

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Einfluss ultravioletter Strahlung auf maligne Melanomzellen in Hautrekonstrukten

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Kathrin Margret Hölzle
aus München
2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatterin: PD Dr. med. Carola Berking

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Edmund Lengfelder
Prof. Dr. Volker Heinemann
Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2008

1. Einleitung und Grundlagen	5
1.1 Das maligne Melanom	5
1.1.1.Epidemiologie	5
1.1.2 Risikofaktoren und Pathogenese.....	6
1.1.3 Klinik und Einteilung.....	7
1.1.4 Prognose.....	8
1.1.5 Therapie	9
1.2 Ultraviolette Strahlung.....	10
1.2.1 Physikalische Eigenschaften.....	10
1.2.2 Biologische Eigenschaften.....	10
1.3 Haut und ihre organotypische Kultur.....	12
1.4 Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Zellkultur	14
2.1.1 Materialien	14
2.1.2 Zellexpansion.....	16
2.1.3 Zellisolierung	17
2.1.3.1 Isolierung humaner Keratinozyten.....	17
2.1.3.2 Isolierung humaner Fibroblasten	18
2.1.3.3 Wistar-Melanomzelllinien	18
2.1.4 Zellaufbewahrung	18
2.2 Hautrekonstruktion	19
2.2.1 Materialien	19
2.2.2 Rekonstruktion der Dermis	20
2.2.3 Rekonstruktion der Epidermis	21
2.3 Bestrahlung der Rekonstrukte.....	23
2.3.1 Materialien	23
2.3.2 Arbeitsschritte vor und nach der Bestrahlung.....	23
2.3.3 UV-B-Bestrahlung	23
2.3.4 UV-A-Bestrahlung.....	24
2.4 Histologische Aufarbeitung und mikroskopische Auswertung	24
2.4.1 Materialien	24
2.4.2 Ernten der Hautrekonstrukte.....	25
2.4.3 Gewebsaufbereitung und -fixierung	25
2.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
2.4.5 Histologische Auswertung.....	27
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Vorversuche zur Festlegung des optimalen Erntezeitpunkts der Hautrekonstrukte	28
3.1.1 Fragestellung.....	28
3.1.2 Versuchsaufbau.....	28
3.1.3 Ergebnisse	29
3.1.4 Fazit	29
3.2 Vorversuche zur Festlegung des optimalen UV-A-Bestrahlungsmodus	30
3.2.1 Fragestellung.....	30
3.2.2 Versuchsaufbau.....	30
3.2.3 Ergebnisse	30
3.2.4 Fazit	34
3.3 Vorversuche zur Festlegung des optimalen UV-B-Bestrahlungsmodus	34
3.3.1 Fragestellung.....	34
3.3.2 Versuchsaufbau.....	34
3.3.3 Ergebnisse	34

3.3.4 Fazit	38
3.4 Versuch UV-A: Einfluss von UV-A-Bestrahlung auf Melanomzellen in Hautrekonstrukten.....	38
3.4.1 Fragestellung.....	38
3.4.2 Versuchsaufbau.....	38
3.4.3 Ergebnisse	38
3.4.4 Fazit	41
3.5 Versuch UV-B: Einfluss von UV-B-Bestrahlung auf Melanomzellen in Haut- rekonstrukten	41
3.5.1 Fragestellung.....	41
3.5.2 Versuchsaufbau.....	41
3.5.3 Ergebnisse	42
3.5.4 Fazit	44
4. Diskussion	44
4.1 UV-Wirkung auf Nävuszellnävi	44
4.2 UV-Strahlung bei der Entstehung des malignen Melanoms.....	45
4.2.1 UV-A bei der Entstehung des malignen Melanoms	45
4.2.1.1 Epidemiologische Daten	46
4.2.1.2 Tiermodelle	46
4.2.1.3 Zellkulturen.....	46
4.2.1.4 Mutagene und karzinogene UV-A-Effekte.....	47
4.2.2 UV-B bei der Entstehung des malignen Melanoms.....	48
4.2.2.1 Epidemiologische Daten	49
4.2.2.2 Tiermodelle	49
4.2.2.3 Zellkulturen.....	50
4.2.2.4 Mutagene und karzinogene UV-B-Effekte	51
4.3 Wirkung ultravioletter Strahlung auf die Tumorumgebung	51
4.3.1 UV-Einfluss auf Wachstumsfaktoren	52
4.3.2 UV-Einfluss auf die Extrazellulärsubstanz.....	53
5. Zusammenfassung	56
6. Anhang: Gesamtübersicht der Experimente.....	57
7. Abkürzungen.....	61
8. Literaturverzeichnis	63
9. Danksagung	69
10. Lebenslauf.....	70

1. Einleitung und Grundlagen

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Epidemiologie

Das maligne Melanom, eine Neoplasie aus entarteten Melanozyten, zählt zu den bösartigsten Tumoren der Haut und Schleimhäute. Weltweit hat seine Inzidenz bei den kaukasischen Völkern in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen. Insbesondere ein Zuwachs dünner, superfiziell spreitender maligner Melanome ist zu verzeichnen. Zum einen wird für die steigenden Inzidenzzahlen eine verbesserte Früherkennung infolge einer breiteren Risikoaufklärung der Bevölkerung verantwortlich gemacht. Zum anderen ist ein veränderter Lebensstil zu beobachten, der zu vermehrter Sonnenlichtexposition, einem Melanomrisikofaktor, führt [6]. In den USA beispielsweise hat sich die Inzidenz im Verlauf von 25 Jahren verdoppelt [7]. Internationale Inzidenzraten variieren stark zwischen einzelnen geographischen Regionen (siehe Tab. 1).

Land	Inzidenz pro 10 ⁵ Männer	Inzidenz pro 10 ⁵ Frauen
Australien	40,5	31,8
Neuseeland	36,7	34,9
Norwegen	14,1	15,9
USA	13,3	9,4
Österreich	8,8	10,4
Frankreich	6,8	7,9
China	0,2	0,2
Japan	0,4	0,3

Tabelle 1: Inzidenzraten des malignen Melanoms verschiedener Länder
(Nach C.M.Balch, Cutaneous Melanoma [8])

Diese Beobachtung wird von Epidemiologen durch die Verschiedenartigkeit der jeweiligen Bevölkerung z.B. im Hauttyp und durch die unterschiedliche UV-Belastung, die mit abnehmendem geografischen Breitengrad zunimmt, erklärt [6]. Die in Bezug auf das Alter standardisierten Inzidenzraten reichen von 0,2 pro 10⁵ Einwohner in China bis 34,9 pro 10⁵ Frauen in Neuseeland und 40,5 pro 10⁵ Männer in Australien [8]. In Australien steht das maligne Melanom damit auf der Häufigkeitsliste der Krebserkrankungen auf Rang drei bei den Frauen und auf Rang vier bei den Männern. Das Lebenszeitrisiko beträgt dabei eins zu 25 [9].

Die Mortalität des malignen Melanoms ist in den letzten Jahrzehnten ebenfalls gestiegen [6]. Neuseeland und Australien zeigen weltweit die höchsten Mortalitätsraten mit 5,3 bzw. 4,8 bei den Männern und 3,2 bzw. 2,5 bei den Frauen. Aus noch nicht geklärter Ursache wird bei Frauen ein längerer Überlebenszeitraum nach Diagnosestellung beobachtet als bei Männern [8]. Die Fünfjahresüberlebensrate hat bei beiden Geschlechtern stetig über die Jahrzehnte zugenommen und liegt heute bei über 85 %. Dennoch verursacht das maligne Melanom eine unproportionale Sterblichkeit von relativ jungen Patienten, so dass durchschnittlich 18,6 Jahre der möglichen Lebenserwartung mit jedem Sterbefall infolge eines Melanoms verloren gehen [9].

1.1.2 Risikofaktoren und Pathogenese

Der vorherrschende Risikofaktor für die Entwicklung des malignen Melanoms ist die Sonnenlichtexposition [56]. Insbesondere scheint eine akut-intermittierende Sonnenbestrahlung der Haut eine große Rolle bei der Melanomentstehung zu spielen [55].

Dies steht im Gegensatz zum Auftreten von spinözellulären Karzinomen, für die eine chronisch-kumulative UV-Bestrahlung der Haut im Laufe des Lebens ausschlaggebend ist [8]. Folglich treten spinözelluläre Karzinome gewöhnlich in Hautarealen mit chronischer Sonnenlichtexposition wie z.B. dem Gesicht und Handrücken auf. Sie treffen vorwiegend Personen mit täglicher UV-Bestrahlung wie z.B. Landwirte.

Maligne Melanome hingegen entstehen häufig auf Körperregionen, die nur intermittierend der Sonne ausgesetzt sind wie beispielsweise der Rücken von Männern oder die Unterschenkel von Frauen. Sie sind häufiger bei Personen, die ihren Beruf in geschlossenen Räumen ausüben [49]. Eine hohe beruflich bedingte Sonnenlichtexposition zeigt eine inverse Assoziation mit dem Auftreten von Melanomen. Man vermutet, dass die Haut unter regelmäßiger Sonnenlichtexposition protektive Anpassungsmechanismen wie Pigmentierung entwickelt. Bei Personen, die sich lediglich intermittierend der Sonne exponieren, wird die Haut hingegen unvorbereitet von UV-Strahlung getroffen und zeigt sich somit vulnerabler [55]. Das Melanomrisiko ist speziell mit einer Sonnenlichtexposition, die eine Dermatitis solaris (Sonnenbrand) induziert, assoziiert [55]. Insbesondere eine Anamnese von fünf oder mehr Sonnenbränden in der Kindheit kann das Risiko mehr als verdoppeln [49]. Eine mögliche Vulnerabilität im Jugendalter deckt sich mit dem Ergebnis, dass sich Melanozyten Neugeborener empfindlicher gegenüber einer Transformation durch die Karzinogene DMBA und UV-B zeigten als Melanozyten Erwachsener [24]. Betrachtet man die unterschiedlichen von der Sonne emittierten elektromagnetischen Strahlen, so wird neben dem UV-B-Anteil von vielen Autoren auch dem UV-A-Anteil eine Rolle bei der Pathogenese des malignen Melanoms zugesprochen [12,20,34,50]. Von großer Bedeutung sind individuelle Charakteristika, die die Adaptierung der Haut auf die UV-Bestrahlung z.B. in Form von Pigmentierung bestimmen. Demzufolge zählen Menschen mit hellem Hauttyp, die rasch einen Sonnenbrand erleiden und nach Sonnenexposition kaum bräunen, zur Hauptrisikogruppe. Sie produzieren infolge einer Variante des Melanocortinrezeptors MC1R nicht UV-protektives Phäomelanin. Sie weisen häufig blaue Augen, rote Haare und zahlreiche Sommersprossen auf.

Potentielle Vorläufer des malignen Melanoms sind Nävuszellnävi (NZN). Jedoch ist deren Transformation gemessen an ihrer Häufigkeit sehr selten. NZN sind eine morphologisch vielgestaltige Gruppe gutartiger melanozytärer Läsionen. NZN gehören zu den häufigsten Tumoren der Haut. Klinisch handelt es sich in der Regel um runde, kleine, gut abgrenzbare, flache oder erhabene Pigmentmale von rötlich-brauner bis schwärzlicher Farbe und regelmäßigem Aufbau. NZN sind aus kugeligen, strang- oder haufenartigen Nestern aggregierter Pigmentzellen, den sogenannten Nävuszellen, aufgebaut. Die Nävuszellen unterscheiden sich von normalen Melanozyten durch folgende Merkmale: Sie liegen in der epidermalen Junktionszone oder tiefer, sind kaum dendritisch und haben die Fähigkeit zur Melaninsynthese teilweise verloren. Sie sind von einer Basalmembran umgeben und zeigen manchmal Merkmale der Transformation wie Melanommarkerexpression und Karyotypanomalien. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Nävuszellen genetisch veränderte Pigmentzellen sind und NZN demnach benigne Neoplasien. Manche Autoren sehen Nävuszellen als ein Differenzierungsstadium zwischen normalen Melanozyten und Melanomzellen [58,40]. Es ist nach wie vor umstritten, ob Nävuszellen aus epidermalen

Melanozyten oder aus Nervenstrukturen der tiefen Dermis hervorgehen. Nach heutiger Anschauung sind Nävuszellen das Produkt defekter Melanoblasten (Nävomelanoblasten), die gemeinsam mit den normalen Melanoblasten die Haut besiedeln [57]. Das Melanomrisiko steigt mit der Anzahl von NZN (> 50 –100 Stück) und dem Auftreten multipler dysplastischer NZN [8,9]. Patienten, bei denen bereits selbst oder bei engen Familienangehörigen ein malignes Melanom aufgetreten ist, zeigen ein erhöhtes Risiko für diese Erkrankung [8,9].

Ein Zehntel aller malignen Melanome treten infolge vererbter Genmutationen familiär auf. In diese Gruppe gehört unter anderem das B-K Mole Syndrom, welches Varianten im Tumorsuppressorgen CDKN2A und dem Onkogen CDK4 aufweist [56]. Diese Patienten zeigen mehr als 50 NZN mit histologischen Atypien und berichten über mindestens einen Melanomfall in ihrer engsten Verwandtschaft [7].

Sowohl für die Entwicklung des malignen Melanoms als auch für die Entstehung zahlreicher anderer Malignome ist Immunsuppression ein weiterer anerkannter Risikofaktor [8,9].

1.1.3 Klinik und Einteilung

Maligne Melanome weisen eine außerordentliche morphologische Vielgestaltigkeit auf. Sie sind zumeist tief braune bis bläulich-schwärzliche Tumoren, unterschiedlicher Farbintensität. Sie können pigmentfreie Areale und sekundäre Veränderungen wie z.B. Nässen, Verkrustung und Ulzerationen zeigen. Wichtige diagnostische Charakteristika des malignen Melanoms werden mit der ABCD-Regel zusammengefasst: Asymmetrie, unregelmäßige Begrenzung, unterschiedliches Colorit innerhalb des Herdes und ein Durchmesser größer 5 mm [5].

Im deutschsprachigen Raum werden vier Melanomhaupttypen unterschieden. Diese wurden von Clark und Reed aufgrund klinischer und histologischer Unterschiede eingeführt [11]. Dazu gehört das superfiziell spreitende Melanom (SSM), welches eine flache, vorwiegend horizontal wachsende Pigmentläsion darstellt. Das noduläre maligne Melanom (NMM) wächst in Form eines Knotens und dehnt sich vertikal aus. Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) entwickelt sich in chronisch lichtexponierter Haut auf dem Boden einer präexistenten Lentigo maligna. Das akrolentiginöse Melanom (ALM) tritt an den Händen oder Füßen auf [10]. Tabelle 2 gibt die Häufigkeitsverteilung und das durchschnittliche Patientenalter der jeweiligen Subtypen wieder.

Typ	Anteil in %	Medianes Alter in Jahren
SSM	57,4	51
NMM	21,4	56
LMM	8,8	68
ALM	4,0	63
Sonstige	8,4	54

Tabelle 2: Häufigkeit und medianes Patientenalter kutaner Melanomsubtypen (Nach C.Garbe, Dermatologische Onkologie [10])

Im englischsprachigen Raum hat sich eine histopathologische Einteilung, welche die Melanomprogression charakterisiert, durchgesetzt. Man differenziert das Melanom in situ, welches auf die Epidermis begrenzt ist und die Basalmembran nicht durchbricht. Ein vorwiegend horizontal wachsendes malignes Melanom, das die Basalmembran durchstößt und in das oberflächliche Stratum papillare der Dermis vordringt, wird als radial growth phase melanoma (RGP) bezeichnet. Das sogenannte vertical growth phase melanoma (VGP) zeigt

seine größte Tumormasse in Form von vertikal orientierten Tumornestern im Stratum papillare der Dermis und wächst bis ins Stratum reticulare oder ins subkutane Fettgewebe vor. Das Melanom in situ besitzt aufgrund fehlenden Anschlusses zu Lymph- und Blutgefäßen nicht die Fähigkeit zur Metastasierung. RGP-Melanomen gelten generell als nicht bzw. selten metastasierend. VGP-Melanome haben die Fähigkeit zur Metastasierung erworben. Diese drei aufeinander folgenden Entwicklungsphasen sind nicht bei allen Melanomen zu finden. SSM und LMM beginnen zunächst als RGP-Melanome. Das NMM zeigt sich bereits zu Krankheitsbeginn in Form eines VGP-Melanoms, welches eine ungünstige Prognose mit sich bringt [8].

Nach Clark et al. werden Melanome nach der Tumoreindringtiefe in fünf Grade eingeteilt (siehe Tab. 3) [11]. Die Tumordicke wird nach der von Breslow vorgeschlagenen Methode am histologischen Präparat mittels eines Messokulars gemessen. Als Tumordicke gilt dabei der vertikale Durchmesser in Millimetern ab dem Stratum granulosum der Epidermis bis zur tiefsten identifizierbaren Melanomzelle in der Dermis oder Subkutis [10].

Grad	Tumoreindringtiefe
I	Epidermis, BM intakt
II	Stratum papillare, ohne diese auszufüllen
III	Stratum papillare, ausfüllend bis zum Stratum reticulare
IV	Stratum reticulare
V	subkutanes Fettgewebe

Tabelle 3: Tumoreindringtiefe nach Clark, BM: Basalmembran

1.1.4 Prognose

Unter allen derzeit bekannten Prognosekriterien hat sich die Tumordicke nach Breslow als der wichtigste prognostische Faktor erwiesen [10]. Tabelle 4 gibt die klinische Stadieneinteilung anhand von Tumordicke und Metastasierungsgrad mit ihrer jeweiligen Zehnjahresüberlebensrate wieder.

Stadium	Tumordicke (pT)	Regionäre Lymphknoten (N)	Fernmetastasen (M)	Zehnjahresüberlebensrate (in %)
Ia	pT1 (< 0,75 mm)	N0	M0	97
Ib	pT2 (0,76 - 1,5 mm)	N0	M0	90
IIa	pT3 (1,51 – 4,0 mm)	N0	M0	67
IIb	pT4 (> 4,0 mm)	N0	M0	43
IIIa	pT4 und S, I	N0	M0	28
IIIb	jedes pT	N1, N2	M0	19
IV	jedes pT	jedes N	M1	3

Tabelle 4: Stadieneinteilung und Zehnjahresüberlebensraten des malignen Melanoms

(Nach C.Garbe, Dermatologische Onkologie [10])

N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1: Metastasen ≤ 3 cm in größter Ausdehnung im regionären Lymphknoten

N2: Metastasen > 3 cm in größter Ausdehnung im regionären Lymphknoten

S: Satellitenmetastasen

I: In-Transit-Metastasen

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

Prognostisch grundlegend ist die Differenzierung regionärer oder disseminierter Tumormetastasierung. Die Zehnjahresüberlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei Patienten mit Satelliten- und In-Transit-Metastasen 25-40 % und mit regionalen Lymphknotenmetastasen

15-30 %. Bei Fernmetastasierung ergibt sich eine durchschnittliche Überlebenszeit von vier bis sechs Monaten [10]. Unter den histologischen Merkmalen sind ein niedriger Mitoseindex von unter sechs Mitosen pro mm^2 [11] sowie die Subtypen SSM und LMM, im Vergleich zum NMM und ALM, mit einer günstigeren Prognose vergesellschaftet [10]. Maligne Melanome an den Extremitäten haben eine bessere Prognose als Melanome am Rumpf oder im Kopfbereich. Als besonders bösartig gelten Melanome im Anogenital- und Vulvabereich. Frauen haben statistisch eine 10 % höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als Männer [5]. Wenn auch aufgrund des Auftretens in fortgeschrittenen Stadien von geringerer Aussagekraft, sind klinische Merkmale wie Ulzeration, Regression und der Verlust der oberflächlichen Hautleisten prognostisch ungünstig [11].

1.1.5 Therapie

Den wichtigsten und entscheidenden therapeutischen Schritt in der Behandlung des malignen Melanoms stellt die Exzision des Primärtumors dar. Dabei sollte einem ausreichenden Sicherheitsabstand im Gesunden (vgl. Tab. 5) und in die Tiefe bis zur darunter liegenden Faszie eingehalten werden. Dieses Vorgehen ist für lokalisierte kutane Melanome kurativ.

Tumordicke nach Breslow	Sicherheitsabstand
Melanom in situ	0,5 cm
< 2 mm	1 cm
> 2 mm	2 cm
> 4 mm	3 cm

Tabelle.5 Prognoseorientierte Exzisionsabstände

Die regionalen Lymphknoten zählen in der Regel zu den ersten Orten einer Metastasierung. Deshalb wird ab einer Tumordicke von größer einem Millimeter der sogenannte Schildwächterlymphknoten oder „sentinel lymph node“ routinemäßig entfernt und immunhistochemisch auf Metastasen untersucht. Patienten, deren Schildwächterlymphknoten Metastasen zeigen, werden einer vollständigen Lymphknotendissektion der betroffenen Region unterzogen [13].

Bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien mit dicken Melanomen oder Metastasen werden eine Reihe von adjuvanten systemischen Therapien z.B. mit Darcabazin oder Cisplatin eingesetzt. Keine Studie konnte jedoch einen Überlebensvorteil einer solchen Therapie bei Melanompatienten mit hohem Rezidivrisiko belegen [13]. Die einzige Substanz, die in großen randomisierten klinischen Studien reproduzierbar eine Verlängerung der rückfallfreien Überlebenszeit zeigte, ist Interferon alpha ($\text{IFN}\alpha$). Über die Effekte von $\text{IFN}\alpha$ auf das Gesamtüberleben sind die Aussagen hingegen uneinheitlich [9]. Die Therapie mit $\text{IFN}\alpha$ erfolgt intravenös oder subkutan in einer Dosis von 3-20 Millionen Einheiten pro Tag mehrmals wöchentlich unter engmaschiger ärztlicher Kontrolle.

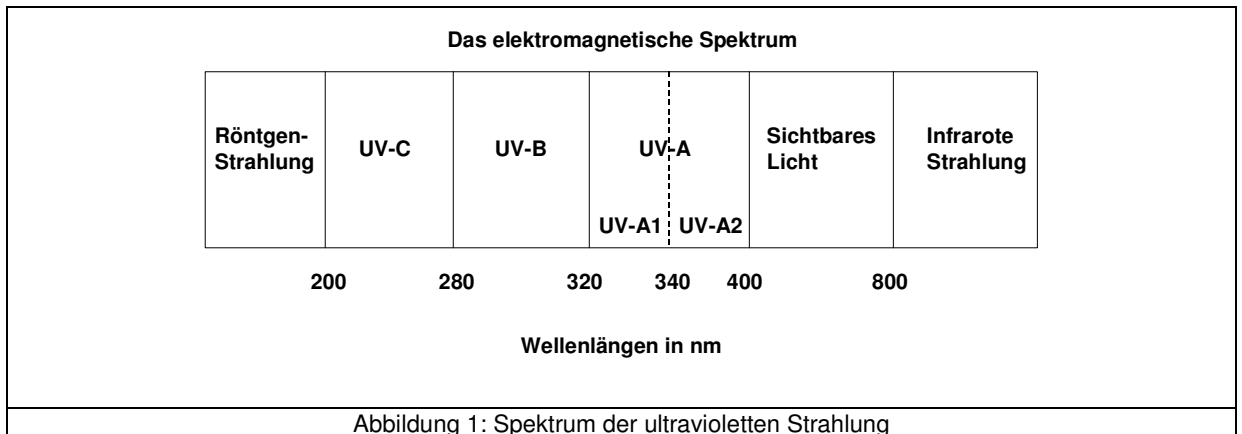
Mögliche zukünftige Therapieoptionen, die derzeit Gegenstand der Forschung sind, könnten der Einsatz von GM-CSF (Granulozyten und Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor) oder von speziellen gegen Melanomzellen gerichteten Vakzinen sein [13].

Im Bereich der palliativen Patientenversorgung werden außerdem die Strahlentherapie von Knochenmetastasen und die isolierte Extremitätenperfusion mit Chemotherapeutika eingesetzt [10].

1.2 Ultraviolette Strahlung

1.2.1 Physikalische Eigenschaften

Die von der Sonne emittierte elektromagnetische Strahlung der Wellenlängen 100 – 400 nm wird als ultraviolette (UV) Strahlung bezeichnet. Man differenziert den kurzwelligen UV-C-Bereich (100 – 280 nm), den mittelwelligen UV-B-Bereich (280 – 320 nm) und den langwelligen UV-A-Bereich (320 – 400 nm). Die langwellige ultraviolette Strahlung wird in UV-A1 (320 – 340 nm) und UV-A2 (340 – 400 nm) unterteilt (siehe Abb.1).



UV-Strahlung ist umso energiereicher, je kurzwelliger sie ist [1]. Die von der Sonne ausgehende ultraviolette Strahlung erreicht aufgrund von Absorptions- und Streuvorgängen in der Erdatmosphäre die Erdoberfläche nicht vollständig. Die Abschwächungseffekte sind umso größer, je kurzwelliger die Strahlung ist. UV-C ist in unserem Umfeld biologisch irrelevant, da es komplett von der Ozonschicht der Stratosphäre gefiltert wird und die Erdoberfläche nicht erreicht. Die UV-B-Exposition auf der Erde wird vom Grad der Bewölkung, dem Ausmaß der Luftverschmutzung sowie der Reflexion durch die Umgebung beeinflusst. Sie steigt mit hohem Sonnenstand, abnehmendem Breitengrad und Aufenthalt in Höhenlagen. Unter diesen Bedingungen legt die ultraviolette Strahlung eine verhältnismäßig kurze Strecke durch die Atmosphäre, in der sie Abschwächung erfährt, zurück. UV-A hingegen wird aufgrund seiner längerwelligen Eigenschaften durch Absorption und Streuung nur wenig beeinflusst. Sie wird auch durch die Ozonschicht der Stratosphäre nicht gefiltert [2]. Unter Idealbedingungen, d.h. Sonnenstand im Zenit, wolkenlos, klare Luft und normale Ozonschichtdicke, beträgt die Bestrahlungsstärke der von der Sonne ausgehenden optischen Strahlung auf der Erdoberfläche 1120 W/m^2 . Über die Hälfte entfällt dabei auf den Bereich des sichtbaren Lichtes mit einem Bestrahlungsstärkeanteil von 51,8 %. Einen Anteil von 43,9 % trägt die Infrarotstrahlung bei. UV-A und UV-B mit 3,9 % bzw. 0,4 % sind nur in geringem Maße an der gesamten Bestrahlungsstärke beteiligt [1].

