

Nachweis von δ - Opioidrezeptoren auf Melanozyten der Melanomzelllinie G-361

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Melany Jayasinghe
aus Bremen

Gießen 2003

Aus der Medizinischen Betriebseinheit
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. H. Schmidt

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher
Gutachter: PD Dr. J. Mühling
Tag der Disputation: 13.05.2004

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Opioiderge Systeme: Komponenten	1
1.1.1 Opioidrezeptorliganden	1
1.1.1.1 Exogene Opiode	1
1.1.1.2 Endogene Opiode	2
1.1.2 Opioidrezeptoren.....	3
1.1.2.1 Einteilung	3
1.1.2.2 Struktur und Interaktionen.....	4
1.1.2.3 δ - Opioidrezeptoren	6
1.2 Opioiderge Systeme : Verteilung.....	8
1.2.1 Opioiderge Systeme im Organismus.....	8
1.2.2 Opioiderge Systeme in der Haut	9
1.3 Melanozyten	11
2 FRAGESTELLUNG.....	13
3 MATERIAL.....	15
3.1 Materialien und Geräte	15
3.2 Chemikalien und Substanzen	17

3.3	Lösungen.....	19
3.4	Computerprogramme	22
4	METHODEN.....	23
4.1	Zellkultur.....	23
4.1.1	Melanom- Zelllinien: G-361 und COLO 679	23
4.1.2	Kultivierung.....	23
4.2	Gentechnologische Methoden: Suche nach mRNA von Opioidrezeptorgenen in Melanomzelllinien mittels RT- PCR.....	24
4.2.1	RNA- Extraktion.....	24
4.2.2	Überprüfung der extrahierten Gesamt- RNA	25
4.2.3	Transkription extrahierter RNA in DNA.....	25
4.2.4	PCR.....	26
4.2.4.1	cDNA- Sequenz des humanen δ - Opioidrezeptors	26
4.2.4.2	Eingesetzte Primer.....	27
4.2.4.3	Durchführung der PCR	28
4.2.5	Gelelektrophoretische Darstellung der PCR- Produkte	30
4.3	Bindungsversuche: Suche nach Opioidrezeptoren auf Melanozytenmembranen der Melanomzelllinie G-361 im Radiorezeptor- Bindungsversuch	30
4.3.1	Liganden: markierte und nichtmarkierte Opioidrezeptorliganden	30
4.3.1.1	(³ H)–DPDPE, (³ H)-DAMGO, (³ H)-U 69593 (Tracer).....	30
4.3.1.2	DPDPE, DAMGO und U 69593 (Verdränger)	31
4.3.2	Binder: Melanozytenmembranen der Melanomzelllinie G-361	31
4.3.2.1	Herstellung von Membransuspensionen.....	31

4.3.2.2	Proteinbestimmung	32
4.3.3	Durchführung des Bindungsversuchs.....	33
4.3.3.1	Inkubationsansätze	33
4.3.3.2	Trennmethode: Filtration.....	35
4.3.3.3	Bestimmung der Radioaktivität	36
4.3.4	Auswertung der Bindungsdaten	36
4.4	Bindung des Opioidrezeptorliganden (³H)– DPDPE an δ- Opioidrezeptoren: Charakterisierung	38
4.4.1	Zeitabhängigkeit.....	38
4.4.2	Reversibilität.....	39
4.4.3	Sättigbarkeit	39
4.4.4	Ermittlung der Bindungsparameter K _D und B _{MAX}	40
5	ERGEBNISSE.....	41
5.1	Nachweis von δ- Opioidrezeptor mRNA in Melanomzelllinien	41
5.1.1	Nachweis von δ- Opioidrezeptor mRNA in der Melanomzelllinie G-361.	41
5.1.1.1	Amplifikation des cDNA- Fragments 462 bis 1234des δ- Opioidrezeptors	41
5.1.1.2	Amplifikation des cDNA- Fragments 493 bis 986 des δ- Opioidrezeptors	42
5.1.2	Nachweis von δ- Opioidrezeptor mRNA in der Melanomzelllinie COLO 679	42
5.1.2.1	Amplifikation des cDNA- Fragments 462 bis 1234 des δ- Opioidrezeptors	43
5.1.2.2	Amplifikation des cDNA- Fragments 493 bis 986 des δ- Opioidrezeptors	43
5.1.2.3	Reamplifikation	45

5.2 Nachweis von Opioidrezeptoren auf Melanozytenmembranen der Melanomzelllinie G-361.....	46
5.2.1 Ausschluß der Existenz von μ - und κ - Rezeptoren in Membranen der Melanomzelllinie G-361 im Bindungsversuch	47
5.2.2 Bindung des Opioidrezeptorliganden (^3H)–DPDPE an δ -Opioidrezeptoren auf Melanozyten der Melanomzelllinie G-361: Charakteristika	48
5.2.2.1 Zeitabhängigkeit	48
5.2.2.2 Reversibilität	49
5.2.2.3 Sättigbarkeit.....	50
5.2.2.4 Bindungsparameter K_D und B_{Max}	52
6 DISKUSSION	55
6.1 Methodik.....	55
6.1.1 Melanozyten als Untersuchungsobjekt.....	55
6.1.2 Bindungsversuche.....	56
6.1.2.1 Liganden.....	56
6.1.2.2 Membranpräparation.....	56
6.1.2.3 Filtration.....	58
6.1.2.4 Bestimmung der Radioaktivität	59
6.2 Ergebnisse	59
6.2.1 Gentechnologische Ergebnisse.....	59
6.2.1.1 Expression des δ -Opioidrezeptors in Melanomzelllinien.....	59
6.2.1.2 Entdeckung einer ca. 150 bp kürzeren Sequenz	61
6.2.1.3 Entstehung, Vorkommen und Bedeutung der δ -Opioidrezeptorvariante.....	63
6.2.2 Ergebnisse der Bindungsversuche.....	64
6.2.2.1 Nachweis einer spezifischen Bindungsstelle	64

6.2.2.2	Berechnung der Dissoziationskonstanten.....	65
6.2.2.3	Berechnung der Bindungskapazität	66
6.2.3	Existenz und Bedeutung opioidergere Systeme der Haut für Melanozytenfunktionen	67
7	ZUSAMMENFASSUNG	70
8	SUMMARY	73
9	LITERATURVERZEICHNIS	74
	DANKSAGUNG	85
	LEBENS LAUF	86

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

μ	mikro, mu
n	nano
p	pico
κ	kappa
δ	delta
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Bl -Wert	Blank- Wert
B _{MAX}	maximal erreichbare Bindung (max. Bindung des Liganden, Konzentration an Bindungsstellen, Bindungskapazität)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CT-Wert	Insgesamt eingesetzte Radioaktivität pro Ansatz
DAMGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-Enkephalin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPDPE	cyclic[D-Pen ² ,D-Pen ⁵]-Enkephalin
dpm	desintegrations per minute (tatsächllliche Zerfälle eines Radioisotops pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fMol	Femtomol, femto- Mol
FCS	fetales Kälberserum

g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²), letzteres im Zusammenhang mit Zentrifugation
GLY	Glycin
HDE	human delta receptor
HGP	Homogenisationspuffer
IKP	Inkubationspuffer
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante
KOP	Kompensationspuffer
l	Liter
β-LPH	β-lipotropes Hormon
m	Meter, Milli-
M	Molar (molare Konzentration)
m ²	Quadratmeter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MP	Membranpuffer
mRNA	Messenger- RNA
β-MSH	β-Melanozyten-stimulierendes Hormon
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PHE	Phenylalanin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POMC	Proopiomelanocortin
RBA	Radiorezeptor-Bindungsversuch
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat

sek	Sekunde
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
U 69593	(5 α , 7 α , 8 β)-(+)-N-Methyl-N-(7-[1-Pyrrolidiny]-1-Oxaspiro[4,5] Dec-8-yl) – Benzeneacetamide

1 EINLEITUNG

1.1 Opioiderge Systeme: Komponenten

1.1.1 Opioidrezeptorliganden

1.1.1.1 Exogene Opioide

Die Opiumgewinnung erfolgt durch Trocknen des Milchsaftes der Schlafmohnkapsel (*Papaver somniferum*). Schon in Schriften der griechischen und römischen Antike, wie zum Beispiel in denen des THEOPHRASTUS, werden die analgetische und bewusstseinsverändernde Wirkung des Opiums beschrieben. Opium enthält 25 Alkaloide, wovon Morphin das medizinisch wichtigste darstellt; 1804 gelang es Friedrich SERTÜRNER, das Morphin daraus zu isolieren.

Die Klärung der Morphinstruktur erfolgte 1923 durch GULLAND und ROBINSON; bestätigt wurde sie 1952 durch de- novo Synthese von GATES und TSCHUDI.

Als Opiate bezeichnet man Morphin und alle natürlichen sowie synthetisch hergestellten Alkaloide mit morphinartiger Wirkung. In der Regel handelt es sich dabei um exogene Opioide.

In der Klinik findet Morphin vor allem als Analgetikum Anwendung. Als unerwünschte Nebenwirkungen sind Obstipation, Atemdepression, Übelkeit und Erbrechen zu nennen.

Die spezifischen Wirkungen der Opiate sowie die antagonistische Wirkung des Opioidantagonisten Naloxon gaben Anlass zur Suche nach opiat-spezifischen Rezeptoren.

Diese Opiatrezeptoren konnten 1973 unabhängig voneinander von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (PERT und SNYDER,1973; SIMON et al.,1973; TERENIUS,1973).

Der Nachweis spezifischer Opiatrezeptoren gab Anlass zur Suche nach endogenen Liganden, da es unwahrscheinlich erschien, dass nur exogene Opioide mit diesen hochspezifischen Bindungsstellen interagieren sollten.

1.1.1.2 Endogene Opioide

Zu den Opioiden zählt man einerseits Opioide mit Alkaloidstruktur, die Opiate (in der Regel exogene Opioide) und andererseits Opioide mit Peptidstruktur, die Opioidpeptide (in der Regel endogene Opioide). Beiden Gruppen ist eine agonistische Wirkung an den Opioidrezeptoren, die zu Beginn als Opiatrezeptoren bezeichnet wurden, gemeinsam.

Die ersten endogenen Opioide wurden 1975 von HUGHES und KOSTERLITZ entdeckt. Es handelte sich dabei um die Gruppe der Enkephaline. Wenig später wurden weitere Opioidpeptide, wie das β -Endorphin 1976 durch LI et al. und das Dynorphin 1979 durch GOLDSTEIN et al., gefunden. Es handelt sich hierbei um Peptide mit der N-terminalen Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe, über die sie mit Opioidrezeptoren in Verbindung treten. Außer diesen sogenannten „typischen“ Opioidpeptiden kennt man einige „atypische“ Opioidpeptide wie z.B. die β -Casomorphine, Fragmente des Milchproteins β -Casein (BRANTL and TESCHEMACHER, 1983) oder die Dermorphine, die in der Haut von Amphibien gefunden wurden (BROCCARDO et al., 1981). Sie binden und wirken ebenfalls an Opioidrezeptoren, verfügen jedoch mit Ausnahme des N-terminalen Tyrosinrestes nicht über die typische N-terminale Aminosäuresequenz der Opioidpeptide. Es handelt sich um eine Gruppe von Peptiden, welche aus verschiedensten Proteinen freigesetzt werden können (TESCHEMACHER, 1993).

Alle typischen Opioidpeptide stammen von ausschließlich drei verschiedenen Precursormolekülen ab: Proopiomelanocortin (POMC), Proenkephalin (PENK) und Prodynorphin (PDYN) (HÖLLT, 1983). Durch enzymatische Freisetzung werden aus diesen Molekülen die verschiedenen typischen Opioidpeptide abgespalten.

Von dem wohl bekanntesten Precursormolekül, dem Proopiomelanocortin, leiten sich das β -Endorphin (1-31) sowie die durch weitere Spaltung entstehenden Peptide α - und γ -Endorphin ab. Neben den Endorphinen werden auch die Hypophysenhormone ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), α -, β - und γ -MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) und β -LPH (Lipotropin) aus POMC freigesetzt. Die höchste Konzentration an POMC findet man im Hypophysenvorderlappen.

Aus dem Proenkephalin gehen die Enkephaline Met- und Leu-Enkephalin hervor.

Die Dynorphine A und B sowie α - und β -Neoendorphin werden aus dem Prodynorphin herausgespalten. Die Peptide beider Gruppen lassen sich in verschiedenen Regionen des ZNS, im Nebennierenmark und im Plexus myentericus und submukosus nachweisen.

Mit Hilfe dieser hochspezifischen Liganden konnte gezeigt werden, dass es mehrere Rezeptortypen und –subtypen geben muss, an die die einzelnen Opioide mit unterschiedlicher Affinität binden (PATERSON et al., 1983).

1.1.2 Opioidrezeptoren

1.1.2.1 Einteilung

Nachdem 1973 Opiatrezeptoren im Nervensystem von Vertebraten nachgewiesen werden konnten (PERT und SNYDER, 1973; SIMON et al., 1973; TERENIUS, 1973), gelang 1980 erstmals die Isolierung dieser Rezeptoren aus Membranen (RUEGG et al., 1980).

Erkenntnisse aus Bindungsversuchen zeigten bald, dass mehrere Rezeptortypen existieren. Definiert wurden sie über ihre spezifische Affinität zu unterschiedlichen Liganden. Wie viele und welche Opioidrezeptoren es wirklich gibt, wird bis heute kontrovers diskutiert.

Als Opioidrezeptoren wurden 1976 die μ -, κ - und σ - Rezeptoren beschrieben (MARTIN et al., 1976) ; der δ - Rezeptor wurde zum erstenmal erst 1977 nachgewiesen (LORD et al., 1977). Zwei Jahre später entstand das Modell der μ -, δ - und ϵ - Rezeptoren (WÜSTER et al., 1979).

Der σ - Rezeptor wird in der neueren Literatur nicht mehr der Opioidrezeptorfamilie zugerechnet, weil seine Wirkungen nicht durch den Opioidantagonisten Naloxon aufzuheben sind (QUIRION et al., 1987).

Nachdem die These eines ϵ - Rezeptors wiederholt verworfen wurde, legen es neuere Arbeiten nahe, den ϵ - Rezeptor als eigenständigen Rezeptortyp anzuerkennen (HERZ, 1986; SHOOK et al., 1988; NOCK et al., 1993).

Allgemein akzeptiert und am besten untersucht sind die μ -, κ - und δ -Rezeptoren, die auch OP₃ (MOR), OP₂ (KOR) und OP₁ (DOR) genannt werden. Die Bezeichnung OP₁, OP₂ und OP₃ basiert auf die Reihenfolge, in der die drei Rezeptoren geklont wurden (DHAWAN et al., 1996).

Diese Rezeptortypen lassen sich wiederum in Subtypen, die sogenannten μ_1 -, μ_2 -, κ_{1a} -, κ_{1b} -, κ_2 -, κ_3 -, δ_1 - und δ_2 - Rezeptoren aufgliedern (ZUKIN et al., 1988; PAUL et al., 1989; SOFUOGLU et al., 1991; MATTIA et al., 1991; JIANG et al., 1991; ZAKI et al., 1996).

Eine neuere Entdeckung ist der ORL₁- Rezeptor (opioid receptor-like protein₁ receptor), der aufgrund seiner strukturellen Homologie (50-60%) zu den Opioidrezeptoren gezählt wird (MOLLEREAU et al., 1994).

Ein großer Fortschritt in der Entwicklung der Opioidrezeptor- Forschung konnte durch die Klonierung des Maus- δ - Opioidrezeptors 1992 durch zwei unabhängig voneinander arbeitende Gruppen erzielt werden (KIEFFER et al., 1992; EVANS et al.; 1992).

Die Sequenzanalyse der 372 Aminosäuren des entschlüsselten Maus- δ - Opioidrezeptorproteins ergab, dass der geklonte Rezeptor der G-Protein-gekoppelten Rezeptorenfamilie angehört (PROBST et al., 1992) und demnach den typischen Aufbau G-Protein- gekoppelter Rezeptoren aufweist.

1993 erfolgte die Klonierung des μ - und des κ - Rezeptors von Ratten (CHEN et al., 1993a,b).

Heute sind DNA-Klone der humanen μ -, δ - und κ -Rezeptoren verfügbar.

1.1.2.2 Struktur und Interaktionen

Durch die Kenntnis der Aminosäuresequenz der Rezeptoren und die Möglichkeit, die Rezeptoren in geeigneten Zellen in größerer Menge zu exprimieren, konnte das Wissen über Bau und Funktion der Opioidrezeptoren schnell erweitert werden.

Die Opioidrezeptoren gehören zu der Gruppe der G- Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ihre Struktur entspricht somit dem einheitlichen Bauprinzip dieser Rezeptoren: der N-Terminus der Aminosäurekette liegt im Extrazellulärraum, der C-

Terminus im Intrazellulärraum. Die etwa vierhundert Aminosäuren lange Peptidkette durchquert siebenmal die Zellmembran (EVANS et al., 1992), wodurch außer den N- und C- terminalen Sequenzen sieben transmembranäre Domänen sowie drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Domänen (Schleifen) entstehen.

Der Vergleich der verschiedenen Opioidrezeptortypen zeigt, dass diese in sechs transmembranären sowie in den drei intrazellulären Domänen und der ersten extrazellulären Schleife weitgehend übereinstimmen (65%). Im Gegensatz dazu findet man weder in der vierten transmembranären Domäne noch in der zweiten und dritten extrazellulären Schleife oder im N- bzw. C- Terminus der Rezeptortypen eine ausgeprägte Homologie (35%). Man schließt daraus, dass diese Teile der Opioidrezeptoren wahrscheinlich für die unterschiedlichen Bindungscharakteristika der verschiedenen Rezeptortypen verantwortlich sind und so unterschiedliche Funktionen bedingen können (KONG et al., 1994). Die dritte intrazelluläre Schleife hingegen soll die Bindung des G-Proteins an den Rezeptor beeinflussen können.

Alle Opioidrezeptoren inhibieren G-Protein- vermittelt die cAMP- Bildung durch Hemmung der Adenylatcyclase. Außerdem kommt es zur Aktivierung von Kaliumkanälen und zur Inaktivierung von Calciumkanälen.

Grundsätzlich treten Opioidpeptide mit Opioidrezeptoren über ihren N-Terminus in Verbindung. Wie schon erläutert unterscheiden sich die einzelnen Liganden in ihrer Affinität zu dem jeweiligen Rezeptortyp. Dennoch beschränkt sich die Affinität der Opioidpeptide nicht selektiv auf einen einzigen Rezeptortyp.

So zeigen Proopiomelanocortin- und Proenkephalinderivate hohe Bindungsaffinität zu den δ - und μ -Opioidrezeptoren. Im Gegensatz zu Prodynorphinpeptiden binden sie aber nicht an den κ -Opioidrezeptor.

Infolgedessen bindet β -Endorphin bevorzugt an μ - Rezeptoren, die Enkephaline an δ - Rezeptoren und die Dynorphine an κ - Rezeptoren (CHAVKIN et al., 1982; SIMON und GIOANNINI, 1993).

Das Bindungsprofil der synthetischen Opioidpeptide entspricht vorangegangenen Charakterisierungen an Membranpräparationen:

(D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵)- Enkephalin (DAMGO) ist wie Morphin ein hochpotenter

μ - Opioidrezeptoragonist, (D-Pen^{2,5})- Enkephalin (DPDPE) zeigt höchste Affinität gegenüber dem δ - Opioidrezeptor und (5 α , 7 α , 8 β)-(+)-N-Methyl-N-(7-[1-Pyrrolidinyll]-1-Oxaspiro[4,5] Dec-8-yl)- Benzeneacetamide (U69 593) bindet hochselektiv an den κ - Opioidrezeptor.

Die Bindungspotenz ausgedrückt als Dissoziationskonstante (K_D) liegt bei allen drei Opioidrezeptorliganden zwischen 10^{-9} und 10^{-8} M (KIEFFER et al., 1995)

Die durch verschiedene Liganden ausgelösten Wirkungen lassen sich nicht eindeutig bestimmten Opioidrezeptoren zuordnen.

Es werden über den μ -Rezeptor, zum Teil jedoch auch über den δ - Rezeptor, auf supraspinaler Ebene Analgesie, Euphorie, Miosis, Atemdepression, Hustenblockade, Nausea und Emesis hervorgerufen. Agonisten an κ - Rezeptoren wirken vorwiegend auf spinaler Ebene analgetisch. Zusätzliche über den κ - Rezeptor vermittelte Wirkungen sind ebenso Analgesie, Miosis, Dysphorie, Atemdepression und Anxiolyse (REISINE and PASTERNAK, 1996).

Opioidrezeptoren und Opioidpeptide aus den drei Precursurmolekülen finden sich an vielen Stellen im Organismus mit charakteristischen Unterschieden in der Verteilung.

1.1.2.3 δ - Opioidrezeptoren

Der erste Opioidrezeptor, der geklont wurde, war der δ - Opioidrezeptor. Die Arbeitsgruppen EVANS und KIEFFER haben 1992 unabhängig voneinander den Maus- δ - Opioidrezeptor kloniert. Der Ratten- δ - Opioidrezeptor wurde durch FUKUDA et al. (1993) und der menschliche δ - Opioidrezeptor ein weiteres Jahr später durch KNAPP et al. (1994) und SIMONIN et al. (1994) geklont.

Das menschliche δ - Opioidrezeptorprotein bestehend aus 372 Aminosäuren stimmt zu 97% mit dem Maus- und dem Ratten- δ - Opioidrezeptorprotein überein. Die Unterschiede liegen vor allem im N- und C- Terminus der Aminosäurenkette.

Das Gen des menschlichen δ - Opioidrezeptors wurde mittels in-situ-Hybridisierung auf Chromosom 1, an der Position p34,3-p36,1, lokalisiert (BEFORT et al., 1994).

Die Struktur des δ - Opioidrezeptor- Gens wurde 1994 durch SIMONIN et al. aufgeklärt. Demnach ist der kodierende Bereich des δ - Opioidrezeptors über drei Exons verteilt, die wiederum durch zwei Introns, von der Länge 46,3 kbp bzw. 3,4 kbp, voneinander getrennt sind (AUGUSTIN et al.,1995). Die Introns liegen zum einen hinter der ersten und zum anderen hinter der vierten transmembranären Domäne.

Die Struktur des Rezeptormoleküls entspricht dem in 1.1.2.2 beschriebenen Bauprinzip G-Protein- gekoppelter Rezeptoren.

G- Protein gekoppelte Rezeptoren sind auf ihre Struktur und Funktion hin gut untersucht worden. Verschiedene Untersuchungen (QUOCK et al.,1999) zeigen, welche Abschnitte des δ - Opioidrezeptors für die selektive Bindung eines Liganden von Bedeutung sind. Dabei soll die dritte extrazelluläre Schleife zusammen mit einigen Regionen der transmembranären Domänen für die Selektivität des δ - Opioidrezeptors für seine Liganden verantwortlich sein. Hingegen scheinen der N-Terminus als auch die erste und zweite extrazelluläre Schleife keinen Einfluss auf die Bindung von selektiven δ - Opioidliganden zum δ - Opioidrezeptor zu nehmen.

Die Rolle der μ - Opioidrezeptoren in der opioid- vermittelten Analgesie ist schon länger bekannt. Anhand selektiver δ - Opioidrezeptor- Agonisten konnte gezeigt werden, dass auch diese Rezeptoren an der Vermittlung der Analgesie beteiligt sind. Sowohl die Entdeckung selektiver δ - Opioidrezeptor- Antagonisten wie Naltriben und Naltrindol (PORTOGHESE et al., 1988; TAKEMORI and PORTOGHESE, 1992) als auch die Einführung hochselektiver δ - Opioidrezeptor- Agonisten wie z.B. von DPDPE (MOSBERG et al., 1983a,b) ermöglichten den Nachweis δ - Opioidrezeptor- vermittelter Antinozizeption.

Die selektiven δ - Opioidrezeptor- Agonisten scheinen den Vorteil zu haben, dass die unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. Atemdepression (CHENG et al., 1993), Obstipation (SHELDON et al., 1990) und die Ausbildung einer physischen Abhängigkeit (COWAN et al., 1988) geringer ausgeprägt sind als bei den μ - Opioidrezeptor- Agonisten, die momentan in der Schmerztherapie eingesetzt werden. Das δ - Opioidsystem erregt daher zunehmend Aufmerksamkeit bei der Entwicklung neuer Schmerzmedikamente, ferner in der Therapie der Kokain- und Alkoholabhängigkeit und in der Diagnostik und Therapie des Lungenkarzinoms (COOP and RICE, 2000).

