

Quantitative Elektronenmikroskopie
einzelner Zellen aus drei malignen Melanomen
und einem Nävuszellnävus

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Konstantin Triamalis
aus Sotirio/Larissa
Griechenland

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.1995

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. D. Kölsch

Erstberichterstatter: Prof. Dr. C.-G. Arnold
Zweitberichterstatter: Prof. Dr. H. Korn

Abkürzungsverzeichnis

A	:	Fläche
d	:	mittlere kurze Achse der Mitochondrien
D	:	mittlerer Teilchendurchmesser
FF 1	:	zweidimensionaler Formfaktor
FF 2	:	dreidimensionaler Formfaktor
geo (als Index)	:	geometrisch ermittelte Größe
k (als Index)	:	Kern
Ko	:	Korrekturfaktor für die Oberfläche
Kv	:	Korrekturfaktor für das Volumen
L	:	Länge
m (als Index)	:	Mitochondrien
MM	:	malignes Melanom
n	:	Anzahl der Schnitte
n _M	:	Anzahl der Mitochondrien
N	:	Anzahl der Mitochondrienprofile
NZN	:	Nävuszellnävus
O	:	Oberfläche
O'	:	korrigierte Oberfläche
P	:	Umfang
SSM	:	superfiziell spreitendes Melanom
T	:	Schnittdicke
V	:	Volumen
V'	:	korrigiertes Volumen
z (als Index)	:	Zelle

Einleitung

1.1 Allgemeines

Das maligne Melanom, das über 95% die Haut befällt, steht an dritter Stelle der Häufigkeit von Hautkreberkrankungen. Seine ausgeprägte, starke und häufig frühzeitige Neigung zu lymphogener (Deutsch et al., 1992) und hämatogener Metastasenbildung mit letalem Ausgang und eine geringe immunologische Antwort des Organismus machen das maligne Melanom zum bösartigsten Geschwulst der Haut.

Es ist deshalb besonders alarmierend, daß seine Inzidenz in den letzten Jahren weltweit zugenommen hat. In der Bundesrepublik Deutschland wird die Häufigkeit der Neuerkrankungen derzeit viermal höher als in den 50er Jahren eingeschätzt, und zwar jährlich mit acht bis zehn Personen pro 100.000 Einwohner. Zum Vergleich: Aus den USA werden aktuell 10 bis 20, aus Australien sogar 30 bis 40 Personen angegeben. Für Angehörige der weißen Rasse wird das Risiko, im Laufe des Lebens ein malignes Melanom zu entwickeln, für die 1930 geborenen mit 1:1500, für die 1990 geborenen mit 1:105 und für die, die im Jahr 2000 geboren werden, mit 1:75 veranschlagt.

Der steigenden Inzidenz steht eine fehlende Ätiologie gegenüber. Man vermutet verschiedene Faktoren, wie z.B. das höhere Durchschnittsalter der Bevölkerung, eine genetische Disposition, onkogene Viren, chemische Karzinogene etc., die zur Entstehung eines Melanoms führen könnten. Der we-

sentliche Faktor scheint jedoch die stärkere Belastung der Haut durch Sonnenstrahlen zu sein (z. B. Sanchez und Robinson, 1993; Koh und Lew, 1994; Garbe, 1991; Moan und Dahlback, 1992). Langzeitbestrahlung mit niedrigdosiertem UV-Licht soll allerdings eher einen prophylaktischen Effekt haben (Elwood et al., 1985; Gallagher et al., 1989), und nur intensive und zeitweilige UV-Exposition steht in Korrelation mit einem erhöhten Melanomrisiko (Elwood et al., 1985; Mackie und Aitchison, 1982).

Unbestritten ist die Wichtigkeit, maligne Melanome möglichst frühzeitig zu erkennen und operativ zu entfernen, nicht zuletzt wegen des Fehlens wirksamer Behandlungsmethoden in fortgeschrittenen Stadien. Die meisten Hauttumoren können aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika einwandfrei identifiziert werden (Kerl et al., 1990). Anders ist es beim malignen Melanom, da die histologische Diagnose des malignen Melanoms der Haut zu den schwierigsten Problemen in der Dermatopathologie gehört. Es gibt keine einheitliche Meinung zwischen den Dermatopathologen, was die Diagnose des malignen Melanoms und seiner Vorläufer betrifft (Schmoeckel, 1984). Mit den üblichen klinischen Untersuchungen von selbst routinisierten Fachleuten werden meist nur 70 bis 80% der malignen Melanome richtig erkannt (Larsen et al., 1980; Kerl und Sterry, 1992; Braun-Falco et al., 1986). Aufgrund dieser Tatsache fordert man ein „overdiagnosing“ (Neuber et al., 1990).

Durch den Einsatz moderner Technik und Methoden versucht man, eine verbesserte Frühdiagnostik und eine sichere Unterscheidung zwischen Melanomen, deren Vorstufen und anderen harmlosen Hautveränderungen zu ermöglichen (z. B. Fornage et al., 1993; Schindewolf et al., 1993; Stolz et al., 1991; Marchesini et al., 1992). Das Elektronenmikroskop wird jedoch in der modernen Dermatopathologie nicht für Routineuntersuchungen eingesetzt, obwohl es seit mehr als drei Jahrzehnten detaillierte Informationen über pathologische Hautveränderungen liefert (z. B. Mackay und Osborne, 1978; Mackay

und Silva, 1980). So liegt das biologische Verhalten auch von bestens bekannten Tumoren wie den Nävuszellnävus, die bei fast jedem Menschen vorkommen, im dunkeln. Nur wenn das gesamte Pigmentsystem tiefergehend untersucht wird, kann man genauere Aussagen über das Melanom machen (Worret und Watzig, 1991). Nach Forslind und Emilson (1992) sollte man bei quantitativen Untersuchungen, wie der Morphometrie, sogar das Elektronenmikroskop bevorzugen.

1.2 Malignes Melanom (MM)

Das Melanom ist ein Tumor der Melanozyten. Die Melanozyten zusammen mit den Keratinozyten, die Merkelzellen und die Langerhans-Zellen sind die Zellen der Epidermis. Die Melanozyten stammen aus der Neuralleiste und wandern während der Fötalzeit in die Epidermis ein. Normalerweise liegen sie dann in der Basalschicht. Ihre Dichte beträgt etwa 1155 bis 1560 pro mm², was bedeutet, daß im histologischen Schnitt etwa jede zehnte Zelle der Basalschicht ein Melanozyt ist. Für die sonnenexponierte Haut wird ihre Dichte doppelt so hoch angegeben (Gilchrist, 1979; Fallowfield et al., 1991). Die Melanozyten können auch atypische Merkmale aufweisen, wie z. B. unregelmäßig vergrößerte Zellkerne, insbesondere bei chronisch sonnenexponierter Haut (Mitchell, 1963; Fallowfield et al., 1991). Aber nicht nur in der Haut können sich Melanozyten befinden, sondern z. B. auch im Auge oder in Schleimhäuten (van Duinen, 1984).

In den Melanozyten wird Melanin produziert, das über ihre dendritischen Fortsätze zu den umliegenden Keratinozyten

gelangt. Dem Melanin wird eine Schutzfunktion für die DNA der Keratinozyten gegen UV-Strahlung und Toxine, wie freie Sauerstoffradikale, zugeschrieben (Jimbow et al., 1991; Nordlund et al., 1989). Innerhalb der Melanozyten befinden sich spezielle Einschlüsse, die Melanosomen, in denen die Melaninsynthese stattfindet. Diese Zellbestandteile besitzen Tyrosinase, ein Enzym, das mittels Oxidation die farblose Aminosäure Tyrosin in das pigmentierte Polymer Melanin umwandelt (Seiji et al., 1961). Ihre Größe und Form variiert sowohl zwischen den Tieren unterschiedlicher Spezies als auch zwischen Tieren derselben Spezies. Bei den Melanosomen unterscheidet man, je nach Reifungsgrad, vier Stadien: von Stadium I (ohne Melanin) bis hin zum Stadium IV (voll mit Melanin).

Wie die normalen Melanozyten sind auch die neoplastischen Melanozyten durch die Präsenz von einzelnen und nicht im Verbund auftretenden Melanosomen in unterschiedlichen Reifungszuständen gekennzeichnet. Es soll jedoch betont werden, daß nicht nur die Melanozyten die Fähigkeit zur Bildung von Melanosomen besitzen. Auch andere Tumoren, die sich aus den der Neuralleiste entstammenden Zellen, wie z. B. den Schwann-Zellen und vielleicht auch neuroendokrinen Zellen zusammensetzen, besitzen diese Fähigkeit. Die Melanosomen im malignen Melanom sind sehr pleomorph und zeigen strukturelle Unordnungen. Nicht unerwähnt sollte bleiben, daß der Primärtumor in seltenen Fällen völlig melaninfrei sein kann (amelanotisches Melanom).

Trotz der vielen Variationen, die die Melanome zeigen, teilt man sie üblicherweise in die vier nachstehenden Hauptgruppen auf:

- ⇒ Superfiziell Spreitendes Melanom (SSM)
- ⇒ Lentigo Maligna Melanom (LMM)
- ⇒ Noduläres Melanom (NM)
- ⇒ Akral Lentiginöses Melanom (ALM)

Von größter Wichtigkeit für die Prognose und Therapie des Melanoms ist die Eindringtiefe des Tumors. Nach Clark et al. (1969) werden hierbei folgende Stadien unterschieden:

- ◆ Eindringtiefe I : Tumorzellen nur in der Epidermis
- ◆ Eindringtiefe II : Tumorzellen durchbrechen die Basalmembran und dringen in das Stratum papillare ein
- ◆ Eindringtiefe III: Tumorzellen füllen das Stratum papillare stellenweise aus und buchten manchmal das Stratum reticulare nach unten aus
- ◆ Eindringtiefe IV : Tumorzellen im Stratum reticulare
- ◆ Eindringtiefe V : Tumorzellen in subkutanen Fettgewebe

Diese Einteilung, die sehr verbreitet ist, hat jedoch einen wesentlichen Nachteil: Sie berücksichtigt nicht den exophytischen Anteil des Melanoms, der für die Prognose genauso wichtig ist. Abgesehen davon ist die Dermis in Abhängigkeit von Lokalisation und Alter auch noch unterschiedlich strukturiert (Braun-Falco und Schmoeckel, 1981). Objektiver erscheint die Methode nach Breslow (1970; 1975), wonach die Invasionstiefe mittels Okularmikrometer bestimmt wird. Der Tumor wird von seiner Oberfläche oder vom Stratum granulosum der Epidermis bis zur tiefstgelegenen Tumorzelle gemessen. Dieses Verfahren hat sich auch in der Praxis bewährt und ist weltweit üblich (Kernohan, 1991; Rivers und Ho, 1992).

