

Aus dem zellbiologischen Labor der Klinik für Dermatologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Klinikdirektorin Frau Professor Doktor I. Moll

**Einsatz von Gap-Junction und Tight-Junction Proteinen für die
Diagnostik und Prognose des malignen Melanoms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Diane Ripperger

aus Hannover

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 12.05.2009

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. I. Moll
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Schumacher
3. Gutachterin: PD Dr. J. Brandner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gap Junctions und Connexine	1
1.2	Interaktion von Connexinen und Protein ZO-1	4
1.3	Connexine, Protein ZO-1 und Tumorgenese	4
1.4	Connexine, Protein ZO-1 und malignes Melanom	6
1.5	Fragestellung	7
2	Material	9
2.1	Untersuchungsgut.....	9
2.2	Geräte.....	9
2.3	Chemikalien	10
2.4	Material Immunhistochemie	11
2.4.1	Primärantikörper	11
2.4.2	Sekundärantikörper.....	12
2.4.3	Isotypenkontrollen.....	12
2.4.4	DNA-Färbung.....	12
2.5	Puffer und Lösungen.....	13
3	Methoden	14
3.1	Auswahl der Gewebeproben.....	14
3.2	Herstellung der Paraffinschnitte	14
3.3	Immunfluoreszenzfärbung	14
3.4	Auswertung.....	16
3.5	Statistische Auswertung.....	17

4 Ergebnisse	19
4.1 Klinische und histologische Charakteristika der melanozytären Naevi und malignen Melanome	21
4.2 Connexin 26.....	22
4.2.1 Lokalisation von Connexin 26 in Tumorzellen.....	22
4.2.2 Lokalisation von Connexin 26 in der angrenzenden Epidermis	24
4.2.3 Korrelation zwischen Connexin 26-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index	29
4.3 Connexin 30.....	32
4.3.1 Lokalisation von Connexin 30 in Tumorzellen.....	32
4.3.2 Lokalisation von Connexin 30 in der angrenzenden Epidermis	34
4.3.3 Korrelation zwischen Connexin 30-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index	38
4.4 Connexin 43.....	40
4.4.1 Lokalisation von Connexin 43 in Tumorzellen.....	40
4.4.2 Lokalisation von Connexin 43 in der angrenzenden Epidermis	42
4.4.3 Korrelation zwischen Connexin 43-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index	45
4.5 ZO-1.....	46
4.5.1 Lokalisation von ZO-1 in Tumorzellen.....	46
4.5.2 Lokalisation von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis	48
4.5.3 Korrelation zwischen ZO-1-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index	51
4.6 Vergleich zwischen melanozytären Naevi und malignen Melanomen	52
4.7 Zusammenhang zwischen Expression der Connexine bzw. ZO-1 und dem Überleben der Patienten	55

4.8 Zusammenhang zwischen Expression der Connexine bzw. ZO-1 und der Metastasenbildung.....	56
5 Diskussion.....	60
5.1 Eignung der Expression von Cx26, Cx30, und Cx43 im malignen Melanom als Tumormarker	60
5.2 Eignung der Expression von ZO-1 im Tumor als Tumormarker.....	63
5.3 Eignung der Lokalisation von Cx26, Cx30, und Cx43 in der Umgebung des Tumors als Tumormarker	64
5.4 Eignung des Nachweises der Lokalisation von ZO-1 in der Umgebung des Tumors als Tumormarker	67
5.5 Zusammenhang zwischen Progression des Melanoms und Lokalisation von Cx26, Cx30 und Cx43 in der umgebenden Epidermis	68
5.6 Zusammenhang zwischen Progression des Melanoms und Lokalisation von ZO-1 in der umgebenden Epidermis	70
5.7 Zusammenhang zwischen Expression der Connexine bzw. ZO-1 und dem Überleben der Patienten	71
6 Zusammenfassung.....	73
7 Abbildungsverzeichnis.....	74
8 Tabellenverzeichnis	79
9 Literaturverzeichnis	80
10 Lebenslauf.....	84
11 Eidesstattliche Erklärung.....	85
12 Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CEACAM1	Carcino-emryonic antigen-like cell adhesion molecule 1
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cx26	Connexin 26, Gap Junction-Protein
Cx30	Connexin 30, Gap Junction-Protein
Cx43	Connexin 43, Gap Junction-Protein
Da	Dalton, Masseeinheit
DNA	Desoxyribonucleinsäure
HMB45	Human Melanoma Black, monoklonaler Antikörper
IFN- β	Beta-Interferon
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton = 1000 Dalton, Masseeinheit
L1	L1 cell adhesions molecule
M	Mol
Melan A	Melanom-assoziiertes Antigen
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μm	Mikrometer
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

S.	Seite
s	Sekunde
S 100	S100-Protein als Melanom-assoziiertes Antigen
SH3-Domäne	Src-homology region 3
TEC	Tris-EDTA-Citrat-Puffer
W	Watt
ZO-1	Zonula occludens-Protein 1, Tight Junction-Protein
°C	Grad Celsius

Meinen Eltern gewidmet

1 Einleitung

Die Kommunikation zwischen Zellen ist essentiell für ihre Funktionen und ihr Überleben. Man kann dabei direkte Kommunikation, d.h. den direkten Austausch von Molekülen von einer Zelle zur nächsten über so genannte Gap Junctions, und indirekte Kommunikation, d.h. über extrazelluläre Signalmoleküle, z.B. Cytokine, und deren Rezeptoren, unterscheiden. Bei malignen Erkrankungen verändert sich die Kommunikation zwischen Zellen.

1.1 Gap Junctions und Connexine

Gap Junctions sind Zell-Zell-Kontakte, die ein Kanalsystem zwischen benachbarten Zellen bilden. Aufgebaut sind die Gap Junctions aus Transmembranproteinen, die sich Connexine nennen. Ein Connexin besteht aus 4 Transmembrandomänen, 2 Extrazellulärdomänen, einer intrazellulären Schleife und einem cytoplasmatischen Carboxy- und einem cytoplasmatischen Aminoende (Yeager und Nicholson 1996). 6 Connexine bilden ein Connexon, das in die Plasmamembran eingebettet ist. Zwei gegenüberliegende Connexone benachbarter Zellen legen sich mit ihren Extrazellulärdomänen im Interzellularraum zu einem Kanal zusammen. Einige wenige bis viele tausend Kanäle bilden eine Gap Junction (Abb. 1). Es sind bisher 21 Subtypen von Connexinen identifiziert worden, wobei die Nomenklatur auf dem Molekulargewicht der Proteine basiert. Die Connexine unterscheiden sich vor allem im Aufbau der intrazellulären Schleife und dem Carboxyende (Richard 2000). Connexone können homomer, aus einer Art von Connexinen, oder heteromer, aus verschiedenen Connexinen aufgebaut sein. Die interzellulären Kanäle können dementsprechend aus einer Connexon-Art (homotypisch), aus zwei Connexon-Arten mit je identischen Connexinen (heterotypisch) oder aus zwei Connexonen mit unterschiedlichen Connexinen (heteromer) aufgebaut

sein. Die Bildung homotypischer, heteromerer oder heterotypischer Kanäle ist von der Kompatibilität der Extrazellulärdomänen der Connexine abhängig (White et al. 1995).

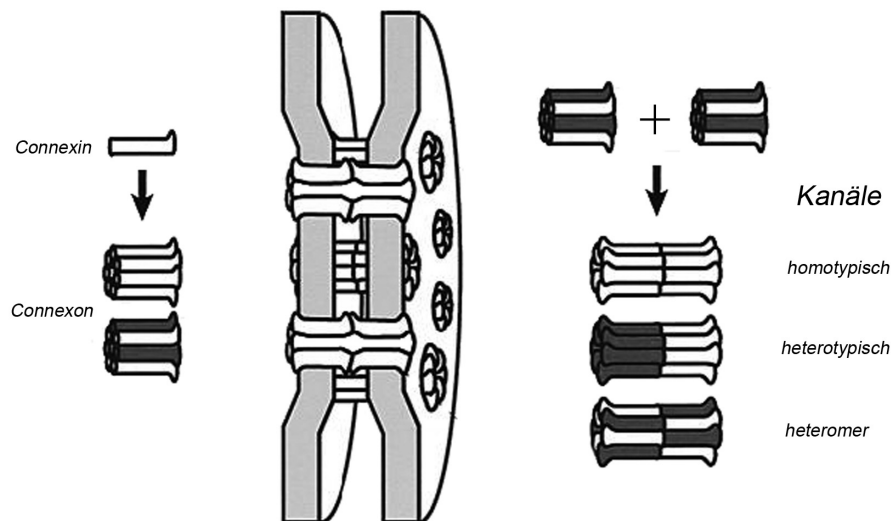


Abbildung 1: Zusammensetzung von Connexinen zu Connexonen zu Gap Junctions. Abb. nach G. Richard.

Die interzellulären Kanäle verbinden das Cytoplasma benachbarter Zellen und erlauben die Passage von kleinen Molekülen bis zu 1200 Da (Loewenstein 1981). So findet ein Austausch von Ionen, Metaboliten und Second-Messenger-Molekülen statt, der eine interzelluläre Kommunikation ermöglicht. Die Permeabilität der Kanäle ist variabel. Sie ist spannungsabhängig, wird von der Calciumkonzentration und dem pH-Wert der Zelle beeinflusst und kann durch Phosphorylierung der Connexine variiert werden. Des Weiteren sind bestimmte Connexonarten für spezifische Moleküle permeabel. Es wurde gezeigt, dass homotypische Cx26 - Kanäle den Kationenaustausch ermöglichen, während homotypische Cx32 - Kanäle für Anionen permeabel sind (Veenstra 1996). In verschiedenen Arbeiten konnte die spezifische Permeabilität von Gap-Junction-

Kanälen für Second Messenger, wie Calcium, Inositoltrisphosphat und zyklische Nukleotide (cAMP und cGMP) gezeigt werden (Bevans *et al.* 1998; Saez *et al.* 1989). Die veränderte Expression von Connexinen durch einen Connexin-Wechsel oder die Hoch- und Runterregulation verschiedener Connexin-Arten hat somit Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation (Hsu *et al.* 2000).

Connexine sind nicht organspezifisch (Bruzzone *et al.* 1996), das bedeutet, eine Connexinart wird in verschiedenen Organen exprimiert und auch in einem Organ sind verschiedene Connexinarten zu finden. Es sind alleine zehn verschiedene Connexine in der menschlichen Haut nachgewiesen worden (Di *et al.* 2001; Willecke *et al.* 2002). Cx43 ist das am häufigsten vertretene Connexin in der humanen interfollikulären Epidermis. Es ist in allen Schichten der Epidermis zu finden und auch in seborrhischen Drüsen und Haarfollikeln (Tada und Hashimoto 1997). Cx26 konnte vor allem im Stratum basale der Haut von Handflächen und Fußsohlen nachgewiesen werden. Außerdem gibt es eine hohe Expression von Cx26 in Haarfollikeln und eccrinen Schweißdrüsen (Lucke *et al.* 1999; Salomon *et al.* 1994). In einer Zelle können verschiedene Arten von Connexinen zu finden sein.

Immunhistochemische Untersuchungen von muriner Embryonalhaut zeigten, dass die Differenzierung und Schichtung der Epidermis in der Entwicklung des Embryos mit einer Veränderung der Connexinexpression einhergeht (Choudhry *et al.* 1997). Die Hoch- oder Runterregulation verschiedener Connexin-Arten in einem Gewebe zeigte sich auch in Versuchen zur Proliferation und Differenzierung der Haut. In Tape-Strip-Experimenten, die einen Barriereverlust und häufig eine Hyperproliferation der Haut bewirken, konnte eine Induktion der Expression von Cx26 in der interfollikulären Haut festgestellt werden (Lucke *et al.* 1999). Versuche zur Wundheilung zeigten ebenfalls eine Induktion der Expression von Cx26 und Cx30 im Bereich der Wundränder (Brandner *et al.* 2004). Es wird angenommen, dass für Phasen raschen Wachstums und Differenzierung eine veränderte interzelluläre Kommunikation vonnöten ist. Zu diesem Thema konnte in der Arbeit von Djalilian (2006) gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cx26 den Erwerb der epidermalen Barrierefunktion in

Mäuseembryos beeinflusst, zu einer gesteigerten interzellulären Kommunikation führt und epidermale Hyperproliferation stimuliert.

1.2 Interaktion von Connexinen und Protein ZO-1

Das Zonula occludens Protein 1 (ZO-1) ist ein membran-assoziiertes Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 220 kDa. Es beinhaltet 3 PDZ-Domänen (wichtig für Protein-Protein-Interaktionen), eine SH3-Domäne (src-homology region 3) und eine GUK-Domäne (guanylyl kinase-like domain). Das primär als Tight Junction-Protein beschriebene ZO-1 ist auch in Adhärenzverbindungen nachgewiesen worden und geht zudem eine Interaktion mit verschiedenen Connexinen ein, wie z.B. Cx43. Cx43 bindet mit seinem Carboxyende an die PDZ-Domäne von ZO-1 (Giepmans 2004). Es wurde dabei ZO-1 eine Funktion bei der Zusammensetzung von Proteinen zu Gap Junctions und eine Größenregulation der Gap Junctions zugesprochen (Giepmans und Moolenaar 1998).

1.3 Connexine, Protein ZO-1 und Tumorgenese

Eine wichtige Rolle scheint die Connexin-Expression auch während der Tumorgenese zu spielen. Es wurde in verschiedenen Versuchen deutlich, dass die veränderte Expression und Funktion der Connexine eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums einnimmt. Im Magenkarzinom wurde ein Verlust von Cx32 festgestellt (Uchida *et al.* 1995), Cx43 ist im Prostatakarzinom (Tsai *et al.* 1996) und im Gliom (Huang *et al.* 1998) herunterreguliert. In Lungenkrebszellen sind beide Moleküle, Cx32 und Cx43 deutlich reduziert (Jinn *et al.* 1998). Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, dass eine verminderte Connexin-Expression ein Marker für die Tumorentwicklung und dass die intakte interzelluläre Kommunikation ausschlaggebend für eine Wachstumskontrolle unter benachbarten Zellen sein könnte. Untersuchungen, die zeigten, dass Signale, die eine Zerstörung von Zellen anzeigen, wie z.B. eine erhöhte Calciumkonzentration, über Gap Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation zwischen benachbarten Zellen weitergeleitet wurden

(Krutovskikh *et al.* 2002), bekräftigten die Vermutung, dass eine verminderte oder veränderte Expression von Connexinen und der damit einhergehende Verlust von interzellulärer Kommunikation (Grossman *et al.* 1994) die Tumorzellen in ihrem Wachstum autonom macht.

In Untersuchungen verschiedener epidermaler Neoplasien fand sich eine Herunterregulation von Cx43, die mit dem Verlust der interzellulären Kommunikation einherging. Es wurde festgestellt, dass in Spinaliomen und Basaliomen Cx26 hingegen hochreguliert war. Nur in invasiven Bereichen des Spinalioms, bzw. in der angrenzenden Epidermis, konnte es vermindert oder gar nicht nachgewiesen werden (Haass *et al.* 2006; Kamibayashi *et al.* 1995; Sawey *et al.* 1996; Tada and Hashimoto 1997).

Auch für Protein ZO-1 wurde eine Rolle in der Tumorgenese postuliert. Während im Mammakarzinom und im Colonkarzinom eine verminderte Expression von ZO-1 beobachtet wurde, fand sich im Pankreaskarzinom eine vermehrte Expression des Tight-Junction-Proteins (Hoover *et al.* 1998; Kleeff *et al.* 2001). Diese Diskrepanz führte zu der Vermutung, dass im Falle der verminderten ZO-1-Expression die Lockerung der Zellverbände und damit eine erhöhte Motilität der Zellen Voraussetzung für eine Invasion ins umliegende Gewebe sei. Die gesteigerte Expression von ZO-1 ließ eine gleichzeitige Dysregulation der Tight Junctions vermuten, die ebenfalls eine Ausbreitung des Tumors ermöglichen könnte. In epidermalen Tumoren wurde eine starke Expression von ZO-1 in Keratin-bildenden Zellen des Spinalioms gefunden. Die entdifferenzierteren Spinaliomzellen ohne Keratinproduktion zeigten allerdings verminderte oder fehlende ZO-1-Expression (Morita *et al.* 2004). So korreliert der Verlust der Differenzierung mit dem Verlust von ZO-1-Proteinen. Im Merkelzellkarzinom wurde ZO-1 nachgewiesen. Die Funktion von Tight Junction-Proteinen oder Tight Junctions in Tumoren ist noch nicht bekannt. Wenn von der Bildung funktionstüchtiger Tight Junctions ausgegangen wird, könnten die Tight Junctions zur Isolation der Tumorzellen vom umgebenden Gewebe beitragen. Die Abschottung des Tumors gegen zellzerstörende Signale

aus dem umliegenden gesunden Gewebe wäre somit Grundlage für autonomes Wachstum (Haass *et al.* 2003). Gegebenenfalls erfüllen die Tight Junction-Proteine, vor allem ZO-1, aber Tight Junction unabhängige Funktionen.

1.4 Connexine, Protein ZO-1 und malignes Melanom

Der melanozytäre Naevus mit ausdifferenzierten Melanozyten (Kerl *et al.* 2003) kann in der Entwicklung eines malignen Melanoms zum dysplastischen Naevus werden. In ihm finden sich strukturell atypische Zellen, die maligne entarten können. Es folgt die radiale Wachstumsphase des malignen Melanoms in situ, an die sich die vertikale Wachstumsphase mit Invasion der Dermis anschließt. Es besteht das Potential zur Metastasierung, das dann als metastasierendes Melanom bezeichnet wird. Mit Hilfe des histologisch ermittelten Breslow-Index, der Tumordicke in Millimetern, wird die TNM-Stadieneinteilung des malignen Melanoms vorgenommen.

Während in der gesunden Epidermis Melanozyten als epidermale Melanineinheit über Gap Junctions mit Keratinozyten kommunizieren, interagieren Melanomzellen untereinander, mit Fibroblasten und Endothelzellen, aber nicht mit Keratinozyten (Hsu *et al.* 2000). Die Melanomzellen entziehen sich somit der Wachstumskontrolle durch die Keratinozyten und gehen eine Interaktion mit den Zellen der Dermis ein, als Voraussetzung zur dermalen Invasion und eventuellen weiteren Metastasierung. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl Melanozyten als auch Keratinozyten Cx43 exprimieren, was die Vermutung zulässt, dass die Kommunikation der epidermalen Melanineinheit auf Cx43 basiert, das verbreitet in der Epidermis ist.

In der Arbeit von Haass *et al.* (2006) wurde die Expression von Cx26, Cx30 und Cx43 an einer exemplarischen Zahl maligner Melanome untersucht. Weder Cx26 noch Cx30 konnten im malignen Melanom, in Melanommetastasen oder in

melanozytären Naevi nachgewiesen werden. Auch für Cx43 waren die untersuchten Tumoren negativ. Allerdings zeigte sich in der so genannten „adjacent epidermis“ (siehe Abb.2), die als Epidermis über dem Tumor bis zum Tumorrand reichend definiert wurde, eine Expression von Cx26 und Cx30. Cx43 war in allen Schichten der an den Tumor grenzenden Epidermis exprimiert. Da eine vergleichbare Induktion von Cx26 und Cx30 zwar in der umgebenden Epidermis des malignen Merkelzellkarzinoms, nicht aber in der umgebenden Epidermis von semimalignen oder benignen Tumoren, wie z.B. dem Basaliom, dem melanozytären Naevus und dem Angiom gefunden wurden, konnte diskutiert werden, ob diese Induktion ggf. mit der Malignität des Melanoms und seiner Invasivität zusammenhängen könnte.

Eine Arbeit von Smalley und Kollegen zeigte eine vermehrte Expression von ZO-1 im malignen Melanom (Smalley *et al.* 2005). Die experimentell herbeigeführte ZO-1-Herunterregulation ging mit einer veränderten Morphologie der Melanomzellen einher. Es fanden sich abgerundetere und weniger dendritische Zellen, die in vitro, im Kollagengel, weniger adhärend und invasiv wuchsen. Diese Versuche deuten darauf hin, dass die gesteigerte Expression von ZO-1 zum kanzerogenen Verhalten des Melanoms beitragen kann. Es wurde gezeigt, dass ZO-1 im malignen Melanom überwiegend mit Adhärenz-Verbindungen assoziiert ist.

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die bereits exemplarisch beobachtete Induktion von Cx26 und Cx30 in der umgebenden Epidermis von malignen Melanomen an einer größeren Fallzahl zu untersuchen und eine mögliche Korrelation zwischen Ausbreitung der Induktion (horizontal und vertikal) und der Tumorprogression festzustellen. Dabei wurden zum Vergleich auch melanozytäre Naevi untersucht. Zur Vertiefung des Einblicks in die Dynamik der Connexine wurde auch die korrespondierende Lokalisation des ubiquitären epidermalen Cx43, und des interagierenden Proteins ZO-1 in der Epidermis untersucht. Da Arbeiten

aus der Arbeitsgruppe von Nojima (Saito-Katsuragi *et al.*, 2007, Miura *et al.*, 2007, Ohba *et al.*, 2007, Ito *et al.*, 2000, 2004), eine Induktion von Cx26 im malignen Melanom zeigen, wurde nochmals ein besonderes Augenmerk auf die Expression von Cx26, Cx30, Cx43 und ZO-1 in malignen Melanomen verschiedener Stadien und in melanozytären Naevi gelegt.

2 Material

2.1 Untersuchungsgut

Es wurden Hautbiopsien verwendet, die im Rahmen von Gewebeentnahmen zur histologischen Diagnosesicherung von Melanomen in der Klinik für Dermatologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen wurden. Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben beinhalteten meist gesunde Epidermis sowie Tumorgewebe. Bei den Patienten handelte es sich um 17 Frauen und 24 Männer im Alter von 26 bis 91 Jahren. Zusätzlich wurden 14 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben mit melanozytären Naevi verwendet, die von 6 Frauen und 8 Männern im Alter zwischen 14 und 73 stammten. Es handelte sich dabei um 6 dermale und 8 dysplastische melanozytäre Naevi. Die Verwendung der Proben wurde durch die Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigt (Nr.: OB 008/04).

2.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus Typ 6030 (Heraeus Instruments, Hanau)
Feinwaage	Sartorius BP 210D (Sartorius AG, Göttingen)
Kühlschrank	Viessmann (Allendorf)
Magnetrührer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia N.Y., USA)
Mikroskop	Zeiss Axioplan 2 Immunfluoreszens (Zeiss GmbH, Jena) mit CCD-Kamera Hamamatsu C 4742-95 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching)

Mikrowelle	Bosch HMT 882L (Robert Bosch Hausgeräte GmbH)
PH-Meter	Labor PH-Meter 766 (Knick GmbH & Co, Berlin)
Rotatom	Leica RM 2165 (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
Umrandungsstift	Liquid Blocker super Pap-pen (Daido Sangyo Co, Tokyo, Japan)
Waage	Sartorius BL 3100 (Sartorius AG, Göttingen)
Zentrifuge	Heraeus Biofuge pico (Heraeus Instruments, Hanau)

2.3 Chemikalien

CaCl 2H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt
EDTA	Merck KgaA, Darmstadt
Eindeckungsmedium	Fluoromount-G™ (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham)
Ethanol	Th. Geyer GmbH & Co Kg, Hamburg
KCl	Merck KgaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
NaCl	J.T.Baker Mallinckrodt, Deventer, Niederlande
Na ₂ HPO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt
Triton	X-100 Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tris	ultra Pure, Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA
Xylolersatz	XEM 200, Vogel GmbH & CoKG, Giessen

2.4 Material Immunhistochemie

2.4.1 Primärantikörper

Gerichtet gegen:

Connexin 26	Rohserum mit polyklonalem AK des Meerschweins, (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg), Endverdünnung 1:500
Connexin 30	Klon: pAb 71-2200, polyklonaler AK des Kaninchens, IgG, (Zymed Laboratories Inc., San Francisco), Endverdünnung 1:40
Connexin 43	Klon: pAb 71-0700, polyklonaler AK des Kaninchens, IgG, (Zymed Laboratories Inc., San Francisco), Endverdünnung 1:50
ZO-1	Klon: pAb 61-7300, polyklonaler AK des Kaninchens, IgG, (Zymed Laboratories Inc., San Francisco), Endverdünnung 1:150
Melan A	Klon: mAb A103, monoklonaler AK des Maus, IgG1, (Dako A/S, Glostrup), Endverdünnung 1:10

2.4.2 Sekundärantikörper

Kaninchen-IgG	aus der Ziege, Klon: A11072 (Alexa Fluor® 594 F(ab') ₂ , Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands), Endverdünnung 1:750
Meerschwein-IgG	aus der Ziege, Klon: A11076 (Alexa Fluor® 594, Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands), Endverdünnung 1:750
Maus-IgG	aus der Ziege, Klon: A11017 (Alexa Fluor® 488 F(ab') ₂ , Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands), Endverdünnung 1:600

2.4.3 Isotypenkontrollen

Kaninchen-IgG	Klon: X 0903 (Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup)
Maus-IgG1	Klon: X 0931 (DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup)

2.4.4 DNA-Färbung

Die DNA-Färbung wurde mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) der Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS durchgeführt.