MATTHES et al. (1998) konnten bei Gen- mutierten Mäusen, in denen die Expression des μ - Opioidrezeptors gestört war, zeigen, dass selektive δ - Opioidrezeptor- Agonisten den μ - Opioidrezeptor nicht benötigen, um Antinozizeption zu vermitteln. Im Gegensatz dazu wurde von SORA et al. (1997a,b) beschrieben, dass die antinozizeptive Wirkung von DPDPE in μ - Opioidrezeptor- knockout Mäusen geringer ausgeprägt war als in der Kontrollgruppe. Demnach scheint zumindest die antinozizeptive Wirkung des δ - Opioidrezeptor- Agonisten DPDPE doch von einem intakten μ - Opioidrezeptor abhängig zu sein.

1.2 Opioiderge Systeme : Verteilung

1.2.1 Opioiderge Systeme im Organismus

Opioidrezeptoren und Opioidpeptide lassen sich unter funktionellem Gesichtspunkt als opioidpeptiderge Systeme beschreiben.

Opioidrezeptoren sind in den verschiedensten Geweben und Zellen entdeckt worden. Im Gehirn findet man eine hohe Dichte an μ - Rezeptoren, die vor allem im Thalamus und Hypothalamus vorzufinden sind. δ - Rezeptoren und κ - Rezeptoren sind hauptsächlich im Bereich des Cortex lokalisiert, κ - Rezeptoren außerdem in höherer Konzentration im limbischen System (ATWEH und KUHAR,1983; MANSOUR und WATSON, 1993; PFEIFFER et al.,1982).

Endorphine lassen sich in hohen Konzentrationen im hypothalamisch-hypophysären Bereich nachweisen. Enkephaline und Dynorphine sind dagegen über viele Regionen des ZNS verteilt (DORES et al., 1984; KHACHATURIAN,1985).

Außerhalb des ZNS werden opioidpeptiderge Systeme im Herzen (ARCHELOS et al., 1987; PITTIUS et al., 1987; SPAMPINATO et al.1991; WEIHE et al.,1983) im Gastrointestinaltrakt (CHAMOULARD et al., 1993; INTORRE et al., 1993; ORWOLL und KENDALL, 1980), im Nebennierenmark (LUNDBERG et al., 1979) und im Immunsystem (SIBINGA und GOLDSTEIN,1988) beschrieben.

Opioiderge Systeme greifen u.a. in Leitung und Verarbeitung der Schmerzempfindung ein, sind an der Regulation der Körpertemperatur beteiligt,

kontrollieren die Hormonsekretion, beeinflussen immunregulatorische sowie gastrointestinale Funktionsabläufe und sind an der Regulation des emotionalen Erlebens beteiligt, um nur einige physiologische Funktionen zu nennen.

1.2.2 Opioiderge Systeme in der Haut

Die Haut ist mit einer Oberfläche von 1,8 m² eines der umfangreichsten Organe des Körpers. Sie macht ca. 16% des Körpergewichts aus. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Bildung einer Barriere, die den Körper vor schädlichen äußeren Faktoren schützen und das innere Gleichgewicht intakt halten soll. Die Haut ist aus drei Schichten aufgebaut: der Epidermis, der Dermis und der Subkutis.

Die Epidermis als Oberflächenepithel ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel mit vier Schichten (Übersicht Abb.1). Die Anordnung der Schichten von innen nach außen: Basalzellschicht, Stachelzellschicht, Granularzellschicht, Hornschicht. Die Epidermis besteht zu 90% aus den eigentlichen Epidermiszellen, den Keratinozyten. Sie enthält außerdem Langerhanszellen (Immunsystem), Melanozyten (Pigmentsystem) und Merkel- Zellen (Nervensystem).

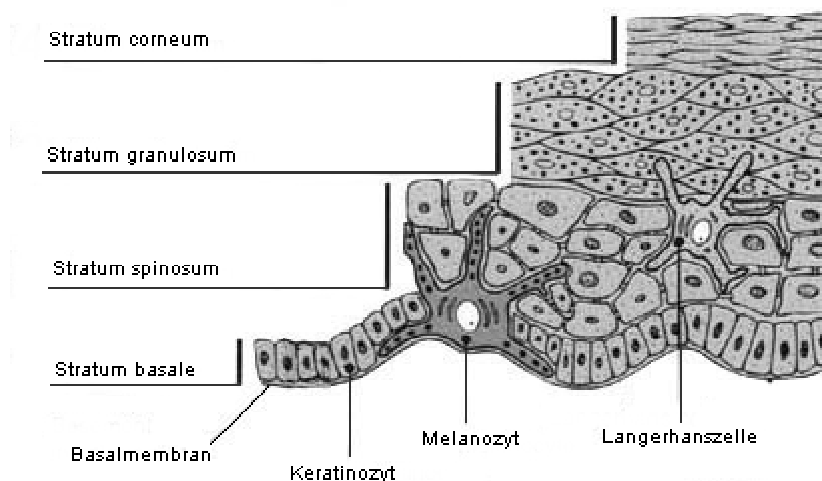


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Epidermis

Differenzierung der Keratinozyten vom *Stratum basale* über *Stratum spinosum* in das *Stratum granulosum*. Abrupter Übergang der Keratinozyten in die Hornzellen des *Stratum corneum*. Die Melanozyten liegen in der dermoepithelialen Grenzzone zwischen den Basalzellen der Epidermis. (Modifiziert nach Gawkrödger, D.J., 1997)

Die intensive Suche nach opioidergen Systemen in der Haut begann, nachdem die ersten Opioidrezeptorliganden in der Froschhaut nachgewiesen werden konnten. Es handelte sich dabei um hochselektive δ - Opioidrezeptorliganden, die man als Deltorphine und Dermorphine bezeichnete (KREIL et al., 1989; MONTECUCCI et al., 1981; LAZARUS et al., 1999).

Untersuchungen von BHARDWAJ und LUGER (1994) zeigten, dass das Precursormolekül POMC in nativen Keratinozyten exprimiert wird und seine Derivate ACTH, α -MSH (SCHAUER et al., 1994) und β - Endorphin (WINTZEN et al., 1996) aus diesen Zellen freigesetzt werden können.

Später ergaben sich weitere Hinweise auf ein opioiderges System in der menschlichen Haut. Es wurden sowohl Opioidbindungsstellen auf Keratinozyten (BIGLIARDI et al., 1998) als auch Effekte durch Opioidrezeptorliganden an Keratinozyten beschrieben (NISSEN et al., 1997). Die Arbeitsgruppe BIGLIARDI wies den μ -Opioidrezeptor auf humanen Keratinozyten nach und war damit die erste, die einen Rezeptor für den POMC-Abkömmling β -Endorphin, welches mit hoher Affinität an den μ -Opioidrezeptor bindet, in der menschlichen Haut beschreiben konnte.

Diesen Befunden entsprechend wurden in weiteren Untersuchungen spezifische Bindungsstellen für β - Endorphin in Keratinozyten gefunden (EGELING et al., 1999).

Über die physiologischen Funktionen opioidergere Systeme in der Haut gibt es nur wenige Arbeiten.

Opioiderge Systeme in der menschlichen Haut scheinen für die Regulation der Zelldifferenzierung und Pathogenese einiger Hauterkrankungen von Bedeutung zu sein.

Berichten zufolge werden im Plasma von Patienten mit atopischer Dermatitis, Psoriasis (GLINSKI et al., 1994 und 1995) und Vitiligo (MOZZANICA et al., 1992) erhöhte β -Endorphin- Konzentrationen beobachtet, was mit einer möglichen Beteiligung der Opioidpeptide an der Regulation und Pathogenese dieser Krankheiten kompatibel wäre.

Ferner gibt es Hinweise, dass opioiderge Systeme in die Regulation der Keratinozytendifferenzierung und des epithelialen Wachstums involviert sind und so eine Schlüsselfunktion in der Wundheilung einnehmen könnten.

Es wurden in der Wundflüssigkeit (CEPEDA et al., 1993) und im Plasma (XUE et al., 1991) von Patienten mit Verbrennungswunden erhöhte Konzentrationen von β -Endorphin gefunden. Opioidpeptide, die in Wunden exprimiert werden, sollen nicht nur den Schmerz lindern, sondern zusätzlich durch Stimulation der Migration und Chemotaxis von Keratinozyten (BIGLIARDI et al., 2002) und Leukozyten (VAN EPPS et al., 1993) die Reepithelialisierung im Rahmen der Wundheilung verbessern können.

Als eine weitere Funktion der Opioidpeptide in der Haut wird die Beteiligung an der Regulation der Sinneswahrnehmung beschrieben. Diese These konnte anhand von Versuchen mit dem Opioidantagonisten Naloxon unterstützt werden. Naloxon konnte den auftretenden Juckreiz bei Urämiepatienten aufheben (PEER et al., 1996). Somit kann eine Beteiligung der Opioidpeptide an der Entstehung bzw. Wahrnehmung des Juckreizes nicht ausgeschlossen werden.

Die physiologische Bedeutung der opioidergen Systeme in der Haut bedarf weiterer Abklärung.

1.3 Melanozyten

Melanozyten wandern aus der Neuralleiste, die aus Zellen des Ektoderms hervorgeht aus und dringen in die basale Lage der Epidermis ein. Sie werden zu den neuroepithelialen Zellen gerechnet.

Die regionale Verteilung der Melanozyten erfolgt nach der Geburt. Melanozyten sind am häufigsten im Gesicht und anderen exponierten Körperpartien lokalisiert.

Melanozyten liegen in der Basalzellschicht in Kontakt mit der Basalmembran. Sie machen etwa 5-10% der Basalzellpopulation aus.

Ein Melanozyt versorgt ca. 36 Keratinozyten („Epidermale Melanineinheit“) mit Melanin.

Melanozyten synthetisieren das braun-schwarze Pigment Melanin in sogenannten Melanosomen. Das Melanin wird in Granula eingebaut und über dendritische

Ausläufer an die benachbarten Keratinozyten weitergegeben, die es durch Phagozytose aufnehmen.

Die Zahl der Melanozyten ist bei allen Menschen gleich, unterschiedlich dagegen sind Anzahl und Größe der gebildeten Melaningranula, was die unterschiedliche Pigmentierung bei der Bevölkerung bedingt.

Die Pigmentierung stellt einen Schutz gegenüber UV Strahlen dar.

Das maligne Melanom ist eine maligne Entartung der Melanozyten, die zunächst mit einer melanozytären Proliferation in der Epidermis beginnt und sich später in die Dermis ausbreitet. Dieser Hauttumor zeichnet sich durch aggressives und infiltratives Wachstum sowie durch seine Neigung zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung aus und ist infolgedessen durch eine hohe Letalität gekennzeichnet.

Maligne Melanome kommen vorwiegend bei Menschen weißer Rassen vor, bei Schwarzen sind sie sehr selten. Menschen mittleren Alters sind bevorzugt betroffen, das weibliche Geschlecht häufiger als das männliche. Die Ätiopathogenese des malignen Melanoms ist noch nicht bis ins Detail aufgeklärt, von Bedeutung sind eine genetische Disposition und UV Belastung. Vor allem massive Sonnenbrände in der Kindheit werden in der Entstehung maligner Melanome Bedeutung beigemessen.

Die Inzidenz des malignen Melanoms nimmt weltweit jährlich zu. Sie beträgt derzeit in Europa 6-14 Neuerkrankungen pro Jahr und 100000 Einwohnern (BRAUN-FALCO et al., 1996).

2 FRAGESTELLUNG

Opioidpeptide und Opioidrezeptoren, zusammengefasst als opioiderges System, kommen vorwiegend im peripheren und zentralen Nervensystem vor. Daneben existieren weitere opioiderge Systeme, z.B. im Herzen, im Gastrointestinaltrakt, im Immunsystem und in der Haut.

Hinweise auf die Existenz opioidergere Systeme in der Haut erbrachte u. a. die Entdeckung hochselektiver δ - Opioidrezeptorliganden, der Deltorphine und Dermorphine. Spätere Befunde zeigten zum einen, dass POMC in Keratinozyten exprimiert und zum anderen, dass Derivate hiervon aus diesen Hautzellen freigesetzt werden können. Desweiteren konnte mit dem Nachweis des μ - Opioidrezeptors auf menschlichen Keratinozyten die Existenz opioidergere Systeme in der Haut bestätigt werden.

Die menschliche Epidermis besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten. Zusätzlich beherbergt die Epidermis unter anderem die melaninbildenden Zellen des Pigmentsystems, die Melanozyten.

Nachdem sich die Suche nach opioidergen Systemen in der menschlichen Haut bisher im wesentlichen auf Keratinozyten beschränkt hatte, entstand die vorliegende Arbeit in dem Bestreben, nach den drei Opioidrezeptortypen μ , κ und δ auf Melanozyten der menschlichen Haut zu suchen.

Um den für die Versuche hohen Bedarf an Zellen decken zu können, sollten für die Experimente Melanozyten der menschlichen Zelllinien G-361 und COLO 679 eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte sowohl nach der mRNA als auch nach dem exprimierten Protein der Opioidrezeptoren gesucht werden. Hierzu sollten zwei Methoden eingesetzt werden:

Zuerst sollten die Melanomzelllinien G-361 und COLO 679 mittels RT- PCR auf die Expression von mRNA der drei Opioidrezeptortypen μ , κ und δ untersucht werden.

Anschließend sollte mittels Radioligand- Bindungsversuchen überprüft werden, welcher der drei Opioidrezeptortypen gegebenenfalls auch auf Membranen der Melanomzellen nachgewiesen werden könnte.

Als Liganden sollten die radioaktiv markierten Opioidrezeptorliganden (^3H)-DPDPE (δ -Opioidrezeptoragonist), (^3H)-DAMGO (μ -Opioidrezeptoragonist) und (^3H)-U69 593 (κ -Opioidrezeptoragonist) und die betreffenden Opioidrezeptorliganden in nicht markierter Form in Radioligand- Bindungsversuchen eingesetzt werden. Membranpräparate der Melanomzelllinie G-361 waren als Binder vorgesehen. Mit dieser Methode sollte nach spezifischen Bindungstellen für die Opioidrezeptorliganden gesucht werden.

Wir fanden m-RNA des δ - Opioidrezeptors in der Melanomzelllinie G-361 mittels RT-PCR und konnten für (^3H)-DPDPE in den Bindungsversuchen eine spezifische Bindung auf den Membranen der G-361 Zellen aufzeigen.

Deshalb sollten in weiteren Versuchen die Bindungscharakteristika wie Zeitabhängigkeit, Reversibilität und Sättigbarkeit untersucht sowie die Bindungsparameter K_D und B_{MAX} , als Maß für die Affinität der Bindung, bestimmt werden .

3 MATERIAL

3.1 Materialien und Geräte

a) Gentechnologie und Zellkultur :

Absaugpumpe	Leybold, Köln
Autoklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim bei München
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Einmalpipette (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Falcon Röhrchen (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Flowbank	Heraeus, Hanau
Gelelektrophoresekammer	Werkstatt des MZG, Gießen
Gene Amplification PCR System 2400	Perkin Elmer, Überlingen
Glasmaterialien (autoklaviert)	Schott, Mainz
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Neubauer- Zählkammer	Kalensee, Gießen
Nylon-Membran (Nytran NY 13N)	Schleicher und Schüll, Dassel
PCR-Cycler“Crocodile“	Appligene, Heidelberg
Pipetten, verstellbar (5ml, 1 ml, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl)	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
Reaktionsgefäße (2ml, 1.5ml, 0,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rüttler	Heidolph, Kehlheim
Spannungsquelle	Elektrowerkstatt MZI, Giessen
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge, Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Hanau
UV-Lampe „Eagle Eye“	Stratagene, Heidelberg
UV Lampe Micro Bio Tec	Brand, Gießen
Waage- Feinwaage M5	Mettler, Zürich

Waage-Tischwaage AT 250
Wasserbad

Mettler, Zürich
Köttermann, Hänigsen

b) Radiorezeptorbindungsversuche und Proteinbestimmung:

Beta-Counter, Wallac1410	Pharmacia Biotech, Freiburg
Dispenser Tips	Nerbe, Winsen/Luhe
Filtrationskammer	Werkstatt des MZG, Gießen
Glasfaserfilter (GFB)	Whatman-Biometra, Göttingen
Glasmaterialien	Schott, Mainz
Glaspipetten (10ml, 20ml)	Brand, Wertheim/Main
Homogenisator	Braun, Melsungen
Horizontalschüttler	Edmund Bühler, Tübingen
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Parafilm	American Can Company, Dixie/Marathon, USA
Petrischalen (100er; 145er)	Greiner, Frickenhausen
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer Biochrom 4060	Pharmacia- LKB, Freiburg
Pipetten(1ml, 5ml)	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Polystyrolröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5ml ; 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rundschüttler	Heidolph, Kehlheim
Rüttler	Eppendorf, Hamburg
Sarstedt-Röhrchen (13ml; 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Teflonschaber	Greiner, Frickenhausen
Unterdruckpumpe	Leybold, Köln
Vortexer	Heidolph, Kehlheim
Zentrifuge: Sorvall RC-5C PLUS	Du Pont, Bad Homburg

3.2 Chemikalien und Substanzen

a) Gentechnologie und Zellkultur:

10x True 1-Puffer	Hybaid AGS, Heidelberg
8-Hydroxy-Chinolin	Sigma, Deisenhofen
10x PCR- Puffer	Appligene, Heidelberg
Agarose	Seakem/Biozym, Oldendorf
Aqua-Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Bio Ladder TM 100 (100-1000bp)	Hybaid AGS, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Molecular Weight Marker 8 (0,013-1,11kbp)	Boehringer, Mannheim
dNTP-Mix	Hybaid AGS, Heidelberg
d N6 1:300 (pol (N) ₆ Sodium Salt)	Pharmacia Biotech, Freiburg
DTT	Hybaid AGS, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (70%; 100%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen; Serva, Heidelberg
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Guanidinthiocyanat	Sigma, Deisenhofen; Fluka, Buchs CH
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe
Mc Coy`5a, Nährmedium	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methylenblau	Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂	Hybaid AGS, Heidelberg
Mineralöl	Sigma , Deisenhofen

Na-acetat	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Na-Citrat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na-H ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na-HPO ₄	Merck, Darmstadt
N-Laurylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
PBS-Tabletten	Gibco, Karlsruhe
PCR- Primer	NAPS, Göttingen
Penicillin	Serva, Heidelberg
Reverse Transkriptase (M-MuLV)	Hybaid AGS, Heidelberg
RNase freies Wasser	Fluka Buchs CH
RNase-Inhibitor	Hybaid AGS, Heidelberg
RPMI 1640, Nährmedium	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Serva, Heidelberg
Taq-Polymerase	Hybaid AGS, Heidelberg
Trypsin	Biochrom KG, Berlin
Xylene cyanol	Sigma, Deisenhofen; Serva, Heidelberg

b) Radiorezeptorbindungsversuche und Proteinbestimmung:

(³ H)- U69593	NEN, Boston
(³ H)-DAMGO	NEN, Boston
(³ H)-DPDPE	NEN, Boston
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Aquasafe 300 plus	Zinsser, Frankfurt
Bacitracin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Bovines Serumalbumin(BSA)	Sigma, Deisenhofen
DAMGO	Bachem, Heidelberg
DPDPE	Bachem, Heidelberg
Folin	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Bachem, Heidelberg

PMSF	Roche Diagnostics, Mannheim
Polyethylenimin	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salze der Pufferlösungen	Merck, Darmstadt oder Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsininhibitor	Sigma, Deisenhofen
U 69 593	Sigma, Deisenhofen

3.3 Lösungen

a) Gentechnologie und Zellkultur:

2% Agaroselösung für DNA-Analyse:

Agarose; Laufpuffer für DNA-Analyse

2% Agaroselösung für RNA-Analyse:

Agarose, 0,01M Na-PO₄-Puffer

Denaturierungslösung, pH 6,5:

Glyoxal, 1M Na-PO₄-Puffer, DMSO

Extraktionspuffer, pH 7:

4M Guanidinthiocyanat; 25mM Na-Citrat; 0,5% N-Laurylsarcosin; 0,1 M Mercaptoethanol

Färbelösung:

0,5 M Na-Acetat, 0,04% Methyleneblau in 100% Essigsäure

Ladungspuffer für DNA-Analyse:

0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylene cyanol in 50% Glycerol (Glycerol+Wasser)

Ladungspuffer für RNA-Analyse:

0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylene cyanol in 50% Glycerol (Glycerol+Laufpuffer)

Laufpuffer für DNA-Analyse:

Laufpufferstocklösungs-Verdünnung: 1:50

Laufpuffer für RNA-Analyse:

0,01M Na-PO₄-Puffer

Laufpufferstocklösung für DNA-Analyse:

242 g Tris base, 57,1ml Eisessig und 18,61 g (0,5M) EDTA gelöst in 1l Wasser

Natrium-Phosphatpuffer, pH 6,5 (Na-PO₄-Puffer/ Laufpufferstocklösung für RNA-Analyse):

1M Na₂HPO₄; 1M Na-H₂PO₄

PBS-Lösung:

0,5 mM MgCl₂, 2,7mM KCl, 140mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄

PBS defic, pH 7,4:

2,7mM KCl, 140mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄

Transferpuffer, pH 7 (Na-Citratpuffer):

3M NaCl, 0,3M Na-Citrat

Trysin/EDTA-Lösung, pH 7,4:

0.02% EDTA und 0,05% Trypsin (1:50 verd. aus 2,5% Stocklösung) in PBS defic

b) Radiorezeptorbindungsversuche und Proteinbestimmung:

Folinlösung:

1 Teil Folin-Ciocalteus Phenolreagenz + 1 Teil a. bidest.

Homogenisationspuffer, pH 7,4 (HGP):

10mM Tris-HCl-Puffer; 320mM Saccharose; 0,01% Aprotinin; 1mM PMSF;
10µg/ ml Leupeptin; 50µg/ ml Bacitracin; 10µg/ml Trypsininhibitor

Inkubationspuffer, pH 7,4 (IKP):

0,5mM MgCl₂, 2,7mM KCl, 140mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 0,1% BSA, 0,01% Aprotinin; 1mM PMSF; 10µg/ ml Leupeptin; 50µg/ ml Bacitracin; 10µg/ml Trypsininhibitor

Kompensationspuffer (KOP):

1mM MgCl₂, 5,4mM KCl, 280mM NaCl, 3 mM KH₂PO₄, 16,2 mM Na₂HPO₄, 0,1% BSA, 0,02% Aprotinin; 2mM PMSF; 20µg/ ml Leupeptin; 100µg/ ml Bacitracin; 20µg/ml Trypsininhibitor

Lösung A:

2% Na₂CO₃; 0,4% NaOH, 0,16% Na-Tartrat (C₄H₅Na₂O₆·2H₂O), 1% SDS

Lösung B:

4% CuSO₄·5 H₂O

Membranpuffer, pH 7,4 (MP):

10mM Tris-HCl-Puffer; 320mM Saccharose

Waschpuffer 1 (WP1):

0,5mM MgCl₂, 2,7mM KCl, 140mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄

Waschpuffer 2 (WP2):

0,5mM MgCl₂, 2,7mM KCl, 140mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄
und 0,01% Triton X-100

3.4 Computerprogramme

LIGAND	Elsevier-Biosoft; Cambridge
ORIGIN 3,5	Microcal, USA
Word für Windows 2000	Microsoft, USA
Corel Draw	Corel, USA
Photoshop	Adobe, USA

4 METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden teilweise englische Bezeichnungen für die Methoden verwendet, weil deren schlagwortartige Charakterisierung damit besser gelang als mit deutschen Begriffen.

4.1 Zellkultur

4.1.1 Melanom- Zelllinien: G-361 und COLO 679

Die humane Melanomzelllinie G-361 bezogen wir von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) und die humane Melanomzelllinie COLO 679 von der „European Collection of Cell Cultures“, Salisbury, UK (ECACC).

4.1.2 Kultivierung

Zellen der Melanomzelllinie G-361 wurden in McCoy´s 5A Medium und Zellen der Melanomzelllinie COLO 679 wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100U/ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert.

Die G-361-Zellen wurden sechs Tage vor dem Experiment mit einer Dichte von 250000 Zellen in 20 ml Medium in einer Zellkulturschale mit 145 mm Durchmesser ausgesät. Es wurden je 10 ml Medium an den zwei Tagen vor dem Versuch den Zellkulturen zusätzlich zugegeben.

Am Versuchstag wurden die Zellen einer Zellkulturschale gezählt. Dazu wurden nach Abnahme des Kulturmediums 4 ml Trypsin/EDTA- Lösung auf die in einer Zellkulturschale gezüchteten Zellen gegeben. Es folgte eine dreiminütige Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurden die abgelösten Zellen resuspendiert und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Im Durchschnitt wurden 3×10^6 Zellen in einem Mediumvolumen von 4 ml bestimmt.