Um eine höhere Treffsicherheit der Aussagen über das Metastasierungsrisiko zu erzielen, führten Schmoeckel und Braun-Falco (1978) den prognostischen Index (PI) ein. Danach ist PI das Produkt aus der Tumordicke und dem Mitoseindex. Der Mitoseindex zeigt die mitotische Aktivität im Tumor und wird als Zahl der Mitosen pro Quadratmillimeter angegeben.

Das typische maligne Melanom existiert nicht, weil Größe, Gestalt, Tiefenausdehnung, Farbe und sekundäre Veränderungen wie Nässen, Verkrustung, Erosion etc. einer außerordentlichen morphologischen Vielfalt unterliegen (Braun-Falco und Schmoekel, 1981). Nach Ackerman und Mihara (1985) weisen die meisten Melanozyten in der Mehrzahl der malignen Melanome kernatypische Anzeichen auf. Bei der Kernatypie werden alle nicht normalen morphologischen Eigenschaften des Kernes zusammengefaßt, wie die Variation der Größe und Form, verändertes Erscheinungsbild des Nukleolus etc. Dieselben Autoren betonen jedoch, daß die Kernatypie ein ganz subjektives Merkmal darstellt und deshalb sehr häufig nicht reproduzierbar ist.

Das SSM macht etwa 60% aller Melanome aus. Bevorzugt wird das mittlere Erwachsenenalter und eher das weibliche Geschlecht. Es kann an jeder Körperstelle vorkommen.

Im intraepidermalen Teil des SSM überwiegen große Zellen mit einer mittelgradigen bis starken Melanisierung. Sie kommen in lockerer, nestartiger Formation von bis zu zehn Zellen vor. Ähnlich sind auch die Zellen im dermalen Bereich: Sie sind polymorph, meistens im Stratum papillare lokalisiert und treten ebenfalls in Nestern auf, die allerdings kleiner sind als diejenigen im epidermalen Teil (Clark et al., 1986). Die Dendriten sind deutlich reduziert oder fehlen sogar. Dadurch bedingt könnte eine Kumulation der Pigmentgranula zustande kommen, die zu stärkerer Pigmentierung der Zellen führt (Mintz et al., 1993). Die Form der Zellkerne variiert stark: von rund, oval bis hin zu bizarr gelappten und gezackten Gebilden, die in allen Übergangsstadien vorkommen können. Die Kernmembran erscheint deutlich und zeigt eine scharfe Begrenzung. Chromatin ist häufig randbetont, der Nukleolus überwiegend prominent. Die Ausbildung mikrovilliartiger Strukturen in den Interzellularräumen ist vorhanden. Mikrovilli sind zytoplasmatische feine Fortsätze, die von der unmittelbaren Umgebung abhängen scheinen; stark melanierte Zellen weisen weniger Mikrovilli auf. Die

vorherrschende Melanosomenform ist rund-oval, während die Stäbchenform nur ganz selten auftaucht. Häufig treten abortive Melanosomen in Erscheinung, die z.B. ring- oder halbmondförmig sind. Vereinzelt gibt es auch Prämelanosomen mit regelrecht lamellärer Innenstruktur.

Nach Mazur und Katzenstein (1980) weist ein Auftreten von Mikrovilli in Verbindung mit Zellhaufen und Dendritenbildung auf Malignität hin. Andererseits behaupten sie, daß ihre Anwesenheit kein pathognomonisches Indiz für das Vorliegen eines Melanoms sei. Die Dendritenbildung scheint vom Pigmentierungsgrad und auch von gewissen Umgebungsfaktoren abhängig zu sein. Es wäre ebenso denkbar, daß sie Ausdruck eines Differenzierungsgrades ist (Paul, 1984).

1.3 Nävuszellnävus (NZN)

Nävi sind Pigmentgeschwülste, die angeboren oder erst im späteren Leben in Erscheinung treten. Sie können an jeder Stelle der Haut vorkommen und fallen durch besondere Farbe (Pigmentation oder Depigmentation) oder durch besondere Beschaffenheit der Oberhaut auf. Sind sie einmal entstanden, dann bleiben sie im allgemeinen nahezu unverändert bestehen. Obwohl nicht zu den normalen Bestandteilen der Haut gehörend, kommen sie bei fast jedem Menschen vor. Bei den weißen Europäern wird als durchschnittliche Zahl 15 Nävi angegeben (Fitzsimons, 1984). Bei Menschen schwarzer Hautfarbe sind die Ergebnisse nicht einheitlich. Nach Coleman (1980) und Lewis und Johnson (1968) sollen Nävi bei diesen Farbigen in

größerer Anzahl vorkommen. Andere Arbeitsgruppen (Pack und Davis, 1963; Rampen, 1988) behaupten eher das Gegenteil.

Es scheint eine gewisse Korrelation zwischen Lichttoleranz und Zahl der Nävi zu existieren. Lichtempfindliche Personen gehören zum Kreis derer, die eine größere Zahl an Nävi aufweisen. Allerdings berichten Augustsson et al. (1992) von einem „nävogenen“ Effekt des UV-Lichtes. Zeitweise sonnenexponierte Haut hat eine größere Zahl an Nävi je Oberflächen-einheit im Vergleich zur weniger sonnenexponierten. Die niedrigsten Werte jedoch gab es bei chronisch sonnenexponierter Haut. Man vermutet hier einen schützenden Effekt gegen Nävusbildung, ähnlich wie beim Melanom.

Unterschieden werden Pigmentzellnävi, organoide Nävi und Nävuszellnävi.

Nach jahrelangen Diskussionen über die Histogenese von Nävuszellen setzte sich die Meinung durch, daß sie ebenfalls aus der Neuralleiste stammen und mit den Melanozyten eng verwandt sind. Sie haben das gleiche elektronenmikroskopische Bild, die gleichen Organellen und Enzymsysteme wie die Melanozyten. Im Gegensatz aber zu den spindelförmigen dendritischen Melanozyten sind Nävuszellen rundlicher, und gewöhnlich fehlen ihnen die dendritischen Fortsätze (McKee, 1990).

Das histologische Bild von Nävuszellen wird mit einem bläschenförmigen, rundlichen oder ovalen Kern mit deutlicher Kernmembran und kleinem Nukleolus beschrieben. Sie neigen dazu, in Nestern zusammenzutreten und können, müssen aber nicht, feinkörniges Melanin enthalten. Die Zellen haben meistens eine rundliche oder polyedrische Form. Mikrovilli-bildung ist deutlich nachweisbar.

Die Nävuszellen werden nach ihrer Größe und Lage in A-, B- und C-Typen geteilt (Miescher und von Albertini, 1935; Rhodes, 1987). A-Zellen sind meist groß, epitheloid und lie-

gen überwiegend oberflächlich unter der Epidermis oder um Haarfollikeln herum. B-Zellen sind kleiner, liegen meist tiefer und enthalten selten Melanin. Sie haben eine gewisse Ähnlichkeit mit Lymphozyten. C-Zellen sind länglich, ähnlich wie die Schwann-Zellen und liegen tief im Korium.

Klinisch ist eine Einteilung nach kongenital oder erworben, papillomatös oder flach, groß oder klein üblich. In der Histologie jedoch werden sie nach Lage der Zellnester eingeteilt:

- * Junctionstyp: die Nester liegen nur in der Epidermis
- * Compoundtyp: die Nester liegen in der Epidermis und im Korium
- * koralier Typ: die Nester liegen in der Dermis

Nach Gottlieb und Ackerman (1985) können auch in NZN eine oder zwei Mitosen gefunden werden. Dies ist insofern von Bedeutung, als das Auftreten von Mitosen oft als wichtiges Malignitätskriterium angenommen wird (Massoudy, 1992).

Erwähnenswert sind übrigens die Ergebnisse, wonach die Nävuszellen als Nester nicht frei im Korium liegen, sondern von einer Basalmembran umschlossen sind (Lea und Pawlowski, 1986). Diese Membran kann nur von Keratinozyten produziert werden, während Nävuszellen und Melanozyten diese Fähigkeit nicht besitzen (Bell et al., 1983; Hu et al., 1957). Nach dieser Annahme zeigten dann Lea und Pawlowski (1986) mit einer dreidimensionalen Rekonstruktion, daß alle nestförmig aufgebauten Nävi intraepidermal liegen. Hingegen behaupten Yaar et al. (1988), daß es gerade die Nävuszellen seien, die eine solche - allerdings anders aufgebaute - Basalmembran herstellen. Weitere Zellen aus der Neuralleiste haben ebenfalls diese Fähigkeit, wie z.B. die Schwann- und Merkel-Zellen (McGarvey et al., 1984; Mehta et al., 1985). Danach können die Nävuszellen bei ihrer Wanderung Richtung Epidermis auch im Korium verbleiben und dort Nester bilden.

1.4 Mitochondrien

Die Mitochondrien, wichtige Bestandteile einer eukaryotischen Zelle, sind als wesentliche Elemente sowohl für die Energiegewinnung als auch für die Atmung der Zelle zuständig. Zu ihren wichtigsten Eigenschaften zählt - neben dem Besitz einer eigenen DNA und damit selbständigen genetischen Information - ihre Morphodynamik: Sie sind in der Lage, sich zu bewegen bzw. Form und Gestalt zu verändern (z. B. Grobe und Arnold, 1975; Gaffal und Kreutzer, 1977; Bereiter-Hahn, 1978; Blank und Arnold, 1981; Brand und Arnold, 1988; Röttinger, 1989; Arnold, 1989). Die Zahl der Mitochondrien pro Zelle variiert sehr stark, ebenso ihr Volumenanteil.

Gekennzeichnet durch eine äußerst hohe Sensibilität reagieren die Mitochondrien schnell sowohl auf intrazelluläre als auch extrazelluläre Veränderungen und Einflüsse. Nahrung, Arzneimittel und chemische Substanzen beeinflussen ihre Größe und Form (z. B. Gaffal et al., 1989; Schwartz et al., 1986; Suzuki et al., 1989; Mattfeld, 1990; Venus, 1992). Aber auch pathologische Zustände verursachen eine Änderung ihrer Struktur (z. B. Wu et al., 1984; Daugherty et al., 1987; Nickerson, 1987; Kataoka et al., 1991; van Ekeren et al., 1992; Mihatsch et al., 1992). Dagegen gibt es auch Erkrankungen, wie z. B. bestimmte Formen der Kardiomyopathie, bei denen die Mitochondrienstruktur nicht oder nur wenig beeinflusst wird (Rowan et al., 1988; Borgia et al., 1982; Iwama et al., 1986; Meijer et al., 1991).