2.5 Puffer und Lösungen

Blocklösung	2910µl 5%ige Magermilchlösung, 30µl Triton und 60µl NGS (Normal Goat Serum, 005-000-121, Dianova GmbH, Hamburg)
10 x PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung 80,0g NaCl + 2,0g KCl + 11,6g Na ₂ HPO ₄ + 2,0g KH ₂ PO ₄ ad. 1000ml Aqua dest., pH auf 7,3-7,5 einstellen.
20 x TEC-Puffer	Tris-EDTA-Citrat-Puffer 5g Tris + 10g EDTA + 6,4g Tri-Natriomcitrat-Dihydrat ad. 1000 ml Aqua dest., pH auf 7,8 einstellen. Verdünnung 1:20
Trypsin-Lösung	Stammlösung: 9ml Aqua dest. steril + 1ml 0,5M Tris-HCl + 0,010g Trypsin + 0,0114g CaCl 2H ₂ O. Gebrauchslösung: 9ml Aqua dest. steril + 1ml 0,5M Tris-HCl-Puffer, 100µl verwerfen und durch 100µl Stammlösung ersetzen

3 Methoden

3.1 Auswahl der Gewebeproben

Es wurden aus dem Archiv der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf 41 Paraffinblöckchen mit Melanomgewebe und 14 mit Gewebe von melanozytären Naevi ausgewählt. Die 41 Melanome hatten einen Breslow-Index zwischen 0,05 mm und 16 mm. Alle Melanome stammten aus den Jahren 1998 und 1999. Die Paraffinblöckchen beinhalteten jeweils Melanomgewebe, sowie (meist) gesunde Epidermis an den Randzonen.

3.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Mit Hilfe des Rotatoms wurden aus den Paraffinblöckchen 3 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Zur Fixierung wurden die Schnitte über Nacht bei 50°C inkubiert.

3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Schnitte wurden unmittelbar vor der Färbung zur Entparaffinierung 2 x 20 min in Xylolersatz und 5 min in 100%iges Ethanol gestellt. Anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 30 s mit 96%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol, die in Aqua dest. für 5 min endete.

Zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung wurden die Schnitte für 4 x 5 min in TEC-Puffer in der Mikrowelle bei 600 W zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und 2 x Spülung in PBS wurde Trypsinlösung auf die Schnitte aufgetragen mit anschließender Inkubation bei 37°C für 10 min. Nach erneuter Spülung in PBS und Umrandung der Schnitte mit dem PAP-Pen wurde

die Blocklösung aufgetragen, die nach 30 min abgeklopft wurde. Der Primärantikörper verblieb über Nacht bei 4°C auf den Schnitten.

Am nächsten Morgen folgte die Spülung in PBS für 4 x 10 min, bevor der Sekundärantikörper für 30 min aufgebracht wurde. Die Schnitte wurden nach einer erneuten Spülung für 1 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, 1:5000) inkubiert und abschließend 2 x 5 min in PBS und 2 x 5 min in Aqua dest. gespült. In feuchtem Zustand wurden die Schnitte mit Fluoromount-G™ eingedeckelt und nach Trocknung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Jede Färbung wurde durch eine Positivkontrolle pro Primärantikörper und eine Negativkontrolle pro Sekundärantikörper überprüft. Für die Positivkontrollen wurde für Cx30 und Cx26 gesunde Kopfhaut und für Cx43, Melan A und ZO-1 gesunde Felderhaut verwendet. Für die Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch Kaninchen IgG, Maus IgG1 oder PBS ersetzt und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Positive Ergebnisse in der Negativkontrolle hätten Färbefehler oder unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers aufgedeckt und eine erneute Färbung veranlasst. Die Positivkontrolle bewies den korrekten Ablauf der Färbereaktion und die Funktionsfähigkeit der Antikörper.

3.4 Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte mit dem Zeiss Immunfluoreszenz-mikroskop (Axioplan 2). Die Lokalisation der Antikörperfärbung wurde in folgende Bereiche eingeteilt:

In der Epidermis

angrenzende Epidermis	über dem Tumor bis zum Tumorrand
entfernte Epidermis	über der gesunden tumorfreien Haut
Stratum granulosum	oberste Hautzellschicht
oberste Schichten	Stratum granulosum und oberste Schicht des Stratum spinosum
obere Schichten	Stratum granulosum und alle Schichten des Stratum spinosum
alle Schichten	Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale

Im Tumor

zentral im Tumorknoten	
epidermisnaher Rand	
Invasionsfront	
pagetoide Zellen	Mischpopulation von Melanomzellen und Keratinozyten in der Epidermis

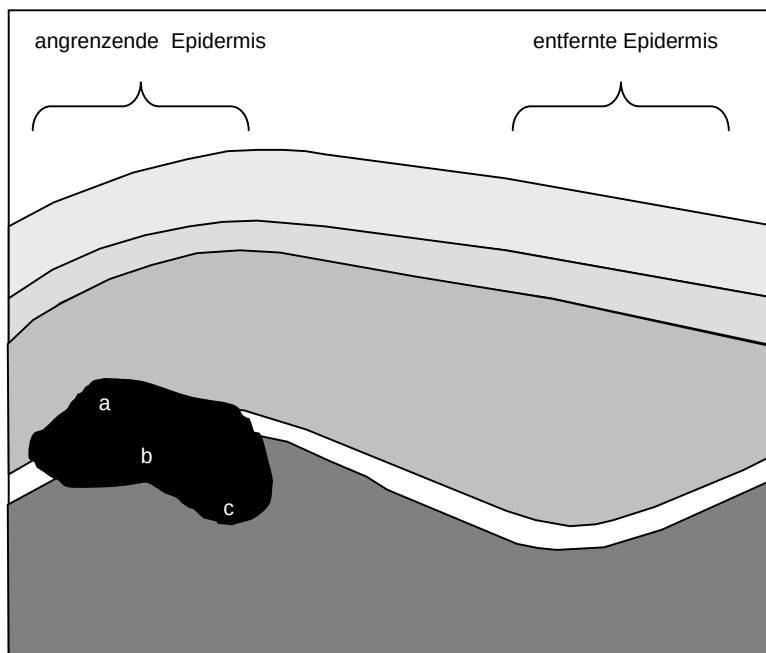


Abbildung 2: Skizze der Epidermis mit malignem Melanom. Definition der angrenzenden Epidermis direkt über dem malignem Melanom gelegen und entfernte Epidermis in maximaler Entfernung zum malignen Melanom. a = Epidermisnaher Rand des Tumors, b = zentral im Tumorknoten, c = Invasionsfront des Tumors.

Zur Dokumentation wurden mit der Digitalkamera (Hamamatsu C4742-95) und mit Hilfe der Openlab-Software (Openlab 3.0.9, Improvision®) Fotos von den gefärbten Schnitten angefertigt. Des Weiteren diente die Openlab-Software als Messinstrument zur Bestimmung der horizontalen Ausdehnung der Cx26-Färbung. Es wurde mit Hilfe des flexiblen Messinstruments des Programms die Strecke der Färbung in der Epidermis in Mikrometern ausgemessen.

3.5 Statistische Auswertung

Die Patientendaten zu Breslow-Index, Metastasierung und Überleben wurden den Patientenakten der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entnommen. Die statistische Auswertung dieser Daten im

Zusammenhang mit den experimentell ermittelten Daten zur Expression der Antikörper erfolgte mit Hilfe der SPSS-Software (SPSS 12, SPSS GmbH, München).

Mit Hilfe des parametrischen T-Tests und dem Pearson Korrelationskoeffizienten sowie dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test, dem Mann-Whitney-Test und dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten wurden folgende Zusammenhänge auf statistische Signifikanz überprüft.

- der Zusammenhang zwischen dem Breslow-Index des Tumors und der Auswertung der Färbung von Cx26, Cx30, Cx43 und ZO-1 in den Schichten der angrenzenden Epidermis, bzw. mit der horizontalen Ausbreitung der Färbung von Cx26, sowie der Lage der Maximalfärbung von ZO-1 im Tumor
- Gruppenvergleiche zwischen den Auswertungen der Färbungen von Cx26, Cx30, Cx43 und ZO-1 in der angrenzenden Epidermis der malignen Melanome und der melanozytären Naevi
- der Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten 5 Jahre nach der Diagnose des malignen Melanoms und den Auswertungen der Färbungen von Cx26, Cx30, Cx43 und ZO-1 in der angrenzenden Epidermis des malignen Melanoms, bzw. mit der horizontalen Ausbreitung der Färbung von Cx26
- der Zusammenhang zwischen der Bildung von Metastasen in 5 Jahren nach Diagnose eines malignen Melanoms und der Auswertung der Färbung von Cx26, Cx30, Cx43 und ZO-1 in den Schichten der angrenzenden Epidermis, bzw. mit der horizontalen Ausbreitung der Färbung von Cx26

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Expression der Gap-Junction-Proteine Cx26, Cx30 und Cx43, sowie des Tight-Junction-Proteins ZO-1 mittels Immunfluoreszenzfärbung in den Zellen maligner Melanome verschiedener Stadien und in den Zellen der angrenzenden Epidermis beurteilt. Diesen Beobachtungen wurde das Expressionsmuster der gleichen Proteine in benignen Hyperplasien von Melanozyten, den melanozytären Naevi und deren angrenzender Epidermis gegenübergestellt. Zur Darstellung der Melanozyten und Melanomzellen wurde eine Doppelfärbung mit Melan A durchgeführt.

Direkt über dem Tumor gelegene Epidermis wird im Folgenden als „angrenzende Epidermis“ bezeichnet. „Entfernte Epidermis“ beschreibt die Epidermis in maximaler Entfernung zum Tumor im Schnitt (Abb.3).

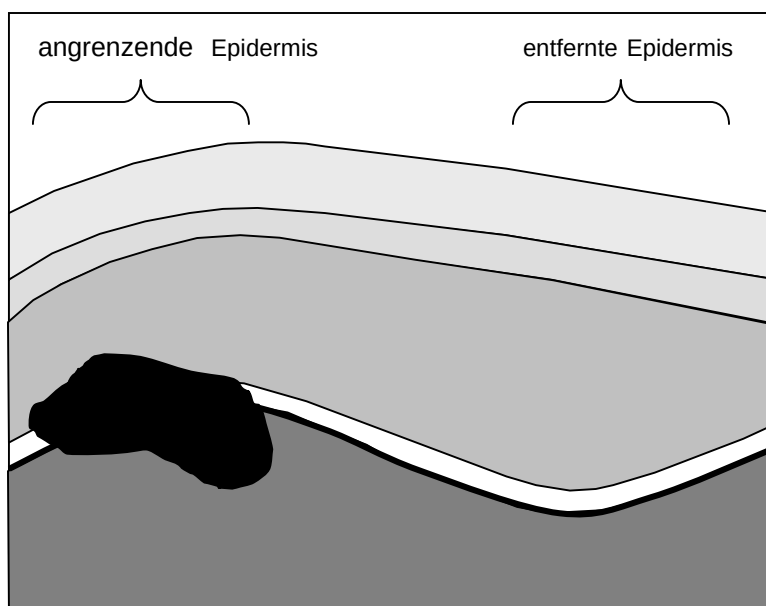


Abbildung 3: Skizze der Epidermis mit malignem Melanom. Definition der angrenzenden Epidermis direkt über dem malignem Melanom gelegen und entfernte Epidermis in maximaler Entfernung zum malignen Melanom.

Die weitere Einteilung der Ergebnisse der Färbungen wurde anhand der Hautschichten vorgenommen (Abb.4). Es gibt die Gruppe der Fälle mit einer Färbung im *Stratum granulosum*, eine Gruppe, die eine Expression in den obersten Schichten zeigt, d.h. im *Stratum granulosum* und in der obersten Schicht des *Stratum spinosum*. Eine dritte Gruppe zeigte die Färbung in den oberen Schichten, d.h. im *Stratum granulosum* und allen Schichten des *Stratum spinosum*. In der vierten Gruppe konnte die Färbung in allen Schichten der lebenden Epidermis, im *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale* nachgewiesen werden.

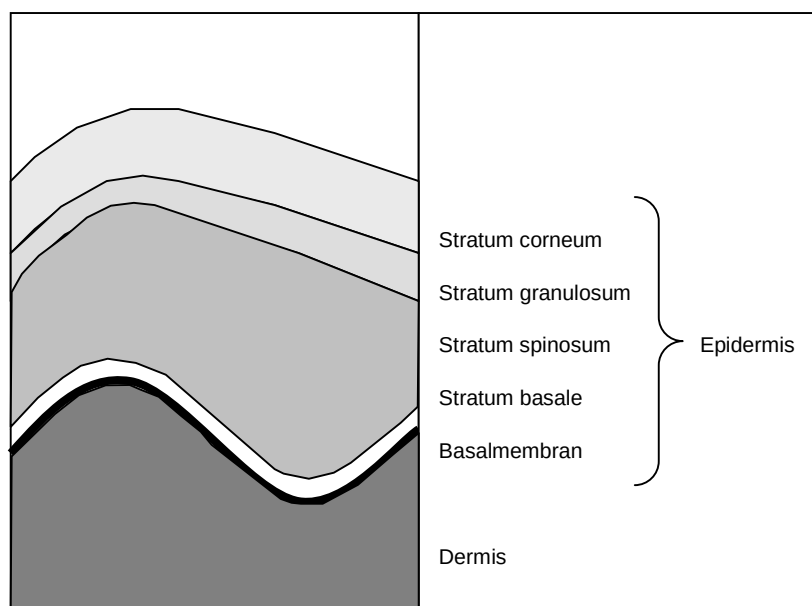


Abbildung 4: Skizze der Hautschichten der Epidermis.

4.1 Klinische und histologische Charakteristika der melanozytären Naevi und malignen Melanome

Die 17 weiblichen Patientinnen, im Alter von 26 bis 91 Jahren, und 24 männlichen Patienten, im Alter von 28 bis 81 Jahren, hatten maligne Melanome mit einem Breslow-Index zwischen 0,05 mm und 16,0 mm, wovon 26 Melanome in die Gruppe ≤ 1.00 mm fielen, 4 in die Gruppe 1.01 mm – 2.00 mm, 7 in die Gruppe 2.01 mm – 4.00 mm und 4 Melanome in die Gruppe mit einem Breslow-Index ≥ 4.00 mm. 8 der 41 Patienten entwickelten in den 5 Jahren nach ihrer Krebsdiagnose eine oder mehrere Metastase/n. Von diesen 8 Patienten fielen je 2 Melanome in die Gruppen mit einem Breslow-Index ≤ 1.00 mm bzw. 2.01 mm – 4.00 mm. Auch alle 4 Patienten mit Melanomen mit einem Breslow-Index ≥ 4.00 mm entwickelten Metastasen. Es handelte sich um 7 Lymphknotenmetastasen, eine Milzmetastase, eine Hirnmetastase und eine Hautmetastase, wobei die Milzmetastase und eine Lymphknotenmetastase, sowie die Haut- und die Hirnmetastase beim jeweils selben Patienten auftraten. Bei 5 der 41 malignen Melanome war histologisch eine Ulzeration des Tumors diagnostiziert worden (alle Breslow 2,01-4,00 mm). Von diesen 5 Patienten entwickelten 4 später eine Metastase. 8 der 41 Patienten verstarben innerhalb von 5 Jahren nach der Diagnose. Von diesen 8 Patienten hatten 4 ein malignes Melanom mit einem Breslow-Index ≤ 1.00 mm, 1 mit einem Breslow-Index von 1,10 mm, 1 mit einem Breslow-Index von 3.3 mm und 2 Patienten hatten einen Breslow-Index ≥ 4.00 mm. Alle Melanome wurden histopathologisch als Primärmelanome diagnostiziert.

Von den Patienten mit einem melanozytären Naevus waren 6 weiblich und 8 männlich und im Alter zwischen 14 und 73 Jahren. Von 8 Patienten zeigte der histologische Befund einen dysplastischen melanozytären Naevus und die anderen 6 Patienten hatten einen nicht-dysplastischen melanozytären Naevus.

Tabelle 1: Anzahl der malignen Melanome und Verteilung von Breslow-Index, Ulzerationen, Metastasen und Überleben.

Breslow-Index (mm)	Anzahl	Ulzeration	Lymphknotenmetastasen	Fernmetastasen	Verstorben 5 Jahre nach Diagnose
≤ 1.00	26		1	2	4
1.01-2.00	4				1
2.01-4.00	7	5	2		1
> 4.00	4		4	1	2

4.2 Connexin 26

4.2.1 Lokalisation von Connexin 26 in Tumorzellen

Die Zellen der melanozytären Naevi, die mit Melan A nachgewiesen wurden, zeigten keine positive Reaktion mit Antikörpern gegen Cx26 an den Zell-Zell-Grenzen. Gelegentlich wurde eine sehr schwache, zytoplasmatische Färbung beobachtet, die auch in anderen Zellen gesehen wurde.

In den Zellen des malignen Melanoms konnte die Färbung von Cx26 in 2 von 41 Fällen an den Zell-Zell-Grenzen nachweisen werden. Zusätzlich ließ sich die Färbung von Cx26 in 9 Fällen an den Zell-Zell-Grenzen der Tumorzellen nachweisen, die in der Epidermis lagen (pagetoide Zellen) und somit eine Mischpopulation mit Keratinozyten bildeten (Abb.5). In 16 von 41 Fällen wurde eine sehr schwache zytoplasmatische Färbung in den Tumorzellen beobachtet.

Tabelle 2: Färbung von Connexin 26 im malignen Melanom

Breslow-Index (mm)	Anzahl	Cx26 negativ im Tumor	Cx26 zytoplasmatisch im Tumor	Cx26 negativ oder zytoplasmatisch	Cx26 Mischpopulation	Cx26 positiv
≤ 1.00	26	6 (23%)	14 (54%)	20 (77%)	6 (23%) davon 1 wenig	0
1.01-2.00	4 (nur 3 auswertbar, da 1 komplett neg)	2 (67%)	0	2 (67%)	1 (33%)	0
2.01-4.00	7	4 (57%)	2 (29%)	6 (86%)	0	1 (14%)
> 4.00	4	1 (25%)	0	1(25%)	2 (50%)	1 (25%)

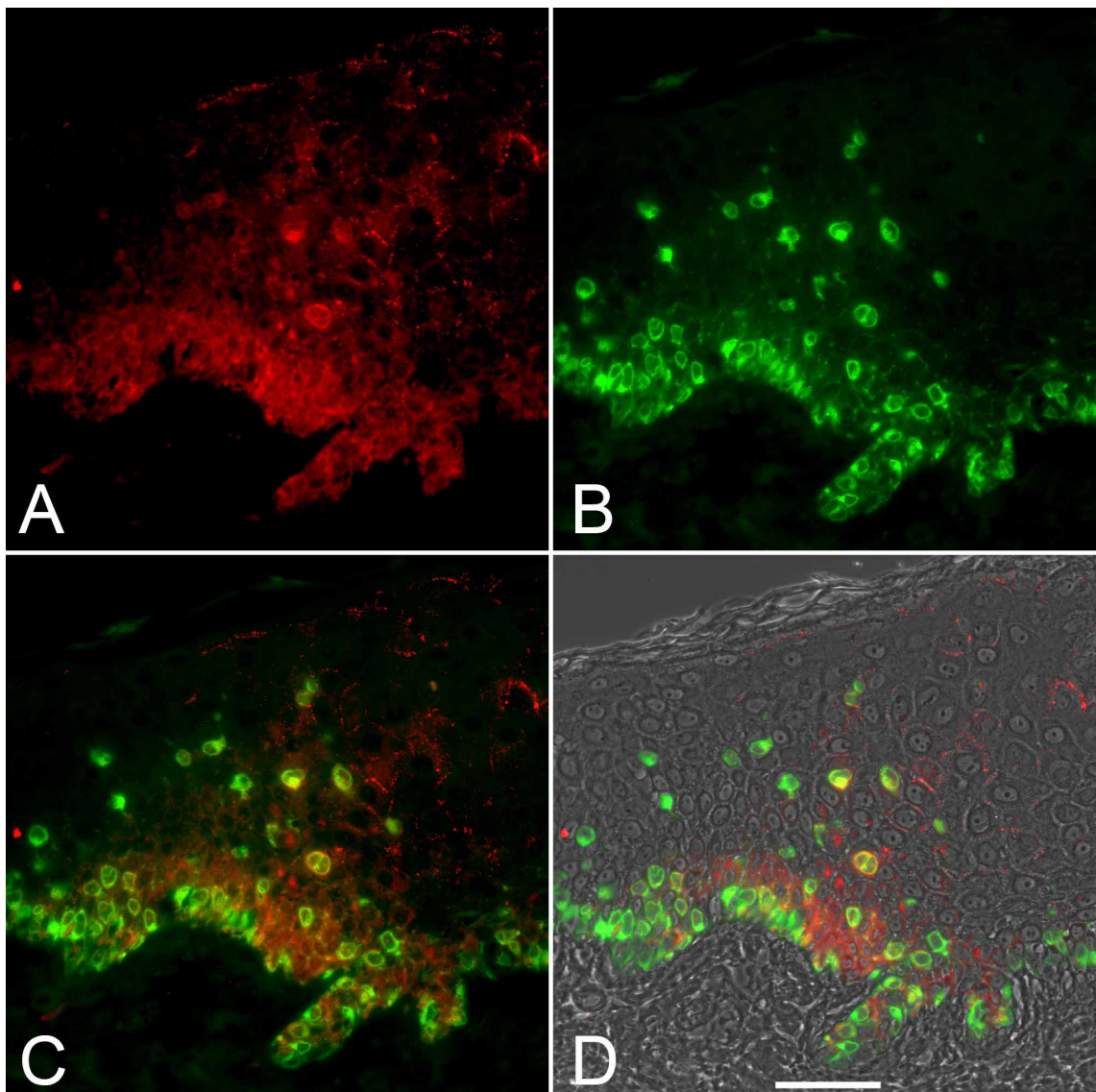


Abbildung 5: Cx26 in der Mischpopulation von Melanomzellen mit Keratinozyten in der Epidermis. A= Cx 26 rot, B= Melan A grün, C= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün, D= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast hinterlegt. Maßstab 50µm.

4.2.2 Lokalisation von Connexin 26 in der angrenzenden Epidermis

In der gesunden Epidermis von Kontrollhautschnitten wurde keine Expression von Cx26 gefunden (Abb. 6). Die Schnitte wiesen jedoch allesamt eine interne Positivkontrolle in Form von angefärbten Drüsen oder Haarfollikeln auf.