4.2 Gentechnologische Methoden: Suche nach mRNA von Opioidrezeptorgenen in Melanomzelllinien mittels RT- PCR

4.2.1 RNA- Extraktion

Zuerst wurde das Zellkulturmedium aus den Zellkulturschalen abpipettiert und die Zellen mit 5ml PBS-Lösung gewaschen.

Durch Zugabe von 1ml Extraktionspuffer (4M Guanidinthiocyanat, 25mM Na-Citrat, pH 7, 0,5% N-Laurylsarcosin, 0,1 M Mercaptoethanol) wurde die Lyse der Zellen und die RNA-Denaturierung erreicht. Es folgte eine Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde das Gemisch aus jeder Zellkulturschale in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und jeder Probe 70µl 2 M Na-acetat (pH 4), 140µl Chloroform-Isoamylalkohol (49+1) und 0,7 ml Phenol zur Proteinfällung zugegeben. Die Eppendorfgefäße wurden gevortext, 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei 11200 U und 15°C 30 min im Winkelrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß abpipettiert, und die Proteine erneut mit 0,7 ml Chloroform-Isoamylalkohol (49+1) ausgefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 11200 U und 15°C über 30 min wurde dieser Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert, mit 1 ml 100%-igem Ethanol versetzt und zur Fällung der Nukleinsäuren eine Stunde lang bei – 70°C gelagert.

Durch Zentrifugation der Proben bei 11200 U und 4°C für 30 min wurde die RNA abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die RNA mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 11200 U über 20 min und darauffolgendem Dekantieren des Ethanols wurden die Proben im Heizbock bei 37°C getrocknet.

Das Nukleinsäurepellet wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst, gevortext, kurz abzentrifugiert und dann für 10 min im Wasserbad bei 60°C inkubiert.

Die RNA-Präparate konnten gleich weiterbehandelt oder bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

4.2.2 Überprüfung der extrahierten Gesamt- RNA

6 µl der extrahierten RNA-Probe wurden mit 12 µl einer Denaturierungslösung (Glyoxal, 1M NaPO₄(pH 6,5), DMSO) versetzt, eine Stunde bei 50°C denaturiert und dann auf Eis gestellt.

Nach Zugabe von 2 µl Ladungspuffer wurden die Proben auf einem 2% Agarosegel (Agarose gelöst in Laufpuffer:0,01 M Na-PO₄ , pH 6.5) bei 70 V/cm 2½ Stunden aufgetrennt und die RNA anschließend mit Transferpuffer (3M NaCl, 0,3 M Na-Citrat), pH 7, auf eine Nylon-Membran (Nytran NY 13 N, Schleicher und Schüll) geblottet. Der RNA-Transfer vollzog sich über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Membran getrocknet, in 1 M Essigsäure bei Raumtemperatur 15 min inkubiert und danach in Färbelösung (0,5 M Na-Acetat, 0,04% Methylenblau in 100% Essigsäure) angefärbt. Es folgte die Entfärbung in Wasser und die Betrachtung der Blotting Membran unter Tageslicht.

4.2.3 Transkription extrahierter RNA in DNA

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden folgende Komponenten gemischt: 3,8 µl Aqua dest., 2 µl 10x TRUE 1-Puffer, 4,8 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,4 µl 500 mM DTT und 1 µl dN₆-Primer 1:300.

Dieser Mix wurde mit 4 µl (1-3µg) der Gesamt-RNA-Probe beziehungsweise in einem Ansatz mit 4 µl Wasser (RT-blank) versetzt, zur Denaturierung der mRNA 3 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Danach wurden sowohl dem RNA- als auch dem Blank-Ansatz 0,5 µl RNase-Inhibitor und 1,5 µl Reverse Transkriptase (M-MuLV, Fa. AGS, oder Superscript 2, Fa. Gibco BRL) zugegeben. Einem RNA-Ansatz wurde anstelle der Reversen Transkriptase 1,5 µl Wasser (Probe ohne Enzym zur Kontrolle einer eventuellen Kontamination) zugesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug dann 20 µl.

Nach 10 min Vorinkubation bei 18°C erfolgte die cDNA-Synthese bei 42°C in zwei Stunden.

Anschließend konnten die RNA-Transkripte (cDNA) sofort für eine PCR-Reaktion verwendet oder bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren werden.

4.2.4 PCR

4.2.4.1 cDNA- Sequenz des humanen δ - Opioidrezeptors

Der menschliche δ - Opioidrezeptor wurde zeitgleich durch KNAPP et al. (1994) und SIMONIN et al. (1994) geklont. .Der kodierende Bereich des δ - Opioidrezeptors ist über drei Exons verteilt, die wiederum durch zwei Introns voneinander getrennt sind.

```
1  ATGGAACCGG CCCCCTCCGC CGGCGCCGAG CTGCAGCCCC CGCTCTTCGC CAACGCCTCG
61 GACGCCTACC CTAGCGCCTG CCCCAGCGCT GGCGCCAATG CGTCGGGGCC GCCAGGCGCG
121 CGGAGCGCCT CGTCCCTCGC CCTGGCAATC GCCATCACCG CGCTCTACTC GGCCGTGTGC
181 GCCGTGGGGC TGCTGGGCAA CGTGCTTGTC ATGTTTCGGCA TCGTCCGGTA CACTAAGATG
241 AAGACGGCCA CCAACATCTA CATCTTCAAC CTGGCCTTAG CCGATGCGCT GGCCACCAGC
301 ACGCTGCCTT TCCAGAGTGC CAAGTACCTG ATGGAGACGT GGCCCTTCGG CGAGCTGCTC
361 TGCAAGGCTG TGCTCTCCAT CGACTACTAC AATATGTTCA CCAGCATCTT CACGCTCACC
421 ATGATGAGTG TTGACCGCTA CATCGCTGTC TGCCACCCTG TCAAGGCCCT GGACTTCCGC
481 ACGCCTGCCA AGGCCAAGCT GATCAACATC TGTATCTGGG TCCTGGCCTC AGGCGTTGGC
541 GTGCCCATCA TGGTCATGGC TGTGACCCGT CCCCGGGACG GGGCAGTGGT GTGCATGCTC
601 CAGTTCCCCA GCCCCAGCTG GTACTGGGAC ACGGTGACCA AGATCTGCGT GTTCTCTTC
661 GCCTTCGTGG TGCCCATCCT CATCATCACC GTGTGCTATG GCCTCATGCT GCTGCGCCTG
721 CGCAGTGTGC GCCTGCTGTC GGGCTCCAAG GAGAAGGACC GCAGCCTGCG GCGCATCAGC
781 CGCATGGTGC TGGTGGTTGT GGGCGCCTTC GTGGTGTGTT GGGCGCCCAT CCACATCTTC
841 GTCATCGTCT GGACGCTGGT GGACATCGAC CGGCGCGACC CGCTGGTGGT GGCTGCGCTG
901 CACCTGTGCA TCGCGCTGGG TTACGCCAAT AGCAGCCTCA ACCCCGTGCT CTACGCTTTC
961 CTCGACGAGA ACTTCAAGCG CTGCTTCCGC CAGCTCTGCC GCAAGCCCTG CGGCCGCCCA
1021 GACCCAGCA GCTTCAGCCG CGCCCAGCAA GCCACGGCCC GCGAGCGTGT CACCGCCTGC
1081 ACCCCGTCCG ATGGTCCCGG CGGTGGCGCT GCCGCCTGAC CAGCCATCCG GCCCCAGAG
1141 CGCCCCTCCC TAGTGACCCG GAGGCCACAT GAGTCCCAGT GGGAGGCGCG AGCCATGATG
1201 TGGAGTGGGG CAGTAGAAGG TCGGAGGCTT GGGACCGCCA GATGGGGCCT CTGTTTCGGA
1261 GACGGGACCG GGCCGCTAGA TGGGCATGGG GTGGGCCTCT GGTTTGGGGC GAGGCAGAGG
1321 ACAGATCAAT GCGCAGTGC CTCTGGTCTG GGTGCCCCCG TCCACGGCTC TAGGTGGGGC
1381 GGGAAAGCCA GTGACTCCAG GAGAGGAGCG GGACCTGTGG CTCTACAAC TACTCCTTAA
1441 ACAGGGCATC TCCAGGAAGG CGGGGCTTCA ACCTTGAGAC AGCTTCGGTT TCTAACTTGG
1501 AGCCGGACTT TCGGAGTTGG GGGGTCCGGG GCCCCGAGG AGCCTGCGCT GCTCCTGGCT
1561 CACAGCGCTC CGGGCGAGGA GAGCGGGCGG ACCGGGGGGC TGGGCCGGTG CGGGCGGCGA
1621 GGCAGGCGGA CGAGGCGCAG AGACAGCGGG GCGGCCGGGG CGCGGCACGC GCGGGTCCG
1681 GGCCGGCCTC TGCTTGGCG CTCCCCTCGC GTCGGATCCC CGCGCCCAGG CAGCCGGTGG
1741 AGAGGGACGC GCGGACGCC GGCAGCC
```

Abbildung 2: cDNA- Sequenz des humanen δ - Opioidrezeptors

Die Sequenz umfasst 1767 bp (Genidentifikationsnummer 27734716, modifiziert nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>). Start und Stopkodon sind fettgedruckt abgebildet. Die Nummerierung der Basen ist so gewählt, dass die Basenposition 1 dem ersten Nukleotid des Startcodons ATG entspricht.

4.2.4.2 Eingesetzte Primer

Da die extrahierte RNA mit genomischer DNA kontaminiert sein konnte, hätte letztere anstelle der cDNA amplifiziert werden können.

Um eine Fehlinterpretation der PCR- Ergebnisse infolge genomischer Amplifikation auszuschließen, wurden Primerpaare ausgewählt, die mindestens ein Intron überspannten.

Es wurden folgende drei Primerpaare für unsere PCR-Reaktionen verwendet (die Nummerierung der Basen ist so gewählt, dass die Basenposition 1 dem ersten Nukleotid des Startcodons ATG entspricht):

Primer 1: 5`- CAA GGC CCT GGA CTT CCG CA ; bp Position 462- 481 der δ - Opioidrezeptor- cDNA

Primer 2: 5`- TCC CAA GCC TCC GAC CTT CTA CTG; bp Position 1234- 1211 des komplementären Stranges der δ -Opioidrezeptor- cDNA

Die „annealing“ Temperatur für dieses Primerpaar betrug 66°C.

Primer 3: 5`- GCC AAG CTG ATC AAC ATC TG ; bp Position 493- 512 der δ - Opioidrezeptor- cDNA

Primer 4: 5`- AAG CAG CGC TTG AAG TTC TC ; bp Position 986- 967 des komplementären Stranges der δ -Opioidrezeptor- cDNA

Die „annealing“ Temperatur für dieses Primerpaar betrug 58°C.

Primer 5: 5`- GTT GGC GTG CCC ATC ATG GT ; bp Position 535- 554 der δ - Opioidrezeptor- cDNA

Primer 6: 5`- GAA GTT CTC GTC GAG GAA AGC GTA G ; bp Position 975- 951 des komplementären Stranges der δ -Opioidrezeptor- cDNA

Die „annealing“ Temperatur für dieses Primerpaar betrug 68°C.

Das Primerpaar 5/6 wurde auch für die Reamplifikation der Amplifikate des Primerpaars 3/4 eingesetzt.

Eine schematische Darstellung der Primerpositionen ist in Abbildung 3 zu sehen.

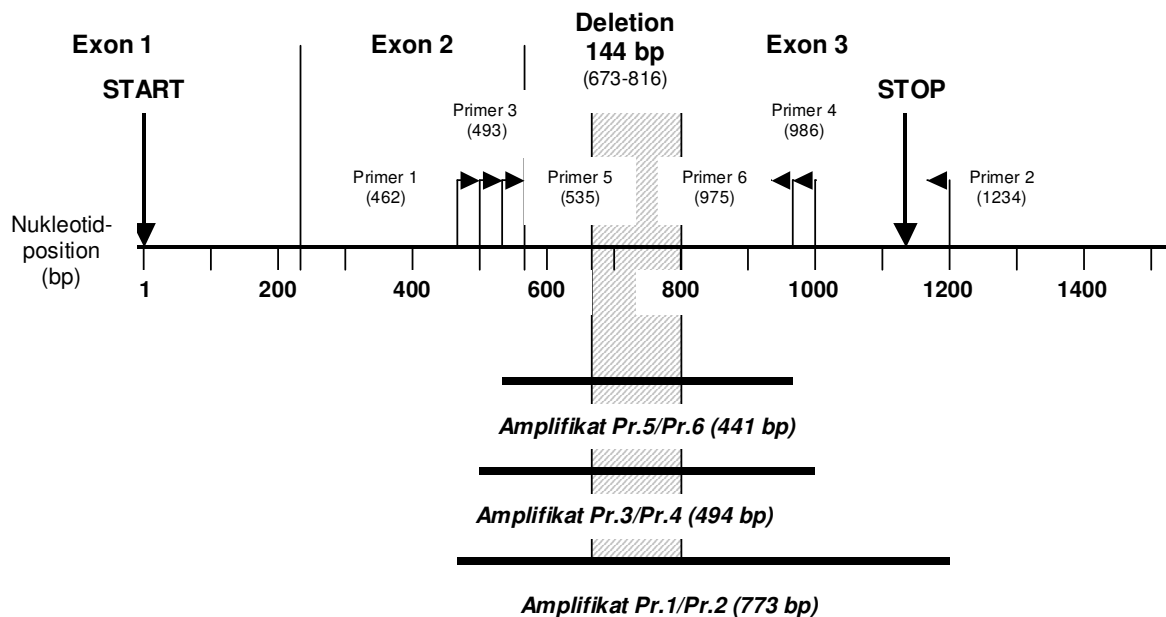


Abbildung 3: Schematische Darstellung der δ - Opioidrezeptor- cDNA mit den Primerpositionen

Die Abbildung zeigt die δ - Opioidrezeptor- cDNA mit Exon 1, 2 und 3 sowie die Primerpositionen und die Positionen und Längen der durch die Primerpaare amplifizierten cDNA- Fragmente (PCR- Produkte). Ebenfalls angegeben ist die Basenpaardeletion, welche die cDNA einer im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen δ - Opioidrezeptorvariante enthält. Die Nummerierung der Basen ist so gewählt, dass die Basenposition 1 dem ersten Nukleotid des Startcodons ATG entspricht.

4.2.4.3 Durchführung der PCR

Für alle PCR- Reaktionen wurde Taq-Polymerase der Firma Hybaid AGS und der PCR-Puffer von Appligene, Heidelberg, verwendet. Die PCR- Reaktionen wurden im Gene Amplification PCR System 2400 der Firma Perkin Elmer bzw. im PCR- Cycler „Crocodile“ der Firma Appligene durchgeführt.

a) Amplifikation

Einzelsträngige cDNA diente als Matrize für die Amplifikation mittels PCR. Da der PCR- Reaktion eine Umschreibung von RNA in einzelsträngige cDNA mittels einer Reversen Transkriptase (RT) vorausging, spricht man hier von einer RT-PCR.

Für die PCR wurden 4 µl cDNA- Lösung eingesetzt. Nach Zugabe eines Reaktionsgemisches in ein 0,5ml Eppendorfgefäß betrug das gesamte PCR- Volumen 20 µl. Es wurden folgende Komponenten gemischt: 11 µl Aqua dest., 1,8 µl 10x AGS- Puffer, 0,64 µl 25 mM MgCl₂ , 0,4 µl 10 mM dNTP-Mix, je 1 µl Primerstocklösung (10pmol/µl) und 0,16 µl Taq-Polymerase- Lösung.

Es wurden zusätzlich zwei PCR- Blanks ohne DNA- Matrize angesetzt.

Die Amplifikation des cDNA- Fragmentes erfolgte unter folgenden Zyklusbedingungen: 3 min Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen der folgenden Sequenz: 50s Denaturierung bei 95°C, 90s „Primer-Annealing“ (Temperatur für die einzelnen Primerpaare siehe unter 4.2.4.2) und 3 bis 6min (abhängig von der Länge des PCR-Produkts) Synthese bei 72°C. Abgeschlossen wurde die PCR mit jeweils 10 min Inkubation bei 72°C.

b) Reamplifikation

Zur Reamplifikation wurde das mittels Amplifikation gewonnene PCR- Produkt zunächst 1:1000 verdünnt und dann einer erneuten PCR mittels eines anderen Primerpaares unterzogen. Dieses Primerpaar lag innerhalb des PCR- Produktes aus der ersten Amplifikation („nested PCR“).

Folgende Komponenten wurden hierzu in einem 0,5ml Eppendorfgefäß zu einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt: 33,75 µl Aqua dest., 5µl 10x AGS-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂ , 1 µl 10 mM dNTP-Mix, je 2,5 µl 10pmol/µl Primer, 0,24 µl Taq- Polymerase und 1 µl des PCR- Produktes (1:1000) aus der ersten Amplifikation bzw. 1 µl Wasser für den PCR- Blank.

Ansonsten entsprachen die PCR- Bedingungen der Reamplifikation denen der ersten Amplifikation.

4.2.5 Gelelektrophoretische Darstellung der PCR- Produkte

10µl von jedem PCR- Produkt wurden mit 2 µl Ladungspuffer versetzt und auf einem nicht- denaturierenden 2%igem Agarosegel (Agarose gelöst in Laufpuffer: Tris base, Eisessig, 0,5 M EDTA) bei 90V eine ½ Stunde aufgetrennt .

Zur Analyse des PCR-Amplifikats wurde ein DNA- Längenmarker der Firma Hybaid AGS (Bio Ladder TM100) neben den PCR-Proben auf dem Gel aufgetragen und mit aufgetrennt.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für eine ½ Stunde in eine 1:1000 verdünnte Ethidiumbromidlösung (Stocklösung: 0,5 mg/ml in Aqua dest.) gelegt, um die aufgetrennten Amplifikate darzustellen.

Die Banden wurden unter einer UV- Lampe betrachtet, fotografiert und analysiert.

4.3 Bindungsversuche: Suche nach Opioidrezeptoren auf Melanozytenmembranen der Melanomzelllinie G-361 im Radiorezeptor-Bindungsversuch

4.3.1 Liganden: markierte und nichtmarkierte Opioidrezeptorliganden

4.3.1.1 (³H)–DPDPE, (³H)-DAMGO, (³H)-U 69593 (Tracer)

Für unsere Bindungsversuche wurden Tritium-markierte Opioidrezeptorliganden eingesetzt.

Wir verwendeten als δ- Opioidrezeptorliganden (³H)–DPDPE (cyclic[D-Pen²,D-Pen⁵]-Enkephalin), als µ- Opioidrezeptorliganden (³H)-DAMGO ([D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵]-Enkephalin) und als κ-Opioidrezeptorliganden (³H)-U 69593 ((5α, 7α, 8β)-(+)-N-Methyl-N-(7-[1-Pyrrolidiny]-1-Oxaspiro[4,5] Dec-8-yl) – Benzeneacetamide).

Die spezifische Aktivität des (³H)–DPDPE betrug 45 Ci/ mmol, die für (³H)-DAMGO 54,5 Ci/ mmol und diejenige für (³H)- U 69593 39,7 Ci/ mmol.

Die Effizienz der Bestimmung der Radioaktivität im Beta- Counter betrug etwa 45%.

Für den Einsatz im Bindungsversuch musste der Tracer mit Inkubationspuffer verdünnt werden.

In 10 µl der verdünnten (³H)–DPDPE- Lösung wurden dann 22 000 dpm gemessen.

Im Inkubationsansatz entsprach das einer Konzentration von 2,2 nM.

(³H)-DAMGO wurde in einer Konzentration von 1,8 nM und (³H)-U 69593 in einer Konzentration von 2,5 nM eingesetzt.

4.3.1.2 DPDPE, DAMGO und U 69593 (Verdränger)

Die nicht radioaktiv markierten Opioidliganden DPDPE und DAMGO wurden von Bachem, Heidelberg und U 69593 von SIGMA, Deisenhofen bezogen. Sie dienen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung der markierten Liganden in den Radiorezeptor- Bindungsversuchen und wurden dort in einer Konzentration von 10⁻⁴M eingesetzt. Im RBA- Ansatz entsprach dies einer Konzentration von 2x 10⁻⁵M.

DPDPE wurde außerdem als Verdränger in verschiedenen Konzentrationen den RBA- Ansätzen der Sättigungsexperimente zugegeben.

4.3.2 Binder: Melanozytenmembranen der Melanomzelllinie G-361

4.3.2.1 Herstellung von Membransuspensionen

Die Membranpräparation stützt sich auf die von REPP et al., (1990), WHEATLEY et al., (1997) und WOODS et al., (1997) beschriebenen Methoden mit geringen Abweichungen.

Nach Abnahme des Kulturmediums von den bei 37°C in 145mm Durchmesser– Petrischalen gezüchteten G-361- Melanomzellen, erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte bei 4°C.

Als erstes wurden die G-361-Zellen zweimal mit 7 ml Membranpuffer gewaschen. Die Waschzeit betrug für eine Zellkulturschale weniger als eine Minute. Nach Zugabe von 1 ml Homogenisationspuffer wurden die Zellen mit einem Teflon-Schaber von den Petrischalen abgekratzt und in einen Glashomogenisationskolben transferiert. Es

wurde versucht, die noch an der Schale klebenden Zellen mit 1,5 ml Homogenisationspuffer abzulösen und den anderen beizufügen. Dieser Ablösungsprozess dauerte ungefähr zwei Minuten pro Zellkulturschale.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend homogenisiert. Dazu wurde ein mit 800 Umdrehungen pro Minute rotierender Teflonstempel 20 mal in dem Glaskolben auf- und abgesenkt.

Das Homogenat wurde in 50 ml Sarstedtröhrchen umgefüllt und dann für 5min bei 200 x g (in einer Sorvall- Zentrifuge mit SS34- Rotor) zentrifugiert, um Zellkerne und größere Zelltrümmer von den Membranen abzutrennen. Der Membranen enthaltende Überstand wurde in 13 ml Sarstedtröhrchen pipettiert und einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 38000 x g für 20 min unterzogen.

Der Überstand wurde dekantiert und das Membranen enthaltende Pellet in Homogenisationspuffer resuspendiert und erneut für 20 min bei 38000 x g zentrifugiert.

Das entstandene Membranpellet wurde (zu Proteinkonzentrationen von etwa 12mg/ml) in Inkubationspuffer resuspendiert und anschließend entweder sofort in den Radioligand-Bindungsversuchen eingesetzt oder bis zur Weiterverarbeitung bei – 80°C gelagert.

Es wurden Membranen von 3×10^7 Zellen jeweils für einen Ansatz eingesetzt.

4.3.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteingehaltbestimmung der Membransuspensionen erfolgte nach der Methode von LOWRY et al., 1951.

Dazu wurden zunächst die Lösungen A und B angesetzt und aus Membransuspension- Resten Verdünnungen in Inkubationspuffer (1:50, 1:100, 1:200; 1:400) hergestellt. Jedem Membranverdünnungsansatz (200 µl) wurden 1000µl eines frisch angesetzten A+B Gemisches (100 Teile Lösung A+ 1 Teil Lösung B) zugegeben und dann für 10 min geschüttelt. Nach Zugabe von 100 µl Folinlösung wurden die Proben kurz geschüttelt und danach für 30 min stehen gelassen.

Nach der Inkubation wurde die Extinktion der Proben in einem Photometer bei 750 nm gegen einen Leerwert gemessen. (IKP- Extinktion gemessen und abgezogen)

Daneben wurden Proteinverdünnungen (Ovalbumin) von 2,5 µg/ml bis 500µg/ml für eine Standardkurve angesetzt und ihre Extinktion entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise bestimmt.

Die bei 750nm gemessene Extinktion wurde dann gegen die Ovalbuminkonzentration (µg/ml) aufgetragen. Anhand dieser Standardkurve konnten den Extinktionswerten der Membranverdünnungen Proteinkonzentrationen zugeordnet werden.

Es ergab sich eine Proteinkonzentration zwischen 11 und 14 mg/ ml für die in den Radiorezeptor- Bindungsversuchen eingesetzten Membransuspensionen.

4.3.3 Durchführung des Bindungsversuchs

Der Nachweis von Opioidrezeptoren auf Melanozytenmembranen erfolgte in einem Radiorezeptorbindungsversuch. Das Prinzip besteht darin, daß ein radioaktiv markierter Ligand, z.B. Opioidligand, mit einem spezifischen Interaktionspartner, in unserem Fall mit einem Rezeptor (Zellmembranen), inkubiert wird. Nach Abtrennung des nicht gebundenen Liganden erfolgt die Messung der gebundenen Aktivität.