Mitochondriale Veränderungen wie z. B. Cristae-Modifikationen, abnorme Formen, Matrixeinschlüsse, Flächenveränderungen wurden in der Literatur zunächst vorwiegend in Form von qualitativen Befunden beschrieben (z. B. Noorden et al., 1971; Kataoka und Hyo, 1986; Sekiguchi, 1974; Maron et al., 1975). Mit Zunahme der Anwendung morphometrischer Methoden im biomedizinischen Bereich wird auch den Mitochon-

drien besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Man versucht auch hier solche Modifikationen zu quantifizieren, um - wie schon erwähnt - Objektivität und bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen. Fläche, Volumen, Form werden hier erfasst und nicht zuletzt die Zahl der Organellen und Cristae-Länge bzw. -Ausdehnung (Heppelmann et al., 1994; Kataoka et al., 1991; Shah und Sahgal, 1991; Tashiro et al., 1990; Iwama und Mochi, 1986; Kayar et al., 1988; Venus, 1992; Gaffal et al., 1982; Madhavi und Jacob, 1992). Dadurch soll eine Unterscheidung von Zuständen erlangt werden, die ansonsten sehr schwer möglich ist.

In der Literatur ist bereits festgehalten, daß bei gleichem Gesamtvolumen viele kleine Mitochondrien aktiver sind als wenige große (Hatt, 1977). Durch das Ansteigen der Anzahl und Größenverminderung der Organellen wird ihre Gesamtoberfläche, auf der ATP und energieproduzierende Enzyme reich vorhanden sind, erweitert (Anversa et al., 1971). Die ausgedehnte Gesamtoberfläche ist effizienter für die mitochondrialen Funktionen (Rowan et al., 1988).

Das morphologische Erscheinungsbild der Mitochondrien ist Ausdruck ihres Energiestatus (Tassin und Brucher, 1982). Auch normale Mitochondrien verändern ihre Cristae-Konfiguration während der unterschiedlichen Energiestadien.

1.5 Morphometrie

Mit dem Ziel, bessere Objektivität und Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurden in den letzten 30 Jahren Messungen

morphologischer Befunde immer häufiger durchgeführt und haben in den biomedizinischen Bereichen große Bedeutung erhalten (z. B. Ito und Abe, 1976; Haug, 1982; Forslind und Emilson, 1992; Atkins et al., 1991; Mayhew und White, 1980; van Diest et al., 1989). Alle Meßtechniken an Strukturen werden unter dem Begriff Morphometrie zusammengefaßt. Daß solche Methoden trotz der Komplexität, die sie zu besitzen scheinen, ganz elegante und nützliche Methoden sind, zeigen auch die Publikationen der letzten Zeit, in denen Meßtechniken beschrieben werden, die die Anwendung moderner Hilfsmittel berücksichtigen (z. B. Lynnerup et al., 1992; Smolle et al., 1993; Masson et al., 1992; Oberholzer et al., 1987; Piloquet et al., 1991).

Morphometrie bedeutet wörtlich Formmessung. Nach Weibel (1969) jedoch ist Morphometrie „die quantitative Beschreibung einer Struktur“, später (1979) definierte er sie als „quantitative Morphologie; Messung von Strukturen mit jeder Methode inklusive Stereologie“. Planimetrie ist die Messung geometrischer Merkmale von Strukturen in einer zweidimensionalen Darstellung, obwohl die Strukturen selbst dreidimensional sind (Baak, 1991). Oft wird sie mit einer speziellen Bezeichnung versehen, wie z. B. Karyometrie für Messungen an Zellkernen oder einfach als Synonym zur Morphometrie (wie auch in der vorliegenden Arbeit). Als Stereologie dagegen werden alle Methoden bezeichnet, mit denen quantitative Informationen über geometrische Merkmale einer Struktur ermittelt werden. Dabei muß das benutzte Testsystem um eine Dimension kleiner sein als die Struktur selbst (Weibel, 1979; Baak, 1991). So werden aus Flächen (zwei Dimensionen) Volumina (drei Dimensionen) extrapoliert, aus Linien (eine Dimension) Flächen (zwei Dimensionen) usw.

Im Bereich der Tumorforschung ist der Zellkern ein ausschlaggebender Anzeiger für den Grad der Entartung einer Zelle. Kernabnormalität wird als wichtiges Charakteristikum bei der histologischen Differentialdiagnose zwischen benignem und malignem Status benutzt (Ishido et al., 1992; Fleege

et al., 1993; Sasaki et al., 1993). Eines der bedeutendsten zytologischen Merkmale bei der neoplastischen Differenzierung ist die Kernvergrößerung. Überwiegend in den letzten Jahren sind Untersuchungen publiziert worden, die Abnormalitäten der Kerne in den Zellen verschiedener Organe quantitativ erfaßten, wie z. B. beim Mammakarzinom, beim Blasenkarzinom und beim Ovarialkarzinom (Baak und Derley, 1984; Baak et al., 1985; Foraker und Reagan, 1956).

Zellen und Zellorganellen sind dreidimensionale Gebilde mit teilweise sehr komplizierten Formen und Orientierungen. Zweidimensionale Ergebnisse, wie z. B. die Messung der Kernfläche in einem Schnitt, enthalten keine Information über die Form und die Größe des gesamten Kernes. Das Fehlen der dritten Dimension läßt sich mit Hilfe von Modellvorstellungen rekonstruieren. Es werden allerdings Vermutungen angestellt, die selten realistisch sind. Auch bei gründlichster und gut durchdachter Interpretation zweidimensionaler Resultate, die auf statistischen Modellen beruhen, sind die Volumenschätzungen der untersuchten Partikel mit Fehlern behaftet. Eine genauere und anspruchsvollere Methode dagegen ist die Serienschneittechnik (DeHoff, 1983; Parsons et al., 1990; Sørensen, 1992).

1.6 Ziel der eigenen Arbeit

Bislang basieren die Ergebnisse quantitativer Feinstrukturuntersuchungen an Melanozyten grundsätzlich auf der Analyse von einzelnen Schnitten. Dabei kamen nahezu immer statistische Verfahren zur Anwendung. Derart gewonnene Daten

können aber „nur eine Antwort auf die Frage (geben)..., in welchem Ausmaß oder mit welcher Wahrscheinlichkeit die an einer Stichprobe gemachten empirischen Beobachtungen (Unterschiede, Zusammenhänge) verallgemeinert werden dürfen“ (Oberholzer, 1983).

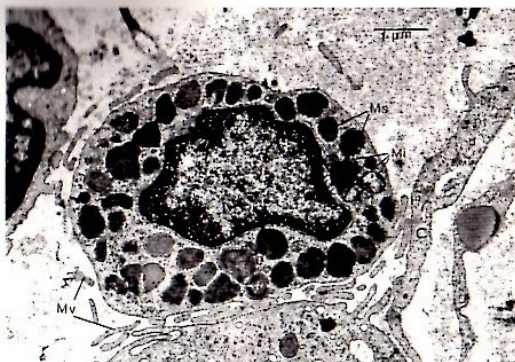
Die Stereologie kann nicht immer Unregelmäßigkeiten der Form und der Größe analysieren. Die dreidimensionale Rekonstruktion erwies sich aber als sehr nützlich bei der Unterscheidung von Veränderungen auf ultrastrukturellem Niveau im Falle von Dysplasien (Ishido et al., 1991). Diese Methode ist aber ausgesprochen zeitintensiv und deshalb nicht sehr verbreitet.

Bei einigen Untersuchungen wurde (Baak und Derley, 1984; Baak et al., 1985; Tosi et al., 1989; Tosi et al., 1987) die Standardabweichung benutzt, um Ungleichmäßigkeiten des Kernes zu zeigen. Sie ist aber stark abhängig vom Mittelwert, und deshalb sind Ergebnisse einer solchen Studie nicht unkritisch zu betrachten.

Aus der zur Verfügung stehenden Literatur war ersichtlich, daß eine vollständige Analyse von Melanozyten mit Hilfe der Serienschchnitttechnik noch nicht existiert. Die erwähnte Technik erfordert große Geschicklichkeit und ist sehr zeitaufwendig, trotz aller Bemühungen, sie zu vereinfachen (z. B. Meyer und Domanico, 1993; Järvillehto und Marjula, 1986; Gorycki, 1977; Heinrich, 1985). DeHoff (1983) schreibt: „The section-by-section analyses for topological properties is at best tedious. At its worst, where measurements of area, perimeter, etc., are required on each feature on each section in order to estimate distributions, undertaking a program with more than few samples is probably beyond human endurance“. Solche Analysen haben zwar den Nachteil, nur wenige Einzeldaten zu liefern (Steer, 1984), dafür aber den Vorteil, daß es sich dann um exakte absolute Werte handelt, an denen die statistische Methodik gemessen werden kann. Letzteres gilt um so mehr, je unregelmäßiger ein Un-

tersuchungsobjekt gestaltet ist, wie z. B. die Melanozyten mit ihren Dendriten und polymorphen Kernen. So ist es in der Regel in Einzelschnitten unmöglich, einem Melanozytenprofil alle dazugehörigen Dendritenprofile zuzuordnen. Entsprechendes gilt auch für die Profile der Mikrovilli. Dieser Umstand führt zwangsläufig zu Meßfehlern.

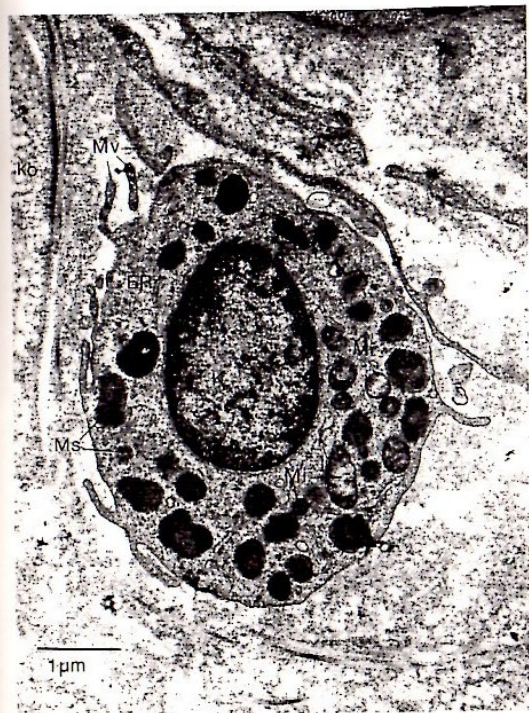
Wie wiederholt gezeigt werden konnte (z. B. Arnold und Gaffal, 1979a; Arnold und Gaffal, 1979b; Arnold, 1989; Gaffal und Kreutzer, 1977; Gaffal und Schneider, 1980; Grobe und Arnold, 1975), sind manche Aussagen zum intrazellulären Aufbau nur mit Hilfe der Serienschchnitttechnik möglich. Es erschien deshalb sinnvoll und wünschenswert, dieses Erfahrungsgut auch bei entarteten Zellen der menschlichen Haut anzuwenden.