1.2.2 Biologische Eigenschaften

Die biologische Wirkung von optischer Strahlung auf der Haut wird durch physikalische Effekte wie Reflexion, Beugung, Absorption und Streuung beeinflusst. Die Eindringtiefe der Strahlung in die Haut hängt dabei entscheidend von Streuphänomenen ab. Langwellige Strahlung wird geringer gestreut und kann tiefer in die Haut eindringen als kurzwellige Strahlung. UV-C wird in der Hornschicht absorbiert und erreicht die Epidermis nur zu einem geringen Maße. UV-B dringt bis in obere Abschnitte der Dermis ein und entfaltet seine

Wirkung überwiegend in der Epidermis. UV-A durchstrahlt die gesamte Haut bis weit in das Korium hinein und beeinflusst neben der Epidermis vorwiegend die Dermis [1].

Heutzutage ist eine Vielzahl akuter und chronischer Folgen photochemischer Prozesse an der Haut bekannt. Dazu zählen der akute Sonnenbrand, Sommersprossen, Faltenbildung und maligne Tumoren der Haut. Aus dem breiten Spektrum möglicher strahlungsbedingter Hauterscheinungen soll in diesem Abschnitt lediglich auf die für diese Arbeit relevanten UV-induzierten Hautveränderungen eingegangen werden.

Die häufigste akute UV-Bestrahlungsfolge der menschlichen Haut zeigt sich in Form der Dermatitis solaris, dem Sonnenbrand. Er ist Ausdruck einer toxischen Kontaktdermatitis infolge einer zu intensiven Bestrahlung mit Sonnenlicht. Die erythemwirksamste Strahlung liegt im UV-B-Bereich zwischen 295 und 315 nm. Der Sonnenbrand äußert sich in einer intensiven Hautrötung mit ödematöser Schwellung, Hitzegefühl, eventuell Blasenbildung und Allgemeinsymptomen. Das prostaglandinvermittelte Erythem setzt akut vier bis sechs Stunden nach UV-Exposition ein. Es erreicht seinen Höhepunkt nach 12 –24 Stunden und klingt nach 72 Stunden wieder ab. Histologisch zeigen sich fokale bis ausgedehnte Zellnekrosen in der Epidermis und weitgestellte Kapillaren im oberen Korium mit perivaskulärem lymphohistozytärem Infiltrat. Charakteristisch sind die sogenannten Sonnenbrandzellen, eosinophile, dyskeratotische Keratinozyten mit pyknotisch zusammengeschrumpften Kernen und blass wirkendem Zytoplasma [5].

Beim Vorgang der UV-induzierten Hautpigmentierung unterscheidet man die Sofortbräunung von der verzögerten Pigmentierung. Die Sofortbräunung zeichnet sich durch eine blau-graue Hautpigmentierung aus, die sich unmittelbar nach UV-Exposition entwickelt. Sie schwächt sich bereits eine Stunde nach Ende der UV-Exposition ab. Sofortbräunung wird am stärksten durch den UV-A-Anteil (320 – 340 nm) induziert und tritt bei dunklen Hauttypen leichter als bei hellhäutigen Menschen auf. Die molekularen Mechanismen der Sofortbräunung sind noch nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass Oxidationsvorgänge des Melanins eine Rolle spielen. Die Sofortbräunung schützt nicht vor UV-B-induzierten Erythemen. Die verzögerte Pigmentierung zeichnet sich durch eine braune Färbung UV-exponierter Haut aus. Sie ist drei bis vier Tage nach der Bestrahlung zu erkennen. Die verzögerte Pigmentierung ist die Folge einer Vermehrung des epidermalen Melaningehaltes aufgrund einer Zunahme sowohl der Melanozytenanzahl in der Epidermis als auch der Melaninsynthese in den Melanozyten [2].

UV-Strahlung schädigt die DNS von Hautzellen und induziert Mutationen. Entstehen sie im Bereich von Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen und entgehen sie DNS-Reparatursystemen können sie Ursache maligner Hauttumore sein [53]. Die UV-B-Strahlung ist in der Lage, das DNS-Molekül direkt anzuregen und zu schädigen [3]. Nach UV-B-Bestrahlung entstehen durch kovalente Bindungen vorwiegend Cyclobutan-Pyrimidindimere und Pyrimidin-(6,4)-Pyrimidon-Photoprodukte. Insbesondere die erstgenannten sind für die UV-B-induzierten Mutationen verantwortlich [4].

UV-A-Strahlung wird nicht wesentlich von DNS-Molekülen absorbiert und beeinflusst das Erbgut wahrscheinlich vornehmlich auf indirektem Wege. Dabei werden Photosensibilisatoren, die sowohl endogener (z.B. Flavine) oder exogener (z.B. Psoralen) Natur sind, durch UV-A angeregt. In einem nächsten Schritt erfolgt der Energie- bzw. Elektronentransfer vom angeregten Photosensibilisator auf das DNS-Molekül. Dies geschieht entweder auf direktem Wege oder über reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere Singulett-Sauerstoff. Die Folge sind Purinbasenmodifikationen wie die Entstehung von 7,8-Dihydro-8-

Oxoguanosin sowie DNS-Strangbrüche. Eine Transversions-Mutation von Thymin zu Guanin ist dabei nach UV-A-Bestrahlung typisch. Das 8-Hydroxyguanin paart sich nämlich bevorzugt mit Adenin im Gegensatz zum unveränderten Guanin, das sich mit Cytosin paaren würde [3,4].

1.3 Haut und ihre organotypische Kultur

Experimentielle Untersuchungen an Melanomzelllinien nehmen in der Melanomforschung eine Schlüsselrolle ein. Die Kultivierung von Melanomzellen in Monokultur verursacht jedoch kulturbedingte Zellveränderungen. Insbesondere Zellen früher Progressionsstadien wie RGP-Melanomzellen zeigen phänotypische und genetische Veränderungen in Monokultur [14]. Eine weitere Einschränkung der Monokultur besteht im Unvermögen, die in situ bedeutende interzelluläre Kommunikation der Hautzellen untereinander untersuchen zu können. Eves et al. zeigten, dass die metastatische Melanomzelllinie HBL nur in Anwesenheit von Keratinozyten und Fibroblasten in ein Dermisäquivalent einzudringen vermag [15].

Mittlerweile stehen unterschiedliche Methoden, Hautzellen in einem dreidimensionalen Zellverbund zu kultivieren, zur Verfügung. Solche menschlichen Hautrekonstrukte erweisen sich für Forschungszwecke gegenüber Zellmonokulturen als vorteilhaft, da sie in ihrem Aufbau menschlicher Haut stark ähneln [18]. Abbildung 2 stellt die Architektur von Hautrekonstrukten der natürlichen Hautbeschaffenheit eines Menschen gegenüber.

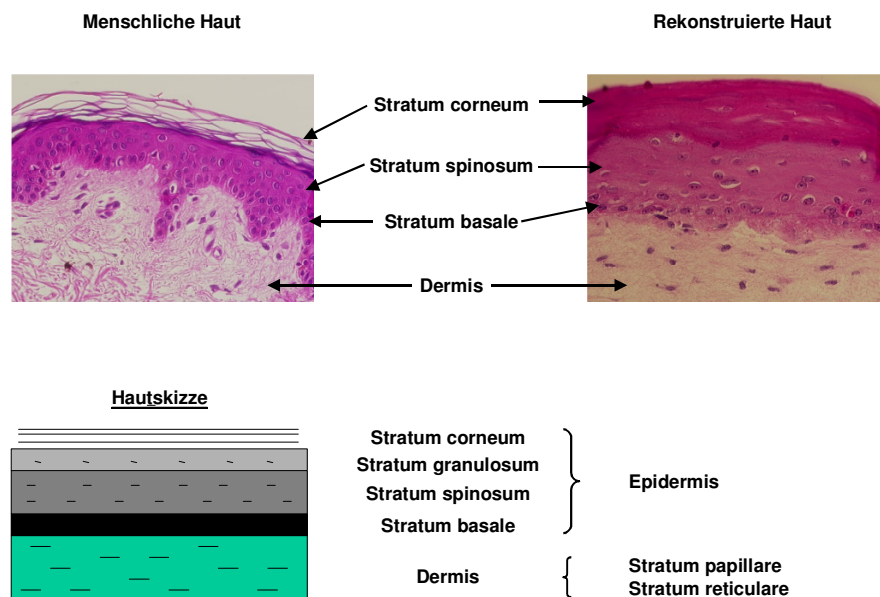


Abbildung 2: Aufbau der menschlichen Haut und der Hautrekonstrukte (HE, 200x)

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m² gehört sie zu den größten Organen des Menschen. Sie setzt sich aus zwei durch eine Basalmembran getrennte Schichten zusammen: der oberflächlichen Epidermis und der darunter liegenden Dermis, an die sich das subkutane Fettgewebe anschließt. Die tiefe Schicht der Dermis des Menschen ist das Stratum reticulare. Es besteht aus kollagenen und elastischen Fasern in einer proteoglykanhaltigen Grundsubstanz. In dieser bilden Fibroblasten mit langen Zellausläufern ein Netz. Die oberflächliche Dermissschicht ist das Stratum papillare. Es füllt den Raum zwischen den epidermalen Reteleisten aus und

besteht überwiegend aus Zellen und Matrix. In die Dermis sind die Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen eingebettet. Ein oberflächlicher subpapillärer sowie ein tiefer dermaler Gefäßplexus durchziehen die Dermis. In den Hautrekonstrukten besteht das Dermisäquivalent aus einer homogenen Kollagenmatrix, in die Fibroblasten gleichmäßig in allen Schichten eingebettet sind. Zellen des Immunsystems, Hautanhangsgebilde sowie Kapillar- und Nervengeflechte fehlen.

Die Epidermis wird von Keratinozyten gebildet. Es sind verschiedene Schichten zu unterscheiden, die in analoger Weise in den Hautrekonstrukten abzugrenzen sind. Die unterste Schicht stellt das Stratum basale aus pallisadenartig angeordneten kubischen Keratinozyten mit großen Zellkernen und wenig Zytoplasma dar. Hier findet die mitotische Aktivität der Keratinozyten statt. Darüber befindet sich das vielschichtige Stratum spinosum mit größeren, polygonalen Keratinozyten. In den höheren Schichten flachen die Keratinozyten zunehmend ab. Untereinander sind sie durch multiple stachelartige Interzellularbrücken, den Desmosomen, verbunden. Es schließt sich das ein- bis mehrschichtige Stratum granulosum aus abgeflachten Keratinozyten mit zahlreichen basophile Keratohyalin granula an. Die äußerste Zellschicht, das Stratum corneum, bilden flache, eosinophile, kernlose Hornzellen gefüllt mit Tonofilamenten und amorpher Matrix. Die natürliche Epidermis enthält folgende weitere Zellen: Antigenpräsentierende Langerhanszellen, neuroendokrine Merkelzellen und Melanozyten. Diese fehlen in den Hautrekonstrukten. Melanozyten sind neuroektodermaler Herkunft. Sie wandern während der Ontogenese als Melanoblasten aus der Neuralleiste in die Haut ein.

Jede fünfte bis achte Zelle der Basalschicht ist ein Melanozyt. Er synthetisiert und speichert Melanin, das Hautpigment, in Melanosomen. Diese werden über Dendriten an benachbarte Keratinozyten abgegeben. Die strukturelle und funktionelle Einheit aus einem Melanozyt und der mit ihm verbundenen Keratinozyten, etwa 36 Zellen, heißt epidermale Melanineinheit. Des weiteren sind vegetative und sensible Nervenfasern sowie immunkompetente Zellen sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis des Menschen vorhanden [16,17,57].

Untersuchungen zeigten, dass in Hautrekonstrukten die Wachstumseigenschaften verschiedener Melanomzellen den Verhältnissen in situ gleichen. Zelllinien biologisch früher Melanome in der horizontalen Wachstumsphase (RGP) wuchsen ausschließlich in der Epidermis. Zelllinien von VGP-Melanomen dringen zusätzlich in die Dermis der Rekonstrukte ein. Metastatische Melanomzelllinien zeigten eine rasche Proliferation in den Hautrekonstrukten verbunden mit einem aggressiven und tiefen Einwachsen in die Dermis [18,33,72]. Gontier et al. beobachteten in Hautrekonstrukten, dass ausschließlich Melanomzellen fähig waren, in die Dermis einzudringen. Normale Melanozyten und Nävuszellen wuchsen nicht in die Dermis ein und waren lediglich in der Epidermis zu finden [58].

1.4 Zielsetzung

Sonnenlichtexposition ist ein anerkannter Risikofaktor für das maligne Melanom und die Beteiligung von UV-Strahlung an der Melanomentstehung gilt als gesichert. Allerdings ist bisher noch nicht untersucht worden, ob maligne Melanome, die sich bereits in der Haut entwickelt haben, durch Sonnenstrahlen weiter beeinflusst werden. Würde eine UV-Exposition das biologische Verhalten bereits bestehender, aber noch nicht erkannter maligner Melanome in der Haut ändern, könnte sich das auf die Prognose der Patienten auswirken.

Da sich solche in vivo Experimente am Menschen aus ethischen Gründen verbieten, wurde für die Untersuchungen ein Hautmodell aus humanen Keratinozyten, Fibroblasten und Melanomzellen verwendet. Die Melanomzellen stammten aus den drei unterschiedlichen Progressionsstadien, nämlich horizontale, vertikale und metastasierende Wachstumsphase.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob UV-Strahlung die Wachstumseigenschaften von malignen Melanomzellen beeinflusst und es sollten Unterschiede in der Wirkung von UV-A-Strahlung und UV-B-Strahlung aufgedeckt werden. UV-A- und UV-B-Bestrahlung wurde deshalb getrennt von einander untersucht. Zudem sollte die Frage geklärt werden, ob sich die Wirkung von UV-A- oder UV-B-Strahlung auf Melanomzellen der drei Progressionsstadien (RGP, VGP, Met) unterscheidet.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Materialien

Geräte

- Membran – Vakuumpumpe Typ N79 KN18 , Gerät-Nr. 2.221842, Bachofer GmbH, Reutlingen, Deutschland
- CO₂ Unitherm 170 Inkubator, Uniequip GmbH, Martinsried, Deutschland
- Zentrifuge ROTIX 50 RS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Mikroskop ULWCD 0.30, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
- Sterile Werkbank Class II Typ A/B3, Model-Nr. Nu-425-600, Nuair, Plymouth, USA
- Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
- Neubauer Zählkammer 0,0025 mm² 0,1 mm Tiefe, Assistent Glaswarenfabrik, Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
- Chronos Stickstofftank Modell ADUR β (Nr.2097), Messer Cryotherm GmbH&Co KG, Kirchen, Deutschland
- - 80°C Gefriertruhe Kryotec, Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg, Deutschland
- Cryo Freezing Container, Qualilab, Olivet, Frankreich (Nr. 115650)

Einwegartikel

- puderfreie Handschuhe Sempercare, Semperit Technische Produkte GmbH & Co KG , Wien, Österreich
- T25 Kulturflasche, 25 cm², 50 ml, Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland (Nr. 3013E)
- T75 Kulturflasche 75 cm², 250 ml, Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (Nr. 658 170)
- Zellkulturschale 100x20 mm, 79 cm² (Nr. 93100) und Zellkulturschale 150x20 mm, 177 cm² (Nr.93150) Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, Schweiz
- Glas Pasteur-Pipetten 230 mm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland (Nr.VWRI1822)
- Serologische Pipetten 2 ml (Nr. 86.1252.001), 5 ml (Nr. 86.1253.001), 10 ml (Nr. 86.1254.001), 25 ml (Nr. 86.1685.001), Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland
- Cellstar Serologische Pipette 50 ml, Greiner Bio-One GmbH (Nr. 768180)
- 15 ml Zentrifugenröhrchen (Nr. 188271) und 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nr. 227261), Greiner Bio-One GmbH
- Sterile Spritzen 5 ml (Nr.309050), 10 ml (Nr.309110), 20 ml (Nr.300296), Becton Dickinson GmbH

- Sterile Spritze 50 ml, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland (Nr. 9000701)
- Sterile Spritzenfilter 0,22 µm, Millex-CP, Millipore Corporation Bedford, MA 01730, USA (Nr. SLGPR25LS)
- Handelsübliche Metallpinzetten, selbst autoklaviert
- Skalpell zum Einmalgebrauch Nr. 22, Produkte für die Medizin (PfM) AG, Köln, Deutschland
- Cryo Tube Vials 1 ml, Nalge Nunc International, Rochester New York, USA (Nr. 366656)

Kulturmedien und Zusätze

- Serumfreies Medium (SFM) 500 ml (Nr.1-7005-034), Rinderhypophysenextrakt (BPE) (Nr.13028), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) (Nr.10450), Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 500 ml, (Nr. F60435), Biochrom AG Seromed, Berlin, Deutschland
- Fötale Kälberserum (FKS), Biochrom (Nr.SZ-0115)
- Basalmedium (MCDB 153), Sigma ,Taufkirchen bei München, Deutschland (Nr.M-7403)
- Leibovitzmedium (L-15), PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland (Nr. E15-821)
- Insulin 5 µg/ml, Sigma (Nr. J-5500)
- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) 500 ml, PAA (Nr. H-15-010)
- Dialysiertes fötales Kälberserum (dFKS), Biochrom AG (Nr. B025)
- Trypsin in 0,05 % EDTA, PAA (Nr.gmbL11-660)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 250 g, Sigma (Nr. E5134)
- Penicillin/Streptomycin 100 ml, Sigma, (Nr. PO-781)
- Amphotericin B, Sigma, (Nr. A-2942)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) 100 ml, Merck, (Nr. 1.0967810.100)
- Dispase II, Roche-Boehringer, Mannheim, Deutschland (Nr. 165859)
- Collagenase Typ I 100 mg, Biochrom, (Nr. CI-28)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), selbst hergestellt aus 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ auf 1 l destilliertes Wasser.
- Tumormedium (Tu 2%), selbst hergestellt aus 80 ml MCDB 153, 20 ml L-15, 2 ml FKS, 0,1 ml Insulin, 84 µl CaCl₂

Weitere Chemikalien

- Bacillol 1 l , Bode Chemie, Hamburg (Ref. 973380)
- Isopropanol 70 %, Apotheke Innenstadt Universität München Pettenkofenstr.8a
- Kalziumchlorid 1,68 M, Sigma (Nr.C-5670)
- Natriumchlorid, Merck Eurolab GmbH, Ismaning bei München (Nr. 1.06404.1000)
- Kaliumchlorid, Merck (Nr. 1.04936.1000)
- Na₂HPO₄, Merck (Nr. 1.06586)
- KH₂PO₄, Merck (Nr.1.06586)
- 80 % und 70 % Ethanol 5 l, Glycerol, Apotheke Universitätsklinikum Innenstadt München

2.1.2 Zellexpansion

Im folgenden Kapitel werden die grundlegenden Arbeitsschritte zur Kultivierung von Zellen aus menschlicher Haut dargestellt, die für die Hautrekonstruktion erforderlich sind.

Allgemeines zur Zellkultur

Die Arbeit mit den Zellen und der Umgang mit den Medien erfolgt ausschließlich mit Latex-Handschuhen unter der sterilen Werkbank. Die sterile Werkbank wird mindestens 15 min vor Arbeitsbeginn in Betrieb genommen. Sie wird sowohl vor Beginn als auch nach Abschluss der Arbeit zunächst mit 70 % Isopropanol und anschließend mit Bacillol® gründlich gereinigt. Das Schlauchsystem der Absaugpumpe wird vor der Benutzung mit 70 % Isopropanol durchgespült.

Medien

Zur Kultivierung der verschiedenen Zelltypen sind unterschiedliche Medien erforderlich (siehe auch 2.1.1), wobei die Menge von der Größe der Kulturgefäße abhängt (Tab. 6,7).

Zelltyp	Kulturmedium	Stopmedium	Waschmedium
Keratinocyten	SFM	HBSS + 10 % dFKS	HBSS
Fibroblasten	DMEM + 10 % FKS	DMEM + 10 % FKS	HBSS, PBS, L15
Melanomzellen	Tu 2 %	L15 + 10 % FKS	HBSS, PBS, L15

Tabelle 6: Zelltypenspezifische Medien, SFM = Serumfreies Medium, DMEM = Fibroblastengrundmedium, FKS = fötales Kälberserum, dFKS = dialysiertes fötales Kälberserum, Tu 2 % = Tumormedium, HBSS = Hanks' Balanced Salt Solution, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, L-15 = Leibovitzmedium

Kulturgefäß- fläche	Kultur- und Waschmedium	Trypsin	Stop- medium
25 cm²	5 ml	1 ml	3 ml
75 cm²	12 ml	2 ml	5 ml
177 cm²	20 ml	4 ml	10 ml

Tabelle 7: Medienvolumina in Abhängigkeit von der Kulturgefäßfläche

Mediumwechsel

Es erfolgt regelmäßig ein Mediumwechsel abhängig vom jeweiligen Zelltyp (siehe Tab. 8). Zuerst wird das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt, dann wird das Waschmedium (Tab. 6) in geeigneter Menge (Tab. 7) in die Kulturflasche gefüllt, ein wenig geschwenkt und schließlich wieder abgesaugt. Nach Zugabe von frischem Kulturmedium (Tab. 6,7) werden die Zellen im Inkubator weiter kultiviert.

Zelltyp	Mediumwechsel pro Woche	Maximale Konfluenz
Keratinocyten	2x	60-80 %
Fibroblasten	1x	100 %
Melanomzellen	1x	100 %

Tabelle 8: Zeitpunkte des Mediumwechsels und maximalen Zellkonfluenz vor dem nächsten Auftrennen der jeweiligen Zellen

Ernten der Zellen

Das Ernten der Zellen aus der Kulturschale erfolgt für alle verwendeten Zellarten analog mit unterschiedlichen Medien (siehe Tab. 6). Nach einem Waschschrift (siehe Mediumwechsel) werden die Zellen mit Trypsin / EDTA 0,05 % bedeckt. Unter mikroskopischer Kontrolle wird der Zeitpunkt der Zellenablösung, gewöhnlich nach 2–5 min, ermittelt. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wird daraufhin zügig mittels Zugabe des Stopmediums beendet. Der Ablösevorgang der Zellen kann durch eine einminütige Inkubation bei 37°C und

durch Erschütterung der Kulturflasche beschleunigt werden. Keratinozyten werden vor der Trypsinzugabe für 2-4 min in 0,05 % EDTA in PBS bei 37°C inkubiert, wodurch Kalzium gebunden wird, welches für die Zelladhäsion auf der Kulturflasche notwendig ist. Die im Stopmedium und Trypsin gelösten Zellen werden in ein geeignetes Reagenzröhrchen pipettiert und mit 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Auf diese Weise setzen sich die Zellen am Boden des Röhrchens ab und bilden dort ein sogenanntes Zellpelett. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpelett in einem geeigneten Medium aufgenommen.

Zelltrennung

Die Zellvermehrung wird bei Betrachtung der Zellen in der Kulturflasche unter dem Mikroskop durch Bestimmung der sogenannten Konfluenz beurteilt. Die Konfluenz beschreibt den prozentualen Anteil des von den Zellen bedeckten Bodens der Kulturflasche. Da die Zellteilung normaler Hautzellen durch zu engen Kontakt zu den Nachbarzellen gestoppt wird, müssen sie nach Erreichen einer hohen Konfluenz (Tab.3) getrennt werden, um eine weitere Zellvermehrung zu ermöglichen. Von dieser sogenannten Kontaktinhibition unabhängig sind maligne Zellen wie die Melanomzellen. Um die Zellen zu trennen, müssen sie zunächst aus der Kulturflasche geerntet werden. Dies erfolgt nach dem oben beschriebenen Protokoll. Das zentrifugierte Zellpelett wird in Kulturmedium aufgenommen und je nach gewünschtem Trennverhältnis auf mehrere Kulturflaschen verteilt.

Zellzählung

Zum Zählen werden 10 µl einer Zellsuspension mit fraglicher Zellzahl in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop werden die Zellen der vier peripheren Felder ausgezählt. Der Mittelwert dieser vier Felder multipliziert mit 10 000 ergibt die Zellzahl in 1 ml der Zellsuspension.

2.1.3 Zellisolierung

Als Ausgangsmaterial für die Zellisolierung von humanen Fibroblasten und Keratinozyten dienten Vorhautstücke, die bei der Zirkumzision von Jungen im Alter zwischen 2–9 Jahren anfielen (Kinderchirurgische Praxis im Landkreis München). Der Herstellung der Hautrekonstrukte aus menschlichem Gewebe lag ein Ethikvotum (Projekt Nr. 261/01, Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität, Vorsitzender: Prof. Dr. Gustav Paumgartner) zugrunde, das die Verwendung von Vorhautstücken aus Zirkumzisionen genehmigte. Das Gewebe wird direkt nach der Operation in ein mit 10 ml Transportmedium gefülltes 50 ml Röhrchen gelegt und bei 4°C aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung erfolgte meist unmittelbar am selben Tag oder bis spätestens vier Tage nach der Operation.

2.1.3.1 Isolierung humaner Keratinozyten (HK)

1. Tag

Zunächst wird das Transportmedium abgesaugt und die Vorhautstücke wiederholt mit 5 ml HBSS gespült. Nach Entfernen von HBSS erfolgt eine fünfminütige Inkubation in 80 % Ethanol bei Raumtemperatur mit anschließender Spülung mit 5 ml HBSS. Der gesamte Röhrcheninhalt wird in eine 10 cm Petrischale geschüttet. Nach Absaugen der Flüssigkeit werden mit sterilem Skalpell und steriler Pinzette das Fettgewebe und die Gefäße des Vorhautstückes entfernt. Der Rest wird in 5 x 5 mm große Stücke geschnitten. Die Hautstückchen werden für 15-18 h in 5 ml Dispase II in einem 50 ml Röhrchen bei 4 °C inkubiert. Dabei trennt sich die Epidermis von der Dermis.

2.Tag

Nach der Inkubationszeit in Dispase II werden die Hautstückchen in eine 10 cm Petrischale geschüttet. Die Flüssigkeit wird abgesaugt und mit Hilfe zweier steriler Pinzetten wird die Epidermis von der Dermis abgezogen. Alle Epidermisstücke werden in ein mit 2 ml Trypsin gefülltes 50 ml Röhrchen überführt, mehrere Male resuspendiert und anschließend für 5 min bei 37°C inkubiert. Zu der nun trüben Suspension werden 5 ml HBSS + 10% dFKS hinzu gegeben, um die enzymatische Trypsinwirkung zu stoppen. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation mit 1200 rpm über 5 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet wird in 5 ml Kerationzytenmedium aufgenommen und in eine T25 Flasche gesät (Passage Nr. 0).

2.1.3.2 Isolierung humaner Fibroblasten (HF)

Die Arbeitsschritte am ersten Tag entsprechen denen zur Isolierung humaner Keratinozyten am ersten Tag (vgl. 2.1.3.1).

