

**Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens und
der Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten in
den Zelllinien HaCaT und Colo 679**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Marcus Tschischka
aus Friedberg

Gießen 2006

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. F. Dreyer
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher
Gutachter: Prof. Dr. H. Stracke

Tag der Disputation: 30.04.2007

Inhaltsverzeichnis:

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen

1.	Einführung	14
1.1	Vorkommen von POMC (Proopiomelanocortin) beim Menschen	14
1.2	Das hypophysäre POMC-System des Menschen	15
1.2.1	Expression von POMC	15
1.2.2	Prozessierung von POMC	16
1.2.3	Physiologische Bedeutung von POMC-Derivaten	18
1.2.3.1	Aktivierung des POMC-Systems	19
1.2.3.2	Zielstrukturen der POMC-Derivate	20
1.2.3.3	Wirkungen der POMC-Derivate	21
1.2.3.4	Funktionelle Bedeutung des hypophysären POMC-Sytemes	24
1.3	Das dermale POMC-System des Menschen	25
1.3.1	Expression von POMC	26
1.3.2	Physiologische Bedeutung von POMC-Fragmenten	26
1.3.2.1	Aktivierung des POMC-Systems	26
1.3.2.2	Zielstrukturen der POMC-Derivate	27
1.3.2.3	Funktionelle Bedeutung des dermalen POMC-Systemes	28
1.3.3	Hypophysäres oder nicht-hypophysäres POMC-System?	29
2.	Fragestellung	31
3.	Material	34
3.1	Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen	34
3.2	Lösungen	37
3.3	Geräte und Zubehör	42
3.4	PC und Software	45
4.	Methodik	46
4.1	Zellen	46
4.1.1	Eingesetztes Zellmaterial aus menschlichen Geweben	46
4.1.1.1	Keratinozyten der Zelllinie HaCaT	46
4.1.1.2	Melanomzellen der Zelllinie Colo 679	47
4.1.1.3	Zellen der Lungencarcinomzelllinie DMS 79	47
4.1.2	Kultivierung der Zellen	47

4.1.2.1	Kultivierung und Stimulierung der Zellen für Untersuchungen zur Expression eines POMC-Gens	47
4.1.2.1.1	Keratinocyten der Zelllinie HaCaT	47
4.1.2.1.2	Melanomzellen der Zelllinie Colo 679	48
4.1.2.1.3	Zellen der Lungencarcinomzelllinie DMS 79	48
4.1.2.2	Kultivierung der Zellen für Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten	49
4.1.2.2.1	Keratinocyten der Zelllinie HaCaT	49
4.1.2.2.2	Melanomzellen der Zelllinie Colo 679	50
4.2	Stimulation und Suppression der Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten in Keratinocyten und Melanomzellen	50
4.2.1	CRH ($10^{-8}M$)	50
4.2.2	Dexamethason ($10^{-6}M$)	51
4.2.3	CRH ($10^{-8}M$) + Dexamethason ($10^{-6}M$)	51
4.3	Suche nach Transkripten eines POMC-Gens in Hautzellen	52
4.3.1	Extraktion der gesamten RNA der Zellen	52
4.3.1.1	Lyse der Zellen	52
4.3.1.1.1	Zellyse bei nativen Keratinocyten	52
4.3.1.1.2	Zellyse bei Keratinocyten der Zelllinie HaCaT	53
4.3.1.1.3	Zellyse bei Melanomzellen der Zelllinie Colo 679	53
4.3.1.1.4	Zellyse bei Lungencarcinomzellen der Zelllinie DMS 79	53
4.3.1.2	Extraktion der gesamten RNA der Zellen nach Zellyse	54
4.3.2	RT-PCR: Prinzip	54
4.3.3	Durchführung der RT-PCR	55
4.3.3.1	RT-PCR-Ansätze	58
4.3.3.2	Reverse Transkription der Gesamt-RNA	58
4.3.3.3	Amplifikation von POMC-cDNA-Fragmenten	59
4.3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese der cDNA-Amplifikate	59
4.4	Überprüfung der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten	60
4.4.1	Materialgewinnung	60
4.4.1.1	Zellkultur-Überstände	60
4.4.1.2	Zellen	60

4.4.2	Materialaufarbeitung	61
4.4.3	Extraktion	61
4.4.4	Standardisierung	62
4.4.5	Nachweis von POMC-Derivaten in Extrakten mit Hilfe von Radioimmunoassays (RIAs)	64
4.4.5.1	Neuentwicklung von one-site-fluid-phase-RIAs und two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIAs zum Nachweis von POMC-Derivaten in Extrakten	65
4.4.5.1.1	Herstellung polyklonaler Kaninchen-Antiseren für one-site-fluid-phase-Radioimmunoassays	65
4.4.5.1.1.1	Peptide und deren Kopplung an Keyhole limpet Hemocyanin (KLH) mittels Carbodiimid-Derivat (CDI)	65
4.4.5.1.1.2	Immunisierung	66
4.4.5.1.1.3	Blutentnahmen	67
4.4.5.1.1.4	Herstellung radioaktiv markierter Antigene (Tracer)	67
4.4.5.1.1.5	Titerbestimmung mittels one-site-fluid-phase RIA als Titerest	68
4.4.5.1.1.6	Entbluten der Kaninchen und Aufbewahren der Antiseren	70
4.4.5.1.2	Gewinnung monoklonaler Antikörper von Mäusen zum Aufbau von two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIAs	71
4.4.5.1.2.1	Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von γ_H -MSH	71
4.4.5.1.2.1.1	Kopplung des N-terminalen Fragmentes von γ_H -MSH mit einem Carbodiimid-Derivat (CDI) an Keyhole limpet Hemocyanin (KLH)	71
4.4.5.1.2.1.2	Immunisierung	72
4.4.5.1.2.1.3	Blutentnahmen	72
4.4.5.1.2.1.4	Antikörperrnachweis in Maus-Seren mittels Dot Blot-Test	73
4.4.5.1.2.1.4.1	Kopplung des N-terminalen Fragmentes von γ_H -MSH an BSA mit einem bis-diazotierten Benzidin (BDB)	73
4.4.5.1.2.1.4.2	Dot Blot-Test zum Nachweis von Antikörpern im Mäuseserum	73
4.4.5.1.2.1.5	Präparation von Lymphozyten aus der Milz der Maus	75
4.4.5.1.2.1.6	Zellfusion	76
4.4.5.1.2.1.7	Klonierung	77
4.4.5.1.2.1.8	ELISA	78

4.4.5.1.2.1.9	Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuche	80
4.4.5.1.2.2	Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von β_H -LPH	83
4.4.5.1.2.2.1	Kopplung des N-terminalen Fragmentes von β_H -LPH mit einem Carbodiimid-Derivat (CDI) an Keyhole limpet hemocyanin (KLH)	83
4.4.5.1.2.2.2	Immunisierung	83
4.4.5.1.2.2.3	Blutentnahmen	84
4.4.5.1.2.2.4	Titerbestimmung in Maus-Seren mittels Solid-phase-one-site-RIA	84
4.4.5.1.2.2.5	Präparation der Lymphozyten aus der Milz der Maus	85
4.4.5.1.2.2.6	Zellfusion	86
4.4.5.1.2.2.7	Klonierung	86
4.4.5.1.2.2.8	ELISA	86
4.4.5.1.2.2.9	Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuche	86
4.4.5.2	Eingesetzte Radioimmunoassays zum Nachweis von POMC-Derivaten in Extrakten	88
4.4.5.2.1	One-site-fluid-phase-RIAs	88
4.4.5.2.1.1	One-site-fluid-phase-RIA zum Nachweis von N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM	91
4.4.5.2.1.2	One-site-fluid-phase-RIA zum Nachweis von β_H -Endorphin-IRM	91
4.4.5.2.1.3	One-site-fluid-phase-RIA zum Nachweis von β_H -LPH-IRM	91
4.4.5.2.2	Two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA zum Nachweis von β_H -Endorphin (1-31)	91
4.4.5.2.3	Auswertung der Ergebnisse	95
5.	Ergebnisse	98
5.1	Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens in Keratinozyten der Zelllinie HaCaT und in Melanomzellen der Zelllinie Colo 679	98
5.1.1	Primerpaar HPO 10 / HPO 13	102
5.1.2	Primerpaar HPO 10 / EXO 21	103
5.1.3	Primerpaar HPO 1 / HPO 2	105

5.2	Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation	107
5.2.1	Gewonnene Antiseren und Antikörper	107
5.2.1.1	Polyklonale Antiseren aus Kaninchen	107
5.2.1.2	Monoklonale Antikörper aus Mäusen	110
5.2.1.2.1	Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von γ_H-MSH	110
5.2.1.2.2	Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von β_H-LPH	115
5.2.2	Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung von N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM, β_H-Endorphin-IRM, β_H-LPH-IRM und β_H-Endorphin (1-31)	125
5.2.2.1	Keratinocyten der Zelllinie HaCaT	125
5.2.2.1.1	N-Acetyl-β-Endorphin-IRM	125
5.2.2.1.2	β_H-Endorphin-IRM	127
5.2.2.1.3	β_H-LPH-IRM	128
5.2.2.1.4	β_H-Endorphin (1-31)	128
5.2.2.2	Melanomzellen der Zelllinie Colo 679	128
5.2.2.2.1	N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM	128
5.2.2.2.2	β_H-Endorphin-IRM	130
5.2.2.2.3	β_H-Endorphin (1-31)	131
6.	Diskussion	132
6.1	Diskussion der Methodik	132
6.1.1	Charakteristika der verwendeten Zellen	133
6.1.1.1	Keratinocyten der Zelllinie HaCaT	133
6.1.1.2	Melanomzellen der Zelllinie Colo 679	134
6.1.2	Zellkultur und Kulturmedien	134
6.1.3	Stimulation der Zelllinien	134
6.1.4	RT-PCR	135
6.1.5	Verwertbarkeit der Zelllysate und Zellüberstände bei unterschiedlicher Aufarbeitung	136
6.1.6	Herstellung polyklonaler Antiseren aus Kaninchen	137
6.1.7	Herstellung monoklonaler Antikörper aus Mäusen	138
6.2	Diskussion der Ergebnisse	139

6.2.1	Bereitstellung polyklonaler Antiseren	139
6.2.2	Hinweis auf methodische Lücken bei der Herstellung monoklonaler Antikörper	139
6.2.3	Hinweis auf die essentielle Funktion von β_H-LPH in bestimmten Zellen	140
6.2.4	Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens in den untersuchten Hautzellen	141
6.2.5	Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate	145
6.2.5.1	Ausschluß der Bildung der Bildung und Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate [β_H-Endorphin (1-31), β_H-Endorphin-IRM, β_H-LPH-IRM]	145
6.2.5.2	Hinweis auf die Bildung und Freisetzung eines POMC-Derivates [N-Ac-β_H-Endorphin] aus dem Translationsprodukt eines nicht- hypophysären POMC-Gens	147
6.2.5.3	Einordnung der Befunde	149
7.	Zusammenfassung	151
8.	Summary	154
9.	Literatur	157

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen

Aminosäuren:

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

Nucleotide:

a	Adenosin
c	Cytidin
g	Guanosin
t	Thymidin

Fragmente:

Ac-N-CLIP _H (1-5)	acetyliertes N-terminales Fragment von humanem Corticotropin-like intermediate lobe peptide
------------------------------	---

Ac-N-[Tyr ⁵] α _H -MSH (1-5)	acetyliertes N-terminales Fragment von humanem α-Melanocyten-stimulierendem Hormon, mit Tyrosin an Position 5
Ac-N-[Tyr ⁵] γ _H -MSH (1-5)	acetyliertes N-terminales Fragment von humanem γ-Melanocyten-stimulierendem Hormon, mit Tyrosin an Position 5
Ac-N-[Tyr ⁵] JP _H (1-5)	acetyliertes N-terminales Fragment von humanem Joining Peptide, mit Tyrosin an Position 5
β _H -MSH (5-9)	Fragment von humanem β-Melanocyten-stimulierendem Hormon
γ _H -MSH (1-12)	N-terminales Fragment von humanem γ-Melanocyten-stimulierendem Hormon
[Tyr ⁵] α _H -MSH (1-5)	N-terminales Fragment von humanem α-Melanocyten-stimulierendem Hormon, mit Tyrosin an Position 5
[Tyr ⁹] α _H -MSH (9-13)	C-terminales Fragment von humanem α-Melanocyten-stimulierendem Hormon mit Tyrosin an Position 9
[Tyr ⁵] β _H -LPH (1-5)	N-terminales Fragment von humanem β-Lipotropin, mit Tyrosin an Position 5
[Tyr ¹⁸] β _H -MSH (18-22)	C-terminales Fragment von humanem β-Melanocyten-stimulierendem Hormon, mit Tyrosin an Position 18
[Tyr ¹⁸] CLIP _H (18-22)	C-terminales Fragment von humanem Corticotropin-like-intermediate-lobe-peptide, mit Tyrosin an Position 18
[Tyr ⁵] γ _H -MSH (1-5)	N-terminales Fragment von humanem γ-Melanocyten-stimulierendem Hormon, mit Tyrosin an Position 5
[Tyr ⁵] JP _H (1-5)	N-terminales Fragment von humanem Joining Peptide, mit Tyrosin an Position 5

Dimensionen:

° C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute (gemessene Zerfälle eines Radioisotops pro Minute)
d	Tag
dpm	Desintegrations per minute (radioaktive Zerfälle eines Radioisotops pro Minute)
f	Femto- (10^{-15})
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar (molare Konzentration, Mol/l)
m	Meter oder Milli- (10^{-3})
μ	Mikro- (10^{-6})
min	Minute
n	Nano- (10^{-9})
sec	Sekunde
p	Piko- (10^{-12})
pH	potentia Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
V	Volt

Weitere Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Aqua bidest	Aqua bidestillata
AS	Aminosäuren
AVP	Arginin-Vasopressin

ATP	Adenosintriphosphat
β -END	β -Endorphin
β_H -END, β_H -Endorphin	Humanes β -Endorphin
β_H -LPH, β_H -Lipotropin	Humanes β -Lipotropin
B ₀	Nullstandard
BDB	bis-diazotiertes Benzidin
BL	Blank
B _{max}	maximal erreichbare Konzentration an gebundener Substanz (Konzentration an Bindungsstellen, Bindungskapazität)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDI	1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
CREB	cAMP responsive element binding protein
CRH	Corticotropin releasing hormone
CT	insgesamt eingesetzte Radioaktivität pro Ansatz
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
ECL-Reagenz	Enhanced Chemoluminescence Analysis Kit
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
GARGG	Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G
HRPO	Meerrettich Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
¹²⁵ I	radioaktives Jodisotop
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
IRM	Immunoreaktives Material
KLH	Keyhole limpet Hemocyanin
MC1-Rezeptor	Melanocortin 1-Rezeptor
m-RNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MSH	Melanocyten-stimulierendes Hormon
N-Ac	N-acetyliert

NRS	Normal Rabbit Serum
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung)
P-C	RIA-Puffer-C
P-D	RIA-Puffer-D
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
POD-IgG	Peroxidase konjugiertes Immunglobulin G
POMC	Proopiomelanocortin
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TV	Totalverdränger
Vol.	Volumen
well	Vertiefung in einer Mikrotiterplatte zur Aufnahme von Reaktionsansätzen
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einführung

1.1 Vorkommen von POMC (Proopiomelanocortin) beim Menschen

Die Expression des POMC-Gens ist schon bei den Wirbeltieren nachgewiesen (Deneff und Van Bael 1998). Es gibt jedoch Hinweise, die das Vorkommen von POMC auch bei Würmern, Mollusken und Gliederfüßlern wahrscheinlich machen (LeRoith et al. 1982, Salzet et al. 1997). Demnach gibt es das POMC-Gen seit mindestens 500 Millionen Jahren oder noch länger.

Aus Tierversuchen ist bekannt, daß bereits in der 7. Schwangerschaftswoche Fragmente des POMC im fetalen Organismus vorkommen. Bereits in der 5. Schwangerschaftswoche setzt die Biosynthese des POMC und seiner Fragmente in den Eihäuten, im Amnion und Chorion ein (Facchinetti et al. 1987). In der Placenta werden nicht nur beträchtliche Mengen an POMC produziert, sondern auch CRH, ein Stimulator seiner Biosynthese (Challis et al. 1995). Demnach scheinen POMC und seine Fragmente direkt in die Entwicklung des Feten eingebunden zu sein (Raffin-Sanson et al. 1999).

Das beim Menschen auf Chromosom 2 (p23) lokalisierte POMC-Gen umfasst 7665 Basenpaare. In Abhängigkeit vom Ort seiner Expression im menschlichen Körper wird es in mRNA von etwas unterschiedlicher Länge umgeschrieben. Das Gen selbst besteht aus 3 Exons und 2 Introns (Höllt 1993, Bertagna 1994).

Exon 1 beinhaltet eine nicht codierende Region. Exon 2 codiert unter anderem ein Signalpeptid, das für die Überführung des Proteins vom Synthesekompartiment in das endoplasmatische Retikulum notwendig ist. Exon 3 codiert die bioaktiven Peptide, wie z.B. ACTH, MSH und β -Endorphin (Autelitano et al. 1989).

Im menschlichen Organismus wird POMC in verschiedenen Organsystemen exprimiert und weiterprozessiert.

Endokrines System:

Aus der Hypophyse werden POMC-Fragmente über das Blut in die Peripherie des menschlichen Körpers transportiert (Smith und Funder 1988).

In den Gonaden wird POMC in Testes (Spermien) und Ovarien (Granulosazellen) exprimiert (Krieger et al. 1983).

Weiter wurden POMC-Derivate in der Placenta, der Schilddrüse, im Nebennierenmark und im Pankreas gefunden (Smith und Funder 1988).

Immunsystem:

In den Hoden, der Lunge und der Milz wurden POMC-Derivate in Monozyten/Makrophagen, sowie in Thymozyten bzw. T-Zellen nachgewiesen (Teschemacher 2003).

Innere und äußere Körpergrenzen:

In der Haut haben POMC-Derivate unter anderem Einfluß auf die Pigmentierung und nehmen Einfluß auf die Immunabwehr (Slominski et al. 2000).

Wasser- und Elektrolythaushalt:

POMC-Fragmente nehmen in der Niere direkt und indirekt Einfluß auf den Wasser- und Elektrolythaushalt (Smith und Funder 1988, Young et al. 1993).

Zentralnervensystem:

Die Expression von POMC erfolgt in Kerngebieten des Hypothalamus (z.B. Nucleus arcuatus) und im Nucleus tractus solitarii. POMC-Fragmente werden von dort in eine Reihe weiterer spinaler und supraspinaler Kern- und Faserstrukturen transportiert.

Als Transportsystem für POMC-Derivate im ZNS dient eventuell der Liquor cerebrospinalis. So könnten POMC und seine Fragmente von den oben genannten Kerngebieten an Zielstrukturen im ZNS gebracht werden (Knigge und Joseph 1984, Höllt 1993, Young et al. 1993, Slominski et al. 2000, Teschemacher 2003).

1.2 Das hypophysäre POMC-System des Menschen

In der Hypophyse des Menschen kann eine Reihe von Verbindungen nachgewiesen werden, deren Präkursor POMC ist. Zu nennen sind vor allem ACTH, β -Endorphin und β -Lipotropin (Smith und Funder 1988).

Im folgenden soll die Biosynthese dieser Verbindungen ausgehend von der Expression des POMC-Gens dargestellt werden.

1.2.1 Expression von POMC

In der Hypophyse erfolgt die Transkription des POMC-Gens (7665 Basenpaare) zu einer mRNA von 1072 Basen. An diese mRNA ist eine Poly-A-Sequenz angekoppelt, die unterschiedliche Länge haben kann.

Bei der folgenden Translation entsteht Prä-POMC, ein Protein mit 267 Aminosäuren. Durch Abspaltung des Signalpeptids vom N-terminalen Ende des Prä-POMC entsteht das POMC der Hypophyse mit 241 Aminosäuren (Höllt 1993, Bertagna 1994).

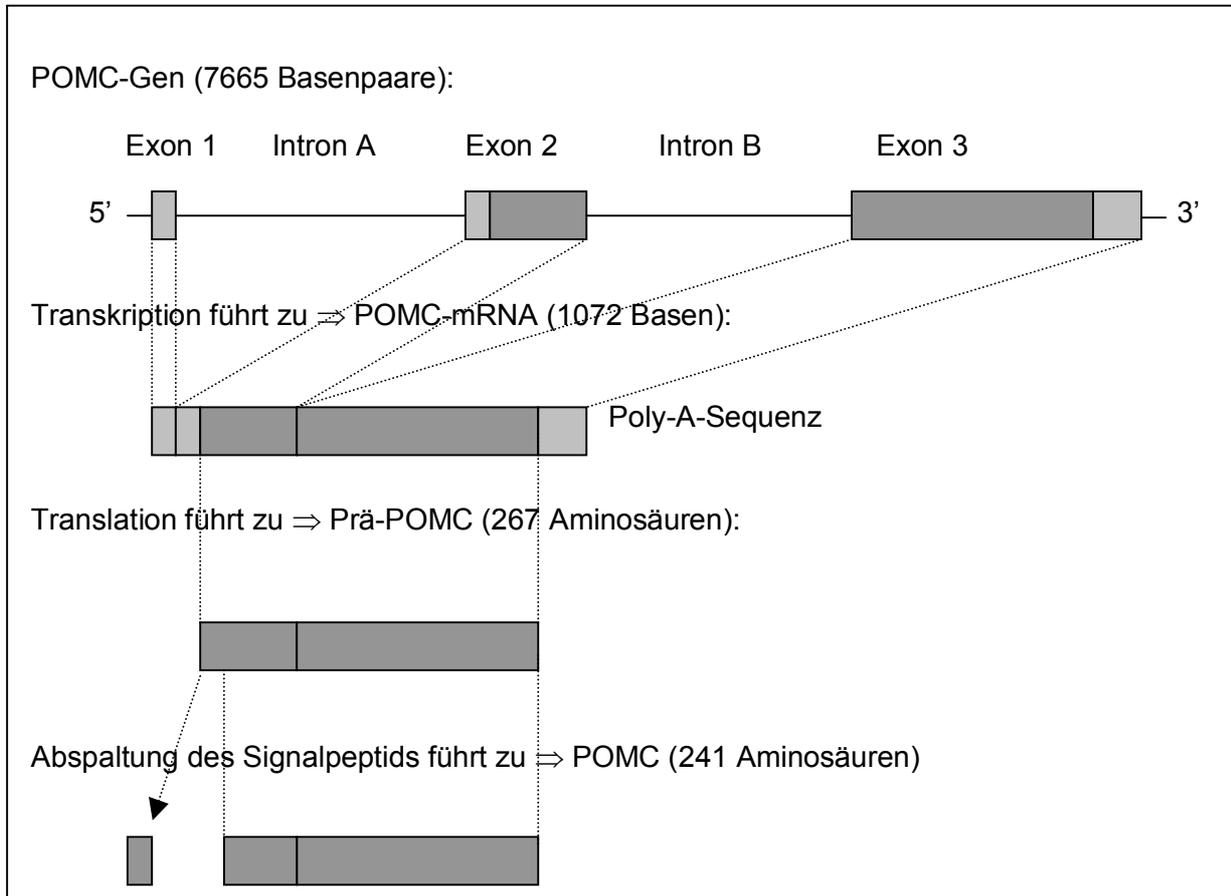


Abb. 1.1: Die Expression von POMC in der Hypophyse des Menschen
(nach Bertagna 1994)

1.2.2 Prozessierung von POMC

Die Spaltung und Derivatisierung von POMC in der Hypophyse niederer Säuger geschieht in zwei verschiedenen Zelltypen. Man unterscheidet die kortikotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens und die melanotrophen Zellen des Zwischenlappens (Loh 1992, Young et al. 1993, Bertagna 1994, Castro und Morrison 1997).

Beim erwachsenen Menschen fehlt der Hypophysenzwischenlappen. Offenbar verfügen die POMC-exprimierenden Zellen im Vorderlappen der menschlichen Hypophyse in ihrer Mehrzahl sowohl über das kortikotrophe als auch über das

melanotrophe Prozessierungssystem. Die Regulierung der beiden Systeme und ihrer Enzyme erfolgt allerdings getrennt. Diese unterschiedliche Aktivierbarkeit ermöglicht die Existenz zweier Steuerungssysteme mit unterschiedlichen Zielstrukturen. In der Hypophyse überwiegt die kortikotrophe Aktivierung (Evans et al. 1994).

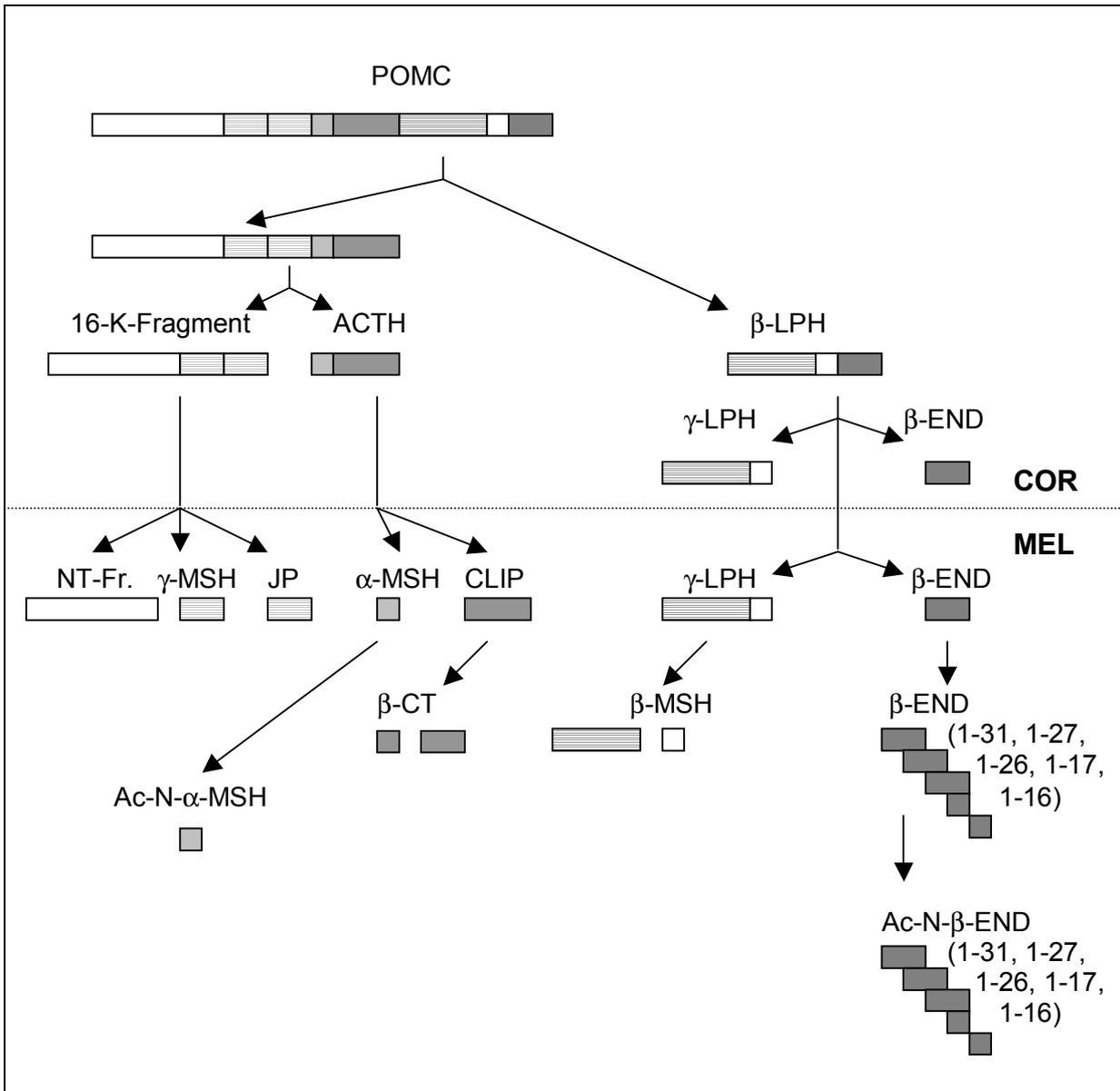


Abb. 1.2 Struktur des POMC und seine Prozessierung:

Kortikotropes Muster (COR): Spaltung des POMC in vier Fragmente

Melanotropes Muster (MEL): weitere Spaltung und Modifizierung der Spaltprodukte (nach Castro und Morrison 1997)

Im kortikotropen System wird POMC an wenigen Stellen glykosyliert und phosphoryliert, bevor es dann durch ein Enzymsystem in mehrere Fragmente zerlegt

wird. Die beteiligten Enzyme sind neben glykosylierenden und phosphorylierenden Enzymsystemen vor allem die Prohormon Konvertase 1, in geringerem Maße die Prohormon Konvertase 2 und möglicherweise ein „POMC-converting-Enzyme“ (PCE). Bei diesem Prozeß entstehen das N-terminale „16-K-Fragment“, ACTH und β -Lipotropin (β -LPH). Letzteres wird in geringerem Umfang in β -Endorphin und γ -Lipotropin gespalten.

