%	91,12%	90,45%	1,35%	1,54%	42,97%	48,93%
s	1,96%	1,57%	5,23%	5,86%	7,50%	7,51%	0,30%	0,27%	8,71%	9,95%

Angaben in % der immunreaktiven Zellen bei durchflusszytometrischer Messung

## 7.2 Melanozyten auf Fibronektin- Beschichtung, unbestrahlt vs. UVB 5mJ/cm<sup>2</sup>

Messung	$\alpha 2$ -Integrin		$\alpha 3$ -Integrin		$\alpha 5$ -Integrin		$\alpha 6$ -Integrin		$\alpha V$ -Integrin	
	unbestrahlt	bestrahlt								
1	74,80%	77,70%	99,80%	99,60%	94,30%	94,70%	96,40%	96,00%	47,00%	77,30%
2	23,60%	53,30%	99,80%	99,50%	97,00%	95,70%	95,30%	90,40%	77,30%	83,90%
3	26,80%	47,80%	99,50%	99,40%	97,40%	98,00%	97,20%	96,90%	66,40%	54,30%
4	69,30%	63,20%							74,00%	73,00%
5	36,80%	44,50%							18,80%	16,50%
6	46,60%	44,70%							45,80%	46,10%
$\bar{x}$	46,32%	55,20%	99,70%	99,50%	96,23%	96,13%	96,30%	94,43%	54,88%	58,52%
s	21,57%	13,06%	0,17%	0,10%	1,69%	1,69%	0,95%	3,52%	22,12%	25,08%

Messung	$\beta 1$ -Integrin		$\beta 3$ -Integrin		E-Cadherin		N-Cadherin		ICAM-1	
	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt
1	82,80%	99,90%	11,40%	22,50%	63,20%	74,80%	0,80%	0,79%	36,00%	46,20%
2	99,60%	99,60%	13,80%	18,80%	92,40%	96,40%	1,13%	1,90%	55,10%	67,10%
3	98,80%	97,70%	23,50%	17,30%	95,10%	92,20%	1,06%	1,19%	51,10%	46,90%
4			18,40%	22,70%	90,40%	83,20%			43,80%	43,90%
5			12,90%	8,97%	80,20%	77,30%			46,00%	58,40%
6			13,60%	17,10%	64,30%	67,80%			67,00%	78,20%
$\bar{x}$	93,73%	99,07%	15,60%	17,90%	80,93%	81,95%	1,01%	1,29%	49,83%	56,78%
s	9,48%	1,19%	4,53%	5,02%	14,24%	10,85%	0,17%	0,56%	10,64%	13,74%

Angaben in % der immunreaktiven Zellen bei durchflusszytometrischer Messung

### 7.3 Melanozyten von Laminin-1-Beschichtung, unbestrahlt vs. UVB 5mJ/cm<sup>2</sup>

Messung	$\alpha 2$ -Integrin		$\alpha 3$ -Integrin		$\alpha 5$ -Integrin		$\alpha 6$ -Integrin		$\alpha V$ -Integrin	
	unbestrahlt	bestrahlt								
1	41,10%	66,10%	99,10%	99,60%	97,80%	96,10%	90,90%	94,20%	78,60%	79,50%
2	58,80%	74,90%	99,90%	98,70%	73,60%	99,00%	78,20%	97,40%	81,70%	71,40%
3	58,30%	56,80%	99,90%	99,70%	99,70%	99,40%	99,30%	98,20%	79,10%	76,00%
4	63,60%	67,80%							78,10%	82,20%
5	42,40%	36,60%							15,60%	20,90%
6	49,50%	38,00%							45,50%	47,30%
$\bar{x}$	52,28%	56,70%	99,63%	99,33%	90,37%	98,17%	89,47%	96,60%	63,10%	62,88%
s	9,35%	16,10%	0,46%	0,55%	14,55%	1,80%	10,62%	2,12%	26,96%	24,08%