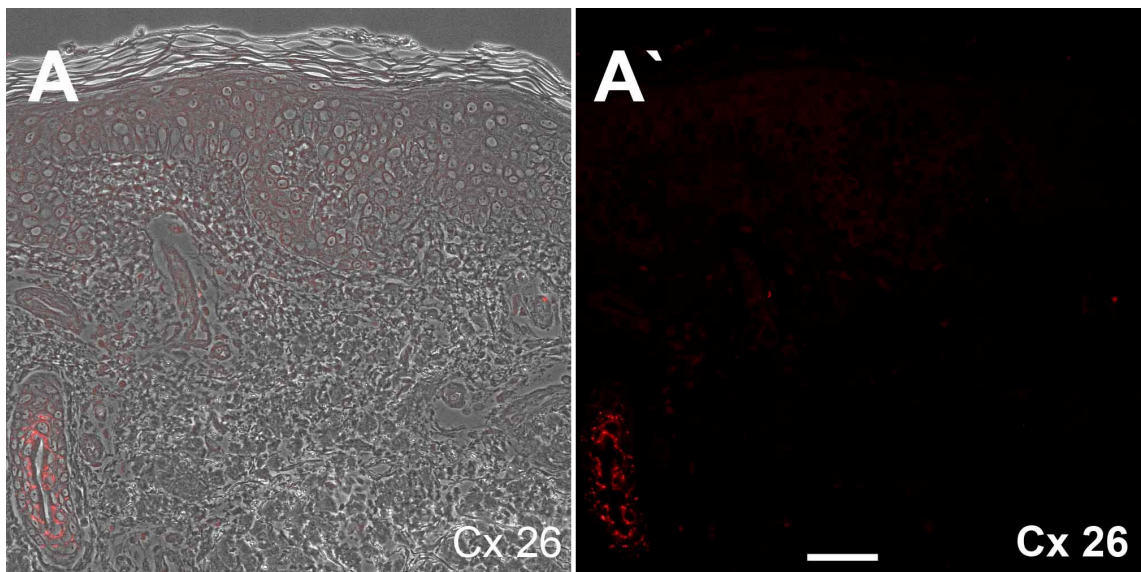


Abbildung 6: Cx26 negativ in der gesunden Epidermis mit Positivkontrolle in einem Blutgefäß. A= Cx26 rot mit Phasenkontrast hinterlegt, A`= Cx26 rot, Maßstab 50µm.

Melanozytäre Naevi zeigten in 6 von 14 Fällen keine Immunfluoreszenzfärbung in der angrenzenden Epidermis. Von den übrigen 8 melanozytären Naevi wurde Cx26 in 7 im *Stratum granulosum* (Abb. 7) und 1 in den oberen Schichten, d.h. im *Stratum granulosum* und im *Stratum spinosum* nachgewiesen. Die von den melanotyären Naevi weiter entfernt gelegene Epidermis war negativ für Cx26.

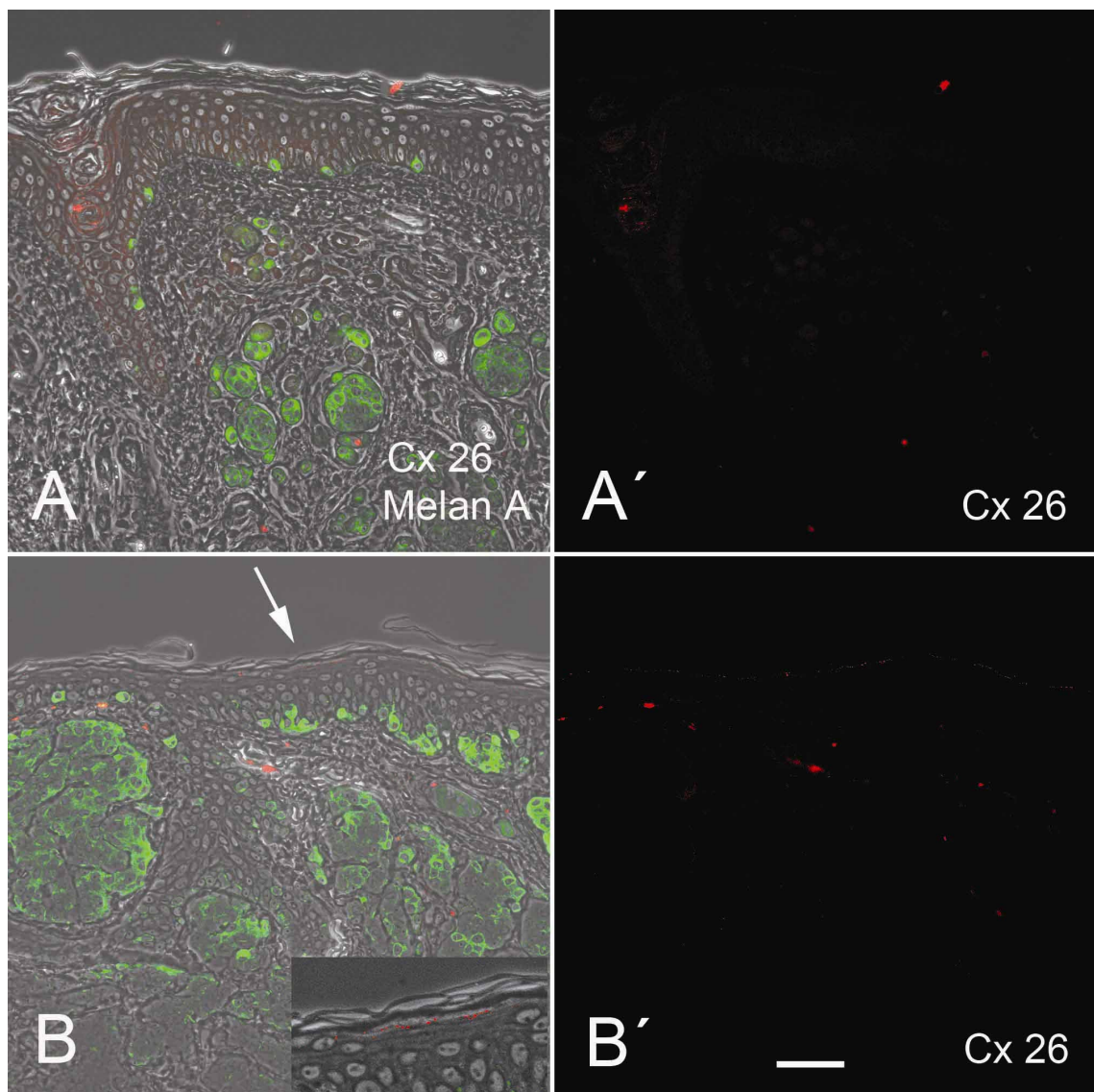


Abbildung 7: Cx26 im melanozytären Naevus. A= Cx26 negativ in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis mit Positivkontrolle im Haarfollikel, Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast hinterlegt. A'= Cx26 rot. B= Cx26 im Stratum granulosum in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis (siehe mit Pfeil markierten Ausschnitt). Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast hinterlegt. B'= Cx26 rot, Maßstab 50µm.

In 40 von 41 Fällen des malignen Melanoms verschiedener Stadien war die angrenzende Epidermis in unmittelbarer Nachbarschaft des malignen Melanoms positiv für Cx26. Bei 10 von 41 Fällen zeigte sich die Färbung in den obersten Schichten der angrenzenden Epidermis (Abb. 8). In 9 Fällen wurden die oberen

Schichten angefärbt, 21 Fälle zeigten einen Nachweis für Cx26 in allen Schichten (Abb.9). Ausschließlich eine Färbung des *Str. granulosum*, wie sie bei melanozytären Naevi vereinzelt gefunden wurde, zeigte sich beim malignen Melanom nicht. In der vom malignen Melanom entfernten Epidermis wurde Cx26 nicht gefunden.

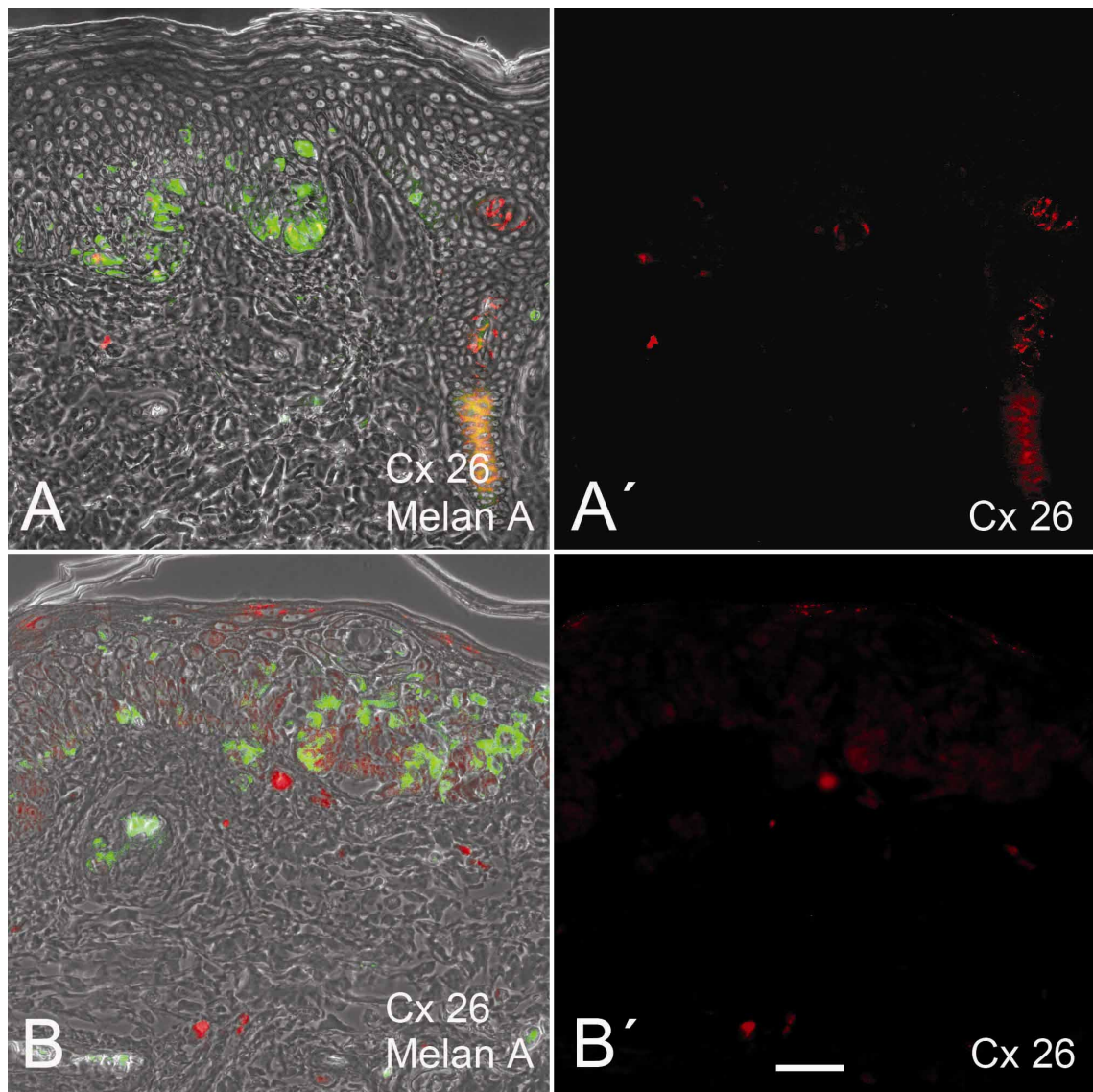


Abbildung 8: A= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Cx26 negativ in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis mit Positivkontrolle im Haarfollikel. A'= Cx26 rot. B= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast in den obersten Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. B'= Cx26 rot. Maßstab 50µm.

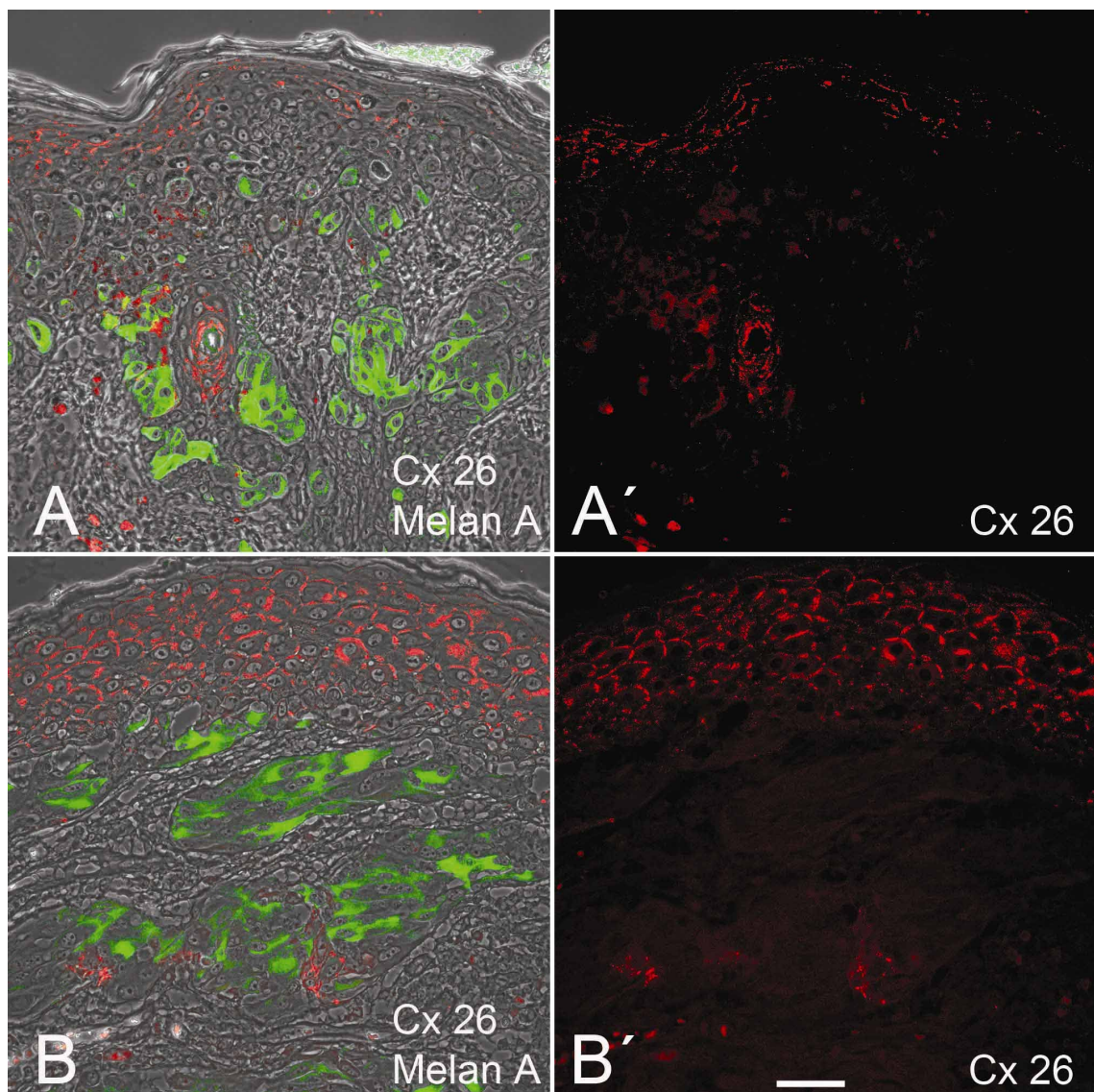


Abbildung 9: A= Cx26 in den oberen Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A'= Cx26 rot. B= Cx26 in allen Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Maßstab 50 50µm.

Die horizontale Ausbreitung der Färbung über dem malignen Melanom wurde mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops und der Openlab-Software ausgemessen. Die histologischen Schnitte der malignen Melanome mit unterschiedlichen Breslow-Indizes waren in der Epidermis auf einer Strecke von 490,00 µm bis 10560,00 µm positiv für Cx26.

Tabelle 3: Connexin 26 in der an melanozytäre Naevi und maligne Melanome angrenzenden Epidermis

Gewebeprobe	normale Haut	melanozytäre Naevi (n=14)		maligne Melanome (Breslow-Index in mm, n=41)			
Connexin 26		nicht-dysplastisch	dysplastisch	≤ 1.00	1.01-2.00	2.01-4.00	≥ 4.00
negativ	alle	3/6	3/8	1/26	0/4	0/7	0/4
Str. granulosum		3/6	4/8	0/26	0/4	0/7	0/4
Oberste Schichten		0/6	0/8	10/26	0/4	0/7	0/4
Obere Schichten		0/6	1/8	7/26	2/4	0/7	0/4
Alle Schichten		0/6	0/8	8/26	2/4	7/7	4/4

4.2.3 Korrelation zwischen Connexin 26-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index

Die statistische Überprüfung der Cx26-Färbung im Zusammenhang mit dem Breslow-Index ergab im parametrischen T-Test ($p=0,021$) und im nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test eine signifikante Korrelation ($p\leq 0,001$) zwischen der vertikalen Ausdehnung der Färbung von Cx26 in den Schichten der Epidermis nahe eines Melanoms und dem steigenden Breslow-Index (Abb. 10). Die Färbung ist in mehr Schichten zu finden, je größer der Breslow-Index ist. Die 10 Melanome mit einer Färbung von Cx26 in den obersten Schichten der Epidermis hatten einen Mittelwert des Breslow-Index von 0,2 mm. In den 21 Fällen, in denen alle Schichten der Epidermis angefärbt waren, hatte der Breslow-Index einen Mittelwert von 3,6 mm.

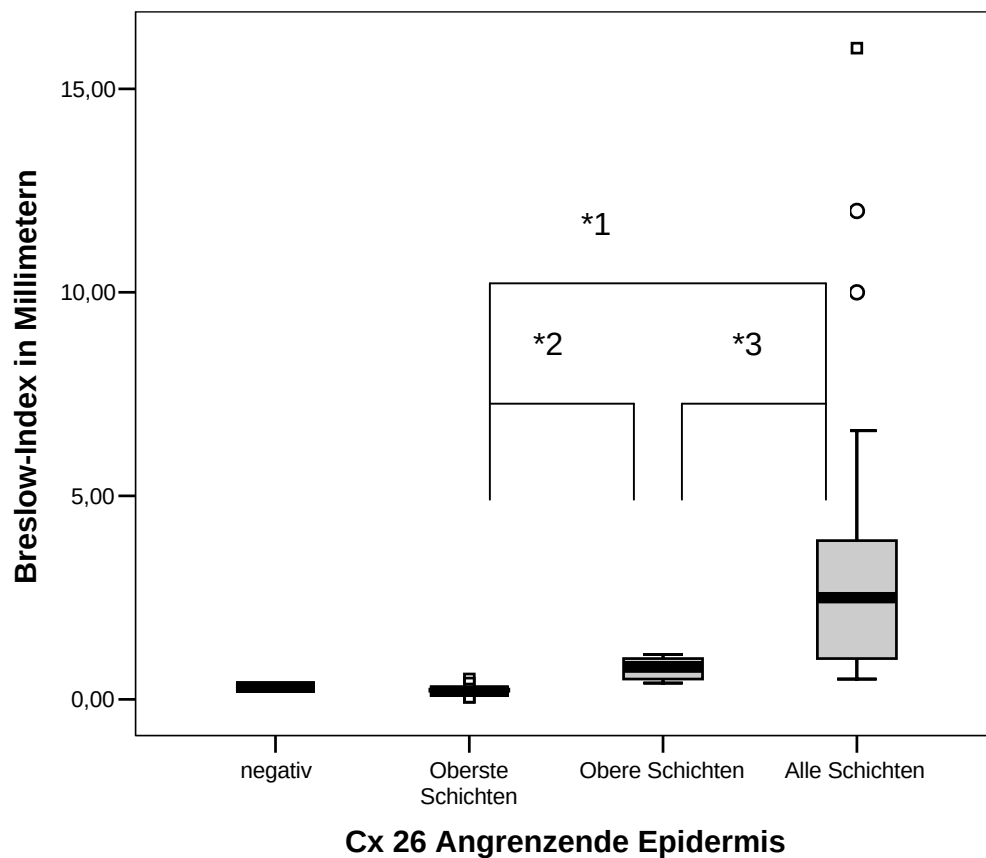


Abbildung 10: Boxblots zur Korrelation zwischen der Lokalisation von Cx26 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben sind Median, Interquartilebene und Ausreißer, o = Ausreißer, Entfernung von 75%- bzw. 25%-Quantile, □ = Extremwerte, noch weiter außen gelegen (*1 $p \leq 0.001$, *2 $p \leq 0.001$, *3 $p = 0.006$).

Die Überprüfung der horizontalen Ausbreitung der Cx26-Färbung mittels des parametrischen Pearson Korrelationskoeffizienten ($r=0.54$) und des nichtparametrischen Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ($r=0.70$) ergab eine signifikante Korrelation ($p \leq 0,001$) zwischen der in Mikrometern gemessenen Ausdehnung der Färbung in der Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern (Abb. 11).

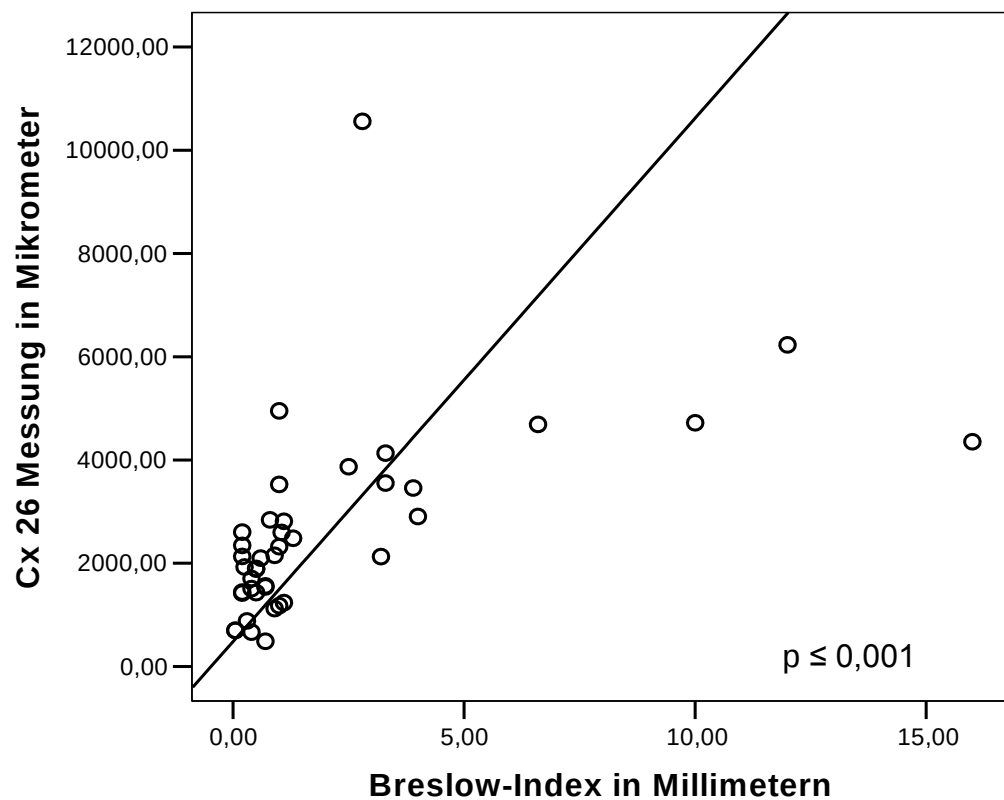


Abbildung 11: Korrelation zwischen der horizontalen Ausbreitung der Cx26-Färbung in Mikrometern in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben ist eine lineare Anpassungslinie ($p \leq 0.001$).

4.3 Connexin 30

4.3.1 Lokalisation von Connexin 30 in Tumorzellen

Die Zellen der melanozytären Naevi, die mit Melan A nachgewiesen wurden, zeigten keine Cx30-Färbung an den Zell-Zell-Grenzen. Gelegentlich wurde eine sehr schwache, zytoplasmatische Färbung beobachtet, die auch in anderen Zellen gesehen wurde.

In Melanomzellen war die Färbung für Cx30 in 1 von 41 Fällen an den Zell-Zell-Grenzen der Tumorzellen des malignen Melanoms positiv. In 13 Fällen war die Färbung für Cx30 an den Zell-Zell-Grenzen der pagetoiden Tumorzellen, die in der Mischpopulation mit Keratinozyten in der Epidermis lagen, positiv (Abb.12). In 8 Tumoren war zudem die Färbung schwach zytoplasmatisch zu beobachten.