2. Tag

Eine über einen Spritzenfilter (2 µm) steril gefilterte Kollagenaselösung (2 ml) wird in ein 50 ml Röhrchen gefüllt. Die Hautstückchen werden wie oben beschrieben in Epidermis und Dermis geteilt. Sämtliche Dermisstückchen werden in die vorbereitete Kollagenase gelegt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3. Tag

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 45 ml PBS / EDTA 0,02 % zu den 2 ml Kollagenase mit den Dermisstückchen gegeben und dieses Gemisch ca. 30igmal kräftig resuspendiert. Anschließend wird bei Raumtemperatur das 50 ml Röhrchen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in 5 ml DMEM + 10 % FKS aufgenommen und in eine T25 Flasche gesät. Es folgt eine mehrtägige Inkubation im CO₂-Inkubator.

2.1.3.3 Wistar–Melanomzelllinien

Die Melanomzellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. Herlyn, Wistar-Institut in Philadelphia, USA, zur Verfügung gestellt. Sie wurden vor dem Einbringen in die Hautrekonstrukte in unserem Labor über mehrere Passgen hinweg kultiviert, expandiert und asserviert. In den Experimenten werden drei verschiedenen Melanomzelllinien aus den drei unterschiedlichen Progressionsstadien verwendet. Bei den Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase (RGP) handelt es sich um die Linie WM3211, bei den Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase (VGP) handelt es sich um die Linie WM793 und bei den metastatische Melanomzellen (Met) um die Linie 1205Lu.

2.1.4 Zellaufbewahrung

Kryokonservierung von Zellen

Alle eingefrorenen Zellen werden in einem Stickstofftank bei -180°C gelagert. Pro Kryoröhrchen werden mindestens 1 Million Zellen in 1 ml Einfriermedium aufbewahrt. Die einzufrierenden Zellen werden laut Protokoll (vgl. 2.1.2) geerntet. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet im Einfriermedium aufgenommen und je 1 ml davon in ein Kryoröhrchen gefüllt. Diese werden in einen Cryo Freezing Container gestellt und für 24-48 h bei -80°C gelagert. Anschließend werden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank (-180°C) überführt. Das Einfriermedium für Keratinozyten besteht aus 95 % serumfreiem

Keratinocyten-Medium (SFM) und 5% Glycerol. Das Medium zum Einfrieren von Fibroblasten sowie Melanomzellen besteht aus 95% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 5% Dimethylsulfoxid (DMSO).

Auftauen kryokonservierter Zellen

Zunächst werden in ein 50 ml Röhrchen 2-5 ml des jeweiligen Zellkulturmediums (siehe Tab.6) gefüllt. Nun wird das Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank genommen. Sobald der Inhalt bei Raumtemperatur aufgetaut ist, wird er in das vorbereitete Kulturmedium pipettiert und vermischt. Danach wird das 50 ml Röhrchen bei Raumtemperatur für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen (vgl. Tab. 6,7) und in eine Kulturflasche ausgesät.

2.2 Hautrekonstruktion

Die Herstellung der Hautrekonstrukte aus humanen Hautzellen erfolgte mit Modifikationen nach der Methode von Vaccariello et al. [14,70]. Die Rekonstrukte setzen sich aus einem Dermisäquivalent und einem Epidermisäquivalent zusammen. Das Dermisäquivalent besteht aus in Kollagen eingebetteten humanen Fibroblasten. Das Epidermisäquivalent wird von humanen Keratinocyten gebildet und es werden Melanomzellen integriert.

Die Mengenangaben werden im Folgenden für n = 6 Rekonstrukte angegeben, da dies einer Versuchsschale mit sechs Einsätzen entspricht (siehe Abb. 3).



Abbildung 3: Makroskopische Ansicht von sechs Rekonstrukten (Pfeile) in einer Kulturschale mit sechs Einsätzen

2.2.1 Materialien

Geräte

- Eismaschine Scotsman AF10, Hierhammer Kältetechnik GmbH, München, Deutschland
- Pipetierhilfe 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Gilson Company, Ohio, USA

Einwegartikel

- Kulturschale mit 6 Einsatzstellen, Biocoat, Becton Dickinson Labware, Bedford MA, USA (Nr.355467)
- Millicell 3,0 µm Einsätze 30 mm Durchmesser, Millipore, Molsheim, Frankreich (Nr. PITT03050)
- Flaschenfilter 500 ml, Nalge Nunc International (Nr. 0002914520)
- Filtersystem 500 ml, Corning Incorporated, Corning, NY USA (Nr. 430769)
- Flaschenfilter 150 ml Porengröße 20 µm , Nalge Nunc International (Nr. 0002904520)
- SFCA Filtereinheit 250 ml, Nalge Nunc International (Nr.0001570020)
- Glasflaschen 100 ml und 500 ml, Biochrom
- Pipettenspitzen bis 200 µl Diamond D200, Gilson Company (Nr. FHCO/08425)
- Pipettenspitzen 1000 µl, Sarstedt (Nr. 70.762)

Kulturmedien und Chemikalien

- Hydroxyethylpiperazinethansulfonessig (HEPES) 1 M, Sigma, (Nr. H0887)
- Gentamycin 50 mg/ml, Gibco (Nr. 15750-037)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (10xEMEM), Cambrex (BioWhittaker), East Rutherford, NJ, USA (Nr. BE12-684F)
- L -Glutamin 200 mM, Sigma (Nr. G-7513)
- Adenin 200 mM, Sigma (Nr. G-6554)
- Natriumbicarbonat (NaHCO₃)100 ml, Gibco (Nr. 25080-060)
- Kollagen 1 Rattenschwanz 1g, Becton Dickinson, (Nr. 356236)
- Essigsäure 100 ml, Sigma (Nr. 200-580-7)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME-Medium) 500 ml, Gibco (Nr.21068-028)
- HAM's Nutrient Medium F-12 (F-12) 500 ml, PAA (Nr. E15-016)
- Hydrocortison, MP Biomedicals, Irvine, Kanada (Nr. 194569)
- Trijodthyronin (TIT), 20 g/ml, MP Biomedicals (Nr. 194584)
- ITES (Insulin, Transferrin, Ethanolamin, Selenensäure), Cambrex Bio Science, Walkesville, MD USA (Nr. 17-839Z)
- Progesteron, MP Biomedicals (Nr. 194570)
- Newborn calf serum (NBCS) cheliert , PAA (Nr. 234527)
- O-Phosphorylethan (O-PEA), MP Biomedicals (Nr. 194557)

2.2.2 Rekonstruktion der Dermis

Vorbereitungen

Am Tag vor der Herstellung der Kollagenmatrix werden die Fibroblasten im Verhältnis 1:2 ausgesät, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht haben. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass sich die HF zum Zeitpunkt der Einbettung in die Kollagenmatrix in einer aktiven Wachstumsphase befinden. Für die Experimente werden insgesamt sechs verschiedene Fibroblastenlinien verwendet. Eine Passageanzahl von 11 wird nicht überschritten, da mit zunehmendem Alter der Fibroblasten ihr Zellteilungsvermögen abnimmt. Vor jedem Experiment wird neues FCM-Medium (Fibroblastenkulturmedium) frisch angesetzt. 100 ml FCM-Medium für sechs Rekonstrukte besteht aus 89 ml DMEM, 10 ml FKS, 1 ml HEPES und 0,126 ml Gentamycin.

Kollagenmatrix

Die Durchführung sämtlicher Arbeitsschritte sowie die Aufbewahrung aller benötigten Reagenzien und Zellsuspensionen erfolgt ausschließlich auf Eis, um ein vorzeitiges Erstarren

des Kollagens zu vermeiden. Als erstes wird die azelluläre Matrix hergestellt, indem die Reagenzien (vgl. Tab. 4) nacheinander in ein 50 ml Röhrchen pipettiert werden.

	Azelluläre Matrix	Zelluläre Matrix
10xEMEM	0,59 ml	1,65 ml
L – Glutamin	0,05 ml	0,15 ml
FKS	0,6 ml	1,85 ml
NaHCO₃	0,17 ml	0,52 ml
Kollagen	4,6 ml	14 ml
Fibroblasten	---	4,2 x 10 ⁵ HF in 1,5 ml FCM

Tabelle 9: Substanzen zur Herstellung der Kollagenmatrix mit ihren jeweiligen Volumina für n = 6 Rekonstrukte, FKS = fötales Kälberserum, 10xEMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium , NaHCO₃ = Natriumbicarbonat

Die Einstellung des optimalen pH-Wertes erfolgt optisch über die Farbe der Lösung, die einen pH-Indikator enthält. Dabei wird zunächst nur etwa die Hälfte der berechneten NaHCO₃-Menge hinzugefügt und nach Zugabe des Kollagens tröpfchenweise weiteres NaHCO₃ hinein titriert bis ein Farbumschlag von goldgelb zu altrosa erfolgt. Anschließend werden je 1 ml der azellulären Matrixlösung in jeden Einsatz gegeben. Während die azelluläre Matrix unter der sterilen Werkbank bei Raumtemperatur zu einem Gel erhärtet, wird schrittweise die zelluläre Matrix in einem 50 ml Röhrchen auf Eis vorbereitet: 10xEMEM, L-Glutamin, FKS, NaHCO₃ und Kollagen (vgl. Tab. 9) werden gemischt und die Fibroblasten geerntet (vgl. 2.1.2). Für sechs Rekonstrukte benötigt man 6 x 70 000 Fibroblasten, d.h. 420 000 Fibroblasten werden ausgezählt (vgl. 2.1.2) und das Pellet in 1,5 ml FCM-Medium aufgenommen. Nun erfolgt die pH-Wert-Einstellung durch tröpfchenweises Hinzufügen von NaHCO₃ bis zum Farbumschlag von goldgelb zu altrosa. Als letztes fügt man die vorbereitete Fibroblastensuspension hinzu und verteilt die Zellen in der viskösen zellulären Matrixlösung homogen. Anschließend werden je 3 ml auf die mittlerweile zu Gel erhärtete azelluläre Matrix in den Einsatz gegeben.

Die Schale wird für 45 min bei Raumtemperatur unter der sterilen Werkbank bis zur Erhärtung der zellulären Matrix stehen gelassen. Danach werden 14 ml FCM-Medium außen um den Einsatz und 2 ml in den Einsatz auf die Kollagenmatrix gefüllt. Anschließend werden die Rekonstrukte für fünf bis sieben Tage im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

Während dieser Zeit erfolgt durch Stoffwechselfvorgänge der Fibroblasten eine Kontraktion der Kollagenmatrix auf etwa die Hälfte ihrer Ursprungsgröße. Zur Verhinderung einer zu starken Kontraktion oder einer Ablösung vom Einsatzboden wird bei Bedarf ein Teflonring von 1 cm Durchmesser und 3 mm Dicke mit Hilfe einer sterilen Pinzette auf das Rekonstrukt gelegt.

2.2.3 Rekonstruktion der Epidermis

Herstellung der EPI-Medien

Die zur weiteren Kultivierung der Rekonstrukte benötigten EPI-Medien (Epithelisierungsmedien) werden möglichst zeitnah zum Gebrauch frisch angesetzt. Dazu werden die in Tabelle 10 für jeweils 100 ml Medium angegebenen Substanzen gemischt und vor Gebrauch steril gefiltert.

	EPI I	EPI II	EPI III
DME	72,2 ml	72,2 ml	47,5 ml
F – 12	24,0 ml	24,0 ml	47,5 ml
L – Glutamin	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Hydrocortison	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
ITES	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
O-PEA	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Trijodthyronin	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Adenin	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
CaCl₂	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Progesteron	0,2 ml	0,2 ml	---
NBCS	0,1 ml cheliert	0,1 ml uncheliert	2,0 ml uncheliert

Tabelle 10: EPI-Medienzusammensetzung für jeweils 100 ml, DME = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, F-12 = Ham's Nutrient Medium, ITES = Insulin, Transferrin, Ethanolamin, Selensäure, O-PEA = O-Phosphorylethan, CaCl₂ = Kalziumchlorid, NBCS = Newborn calf serum

Aussaat von Keratinozyten und Melanomzellen

Nach erfolgter Kontraktion der Kollagenmatrix nach fünf bis sieben Tagen wird das FCM-Medium abgesaugt. Die Dermisäquivalente werden in 16 ml HBSS (14 ml außen, 2 ml innen) zum Auswaschen des FCM für 20 min bis 1 h im Inkubator inkubiert. Anschließend wird das HBSS abgesaugt und die Rekonstrukte für 15 min im Inkubator getrocknet. In der Zwischenzeit wird die Zellsuspension zur Aussaat vorbereitet. Pro Rekonstrukt werden 500 000 Zellen in 50 µl EPI I Medium benötigt. Die Melanomzellen werden zusammen mit den Keratinozyten ausgesät.

In den Experimenten werden insgesamt sieben Keratinozytenlinien verwendet. Dabei wird eine Passageanzahl von 6 nicht überschritten, da die Keratinozyten ansonsten bereits in der Petrischale beginnen, auszudifferenzieren. Im Rahmen von Vorversuchen wurde festgelegt, dass das Mischungsverhältnis von Melanomzellen zu Keratinozyten je nach Zelltyp zwischen 1:4 bis 1:11 variieren sollte in Abhängigkeit von der Fähigkeit der Melanomzellen, Tumorzellnester in den Hautrekonstrukten zu bilden. In der Regel wurden Melanomzellen höherer Progressionsstadien stärker verdünnt als Melanomzellen weniger fortgeschrittener Progressionsstadien.

Zuerst werden die Melanomzellen geerntet, gezählt (vgl. 2.1.2) und das Pellet in 6 x 20 µl EPI I Medium aufgenommen. Anschließend werden die Keratinozyten geerntet, ausgezählt (vgl. 2.1.2) und das Pellet in 6 mal 30 µl EPI I Medium aufgenommen. Danach werden beide Zellsuspensionen miteinander gemischt. Schließlich werden jeweils 50 µl dieses Zellgemisches tröpfchenweise auf die Kollagenmatrix gegeben. Nach der Aussaat wird eine Adhäsion der Zellen über 1,5 h im Inkubator ohne Medium ermöglicht. Anschließend werden 14 ml EPI I Medium außen um den Einsatz und 2 ml EPI I Medium in den Einsatz gefüllt und die Rekonstrukte im CO₂-Inkubator aufbewahrt. Der Tag der Zellaussaat wird als Tag 1 der Rekonstrukte festgelegt.

Mediumwechsel

Der Mediumwechsel zur Kultivierung der Rekonstrukte erfolgt an jedem zweiten Tag. In den ersten zwei Tagen werden die Rekonstrukte in EPI I, am Tag 3 und 4 in EPI II und ab Tag 5 in EPI III kultiviert (Tab. 10, 11). Die drei EPI-Medien unterscheiden sich in der Kalziumkonzentration. Während EPI I reich an Kalzium ist, sind EPI II und EPI III kalziumarm, was die Keratinozytendifferenzierung induziert. Das verbrauchte Medium wird komplett abgesaugt und das frische Medium eingefüllt (Tab. 11). Während der ersten vier

Tage bedecken die EPI – Medien I bzw. II die Rekonstrukttoberfläche vollständig. Ab Tag 5 wird exakt so viel Medium von außen zugegeben, dass die Rekonstrukttoberfläche gerade noch trocken bleibt, aber seitlich Mediumflüssigkeit an das Rekonstrukt heranreicht. Diese Luftexposition der Oberfläche der Rekonstrukte induziert eine Differenzierung der Keratinozyten mit der Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels, der Epidermis.

Tag	Medium	Volumen	Verteilung
1 + 2	EPI I	16 ml	14 ml außen, 2 ml innen
3 + 4	EPI II	16 ml	14 ml außen, 2 ml innen
ab 5	EPI III	9,4-10,0 ml	alles außen

Tabelle 11: Verwendete Medien, ihre Volumina und Verteilung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer der Rekonstrukte, EPI = Epithelisierungsmedien

2.3 Bestrahlung der Rekonstrukte

2.3.1 Materialien

- UV-A-Meter (Nr. 0020), Dr. Hönle AG, Planegg, Deutschland
- UV-B-Meter Typ 585100, Herbert Waldmann GmbH & Co, Villingen-Schwenningen, Deutschland
- UV-A-Lampe UVASUN5000S, Mutzhas Produktionsgesellschaft mbH, München, Deutschland (Nr. 94.12.050.0332)
- UV-B-Lampe TL20W/12 Ultraviolet, Philips, Würzburg, Deutschland
- Alufolienspenderbox 0,03 mm x 500 mm x 100 m, Merck

2.3.2 Arbeitsschritte vor und nach der Bestrahlung

Unabhängig von der Art der UV-Bestrahlung werden alle Rekonstrukte in PBS-Lösung bestrahlt. Da es sich hierbei um eine farblose Pufferlösung handelt, wird auf diese Weise das Risiko der Absorption und Streustrahlung, wie sie bei den rot gefärbten EPI-Medien auftreten können, vermindert. Zunächst wird das EPI III-Medium abgesaugt und mit PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wird die gleiche Menge PBS-Lösung um die Einsätze gegeben. Es folgt die Bestrahlung mit UV-Strahlung. Nach Abschluss der Bestrahlung wird die PBS-Lösung abgesaugt, Epi III-Medium außerhalb der Einsätze eingefüllt und die Hautrekonstrukte im Inkubator weiter kultiviert.

2.3.3 UV-B-Bestrahlung

Mindestens 15 min vor Bestrahlungsbeginn sollte die UV-B-Lampe eingeschaltet werden, damit sich ein homogenes Bestrahlungsfeld einstellt. Unmittelbar vor der Bestrahlung wird die aktuelle Leistung der UV-B-Lampe im Abstand von 40,5 cm mit Hilfe eines UV-B-Meters ermittelt. Die zur Erzielung der gewünschten Energie benötigte Bestrahlungsdauer ergibt sich aus folgendem physikalischen Zusammenhang:

$$\text{Zeit [sec.]} = \text{Energie [mJ/cm}^2 \text{]} / \text{Leistung [mW/cm}^2 \text{]}$$

Die sich in PBS-Lösung befindenden Rekonstrukte werden mit abgehobenem Deckel unter die UV-B-Lampe gestellt und für die Dauer der berechneten Zeit (circa 5 min) bestrahlt. Anschließend erfolgt der Mediumwechsel. Die Rekonstrukte, die nicht bestrahlt werden sollen, werden mit Aluminiumfolie abgedeckt.

2.3.4 UV-A-Bestrahlung

Analog zur UV-B- erfolgt die UV-A-Bestrahlung (vgl. 2.3.2). Nach mindestens fünfminütigem Brennen der UV-A-Lampe wird die aktuelle Leistung im Abstand von 43 cm mit Hilfe des UV-A-Meters ermittelt.

Die zur Erzielung der gewünschten Energie benötigte Bestrahlungsdauer ergibt sich aus folgendem physikalischen Zusammenhang:

$$\text{Zeit [sec.]} = \text{Energie [mJ/cm}^2 \text{]} / \text{Leistung [mW/cm}^2 \text{]}$$

Die von PBS-Lösung umspülten Rekonstrukte werden unter abgehobenem Deckel mit der UV-A-Lampe bestrahlt. Die Abdeckung der nicht bestrahlten Hautrekonstrukte erfolgt mit Aluminiumfolie.

2.4 Histologische Aufarbeitung und mikroskopische Auswertung

2.4.1 Materialien

Geräte

- Exsikkator, Tissue-TEK[®]Vip, Miles Scientific, Midland, Canada
- Heizplatte Bavimed, Birkenau, Deutschland
- Kühlplatte COP 30, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
- Mikrotom RM2155, Leica Mikrosystems, Wetzlar, Deutschland
- Streckbad Typ 25900, Medax, Kiel, Deutschland
- HE-Färbemaschine, Shandon Varistain 24-4, Erlangen, Deutschland
- Automatischer Deckgläschenbedecker, Sakura Coveraid, IMEB, San Marcos, USA
- Mikroskop Axioskop 2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Einwegartikel

- Objektträger Superfrost[®]Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
- Einbettkästchen Histolette II, Simport, Beloeil QC, Kanada (Nr. M492-5)
- Handelsübliches Filterpapier

Chemikalien

- Formaldehyd-Lösung 10% 1 l, Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
- Paraffinkugeln Parablast, Firma Vogel, Gießen, Deutschland
- Ethanol absolut 1 l, Merck (Nr. 1.00983.1000)

2.4.2 Ernten der Hautrekonstrukte

Die Hautrekonstrukte werden zwischen Tag 10 und 21 geerntet. Zuerst wird eine 4 % Formalin-Lösung hergestellt. 100 ml dieser Formalin-Lösung setzen sich aus 40 ml 10 % Formalin, 40 ml Leitungswasser und 20 ml Ethanol absolut zusammen. Das EPI III-Medium wird vollständig abgesaugt und der Einsatz wird mit einer sterilen Pinzette heraus genommen. Auf einer 10 cm Plastischale wird mit einem Skalpell der Boden des Einsatzes vom Rand getrennt. Anschließend das Rekonstrukt halbiert und beide Hälften in ein mit Filterpapier ausgelegtes Einbettkästchen gelegt. Anschließend wird das Einbettkästchens in 4 % Formalin-Lösung eingelegt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag überträgt man das Einbettkästchen in eine 70 % Ethanol-Lösung, worin das Rekonstrukt bei 4 °C bis zur histologischen Aufarbeitung konserviert bleibt.

2.4.3 Gewebsaufbereitung und -fixierung

Die Formalin-fixierten Rekonstrukte werden nach Wasserentzug in Paraffin getränkt. Dies geschieht über Nacht automatisch im Gerät Tissue-TEK®Vip des Histologielaabores (Tab. 12).

Arbeitsschritt	Chemikalie	Temperatur	Verweildauer
1	Formalin	40 °C	2 h
2	Alkohol 70%	40 °C	0,5 h
3	Alkohol 70%	40 °C	1,0 h
4	Alkohol 96%	40 °C	1,0 h
5	Alkohol 96%	40 °C	1,0 h
6	Alkohol abs.	40 °C	1,0 h
7	Alkohol abs.	40 °C	1,0 h
8	Alkohol abs.	40 °C	2,0 h
9	Xylol	40 °C	2,0 h
10	Xylol	40 °C	1,0 h
11	Paraffin	62 °C	1,0 h
12	Paraffin	62 °C	1,0 h
13	Paraffin	62 °C	1,0 h
14	Paraffin	62 °C	1,0 h

Tabelle 12: Arbeitsschritte des Nachtprogrammes des Tissue-TEK®Vip
abs. : absolut, h : Stunde

Am folgenden Tag werden handelsübliche Paraffinkugeln in ein Becherglas gegeben und zur Verflüssigung in einen Brutschrank bei 57 °C gestellt. Auf einer Heizplatte mit 60 °C wird das flüssige Paraffin in einen Gießrahmen gegossen. Anschließend wird eine Hälfte des Rekonstrukts mit der Epidermis nach oben mit Hilfe einer abgeflamten Pinzette in das flüssige Paraffin hineingegeben und möglichst ohne Blasenbildung am Boden fest angedrückt. Nun wird der fertig bestückte Gießrahmen auf eine Kühlplatte mit -18 °C gelegt, wo das Paraffin innerhalb von 20 min trocknet und erhärtet. Schließlich werden die Rekonstrukte am Mikrotom 5 µm dick geschnitten. Die Gewebeschnitte werden dann für 5-10 min in ein Streckbad von 40-50 °C überführt. Nach dem Aufbringen auf einen Glasobjektträger trocknen die Schnitte über Nacht in einem Inkubator.

2.4.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Anfärbung der Rekonstruktsschnitte auf den Objektträgern mit Hämatoxylin und Eosin (HE) erfolgt automatisch im Gerät Varistain 24-4 (siehe Tab. 13). Nach der Färbung werden maschinell Deckgläschen auf den Gewebeschnitt aufgebracht. Das fertige histologische Präparat kann nun am Mikroskop beurteilt werden.

Arbeitsschritt	Chemikalie	Verweildauer
1	Xylol	3 min
2	Xylol	3 min
3	Xylol	3 min
4	Alkohol abs.	3 min
5	Alkohol abs	3 min
6	Alkohol 96%	3 min
7	Alkohol 96%	3 min
8	Alkohol 70%	3 min
9	Alkohol 70%	3 min
10	destilliertes Wasser	3 min
11	Hämatoxylin	16 min
12	Leitungswasser	4 min
13	HCl-Alkohol	1 sec.
14	Leitungswasser	5 min
15	Bläuen-Reagenz	1 min
16	Leitungswasser	1 min
17	Eosin-Gemisch	3 sec.
18	destilliertes Wasser	15 sec.
19	Alkohol 70%	2 min
20	Alkohol 96%	2 min
21	Alkohol abs.	2 min
22	Alkohol abs.	2 min
23	Xylol	1 min
24	Xylol	2 min

Tabelle 13: Arbeitsschritte der automatischen HE-Färbung
abs.: absolut

2.4.5 Histologische Auswertung

Nach der histologischen Aufbereitung wurden unter dem Lichtmikroskop folgende Parameter am Rekonstrukt bestimmt:

- Dicke der Epidermis
- Dicke der Dermis
- Anzahl und Größe der Melanomzellnester

Die Schichtdicken der Epidermis und Dermis wurden wie folgt definiert:

- 1: Dünn, bei höchstens 4 Zellschichten
- 2: Mitteldick, bei 5-10 Zellschichten
- 3: Dick, ab 11 Zellschichten

Bildeten die Melanomzellen Aggregate in den Hautrekonstrukten, wurden diese in der vorliegenden Arbeit mit „Tumor“ bezeichnet. Die Tumoranzahl im Hautrekonstrukt sowie die jeweilige Tumorgroße wurden wie folgt bestimmt. Die Tumoranzahl wurde pro Gewebeschnitt (nach HE-Färbung) ausgezählt. Die Tumorgroße wurde folgendermaßen definiert:

- 1: „Kleiner Tumor“ bei 3-6 Zellen
- 2: „Mittelgroßer Tumor“ bei 7-15 Zellen
- 3: „Großer Tumor“ ab 16 Zellen

Aus diesen beiden Parametern wurde ein so genannter Tumorscore für jedes Rekonstrukt berechnet. Dieser Tumorscore wurde definiert als die Summe der gezählten und ausgemessenen Tumoren, wobei kleine einfach, mittelgroße zweifach und große Tumoren dreifach gewichtet wurden.

Beispiel: Pro Gewebeschnitt wurden X kleine, Y mittelgroße und Z große Tumoren gezählt. Daraus ergibt sich folgender Tumorscore = $(1 \times X) + (2 \times Y) + (3 \times Z)$.

Unterschiede der Tumoranzahl in den Hautrekonstrukten wurden als Differenz der jeweiligen Tumorscore angegeben. Dabei wurde die Tumorscoredifferenz als Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle definiert.