EM-Aufnahmen der Schnitte Nr. 117 (Abb. 1) und Nr. 241 (Abb. 2) durch einen Melanozyten (Zelle I) aus einem superfiiziell spreitenden Melanom.

Abb. 1: Das Zellprofil hat eine rundlich-ovale Form während das Kernprofil eine unregelmäßige Form aufweist. Vier Mitochondrienprofile (Mi) sind zu erkennen (drei rechts vom Kern, eins unterhalb von ihm). Sehr viele Melanosomen (Ms) sind relativ homogen in der Zelle verteilt. Diese Aufnahme läßt sich schwer erkennen, wie aufwendig es ist, Schnitt für Schnitt zu verfolgen, welche der isoliert vorliegenden Mikrovilliprofile (Mv) zu welcher der benachbarten Zellen gehört. Vergrößerung: 17400x

Abb. 2 (nächste Seite): In der Mitte des fast runden Zellanschnitts befindet sich der Kern mit einer regelmäßigen ovalen Form. Auf diesem Schnitt sind acht Mitochondrienprofile, die unterschiedlich groß sind, zu erkennen. Sie sind alle im unteren rechten Teil des Zellanschnitts zu finden. Die Melanosomenprofile sind nicht so zahlreich wie auf dem Schnitt 117. Ihre lamellare Struktur bereitet Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von den Mitochondrien. Das gilt vor allem für die Anfangs- bzw. Schlußprofile. Erst durch das Heranziehen vorheriger bzw. nachfolgender Abbildungen ist eine einwandfreie Identifizierung möglich. BR: endoplasmatisches Reticulum; ko: Kollagen. Vergrößerung: 26700x



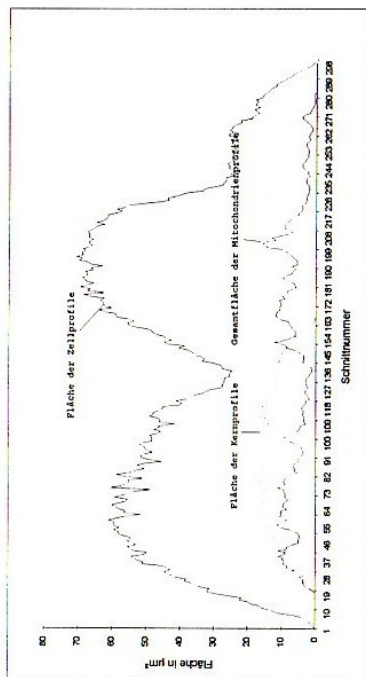
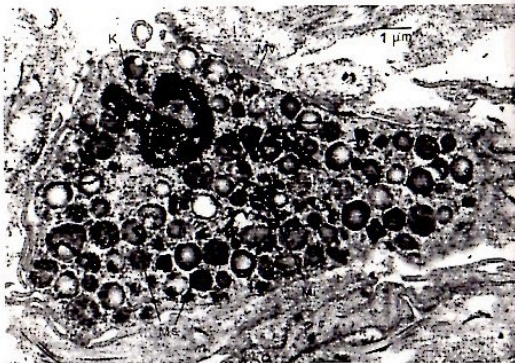
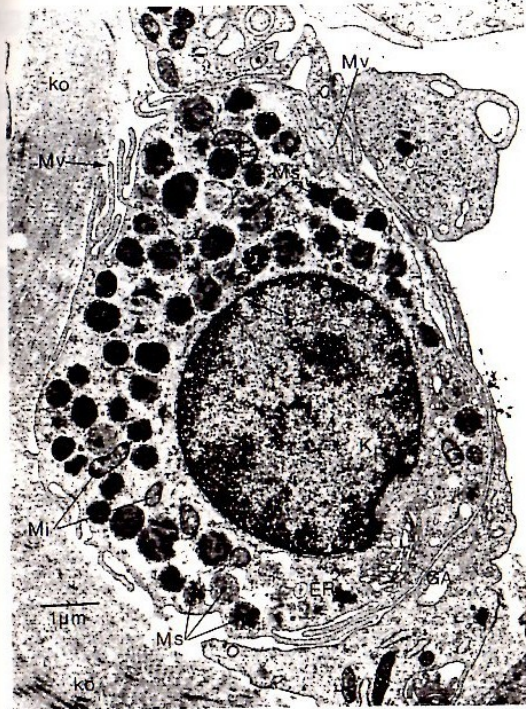


Diagramm 5: Das Diagramm zeigt die Fläche der Zell- und der Kernprofile sowie die Gesamtfläche der Mitochondrienprofile in den einzelnen Schnitten durch die Zelle II (Melanozyt aus einem SSN). Die Werte der Gesamtfläche der Mitochondrienprofile sind zur Verdeutlichung um den Faktor sechs vergrößert worden. Nur die Gesamtfläche der Mitochondrienprofile verläuft annähernd proportional zur Fläche der Zellprofile.



EM-Aufnahmen der Schnitte Nr. 91 (Abb. 11) und Nr. 163 (Abb. 12) durch einen Melanozyten (Zelle II) aus einem superficial spreitenden Melanom.

Abb. 11 (vorherige Seite): Auf diesem Schnitt hat das Kernprofil (K) eine fast runde Form (FF 1: 0,89). Die zahlreich vorkommenden Melanosomen (Ma) haben unterschiedliche Innenstruktur und befinden sich in unterschiedlichen Reifungsstadien. Rechts unten ist ein Golgi Apparat (GA) und Teile des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu sehen. Die Zelle weist sehr viele Mikrovilii (Mv) auf; bei manchen Schnittprofilen nehmen sie etwa 50% des Gesamtumfanges für sich in Anspruch, während ihre Fläche nur 10% der Gesamtfläche des entsprechenden Schnittes entspricht. Dieser spezielle Schnitt belegt (links oben), daß die Mikrovilii verzweigt sein können. P: Kernporen; ko: Kollagen. Vergrößerung: 19000x

Abb. 12: Auffallend ist auf diesem Schnitt die bizarre Form des Kernprofils; sein Formfaktor (FF 1) beträgt nur 0,41. Die Mitochondrienprofile (Mi) sind deutlich mehr als in Abb. 11 und eher im oberen Teil des Zellschnittes lokalisiert. Vergrößerung: 13300x

3.3.2 KERN

Der Kern dieser Zelle erstreckt sich über 147 Schnitte und erreicht damit in Schnittrichtung eine Länge (L) von ca. 10 µm. Er ist fast halb so lang wie die Zelle selbst.

Der Kurvenverlauf seiner Profilflächen (Diagramm 5) ist ziemlich gleichmäßig. Auch der Tiefpunkt im Verlauf der Zell- und Mitochondrienprofilflächen auf dem Schnitt mit der Nummer 137 hat keine Einwirkung auf ihn. Er beginnt auf dem Schnitt mit der Nummer 20 und steigt langsam an bis zum Schnitt mit der Nummer 58, wo der Flächenwert knapp 15 µm² erreicht. Dieser Wert wird in etwa bis Schnitt 122 beibehalten, worauf er wieder langsam abfällt.

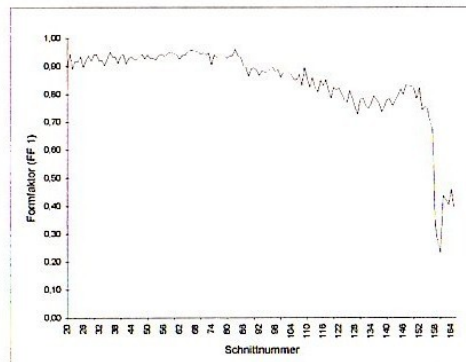


Diagramm 6: Der Formfaktor (FF 1) der Kernprofile in Abhängigkeit von der Schnittnummer (Zelle II).

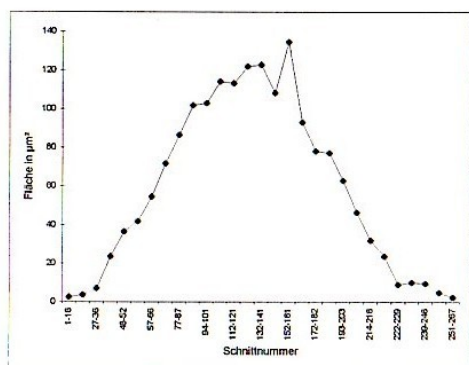


Diagramm 9: Fläche der Zellprofile der Zelle III (Melanozyt aus einem SSM). Es sind die Mittelwerte von in der Regel zehn Schnitten gegen die jeweiligen Schnittintervalle aufgetragen.

3.4.2 KERN

Der Kern dieser Zelle erstreckt sich über 151 Schnitte. Das entspricht einer Länge in Schnittrichtung von etwa 11 μm . Damit ist er gut halb so lang wie die Zelle selbst (siehe Diagramm 10).



Abb. 21 und Abb. 22 (nächste Seite)

EM-Aufnahmen der Schnitte Nr. 69 (Abb. 21) und Nr. 132 (Abb. 22) durch einen Melanozyten (Zelle III) aus einem superfiziell spreitenden Melanom.