Im melanotrophen System werden die gleichen POMC-Fragmente gebildet, durch weitere Enzymsysteme werden diese jedoch in der Folge in eine Vielzahl kleinerer Fragmente gespalten. Diese werden dann zum Teil C-terminal amidiert oder N-terminal acetyliert. So entstehen unter anderem α -, β - und γ -MSH, das sogenannte joining peptide (JP), corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) und acetylierte β -Endorphinfragmente. An das NT-Fragment, im Bereich der γ -MSH- und CLIP-Sequenz, können Glykosidreste angehängt werden. Im Bereich der CLIP-Sequenz kann eine Phosphorylierung erfolgen.

(Wuttke et al. 1980, Eipper und Mains 1980, Krieger 1983a, Hakanson und Thorell 1985, Smith und Funder 1988)

In der Hypophyse und im ZNS wird das POMC-Gen wie bereits beschrieben in eine mRNA von 1072 Basen transkribiert. Hinzu kommt noch eine Poly-A-Sequenz unterschiedlicher Länge. Dieses lange Transkript erlaubt eine Translation in ein Protein, an dessen N-terminalem Ende sich das Signalpeptid befindet.

Dieses Protein kann also in das endoplasmatische Retikulum transportiert und in einen Prozessierungs- und Sekretionsmechanismus eingeschleust werden. Aus der Hypophyse und anderen Strukturen des ZNS können POMC-Fragmente freigesetzt werden und so über das Blut bzw. den Liquor cerebrospinalis ihre Zielstrukturen erreichen. (Höllt 1993, Bertagna 1994)

1.2.3 Physiologische Bedeutung von POMC-Derivaten

POMC-Derivate nehmen im menschlichen Körper möglicherweise eine Vielzahl an Steuerungsfunktionen wahr.

1.2.3.1 Aktivierung des POMC-Systems

Durch verschiedene Hormone wird die Expression des POMC-Gens organspezifisch gesteuert. In der Hypophyse wirkt Corticotropin Releasing Hormone (CRH) stimulierend auf die Expression des POMC-Gens, Glukokortikoide dagegen inhibierend im Sinne einer negativen Rückkopplung im Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde.

Weitere Stimulatoren sind Arginin-Vasopressin (AVP), Serotonin, Oxytocin, Bradykinin, die Interleukine 1, 2 und 6, Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interferon γ , Leptin und Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) (Autelitano et al. 1989, Slominski et al. 2000, Schwartz et al. 2002).

Als Repressoren wirken γ -Amino-Buttersäure (GABA), Dopamin-Agonisten (Torpy et al. 1995), Glukoseüberschuß (Gunozi et al. 1994) und Prostaglandin (Slominski et al. 2000).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht geklärt, welche dieser Stimulatoren unter welchen Bedingungen zur Expression des POMC-Gens und zur Ausschüttung von POMC-Derivaten im ZNS oder in peripheren Geweben führen, oder welche der genannten Repressoren unter welchen Bedingungen die Expression des POMC-Gens und damit die Ausschüttung von POMC-Derivaten im ZNS oder in peripheren Geweben verhindern.

Offenbar unterliegt aber das POMC-System sowohl zentral als auch peripher einem komplizierten Regulationsmechanismus.

Bestimmte Situationen, die die Homöostase des Organismus bedrohen, triggern die Expression des POMC-Gens in der Hypophyse und die Freisetzung von POMC-Derivaten ins Blut.

Somit werden unter „Stress“ POMC-Derivate aus der Hypophyse ins Blut freigesetzt. Stressoren können dabei psychische und physische Belastungen sein. Zu nennen sind dabei unter anderem Leistungssport und Gefahrensituationen (Taylor et al. 1994, Schedlowski et al. 1995, Harbach et al. 2000, Schulz et al. 2000). Auch Gewebszerstörungen durch thermische, chemische oder mechanische Noxen und die damit verbundenen Schmerzen fördern die Freisetzung von POMC-Derivaten (Kehlet 1982, Adams und Hempelmann 1991, Matejec et al. 2006). Auch extreme Schwankungen des Stoffwechsels, wie bei Hypoglykämie und Azidose oder Schocksituationen und Infektionen führen zur Freisetzung von POMC-Derivaten

(Gurll et al. 1981, McLoughlin et al. 1993, Catania und Lipton 1994, Matejec et al. 2004).

Bei Patienten mit endogener Depression ist die Flexibilität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Regelkreise, in die das hypophysäre POMC-System integriert ist, eingeschränkt (Holsboer und Barden 1996).

1.2.3.2 Zielstrukturen der POMC-Derivate

Wie erwähnt, sind die Zielstrukturen der in der Hypophyse gebildeten POMC-Derivate im gesamten Körper zu finden. Dabei wirken die POMC-Derivate über spezifische Rezeptoren.

Bislang wurden fünf membrangebundene Melanocortin-Rezeptoren (MC1-Rezeptor – MC5-Rezeptor) gefunden, über die ACTH und MSH-Varianten ihre Wirkungen auf die Zielstrukturen auslösen. Diese Melanocortin-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt. Über die Interaktion von ACTH und MSH-Varianten mit ihren Rezeptoren kommt es in den Zellen über eine Aktivierung der Adenylatcyclase durch das G-Protein zu einer Umwandlung von ATP in cAMP. In der Zelle wirkt cAMP dann als second messenger und steuert die physiologische Antwort der Zelle (Hunt et al. 1994a, 1994b, Busca und Ballotti 2000). In Anwesenheit eines Adenosin-Agonisten, der den cAMP-Pfad hemmt, kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (Elliott et al. 2004).

Die Haut- und Haarpigmentierung wird über die Bindung von α -MSH und ACTH am MC1-Rezeptor in Keratinozyten und Melanozyten gesteuert (Kausar et al. 2005). ACTH wirkt hauptsächlich durch eine Bindung zum MC2-Rezeptor (Gantz et al. 1993). Der MC3-Rezeptor wurde im Gehirn, dem Verdauungstrakt und in der Plazenta gefunden. In den Nebennieren und in malignen Melanomen wurde er nicht nachgewiesen. Über die Funktion dieses Rezeptors ist bislang nichts bekannt (Gantz et al. 1993). Der MC4-Rezeptor wurde fast ausschließlich im Gehirn gefunden. Im Tierversuch konnte seine Bedeutung in Bezug auf Nahrungsaufnahme und Gewichtsregulierung gezeigt werden (Huszar et al. 1997). Der MC5-Rezeptor wurde in vielen exokrinen Organen gefunden (van der Kraan et al. 1998).

In der Nebennierenrinde fördert ACTH die Synthese von Glukokortikoiden, aber auch die Synthese von Mineralkortikoiden und adrenalen Androgenen. Durch die Wirkung der Glukokortikoide wirkt es indirekt antiphlogistisch und immunsuppressiv (Wilson

und Foster 1985, Miller 1988). ACTH fördert die Durchblutung und das Wachstum der Nebennierenrinde (Miller 1988, von Werder und Scriba 1994, Wilckens 1995). In der Haut steuern α -MSH und ACTH die Melaninsynthese in den Melanozyten und die Expansion der Melanozyten. Im Hypothalamus wirkt α -MSH als Neurotransmitter.

Im Jahr 1973 konnten spezifische Opioidrezeptoren nachgewiesen werden (Pert und Snyder 1973, Simon et al. 1973, Terenius 1973). Man geht heute von der Existenz dreier verschiedener Opioidrezeptortypen und mehrerer Opioidrezeptorsubtypen aus. Alle Rezeptortypen sind G-Protein gekoppelt. Der N-Terminus der Aminosäurekette liegt im Extrazellulärraum, der C-Terminus im Intrazellulärraum. Die Liganden der Opioidrezeptoren inhibieren über das G-Protein die cAMP-Bildung durch Hemmung der Adenylatcyclase. Außerdem kommt es zu einer Aktivierung von Kaliumkanälen und zur Inaktivierung von Kalziumkanälen (Kieffer 1995). Prinzipiell können endogene Opioide an jeden der 3 Rezeptortypen binden. Das POMC-Derivat β -Endorphin besitzt jedoch die höchste Affinität für den μ -Rezeptor. (Simon und Giannini 1993).

Endorphine könnten durch die Besetzung von Opiatrezeptoren Einfluß auf Stimmungslage und Schmerzmodulation nehmen (Herz 1984). Zentralnervöse Effekte von aus der Hypophyse ins Blut freigesetztem β -Endorphin sind jedoch umstritten. Die hypothalamische Freisetzung von Gonadotropin-Releasing Hormon wird durch Endorphine über eine Modulation der Katecholaminwirkung gehemmt (Ferin et al 1984, Yen et al. 1985, Kuljis und Advis 1989, Rassmussen et al. 1989). Im peripheren Nervensystem wurde eine Beteiligung der Endorphine an der Verarbeitung sensorischer Afferenzen nachgewiesen. Die Darmmotilität wird durch Endorphine gehemmt (Pollak et al. 1977).

1.2.3.3 Wirkungen der POMC-Derivate

Über ACTH liegen mehr Informationen vor als über die anderen POMC-Derivate. ACTH (adrenocorticotropes Hormon) ist ein aus 39 Aminosäuren bestehendes glandotropes Proteohormon, das im Hypophysenvorderlappen aus POMC durch Proteolyse abgespalten und dessen Ausschüttung unter anderem durch CRH induziert wird. Die Synthese und Ausschüttung unterliegt einem zirkadianen Rhythmus mit höchsten Werten am Morgen (Eipper und Mains 1980, Herbert et al. 1980, Wuttke et al. 1980, Hakanson und Thorell 1985).

Für die bekannten biologischen Wirkungen wird nur der N-terminale Anteil (ACTH(1-24)) benötigt. Diagnostisch und therapeutisch verwendete synthetisch hergestellte ACTH-Peptide umfassen deshalb auch nur den N-terminalen Anteil (ACTH(1-24)). In der Struktur des C-terminalen Anteils (ACTH 25-33) zeigt sich eine Spezifität (Krieger 1983b, de Keyser et al. 1985).

ACTH wirkt direkt auf Zielstrukturen, aber auch indirekt über die Biosynthese und Freisetzung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde (Wilson und Foster 1985). Zu erwähnen sind vor allem die antiphlogistischen und immunsuppressiven Wirkungen der Glukokortikoide. ACTH fördert über eine Aktivierung der Adenylatzyklase die Synthese der Glukokortikoide in der Nebennierenrinde. Die Signaltransduktion erfolgt hierbei über das stimulierende G-Protein und nachfolgender Aktivierung cAMP-abhängiger Proteinkinasen, was unter anderem zu einer Aktivierung der Cholesterinesterhydrolase und somit zu einer Spaltung der Cholesterinester führt. Damit wird Pregnenolon für die weitere Steroidsynthese bereitgestellt (Hunt et al. 1994a, Suzuki et al. 1996, Busca und Ballotti 2000).

Neben der Bildung von Glukokortikoiden fördert ACTH auch die Bildung von Mineralokortikoiden und adrenalen Androgenen (Miller 1988).

Die Aufnahme von Cholesterin in die Mitochondrien wird durch ACTH gefördert (Slominski und Wortsman 2000).

ACTH hat einen positiven Einfluß auf die Durchblutung der Nebennierenrinde und fördert das Wachstum der Nebennierenrinde (Miller 1988, von Werder und Scriba 1994, Wilckens 1995).

Die Lipolyse wird durch ACTH gesteigert und indirekt eine vermehrte Insulinausschüttung ausgelöst, was aber beim Menschen wahrscheinlich keine physiologische Bedeutung hat (von Werder und Scriba 1994).

ACTH greift in den Elektrolythaushalt und in den Energiestoffwechsel ein.

β -Lipotropin ist ein aus 89 Aminosäuren bestehendes POMC-Fragment. Über die Wirkung von β -Lipotropin im menschlichen Organismus ist nur sehr wenig bekannt (de Keyser et al. 1985).

Beim Tier fördert es eine Aktivierung der Triacylglycerinlipasen des Fettgewebes, die Triglyceride in Glycerin und freie Fettsäuren spalten, und fördert einen erhöhten Fetttransport zur Leber mit gleichzeitigem Anstieg der Ketonkörper und freien Fettsäuren im Blut. Nach Fettbelastung und im Hungerzustand kommt es zu einer

Zunahme der Ausschüttung von β -Lipotropin. Eine pathologische Vermehrung des β -Lipotropin ist bei Patienten mit Diabetes mellitus nachzuweisen. Ob β -Lipotropin auch beim Menschen bei der physiologischen Regulation der Lipolyse beteiligt ist, ist fraglich. Diese Funktion wird beim Menschen vom Wachstumshormon übernommen. Man nimmt heute an, daß β -Lipotropin nur als Vorstufe von β -Endorphin und β -MSH dient und keine eigene physiologische Bedeutung beim Menschen hat. (Herbert et al. 1980, Krieger 1983a, de Keyser et al. 1985)

Unter dem Namen Endorphine werden β -Endorphin und acetylierte bzw. nicht-acetylierte Fragmente desselben zusammengefasst. In der Regel bezieht sich die Bezeichnung „Endorphine“ jedoch nur auf die nicht-acetylierten β -Endorphinderivate einschließlich des β -Endorphins selbst. Diese nicht-acetylierten Fragmente besetzen die gleichen Rezeptoren wie Opiate.

In vivo wie in vitro besitzen sie eine starke analgetische Potenz, vergleichbar der des Morphins (Herz 1984); ihre funktionelle Bedeutung als Analgetika in Stress-Situationen ist fraglich (Matejec et al. 2006).

Endorphine hemmen die hypothalamische Freisetzung von Gonadotropin-Releasing-Hormon durch Modulation der Katecholaminwirkung. Wahrscheinlich bestehen auch funktionelle Interaktionen zwischen β -Endorphin und dopaminergen Neuronen bei der Prolactinsekretion. In vitro (an isoliertem Gewebe des menschlichen mediobasalen Hypothalamus) und eventuell auch in vivo supprimiert β -Endorphin die Gonadotropin-Releasing-Hormon-Pulsatilität (Ferin et al. 1984, Yen et al. 1985, Kuljis und Advis 1989, Rassmussen et al. 1989). Diese Befunde werden zur Erklärung stressbedingter Amenorrhöe herangezogen.

Endorphine sind an der Steuerung vegetativer Funktionen über die Aktivierung endorphinergener Neurone beteiligt. Dabei können die Endorphine als Neurotransmitter, Neuromodulatoren oder als Hormone wirken. Endorphine haben eventuell Einfluß auf die Regulation der Körpertemperatur und der hypophysären Inkretion; sie sind möglicherweise eingebunden in die Steuerung der Darmmotilität (Pollak et al. 1977, Slominski und Wortsmann 2000).

Aus β -Endorphin kann Met-Enkephalin abgespalten werden (Herbert et al. 1980), was aber offenbar keine funktionelle Bedeutung besitzt.

Nahezu 95 % der uns derzeit zu Verfügung stehenden Informationen über MSH betreffen α -MSH.

Im Rahmen des Pigmentschutzes der Haut steuert α -MSH die Melaninsynthese in den Melanozyten und die Melanozytenexpansion, sowie die Pigmentdispersion über den Melanocortin-1 Rezeptor. Ob dabei die in der Hypophyse freigesetzte Menge an α -MSH ausreicht, um einen Effekt an der Haut zu erzielen, ist strittig (Lerner und McGuire 1961, 1964, Hunt et al. 1994a, Thody und Graham 1998, Slominski et al. 2000). Durch die zu geringe Mineralokortikoidproduktion beim Morbus Addison erhöht sich die Sekretion von ACTH und α -MSH, was zu einer verstärkten Pigmentierung der Haut (Bronzefärbung) führt (Krieger 1983a, 1983b).

Als hypothalamischer Neurotransmitter nimmt α -MSH eine lokale Aufgabe in der Kontrolle des Fettstoffwechsels mittels Nahrungsaufnahme, im Rahmen der Leptin- und Insulin-Regelkreise wahr (Schwartz et al. 2000). Diese Funktion wird jedoch wahrscheinlich nicht von hypophysär, sondern von hypothalamisch produziertem α -MSH wahrgenommen.

Sporadische Befunde deuten darauf hin, daß γ -MSH die Mitoserate adrenerger Zellen erhöht und das Wachstum der Nebennierenrinde positiv beeinflusst (Lowry et al. 1984).

Systemische Gabe von α -MSH führt zu Fieberabfall, Abfall von Leukozytose und senkt die Plasmaspiegel von Akute-Phase-Protein (Cannon et al. 1986).

1.2.3.4 Funktionelle Bedeutung des hypophysären POMC-Systemes

Das hypophysäre POMC-System reagiert auf Belastungen („Stress“), die auf den Körper einwirken, mit der Ausschüttung von POMC-Derivaten („Stressresponder“). Welche Funktion die freigesetzten POMC-Derivate im Sinne einer Adaptation des Organismus an die Stressoren haben („Stressadapter“), ist weitgehend unklar.

Durch Wirkung von POMC-Derivaten, wie ACTH und α -MSH, an der Nebennierenrinde kommt es zur Freisetzung von Glukokortikoiden. Damit wirken diese POMC-Derivate immunsuppressiv. Möglicherweise ist für die Reorganisation des Gewebeverbandes nach akuten Gewebsverletzungen die Unterdrückung bestimmter Immunabwehrreaktionen notwendig. Bestimmte POMC-Derivate scheinen eine kardiovaskulär relevante Rolle in vital bedrohenden Grenzsituationen,

wie z.B. im Schock, einnehmen zu können. Sinnvoll erscheint auch die Hemmung der Darmmotilität durch bestimmte POMC-Derivate in einer Stress-Situation.

Bei Menschen mit pathologisch veränderter oder blockierter POMC-Expression fand sich eine extreme Adipositas, die bereits im ersten Lebensjahr einsetzte, Insuffizienz der Nebennierenrinde und orange-rotes Haar.

Die funktionelle Bedeutung des hypophysären POMC-Systems beim Menschen konnte bis jetzt jedoch nicht sicher geklärt werden (Teschemacher 2003).

1.3 Das dermale POMC-System des Menschen

Mit einer Gesamtfläche von etwa 1,5 – 2 m² stellt die Haut des Menschen die äußere Begrenzung zu seiner Umwelt dar. Sie dient nicht nur dem mechanischen, chemischen und thermischen Schutz des Körpers, sondern nimmt wichtige Funktionen im Rahmen der Temperaturregulation sowie des Wasser- und Elektrolythaushaltes wahr. Durch die in der Haut beherbergten Sinnesorgane kann der Mensch seine Umgebung wahrnehmen und auf Reize reagieren. Auch an zahlreichen immunologischen Prozessen ist die Haut beteiligt. Das mehrschichtige, verhornende Plattenepithel der Epidermis besteht zu 90 % aus Keratinozyten. Die restlichen 10 % setzen sich aus Merkel-Zellen, Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphozyten, sowie Nerven und kleinen Gefäßen zusammen. In vivo stehen jeweils etwa 30 bis 40 Keratinozyten in Verbindung mit einem Melanozyten. Diese Verbindung ermöglicht einen Melanintransport aus den Melanozyten in die Keratinozyten. Die Epidermis stammt aus dem Ektoderm und setzt sich aus Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum zusammen. Zusammen mit der aus dem Mesoderm stammenden Dermis bildet sie die Cutis. Durch Papillenzapfen der Dermis entsteht eine enge Verzahnung der beiden Schichten. Dadurch vergrößert sich die Berührungsfläche der beiden Schichten, was die mechanische Stabilität verbessert und die Ernährung der Epidermis erleichtert. In der aktuellen Literatur wird die Haut als Entstehungsort und Zielstruktur von POMC-Derivaten beschrieben (Slominski et al. 1993, Zouboulis 2004). In Zellen der Haut, wie Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten, wurden Rezeptoren für POMC-Derivate und die notwendigen Prohormon-Konvertasen, sowie wichtige Kofaktoren wie Faktor 7B2 nachgewiesen (Bigliardi et al. 1998, Schiller et al 2001, Busca und Ballotti 2000, Kauser et al. 2005).

1.3.1 Expression von POMC

Es wurde versucht, mRNA des hypophysären POMC-Gens in Zelllinien der Haut (Keratinocyten, Melanocyten und Fibroblasten) oder kultivierten Hautzellen nachzuweisen (Slominski et al. 1995, Teofoli et al 1997). In der Tat gelang es, mittels Northern blot-Analyse POMC-mRNA in menschlichen Keratinocyten und Melanocyten nachzuweisen (Schauer et al. 1994, Chakraborty et al. 1996, Wakamatsu et al. 1997). Weiterhin wurden in RT-PCR-Versuchen Primer aus der Nukleotidsequenz des hypophysären POMC-Gens eingesetzt. Positive Ergebnisse hinsichtlich der Expression des hypophysären POMC-Gens in der Haut fanden sich jedoch nur in RT-PCR-Untersuchungen, bei denen allein Primer aus dem Exon 3 eingesetzt wurden. Bei der Suche mit Primerpaaren von denen ein Primer aus Exon 3 und der zweite aus Exon 2 (Intron B übergreifend) bzw. Exon 1 (Intron A und Intron B übergreifend) stammte, konnte keine Expression des hypophysären POMC-Gens in der Haut der Maus nachgewiesen werden (Ermak und Slominski 1997).

1.3.2 Physiologische Bedeutung von POMC-Fragmenten

Neben der Suche nach einem POMC-Gen erfolgte auch die Suche nach POMC-Derivaten in Zellen der Haut (native Zellen oder Zelllinien), bzw. deren Freisetzung daraus. Die im Rahmen dieser Suche erhobenen Befunde provozierten die Frage nach der funktionellen Bedeutung eines POMC-Systems in der Haut - im Vergleich zu dem längst bekannten POMC-System der Hypophyse.

1.3.2.1 Aktivierung des POMC-Systems

Die im Blut nachgewiesenen Spiegel für ACTH und α -MSH sind so niedrig, daß ein Effekt auf die in der Haut nachgewiesenen Rezeptoren eher als unwahrscheinlich anzusehen ist (Rees 2003). Nur unter pathologischen Bedingungen erreichen die Spiegel an zirkulierenden POMC-Derivaten eine Höhe, die einen Einfluß auf die Zielstrukturen in der Haut hat (Thody et al. 1985). Für die dermale Funktion eines dermalen POMC-Systems scheint also eine lokale Biosynthese und Freisetzung von POMC-Derivaten nötig zu sein.

Über eine Produktion von POMC-Derivaten in menschlichen Keratinozyten wurde mehrfach berichtet (Wintzen et al. 1995, Zanello et al. 1999). Auch in humanen Melanozyten und Melanomzellen, sowie in Naevi wurden POMC-Derivate nachgewiesen (Slominski 1998, Nagahama et al 1998). Dabei zeigte sich eine gewisse Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, mit denen die Keratinozyten behandelt wurden. Nicht in jeder Untersuchung konnten POMC-Derivate gefunden werden, sondern nur bei einem Versuchsaufbau, bei dem die Keratinozyten in einem nährstoffarmen Medium oder in einem Kulturmedium mit niedriger Kalziumkonzentration kultiviert wurden (Wintzen et al. 2000). Versuche zur Stimulierbarkeit des POMC-Systems in der Haut zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Je nach Versuchsaufbau konnte z.B. durch eine Bestrahlung mit UV-Licht eine Freisetzung der POMC-Fragmente nachgewiesen werden oder nicht (Wintzen et al. 1995, Chakraborty et al. 1996, Zanello et al. 1999).

Eine Stimulation humaner Keratinozyten mit dem Endothelin-B-Rezeptor-Agonisten IRL-1620 erhöhte die Sekretion von β -Endorphin (Khodorova et al. 2003).

In der Haut scheinen zwei verschiedene Zellsysteme zu existieren, die als Endprodukte entweder ACTH und β -Endorphin oder ausschließlich α -MSH produzieren und sezernieren. (Slominski 1998)

1.3.2.2 Zielstrukturen der POMC-Derivate

In humanen Keratinozyten konnten μ -Opiatrezeptoren nachgewiesen werden (Bigliardi et al 1998). Eine Vermehrung von Cytokeratin 16, ein wichtiger Marker für die Hyperproliferation bei Psoriasis und anderen Hauterkrankungen, wurde durch Stimulation der Haut mit β _H-Endorphin erreicht, und die Expression von μ -Opiatrezeptoren in den Zellen der Haut nahm ab (Bigliardi-Qi et al. 2000).

In menschlichen Melanozyten wurde der Melanocortin-1 Rezeptor nachgewiesen, der eine hohe Affinität zu α -MSH und ACTH besitzt (Tsatmali et al. 1999). Die Stimulation von Melanocortinrezeptoren menschlicher Melanozyten wirkt über die cAMP Signalkaskade und aktiviert die Proteinkinase A und CREB, was zu einer Erhöhung der Transkriptionsfaktoren und der Gene, die an der Melanogenese beteiligt sind, führt (Busca und Ballotti 2000). Hierbei ist insbesondere Tyrosinase zu nennen; α -MSH steigert die Expression, die Neusynthese und Aktivierung der Tyrosinase (Hunt et al. 1994b).

Bei pharmakologisch blockierter cAMP-Signalkaskade erfolgt die intrazelluläre Wirkung von ACTH und MSH in menschlichen Keratinozyten über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (Elliott et al. 2004).

1.3.2.3 Funktionelle Bedeutung des dermalen POMC-Systemes

Eine Stimulation humaner Keratinozyten mit β -Endorphin führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Bigliardi et al. 2003), stimuliert die Migration der Keratinozyten, fördert die Reepithelialisierung und damit die Wundheilung (Bigliardi et al. 2002).

Sowohl β -Endorphin als auch μ -Opiat-Rezeptoren konnten in menschlichen Melanozyten in vivo und in vitro nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine enge Beziehung insbesondere zu den Melanosomen. Eine Stimulierung der Melanozyten mit β -Endorphin führte zu einer Steigerung der Melanozytendendritizität, sowie zu einer Proliferation der Melanozyten und gesteigerten Pigmentierung (Kausser et al. 2003).

Bei Patienten mit Psoriasis und atopischem Ekzem konnten erhöhte Spiegel an β_H -Endorphin nachgewiesen werden (Glinski et al. 1994 und 1995). Angstzustände und psychischer Stress können diese Hauterkrankungen verschlimmern, was zu der Annahme führte, daß die Haut Zielorgan hypophysärer POMC-Derivate sein könnte. Rezeptoren für α -MSH konnten in humanen Keratinozyten nachgewiesen werden, hierbei ist besonders der Melanocortin-1-Rezeptor zu nennen (Chakraborty et al. 1996). ACTH bindet ebenfalls an die Melanocortin-Rezeptoren, die in humanen Keratinozyten nachgewiesen wurden und nimmt so Einfluß auf die Pigmentierung (Wakamatsu et al. 1997, Moustafa et al. 2002). Bei Menschen mit rotem Haar und heller Haut wurden eine große Anzahl an Varianten des Melanocortin-1-Rezeptors in den Melanozyten gefunden (Valverde et al. 1995). Später wurde beobachtet, daß die Melanozyten bei Menschen dieses Phänotyps eine Variante des Melanocortin-1-Rezeptors besaßen, die nicht auf α -MSH ansprach (Hunt et al. 1996). In vitro erhöhen ACTH und α -MSH die Melanozytendendritizität, die Melanozytenproliferationsrate und die Melanogenese (Tsatmali et al. 2002). In vivo ist die Förderung der Pigmentierung der Haut durch ACTH und MSH vielfach beschrieben (Lerner und McGuire 1964, Levine et al. 1991). So führten Injektionen von ACTH und α -MSH zu einer verstärkten Bräunung sonnenexponierter Haut.