Tabelle 4: Färbung von Connexin 30 im malignen Melanom

Breslow-Index (mm)	Anzahl	Cx30 negativ im Tumor	Cx30 zytoplasmatisch im Tumor	Cx30 negativ oder zytoplasmatisch	Cx30 Mischpopulation	Cx30 positiv
≤ 1.00	26	12 (46%)	6 (23%)	18 (69%)	8 (31%) davon 3 wenig	0
1.01-2.00	4	2 (50%)	0	2 (50%)	2 (50%)	0
2.01-4.00	7	4 (57%)	2 (29%)	6 (86%)	1 (13%)	0
> 4.00	4	1 (25%)	0	1 (25%)	2 (50%)	1(25%)

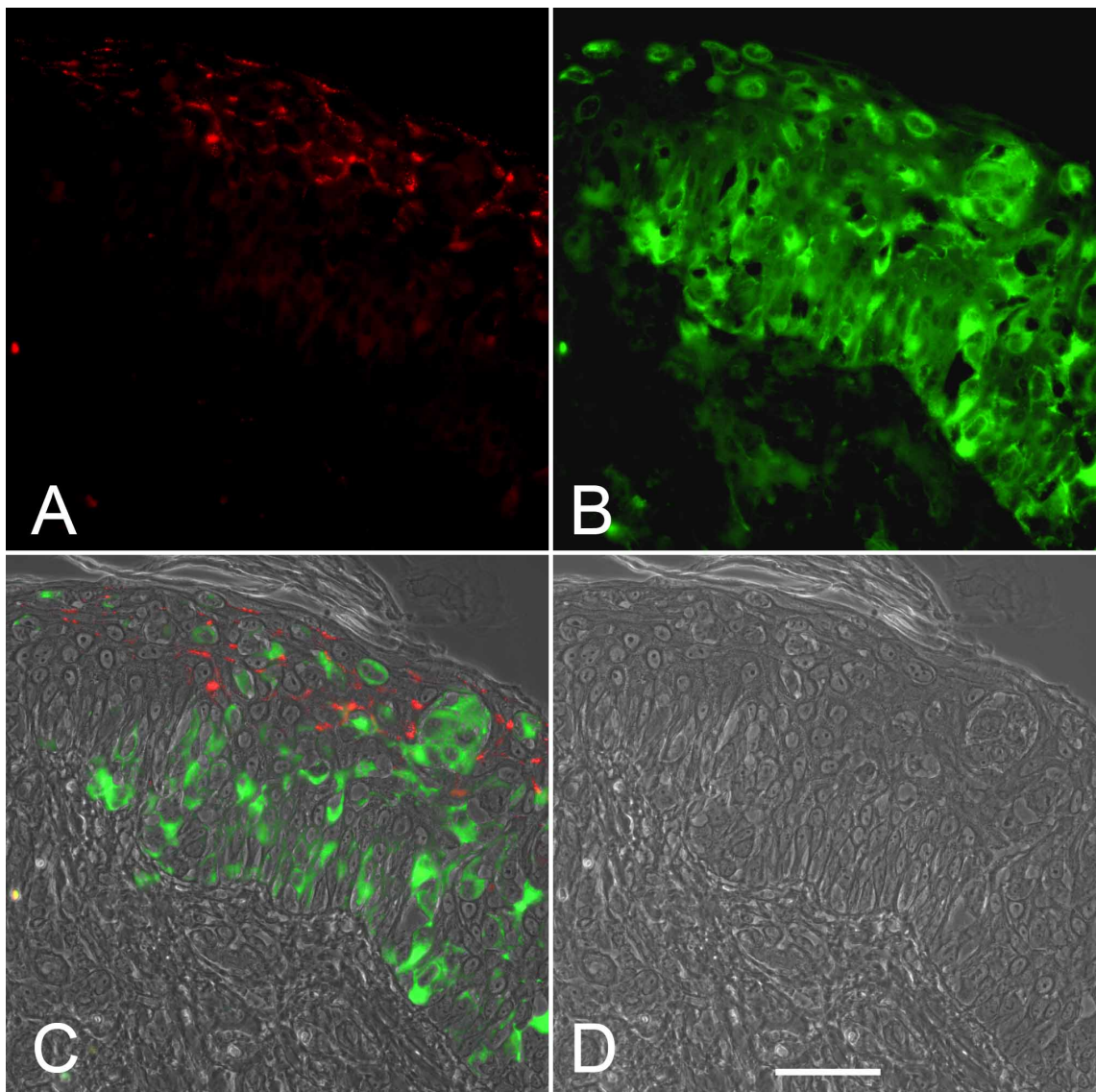


Abbildung 12: Cx30 in der Mischpopulation von Melanomzellen mit Keratinozyten in der Epidermis.

A= Cx30 rot, B= Melan A grün, C= Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast, D= Phasenkontrast. Maßstab 50µm.

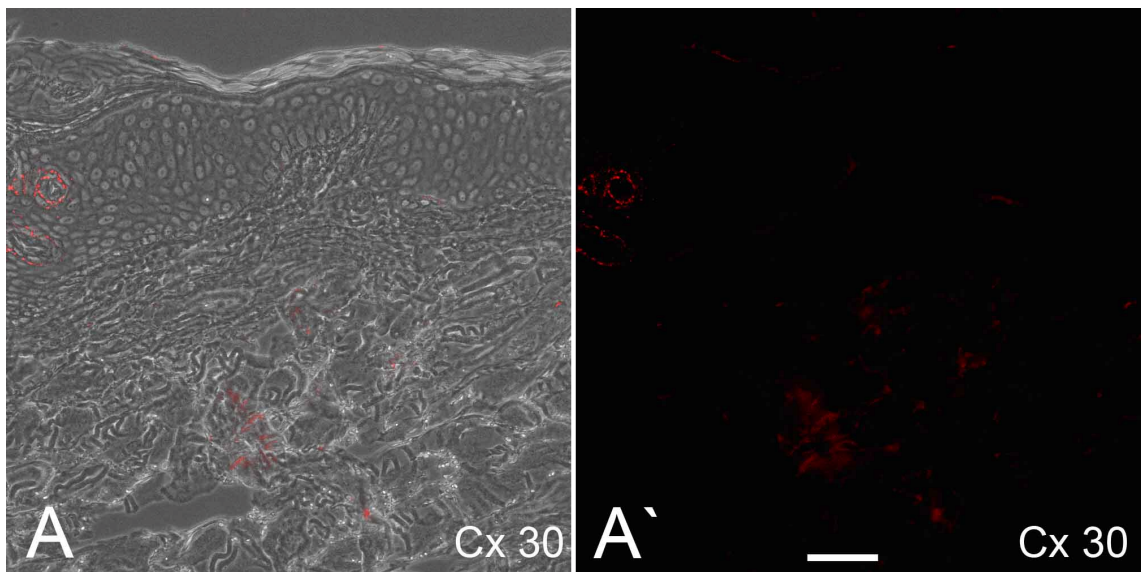


Abbildung 13: Cx30 negativ in der gesunden Epidermis mit Positivkontrolle in Drüsen. A= Cx26 rot mit Phasenkontrast. A'= Cx30 rot. Maßstab 50µm.

4.3.2 Lokalisation von Connexin 30 in der angrenzenden Epidermis

In der gesunden Epidermis von Kontrollhautschnitten wurde keine Expression von Cx30 gefunden (Abb.13).

Die 14 untersuchten melanozytären Naevi zeigten in 5 Fällen eine Färbung für Cx30 im *Stratum granulosum*, in 3 Fällen in den obersten Schichten und in 1 Fall in den oberen Schichten der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis. In den übrigen 5 Fällen blieb die Färbung negativ (Abb.14).

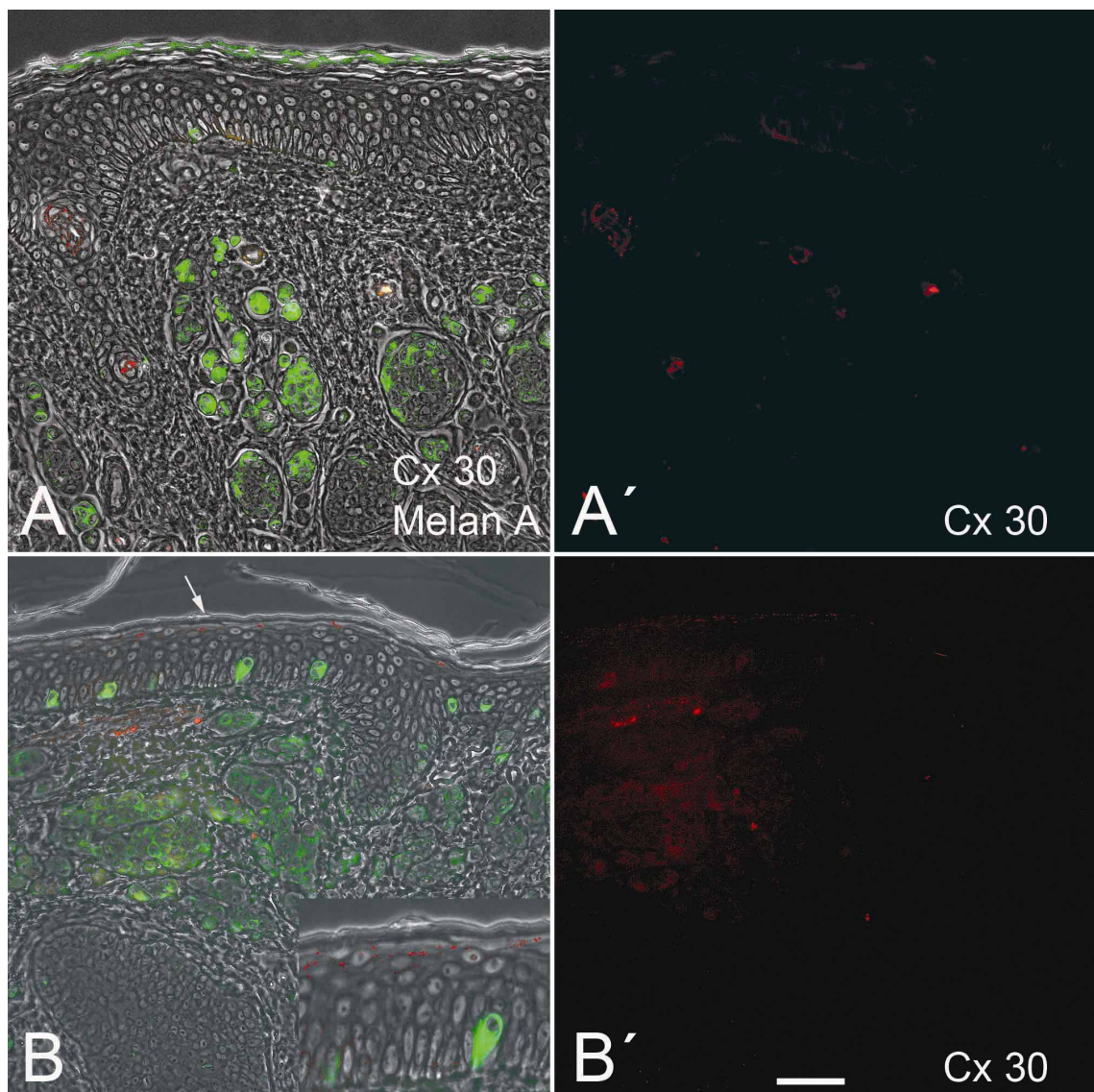


Abbildung 14: Cx30 in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis. A= Cx30 negativ mit Positivkontrolle im Haarfollikel. Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A'= Cx30 rot. B= Cx30 im Stratum granulosum der Epidermis (siehe mit Pfeil markierten Ausschnitt). Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Maßstab 50µm.

Die Schnitte der malignen Melanome waren in der angrenzenden Epidermis alle positiv für Cx30, davon zeigten 4 Fälle eine Färbung in den obersten Schichten, 18 Fälle in den oberen Schichten und 19 Fälle zeigten die Färbung in allen Schichten der melanomangrenzenden Epidermis (Abb. 15). In der vom

malignen Melanom entfernten Epidermis war keine Expression von Cx30 zu finden.

Tabelle 5: Cx30 in der an melanozytäre Naevi und maligne Melanome angrenzenden Epidermis

Gewebeprobe	normale Haut	melanozytäre Naevi (n=14)		maligne Melanome (Breslow-Index in mm, n=41)			
Connexin30		nicht-dysplastisch	dysplastisch	≤ 1.00	1.01-2.00	2.01-4.00	>4.00
negativ	alle	4/6	1/8	0/26	0/4	0/7	0/4
Str. granulosum		1/6	4/8	0/26	0/4	0/7	0/4
Oberste Schichten		1/6	2/8	4/26	0/4	0/7	0/4
Obere Schichten		0/6	1/8	16/26	2/4	0/7	0/4
Alle Schichten		0/6	0/8	6/26	2/4	7/7	4/4

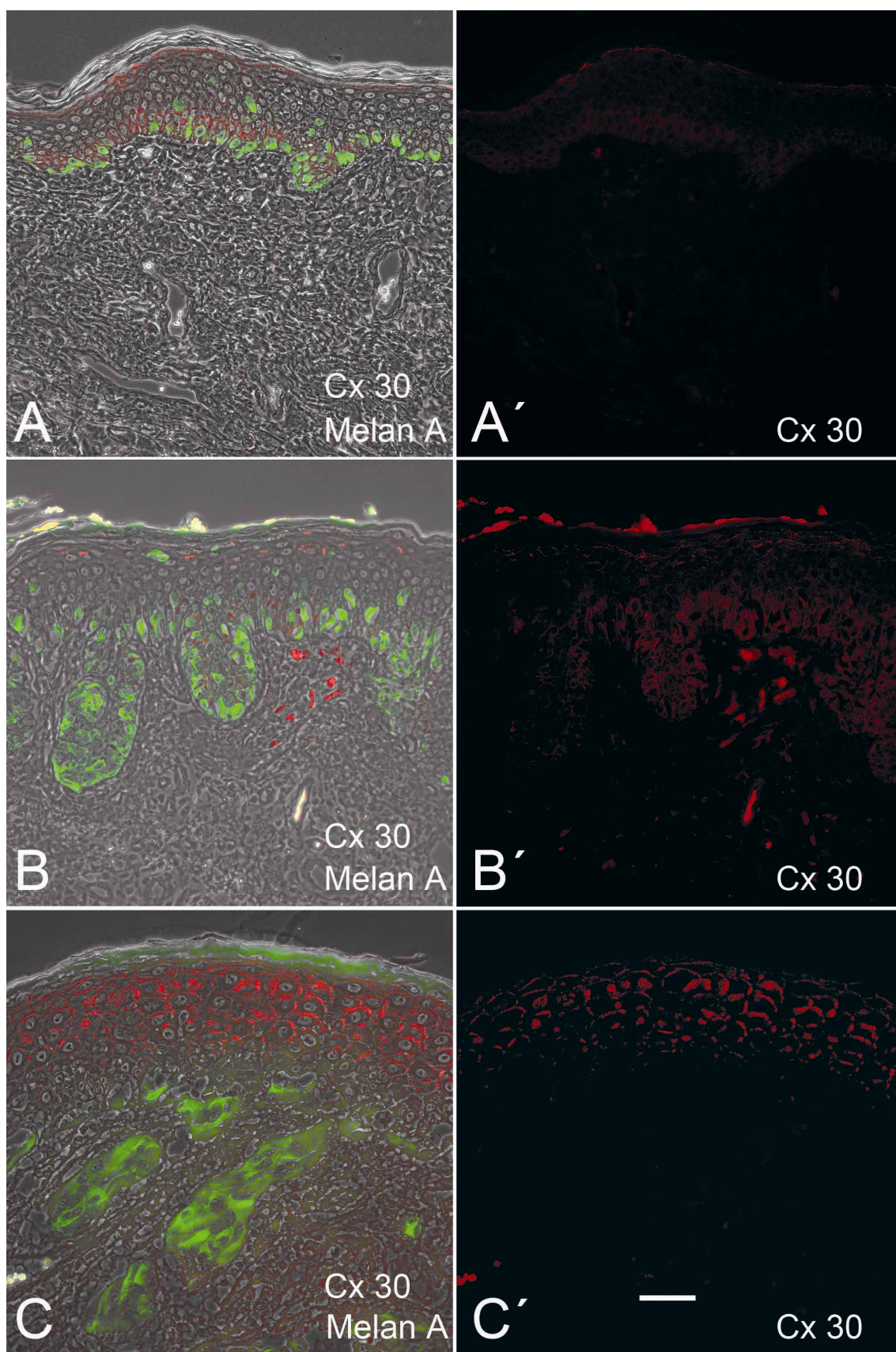


Abbildung 15: Cx30 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. A und A' = Cx30 in den obersten Schichten, sowie zytoplasmatische Färbung basal. Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = Cx30 rot. B und B' = Cx30 in den oberen Schichten der Epidermis und. Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. B' = Cx30 rot, in Tumorzellen auch zytoplasmatisch. C und C' = Cx30 in den allen Schichten der Epidermis. Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. C' = Cx30 rot. Maßstab 50µm.

4.3.3 Korrelation zwischen Connexin 30-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index

Die Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Auswertung der Cx30-Färbung und dem Breslow-Index zeigte ebenfalls eine Signifikanz ($p = 0,003$). Die Fälle mit einer Färbung von Cx30 in den obersten Schichten der Epidermis hatten im Mittel einen Breslow-Index von 0,48 mm, die Fälle, die in allen Schichten der Epidermis eine Expression von Cx30 aufwiesen, hatten 3,94 mm als Mittelwert des Breslow-Index (Abb. 16).

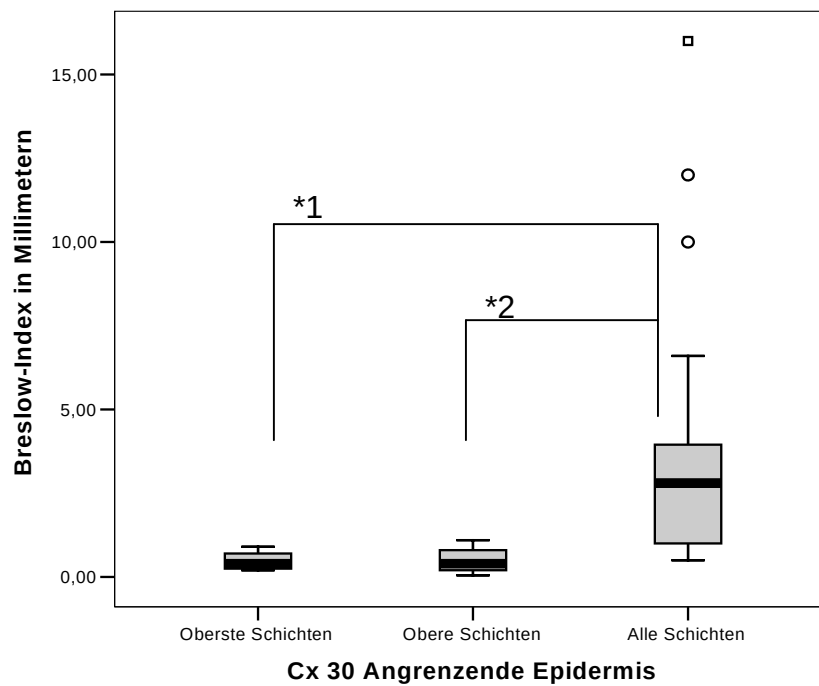


Abbildung 16: Boxplot zur Korrelation zwischen der Lokalisation von Cx30 in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte, o = Ausreißer, □ = Extremwerte (*1 $p \leq 0,003$, *2 $p \leq 0,001$).

Die horizontale Ausbreitung der Cx30-Färbung befand sich über die volle Breite der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und wurde daher nicht wie die Cx26-Färbung ausgemessen.

4.4 Connexin 43

4.4.1 Lokalisation von Connexin 43 in Tumorzellen

Die Zellen der melanozytären Naevi zeigten keine Expression von Cx43.

Im malignen Melanom wurde Cx43 in 2 von 40 Fällen an den Zell-Zell-Grenzen der Tumorzellen nachgewiesen. In 18 Fällen fand sich eine Färbung von Cx43 an den Zell-Zell-Grenzen der pagetoiden Tumorzellen, die in der Epidermis lagen und eine Mischpopulation mit Keratinozyten bildeten (Abb.17). In 5 Tumoren zeigte sich die Färbung mit Cx43 zytoplasmatisch.

Tabelle 6: Färbung von Connexin 43 im malignen Melanom

Breslow-Index (mm)	Anzahl	Cx43 negativ im Tumor	Cx43 zytoplasmatisch im Tumor	Cx43 negativ oder zytoplasmatisch	Cx43 Mischpopulation	Cx43 positiv
≤ 1.00	26	10 (38%)	3 (12%)	13 (50%)	13 (50%)	0
1.01-2.00	3	1 (33%)	0	0	2 (67%)	0
2.01-4.00	6	3 (50%)	2 (33%)	5 (83%)	1 (17%)	0
> 4.00	4	0	0	0	2 (50%)	2 (50%)

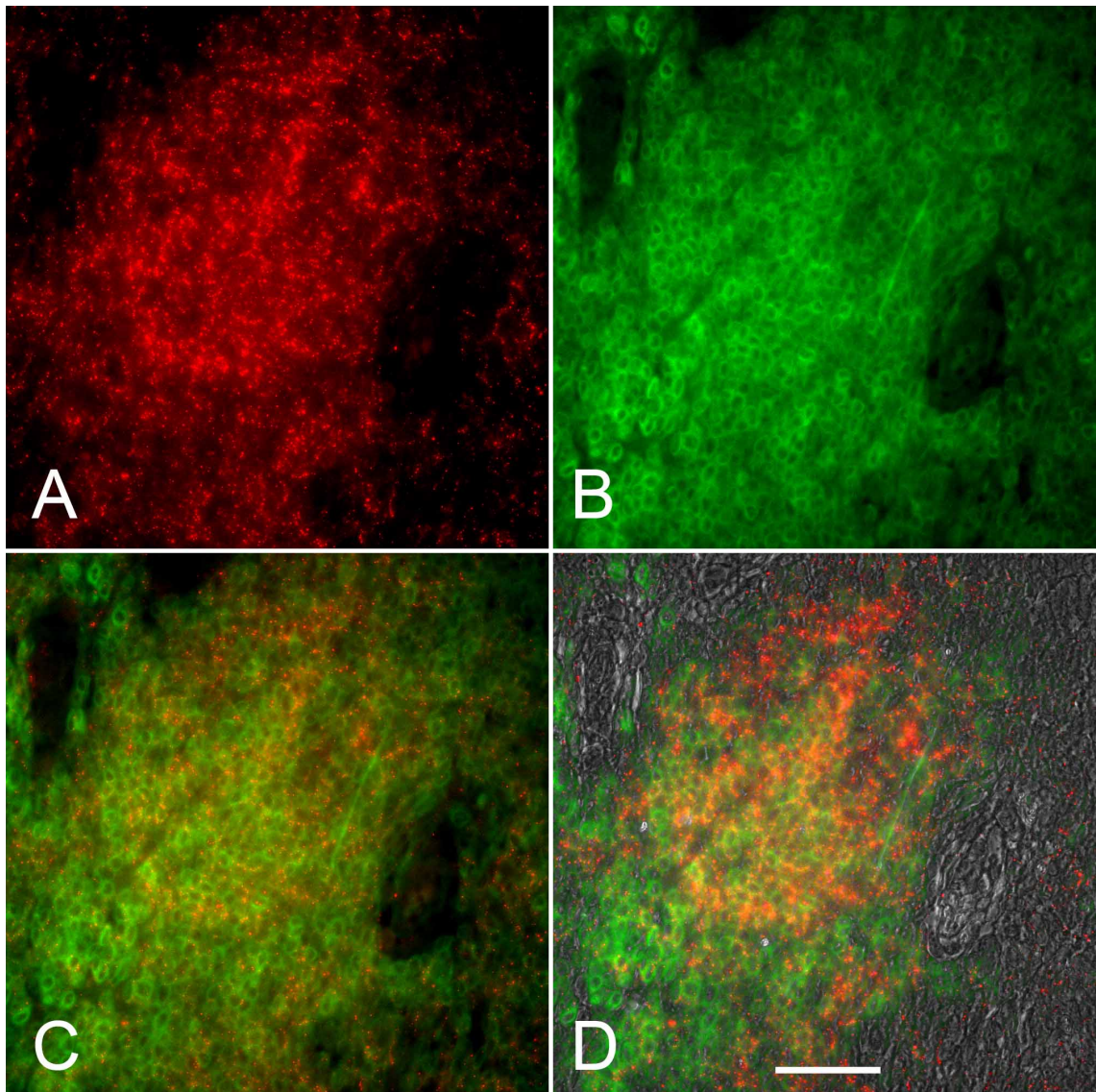


Abbildung 17: Cx43 im malignen Melanom. A= Cx43 rot. B= Melan A grün. C= Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün. D= Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Maßstab 50µm.