Des Weiteren wurden Auffälligkeiten wie das Vorhandensein von nekrotischen Zellen, bakterieller Kontamination, die Anordnung der Keratinozyten, Fibroblastenmenge der Dermis und Invasion der Melanomzellen in die Dermis dokumentiert. Die histologischen Schnitte wurden stets von derselben Person am selben Lichtmikroskop in fünfzig- (50x), hundert- (100x) und zweihundertfacher (200x) Vergrößerung beurteilt.

Die Ergebnisse der Experimente werden histologisch beschreibend dargestellt. Es sollten die Wertigkeit des Modells der Hautrekonstrukte und das Wachstumsverhalten der Melanomzellen nach UV-Bestrahlung beobachtet werden. Durch die unterschiedlichen Variablen des Versuchsaufbaus ergaben sich kleine Fallzahlen. Aus diesen Gründen war eine statistische Auswertung nicht möglich.

3. Ergebnisse

Es wurden vier Versuche mit unterschiedlichen Zelllinien, Bestrahlungsspektren und -dosen sowie Erntezeitpunkten im Rahmen von Vorversuchen durchgeführt. Sie diente zur Optimierung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Einflusses von UV-A- und UV-B-Bestrahlung auf das Wachstum von Melanomzellen in Hautrekonstrukten. Die Ergebnisse dieser Vorversuche werden unter den folgenden Gliederungspunkten 3.1-3.3 je nach

untersuchter Zielgröße dargestellt. Eine Tabelle der gesamten Untersuchungsparameter findet sich im Anhang (vgl. 6.). Im Anschluss folgen unter Gliederungspunkt 3.4 und 3.5 die Ergebnisse der Versuche zum Einfluss von UV-A- und UV-B-Bestrahlung auf das Wachstum von Melanomzellen in Hautrekonstrukten. Sämtliche Experimente wurden nach folgendem Versuchsaufbau (vgl. Abb. 4) durchgeführt:

Versuchsaufbau

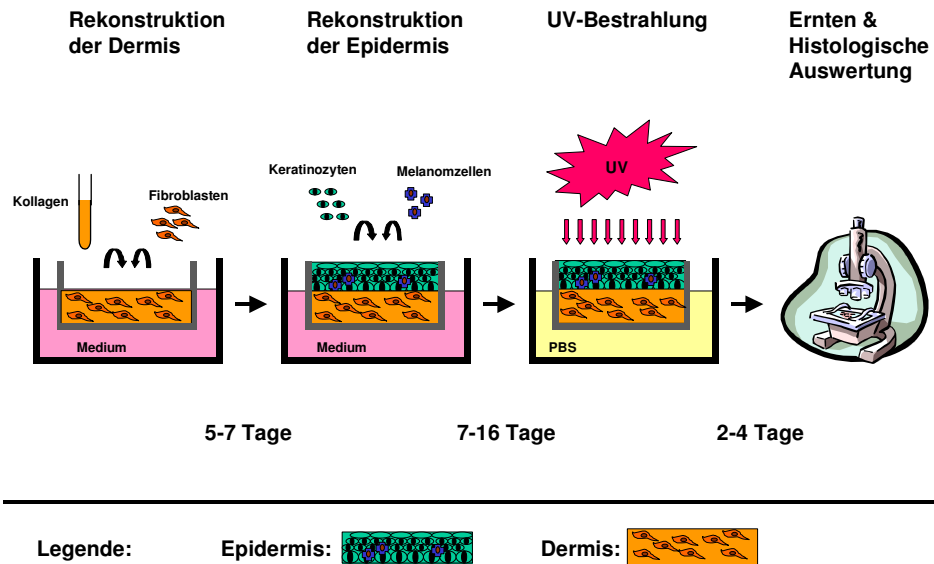


Abbildung 4: Versuchsaufbau

3.1 Vorversuche zur Festlegung des optimalen Erntezeitpunktes der Hautrekonstrukte

3.1.1 Fragestellung

Die Keratinozyten differenzieren zunächst im Verlauf der Kultivierung aus und bilden die für die Epidermis charakteristischen Zelllagen. Die Lebensdauer der Keratinozyten und Fibroblasten ist auf etwa vier Wochen beschränkt. Die Melanomzellen hingegen bilden anfänglich Tumoren, die im Verlauf an Größe zunehmen und bei fortschreitender Kultivierung die Epidermis und Dermis überwuchern. Folglich muss ein optimaler Erntezeitpunkt gefunden werden, an dem einerseits die Epidermis und Dermis voll ausgebildet und vital sind und andererseits sich deutlich sichtbare Melanomzellnester gebildet haben. Ziel dieser Vorversuche war es deshalb, den optimalen Erntezeitpunkt der Hautrekonstrukte zu bestimmen.

3.1.2 Versuchsaufbau

Die Hautrekonstrukte wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich von 7. bis 20. Tag nach der Aussaat der Keratinozyten und Melanomzellen, geerntet.

3.1.3 Ergebnisse

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Dicke und organotypische Ausdifferenzierung der Epidermis und die Dermisdicke mit zunehmender Kultivierungsdauer bis zum 15. Tag zunahm. Dies blieb bis zum 20. Tag erhalten, dann wurden die Zellen nekrotisch. Gleichzeitig nahm die Anzahl und Größe der Melanomzellnester mit zunehmender Kultivierungsdauer zu (vgl. Tab. 14 und Abb. 5).

Erntezeitpunkt	Tumorscore	Dermis	Epidermis
9. Tag	13	2	2
15. Tag	20	0,5	1,5

Tabelle 14: Tumorscore und Dicke der Epidermis und Dermis in Abhängigkeit vom Erntezeitpunkt, verwendet wurden Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase

Erntezeitpunkt: Anzahl der Kultivierungstage nach Aussaat der Keratinozyten/Melanomzellen
Epidermis/Dermis: Dicke der Epidermis und Dermis der Hautrekonstrukte (0: Nicht vorhanden, 1: ≤ 4 Zelllagen, 2: 5-10 Zelllagen, 3: ≥ 11 Zelllagen)
Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal Tumorgroße (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: Mittlgrößer Tumor 7- 15 Zellen, 3: Großer Tumor ≥ 16 Zellen)

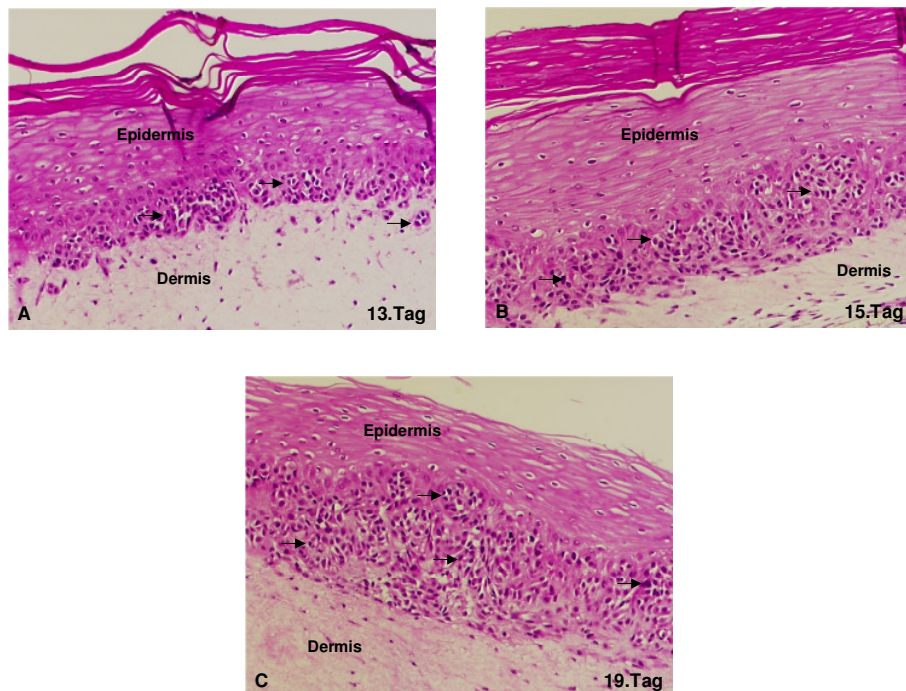


Abbildung 5: Repräsentative histologische Schnitte der Versuche mit metastasierenden Melanomzellen zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten, 13. Tag (A), 15. Tag (B), 19. Tag (C): Die Tumoranzahl nimmt mit der Kultivierungsdauer zu. HE, 100x, Melanomzellen (Pfeil)

3.1.4 Fazit

Es erfolgte keine Kultivierung über 20 Tage hinaus. Es zeigte sich, dass in den Versuchen zum UV-A- und UV-B-Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Melanomzellen in Hautrekonstrukten die Tumorauswertung nach 9-20 Tagen erfolgen sollte.

Jedes bestrahlte Rekonstrukt wird mit einem unbestrahlten Rekonstrukt, das in Zellenmischungsverhältnis und Erntezeitpunkt vollständig übereinstimmt, verglichen. Da lediglich die Differenz der Tumorscores und keine Absolutzahlen untersucht werden, wird im Folgenden auf die Angabe der Erntezeitpunkte der Einfachheit halber verzichtet.

3.2 Vorversuche zur Festlegung des optimalen UV-A-Bestrahlungsmodus

3.2.1 Fragestellung

Die Vorversuche mit UV-A-Bestrahlung entsprechen Dosisfindungsstudien. Es sollte die Frage geklärt werden: Unter welcher UV-A-Bestrahlung soll der UV-A-Einfluss auf das Melanomzellwachstum in Hautrekonstrukten untersucht werden? Der Versuchsaufbau im Hinblick auf Bestrahlungsdosis sowie Bestrahlungshäufigkeit sollte in Abhängigkeit der Ergebnisse dieser Vorversuche für den Bestrahlungsversuch mit UV-A-Strahlung festgelegt werden. Es musste ein optimaler Bestrahlungsmodus gefunden werden, der zum einen zu einer geringen Toxizität der Epidermis und Dermis führt, zum anderen deutliche Veränderungen des Melanomzellwachstums zeigt.

3.2.2 Versuchsaufbau

In den Vorversuchen wurden die Anzahl der Melanomzellnester unter UV-A-Bestrahlung mit der in den unbestrahlten Kontrollen verglichen. Die Dicke der Epidermis und Dermis in Abhängigkeit vom UV-A-Bestrahlungsmodus wurde untersucht.

Da die minimale Erythemdosis (MED) bei hellen Hauttypen bei 15 J/cm^2 [1] liegt, wurden UV-A-Bestrahlungsdosen von $10\text{-}20 \text{ J/cm}^2$ untersucht. Um einen möglichen, kumulativen UV-A-Einfluss aufzudecken, erfolgten mindestens eine und höchstens vier Einzelbestrahlungen im Abstand von jeweils zwei Tagen. Das Maximum von vier Einzelbestrahlungen ergab sich aus der Beobachtung, dass die Hautrekonstrukte nur für circa 21 Tage vital in Kultur zu halten waren.

Es wurden Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase (RGP) in die Hautrekonstrukte eingebettet und im Abstand von jeweils zwei Tagen mit UV-A-Strahlung bestrahlt.

3.2.3 Ergebnisse

Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zeigten sechs der acht Bestrahlungsgruppen mehr Tumoren und zwei Bestrahlungsgruppen weniger Tumoren. Bei mehrfacher UV-A-Bestrahlung war die Differenz zur Kontrollgruppe ohne Bestrahlung größer als bei einfacher UV-A-Bestrahlung (vgl. Abb. 6,9 und Tab. 15).

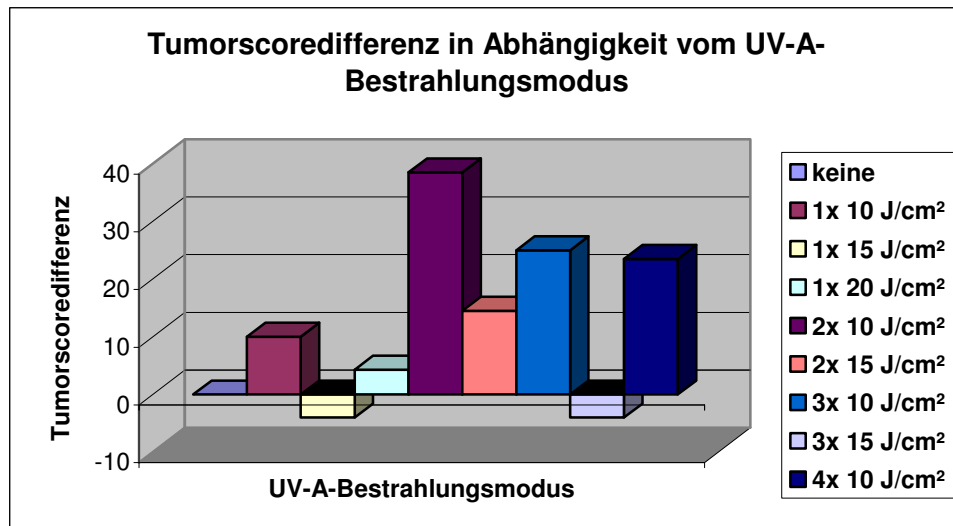


Abbildung 6: Tumorscore in UV-A bestrahlten Rekonstrukten im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Es wurden unterschiedliche UV-A-Dosen (10-20 J/cm²) und UV-A-Bestrahlungshäufigkeiten (1x bis 4x) untersucht.

Tumorscoredifferenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle (Durchschnittswerte)

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal Tumorgroße (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: Mittelgroßer Tumor 7- 15 Zellen, 3: Großer Tumor ≥ 16 Zellen)

Die Dicke der Epidermis und der Dermis nahm unter UV-A-Bestrahlung ab. Insbesondere nach dreifacher UV-A- Applikation war die Dermis dünnere als die unbestrahlte Kontrolle (vgl. Abb. 7,8 Und Tab. 15).

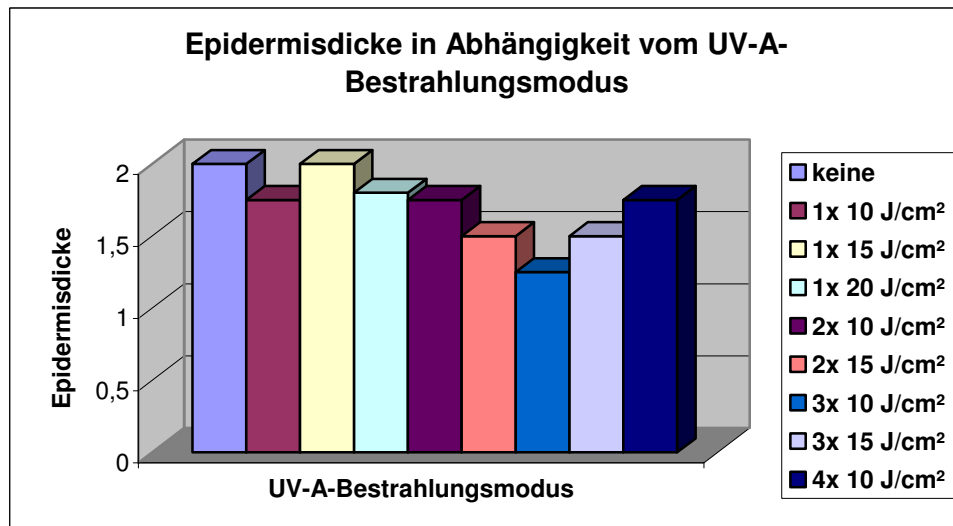


Abbildung 7: Unterschiede in der Epidermisdicke in Abhängigkeit von der UV-A-Bestrahlungsdosis und -häufigkeit
 Epidermisdicke: 0: Nicht vorhanden, 1: ≤ 4 Zelllagen, 2: 5-10 Zelllagen, 3: ≥ 11 Zelllagen

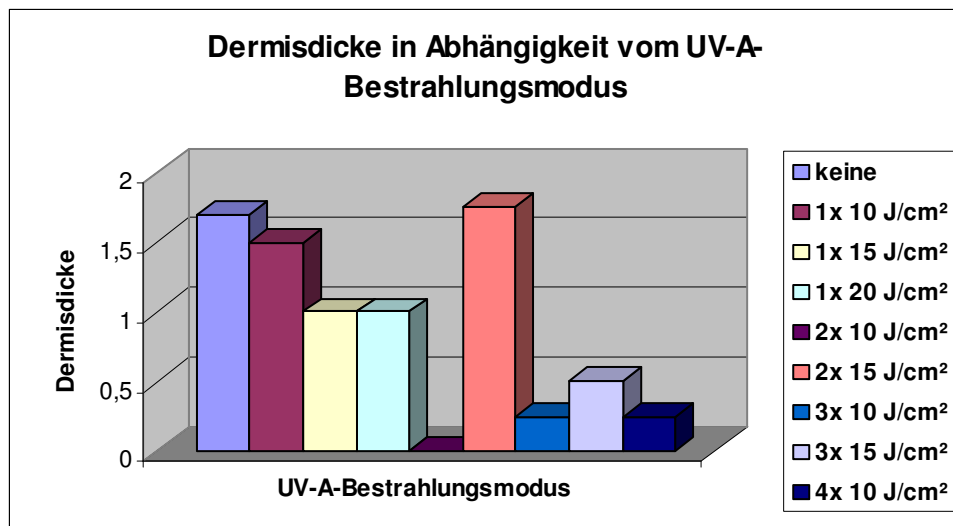


Abbildung 8: Unterschiede in der Dermsdicke in Abhängigkeit von der UV-A-Bestrahlungsdosis und -häufigkeit
 Dermsdicke: 0: Nicht vorhanden, 1: ≤ 4 Zellschichten, 2: 5-10 Zellschichten, 3: ≥ 11 Zellschichten

Tabelle 15 gibt die Ergebnisse der Vorversuche mit UV-A-Bestrahlung wieder:

UV-A-Bestrahlung	Tumorscore	Tumorscore-differenz	Epi-dermis	Derms
keine	0	-	3	3
keine	33	-	2	1
keine	37	-	1	0,5
keine	6	-	2	2
keine	0	-	2	2
Durchschnittswert: keine		-	2	1,7
1x 10 J/cm ²	18	12	2	1
1x 10 J/cm ²	8	8	1,5	2
Durchschnittswert: 1x 10 J/cm²		10	1,75	1,5
1x 15 J/cm ²	0	0	3	2
1x 15 J/cm ²	27	-6	2	0,5
1x 15 J/cm ²	31	-6	1	0,5
Durchschnittswert: 1x 15 J/cm²		-4	2	1
1x 20 J/cm ²	8	8	2,5	2
1x 20 J/cm ²	38	5	2	0,5
1x 20 J/cm ²	37	0	1	0,5
Durchschnittswert: 1x 20 J/cm²		4,3	1,8	1
2x 10 J/cm ²	37	31	1,5	0
2x 10 J/cm ²	46	46	2	0
Durchschnittswert: 2x 10 J/cm²		38,5	1,75	0
2x 15 J/cm ²	48	15	1	3

UV-A-Bestrahlung	Tumorscore	Tumorscore-differenz	Epi-dermis	Dermis
2x 15 J/cm ²	51	14	2	0,5
Durchschnittswert: 2x 15 J/cm²		14,5	1,5	1,75
3x 10 J/cm ²	37	31	1	0
3x 10 J/cm ²	19	19	1,5	0,5
Durchschnittswert: 3x 10 J/cm²		25	1,25	0,25
3x 15 J/cm ²	13	-20	2	0,5
3x 15 J/cm ²	49	12	1	0,5
Durchschnittswert: 3x 15 J/cm²		-4	1,5	0,5
4x 10 J/cm ²	29	29	1,5	0
4x 10 J/cm ²	18	18	2	0,5
Durchschnittswert: 4x 10 J/cm²		23,5	1,75	0,25

Tabelle 15: Tumorscore sowie Dicke der Epidermis und Dermis in Abhängigkeit von unterschiedlicher UV-A-Bestrahlung

Epidermis/Dermis: Dicke der Epidermis und Dermis der Hautrekonstrukte (0: Nicht vorhanden, 1: ≤ 4 Zelllagen, 2: 5-10 Zelllagen, 3: ≥ 11 Zelllagen)

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal Tumorgroße (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: Mittelgroßer Tumor 7- 15 Zellen, 3: Großer Tumor ≥ 16 Zellen)

Tumorscore-differenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle

UV-A-Bestrahlung: Anzahl und Dosis der Einzelbestrahlungen

Durchschnittswerte: Durchschnittswerte der jeweiligen Rekonstrukte mit gleichem Bestrahlungsmodus

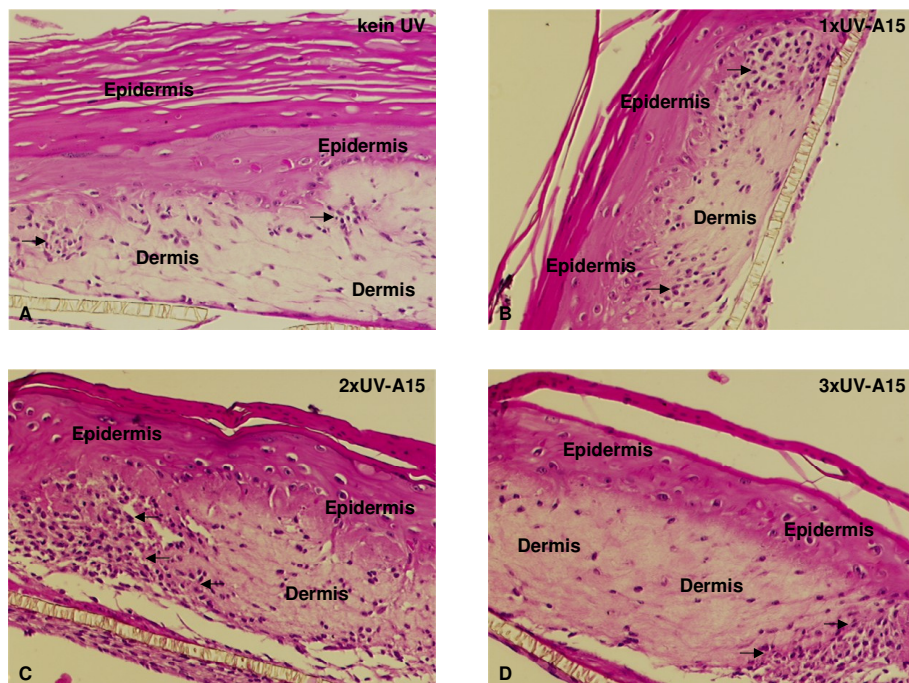


Abbildung 9: Repräsentative histologische Schnitte der Vorversuche UV-A mit Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase: Unterschiede in Abhängigkeit von der Bestrahlungshäufigkeit

HE, 100x, Melanomzellen (Pfeil)

A: unbestrahltes Rekonstrukt als Kontrolle

B: einmal mit 15 J/cm² UV-A bestrahltes Rekonstrukt: kleinere Tumoranzahl als die unbestrahlte Kontrolle

C: zweimal mit 15 J/cm² UV-A bestrahltes Rekonstrukt: höhere Tumoranzahl als die unbestrahlte Kontrolle

D: dreimal mit 15 J/cm² UV-A bestrahltes Rekonstrukt: höhere Tumoranzahl als die unbestrahlte Kontrolle

3.2.4 Fazit

UV-A- Bestrahlung beeinflusste das Wachstum der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten. Da sich die größten Differenzen der Tumoranzahl unter mehrfacher UV-A- Bestrahlung ergaben, sollte der UV-A-Einfluss auf das Melanomzellwachstum im Folgenden nach kumulativer UV-A-Bestrahlung untersucht werden.

Um ein möglichst naturgetreues Modell zu haben, ist eine ausreichende Dicke der Epidermis und Dermis notwendig. Unter zweifacher UV-A-Bestrahlung mit 15 J/cm^2 waren Epidermis- und Dermisdicke im Vergleich zu den anderen Bestrahlungsgruppen mit mehrfacher UV-A-Bestrahlung insgesamt am größten und ermöglichten auf diese Weise die beste Beurteilbarkeit der Rekonstrukte.

Im Folgenden soll deshalb der Einfluss von UV-A-Bestrahlung auf Melanomzellen in Hautrekonstrukten unter zweifacher UV-A-Bestrahlung mit 15 J/cm^2 untersucht werden.

3.3 Vorversuche zur Festlegung des optimalen UV-B-Bestrahlungsmodus

3.3.1 Fragestellung

Die Vorversuche mit UV-B-Bestrahlung entsprechen Dosisfindungsstudien. Es sollte die Frage geklärt werden: Unter welcher UV-B-Bestrahlung soll der UV-B-Einfluss auf das Melanomzellwachstum in Hautrekonstrukten untersucht werden? Der Versuchsaufbau im Hinblick auf Bestrahlungsdosis sowie Bestrahlungshäufigkeit sollte in Abhängigkeit der Ergebnisse dieser Vorversuche für den Bestrahlungsversuch mit UV-B-Strahlung festgelegt werden. Es musste ein optimaler Bestrahlungsmodus gefunden werden, der zum einen zu einer geringen Toxizität der Epidermis und Dermis führt, zum anderen deutliche Veränderungen des Melanomzellwachstums zeigt.

3.3.2 Versuchsaufbau

In den Vorversuchen wurden die Anzahl der Melanomzellnester unter UV-B-Bestrahlung mit der unbestrahlten Kontrolle verglichen. Die Dicke der Epidermis und Dermis (vgl. 2.4.5) in Abhängigkeit vom UV-B-Bestrahlungsmodus wurde untersucht.

Da die minimale Erythemdosis (MED) bei hellen Hauttypen bei $50\text{-}75 \text{ mJ/cm}^2$ [1] liegt, wurden UV-B-Bestrahlungsdosen von $50\text{-}100 \text{ mJ/cm}^2$ untersucht. Um einen möglichen, kumulativen UV-B-Einfluss aufzudecken, erfolgten mindestens eine und höchstens drei Einzelbestrahlungen im Abstand von jeweils zwei Tagen. Das Maximum von drei Bestrahlungen ergab sich zum einen aus der Tatsache, dass die Hautrekonstrukte nur für circa 21 Tage vital in Kultur zu halten waren. Zum anderen sollte die stärkere biologische Wirkung von UV-B- im Gegensatz zu UV-A-Strahlung berücksichtigt werden.

Es wurden Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase (RGP) sowie Melanomzelllinien der metastatischen Wachstumsphase (Met) in die Hautrekonstrukte eingebettet und im Abstand von jeweils zwei Tagen mit UV-B-Strahlung bestrahlt.

3.3.3 Ergebnisse

Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zeigten alle acht UV-B-Bestrahlungsgruppen weniger Tumoren (vgl. Tab. 16 und Abb. 10,12).

Bei UV-B-Bestrahlungen mit Einzeldosen von 60 mJ/cm^2 zeigten sich keine Tumoren in den Hautrekonstrukten. Die Beobachtung, dass die Melanomzellen in den Hautrekonstrukten der Experimente mit 60 mJ/cm^2 UV-B-Bestrahlung nicht gewachsen sind, muss als nicht erklärbares Artefakt betrachtet werden.