Abb. 21: Das Zellprofil hat eine fast viereckige Form mit einem kurzen Fortsatz und das Kernprofil ist eher oval. Es gibt nur wenige Mitochondrienprofile (Mi) auf diesem Schnitt und die Melanosomen (Ms) sind nicht so zahlreich wie bei den Zellen I und II. Vergrößerung: 8200x

Abb. 22: In diesem nahe der Kernmitte liegenden Schnitt sind die zwei Zellfortsätze getroffen, die den kernhaltigen Teil einer Nachbarzelle umschließen. Der Kern weist drei Invaginationen (I) auf. In seinem Mittelpunkt ist ein Nukleolus (N) erkennbar. Gegenüber von den zwei größeren Invaginationen befindet sich ein Golgi Apparat (GA) und um ihn herum zahlreiche Mitochondrien. Zwei Melanosomenansammlungen sind im rechten und eine im linken Fortsatz deutlich erkennbar. Einzelne Melanosomen sind in der ganzen Zelle verteilt. Mikrovilli (Mv) sind auch hier deutlich zu sehen. ER: endoplasmatisches Reticulum; P: Kernporen. Vergrößerung: 8200x

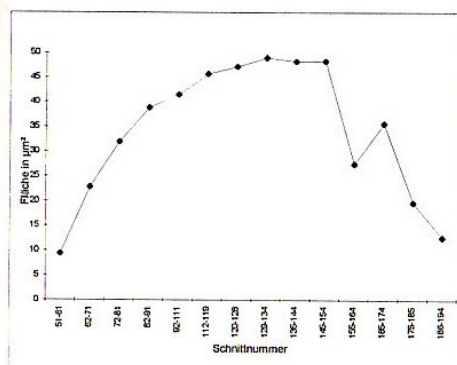
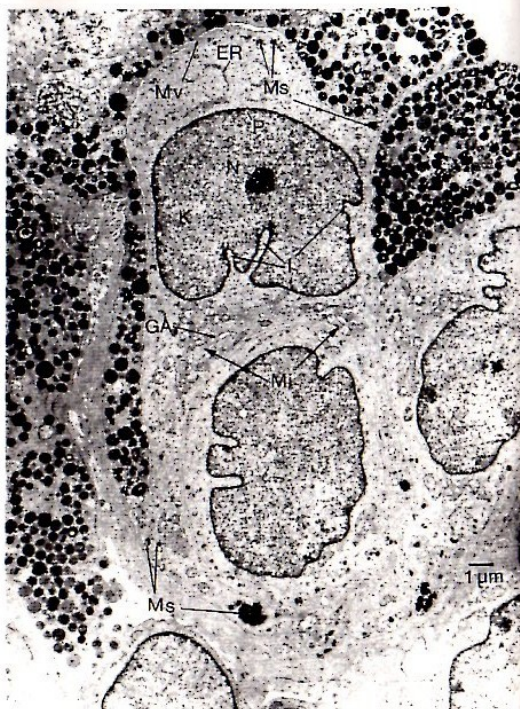


Diagramm 10: Fläche der Kernprofile der Zelle III. Ebenso wie in Diagramm 9 sind auch hier die Mittelwerte aus mehreren Folgeschnitten aufgetragen gegen diese Schnittintervalle.

Die Kernanschnitte haben eine Gesamtfläche (A_k) von $4730 \mu\text{m}^2$. Das entspricht einem Volumen (V_k) von $331 \mu\text{m}^3$ und somit einem Volumenanteil ($\%V_z$) von 29,3%. Verglichen mit den anderen der hier untersuchten Zellen besitzt diese den verhältnismäßig größten Kern. Der Gesamtumfang (P_k) beträgt fast $4137 \mu\text{m}$ und die daraus errechnete Oberfläche (O_k) fast $290 \mu\text{m}^2$ (siehe Tabelle 8).

Der Formfaktor (FF 1) variiert viel stärker als in den beiden vorerwähnten Zellen und zwar zwischen 0,96 und 0,23 (Diagramm 11) mit einem Mittelwert und einer Standardabweichung.

3.5 Zelle IV

3.5.1 ZELLE

Diese Zelle ist mit 347 Schnitten (Abb. 31 und 32) in Schnittrichtung 24 μm lang. Der Kurvenverlauf ihrer Fläche pro Schnitt (Diagramm 15) weist drei „Hauptpeaks“ in folgenden Bereichen auf: zwischen den Schnitten mit den Nummern 22 und 33, zwischen 210 und 240 und schließlich zwischen 295 und 310. Sie kommen unter anderem dadurch zustande, daß die Zelle infolge ihrer unregelmäßig gewundenen Form sowohl senkrecht (mittlerer Bereich) als auch parallel zur langen Achse geschnitten wurde (siehe Stereobilder Abb. 33 bis 40).

Mit einer Gesamtfläche (Az) von 6932 μm^2 und einem Gesamtumfang (Pz) von 17443 μm erreicht die Zelle ein Volumen (Vz) von 485 μm^3 und eine Oberfläche (Oz) von 1221 μm^2 . Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis ist dann (Oz/Vz) 2,5 μm^{-1} (siehe Tabelle 10).

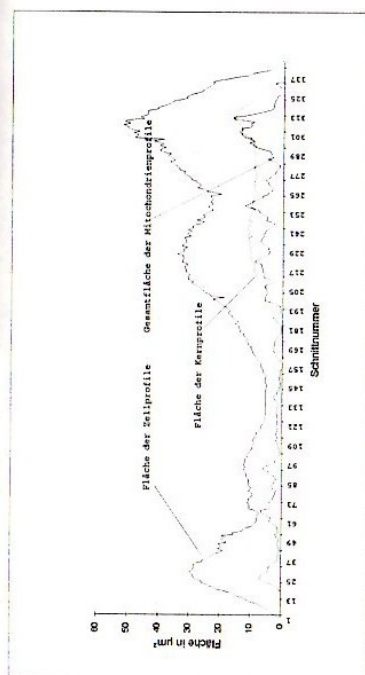


Diagramm 15: Das Diagramm zeigt die Fläche der Zell- und der Kernprofile sowie die Gesamtfläche der Mitochondrienprofile in den einzelnen Schnitten durch die Zelle IV (Nävozyt aus einem N2N). Die Werte der Gesamtfläche der Mitochondrienprofile sind zur Verdeutlichung um den Faktor sechs vergrößert worden. Hier verläuft nur die Gesamtfläche der Mitochondrienprofile annähernd proportional zur Fläche der Zellprofile.



Abb. 31 (vorherige Seite) und Abb. 32
EM-Aufnahmen der Schnitte Nr. 275 (Abb. 31) und Nr. 293 (Abb. 32) durch einen Nävozyten (Zelle IV) aus einem Nävozytenlävus.

Abb. 31: Das Zellprofil weist eine eher dreieckige Form auf, während das Kernprofil eher rundlich ist. Auffallend ist die randbetonte Verteilung des Chromatins im Kern (K). Viele der Melanosomen (Ms) sind nur teilweise melanisiert. P: Kernporen; ko: Kollagen. Vergrößerung: 26700x

Abb. 32: Relativ wenige (18) Schnitte weiter ist der Formfaktor (FF 1) des Kerns von 0,86 auf 0,64 gesunken (Diagramm 16), was sich in den wesentlich unregelmäßigeren Umriss des Kernanschnitts widerspiegelt. Die dreieckige Form des Zellprofils ist erhalten geblieben. Mikrovilli (Mv) sind zahlreicher vorhanden und ein Golgi Apparat (GA) ist sichtbar (oben rechts).
Vergrößerung: 11300x

ZELLE		
n		497
L	μm	34,8
Az	μm^2	6914
Vz	μm^3	484
Pz	μm	15351
Oz	μm^2	1075
Oz/Vz	μm^{-1}	2,2
KERN		
n		158
L	μm	11,1
Ak	μm^2	1527
Vk	μm^3	107
Vk/Vz	$\%$	22,1
Pk	μm	1847
Ok	μm^2	129
FF 1		0,80 $\pm$ 0,13
MITOCHONDRIEN		
n _m		126
Am	μm^2	202
Vm	μm^3	14
Kvm		1,32
V'm	μm^3	11
V'm/Vz	$\%$	2,3
Pm	μm	2526
Om	μm^2	177
Kom		1,11
O'm	μm^2	196
O'm/V'm	μm^{-1}	18,3
d	μm	0,26
D	μm	0,33
T	μm	0,07
Vergrößerung		16600

Tabelle 4: Ergebnisse der Zelle I (Melanozyt aus einem SSM)

3.3 Zelle II

3.3.1 ZELLE

Diese Zelle ist in Schnittrichtung, mit 300 Schnitten (siehe Abb. 11 und 12), 21 μm lang. Sie ist ungefähr keulenförmig, wobei am Keulenschaft seitlich noch ein knotenartiger Auswuchs sitzt (siehe Stereobilder Abb. 13 bis 20). Der Kurvenverlauf ihrer Fläche pro Schnitt hat zwei Maxima. Das erste Maximum liegt im Bereich des Kerna (dickes Keulende), das zweite im Bereich der Schnitte 180 bis 210 (seitlicher Auswuchs). Dazwischen gibt es einen Tiefpunkt, der auf dem Schnitt mit der Nummer 137 liegt (siehe Diagramm 5).

Die Gesamtfläche (Az) der Zelle beträgt 12506 μm^2 , der Gesamtumfang (Pz) inklusive Mikrovilli 22316 μm . Daraus errechnet sich ein Volumen (Vz) von 875 μm^3 und eine Oberfläche (Oz) von 1562 μm^2 . Das Verhältnis Oberfläche zum Volumen (Oz/Vz) ist dann 1,8 μm^{-1} (siehe Tabelle 6).

ZELLE		
n		300
L	μm	21,0
Az	μm^2	12506
Vz	μm^3	875
Pz	μm	22316
Oz	μm^2	1562
Oz/Vz	μm^{-1}	1,8
KERN		
n		147
L	μm	10,3
Ak	μm^2	1699
Vk	μm^3	119
Vk/Vz	$\%$	13,6
Pk	μm	1850
Ok	μm^2	129
FF 1		0,85 $\pm$ 0,13
MITOCHONDRIEN		
n _m		193
Am	μm^2	256
Vm	μm^3	18
Kvm		1,31
V'm	μm^3	14
V'm/Vz	$\%$	1,6
Pm	μm	3546
Om	μm^2	248
Kom		1,11
O'm	μm^2	276
O'm/V'm	μm^{-1}	20,1
d	μm	0,23
D	μm	0,34
T	μm	0,07
Vergrößerung		14600

Tabelle 6: Ergebnisse der Zelle II (Melanozyt aus einem SSM)

3.4 Zelle III

Bei dieser Zelle wurden die Werte in der Regel über zehn Schnitte summiert und diese Zwischensummen addiert. Diese Messungsart hat allerdings den Nachteil, daß für die Diagramme die Mittelwerte der Zwischensummen eingetragen werden müssen und nicht die Einzelwerte, wie es bei den anderen Zellen der Fall ist.