Ein Einfluß von ACTH und α -MSH auf die Immunmodulation und die Stressantwort in der Haut wurde beschrieben (Slominski et al 2000). In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, daß α -MSH einen antagonisierenden Effekt auf proinflammatorische Cytokine wie z.B. IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF α ausübt (Catania und Lipton 1993). Allerdings wurde auch ein Auslösen lokaler inflammatorischer Prozesse in der Haut durch von α -MSH verursachte Histaminausschüttung aus Mastzellen beschrieben (Grutzkau et al. 2000).

Es wird vermutet, daß γ -MSH in der Haut eine wichtige Funktion in der Regulation des Elektrolythaushaltes ausübt, da dieses POMC-Derivat in Keratinozyten gefunden wurde, die Schweißdrüsen und deren Ausführungsgängen benachbart sind.

Im Gegensatz zum hypophysären POMC-System scheinen die entstehenden POMC-Derivate vor allem lokale Aufgaben zu erfüllen.

1.3.3 Hypophysäres oder nicht-hypophysäres POMC-System?

Bei Einsatz von Primerpaaren aus dem Exon 3 in RT-PCR-Versuchen konnten Slominski et al. (1995) mRNA-Fragmente des hypophysären POMC-Gens in der menschlichen Haut nachweisen. Die in der Haut gefundene mRNA des POMC-Gens war in einigen Fällen kürzer (etwa 800 – 900 Basen), als die mRNA des POMC-Gens der Hypophyse (1072 Basen), jedoch wurde auch längere (etwa 1200 Basen) mRNA nachgewiesen (Autelitano et al. 1989, Slominski et al. 1992, Schauer et al. 1994). Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Befunde gibt es bisher nicht.

Bei Einsatz von Primerpaaren aus dem Bereich des Exon 3 und Exon 2 bzw. Exon 1 des hypophysären POMC-Gens in RT-PCR-Versuchen konnte in der Haut von Mäusen keine Expression des hypophysären POMC-Gens nachgewiesen werden (Ermak und Slominski 1997). Ergebnisse ähnlicher Versuche mit Primerpaaren aus dem Bereich von Exon 3 einerseits und Exon 2 bzw. Exon 1 andererseits, also Intron B oder sogar Intron B und A übergreifend, zum Nachweis von mRNA des hypophysären POMC-Gens in menschlicher Haut wurden bislang nur von der Arbeitsgruppe um Farooqui (1998) veröffentlicht: Can et al. (1998) beschrieben den Nachweis einer POMC-mRNA in Zellen der menschlichen Epidermis, die der mRNA aus dem POMC-Gen der Hypophyse sehr ähnelte. Eine Sequenzanalyse des RT-

PCR Produktes ergab eine Übereinstimmung von ca. 85 % im Vergleich zur POMC-DNA der menschlichen Hypophyse.

Diesem Ergebnis wurde von einer anderen Arbeitsgruppe vehement widersprochen (Ancans et al. 1999). Hier wurde die von Can et al. (1998) nachgewiesene mRNA als eine Kontamination der Proben bezeichnet, da die veränderten 28 Basenpaare denjenigen des POMC-Gens der Maus entsprachen. Außer einer von der Farooqui-Gruppe publizierten Gegendarstellung wurde zu diesem Thema seither nichts mehr veröffentlicht (Farooqui 1999).

Die bisher in der Haut (Keratinocyten, Melanozyten, Fibroblasten) und in Hautzelllinien (z.B. HaCaT, A431) nachgewiesenen POMC-Derivate werden alle im Exon 3 codiert.

Es stellt sich im Hinblick auf die kontroversen Literaturbefunde nun die Frage, ob es in der Haut ein „aberrantes“ POMC-Gen geben könnte, das sich von dem POMC-Gen der Hypophyse unterscheidet (Can et al. 1998, Farooqui 1999). Die Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen dem hypophysären POMC-Gen und diesem „aberranten“ POMC-Gen der Haut könnten erklären, daß bislang der eindeutige Nachweis der Expression des hypophysären POMC-Gens in der Haut scheiterte.

Die bisher verwendeten hypophysären Primer aus Exon 1 und 2 konnten die Nucleotidsequenzen des möglichen „aberranten“ POMC-Gens nicht erkennen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß hypophysäre Primer zufällig auf Nucleotidsequenzen treffen, die das hypophysäre und das postulierte „aberrante“ POMC-Gen der Haut gemeinsam haben: In diesem Falle wäre der Nachweis der Expression eines POMC-Gens möglich. Das in der PCR erhaltene Amplifikat müsste dann einer Nucleotidsequenz-Analyse unterzogen werden, um zu klären, ob in der menschlichen Haut das hypophysäre POMC-Gen oder das von der Farooqui-Gruppe postulierte „aberrante“ POMC-Gen exprimiert wird.

2. Fragestellung

Slominski et al. konnten 1995 mit Primerpaaren aus dem Exon 3 des hypophysären POMC-Gens mittels RT-PCR in menschlichen Melanozyten und Keratinozyten mRNA des hypophysären POMC-Gens nachweisen. Die von Slominski et al. (1995) verwendeten Primer wurden danach in einer Reihe weiterer RT-PCR-Untersuchungen eingesetzt. Die Amplifikate der PCR waren alle kompatibel mit der Expression eines hypophysären POMC-Gens in den jeweils untersuchten Hautzellen. Can et al. wiesen 1998 erstmals unter Verwendung eines Primerpaars aus Exon 2 und 3 eine POMC-mRNA in menschlichen Melanozyten und Keratinozyten nach, die nur zu 85 % identisch mit der hypophysären POMC-mRNA war. Diesem Befund wurde von der Gruppe um Thody (Ancans et al. 1999) scharf widersprochen. Seit der sofortigen Publikation der Gegendarstellung (Farooqui 1999) wurde zu dieser kontrovers dargestellten Thematik nichts mehr publiziert.

Eine Reihe von Arbeiten, in denen die Freisetzung von ACTH, α -MSH und β -Endorphin aus Melanozyten und Keratinozyten sowie aus Hautzelllinien beschrieben wurde, stützte die Befunde der RT-PCR-Untersuchungen, in denen die Expression des hypophysären POMC-Gens in Hautzellen wahrscheinlich gemacht werden konnte; diese POMC-Derivate werden jedoch alle im Exon 3 codiert, weswegen hierdurch der Farooqui-Befund nicht entkräftet werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Klärung der Frage geleistet werden, ob in Hautzellen ein hypophysäres oder ein nicht-hypophysäres („aberrantes“) POMC-Gen exprimiert wird, bzw. ob hypophysäre oder „aberrante“ POMC-Derivate gebildet und freigesetzt werden. Mit den zu Verfügung stehenden „hypophysären Werkzeugen“, d.h. Primerpaaren aus dem hypophysären POMC-Gen und Antikörpern gegen das hypophysäre POMC-Protein sollte nach Nucleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen gesucht werden, die sowohl einem hypophysären, als auch einem nicht-hypophysären („aberranten“) POMC-Gen bzw. POMC-Protein entstammen könnten: „Hypophysäre Primerpaare“ könnten zwischen den hypophysären Primersequenzen liegende hypophysäre oder nicht-hypophysäre Nucleotidsequenzen amplifizieren. An den, von den „hypophysären Antikörpern“ erfassten hypophysären Aminosäuresequenzen des POMC-Proteins könnten hypophysäre oder nicht-hypophysäre Aminosäuresequenzen hängen.

Positive Befunde könnten also im Sinne eines hypophysären oder nicht-hypophysären POMC-Gens bzw. POMC-Proteins interpretierbar sein. Würden bei Einsatz mehrerer Primerpaare bzw. Antikörper nur positive Befunde erhoben, spräche das für ein hypophysäres POMC-Gen. Die Primer würden in diesem Falle eben immer auf die hypophysäre Nucleotidsequenz treffen, bzw. die Antikörper auf ein Post-Translationsprodukt des hypophysären POMC-Gens, und so zu positiven Ergebnissen führen. Würden positive und negative Befunde erhoben, dann läge mit Sicherheit ein nicht-hypophysäres POMC-Gen vor. Die Primer würden im Fall der positiven Ergebnisse zufällig auf eine Nucleotidsequenz treffen, die das hypophysäre und das „aberrante“ POMC-Gen gemeinsam haben. Im Fall der negativen Ergebnisse trafen die hypophysären Primer dagegen auf eine „aberrante“ Nucleotidsequenz. Die Antikörper würden im Fall der positiven Ergebnisse auf Aminosäuresequenzen treffen, die die Post-Translationsprodukte des hypophysären und des „aberranten“ POMC-Gens zufällig gemeinsam hätten. Im Fall der negativen Ergebnisse trafen die Antikörper dagegen auf eine Aminosäuresequenz, in der sich das Post-Translationsprodukt des möglichen „aberranten“ POMC-Gens von demjenigen des POMC-Gens der Hypophyse unterscheiden würde. Würden dagegen nur negative Befunde erhoben, dann spräche das für das Fehlen eines POMC-Gens. Das nicht hypophysäre POMC-Gen wäre jedoch weder im komplett negativen, noch im komplett positiven Fall ausgeschlossen.

In orientierenden Pilot-Studien wurden native menschliche Keratinozyten untersucht. Da für die Untersuchungen zum Nachweis von POMC-Derivaten mittels immunradiometrischer Methoden native Keratinozyten jedoch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurden als Modelle menschlicher Hautzellen die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und die Melanom-Zelllinie Colo 679 für die Untersuchungen eingesetzt.

Mittels RT-PCR sollten die Zelllinien auf das Vorhandensein von POMC-mRNA untersucht werden. Dazu wurden sowohl Primerpaare aus dem hypophysären Exon 3 (mutmaßlich nur hypophysär/aberrant-identische Nucleotidsequenzen beteiligt), als auch Primerpaare aus Exon 3 und Exon 2 und damit Intron B übergreifend (mutmaßlich „aberrante“ Nucleotidsequenzen beteiligt), eingesetzt. Als Positivkontrolle bei der Suche nach dem Transkript eines POMC-Gens in den

untersuchten Zellen diene eine Zelllinie aus einem kleinzelligen Bronchialcarcinom (DMS 79), die nachweislich das humane hypophysäre POMC-Gen exprimiert.

Die RT-PCR wurde mit Zellmaterial aus den eingesetzten Zelllinien sowohl unter Basalbedingungen durchgeführt, als auch nach Stimulation mit CRH (10^{-8} M), das in der Hypophyse die Expression des POMC-Gens und die Bildung und Freisetzung von POMC-Fragmenten stimuliert.

Ferner sollten die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und die Melanom-Zelllinie Colo 679 auf die Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten (N-Acetyl- β _H-Endorphin, β _H-Endorphin und β _H-LPH) untersucht werden. Diese POMC-Derivate werden alle auf Exon 3 codiert. Zellmaterial und Zellkulturüberstände der beiden Zelllinien wurden mit Hilfe von bereits etablierten Radioimmunoassays (RIAs) auf das Vorhandensein von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM, β _H-Endorphin-IRM und β _H-LPH-IRM, sowie β _H-Endorphin (1-31) getestet. Das im Hypothalamus gebildete Polypeptidhormon CRH stimuliert in der Hypophyse unter anderem Synthese und Freisetzung von ACTH und anderen POMC-Fragmenten. Es lag also nahe, mit CRH eine Stimulierung der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten in den Hautzellen zu versuchen. In der Nebennierenrinde steuert ACTH die Freisetzung von Glukokortikoiden. Glukokortikoide hemmen die Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten aus der Hypophyse. Deshalb wurde als potentieller Repressor das Glukokortikoid Dexamethason (20fache Glukokortikoid-Aktivität im Vergleich zu Cortison) ausgewählt. Mit einem Gemisch von CRH und Dexamethason sollte versucht werden, mit einem potentiellen Repressor den möglichen Einfluß eines Stimulators auf die Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten in Hautzellen zu hemmen. Das Zellmaterial und die Zellüberstände wurden unter Basalbedingungen und nach versuchter Stimulation der Zellen mit CRH (10^{-8} M), nach versuchter Suppression mit Dexamethason (10^{-6} M) und nach Inkubation mit einem Gemisch aus CRH (10^{-8} M) und Dexamethason (10^{-6} M) in den RIAs untersucht.

Des weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper herzustellen, die sich gegen das C-terminale oder N-terminale Ende weiterer POMC-Derivate richten sollten. Mit Hilfe dieser Antikörper sollten in künftigen Untersuchungen, mit neu zu etablierenden RIAs, auch andere POMC-Derivate in der Haut nachgewiesen werden.

3. Material

3.1 Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen

Äthanol	Merck, Darmstadt
Äther	Merck, Darmstadt
Agarose NEE0	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
Antikörper 3E7	Gramsch Laboratories, Dachau
Anti-Maus-IgG-HRPO	Dako, Hamburg
Aprotinin (Trasylol)	Bayer Vital, Leverkusen
Arginin-Vasopressin (AVP)	Bachem, Heidelberg
Benzidin-HCl	Sigma, München
Borax	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BM condimed H1 (Nr. 1088947)	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Serva, Heidelberg
Citronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt
Carbodiimid (CDI)	Serva, Heidelberg
Corticotropin releasing hormone (CRH)	Sigma, München
dNTP	QIAGEN, Hilden
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	Sigma, München
EDTA (Ethylene Diamine tetraacetic acid)	Merck, Darmstadt
ECL-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Eisessig (glacial acetic acid)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Freund'sches Adjuvans (komplett und inkomplett)	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt

Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G	Peninsula, Heidelberg
Guanidin	Fluka, Neu-Ulm
Harnstoff (CH ₄ N ₂ O)	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, München
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Keyhole limpet Hemocyanine (KLH)	Sigma, München
Magermilchpulver: Glücksklee	Nestlé, Frankfurt
Magermilchpulver: Naturaflor	Töpfer, Dietmannsried
Maus-IgG	Peninsula, Heidelberg
Methanol	Apotheke der Justus-Liebig-Universität Gießen
Na ¹²⁵ I, Natrium- ¹²⁵ Jodid	Amersham-Buchler, Braunschweig
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaNO ₂	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose	Wolff Cellulosics, Walsrode
Normal-Rabbit-Serum	Peninsula, Heidelberg
OPI O5003 (Oxalacetat, Pyruvat, Insulin)	Sigma, München
PEFABLOC	Boehringer, Mannheim
PCR Buffer	QIAGEN, Hilden
POD-Anti-Maus-IgG	Peninsula, Heidelberg
1-Propanol	Merck, Darmstadt
Protein-A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
RNAse free H ₂ O	QIAGEN, Hilden

RPMI 1640-Waschmedium	Sigma, München
RT-PCR Mix	QIAGEN, Hilden
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Smart Ladder SF	Eurogentec, Seraing, Belgien
Thiomersal	Merck, Darmstadt
Thyroglobulin, porcine	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, München
Trireagent	Sigma, München
Tris Base	Sigma, München
Tris(-hydroxymethyl)aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Tween 20	Sigma, München
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Peptide:

β _H -Endorphin(1-31)	Peninsula, Heidelberg
β _H -MSH	Peninsula, Heidelberg
N-Acetyl-β _H -Endorphin(1-31)	Peninsula, Heidelberg
Fragmente	Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Primer:

HPO 1	Roth, Karlsruhe
HPO 2	Roth, Karlsruhe
HPO 10	Roth, Karlsruhe
HPO 13	Roth, Karlsruhe
EXO 21	Roth, Karlsruhe

3.2 Lösungen

BDB:	Einwiegen von Benzidin-HCl 50 mg lösen in 10 ml 0,2 M HCl Zugabe von 35 mg NaNO ₂ bei 4° C 1 h Inkubation im Dunkeln bei 4° C unter ständigem Rühren Herstellung von 500 µl Aliquots In Alufolie einpacken und einfrieren bei -80° C
Blockerlösungen für ELISA:	
5 %ige BSA-Lösung:	1 g BSA auf 20 ml PBS-Tween 0,1 %
5 %ige Magermilch-Lösung:	1 g Magermilchpulver auf 20 ml PBS-Tween 0,1 %
Boratpuffer:	6,1 g Borax 0,76 g NaCl in Aqua bidest. lösen pH von 9 einstellen ⇒ auffüllen auf 100 ml mit Aqua bidest.
Citratpuffer:	0,1 M NaOH ⇒ 2 g NaOH Plättchen auffüllen auf 500 ml Aqua bidest. 0,1 M Citronensäure ⇒ 10,507 g Citronensäuremonohydrat auffüllen auf 500 ml Aqua bidest. Citronensäure der Natronlauge hinzugeben, bis ein pH von 4,5 erreicht ist
Entwickler für ELISA:	10 ml Citratpuffer pH 4,5 Zugabe von 10 mg O-Phenylendiamine 4 µl H ₂ O ₂

Enzym-Hemmer Cocktails:

für Zelllysate:

1. Trispuffer 10 mM:
⇒ 1,2113 g Tris (-hydroxymethyl) aminomethan mit
Aqua bidest auf 1 l auffüllen
pH von 7,4 einstellen
2. Aprotinin 0,2 %
⇒ 200 µl Aprotininlösung (2,8 mg/ml)
Zugabe von 2600 µl Aqua bidest
3. PEFABLOC 20 mM
7,2 mg PEFABLOC
Zugabe von 1,5 ml Aqua bidest
4. 30 ml Trispuffer 10 mM
+ 1,5 ml Aprotinin 0,2 %
(≅ 0,01 % in Gesamtlösung)
+ 1,5 ml PEFABLOC 20 mM
(≅ 1mM in Gesamtlösung)

für Zellüberstände:

1. Aprotinin 0,2 %
⇒ 200 µl Aprotininlösung (2,8 mg/ml)
Zugabe von 2600 µl Aqua bidest
2. PEFABLOC 20 mM
7,2 mg PEFABLOC
Zugabe von 1,5 ml Aqua bidest
3. + 1,5 ml Aprotinin 0,2 % (≅ 0,1 % im Cocktail)
+ 1,5 ml PEFABLOC 20 mM (≅ 10 mM im Cocktail)
⇒ die so entstandene Lösung wird dem
Zellüberstand zugegeben, daß eine Verdünnung
1:10 entsteht
(≅ Aprotinin 0,01 % in Gesamtlösung, ≅ PEFABLOC
1 mM in Gesamtlösung)

Essigsäure 4 %:

80 ml Essigsäure 100 % ad 2000 ml Aqua bidest

Essigsäure 5 N:	300,25 g Essigsäure 100 % \approx 300,25 ml \Rightarrow ad 1 l Aqua bidest
Farbstoff für Gelelektrophorese:	50 % Glycerol 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol \Rightarrow gelöst in H ₂ O
Harnstoff 8 M:	1000 g Harnstoff ad 2080 ml Aqua bidest
HAT-Medium:	RPMI 1640 (mit L-Glutamin) 10 % fötales Kälberserum 10 % BM condimed H1 Boehringer, Mannheim Nr. 1088947 1 % OPI (Oxalacetat, Pyruvat, Insulin), Sigma O5003 2 % HAT (Hypoxantin, Aminopterin, Thymidin) (50*conz.) Pen/Strep (100 IE/100 μ g per ml)
Kulturmedium:	DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium with L-glutamine and 4500 mg glucose / liter without sodium phosphat or sodium bicarbonate) (Sigma) 25 mM HEPES hinzufügen und mit NaOH auf pH 7,4 titrieren, sterile Filtration, Aufbewahrung bei 4° C
Mastermix für PCR:	5-fach Buffer 140 μ l H ₂ O RNase free 467,6 μ l dNTP 28 μ l Primer I 4,2 μ l + Primer II 4,2 μ l RT-PCR-Mix 28 μ l

Natriumphosphatpuffer 0,02M:	<p>0,02 M Na₂HPO₄ wasserfrei ⇒ 11,36 g / 4 l Aqua bidest. 0,02 M NaH₂PO₄ ⇒ 2,76 g / 1 l Aqua bidest. ⇒ pH von 7,5 einstellen ca. 3400 ml 0,02 M Na₂HPO₄ ca. 800 ml NaH₂PO₄ ⇒ pH von 7,4 einstellen durch Zugabe der jeweiligen Lösung</p>
Natronlauge (1 N NaOH):	40 g NaOH Plättchen auffüllen auf 1 l Aqua bidest.
PBS für Dot Blot:	<p>8 g NaCl 0,2 g KCL 1,44 g Na₂HPO₄ 0,2 g KH₂PO₄ ⇒ 1 l Aqua bidest. pH auf 7,3 einstellen</p>
PBS für Elisa (5-fach):	<p>113,6 g Na₂HPO₄ wasserfrei lösen in ca. 1,8 l Aqua bidest. 27,6 g NaH₂PO₄ 58,4 g NaCl ⇒ auffüllen auf 2 l mit Aqua bidest.</p>
PBS für Elisa (1-fach):	<p>200 ml PBS (5-fach) ⇒ auffüllen auf 1 l mit Aqua bidest.</p>
PBS-Tween 0,1 %:	<p>1000 ml PBS (1-fach) 1 ml Tween 20</p>
PBS-Tween 0,05 %:	<p>1000 ml PBS (1-fach) 500 µl Tween 20</p>

PBS defici (\emptyset Ca^{2+} , \emptyset Mg^{2+}): 40,0 g NaCl
1,0 g KCl
5,68 g Na_2HPO_4 wasserfrei
1,0 g KH_2PO_4
pH von 7,3-7,4 einstellen
 \Rightarrow auffüllen auf 5 l mit Aqua bidest.
500 ml Aliquots autoklavieren

1-Propanol / Essigsäure (96 % / 4 %):
80 ml Essigsäure 100 % ad 2000 ml 1-Propanol

Puffer C:
0,02 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4
0,15 M NaCl
0,1 % Gelatine
0,01 % BSA
0,01 % Thiomersal

Puffer D:
0,1 % Triton X-100
 \Rightarrow 1 ml Triton + 1 l Puffer C

Schwefelsäure (4N(2M) H_2SO_4): 10,66 ml H_2SO_4 (98 %)
auffüllen auf 100 ml Aqua bidest.

TAE Puffer Stocklösung 50fach für Gelelektrophorese:
Tris Base 221 g
Eisessig (glacial acetic acid) 28,5 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0) 50 ml
 \Rightarrow aufgießen auf 500 ml mit Aqua bidest.

für die Gelherstellung wird die Stocklösung 1:50 verdünnt

Zell-Lösungsgemisch:
PBS defici (\emptyset Ca^{2+} , \emptyset Mg^{2+})
0,02 % EDTA \Rightarrow 100 mg EDTA auf 500 ml PBS
0,05 % Trypsin \Rightarrow 10 ml 2,5 % Trypsin auf 500 ml
PBS

3.3 Geräte und Zubehör

Biofuge 15	Heraeus Sepotech, Osterode
Brutschrank BB6220	Heraeus Instruments, Hanau
SepPak C18 Kartuschen	Waters, Milford, USA
Combitips	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Dialyseschlauch Type 8 (cut-off 12 –14 kD)	Biomol-Feinchemikalien, Hamburg
Einmalkanülen Microlance 2 – steril	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalvenenkatheter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Extraktions-Anlage	Werkstatt der Justus-Liebig-Universität, Gießen
Filter 0,45µm Type HA	Millipore, Molsheim, Frankreich
Filterpapier	Millipore, Molsheim, Frankreich
Fraktionssammler Ultrorac II	LKB Bromma, Schweden
Gamma-Zähler	LKB Wallac, Turku, Finnland
1282 Compugamma CS	
Glasmaterialien (Messkolben, etc.)	Schott, Mainz
Glaspipetten	Brand, Wertheim/Main
Handschuhe Latex	Ansell Medical, München
Heizplatte MR 2002	Heidolph, Kehlheim
Hermle Z380-Zentrifuge	Hermle GmbH u. Co., Gosheim
Horizontal-Schüttler SM	Edmund Bühler, Tübingen
Kodan Tinktur forte	Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt
Kühlzentrifuge	DuPont Company, Newtown, Connecticut, USA
Sorvall SM 24 und SS34	
Kulturflaschen (verschiedene Größen)	Greiner, Frickenhausen
Kunststoff-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Mümbrecht
Kunststoff-Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Labofuge 400e	Heraeus Instruments, Hanau

Lamin Air HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Lyophilisator GT 02	Leybold Heraeus, Köln
Magnetrührer 2002	Heidolph, Kehlheim
Mehrfach-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Mettler AT250	Mettler Instrumente GmbH, Gießen
Mettler P162	Mettler-Waagen GmbH, Gießen
Mettler-Feinwaage	E. Mettler, Zürich
Microfuge 22R Centrifuge	Beckmann Coulter
Mikrofiltrieranlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Mikrotiterplatten (Maxisorp)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten (break apart Module)	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiter Shaker Inkubator	Dynatech, Denkendorf
Milli-Q50 Ultra pure water system	Millipore, Molsheim, Frankreich
Mixer 5432	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Mixer IKA-Combimag RC0	Janke u. Kunkel KG, Staufen
MP-3000 Chyco Electronic Balance	Chyco Balance Coop., Japan
Multi-Reagent-Washer für Mikrotiterplatten	Dynatech, Denkendorf
Narrow-Mouth-Bottle PP, 8 ml	Nalge Company, Rochester, USA
Nunc Immuno wash 6T	Nunc, Wiesbaden
Nunc Immuno-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Ölpumpe	General Electric, Fort Wayne, USA
Parafilm	American Can Company, Dixie/Marathon, USA
Petrischalen Cellstar	Greiner, Frickenhausen
PCR-System 2400	Perkin Elmer Gene Amp
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
pH-Meter PHM Standard	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Photometer Ultrospec 4050	LKB Biochrom, Cambridge, England
Photometer Bachofer	Bachofer, Reutlingen
Pipetten, verstellbar	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen	ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen (0,5 – 10 µl)	Gilson Medical Electronic, Villiers-le-Bel, Frankreich

Pipetus-Standard	Hirschmann Laborgeräte
Pyrex-Ganzglas-Filtrationsgerät (47 mm)	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße Nr. 2810 (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen aus Polypropylen (3,5 ml, 4 ml, 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rundschüttler-HT	Infors AG, Basel, Schweiz
Schüttler	Heidolph, Kehlheim
Schüttelwasserbad	Köttermann, Häningen
Selectron M FP027/3-Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher u. Schüll GmbH, Dassel
Sorvall RC-5B refrigerated superspeed Centrifuge	DuPont Instruments, Bad Homburg
Spannungsgeber:	
Biometra Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Speed Vac concentrator Model SVC-100H	Savant, New York, USA
Swinny Filterhalter aus Edelstahl	Millipore, Eschborn
Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg
Tuberkulin-Spritzen-monoject 1 ml	Sherwood Medical, Ballymoney, Irland
Ultraschallbad Sonorex RK102	Bandelin
Vari Shaker für Mikrotiterplatten	Dynatech, Denkendorf
Vortex-Rührer	Heidolph, Kehlheim
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
Zentrifugenröhrchen (verschiedene Größen)	Greiner, Frickenhausen
 <u>Tiere:</u>	
Balb/c Mäuse	Fa. Harlan-Winkelmann
Kaninchen	Fa. Harlan-Winkelmann

Zellen und Zelllinien:

Colo 679	European Collection of (Animal) Cell Cultures, Salisbury, UK
DMS 79	European Collection of (Animal) Cell Cultures, Salisbury, UK
HaCaT	E. Fusenig, Heidelberg
native Keratinozyten	Prof. Boehnke, Dermatologische Klinik der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt

3.4 PC und Software

Hewlett Packard Omnibook 4150	
Excel	Microsoft
Ligand	Munson and Rodbard
Origin	Microcal
Word	Microsoft

4. Methodik

4.1 Zellen

Die Auswahl der verwendeten menschlichen Zellen der Haut und ihre Behandlung in der Zellkultur war von entscheidender Bedeutung. In vitro sollte eine Situation geschaffen werden, die Rückschlüsse auf die Situation in vivo zulässt.