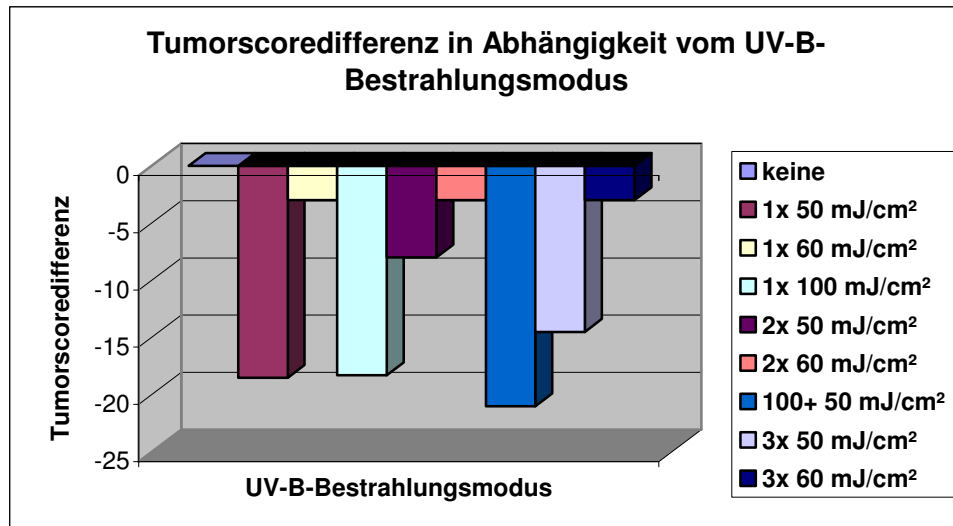
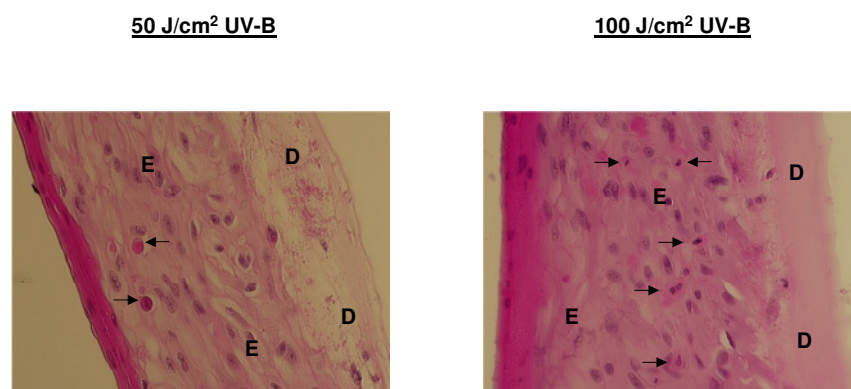


Abbildung 10: Tumorscore in UV-B bestrahlten Rekonstrukten im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Es wurden unterschiedliche UV-B-Dosen ($50\text{-}100 \text{ mJ/cm}^2$) und UV-A-Bestrahlungshäufigkeiten (1x bis 3x) untersucht.

Tumorscoredifferenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle (Durchschnittswerte)

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal Tumorgroße (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: Mittegroßer Tumor 7- 15 Zellen, 3: Großer Tumor ≥ 16 Zellen)

Die Dicke der Epidermis nahm unter UV-B-Bestrahlung ab. Während die durchschnittliche Epidermisdicke ohne Bestrahlung bei 2 lag, war sie unter UV-B-Bestrahlung 1,23. Bei Einzelbestrahlungen mit 100 mJ/cm^2 zeigten sich zahlreiche Sonnenbrandzellen (vgl. 1.2.2) als Zeichen einer toxischen Schädigung der Keratinozyten (vgl. Abb. 11).



Legende: HE, 200x, Sonnenbrandzellen (SBZ) →
E: Epidermis
D: Dermis

Abbildung 11: Zunahme der Sonnenbrandzellen mit erhöhter UV-B-Bestrahlungsdosis

Die Dermisdicke blieb durch die UV-B-Bestrahlung im Durchschnitt nahezu unbeeinflusst. Während die durchschnittliche Dermisdicke ohne Bestrahlung bei 1,26 lag, war sie unter UV-B-Bestrahlung 1,35. Tabelle 16 gibt die Ergebnisse dieser Vorversuche wieder:

UV-B-Bestrahlung	Tumor-score	Tumorscore-differenz	Epi-dermis	Dermis
keine	30	-	2,5	2
keine	33	-	2	2
keine	32	-	1,5	0,5
keine	0	-	3	3
keine	33	-	2	1
keine	37	-	1	0,5
keine	6	-	2	2
keine	0	-	2	2
Durchschnittswert: keine		-	2	1,26
1x 50 mJ/cm ²	0	0	3	1,5
1x 50 mJ/cm ²	8	-25	1	2
1x 50 mJ/cm ²	7	-30	2	2
Durchschnittswert: 1x 50 mJ/cm²		-18,3	2	1,8
1x 60 mJ/cm ²	0	-6	1,5	1
1x 60 mJ/cm ²	0	0	1	1
Durchschnittswert: 1x 60 mJ/cm²		-3	1,25	1
1x 100 mJ/cm ²	4	-26	1,5	3
1x 100 mJ/cm ²	15	-18	2	1,5
1x 100 mJ/cm ²	12	-11	1	3
Durchschnittswert: 1x 100 mJ/cm²		-18,3	1,5	2,5
2x 50 mJ/cm ²	3	3	2	2
2x 50 mJ/cm ²	18	-19	1	1
Durchschnittswert: 2x 50 mJ/cm²		-8	1,5	1,5
2x 60 mJ/cm ²	0	-6	1	0,5
2x 60 mJ/cm ²	0	0	0	1
Durchschnittswert: 2x 60 mJ/cm²		-3	0,5	0,75
100 + 50 mJ/cm ²	7	-23	1,5	1,5
100 + 50 mJ/cm ²	1	-32	1	1
100 + 50 mJ/cm ²	24	-8	1,5	2
Durchschnittswert: 100 + 50 mJ/cm²		-21	1,3	1,5

UV-B-Bestrahlung	Tumorscore	Tumorscore-differenz	Epidermis	Dermis
3x 50 mJ/cm ²	20	-13	2	1
3x 50 mJ/cm ²	21	-16	1	1
Durchschnittswert: 3x 50 mJ/cm²		-14,5	1,5	1
3x 60 mJ/cm ²	0	-6	0	1
3x 60 mJ/cm ²	0	0	0,5	0,5
Durchschnittswert: 3x 60 mJ/cm²		-3	0,25	0,75

Tabelle 16: Tumorscore sowie Dicke der Epidermis und Dermis in Abhängigkeit von unterschiedlicher UV-B-Bestrahlung

Epidermis/Dermis: Dicke der Epidermis und Dermis der Hautrekonstrukte (0: Nicht vorhanden, 1: ≤ 4 Zellschichten, 2: 5-10 Zellschichten, 3: ≥ 11 Zellschichten)

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal Tumorgroße (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: Mittlgrößer Tumor 7- 15 Zellen, 3: Großer Tumor ≥ 16 Zellen)

Tumorscore-differenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle

UV-B-Bestrahlung: Anzahl und Dosis der Einzelbestrahlungen

Durchschnittswerte: Durchschnittswerte der jeweiligen Rekonstrukte mit gleichem Bestrahlungsmodus

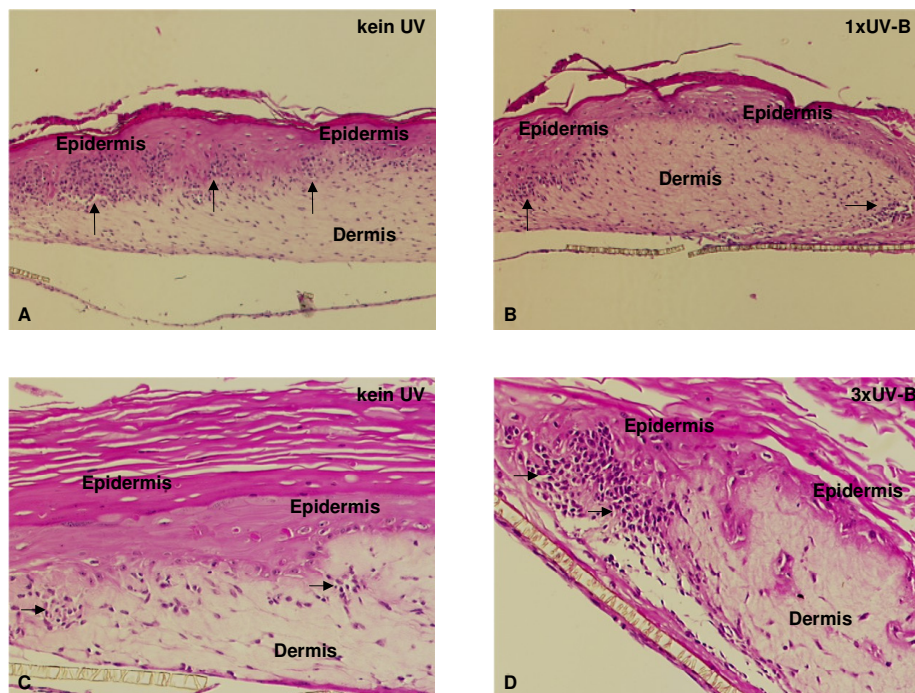


Abbildung 12: Repräsentative histologische Schnitte der Vorversuche UV-B mit Melanomzellen der metastatischen Melanomzellen (A, B) und horizontalen Wachstumsphase (C, D)

HE, A und B 50x, C und D 100x, Melanomzellen (Pfeil)

A: unbestrahltes Rekonstrukt als Kontrolle

B: einmal mit 100 mJ/cm² UV-B bestrahltes Rekonstrukt: kleinere Tumoranzahl als die unbestrahlte Kontrolle (A)

C: unbestrahltes Rekonstrukt als Kontrolle

D: dreimal mit 50 mJ/cm² UV-B bestrahltes Rekonstrukt: kleinere Tumoranzahl als die unbestrahlte Kontrolle (C), jedoch größerer Tumor

3.3.4 Fazit

UV-B-Bestrahlung beeinflusste das Wachstum der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten. In den UV-B-Bestrahlungsgruppen zeigten sich weniger Tumoren als in der unbestrahlten Kontrolle. Unter UV-B-Bestrahlung mit 60 mJ/cm^2 fanden sich keine Tumoren, deshalb soll diese UV-B-Dosis im Verlauf nicht weiter untersucht werden. Das fehlende Wachstum der Melanomzellen muss als unerklärbares Artefakt gewertet werden.

Da sich unter Bestrahlung mit 100 mJ/cm^2 UV-B multiple Sonnenbrandzellen (SBZ) (vgl. 1.2.2) fanden, muss diese UV-B-Dosis als zu toxisch für die Keratinozyten der Epidermis angesehen werden. Vergleicht man die UV-B-Bestrahlungsgruppen mit Einzeldosen von 50 mJ/cm^2 , so ergibt sich die größte Tumordifferenz und größte Epidermis- sowie Dermisdicke bei einfacher Bestrahlung.

Im Folgenden soll deshalb der UV-B-Einfluss auf das Melanomzellwachstum in Hautrekonstrukten unter einfacher UV-B-Bestrahlung mit 50 mJ/cm^2 untersucht werden.

3.4 Versuch UV-A: Einfluss von UV-A-Bestrahlung auf Melanomzellen in Hautrekonstrukten

3.4.1. Fragestellung

In den folgenden Experimenten sollten folgende Frage geklärt werden: Beeinflusst UV-A-Bestrahlung das Melanomzellwachstum in Hautrekonstrukten? Ergeben sich dabei Unterschiede in Abhängigkeit von den Progressionsstadien der verwendeten Melanomzellen?

3.4.2 Versuchsaufbau

Wie im Rahmen von Vorversuchen (vgl. 3.2.4) optimiert, sollte der Einfluss von UV-A-Bestrahlung auf Melanomzellen in Hautrekonstrukten unter Einsatz zweifacher UV-A-Bestrahlung mit je 15 J/cm^2 untersucht werden. Dazu wurden insgesamt 36 Rekonstrukte mit Melanomzellen aus den drei unterschiedlichen Progressionsstadien gemäß deren optimalen Mischungsverhältnisses (vgl. 2.2.3) angelegt. Davon wurden 18 Rekonstrukte mit zweifacher UV-A-Bestrahlung mit je 15 J/cm^2 bestrahlt. Die übrigen 18 Rekonstrukte dienten als Kontrollgruppe. Die Anzahl der Melanomzellnester in den bestrahlten Rekonstrukten wurden mit der jeweiligen, unbestrahlten Kontrolle verglichen.

3.4.3 Ergebnisse

Im Durchschnitt förderte UV-A-Bestrahlung das Melanomzellwachstum in Hautrekonstrukten. Es ergaben sich durchschnittlich drei Tumoren mehr in den bestrahlten Rekonstrukten im Vergleich zu ihrer unbestrahlten Kontrolle (vgl. Tab. 17, Abb. 13).

Dabei gab es allerdings erhebliche Unterschiede in Abhängigkeit von den Melanomprogressionsstadien. Die Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase (RGP) wurden in ihrem Wachstum nach Bestrahlung stark gefördert, durchschnittlich fand sich eine Tumorscoredifferenz von 13,1. Die Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase wurden durch UV-A-Bestrahlung leicht gehemmt mit durchschnittlich $-0,8$ Tumoren weniger unter Bestrahlung als ohne Bestrahlung. Die metastatischen Melanomzellen wurden durch UV-A-Bestrahlung in ihrem Wachstum deutlich gehemmt. Es fanden sich durchschnittlich 10,3

Tumoren weniger in den bestrahlten Rekonstrukten im Vergleich zu den unbestrahlten Rekonstrukten (vgl. Tab. 17, Abb. 13,14).

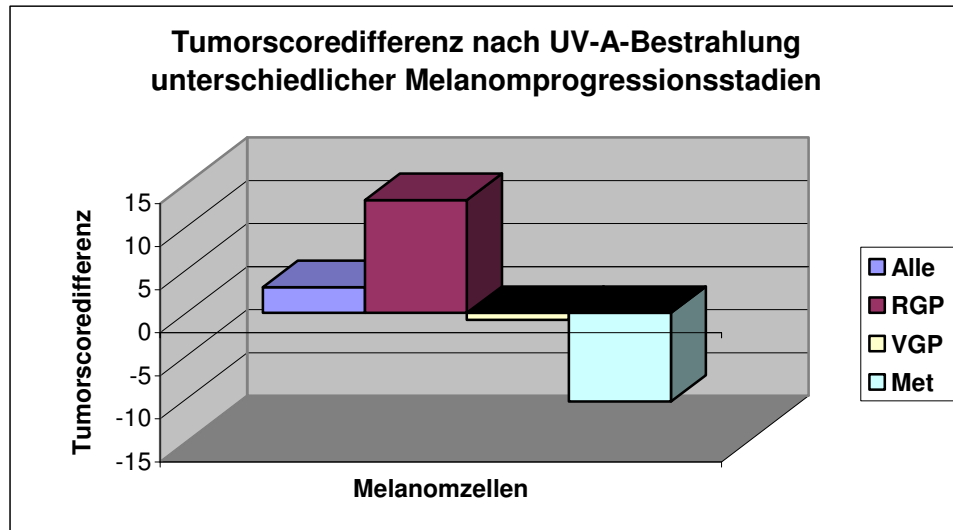


Abbildung 13: Tumorscore in UV-A bestrahlten Rekonstrukten unterschiedlicher Melanomprogressionsstadien im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Tumorscoredifferenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle (Durchschnittswerte)

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal TumorgroÙe (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: MittelhoÙer Tumor 7- 15 Zellen, 3: GroÙer Tumor ≥ 16 Zellen)

Alle: Durchschnittswert aller drei Wachstumsphasen, RGP: Melanomzelllinie der horizontalen Wachstumsphase VGP: Melanomzelllinie der vertikalen Wachstumsphase, Met: metastasierende Melanomzelllinie

Tabelle 17 gibt die Ergebnisse des Versuchs UV-A wieder.

Melanomzellen	UV-A-Bestrahlung	Tumorscore	Tumorscore-differenz
Met	keine	36	-
Met	keine	48	-
Met	keine	79	-
	Durchschnittswert Met	54,3	-
RGP	keine	4	-
RGP	keine	12	-
RGP	keine	0	-
RGP	keine	5	-
RGP	keine	3	-
RGP	keine	0	-
RGP	keine	33	-
RGP	keine	37	-
	Durchschnittswert RGP	11,8	-

Melanomzellen	UV-A-Bestrahlung	Tumorscore	Tumorscore-differenz
VGP	keine	0	-
VGP	keine	13	-
VGP	keine	8	-
VGP	keine	11	-
VGP	keine	0	-
VGP	keine	0	-
	Durchschnittswert VGP	5,3	-
	Durchschnittswert keine Bestrahlung	17	-
Met	2x 15 J/cm ²	42	6
Met	2x 15 J/cm ²	43	-5
Met	2x 15 J/cm ²	47	-32
	Durchschnittswert Met	44	-10,3
RGP	2x 15 J/cm ²	4	0
RGP	2x 15 J/cm ²	0	-12
RGP	2x 15 J/cm ²	0	0
RGP	2x 15 J/cm ²	41	36
RGP	2x 15 J/cm ²	42	39
RGP	2x 15 J/cm ²	48	15
RGP	2x 15 J/cm ²	51	14
	Durchschnittswert RGP	26,6	13,1
VGP	2x 15 J/cm ²	0	-6,5
VGP	2x 15 J/cm ²	0	-6,5
VGP	2x 15 J/cm ²	28	18,5
VGP	2x 15 J/cm ²	3	-6,5
VGP	2x 15 J/cm ²	0	-6,5
VGP	2x 15 J/cm ²	0	0
VGP	2x 15 J/cm ²	1	1
VGP	2x 15 J/cm ²	0	0
	Durchschnittswert VGP	4	-0,8
	Durchschnittswert UV-A	19,4	3

Tabelle 17: Tumorscore und -differenz unterschiedlicher Melanomprogressionsstadien in Abhängigkeit von der UV-A-Bestrahlung

RGP: Melanomzelllinie der horizontalen Wachstumsphase, VGP: Melanomzelllinie der vertikalen Wachstumsphase, Met: metastasierende Melanomzelllinie

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal Tumorgroße (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: Mittlgrößer Tumor 7- 15 Zellen, 3: Großer Tumor ≥ 16 Zellen)

Tumorscore-differenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle UV-A-Bestrahlung: Anzahl und Dosis der Einzelbestrahlungen

Durchschnittswerte: Durchschnittswerte der jeweiligen Rekonstrukte mit gleichem Bestrahlungsmodus

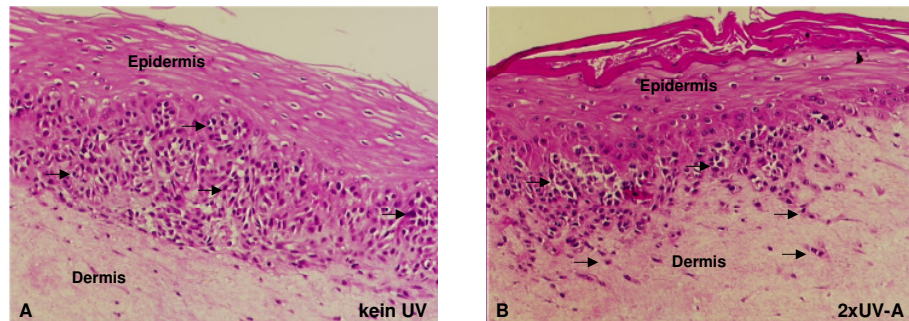


Abbildung 14: Repräsentative histologische Schnitte der metastatischen Melanomzelllinie ohne (A) und mit UV-A-Bestrahlung (B): kleinere Tumoranzahl aber stärkere Invasion der Melanomzellen in die Dermis unter Bestrahlung. HE, 100x, Melanomzellen (Pfeil)

3.4.4 Fazit

Im Durchschnitt förderte UV-A-Bestrahlung das Wachstum der Melanomzellen in Hautrekonstrukten. Besonders Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase bilden deutlich mehr Tumoren unter UV-A-Bestrahlung als ohne Bestrahlung. Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase wurden durch die UV-A-Applikation im Wachstum leicht gehemmt. Metastasierende Melanomzellen hingegen zeigten deutlich weniger Tumoren nach UV-A-Applikation als ohne Bestrahlung.

3.5 Versuch UV-B: Einfluss von UV-B-Bestrahlung auf Melanomzellen in Hautrekonstrukten

3.5.1 Fragestellung

In den folgenden Experimenten sollten folgende Frage geklärt werden: Beeinflusst UV-B-Bestrahlung das Melanomzellwachstum in Hautrekonstrukten? Ergeben sich dabei Unterschiede in Abhängigkeit von den Progressionstadien der Melanomzellen?

3.5.2 Versuchsaufbau

Wie im Rahmen von Vorversuchen (vgl. 3.3.4) optimiert, sollte der Einfluss von UV-B-Bestrahlung auf Melanomzellen in Hautrekonstrukten unter einfacher UV-B-Bestrahlung mit 50 mJ/cm^2 untersucht werden. Dazu wurden insgesamt 22 Rekonstrukte mit Melanomzellen aus den drei unterschiedlichen Progressionsstadien gemäß deren optimalen Mischungsverhältnisses (vgl. 2.2.3) angelegt. Davon wurden 11 Rekonstrukte mit 50 mJ/cm^2 bestrahlt. Die übrigen 11 Rekonstrukte dienten als Kontrollgruppe. Die Anzahl der Melanomzellnester in den bestrahlten Rekonstrukten wurden mit der jeweiligen, unbestrahlten Kontrolle verglichen.

3.5.3 Ergebnisse

UV-B-Bestrahlung hemmte das Melanomzellwachstum in Hautrekonstrukten. Im Durchschnitt ergaben sich 12,6 Tumoren weniger in den bestrahlten Rekonstrukten als in den unbestrahlten Kontrollen. Dies zeigte sich in allen drei Melanomprogressionsstadien. Dabei war die Wachstumshemmung bei den Melanomzellen höherer Progressionsstadien ausgeprägter als bei den Melanomzelllinien früherer Progressionsstadien. Die Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase (RGP) bildeten durchschnittlich 7,7 Tumoren weniger nach UV-B-Bestrahlung als ohne Bestrahlung. Die Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase bildeten 12,6 Tumoren weniger unter Bestrahlung als ohne Bestrahlung. Die metastatischen Melanomzellen bildeten durchschnittlich 26,3 Tumoren weniger in den mit UV-B bestrahlten Rekonstrukten im Vergleich zu den unbestrahlten Rekonstrukten (vgl. Abb.15, 16, Tab. 18).

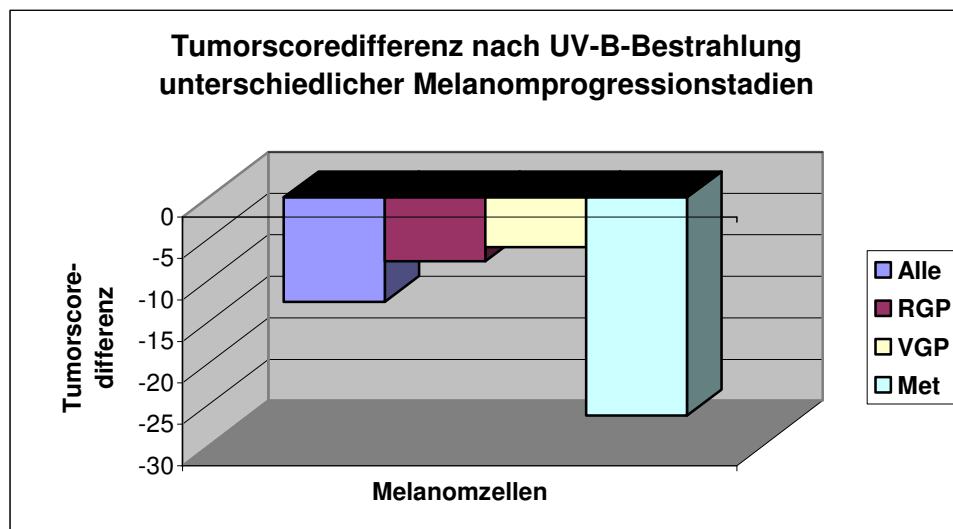


Abbildung 15: Tumorscore in UV-B bestrahlten Rekonstrukten unterschiedlicher Melanomprogressionsstadien im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Tumorscoredifferenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle (Durchschnittswerte)

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal TumorgroÙe (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: MittelgroÙer Tumor 7- 15 Zellen, 3: GroÙer Tumor \geq 16 Zellen)

Alle: Durchschnittswert aller drei Wachstumsphasen, RGP: Melanomzelllinie der horizontalen Wachstumsphase
VGP: Melanomzelllinie der vertikalen Wachstumsphase, Met: metastasierende Melanomzelllinie

Tabelle 18 gibt die Ergebnisse des Versuch UV-B wieder.