Der im folgenden beschriebene Membran-Bindungsversuch beruht im wesentlichen auf den von REPP et al. (1990), SHAHABI et al. (1992), WOODS et al. (1997) und WHEATLEY et al. (1997) beschriebenen Filtrationsassays mit geringfügigen Modifikationen bzw. Ergänzungen.

4.3.3.1 Inkubationsansätze

Das Inkubationsvolumen betrug einheitlich 100 µl pro Ansatz. Die einzelnen Komponenten wurden gemäß dem in Tabelle 1 angegebenen Schema in 1,5 ml Eppendorfgefäße auf Eis einpipettiert.

Anschließend wurden die Ansätze auf einem Eppendorf- Rüttler ca. 10 sec. durchmischt.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 2 Stunden auf Eis. Während dieser Zeit wurden die Proben alle 20 min für 10 sek. auf den Rüttler gestellt.

Bei den kinetischen Experimenten haben die Inkubationszeiten entsprechend späteren Angaben variiert.

Die Bindungsversuche wurden mit folgenden Ansätzen durchgeführt:

- Kontrollwert (Bo/KON):
Ermittlung der Gesamtbindung (unspezifische + spezifische Bindung) der verschiedenen radioaktiv markierten Opioidrezeptorliganden an die G361-Membranen in Abwesenheit von Inhibitoren.
- Blankwert (BL):
Erfassung der Radioaktivität im Filter, die nicht durch Bindung von radioaktiv markierten Opioidrezeptorliganden an die Membranen (Rezeptoren) erklärt werden konnte.
- Verdrängungswert:
Ermöglichung der Bestimmung der spezifischen Bindung der radioaktiv markierten Opioidrezeptorliganden an die G-361-Membranen durch Bestimmung ihrer unspezifischen Bindung.
Dazu wurde nicht radioaktiv markierter Ligand als Verdränger (Totalverdrängungswert, TVD) im Überschuß ($2 \times 10^{-5} \text{M}$) dem Ansatz zugegeben und die nicht verdrängbare (= unspezifische) Bindung gemessen. Der verdrängte Anteil an der Gesamtbindung B_0 entsprach der spezifischen Bindung.
Unter den üblichen Bedingungen unterschieden sich die Totalverdrängungswerte nur unwesentlich von den Blankwerten.
In den Sättigungsexperimenten wurde nicht radioaktiv markierter Ligand in Konzentration zwischen $2 \times 10^{-5} \text{M}$ und $2 \times 10^{-10} \text{M}$ eingesetzt (VD).
- Ct-Wert (CT):
Bestimmung der Gesamtmenge an Radioaktivität im Meßansatz.
Die Ansätze enthielten nur Inkubationspuffer und radioaktiv markierten Liganden. Die Ansätze wurden direkt nach der Inkubation ohne Filtration in Szintillationsgefäße einpipettiert. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte dann zusammen mit den filtrierten Proben

Komponenten	B ₀	BL	VD	CT
Membransuspension (in Inkubationspuffer)	50µl	-	50µl	-
Inkubationspuffer	-	50µl	-	90µl
Verdränger in 0,1% BSA-Lösung (nicht radioaktiv markierter Opioidrezeptorligand)	-	-	20µl	-
0,1% BSA-Lösung	20µl	20µl	-	-
Kompensationspuffer	20µl	20µl	20µl	-
Tracer in IKP (Tritium- markierter Opioidrezeptorligand)	10µl	10µl	10µl	10µl

Tabelle 1: Inkubationsansätze des Radiorezeptor-Bindungsversuchs

(Verdränger: $2 \times 10^{-5} \text{M}$ - $2 \times 10^{-10} \text{M}$; Tracer: 2,2nM; Membranen aus 3×10^7 Zellen/Ansatz)

4.3.3.2 Trennmethode: Filtration

Zur Trennung von membrangebundenen und freien (^3H)- Opioidrezeptorliganden wurde eine Vakuumfiltration durchgeführt; hierbei wurden die Proben nach Ablauf der Inkubationszeit auf die Glasfaserfilter (GFB) einer Filtrationskammer aufgebracht und mittels Vakuum in die Filtrationskammer gesaugt.

Die Glasfaserfilter wurden drei Stunden vor der Filtration der Proben auf die Filterträger der Filtrationskammer platziert und während dieser drei Stunden alle 45 min mit 1ml 0,1% Polyethyleniminlösung bei Raumtemperatur benetzt.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde auf alle Filter 3 ml Waschpuffer 1 aufgegeben und abfiltriert. Dann wurde zu den Ansätzen 1 ml eiskalter Waschpuffer 1 pipettiert,

das Eppendorfgefäß geschüttelt und der Inhalt auf den Glasfaserfilter dekantiert. Danach wurde sofort Vakuum in die Kammer gelegt und filtriert. Dieser Schritt wurde wiederholt.

Beim nächsten Schritt wurde der zugegebene Waschpuffer ohne Schütteln gleich auf den Filter gekippt und abfiltriert. Die Filter wurden dann innerhalb weniger Sekunden zweimal mit je 3ml eiskaltem Waschpuffer 2 gewaschen. Die geschilderte Prozedur wurde für jeden Ansatz getrennt durchgeführt.

4.3.3.3 Bestimmung der Radioaktivität

Die Glasfaserfilter wurden in 20 ml Szintillationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 2 ml 0,1% Triton X-100 über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rundschtüttler geschüttelt. Nach Aufgabe von 10ml Aquasafe 300 plus (Zinsser, Frankfurt) wurden die Proben erneut einen Tag lang bei RT geschüttelt.

Die aus den Filtern herausgelöste Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeits-Szintillations- Zähler (Beta-Counter) bestimmt.

Jede Probe wurde 10 min lang gemessen. Die Eichung des Gerätes erlaubte die Bestimmung der Radioaktivität in dpm.

4.3.4 Auswertung der Bindungsdaten

Zur Auswertung der im Beta- Counter gemessenen Radioaktivität wurden verschiedene Rechenoperationen durchgeführt.

Die Gesamtbindung B errechnete sich als Differenz aus dem Kontrollwert Bo (Bo= B_S+B_U+BL) und dem Blankwert BL:

$$B = B_o - B_L \text{ (dpm)}$$

Die unspezifische Bindung B_u errechnete sich aus der Differenz des Totalverdrängerwertes TVD und des Blankwertes BL:

$$B_u = \text{TVD} - \text{BL} \text{ (dpm)}$$

Die spezifische Bindung B_s errechnete sich aus der Differenz der Gesamtbindung B und der unspezifischen Bindung B_u

$$B_s = B - B_u \text{ (dpm)}$$

In der Regel wurde die spezifische Bindung B_s als prozentualer Anteil $B_{s\%}$ der in den Ansätzen enthaltenen Gesamtmenge an Radioaktivität (CT –Wert) ausgedrückt:

$$B_{s\%} = B_s \times 100 / (\text{CT} - \text{BL}) \text{ (in \% der Gesamtaktivität im Ansatz)}$$

Für Konkurrenzexperimente wurde die im Verdrängungsansatz gemessene Bindung (VD- Wert) als prozentualer Anteil B_{VD} der Gesamtbindung B dargestellt:

$$B_{VD} = (\text{VD} - \text{BL}) \times 100 / B \quad \text{(in \% des Ansatzes ohne Verdränger)}$$

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

Es handelte sich meistens um Dreifachwerte aus drei Versuchen. Einige Ergebnisse wurden auch nur anhand eines Einzelversuchs dargestellt.

4.4 Bindung des Opioidrezeptorliganden (³H)– DPDPE an δ- Opioidrezeptoren: Charakterisierung

Die Interaktion eines Liganden mit einer Bindungsstelle kann nur dann als spezifisch bezeichnet werden, wenn sie den Kriterien einer Rezeptor-Liganden-Bindung genügt (BURT,1978).

Zur Charakterisierung der Bindung wurden Zeitabhängigkeit, Reversibilität und Sättigbarkeit der Bindung von (³H)–DPDPE an Membranen der G-361-Melanomzelllinie untersucht. Weiterhin wurden die molekularkinetischen Bindungsparameter K_D und B_{max} für die Interaktion von (³H)–DPDPE mit den δ-Opioidrezeptoren bestimmt.

4.4.1 Zeitabhängigkeit

Diese Versuche dienten der Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Bindung von (³H)–DPDPE an δ-Opioidrezeptoren.

Eine spezifische Bindung wäre durch eine hyperbolisch ansteigende Kurve gekennzeichnet. Die Ausbildung eines Plateaus zeigt, dass die Bindungsreaktion einen Gleichgewichtszustand erreicht hat.

Die Inkubationszeit für die Bindungsversuche wurde hieraus abgeleitet. Sie sollte mindestens der Zeit entsprechen, die zur Ausbildung des Gleichgewichtszustandes benötigt wird.

Es wurden die RBA- Ansätze, wie unter 4.3.3.1 beschrieben, erstellt und die Inkubation in verschiedenen Zeitabständen von 10 min bis 180 min (10, 30, 60, 120 und 180 min) durchgeführt.

4.4.2 Reversibilität

Die Reversibilität der Bindung im Rahmen eines dynamischen Reaktionsgleichgewichtes ist ein weiteres Kriterium für das Vorliegen einer spezifischen Bindung.

Es wurde geprüft, ob nach Einstellung des Bindungsgleichgewichtes (^3H)-DPDPE von den δ - Opioidrezeptoren durch nicht radioaktiv markiertes DPDPE im Überschuß wieder vollständig verdrängbar war.

Es wurde ein RBA nach 4.3.3 durchgeführt, in welchem die Inkubationsansätze für drei Stunden inkubiert wurden.

Hiernach wurde nicht radioaktiv markiertes DPDPE (10^{-4}M) den Inkubaten zugesetzt und die Verdrängung des markierten DPDPE nach unterschiedlich langer Zeit (nach 10, 30, 60, 120, und 180 min) bestimmt.

4.4.3 Sättigbarkeit

Eine spezifische Bindung ist charakterisiert durch ihre Sättigbarkeit.

Das bedeutet, dass spezifische Bindungsstellen nur in endlicher Anzahl vorliegen können. Unspezifische Bindungsstellen hingegen liegen in unendlich hoher Anzahl vor und sind deshalb nicht sättigbar.

Um zu prüfen, ob die Bindung von (^3H)-DPDPE sättigbar war, wurden elf Inkubationsansätze mit steigenden Konzentrationen des nicht radioaktiv markierten DPDPE (von 2×10^{-5} bis 2×10^{-10} M) erstellt, wobei ansonsten ihre Zusammensetzung nicht verändert wurde. Jeder Inkubationsansatz enthielt die gleiche Menge an radioaktiv markiertem Liganden. Da der unmarkierte Ligand im Überschuß vorlag, sollte es zu einer Verdrängung des Radioliganden von seiner Bindungsstelle kommen.

Mit steigender Konzentration des DPDPE nimmt erstens der Anteil an (^3H)-DPDPE an der Gesamtmenge des Liganden ab. Je höher zweitens die Gesamtkonzentration des Liganden wird, desto geringer wird der Anteil an gebundenem Liganden.

Wenn steigende Konzentrationen des unmarkierten Liganden keine weitere Verdrängung des Radioliganden von der Bindungsstelle bewirken können, ist eine

Absättigung der Bindungsstellen anzunehmen, was wiederum bedeutet, dass die spezifischen Bindungsstellen in endlicher Zahl vorliegen.

4.4.4 Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{MAX}

Eine spezifische Bindung wird außerdem in der Regel durch eine hohe Affinität des Liganden zu seiner Bindungsstelle gekennzeichnet. Je höher die Affinität, desto niedriger die K_D .

Um dieses Kriterium für die Interaktion des (3H)–DPDPE mit den δ - Opioidrezeptoren zu prüfen, wurde die Dissoziationskonstante K_D sowie die Bindungskapazität B_{Max} (maximal erreichbare Bindung des Liganden/ Opioidrezeptorenkonzentration) aus den Daten der Sättigungsexperimente mit Hilfe der Computerprogramme LIGAND (MUNSON and RODBARD,1980) und ORIGIN ermittelt.

Bei der Datenauswertung über LIGAND wurden mittels eines iterativen Kurvenanpassungsprogramms K_D und B_{Max} für ein und mehrere Bindungsstellen unter Berücksichtigung statistischer Signifikanzen bestimmt.

Bei der Datenauswertung über ORIGIN wurde zunächst eine Scatchard-Analyse durchgeführt. Ausgehend von der Scatchard- Gleichung wurde ein Scatchard-Diagramm erstellt, wobei der Quotient aus gebundenem zu freiem Liganden gegen die Konzentration des gebundenen Liganden aufgetragen wird (SCATCHARD, 1949).

Aus den erstellten Scatchard-Diagrammen wurde von Hand eine Kurvenanpassung an die Punkte vorgenommen und aus den hervorgehenden Tangenten ohne Berücksichtigung statistischer Signifikanzen K_D als negativer Reziprokwert der Geradensteigung ($- 1/ K_D$) und B_{Max} als Schnittpunkt der Tangente mit der Abszisse bestimmt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Nachweis von δ - Opioidrezeptor mRNA in Melanomzelllinien

Es wurden in zwei humanen Melanomzelllinien, G-361 und COLO 679, mittels RT-PCR nach m-RNA des δ - Opioidrezeptors gesucht.

5.1.1 Nachweis von δ - Opioidrezeptor mRNA in der Melanomzelllinie G-361

Reverse Transkription von extrahierter Total- RNA und PCR- Reaktionen mit zwei verschiedenen Primerpaaren wurden, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt.

Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurden bei den PCR- Reaktionen Proben mitgeführt, mit denen keine reverse Transkription durchgeführt worden war.

5.1.1.1 Amplifikation des cDNA- Fragments 462 bis 1234 des δ -Opioidrezeptors

Es wurden zunächst die Primer 1 und 2 für die RT- PCR eingesetzt. Die Primer schlossen ungefähr zwei Drittel des kodierenden Abschnitts der δ - Opioidrezeptor cDNA ein, darunter Teile aus Exon 2 und 3 sowie das Stop-Kodon.

Das Ergebnis dieser PCR zeigt Abb.4.

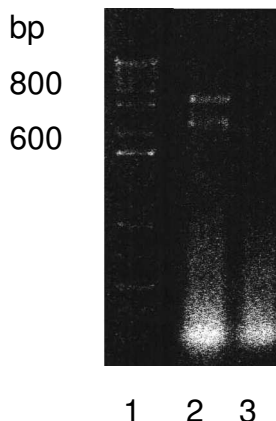


Abbildung 4: PCR- Amplifikation eines 773 bp langen cDNA-Fragments des humanen δ -Opioidrezeptors aus G-361-Melanomzellen

Mit den Primern 1 und 2 wurde die cDNA der RNA-Transkripte mittels PCR amplifiziert (95 °C 50 s.;66°C 1:30 min.;72°C 6 min). Auftrennung: Agarosegel 2%

Spur 1: Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenz
Spur 2: Amplifiziert wurde ein ca. 770 bp langes sowie ein ca 620 bp langes cDNA-Fragment.

Spur 3: PCR-Produkt aus einem Kontrollansatz, dem die Reverse Transkriptase nicht zugesetzt worden war.

Zu sehen ist ein PCR- Produkt, dessen Größe der erwarteten Länge von 773 bp entspricht. Außerdem ist schwach eine zweite, ca. 150 bp kleinere Bande, zu erkennen.

5.1.1.2 Amplifikation des cDNA- Fragments 493 bis 986 des δ - Opioidrezeptors

Um unser Ergebnis zu verifizieren, wurde das RT- Produkt (die cDNA) einer weiteren PCR unterzogen. Und zwar diesmal mit den weiter innen liegenden Primern 3 und 4. Die von den Primern eingegrenzte Sequenz schloß ebenfalls Teile aus Exon 2 und 3 ein.

Abb.5 zeigt das Ergebnis der PCR.

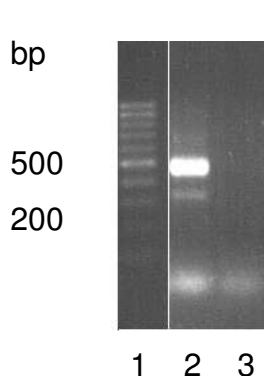


Abbildung 5: PCR-Amplifikation eines 494 bp langen cDNA-Fragments des humanen δ -Opioidrezeptors aus G-361-Melanomzellen

Mit den Primern 3 und 4 wurde die c-DNA der RNA-Transkripte über PCR amplifiziert (95 0C 50 s.;58°C 1:30 min.;72°C 6 min).

Auftrennung: Agarosegel 2%

Spur 1 : Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenz.
Spur 2 :Amplifiziert wurde ein 500 bp und ca. 350 bp langes cDNA-Fragment.

Spur 3: PCR-Produkt aus einem Kontrollansatz, dem die Reverse Transkriptase nicht zugesetzt worden war.

Auf dem 2% Agarosegel, auf dem die Reaktionsprodukte analysiert wurden, sind zwei Amplifikate zu erkennen.

Es zeigte sich den Erwartungen entsprechend ein 494 bp langes PCR- Fragment. Zusätzlich erschien eine circa 150 bp kürzere Bande auf dem Gel.

5.1.2 Nachweis von δ - Opioidrezeptor mRNA in der Melanomzelllinie COLO 679

Die cDNA, die durch Transkription der Total- RNA aus den Melanomzellen gewonnen wurde, setzten wir zunächst in zwei PCR- Reaktionen mit zwei verschiedenen Primerpaaren ein.

Auch hier wurden bei den PCR- Reaktionen Proben, die ohne Reverse Transkriptase angesetzt wurden, zur Kontrolle einer eventuellen Kontamination mitamplifiziert. Zur Abklärung einer zusätzlich zum erwarteten PCR- Fragment erscheinenden Bande, wurden die PCR-Produkte in 1000-facher Verdünnung einer weiteren PCR unterzogen.

5.1.2.1 Amplifikation des cDNA- Fragments 462 bis 1234 des δ -Opioidrezeptors

Die RT- PCR erfolgte wie in 5.1.1.1 beschrieben mit dem Primerpaar 1 und 2.

4 μ l des RT-Transkriptes wurden für die PCR eingesetzt.

Das Ergebnis dieser PCR zeigt Abb.6.

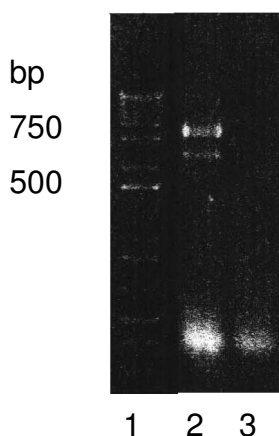


Abbildung 6: PCR- Amplifikation eines 773 bp langen cDNA-Fragments des humanen δ -Opioidrezeptors aus COLO 679-Melanomzellen

Mit den Primern 1 und 2 wurde die cDNA der RNA-Transkripte mittels PCR amplifiziert (95 °C 50 sec.;66°C 1:30 min.;72°C 6 min).

Auftrennung: Agarosegel 2%

Spur 1: Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenz.

Spur 2: Amplifiziert wurde ein 770 bp langes und ein ca 620 bp langes cDNA-Fragment.

Spur 3: PCR-Produkt ,dem vorher die Reverse Transkriptase nicht zugesetzt worden war

Die Auftrennung eines 12 μ l Aliquots auf 2% Agarosegel zeigt die Amplifikation eines ca. 770 bp langen PCR- Produktes (erwartete Länge. 773bp). Außerdem zeigt sich eine schwächere zweite Bande, ca. 150 bp kürzer.

5.1.2.2 Amplifikation des cDNA- Fragments 493 bis 986 des δ - Opioidrezeptors

Der codierende Bereich des δ - Opioidrezeptorgens wurde in einer PCR mit den Primern 3 und 4 amplifiziert. Sie setzen an der Basenpaarposition 493 bzw. 986 an

und vervielfältigen somit einen 494 bp langen cDNA- Abschnitt. Die Reaktion wurde durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben.

Das Ergebnis ist in Abb.7 dargestellt.

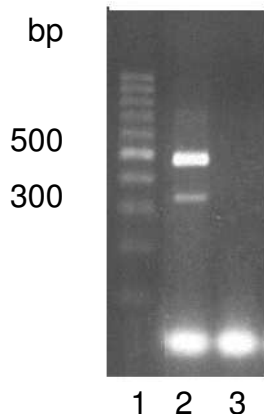


Abbildung 7: PCR- Amplifikation eines 494 bp langen cDNA-Fragments des humanen δ -Opioidrezeptors aus COLO 679-Melanomzellen

Mit den Primern 3 und 4 wurde die c-DNA der RNA-Transkripte über PCR amplifiziert (95 °C 50 s.; 58°C 1:30 min.; 72°C 6 min).

Auftrennung: Agarosegel 2%

Spur 1: Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenz.

Spur 2: Amplifiziert wurde ein 500 bp und ein ca. 350 bp langes cDNA-Fragment.

Spur 3: PCR-Produkt eines Kontrollansatzes, dem keine Reverse Transkriptase zugesetzt worden ist.

Zu erkennen ist die Amplifikation von zwei PCR- Produkten. Die Länge der amplifizierten cDNA- Fragmente entspricht zum einen der erwarteten Länge von 494 bp, das andere PCR- Produkt ist unter Vergleich mit der Markerspur ca. 350 bp lang.

Durch Nukleotidsequenzierung des amplifizierten cDNA- Fragmentes (in Kooperation mit der AG von Prof. V. Höllt, Magdeburg) wurde bestätigt, das es tatsächlich vom menschlichen δ - Opioidrezeptor stammt.

Demnach exprimieren COLO 679- Melanomzellen sowie G-361- Melanomzellen den δ -Opioidrezeptor.

Die weitere Bande , die durch RT- PCR sowohl in G-361- Melanomzellen als auch in COLO 679- Melanomzellen nachgewiesen wurde, stellt entweder ein unspezifisches Amplifikat durch aberrantes Anlagern der Primer an eine mit dem δ -Rezeptor nicht verwandte Sequenz dar („false priming“). Oder es handelt sich um eine neue, verkürzte Form des menschlichen δ -Opioidrezeptors, entstanden zum Beispiel durch alternatives Spleißen.

Zur Klärung dieser Frage wurden die PCR- Proben, die schon gelelektrophoretisch analysiert wurden, in 1000- facher Verdünnung einer weiteren PCR mit anderen Primern unterzogen.

Die Ergebnisse sollten am Beispiel der COLO 679 – Melanomzellen aufgezeigt werden. An den G-361- Melanomzellen wurden entsprechende Ergebnisse bei dem folgenden Versuch gefunden.

5.1.2.3 Reamplifikation

Um die cDNA des δ - Opioidrezeptors stärker zu amplifizieren, wurde das PCR-Produkt, das mit den Primern 3 und 4 gewonnen wurde, nochmals amplifiziert, und zwar mit den weiter innen liegenden Primern 5 und 6.

Dieses Primerpaar schnitt einen kürzeren Bereich der cDNA- Sequenz des humanen δ -Opioidrezeptors heraus, als im Rahmen der vorangegangenen PCR mit dem Primerpaar 3/4 („genestete PCR“). Man erwartete demnach ein um ebenfalls 150 bp kleineres PCR- Produkt falls es sich um einen verkürzten δ -Rezeptor handelt und überhaupt kein zusätzliches Produkt im Fall von *false priming*. Der Bereich, der von den genesteten Primern eingeschlossen wurde, enthielt das Ende von Exon 2 und einen Abschnitt von Exon 3. Das Amplifikat des „Wildtyp“-Rezeptors sollte mit diesen Primern 441 bp lang sein.

Die PCR-Proben, die aus der RT- PCR mit den Primern 3 und 4 erhalten wurden, wurden 1:1000 verdünnt und einer weiteren PCR unterzogen. Es wurde 1 μ l der verdünnten PCR- Probe für die Reamplifikation eingesetzt.

Auf einem 2% Agarosegel wurden 10 μ l des neuen PCR- Produktes aufgetrennt (Abb.8):

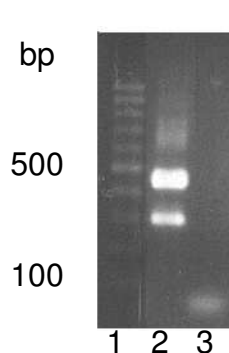


Abbildung 8: PCR- Reamplifikation eines 440 bp langen cDNA-Fragments des humanen δ -Opioidrezeptors aus COLO 679-Melanomzellen

Mit den Primern 5 und 6 wurde ein 1:1000 verdünntes cDNA- Amplifikat über PCR reamplifiziert (95 °C 50 sec.; 68°C 1:30 min.; 72°C 3 min) .
Auftrennung: Agarosegel 2%
Spur 1: Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenz.
Spur 2: Amplifiziert wurde ein 450 bp langes und ein ca. 300 bp langes PCR-Fragment.
Spur 3: PCR-Produkt eines Kontrollansatzes, dem keine Reverse Transkriptase zugesetzt worden ist.