4.1.1 Eingesetztes Zellmaterial aus menschlichen Geweben

Da native Keratinozyten in der Zellkultur nur wenige Tage überlebensfähig sind und eine Massenproduktion damit nicht möglich ist, mußten Zelllinien eingesetzt werden. Nur durch die Verwendung von Zelllinien konnte eine ausreichend große Menge der Zellen für die Stimulationsversuche und die Bestimmung der POMC-Derivate im RIA gewonnen werden.

4.1.1.1 Keratinozyten der Zelllinie HaCaT

Die Zelllinie HaCaT entstand aus spontaner Transformation nativer, histologisch normaler Keratinozyten aus dem Randbereich eines Melanoms an der oberen Hälfte des Rückens eines 62 Jahre alten Mannes, in einer speziellen Zellkultur. Die Keratinozyten wurden bei einer zweiten Exzision zur Vergrößerung des Sicherheitsabstandes nach histologischem Nachweis eines Melanoms gewonnen. Diese histologisch normalen Keratinozyten wurden nach einem bestimmten Schema mit veränderten Kulturmedien kultiviert. Zuletzt wurden diese Zellen in einem Kulturmedium mit einem niedrigen Ca^{2+} -Gehalt und bei hoher Temperatur ($38,5^\circ \text{C}$) kultiviert. Beim Durchlaufen der sich ändernden Kulturbedingungen war es zu einer spontanen Transformation der Keratinozyten gekommen. Durch diese spontan aufgetretene Transformation waren die Zellen immortal geworden und zeigten teilweise noch die für normale Keratinozyten charakteristischen Eigenschaften, insbesondere ähnliche Wachstums- und Verhornungseigenschaften (Boukamp et al. 1988).

Andere Keratinozyten-Zelllinien waren z.B. durch eine Infektion mit simian virus-40 (SV40), oder Transfektion mit seiner isolierten DNA immortalisiert worden. Das führte

jedoch zu deutlichen Unterschieden in der Differenzierung im Vergleich zu normalen Keratinozyten. Diese Zelllinien hatten im Vergleich zu nativen Keratinozyten andere Wachstums- und Verhornungseigenschaften und zeigten erneut auftretende charakteristische Eigenschaften fötaler Zellen (Boukamp et al. 1988).

Aufgrund der relativen Ähnlichkeit zu normalen Keratinozyten wurde die Zelllinie HaCaT ausgewählt.

4.1.1.2 Melanomzellen der Zelllinie Colo 679

Als weitere Zelllinie wurde die Melanom-Zelllinie Colo 679 ausgewählt.

Die Zelllinie Colo 679 war 1985 etabliert worden. Sie entstand aus Zellen einer Weichteilmetastase eines malignen Melanoms einer 47 Jahre alten Frau.

Sie zeigten adhärenente fibroblastische Eigenschaften, waren aber nicht an ein Wachstum in Form eines Monolayers gebunden.

4.1.1.3 Zellen der Lungencarcinomzelllinie DMS 79

Die Zelllinie DMS 79 entstand aus der Pleuraflüssigkeit eines Patienten mit einem kleinzelligen Lungencarcinom. Der Patient war mit Cytoxan, Vincristin, Methotrexat und Bestrahlung behandelt worden. Für diese Zellen war die Produktion von ACTH, Bombesin, Calcitonin, β -Endorphin, 17- β -Estradiol, Lipotropin und anderen Substanzen beschrieben worden. Die Zellen besitzen einen Rezeptor für EGF (epidermal growth factor). Da die Expression des hypophysären POMC-Gens bei dieser Zelllinie gesichert war, konnte sie zur Positivkontrolle im Rahmen der RT-PCR eingesetzt werden.

4.1.2 Kultivierung der Zellen

4.1.2.1 Kultivierung und Stimulierung der Zellen für Untersuchungen zur Expression eines POMC-Gens

4.1.2.1.1 Keratinozyten der Zelllinie HaCaT

Für die Versuche erfolgte zunächst eine Kultivierung der Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum als Kulturmedium und mit Penicillin

(100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in 40 ml Kulturflaschen in einem begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C.

Zur Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens in Hautzellen mittels RT-PCR wurden die HaCaT-Zellen mit jeweils etwa 5 ml Kulturmedium in 100er Petrischalen ausgesät, so daß eine Konfluenz von etwa 70 – 80 % entstand.

Als Stimulator wurde CRH 10⁻⁶ M in 50 µl Puffer C gelöst. Nach Zugabe der CRH-Lösung zum Kulturmedium lag das CRH 10⁻⁸ M in der Kulturschale vor. Bei jedem Stimulationsversuch wurden dem Kontrollansatz lediglich 50 µl Puffer C in das Kulturmedium zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C erfolgte die weitere Aufarbeitung zwecks Extraktion der Gesamt-RNA. Über Nacht hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 100 % erreicht.

4.1.2.1.2 Melanomzellen der Zelllinie Colo 679

Die Melanom-Zelllinie Colo 679 wurde in RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in 40 ml Kulturflaschen in einem begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C kultiviert.

Zur Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens in Hautzellen mittels RT-PCR wurden Colo 679-Zellen mit jeweils etwa 5 ml Kulturmedium in 100er Petrischalen ausgesät, so daß eine Zelldichte von etwa 70 – 80 % erreicht wurde. Als Stimulator wurde CRH 10⁻⁶ M in 50 µl Puffer C gelöst. Nach Zugabe der CRH-Lösung zum Kulturmedium lag das CRH 10⁻⁸ M in der Kulturschale vor. Bei jedem Stimulationsversuch wurden dem Kontrollansatz lediglich 50 µl Puffer C in das Kulturmedium zugesetzt. Nach einer Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C - nach dieser Inkubationszeit entstand eine Zelldichte von etwa 100 % - erfolgte die weitere Aufarbeitung zwecks Extraktion der Gesamt-RNA.

4.1.2.1.3 Zellen der Lungencarcinomzelllinie DMS 79

Diese Zelllinie wurde als Positivkontrolle im Rahmen der RT-PCR eingesetzt, da bei diesen Zellen die Expression des hypophysären POMC-Gens gesichert war (Picon et al. 1995).

Für die Versuche erfolgte zunächst eine Kultivierung der Zelllinie DMS 79 in RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) als Kulturmedium im begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C.

In Kulturflaschen (TPP 75 cm²) wurden die Zellen mit jeweils etwa 15 ml Kulturmedium ausgesät. Als Stimulator wurde CRH 10⁻⁶ M in 150 µl Puffer C gelöst. Nach Zugabe der CRH-Lösung zum Kulturmedium lag das CRH 10⁻⁸ M in der Kulturflasche vor. Bei jedem Stimulationsversuch wurden dem Kontrollansatz lediglich 150 µl Puffer C in das Kulturmedium zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C erfolgte die weitere Aufarbeitung zwecks Extraktion der Gesamt-RNA.

4.1.2.2 Kultivierung der Zellen für Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten

4.1.2.2.1 Keratinozyten der Zelllinie HaCaT

Für die Versuche erfolgte zunächst eine Kultivierung der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum als Kulturmedium und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in 40 ml Kulturflaschen in einem begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C.

Nach Zellzählung wurden die Zellen in definierten Mengen in die Kulturschalen ausgesät. Für den ersten, orientierenden Stimulationsversuch wurden Aussaatmengen von 200000, 400000, 800000 und 1600000 Zellen in 6-well-Platten (Nunc Multidish6: Fläche 9,6 cm², Durchmesser 25 mm) gewählt. Die jeweils festgelegte Zellmenge wurde in 2000 µl Kulturmedium (DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) in den wells inkubiert.

Bei den späteren Versuchen wurden größere Volumina an Zellüberstand und Zelllysate (s.u.) benötigt. Deshalb erfolgte die Aussaat der Zellen in den folgenden Versuchen nur noch in 60er Petrischalen (Fläche 21 cm², Durchmesser 60 mm).

Wegen der etwa 2,2-fach größeren Bodenfläche der Kulturschalen im Vergleich zu den 6-well-Platten wurde die Aussaatmenge der Zellen ebenfalls um den Faktor 2,2 erhöht. So sollte eine bessere Vergleichbarkeit zum ersten Stimulationsversuch

erzielt werden. Die Aussaat erfolgte also letztlich mit Zellmengen von 440000, 880000 und 1760000 Zellen in 5000 µl Kulturmedium pro Kulturschale.

4.1.2.2 Melanomzellen der Zelllinie Colo 679

Die Melanom-Zelllinie Colo 679 wurde in RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in 40 ml Kulturflaschen in einem begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C kultiviert. Nach Zellzählung wurden die Zellen in definierten Mengen in die Kulturschalen ausgesät. Analog zur Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurden die Zellen der Melanom-Zelllinie Colo 679 beim ersten orientierenden Stimulationsversuch in Aussaatmengen von 200000, 400000, 800000 und 1600000 Zellen in 6-well-Platten (Nunc Multidish6: Fläche 9,6 cm², Durchmesser 25 mm) ausgesät. Die jeweils festgelegte Zellmenge wurde mit 2000 µl Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) in den wells inkubiert.

Bei den späteren Versuchen erfolgte auch bei Colo 679 die Aussaat der Zellen letztlich mit Zellmengen von 440000, 880000 und 1760000 Zellen in 5000 µl Kulturmedium pro Kulturschale in 60er Petrischalen, um größere Volumina an Zellüberstand und Zelllysat für die Versuche zu erhalten.

4.2 Stimulation und Suppression der Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten in Keratinozyten und Melanomzellen

4.2.1 CRH (10⁻⁸M)

Zur Überprüfung der Stimulierbarkeit der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten in Hautzellen wurden die Zellen (HaCaT und Colo 679) wie folgt stimuliert: In 60er Petrischalen wurden die Zellen (HaCaT und Colo 679) wie oben beschrieben in den jeweils festgelegten Zellmengen mit 5000 µl Kulturmedium (HaCaT: DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml); Colo 679: RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) ausgesät. Direkt nach Zellaussaat

wurde CRH 10^{-6} M, gelöst in 50 μ l Puffer C, in die Kulturschale gegeben. Auf der Kulturschale lag somit eine CRH Konzentration von 10^{-8} M vor.

Als Kontrolle wurden zu weiteren Zellkulturen, die wie oben beschrieben angesetzt wurden, 50 μ l Puffer C ohne darin gelösten Stimulator zugegeben, um einen eventuellen stimulierenden Einfluß von Puffer C berücksichtigen zu können.

Nach einer Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO_2) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C wurde der Zellüberstand abgenommen und eine erneute Stimulation mit CRH 10^{-8} M vorgenommen. Der abgenommene Zellüberstand wurde, wie bei 4.4.1.1 beschrieben, zum späteren Einsatz in RIAs aufgearbeitet.

Nach einer weiteren Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO_2) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C wurden die Zellüberstände abgenommen und es erfolgte die Aufarbeitung der Zellen zum späteren Einsatz in RIAs, wie unter 4.4.1.2 beschrieben.

4.2.2 Dexamethason (10^{-6} M)

Nach der oben beschriebenen Zellaussaat von HaCaT und Colo 679 in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium in 60er Petrischalen wurde Dexamethason 10^{-4} M gelöst in 50 μ l Puffer C in die Kulturschalen gegeben. Auf der Kulturschale lag also eine Dexamethason Konzentration von 10^{-6} M vor. Als Kontrolle wurden weiteren wie oben beschrieben angesetzten Zellkulturen 50 μ l Puffer C ohne darin gelösten Inhibitor zugegeben, um einen eventuellen Einfluß von Puffer C berücksichtigen zu können. Nach einer Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO_2) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C wurde der Zellüberstand abgenommen und erneut Dexamethason 10^{-4} M in das Kulturmedium gegeben. Der abgenommene Zellüberstand wurde zum späteren Einsatz in RIAs (s.u.) aufgearbeitet.

Nach einer weiteren Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO_2) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C wurden die Zellüberstände abgenommen und es erfolgte die Aufarbeitung der Zellen zum späteren Einsatz in RIAs.

4.2.3 CRH (10^{-8} M) + Dexamethason (10^{-6} M)

Direkt nach Zellaussaat von HaCaT und Colo 679 in ihrem jeweiligen Kulturmedium in 60er Petrischalen wurde ein Gemisch von Dexamethason 10^{-4} M und CRH 10^{-6} M

gelöst in 50 µl Puffer C in die Kulturschale gegeben. So wurde eine Dexamethason Konzentration von 10^{-6} M und eine CRH Konzentration von 10^{-8} M auf der Kulturschale erreicht.

Anderen Zellkulturen wurden als Kontrolle 50 µl Puffer C ohne die darin gelösten Substanzen zugegeben, um einen eventuellen Einfluß von Puffer C berücksichtigen zu können.

Nach einer Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C wurde der Zellüberstand abgenommen und erneut ein Gemisch von Dexamethason 10^{-4} M und CRH 10^{-6} M zugegeben. Der abgenommene Zellüberstand wurde weiter aufgearbeitet, um ihn später in RIAs einzusetzen.

Nach einer weiteren Inkubation über Nacht im begasten (5 % CO₂) Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C wurden die Zellüberstände abgenommen und die Zellen wurden zum späteren Einsatz in RIAs aufgearbeitet.

4.3 Suche nach Transkripten eines POMC-Gens in Hautzellen

Die Suche nach POMC-mRNA in den Zellen der Haut war der erste Ansatz zur Überprüfung der Expression eines POMC-Gens.

4.3.1 Extraktion der gesamten RNA der Zellen

Nachdem die Zellen wie unter 4.2.1 beschrieben behandelt worden waren, wurde aus den Hautzellen (native Keratinozyten, HaCaT und Colo 679) und aus der Lungenkrebszelllinie DMS 79 als Positivkontrolle die gesamte RNA extrahiert.

4.3.1.1 Lyse der Zellen

4.3.1.1.1 Zellyse bei nativen Keratinozyten

Der Zellüberstand wurde abgenommen. Die nativen Keratinozyten wurden mit 5 ml PBS defec gespült. Nach Abnahme des PBS defec wurde 1 ml Tri-Reagent auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Zellysat abgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben.

4.3.1.1.2 Zellyse bei Keratinozyten der Zelllinie HaCaT

Der Zellüberstand wurde abgenommen. In die Kulturschale wurde zum Spülen der HaCaT-Zellen 5 ml PBS defic gegeben. Nach Abnahme des PBS defic wurde 1 ml Tri-Reagent auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Zellysat abgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben.

4.3.1.1.3 Zellyse bei Melanomzellen der Zelllinie Colo 679

Der Zellüberstand wurde abgenommen. Da sich die Zellen von Colo 679 relativ leicht von der Kulturschale lösen wurde auf die Spülung mit PBS defic verzichtet. Auf die Zellen von Colo 679 wurde 1 ml Tri-Reagent gegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Zellysat abgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben.

4.3.1.1.4 Zellyse bei Lungencarcinomzellen der Zelllinie DMS 79

Da die Zellen von DMS 79 nicht anhaften, wurden sie mit dem Zellüberstand abgenommen. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und eine Zentrifugation in der Labofuge 400e für 7 Minuten bei 1100 rpm (200 g) durchgeführt. Nach Abgießen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet zum Spülen mit je 4 ml PBS defic resuspendiert und in 14 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Nach einer Zentrifugation in der Labofuge 400e für 7 Minuten bei 1100 rpm (200 g) wurde der Überstand abgegossen. Das Zellpellet wurde in 4 ml PBS defic resuspendiert, ein kleines Aliquot wurde in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Nach einer Zentrifugation für 7 Minuten bei 1100 rpm (200 g), wurde der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde mit 1 ml Tri-Reagent versetzt und das Zellysat nach 15 min in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben.

4.3.1.2 Extraktion der gesamten RNA der Zellen nach Zellyse

Nach Lyse der Zellen mit Tri-Reagent wurden der Probe 0,2 ml Chloroform zugegeben, um die RNA von der DNA zu trennen. Das Gemisch wurde gut geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bildeten sich zwei Phasen. Nun wurde eine Zentrifugation mit 14000 rpm in der Microfuge 22R (12000 g) für 15 Minuten bei 4° C durchgeführt. Es bildeten sich 3 Phasen. Die rötliche untere Phase enthielt Protein. In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA. Diese wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert. Dabei wurde streng darauf geachtet, nicht Bestandteile der darunter liegenden weißen Phase mit DNA mitzunehmen. Die abgenommene wässrige Phase wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Dazu wurden 500 µl Isopropanol gegeben und die Probe gut geschüttelt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation mit 12000 g bei 4° C für 10 Minuten. Danach wurde der Überstand dekantiert. Zum Pellet wurde 1 ml Ethanol (75 %) pro ml Tri-Reagent gegeben und gut geschüttelt. Nach 5 Minuten Zentrifugation mit 7500 g bei 4° C wurde der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde bei 45° C getrocknet und anschließend in 20 µl RNase freiem H₂O aufgenommen. Der entstandene Extrakt der gesamten RNA der Zellen wurde bei -80° C eingefroren.

Der erhaltene RNA-Extrakt konnte auf seinen Gehalt an POMC-RNA mittels RT-PCR geprüft werden.

4.3.2 RT-PCR: Prinzip

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte, das um 1985 von Kary B. Mullis entwickelt wurde. Erstmals beschrieben wurde die PCR von Saiki et al. (1985).

Da der Ausgangspunkt der PCR cDNA ist, muß die aus den Zellen gewonnene RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Nach reverser Transkription kann durch den Einsatz bestimmter Primer die gewünschte DNA-Sequenz vervielfältigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kam das One-step-Verfahren (reverse Transkription der RNA mit den Enzymen Omniscript™ und Sensiscript™ sowie PCR mit Taq-DNA-Polymerase in einem Ansatz) mit dem Qiagen-Kit zum Einsatz, das nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt wurde.

Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von 3 Schritten.

1. Denaturierung: Bei Temperaturen über 90° C wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge denaturiert.

2. Annealing (Anlagerung): Nach Zugabe bestimmter Primer erfolgt die Anlagerung derselben an ihre komplementären Nucleotidsequenzen an den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitt bei Temperaturen zwischen 50° C und 65° C.

Die Primer sind Oligonucleotide (mit einer Sequenz von etwa 20 – 30 Basen).

Ein Primer wird direkt dem 5'-Ende der Nucleotidsequenz des Gens entnommen, ein zweiter ist komplementär (anti-sense) zur Basensequenz des DNA-Stranges am 3'-Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes lokalisiert.

Die Primer können maschinell in gewünschter Länge auf einem Oligonucleotid-Synthesizer erzeugt werden. Dabei sollten einige Bedingungen erfüllt werden. Z.B. sollten die Primer aus nicht repetitiven Sequenzen des Genoms stammen, und dabei sollte der Gehalt an Guanosin und Cytidin nicht zu groß sein. Um die verschiedenen Bedingungen zu erfüllen, werden Primer-Design-Programme verwendet.

3. Extension (Polymerisierung): Durch Zugabe von DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) in die Mischung aus DNA, Primer und Mononucleotiden im Überschuß wird ein neuer DNA-Abschnitt durch komplementäre Ergänzung bei 70° C bis 75° C polymerisiert. Diese Polymerase ist extrem hitzestabil und kann die wechselnden Temperaturen im Verlauf des Verfahrens ohne Aktivitätsverlust überstehen.

Dieser etwa 5 Minuten dauernde Reaktionszyklus wird in der Praxis etwa 25 – 35 mal durchlaufen.

4.3.3 Durchführung der RT-PCR

In der Versuchsserie wurden die folgenden Primer eingesetzt:

HPO 1 5'-TGT CAG GAC CTC ACC ACG GA-3'

HPO 1 entspricht einer 20 Basen langen Sequenz auf Exon 2 des POMC-Gens mit der Position 4594 – 4613.

HPO 13 5'-AAG CGG CGC CCA GTG AAG GT-3'

HPO 13 entspricht einer 20 Basen langen Sequenz auf Exon 3 des POMC-Gens mit der Position 7837 – 7856.

EXO 21 5'-GAA GAT GCC GAG ATC GTG CT-3'

EXO 21 entspricht einer 20 Basen langen Sequenz auf Exon 2 des POMC-Gens mit der Position 4491-4510.

HPO 2 5'- CCA TGG AGT AGG AGC GCT TG-3' (Antisense Primer)

HPO 2 ist eine 20 Basen lange Sequenz, die dem komplementären und vom 5' nach dem 3' Ende geschriebenen Strang der auf Exon 3 gelegenen Basen mit der Position 7785-7804 des POMC-Gens entspricht.

HPO 10 5'-TGC CCT CAC TCG CCC TTC TTG TAG-3' (Antisense Primer)

HPO 10 ist eine 24 Basen lange Sequenz, die dem komplementären und vom 5' nach dem 3' Ende geschriebenen Strang der auf Exon 3 gelegenen Basen mit der Position 8166-8189 des POMC-Gens entspricht.

Beim Einsatz des Primer-Paares EXO 21 und HPO 10 wurde eine 813 Basenpaare lange Nucleotidsequenz des POMC-Gens (ohne Intron B) aus dem Zellmaterial der Positivkontrolle amplifiziert, bzw. ein 813 Basenpaare langes Amplifikat aus dem Zellmaterial der Proben erwartet.

Beim Einsatz des Primer-Paares HPO 1 und HPO 2 wurde eine 319 Basenpaare lange Nucleotidsequenz des POMC-Gens aus dem Zellmaterial der Positivkontrolle amplifiziert, bzw. ein 319 Basenpaare langes Amplifikat aus dem Zellmaterial der Proben erwartet.

Beim Einsatz des Primer-Paares HPO 13 und HPO 10 wurde eine 353 Basenpaare lange Nucleotidsequenz des POMC-Gens aus dem Zellmaterial der Positivkontrolle amplifiziert, bzw. ein 353 Basenpaare langes Amplifikat aus dem Zellmaterial der Proben erwartet.

```

1 ctgctcttca cagcatcacc ctctccccat ttaatggttt aggttaacag gactttttcc
...
661 gacagaggag cgcgggacca agcggcggcg aaggagggga agaagagccg cgaccgagagEXON1
721 aggccgccga gcgccccgc cctcagagag cagcctcccg agacaggtaa gggcgacagc
...
4441 gcaggggtcc caccaatctt gtttgcttct gcagagcctc agcctgcctg gaagatgccgEXON2
                                     EXO21.....
-R-----
4501 agatcgtgct gcagccgctc gggggccctg ttgctggcct tgctgcttca ggctccatg
.....
-----N-
4561 gaagtgcgtg gctgggtgct ggagagcagc cagtgtcagg acctcaccac ggaaagcaac
                                     HPO1.....
-L--L-
4621 ctgctggtac gtgggccatg actgccatct tggcttagac attagatggg actggagctg
...
7501 gtcttcccc aggagtgcac cggggcctgc aagcccagacc tctcggccga gactcccatgEXON3
7561 ttccgggaa atggcgacga gcagcctctg accgagaacc cccggaagta cgcatgggc
7621 cacttccgct gggaccgatt cggccgccgc aacagcagca gcagcggcag cagcggcgca
7681 gggcagaagc gcgaggacgt ctcagcgggc gaagactgcg gcccgctgcc tgagggcggc
                                     -S--Y--S-
7741 cccgagcccc gcagcgatgg tgccaagccg ggcccgcgcy agggcaagcg ctctactcc
                                     HPO2.....
-M--E--H-- F--R--W--G --K--P--V- -G--K--K-- R--R--P--V --K--V--Y-
7801 atggagcact tccgctgggg caagccgggt ggcaagaagc ggcgcccagt gaaggtgac
....
                                     HPO13.....
-P--N--G-- A--E--D--E --S--A--E- -A--F--P-- L--E--F--K --R--E--L-
7861 cctaaccggc ccgaggacga gtcggccgag gccttcccc tggagttcaa gagggagctg
                                     -T--G--Q-- R--L--R--E --G--D--G- -P--D--G-- P--A--D--D --G--A--G-
7921 actggccagc gactccggga gggagatggc cccgacggcc ctgccgatga cggcgcaggg
                                     -A--Q--A-- D--L--E--H --S--L--L- -V--A--A-- E--K--K--D --E--G--P-
7981 gcccaggccg acctggagca cagcctgctg gtggcggccg agaagaagga cgagggcccc
                                     93E []
-Y--R--M-- E--H--F--R --W--G--S- -P--P--K-- D--K--R--Y --G--G--F-
8041 tacaggatgg agcacttccg ctggggcagc cgcaccaagg acaagcgcta cggcggtttc
.....
                                     3E7/P27 []
-M--T--S-- E--K--S--Q --T--P--L- -V--T--L-- F--K--N--A --I--I--K-
8101 atgacctccg agaagagcca gacgcccctg gtgacgctgt tcaaaaacgc catcatcaag
                                     84E []
-N--A--Y-- K--K--G--E
8161 aacgcctaca agaagggcga gtgagggcac agcggggcccc agggctaccc tccccagga
.....HPO10.....
11P []
8221 ggtcgacccc aaagcccctt gctctcccct gccttctgctc cgcctcccag cctgggggggt
8281 cgtggcagat aatcagcctc ttaaagctgc ctgtagttag gaaataaaac ctttcaaatt
8341 tcacatccac ctctgacttt gaatgtaaac tgtgtgaata aagtaaaaat acgtagccgt

```

Abb. 4.1: *Ausschnitt aus der Nucleotid- und der Aminosäuresequenz des humanen hypophysären POMC-Gens bzw. des POMC-Proteins. Primer- und Antikörperbindende Nucleotid- bzw. Aminosäuresequenzen sind mit Unterstreichungen bzw. Bändern gekennzeichnet.*
Rot: EXON-Bereiche / transkribiert (POMC-mRNA)
Blau: EXON-Bereiche / transkribiert (POMC-mRNA) und translatiert (POMC-Protein)(nach Takahashi et al. 1983)

4.3.3.1 RT-PCR-Ansätze

Die RNA wurde mit Hilfe der im verwendeten RT-PCR Mix (Qiagen-Kit: One-step-Verfahren mit reverser Transkription der RNA und PCR des Transkripts in einem Ansatz) enthaltenen reversen Transkriptasen (Enzyme: Omniscript™ und Sensiscript™) in cDNA umgeschrieben, um eine PCR durchführen zu können. Nach reverser Transkription konnte durch den Einsatz bestimmter Primer-Paare die gewünschte DNA Sequenz mit Hilfe der, ebenfalls im Ansatz enthaltenen, Taq-DNA-Polymerase vervielfältigt werden.

Zunächst erfolgte die Herstellung des Mastermix für PCR.

Dazu wurden 140 µl 5-fach Buffer mit 467,6 µl RNase freiem H₂O gemischt. Dann wurden 28 µl dNTP sowie je 4,2 µl von Primer 1 und Primer 2 zugegeben. Anschließend wurden 28 µl RT-PCR-Mix (mit den darin enthaltenen Enzymen: Omniscript™ und Sensiscript™ Reverse Transcriptase sowie Taq-DNA-Polymerase) dazu pipettiert und durchmischt.

Jeweils 48 µl Mastermix wurden in jedes Eppendorf-Minicut des Reaktionsansatzes pipettiert.

Der PCR Kontrolle wurde 2 µl H₂O zugegeben.

In die übrigen Reaktionsgefäße wurden je 2 µl der Proben zugegeben. Als Proben wurden verdünnte RNA-Extrakte, die aus den Zellen von Colo 679, HaCaT, nativen Keratinozyten und DMS 79 (jeweils mit und ohne CRH Stimulation) gewonnen worden waren, eingesetzt.

Von allen RNA-Extrakten wurden Doppelproben angesetzt, um jeweils eine Probe der reversen Transkription zuzuführen und die andere ohne vorherige reverse Transkription in die PCR einzuschleusen.

4.3.3.2 Reverse Transkription der Gesamt-RNA

Nachdem die PCR-Anlage (Programm bd Quiaos) die notwendige Temperatur von 50° C erreicht hatte, wurden die Proben, die eine reverse Transkription durchlaufen sollten, eingestellt. Die reverse Transkription lief nun 30 Minuten lang bei einer Temperatur von 50° C ab. Nun wurde die Temperatur der PCR-Anlage auf 94° C

gesteigert, danach wurden auch die übrigen Proben dazugestellt. Die Temperatur von 94° C wurde für 15 Minuten gehalten, um die Reverse-Transkriptase zu inaktivieren und die Polymerase (Taq) zu aktivieren.