Melanomzellen	UV-B-Bestrahlung	Tumorscore	Tumorscore-differenz
Met	keine	36	-
Met	keine	48	-
Met	keine	79	-
	Durchschnittswert Met	54,3	-
RGP	keine	4	-
RGP	keine	3	-
RGP	keine	0	-
RGP	keine	33	-
RGP	keine	37	-
RGP	keine	0	-
RGP	keine	43	-
	Durchschnittswert RGP	17,1	-
VGP	keine	22	-
	Durchschnittswert keine Bestrahlung	27,7	-
Met	50 mJ/cm ² UV-B	35	-1
Met	50 mJ/cm ² UV-B	25	-23
Met	50 mJ/cm ² UV-B	24	-55
	Durchschnittswert Met	28	-26,3
RGP	50 mJ/cm ² UV-B	0	-4
RGP	50 mJ/cm ² UV-B	0	-3
RGP	50 mJ/cm ² UV-B	0	0
RGP	50 mJ/cm ² UV-B	8	-25
RGP	50 mJ/cm ² UV-B	7	-30
RGP	50 mJ/cm ² UV-B	20	20
RGP	50 mJ/cm ² UV-B	31	-12
	Durchschnittswert RGP	9,4	-7,7
VGP	50 mJ/cm ² UV-B	16	-6
	Durchschnittswert UV-B	15,1	-12,6

Tabelle 18: Tumorscore und -differenz unterschiedlicher Melanomprogressionsstadien in Abhängigkeit von der UV-B-Bestrahlung

RGP: Melanomzelllinie der horizontalen Wachstumsphase, VGP: Melanomzelllinie der vertikalen Wachstumsphase, Met: metastasierende Melanomzelllinie

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal Tumorgroße (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen, 2: Mittelgroßer Tumor 7- 15 Zellen, 3: Großer Tumor ≥ 16 Zellen)

Tumorscoredifferenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle

UV-B-Bestrahlung: Anzahl und Dosis der Einzelbestrahlungen

Durchschnittswerte: Durchschnittswerte der jeweiligen Rekonstrukte mit gleichem Bestrahlungsmodus

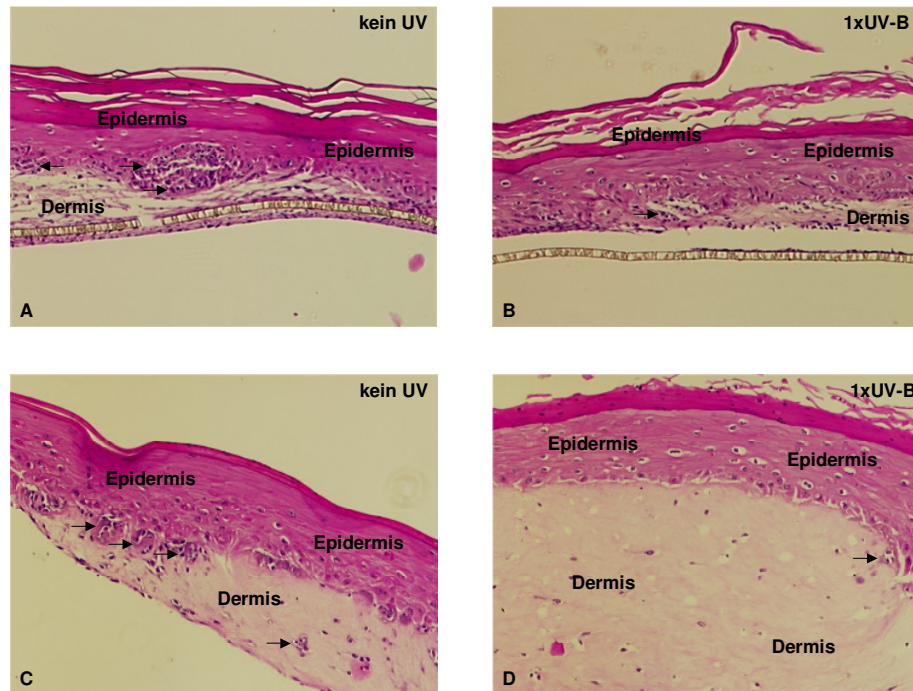


Abbildung 16: Repräsentative histologische Schnitte der Melanomzelllinie der horizontalen (A, B) und vertikalen (C, D) Wachstumsphase: kleinere Tumorzahl unter UV-B-Bestrahlung (B, D) als ohne Bestrahlung (A, C). HE, A und B 50x, C und D 100x, Melanomzellen (Pfeil)

3.5.4 Fazit

UV-B-Bestrahlung hemmte das Wachstum der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten. Dieser wachstumshemmende Effekt war bei Melanomzellen fortgeschrittener Progressionsstadien (Met) stärker ausgeprägt als bei Melanomzellen weniger fortgeschrittener Progressionsstadien (RGP).

4. Diskussion

4.1 UV-Wirkung auf Nävuszellnävi

Ultraviolette Strahlung ist ein bedeutendes Karzinogen bei der Transformation des Melanozyten zur Melanomzelle. Weitere UV-Einflüsse bei der Progression von Melanomzellen sind nicht beschrieben worden. Im Gegensatz dazu ist von einer Wirkung ultravioletter Strahlung auf die verwandten Nävuszellen berichtet worden.

Im Hautrekonstruktionsmodell zeigten sich nach UV-Exposition Veränderungen im Wachstum der Melanomzellen. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierzu sind unklar. Möglicherweise sind direkte Veränderungen der Melanomzellen oder ihres Stoffwechsels verantwortlich. Das An- oder Abschalten von Genen des Zellzyklus (p53, CDKN2A) oder des MAPK-Signaltransduktionsweges (RAS, B-RAF) könnten beteiligt sein. Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. Integrine oder von Wachstumsfaktoren (bFGF, TGF- β) wären denkbar.

In der Haut wird die Melaninsynthese der Melanozyten durch Sonnenlicht stimuliert. Eine Aktivierung der verwandten Melanomzellen durch Sonnenstrahlung wäre ebenso denkbar. Die Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase wurden in unseren Experimenten

möglicherweise durch UV-A-Strahlung zur Proliferation angeregt. Sie bildeten mehr Tumoren in den mit UV-A bestrahlten Rekonstrukten als in den unbestrahlten Rekonstrukten.

Bei Nävuszellen konnte bereits ein UV-Einfluss auf die Zellmorphologie und den Zellstoffwechsel beobachtet werden. Melanozytäre Nävuszellnävi (NZN) zeigen nach UV-Exposition dosisabhängig, reversible, morphologische Veränderungen. Histologisch ähneln diese einem Melanom in situ [59, 60, 61]. Eine Woche nach Bestrahlung mit zweifacher MED zeigten NZN eine höhere Anzahl von Melanozyten in suprabasalen Epidermisschichten und eine verstärkte Expression des Melanommarkers HMB-45 als ihre unbestrahlten Kontrollen. Morphologisch deuteten ein hypertropher Golgi-Apparat, vergrößertes Cytoplasma und Nucleoli sowie eine erhöhte Melanosomenanzahl auf eine gesteigerte metabolische Aktivität der bestrahlten Nävuszellen hin.

UV-Strahlung kann die adhäsiven Eigenschaften von Melanozyten direkt beeinflussen [59]. Bei Melanozyten in vitro induziert UV-Strahlung die Expression von fibronektinspezifischen Integrinen ($\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha \beta 3$ -Integrin). UV-Exposition verstärkt zudem die suprabasale Expression von $\beta 1$ -Integrinen auf Keratinozyten. Eine Proliferation der Nävuszellen eine Woche nach Bestrahlung fand sich nicht. Die geschilderten Veränderungen erwiesen sich innerhalb von drei Wochen als reversibel [60, 61]. Diese histologischen Veränderungen in NZN nach UV-Exposition sind nicht von Allelverlusten in Chromosomenregionen begleitet, die in dysplastischen NZN mutiert sind [62]. In den Augen der Autoren ist die mehrheitliche Reaktion der NZN auf UV-Exposition ohne permanente DNS-Veränderungen. Genetische Mutationen, die zur Transformation einiger weniger NZN führen, sind seltene Ereignisse [62]. Trotz der Reversibilität der morphologischen Veränderungen nach ultravioletter Stimulation ist die Frage der biologischen Relevanz nicht sicher geklärt. Eine mögliche Bedeutung bei der Initiation der Melanomkaskade wird diskutiert. Eine initiiierende UV-Wirkung ist bei der Karzinogenese vor allem für nävusassoziierte Melanome nicht auszuschließen [59].

4.2 UV-Strahlung bei der Entstehung des malignen Melanoms

Erhöhte Sonnenexposition wird allgemein als Hauptursache für die wachsende Melanominzidenz angesehen [49, 51]. Insbesondere Sonnenbrände in der Kindheit gelten als Risikofaktor bei der Melanomentwicklung. Sonnenbrände werden vorwiegend durch UV-B-Strahlung verursacht. Deshalb wird UV-B-Strahlung als ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des Melanoms angesehen [34]. In der Literatur mehren sich jedoch die Hinweise, dass auch die Wellenlängen im UV-A-Bereich an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt sein könnten. Derzeit stehen eindeutige Beweise dieser Hypothese noch aus. Außerdem sind teilweise widersprüchliche Daten veröffentlicht. Vor dem Hintergrund unserer eigenen Daten soll im folgenden Abschnitt die Bedeutung von UV-A-Strahlung versus UV-B-Strahlung bei der Entstehung des malignen Melanoms diskutiert werden.

4.2.1 UV-A bei der Entstehung des malignen Melanoms

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten im Durchschnitt einen fördernden Einfluss von UV-A auf das Wachstum von Melanomzellen in Hautrekonstrukten. Besonders Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase bilden deutlich mehr Tumoren unter UV-A-Bestrahlung als ohne Bestrahlung. Melanomzellen der vertikalen und metastasierenden Wachstumsphase wurden durch die UV-A-Applikation im Wachstum gehemmt. Es stellt sich die Frage, ob UV-A-Strahlung nicht nur in Hautrekonstrukten, sondern auch in vivo die Tumorprogression zu beeinflussen vermag.

4.2.1.1 Epidemiologische Daten

Moan et al. untersuchten das Verhältnis der Inzidenzraten für Basaliome, spinözelluläre Karzinome und maligne Melanome verschiedener Länder unterschiedlicher Breitengrade. Sie setzten diese in Relation zur jeweiligen UV-A- und UV-B-Belastung der Bevölkerung. Die Autoren folgerten aus den erhobenen Daten, dass UV-A-Strahlung ein melanominduzierendes Agens ist. Ihre hypothetische Erklärung sieht das Melanin in den Melanozyten als Photokarzinogen für die Melanominduktion. Während das Melanin in den Keratinozyten der oberflächlichen Epidermisschichten als Sonnenprotektor wirkt [50].

In einem Übersichtsartikel aktueller epidemiologischer Daten trugen Wang et al. weitere Hinweise auf ein erhöhtes Melanomrisiko nach UV-A-Exposition zusammen [34]. Einige Studien fanden eine positive Assoziation zwischen dem Gebrauch von Solarien, die vorwiegend UV-A Strahlen emittieren, und der Entwicklung eines malignen Melanoms. Andere Studien jedoch zeigten keine solche Korrelation [76]. Die Datenlage bezüglich eines erhöhten Melanomrisikos bei Patienten nach PUVA-Therapie ist nicht eindeutig. Bei der PUVA-Therapie wird durch Psoralen photosensibilisierte Haut zur Behandlung bestimmter Hauterkrankungen wie z.B. Psoriasis mit UV-A bestrahlt. Wenige Studien zeigten ein erhöhtes Risiko der Melanomentwicklung nach PUVA-Behandlung [73]. Zahlreiche andere Untersuchungen beobachteten dies nicht [74,75]. Der karzinogene PUVA-Effekt ist zudem wahrscheinlich nicht eine direkte UV-A-Folge, sondern die Folge einer mutagenen Psoralenwirkung nach UV-A-Applikation.

In sechs von dreizehn Studien zeigten Sonnencremebenutzer ein statistisch signifikant erhöhtes Melanomrisiko. Zur Erklärung sind zwei Hypothesen denkbar. Zum einen dürften Personen, die von Natur aus durch ihren hellen Hauttyp zu einer Melanomrisikogruppe zählen, häufiger Sonnencreme verwenden als Personen mit dunklerem Hauttyp. Zum anderen könnte das erhöhte Melanomrisiko in Zusammenhang mit einer durch die Sonnencreme verlängerten Dauer der Sonnenexposition stehen. Ältere Sonnenschutzmittel schirmen vorwiegend UV-B ab und lassen UV-A ungehindert passieren. Dadurch ist insbesondere die UV-A-Dosis der Sonnencremebenutzer erhöht. Geschützt vor dem UV-B induzierten Sonnenbrand sind sie in der Lage, sich insgesamt länger in der Sonne aufzuhalten [34].

4.2.1.2 Tiermodelle

In zwei Tiermodellen wurde ein UV-A-Einfluss bei der Entwicklung des Melanoms und seiner Vorläuferläsionen beobachtet. Ley zeigte, dass Melanomvorläuferläsionen im Opossum *Monodelphis domestica* nach wiederholter Exposition gegenüber Breitspektrum-UV-A ($2,5 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ dreimal wöchentlich) entstehen. Nach 81 Wochen entwickelten 22 % der Tiere melanozytäre Hyperplasien, welche als Melanomvorläufer angesehen werden [42]. Setlow et al. entwickelten ein Aktionsspektrum für die Melanominduktion in einem Fischmodell der Gattung *Xiphophorus*. Zahlreiche UV-A-Wellenlängen konnten nach einmaliger Applikation Melanome im Fischmodell induzieren. Die effektivste Wellenlänge lag mit 365 nm im sichtbaren Bereich. Falls das Aktivitätsspektrum für humane Melanome dem des Fisches ähneln sollte, wären annähernd 90 % des Melanom-induzierenden Sonnenlichteffekts dem UV-A-Bereich und dem sichtbaren Licht zuzuschreiben [43].

4.2.1.3 Zellkulturen

UV-A-Strahlung kann in humanen Zellen Mutationen induzieren. Kvam und Tyrrell beobachteten, dass UV-A und sichtbares Licht für den Großteil der oxidativen DNS-Schäden

in humanen Fibroblasten verantwortlich sind. Sie vermuteten, dass diese indirekten DNS-Schäden des Sonnenlichts mindestens genauso häufig wie direkte DNS-Schäden durch UV-B-Strahlen auftreten [44]. Marrot et al. induzierten DNS-Brüche in humanen Melanozytenkulturen mittels einer Breitspektrums-UV-A-Bestrahlung. Diese Beobachtungen legen einen karzinogenen UV-A-Effekt auf Melanozyten nahe [45]. In Fibroblasten des chinesischen Hamsters beobachteten Dahle und Kvam nach Bestrahlung mit UV-A, UV-B und Röntgenstrahlen Sofort- und Spätmutationen. Während die Sofortmutationen zahlreicher unter UV-B- und Röntgenbestrahlung waren, zeigten sich Spätmutationen vornehmlich nach UV-A-Applikation [54].

4.2.1.4 Mutagene und karzinogene UV-A-Effekte

Kreislernkrankungen schreiten über verschiedene Stadien von der Initiation über die Progression bis hin zur Metastasierung fort. Das maligne Melanom kann sich wahrscheinlich ähnlich dem Kolonkarzinom aus einer Serie aufeinanderfolgender Mutationen entwickeln [34,40]. Ausgangspunkt dieses mehrstufigen Tumorentstehungsmodells ist der gesunde Melanozyt. Anfangs entsteht ein benignes NZN, aus dem sich zunächst ein hyperplastischer und später ein dysplastischer NZN bildet. Im Verlauf entwickelt sich daraus ein primäres Melanom der horizontalen Wachstumsphase, aus dem ein Melanom der vertikalen Wachstumsphase und schließlich ein metastasierendes Melanom hervorgeht (vgl. Abb. 17).

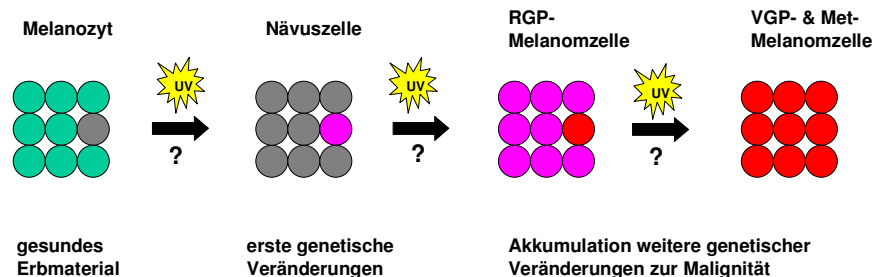


Abbildung 17: Modell zur Melanomentwicklung (Nach MR Hussein [40])

RGP: horizontale Wachstumsphase, VGP: vertikale Wachstumsphase, Met: metastasierende Wachstumsphase

Jede Entwicklungsstufe ist von weiteren sukzessiven Veränderungen des Erbmateriels begleitet. Sie beinhaltet die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die Aktivierung von Onkogenen sowie Veränderungen in Genen der DNS-Reparatursysteme [40, 41].

Onkogene entstehen durch Mutationen sogenannter Protoonkogene. Protoonkogene sind in allen gesunden Zellen enthalten und essentiell für die Regulierung von Zellwachstum und -differenzierung. Onkogene können dabei mutierte Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren oder Bestandteile der intrazellulären Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren sein. Entscheidend ist, dass sie zu einer permanenten Aktivierung der zur Proliferation benötigten Signalwege führen [52]. Zu den bekanntesten Onkogenen in der Melanomentstehung zählen folgende Gene: RAS, B-RAF, Cyclin D1, c-MYC [41, 51].

Die Proteinprodukte der Tumorsuppressorgene regulieren den Zellzyklus und induzieren einen Proliferationsstillstand in Zellen, deren DNS geschädigt ist. Eine Inaktivierung mutierter Tumorsuppressorgene führt zum Verlust wichtiger Kontrollelemente des Zellzyklus. Eine gesteigerte Zellproliferation ist die Folge [52]. Bekannte Vertreter der Tumorsuppressorgene sind CDKN2A und p53 [41].

Das Ausmaß von Allelverlusten, Mikrosatelliteninstabilität und der Herunterregulierung von Komponenten der DNS-Reparatur steigt mit dem Übergang vom benignen NZN über den dysplastischen NZN bis hin zum Melanom parallel an (vgl. Abb. 28). Dies bestärkt die Hypothese der schrittweisen Akkumulation von genetischen Veränderungen als dem wesentlichen Mechanismus der Tumorgenese [40].

UV-A-Strahlung schädigt DNS indirekt. Sie ruft Mutationen und Chromosomenveränderungen hervor, die zu Zytotoxizität und Tumorentstehung führen (vgl. 1.2.2). UV-A regt Photosensibilisatoren wie Porphyrine in den Zellen an, die anschließend die DNS, häufig unter Vermittlung reaktiver Sauerstoffradikale, verändern. Unter anderem verursacht UV-A über die Bildung von 8-Hydroxydeoxyguanosin G-zu-T-Transversionen, Einzelstrangbrüche und DNS-Querbrücken [53].

In unseren Versuchen förderte UV-A-Bestrahlung im Durchschnitt das Wachstum der Melanomzellen in Hautrekonstrukten. Besonders Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase bilden mehr Tumoren unter UV-A-Bestrahlung als ohne Bestrahlung. Melanomzellen der vertikalen und metastasierenden Wachstumsphase wurden hingegen durch die UV-A-Applikation im Wachstum gehemmt in den Hautrekonstrukten.

Diese Ergebnisse lassen spekulieren, dass nach UV-A-Bestrahlung die Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase in den Hautrekonstrukten in eine aggressivere Form transformiert worden sind. Möglicherweise haben sie eine Stufe weiter auf dem Weg zum metastasierenden Melanom erreicht. Genetische Veränderungen in Form von UV-induzierten Mutationen könnten die Melanomzellen in den Hautrekonstrukten befähigen, stärker zu proliferieren. Dies würde die erhöhte Tumoranzahl in den bestrahlten Hautrekonstrukten erklären. Um solche DNS-Schäden nachzuweisen, wäre eine vergleichende Genomanalyse zwischen Melanomzellen nach Bestrahlung und Melanomzellen ohne Bestrahlung sinnvoll. Ultraviolette Strahlung verursacht Mutationen in der DNS nach dem Zufallsprinzip. Unterschiedliche Gene in verschiedenen Zellen könnten betroffen sein. Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen äußern sich somit je nach ihrem Entstehungsort in unterschiedlicher Art und Weise. Sie können beispielsweise Zellapoptose induzieren oder Zellteilung fördern. Falls die Zelle im Stande ist, den Defekt zu reparieren, wären der Schaden folgenlos [52, 53].

4.2.2 UV-B bei der Entstehung des malignen Melanoms

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen inhibierenden Einfluss von UV-B-Strahlung auf das Wachstum von Melanomzellen in Hautrekonstrukten. Die wachstumshemmende Wirkung von UV-B-Strahlung war unerwartet, da sie als wichtigstes Karzinogen bei der Entstehung des malignen Melanoms gilt [34].

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von UV-Strahlung auf die Progression bereits bestehender maligner Melanome untersucht. Von der Literatur abweichende Ergebnisse bezüglich der Wirkung von UV-B-Strahlung auf melanozytäre Zellen könnten in dieser Tatsache begründet liegen. Daraus ergibt sich die Frage, ob UV-B-Strahlung nicht nur die Transformation, sondern auch die Progression von malignen Melanomen beeinflusst. Beobachtungen aus Bestrahlungsexperimenten von Melanomzellen in Monokultur oder im Tiermodelle können nicht ohne weiteres übertragen werden.

4.2.2.1 Epidemiologische Daten

Eine von Berwick et al. veröffentlichte Fall-Kontroll-Studie von Melanompatienten in Connecticut, USA, zeigte eine Assoziation von erhöhter Sonnenexposition wie Lichtelastose und Sonnenbrände mit einer verlängerten Überlebenszeit beim Melanom [35]. Das Ausmaß der Sonnenexposition und lichtinduzierten Elastose der Haut stand statistisch signifikant umkehrt im Verhältnis zum Sterberisiko durch das Melanom. Patienten, die Sonnenbrände erlitten hatten oder häufig intermittierender Sonnenexposition ausgesetzt waren, hatten rückblickend ein vermindertes Risiko durch das Melanom zu versterben als Patienten, die niemals Sonnenbrände erlitten hatten und nur geringer intermittierender Sonnenexposition ausgesetzt waren. Diese Assoziation von biologischen Markern der Sonnenexposition und der Melanommortalität war auch nach Anpassung möglicher Confoundingfaktoren wie Tumordicke oder weitere gesicherte Prognosefaktoren unverändert vorhanden. Die Autoren stellten zwei Hypothesen auf, den Effekt des Sonnenlichtes auf die Melanomüberlebenswahrscheinlichkeit plausibel zu erklären. Erstens könnte Sonnenlicht weniger aggressive Melanome induzieren, indem es die schützende Melaninpigmentierung und eine verstärkte DNS-Reparatur fördert. Das Risiko weiterer Mutationen in der Melanomzelle könnte somit reduziert werden [35]. Beobachtungen, dass Melanome eine Gruppe heterogener Tumore bilden, in deren Entwicklung möglicherweise unterschiedliche Wirkungsmuster der ultravioletten Strahlung beteiligt sind, unterstreichen dies [36, 37]. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit sieht die Ursache in einer erhöhten Vitamin-D-Synthese in der Haut infolge UV-B Exposition [35]. Vitamin D hat antiproliferative und proapoptische Eigenschaften. Melanomzellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche Vitamin D-Rezeptoren. Sie erweisen sich für die antiproliferativen und differenzierungsfördernden Vitamin-D-Effekte empfänglich. Melanompatienten zeigen zudem verminderte 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Serumspiegel und Vitamin-D-Rezeptor Polymorphismen, die mit der Melanomentwicklung und dem Krankheitsverlauf assoziiert sind [36].

Eine epidemiologische Studie zeigte, dass Sonnenlichtbestrahlung das Risiko, an Non-Hodgkin-Lymphomen zu erkranken, reduziert [38]. So mehren sich die Hinweise in der Literatur, dass Sonnenlicht neben seiner karzinogenen Potenz möglicherweise auch einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von Krebserkrankungen haben könnte. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit lassen sich in eine ähnliche Richtung interpretieren. Die UV-B-Exposition hemmte die Expansion der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten. Die Hypothese von Berwick et al. kann nicht zur Erklärung dieser Beobachtungen in den Hautrekonstrukten herangezogen werden. Da es sich bereits um Melanomzellen handelte, die in den Kontrollgruppen deutliche Tumoren bildeten, kann die Ursache nicht in der Induktion weniger aggressiver Melanome durch UV-B-Strahlung in den Hautrekonstrukten gesehen werden. Die UV-B-Bestrahlung zeigte vielmehr Effekte auf die Melanomprogression in den Rekonstrukten nach deren Induktion. Außerdem kann sich in den Rekonstrukten keine schützende Melaninpigmentierung nach UV-B-Applikation ausbilden, da gesunde Melanozyten fehlen. Die zweitgenannte Erklärungsmöglichkeit lässt sich hingegen auf die Rekonstrukte übertragen. Möglicherweise könnte eine verstärkte Vitamin-D-Synthese in den UV-B-bestrahlten Rekonstrukten eine antiproliferative und proapoptische Wirkung auf die Melanomzellen haben.

4.2.2.2 Tiermodelle

Die in dieser Arbeit beobachtete wachstumshemmende UV-B-Wirkung auf Melanomzellen in Hautrekonstrukten unterscheidet sich von Beobachtungen in Tiermodellen. In Tiermodellen konnte UV-B-Strahlung Melanozyten transformieren [21]. Kesall und Mintz bestrahlten 112

transgene (Tyr-SV40E) Mäuse im Alter von zwei bis drei Tagen über einen Zeitraum von drei bis zehn Tagen mit einer Gesamtdosis von 1,1 bis 3,7 J/cm² UV-B. Im Alter von 35 bis 115 Wochen entwickelten 14 Mäuse insgesamt 15 invasive Melanome, die in fünf Mäusen makroskopisch sichtbare Metastasen setzten [63]. In den transgenen Mäusen reichte UV-B als Stimulus aus, Melanome zu induzieren. In der nicht-transgenen Kontrollgruppe zeigten sich keine Melanome durch die UV-B-Bestrahlung. Die Arbeitsgruppe um M. Broome Powell untersuchte die Melanomentstehung in transgenen Mäusen (TPras), die ein mutiertes humanes Ha-ras Gen in ihren Pigmentzellen exprimieren. Die topische Applikation von DMBA resultierte in einer hohen Melanominzidenz in den TPras-Mäusen. Des Weiteren rief UV-B-Bestrahlung in TPras-Mäusen Melanome hervor [64]. Noonan et al. beobachteten in neonatalen Mäusen, die HGF/SF transgen exprimieren, nach einmaliger sonnenbrandäquivalenter UV-B-Exposition die Entstehung von Melanomen [66]. Wurden erwachsene Mäuse dieser transgenen Linie chronischer suberythemaler UV-B-Bestrahlung ausgesetzt, entstanden vornehmlich spinozelluläre Karzinome und Fibrosarkome [65]. In den neonatalen HGF/SF transgenen Mäusen konnten ausschließlich UV-B enthaltende Strahlungsquellen Melanome induzieren. Dabei erwies sich eine alleinige UV-B-Bestrahlung signifikant effektiver in der Melanominduktion als sonnenlichtimitierende Strahlung, die eine Kombination aus UV-B, UV-A und sichtbarem Licht enthielt. HGF/SF transgene Mäuse, die lediglich mit UV-A bestrahlt wurden, entwickelten keine Melanome [67]. Die Autoren folgerten, dass im natürlichen Sonnenlicht nicht UV-A, sondern UV-B das Karzinogen für maligne Melanome ist. Berking et al. untersuchten die Melanomentwicklung in humaner Haut, die sich als Xenotransplantat auf immundefizienten Mäusen befand. Durch die Kombination von UV-B-Bestrahlung mit der Überexpression von Wachstumsfaktoren (bFGF allein oder zusammen mit SCF und ET-3) konnten Melanome induziert werden [22, 23].