Messung	$\beta 1$ -Integrin		$\beta 3$ -Integrin		E-Cadherin		N-Cadherin		ICAM-1	
	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt
1	100,00%	99,70%	14,40%	14,70%	87,80%	71,20%	0,60%	0,53%	57,30%	54,60%
2	99,50%	99,00%	50,90%	54,10%	98,10%	88,50%	0,68%	0,60%	50,80%	55,30%
3	99,90%	99,60%	19,80%	19,70%	92,50%	87,90%	2,16%	1,36%	49,30%	51,60%
4			18,90%	23,60%	84,30%	79,90%			52,20%	55,10%
5			10,20%	12,40%	80,50%	80,80%			44,10%	52,30%
6			11,30%	16,70%	53,30%	75,60%			60,20%	71,60%
$\bar{x}$	99,80%	99,43%	20,92%	23,53%	82,75%	80,65%	1,15%	0,83%	52,32%	56,75%
s	0,26%	0,38%	15,19%	15,48%	15,69%	6,78%	0,88%	0,46%	5,76%	7,43%

Angaben in % der immunreaktiven Zellen bei durchflusszytometrischer Messung

## 7.4 Melanozyten (unbeschichtete Kulturplatten), unbestrahlt vs. UVB 20mJ/cm<sup>2</sup>

(Die Ergebnisse für α6-Integrin sind in Tab. 7.5 gesondert dargestellt)

Messung	α2-Integrin			α3-Integrin			α5-Integrin			αV-Integrin		
	% positiver Zellen		MFI									
	unbestrahlt	bestrahlt		unbestrahlt	bestrahlt		unbestrahlt	bestrahlt		unbestrahlt	bestrahlt	
1	60,80%	48,30%	1,13	98,80%	99,30%	1,25	91,90%	93,80%	0,94	73,80%	61,80%	1,21
2		57,80%	0,97		99,80%	1,21		94,60%	0,91		66,30%	1,11
3		53,70%	1,04		99,70%	1,28		95,00%	0,92		61,60%	1,23
$\bar{x}$		53,27%	1,05		99,60%	1,25		94,47%	0,92		63,23%	1,18
s		4,77%	0,08		0,27%	0,04		0,61%	0,02		2,66%	0,06

Messung	β1-Integrin			β3-Integrin			E-Cadherin			N-Cadherin			ICAM-1		
	% positiver Zellen		MFI												
	unbestrahlt	bestrahlt		unbestrahlt	bestrahlt		unbestrahlt	bestrahlt		unbestrahlt	bestrahlt		unbestrahlt	bestrahlt	
1	83,60%	82,50%	0,98	10,70%	11,80%	0,76	89,00%	86,40%	1,16	0,86%	0,63%	1,25	32,40%	34%	0,96
2		87,90%	0,87		17,00%	0,60		87,80%	1,01		0,41%	6,25		32,70%	0,96
3		75,80%	1,13		14,10%	0,67		83%	1,21		0,58%	1,47		34,90%	0,92
$\bar{x}$		82,07%	0,99		14,30%	0,68		85,83%	1,13		0,54%	2,99		33,73%	0,95
s		6,06%	0,13		2,61%	0,08		2,30%	0,10		0,12%	2,83		1,11%	0,02

$$MFI = (MnX_{unbestrahlt} - MnX_{Isotypkontrolle}) / (MnX_{bestrahlt} - MnX_{Isotypkontrolle})$$

MFI: mittlerer Fluoreszenzindex

MnX: mittlere Fluoreszenz

## 7.5 $\alpha 6$ -Integrin-Expression auf Melanozyten

### 7.5.1 unbeschichtete Kulturplatten

Messung	unbestrahlt			UVB 10 mJ/cm <sup>2</sup>			UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup>			
	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	
1	94,70%	91,70%	93,00%	82,60%	59,50%	89,10%	67,00%	28,80%	keine Messung durchführbar	
2	95,00%	90,70%	91,30%	81,60%	63,40%	89,60%	65,90%	20,90%		
3	95,20%	91,60%	91,00%	78,80%	67,80%	89,30%	71,30%	15,60%		
$\bar{x}$	94,97%	91,33%	91,77%	81,00%	63,57%	89,30%	68,07%	21,60%		
s	0,25%	0,55%	1,08%	1,97%	4,15%	0,25%	2,85%	6,37%		