3.4.1 ZELLE

Um die Zelle ganz in Scheiben zu zerlegen waren 267 Schnitte (siehe Abb. 21 und 22) notwendig. Sie ist somit in Schnittrichtung fast 19 μm lang. Die Kurve ihrer pro Schnittintervalle gemittelten Profilflächen weist einen Hauptpeak zwischen den Schnitten mit den Nummern 94 bis 152 auf (Diagramm 9). In diesem Bereich ist auch der Kern lokalisiert (siehe Stereobilder Abb. 23 bis 30).

Die Gesamtfläche (Az) ist 16153 μm^2 groß, was einem Volumen (Vz) von 1131 μm^3 entspricht. Damit ist sie die größte Zelle, nämlich mehr als doppelt so groß wie die Zellen I und IV. Der Gesamtumfang (Pz) von 17227 μm führt zu einer Oberfläche (Oz) von 1206 μm^2 . Das führt zu einem Verhältnis von Oberfläche zum Volumen (Oz/Vz) von 1,1 μm^{-1} (siehe Tabelle 8).

ZELLE		
n		267
L	μm	18,7
Az	μm^2	16153
Vz	μm^3	1131
Pz	μm	17227
Oz	μm^2	1206
Oz/Vz	μm^{-1}	1,1
KERN		
n		151
L	μm	10,6
Ak	μm^2	4730
Vk	μm^3	331
Vk/Vz	%	29,3
Pk	μm	4137
Ok	μm^2	290
FF 1		0,58 $\pm$ 0,21
MITOCHONDRIEN		
n _m		84
Am	μm^2	786
Vm	μm^3	55
Kvm		1,24
V'm	μm^3	44
V'm/Vz	%	3,9
Pm	μm	8040
Om	μm^2	563
Kom		1,13
O'm	μm^2	636
O'm/V'm	μm^{-1}	14,3
d	μm	0,32
D	μm	0,44
T	μm	0,07
Vergrößerung		10250

Tabelle 8: Ergebnisse der Zelle III (Melanozyt aus einem SSM)

Abb. 23-24 (S. 76), 25-26 (S. 77) und 27-28 (S. 78): Stereopaare der 3-D-Rekonstruktion der Zelle III (Melanozyt aus einem SSM). Das Modell ist in sechs verschiedenen, senkrecht zueinander stehenden Ansichten präsentiert. Besonders beim Vergleich der Abb. 23-24 mit Abb. 25-26 und 29-30 wird klar, daß es sich bei den kernhaltigen Teil der Nachbarzelle umhüllenden Fortsätzen dieser Zelle (siehe Abb. 21) um flächige Gebilde handelt. Außerdem erhält man einen deutlichen Eindruck davon, wie sehr es von der räumlichen Lage (bzw. von der Lage der Schnittebene durch derartige Zellen) solcher bizarr gestalteter Zellen abhängt, welcher Zell- bzw. Schnittumriß zur Charakterisierung dieses Zelltyps in Erscheinung tritt.

Abb. 29-30 (S. 79): Teilrekonstruktion im Bereich der beiden Kernhälften (Zelle III). Man beachte die Invaginationen der Kernoberfläche, die für die kleinen Werte des Formfaktors (FF 1) verantwortlich sind.

ZELLE		
n		347
L	μm	24,3
Az	μm^2	6932
Vz	μm^3	485
Pz	μm	17443
Oz	μm^2	1221
Oz/Vz	μm^{-1}	2,5
KERN		
n		137
L	μm	9,6
Ak	μm^2	1316
Vk	μm^3	92
Vk/Vz	%	19,0
Pk	μm	1677
Ok	μm^2	117
FF 1		0,81 $\pm$ 0,16
MITOCHONDRIEN		
n _m		141
Am	μm^2	201
Vm	μm^3	14
Kvm		1,28
V'm	μm^3	11
V'm/Vz	%	2,3
Pm	μm	2177
Om	μm^2	152
Kom		1,12
O'm	μm^2	171
O'm/V'm	μm^{-1}	15,6
d	μm	0,28
D	μm	0,37
T	μm	0,07
Vergrößerung		14600

Tabelle 10: Ergebnisse der Zelle IV (Nävozyt aus einem NZN)

Abb. 33-34 (S. 90), 35-36 (S. 91) und 37-38 (S. 92): Stereopaare der 3-D-Rekonstruktion der Zelle IV (Nävozyt aus einem NZN) in sechs verschiedenen senkrecht zueinander orientierten Ansichten. Es handelt sich um eine längliche, verdreht sinusförmig gebogene Zelle, deren exzentrisch gelegener Kern mit in eine der Zellkrümmungen einbezogen ist.

Abb. 39-40 (S. 93): Teilrekonstruktion im Bereich der Kernmitte (Zelle IV).

3.6 Mikrovilli und Oberflächenvergrößerung

Bei Stichproben an einzelnen Schnitten wurde festgestellt, daß die Mikrovilli zwar mehr als 50% des Gesamtumfanges des Zellprofils ausmachen können, das auf sie aber weniger als 10% der Fläche des Zellprofils entfallen. Um diese starke Oberflächenvergrößerung exakter zu ermitteln, wurden die Computer-Rekonstruktionen zur Hilfe herangezogen.

Wie schon erwähnt (S. 33), mußte bei den Rekonstruktionen auf die Wiedergabe kleinerer Formveränderungen wie die Mikrovilli verzichtet werden. Dadurch stellen die Rekonstruktionen nur den „Grundkörper“ der Zellen ohne die Mikrovilli dar. Da mit Hilfe des Programms ANAT-3D auch die Volumina und die Oberflächen der rekonstruierten Grundkörper erchenbar sind, läßt sich aus den Vergleich der mit („Morphometrie“) und ohne Mikrovilli erhobenen Werte der Faktor abschätzen, um den die Zelloberfläche auf Grund des Mikrovillibesatzes vergrößert wird. Alle diese Daten werden in der Tabelle 11 wiedergegeben. Um die Qualität der Computergestützten Berechnungsmethode zu kontrollieren, wurden auch die Volumina und die Oberflächen der Zellkerne mitbestimmt. Da die Kernoberfläche keine mikrovilliartigen Ausläufer besitzt und im Vergleich zur Zelloberfläche relativ glatt ist, dürften bei Gleichwertigkeit der beiden Methoden keine größeren Abweichungen zwischen den Werten auftreten. Auch dies wird durch die Daten in der Tabelle 11 belegt.

Es wird deutlich, daß der Mikrovillibesatz der Zellen I, II und IV zu einer Vergrößerung der Oberfläche um mehr als das Doppelte führt. Bei der Zelle III ist die Oberflächenvergrößerung trotz der Existenz von Dendriten nicht so hoch; das liegt daran, daß hier weniger Mikrovilli ausgebildet sind (vergleiche Abb. 21 und 22).

		Zelle I	Zelle II	Zelle III	Zelle IV
$V_z \text{ mor}$	μm^3	484	875	1131	485
$V_z \text{ rek}$	μm^3	460	859	1153	449
$O_z \text{ mor}$	μm^2	1075	1562	1206	1221
$O_z \text{ rek}$	μm^2	442	564	941	468
F		2,4	2,8	1,3	2,6
$V_k \text{ mor}$	μm^3	107	119	331	92
$V_k \text{ rek}$	μm^3	107	121	338	90,3
$O_k \text{ mor}$	μm^2	129	129	290	117
$O_k \text{ rek}$	μm^2	129	129	275	116

Tabelle 11: Gegenüberstellung der auf zweierlei Weise (1 und 2) bestimmten Werte für die Volumina und Oberflächen der untersuchten Zellen und ihren Kernen. 1) mor: mit Hilfe des halbautomatischen Bildanalysensystems MOP unter Verwendung aller Schnitte; 2) rek: mit Hilfe des Programms ANAT-3D unter Verwendung jedes fünften bis zehnten Schnittes. Man beachte die gute Übereinstimmung der Kern- und der Zellvolumen-Werte. F: Faktor, der zeigt um wieviel die Zelloberflächen durch das Vorhandensein der Mikrovilli vergrößert sind ($F = O_z \text{ mor} / O_z \text{ rek}$). Weitere Erläuterungen im Text S. 94

ZELLE I				
Werte im ganzen Kernbereich				
	Zelle	Mitochondrien		Profile
Fläche (μm^2)	4152	118,9	Anzahl	1191
Anteil (%)	60,1	58,8	Anteil (%)	54,1

Werte in Teilbereichen der Zelle							
Bereich	FF 1	Profile	$\bar{A}_z$	$N_A (M/2)$	$\bar{A}_k$	$\bar{A}_k / \bar{A}_z$	$\bar{A}_m / \bar{A}_z$
6-163	0,81	7,6	26,4	28,8	9,7	36,7	2,9
16-152	0,82	7,9	27,9	28,3	10,9	37,9	2,8
26-142	0,83	8,3	29,4	28,2	11,9	40,0	2,7
46-122	0,85	9,6	32,7	29,4	13,6	41,5	3,0
36-96	0,88	8,2	31,8	25,8	14,2	44,4	2,6
max	0,96	15,0	37,7	85,9	17,5	48,5	5,6
x	0,81	5,0	13,9	35,3	9,7	22,1	2,3*

Tabelle 18: Ergebnisse aus Teilbereichen der Zelle I (Melanomzelle). Erläuterungen siehe Text S. 104f.

ZELLE II				
Werte im ganzen Kernbereich				
	Zelle	Mitochondrien		Profile
Fläche (μm^2)	6797	148,8	Anzahl	1839
Anteil (%)	54,4	58,1	Anteil (%)	59,5

Werte in Teilbereichen der Zelle							
Bereich	FF 1	Profile	$\bar{A}_z$	$N_A (M/2)$	$\bar{A}_k$	$\bar{A}_k / \bar{A}_z$	$\bar{A}_m / \bar{A}_z$
20-166	0,85	12,6	46,2	27,3	11,6	25,0	2,2
30-155	0,87	12,9	46,9	27,5	13,1	28,9	2,1
40-145	0,88	12,2	47,3	25,8	14,0	31,0	2,0
55-130	0,88	13,3	49,4	26,9	15,1	31,0	2,1
113-143	0,79	7,2	34,1	21,1	13,0	39,1	1,4
max	0,96	22,0	60,9	49,3	17,9	45,8	4,6
x	0,85	11,7	41,7	28,1	11,6	13,6	1,6*

Tabelle 19: Ergebnisse aus Teilbereichen der Zelle II (Melanomzelle). Erläuterungen siehe Text S. 104f.