4.2.2.3 Zellkulturen

Hussein et al. beobachteten in Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase (RGP) nach einmaliger UV-B-Bestrahlung (Dosis 10 mJ/cm²) eine Induktion von Apoptose, veränderte Expression von p53, Bcl-2 und hMSH2, morphologische Veränderungen mit Zellkernatypien sowie eine erhöhte metabolische Aktivität [39]. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Wirkung von ultravioletter Strahlung auf die Progression des malignen Melanoms zu aggressiveren Stadien. In unseren Experimenten lag die applizierte UV-B-Dosis mit durchschnittlich 50 mJ/cm² deutlich über der Dosis dieser Monokulturbestrahlung. Die die Melanomzellen erreichende Energie in den Hautrekonstrukten wird allerdings durch die darüber liegenden Keratinozytenschichten abgeschwächt. Unter höheren Bestrahlungsdosen könnte sich die Apoptoseinduktion durch UV-B stärker auswirken als andere aktivierende UV-B-Effekte. Möglicherweise wurden die Melanomzellen in den Hautrekonstrukten durch die UV-B-Applikation zu sehr geschädigt, um vital zu bleiben. In der histologischen Auswertung fanden sich folglich geringere Tumorzahlen in den UV-B bestrahlten Rekonstrukten.

Mudgil et al. beobachteten in Hautrekonstrukten mit einem Gemisch aus normalen Keratinozyten und entarteten Keratinozyten (HaCaT-ras, Klon IL-4) nach Applikation von 50 mJ/cm² UV-B eine Expansion dieser Tumorzellen im Vergleich zur unbestrahlten Kultur [69]. Normale Keratinozyten zeigten nach UV-B-Exposition vermehrt Apoptose. Ihre Proliferation war gehemmt. Im Gegensatz dazu blieb die Apoptose- und Proliferationsrate der Tumorzellen in den bestrahlten Rekonstrukten unverändert [69]. Die Autoren schlussfolgerten, dass UV-B die klonale Expansion der HaCaT-ras-Zellen ermöglichte, indem es in den normalen Keratinozyten Apoptose induzierte und deren Proliferation hemmte. UV-B scheint folglich die Proliferation potenziell maligner Zellen zu begünstigen, indem es das Verhalten der umgebenden Keratinozyten verändert. Einer direkten Veränderung der Tumorzellen durch

UV-B steht nicht im Vordergrund. Ein analoger UV-B-Effekt auf Melanomzellen in den Rekonstrukten konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

4.2.2.4 Mutagene und karzinogene UV-B-Effekte

In den Versuchsreihen mit UV-B-Exposition zeigten sich weniger Tumoren im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Dieses Ergebnis war überraschend, da UV-B-Strahlung als Karzinogen bei der Entstehung des kutanen Melanoms gilt und man vielmehr vermutet hätte, dass es auch die Progression und das Wachstum der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten fördert.

Nach direkter Absorption von UV-B-Strahlung durch die DNS der Zellen können dimere Photoprodukte zwischen benachbarten Pyrimidinbasen eines DNS-Stranges entstehen. Den Hauptanteil bilden dabei Cyclobutanpyrimidindimere und (6-4)Photoprodukte [53]. Außerdem verursacht UV-B-Strahlung die Entstehung von Sauerstoffradikalen, die ihrerseits Mutationen induzieren. In sporadisch auftretenden Melanomen wurden Mutationen im CDKN2A-Gen gefunden. Mutationen im CDKN2A-Gen sind UV-B-induzierte Veränderungen. Dies weist auf UV-B-Einflüsse in der Ätiologie des malignen Melanoms hin [68]. Jedoch sind typische UV-B-verursachte Mutationen, die so genannten UV-B-Kennzeichen-Mutationen, insbesondere im Tumorsuppressorgen p53 in Melanomen allgemein selten. Hingegen sind in spinözellulären Karzinomen oder Basaliomen solche UV-B-induzierte Mutationen weit verbreitet [68]. Auch wenn heutzutage eine Vielzahl unterschiedlicher UV-B-Effekte auf die Haut des Menschen wie DNS-Schädigung, Apoptoseinduktion, Melanogenese, Lichtalterung etc. bekannt ist, kann noch kein genaues Bild der einzelnen Wirkungswege und ihrer Verzahnung gezeichnet werden. Es muss zum jetzigen Zeitpunkt offen bleiben, ob UV-B-Strahlung in vivo das Melanomzellwachstum, wie in den Hautrekonstrukten gesehen, hemmt.

4.3 Wirkung ultravioletter Strahlung auf die Tumorumgebung

Die Transformation gutartiger Läsionen in invasive, metastasierende Tumoren ist ein komplexer Prozess. Sie beinhaltet Veränderungen in der Expression und Funktion von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Tumorzellen erwerben die Fähigkeit, Zell-Zell-Adhäsion und die Kontrolle durch die umgebenden Zellen zu umgehen und in andere Gewebe vorzudringen [31].

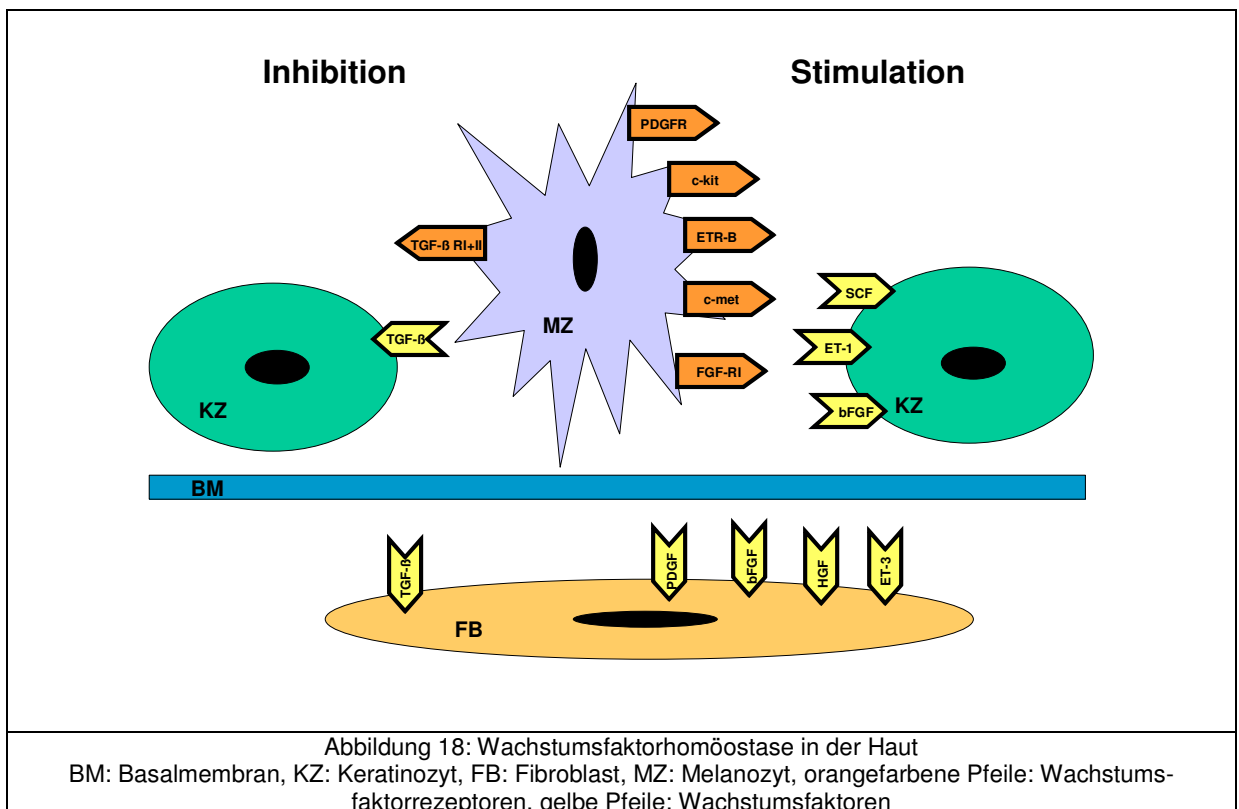
Bei bereits entstandenen Melanomen stellt sich die Frage, ob ultraviolette Strahlung durch direkte Veränderungen der Tumorzelle oder auf indirektem Weg über ein verändertes Mikromilieu Einfluss nimmt. Tumorzellen erweisen sich als äußerst apoptoseresistent und haben spezielle Abwehrmechanismen gegenüber Noxen entwickelt. Vor diesem Hintergrund scheinen indirekte Einflüsse auf die Tumorzellen besonders interessant.

Neben der direkten DNS-Schädigung von Zellen (vgl. 4.2.1.4, 4.2.2.4) hat UV-Strahlung indirekte Effekte auf das homöostatische Gleichgewicht der Haut. Sie beeinflusst die Proteinexpression von Keratinozyten und Fibroblasten. Das die Zellen umgebende Milieu ändert sich nach UV-Exposition [19]. In dieser Arbeit zeigte sich ein Zusammenhang von UV-A- bzw. UV-B-Applikation mit dem Wachstumsverhalten der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten. Dies könnte nicht nur auf direkte Veränderungen in den Melanomzellen, sondern auch auf ein verändertes Mikromilieu in den Rekonstrukten infolge Stoffwechselveränderungen der Keratinozyten und Fibroblasten zurückzuführen sein.

4.3.1 UV-Einfluss auf Wachstumsfaktoren

Gesunde und entartete Melanozyten interagieren eng mit ihrer Umgebung. Zum einen über direkten Zell-Zell-Kontakt, zum anderen mittels löslicher Botenstoffe. Archambault et al. untersuchten den Einfluss von Keratinozyten und Fibroblasten auf das Verhalten von Melanozyten in Rekonstrukten. Ihre Daten bestärken die Vermutung, dass Fibroblasten und Keratinozyten die Funktion der Melanozyten in der Haut modulieren [71].

Melanomzellen sind im Gegensatz zu Melanozyten von den umgebenden Hautzellen unabhängiger. Sie produzieren verschiedene Wachstumsfaktoren selbst. Damit beeinflussen sie die Angiogenese, die Stromabildung, die Zellmobilität und die immunologische Antwort [32]. Wachstumsfaktoren gehören zu einer Gruppe unterschiedlicher Proteine, die essenzielle Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Migration kontrollieren. In der Haut regulieren Wachstumsfaktoren u.a. Überleben, Wachstum und Pigmentproduktion von Melanozyten. Melanozyten tragen an ihrer Zelloberfläche unterschiedliche Wachstumsfaktorrezeptoren. Deren Liganden werden von den umgebenden Keratinozyten in der Epidermis und von den Fibroblasten der Dermis produziert (vgl. Abb.18).



Zu den Melanozyten-stimulierenden Faktoren zählen der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), das Endothelin-1 (ET-1), der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), PDGF (platelet derived growth factor) und der Stammzellfaktor (SCF). Ein Melanozyten-inhibierender Faktor ist der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF-β) [20]. Brenner et al. zeigten, dass UV-Exposition die Wachstumsfaktorenexpression der Hautzellen in Abhängigkeit von der Wellenlänge verändern kann. UV-A-Bestrahlung hemmte in humanen Keratinozyten die Expression von ET-1 und in geringerem Ausmaß auch von TGF-β und PDGF-AA. Die Expression von bFGF und SCF blieb unter diesen Bedingungen unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu förderte eine UV-B-Bestrahlung in humanen Keratinozyten die Produktion von bFGF und ET-1. Die Wachstumsfaktoren SCF, TGF-β und PDGF-AA

blieben unverändert. UV-A und UV-B stimulierten in humanen Fibroblasten die Expression von bFGF, HGF und TGF- β [19]. Es liegt nahe, dass solche Veränderungen der Wachstumsfaktorhomöostase auch in den Hautrekonstrukten nach Bestrahlung auftreten. Sie stellen eine mögliche Ursache für Unterschiede in der Proliferation und Invasion der Melanomzellen in den bestrahlten Rekonstrukten dar. Der wachstumsfördernde UV-A-Effekt auf Melanomzellen in den Rekonstrukten könnte zum einen durch eine gesteigerte Expression proliferationsfördernder Faktoren und zum anderen durch eine gehemmte Expression proliferationsinhibierender Faktoren begründet sein. Ein gegensinnig verändertes Wachstumsfaktorenprofil mit Überwiegen der hemmenden Faktoren unter UV-B-Bestrahlung wäre als Ursache für die geringere Melanomzellproliferation in den UV-B-bestrahlten Rekonstrukten denkbar. Da aufgrund möglicher interzellulärer Einflüsse nicht ohne weiteres von den Bestrahlungen einer Keratinozyten- oder Fibroblastenmonokultur auf die Expression der Wachstumsfaktoren in bestrahlten Hautrekonstrukten geschlossen werden kann, bleibt das genaue Wachstumsfaktorenprofil dieser Rekonstrukte ungewiss.

Jamal und Schneider erörtern am Beispiel des ET-1, wie UV-B über die Induktion von Wachstumsfaktoren in Keratinozyten die Entwicklung einer melanözytären Neoplasie begünstigt [28]. ET-1 wird dosisabhängig von Keratinozyten nach UV-B-Bestrahlung sezerniert. Es stimuliert über den ET_B-Rezeptor eine intrazelluläre Signalkette, die zur Herunterregulierung des Oberflächenmoleküls E-Cadherin auf Melanozyten und Melanomzellen führt [28]. Cadherine stellen eine Familie von Glykoproteinen dar, die als Adhäsionsmoleküle am Zell-Zell-Kontakt in der Haut entscheidend beteiligt sind. In gesunder menschlicher Haut exprimieren alle epidermalen Zellen wie z.B. Keratinozyten und Melanozyten an ihrer Zelloberfläche E-Cadherin. Während Fibroblasten und Endothelzellen N-Cadherine tragen [29]. Keratinozyten kontrollieren das Wachstum und den Phänotyp der Melanozyten auf eine E-Cadherin abhängige Art und Weise. In vielen Melanomzellen ist E-Cadherin, das als eine Art Tumordinvasionsinhibitor fungiert, herunterreguliert. Die malignen Zellen können sich somit der Kontrolle durch die Keratinozyten entziehen [28]. Anstelle von E-Cadherin tragen viele Melanomzellen N-Cadherine auf ihrer Zelloberfläche. Damit binden sie an Fibroblasten und Endothelzellen und können ihr Überleben in der Dermis ermöglichen. Zellen, die E-Cadherin beispielsweise nach UV-B-Exposition herunterregulieren, verlieren damit eine Verbindung zu Keratinozyten. Sie weisen eine verstärkte Mobilität und Invasivität auf [30]. In Hautrekonstrukten könnten Melanomzellen nach UV-B-Applikation aufgrund Endothelin-1 vermittelter Herunterregulierung von E-Cadherin erleichterte Bedingungen zum Einwachsen in das Dermisäquivalent vorfinden. In Hautrekonstrukten wurde bereits eine Korrelation zwischen erniedrigter Expression von Zelladhäsionsmolekülen der Melanomzellen und ihrer vermehrten Invasion in die Dermis beschrieben [33].

Untersuchungen an halbseitig UV-exponierten NZN zeigten ein verändertes epidermales Expressionsmuster von β_1 -Integrinen. β_1 -Integrinen sind bedeutende Adhäsionsmoleküle für die Melanozytenmotilität und Tumorprogression. Des Weiteren induziert UV-B-Strahlung die Expression fibronektinspezifischer Integrine auf Melanozyten *in vitro* [59]. Dies veranschaulicht modellhaft die Möglichkeit der direkten Einflussnahme von UV-Strahlung auf die adhäsiven Eigenschaften von Melanozyten [59].

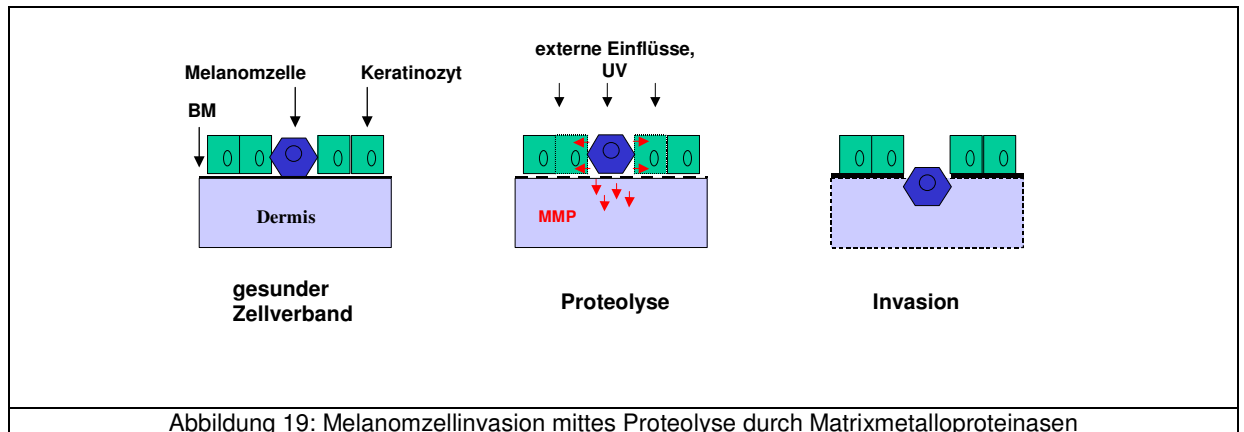
4.3.2 UV-Einfluss auf die Extrazellulärsubstanz

Chronische UV-Exposition der Haut führt zur sogenannten Lichtalterung. Deren stärkste Effekte zeigen sich im Bindegewebe der Dermis [25]. Dort entsteht neben einer Anhäufung elastischer Fasern, Glykosaminoglycan- und Proteoglycankomplexen eine deutliche Abnahme der Anzahl kollagener Fasern. Zudem finden sich strukturellen Veränderungen des dermalen

Kollagens [26]. In den Hautrekonstrukten könnten ähnliche strukturelle Veränderungen des Dermisäquivalentes nach UV-Bestrahlung auftreten. Ohne die Melanomzellen selbst zu verändern, könnte deren Proliferation beeinflusst werden. Eine UV-induzierte Kollagenmodifikation oder Kollagenabbau in den Hautrekonstrukten dürfte eine geringere Wachstumsbarriere für die Melanomzellen darstellen. In der humanen Dermis produzieren die Fibroblasten die Komponenten der Extrazellulärsubstanz. Dabei nimmt Kollagen Typ I eine zentrale Rolle für die Festigkeit und Elastizität der Haut ein. Zudem bilden Fibroblasten auch die Proteasen zum Abbau dieser Extrazellulärsubstanz wie beispielsweise Matrixmetalloproteasen (MMP). Ultraviolette Strahlung führt zu einer posttranslationalen Modifikation des neu synthetisierten Kollagenmoleküls. Zudem induziert UV-Strahlung die Produktion von Proteasen, die Kollagen abbauen. In diesem Zusammenhang sind reaktive Sauerstoffradikale (RSR) von Bedeutung. Sie werden in der Haut nach UV-B- und UV-A-Exposition gebildet (vgl. 1.2.2). RSR zerstören direkt interstitielles Kollagen. Sie hemmen Gewebsinhibitoren von MMPs und aktivieren die MMP-Synthese kutaner Zellen. Die Folge ist ein vermehrter Kollagenabbau [25]. Matrixmetalloproteasen (MMP) stellen eine Familie von Zink enthaltener Endopeptidasen dar. Sie spalten zahlreiche Proteine der extrazellulären Matrix. Anhand ihrer Substratspezifität teilt man sie in die folgenden Untergruppen auf: interstitielle Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Metalloelastasen und membran-gebundene MMPs. Die löslichen MMPs werden meist in Form inaktiver Vorstufen in die Extrazellulärsubstanz sezerniert. Dort werden sie von einem Plasminogenaktivator oder durch andere MMPs aktiviert. Außerdem wird ihre Funktion durch Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP) im extrazellulären Milieu reguliert [47, 48].

K. Scharffetter et al. induzierten in Fibroblasten dosisabhängig durch UV-A-Bestrahlung erhöhte Spiegel von Kollagenasen-mRNS. Die maximale Induktion von Kollagenasen-mRNS zeigte sich 24 Stunden nach Applikation von 35 J/cm^2 UV-A [26]. In Hautrekonstrukten dringt UV-A-Strahlung bis in die Dermis vor und könnte in den Fibroblasten folglich Kollagenasen induzieren. Kollagenasen könnten anschließend die Kollagenmatrix andauern. Eine solche Aufweichung des Dermisäquivalents dürfte den Melanomzellen das Eindringen in diese Schicht erleichtern. Dies erklärt möglicherweise die begünstigte Invasion und das vermehrte Wachstum der Melanomzellen in den UV-A bestrahlten Rekonstrukten im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Eine zentrale Rolle von Proteasen, speziell MMPs, in der Tumordinvasion und Metastasierung ist nach heutigem Wissensstand unumstritten. Eine Vielzahl von Studien zeigten eine positive Korrelation zwischen Invasivität und Metastasierungsvermögen mit der MMP-Expression der Tumorzellen [47]. Anfangs wurde vermutet, dass die Hauptfunktion der MMPs bei der Metastasierung in der Zerstörung physiologischer Barrieren wie der Basalmembran liegt. Somit würde der Weg in das umgebende Gewebe und in die Gefäße durch MMPs geebnet (vgl. Abb. 19).



Mittlerweile mehren sich jedoch Hinweise darauf, dass die Funktionen dieser Enzyme in der Tumorgenese wesentlich komplexer und vielseitiger sind. MMPs wirken vermutlich auch in der Tumorinduktion, der Zellproliferation, der Zellmigration, der Wachstumsfaktorenfreisetzung, der Angiogenese und in der Modifikation extrazellulärer Strukturen mit. Beispielsweise setzen MMPs Wachstumsfaktoren wie TGF- β und bFGF, sowie Zytokine aus der extrazellulären Matrix frei. Diese sind wichtig für das Überleben, die Proliferation, die Invasion und Metastasierung maligner Zellen [47, 48].

Vorausgesetzt, UV-Strahlung schädigt das Bindegewebe der Haut infolge einer veränderten MMP-Homöostase, ergibt sich eine geringere Barriere für das Wachstum von Melanomzellen in Hautrekonstrukten. Eine vermehrte Tumoranzahl und eine tiefere Invasion in den bestrahlten Rekonstrukten verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle wären zu erwarten. Unter UV-A-Bestrahlung zeigte sich in dieser Arbeit ein fördernder Einfluss auf das Melanomzellwachstum und die Invasion in Hautrekonstrukten. Nur in einer Minderheit der UV-B bestrahlten Rekonstrukte wurden zahlreichere Tumoren als in der unbestrahlten Kontrolle beobachtet. In der Mehrzahl der Fälle erwies sich UV-B als wachstumshemmend auf die Melanomzellen. Dies steht im Kontrast zu den Erkenntnissen in der Literatur, die nicht nur UV-A sondern auch UV-B eine Aktivierung der Matrixmetalloproteasenproduktion von Hautzellen zusprechen.

Fagot et al. beobachteten, dass in humanen Fibroblasten UV-B-Exposition die Produktion von MMP-1 auf direktem Weg erhöht. Außerdem zeigte sich eine parakrine Aktivierung der MMP-1-Produktion in Fibroblasten durch Mediatoren aus UV-B bestrahlten humanen Keratinozyten. In vitro werden nach UV-B-Applikation in Keratinozyten beispielsweise IL-1, IL-6 und TNF- α hochreguliert. Diese induzieren in dermalen Fibroblasten die MMP-1-Produktion [27]. Kregel und Mitarbeiter untersuchten die MMP-2-Expression von melanozytären NZN und ihrer Umgebung nach UV-B-Bestrahlung (vierfache MED) [46]. In den melanozytären NZN exprimierten Keratinozyten MMP-2. Die MMP-2-Expression wurde nach UV-B-Bestrahlung hochreguliert. Melanozyten exprimierten kein MMP-2. Im Gegensatz dazu wurde TIMP-2 vorwiegend von den melanozytären Nävuszellen exprimiert. Seine Expression wurde teilweise durch UV-B-Bestrahlung herunterreguliert. Die Autoren vermuteten, dass die Reduktion der TIMP-2-Expression in den melanozytären Zellen verbunden mit der Zunahme von MMP-2-Expression der umgebenden Keratinozyten durch UV-B-Strahlung synergistisch wirkt. Die Folge ist ein Basalmembranabbau und das Einwandern der Nävuszellen in die Dermis.

5. Zusammenfassung

Bei der Entstehung des malignen Melanoms ist die ultraviolette Strahlung ein wichtiger ätiologischer Faktor. Ob Sonnenexposition die Progression bereits manifester Melanome in der Haut beeinflusst, ist ungeklärt. In dieser Arbeit wurde deshalb erstmalig der Einfluss von UV-A- und UV-B-Strahlung auf Melanomzellen in organotypischer Co-Kultur mit Keratinozyten und Fibroblasten untersucht. Dabei wurde der UV-Einfluss auf Melanomzellen aller drei Wachstumsphasen (RGP, VGP, Met) beobachtet.

In der Gesamtzahl der Experimente, inklusive ausgedehnter Vorversuche, wurden insgesamt 175 Hautrekonstrukte mit drei verschiedenen Melanomzelllinien nach modifizierter Methode von Vaccariello et al. [70] angelegt. 69 Hautrekonstrukte wurden mit UV-A und 53 Hautrekonstrukte mit UV-B bestrahlt, die übrigen Hautrekonstrukte dienten als unbestrahlte Kontrollen.

Die wichtigsten Zielgrößen im Rahmen der histologischen Auswertung waren Anzahl und Größe der Melanomzellnester. Die Melanomzellen bildeten Nester in der Epidermis und Dermis. Dabei verhielten sie sich gemäß ihrer Wachstumsphase analog zu den Verhältnissen in vivo. RGP-Melanomzellen bildeten vornehmlich Nester in der Epidermis. Metastatische Melanomzellen drangen bis tief in die Dermis ein. VGP-Melanomzellen nahmen eine Zwischenstellung ein.

Im Durchschnitt förderte UV-A-Strahlung das Melanomzellwachstum in den Hautrekonstrukten. Jedoch zeigten sich klare Unterschiede in Abhängigkeit vom Melanomprogressionsstadium. Melanomzellen der horizontalen Wachstumsphase bildeten deutlich mehr und größere Tumoren unter UV-A-Bestrahlung als ohne Bestrahlung. Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase wurden unter UV-A-Bestrahlung leicht gehemmt. Metastasierende Melanomzellen zeigten hingegen nach UV-A-Applikation deutlich weniger und kleinere Tumoren als ohne UV-Bestrahlung.

UV-B-Strahlung hingegen hemmte das Melanomzellwachstum in den Hautrekonstrukten. Dieser wachstumshemmende Effekt war bei Melanomzellen fortgeschrittener Progressionsstadien stärker ausgeprägt als bei Melanomzellen weniger fortgeschrittener Progressionsstadien.