4.4.2 Lokalisation von Connexin 43 in der angrenzenden Epidermis

Die Positivkontrollen mit gesunder Haut zeigten die Expression von Cx43 zumeist in allen Schichten der Epidermis (Abb.18).

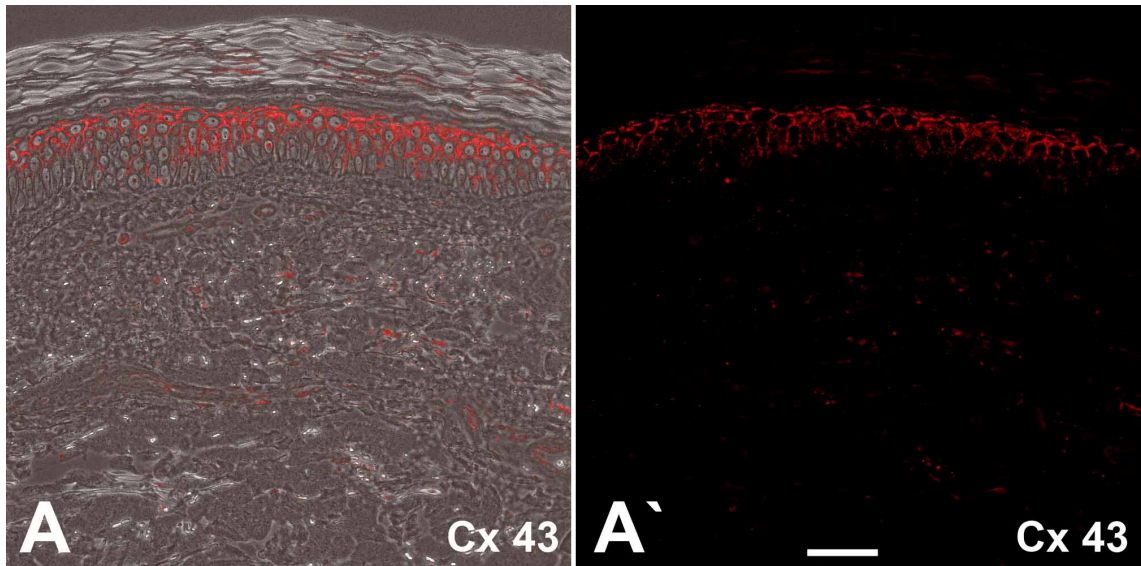


Abbildung 18: Cx43 in der gesunden Epidermis. A= Cx43 rot und Phasenkontrast. A'= Cx43 rot.
Maßstab 50µm.

In Nachbarschaft zu den melanozytären Naevi wurde in 13 von 14 Fällen die Epidermis in den oberen Schichten angefärbt. Ein Schnitt zeigte die Färbung in allen Schichten der Epidermis (Abb.19). Die Färbung bildete keinen deutlichen Übergang von der an die melanozytären Naevi angrenzenden Epidermis zur entfernten Epidermis.

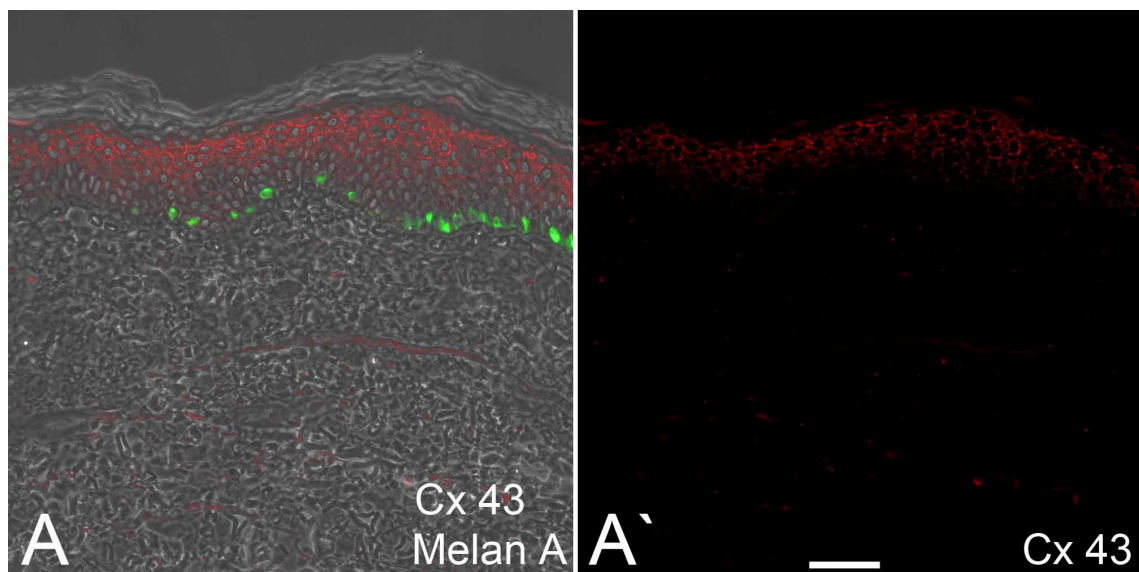


Abbildung 19: Cx43 in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis. A= Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A'= Cx43 rot. Maßstab 50µm.

In malignen Melanomen wurde die angrenzende Epidermis in 5 von 41 Fällen nur in den obersten Schichten angefärbt. In 23 Fällen zeigte sich die Expression von Cx43 in den oberen Schichten und in 13 Fällen wurden alle Schichten der angrenzenden Epidermis angefärbt (Abb.20). Die vom malignen Melanom weiter entfernt liegende Epidermis zeigte eine Färbung mit Antikörpern gegen Cx43 zumeist in allen Schichten.

Tabelle 7: Connexin 43 in der an melanozytäre Naevi und maligne Melanome angrenzenden Epidermis

Gewebeprobe	normale Haut	melanozytäre Naevi (n=14)		maligne Melanome (Breslow-Index in mm, n=41)			
		nicht-dysplastisch	dysplastisch	≤ 1.00	1.01 - 2.00	2.01 - 4.00	> 4.00
Connexin 43							
negativ		0/6	0/8	0/26	0/4	0/7	0/4
Str. granulosum		0/6	0/8	0/26	0/4	0/7	0/4
Oberste Schichten		0/6	0/8	2/26	2/4	1/7	0/4
Obere Schichten		6/6	7/8	15/26	1/4	3/7	4/4
Alle Schichten	alle	0/6	1/8	9/26	1/4	3/7	0/4

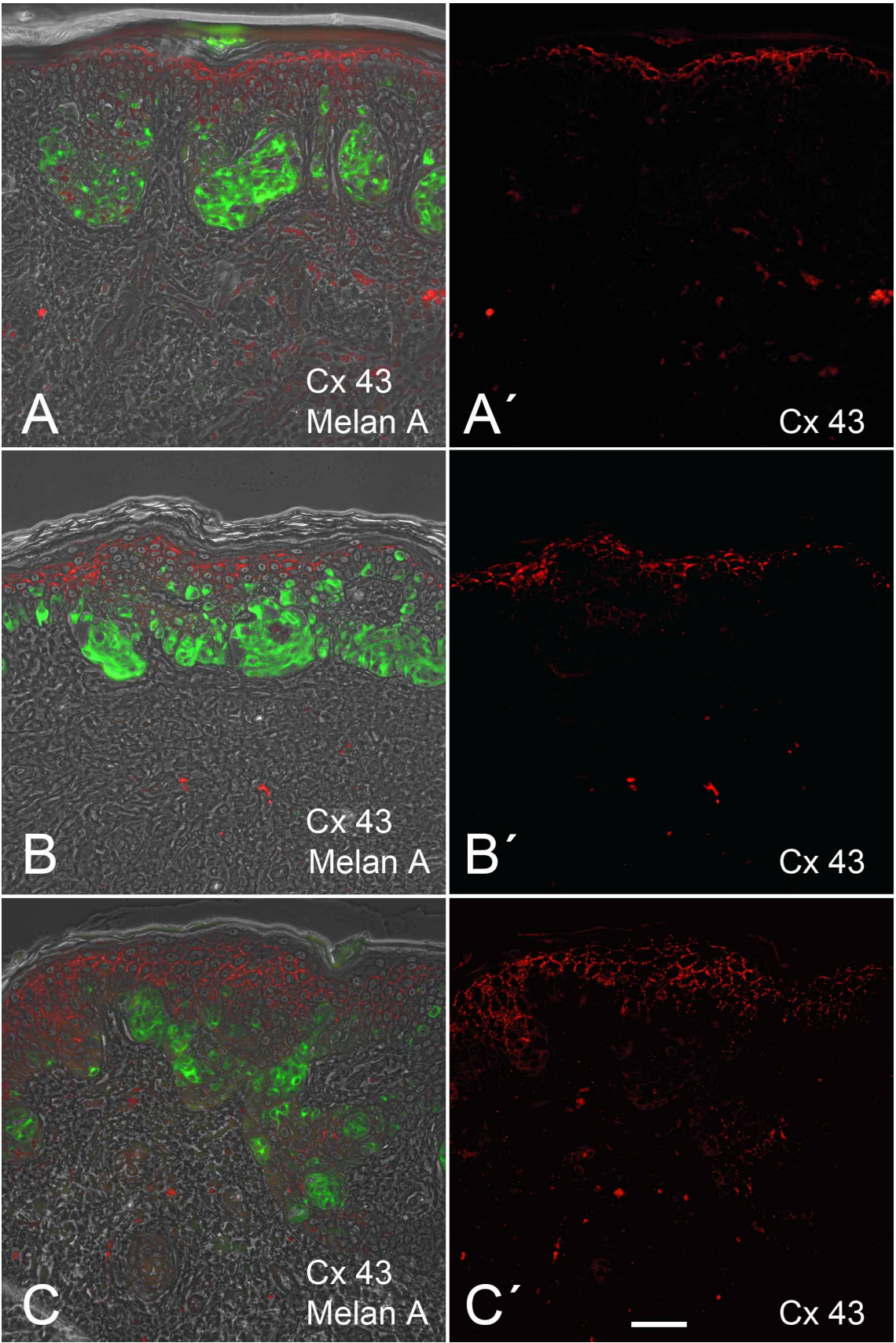


Abbildung 20: Cx43 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. A und A' = Cx43 in den obersten Schichten der Epidermis. A = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melanin grün mit Phasenkontrast. A' = Cx43 rot. B und B' = Cx43 in den oberen Schichten der Epidermis. B = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melanin grün mit Phasenkontrast. B' = Cx43 rot. C und C' = Cx43 in allen Schichten der Epidermis. C = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melanin grün mit Phasenkontrast. C' = Cx43 rot. Maßstab 50µm.

4.4.3 Korrelation zwischen Connexin 43-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index

Die Färbung von Cx43 in der Epidermis zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Breslow-Index ($p=0.654$). Die 5 malignen Melanome, die eine Färbung von Cx43 in den obersten Schichten zeigten, hatten im Mittel einen Breslow-Index von 1,5 mm. 23 maligne Melanome mit einer Cx43-Färbung in den oberen Schichten der angrenzenden Epidermis zeigten einen mittleren Breslow-Index von 2,7 mm und 13 maligne Melanome mit einer Cx43-Färbung in allen Schichten einen mittleren Breslow-Index von 1,3 mm (Abb. 21).

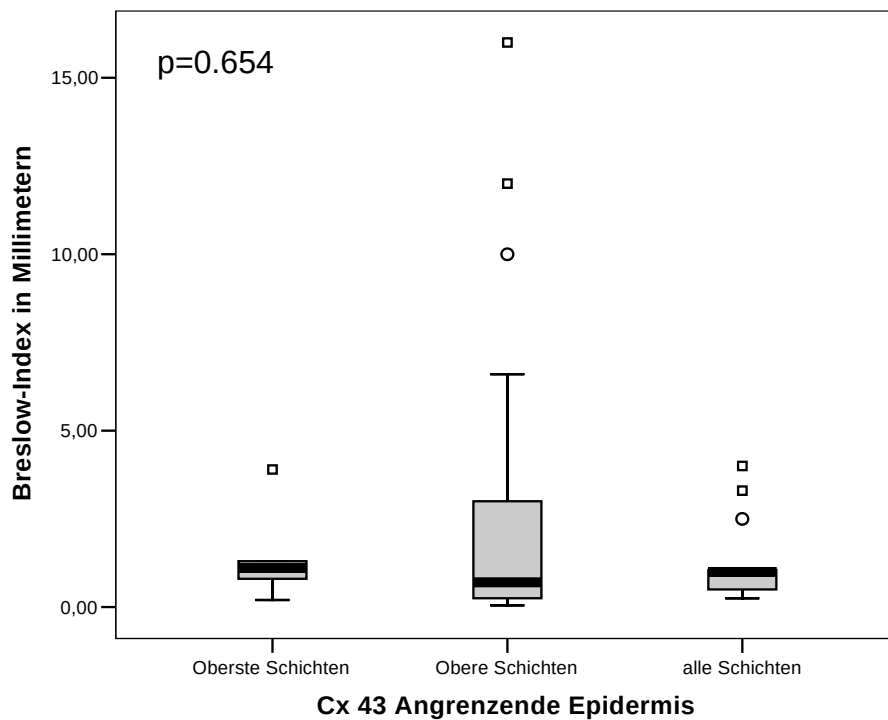


Abbildung 21: Boxplot zur Korrelation zwischen der Lokalisation von Cx43 in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern ($p = 0.654$). Angegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte, o = Ausreißer, □ = Extremwerte.

4.5 ZO-1

4.5.1 Lokalisation von ZO-1 in Tumorzellen

In 11 der 14 melanozytären Naevi konnte eine Färbung von ZO-1 in den Melanozyten nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um 6 dysplastische und 5 nichtdysplastische melanozytäre Naevi.

In 38 von 41 malignen Melanomen wurde eine Expression von ZO-1 gefunden. Dabei war in 5 Fällen ZO-1 besonders zentral im Tumor zu finden. In 9 Tumoren war die Färbung am intensivsten in den Epidermis-nahen Bereichen, in 24

Tumoren im Bereich der Invasionsfront der Tumoren, den von der Epidermis am entferntesten gelegenen Tumorzellen (Abb.25B). Die 3 nicht angefärbten malignen Melanome hatten einem Breslow-Index von 0,2 mm, 0,4 mm und 3,3 mm. Die Schnitte enthielten interne Positivkontrollen. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Intensitätsmaxima der Färbung von ZO-1 im Tumor und dem Breslow-Index nachvollziehen.

Tabelle 8: Maximum der Färbung von ZO-1 in den melanozytären Naevi und malignen Melanomen

Gewebeprobe	melanozytäre Naevi (n=14)		maligne Melanome (Breslow-Index in mm, n=41)			
	nicht-dysplastisch	dysplastisch	≤ 1.00	1.01 – 2.00	2.01 – 4.00	> 4.00
ZO-1						
negativ	1/6	2/8	2/26	0/4	1/7	0/4
Zentral im Tumor	1/6	0/8	3/26	1/4	1/7	0/4
Epidermisnaher Rand	4/6	6/8	6/26	0/4	1/7	2/4
Invasionsfront	0/6	0/8	15/26	3/4	4/7	2/4

4.5.2 Lokalisation von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis

In der gesunden Haut von Kontrollschnitten wurde die Expression von ZO-1 in den obersten Schichten der Epidermis gefunden (Abb22).

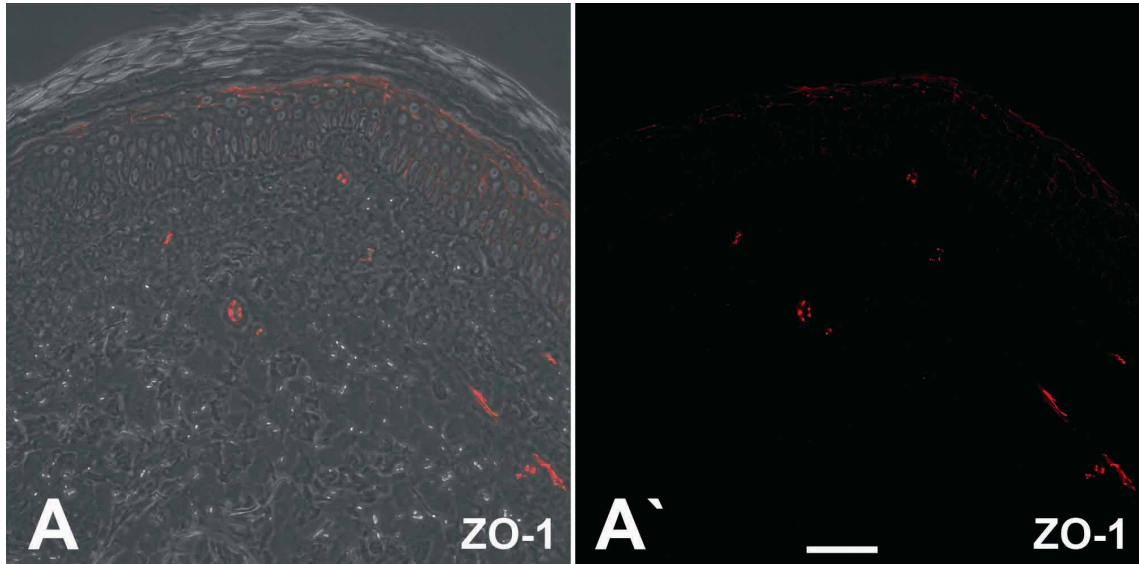


Abbildung 22: ZO-1 in der gesunden Epidermis. A= ZO-1 rot und Phasenkontrast. A'= ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

Von den 14 melanozytären Naevi war einer ebenfalls in den obersten Schichten der angrenzenden Epidermis für ZO-1 positiv. In 11 Fällen konnte ZO-1 in den oberen Schichten der angrenzenden Epidermis nachgewiesen werden und in 2 Fällen in allen Schichten (Abb.23). Die von den melanozytären Naevi entfernte Epidermis zeigte eine Färbung in den obersten Schichten.

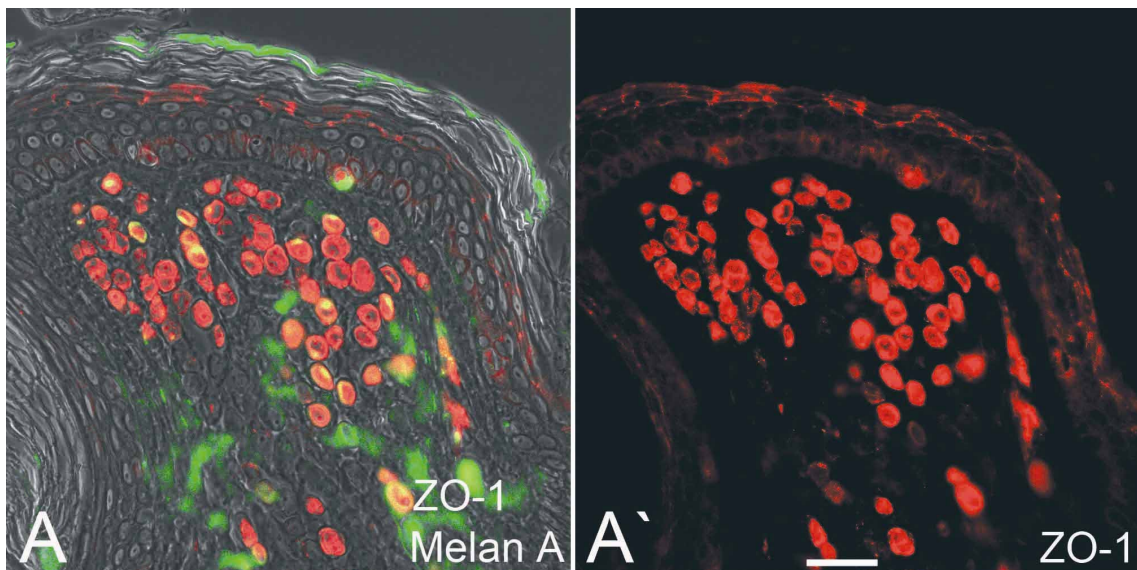


Abbildung 23: ZO-1 in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis und in Melanozyten. A= Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melanin grün mit Phasenkontrast. A'= ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

Die Epidermis in Nachbarschaft zu den malignen Melanomen war in 4 von 41 Fällen in den obersten Schichten positiv für ZO-1. In 29 Fällen wurden die oberen Schichten und in 8 Fällen alle Schichten der angrenzenden Epidermis angefärbt (Abb.24 und 25). Die entfernte Epidermis zeigte eine Expression von ZO-1 in den obersten Schichten.

Tabelle 9: ZO-1 in der an melanozytären Naevi und maligne Melanome angrenzenden Epidermis

Gewebeprobe	normale Haut	melanozytäre Naevi (n=14)		maligne Melanome (Breslow-Index in mm, n=41)				
		nicht-dysplastisch	dysplastisch	≤ 1.00	1.01 – 2.00	2.01 – 4.00	> 4.00	
ZO-1								
negativ		0/6	0/8	0/26	0/4	0/7	0/4	
Str. granulosum		0/6	0/8	0/26	0/4	0/7	0/4	
Oberste Schichten	alle	0/6	1/8	4/26	0/4	0/7	0/4	
Obere Schichten		6/6	5/8	22/26	4/4	3/7	0/4	
Alle Schichten		0/6	2/8	0/26	0/4	4/7	4/4	

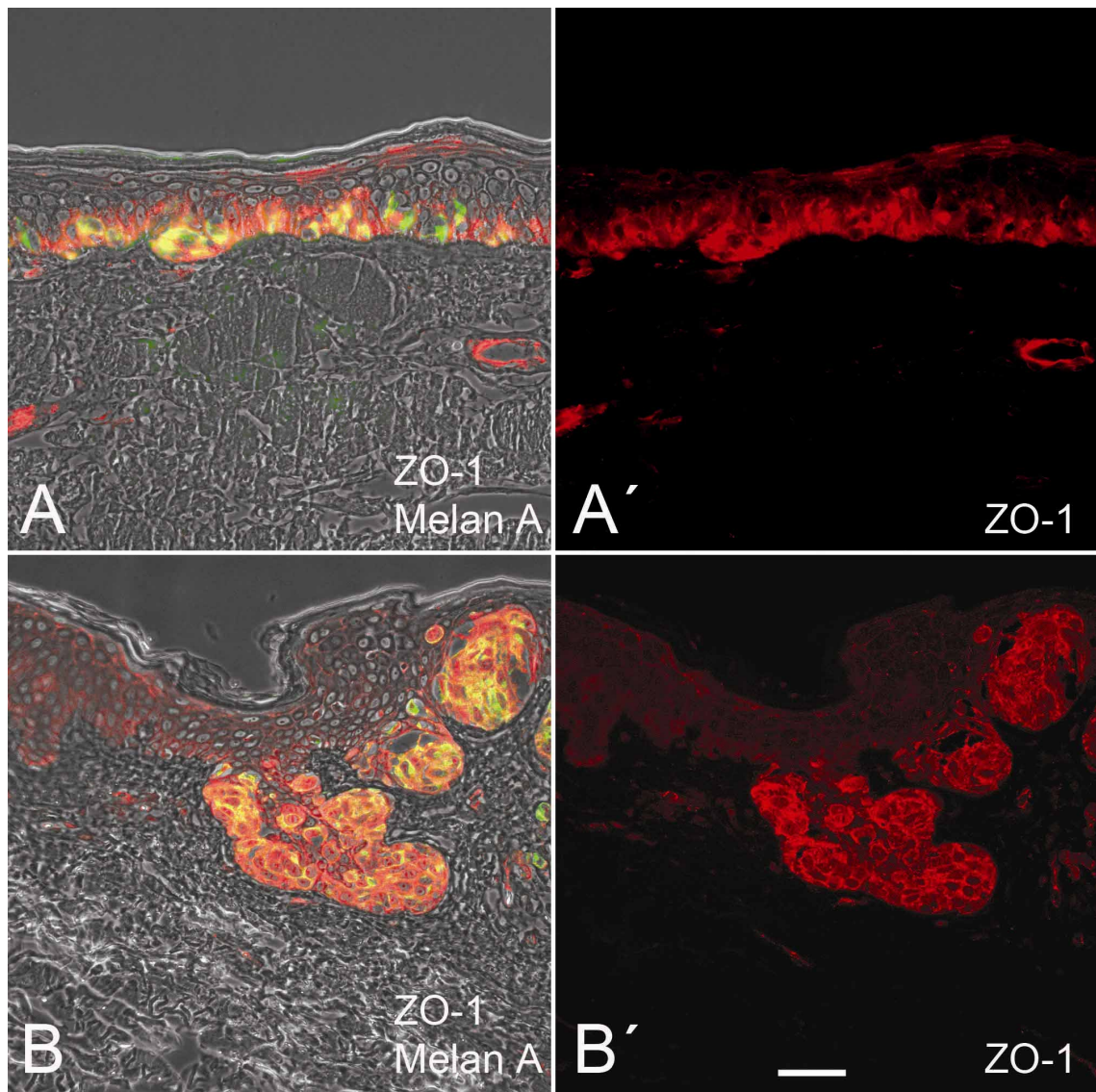


Abbildung 24: ZO-1 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und basal in Melanomzellen, bzw. im Tumorknoten. A und A' = ZO-1 in den obersten Schichten der Epidermis. A = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = ZO-1 rot. B und B' = ZO-1 in den oberen Schichten der Epidermis. B = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. B' = ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