4.3.3.3 Amplifikation von POMC-cDNA-Fragmenten

Nun startete der erste Zyklus der PCR. Der DNA-Doppelstrang wurde 50 Sekunden lang bei 94° C denaturiert. Bei einer Temperatur von 58° C erfolgte dann die Anlagerung der Primer an ihre komplementären Nucleotidsequenz-Abschnitte innerhalb einer 1 Minute. Die Synthese des neuen DNA-Abschnittes mit Hilfe der DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* erfolgte bei 72° C für eine Minute.

Dieser Zyklus wurde 35 mal durchlaufen. Abschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 72° C, um alle begonnenen Amplifikationen abzuschließen. Bis zur Gelelektrophorese wurden die Proben bei 4° C gelagert.

4.3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese der cDNA-Amplifikate

Um ein 1,2 %iges Gel herzustellen, wurden 1,8 g Agarose NEEO (niedrige Elektroendoosmose) in 150 ml TAE (Tris-Acetat-EDTA) im Microwellengerät bei ca. 100° C gelöst. Diese Lösung wurde nach Abkühlen auf etwa 60° C in eine Gelkammer gegossen und ein Platzhalter zur Herstellung der Taschen im Gel eingesetzt. Nach etwa einer halben Stunde war das Gel fest und der Platzhalter wurde entfernt.

In 1,5 ml Eppendorfgefäße wurden je 3 µl Farbstoff in Glycerin-Lösung für die Gelelektrophorese gegeben. Dazu wurden je 15 µl der Proben gegeben. Nach Anschließen des Spannungsgebers und Zugabe des TAE Lauf-Puffers in die Gelkammer wurden in die Geltaschen je 18 µl der Proben gegeben. An Position 1 der Geltaschen wurden 8 µl eines Nucleotidsequenz-Längenmarkers zur Größenbestimmung der Amplifikate gegeben. Bei einer Spannung von 90 V wurde die Gelelektrophorese etwa eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 30 Sekunden in eine 0,05 %ige Ethidiumbromid-Lösung gelegt. Durch UV-Bestrahlung wurden die Nucleotidbanden sichtbar gemacht und fotografiert.

4.4 Überprüfung der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten

4.4.1 Materialgewinnung

Nachdem die Zellen in definierter Zellmenge in 60er Petrischalen ausgesät und die Zugabe des Stimulators bzw. Inhibitors oder von Puffer C als Kontrolle erfolgt war, schloss sich eine Inkubation über Nacht im mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C an.

4.4.1.1 Zellkultur-Überstände

Die Zellkulturüberstände (je etwa 5 ml) wurden 24 h nach Versuchsbeginn von den Kulturschalen abgenommen, in 13 ml Sarstedt-Röhrchen gegeben und mit 500 µl Enzymhemmercocktail für Zellüberstände (Herstellung unter 3.2 beschrieben) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl 1 N HCl stellten sich pH-Werte von 3 - 3,5 ein. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4° C wurden die mit Enzymhemmercocktail versetzten und angesäuerten Zellkulturüberstände bei -20° C eingefroren.

Auf die Zellen wurden pro Kulturschale 5 ml neues Kulturmedium gegeben (HaCaT: DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml); Colo 679: RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und mit Penicillin (100 units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml)) und danach erfolgte die erneute Zugabe der jeweiligen Substanzen, bzw. von Puffer C. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C erfolgte die erneute Abnahme der Zellüberstände und Überführung in 13 ml Sarstedt-Röhrchen. Zu den Zellüberständen wurden 500 µl Enzymhemmercocktail für Zellüberstände (Herstellung unter 3.2 beschrieben) und 200 µl 1 N HCl gegeben. Nach einer Inkubation bei 4° C für 30 Minuten wurden die mit Enzymhemmercocktail versetzten und angesäuerten Zellkulturüberstände bei -20° C eingefroren.

4.4.1.2 Zellen

Die festhaftenden Zellen (HaCaT) wurden einmal kurz mit 2500 µl PBS defic. (50 % des Zellüberstandsvolumens) gespült. Bei Colo 679 wurde dieser Schritt nicht durchgeführt, da sich diese Zellen sehr leicht von der Unterlage ablösen.

Auf die Kulturschalen wurden nun je 2500 µl EDTA-Trypsin in PBS defic (Lösung für festhaftende Zellen wie unter 3.2 beschrieben) gegeben. Nach vollständiger Ablösung (bei HaCaT nach ca. 15 min bei 37°C) konnten die Zellen mit der EDTA-Trypsin-PBS defic-Lösung abgenommen werden. Ein Aliquot wurde in die Neubauerzählkammer gegeben und eine Zählung der Zellen durchgeführt.

Nach 5 Minuten Zentrifugation der Zellsuspension bei 280 g in der Bio-Fuge wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 2500 µl Enzymhemmercocktail für Zelllysate (Herstellung unter 3.2 beschrieben) resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4° C wurden die Proben bei –20° C eingefroren.

4.4.2 Materialaufarbeitung

Die Zellüberstände wurden aufgetaut. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 16000 g bei 4° C wurde der Überstand abgenommen und extrahiert, wie unter 4.4.3 beschrieben.

Die Zelllysate wurden nach Auftauen zunächst für 30 Sekunden im Ultraschallbad bei 4° C behandelt, um die Zellen weiter zu zerstören. Anschließend wurden die Zelllysate mit 2500 µl 0,005 N HCl angesäuert. Dabei stellten sich pH-Werte zwischen 3 und 3,5 ein. Nach einer dreißigminütigen Zentrifugation bei 16000 g bei 4° C wurde der Überstand abgenommen und, wie unter 4.4.3 beschrieben, extrahiert.

4.4.3 Extraktion

Nach der Zellernte und Materialaufarbeitung wurden die Zellüberstände und Zelllysate nach der im Folgenden beschriebenen Methode extrahiert.

Verwendet wurden C18-Kartuschen, die in eine Extraktions-Anlage eingebracht wurden. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Kühlung der Kartuschen durch Eis. Die Lösungen wurden in der beschriebenen Reihenfolge auf die Kartuschen gegeben und mittels Vakuum durch die Kartusche gesaugt:

Die Kartuschen wurden zuerst mit 5 ml Methanol, 5 ml Harnstoff (8 M) und 10 ml Aqua bidest. aktiviert. Danach erfolgte die Aufgabe der Proben (jeweils etwa 5 ml angesäuerter Zellüberstand bzw. angesäuertes Zelllysate). Nun wurden die

Kartuschen mit 10 ml Aqua bidest. und 10 ml Essigsäure (4 %ig) gewaschen. Zum Auffangen des Eluates wurden nun die Sammelröhrchen in die Extraktionsanlage eingestellt. Auf die Kartuschen wurden 10 ml eines Gemisches aus 1-Propanol (96 %) und Essigsäure (4 %) gegeben. Nach Auffangen des Eluates wurden die Sammelröhrchen aus der Extraktionsanlage entfernt. Die Kartuschen wurden nun mit 10 ml Essigsäure (4 %ig), dann mit 10 ml Aqua bidest. und zuletzt mit 5 ml Harnstoff (8 M) gespült. Im Falle weiterer Extraktionen wurden die Kartuschen wie oben beschrieben erneut aktiviert. Zur Beendigung der Extraktion wurden 5 ml Methanol auf die Kartuschen gegeben.

Nach der Extraktion wurden die aufgefangenen Eluate der Proben von Zellüberständen und Zelllysaten in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed Vac) von 1-Propanol befreit. Die entstehenden Rückstände wurden in jeweils 500 µl Aqua bidest. aufgenommen. Anschließend wurden die Proben bei -20° C eingefroren und lyophilisiert. Die Lyophilisate, als Extrakte bezeichnet, wurden in jeweils 500 µl Puffer C aufgenommen.

Die Extrakte der Zellkulturüberstände wurden in 5 Aliquots zu jeweils 100 µl aufgeteilt, die der Zelllysate wurden in 10 Aliquots à 50 µl aufgeteilt. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

4.4.4 Standardisierung

Die Bestimmung der Mengen an POMC-Derivaten in den Probenextrakten erfolgte in Radioimmunoassays (wie in 4.4.5 beschrieben) anhand von Standardkurven, die folgendermaßen erstellt wurden: Zellkulturüberständen bzw. Zelllysaten der eingesetzten Zelllinien (HaCaT und Colo 679) wurde das jeweilige Antigen nach Vorbereitung der Proben, wie nachfolgend beschrieben, in definierten Mengen von 1 - 10000 fmol zugesetzt.

HaCaT- und Colo 679-Zellen wurden in 100er Petrischalen anstatt in 60er Petrischalen, analog zu der Kultivierung der Zellen wie in 4.1.2.2 beschrieben, gezüchtet. Die Verarbeitung der Zellkulturüberstände und Zellen für die Herstellung der Standardkurven erfolgte analog zu dem Verfahren, das bei den stimulierten Zellen und Zellkulturüberständen angewendet wurde (wie unter 4.4.1.1 und 4.4.1.2

beschrieben), jedoch unterblieb sowohl bei den Zellkulturüberständen, als auch bei den Zelllysaten das Ansäuern.

Zellkulturüberstände:

Die für Standardkurven bestimmten Zellkulturüberstände wurden von den Schalen abgenommen. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 16000 g bei 4° C wurden die entstandenen Überstände gepoolt und in 5 ml Aliquots zunächst neutral filtriert, um vorhandene POMC-Derivate zu entfernen.

Auch für die Filtration wurden C18-Kartuschen verwendet, die in eine Extraktions-Anlage eingebracht wurden. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Kühlung der Kartuschen durch Eis. Die Lösungen wurden in der beschriebenen Reihenfolge auf die Kartuschen gegeben und mittels Vakuum durch die Kartusche gesaugt:

Die Kartuschen wurden mit 5 ml Methanol, dann mit 5 ml Harnstoff (8 M) und zuletzt mit 10 ml Aqua bidest. aktiviert. Zum Auffangen des Filtrates wurden nun die Sammelröhrchen in die Extraktionsanlage eingestellt. Danach erfolgte die Aufgabe von jeweils etwa 5 ml nicht angesäuertem Zellüberstand. Nach Auffangen des Filtrates wurden die Sammelröhrchen aus der Extraktionsanlage entfernt. Nun wurden die Kartuschen mit 10 ml Aqua bidest. und 10 ml Essigsäure (4 %ig) gewaschen. Auf die Kartuschen wurden 10 ml eines Gemisches aus 1-Propanol (96 %) und Essigsäure (4 %) gegeben. Die Kartuschen wurden nun mit 10 ml Essigsäure (4 %ig), dann mit 10 ml Aqua bidest. und zuletzt mit 5 ml Harnstoff (8 M) gespült. Im Falle weiterer Extraktionen oder Filtrationen wurden die Kartuschen wie oben beschrieben erneut aktiviert. Zur Beendigung der Filtration wurden 5 ml Methanol auf die Kartuschen gegeben.

Den aufgefangenen Filtraten (jeweils 5 ml) wurden dann entweder nur 20 µl Puffer D („Leer-Proben“) oder 20 µl der Antigenlösung („Standard-Lösung“) zugegeben. Diese Standard-Lösungen enthielten das jeweilige Antigen in definierten Mengen von 1 - 10000 fmol in Puffer D.

Anschließend wurden diese Leer- und Standardproben mit 200 µl 1 N HCl angesäuert; es stellten sich pH-Werte zwischen 3 und 3,5 ein. Nun wurden die Leer- und Standardproben bei -20° C für 2 Stunden eingefroren. Nach dem Wiederauftauen wurden die Proben 30 Minuten lang bei 16000 g zentrifugiert. Die so entstehenden Probenüberstände wurden wie die Überstände der oben beschriebenen Proben nach Vorschrift (4.4.3) extrahiert, d.h. die Zellüberstand-

Standardproben wurden weiterbehandelt wie die oben beschriebenen Zellüberstandproben und 100 µl Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung als Leer- und Standardextrakte der Zellüberstände bei -20° C gelagert.

Zellysate:

Für die Herstellung von Standardkurven aus lysiertem Zellmaterial wurden die nicht angesäuerten Zellysate 30 Minuten bei 16000 g bei 4° C zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden gepoolt und in 2,5 ml Aliquots neutral filtriert, wie oben für die Zellkulturüberstände beschrieben. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µl Puffer D („Leer-Proben“) bzw. von jeweils 20 µl der Antigenlösung („Standard-Lösung“) zu jeweils 2,5 ml des Filtrates. Diese Standard-Lösungen enthielten das jeweilige Antigen in definierten Mengen von 1 - 10000 fmol in Puffer D.

Anschließend wurde diese Leer- und Standardproben mit 2,5 ml 0,005 N HCl angesäuert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 16000 g erfolgte die Extraktion des entstandenen Überstandes nach Vorschrift (4.4.3), d.h. die Zellysat-Standardproben wurden weiterbehandelt wie die oben beschriebenen Zellysatproben. Die entstandenen Zellysat Leer- und Standardextrakte wurden in 50 µl Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

4.4.5 Nachweis von POMC-Derivaten in Extrakten mit Hilfe von Radioimmunoassays (RIAs)

Die gewonnenen Extrakte wurden in RIAs auf ihren Gehalt an POMC-Derivat-immunoreaktivem Material getestet. Einerseits sollten hierzu bereits etablierte Radioimmunoassays eingesetzt werden, andererseits sollten im Rahmen eines mehrere Untersuchungen übergreifenden Projektes neue Radioimmunoassays entwickelt und die dazu nötigen polyklonalen Antiseren und monoklonalen Antikörper gewonnen werden.

4.4.5.1 Neuentwicklung von one-site-fluid-phase-RIAs und two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIAs zum Nachweis von POMC-Derivaten in Extrakten

Voraussetzung für die Entwicklung von Radioimmunoassays war die Gewinnung von Antikörpern.

4.4.5.1.1 Herstellung polyklonaler Kaninchen-Antiseren für one-site-fluid-phase-Radioimmunoassays

Zunächst wurden Kaninchenserum mit polyklonalen Antikörpern hergestellt. Die Antikörper sollten sich gegen bestimmte Aminosäuresequenzen der POMC-Derivate richten.

4.4.5.1.1.1 Peptide und deren Kopplung an Keyhole limpet Hemocyanin (KLH) mittels Carbodiimid-Derivat (CDI)

Als Antigene dienten Sequenzen von fünf Aminosäuren aus dem N- und C-Terminus von POMC-Derivaten. Die verwendeten Pentapeptide wurden von Frau Friedrich im Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen synthetisch hergestellt. Um eine spätere radioaktive Markierung der Peptide mit ¹²⁵Jod zu ermöglichen, wurde aus der eigentlichen Aminosäuresequenz der POMC-Derivate jeweils eine Aminosäure gegen Tyrosin ausgetauscht, soweit nicht in der betreffenden Sequenz ein Tyrosinrest enthalten war.

Zur Anwendung kamen:

FR 3b (Acetyl-YVMGY, Acetyl-Tyr-Val-Met-Gly-Tyr): Ac-N-[Tyr⁵] γ _H-MSH (1-5)

FR 4a (EDVSY, Glu-Asp-Val-Ser-Tyr): [Tyr⁵] JP_H (1-5)

FR 4b (Acetyl-EDVSY, Acetyl-Glu-Asp-Val-Ser-Tyr): Ac-N-[Tyr⁵] JP_H (1-5)

FR 5b (Acetyl-SYSMY, Acetyl-Ser-Tyr-Ser-Met-Tyr): [Tyr⁵] α _H-MSH (1-5)

FR 6 (YGKPV-Amid, Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-Amid): [Tyr⁹] α _H-MSH (9-13)

FR 7b (Acetyl-PVKVY, Acetyl-Pro-Val-Lys-Val-Tyr): Ac-N-CLIP_H (1-5)

FR 8 (YPLEF, Tyr-Pro-Leu-Glu-Phe): [Tyr¹⁸] CLIP_H (18-22)

FR 9a (ELTGY, Glu-Leu-Thr-Gly-Tyr): [Tyr⁵] β_H-LPH (1-5)

FR 10a (DEGPY, Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr): β_H-MSH (5-9)

FR 11 (YPPKD, Tyr-Pro-Pro-Lys-Asp): [Tyr¹⁸] β_H-MSH (18-22)

Da diese genannten Oligopeptide nur geringe antigene Eigenschaften erwarten ließen, mußten sie als Haptene an ein Trägermolekül gekoppelt werden, um so ihre Immunogenität zu erhöhen. Die obengenannten Peptide wurden deshalb alle an KLH mit CDI gekoppelt, wie in der folgenden Kopplungsvorschrift beschrieben. Mengen- und Volumenangaben beziehen sich jeweils auf die Immunisierung eines Kaninchens.

In 1,5 ml Aqua bidest. wurden 10 mg KLH gelöst. In 500 µl Aqua bidest. wurden 5 mg Peptid gelöst und dazu gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden unter ständigem Schütteln 5 mg CDI, gelöst in 1 ml Aqua bidest., zugegeben. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung in den Kühlraum überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4° C wurde 1 ml Aqua bidest zugegeben. Die so entstandenen 4 ml Konjugat wurden in 10 Aliquots à 0,4 ml aufgeteilt und bei -20° C gelagert.

4.4.5.1.1.2 Immunisierung

Als Versuchstiere wurden für die Immunisierung pro eingesetztem Antigen jeweils ein weißes und ein wildfarbendes Kaninchen verwendet. Die Kaninchen wurden unter definierten Lichtverhältnissen (12 h hell und 12 h) dunkel gehalten. Die Versorgung mit Wasser und Futter erfolgte unter standardisierten Bedingungen.

Zur Primärimmunisierung (Priming) wurden je 0,4 ml des Konjugates mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schem Adjuvans vermischt und den Kaninchen subcutan injiziert. Das Priming erfolgte viermal im Abstand von je 7 Tagen.

Für die Boosterungen wurde den Kaninchen nach 4 Wochen und weiterhin in vierwöchigen Abständen ein Gemisch aus 0,4 ml Konjugat und 0,4 ml inkomplettem Freund'schen Adjuvans subcutan injiziert. Die Boosterungen erfolgten so lange, bis verwertbare Titer der Antikörper im Kaninchenblut nachweisbar waren und diese nicht weiter anstiegen. Zur Titerbestimmung wurde den Kaninchen nach dem bei

4.4.5.1.1.3 beschriebenen Verfahren Blut entnommen. Wenn die Kaninchen nach einem halben Jahr noch keinen verwertbaren Titeranstieg zeigten, wurden sie nicht weiter immunisiert. Kaninchen mit verwertbarem und nicht mehr steigendem Antikörpertiter wurden entblutet, wie unter 4.4.5.1.1.6 beschrieben.

4.4.5.1.1.3 Blutentnahmen

Zwei Wochen nach Abschluß des Priming erfolgte die erste Antikörper-Titerbestimmung. Weitere Titerbestimmungen folgten jeweils 2 Wochen nach den Boosterungen. Dazu wurde den Kaninchen Blut aus einer Ohrvene entnommen und daraus Serum gewonnen.

Das Blut wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und dann bei 4° C über Nacht stehen gelassen. Anschließend wurde das Blut bei 1000 g für 15 min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und in einem one-site-fluid-phase RIA unter Einsatz von radioaktiv markiertem und nicht markiertem Antigen auf seinen Antikörpertiter untersucht. Dabei konnten mehrere Serumverdünnungen ausgetestet werden.

Das restliche Serum wurde bei -20° C eingefroren.

4.4.5.1.1.4 Herstellung radioaktiv markierter Antigene (Tracer)

Zur Bestimmung der Antikörpertiter im Kaninchenserum mußten die Antigene radioaktiv markiert werden. Hierzu wurde die aromatische Ringstruktur der Tyrosinreste der Peptide mit dem Gammastrahler ¹²⁵I (Halbwertszeit 60 Tage) radioaktiv markiert. Die Markierung erfolgte mittels der Chloramin T-Methode nach Hunter und Greenwood (1962) mit einer Modifikation nach Wiedemann und Teschemacher (1986).

50 µl eines 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffers (pH 7,5) und 10 µl einer 5 x 10⁻⁵ M Lösung des zu jodierenden Peptids (in Aqua bidest.) wurden in einem silikonisierten Glasgefäß mit 0,1 mCi trägerfreiem Na-¹²⁵I, gelöst in 10 µl einer Natriumhydroxidlösung (Amersham, Braunschweig), gemischt. Durch die Zugabe von 10 µl einer Chloramin T-Lösung (20 µg Chloramin T /10 µl 0,05 M Natrium-Phosphat-Puffer) wurde die Jodierung gestartet. Nach einer Inkubation von 30 Sekunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20 µg Natriummetabisulfit (gelöst in 10 µl 0,05 M Natrium-Phosphat-Puffer) gestoppt. Alle

Lösungen, außer Na-¹²⁵I, wurden auf Eis gelagert. Die Jodierung fand bei Raumtemperatur statt.

Das Jodierungsprodukt wurde mit 1 ml 1-Propanol und 1 ml 4 %iger Essigsäure gemischt und bei 4° C gelagert.

4.4.5.1.1.5 Titerbestimmung mittels one-site-fluid-phase RIA als Titerest

Die Bestimmung der jeweiligen Antikörpertiter im Kaninchenserum erfolgte mit one-site-fluid-Phase RIA wie im folgenden beschrieben.

Als Doppelproben wurden folgende Werte bestimmt:

Gesamtradioaktivität (CT)

In diesem Inkubationsansatz wurde die Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität (Tracer) bestimmt.

Blank-Wert (BI)

Hierbei wurde die Radioaktivität (Tracer) im Überstand (s.u.) bestimmt, die nicht auf der Bindung der radioaktiv markierten Peptide an Bestandteile des Antiserums oder der Probe beruhte. Alle anderen Werte wurden um den Blank-Wert bereinigt.

Null-Standard (B₀)

Der B₀ entsprach der Bindung des Tracers in Anwesenheit des Antiserums bei Abwesenheit von Verdrängern (nicht radioaktiv markierter Liganden).

TV-Wert

Der Totalverdränger-Wert gab die Radioaktivität an, die in Anwesenheit einer im Überschuss zugegebenen Menge an nicht radioaktiv markierten Liganden noch im Überstand vorlag, d.h. an bestimmte Bestandteile des Antiserums unspezifisch gebunden wurde.

In der Reihenfolge und Menge wie in der Tabelle 4.1 gezeigt, wurden die einzelnen Komponenten der Inkubationsansätze in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und gemischt. Alle Inkubationen wurden auf Eis durchgeführt.

Angaben in μl	CT	Bl	Bo	TV
Puffer C	500	200	150	150
Puffer D	20	20	20	—
Totalverdränger	—	—	—	20
Antiserum-Verdünnung in Puffer C	—	—	50	50
Tracer in Puffer D	20	20	20	20

Tab. 4.1 *Quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze des one-site-fluid-Phase RIA als Titer test (Angaben in μl)*

Das Kaninchenserum wurde mit Puffer C verdünnt. Zu Beginn der Titer tests wurde üblicherweise eine Antiserum-Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Zur weiteren Untersuchung des Kaninchenserums wurde später eine Reihe von Verdünnungen des Kaninchenserums eingesetzt.

Der Ansatz wurde mit einer definierten Menge an radioaktiv markiertem Antigen inkubiert. Als Tracer wurde soviel ^{125}I markiertes Antigen (Peptid) in Puffer D gelöst, wie nötig war, um in 20 μl dieser Lösung ca. 3000 cpm zu erhalten. Wenn sich spezifische Antikörper im getesteten Antiserum befanden, so kam es zur Bindung des radioaktiv markierten Antigens an die Antikörper.

Als Totalverdränger wurde nicht radioaktiv markiertes Peptid, 10^{-5} M, gelöst in Puffer D verwendet. Da hiermit ein Überschuß an Peptid im Ansatz erzielt wurde, kam es im Falle einer Bindung des Tracers an die Antikörper zu dessen kompetitiver Verdrängung. Das Ausmaß der Verdrängbarkeit des Tracers von den Antikörpern des Antiserums verhielt sich proportional zum erreichten Titer.

Nach Zugabe des radioaktiv markierten Peptids wurden die Inkubationsansätze etwa 20 sec geschüttelt. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 4°C .

Durch Adsorption an Aktivkohle wurde das freie Peptid dann vom antikörpergebundenen Peptid getrennt. Dazu wurde eine Kohlesuspension, bestehend aus 1 % Aktivkohle und 0,5 % BSA in Puffer C, hergestellt und 300 μl davon allen Inkubationsansätzen (ausgenommen CT-Wert) zugegeben. Die Ansätze wurden 20 sec geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine

Zentrifugation in der Epifuge bei 8800 g für 4 min. Danach wurden die Inkubationsansätze 10 min auf Eis gestellt.

Nun wurden jeweils 450 µl des o.g. Überstandes vorsichtig abgenommen und in RIA-Röhrchen (3,5 ml Sarstedt-Röhrchen) pipettiert. Jeder Ansatz wurde eine Minute im Gamma-Zähler gemessen. Die dabei gemessene Radioaktivität war ein Maß für den Gehalt an spezifischen Antikörpern im Versuchsansatz. Die Berechnung der spezifischen Bindung des Tracers an die POMC-Derivat (Antigen)-spezifischen Antikörper des Antiserums erfolgte nach der Formel $(B_0 - TV) \times 100 / (CT - BI)$.

4.4.5.1.1.6 Entbluten der Kaninchen und Aufbewahren der Antiseren

Die Tiere wurden nach folgendem Verfahren entblutet und getötet.

Zur Narkose wurde den Kaninchen Ketamin in einer Dosis von 1 - 5 mg/kg Körpergewicht i.m. injiziert. Zusätzlich wurden zur Lokalanästhesie an der vorderen Halsseite 5 – 10 ml Prilocain 0,5 % subcutan injiziert. Nach Rasieren der Haare erfolgte ein Hautschnitt über der Trachea. Unter sorgfältiger Blutstillung wurde vorsichtig durch die Halsweichteile bis auf die Trachea vorpräpariert. Nun wurde lateral der Trachea das Paket aus Nervus Vagus und Arteria Carotis aufgesucht. Die Arteria Carotis wurde unter Schonung des Nerven vorsichtig freipräpariert. Die Carotis wurde cranial und caudal mit jeweils zwei Fäden umschlungen. Nach Anlegen einer Bulldog-Klemme caudal und Ligatur der Carotis mit den cranial angelegten Fäden wurde die Arterie vorsichtig mit der Schere eröffnet. Nun wurde ein Venenkatheter in das Lumen der Carotis eingelegt und unter Öffnen der Bulldog-Klemme zentralwärts vorgeschoben. Mit den caudalen Fäden wurde der Katheter fixiert. Das ausströmende Blut konnte nun sauber aufgefangen werden, ohne daß es zu großen Verlusten oder Verunreinigungen kam.

Das Blut wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Anschließend wurde das Blut bei 1000 g für 15 min zentrifugiert. Das so entstandene Antiserum wurde abpipettiert und in einem one-site-fluid-Phase RIA der Antikörpertiter bestimmt (siehe 4.4.5.1.1.5).

Das Serum wurde mit früher gesammelten Serumfraktionen mit hohen Antikörpertitern gepoolt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C eingefroren.

4.4.5.1.2 Gewinnung monoklonaler Antikörper von Mäusen zum Aufbau von two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIAs

Mit Hilfe der aus Mäuselymphozyten gewonnenen monoklonalen Antikörper, die sich gegen bestimmte Aminosäuresequenzen der POMC-Derivate richten sollten, sollten später two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIAs aufgebaut werden.

4.4.5.1.2.1 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von γ_{H} -MSH

Als Antigen diente eine Sequenz aus dem N-terminalen Fragment von γ_{H} -MSH. Um eine radioaktive Markierung des Peptids mit ^{125}I zu ermöglichen, welche die Interaktion des N-Terminus mit Antikörpern nicht stören sollte, wurde der Aminosäurerest in Position 5 von γ -MSH gegen Tyrosin ausgetauscht.