### 7.5.2 Laminin-1-Beschichtung

Messung	unbestrahlt			UVB 10 mJ/cm <sup>2</sup>			UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup>		
	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.
1	98,20%	99,70%	96,30%	96,80%	95,70%	90,60%	93,70%	90,10%	26,00%
2	98,00%	99,90%	95,90%	96,20%	98,80%	93,20%	92,80%	86,70%	21,80%
3	97,90%	99,60%	94,60%	96,00%	98,10%	92,50%	93,00%	85,90%	21,90%
$\bar{x}$	98,03%	99,73%	95,60%	96,30%	97,53%	92,10%	93,17%	87,57%	23,23%
s	0,15%	0,15%	0,89%	0,42%	1,63%	1,35%	0,47%	2,23%	2,40%

Angaben in % der immunreaktiven Zellen bei durchflusszytometrischer Messung

## 7.6 $\alpha 6$ -Integrin-Expression auf Melanozyten

mittlerer Fluoreszenzindex [MFI]

### 7.6.1 unbeschichtete Kulturplatten

Messung	UVB 10 mJ/cm <sup>2</sup>			UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup>			
	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	
1	1,45	1,95	1,04	2,02	3,29	Messung nicht durchführbar	
2	1,45	1,69	1,04	2,05	3,60		
3	1,95	1,63	1,07	2,29	4,33		
$\bar{x}$	1,62	1,76	1,05	2,12	3,74		
s	0,29	0,17	0,02	0,15	0,44		

### 7.6.2 Laminin-1-Beschichtung

Messung	UVB 10 mJ/cm <sup>2</sup>			UVB 20 mJ/cm <sup>2</sup>		
	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.
1	1,41	2,21	1,04	1,82	2,43	8,93
2	1,46	1,70	0,88	1,78	2,61	11,04
3	1,46	1,29	0,83	1,72	2,84	8,96
$\bar{x}$	1,44	1,73	0,92	1,77	2,63	9,64
s	0,03	0,46	0,11	0,05	0,21	1,21

$$\text{MFI} = (\text{MnX}_{\text{unbestrahlt}} - \text{MnX}_{\text{Isotypkontrolle}}) / (\text{MnX}_{\text{bestrahlt}} - \text{MnX}_{\text{Isotypkontrolle}})$$

MFI: mittlerer Fluoreszenzindex

MnX: mittlere Fluoreszenz

## 8 Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Brinckmann, der mir das Thema dieser Promotionsarbeit überließ und es mir so ermöglichte, in dem Fachgebiet eine Promotionsarbeit anzufertigen, das schon zu diesem Zeitpunkt mein Wunschfach war.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. H. Wolff als ehemaligem Institutsleiter und Herrn Prof. Dr. D. Zillikens als neuem Leiter der Dermatologie für die freundliche Aufnahme in die Klinik und die Ermöglichung der Durchführung der Experimente in deren Räumlichkeiten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Sven Krenzel bedanken, der von Anfang an die Weichen für ein gutes Gelingen dieser Arbeit stellte: Durch sein fachliches Wissen und seine fortwährende Motivation fühlte ich mich während der gesamten Zeit der Zusammenstellung dieser Arbeit durch ihn ausgezeichnet betreut.

Bei Frau Gabriele Scheel möchte ich mich sehr herzlich für die ausgezeichnete Einarbeitung im Zellkulturlabor bedanken und die wirklich sehr nette Zusammenarbeit.

Bei Herrn PD Dr. P. Schlenke aus dem Institut für Immunologie bedanke ich mich für die fachliche Beratung hinsichtlich der Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen sowie für die Bereitstellung des FACS- Gerätes.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung das Studium der Humanmedizin und die Anfertigung dieser Promotionsarbeit ermöglichten, und Henning, der mir während der gesamten Zeit immer zur Seite stand.