Unterschiede im Wachstumsverhalten der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten nach Bestrahlung könnten eine direkte UV-Folge mit Veränderungen der Melanomzellen sein. Diese könnten UV-induzierte genetische Veränderungen, im Sinne einer Progression zur fortschreitenden Malignität, zytotoxische UV-Effekte oder Veränderungen im Melanomzellstoffwechsel umfassen.

Zum anderen wäre ein indirekter UV-Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Melanomzellen in den Hautrekonstrukten nach Bestrahlung durch Veränderungen des Mikromilieus denkbar. UV-Strahlung könnte die Proteinexpression der Keratinozyten, Fibroblasten und Melanomzellen beeinflussen. Durch UV-modulierte Veränderungen der Sekretion von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und anderer Botenstoffe könnte das Wachstum der Melanomzellen indirekt beeinflusst werden.

In der Gesamtschau zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Sonnenexposition einen differenzierten Einfluss abhängig vom UV-Spektrum und dem Progressionsstadium der Melanomzellen auf bereits bestehende maligne Melanome in der Haut haben könnte.

Weiterführende Forschung ist notwendig, um mögliche UV-A- und UV-B-Effekte auf kutane, maligne Melanome in vivo abschätzen und verstehen zu können. Solche Erkenntnisse könnten die Melanomprophylaxe und die Melanomtherapie in der Zukunft beeinflussen.

6. Anhang: Gesamtübersicht der Experimente

Nr.	Bestrahlungsmodus	Tumor-score	Tumor-score-differenz	Epi-dermis	Dermis	Erntezeitpunkt	Melanomzellen
9D	keine	30		2,5	2	12	Met
9E	keine	33		2	2	16	Met
9F	keine	32		1,5	0,5	20	Met
21A	keine	36		3	3	13	Met
21B	keine	48		3	2	15	Met
21C	keine	79		3	3	19	Met
10F	keine	4		1	0,5	17	RGP
11B	keine	12		2	1,5	17	RGP
13M	keine	0		1	2	11	RGP
13N	keine	5		2	1	15	RGP
13O	keine	3		2	1	19	RGP
14A	keine	0		3	3	11	RGP
14B	keine	33		2	1	15	RGP
14C	keine	37		1	0,5	19	RGP
15N	keine	6		2	2	13	RGP
15Q	keine	0		2	2	18	RGP
16A	keine	0		2	2	15	RGP
16D	keine	43		2	0,5	19	RGP
17A	keine	13		2	2	11	VGP
17B	keine	20		0,5	2	15	VGP
19A	keine	0		2	1,5	7	VGP
19D	keine	16		2	1	9	VGP
19F	keine	22		2	0,5	11	VGP
20A	keine	0		2	3	11	VGP
20D	keine	13		1,5	3	11	VGP
20B	keine	8		0,5	3	15	VGP
20E	keine	11		2	3	15	VGP
20C	keine	0		0,5	3	19	VGP
20F	keine	0		0,5	2	19	VGP
15M	1x 10 J/cm ² UV-A	18	12	2	1	12	RGP
15P	1x 10 J/cm ² UV-A	8	8	1,5	2	16	RGP
21G	1x 15 J/cm ² UV-A	30	-6	1	2	13	Met

21H	1x 15 J/cm ² UV-A	53	5	2	2	15	Met
21I	1x 15 J/cm ² UV-A	49	-30	2	2	19	Met
10D	1x 15 J/cm ² UV-A	23	19	2	0,5	17	RGP
11F	1x 15 J/cm ² UV-A	0	-12	1	0,5	17	RGP
13D	1x 15 J/cm ² UV-A	0	0	1	1	11	RGP
13E	1x 15 J/cm ² UV-A	0	-3	1	1	15	RGP
13F	1x 15 J/cm ² UV-A	0	-5	0	0	19	RGP
14P	1x 15 J/cm ² UV-A	0	0	3	2	11	RGP
14Q	1x 15 J/cm ² UV-A	27	-6	2	0,5	15	RGP
14R	1x 15 J/cm ² UV-A	31	-6	1	0,5	19	RGP
19B	1x 15 J/cm ² UV-A	8	-14	2	1	15	VGP
19C	1x 15 J/cm ² UV-A	23	1	1	1	11	VGP
20G	1x 15 J/cm ² UV-A	0	-6,5	0,5	1	11	VGP
20H	1x 15 J/cm ² UV-A	0	-9,5	0,5	1	15	VGP
20I	1x 15 J/cm ² UV-A	20	20	1	2	19	VGP
9A	1x 20 J/cm ² UV-A	14	-16	1	3	12	Met
9B	1x 20 J/cm ² UV-A	45	12	2	2	16	Met
9C	1x 20 J/cm ² UV-A	32	0	1,5	0,5	20	Met
13A	1x 20 J/cm ² UV-A	0	0	0,5	1	11	RGP
13B	1x 20 J/cm ² UV-A	0	-3	1	1	15	RGP
13C	1x 20 J/cm ² UV-A	0	-5	0	0	19	RGP
14M	1x 20 J/cm ² UV-A	8	8	2,5	2	11	RGP
14N	1x 20 J/cm ² UV-A	38	5	2	0,5	15	RGP
14O	1x 20 J/cm ² UV-A	37	0	1	0,5	19	RGP
15G	2x 10 J/cm ² UV-A	37	31	1,5	0	14	RGP
15J	2x 10 J/cm ² UV-A	46	46	2	0	18	RGP
21J	2x 15 J/cm ² UV-A	42	6	1	1	13	Met
21K	2x 15 J/cm ² UV-A	43	-5	1	2	15	Met
21L	2x 15 J/cm ² UV-A	47	-32	2	3	19	Met
10E	2x 15 J/cm ² UV-A	4	0	1	1	17	RGP
11E	2x 15 J/cm ² UV-A	0	-12	1,5	1,5	17	RGP
13G	2x 15 J/cm ² UV-A	0	0	0,5	2	13	RGP
13H	2x 15 J/cm ² UV-A	41	36	1,5	1	17	RGP
13I	2x 15 J/cm ² UV-A	42	39	1	0,5	19	RGP
14T	2x 15 J/cm ² UV-A	48	15	1	3	15	RGP
14U	2x 15 J/cm ² UV-A	51	14	2	0,5	19	RGP
20M	2x 15 J/cm ² UV-A	0	-6,5	0,5	2	11	VGP
20P	2x 15 J/cm ² UV-A	0	-6,5	0	1	11	VGP
20N	2x 15 J/cm ² UV-A	28	18,5	1	2	15	VGP
20Q	2x 15 J/cm ² UV-A	3	-6,5	0,5	2	15	VGP
20U	2x 15 J/cm ² UV-A	0	-6,5	0	3	13	VGP
20O	2x 15 J/cm ² UV-A	0	0	0,5	2	19	VGP
20R	2x 15 J/cm ² UV-A	1	1	1	3	19	VGP
20T	2x 15 J/cm ² UV-A	0	0	0	3	19	VGP

15H	3x 10 J/cm² UV-A	37	31	1	0	16	RGP
15K	3x 10 J/cm² UV-A	19	19	1,5	0,5	18	RGP
13J	3x 15 J/cm² UV-A	3	3	0,5	2	15	RGP
13K	3x 15 J/cm² UV-A	16	11	2	2	17	RGP
13L	3x 15 J/cm² UV-A	23	20	1	0,5	19	RGP
14V	3x 15 J/cm² UV-A	13	-20	2	0,5	17	RGP
14X	3x 15 J/cm² UV-A	49	12	1	0,5	19	RGP
20J	3x 15 J/cm² UV-A	11	4,5	0,5	3	13	VGP
20K	3x 15 J/cm² UV-A	3	-6,5	0,5	3	15	VGP
20L	3x 15 J/cm² UV-A	10	10	1	1,5	19	VGP
15I	4x 10 J/cm² UV-A	29	29	1,5	0	18	RGP
15L	4x 10 J/cm² UV-A	18	18	2	0,5	18	RGP
21D	1x 50 mJ/cm² UV-B	35	-1	3	2	13	Met
21E	1x 50 mJ/cm² UV-B	25	-23	2	2	15	Met
21F	1x 50 mJ/cm² UV-B	24	-55	3	2	19	Met
10A	1x 50 mJ/cm² UV-B	0	-4	1	3	17	RGP
13R	1x 50 mJ/cm² UV-B	0	-3	1	2	19	RGP
14D	1x 50 mJ/cm² UV-B	0	0	3	1,5	11	RGP
14E	1x 50 mJ/cm² UV-B	8	-25	1	2	15	RGP
14F	1x 50 mJ/cm² UV-B	7	-30	2	2	19	RGP
16B	1x 50 mJ/cm² UV-B	20	20	2,5	1	15	RGP
16E	1x 50 mJ/cm² UV-B	31	-12	1,5	0,5	19	RGP
19E	1x 50 mJ/cm² UV-B	16	-6	2	1	11	VGP
15A	1x 60 mJ/cm² UV-B	0	-6	1,5	1	12	RGP
15D	1x 60 mJ/cm² UV-B	0	0	1	1	16	RGP
9G	1x 100 mJ/cm² UV-B	4	-26	1,5	3	12	Met
9H	1x 100 mJ/cm² UV-B	15	-18	2	1,5	16	Met
9I	1x 100 mJ/cm² UV-B	21	-11	1	3	20	Met
10C	2x 50 mJ/cm² UV-B	21	17	1,5	0,5	17	RGP
11C	2x 50 mJ/cm² UV-B	0	-12	1	1	17	RGP
14G	2x 50 mJ/cm² UV-B	3	3	2	2	13	RGP
14I	2x 50 mJ/cm² UV-B	18	-19	1	1	19	RGP
16C	2x 50 mJ/cm² UV-B	35	35	1	0,5	15	RGP
16F	2x 50 mJ/cm² UV-B	2	-41	1,5	1,5	19	RGP
15B	2x 60 mJ/cm² UV-B	0	-6	1	0,5	12	RGP
15E	2x 60 mJ/cm² UV-B	0	0	0	1	18	RGP
9J	100+50 mJ/cm² UV-B	7	-23	1,5	1,5	14	Met
9K	100+50 mJ/cm² UV-B	1	-32	1	1	16	Met
9L	100+50 mJ/cm² UV-B	24	-8	1,5	2	20	Met

14J	3x 50 mJ/cm² UV-B	20	-13	2	1	15	RGP
14L	3x 50 mJ/cm² UV-B	21	-16	1	1	19	RGP
15C	3x 60 mJ/cm² UV-B	0	-6	0	1	16	RGP
15F	3x 60 mJ/cm² UV-B	0	0	0,5	0,5	18	RGP
10B	50 mJ/cm² UV-B + 15 J/cm² UV-A	11	7	2	1	17	RGP

Tabelle 19: Erhobene Daten aller Experimente

Nr : Bezeichnung des Rekonstrukts

Bestrahlungsmodus: Qualität, Anzahl und Dosis der UV-Bestrahlung

Epidermis/Dermis: Dicke der Epidermis und Dermis der Hautrekonstrukte (0 : Nicht vorhanden, 1 : ≤ 4 Zelllagen, 2 : 5-10 Zelllagen, 3 : ≥ 11 Zelllagen)

Tumorscore: Anzahl der Tumorzellnester pro Rekonstrukt mal TumorgroÙe (1: Kleiner Tumor 3-6 Zellen

2: MittelgroÙer Tumor 7-15 Zellen, 3: GroÙer Tumor ≥ 16 Zellen)

Tumorscoredifferenz: Tumorscore des bestrahlten Rekonstrukts minus Tumorscore der unbestrahlten Kontrolle

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALM	Akrolentiginöses Melanom
Bcl-2	Protoonkogen (B-Zellen-Lymphom)
bFGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BM	Basalmembran
BPE	Rinderhypophysenextrakt (bovine pituitary extract)
B-RAF	Onkogen B-RAF
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 2A
c-Myc	Protoonkogen c-Myc
d	Tag des Erntens
dFKS	Dialysiertes fötales Kälberserum
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthrazen
DME(M), EMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EPI	Epidermalisierungsmedium
ET	Endothelin
F-12	HAM's Nutrient Medium F-12
FCM	Fibroblasten Kulturmedium
FKS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-/Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HaCat	Humane Kerationzytenzelllinie
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonessig
HF	Humane Fibroblasten
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
HK	Humane Keratinozyten
HMB-45	Monoklonaler Antikörper (human melanoma black)
hMSH2	DNS-Reparatursystem hMSH2
IL	Interleukin
INF α	Interferon alpha
ITES	Insulin, Transferrin, Ethanolamin, Selensäure
L-15	Leibovitzmedium
LMM	Lentigo maligna Melanom
MCDB 153	Basalmedium
MCR1	Melanocortinrezeptor 1
MED	Minimale Erythemdosis
Met	Metastasierend
min	Minuten
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
NBCS	Serum neugeborener Kälber (newborn calf serum)

NMM	Noduläres malignes Melanom
Nr.	Nummer
NZN	Nävuszellnävus
O-PEA	O-Phosphorylethan
P	Passage
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Thrombozytenwachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PUVA	Psoralen plus ultraviolette Strahlung A
RAS	Protoonkogen RAS
RGP	Horizontale Wachstumsphase (radial growth phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RSR	Reaktive Sauerstoffradikale
SCF	Stammzellfaktor
SBZ	Sonnenbrandzellen
SFM	Serumfreies Medium
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
Tab.	Tabelle
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	Inhibitor der Matrixmetalloproteinase
TIT	Trijodthyronin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tu 2%	Tumormedium
TPras	Onkogen TPras
Tyr	Tyrosinase
UV	Ultraviolett
UV-A	Ultraviolette Strahlung A
UV-B	Ultraviolette Strahlung B
VGP	Vertikale Wachstumsphase (vertical growth phase)

8. Literaturverzeichnis

- [1] Hölzle E (2003) Photodermatosen und Lichtreaktion der Haut. 1. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- [2] Ortonne JP, Schwarz T (2003) Klinik und Pathogenese UV-induzierter Pigmentveränderungen. JDDG 1:274-284
- [3] Rütger TM (1995) Genotoxizität, Mutagenität und Karzinogenität von UVA und UVB. H+G 70 (12):877-881
- [4] Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A (2005) Review: Mutations induced by ultraviolet light. Mutat Res 571:19-31
- [5] Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (1997) Dermatologie und Venerologie. 4. Auflage Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- [6] Lens MB, Dawes M (2004) Topical Review: Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol 150:179-185
- [7] Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW, Bologna JL (2004) Cutaneous melanoma - Past, present, and future. J Am Acad Dermatol 51 (1):65-69
- [8] Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ (2003) Cutaneous melanoma. 4. Edition Quality Medical Publishing, St. Louis
- [9] Thompson JF, Scoyler RA, Kefford R (2005) Cutaneous melanoma. Lancet 365:687-701
- [10] Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (1997) Dermatologische Onkologie. 1. Auflage Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [11] Hölzle E, Kind P, Plewig G, Burgdorf W (1993) Malignant melanoma, diagnosis and differential diagnosis. English edition, Schattauer Stuttgart - New York
- [12] Rütger TM (1999) Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer: a short review. Photodermatol Photoimmunol Photomed 15(6):212-216
- [13] Chung ES, Sabel MS, Sondak VK (2004) Current state of treatment for primary cutaneous melanoma. Clin Exp Med 4:65-77
- [14] Berking C, Herlyn M (2001) Review: Human skin reconstruct models: A new application for studies of melanocyte and melanoma biology. Histol Histopathol 16:1-6
- [15] Eves P, Layton C, Hedely S, Dawson RA, Wagner M, Morandini R, Ghanem G, Mac Neil S (2000) Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human skin. Br J Dermatol 142:210-222
- [16] Jung EG, Moll I (2003) Dermatologie. 5. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [17] Thomas C (1998) Histopathologie, Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen

- [18] Meier F, Nesbit M, Hsu MY, Martin B, Van Belle P, Elder DE, Schaumburg-Lever G, Garbe C, Walz TM, Donatien P, Crombleholme TM, Herlyn M (2000) Human melanoma progression in skin reconstructs, biological significance of bFGF. *Am J Pathol* 156 (1):193-208
- [19] Brenner M, Degitz K, Besch R, Berking C (2005) Differential expression of melanoma-associated growth factors in keratinocytes and fibroblasts by ultraviolet A and ultraviolet B radiation. *Br J Dermatol* 153(4):733-739
- [20] Berking C (2005) Bedeutung von ultravioletter Strahlung beim malignen Melanom. *Hautarzt* 56:687-697
- [21] Jhappan C, Noonan FP, Merlino G (2003) Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22:3099-3112
- [22] Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K, Shirakawa T, Eskandarpour M, Hansson J, Van Belle PA, Elder DE, Herlyn M (2004) Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer Res* 64:807-811
- [23] Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K, Elenitsas R, Herlyn M (2001) Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. *Am J Pathol.* 158 (3):943-953
- [24] Berking C, Takemoto R, Binder RL, Hartmann SM, Rüter D, Gallagher PM, Lessin SR, Herlyn M (2002) Photocarcinogenesis in human adult skin grafts. *Carcinogenesis* 23 (1):181-187
- [25] Ma W, Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, Schüller J, Scharffetter-Kochanek K (2001) Review article: chronological ageing and photoageing of the fibroblast and the dermal connective tissue. *Clin Exp Dermatol* 26:592-599
- [26] Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst A, Goerz G, Krieg T, Plewig G (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res* 283:506-511
- [27] Fagot D, Asselineau D, Bernerd F (2002) Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation. *Arch Dermatol Res* 293:576-583
- [28] Jamal S, Schneider RJ (2002) UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin Invest* 110 (4):443-452
- [29] Herlyn M, Berking C, Li G, Satyamoorthy K (2000) Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Research* 10:303-312
- [30] Perlis C, Herlyn M (2004) Recent Advances in Melanoma Biology. *The Oncologist* 9:182-187

- [31] Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001) Downregulation of E-cadherin and desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20:8125-8135
- [32] Herlyn M, Shih IM (1994) Interactions of melanocytes and melanoma cells with the microenvironment. *Pigment Cell Res* 7:81-88
- [33] Dekker SK, van Doorn R, Kempenaar J, Gruijs NA, Vermeer BJ, Ponc M (2000) Skin equivalent: an attractive model to evaluate early melanoma metastasis. *Melanoma Res* 10:127-140
- [34] Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, Bart RS (2001) Ultraviolet A and melanoma: A review. *J Am Acad Dermatol* 44 (5):837-846
- [35] Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricke A, Eberle C, Barnhill R (2005) Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst* 97 (3):195-198
- [36] Egan KM, Sosman JA, Blot WJ (2005) Sunlight and reduced risk of cancer: Is the real story vitamin D ? *J Natl Cancer Inst* 97 (3):161-162
- [37] Rivers JK (2004) Rapid review: Is there more than one road to melanoma ? *Lancet* 363:728-730
- [38] Smedby KE, Hjalgrim h, Melbye M, Torrang A, Rostgaard K, Munksgaard L et al. (2005) Ultraviolet radiation exposure and risk of malignant lymphomas. *J Natl Cancer Inst* 97 (3):199-209
- [39] Hussein MR, Hassan M, Wood GS (2003) Morphological changes and apoptosis in radial growth phase melanoma cell lines following ultraviolet-B irradiation. *Am J Dermatopathol* 25 (6):466-472
- [40] Hussein MR (2004) Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol* 57:797-801
- [41] Polsky D, Cordon-Cardo C (2003) Oncogenes in melanoma. *Oncogene* 22:3087-3091
- [42] Ley RD (1997) Ultraviolet radiation A-induced precursors of cutaneous melanoma in *Monodelphis domestica*. *Cancer Res* 57:3682-3684
- [43] Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6666-6670
- [44] Kvam E, Tyrrell RM (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 18:2379-2384
- [45] Marrot L, Belaidi JP, Meunier JP, Perez P, Agapakis-Causse C (1999) The human melanocyte as a particular target for UVA radiation and an endpoint for photoprotection assessment. *Photochem Photobiol* 69:686-693
- [46] Krenkel S, Alexander M, Brinckmann J, Tronnier M (2002) MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP are differentially expressed in lesional skin of melanocytic nevi and their

expression is modulated by UVB-light. *J Cutan Pathol* 29:390-396

- [47] Stetler-Stevenson WG, Yu AE (2001) Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Sem Cancer Biol* 11:143-152
- [48] Stamenkovic I (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Sem Cancer Biol* 10:415-433
- [49] Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 340 (17):1341-1348
- [50] Moan J, Dahlback A, Setlow RB (1999) Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochem Photobiol* 70 (2):243-247
- [51] Ortonne JP (2002) Photobiology and genetics of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 146 (Suppl.61):11-16
- [52] Löffler G, Petrides PE (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*. 6.Auflage Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- [53] Ischihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* 189:21-39
- [54] Dahle J, Kvam E (2003) Induction of delayed mutations and chromosomal instability in fibroblasts after UVA-, UVB-, and X-radiation. *Cancer Res* 63:1464-1469
- [55] Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF (2004) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 41:45-60
- [56] Tucker MA, Goldstein AM (2003) Melanoma etiology: where are we ? *Oncogene* 22 :3042-3052
- [57] Fritsch P (2004) *Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas*. 2.Auflage Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [58] Gontier E, Cario-Andre M, Lepreux S, Vergnes P, Bizik J, Surleve-Bazeille JE, Taieb A (2002) Dermal nevus cells from congenital nevi cannot penetrate the dermis in skin reconstructs. *Pigment Cell Res* 15:41-48
- [59] Tronnier M, Alexander M, Neitmann M, Brinckmann J, Wolff HH (2000) Morphologische Veränderungen in melanozytären Nävi durch exogene Faktoren. *Hautarzt* 51:561-566
- [60] Tronnier M, Wolff HH (1995) UV-irradiated melanozytic nevi simulating melanoma in situ. *Am J Dermatopathol* 17 (1):1-6
- [61] Tronnier M, Smolle J, Wolff HH (1995) Ultraviolet irradiation induces acute changes in melanozytic nevi. *J Invest Dermatol* 104 (4):475-478

- [62] Böni R, Matt D, Burg G, Tronnier M, Vortmeyer A, Zhuang Z (1998) Ultraviolet-induced acute histological changes in irradiated nevi are not associated with allelic loss. *Arch Dermatol* 134:853-856
- [63] Kelsall SR, Mintz B (1998) Metastatic cutaneous melanoma promoted by ultraviolet radiation in mice with transgene-initiated low melanoma susceptibility. *Cancer Res* 58:4061-4065
- [64] Broome Powell M, Gause PR, Hyman P, Gregus J, Lluria-Prevatt M, Nagle R, Bowden GT (1999) Induction of melanoma in Tpr^{ras} transgenic mice. *Carcinogenesis* 20 (9):1747-1753
- [65] Noonan FP, Otsuka T, Bang S, Anver MA, Merlino G (2000) Accelerated ultraviolet radiation-induced carcinogenesis in hepatocyte growth factor/scatter factor transgenic mice. *Cancer Res* 60:3738-3743
- [66] Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, DeFabio EC, Merlino G (2001) Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 413:271-272
- [67] DeFabio EC, Noonan FP, Fears T, Merlino G (2004) Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res* 64:6372-6376
- [68] Kadokaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek Z (2003) Review : cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round ? *Pigment Cell Res* 16:434-447
- [69] Mudgil AV, Segal N, Andriani F, Wang Y, Fusenig NE, Garlick JA (2003) Ultraviolet B irradiation induces expansion of intraepithelial tumor cells in tissue model of early cancer progression. *J Invest Dermatol* 121 (1):191-197
- [70] Vaccariello MA, Javaherian A, Parenteau N, Garlick JA (1998) Use of skin equivalent technology in a wound healing model. *Methods in molecular medicine, vol.18: tissue engineering methods and protocols* S.391-400, Human Press Inc.Totowa
- [71] Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA (1995) Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 104 (5):859-867
- [72] Bechetoille N, Haftek M, Staquet MJ, Cochran AJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O (2000) Penetration of human metastatic melanoma cells through an authentic dermal-epidermal junction is associated with dissolution of native collagen types IV and VII. *Melanoma Res* 10:427-434
- [73] Stern RS, Nichols KT, Vakeva LH (1997) Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA): the PUVA follow-up study. *N Engl J Med* 336:1041-1045
- [74] Hannuksela-Svahn A, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Lindelof B, Berne B, Hannuksela M, et al. (1999) Trioxsalen bath PUVA did not increase the risk of squamous cell skin carcinoma and cutaneous malignant melanoma in a joint analysis of 944 Swedish and Finnish patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 141:497-501

- [75] Lindelof B, Sigurgeirsson B, Tegner E, Larko O, Johannesson A, Berne B, et al. (1999) PUVA and cancer risk: the Swedish follow-up study. *Br J Dermatol* 141:108-112
- [76] Swerdlow AJ, Weinstock MA (1998) Do tanning lamps cause melanoma? An epidemiologic assesment. *J Am Acad Dermatol* 38:89-98

9. Danksagung

Diese Danksagung richtet sich an alle, die es mir ermöglicht haben, meine Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München verfassen zu können. Besonders danke ich Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. Gerd Plewig für die Möglichkeit, in den Laboratorien der Klinik arbeiten zu dürfen.

Frau Privatdozentin Dr. med. Carola Berking danke ich besonders herzlich für die gute Betreuung meiner Arbeit, für die fachliche Unterstützung und die stete Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, und vor allem für den wissenschaftlichen Dialog.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Ursula Nägele für die histologische Gewebefixierung und das Schneiden der Rekonstrukte. Mit allen Fragen bezüglich des Laboralltags konnte ich mich stets an sie wenden und auf ihre tatkräftige Unterstützung zählen.
Herrn Harraßer und seinem gesamten Team im Histologielabor danke ich für die Kooperation und die Färbung der histologischen Schnitte.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und den Beistand, auch in schwierigen Zeiten, der Grundstein für das Gelingen dieser Arbeit war.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hölzle
Vorname	Kathrin Margret
Geburtsdatum	24.11.1978
Geburtsort	München
Eltern	Prof. Dr. med. Erhard Hölzle, Dermatologe Helga Hölzle, Realschullehrerin
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

08/1985 – 06/1989	Grundschule am Rheindorferweg in Düsseldorf
08/1989 – 06/1995	St. Ursula Gymnasium Düsseldorf
09/1995 – 06/1998	Gymnasium Unterhaching, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
06/1998	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1998 – 05/2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2000	Ärztliche Vorprüfung
08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04/2004 – 08/2004	Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität München
08/2004 – 10/2004	Austin&Repatriation Medical Centre (Gastroenterologie), University of Melbourne
10/2004 – 11/2004	Royal North Shore Hospital (Endokrinologie, Hämatologie), Northern Clinical School, University of Sydney
11/2004 – 03/2005	Städt. Krankenhaus München-Harlaching (Chirurgie)

Beruflicher Werdegang

seit 12/2005	Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Essen
--------------	---