FR 3a (YVMGY, Tyr-Val-Met-Gly-Tyr): [Tyr^5] γ_{H} -MSH (1-5)

Da dieses Oligopeptid nur geringe antigene Eigenschaften erwarten ließ, musste es als Hapten an ein Trägermolekül gekoppelt werden, um so seine Immunogenität zu erhöhen. Das Peptid wurde deshalb an KLH mit CDI gekoppelt, wie in der folgenden Kopplungsvorschrift beschrieben.

4.4.5.1.2.1.1 Kopplung des N-terminalen Fragmentes von γ_{H} -MSH mit einem Carbodiimid-Derivat (CDI) an Keyhole limpet Hemocyanin (KLH)

Die Mengen- und Volumenangaben beziehen sich auf die Immunisierung einer Maus.

In 0,4 ml Aqua bidest. wurden 3 mg KLH gelöst. Dazu wurde 1 mg des Pentapeptids, gelöst in 0,4 ml Aqua bidest., zugegeben. Nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln erfolgte Zugabe von 2 mg CDI gelöst in 0,25 ml Aqua bidest. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Lagerung bei 4° C über Nacht zur weiteren Inkubation. Die so entstandenen 1,050 ml Konjugat wurden in 7 Aliquots à 150 μl aufgeteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -20° C gelagert.

4.4.5.1.2.1.2 Immunisierung

Für die Immunisierung wurden 5 Balb/c Mäuse eingesetzt (die bei der Zellfusion verwendeten Myelomzellen stammen von Balb/c Mäusen)

Die Mäuse waren bei Beginn der Immunisierung etwa sechs Wochen alt. Sie wurden unter definierten Lichtverhältnissen (12 h hell und 12 h dunkel), bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Versorgung mit Wasser und Futter erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Jede Maus hatte einen eigenen Käfig.

Zur Immunisierung wurde die Maus zwischen Daumen und Zeigefinger im Nacken kurz hinter den Ohren gefasst, so daß die Maus den Kopf nicht mehr nach hinten wenden konnte. Zusätzlich wurde der Schwanz zwischen Klein- und Ringfinger festgehalten. Die Injektion des Konjugates erfolgte intraperitoneal. Die Kanüle wurde zwischen Genitale und Leiste angesetzt, der Einstich erfolgte flach in cranialer Richtung. Zur Vermeidung einer Darmverletzung hielt man dabei den Kopf der Maus tiefer als das Becken. Dann wurde das Konjugat langsam injiziert.

Am Tag 1 erfolgte das Priming mit 150 µl des Konjugates vermischt mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schem Adjuvans.

An den Tagen 30, 60 und 90 erfolgte eine Boosterung mit 150 µl des Konjugates vermischt mit dem gleichen Volumen an inkomplettem Freund'schem Adjuvans.

Nach Abschluß der Boosterung wurden den Mäusen Blut entnommen (4.4.5.1.2.1.3) und das Vorhandensein von Antikörpern im Serum mit einem Dot Blot-Test (4.4.5.1.2.1.4) bestimmt. Eine positiv getestete Maus wurde ausgewählt und für die Zellfusion vorbereitet.

Dazu erfolgte an den Tagen 120, 121 und 122 eine abschließende Boosterung mit jeweils 150 µl des Konjugates vermischt mit dem gleichen Volumen an PBS.

4.4.5.1.2.1.3 Blutentnahmen

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse flach auf ihren Käfig gesetzt. Durch einen vorsichtigen Zug am Schwanz wurde dieser gestreckt. Nun konnte die Schwanzvene punktiert werden. Mit Kapillar-Röhrchen wurde das austretende Blut aufgefangen.

Ein Ende der Kapillaren wurde nun mit Kitt verschlossen. Nach Zentrifugation in der Kapillarzentrifuge wurde das gewonnene Serum abpipettiert und gepoolt.

Das Serum wurde anschließend mit einem Dot Blot-Test qualitativ auf seinen Gehalt an Antikörpern getestet.

4.4.5.1.2.1.4 Antikörpernachweis in Maus-Seren mittels Dot Blot-Test

Da für die Immunisierung der Mäuse das N-terminale Fragment von γ_H -MSH mit CDI an KLH gekoppelt worden war, wurde das Peptid für den Dot Blot-Test mit BDB an BSA gekoppelt. Auf diese Weise sollte verhindert werden, daß fälschlicherweise Antikörper gegen Bestandteile von CDI und KLH detektiert und als Antikörper gegen den N-Terminus von γ -MSH interpretiert würden.

4.4.5.1.2.1.4.1 Kopplung des N-terminalen Fragmentes von γ_H -MSH an BSA mit einem bis-diazotierten Benzidin (BDB)

In 10 ml Boratpuffer wurden 5 mg BSA gelöst. Danach wurden 2 mg des γ_H -MSH-Fragmentes zugegeben. Nach vollständigem Lösen erfolgte Zugabe von 100 μ l BDB tropfenweise im Abzug unter ständigem Rühren. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit unter ständigem Rühren im Abzug wurde die Lösung vorsichtig in Dialyse-Schläuche gefüllt und über Nacht bei 4° C gegen 5 l Aqua bidest. dialysiert. Das Wasser wurde dabei mehrmals gewechselt, um die Dialyseleistung zu steigern. Nach dem letzten Wasserwechsel und weiteren 4 h Dialyse wurde das Dialysat gepoolt, bei -20° C eingefroren und lyophilisiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -20° C bis zur weiteren Verwendung.

4.4.5.1.2.1.4.2 Dot Blot-Test zum Nachweis von Antikörpern im Mäuseserum

Zunächst wurden Nitro-Cellulose-Bögen für die wells einer Zellkultur-Platte mit 24 wells passend ausgestanzt und durchnumeriert. Die ausgestanzten Plättchen wurden dann in die wells gegeben.

Das mit BDB an BSA gekoppelte N-terminale Fragment von γ_H -MSH wurde so in PBS gelöst, daß sich 25 μ g gekoppeltes Peptid in 5 (-10) μ l PBS befanden.

Für die Proben und die Negativkontrolle wurde von dieser Lösung je ein Tropfen (etwa 5 µl) mit einer Pipette als kleiner Punkt auf die Nitro-Cellulose aufgeben.

Als Positivkontrolle wurde ein Tropfen Maus-IgG (1:1000) auf die Nitro-Cellulose gegeben.

Die Flüssigkeiten auf der Nitrocellulose wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Blockung (zwecks Vermeidung unspezifischer Bindung an die Nitrocellulose und damit falsch positiver Resultate) wurden pro well 500 µl Glücksklee-Magermilchpulver (5 %ig) gelöst in PBS-Tween (0,05 %ig) zugegeben. Die 24-Loch-Zellkultur-Platte wurde nun für 30 - 45 Minuten geschüttelt. Dann wurden die Überstände auf der Platte mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zum Waschen der wells wurden 500 µl PBS-Tween (0,05 %ig) pro well zugegeben. Nachdem die Platte für 5 Minuten geschüttelt worden war, wurden die Überstände wieder mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde viermal wiederholt.

Zur Testung der Proben wurden 200 µl des bei den Blutentnahmen gewonnenen Mausserums (in einer 1:10 Verdünnung mit PBS-Tween (0,05 %ig)) aufgeben, um das Serum auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Antigen zu testen. Bei der Positiv- und Negativkontrolle wurden nur 200 µl PBS-Tween (0,05 %ig) eingesetzt. Zur Inkubation wurde die 24-Loch-Zellkultur-Platte 1 - 2 h bei Raumtemperatur auf dem Vari Shaker geschüttelt. Anschließend wurde der oben beschriebene fünfminütige Waschvorgang mit PBS-Tween (0,05 %ig) viermal durchgeführt. Als 2. Antikörper wurden 500 µl Anti-Maus-IgG-HRPO (von der Ziege in einer 1:1000 Verdünnung mit PBS-Tween (0,05 %ig)) auf alle Proben und die Positiv- und Negativkontrolle gegeben. Nach 1 - 2 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Vari Shaker wurde der beschriebene fünfminütige Waschvorgang mit PBS-Tween (0,05 %ig) wieder viermal durchgeführt.

	Beschichtung	1. Inkubationsphase	2. Inkubationsphase
Proben:	gekoppeltes Peptid	Mausserum (nachzuweisender 1. Antikörper)	HRPO-Anti-Maus-IgG (2. Antikörper)
Positivkontrolle:	Maus-IgG (1:1000) (1. Antikörper)	PBS-Tween 0,05%	HRPO-Anti-Maus-IgG (2. Antikörper)
Negativkontrolle:	gekoppeltes Peptid	PBS-Tween 0,05%	HRPO-Anti-Maus-IgG (2. Antikörper)

Tab. 4.2 Inkubationsschema des Dot Blot-Tests

Für etwa 1 Minute wurden die Ansätze dann mit 500 µl des lichtempfindlichen ECL-Reagenz (1 Teil A + 1 Teil B) inkubiert. Das ECL-Reagenz wurde abgenommen. Die Nitro-Cellulose wurde mit Filterpapierstreifen trocken gesaugt und in eine Röntgenfilm-Kassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde für 10 - 60 Sekunden ein Film aufgelegt und anschließend entwickelt.

Als positiv getestet galt eine Maus, wenn die betreffende Serumprobe im Dot-Blot-Test eine Dunkelfärbung auf dem Film, ähnlich der Positivkontrolle zeigte, während die Negativkontrolle keine derartige Dunkelfärbung zeigen durfte.

4.4.5.1.2.1.5 Präparation von Lymphozyten aus der Milz der Maus

Nach Auswählen einer positiv getesteten Maus (laufende Nummer 35) wurde eine abschließende Boosterung mit 150 µl des Konjugates, vermischt mit dem gleichen Volumen an PBS, durchgeführt wie unter 4.4.5.1.2.1.2 beschrieben.

Rechtzeitig vor der Präparation der Lymphozyten mußten genügend Myelomzellen der Zelllinie P3xAG8.653 angezüchtet werden (Beginn ca. 10 Tage vorher).

Zur Vorbereitung wurden die Myelomzellen in T75-Flaschen im CO₂-Inkubator bei 37° C kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 (mit L-Glutamin, Sigma, R6504), Hesp- oder MOPS- gepuffert, mit 10 % fötalem Kälberserum verwendet. Pro Fusion wurden 3 dichtbewachsene T75-Flaschen benötigt. Für die Fusion mußten die Zellen in der logarithmischen Teilungsphase sein.

Die zuvor durch Äthernarkose getötete Maus wurde zur Desinfektion kurz in 70 % Isopropanol getaucht, dann mit der Bauchseite auf eine Styroporplatte gelegt und mit Nadeln fixiert. Das Fell der Maus wurde linkseitig mit einer Schere von caudal nach cranial eröffnet. Nach einem kurzen Schnitt Richtung linkem Oberbauch wurde die Milz als ein längliches ca. 1 bis 2 cm großes dunkelrotes Organ sichtbar. Mit einer feinen sterilen Schere wurde die Muskelschicht geöffnet. Die Milz wurde vorsichtig entfernt und in eine bereitgestellte Petrischale (60 mm Ø, steril) mit dem Waschmedium RPMI 1640 (Hepes- oder MOPS- gepuffert, steril, 37° C) gegeben. Nun wurde die Maus auf den Rücken gedreht, das Herz freipräpariert und mit einer Spritze das Herzblut entnommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Milz wurde mit einer sterilen Pinzette in der Schale festgehalten. Der Milzsack wurde an einem Ende eröffnet und die Milzzellen wurden mit einem sterilen Spatel in das Medium gedrückt, bzw. ausgestrichen. Restliche Milzzellen wurden mit ca. 10 ml Waschmedium RPMI 1640 aus der Milz herausgespült. Die so entstandene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm) in ein steriles 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben. Nach einer Zentrifugation in der Hermle-Zentrifuge für 5 Minuten bei 200 g wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 30 ml Waschmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation in der Hermle-Zentrifuge für 5 Minuten bei 200 g und Abnahme des Überstandes. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

4.4.5.1.2.1.6 Zellfusion

Die während der Vorbereitungszeit gewachsenen Myelomzellen (Ag8.653) wurden aus den T75-Flaschen entnommen und in 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben. Nach Zentrifugation in der Hermle-Zentrifuge für 5 Minuten bei 200 g wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde mit ca. 30 ml Waschmedium RPMI 1640 resuspendiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation in der Hermle-Zentrifuge für 5 Minuten bei 200 g und eine Abnahme des Überstandes. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die Zellpellets der Myelomzellen und Milzzellen wurden in je 1,5 ml Waschmedium RPMI 1640 resuspendiert und zusammen mit 30 ml Waschmedium RPMI 1640 in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben. Für fünf Minuten erfolgte eine Zentrifugation bei 200 g in der Hermle-Zentrifuge. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig per

Aufklopfen auf die Unterlage gelockert. Innerhalb einer Minute wurden 1,5 ml Polyethylenglykol (37° C warm) tropfenweise zupipettiert. Anschließend wurde das Röhrchen verschlossen und für eine Minute im Wasserbad bei 37° C geschüttelt.

Dem Röhrchen wurden 10 ml PBS-Puffer innerhalb von 3 Minuten zupipettiert, dabei wurde das Zellpellet durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Nach 5 Minuten Inkubation im Wasserbad bei 37° C folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 200 g in der Hermle-Zentrifuge. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml HAT-Medium resuspendiert. Davon wurden 4 ml zu 120 ml HAT-Medium gegeben. Von dieser verdünnten Suspension wurden fünf Zellkultur-Platten mit 24 wells mit je 1 ml pro well beschickt. Zum verbliebenen 1 ml unverdünnter Suspension wurde 1 ml HAT-Medium mit 20 % DMSO gegeben. Hiervon wurde jeweils 1 ml in einem Eppendorfcup nach dem Einfrierschema über 4° C, -20° C, -80° C, -196° C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die ausgesäten Zellen konnten bis zu einer Woche ohne Mediumwechsel auf den 24-well-Zellkultur-Platten belassen werden, dann wurden 600 µl Medium abgenommen und 1 ml frisches HAT-Medium addiert.

Die Zellen erhielten ca. 14 Tage HAT-Medium, dann erfolgte ein Umsetzen auf HT-Medium (10 % Condimed). Je nach Wachstumsverhalten der Zellen konnte ab hier die Reduzierung des Condimed-Gehaltes auf 5 % erfolgen.

Wenn nach anfänglichem Absterben der Zellen wieder unter dem HAT-Medium Klone gewachsen waren und diese eine ausreichende Dichte erreicht hatten, konnte die erste Testung auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das gewünschte Immunogen durchgeführt werden. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen ca. 75 % des Kulturbestandes abgenommen.

Die Testungen erfolgten mit ELISA nach dem unter 4.4.5.1.2.1.8 beschriebenen Schema. Je nach Testergebnis wurde die Entscheidung hinsichtlich des Weiterkultivierens der betreffenden Zellen getroffen.

Die positiv getesteten Ansätze konnten bei entsprechender Dichte entweder weggefroren werden oder in die 10er Klonierung überführt werden.

4.4.5.1.2.1.7 Klonierung

Die im ELISA positiv getesteten Ansätze der Zellfusion (4.4.5.1.2.1.6) wurden ausgewählt und eine Zellzählung durchgeführt.

Die erste Klonierung wurde auf Mikrotiterplatten mit 96 wells durchgeführt. Die Zellsuspensionen der positiv getesteten Zellfusions-Ansätze wurden so auf die wells verteilt, daß jedes well rechnerisch 10 Zellen (in 200 µl Medium) enthielt („10er Klonierung“). Die daraus gezüchteten Klone wurden, soweit sie bei der nächsten Testung positiv waren, zur Anreicherung auf 24er Wells überführt und dann eingefroren oder in die nächste Klonierung gebracht.

Die zweite Klonierung erfolgte wiederum auf 96er Mikrotiterplatten. Hierbei wurden die Zellsuspensionen so auf die wells verteilt, daß jedes well rechnerisch eine Zelle (in 200 µl Medium) enthielt („1er Klonierung“). Die nun positiv getesteten Klone konnten schon als monoklonal angesehen werden; sie konnten angereichert oder weggefroren werden.

Es konnte noch eine weitere Klonierung angeschlossen werden (mit rechnerisch nur 0,1 Zelle pro well in 200 µl Medium \Rightarrow „0,1er Klonierung“).

Die Antikörperproduktion konnte nach Adaptation der Zellen auf nahezu serumfreies Medium in großen Rollerkulturen erfolgen.

4.4.5.1.2.1.8 ELISA

Die Durchführung des ELISA erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 wells. Zum Beschichten wurden pro well 50 µl PBS für ELISA mit darin gelöstem, mit BDB an BSA gekoppeltem N-terminalem Fragment von γ_H -MSH (Kopplungsvorschrift 4.4.5.1.2.1.4.1) in der Standardkonzentration von 10 µg/50 µl, gegeben.

Auch für die Negativkontrolle wurden 10 µg Antigen/BDB/BSA-Komplex pro 50 µl PBS für ELISA verwendet. Für die Positivkontrolle erfolgte eine Beschichtung mit Maus IgG (in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS für ELISA).

Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 4° C auf dem Rüttler. Die Antigen/BDB/BSA-Lösung wurde dekantiert und die Platten auf Zellstoff ausgeklopft. Die wells wurden einmal mit 100 µl PBS pro well gewaschen. Nach 5 Minuten Inkubation der Waschlösung im well auf dem Rüttler bei Raumtemperatur wurde die Waschlösung dekantiert und die Platten auf Zellstoff vorsichtig ausgeklopft.

Zum Blocken (zwecks Vermeidung unspezifischer Bindung an das Material der Mikrotiterplatte) wurden in die wells 200 µl der Blocklösung gegeben. Als Blocklösung kamen BSA (5 %ig) oder Magermilch (5 %ig) gelöst in PBS-Tween für ELISA (0,1 %ig) zur Anwendung. Nach 1 h Inkubation bei 37° C oder über Nacht bei

4° C auf dem Rüttler wurden 2 Waschvorgänge mit je 200 µl PBS-Tween (0,1 %ig) pro well durchgeführt. Auf dem Rüttler wurde die Waschlösung für je 4 - 5 Minuten pro Waschgang bei Raumtemperatur im well belassen. Nach Entfernung der Waschlösung konnten die Platten sofort weiter verwendet oder bei 4° C im Exsikkator gelagert werden.

Im Falle der Proben wurden 50 bzw. 100 oder 200 µl Zellüberstand der getesteten Klone pro well zugesetzt, um die betreffenden Zellen auf die Freisetzung eines Antikörpers gegen das Antigen zu testen. Je nach Bedarf wurde der Zellüberstand mit PBS oder Kulturmedium verdünnt.

Bei der Positiv- und Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen an PBS bzw. Kulturmedium in die wells gegeben.

Nach einer Inkubation von 1 - 2 h bei 37° C auf dem Rüttler wurden drei Waschvorgänge mit je 200 µl PBS-Tween (0,1 %ig) pro well wie oben beschrieben durchgeführt.

Dann wurden 50 µl POD-Anti-Maus-IgG (mit Peroxidase konjugierter Anti-Maus Antikörper vom Kaninchen) (in einer Verdünnung von 1:2000 mit PBS-Tween (0,1%ig)) pro well zugesetzt. Es folgten 1 - 2 h Inkubation bei 37° C auf dem Rüttler.

Nun wurden 4 Waschvorgänge mit je 200 µl PBS-Tween (0,1 %ig) pro well wie oben beschrieben durchgeführt.

	Beschichtung	1. Inkubationsphase	2. Inkubationsphase
Proben:	gekoppeltes Peptid	Zellüberstand (nachzuweisender 1. Antikörper)	POD-Anti-Maus-IgG (2. Antikörper)
Positivkontrolle:	Maus-IgG (1:1000) (1. Antikörper obligat)	Medium oder PBS	POD-Anti-Maus-IgG (2. Antikörper)
Negativkontrolle:	gekoppeltes Peptid	Medium oder PBS	POD-Anti-Maus-IgG (2. Antikörper)

Tab. 4.3 Inkubationsschema des ELISA

Zur Farbreaktion wurden 100 µl Entwickler für ELISA (10 ml Citratpuffer (pH 4,5) + 10 mg O-Phenylendiamine + 4 µl H₂O₂, wie unter 3.2 beschrieben) in die wells gegeben.

Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Entwicklung mit 100 µl 4,0 N H₂SO₄ gestoppt.

Anschließend folgte eine Photometrische Messung: Meß-Signal war die durch die Probe bewirkte Extinktion bei 492 nm.

4.4.5.1.2.1.9 Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuche

Um zu überprüfen, ob der Antikörper sich tatsächlich gegen eine Aminosäuresequenz aus dem N-terminalen Fragment von γ _H-MSH (FR 3a) richtete, wurden verschiedene Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuche durchgeführt.

Bei der Immunisierung wurde FR 3a, mit CDI an KLH gekoppelt, eingesetzt. Antikörper, die das Immunsystem der Maus gegen CDI oder KLH gebildet hatte sollten von vorneherein ausgeschlossen werden. Deshalb wurden bei den Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuchen FR3a-BDB-BSA-Kopplungsprodukte eingesetzt, damit positive Testreaktionen nur auf FR3a zurückgeführt werden konnten.

a. Einsatz von „Absorbern“

Als Variante des unter 4.4.5.1.2.1.8 beschriebenen Versuchsansatzes wurden „Absorber“ eingesetzt.

Zu 100 µl Zellüberstand wurden dabei u.a. 200 µg des Kopplungsproduktes FR 3a-BDB-BSA, gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und über Nacht bei 4° C vorinkubiert. Für diese Versuche wurden die Zellüberstände von 6 positiv getesteten Klonen aus der 0,1er Klonierungsstufe (1D2E2F3A1, 1D2E2F3B8, 1D2E2F3C7, 1D2E2F3D5, 1D2E2F3E3, 1D2E2F3F5) verwendet. Mit diesem Vorinkubat wurde ein ELISA-Test durchgeführt, wie unter 4.4.5.1.2.1.8 beschrieben. Eine Mikrotiterplatte mit 96 wells wurde hierzu mit jeweils 10 µg des Kopplungsproduktes FR 3a-BDB-BSA pro well beschichtet. Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung.

Der „Absorber“ des Vorinkubats war ca. 20 mal so hoch konzentriert wie das Antigen im well, das bei der Beschichtung auf der Platte fixiert worden war. Durch die Absorption der Antikörper des Zellüberstandes an das freie Kopplungsprodukt war also im folgenden ELISA-Test eine geringere Extinktion im Vergleich zur Probe ohne Vorinkubation mit freiem „Absorber“ zu erwarten.

Weiterhin wurden zu 100 µl Zellüberstand 200 µg ungekoppeltes FR 3a, gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Auch hier war im folgenden ELISA-Test durch die Absorption der Antikörper an das freie FR 3a eine geringere Extinktion im Vergleich zur Probe ohne Vorinkubation mit freiem „Absorber“ zu erwarten.

Weiterhin wurden zu 100 µl Zellüberstand 200 µg eines Kopplungsproduktes von FR1 (YVMGHFRWDRFG, Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly: γ _H-MSH(1-12)) mit BDB-BSA, gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und über Nacht bei 4° C vorinkubiert.

Auch durch die Zugabe eines längeren N-terminalen Fragmentes von humanem γ _H-MSH war im folgenden ELISA-Test durch die Absorption der Antikörper an das freie Kopplungsprodukt FR 1-BDB-BSA eine geringere Extinktion im Vergleich zur Probe ohne freien „Absorber“ zu erwarten.

Als Kontrolle wurden 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig) ohne darin gelöste Substanz zum Zellüberstand (100 µl) gegeben und über Nacht bei 4° C vorinkubiert.

Danach wurden je 100 µl der Versuchsansätze im ELISA getestet

Das weitere Verfahren erfolgte nach der ELISA Vorschrift, wie unter 4.4.5.1.2.1.8 beschrieben.

b. Kreuzreaktivitätsversuche:

Zur Untersuchung der Spezifität der Antikörper wurden mit den Zellüberständen von 2 positiv getesteten Klonen aus der 0,1er Klonierung (1D2E2F3C7, 1D2E2F3E3) die folgenden Kreuzreaktivitätsversuche durchgeführt.

Eine Mikrotiterplatte mit 96 wells wurde mit verschiedenen Kopplungsprodukten beschichtet. Zum Einsatz kam als Kontrolle eine Beschichtung mit 10 µg und 20 µg des Kopplungsproduktes von FR 3a-BDB-BSA pro well. Hier wurde eine deutliche Extinktion erwartet.

Als Fremdpeptid-Kopplungsprodukte von FR 9a ([Tyr⁵] β _H-LPH (1-5)) wurden Fr 9a-BDB-BSA und Fr 9a-CDI-BSA eingesetzt. Die Platte wurde mit jeweils 10 µg und 20 µg der beiden Kopplungsprodukte pro well beschichtet. In diesen Versuchsansätzen sollte keine Extinktion nachweisbar sein, da es keine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von FR 3a und FR 9a gab, die Antikörper also keine Angriffstelle finden sollten. Da die Maus mit FR 3a mittels CDI

an KLH gekoppelt immunisiert worden war, sollten auch keine Antikörper gegen die Struktur der Kopplungsprodukte von BSA-BDB vorliegen.

Um zu überprüfen, ob in den Zellüberständen überhaupt von Mäusen produzierte Antikörper nachzuweisen seien, erfolgte zusätzlich eine Beschichtung mit Rabbit-Anti-Mouse-Antikörper (RAM) 1:5000. Bei Vorhandensein von Antikörpern im Zellüberstand der getesteten Klone musste hier eine deutliche Extinktion nachweisbar sein.

Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung.

Verwendet wurden jeweils 150 µl des Zellüberstandes der 2 positiv getesteten Klone aus der 0,1er Klonierung, 1D2E2F3C7 und 1D2E2F3E3.

Das weitere Verfahren erfolgte nach der ELISA Vorschrift (4.4.5.1.2.1.8).

Weiterhin wurde eine 96er Mikrotiterplatte mit 10 µg des Kopplungsproduktes von FR 3a-BDB-BSA pro well beschichtet. Hier wurde eine deutliche Extinktion für den Fall spezifischer Antikörper im Zellüberstand erwartet.

Auch bei der Beschichtung der Platte mit 10 µg des Kopplungsproduktes von FR 1-BDB-BSA (γ_H -MSH (1-12)) pro well wurde im ELISA-Test eine deutliche Extinktion erwartet.

Als weitere Fremdpeptid-Kopplungsprodukte, (d.h. POMC-Fragmente, deren Aminosäuresequenzen mit FR 3a nicht identisch waren), wurden FR 9a-BDB-BSA ([Tyr⁵] β_H -LPH (1-5)), FR 4a-BDB-BSA ([Tyr⁵] JP_H (1-5)), FR 5a-BDB-BSA ((SYSMY, Ser-Tyr-Ser-Met-Tyr): [Tyr⁵] α_H -MSH (1-5)) und FR 5b-CDI-BSA (Ac-N-[Tyr⁵] α_H -MSH (1-5)) ausgewählt und die Platte mit jeweils 10 µg dieser Kopplungsprodukte pro well beschichtet. Bei einer Beschichtung der Platte mit diesen POMC-Fragmenten sollte im ELISA-Test keine Extinktion nachweisbar sein, da die erwarteten Antikörper bei diesen Kopplungsprodukten keine Angriffstelle finden sollten.

Zusätzlich erfolgte eine Beschichtung der Platte mit 10 µg eines Kopplungsproduktes von BSA und BDB ohne zusätzliches POMC-Peptid; hier sollte keine Extinktion nachweisbar sein. Da die Maus nämlich nicht mit BSA-BDB immunisiert worden war, sollten keine Antikörper gegen die Struktur dieses Kopplungsproduktes im Zellüberstand zu finden sein.

Durch die Beschichtung mit 10 µg KLH pro well sollten eventuelle Antikörper gegen KLH detektiert werden.

Um in der Versuchsreihe auch die Blockung mit BSA zu testen, erfolgte eine Beschichtung mit BSA. Sollte in diesem Versuchsansatz eine Extinktion messbar

sein, so könnte eine unspezifische Bindung der Antikörper an BSA nicht ausgeschlossen werden.

Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung. Es wurden jeweils 150 µl des Zellüberstandes der beiden positiv getesteten Klone aus der 0,1er Klonierung 1D2E2F3C7 und 1D2E2F3E3 eingesetzt. Das weitere Verfahren erfolgte nach der ELISA Vorschrift (4.4.5.1.2.1.8).

4.4.5.1.2.2 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von β_{H} -LPH

Als Antigen diente die Sequenz von fünf Aminosäuren des N-Terminus von β_{H} -LPH. Um eine radioaktive Markierung des Peptids mit ^{125}I zu ermöglichen, welche die Interaktion des N-Terminus mit Antikörpern nicht stören sollte, wurde der Aminosäurerest in Position 5 von β_{H} -LPH gegen Tyrosin ausgetauscht.

FR 9a (ELTGY, Glu-Leu-Thr-Gly-Tyr): [Tyr^5] β_{H} -LPH (1-5)

Da dieses Oligopeptid nur geringe antigene Eigenschaften erwarten ließ, musste es als Hapten an ein Trägermolekül gekoppelt werden, um so seine Immunogenität zu erhöhen. Das n-terminale Fragment von β_{H} -LPH wurde deshalb an KLH mit CDI gekoppelt.

4.4.5.1.2.2.1 Kopplung des N-terminalen Fragmentes von β_{H} -LPH mit einem Carbodiimid-Derivat (CDI) an Keyhole limpet hemocyanin (KLH)

Die Kopplung erfolgte analog zu der unter 4.4.5.1.2.1.1 beschriebenen Vorschrift. Auch hier wurden die 7 Aliquots à 150 µl bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.4.5.1.2.2.2 Immunisierung

Für die Immunisierung wurden 5 Balb/c Mäuse eingesetzt. Die Immunisierung erfolgte wie unter 4.4.5.1.2.1.2 beschrieben.

4.4.5.1.2.2.3 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen wurde wie unter 4.4.5.1.2.1.3 beschrieben durchgeführt.

4.4.5.1.2.2.4 Titerbestimmung in Maus-Seren mittels Solid-phase-one-site-RIA

Als semiquantitative Testmethode zum Nachweis von Antikörpern in Mausseren wurde ein Solid-phase-one-site-RIA verwendet (Spennemann, Dissertation 2002).

In eine 96er Break-apart-module-Mikrotiterplatte [Nunc Maxisorb] (Soll-Bruchstellen zwecks Überführungsmöglichkeit der einzelnen wells in jeweils zugeordnete Messröhrchen) wurde zur Beschichtung N-terminales Fragment von β_H -LPH mit BDB an BSA gekoppelt (Kopplungsvorschrift 4.4.5.1.2.1.4.1) und in einer Standardkonzentration von 10 μg / 50 μl PBS in eine Reihe von wells gegeben. Für die Negativkontrolle wurde ebenfalls dieses Kopplungsprodukt in PBS gelöst zur Beschichtung in die wells gegeben. Bei der Positivkontrolle wurde Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS in die wells gegeben.

Nach Inkubation über Nacht bei 4° C auf dem Varishaker wurden mit dem Washer (Programm 24; IRMA 1) zwei Waschvorgänge mit 200 μl PBS für ELISA pro well durchgeführt. Anschließend wurden 300 μl BSA (5 %ig) (gelöst in PBS-Tween (0,1 %ig) für ELISA) in die wells gegeben: Diese Blockung erfolgte für 1 h bei 37° C auf dem Varishaker. Mit dem Washer (Programm 24; IRMA 1) wurden nun zwei Waschvorgänge mit 200 μl PBS-Tween (0,1 %ig) durchgeführt. Nun wurden je 100 μl verdünntes Mausserum, das auf den Gehalt an Antikörpern gegen FR 9a (potentieller 1. Antikörper) getestet werden sollte, in die wells gegeben. Das Mausserum wurde mit PBS-Tween (0,1 %ig) in einer Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:1.000.000 verdünnt. Parallel dazu wurden jeweils Ansätze mit Verdrängern gefahren.

Für Verdrängeransätze wurden am Tag vor Durchführung des Solid-phase-one-site RIAs zu 100 μl der jeweiligen Mausserumverdünnung 200 μg Peptid FR 9a gelöst in 20 μl PBS-ELISA-Tween (0,05 %ig) gegeben. Als Kontrollansatz für die Verdränger wurden zu 100 μl der Antiserumverdünnung je 20 μl PBS-ELISA-Tween (0,05 %ig) ohne Peptidzusatz gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4° C wurden von diesen Inkubationsansätzen jeweils 100 μl in die wells gegeben.

Bei der Positiv- und Negativkontrolle wurden je 100 μl PBS in die wells gegeben.

Nach einer Inkubation von 1 - 2 h bei 37° C auf dem Varishaker, wurden mit dem Washer (Programm 24; IRMA 1) zwei Waschvorgänge mit 200 µl PBS-Tween (0,1 %ig) pro well durchgeführt.

Als 2. Antikörper wurden in alle wells 20 µl ¹²⁵I-GAM (goat anti-mouse)-Tracer mit ca. 100.000 cpm / 20µl) in Puffer D gelöst gegeben. Nach Zugabe von 30 µl Puffer C in alle wells folgte eine Inkubation für 2 h bei 37° C auf dem Varishaker unter dem Abzug. Mit dem Washer wurden nun vier Waschvorgänge mit 200 µl PBS-Tween (0,1 %ig) pro well durchgeführt (d.h. zweimal Programm 24; IRMA 1).

Nach Trocknen der wells wurden die Wellstreifen gebrochen und die wells in RIA-Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden im Gamma-Zähler für eine Minute gemessen.

Durch den Vergleich der gemessenen Radioaktivität in den Verdünnungen des Mausserums ohne Verdränger bzw. mit Verdränger konnte entschieden werden, ob eine Maus den gewollten Antikörper produzierte oder nicht.

	Beschichtung	1. Inkubationsphase	2. Inkubationsphase
Proben:	gekoppeltes Peptid	Mausserum (gesuchter Antikörper?)	¹²⁵ I-GAM (goat anti-mouse) (2. Antikörper)
Proben mit Verdränger:	gekoppeltes Peptid	Mausserum (gesuchter Antikörper?) +200 µg Peptid	¹²⁵ I-GAM (goat anti-mouse) (2. Antikörper)
Positivkontrolle:	Maus-IgG (1:1000)	PBS	¹²⁵ I-GAM (goat anti-mouse) (2. Antikörper)
Negativkontrolle:	gekoppeltes Peptid	PBS	¹²⁵ I-GAM (goat anti-mouse) (2. Antikörper)

Tab. 4.4 Inkubationsschema des Solid-phase-one-site-RIA

4.4.5.1.2.2.5 Präparation der Lymphozyten aus der Milz der Maus

Bei der ausgewählten Maus (laufende Nummer 46) wurde eine abschließende Boosterung mit 150 µl des Konjugates vermischt mit dem gleichen Volumen an PBS durchgeführt wie unter 4.4.5.1.2.1.2 beschrieben. Die Maus wurde wie unter 4.4.5.1.2.1.5 beschrieben getötet und die Lymphozyten aus der Milz präpariert.

4.4.5.1.2.2.6 Zellfusion

Die Zellfusion wurde wie unter 4.4.5.1.2.1.6 beschrieben durchgeführt.

4.4.5.1.2.2.7 Klonierung

Die im ELISA positiv getesteten Klone wurden ausgewählt und eine Zellzählung durchgeführt. Die Klonierung erfolgte wie unter 4.4.5.1.2.1.7 beschrieben.

Die Antikörperproduktion konnte nach Adaptation der Zellen auf nahezu serumfreies Medium in großen Rollerkulturen erfolgen.

4.4.5.1.2.2.8 ELISA

Die Durchführung des ELISA erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 wells. Zum Beschichten wurden pro well 50 µl PBS für ELISA mit darin gelöstem Kopplungsprodukt FR 9a-BDB-BSA (N-terminales Fragment von β_H -LPH), in der Standardkonzentration von 10 µg/50 µl, gegeben (siehe unter Kopplungsvorschrift 4.4.5.1.2.1.4.1).

Die weitere Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 4.4.5.1.2.1.8 beschrieben.

4.4.5.1.2.2.9 Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuche

Um zu überprüfen, ob der Antikörper sich tatsächlich gegen eine Aminosäuresequenz aus dem N-terminalen Fragment von β_H -LPH richtete, wurden verschiedene Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuche mit den positiv getesteten Zellüberständen durchgeführt und auf allen Klonierungsstufen wiederholt.

a. Einsatz eines „Absorbers“

Eine 96er Mikrotiterplatte wurde mit 10 µg des Kopplungsproduktes FR 9a-BDB-BSA pro well beschichtet. Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung. Die Zellüberstände wurden teilweise verdünnt und teilweise unverdünnt eingesetzt.

Zu 100 µl der Zellüberstände wurden jeweils 200 µg ungekoppeltes FR 9a, gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Als

Kontrolle wurden 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig) ohne darin gelöste Substanz zu 100 µl Zellüberstand gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Durch die Absorption der Antikörper an das freie FR 9a war im folgenden ELISA-Test eine geringere Extinktion im Vergleich zur Probe ohne freien „Absorber“ zu erwarten. Von den Versuchsansätzen wurden nach der Inkubation jeweils 100 µl im ELISA getestet. Das weitere Verfahren erfolgte wie unter 4.4.5.1.2.1.8 bzw. 4.4.5.1.2.1.9 beschrieben.

b. Kreuzreaktivität

Zur weiteren Untersuchung wurde eine 96er Mikrotiterplatte mit verschiedenen Kopplungsprodukten, jeweils mit 10 µg pro well, beschichtet.

Zum Einsatz kam als Kontrolle eine Beschichtung mit 10 µg des Kopplungsproduktes FR 9a-BDB-BSA pro well. Hier wurde eine deutliche Extinktion erwartet.

Als Kopplungsprodukte von POMC-Fragmenten, deren Aminosäuresequenzen nicht mit derjenigen von FR 9a identisch waren, wurden Kopplungsprodukte von FR 3a-BDB-BSA ([Tyr⁵] γ_H-MSH (1-5)) und FR 1-BDB-BSA (γ_H-MSH (1-12)) ausgewählt. Bei einer Beschichtung der Platte mit diesen Kopplungsprodukten sollte im ELISA-Test keine Extinktion nachweisbar sein, da die gesuchten Antikörper bei diesen Kopplungsprodukten keine Angriffstelle finden sollten.

Zusätzlich erfolgte eine Beschichtung der Platte mit 10 µg eines Kopplungsproduktes von BSA und BDB ohne zusätzliches POMC-Peptid. Hier sollte keine Extinktion nachweisbar sein, da die Maus nicht mit einem Kopplungsprodukt von BSA-BDB immunisiert worden war, somit also auch keine Antikörper gegen die Struktur des Kopplungsproduktes von FR9a-BSA-BDB im Zellüberstand zu erwarten waren.

Um in der Versuchsreihe auch die Blockung mit BSA zu testen, erfolgte auch eine Beschichtung mit BSA. Sollte in diesem Versuchsansatz eine Extinktion messbar sein, so könnte eine unspezifische Bindung der Antikörper an BSA nicht ausgeschlossen werden.

Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung. Es wurden jeweils 100 µl des Zellüberstandes unverdünnt eingesetzt. Die weitere Durchführung des ELISA erfolgte wie bei 4.4.5.1.2.1.8 bzw. 4.4.5.1.2.1.9 beschrieben.

Für Klonierungen wurden, nach Durchführung von Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuchen, jeweils nur Klone ausgewählt, deren Antikörper im

Versuch sowohl eine gute Verdrängung mit 9a als auch eine geringe Kreuzreaktivität mit anderen Fragmenten zeigten.

4.4.5.2 Eingesetzte Radioimmunoassays zum Nachweis von POMC-Derivaten in Extrakten

4.4.5.2.1 One-site-fluid-phase-RIAs

Die Bestimmung der Immunoreaktivitäten der POMC-Derivate in Proben der Zelllysate und Zellkulturüberstände erfolgte mittels one-site-fluid-phase RIAs wie im folgenden beschrieben. Diese RIAs wurden in gleicher Weise durchgeführt wie die RIAs, die als Titertest für die Suche nach Antikörpern im Kaninchenserum (4.4.5.1.1.5) eingesetzt wurden.

Als Doppelproben wurden folgende Werte bestimmt:

Gesamtradioaktivität (CT)

In diesem Inkubationsansatz wurde die Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität (Tracer) bestimmt.

Blank-Wert (BI)

Hierbei wurde die Radioaktivität (Tracer) im Überstand bestimmt, die nicht auf der Bindung der radioaktiv markierten Peptide an Bestandteile des Antiserums, jedoch an diejenige der Probe (Leerextrakt) beruhte. Das schloss auch den Geräteleerwert ein. Alle anderen Werte wurden um den Blank-Wert bereinigt.

Null-Standard (B_0)

Der B_0 -Wert entsprach der Bindung des Tracers in Anwesenheit des Antiserums bei Abwesenheit von Verdrängern (nicht radioaktiv markierten Liganden), d.h. denjenigen Anteil des Tracers, der vom Antiserum und von den Probenanteilen (Leerextrakten) gebunden werden konnte.

Standard-Werte (Standardkurven)

Mit Hilfe dieser Werte konnte eine Standardkurve erstellt werden, anhand deren die Immunoreaktivität eines POMC-Derivats in einer Probe aus der Aufarbeitung der Zellen und Zellkulturüberstände quantitativ bestimmt werden konnte.

Dazu war nicht markiertes Peptid in definierten, in 10er Potenzen ansteigenden Mengen, gelöst in Puffer D, den Filtraten der Zelllysate und der Zellkulturüberstände (siehe unter 4.4.4) zugesetzt worden. Die Extrakte dieser Zelllysate und Zellkulturüberstände („Standardextrakte“) wurden dann wiederum den RIA-Inkubaten zugesetzt.

Proben

In diesen Proben wurde die Immunoreaktivität des POMC-Derivats in den Probenextrakten gemessen. Das in den jeweiligen Probenextrakten vorliegende POMC-Derivat sollte das radioaktiv markierte Antigen von seinen Bindungsstellen an den Antikörpern verdrängen. Anhand der Standardkurve konnte über das jeweilige Ausmaß der Verdrängung des radioaktiv markierten Peptids im Inkubations-Ansatz die Konzentration der POMC-Derivat-Immunoreaktivität bestimmt werden.

In der Reihenfolge und in den Volumina wie in der Tabelle 4.5 für extrahierte Zellkulturüberstände und in der Tabelle 4.6 für extrahierte Zelllysate aufgeführt, wurden die einzelnen Komponenten der Inkubationsansätze in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und gemischt. Alle Inkubationen wurden auf Eis bei 4° C durchgeführt.

Das jeweilig eingesetzte Antiserum wurde mit Puffer C wie benötigt verdünnt.

Die Radioimmunoassays mit den eingesetzten Antikörpern waren bereits charakterisiert.

Als Tracer wurde soviel ¹²⁵I markiertes Antigen (Peptid) in Puffer D gelöst, wie nötig war, um in 20 µl dieser Lösung ca. 3000 cpm zu erhalten.

Nach Zugabe des Tracers wurden die Inkubationsansätze etwa 20 sec geschüttelt. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 4° C.

Das Procedere erfolgte analog zu dem unter 4.4.5.1.1.5 beschriebenen.

Angaben in µl	CT	Bl	Bo	Standard	Probe
Puffer C (PC)	500	100	50	50	50
Puffer D (PD)	20	20	20	20	20
Antiserum-Verdünnung in PC	—	—	50	50	50
¹²⁵ I markiertes Antigen in PD (Tracer)	20	20	20	20	20
Leer-Extrakt/ Zellkulturüberstand in PC	—	100	100	—	—
Standard-Extrakt/ Zellkulturüberstand in PC	—	—	—	100	—
Probenextrakt/ Zellkulturüberstand in PC					100

Tab. 4.5 *Quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze des one-site-fluid-Phase RIA zum Nachweis von POMC-Derivat-Immunoreaktivität in Zellkulturüberstand-Extrakten (Angaben in µl)*

Angaben in µl	CT	Bl	Bo	Standard	Probe
Puffer C (PC)	500	150	100	100	100
Puffer D (PD)	20	20	20	20	20
Antiserum-Verdünnung in PC	—	—	50	50	50
¹²⁵ I markiertes Antigen in PD (Tracer)	20	20	20	20	20
Leer-Extrakt/ Zelllysat in PC	—	50	50	—	—
Standard-Extrakt/ Zelllysat in PC	—	—	—	50	—
Probenextrakt/ Zelllysat in PC					50

Tab. 4.6 *Quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze des one-site-fluid-Phase RIA zum Nachweis von POMC-Derivat-Immunoreaktivität in Zelllysat-Extrakten (Angaben in µl)*

Durch Adsorption an Aktivkohle wurde das freie Peptid dann vom antikörpergebundenen Peptid getrennt.

Dazu wurde eine Kohlesuspension, bestehend aus 1 % Aktivkohle und 0,5 % BSA in Puffer C, hergestellt und 300 µl davon allen Inkubationsansätzen (ausgenommen CT-Wert) zugegeben. Die Ansätze wurden 20 sec geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in der Epifuge bei 8800g für 4 min. Danach wurden die Inkubationsansätze 10 min auf Eis gestellt.

Nun wurden jeweils 450 µl des Überstandes vorsichtig abgenommen und in RIA-Röhrchen (3,5 ml Sarstedt-Röhrchen) pipettiert. Jeder Ansatz wurde eine Minute im Gamma-Zähler gemessen.

4.4.5.2.1.1 One-site-fluid-phase-RIA zum Nachweis von N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM

Zur Anwendung kam ein Antiserum, das sich gegen N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM richtete (Code: 27P) (Matejec et al. 2004). Eingesetzt wurde es in einer Verdünnung von 1:800.

4.4.5.2.1.2 One-site-fluid-phase-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin-IRM

Zur Anwendung kam ein Antiserum, das sich gegen β_H-Endorphin-IRM richtete (Code: 84E) (Harbach et al. 2000). Eingesetzt wurden Verdünnungen von 1:8000, 1:10000 und 1:12000 dieses Antiserums.

4.4.5.2.1.3 One-site-fluid-phase-RIA zum Nachweis von β_H-LPH-IRM

Zur Anwendung kam ein Antiserum, das sich gegen β_H-LPH-IRM richtete (Code: 93E) (Matejec et al. 2006). Eingesetzt wurde es in einer Verdünnung von 1:3000.

4.4.5.2.2 Two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA zum Nachweis von β_H-Endorphin (1-31)

Durch die gleichzeitige Inkubation eines C-terminal angreifenden, vom Kaninchen gewonnenen Antiserums (1. Antikörper) mit dem Peptid im Probenextrakt (bzw. im

Standard) und dem N-Terminal angreifenden, radioaktiv markierten (von der Maus stammenden) 2. Antikörpers war die Bildung von 1.-Antikörper/Peptid/2.-Antikörper-Komplexen möglich. Diese Komplexe wurden per Immunopräzipitation mit einem am 1.-Antikörper angreifenden, von der Ziege gewonnenen Antiserum (3. Antikörper) von den nicht in diesem Komplex gebundenen Komplex-Komponenten getrennt. Nach Zentrifugation des Präzipitats wurde die im Zentrifugat (Pellet) enthaltene Radioaktivität im Gamma-Zähler gemessen. Mittels der Standardkurve wurde dann über die Höhe der gemessenen Radioaktivität die Konzentration an Peptid in den Probenextrakten bestimmt (Harbach et al. 2000).

Als Doppelproben wurden folgende Werte bestimmt:

Gesamtradioaktivität (CT)

Mit dem CT-Wert wurde die Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz bestimmt.

B₀-Wert

Mit diesem Wert wurde die Menge an radioaktiv markiertem Antikörper bestimmt, welche in Abwesenheit des Peptids durch Bindung an andere Bestandteile des Inkubationsansatzes (Leerextrakt, Antiserum, NRS) präzipitiert und abzentrifugiert wurde.

Standard-Werte (Standardkurven)

Für die Standard-Werte wurden die Zellen von HaCaT und Colo 679 wie unter 4.1.2 beschrieben kultiviert und wie unter 4.4.1.2 beschrieben geerntet. Nach Neutralfiltration (4.4.4) wurden 20 µl Puffer D (Leerwerte) bzw. ansteigende Mengen an nicht markiertem Peptid (β _H-Endorphin (1-31) gelöst in 20 µl Puffer D) (Standardwerte) zum Filtrat gegeben (4.4.4). Danach wurde eine Extraktion wie unter 4.4.3 beschrieben durchgeführt. Die aufgefangenen Eluate wurden im Speed Vac von 1-Propanol befreit. Die entstehenden Pellets wurden in jeweils 500 µl Aqua bidest. aufgenommen. Anschließend wurden die Proben bei -20° C eingefroren und lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in 50 µl Puffer C aufgenommen (Zelllysate-Leer- und Standard-Extrakte). Danach wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert. Nach Wiederauftauen wurden die 50 µl Aliquots im Two-site-fluid-phase-

immunoprecipitation-RIA eingesetzt. Die in den Zentrifugaten der RIA-Ansätze gemessenen Radioaktivitäten wurden zwecks Erstellung von Standardkurven den betreffenden β_H -Endorphin (1-31)-Mengen zugeordnet.

Proben

Diesen Inkubationsansätzen wurden jeweils 50 μ l Aliquots der Zelllysate-Proben-Extrakte zugegeben (siehe 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3), um das darin befindliche Peptid bestimmen zu können.

Durch gleichzeitige Inkubation mit 1. Antikörper und radioaktiv markiertem 2. Antikörper war die Bildung von 1. Antikörper/Peptid/2. Antikörper-Komplexen möglich, falls das Peptid im betreffenden Probenextrakt vorhanden war. Diese Komplexe wurden per Immunopräzipitation mit einem 3. Antikörper und anschließender Zentrifugation der Immunkomplexe von den nicht im Komplex gebundenen Komplex-Komponenten getrennt. Die Radioaktivität der Komplexe im Zentrifugationspellet wurde im Gamma-Zähler gemessen. Mittels Standardkurve wurde anhand der Höhe der gemessenen Radioaktivität die Konzentration an Peptid in der untersuchten Probe bestimmt.

Alle Substanzen und Puffer wurden in der in der Tabelle 4.7 angegebenen Reihenfolge auf Eis pipetiert.

Der über Protein A-Sepharose gereinigte 1. Antikörper (Code: 10P) wurde in Puffer C so gelöst, daß eine Konzentration von 10 μ g in 50 μ l vorlag.

Der radioaktiv markierte 2. Antikörper (125 I markierter monoklonaler Antikörper gerichtet gegen den N-Terminus von β_H -Endorphin = Tracer; Code: 3E7) wurde mit Puffer D so verdünnt, daß in 20 μ l dieser Lösung ca. 10000 cpm zu messen waren.

Zwecks Senkung der Basalwerte wurden den Ansätzen Thyreoglobulin und Maus IgG zugesetzt. Die unspezifische Präzipitation des 2. Antikörpers ließ sich dadurch deutlich verringern.

Nach Zugabe aller Bestandteile wurden die Ansätze geschüttelt und bei 4° C über Nacht inkubiert.

Angaben in μ l	CT-Wert	Bo-Wert	Standard	Probe
Puffer C (PC)	500	100	100	100
Puffer D (PD)	20	20	20	20
Leer-Extrakt/ Zelllysate in PC	–	50	–	–
Standard-Extrakt/ Zelllysate in PC	–	–	50	–
Probenextrakt/ Zelllysate in PC	–	–	–	50
1. Antikörper in PC	–	50	50	50
radioaktiv markierter 2. Antikörper in PD	20	20	20	20
Thyreoglobulin (10 μ g) in PC	–	20	20	20
Maus IgG (Verdünnung 1:5) in PC	–	10	10	10

Tab. 4.7 *Quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA zum Nachweis von β _H-Endorphin (1-31) (Angaben in μ l)*

Nach der Inkubation über Nacht wurden allen Ansätzen bis auf CT jeweils 100 μ l GARGG (Goat Anti-Rabbit IgG-Serum gelöst in RIA-Puffer (PC), mit einer Konzentration von 500 mg in 50 ml) und 100 μ l NRS (Normal Rabbit Serum gelöst in RIA-Puffer (PC), mit einer Konzentration von 200 mg in 50 ml) zugegeben und alle Inkubationsansätze geschüttelt.

Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden alle Ansätzen bis auf CT mit 500 μ l Puffer C aufgefüllt und nach Schütteln für 10 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Durch Inkubation mit dem (von der Ziege stammenden und gegen Kaninchen IgG gerichteten) 3. Antikörper (GARGG) präzipitierten die 1. Antikörper/Peptid/2.

Antikörper-Komplexe, da der GARGG-Antikörper mit dem (von Kaninchen gewonnenen) 1. Antikörper interagiert. Die in Lösung befindlichen Präzipitate wurden durch Zentrifugation als Pellet sichtbar. Durch vorsichtiges Absaugen des Überstandes wurden alle noch ungebundenen Komponenten des oben beschriebenen Komplexes, u.a. auch der nicht gebundene radioaktiv markierte 2. Antikörper, der „Marker“ der Methode, entfernt.

Die im Zentrifugationspellet befindliche Radioaktivität wurde im Gamma-Zähler gemessen.

Aus den gemessenen Radioaktivitäten der Standard-Extrakte und den ihnen zugeordneten Peptidwerten wurde eine Standardkurve erstellt, aus der die in den untersuchten Proben befindlichen Peptidkonzentrationen ermittelt werden konnten.

4.4.5.2.3 Auswertung der Ergebnisse

Bestimmung immunoreaktiven Materials in Probenextrakten mittels One-site-fluid-phase-RIAs:

Mit der bei der Zählung im Gamma-Zähler gemessenen Radioaktivität der Standardextrakte konnte mit einem wissenschaftlich-technischen Zeichenprogramm (Origin) eine Standard-Kurve angelegt werden. Anhand dieser Standard-Kurve wurden die Proben quantitativ ausgewertet. Mit Hilfe der Fitfunktion „Logistic“ in diesem Programm ergab sich eine sigmoidal verlaufende, sich asymptotisch der X-Achse annähernde Kurve. Die in den Proben gemessenen Radioaktivitäten konnten über die Standardkurve den gesuchten Mengen an POMC-Derivat-immunoreaktivem Material zugeordnet werden. Dabei war sowohl eine graphische Auswertung über die Standard-Fit-Kurve mittels eines „toolreaders“, als auch eine arithmetische Umrechnung über folgende Formel in die Peptidmenge möglich.

Gleichung der Origin-Fit-Funktion „Logistic“:

$$Y = A_1 - A_2 / (1 + (x/x_0)^P) + A_2$$

Origin codierte Umstellung:

$$(((A_1 - A_2) / (y - A_2)) - 1)^{1/P} * x_0$$

[P: Steigung, x_0 : Wendepunkt, A_1 : initialer Y-Wert (in Abwesenheit von Verdrängern des ^{125}I -markierten Peptids), A_2 : endgültiger Y-Wert (in Anwesenheit eines Überschusses an Verdrängern des ^{125}I -markierten Peptids)]

Es wurden jeweils Doppelwerte an Radioaktivität bzw. Peptidmenge bestimmt, aus denen dann Mittelwerte (\bar{x}_{mean}) und Standardabweichungen (SD) berechnet wurden.

Die Nachweisgrenze entspricht der geringsten Konzentration eines unmarkierten Peptids, die in einer Probe gemessen werden kann. Für jeden durchgeführten RIA wurde die Nachweisgrenze gesondert bestimmt: Als Nachweisgrenze wurde der Mittelwert der im betreffenden RIA gemessenen Nullstandardwerte minus der doppelten Standardabweichung festgesetzt (Chard, 5th edition, p170; 1995).

In den RIAs wurde immer eine Reihe von Nullstandardwerten bestimmt, woraus Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden.

Bei der Auswertung der Proben wurden dementsprechend Werte, die innerhalb der doppelten Standardabweichung des Mittelwertes von B_0 lagen, als nicht signifikant gewertet. Abbildung 4.2 zeigt dies exemplarisch.