## 9 Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Lübeck unter Aufsicht von Herrn PD Dr. Jürgen Brinckmann und Herrn Dr. Sven Krenkel durchgeführt. Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich entnommene Zitate aus den benutzten Werken als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere außerdem, nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt zu haben und habe mich zuvor keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen. Die Arbeit wurde keiner anderen Promotionsbehörde im In- oder Ausland vorgelegt.

Lübeck, im April 2005

Imke Stark

Hartengrube 19 · 23552 Lübeck  
Telefon: (0451) 7098152 · E-mail: imke.stark@travedsl.de

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Informationen

---

- Name: Imke Stark
- Geburtsdatum: 31.7.1979
- Geburtsort: Bremen
- Familienstand: ledig
- Eltern: Manfred Stark, Diplom- Sozialarbeiter  
Karin Stark, geb. Funk, Lehrerin



### Schulbildung

---

- 1986 - 1990: Grundschule
- 1990 - 1992: Orientierungsstufe
- 1992 - 1999: Gymnasiale Oberstufe, Kooperative Gesamtschule Stuhr-Brinkum
- 18.05.1999: Abitur
- außerschulische Aktivitäten: jahrelange Betreuung einer Badminton-Sportgruppe als Übungsleiterin, Tätigkeit als ausgebildete Jugendgruppenleiterin, erfolgreiche Teilnahmen in mehreren Sprachwettbewerben (englisch, französisch, spanisch)

### Studium der Humanmedizin

---

- 1999 - 2001: Vorklinisches Studium an der Universität zu Lübeck
- September 2001: Physikum
- seit 2001: Klinisches Studium an der Universität zu Lübeck
- August 2002: 1. Staatsexamen
- September 2004: 2. Staatsexamen
- Seit Oktober 2004: Praktisches Jahr

---

**Klinische Tätigkeit**

---

- 02.2002 - 03.2002: Famulatur in der Klinik für Innere Medizin,  
Rotes Kreuz Krankenhaus Bremen
- 09.2002: Famulatur in der Dermatologie, Poliklinik,  
Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Lübeck
- 03.2003 - 04.2003: Famulatur in der Gynäkologie,  
Zentralkrankenhaus Links der Weser, Bremen
- 07.2003 - 08.2003: Famulatur in der Dermatologie Station 10c,  
Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Lübeck
- 09. 2003: Praxisfamulatur in der Dermatologie,  
privatärztliche Praxis Frau Dr. Hiss/ Frau Dr. Thomas, Lübeck
- 10.2002 - 10.2003: Studentische Extrawache auf der Intensivstation in den Sana-  
Kliniken Lübeck
- 10. 2004 – 09.2005: Praktisches Jahr
- 10. 2004 – 02. 2005: Klinik für Dermatologie und Venerologie  
Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Lübeck
- 02. 2005- 04. 2005: Klinik für Chirurgie  
Universitätsklinikum Salamanca, Spanien
- 04. 2005 - 05. 2005: Klinik für Chirurgie  
Sana-Kliniken Lübeck
- 05. 2005 - 09. 2005: voraussichtlich Klinik für Innere Medizin  
Sana-Kliniken Lübeck

---

**Promotion**

---

- 04. 2002 – 04.2005: Bearbeitung des experimentellen Themas „Einfluss von UV-  
Licht und extrazellulärer Matrix auf die Expression  
melanozytärer Adhäsionsmoleküle in vitro“ in der Klinik für  
Dermatologie und Venerologie, Universität zu Lübeck
- Publikation: S. Kregel, I. Stark, C. Geuchen, B. Knoppe, G. Scheel, P. Schlenke,  
A. Gebert, L. Wünsch, J. Brinckmann, M. Tronnier: „Selective  
downregulation of the  $\alpha 6$ -integrin-subunit in melanocytes by UVB-  
light (Exp Dermatol, akzeptiert im November 2004)

Lübeck, im April 2005

.....