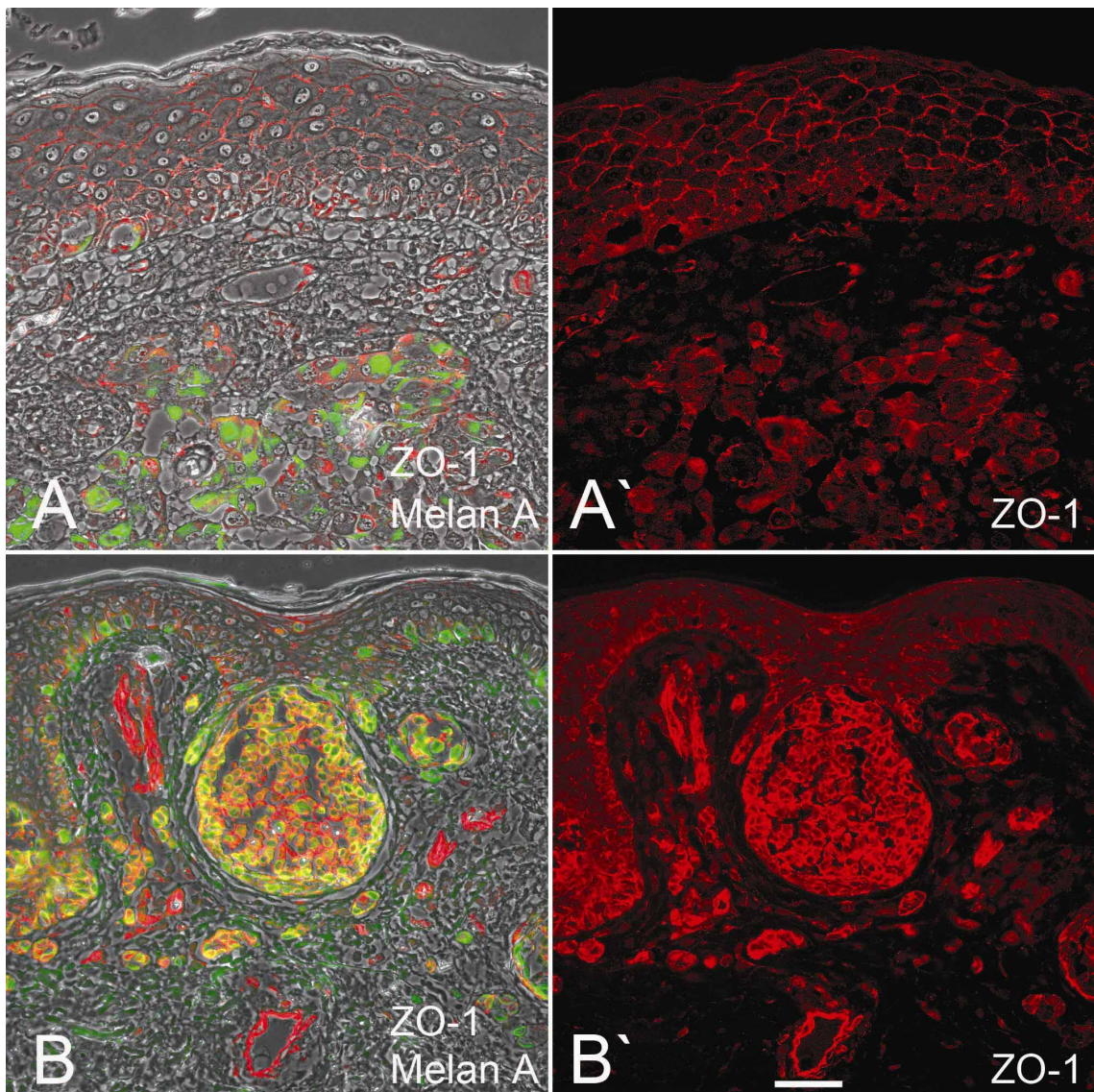


Abbildung 25: ZO-1 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und im Tumor. A und A' = ZO-1 in allen Schichten der Epidermis. A = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = ZO-1 rot. B und B' = ZO-1 in allen Schichten der Epidermis und im Tumor. B = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün ergibt gelb, mit Phasenkontrast hinterlegt. B' = ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

4.5.3 Korrelation zwischen ZO-1-Färbung in der Epidermis und Breslow-Index

Der Zusammenhang zwischen der ZO-1-Färbung und dem Breslow-Index war ebenfalls signifikant ($p \leq 0,001$). Die Gruppe von Melanomen, bei denen die

ZO-1-Färbung in den obersten Schichten der Epidermis zu finden war, hatte im Mittelwert einen Breslow-Index von 0,3 mm und die Fälle mit einer Färbung in allen Schichten der Epidermis hatten im Mittelwert einen Breslow-Index von 7,2 mm. Signifikanz bestand zwischen den Gruppen „oberste Schichten“ und „alle Schichten“ und zwischen „obere Schichten“ und „alle Schichten“ (Abb. 26).

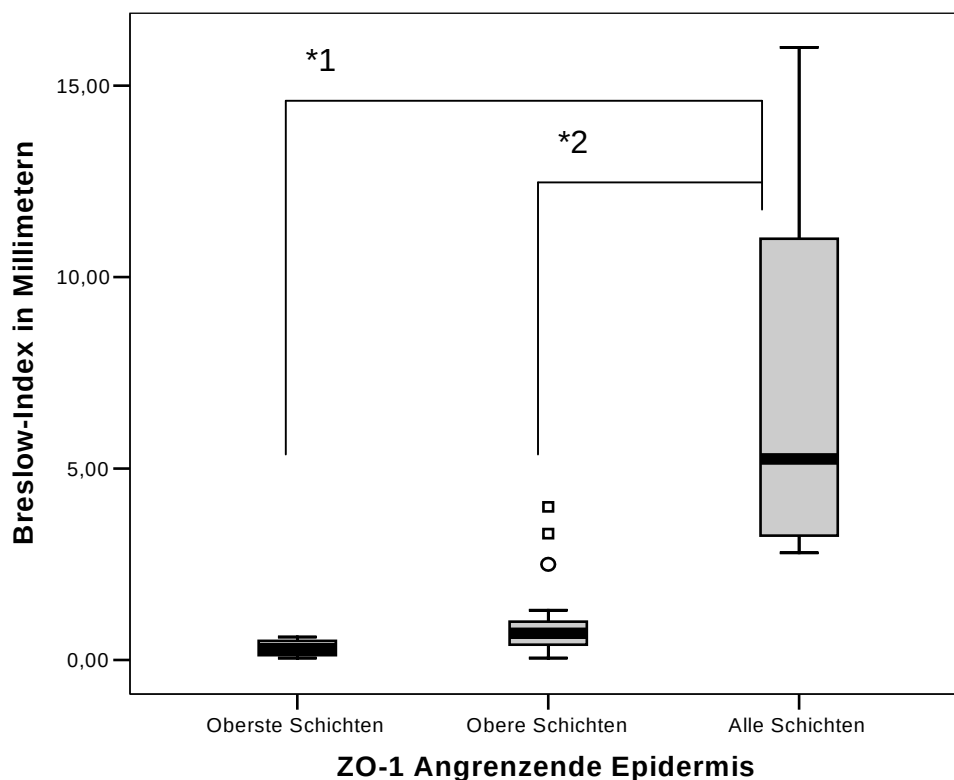


Abbildung 26: Korrelation zwischen der Lokalisation von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte, o = Ausreißer, □ = Extremwerte, (*1 $p = 0.004$, *2 $p \leq 0.001$).

4.6 Vergleich zwischen melanozytären Naevi und malignen Melanomen

Die Ergebnisse der Färbungen der melanozytären Naevi verglichen mit den malignen Melanomen waren signifikant unterschiedlich. Bei 42,9% der

melanozytären Naevi konnte kein Cx26 in der angrenzenden Epidermis nachgewiesen werden. Von den malignen Melanomen waren 97,6% positiv, 51,2% davon in allen Schichten der Epidermis .

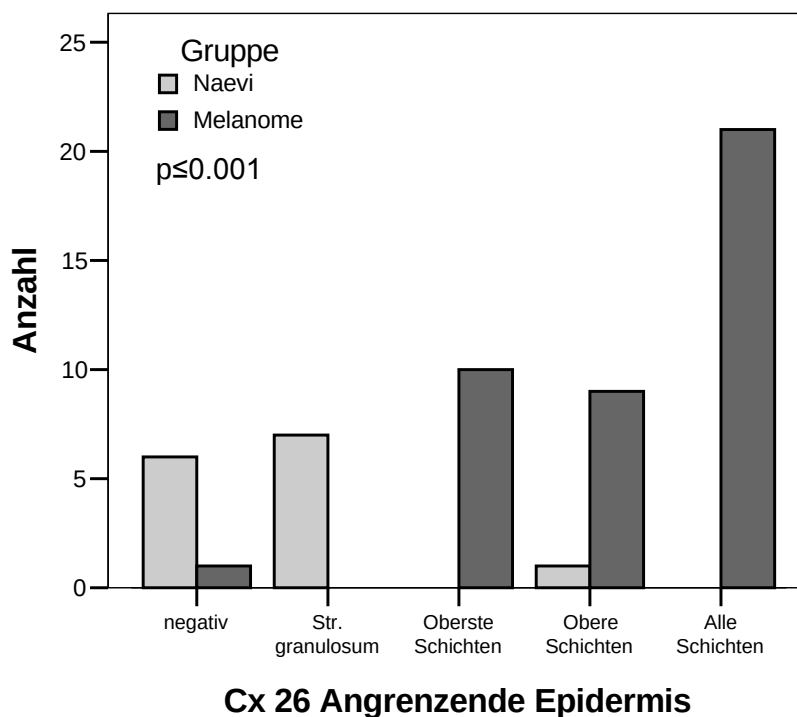


Abbildung 27: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx26 in der angrenzenden Epidermis der melanozytären Naevi (n=14) und den malignen Melanomen (n=41), ($p \leq 0.001$).

Die Färbung der angrenzenden Epidermis mit Antikörpern gegen Cx30 wies zwischen melanozytären Naevi und malignen Melanomen ebenfalls einen signifikanten Unterschied auf ($p \leq 0,001$). 35,7% der melanozytären Naevi waren in der Färbung mit Cx30 negativ, 100% der malignen Melanome waren positiv, 46,3% davon zeigten eine Expression von Cx30 in allen Schichten der Epidermis.

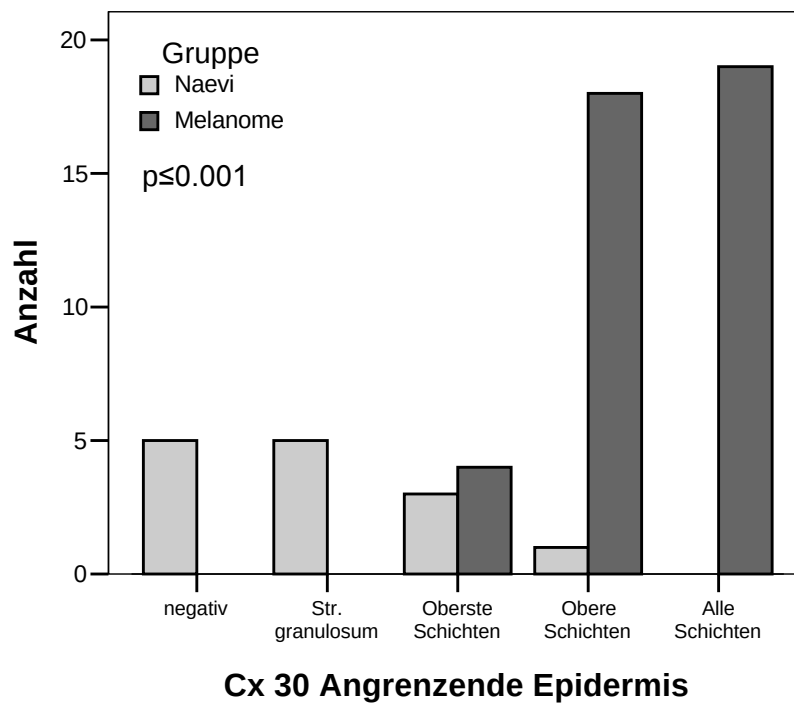


Abbildung 28: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx30 in der angrenzenden Epidermis der melanozytären Naevi (n=14) und den malignen Melanomen (n=41), ($p \leq 0.001$).

Bei 7.1% der melanozytären Naevi zeigte sich die Färbung mit ZO-1 in den obersten Schichten, in 78.6% in den oberen Schichten und in 14,3% in allen Schichten der angrenzenden Epidermis. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur Färbung der malignen Melanome, die in 9,8% der Fälle in den obersten Schichten, in 70.7% in den oberen Schichten und in 19,5% der Fälle in allen Schichten der Epidermis angefärbt waren.

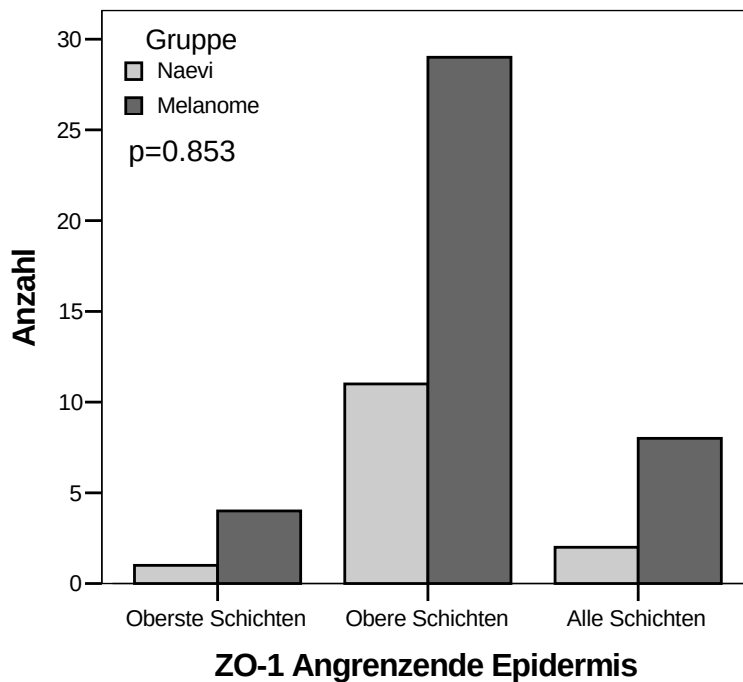


Abbildung 29: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis der melanozytären Naevi (n=14) und den malignen Melanomen (n=41), ($p = 0.853$).

4.7 Zusammenhang zwischen Expression der Connexine bzw. ZO-1 und dem Überleben der Patienten

Die Ergebnisse der Auswertung der Färbungen konnte in keinen statistischen Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten in den 5 Jahren nach ihrer Melanom-Diagnose gestellt werden. Alle parametrischen und nichtparametrischen Tests zeigten nichtsignifikante Ergebnisse.

4.8 Zusammenhang zwischen Expression der Connexine bzw. ZO-1 und der Metastasenbildung

Die statistische Überprüfung der Färbeargebnisse von Cx26 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis im Zusammenhang mit der Metastasenbildung der Patienten ergab keine statistische Signifikanz ($p=0.304$). Von den Patienten, die keine Metastasen im 5-Jahres-Verlauf nach der Diagnose entwickelten, zeigten 25,9% eine Färbung der obersten Schichten der Epidermis über dem Melanom, 18,5% in den oberen Schichten und 51,9% in allen Schichten. Bei den Patienten mit einer Metastasenbildung in 5 Jahren nach der Diagnose war in 75% der Fälle die Färbung mit Cx26 in allen Schichten der Melanom angrenzenden Epidermis zu finden.

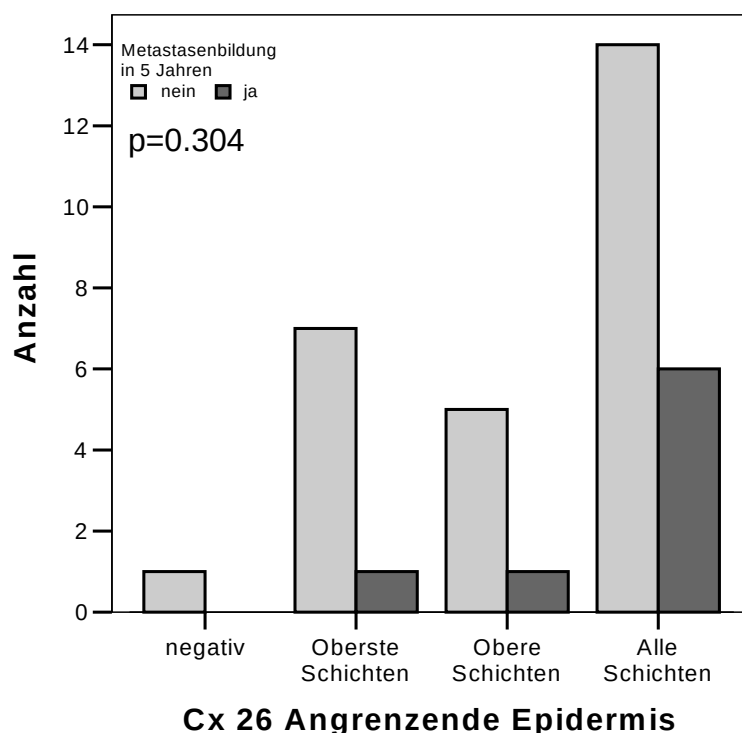


Abbildung 30: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx26 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis der Fälle mit Bildung von Metastasen im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose ($n=8$) und der Fälle ohne Metastasenbildung ($n=33$), ($p=0.304$).

Dahingegen konnte im nichtparametrischen Mann-Whitney-Test ein signifikanter Zusammenhang zwischen der in Mikrometern gemessenen horizontalen Ausdehnung der Cx26-Färbung und der Metastasenbildung festgestellt werden. Die Patienten, die keine Metastasen bildeten, hatten im Mittelwert einen Nachweis von Cx26 auf 2343,83 μm Länge in der Epidermis, und in den Präparaten der Patienten mit Metastasen fand sich die Cx26-Färbung im Mittelwert auf einer Strecke von 3825,02 μm in der Epidermis über dem malignem Melanom.

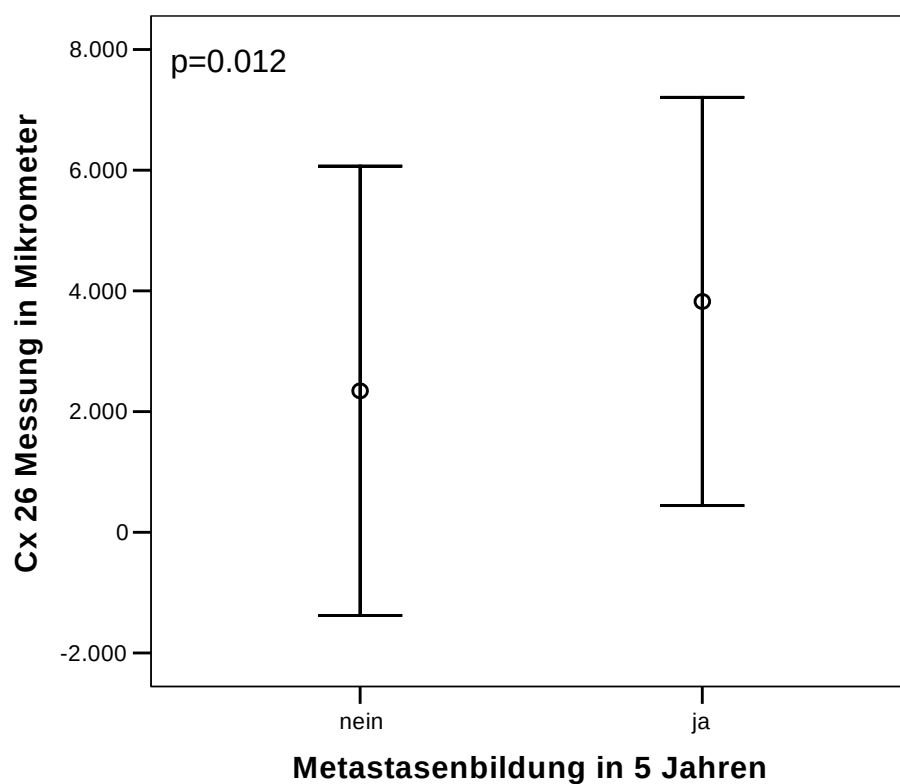


Abbildung 31: Zusammenhang zwischen der horizontalen Ausmessung der Färbung von Cx26 in Millimetern in der an die maligne Melanome angrenzenden Epidermis und der Bildung von Metastasen im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose ($p= 0.012$).

Die statistischen Tests zur Auswertung der Färbung von Cx30 und der Metastasenbildung der Patienten ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p=0.221$). Cx30 wurde in den Schnitten der Patienten, die im Verlauf von 5 Jahren eine Metastase entwickelten in 75% in allen Schichten der angrenzenden Epidermis nachgewiesen und in jeweils 12,5% in den obersten Schichten und in den oberen Schichten. Die Patienten, die keine Metastasen bildeten, enthielten Cx30 bei 40,7% in allen Schichten, in 48,1% in den oberen Schichten und in 11,1% in den obersten Schichten der angrenzenden Epidermis.

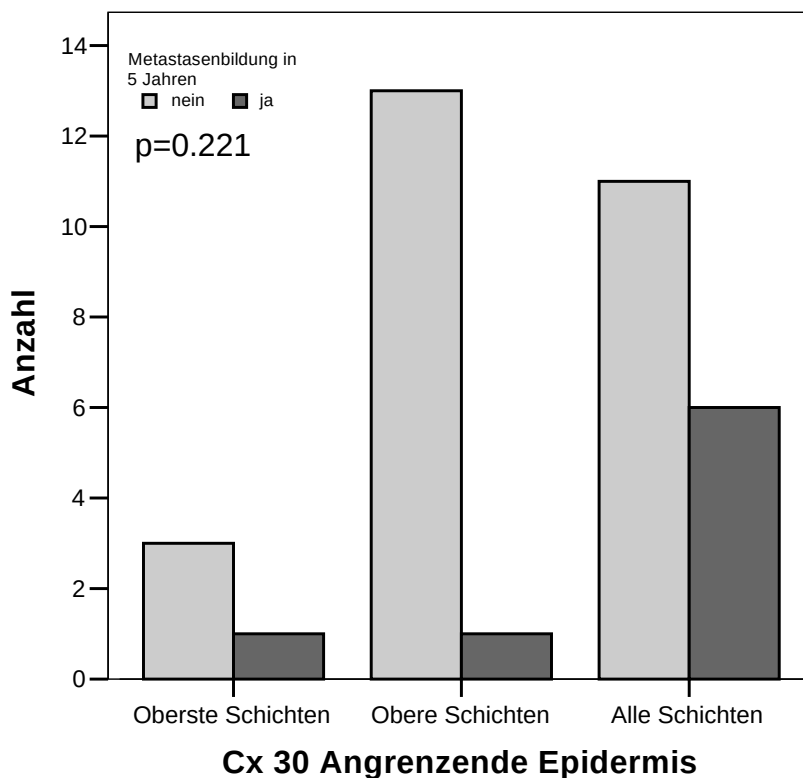


Abbildung 32: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx30 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis der Fälle mit Bildung von Metastasen im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose ($n=8$) und der Fälle ohne Metastasenbildung ($n=33$), ($p=0.221$).