ZELLE III				
Werte im ganzen Kernbereich				
	Zelle	Mitochondrien		Profile
Fläche (μm^2)	13896**	663,0	Anzahl	3514
Anteil (%)	86,0	84,4	Anteil (%)	84,9

Werte in Teilbereichen der Zelle

Bereich	PF 1	Profile	$\bar{A}_z$	$N_{A(M/Z)}$	$\bar{A}_k$	$\bar{A}_k/\bar{A}_z$	$\bar{A}_m/\bar{A}_z$
51-194	0,58	24,6	95,2**	25,8	31,3		4,6**
102-111	0,38	24,5	114,2	21,5	45,7	40,0	3,5
max	0,97	44,0	122,6		48,9		
x	0,58	22,3	60,5	37,2	31,3	29,3	3,9*

Tabelle 20: Ergebnisse aus Teilbereichen der Zelle III (Melanozyt). Erläuterungen siehe Text S. 104f.

** : Bereich zwischen Schnittnummern 53 und 192 (Kernbereich ist 51 bis 194)

ZELLE IV				
Werte im ganzen Kernbereich				
	Zelle	Mitochondrien		Profile
Fläche (μm^2)	4433	136,5	Anzahl	1127
Anteil (%)	63,9	67,8	Anteil (%)	66,0

Werte in Teilbereichen der Zelle

Bereich	PF 1	Profile	$\bar{A}_z$	$N_{A(M/Z)}$	$\bar{A}_k$	$\bar{A}_k/\bar{A}_z$	$\bar{A}_m/\bar{A}_z$
8-144	0,81	8,5	32,6	26,1	9,7	29,8	3,1
28-133	0,80	8,9	34,4	25,9	10,9	31,5	3,3
28-93	0,92	9,0	29,6	30,4	10,2	35,0	3,4
18-93	0,92	8,8	29,8	29,5	10,0	34,0	3,3
8-70	0,94	9,7	29,1	33,3	9,3	32,1	3,8
max	0,97	18,0	52,0	78,7	15,8	43,7	8,8
x	0,81	5,5	20,0	27,5	9,7	19,0	2,3*

Tabelle 21: Ergebnisse aus Teilbereichen der Zelle IV (Näviszelle). Erläuterungen siehe Text S. 104f.

	I	II	III	IV
	SSM	SSM	SSM	NZN
ZELLE				
n	497	300	267	347
Vz	μm^3 484	875	1131	485
Oz	μm^3 1075	1562	1206	1221
Oz/Vz	μm^{-1} 2,22	1,79	1,07	2,52
KERN				
n	158	147	151	137
Vk	μm^3 107	119	331	92
Vk/Vz	% 22,1	13,6	29,3	19,0
Ok	μm^3 129	129	290	117
O'k	μm^3 134	137	339	128
O'k/Vk	μm^{-1} 1,25	1,15	1,02	1,39
PF 1	0,80±0,13	0,85±0,13	0,58±0,21	0,81±0,16
PF 2	0,66	0,72	0,47	0,59
MITOCHONDRIEN				
n _m	126	193	84	141
Vm	μm^3 14	18	55	14
V'm	μm^3 11	14	44	11
V'm/Vz	% 2,3	1,6	3,9	2,3
V'm/Vk	% 10,3	11,8	13,3	12,0
Om	μm^3 177	248	563	152
O'm	μm^3 196	276	636	171
O'm/V'm	μm^{-1} 18,3	20,1	14,3	15,6
d	μm 0,26	0,23	0,32	0,28

Tabelle 22: Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse aus drei Melanozyten (Zellen I-III) und einem Näviszelle (Zelle IV).

Diskussion

4.1 Zellen

Die untersuchten Melanozyten zeigen relativ wenig Ähnlichkeiten in ihrer Form. Es zeichnet sich ab, daß die Variabilität der Zellformen in diesen zwei Sorten entarteten Gewebes größer ist als bislang erkennbar. Die 3-D-Rekonstruktion der Zellen zeigt, daß ihre Form sehr kompliziert ist. Es ist deshalb fraglich, ob es sinnvoll und nützlich ist, sie in die von der Literatur genannten Kategorien einzuordnen. Bei vielen Autoren werden zwei Haupttypen erwähnt: a) spindelförmig und b) epitheloid oder polygonal (z. B. Curran und McCann, 1976; Brundson, 1987) die laut lichtmikroskopischer Befunde sowohl in Melanom- als auch in NZN-Gewebe vorkommen. Daneben gibt es auch viele andere Kategorien (z. B. Lund und Kraus, 1962; Rhodes, 1987), die eher die große Formvariabilität zum Ausdruck bringen, als nützliches Hilfsmittel für prognostische Aussagen zu sein.

Allen untersuchten Zellen gemeinsam war jedoch das Vorhandensein von Mikrovilli. Diese waren weniger stark ausgeprägt in der Zelle III; dieser Melanozyt besaß im Gegensatz zu den anderen Zellen deutliche Dendriten, und die Adhäsion zu den benachbarten Zellen war viel stärker. Die Melanosomen dieser Zelle waren auch nicht so zahlreich wie bei den anderen. Wie schon erwähnt (S. 6) vermuten Mintz et al. (1993), daß das Fehlen der Dendriten zu einer stärkeren Pigmentierung der Zelle führt, während die starke Adhäsion eine frühe

Man erhält in beiden Fällen den gleichen Wert für den Parameter $N_{A(H/N)}$, obwohl in einem Fall lediglich eine Struktur, im anderen jedoch vier vorliegen.

2. Fall: Man vergleicht die vier vorerwähnten Zylinder mit einem Zylinder kleineren Durchmessers d ($d=2r$). Analog zu den vorherigen Überlegungen gilt nun:

$$N_{A(H/N)} = \frac{1}{A} = \frac{1}{\pi r^2} \quad (2)$$

Aus den Gleichungen (1) und (2) folgt:

$$\frac{N_{A(H/N)}}{N_{A(H/N)}} = \frac{1/\pi R^2}{1/\pi r^2} = \frac{r^2}{R^2} \Rightarrow N_{A(H/N)} = \frac{r^2}{R^2} N_{A(H/N)}$$

und weil r kleiner als R ist, ist auch $N_{A(H/N)}$ niedriger als $N'_{A(H/N)}$. Dies würde bedeuten, daß die vier Zylinder in kompakterer Form vorlägen als der einzelne.

Abgesehen vom Versuch, das Chondriom über die numerische Flächendichte zu charakterisieren, hat man (z. B. Madhavi und Jacob, 1992; Oberholzer, 1983; Loud und Anversa, 1984) mit der gleichen Absicht noch andere Bezugsgrößen ermittelt. Solche Parameter wurden eingeführt, um die Morphologie der Chondriome möglichst anhand einzelner Schnitte zu beschreiben. Die Existenz der Serienschritte ermöglicht es, die definitiv für die einzelnen Zellen gültigen Werte zu bestimmen, was aber nicht heißt, daß dadurch die oben erläuterten Fehlerquellen ausgeschaltet würden. Die übersichtli-

che Zusammenstellung derartiger Daten (Tabelle 23) zeigt, daß vor allem wieder die Zelle III die deutlichsten Unterschiede zu den anderen Zellen aufweist. Angesichts der durch die Analyse der Serienschritte ermöglichten zusätzlichen Informationen zum Aufbau des Chondrioms wird klar, wie wenig die aufgelisteten Daten z. B. über die mannigfachen Unterschiede aussagen, die auch zwischen den Zellen I, II und IV festgestellt wurden.

	Zelle I	Zelle II	Zelle III	Zelle IV
n_n	126	193	84	143
N	2201	3092	4140	1707
N/n_n	17,5	16,0	49,3	11,9
$N_{A(H/N)}$	10,9	12,1	5,3	8,5
A_p	0,09	0,08	0,19	0,12
$N_{A(H/2)}$	35,3	28,1	37,2	27,5
$N_{V(H/2)}$	26,0	22,1	7,3	29,5
$A_p \cdot N_{A(H/2)}$	3,2	2,2	7,1	3,3
$O_{V(H/2)}$	40,5	31,5	56,2	35,3

Tabelle 23: Quantitative Daten zum Mitochondrieninventar von drei Zellen aus Melanomen (Zelle I bis III) und einer Zelle aus einem Nävus (Zelle IV).

$N_{A(H/N)}$	numerische Flächendichte (Anzahl der Profile je 100 μm^2 Mitochondrienfläche)
A_p	mittlere Fläche der Profile (in μm^2)
$N_{A(H/2)}$	numerische Flächendichte (Anzahl der Profile je 100 μm^2 Zellfläche)
$N_{V(H/2)}$	numerische Volumendichte (Anzahl der Profile je 100 μm^3 Zellvolumen)
$A_p \cdot N_{A(H/2)}$	Produkt aus A_p und $N_{A(H/2)}$
$O_{V(H/2)}$	Mitochondrienoberfläche je 100 μm^3 Zellvolumen

Die Mitochondrienprofilfläche scheint, wie aus den Diagrammen zu ersehen ist (siehe Kapitel Ergebnisse), in gewisser Korrelation zu der Zellfläche zu stehen, während zwischen der Mitochondrienprofilfläche und der Kernfläche kein Zusammenhang zu erkennen ist (besonders deutlich in der Zelle II, Diagramm 5). Dies bedeutet, daß das Chondriom in den untersuchten Zellen mehr oder weniger homogen verteilt ist.

Es gibt bis jetzt aus der bekannten Literatur keine quantitative Daten über Mitochondrien in der Melanozytenforschung. Man beschränkte sich auf Angaben wie: sehr viele, zahlreich etc., wobei man eher die Anzahl der Profile beschrieb als die Anzahl der Mitochondrien selbst (z. B. Zelikson, 1962; Curran und McCann, 1976). Es soll an dieser Stelle nochmals betont werden, daß eine größere Zahl von Mitochondrienprofilen nicht immer eine größere Zahl einzelner Individuen bedeutet. Ein Grund für fehlende quantitative Daten ist mit Sicherheit der große Arbeitsaufwand und die

Störanfälligkeit einer EM-Untersuchung. Auf der anderen Seite ist sehr fraglich, ob Morphometrie für Strukturen der Größenordnung der Mitochondrien bei dickeren Schnitten, wie sie bei lichtmikroskopischen Untersuchungen üblich sind, sinnvoll ist und aussagekräftige Ergebnisse liefert. Zusätzlich kommt noch die Schwierigkeit hinzu, Formen mit Zahlen beschreiben zu müssen. Hier bietet natürlich die dreidimensionale Rekonstruktion sowohl der Mitochondrien als auch der ganzen Zelle eine bessere Möglichkeit, sie darzustellen. Der Zeitaufwand ist aber so groß, daß man die Anzahl der untersuchten Zellen noch mehr einschränken müßte. Man versucht aus diesem Grund immer wieder, durch den Einsatz von Computern solche Probleme zu bewältigen (z. B. Rambourg und Clermont, 1990; McLean und Prothero, 1991; Keri und Ahnelt, 1991).