Als PCR-Produkt zeigte sich die herausgeschnittene cDNA-Sequenz des δ -Opioidrezeptors mit der korrekten Länge von 441 bp.

Daneben fand man wieder ein um 150 bp verkürztes cDNA- Fragment. Damit scheint es sich tatsächlich um eine verkürzte δ -Rezeptor-mRNA zu handeln und nicht um ein unspezifisches Produkt. Dass dieses verkürzte Amplifikat bei allen getesteten Melanomzelllinien gefunden wurde, widerspricht der Annahme eines zufälligen Spleißfehlers in einzelnen Tumorzelllinien.

Durch die Amplifikation von genomischer DNA (hier nicht dargestellt) konnte gezeigt werden, dass die für den δ -Rezeptor kodierenden Gene in den untersuchten Melanomzellen unverändert sind. Es handelt sich also tatsächlich um ein verändertes Prozessieren der mRNA.

5.2 Nachweis von Opioidrezeptoren auf Melanozytenmembranen der Melanomzelllinie G-361

Nachdem mittels RT- PCR die Expression von δ - Opioidrezeptor- mRNA in Melanomzellen nachgewiesen worden war, wurde in Radiorezeptorbindungsversuchen untersucht, ob diese Zellen tatsächlich auch intakte δ - Opioidrezeptoren exprimieren und letztere auch zur Zellmembran transportiert werden.

Die Bindungsversuche wurden mit Membranen der G-361- Melanomzellen und mit für δ -, μ - und κ -Rezeptoren selektiven Opioidrezeptoragonisten durchgeführt. Es handelte sich dabei um die synthetisch hergestellten Opioidrezeptorliganden: DPDPE, DAMGO und U 69593.

5.2.1 Ausschluß der Existenz von μ - und κ - Rezeptoren in Membranen der Melanomzelllinie G-361 im Bindungsversuch

Es wurden Radiorezeptorbindungsversuche durchgeführt, um spezifische Bindungsstellen für die Tritium- markierten Opioidrezeptoragonisten in G-361- Membranpräparaten nachzuweisen.

Weder für den selektiven μ - noch für den selektiven κ - Opioidrezeptoragonisten, konnte eine Bindung nachgewiesen werden. Der hochselektive δ - Opioidrezeptorligand (^3H)–DPDPE zeigte in den Bindungsversuchen eine spezifische Bindung an die Membran der G-361- Zellen.

Der durch hohe Konzentrationen an nicht radioaktiv markiertem Liganden (z.B., DPDPE: 2×10^{-5} M) verdrängbare Teil der Bindung von (^3H)–DPDPE entsprach der spezifischen Bindung.

Obwohl die spezifische (^3H)–DPDPE– Bindung nicht einmal 1% der Gesamtradioaktivität betrug, konnte sie in allen Versuchen nachgewiesen werden und war doppelt so hoch wie die unspezifische Bindung.

Abb.9 zeigt eine Zusammenfassung von drei Experimenten.

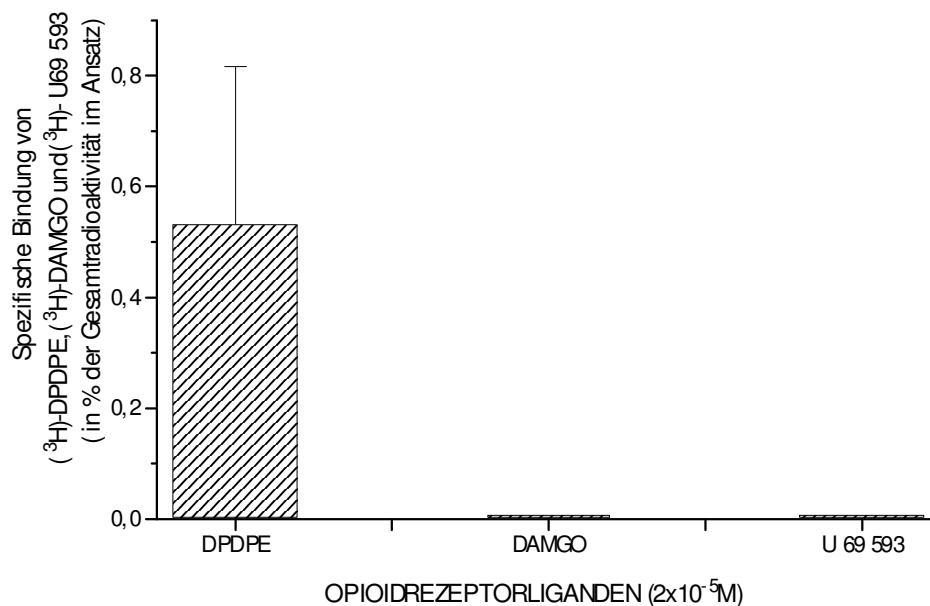


Abbildung 9: Spezifische Bindung von Opioidrezeptorliganden an G-361 Melanozytenmembranen

Spezifische Bindung der Opioidrezeptorliganden (^3H)-DPDPE, (^3H)-DAMGO und (^3H)-U 69 593 an Membranen von Melanozyten der Melanomzelllinie G-361 in Prozent der Gesamtradioaktivität im Ansatz.

Die Daten wurden aus Mittelwerten $\bar{x} \pm \text{SD}$ von Dreifachwerten aus drei Versuchen bestimmt.

5.2.2 Bindung des Opioidrezeptorliganden (^3H)-DPDPE an δ -Opioidrezeptoren auf Melanozyten der Melanomzelllinie G-361: Charakteristika

Der vorangestellte Radiorezeptorbindungsversuch hatte ergeben, daß (^3H)-DPDPE spezifisch, d.h. verdrängbar an eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen auf G-361- Membranen gebunden wurde. Es war jedoch weiter abzuklären, ob diese Bindung den klassischen Kriterien für eine spezifische Ligand- Binder- Interaktion nach BURT, (1978) entsprach.

Folgende Kriterien einer spezifischen Bindung waren abzuklären:

- Zeitabhängigkeit
- Reversibilität
- Sättigbarkeit
- hohe Affinität

5.2.2.1 Zeitabhängigkeit

Die Bindung von (^3H)-DPDPE an die δ -Opioidrezeptoren zeigte einen zeitabhängigen Verlauf. Das dynamische Gleichgewicht der Assoziations-Dissoziationsreaktion des Liganden stellte sich erst nach 3 Stunden ein. Deshalb wurde für die folgenden Versuche eine Inkubationszeit von 3 Stunden festgelegt.

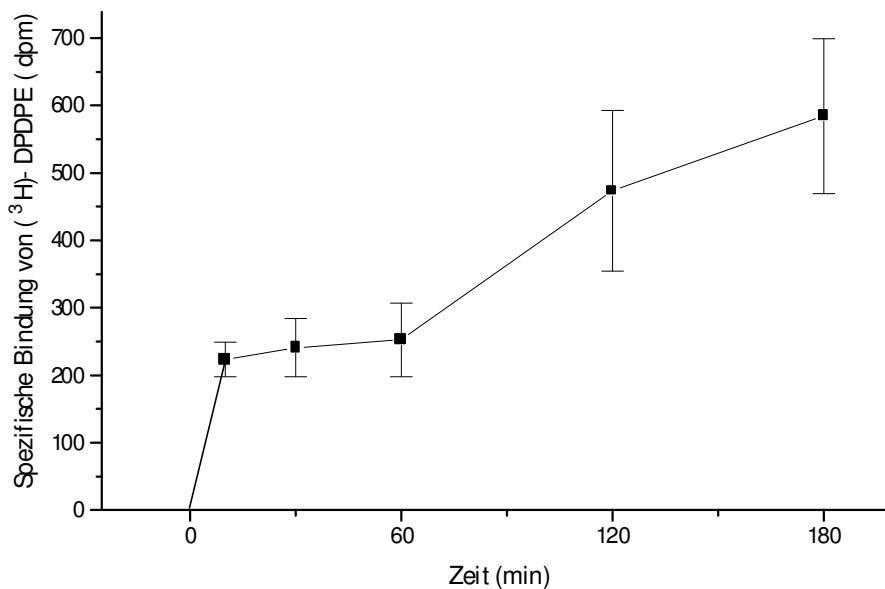


Abbildung 10: Zeitabhängigkeit der Bindung von (³H)–DPDPE an die δ -Opioidrezeptoren

Die spezifische Bindung von (³H)–DPDPE an Melanomzellmembranen wurde als Funktion der Zeit dargestellt. G-361- Membranen wurden im RBA-Ansatz mit (³H)–DPDPE (2,2 nM) auf Eis inkubiert. Nach zunehmenden Zeitintervallen wurde die Assoziation des markierten Liganden an die δ -Opioidrezeptoren beendet, und die membrangebundene Menge an (³H)–DPDPE bestimmt.

Die Punkte entsprechen $\bar{x} \pm SD$ aus Mittelwerten von Dreifachansätzen eines Einzelexperimentes.

5.2.2.2 Reversibilität

Die Reversibilität der Bindung wurde durch Verdrängung des Tritium- markierten DPDPE durch Zugabe eines hohen Überschusses an nicht radioaktiv markiertem DPDPE ($2 \times 10^{-5} M$) bestimmt.

(³H)–DPDPE wurde zunächst über 180 min im RBA-Ansatz mit G-361- Membranen inkubiert. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurde der Verdränger zugegeben und die Menge an spezifisch membrangebundenem (³H)–DPDPE als Funktion der Zeit gemessen.

Nach bereits 10 min waren über 70 % des spezifisch gebundenen (³H)–DPDPE aus seiner Bindung verdrängt. Von einer fast vollständigen Dissoziation konnte man nach 60 min sprechen.

Der zeitliche Verlauf der Dissoziation ist in Abb.11 dargestellt. Die Inkubationsdauer wurde von 10 min bis 180 min variiert.

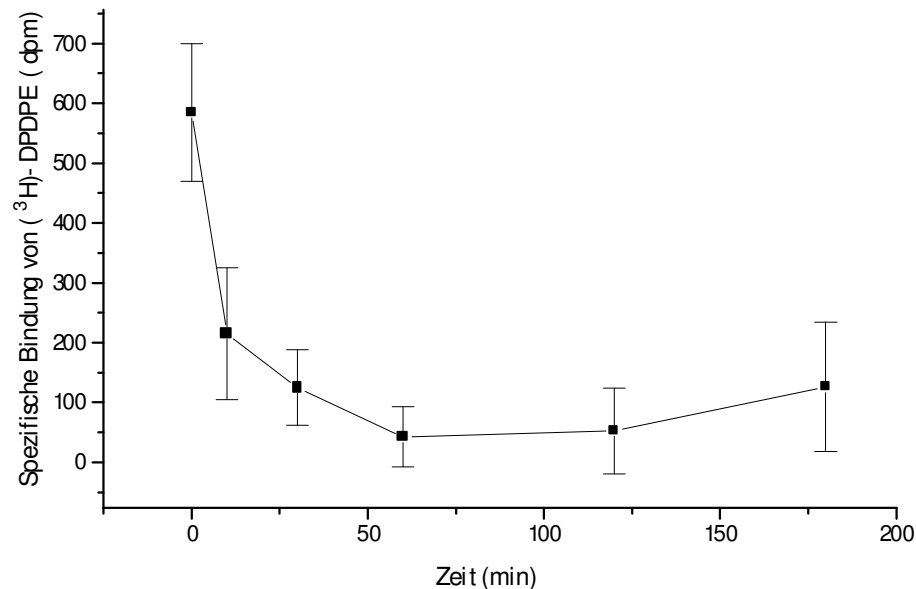


Abbildung 11: Reversibilität der Bindung von (³H)–DPDPE an die δ - Opioidrezeptoren

Die spezifische Bindung von (³H)–DPDPE an Melanomzellmembranen wurde als Funktion der Zeit dargestellt. G-361-Membranen wurden im RBA- Ansatz mit (³H)–DPDPE (2,2 nM) auf Eis 180 min inkubiert. Danach wurde durch Zugabe von DPDPE (2x 10⁻⁵M) die Dissoziation des markierten DPDPE kenntlich gemacht: Seine Re-Assoziation wurde durch den Überschuss an DPDPE verhindert. Der Prozess wurde nach definierten Zeitintervallen beendet und der zum jeweiligen Zeitpunkt noch membrangebundene Anteil des (³H)–DPDPE bestimmt. Die Punkte entsprechen $\bar{x} \pm SD$ aus Mittelwerten von Dreifachansätzen eines Einzelexperiments.

5.2.2.3 Sättigbarkeit

Da spezifische Bindungsstellen ausschließlich in begrenzter Konzentration vorliegen, ergibt sich die Forderung, dass diese durch ihre Liganden sättigbar sind.

Um die Sättigbarkeit der Bindung nachzuweisen, wurden im RBA in einer Serie von Ansätzen einer konstanten Konzentration an G-361- Membranen eine konstante Konzentration an (³H)–DPDPE (2,2nM) sowie unterschiedliche Konzentrationen an nicht radioaktiv markiertem DPDPE zugegeben.

DPDPE wurde in einer Konzentration von $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ bis $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ in den Versuch eingebracht. Dieses entsprach dann Konzentrationen von $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ bis $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ im Inkubationsansatz.

Die Abb.12 zeigt eine sigmoidal verlaufende Kurve, wie sie für Verdrängungskurven typisch ist. Eine Absättigung der Bindungsstellen konnte im Konzentrationsbereich von 10^{-6} M beobachtet werden.

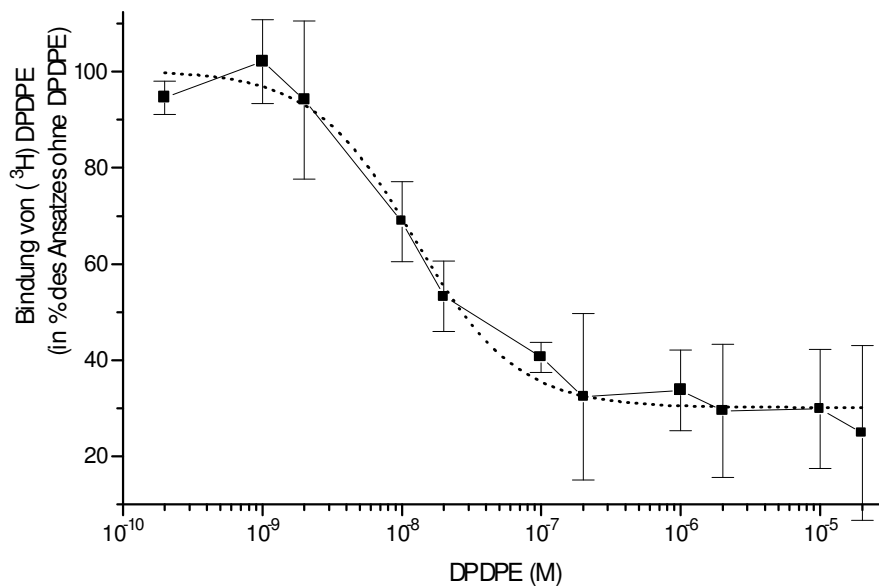


Abbildung 12: Sättigbarkeit der Bindung von (³H)–DPDPE an die δ -Opioidrezeptoren

Spezifische Bindung von (³H)–DPDPE (2,2nM) in Gegenwart steigender Konzentrationen von DPDPE. G-361- Membranen wurden im RBA- Ansatz mit (³H)–DPDPE (2,2 nM) und nicht radioaktiv markiertem DPDPE ($2 \times 10^{-10} \text{ M}$ bis $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ im Ansatz) 120 min auf Eis inkubiert. Die Gesamtbindung B wurde gemessen und als Bindung in Prozent der Kontrolle (des Ansatzes ohne Verdränger) angegeben.

Die gezeigten Punkte sind $x \pm \text{SD}$ aus Mittelwerten von Dreifachbestimmungen aus 3 Versuchen.

Fit-Protokoll des Computerprogrammes ORIGIN:

```
Sigmoidal(Logistic) fit to Data1_mean
Chisqr = 17,91382
-----
Init(A1) = 100,25      3,87
Final(A2) = 30,119    2,06
XatY50(x0) = 1,2328E-8  2,41E-9
Power(p) = 1,1922     0,298
-----
XatY20 = 3,8538E-9
XatY80 = 3,9434E-8
```

5.2.2.4 Bindungsparameter K_D und B_{Max}

Aus den gezeigten Bindungsdaten des Sättigungsexperiments wurden die Bindungsparameter K_D (Dissoziationskonstante) und B_{Max} (Bindungskapazität) zum einen über das Computerprogramm LIGAND und zum anderen über das technisch-wissenschaftliche Zeichenprogramm ORIGIN nach Überführung der Daten in Scatchard- Plots bestimmt.

Für die Interaktion des (3H)–DPDPE mit den δ - Opioidrezeptoren auf den G-361-Membranen wurde mittels des LIGAND- Programms für die K_D ein Wert von 6,2 nM ermittelt , die B_{Max} betrug 2×10^{-10} mol/l bzw 10 fmol/mg Protein (jeweils Mittelwerte aus drei Versuchen $mean \pm SD$).

Die errechnete K_D für DPDPE entsprach der K_D einer hochaffinen Bindungsstelle und lag in dem Bereich, der von KIEFFER et al. (1992), EVANS et al. (1992) und SIMONIN et al. (1994) für den δ - Opioidrezeptor angegeben wurde.

Die Bindungskapazität hingegen war niedriger als sie bei anderen Zelltypen festgestellt worden war (ZADINA et al.,1994).

Im Gegensatz zu den Berechnungen des Computerprogramms LIGAND konnten anhand der Scatchard– Plots zwei geringer affine Bindungsstellen identifiziert werden: Der Kurvenverlauf im Scatchard- Plot ließ sich in zwei Kurvenbereiche aufteilen. Daraus ergaben sich zwei Geraden mit unterschiedlicher Steigung, entsprechend zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität zum Liganden.

Die mit dieser Methode ermittelten Bindungsparameter sind als Relativwerte anzusehen. Die Methode erlaubt die Bestimmung der Bindungsparameter nicht mit der notwendigen Genauigkeit. Es sollte lediglich geprüft werden, ob sich neben der durch LIGAND aufgefundenen Bindungsstelle Hinweise auf weitere Bindungsstellen ergäben.

Mit Hilfe des FIT- Programms aus dem ORIGIN- Computerprogramm konnten die Bindungsparameter für beide Bindungsstellen aus den negativen Reziprokwerten der Geradensteigungen ($- 1/K_D$) und den Geradenschnittpunkten mit der Abszisse (B_{Max}) bestimmt werden.

Die K_D für die Bindung von DPDPE an die höheraffine Bindungsstelle errechnete sich zu $1,6 \times 10^{-7} M$, die B_{Max} zu $4,7 \times 10^{-9} M$ (beides Mittelwerte aus drei Versuchen).

Die K_D für die Bindung von DPDPE an die geringeraffine Bindungsstelle betrug $3,2 \times 10^{-4} \text{M}$, die B_{Max} $4,2 \times 10^{-6} \text{M}$ (Mittelwerte aus drei Versuchen).

Das Scatchard-Diagramm eines der drei Einzelversuche ist in Abb.13 zu sehen.

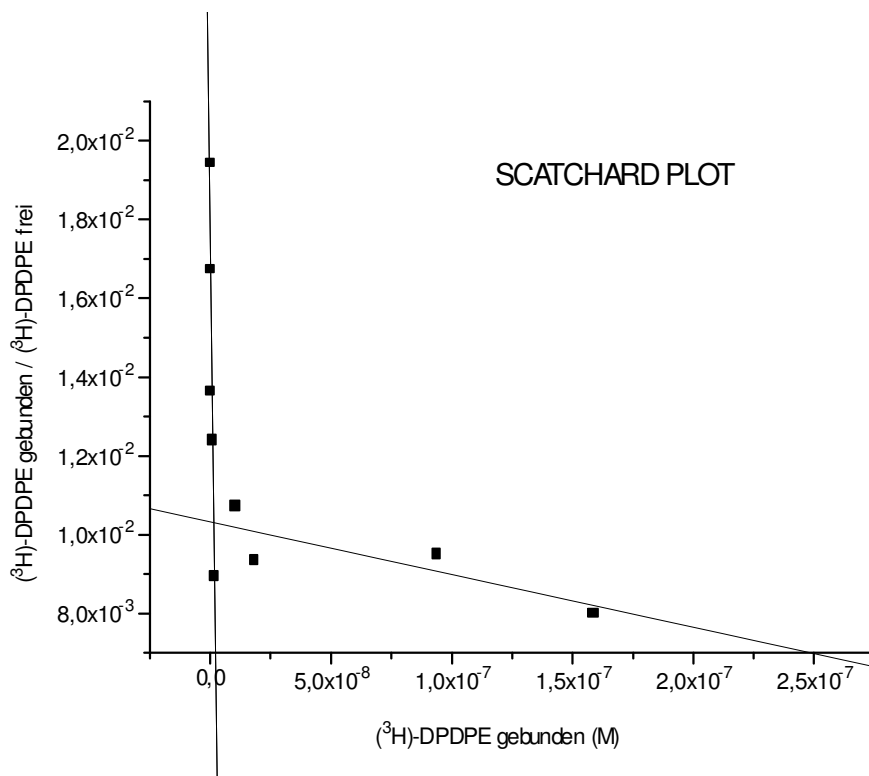


Abbildung 13: Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max} der Interaktion von (^3H) -DPDPE mit δ - Opioidrezeptoren auf G-361- Membranen anhand eines Scatchard – Plots

Scatchard Plot und Bindungsparameter K_D und B_{max} für (^3H) -DPDPE aus einem Einzelversuch der in Abb. 12 dargestellten Bindungsdaten.

Es wurde der Quotient aus gebundenem zu freiem Liganden gegen die Konzentration des gebundenen Liganden aufgetragen. Aus den Kurvenpunkten ließen sich zwei Geraden konstruieren.

Die Dissoziationskonstanten ergaben sich aus den negativen Reziprokwerten der Geradensteigungen, die Bindungskapazitäten als Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse.

Es errechneten sich folgende Bindungsparameter : $K_{D1} = 2,1 \times 10^{-7} \text{M}$, $B_{\text{max}1} = 3,6 \times 10^{-9} \text{M}$ und $K_{D2} = 7,5 \times 10^{-5} \text{M}$, $B_{\text{max}2} = 7,7 \times 10^{-7} \text{M}$.

Die Korrelationskoeffizienten $r_1 = -1$ und $r_2 = -0,85$ ließen sich aus dem ORIGIN Fit-Programm ableiten.

Die Abbildung zeigt die Auswertung eines Einzelversuchs.

Fit-Protokolle des Computerprogrammes ORIGIN:

Linear Fit for Data1.bound.free_LINE on linearized scales

$$\text{yscale}(Y) = A + B * \text{xscale}(X)$$

where scale() is the current axis scale function

Param Value sd

A 0,01775 2,5823E-17

B 4832416,9225 2,4205E-10

R = -1

SD = 8,213E-17, N = 20

P = 1,246E-139

Linear Fit for Data1_bound.free on linearized scales

$$\text{yscale}(Y) = A + B * \text{xscale}(X)$$

where scale() is the current axis scale function

Param Value sd

A 0,01033 0,00055

B -13329,23282 5946,84171

R = -0,84573

SD = 0,00072, N = 4

P = 0,15427

6 DISKUSSION

6.1 Methodik

6.1.1 Melanozyten als Untersuchungsobjekt

Es gibt viele Informationen über die Funktion von Hormonen, Neurotransmittern oder Mediatoren in der Haut.

Es existiert beispielsweise eine Reihe von Arbeiten über die Expression von POMC und seinen Fragmenten in Keratinozyten (SLOMINSKI et al.,1993). Es wurden auch schon Rezeptoren für verschiedene POMC- Fragmente wie ACTH (SLOMINSKI et al.,1996) oder α -MSH (CHAKRABORTY and PAWELEK,1993) in diesen Hautzellen gefunden.

Im Gegensatz dazu gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse über Präsenz und Funktion opioidergere Systeme in der menschlichen Haut.

Bisherige Untersuchungen beschränkten sich hierbei fast ausschließlich auf die Keratinozyten, die den Hauptbestandteil der Haut ausmachen. BIGLIARDLI et al. waren 1998 die ersten, die die Expression eines Opioidrezeptors, des μ -Opioidrezeptors, auf mRNA- sowie auf Proteinebene in menschlichen Keratinozyten nachweisen konnten.

Über opioiderge Systeme in Melanozyten der Haut finden sich nur ganz wenige Arbeiten.