Auch bei der Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Färbung von Cx43 und der Metastasenbildung der Patienten ließ sich keine statistische Signifikanz nachweisen ($p=0.061$). Von den histologischen Schnitten mit einem Nachweis von Cx43 in allen Schichten der angrenzenden Epidermis hat kein Patient im Verlauf von 5 Jahren eine Metastase entwickelt.

Die Auswertung der Färbung von ZO-1 war im Zusammenhang mit der Metastasenbildung der Patienten statistisch signifikant ($p=0.041$). Es fand sich bei 81,5% der Patienten ohne Metastasenbildung in den oberen Schichten der Epidermis die Färbung von ZO-1. 62,5% der Patienten, die später eine Metastase ausbildeten, zeigten in den histologischen Schnitten die Färbung mit Antikörpern gegen ZO-1 in allen Schichten der Epidermis.

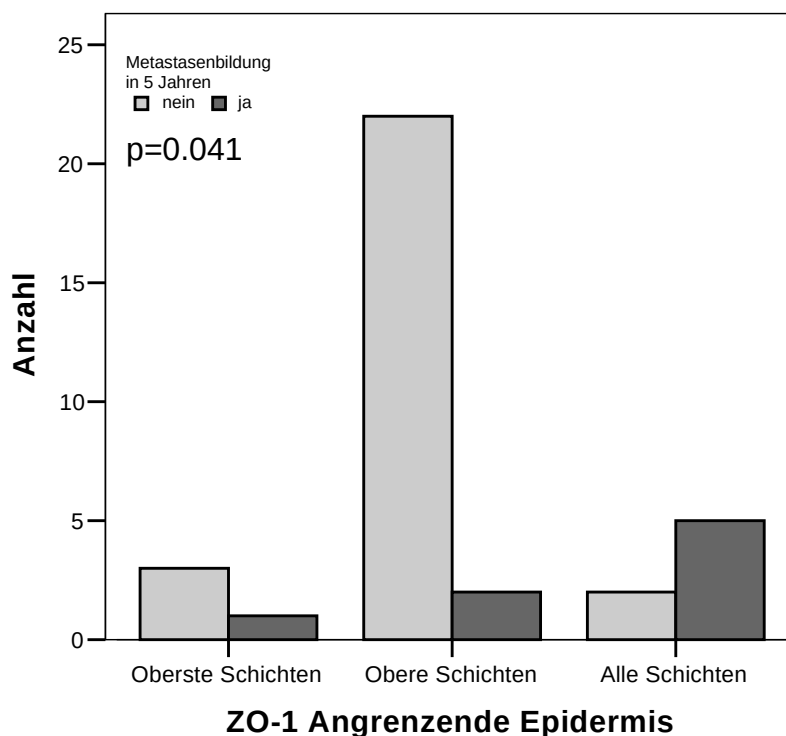


Abbildung 33: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von ZO-1 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis der Gruppe von Patienten, die im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose eine Metastase entwickelten ($n=8$) und der Gruppe von Patienten ohne Metastasenbildung ($n=33$), ($p = 0.041$).

5 Diskussion

5.1 Eignung der Expression von Cx26, Cx30, und Cx43 im malignen Melanom als Tumormarker

Schon 1966 wurde ein erster Zusammenhang zwischen Gap Junctions und Tumoren hergestellt (Loewenstein und Kanno 1966). Eine veränderte Kommunikation über Gap Junctions wurde zwischen Tumorzellen und zwischen Tumor- und gesunden Zellen beobachtet. Es wurde eine Herunterregulation oder ein Verlust von Connexinen in verschiedenen Tumoren beschrieben (Mesnil *et al.* 2005). Im Bronchialkarzinom, sowie im duktalem und lobulärem Mammakarzinom fand sich eine verminderte Expression von Cx43. Auch im Prostatakarzinom wurde Cx43 vermindert und in manchen Fällen gar nicht nachgewiesen. Im hepatozellulären Karzinom wurde eine Herunterregulation von Cx26 beobachtet. Es werden dabei zwei Mechanismen als Grundlage der verminderten Kommunikation diskutiert. Einerseits gibt es einige wenige Beispiele für den Verlust der Transkription und den daraus resultierenden Verlust der Expression der Connexine (Hirai *et al.* 2003), und andererseits haben einige Studien eine veränderte Lokalisation der Connexine gezeigt, vor allem das Vorkommen im Cytoplasma statt an der Zellmembran (Tada and Hashimoto 1997) wurde gezeigt. Der Verlust der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions könnte den Tumorzellen das Überleben sichern, indem sie sich von umliegenden gesunden Zellen abschotten und damit deren Kontrolle, z.B. durch zellzerstörende Signale wie Calcium-Ionen, entgehen.

Vor diesem Hintergrund ist es von großem Interesse, dass ich in meiner Arbeit nur in 2 (Cx26) bzw. 1 (Cx30) von 41 Fällen eine Expression von Cx26 und Cx30 an den Zellgrenzen im malignen Melanom beobachten konnte. Bei diesen wenigen Fällen mit Cx26- bzw. Cx30-Expression an den Zellgrenzen handelte es sich ausschließlich um Tumore mit hohem Breslow-Index. In diesen wurde

die Cx26- bzw. Cx30-Expression zudem in weniger als 10% der Zellen beobachtet. Cx43 wird in 95% der Fälle nicht an den Zell-Zell-Grenzen zwischen Melanomzellen gefunden.

In der Epidermis findet man im Bereich von pagetoid eingewanderten Melanomzellen positive Cx26- bzw. Cx30-Färbung an den Zellgrenzen. Dabei kann allerdings aufgrund der limitierten Auflösung des Lichtmikroskops und der Dreidimensionalität von Hautschnitten nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob diese Connexin-Färbungen tatsächlich an den Zellgrenzen der Melanomzellen oder aber zu den benachbarten Keratinozyten zu finden sind. Generell werden diese Färbungen aber im überwiegenden Maße an Zellgrenzen zwischen Melanomzellen und Keratinozyten, nicht aber zwischen Melanomzellen gefunden.

Meine Ergebnisse bestätigen zum einen die Ergebnisse von Haas *et al.* (2006), die an einer kleineren Fallzahl (n=8) die Abwesenheit von Cx26, Cx30 und Cx43 im malignen Melanom zeigten. Dies ist auch im überwiegenden Anteil der von mir untersuchten Fälle. Zum anderen bestätigen sie zum Teil die Ergebnisse von Saito-Katsuragi *et al.* (2007), die Cx26 im malignen Melanom nachgewiesen haben. Während wir dies allerdings nur in Ausnahmefällen beobachteten, beschreiben Saito-Katsuragi und Kollegen dies in einer Mehrzahl der Fälle.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser Ergebnisse zu unseren Ergebnissen ist die Verwendung unterschiedlicher Antikörper. Der für die Versuchsreihen von Saito-Katsuragi *et al.* (2007) verwendete Antikörper gegen Cx26 zeigte in unseren Vergleichen eine starke Kreuzreaktion mit dem Zytoplasma von Haarfollikelzellen (Haass *et al.* 2006). Für die mangelnde Verlässlichkeit des Antikörpers spricht auch, dass Ito *et al.* (2000) aus der selben Arbeitsgruppe mit dem selben Antikörper, Cx26 in Schnitten des malignen Melanoms ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen haben. Die Autoren gehen auf die Diskrepanz ihrer Ergebnisse nicht ein. Der von unserer Arbeitsgruppe entwickelte und verwendete Anti-Cx26-Antikörper ist hingegen hochspezifisch gegen Cx26-Proteine (Brandner *et al.* 2004). Des Weiteren wäre möglich, dass die Autoren Cx26-Expression im Bereich pagetoider

Melanomzellen in der Epidermis als positiv gewertet haben. Leider ist nur eine einzige Abbildung für die Cx26-Färbung im malignen Melanom gezeigt (Saito-Katsuragi *et al.* 2007).

Eine allgemein beachtete Hypothese besagt, dass bei der Entwicklung des Melanoms die Melanineinheit gestört ist und die Kommunikation zwischen Melanozyten und Keratinozyten nicht wie in der gesunden Haut stattfindet. Die Melanomzellen könnten sich somit der Kontrolle durch die Keratinozyten entziehen und es kommt stattdessen zu einer Interaktion zwischen Melanomzellen und Fibroblasten, sowie zwischen Melanomzellen und Endothelzellen. Das Zusammenspiel mit neuen Kommunikationspartnern ist dann die Grundlage für die Invasion ins umliegende Gewebe und die Metastasierung (Haass *et al.* 2004). Da in meiner Arbeit nur die Connexine Cx26, Cx30 und Cx43 untersucht wurden, kann es sehr wohl sein, dass weitere Connexine (z.B. Cx32), die für die oben genannte Kommunikation verantwortlich sind, im malignen Melanom vorhanden sind. Somit widersprechen meine Ergebnisse dieser Theorie nicht.

Verschiedene Autoren wiesen Cx43 in humanen und Cx26 in humanen und murinen kultivierten Melanomzellen nach (Hsu *et al.* 2000; Ito *et al.* 2000; Saito Katsuragi *et al.* 2007). Für die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen könnte, neben dem oben bereits erwähnten Unterschieden im verwendeten Antikörper, der Unterschied zwischen kultivierten Zellen und *in vivo*-Zellen eine Rolle spielen. So findet man z.B. auch in interfollikulären Keratinozyten im Gewebe keine Expression von Cx26, während dies in kultivierten Keratinozyten eingeschaltet wird (Brandner *et al.* 2004; 2008).

Den Beobachtungen im malignen Melanom wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster von Cx26 und Cx30 in den melanozytären Naevi gegenübergestellt. In einer vorangegangenen Arbeit (Haass *et al.*, 2006) war an einer kleinen Zahl von melanozytären Naevi (n=8) festgestellt worden, dass Cx26 und Cx30 nicht in melanozytären Naevi gefunden werden. Dies wurde für Cx26 von Saito-Katsuragi an 5 melanozytären Naevi ebenfalls gezeigt. Ich bestätigte diese Ergebnisse an einer größeren Fallzahl (n=14).

Zusammenfassend konnten wir in unseren Arbeiten die untersuchten Connexine im überwiegenden Teil der malignen Melanome und in melanozytären Naevi nicht nachweisen. Somit ist der Nachweis der An- bzw. Abwesenheit von Cx26, Cx30 und Cx43 im Tumor nicht als Marker für die Abgrenzung des malignen Melanoms von melanozytären Naevi geeignet.

5.2 Eignung der Expression von ZO-1 im Tumor als Tumormarker

In den meisten bisher veröffentlichten Arbeiten wurde ein Verlust der Expression von ZO-1 in Tumoren, z.B. im Adenokarzinom des Gastrointestinaltraktes, Mammakarzinom und Rektumkarzinom beschrieben. (Hoover *et al.* 1998; Kaihara *et al.* 2003; Kimura *et al.* 1997). Meine Ergebnisse, die eine Induktion der Expression von ZO-1 in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten zeigen (ZO-1 wird in gesunder Epidermis nur in den obersten Schichten gefunden und ist somit in Melanozyten abwesend), stehen im Gegensatz zu diesen Beobachtungen. Hingegen bestätigen die hier gezeigten Ergebnisse den von Smalley *et al.* (2005) beschriebenen Nachweis von ZO-1 in Zellen von malignen Melanomen (n=12) an einer größeren Fallzahl (n=41). Wie bei Smalley *et al.* (2005) wiesen auch wir ZO-1 in 92% der malignen Melanome nach. Die 3 malignen Melanome, die in dieser Arbeit für ZO-1-negativ waren, hatten Breslow-Indizes von 0,2mm, 0,4mm und 3,3mm. In der Arbeit von Smalley und Kollegen war 1 von 12 Tumoren negativ für ZO-1, wobei keine Angabe zum Breslow-Index dieses Tumors gemacht wurde. Es konnte, wie auch bei uns, keine klare Korrelation zwischen der Expression von ZO-1 und dem Tumorstadium beschrieben werden.

Smalley und Kollegen zeigten, dass die Expression von ZO-1 in Melanomzellen mit einer Veränderung der Zellmorphologie, sowie steigender Invasivität und Adhäsivität der Melanomzellen einherging. Daher ist es von besonderem Interesse, dass in meiner Arbeit in 24 von 41 Fällen eine besonders intensive ZO-1 Färbung in den invasiven Bereichen zu finden war. In 9 von 41 Fällen

hingegen war die Färbung am intensivsten in den zur Epidermis hin gelegenen Bereichen. Es ließ sich dabei allerdings kein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Intensitätsmaxima der Färbung von ZO-1 im Tumor und dem Breslow-Index, der Bildung von Metastasen oder dem Überleben der Patienten nachvollziehen.

Wie Smalley *et al.* (2005) konnte auch ich die Expression von ZO-1 bereits in melanozytären Naevi nachweisen. Nur 3 von 14 melanozytären Naevi waren negativ für ZO-1, dabei handelte es sich um 2 dysplastische und 1 nichtdysplastischen melanozytären Naevi. Somit wurde ZO-1 in den melanozytären Naevi in 78.6% der Fälle nachgewiesen und in den malignen Melanomen in 92.9% der Fälle. Daraus folgt für die Färbung von ZO-1 als Test für den Nachweis eines malignen Melanoms eine Sensitivität von 90%, wobei die Spezifität nur 20% beträgt und damit für eine praktischen Anwendung keine Relevanz hat.

Es konnte in dieser Arbeit auch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von ZO-1 im Tumor und der Metastasierung festgestellt werden.

5.3 Eignung der Lokalisation von Cx26, Cx30, und Cx43 in der Umgebung des Tumors als Tumormarker

Zum Verhalten von Zell-Zell-Kontakten in malignen Zellen sind in den letzten Jahren mehrere Arbeiten vorgestellt worden. Im Gegensatz dazu ist über die Expression von Gap- und Tight-Junction-Proteinen in der Umgebung von Tumoren wenig bekannt. In der vorausgegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von Cx26 und Cx30 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis erstmals beschrieben.

Haass *et al.* (2006) beobachteten dabei, dass, im Gegensatz zur Umgebung des malignen Melanoms, in der Umgebung von melanozytären Naevi Cx26 und

Cx30 nicht induziert wurden. In einer größer angelegten Versuchsreihe sollte nun die Allgemeingültigkeit dieser Aussagen überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit mit einer größeren Anzahl von melanozytären Naevi konnte nun Cx26 in 8 von 14 Fällen in der angrenzenden Epidermis nachgewiesen werden. Cx30 fand sich in 9 von 14 Fällen in der an die melanozytären Naevi angrenzenden Epidermis. Somit konnte die von Haass und Kollegen beobachtete Abwesenheit von Cx26 und Cx30 in der Umgebung von melanozytären Naevi nicht komplett bestätigt werden. Die entfernte Epidermis war, wie auch von Haass *et al.* (2006), für beide Connexine negativ.

In der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis konnte in 40/41 Fällen für Cx26 und in 41/41 Fällen für Cx30 eine Induktion beobachtet werden. Dies bestätigt die exemplarische Untersuchung von insgesamt 8 malignen Melanomen von Haass *et al.* (2006).

Betrachtet man die Eignung der Induktion von Cx26 in der Umgebung von malignen Melanomen bzw. melanozytären Naevi als Tumormarker, so beobachtet man 8 falschpositive Ergebnisse (Cx26-Induktion in der Umgebung von 8 melanozytären Naevi) und ein falschnegatives Ergebnis (keine Cx26-Induktion in der Umgebung eines malignen Melanoms). Die Sensitivität zum Nachweis eines malignen Melanoms beträgt somit 98%, die Spezifität 43%.

In weiterführenden Überlegungen stellt sich die Frage nach dem Einsatz der Färbung von Cx26 in speziellen Schichten der Epidermis als Marker für ein malignes Melanom. Dabei zeigen die Ergebnisse unserer Arbeit, dass die Färbung von Cx26 in den obersten Schichten (*Stratum granulosum* und oberes *Stratum spinosum*), oberen Schichten (d.h. *Stratum granulosum* und komplettes *Stratum spinosum*; Gruppe 2) und in allen Schichten der an eine melanozytäre Läsion angrenzenden Epidermis (Gruppe 3) ein guter Nachweis für ein malignes Melanom ist, da die Färbung in der an die melanozytären Naevi angrenzenden Epidermis im *Stratum granulosum* (7 Fälle) und im *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* (1 Fall) (Gruppe 2) zu finden war und man somit nur 1 falschpositives Ergebnis findet (Spezifität 93%). Es tritt dabei nur 1

falschnegatives Ergebnis auf, ein negatives malignes Melanom, was eine Sensitivität von 98% ergibt.

Cx30 konnte in der Epidermis in der Umgebung von allen malignen Melanomen nachgewiesen werden. Allerdings findet man es auch in der Umgebung von 9 melanozytären Naevi. Somit hat man für die Induktion von Cx30 in der umgebenden Epidermis eine Sensitivität fürs maligne Melanom von 100% aber nur eine Spezifität von 36%.

Berücksichtigt man nur die Expression von Cx30 im *Stratum granulosum* und oberen *Stratum spinosum* (Gruppe 1) bzw. *Stratum granulosum* und gesamten *Stratum spinosum* (Gruppe 2) bzw. in allen Schichten (Gruppe 3), so fallen in diese Gruppe 4 melanozytäre Naevi. Dahingegen hat man 0 falschnegative maligne Melanome. Man hat in diesem Fall also eine Spezifität von 72% und eine Sensitivität von 100%.

Vergleicht man die Sensitivität der generellen Expression von Cx26 (98%) und Cx30 (100%) in der den Tumor umgebenden Epidermis mit häufig verwendeten Tumormarkern, so findet man eine vergleichbare bzw. bessere Sensitivität. HMB45 zeigt eine Sensitivität von 93%, Melan A von 87% und S100 von 93%. Auch die von Thies und Kollegen beschriebenen Marker CEACAM1 (93-97%) und L1 (93%) liegen in einem ähnlichen Bereich (Thies *et al.* 2007). Die Spezifität liegt für Cx26 (43% für alle Gruppen, 98% bei einer Beschränkung auf die Gruppen 1+2+3) und Cx30 (36% und 72%) höher als die Spezifität von HMB45 (0%), Melan A (0%) und S100 (0%), die neben malignen Melanomen auch melanozytäre Naevi erkennen. Die Spezifität liegt vergleichbar zu der für CEACAM (67%), ist aber schlechter als die für L1 (100%) (Thies *et al.* 2007).

Da es sich bei den von mir untersuchten Molekülen um Marker handelt, die nicht im malignen Melanom, sondern in der umgebenden Epidermis zu finden sind, stellen diese Marker aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität eine sehr gute Ergänzung zu im Tumor lokalisierten Markern für die Unterscheidung zwischen malignem Melanom und melanozytärem Naevus dar.

Es sollte aber berücksichtigt werden, dass eine Induktion von Cx30 und Cx26 auch in anderen Erkrankungen beobachtet wird, z.B. bei Psoriasis (Lucke *et al.*

1999), an Wundrändern (Brandner *et al.* 2004) und in der Umgebung von Spinaliomen und Basaliomen (Haass *et al.* 2006). Da Cx26 und Cx30 in palmoplantarer Haut vorhanden sind, eignet sich ihre Induktion nicht als Marker für Melanome der Fußsohle und der Handfläche.

Connexin 43 konnte in dieser Arbeit, wie auch bei Haass *et al.* (2006) sowohl in der an melanozytären Naevi als auch an maligne Melanome angrenzenden Epidermis nachgewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen der Expression von Cx43 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index war statistisch nicht signifikant. So veränderte sich die Expression von Cx43 in den Gruppen 1.) gesunde Haut, 2.) Umgebung der melanozytären Naevi und 3.) Umgebung maligner Zellen unwesentlich.

5.4 Eignung des Nachweises der Lokalisation von ZO-1 in der Umgebung des Tumors als Tumormarker

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine veränderte Expression von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis von melanozytären Naevi und malignen Melanomen nachgewiesen. Die Ergebnisse der Färbung von ZO-1 in der Nachbarschaft der melanozytären Naevi und der malignen Melanome sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich. In allen Fällen ließ sich ZO-1 in der angrenzenden Epidermis nachweisen und in beiden Gruppen waren am häufigsten die oberen Schichten der angrenzenden Epidermis positiv für ZO-1. Somit ist die Lokalisation von ZO-1 in der Umgebung des malignen Melanoms nicht als Tumormarker zu verwenden.

5.5 Zusammenhang zwischen Progression des Melanoms und Lokalisation von Cx26, Cx30 und Cx43 in der umgebenden Epidermis

In dieser Arbeit konnte anhand von 41 Fällen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der vertikalen Ausbreitung der Expression von Cx26 und Cx30 in der Epidermis zum Breslow-Index der Tumoren nachgewiesen werden. Hierbei wurde der Breslow-Index als Hilfsmittel zur Stadieneinteilung der Tumore und als Marker der Malignität verwendet. Je fortgeschrittener das maligne Melanom in seinem Wachstum ist, d.h. je grösser der Breslow-Index, desto mehr Cx26 und Cx30 konnte in der darüberliegenden Epidermis nachgewiesen werden, d.h. in mehr Schichten der Epidermis.

Die Induktion von Cx26 und Cx30 in der angrenzenden Epidermis von malignen Melanomen und ihre Korrelation zum Breslow-Index ist ein Hinweis auf den Einfluss der Tumorzellen auf benachbarte gesunde Zellen. In der Arbeit von McCarty *et al.* (2003) wurde ein Zusammenhang zwischen der epidermalen Hyperplasie in der an maligne Melanome angrenzende Epidermis und der Angiogenese im Tumor, dem Tumorwachstum und dem Potential Metastasen zu bilden beschrieben. In Co-Kulturen mit metastasierenden Melanomzellen wurde eine gesteigerte Proliferation von Keratinozyten und eine verminderte Expression des Angiogenese hemmenden Faktors IFN- β beobachtet. Daraus resultierte eine höhere Dichte an Mikrogefäßen. Die Induktion der Angiogenese durch hyperplastisches Epithel könnte Wachstum und Progression des malignen Melanoms stimulieren. Der Einfluss benachbarter Gewebe könnte somit über Wachstumsfaktoren eine Rolle für vermehrte Angiogenese, Zellwachstum und Metastasenbildung spielen, so dass es sich um einen positiven Feedback-Mechanismus des Tumors handeln würde.

Eine Induktion von Cx26 und Cx30 wurde bisher vor allem in hyperproliferativen Prozessen der Epidermis (siehe Einleitung) beobachtet. Es wäre möglich, dass die Induktion der Connexine in der Epidermis in der Nähe von malignen Melanomen ähnlich wie in den oben beschriebenen Prozessen einen Vorteil für

den Tumor darstellt. Es könnte aber auch der Gegensteuerung einer drohenden Exulzeration bei voranschreitendem Wachstum des Tumors durch Verdickung der Haut durch Hyperplasie dienen. Beide Theorien müssen aber erst durch weitere Experimente unterstützt werden.

In meiner Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Cx26 und Cx30 in den verschiedenen Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und der Bildung von Metastasen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich als Trend, dass Fälle mit Metastasierung im Verlauf häufiger in allen Schichten der Epidermis die Expression von Cx26 und Cx30 zeigten.

Da sich aufgrund der kursorischen Schichtung der Schnitte - die Färbung von Cx26 war im Gegensatz zur Färbung von Cx30 nicht auf der ganzen horizontalen Länge der Epidermis über dem Tumor nachzuweisen - Hinweise ergaben, dass auch ein Zusammenhang zwischen der horizontalen Ausbreitung von Cx26 und der Tumorgroße bestehen könnte, wurde die horizontale Ausbreitung der Färbung vermessen. Der Zusammenhang zwischen der horizontalen Ausbreitung von Cx26 und dem Breslow-Index war statistisch signifikant, d.h. bei Melanomen mit höherem Breslow-Index war die Färbung im Durchschnitt auf einer längeren Strecke der angrenzenden Epidermis zu sehen. Die Färbung mit Cx26 könnte demnach mit einem definiertem Sicherheitsabstand als Marker für eine sichere Exzision des malignen Melanoms Verwendung finden. Da wir auch einen signifikanten Zusammenhang zwischen horizontaler Ausbreitung von Cx26 und der Metastasenbildung von Melanomen nachweisen konnten, könnte die Ausbreitung ebenfalls als prognostischer Marker dienen.