Nach der Einteilung menschlicher Melanome in zwei Typen fanden Klug und Günther (1972) auch Unterschiede bei den Mitochondrien des jeweiligen Melanom-Typs. Danach waren zwar die Struktur der Cristae und die Profilform unterschiedlich, nicht aber die Anzahl der Mitochondrienprofile. Langer et al. (1990) stellten fest, daß im Vergleich zu SSM-Zellen die NZN-Zellen weniger Mitochondrien enthalten. Diese Feststellung stimmt nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Wie in der Tabelle 22 zu sehen ist, besitzt die NZN-Zelle mehr Mitochondrien (141) als die SSM-Zellen Zelle I und III (126 bzw. 84). Bei den untersuchten Zellen wurde auch festgestellt, daß die Variabilität sowohl der Chondriomvolumina in der SSM-Zellen als auch deren Anteile am Zellvolumen sehr groß ist. Ebenso belegt ist, daß die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle und die Mitochondrienprofilzahl pro Zellanschnitt kein Unterscheidungsmerkmal in den beiden Tumorguppen darstellen. Lediglich die einzelnen Mitochondrien waren in den SSM-Zellen länger und stärker verzweigt als die Individuen der NZN-Zelle. Diese Tatsache konnte allerdings nur durch die Auswertung der gesamten Schnitte festgestellt aber mit keinem der bekannten Parameter zum Ausdruck gebracht werden.

Es läßt sich folgendes feststellen: Die große Variation der Ergebnisse innerhalb der einzelnen Untersuchungen lassen keinen direkten Vergleich miteinander zu. Es gibt viele Gründe für diese Diskrepanz. Paumgartner et al. (1981) fanden, daß z. B. bei einer Endvergrößerung von 130.000 : 1 die Werte für Oberflächen- und Volumendichte im Vergleich zu einer Endvergrößerung von 18.000 : 1 um den Faktor drei größer sind. Das ist nicht besonders verwunderlich, wenn man an die Unregelmäßigkeit biologischer Strukturen denkt (siehe auch Mandelbrot, 1977; Cross et al., 1993). Dadurch sind elektronenmikroskopisch gewonnene Ergebnisse nicht direkt vergleichbar mit Befunden lichtmikroskopischer Präparate (geringere Auflösung, kleinere Vergrößerung). Aber auch die Auswahl und Anzahl der auszuwertenden Schnitte spielen eine nicht unbedeutende Rolle. In den unterschiedlichen Teilbereichen einer Zelle variieren die Verhältnisse und somit auch die morphometrischen Ergebnisse sehr stark (siehe Tabellen 18 bis 21). In den mehr oder weniger zufällig gewählten Bereichen unterscheiden sich die Werte teilweise um mehr als den Faktor zwei. Es liegt auf der Hand, daß bei Auswertung von einzelnen Schnitten solche Unterschiede noch größer sein können. Diese Tatsache und die große Variabilität der Zellmorphologie sogar innerhalb eines Tumors scheinen die wichtigen Gründe für diese große Diskrepanz zu sein.

Zusammenfassung

Soweit bekannt wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal eine quantitative Analyse von ultradünnen Serienschritten durch Melanozyten bzw. Nävozyten entarteter menschlicher Haut durchgeführt. Angesichts des großen Arbeitsaufwandes und der extremen Störanfälligkeit derartiger Untersuchungen kann man davon ausgehen, daß diese Methodik kaum routinemäßig eingesetzt werden kann. Trotz zahlreicher Fehlversuche gelang es schließlich doch, vier Zellen vollständig zu erfassen; drei davon entstammen zwei verschiedenen superfiziell spreitenden Melanomen und eine Zelle einem Nävuszellnävus.

Mit Hilfe der graphischen Rekonstruktion wurde die Anzahl, ungefähre Länge sowie der Verzweigungsgrad der Mitochondrien ermittelt. Diesbezüglich zeigen die Mitochondrienpopulationen der einzelnen Zellen ein sehr heterogenes Bild. Von kugeligen bis ellipsoiden Formen bis zu mehr oder weniger langen „Fäden“, die auch vielfach verzweigt sein können, scheinen alle Übergänge im Bereich des Möglichen zu liegen. Die zahlenmäßige Verteilung der verschiedenen entweder nach der Größe oder nach dem Verzweigungsgrad eingeteilten Mitochondrientypen ist ebenfalls sehr variabel. Vorausgesetzt, es handelt sich nicht um einen von der Norm abweichenden Einzelfall, dann könnte man aufgrund der vorliegenden Befunde sagen, daß der Anteil an fadenförmigen Mitochondrien im Chondriom des Nävozyten geringer ist als bei den Melanozyten.

Mit Hilfe der computergestützten 3-D-Rekonstruktion wurde die grobe Form der Zellen und ihrer Kerne anschaulich dargestellt. Weder in Bezug auf die Zellform noch auf die topographische Lage des Zellkerns waren Anzeichen für einen

stereotypen Aufbau der Melanozyten erkennbar. Angesichts dieser deutlichen Vielfalt erscheint es fraglich, ob eine anhand von Schnittbildern vorgenommene Einteilung der entarteten Melanozyten in wenige Formkategorien überhaupt möglich ist.

Über die Planimetrie der Serienschritte in Kombination mit der Korrektur der dabei unvermeidbar auftretenden systematischen Fehler wurden mit bestmöglicher Genauigkeit die Oberflächen und Volumina der Zellen, Zellkerne und des Chondrioms bestimmt. Daraus ließen sich auch der prozentuale Anteil der vermessenen Zelleinschlüsse an der gesamten Zelle sowie die von der Form abhängigen Oberflächen-Volumen-Verhältnisse bzw. Formfaktoren ableiten. Ebenfalls wurde die Vergrößerung der Zelloberflächen bestimmt, die durch das Vorhandensein der Mikrovilli zustande kommt. Die innerhalb der Melanozyten stark variierenden Werte und die Tatsache, daß die entsprechenden Werte des Nävozyten innerhalb der Bandbreite der bei den Melanozyten festgestellten Schwankungen lag, ließ keine typischen Merkmale für den jeweiligen Zelltyp erkennen. Einschränkend muß allerdings eingeräumt werden, daß für eine Absicherung einer solche Aussage noch zu wenige Zellen untersucht worden sind.

Die Möglichkeit, die aus Einzelschnitten bzw. Teilbereichen der Zelle gewonnenen Meßwerte mit den für die ganze Zelle gültigen Werte vergleichen zu können, zeigte auf anschauliche Weise, wie groß die Unterschiede im Einzelfall sein können.

Die ursprünglichen Versuche, Melanozyten der gesunden Haut ebenfalls auf die gleiche Weise zu untersuchen, schlugen fehl. Deshalb bleibt bis auf weiteres die Frage offen, ob und welche quantitative Unterschiede auf ultrastrukturellem Niveau zwischen normalen und entarteten Melanozyten existieren.

Literaturverzeichnis

- Ackerman A.B., Mihara I.: Dysplasia, dysplastic melanocytes, dysplastic nevi, the dysplastic nevus syndrome, and the relation between dysplastic nevi and malignant melanomas. *Hum. Pathol.* **16**, 87-91, 1985
- Aherne W.A., Dunnill M.S.: *Morphometry*. Edward Arnold, London, 1982
- Aldrich H.C., Mollenhauer H.H.: Secrets of successful embedding, sectioning, and imaging. In: Aldrich H.C., Todd W.J. (eds.): *Ultrastructure techniques for microorganisms*, pp 101-132. Plenum Press, New York, 1986
- Anversa P., Vitali-Mazza L., Visioli O., Marchetti G.: Experimental cardiac hypertrophy: a quantitative ultrastructural study in the compensatory stage. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1**, 213-227, 1971
- Arnold C.G., Gaffal K.P.: Extranucleäre Vererbung. Die Morphologie extranucleärer Erbräger im Verlauf des Lebenszyklus. *Progress in Botany* **41**, 212-220, 1979a
- Arnold C.G., Gaffal K.P.: Die räumliche Struktur von Mitochondrien und Plastiden. *Biol. in unserer Zeit* **2**, 45-51, 1979b
- Arnold C.G.: Die Mitochondrien. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **41**, 2341-2343, 1989
- Atkins D.L., Rosenthal J.K., Krumm P.A., Marvin W.J.JR.: Application of stereological analysis of cell volume to isolated myocytes in culture with and without adrenergic innervation. *Anat. Rec.* **231**, 209-217, 1991

Herrn Prof. Dr. C.-G. Arnold danke ich an dieser Stelle besonders für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und den Impuls zu dieser Arbeit sowie in das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Dr. K. P. Gaffal danke ich für die vorzügliche Betreuung und außerordentlich qualitätsvolle Unterstützung im Laufe des Arbeitsfortgangs, wie auch die sorgfältige Prüfung des Manuskripts, besonders ebenfalls für das Erstellen und die Überlassung der 3-D-Rekonstruktionen.

Frau G. J. Friedrichs danke ich für die optimale Hilfe und die sehr aufschlußreiche Einweisung in die Arbeitstechniken am Elektronenmikroskop und im Photolabor.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen, die sonst noch zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

01. Oktober 1963	geboren in Solivio/Larissa Griechenland Eltern: Angelos und Maria Tziamalīs
September 1969 bis Juni 1975	Grundschule
September 1975 bis Juni 1978	Gymnasium
September 1975 bis Juni 1978	Lyzeum
Sommersemester 1982	Deutschkurs an der Universität Bonn
Wintersemester 1982/83 bis Sommersemester 1984 bis	Astronomie-Studium an der Universität Bonn
Wintersemester 1987/88	Pharmazie-Studium an der Universität Erlangen-Nürnberg
September 1986	1. Staatsexamen
Mai 1988	2. Staatsexamen
Juni 1988 bis Juni 1989	Praktikum in der Berolina-Apotheke in Fürt/Bay.
September 1989	3. Staatsexamen
Oktober 1989	Approbation als Apotheker
November 1989 bis November 1990	Ableisten des Militärdienstes in Griechenland
Ab Januar 1991	Beginn vorliegender Dissertation