1998 wird in einer Arbeit von SLOMINSKI die Entdeckung von β -Endorphin-, α -MSH- und ACTH- immunoreaktivem Material in menschlichen Melanozyten und in Melanomzellen beschrieben.

Melanozyten könnten daher durchaus in die Funktionen opioidergere Systeme auf noch ungeklärte Weise integriert sein, was sie als Untersuchungsobjekt für unsere Arbeit interessant gemacht hat.

Im Vordergrund stand die Suche nach Opioidrezeptoren als Zielstrukturen für Opioidpeptide und im Falle einer Befunderhebung die Charakterisierung dieser Bindungsstelle.

Um den für diese Arbeit notwendigen Bedarf an Zellmaterial decken zu können, griffen wir auf in vitro kultivierbare Zelllinien zurück.

Melanozyten der Zelllinie G-361 und COLO 679 wurden somit exemplarisch für die Suche nach Opioidrezeptoren in Melanozyten in unseren Versuchen eingesetzt.

6.1.2 Bindungsversuche

6.1.2.1 Liganden

Radioaktiv markierte Liganden müssen in einer Konzentration eingesetzt werden, die eine Verdrängung des Liganden von seinem Binder erlaubt.

Man wählt eine Konzentration in der Größenordnung einer Dissoziationskonstanten K_D , welche die Interaktion des Liganden mit einem bereits bekannten Binder charakterisiert.

Für DPDPE lag dieser Wert der Literatur zufolge (KIEFFER, 1995) für DPDPE/ δ -Opioidrezeptor- Interaktionen etwa bei 10^{-8} M. Demnach wurde der Tritium-markierte Ligand DPDPE in einer Konzentration von 2,2 nM im Inkubationsansatz in unseren Versuchen eingesetzt.

Die Konzentration des unmarkierten, kalten, Liganden muss in der Regel um zwei bis drei Zehnerpotenzen höher liegen als die des markierten Liganden, um eine vollständige Verdrängung des spezifisch gebundenen markierten Liganden durch den unmarkierten Liganden zu gewährleisten und dadurch die Bestimmung der unspezifischen Bindung des radioaktiv markierten Liganden zu ermöglichen.

Das nicht markierte DPDPE wurde als Totalverdränger in einer Konzentration von 2×10^{-5} M eingesetzt.

6.1.2.2 Membranpräparation

Bei der Membranpräparation wurde nach Abnahme des Kulturmediums darauf geachtet, dass die Zellen durchgehend bei 4°C oder auf Eis verarbeitet wurden. Es wurde beabsichtigt, die zelleigenen Enzyme „einzufrieren“, um die enzymatische

Zerstörung von Zellbestandteilen zu verhindern und den Energiestoffwechsel der Zellen herunterzufahren.

Zusätzlich wurden dem Homogenisationspuffer sowie dem Inkubationspuffer Enzymhemmer zugesetzt, um so einen höchstmöglichen Schutz der Zellen vor biochemischen Zerstörungsprozessen zu gewährleisten. Es wurden die von SHAHABI et al. (1992) beschriebenen Enzymhemmer in den angegebenen Konzentrationen übernommen und noch durch PMSF und Aprotinin ergänzt.

Zum Schutz der Zellen musste die gesamte Membranpräparation beginnend bei der mechanischen Zellablösung von der Schale bis zur Homogenisation bei 4°C im Kühlraum erfolgen. Dies bedeutete bei vierzig Zellkulturschalen (Durchmesser von 145 mm), aus denen Membransuspensionen für einen Radiorezeptorbindungsversuch gewonnen werden sollten, drei bis vier Stunden Arbeit bei 4°C.

Um diese Belastung für den Experimentator zu umgehen, wurde ein Versuch unternommen, die Zellen alternativ bei Raumtemperatur mit EDTA abzulösen.

Dazu wurden die Zellen nach Abnahme des Nährmediums einmal mit D-PBS defic (2,7 mM KCl, 140mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 0,1% BSA) gewaschen, in Ablösungspuffer (D-PBS defic, 0,02% EDTA, 1 mM Pefabloc, 50µg/ml Bacitracin, 0,01% Aprotinin) bei 37°C 5 bis 10 min inkubiert, danach abgelöst und bei 280 x g 3 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in Homogenisationspuffer resuspendiert, und wie unter 4.2.2.3 beschrieben in Homogenisationspuffer homogenisiert und weiterbehandelt.

Da die Ausbeute an bindendem Material bei Einsatz der RT/EDTA- Methode nur die Hälfte der bei Einsatz der 4°C/Schaber- Methode erhaltenen Ausbeute betrug (Abb.14), wurde schließlich die Membranpräparation bei 4°C durchgeführt.

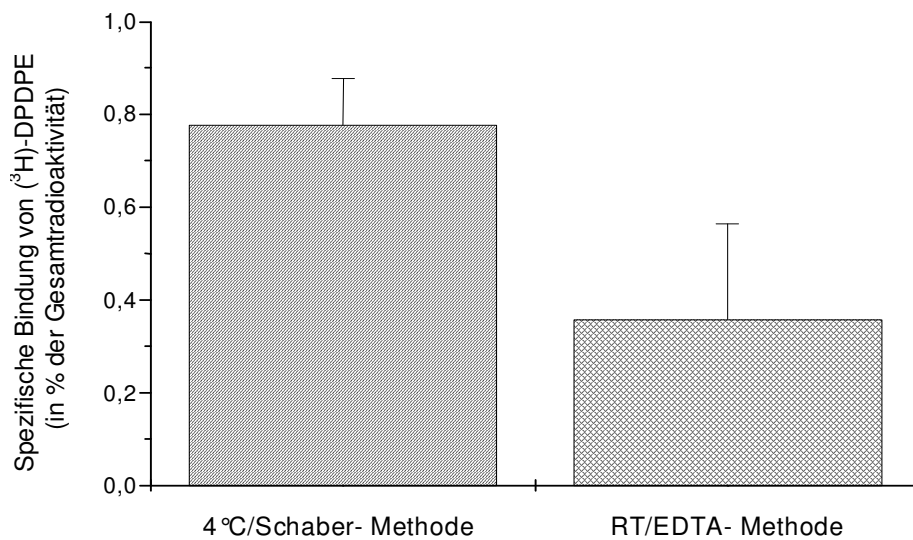


Abbildung 14: Darstellung der spezifischen mechanischen Ablösung der Bindung von (3H)-DPDPE an Membranpräparate: Vergleich der Zellen bei 4°C mit der Ablösung unter EDTA- Einfluß bei Raumtemperatur.

Säule 1 zeigt die spezifische Bindung von (³H)-DPDPE(2,2nM) an Membranen, die bei 4°C mechanisch abgelöst wurden.

Säule 2 zeigt die spezifische Bindung von (³H)-DPDPE (2,2nM) an Membranen, die bei RT mit EDTA abgelöst wurden.

Es wurden je Radiorezeptorbindungsversuch gleichgroße Aliquots aus gleichen Volumina an Membransuspensionen aus 40 Zellkulturschalen á 145mm Durchmesser eingesetzt.

6.1.2.3 Filtration

Bei dem Filtrationsverfahren stellte die unspezifische Adsorption des freien d.h. nicht membrangebundenen (³H)-DPDPE an die Filter ein Problem dar. Dieser Blankwert ist bei der Bestimmung der gebundenen Radioaktivitätsmenge zu berücksichtigen und sollte möglichst niedrig sein.

Um besonders niedrige Leerwerte zu erreichen, wurde die von BRUNS et al. (1983) vorgeschlagene Methode mit leichten Modifikationen gewählt. Dazu wurden die Filter innerhalb von 3 Stunden viermal mit 1 ml 0,1% Polyethyleniminlösung benetzt. Polyethylenimin als Polykation bindet dabei an die Filter und verhindert so die Adsorption ebenfalls positiv geladener Moleküle.

Mit dieser Methode wurden Blankwerte von unter 0,5% des CT-Wertes erhalten.

6.1.2.4 Bestimmung der Radioaktivität

Nach Zugabe von 0,1% Triton X-100 zu den Filtern sollten diese in Szintillationsröhrchen über Nacht geschüttelt werden, um so die gebundenen Substanzen (Radioaktivität) aus den Filtern herauszulösen. Durch ständige Bewegung der Proben sollte dies gefördert werden. Zunächst wurden die Proben bei 4°C auf einem Schüttler mit eindimensionaler horizontaler Bewegung geschüttelt.

Erste Versuche zeigten eine hohe Streuung der Messwerte und eine geringe Zählrate.

Nach weiteren Versuchen erwies sich das Schütteln der Proben auf einem Schüttler mit horizontal geführter Kreisbewegung als die Methode mit der geringeren Streuung. Außerdem wurden weitere Versuche unternommen, die gebundene Radioaktivität so weit wie möglich aus den Filtern herauszulösen. Die Überlegung, dass die Löslichkeit fester Stoffe mit steigender Temperatur größer wird, veranlasste uns, das Schütteln bei Raumtemperatur vorzunehmen; wir erhielten daraufhin eine höhere Zählausbeute.

So ergab sich das Schütteln auf einem Rundschüttler bei Raumtemperatur als die Methode der Wahl.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Gentechnologische Ergebnisse

6.2.1.1 Expression des δ -Opioidrezeptors in Melanomzelllinien

Mittels RT-PCR gelang es, in beiden untersuchten Melanomzelllinien, G-361 und COLO 679, mRNA des humanen δ -Opioidrezeptors nachzuweisen.

Untersuchungen von MAYER et al. (2000) zeigten, dass in diesen Melanomzelllinien keine Expression des μ -Opioidrezeptors stattfand und auch die cDNA des κ -Opioidrezeptors in diesen Zellen nicht reproduzierbar amplifiziert werden konnte.

P. MAYER (persönliche Mitteilung) gelang in einer weiteren Melanomzelllinie, COLO 800, in einer humanen Neuroblastomzelllinie, SH-SY5Y, sowie in kultivierten menschlichen Melanozyten den δ -Opioidrezeptor nachzuweisen. Die hier beschriebene verkürzte Form des Rezeptors war aber nur in den entarteten Zellen und nicht in den „normalen“ Melanozyten nachweisbar.

Die Bestimmung der Menge an δ - Opioidrezeptor- mRNA in den Melanozyten durch kompetitive semiquantitative PCR ergab, dass Pigmentzellen größenordnungsmäßig etwa genauso viel δ - Opioidrezeptor- mRNA exprimieren wie im zerebralen Kortex gefunden wird. Allerdings ist zu bedenken, dass nicht alle Zellen des zerebralen Kortex δ -Rezeptoren exprimieren.

In Hinsicht auf die unterschiedliche anatomische Verteilung von Melanozyten und Nervenzellen im Organismus wird oft vergessen, dass die embryologischen Vorläuferzellen beider Zellarten aus dem Neuroektoderm entspringen, und sie somit einen gewissen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Obwohl die Melanozyten aus der Neuralleiste in die Haut auswandern, werden sie dennoch zu den neuroepithelialen Zellen gerechnet. Die Expression des δ -Opioidrezeptors in Neuronen und Melanozyten legt nahe, dass zwischen beiden Zellarten eine Verbindung besteht und deutet auf ihre gemeinsame Herkunft .

Für beide Zellarten ist die Tendenz zur malignen Entartung bekannt. Sowohl Neuroblastome, die aus Nervenzellen des Gehirns entstehen, als auch Melanome, die in der Haut entstehen, gehören zu den malignen Neoplasieformen. Diese zeichnet sich durch rasches, infiltrierendes und zerstörendes Wachstum mit Neigung zur Metastasierung aus (letzteres vor allem bei den Melanomen) und hat eine schlechte Prognose.

Inwieweit die gefundenen opioidergen Systeme in der Haut bei der Prävention oder der Entstehung und Progression eines Tumors eine Rolle spielen könnten, muss weiter untersucht werden.

6.2.1.2 Entdeckung einer ca. 150 bp kürzeren Sequenz

Bei unserer Suche nach m-RNA des δ - Opioidrezeptors in Melanomzelllinien stießen wir auf ein zusätzliches PCR- Produkt, das ungefähr 150 bp kürzer war als die erwartete Länge des „normalen“ Rezeptors.

Weiterführende Untersuchungen ergaben die Entdeckung einer bis dahin noch nicht beschriebenen Variante des δ - Opioidrezeptors, die offenbar durch atypisches Prozessieren der mRNA hervorgerufen wird und mit Malignität assoziiert scheint (MAYER et al., 2000).

Der Variante fehlte eine Nukleotidsequenz von 144 bp innerhalb der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptormoleküls. Es stellte sich natürlich die Frage, ob es sich bei diesem verkürzten Genprodukt nicht einfach um das Produkt unspezifischen Spleißens, einen Spleißfehler, wie er gelegentlich in pathologisch veränderten Zellen zu beobachten ist, handeln könnte.

Die Position und die Länge der Basenpaardeletion stimmte jedoch in allen getesteten Tumorzellen überein, und es wurden in ihnen auch keine anderen Variationen des δ - Opioidrezeptors gefunden. Weiterhin konnte man anhand der Intensitäten der DNA-Banden feststellen, dass das Mengenverhältnis der „Kurzversion“ zur „Normalversion“ des δ -Opioidrezeptors in allen Melanomzellen konstant war. Dieses betrug etwa 1:3, wie sich aus dem Ergebnis einer durchgeführten kompetitiven semiquantitativen RT- PCR ableiten ließ (MAYER, persönliche Mitteilung).

All diese Beobachtungen lassen die Theorie des fehlerhaften oder unspezifischen Spleißens als unwahrscheinlich erscheinen.

Da die Exzision dieser 144 Basenpaare, wie sich herausstellte, zu keiner Zerstörung einer der sieben transmembranären Domänen führte, blieb das allgemeine Bauprinzip der G- Protein- gekoppelten Rezeptoren erhalten. Die verkürzte Variante könnte also in Prinzip einen intakten und funktionell bedeutsamen Rezeptor darstellen, dessen physiologische oder pathophysiologische Funktionen abgeklärt werden sollten.

Das Rezeptorprotein würde eine um 48 Aminosäuren verkürzte Kette aufweisen.

Abbildung 15 zeigt die Position der Deletion eines 144 bp- Fragments der cDNA-Sequenz der „Normalversion“ des humanen δ - Opioidrezeptors.

```

1 ATGGAACCGG CCCCCTCCGC CGGCGCCGAG CTGCAGCCCC CGCTCTTCGC CAACGCCTCG
61 GACGCCTACC CTAGCGCCTG CCCCAGCGCT GGCGCCAATG CGTCGGGGCC GCCAGGCGCG
121 CGGAGCGCCT CGTCCCTCGC CCTGGCAATC GCCATCACCG CGCTCTACTC GGCCGTGTGC
181 GCCGTGGGGC TGCTGGGCAA CGTGCTTGTC ATGTTCCGCA TCGTCCGGTA CACTAAGATG
241 AAGACGGCCA CCAACATCTA CATCTTCAAC CTGGCCTTAG CCGATGCGCT GGCCACCAGC
301 ACGCTGCCTT TCCAGAGTGC CAAGTACCTG ATGGAGACGT GGCCCTTCGG CGAGCTGCTC
361 TGCAAGGCTG TGCTCTCCAT CGACTACTAC AATATGTTCA CCAGCATCTT CACGCTCACC
421 ATGATGAGTG TTGACCGCTA CATCGCTGTC TGCCACCCTG TCAAGGCCCT GGA CTTCGCGC
481 ACGCCTGCCA AGGCCAAGCT GATCAACATC TGTATCTGGG TCCTGGCCTC AGGCGTTGGC
541 GTGCCCATCA TGGTCATGGC TGTGACCCGT CCCC GGACG GGGCAGTGGT GTGCATGCTC
601 CAGTTCCCCA GCCCCAGCTG GTACTGGGAC ACGGTGACCA AGATCTGCGT GTTCCTCTTC
661 GCCTTCGTGG TGCCCATCCT CATCATCACC GTGTGCTATG GCCTCATGCT GCTGCGCCTG
721 CGCAGTGTGC GCCTGCTGTC GGGCTCCAAG GAGAAGGACC GCAGCCTGCG GCGCATCAGC
781 CGCATGGTGC TGGTGGTTGT GGGCGCCTTC GTGGTGTGTT GGGCGCCCAT CCACATCTTC
841 GTCATCGTCT GGACGCTGGT GGACATCGAC CGGCGCGACC CGCTGGTGGT GGCTGCGCTG
901 CACCTGTGCA TCGCGCTGGG TTACGCCAAT AGCAGCCTCA ACCCGTGCT CTACGCTTTC
961 CTCGACGAGA ACTTCAAGCG CTGCTTCCGC CAGCTCTGCC GCAAGCCCTG CGGCCGCCA
1021 GACCCAGCA GCTTCAGCCG CGCCCGCGAA GCCACGGCCC GCGAGCGTGT CACCGCCTGC
1081 ACCCGTCCG ATGGTCCCGG CGGTGGCGCT GCCGCTGAC CAGCCATCCG GCCCCAGAG
1141 CGCCCCTCC TAGTGACCCG GAGGCCACAT GAGTCCAGT GGGAGGCGCG AGCCATGATG
1201 TGGAGTGGGG CAGTAGAAGG TCGGAGGCTT GGGACCGCCA GATGGGGCCT CTGTTTCGGA
1261 GACGGGACCG GGCCGCTAGA TGGGCATGGG GTGGGCCTCT GGT TTGGGGC GAGGCAGAGG
1321 ACAGATCAAT GCGCGAGTGC CTCTGGTCTG GGTGCCCCCG TCCACGGCTC TAGGTGGGGC
1381 GGGAAAGCCA GTGACTCCAG GAGAGGAGCG GGACCTGTGG CTCTACA ACT GAGTCCTTAA
1441 ACAGGGCATC TCCAGGAAGG CGGGGCTTCA ACCTTGAGAC AGCTTCGGTT TCTAACTTGG
1501 AGCCGACTT TCGGAGTTGG GGGGTCCGGG GCCCCGAGG AGCCTGCGCT GCTCCTGGCT
1561 CACAGCGCTC CGGGCGAGGA GAGCGGGCGG ACCGGGGGGC TGGGCCGGTG CGGGCGCGA
1621 GGCAGGCGGA CGAGGCGCAG AGACAGCGGG GCGGCCGGGG CGCGGCACGC GCGGGTTCGG
1681 GGCCGGCCTC TGCCTTGCCG CTCCCCTCGC GTCGGATCCC CGCGCCCAGG CAGCCGGTGG
1741 AGAGGGACGC GCGGACGCC GGCAGCC

```

Abbildung 15: Position der Deletion eines 144 bp- Fragments innerhalb der cDNA-Sequenz des δ - Opioidrezeptors

An der Nukleotidposition 673- 816 der cDNA- Sequenz des δ - Opioidrezeptors sind die 144 Basenpaare der Deletion der δ - Opioidrezeptorvariante fettgedruckt dargestellt.

6.2.1.3 Entstehung, Vorkommen und Bedeutung der δ - Opioidrezeptorvariante

Nachdem in der genomischen DNA durch PCR keine neue Variante des δ - Opioidrezeptors gefunden wurde, folgerte man, dass die verkürzte Version des δ - Opioidrezeptors nicht im Genom kodiert sein kann. Die Entstehung der 144 bp- Deletion ist demnach auf mRNA- Processing zurückzuführen (MAYER et al. 2000).

Bei den Befunden fiel auf, dass die Kurzversion des Rezeptors ausschließlich in malignen Tumorzelllinien wie in den Melanom- und Neuroblastomzellen entdeckt wurde. Weder in „normalen“ Melanozyten noch in „normalen“ Nervenzellen wurde diese Variante des δ - Opioidrezeptors exprimiert. Dieses deutet darauf hin, dass die δ - Opioidrezeptorvariante bei der Entartung von Zellen eine Rolle spielen könnte.

G- Protein gekoppelte Rezeptoren, zu denen der δ - Opioidrezeptor zählt, sind auf ihre Struktur und Funktion hin gut untersucht worden. Daraus lässt sich folgern, was für Auswirkungen der Verlust der dritten intrazellulären Schleife auf die Funktion des Rezeptors haben könnte.

Es ist bekannt, dass die dritte intrazelluläre Schleife eines G- Protein- gekoppelten Rezeptors an der Bindung des G- Proteins an den Rezeptor und an der Desensibilisierung des Rezeptors nach chronischer Stimulation durch einen Liganden beteiligt ist (KOCH et al. 1997). Weiterhin können Veränderungen innerhalb der dritten intrazellulären Domäne dazu führen, dass der mutierte Rezeptor an einen anderen G- Proteintyp bindet als der „normale“ Rezeptor (MONTMAYEUR et al., 1993; GUIRAMAND et al., 1995).

Untersuchungen von MENG et al. (1996), BEFORT et al. (1996) und VALIQUETTE et al. (1996) weisen auf eine mögliche Liganden- Bindungsstelle hin, die direkt an die dritte intrazelluläre Schleife angrenzen soll, und es somit durch Konformationsänderungen der Bindungsstelle beziehungsweise der Schleife zu Veränderungen in der Signalübertragung kommen kann.

Diesen Informationen zufolge müsste die δ - Opioidrezeptorvariante trotz der fehlenden Schleife Liganden binden können, wohingegen die Desensibilisierung und Adaption des Rezeptors sowie die Übermittlung von Signalen ins Zellinnere beeinträchtigt sein könnten.

Da das Wachstum der Melanozyten stark von Signalübertragungsvorgängen beeinflusst wird, wäre es denkbar, dass eine Strukturveränderung des δ -

Opioidrezeptors Zellteilungsprozesse induzieren und folgedessen eine Tumorentwicklung hervorrufen könnte.

Da es sich bei dieser Variante unseres Wissens nach um einen bis dato unbekanntem δ - Opioidrezeptor handelte, tragen Überlegungen zur funktionellen Bedeutung dieser δ - Opioidrezeptorvariante zum jetzigen Zeitpunkt noch zwangsläufig einen spekulativen Charakter.

Weiterführende Studien werden sich auf die δ - Opioidrezeptorvariante konzentrieren, um aufzuklären, ob es sich um eine Opioidligandenbindungsstelle handelt und inwieweit sie an der Tumorgenese beteiligt sein kann.

6.2.2 Ergebnisse der Bindungsversuche

6.2.2.1 Nachweis einer spezifischen Bindungsstelle

Bindungen eines Liganden an Zellmembranen können im Prinzip an unspezifischen und spezifischen Bindungsstellen stattfinden.

Charakteristisch für spezifische Bindungsstellen sind eine hohe Affinität des Liganden zu diesen Bindungsstellen, eine begrenzte Konzentration und demnach eine Sättigbarkeit dieser Bindungsstellen.

Außerdem wurden ein zeitgebundener Bindungs-/Assoziationsprozess sowie entsprechend ein Lösungs-/Dissoziationsprozess und somit die Möglichkeit der Verdrängung eines Liganden aus dieser Bindungsstelle durch einen zweiten Liganden („chase experiment“) als Spezifitätsmerkmale beschrieben.

Wie aus unseren Ergebnissen hervorgeht, wies die gefundene Bindungsstelle Bindungscharakteristika, die für eine spezifische Bindung zutreffen, auf. Mit dem δ - Opioidrezeptorliganden (^3H)-DPDPE gelang es uns, diese Bindungsstelle als δ - Opioidrezeptor zu identifizieren und charakterisieren.

Die Bindung wies eine Zeitabhängigkeit auf, die in Form der graphischen Darstellung des Assoziationsprozesses von (^3H)-DPDPE dokumentiert werden konnte. Die Reversibilität der Bindung konnte anhand eines darauffolgenden Dissoziationsprozesses („chase experiment“) aufgezeigt werden.

Ein weiteres Merkmal einer spezifischen Bindung konnte durch die Verdrängungskurven geliefert werden. Nach Zusatz von steigenden Mengen an unmarkiertem DPDPE kam es ab einer bestimmten Konzentration von DPDPE im Ansatz zu keiner weiteren Verdrängung des Radioliganden von seiner Bindungsstelle. Diese Versuche bestätigten zum einen das Vorliegen der Bindungsstelle in einer nur begrenzten Konzentration und erlaubten zum anderen die Berechnung der Bindungsparameter K_D und B_{max} .

Die Gleichgewichtskonstante K_D ist definiert als diejenige Ligandenkonzentration, bei der im Gleichgewichtszustand die Hälfte der verfügbaren Bindungsstellen besetzt ist. Die K_D läßt eine Aussage über die Affinität eines Liganden für eine Bindungsstelle zu. Je höher die Affinität des Liganden zum Binder, desto kleiner ist der Wert der Gleichgewichtskonstanten K_D .