5.6 Zusammenhang zwischen Progression des Melanoms und Lokalisation von ZO-1 in der umgebenden Epidermis

Die erhobenen Daten zur Färbung von ZO-1 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis konnten in statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Breslow-Index gestellt werden, d.h. je größer die Tumordicke, umso breiter war die Expression von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis.

Eine verbreiterte bzw. verstärkte Expression von ZO-1 in der Epidermis findet man in Zuständen, in denen die Hautbarriere aufgrund einer intrinsischen Veränderung (z.B. Psoriasis vulgaris) oder eines Verlusts (z.B. Verwundung) des *Stratum corneum* geschädigt ist (Brandner *et al.* 2002; 2006; Pummi *et al.* 2001; Yoshida *et al.* 2001). Man findet es ebenfalls, wenn die Barrierefunktion der Haut durch Besiedelung von Bakterien herausgefordert ist (Ohnemus *et al.* 2008). Es könnte sich bei der verstärkten Expression von ZO-1 also um einen „Rettungsmechanismus“ handeln, der einer – durch den Tumor induzierten? - gestörten Hautbarriere entgegenwirkt. Inwiefern dies in der Umgebung des malignen Melanoms der Fall ist, inwieweit dies für den Körper oder den Tumor von Vorteil ist, und ob die Verbreiterung eine aktive Veränderung durch den Tumor oder eine Reaktion durch die Epidermis ist, ist bisher noch nicht geklärt. Darüber hinaus kann man natürlich nicht ausschließen, dass ZO-1 neben seiner Funktion in funktionellen Tight Junctions - und damit der Barrierefunktion - noch andere Funktionen, z.B. in Proliferation und Differenzierung von Zellen erfüllt. Dies wurde bereits mehrfach für Tight Junction-assoziierte Proteine beschrieben (Übersicht in Brandner *et al.*, 2008) und dies würde auch von der Tatsache unterstützt, dass ZO-1 nicht nur in den Tight Junctions, sondern auch in Adhärenzverbindungen, in Gap-Junctions und im Zellkern gefunden wird.

In meiner Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von ZO-1 im Tumor und der Metastasierung festgestellt werden. Ein signifikanter Zusammenhang hingegen fand sich zwischen der verbreiterten Expression von ZO-1 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis

und der Metastasierung in 5 Jahren nach Diagnosestellung. Es wäre also für die Zukunft eine interessante Frage, ob die verbreiterte Expression von ZO-1 in der dem malignen Melanom benachbarten Epidermis als prognostischer Marker verwendet werden könnte und inwieweit die verbreiterte Expression von ZO-1 die Metastasierung von Melanomzellen begünstigt.

5.7 Zusammenhang zwischen Expression der Connexine bzw. ZO-1 und dem Überleben der Patienten

In der Stichprobe der Patienten mit malignem Melano befanden sich 8 Patienten, die innerhalb von 5 Jahren nach der Diagnose des malignen Melanoms verstorben sind. Bei diesen 8 Patienten zeigte sich ein heterogenes Bild der Färbung der verschiedenen Connexine und des ZO-1. Die Färbung von Cx26 war in 3 von 8 Fällen in allen Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis positiv und Cx30 und ZO-1 waren jeweils in 2 von 8 Fällen in allen Schichten zu finden. Es ergaben sich somit keine signifikanten Ergebnisse. In den Patientenakten war die eigentliche Todesursache nicht in allen Fällen zuverlässig nachzuvollziehen. Der Kontakt zu den weiterbehandelnden Ärzten, um Auskünfte zu erhalten, gestaltete sich schwierig. Die Ergebnisse der statistischen Überprüfung des Zusammenhangs zwischen den Färbeargebnissen und dem Überleben der Patienten können aufgrund dieser Tatsache und aufgrund der niedrigen Zahl der Patienten nur kritisch betrachtet werden.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass vor allem die Induktion von Cx26, eingeschränkt aber auch von Cx30, in der das maligne Melanom umgebenden Epidermis bezüglich seiner Sensitivität und Spezifität ein guter Tumormarker zur Abgrenzung von melanozytären Naevi ist. Darüber hinaus konnte ich herausfinden, dass sowohl die vertikale Expression von Cx26, als auch von Cx30 und ZO-1 statistisch signifikant mit der Tumorgroße korreliert und somit mit der Tumorprogression verbunden scheint. Dasselbe gilt für die horizontale Expression von Cx26. Letzteres könnte ggf. für die Auswahl des

Sicherheitsabstandes bei der Exzision des malignen Melanoms verwendet werden. Die horizontale Expression von Cx26 und die vertikale Expression von ZO-1 korrelieren mit der Metastasierung des malignen Melanoms und könnten somit als prognostischer Marker verwendet werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Expression von Gap-Junction- und Tight-Junction-Proteinen und der Malignität maligner Melanome untersucht. Die Ergebnisse der Färbungen von Cx26, Cx30 und ZO-1 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis, konnten in statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Breslow-Index gestellt werden. Die Ergebnisse der Färbungen der malignen Melanome waren gegenüber denen von melanozytären Naevi, für Cx26, Cx30 und ZO-1 signifikant unterschiedlich. Für die Expression von Cx43 konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Breslow-Index nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Sensitivität der Expression von Cx26 und Cx30 in der den Tumor umgebenden Epidermis mit häufig verwendeten Tumormarkern, so findet man eine vergleichbare bzw. bessere Sensitivität.

Das Überleben der Patienten 5 Jahre nach Diagnose eines malignen Melanoms konnte mit der Expression der getesteten Gap-Junction- und Tight-Junction-Proteine nicht in signifikanten Zusammenhang gestellt werden. Das Auftreten von Metastasen 5 Jahre nach Diagnose eines malignen Melanoms zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Expression von ZO-1 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis.

Die veränderte Expression von Connexinen und die daraus resultierende veränderte Kommunikation zwischen Tumor- und gesunden Zellen könnte Grundlage für den Einfluss benachbarter Gewebe über Wachstumsfaktoren auf vermehrte Angiogenese, Zellwachstum und Metastasenbildung sein. Durch weiterführende Experimente muss sich der Frage genähert werden, ob es sich bei der veränderten Expression von Connexinen um einen Mechanismus zum Vorteil des Tumors oder um eine Gegensteuerung des umliegenden Gewebes handelt.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung von Connexinen zu Connexonen zu Gap Junctions. Abb. nach G. Richard. S. 2

Abbildung 2: Skizze der Epidermis mit malignem Melanom. Definition der angrenzenden Epidermis direkt über dem malignem Melanom gelegen und entfernte Epidermis in maximaler Entfernung zum malignen Melanom. a = Epidermisnaher Rand des Tumors, b = zentral im Tumorknoten, c = Invasionsfront des Tumors. S. 17

Abbildung 3: Skizze der Epidermis mit malignem Melanom. Definition der angrenzenden Epidermis direkt über dem malignem Melanom gelegen und entfernte Epidermis in maximaler Entfernung zum malignen Melanom. S. 19

Abbildung 4: Skizze der Hautschichten der Epidermis. S. 20

Abbildung 5: Cx26 in der Mischpopulation von Melanomzellen mit Kerationozyten in der Epidermis. A= Cx 26 rot, B= Melan A grün, C= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün, D= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast hinterlegt. Maßstab 50µm. S. 24

Abbildung 6: Cx26 negativ in der gesunden Epidermis mit Positivkontrolle in einem Blutgefäß. A= Cx26 rot mit Phasenkontrast hinterlegt, A`= Cx26 rot, Maßstab 50µm. S. 25

Abbildung 7: Cx26 im melanozytären Naevus. A= Cx26 negativ in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis mit Positivkontrolle im Haarfollikel, Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast hinterlegt. A`= Cx26 rot. B= Cx26 im Stratum granulosum in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis (siehe mit Pfeil markierten Ausschnitt). Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast hinterlegt. B`= Cx26 rot, Maßstab 50µm. S. 26

Abbildung 8: A= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Cx26 negativ in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis mit Positivkontrolle im Haarfollikel. A´= Cx26 rot. B= Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast in den obersten Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. B´= Cx26 rot. Maßstab 50µm. S. 27

Abbildung 9: A= Cx26 in den oberen Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A´= Cx26 rot. B= Cx26 in allen Schichten der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. Doppelfärbung von Cx26 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Maßstab 50 50µm. S. 28

Abbildung 10: Boxblots zur Korrelation zwischen der Lokalisation von Cx26 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben sind Median, Interquartilebene und Ausreißer, o = Ausreißer, Entfernung von 75%- bzw. 25%-Quantile, □ = Extremwerte, noch weiter außen gelegen (*1 $p \leq 0.001$, *2 $p \leq 0.001$, *3 $p = 0.006$). S. 30

Abbildung 11: Korrelation zwischen der horizontalen Ausbreitung der Cx26-Färbung in Mikrometern in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben ist eine lineare Anpassungslinie ($p \leq 0.001$). S. 31

Abbildung 12: Cx30 in der Mischpopulation von Melanomzellen mit Keratinozyten in der Epidermis. A= Cx30 rot, B= Melan A grün, C= Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast, D= Phasenkontrast. Maßstab 50µm. S. 33

Abbildung 13: Cx30 negativ in der gesunden Epidermis mit Positivkontrolle in Drüsen. A= Cx26 rot mit Phasenkontrast. A´= Cx30 rot. Maßstab 50µm. S. 34

Abbildung 14: Cx30 in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis. A= Cx30 negativ mit Positivkontrolle im Haarfollikel.

Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = Cx30 rot. B = Cx30 im Stratum granulosum der Epidermis (siehe mit Pfeil markierten Ausschnitt). Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Maßstab 50µm. S. 35

Abbildung 15: Cx30 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. A und A' = Cx30 in den obersten Schichten, sowie zytoplasmatische Färbung basal. Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = Cx30 rot. B und B' = Cx30 in den oberen Schichten der Epidermis und. Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. B' = Cx30 rot, in Tumorzellen auch zytoplasmatisch. C und C' = Cx30 in den allen Schichten der Epidermis. Doppelfärbung von Cx30 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. C' = Cx30 rot. Maßstab 50µm. S. 38

Abbildung 16: Boxplot zur Korrelation zwischen der Lokalisation von Cx30 in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte, o = Ausreißer, □ = Extremwerte (*1 $p \leq 0.003$, *2 $p \leq 0,001$). S. 39

Abbildung 17: Cx43 im malignen Melanom. A = Cx43 rot. B = Melan A grün. C = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün. D = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. Maßstab 50µm. S. 41

Abbildung 18: Cx43 in der gesunden Epidermis. A = Cx43 rot und Phasenkontrast. A' = Cx43 rot. Maßstab 50µm. S. 42

Abbildung 19: Cx43 in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis. A = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = Cx43 rot. Maßstab 50µm. S. 43

Abbildung 20: Cx43 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis. A und A' = Cx43 in den obersten Schichten der Epidermis. A = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = Cx43 rot. B und B' = Cx43 in den oberen Schichten der Epidermis. B = Doppelfärbung von

Cx43 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. B' = Cx43 rot. C und C' = Cx43 in allen Schichten der Epidermis. C = Doppelfärbung von Cx43 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. C' = Cx43 rot. Maßstab 50µm.

S. 45

Abbildung 21: Boxplot zur Korrelation zwischen der Lokalisation von Cx43 in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern ($p = 0.654$). Angegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte, o = Ausreißer, □ = Extremwerte.

S. 46

Abbildung 22: ZO-1 in der gesunden Epidermis. A = ZO-1 rot und Phasenkontrast. A' = ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

S. 48

Abbildung 23: ZO-1 in der an den melanozytären Naevus angrenzenden Epidermis und in Melanozyten. A = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

S. 49

Abbildung 24: ZO-1 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und basal in Melanomzellen, bzw. im Tumorknoten. A und A' = ZO-1 in den obersten Schichten der Epidermis. A = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = ZO-1 rot. B und B' = ZO-1 in den oberen Schichten der Epidermis. B = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. B' = ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

S. 50

Abbildung 25: ZO-1 in der an das maligne Melanom angrenzenden Epidermis und im Tumor. A und A' = ZO-1 in allen Schichten der Epidermis. A = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün mit Phasenkontrast. A' = ZO-1 rot. B und B' = ZO-1 in allen Schichten der Epidermis und im Tumor. B = Doppelfärbung von ZO-1 rot und Melan A grün ergibt gelb, mit Phasenkontrast hinterlegt. B' = ZO-1 rot. Maßstab 50µm.

S. 51

Abbildung 26: Korrelation zwischen der Lokalisation von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis und dem Breslow-Index in Millimetern. Angegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte, o = Ausreißer, □ = Extremwerte, (*1 $p = 0.004$, *2 $p \leq 0.001$).

S. 52

- Abbildung 27: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx26 in der angrenzenden Epidermis der melanozytären Naevi (n=14) und den malignen Melanomen (n=41), ($p \leq 0.001$). S. 53
- Abbildung 28: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx30 in der angrenzenden Epidermis der melanozytären Naevi (n=14) und den malignen Melanomen (n=41), ($p \leq 0.001$). S. 54
- Abbildung 29: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von ZO-1 in der angrenzenden Epidermis der melanozytären Naevi (n=14) und den malignen Melanomen (n=41), ($p = 0.853$). S. 55
- Abbildung 30: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx26 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis der Fälle mit Bildung von Metastasen im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose (n=8) und der Fälle ohne Metastasenbildung (n=33), ($p=0.304$). S. 56
- Abbildung 31: Zusammenhang zwischen der horizontalen Ausmessung der Färbung von Cx26 in Millimetern in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis und der Bildung von Metastasen im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose ($p= 0.012$). S. 57
- Abbildung 32: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von Cx30 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis der Fälle mit Bildung von Metastasen im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose (n=8) und der Fälle ohne Metastasenbildung (n=33), ($p=0.221$). S. 58
- Abbildung 33: Gruppenvergleich zwischen der Färbung von ZO-1 in der an die malignen Melanome angrenzenden Epidermis der Gruppe von Patienten, die im Verlauf von 5 Jahren nach Diagnose eine Metastase entwickelten (n=8) und der Gruppe von Patienten ohne Metastasenbildung (n=33), ($p = 0.041$). S. 59

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der malignen Melanome und Verteilung von Breslow-Index, Ulzerationen, Metastasen und Überleben.	S. 22
Tabelle 2: Färbung von Connexin 26 im malignen Melanom	S. 23
Tabelle 3: Connexin 26 in der an melanozytäre Naevi und maligne Melanome angrenzenden Epidermis	S. 29
Tabelle 4: Färbung von Connexin 30 im malignen Melanom	S. 32
Tabelle 5: Cx30 in der an melanozytäre Naevi und maligne Melanome angrenzenden Epidermis	S. 36
Tabelle 6: Färbung von Connexin 43 im malignen Melanom	S. 40
Tabelle 7: Connexin 43 in der an melanozytäre Naevi und maligne Melaonome angrenzenden Epidermis	S. 43
Tabelle 8: Maximum der Färbung von ZO-1 in den melanozytären Naevi und malignen Melanomen	S. 47
Tabelle 9: ZO-1 in der an melanozytäre Naevi und maligne Melanome angrenzenden Epidermis	S. 49

9 Literaturverzeichnis

- Bevans, C. G., Kordel, M., Rhee, S. K., et al. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem* (1998) 273:2808-2816.
- Brandner, J. M., Houdek, P., Husing, B., et al. Connexins 26, 30, and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. *J Invest Dermatol* (2004) 122(5):1310-20.
- Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., et al. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* (2002) 81(5):253-63.
- Brandner, J. M., Kief, S., Wladykowski, E., et al. Tight Junction Proteins in the Skin. *Skin Pharmacology and Physiology* (2006) 19:71-77.
- Brandner, J. M., Zacheja, S., Houdek, P., et al. Expression of Matrix Metalloproteinases, Cytokines and Connexins in Diabetic and Nondiabetic Human Keratinocytes Before and After Transplantation Into an Ex Vivo Wound-Healing Model. *Diabetes Care* (2008) 31:114-120.
- Bruzzone, R., White, T. W., and Paul, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* (1996) 238:1-27.
- Choudhry, R., Pitts, J. D., and Hodgins, M. B. Changing patterns of gap junctional intercellular communication and connexin distribution in mouse epidermis and hair follicles during embryonic development. *Dev Dyn* (1997) 210:417-430.
- Di, W., Rugg, E., Leigh, I. M., et al. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J Invest Dermatol* (2001) 117:958-964.
- Djalilian, A. R., McGaughey, D., Patel, S., et al. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *J Clin Invest* (2006) 116(5):1243-53.
- Giepmans, B. N. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* (2004) 62(2):233-245.
- Giepmans, B. N., and Moolenaar, W. The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol* (1998) 8:931-4.
- Grossman, H. B., Liebert, M., Lee, I. W., et al. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. *Cancer Res* (1994) 54(11):3062-5.
- Haass, N. K., Houdek, P., Wladykowski, E., et al. Expression patterns of tight junction proteins in Merkel cell carcinoma. In Baumann K I, Halata Z, and Moll I, eds., *The Merkel Cell*. Springer-Verlag, 2003.

- Haass, N. K., Smalley, K. S., and Herlyn, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol* (2004) 35(3):309-18.
- Haass, N. K., Wladykowski, E., Kief, S., et al. Differential induction of Connexin 26 and 30 in skin tumors and their adjacent epidermis. *J Histochem Cytochem* (2006) 54:171-182.
- Hirai, A., Yano, K., Nishikawa, K., et al. Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell line. *Am. J. Nephrol.* (2003) 23:172-177.
- Hoover, K., Liao, S., and Bryant, P. Loss of the Tight Junction MAGUK ZO-1 in Breast Cancer. *Am J Pathol* (1998) 153(6):1767-1773.
- Hsu, M., Andl, T., Li, G., et al. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* (2000) 113(Pt 9):1535-42.
- Huang, R., Fan, Y., Hossain, M. Z., et al. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res* (1998) 58:5089-5096.
- Ito, A., Katoh, F., Kataoka, T. R., et al. A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. *J Clin Invest* (2000) 105(9):1189-97.
- Ito A., Morita N., Miura D. et al. A derivative of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. *Carcinogenesis*. (2004) 25(10):2015-22.
- Jinn, Y., Ichioka, M., and Marumo, F. Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer. *Cancer Lett* (1998) 127:161-169.
- Kaiharu, T., Kawamata, H., Imura, J., et al. Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. *Cancer Sci* (2003) 94:166-172.
- Kamibayashi, Y., Oyamada, Y., Mori, M., et al. Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. *Carcinogenesis* (1995) 16:1287-1297.
- Kerl, H., Garbe, C., Cerroni, L., Wolff, H. Histopathologie der Haut. *Springer-Verlag* (2003) ISBN: 978-3-540-41901-3.
- Kimura, Y., Shiozaki, H., Hirao, M., et al. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am J Pathol* (1997) 151:45-54.
- Kleeff, K., Shi, X., Bode, H., et al. Altered Expression and Localization of the Tight Junction Protein ZO-1 in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer. *Pancreas* (2001) 23(3):259-265.

- Krutovskikh, V. A., Piccoli, C., and Yamasaki, H. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene* (2002) 21:1989-1999.
- Loewenstein, W. Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* (1981) 61:829-913.
- Loewenstein, W. R., and Kanno, Y. Intercellular communication and the control of growth: lack of communication between cancer cells. *Nature (Lond.)* (1966) 209:1248-1249.
- Lucke, T., Choudhry, R., Thom, R., et al. Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. *J Invest Dermatol* (1999) 112(3):354-61.
- McCarty, M., Bielenberg, D., Nilsson, M., et al. Epidermal hyperplasia overlaying human melanoma correlates with tumour depth and angiogenesis. *Melanoma Research* (2003) 13(4):379-387.
- Mesnil, M., Crespín, S., Avanzo, J. L., et al. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1719(1-2):125-45.
- Miura D, Kida Y, Nojima H. Camellia oil and its distillate fractions effectively inhibit the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. *FEBS Lett.* (2007); 581(13):2541-8.
- Morita, K., Tsukita, S., and Miyachi, Y. Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *Br J Dermatol* (2004) 151(2):328-34.
- Ohba Y., Kanao Y., Morita N. et al. Oleamide derivatives suppress the spontaneous metastasis by inhibiting connexin 26. *Int J Cancer*. (2007);121(1):47-54.
- Ohnemus, U., Kohrmeyer, K., Houdek, P., et al. Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative Staphylococcus Strains. *Journal of Investigative Dermatology*. (2008) 128:906-916.
- Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., et al. Epidermal Tight Junctions: ZO-1 and Occludin are Expressed in Mature, Developing, and Affected Skin and In Vitro Differentiating Keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology* (2001) 117(5):1050-1058.
- Richard, G. Connexins: a connection with the skin. *Experimental Dermatology* (2000) 9:77-96.
- Saez, J., Connor, J., Spray, D., et al. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989) 86:2708-2712.
- Saito Katsuragi, M., Asada, H., Niizeki, H., et al. Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer* (2007) 110(5):1162-72.

- Salomon, D., Masgrau, E., Vischer, S., et al. Topography of mammalian connexins in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* (1994) 103:240-247.
- Sawey, M. J., Goldschmidt, M. H., Risek, B., et al. Perturbation in connexin 43 and connexin 26 gap junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia. *Mol Carcinog* (1996) 17:49-61.
- Smalley, K. S., Brafford, P., Haass, N. K., et al. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol* (2005) 166(5):1541-54.
- Tada, J., and Hashimoto, K. Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* (1997) 24(10):628-35.
- Thies, A., Mauer, S., Fodstad, O., et al. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *British Journal of Cancer* (2007) 96:609-616.
- Tsai, H., Werber, J., Davia, M. O., et al. Reduced connexin 43 expression in high grade human prostatic adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1996) 227:64-69.
- Uchida, Y., Matsuda, K., Sasahara, K., et al. Immunohistochemistry of gap junctions in normal and diseased gastric mucosa of humans. *Gastroenterology* (1995) 109:1492-1496.
- Veenstra, R. D. Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J Bioenerg Biomembr* (1996) 28:326-337.
- White, T. W., Paul, D. L., Goodenough, D. A., et al. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* (1995) 6:459-470.
- Willecke, K., Eiberger, J., Eckardt, D., et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* (2002) 383:725-737.
- Yeager, M., and Nicholson, B. J. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* (1996) 6:183-192.
- Yoshida, Y., Morita, K., Mizoguchi, A., et al. Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res* (2001) 293:239-244.

10 Lebenslauf

Name	Diane Ripperger
Geburtstag	07.02.1980
Geburtsort	Burgwedel

Schulbildung

Freie Waldorfschule Hannover-Bothfeld	1986-1999
---------------------------------------	-----------

Studium

Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg	2000-2007
Ärztliche Vorprüfung	03/2003
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	06/2007
Erteilung der Approbation	06/2007

Promotion

Zellbiologisches Labor der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf	2004-2009
---	-----------

Berufserfahrung

Assistenzärztin der Inneren Medizin in der Asklepiosklinik Barmbek, Hamburg	09/2007- 08/2008
Assistenzärztin der Anästhesiologie im Diakoniekrankenhaus Friederikenstift, Hannover	seit 09/2008

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Einsatz von Gap-Junction und Tight-Junction Proteinen für Diagnostik und Prognose des malignen Melanoms

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Diane Ripperger
Hannover, den 12.5.2009

12 Danksagung

Viele Menschen haben unmittelbar und mittelbar zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und ich möchte mich herzlich bei ihnen allen bedanken.

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Moll danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die guten Arbeitsbedingungen im zellbiologischen Labor der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Ich danke meiner Betreuerin Frau PD Dr. Brandner für die Hilfe bei der theoretischen Erarbeitung des Themengebiets und der praktischen Anleitung. Ihr und Herrn Dr. Haas danke ich darüber hinaus für die fachliche Diskussion.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Ewa Wladykowski, die mich in der praktischen Durchführung der Methoden unterrichtet hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Christine Blome danke ich für die Hilfestellung beim Erlernen des Statistikprogramms und der statistischen Ausarbeitung.

Für die bedingungslose Unterstützung möchte ich meinen Eltern Christa und Klaus Ripperger danken, die mir das Studium und diese Promotion ermöglicht haben. Ich danke meinem Freund Gregor Reiter für persönlichen Rückhalt und Motivation. Frau Dr. Jumi Klettke danke ich für freundschaftlichen Beistand im Studium und während der Promotion. Jan Ikels, Elke Meyer und Dr. Daniel Appel danke ich für technische Hilfe.