So errechnete sich die K_D für DPDPE an der Bindungsstelle zu 6,2 nM. Dieser Wert spricht für eine hochaffine Bindung und kann somit als weiteres Merkmal für eine spezifische Bindung betrachtet werden.

Mit diesen Befunden haben wir die Bindung von (^3H)-DPDPE an den δ -Opioidrezeptor als eine eindeutig spezifische Ligand- Binder- Interaktion klassifizieren können.

6.2.2.2 Berechnung der Dissoziationskonstanten

Der K_D - Wert der Ligand- Binder- Interaktion wurde als Maß für die Affinität des Liganden zum Binder anhand von zwei verschiedenen Methoden bestimmt.

Zum einen wurde ein K_D - Wert mittels eines iterativen Kurvenanpassungsprogrammes (LIGAND) unter Berücksichtigung statistischer Signifikanzen berechnet, zum anderen wurden Scatchard- Diagramme unter Zuhilfenahme des technisch- wissenschaftlichen Zeichenprogramms ORIGIN erstellt, aus denen die K_D - Werte ohne Berücksichtigung statistischer Signifikanzen abgeleitet wurden.

Die ORIGIN- Methode wurde Zwecks Suche nach weiteren Bindungsstellen eingesetzt, der Ungenauigkeit der Methode wegen konnte jedoch kein Absolutwert für die K_D ermittelt werden.

Im Gegensatz zu den Berechnungen des Computerprogrammes LIGAND, die eine hochaffine ($K_D = 6,2 \times 10^{-9} \text{M}$) Bindungsstelle ermittelten, konnten mittels Scatchard-Analyse im ORIGIN- Programm zwei Bindungsstellen, eine höheraffine ($K_D = 1,6 \times 10^{-7} \text{M}$) und eine niederaffine ($K_D = 3,2 \times 10^{-4} \text{M}$) identifiziert werden. Beide Bindungsstellen wiesen jedoch eine geringere Affinität zu DPDPE auf als die mittels LIGAND ermittelte.

In welcher Beziehung dieses Ergebnis zu den Befunden der Gentechnologie (δ -Opioidrezeptorvariante) in 6.2.2.2 steht, bedarf weiterer Abklärung.

6.2.2.3 Berechnung der Bindungskapazität

Neben der K_D ist die Konzentration an Bindungsstellen im untersuchten System das zweite Charakteristikum eines Bindungsprozesses, welches häufig angegeben wird. Das LIGAND- Programm errechnete aus den erhaltenen Versuchsdaten eine Bindungskapazität von $2 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$. Die Umrechnung dieses Wertes ergibt unter Bezug auf Membranmaterial aus 6×10^6 Zellen pro Ansatz ($100 \mu\text{l}$) eine Anzahl von 1800 Bindungsstellen pro Zelle; ein Materialverlust bei der Membranpräparation in der Größenordnung von 50 bis 80% wurde berücksichtigt. Unter Berücksichtigung der mittels LIGAND berechneten Bindungskapazitäten von $2 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$ und der im Ansatz durchschnittlich vorliegenden Proteinkonzentration von 12 mg Protein pro ml bzw. unter Berücksichtigung der Bindungskapazität von $2 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$, der K_D von $6,2 \times 10^{-9} \text{M}$ und der (^3H)-DPDPE- Bindung pro Ansatz errechnet sich eine Bindungsstellen- Dichte von 10 fmol Bindungsstellen pro 1 mg Protein.

Diese geringe Anzahl an Bindungsstellen pro Zelle ist kompatibel mit den geringen Ausbeuten, die bei der Bestimmung der spezifischen Bindung von (^3H)-DPDPE an die Membranen der Melanomzelllinien beobachtet wurden: Die gemessenen Werte überschritten selten eine spezifische Bindung von 1% der Gesamtradioaktivität im Ansatz.

Die berechneten Werte liegen unter den in der Literatur publizierten Werten: 18000 Bindungsstellen pro Zelle (PRATHER et al., 1994) beziehungsweise 43 fmol Bindungsstellen pro mg Protein (BARNARD et al., 1983). Hierbei ist zu

berücksichtigen, dass die in der Literatur berichteten Werte mit ganz anderer Methodik und an ganz anderen Zellsystemen bestimmt wurden.

6.2.3 Existenz und Bedeutung opioiderger Systeme der Haut für Melanozytenfunktionen

Mit dem Nachweis des δ - Opioidrezeptors auf G-361- und COLO 679- Zellen wurde zum ersten Mal ein Opioidrezeptor für Endorphine und Enkephaline auf Melanozyten nachgewiesen. Es ist der zweite Opioidrezeptor neben dem μ - Opioidrezeptor auf Keratinozyten, der auf Hautzellen gefunden wurde.

Die neuesten Erkenntnisse stammen von der Arbeitsgruppe KAUSER et al. (2003), die entgegen unseren Untersuchungsergebnissen (MAYER et al., 2000) über die Expression des μ - Opioidrezeptors auf mRNA- und Proteinebene in nativen Melanozyten berichteten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sie mit Melanozyten arbeiteten, die aus Hautpräparaten stammten. Kontaminationen mit Keratinozyten, auf denen μ - Opioidrezeptoren nachgewiesen wurden (BIGLIARDI et al., 1998) können also nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Ergänzend konnte von ihnen gezeigt werden, dass POMC- mRNA in kultivierten menschlichen Melanozyten und β -Endorphin in Glykoprotein 100- positiven Melanozyten exprimiert werden.

POMC- Derivate sind bedeutsam bei der Regulation der Melanozytenproliferation, der Melanogenese und der Haut- und Haarpigmentierung.

Für die POMC- Derivate α -MSH und ACTH konnte anhand mehrerer Arbeiten gezeigt werden, dass sie sowohl an der Regulation der Melanozytenproliferation, Melanogenese und Hautpigmentation (HUNT et al., 1994a,b,c; SUZUKI et al., 1996 und WAKAMATSU et al., 1997) als auch an der Regulation der Haarfollikelpigmentation (LOGAN and WEATHERHEAD, 1981; BURCHILL et al., 1993) beteiligt sind.

Laut den Untersuchungen von KAUSER et al. (2003) soll β -Endorphin ebenfalls eine wichtige Rolle in der Melanozytenproliferation, Melanogenese und Hautpigmentation spielen. Ergänzend konnte TOBIN (2003) die Expression des μ - Opioidrezeptors in

menschlichen Melanozyten der Haarfollikel nachweisen und somit eine Beteiligung des β -Endorphins an der Haarpigmentation nicht ausschließen.

POMC- Derivate, wie α -MSH und ACTH sollen über den c-AMP Regulationsweg die Differenzierung der Melanozyten und die Melanogenese beeinflussen. Die UV-Strahlung, die u.a. zu Zerstörungen in der Haut führen kann, ist als ein „Stressfaktor“ der Haut aufzufassen. In den Melanozyten bewirkt dieser Reiz eine Förderung der Melanozytenproliferation, Melanogenese und Hautpigmentation entweder direkt durch eine Veränderung an der DNA durch die UV- Strahlung oder, was neuerdings diskutiert wird, indirekt durch eine parakrine Regulation mit Beteiligung der Keratinozyten (BUSCA and BALOTTI, 2000).

In den Keratinozyten wurde nach UV-Bestrahlung eine Erhöhung der POMC- bzw. β -Endorphin- Produktion verzeichnet (LEVINS et al., 1993; WINTZEN et al., 1995).

Die Expression von POMC- Derivaten konnte sowohl in gesunder als auch in pathologisch veränderter Haut nachgewiesen werden.

Da β -Endorphin, α -MSH und ACTH in geschädigten Zellen der Haut stärker exprimiert wurden, vermutet man, dass sie an der Regulation verschiedener Entzündungsreaktionen (SLOMINISKI et al., 1993b) und an der Entstehung von Hauttumoren und Entwicklung der Tumorprogression beteiligt sein könnten

Eine Arbeit von SLOMINSKI (1998) zeigt, dass die POMC- Abkömmlinge β -Endorphin, ACTH und α -MSH in menschlichen Melanozyten und Melanomzellen vorkommen. NAGAHAMA et al. (1998) gehen sogar von einer möglichen Beteiligung der POMC- Derivate α -MSH, ACTH und β -Endorphin an der Regulation der Melanomentwicklung aus. In ihren Untersuchungen ließen sich α -MSH, ACTH und β -Endorphin verglichen mit benignen Naevuszellen vermehrt in malignen Melanomzellen darstellen.

Sowohl die Funktion der Opioidrezeptoren als auch diejenige eventuell in den Melanozyten produzierten Opioidpeptide in der Haut bedürfen insbesondere hinsichtlich der Tumorphathogenese noch der weiteren Abklärung.

Der Mechanismus, der zum Transport der melaninhaltigen Melanosomen aus den Melanozyten in die Keratinozyten nötig ist, ist noch nicht genau aufgeklärt.

Die Tatsache, dass sowohl in Keratinozyten als auch in Melanozyten opioiderge Systeme exprimiert werden, stellt zumindest die Basis für einen möglichen

autokrinen oder parakrinen Mechanismus zur Regulation der Melanozytenfunktionen dar. Melanozyten könnten zum Beispiel über Keratinozyten in weitere Funktionen opioidergere Systeme integriert sein. Opioidpeptide könnten dabei eine der funktionellen Verbindungen zwischen Keratinozyten und Melanozyten darstellen, über die KIPPENBERGER et al. (1998) berichtet haben.

Ob und inwieweit die opioidergen Systeme funktionelle Bindeglieder zwischen Haut, Immunsystem und Nervensystem darstellen, kann man noch nicht genau sagen. Interaktionen zwischen der Haut und dem Immunsystem sowie zwischen dem Immunsystem und dem Nervensystem sind jedenfalls schon länger bekannt, und die Nachweise für eine Interaktion des Nervensystems mit der Haut durch Neuropeptide nehmen zu.

Opioiderge Systeme nehmen eine wichtige Funktion in der Physiologie und Pathologie der Haut ein.

Die Expression von Opioidrezeptoren in der Haut spricht für eine Beteiligung der Opioidpeptide u.a. in der Pathogenese von Hauterkrankungen, in der Zelldifferenzierung, in der Entwicklung von Hauttumoren, in der Melanogenese, in der Haut- und Haarpigmentierung und in der Sinneswahrnehmung. Außerdem wird durch derartige Hypothesen eine Kommunikation zwischen den Melanozyten und Keratinozyten über Opioidpeptide nicht ausgeschlossen.

Mit der Entdeckung des δ - Opioidrezeptors in Melanozyten ist es uns gelungen, das opioiderge System in der menschlichen Haut zu ergänzen und einen weiteren Beitrag zur Interaktion der Haut mit dem Nervensystem zu leisten.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Opioidrezeptoren und endogene Opioide werden auch als opioiderge Systeme zusammengefaßt, die nach heutigen Erkenntnissen vorwiegend im zentralen und im peripheren Nervensystem vorkommen. Eine Reihe von Befunden deutet jedoch darauf hin, dass sowohl Opioide als auch ihre Rezeptoren in der Haut existieren. Hierzu zählen insbesondere

- die Entdeckung hochselektiver δ - Opioidrezeptorliganden (Deltorphine) in der Froschhaut (KREIL et al., 1989)
- die Expression von POMC, dem Precursormolekül einiger Opioidpeptide, in Keratinozyten (BHARDWAJ et al., 1994)
- Hinweise auf eine Freisetzung von β -Endorphin aus Keratinozyten (WINTZEN et al., 1996)
- die Expression des μ -Opioidrezeptors in Keratinozyten (BIGLIARDI et al., 1998)
- die Entdeckung spezifischer Bindungsstellen für β - Endorphin auf Keratinozyten (EGELING et al., 1999)

Dabei beziehen sich die heutigen Erkenntnisse im wesentlichen nur auf die Keratinozyten. Eine Interaktion anderer Hautzellen mit opioidergen Systemen wurde noch nicht eingehend untersucht. Die vorliegende Arbeit sollte der Gewinnung neuer Erkenntnisse über opioiderge Systeme in der Haut dienen und bestehende Befunde weiter aufklären beziehungsweise ergänzen. Wir entschieden uns, die Hautzellen des Pigmentsystems, die Melanozyten, für unsere Arbeit heranzuziehen, um so einen anderen Sektor der Haut in Bezug auf opioiderge Systeme zu erschließen. Aus methodischen Gründen wurden Melanomzelllinien für die Versuche herangezogen. Die Melanomzelllinien G-361 und COLO 679 sollten auf eine Expression von μ -, κ - und δ - Opioidrezeptoren geprüft werden.

In der Tat konnte mittels RT- PCR die mRNA des δ -Opioidrezeptors in beiden Melanomzelllinien nachgewiesen werden.

Zusätzlich zum PCR- Amplifikat des δ - Opioidrezeptors wurde ein weiteres PCR- Produkt mit einer um circa 150 bp verkürzten Länge der erwarteten δ - Opioidrezeptorsequenz beobachtet.

Untersuchungen von MAYER et al. (2000) deuteten darauf hin, dass in diesen Melanomzelllinien weder eine Expression des μ - Opioidrezeptors noch des κ - Opioidrezeptors stattfand.

Die Existenz von Translationsprodukten, d.h. von μ -, κ - und δ - Opioidrezeptoren auf Membranebene wurde mittels Radiorezeptor- Bindungsversuchen geprüft. Die Versuche wurden mit Membransuspensionen der Melanomzelllinie G-361 unter Einsatz Tritium- markierter, hochselektiver Liganden für μ -, κ -, und δ - Opioidrezeptoren durchgeführt.

Für den selektiven δ - Opioidrezeptorliganden (^3H)-DPDPE konnte eine spezifische Bindung auf Membranen der Zelllinie G-361 aufgezeigt werden. Diese überschritt jedoch nicht 1% der Gesamtradioaktivität im Ansatz. Den gentechnologischen Ergebnissen entsprechend konnte weder für den μ - Opioidrezeptoragonisten (^3H)-DAMGO, noch für den κ - Opioidrezeptoragonisten (^3H)-U 69 593 eine spezifische Bindung auf Melanomzellmembranen nachgewiesen werden.

Die Bindung von (^3H)-DPDPE an den δ - Opioidrezeptor entsprach den klassischen Kriterien einer spezifischen Ligand- Binder- Interaktion. Mittels Radiorezeptor- Bindungsversuchen gelang die Charakterisierung dieser Bindungsstelle.

Für die Interaktion zwischen (^3H)-DPDPE und den δ - Opioidrezeptor konnten zum einen die Bindungscharakteristika:

- Zeitabhängigkeit
- Reversibilität und
- Sättigbarkeit

beschrieben werden. Zum anderen konnte aus Verdrängungsexperimenten eine K_D berechnet werden, die eine

- Hohe Affinität

anzeigte.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein δ - Opioidrezeptor in der menschlichen Haut existiert. Dieses Ergebnis stellt somit einen weiteren Beweis für die Existenz opioidergere Systeme in der Haut dar.

**VERÖFFENTLICHUNGEN, IN DIE TEILE DER VORLIEGENDEN
DISSERTATIONSSCHRIFT EINGEGANGEN SIND:**

Publikation

MAYER, P.; TISCHMEYER, H.; JAYASINGHE, M.; BONNEKOH, H.; GOLLNICK, H.;
TESCHEMACHER, H.J.; HÖLLT, V.:

A δ opioid receptor lacking the third cytoplasmic loop is generated by atypical mRNA
processing in human malignomas.

FEBS Letters 480, 156-160 (2000)

Kongressbeiträge:

MAYER, P.; TISCHMEYER, H.; JAYASINGHE, M; TESCHEMACHER, H.; HÖLLT,
V.:

A delta opioid receptor lacking the third cytoplasmic loop is generated in human
malignomas.

31st International Narcotics Research Conference (INRC) 2000, Seattle, WA, USA

MAYER, P.; TISCHMEYER, H.; JAYASINGHE, M; TESCHEMACHER, H.; HÖLLT,
V.:

A delta opioid receptor lacking the third cytoplasmic loop is generated in human
malignomas.

Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2000, Berlin;

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 362 (Suppl.): R20, 2000

8 SUMMARY

δ opioid receptors, along with μ and κ , belong to the family of neuropeptide receptors which respond to endogenous opioid peptides. They are mainly found in the central and in the peripheral nervous system. The skin appears to contain such opioidergic systems as well. Highly selective δ opioid receptor ligands called deltorphins have been detected in amphibian skin (KREIL et al., 1989) and recently the presence of opioid receptors in human keratinocytes has been reported (BIGLIARDI et al., 1998) as well as the release of β - Endorphin from keratinocytes (WINTZEN et al., 1996). In addition, mRNA for proopiomelanocortin, the precursor of endorphins, was found in keratinocytes (BHARDWAJ et al., 1994). Furthermore non-opioid binding sites for β - Endorphin became evident on human keratinocytes (EGELING et al., 1999).

We searched for the expression of the three opioid receptors types, μ , δ and κ in human melanocytes.

Two melanoma cell lines, G- 361 and COLO 679, were screened by RT- PCR for the presence of opioid receptor mRNA. PCR amplification of melanocyte cDNA revealed the presence of δ opioid receptor message in both melanoma cell lines. The two other classes of opioid receptors, μ and κ , were absent (MAYER et al., 2000).

In the melanoma cells an additional shorter form of the wild type δ opioid receptor cDNA was detected by RT-PCR.

The presence of functional opioid receptors on pigment cells was demonstrated by radioligand binding studies. They were performed with membranes of G-361 melanoma cells, and tritium- labeled opioid agonists selective for μ , δ and κ receptors were employed.

A highly selective δ opioid receptor ligand, (^3H)- DPDPE, displayed specific binding to crude membrane preparations of G-361 cells, whereas selective μ or κ receptor ligands (^3H)- DAMGO and (^3H)- U69593 did not. (^3H)- DPDPE binding did not exceed 1% of the total radioactivity present in the incubates.

(^3H)- DPDPE binding to the δ opioid receptor on G-361 membranes was time-dependent, reversible, and saturable. Moreover radioligand competition studies revealed a dissociation constant K_D showing high- affinity.

9 LITERATURVERZEICHNIS

ARCHELOS, J.; XIANG, J.Z., REINECKE, M., LANG, R.E.: Regulation of release and function of neuropeptides in the heart.
J Cardiovasc Pharmacol., 10, 45-50 (1987)

ATWEH, S.F.; KUCHAR, M.J.: Distribution and physiological significance of opioid receptors in the brain.
Br. Med. Bull. 39, 47-52 (1983)

AUGUSTIN, L.B.; FLESHEIM, R. F.; MIN, B.H.; FUCHS, S.M.; FUCHS, J.A.; LOH, H. H. : Genomic structure of the mouse δ -opioid receptor gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 207, 111-119 (1995)

BEFORT, K.; MATTEI, M.-G.; ROECKEL, N.; KIEFFER, B.: Chromosomal localization of the δ -opioid receptor gene to human 1p34,3- p36,1 and mouse 4D bands by in situ hybridization.
Genomics 20, 143-145 (1994)

BEFORT, K.; TABBARA, L.; KLING, D.; MAIGRET, B.; KIEFFER, B.: Role of aromatic transmembrane residues of the delta-opioid receptor in ligand recognition.
J. Biol. Chem. 271, 10161-10168 (1996)

BARNARD, E.A. and DEMOLIOU-MASON, C.: Molecular properties of opioid receptors.
Br. Med. Bull. 39, 37-45 (1983)

BHARDWAJ, R.S. and LUGER, T.A.: Proopiomelanocortin production by epidermal cells: evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis.
Arch. Dermatol. Res. 287, 85-90 (1994)

BIGLIARDI, P.L.; BIGLIARDI-QI, M.; BUECHNER, S.; RUFLI, T.: Expression of μ -Opiate Receptor in human epidermis and keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 111, 297-301 (1998)

BIGLIARDI, P.L.; BUECHNER, S.; RUFLI, T.; BIGLIARDI-QI, M.: Specific stimulation of migration of human keratinocytes by μ -opiate receptor agonists.
Journal of receptors and signal transduction 22, 191-199 (2002)

BRANTL, V., and TESCHEMACHER, H.: Opioids in milk.
Trends Pharmacol. Sci. 4, 193 (1983)

BRAUN-FALCO, O.; PLEWIG, G.; WOLFF, H.H.: Dermatologie und Venerologie, Auflage 4, Springer- Verlag Berlin, pp. 913-916, 1345-1346

BROCCARDO, M.; ERSPAMER, V.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.; IMPROTA, G.; LINARI, G.; MELCHIORRI, P., and MONTECUCCHI, P.C.: Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin.
Brit. J. Pharm. 73, 625-631 (1981)

- BRUNS, R.W.; LAWSON-WENDLING, K. and PUGSLEY, T.A.: A rapid filtration assay for soluble receptors using polyethylenimine-treated filters. *Anal. Biochem.* 132, 74-81 (1983)
- BURCHILL, S.A.; ITO, S.; THODY, A.J.: Effects of melanocyte-stimulating hormone on tyrosinase expression and melanin synthesis in hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.* 137,189-195 (1993)
- BURT, D.R.: Criteria for receptor identification. In: *Neurotransmitter Receptor Binding*. Eds.: YAMAMURA, H.I.; ENNA, S.J. and KUHAR, M.J.; Raven Press, New York(1978), pp 41-55
- BUSCA, R.; BALOTTI, R.: Cyclic AMP a key messenger in the regulation fo skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 13, 60-69 (2000)
- CEPEDA, M.S.; LIPKOWSKI, A.W.; LANGLADE, A.; OSGOOD, P.F.; EHRLICH, H.P.; HARGREAVES, K.; SZYFELBEIN, S.K.; CARR, D.B.: Local increases of subcutaneous β -endorphin immunoactivity at the site of thermal injury. *Immunopharmacology* 25, 205-213 (1993)
- CHAKRABORTY, A.; PAWELEK,J.: MSH receptors in immortalized human epidermal keratinocytes: a potential mechanism for coordinate regulation of the epidermal-melanin unit. *J. Cell. Physiol.* 157, 1366-1367 (1993)
- CHAMOUIARD, P.; KLEIN, A.; MARTIN, E.; ADLOFF, M.; ANGEL, F.: Regulatory role of enteric kappa opioid receptors in human colonic motility. *Life Sci.* 53, 1149-1156 (1993)
- CHAVKIN, C.; JAMES, I.F. ; GOLDSTEIN, A.: Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 215, 413-415 (1982)
- CHEN, Y.; MESTEK, A.; LIU,J.; HURLEY, J.A.; YU. L.: Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44, 8-12 (1993a)
- CHEN, Y.; MESTEK, A.; LIU,J.; YU. L.: Molecular cloning of a rat κ -opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors. *Biochem. J.* 295, 625-628 (1993b)
- CHENG, P.Y.; WU, D.; DECENA, H.; SOONG, Y.; McCABE, S. and SZETO, H.H.: Opioid- induced stimulation of fetal respiratory activity by (D-Ala²)deltorphin I. *Eur. J. Pharmacol.* 230, 85-88 (1993)
- COOP, A. and RICE, K.C.: Role of δ -Opioid Receptors in Biological Process. *Drug News Perspect* 13, 481-487 (2000)

COWAN, A.; ZHU, X.Z.; MOSBERG, H.I.; OMNAAS, J.R. and PORRECA, F.: Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 950-955(1988)

DHAWAN, B.N.; CESSELIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T.; BRADLEY, P.B.; PORTOGHESE, P.S. and HAMON, M.: International Union of Pharmacology XII classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.* 48, 567-592 (1996)

DORES, R.M.; KHACHATURIAN, H.; WATSON, S.J.; AKIL, H.: Localization of neurons containing pro-opiomelanocortin-related peptides in the hypothalamus and midbrain of the lizard, *Anolis carolinensis*: evidence for region-specific processing of beta-endorphin. *Brain. Res.* 324, 384-389 (1984)

EGELING, K.; MÜLLER, H.; KARSCHUNKE, B.; TSCHISCHKA, M.; SPENNEMANN, V.; HAIN, B.; TESCHEMACHER, H.: Specific binding sites for β -endorphin on keratinocytes. *Ann. NY Acad. Sci.* 885, 464-465 (1999)

EVANS, C. J.; KEITH, D. E.; MORRISON, H.; MAGENDZO, K., and EDWARDS, R.H.: Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952-1955 (1992)

FUKUDA, K.; KATO, S.; MORI, K.; NISHI, M. and TAKESHIMA, H.: Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ - and μ - subtypes. *FEBS Letters* 327, 311-314 (1993)

GATES, M., and TSCHUDI, G.: The synthesis of morphine. *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 1109-1114 (1952)

GAWKRODGER, D.J.: *Dermatology: An Illustrated Colour Text*, 2nd Livingstone, New York, 1997, p. 2

GLINSKI, W.; BRODECKA, H.; GLINSKA-FERENZ, M.; KOWALSKI, D.: Neuropeptides in psoriasis: possible role of beta-endorphins in the disease. *Int. J. Dermatol.* 33, 356-360, (1994)

GLINSKI, W.; BRODECKA, H.; GLINSKA-FERENZ, M.; KOWALSKI, D.: Increased concentrations of beta-endorphins in the sera of patients with severe atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venereol.* 75, 9-11 (1995)

GOLDSTEIN, A.; TACHIBANA, S.; LOWNEY, L.I.; HUNKPILLER, M., and HOOD, L.: Dynorphin (1-13)- an extraordinary potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 6666-6670 (1979)

GUIRAMAND, J.; MONTMAYEUR, J.P.; CERVALINE, J.; BHATIA, M.; BORRELLI, E.: Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 7354-7358 (1995)

GULLAND, J. M., and ROBINSON, R.: The morphine group. Part I. A discussion of the constitutional problem.
J. Chem. Soc. 123, 980-987 (1923)

HERZ, A.: Opiode und das Schmerzgeschehen.
Internist, 27, 412-417 (1986)

HÖLLT, V.: Regulation of Opioid Peptide Gene Expression.
In: Handb. Exp. Pharmacol., Vol. 104/I, Opioids I (1983). Eds.: HERZ, A.; AKIL, H.; SIMON, E.J.; Springer Berlin, pp. 307-346

HUGHES, J.; SMITH, T.; KOSTERLITZ, H.; FOTHERGILL, L.; MORGAN, B., and MORRIS, H.: Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity.
Nature 258, 577-579 (1975)

HUNT, G.; DONATIER, P.D.; LUNEC, J.; TODD,C.; KYNE, S.; THODY, A.J.: Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH.
Fig. Cell Res. 7, 217-221 (1994a)

HUNT, G.; TODD,C.; CRESSWELL,J.E.; THODY, A.J.: Alpha- melanocyte stimulating hormone and its analogue Nlc4DPhe7 alpha- MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes.
J. Cell. Sci. 107, 205-211 (1994b)

HUNT, G.; TODD,C.; KYNE, S.; THODY, A.J.: ACTH stimulates melanogenesis in cultured human melanocytes.
J. Endocrinol. 140, R1-R3, (1994c)

INTORRE, L.; MENGOZZI, G.; VANNI, E.; GRASSI, F.; SOLDANI, G.: The role of peripheral opioid receptor subtypes in the modulation of gastric acid secretion and plasma gastrin in dogs.
Eur. J. Pharmacol. 243, 265-273 (1993)

JIANG, Q.; TAKEMORI, A.E.; SULTANA, M.; PORTOGHESE, P.S.; BOWEN, W.D.: Differential antagonism of δ -opioid antinociception by (D-Ala², Leu⁵, Cys⁶)-enkephalin and 5'-naltrindole isothiocyanate (5'-NTII): evidence for δ receptor subtypes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 257, 1069-1075 (1991)

KAUSER, S.; SCHALLREUTER, K.U.; THODY, A.J.; GUMMER, C.; TOBIN, D.J.: Regulation of human epidermal melanocyte biology by beta- endorphin.
J. Invest. Dermatolol. 120, 1073-1080 (2003)

KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M.E.; ALESSI, N.E.; WATSON, S.J.: Time of origin of opioid peptide-containing neurons in the rat hypothalamus.
J. Comp. Neurol. 236, 538-546 (1985)

KIEFFER, B.L.: Molecular Aspect of Opioid Receptors
In: Handb. Exp. Pharmacol., Vol. 104/I, Opioids I (1995). Eds.: HERZ, A.; AKIL, H.; SIMON, E.J.; Springer Berlin, pp. 281-303

KIEFFER, B.L.; BEFORT, K.; GAVERIAUX-RUFF, C., and HIRTH, C.G.: The δ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 12048-12052 (1992)

KIPPENBERGER, S.; BERND, A.; BEREITER-HAHN, J.; RAMIREZ-BOSCA, A.; KAUFMANN, R.: The mechanism of melanocyte dendrite formation: the impact of differentiating keratinocytes.

Pigment Cell Res. 11, 34-37 (1998)

KNAPP, R.J.; MALATYNSKA, E.; FANG, L.; LI, X.; BABIN, E.; NGUYEN, M.; SANTORO, G.; VARGA, E.V.; HRUBY, V.J.; ROESKE, W.R. and YAMAMURA, H.I.: Identification of a human delta opioid receptor: Cloning and expression.

Life Sci. 54, 463-469 (1994)

KOCH, T.; KROSLAK, T.; MAYER, P.; RAULF, E.; HÖLLT, V.: Site mutation in the rat mu-opioid receptor demonstrates the involvement of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase 2 in agonist-mediated desensitization.

J. Neurochem. 69, 1767-1770 (1997)

KONG, H.; RAYNOR, K.; YANO, H.; TAKEDA, J.; BELL, G. I., and REISINE, T.: Agonists and antagonists bind to different domains of the cloned κ opioid receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8042-8046 (1994)

KREIL, G., BARRA, D., SIMMACO, M., ERSPAMER, V., ERSPAMER, G.F., NEGRI, L.; SEVERINI, C., CORSI, R., MELCHIORI, P.: Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors.

Eur. J. Pharmacol. 162, 123-128 (1989)

LAZARUS, L. H.; BRYANT, S.D.; COOPER, P.S.; SALVADORI, S.: What peptides these deltorphins be.

Prog. Neurobiol. 57, 377-420 (1999)

LEVINS, P.C.; CARR, D.B.; FISHER, J.E.; MOMTAZ, K.; PARRISH, J.A.: Plasma beta- endorphin and beta- lipoprotein response to ultraviolet radiation.

Lancet ii:166 (1983)

LI, C.H.; CHUNG, D.; DONEEN, B.A.: Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands.

Biochem. Biophys. Res. Com. 72, 1542-1547 (1976)

LOGAN, A.; WEATHERHEAD, B.: Effects of alpha- melanocyte- stimulating hormone and (8-arginine)-vasotocin upon melanogenesis in hair follicle melanocytes in vitro.

J. Endocrinol. 91, 501-501 (1981)

LORD, J.A. H.; WATERFIELD, A.A.; HUGHES, J.; and KOSTERLITZ, H.W.: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors.

Nature 267, 495-499 (1977)

LOWRY, O.J.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.: "Protein assay"

J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

LUNDBERG, J.M.; HAMBERGER, B.; SCHULTZBERG, M.; HOKFELT, T.; GRANBERG, P.O.; EFENDIC, S.; TERENIUS, L.; GOLDSTEIN, M.; LUFT, R.: Enkephalin- and somatostatin-like immunoreactivities in human adrenal medulla and pheochromocytoma.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4079-4083 (1979)

MANSOUR, A.; THOMPSON, R.C.; AKIL, H.; WATSON, S.J.: Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA.

J. Chem. Neuroanat. 6, 351-62 (1993)

MARTIN, R.; EADES, C.G.; THOMPSON, J.A.; HUPPLER, R.E., and GILBERT, P.E.: The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 517-532 (1976)

MATTHES, H.W.D.; SMADJA, C.; VALVERDE, O.; VONESCH, J.-L.; FOUTZ, A.S.; BOUDINOT, E.; DENAVIT-SAUBIE, M.; SEVERINI, C.; NEGRI, L.; ROQUES, B.P.; MALDONADO, R. and KIEFFER, B.L.: Activity of the δ - opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the κ -receptor is maintained in mice lacking the μ -receptor.

J. Neurosci. 18, 7285-7295 (1998)

MATTIA, A.; VANDERAH, T.; MOSBERG, H.I.; PORRECA, F.: Lack of antinociceptive cross-tolerance between [D-Pen²,D-Pen⁵]-Enkephalin and [D-Ala²]-deltorphin II in mice: evidence for delta receptor subtypes.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 258, 583-587 (1991)

MAYER, P.; TISCHMEYER, H.; JAYASINGHE, M.; BONNEKOH, H.; GOLLNICK, H.; TESCHEMACHER, H.J.; HOLLT, V.: A δ opioid receptor lacking the third cytoplasmic loop is generated by atypical mRNA processing in human malignomas.

FEBS Letters 480, 156-160 (2000)

MENG, F.; UEDA, Y.; HOVERSTEN, M.T.; THOMPSON, R.C.; TAYLOR, L.; WATSON, S.J.; AKIL, H.: Mapping the receptor domains critical for the binding selectivity of delta-opioid receptor ligands.

Eur. J. Pharmacol. 311, 285-292 (1996)

MOLLEREAU, C.; PARMENTIER, M.; MAILLEUX, P.; BUTOUR, J.L.; MOISAND, C.; CHALON, P.; CAPUT, D.; VASSART, G. and MEUNIER, J.C.: ORL₁, a novel member of the opioid receptor family: Cloning, functional expression and localization.

FEBS Letters 329, 33-38 (1994)

MONTECUCCHI, P. C.; de CASTIGLIONE, R. and ERSPAMER, V.: Identification of dermorphin and Hyp6-dermorphin in skin extracts of the Brazilian frog *Phyllomedusa rhodei*.

Int. J. Pept. Protein Res. 17, 316-321 (1981)

MONTMAYEUR, J.P.; GUIRAMAND, J.; BORRELLI, E.: Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins.

Mol. Endocrinol. 7, 161-170, (1993)

MOSBERG, H.I.; HURST, R.; HRUBY, V.J.; GEE, K.; AKIYAMA, K.; YAMAMURA, H.I. and BURKS, T.F.: Cyclic penicillamine containing enkephalin analogs display profound delta receptor selectivities.
Life Sci. 33, 447-450 (1983a)

MOSBERG, H.I.; HURST, R.; HRUBY, V.J.; GEE, K.; YAMAMURA, H.I.; GALLIGAN, J.J. and BURKS, T.F.: Bis-penicillamine enkephalin possess highly improved specificity toward δ -opioid receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5871-5874 (1983b)

MOZZANICA, N.; VILLA, M.L.; FOPPA, S.; VIGNATI, G.; CATTNEO, A.; DIOTTI, R.; FINZI, A.F.: Plasma α -melanocyte-stimulating hormone, β -endorphin, met-enkephalin, and natural killer cell activity in vitiligo.
J. Am. Acad. Dermatol. 26, 693-700, (1992)

MUNSON, P.J.; RODBARD, D.: LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems.
Anal. Biochem. 107, 220-239 (1980)

NAGAHAMA, M.; FUNASAKA, Y.; FERNANDEZ-FREZ, M.L.; OHASHI, A.; CHAKRABORTY, A.K.; UEDA, M.; ICHIHASHI, M.: Immunoreactivity of alpha-melanocyte-stimulating hormone adrenocorticotrophic hormone and beta-endorphin in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi.
BrJ. Dermatol. 138,981-985, (1998)

NISSEN, J.B.; KRAGBALLE, K.: Enkephalins modulate differentiation of normal human keratinocytes in vitro.
Exp. Dermatol. 6, 222-229 (1997)

NOCK, B.; GIORDANO, A.L.; MOORE, B.W., and CICERO, T.J.: Properties of the putative epsilon receptor: identification in rat, guinea pig, cow, pig and chicken brain.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 264, 349-359 (1993)

ORWOLL, E.S.; KENDAL, J.W.: Beta-endorphin and adrenocorticotropin in extrapituitary sites: gastrointestinal tract.
Endocrinology 107, 438-442 (1980)

PATERSON, S.J.; ROBSON, L.E.; KOSTERLITZ, H.W.: Classification of opioid receptors.
In: Opioid peptides. Ed.: HUGHES, J.; Churchill Livingstone, London (1983), pp 31-36

PAUL, D., BODNAR, R.J.; GISTRAK, M.A.; PASTERNAK, G.W.: Different μ -receptor subtypes mediate spinal and supraspinal analgesia in mice.
Eur. J. Pharmacol. 168, 307-314 (1989)

PEER, G.; KIVITY, S.; AGAMI, O.; FIREMAN, E.; SILVERBERG, D.; BLUM, M.; LAINA, A.: Randomized crossover trial of naltrexone in uraemic pruritus.
Lancet 348, 1552-1554 (1996)

- PERT, C.B., and SNYDER, S.H.: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014 (1973)
- PFEIFFER, A.; PASI, A.; MEHRAEIN, P.; HERZ, A.: Opiate receptor binding sites in human brain. *Brain. Res.* 248, 87-96 (1982)
- PITTIUS, C.W.; KLEY, N.; LOEFFLER, J.P.; HOLLT, V.: Proenkephalin B messenger RNA in porcine tissues: characterization, quantification, and correlation with opioid peptides. *J. Neurochem.* 48, 586-592 (1987)
- PORTOGHESE, P.S.; SULTANA, M.; NAGASE, H. and TAKEMORI, A.E.: Application of the message- address concept in the design of highly potent and selective non-peptide δ - opioid receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 31, 281-282 (1988)
- PRATHER, P.L.; MCGINN, T.M.; ERICKSON, L.J.; EVANS, C.J.; LOH, H.H. and LAW, P.-Y.: Ability of δ - Opioid Receptors to Interact with Multiple G-proteins Is Independent of Receptor Density *J. Biol.Chem.* 269, 21293-21302 (1994)
- PROBST, W.C.; SNYDER, L.A.; SCHUSTER, D.I.; BROSIUS, J.; SEALFON, S.C.: Sequence alignment of the G-protein-coupled receptor superfamily. *DNA and cell biol.* 11, 1-20 (1992)
- QUIRON, R.; CHICHEPORTICHE, R.; CONTRERAS, P. C.; JOHNSON, K.M.; LODGE, D.; TAM, S. W.; WOODS, J. H. and ZUKIN, S.R.: Classification and nomenclature of phencyclidine and sigma receptor sites. *Trends Neurosci.* 10, 444-446 (1987)
- QUOCK, R.M.; BURKEY, T.H.; VARGA, E.; HOSOHATA, Y.; HOSOHATA, K.; COWELL, S.M.; SLATE, C.A.; EHLERT, F.J.; ROESKE, W.R. and YAMAMURA, H.I.: The δ -Opioid Receptor: Molecular Pharmacology, Signal Transduction, and the Determination of Drug Efficacy. *Pharmacol. Rev.* 51, 503-532 (1999)
- REISINE, T. and PASTERNAK, G.: Opioid analgesics and antagonists. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*; 9th Edition. Eds.: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G.; McGraw-Hill (1996); pp. 521-555
- REPP, H.: Charakterisierung und optische Darstellung der Bindung von Dendrotoxin, einer Komponente des Schlangengiftes der Blattgrünen Mamba, an peripheren Nervenmembranen
Dissertation, FB Humanmedizin der JLU Giessen (1990)
- RUEGG, U.G.; HILLER, J.M.; SIMON, E.J.: Solubilization of an active opiate receptor from *bufo marinus* *Europ. J. Pharmacol.* 64, 367-368 (1980)

- SCATCHARD, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. NY Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)
- SCHAUER, E.; TRAUTINGER, F.; KOECK, A. et al.: Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes.
J. Clin. Invest. 93, 2258-2262 (1994)
- SERTÜRNER, F. W. A.: Säure im Opium.
J. Pharmacie Erfurt 13, 229-243 (1805)
- SHAHABI, N.A.; BOST, K.L.; MADHOK, T.C.; SHARP, B.M.: Characterization of antisera to the naloxone-insensitive receptor for beta-endorphin on U937 cells generated by using the complementary peptide strategy.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 263, 876-883 (1992)
- SHELDON, R.J.; RIVIERE, P.J.; MALARCHIK, M.E.; MOSBERG, H.I.; BURKS, T.F. and PORRECA, F.: Opioid regulation of mucosal ion transport in the mouse isolated jejunum.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 253, 144-151 (1990)
- SHOOK, J. E.; KAZMIERSKI, W.; WIRE, W. S.; LEMCKE, P.K.; HRUBY, V. J., and BURKS, T.F.: Opioid receptor selectivity of β -Endorphin in vitro and in vivo: mu, delta and epsilon receptors.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 246, 1018-1025 (1988)
- SIBINGA, N. E.S., and GOLDSTEIN, A.: Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune systems.
Ann. Rev. Immunol. 6, 219-249 (1988)
- SIMON, E.J. and GIOANNINI, T.L.: Opioid Receptor Multiplicity: Isolation, Purification, and Chemical Characterization of Binding Sites.
In: Handb. Exp. Pharmacol., Vol. 104/1, Opioids I (1993). Eds.: HERZ, A.; AKIL, H.; SIMON, E.J.; Springer Berlin, pp. 3-26
- SIMON, E. J., HILLER, J.M., and EDELMAN, I.: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (^3H)-Etorphine to rat-brain homogenate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1974-1949 (1973)
- SIMONIN, F.; BEFORT, K.; GAVERIAUX-RUFF, C.; MATTHES, H.; NAPPEY, V.; LANNES, B.; MICHELETTI, G.; KIEFFER, B.: The human δ -opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression and distribution in human brain.
Mol. Pharmacol. 46, 1015-1021 (1994)
- SLOMINSKI, A.: Identification of beta-endorphin, alpha-MSH and ACTH peptides in cultured human melanocytes, melanoma and squamous cell carcinoma cells by RP-HPLC.
Exp. Dermatol. 7, 213-216 (1998)
- SLOMINSKI, A.; ERMAK, G.; MIHM, M.: ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 81, 2746-2749 (1996)

SLOMINSKI, A.; PAUS, R.; WORTSMAN, J.: On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology.
Mol. Cell. Endocrinol. 93, C1-C6 (1993a)

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; MAZURKIEWICZ, J. E., et al.: Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin.
J. Lab. Clin. Med. 122, 658-666 (1993b)

SOFUOGLU, M.; PORTOGHESE, P.S.; TAKEMORI, A.E.: Differential antagonism of δ opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for δ opioid receptor subtypes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 257, 676-680 (1991)

SORA I.; FUNADA, M. and UHL, G.R.: The mu-opioid receptor is necessary for D-Pen², D-Pen⁵-enkephalin-induced analgesia.
Eur. J. Pharmacol. 324, R1-R2 (1997a)

SORA I.; TAKAHASHI, N.; FUNADA, M.; UJIKE, H.; REVAY, R.S.; DONOVAN, D.M.; MINER, L.L. and UHL, G.R.: Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1544-1549 (1997b)

SPAMPINATO, S.; CANOSSA, M.; VENTURA, C.; BACHETTI, T.; VENTURINI, R.; BASTAGLI, L.; BERNARDI, P.; FERRI, S.: Heterogeneity of immunoreactive dynorphin B-like material in human, rat, rabbit and guinea-pig heart.
Life. Sci. 48, 551-559 (1991)

SUZUKI, J.; CONE, R.D.; IM, S.; NORDLUND, J., ABDEL-MALEK, Z.A.: Binding of melanotropic hormone to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis.
Endocrinology 137, 1627-1633 (1996)

TAKEMORI, A.E. and PORTOGHESE, P.S.: Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists.
Annu Rev. Pharmacol. Toxicol. 32, 239-269 (1992)

TESCHEMACHER, H.-J.: Atypical opioid peptides.
In: Handb. Exp. Pharmacol., Vol. 104/1, Opioids I (1993). Eds.: HERZ, A.; AKIL, H.; SIMON, E.J.; Springer Berlin, pp. 499-528

TERENIUS, L.: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex.
Acta Pharmacol. Toxicol. 32, 317-320 (1973)

TOBIN, D.J.: Is beta-endorphin a melanotropin in the hair follicle pigmentary unit?
Pigment Cell Res. 16, 575-576 (2003)

VALIQUETTE, M.; VU, H.K.; YUE, S.Y.; WAHLESTEDT, C.; WALKER, P.: Involvement of Trp-284, Val-296 and Val-297 of the human delta-opioid receptor in binding of delta-selective ligands.
J. Biol. Chem. 271, 18789-18796 (1996)

- VAN EPPS, D.E.; KUTVIRT, S.L.: Modulation of human neutrophil adherence by beta-endorphin and met-enkephalin.
J. Neuroimmunol. 15, 219-228 (1987)
- WAKAMATSU, K.; GRAHAM, A.; COOK D.; THODY, A.J.: Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin 1 receptor.
Pigment Cell Res. 10, 288-297 (1997)
- WEIHE, E.; McKNIGHT, A.T.; CORBETT, A.D.; HARTSCHUH, W.; REINECKE, M.; KOSTERLITZ, H.W.: Characterization of opioid peptides in guinea-pig heart and skin.
Life Sci. 33, 711-714 (1983)
- WHEATLEY, M.; HOWL, J.; YARWOOD, N. J.; DAVIES, A.R.L.; PARSLOW, R.A.: Preparation of a membrane fraction for receptor studies and solubilization of receptor proteins with retention of biological activity.
Meth. Mol. Biol. 73, 305-322 (1997)
- WINTZEN, M.; YAAR, M., AVILA, E.; VERMEER, B.J.; GILCHREST, B. A.: Keratinocytes produce β -endorphin and β -lipotropic hormone after stimulation by UV, IL-1a or phorbol esters.
J. Invest. Dermatol. 104, 641 (1995)
- WINTZEN, M.; YAAR, M., BURBACH, J.P., H., GILCHREST, B. A.: Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 106, 673-678, (1996)
- WOODS, J. A.; SHAHABI, N.A.; SHARP, B.: Characterization of a naloxone-insensitive β -endorphin receptor on murine peritoneal macrophages.
Life Sci. 60, 573-586 (1997)
- WÜSTER, M.; SCHULZ, R., and HERZ, A.: Specific of opioid towards the μ -, δ -, and ϵ -opiate receptors.
Neurosci. Lett. 15, 193-198 (1979)
- XUE, J.Z.: Changes in plasma immunoreactive beta-endorphin in burn and its clinical significance.
Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi 7, 253-256, 317 (1991)
- ZAKI, P.A.; BILSKY, E.J.; VANDERAH, T.W.; LAI, J.; EVANS, C.J. and PORRECA, F.: Opioid receptor types and subtypes: The delta receptor as a model.
Annu Rev. Pharmacol. Toxicol. 36, 379-401 (1996)
- ZUKIN, R.Z.; EGHALI, M.; OLIVE, D.; UNTERWALD, E.M.; TEMPEL, A.: Characterization and visualization of rat and guinea pig brain κ opioid receptors: evidence for κ_1 and κ_2 opioid receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4061-4065 (1988)

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei *Herrn Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher* für die Überlassung des Themas und die kompetente und zuverlässige Betreuung auch zu den unmöglichsten Tages- und Nachtzeiten bedanken. Er stand mir während der gesamten Zeit mit seinen Erfahrungen und Hinweisen und manchmal sogar mit ganzem Körpereinsatz zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Volker Höllt danke ich für die Ermöglichung der Zusammenarbeit bei den molekulargenetischen Experimenten und für die herzliche Aufnahme im Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Otto von Guericke Universität in Magdeburg.

Mein weiterer Dank gilt *Herrn Dr. Peter Mayer*, der mich während meiner Zeit in Magdeburg durch seine kompetente Betreuung der molekulargenetischen Experimente sowie durch seine Hinweise und kritische Diskussionen sehr unterstützte. Seine Ratschläge und Anmerkungen bei der Durchsicht des Manuskriptes waren mir eine sehr große Hilfe.

Ich danke *Frau Helga Tischmeyer* für die Einarbeitung in die molekulargenetischen Versuchsmethoden und für ihre qualifizierte Unterstützung bei der Durchführung meiner molekulargenetischen Experimente in Magdeburg.

Mein besonderer Dank geht an *Frau Beate Dickopf* für die Einführung in die Laborarbeiten und für ihre außerordentlich hilfsbereite Unterstützung sowohl bei der Durchführung der Radiorezeptorbindungsversuche als auch bei Problemlösungen aller Art, die im Rahmen einer Dissertation auftreten können.

Bedanken möchte ich mich noch bei *Andre* für die vielen frostigen Stunden beim „Zellen- Kratzen“ und bei *Ralf* für sein offenes Ohr bei allen PC- Fragen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Melany Jayasinghe
Geburtsdatum	10.11.1975
Geburtsort	Bremen

Schul Ausbildung

1982 – 1992	St. Johannis- Schule in Bremen
1992 – 1995	Gymnasium an der Hermann- Böse- Straße in Bremen
29.06.1995	Allgemeine Hochschulreife
Sept. 1995 – Feb. 1996	5- monatiges Krankenpflegepraktikum in St. Petersburg, Florida, USA

Studium und Berufsausbildung

April 1996 – Sept. 2001	Studium der Humanmedizin an der Justus- Liebig- Universität Gießen
März 1998	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sept. 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2001 – Nov. 2002	Praktisches Jahr an der Ludwig- Maximilians- Universität München
06.11.2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Feb. 2003	Ärztin im Praktikum an der Universitäts- Hautklinik Tübingen

ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“