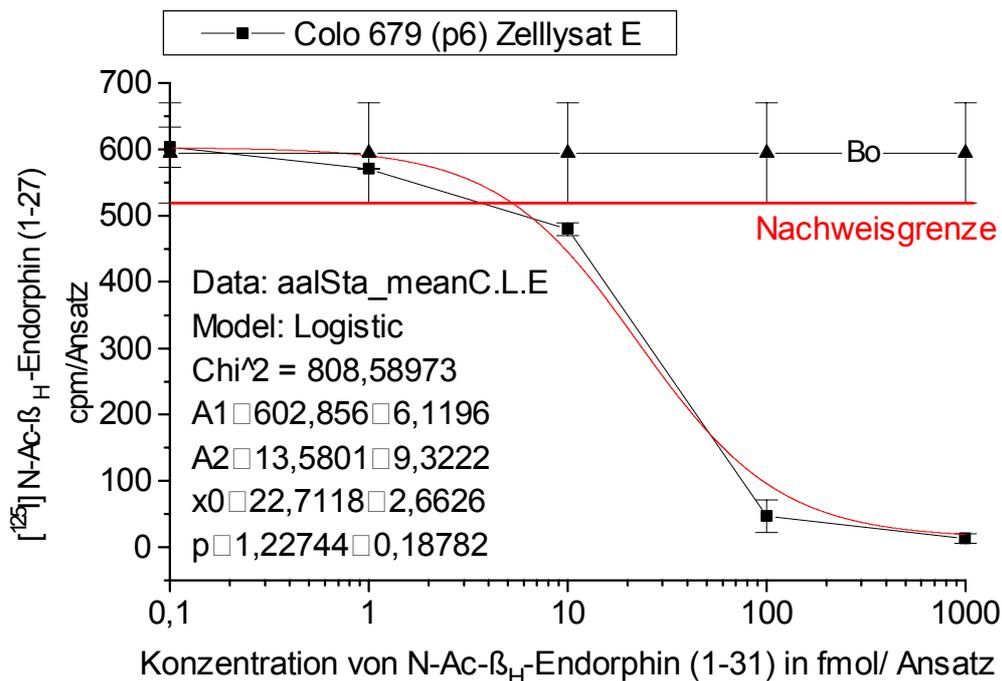


Abb. 4.2: Standardkurve mit Standardextrakten der Zellysate von Colo 679 zur Bestimmung von N-Ac-β_H-Endorphin-IRM in den Zellysate-Probenextrakten; Mittelwert von B_0 und doppelte Standardabweichung von B_0 : $\bar{x} \pm 2 \times SD$; Nachweisgrenze: $\bar{x}_{B_0} - 2 \times SD_{B_0}$.

Bestimmung von β_H -Endorphin (1-31) in Probenextrakten mittels Two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA:

Die Auswertung erfolgte analog zur Auswertung der One-site-fluid-phase-RIAs. Im Gegensatz zum Standardkurvenverlauf bei den One-site-RIAs verläuft die Standardkurve bei den Two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIAs jedoch nicht monoton abfallend, sondern monoton ansteigend sigmoidal.

5. Ergebnisse

5.1 Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens in Keratinozyten der Zelllinie HaCaT und in Melanomzellen der Zelllinie Colo 679

Mittels RT-PCR wurde nach mRNA des menschlichen hypophysären POMC-Gens in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und in der humanen Melanom-Zelllinie Colo 679 gesucht. Es wurden 3 Primerpaare eingesetzt wie unter 4.3.3 beschrieben. Die Lungencarcinom-Zelllinie DMS 79 diente als Positivkontrolle, da bei diesen Zellen die Expression des menschlichen hypophysären POMC-Gens gesichert war (Picon et al. 1995).

Zwecks direkter Vergleichbarkeit sind in den folgenden Tabellen 5.1 und 5.2 alle Ergebnisse der RT-PCR-Versuche mit der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 einander gegenübergestellt.

Beim Einsatz des Primer-Paares EXO 21 und HPO 10 wurde eine ca. 800 Basen lange Nucleotidsequenz aus dem Transkript der POMC-mRNA der Positivkontrolle (DMS 79-Zellen) amplifiziert, deren Länge somit mit dem erwarteten 813 Basen langen Amplifikat (aus der Sequenz des hypophysären POMC-Gens abgeleitete Nucleotidsequenzlänge) übereinstimmte. Bei Verwendung des Primer-Paares HPO 1 und HPO 2 wurde eine ca. 320 Basen lange Nucleotidsequenz aus dem Transkript der POMC-mRNA der Positivkontrolle (DMS 79-Zellen) amplifiziert, deren Länge mit dem erwarteten 319 Basen langen Amplifikat kompatibel war. Beim Einsatz des Primer-Paares HPO 13 und HPO 10 wurde eine ca. 350 Basen lange Nucleotidsequenz aus dem Transkript der POMC-mRNA der Positivkontrolle (DMS 79-Zellen) amplifiziert, die wiederum mit dem erwarteten 353 Basen langen Amplifikat übereinstimmte.

Auch bei den mit CRH stimulierten bzw. nicht stimulierten (Kontrollen) HaCaT- und Colo 679-Zellen wurden Amplifikate (Banden) gefunden, welche die gleichen Nucleotidsequenzlängen aufwiesen wie die Amplifikate aus den mRNA-Transkripten der DMS 79-Zellen; da sie jedoch sowohl auf den RT+ wie auf den RT- Spuren zu beobachten waren, mußten sie als genomische Kontaminationen der RNA-Extrakte eingestuft werden.

Neben diffusen Amplifikaten wurde bei Einsatz des Primerpaares HPO 10 / EXO 21 auch die Amplifizierung eines mRNA-Transkripts aus einem nicht mit dem POMC-Gen identischen Gens beobachtet – sowohl bei DMS 79- wie bei HaCaT- und Colo 679-Zellen.

Ein Beweis für die Transkription des hypophysären POMC-Gens unter Basalbedingungen oder nach Stimulation mit CRH konnte somit weder für die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT noch für die Melanom-Zelllinie Colo 679 anhand der vorliegenden erbracht werden. Die Expression eines nicht-hypophysären („aberranten“) POMC-Gens ließ sich jedoch damit nicht ausschließen.

Primerpaare			HPO 10 HPO 13	HPO 10 EXO 21	HPO 1 HPO 2
Aus der Basensequenz des menschlichen hypophysären POMC-Gens abgeleitete Nucleotidsequenzlänge (Anzahl Basenpaare) (Takahashi et al. 1983)			353	813	319
Experiment Nummer	Experimentelle Bedingungen		Mit RT-PCR gefundene Nucleotidsequenzen (Anzahl Basenpaare)		
1	HaCaT-Zellen	CRH (10 ⁻⁸ M)	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350	Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	
	HaCaT-Zellen	CRH-Kontrolle	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350	Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+; B.: ca. 350	RT+; B.: ca. 500 RT+; B.: ca. 800	
2	HaCaT-Zellen	CRH (10 ⁻⁸ M)	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350	Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	Diff. Ampl.;
	HaCaT-Zellen	CRH-Kontrolle		Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	Diff. Ampl.;
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+; B.: ca. 350	RT+; B.: ca. 500 RT+; B.: ca. 800	RT+; B.: ca. 320
3	HaCaT-Zellen	CRH (10 ⁻⁸ M)	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350		Diff. Ampl.;
	HaCaT-Zellen	CRH-Kontrolle	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350		Diff. Ampl.;
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+; B.: ca. 350		RT+; B.: ca. 320

Tab. 5.1 *Übersichtstabelle der RT-PCR-Ergebnisse aus 3 Experimenten zur Prüfung der Zelllinie HaCaT auf die Transkription des menschlichen hypophysären POMC-Gens unter Verwendung der Primerpaare HPO10/HPO13, HPO10/EXO21 und HPO1/HPO2.*

Diff. Ampl.: diffuse Amplifikate; B.: Bande; RT+: Reverse Transkription; RT-: keine Reverse Transkription.

Primerpaare			HPO 10 HPO 13	HPO 10 EXO 21	HPO 1 HPO 2
Aus der Basensequenz des menschlichen hypophysären POMC-Gens abgeleitete Nucleotidsequenzlänge (Anzahl Basenpaare) (Takahashi et al. 1983)			353	813	319
Experiment Nummer	Experimentelle Bedingungen		Mit RT-PCR gefundene Nucleotidsequenzen (Anzahl Basenpaare)		
1	Colo 679-Zellen	CRH (10^{-8} M)	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350	Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	Diff. Ampl.;
	Colo 679-Zellen	CRH-Kontrolle	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350	Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	Diff. Ampl.;
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+; B.: ca. 350	RT+; B.: ca. 500 RT+; B.: ca. 800	RT+; B.: ca. 320
2	Colo 679-Zellen	CRH (10^{-8} M)	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350	Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	Diff. Ampl.;
	Colo 679-Zellen	CRH-Kontrolle	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350	Diff. Ampl.; RT+; B.: ca. 500	Diff. Ampl.;
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+; B.: ca. 350	RT+; B.: ca. 500 RT+; B.: ca. 800	RT+; B.: ca. 320
3	Colo 679-Zellen	CRH (10^{-8} M) Stimulation	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350		
	Colo 679-Zellen	CRH-Kontrolle	Diff. Ampl.; RT+/-; B.: ca. 350		
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+; B.: ca. 350		

Tab. 5.2 *Übersichtstabelle der RT-PCR-Ergebnisse aus 3 Experimenten zur Prüfung der Zelllinie Colo 679 auf die Transkription des menschlichen hypophysären POMC-Gens unter Verwendung der Primerpaare HPO10/HPO13, HPO10/EXO21 und HPO1/HPO2*
Diff. Ampl.: diffuse Amplifikate; B.: Bande; RT+: Reverse Transkription; RT-: keine Reverse Transkription

5.1.1

Primerpaar HPO 10 / HPO 13

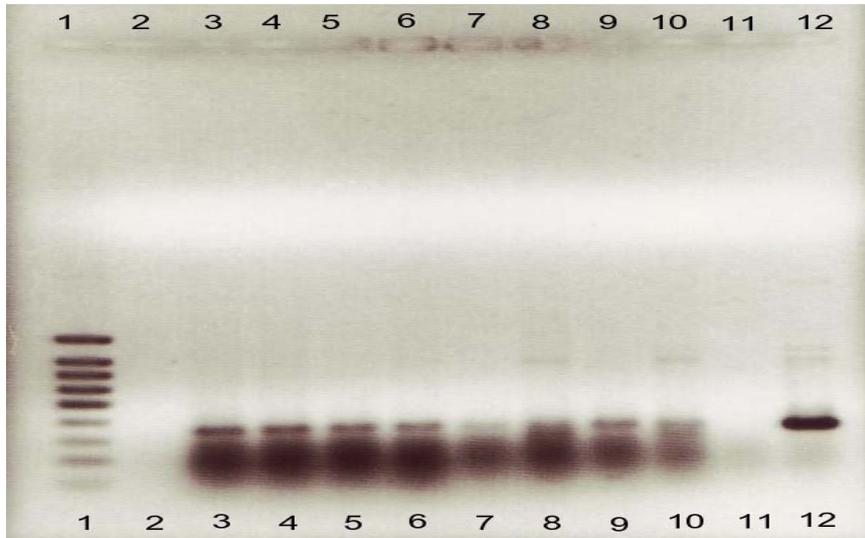


Abb. 5.01 *Aufnahme eines Gels nach Auftrennung der Amplifikate aus RT-PCR-Versuchen mit dem Primerpaar HPO 10 und HPO 13 mit RNA-Extrakten von HaCaT-, Colo 679- und DMS 79-Zellen*
Die Spuren wurden von 1 – 12 nummeriert

1: Marker-Serie (100/200/300/400/500/600/700/800/1000 bp) zur Bestimmung der Nucleotidsequenzlänge der Amplifikate, 2: Negativkontrolle der RT-PCR (RNase freies Wasser), 3: Colo 679-Zellen: Kontrolle, ohne Reverse Transkription (RT-), 4: Colo 679-Zellen: Kontrolle, mit Reverse Transkription (RT+), 5: Colo 679-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, ohne Reverse Transkription (RT-), 6: Colo 679-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, mit Reverse Transkription (RT+), 7: HaCaT-Zellen: Kontrolle, ohne Reverse Transkription (RT-), 8: HaCaT-Zellen: Kontrolle, mit Reverse Transkription (RT+), 9: HaCaT-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, ohne Reverse Transkription (RT-), 10: HaCaT-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, mit Reverse Transkription (RT+), 11: DMS 79-Zellen: ohne Reverse Transkription (RT-), 12: DMS 79-Zellen: mit Reverse Transkription (RT+)

Wie aus der Abbildung 5.01 zu ersehen, ergab die RT-PCR der RNA-Extrakte von DMS 79-Zellen mit dem Primerpaar HPO 10 und HPO 13 ein Amplifikat mit der Nucleotidsequenzlänge von etwa 350 bp. Dies entspricht der Nucleotidsequenzlänge

des erwarteten Transkripts der hypophysären POMC-mRNA (Positivkontrolle). Bei den RNA-Extrakten der Zellen von DMS 79, die nicht der reversen Transkription unterworfen worden waren, fand sich kein Signal. Weiterhin zeigte sich, daß die RT-PCR der RNA-Extrakte von CRH-stimulierten und nicht stimulierten HaCaT- und Colo 679-Zellen neben diffusen Amplifikaten sowohl mit als auch ohne reverse Transkription zu Banden in der Position führte, die dem Amplifikat der Nucleotidsequenz aus der Positivkontrolle (DMS 79-Zellen) entsprach. Hierbei handelte es sich demnach um eine Kontamination mit genomischer DNA, da das Erscheinen dieser Banden offenbar nicht auf reverse Transkription von mRNA zurückzuführen war. Mit dem Primerpaar HPO 10 und HPO 13 war für die Zellen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 somit kein Nachweis der Transkription des menschlichen hypophysären POMC-Gens zu erbringen. Die Expression eines nicht-hypophysären POMC-Gens war hierdurch jedoch nicht auszuschließen.

5.1.2 Primerpaar HPO 10 / EXO 21

Die RT-PCR der RNA-Extrakte von DMS 79-Zellen mit dem Primerpaar HPO 10 und EXO 21, ergab wie erwartet ein Amplifikat mit der Nucleotidsequenzlänge von etwa 700 - 800 bp (siehe Abbildung 5.02). Dies entspricht dem erwarteten Transkript der hypophysären POMC-mRNA (Positivkontrolle). Bei den RNA-Extrakten der Zellen von DMS 79, die nicht der reversen Transkription unterworfen worden waren, fand sich kein Signal. Bei den RNA-Extrakten von DMS 79-Zellen, die einer vorherigen CRH-Stimulation unterworfen worden waren, ergab die RT-PCR sowohl mit als auch ohne reverse Transkription lediglich diffuse Amplifikate (Schmier); inwieweit die CRH-Stimulation hier zu einer Desensitierung über einen negativen feed-back-Mechanismus geführt haben mag, muß offen bleiben. Weiterhin zeigte sich, daß die RT-PCR der RNA-Extrakte von CRH-stimulierten und nicht stimulierten HaCaT- und Colo 679-Zellen sowohl mit als auch ohne reverse Transkription auf den Positionen der Nucleotidsequenzlänge des erwarteten Transkripts nur diffuse Amplifikate ergab.

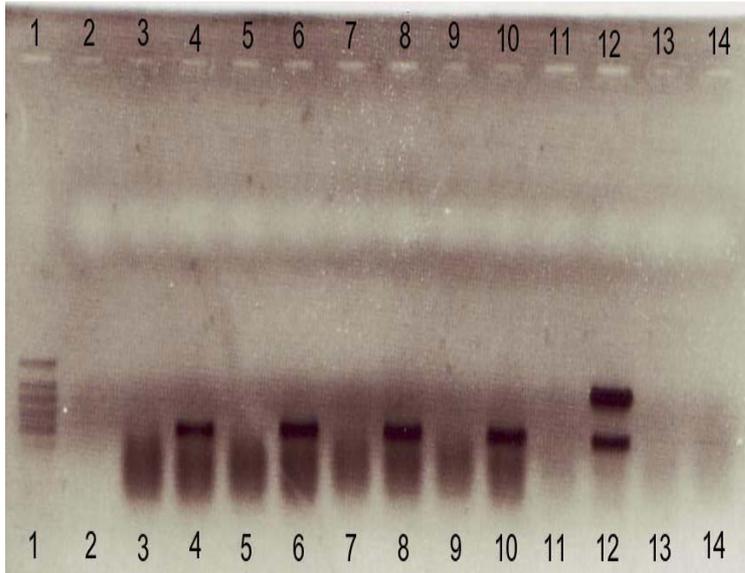


Abb. 5.02 *Aufnahme eines Gels nach Auftrennung der Amplifikate aus RT-PCR-Versuchen mit dem Primerpaar HPO 10 und EXO 21 mit RNA-Extrakten von HaCaT-, Colo 679- und DMS 79-Zellen*
Die Spuren wurden von 1 – 14 nummeriert
 1: Marker-Serie (100/200/300/400/500/600/700/800/1000 bp) zur Bestimmung der Nucleotidsequenzlänge der Amplifikate, 2: Negativkontrolle der RT-PCR (RNase freies Wasser), 3: Colo 679-Zellen: Kontrolle, ohne Reverse Transkription (RT-), 4: Colo 679-Zellen: Kontrolle, mit Reverser Transkription (RT+), 5: Colo 679-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, ohne Reverse Transkription (RT-), 6: Colo 679-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, mit Reverser Transkription (RT+), 7: HaCaT-Zellen: Kontrolle, ohne Reverse Transkription (RT-), 8: HaCaT-Zellen: Kontrolle, mit Reverser Transkription (RT+), 9: HaCaT-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, ohne Reverse Transkription (RT-), 10: HaCaT-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, mit Reverser Transkription (RT+), 11: DMS 79-Zellen: Kontrolle, ohne Reverse Transkription (RT-), 12: DMS 79-Zellen: Kontrolle, mit Reverser Transkription (RT+), 13: DMS 79-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, ohne Reverse Transkription (RT-), 14: DMS 79-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, mit Reverser Transkription (RT+)

Bei allen RNA-Extrakten (mit Ausnahme von DMS 79-Zellen nach CRH-Stimulation), die einer reversen Transkription unterworfen worden waren, zeigte sich außerdem eine Nucleotidsequenz mit einer Länge von etwa 500 bp. Eine Sequenzanalyse ergab, daß es sich hierbei um ein 501 bp großes Fragment des WD40-Ciao1-Gens handelt. Dieses Gen ist auf Chromosom 2 gelegen und etwa 70 Millionen Basenpaare vom POMC-Gen entfernt. Das von diesem Gen codierte Protein verändert die Mobilität des Wilms Tumor Suppressor Protein WT1 und scheint die physiologischen Funktionen von WT1 in Zellwachstum und Differenzierung zu modulieren (Johnstone et al. 1998).

Auch unter Verwendung des Primerpaares HPO 10 / EXO 21 war somit in den Zellen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 kein Nachweis der Transkription des menschlichen hypophysären POMC-Gens zu erbringen. Die Expression eines nicht-hypophysären POMC-Gens war hierdurch jedoch nicht auszuschließen.

5.1.3 Primerpaar HPO 1 / HPO 2

Wie erwartet ergab die RT-PCR der RNA-Extrakte von DMS 79-Zellen mit dem Primerpaar HPO 1 und HPO 2 ein Amplifikat mit der Nucleotidsequenzlänge von etwa 300 bp (siehe Abbildung 5.03). Dies entspricht dem erwarteten Transkript der hypophysären POMC-mRNA (Positivkontrolle). Bei den RNA-Extrakten der Zellen von DMS 79, die nicht der reversen Transkription unterworfen worden waren, fand sich kein Signal. Weiterhin zeigte sich, daß die RT-PCR der RNA-Extrakte von CRH-stimulierten und nicht stimulierten HaCaT- und Colo 679-Zellen, sowohl mit als auch ohne reverse Transkription, lediglich diffuse Amplifikate ergab.

Unter Verwendung des Primerpaares HPO 1 / HPO 2 war in den Zellen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 somit kein Nachweis der Transkription des menschlichen hypophysären POMC-Gens zu erbringen. Die Expression eines nicht-hypophysären POMC-Gens war hierdurch jedoch nicht auszuschließen.

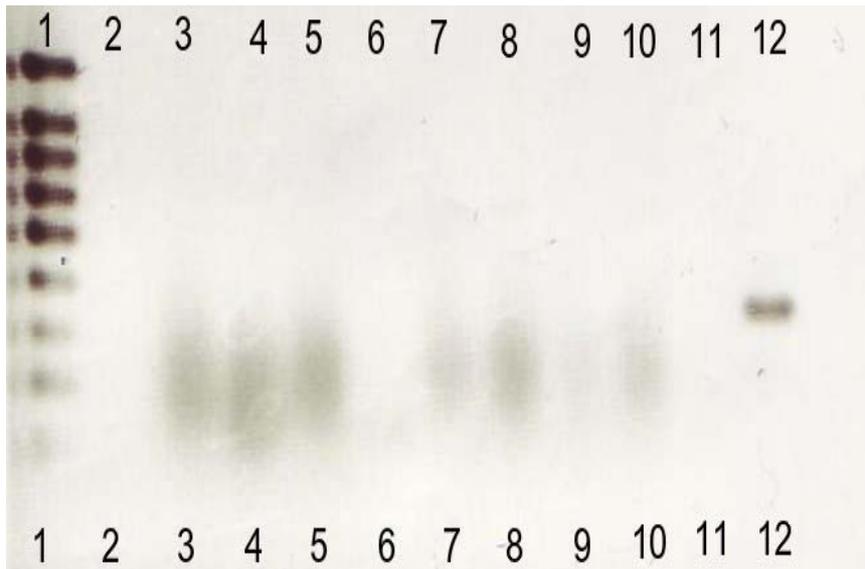


Abb. 5.03 Aufnahme eines Gels nach Auftrennung der Amplifikate aus RT-PCR-Versuchen mit dem Primerpaar HPO 1 und HPO 2 mit RNA-Extrakten von HaCaT-, Colo 679- und DMS 79-Zellen
Die Spuren wurden von 1 – 14 nummeriert

1: Marker-Serie (100/200/300/400/500/600/700/800/1000 bp) zur Bestimmung der Nucleotidsequenzlänge der Amplifikate, 2: Negativkontrolle der RT-PCR (RNase freies Wasser), 3: Colo 679-Zellen: Kontrolle, ohne Reverse Transkription (RT-), 4: Colo 679-Zellen: Kontrolle, mit Reverse Transkription (RT+), 5: Colo 679-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, ohne Reverse Transkription (RT-), 6: Colo 679-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, mit Reverse Transkription (RT+), 7: HaCaT-Zellen: Kontrolle, ohne Reverse Transkription (RT-), 8: HaCaT-Zellen: Kontrolle, mit Reverse Transkription (RT+), 9: HaCaT-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, ohne Reverse Transkription (RT-), 10: HaCaT-Zellen: mit CRH 10^{-8} M stimuliert, mit Reverse Transkription (RT+), 11: DMS 79-Zellen: ohne Reverse Transkription (RT-), 12: DMS 79-Zellen: mit Reverse Transkription (RT+)

5.2 Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation

Nachdem Zellkulturen der Zelllinien HaCaT und Colo 679 mit verschiedenen Substanzen (potentielle Stimulatoren bzw. Repressoren) behandelt worden waren, wurden die Extrakte aus Zellkulturüberständen und Zelllysaten in RIAs auf ihren Gehalt an POMC-Derivat-immunoreaktivem Material getestet. Hierzu sollten einerseits bereits etablierte Radioimmunoassays eingesetzt werden, andererseits sollten im Rahmen eines mehrere Untersuchungen übergreifenden Projektes auch neue Radioimmunoassays entwickelt und die dazu nötigen polyklonalen Antiseren und monoklonalen Antikörper gewonnen werden.

5.2.1 Gewonnene Antiseren und Antikörper

Für die Erstellung neuer Radioimmunoassays wurden polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper hergestellt.

5.2.1.1 Polyklonale Antiseren aus Kaninchen

Nach dem beschriebenen Schema (4.4.5.1.1.2) wurden die Kaninchen über mehrere Wochen immunisiert und Blut aus der Ohrvene entnommen. Im folgenden werden die Titerverlaufskurven der Antikörper-Titertests gezeigt. Bei den Titertests kam jeweils eine Verdünnung der Kaninchenserum von 1:100 zum Einsatz. Die Berechnung der spezifischen Bindung des Tracers an die Antikörper (spezifische Bindung von ^{125}I -markiertem Antigen in % des ^{125}I -markierten Antigens im Ansatz) erfolgte nach der Formel $(B_0 - TV) \times 100 / (CT - BI)$.

Die Kaninchen, bei denen keine Antikörper im Serum nachweisbar waren, sind in den Abbildungen nicht dargestellt.

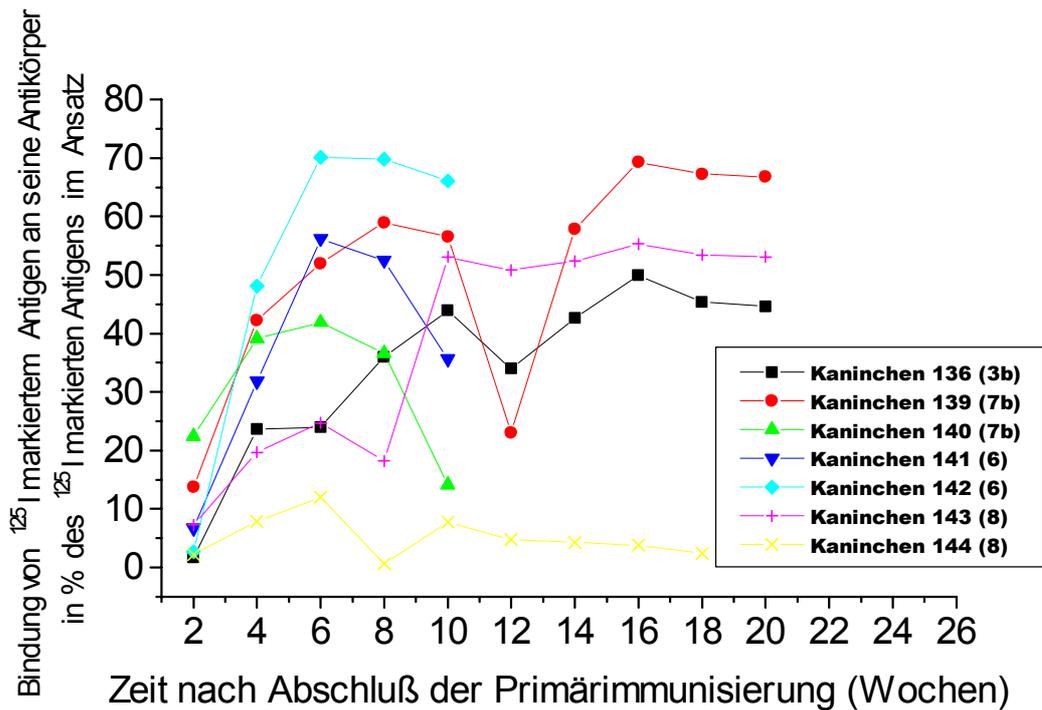


Abb. 5.04 *Titerverlaufskurven der Antiseren aus Kaninchenserie 1*

(1:100 – Verdünnung der Antiseren)

Kaninchen 136 wurde gegen FR 3b immunisiert, was dem acetylierten N-terminalen Fragment von γ_H -MSH (Ac-N-[Tyr⁵] γ_H -MSH (1-5)) entspricht. Kaninchen 139 und 140 wurden gegen FR 7b immunisiert, was dem acetylierten N-terminalen Fragment von CLIP_H (Ac-N-CLIP_H (1-5)) entspricht. Kaninchen 141 und 142 wurden gegen FR 6 immunisiert, was dem C-terminalen Fragment von α_H -MSH-Amid ([Tyr⁹] α_H -MSH (9-13)) entspricht. Kaninchen 143 und 144 wurden gegen FR 8 immunisiert, was dem C-terminalen Fragment von CLIP_H ([Tyr¹⁸] CLIP_H (18-22)) entspricht. Die Blutentnahmen erfolgten im Abstand von 2 Wochen nach Abschluß der Primärimmunisierung

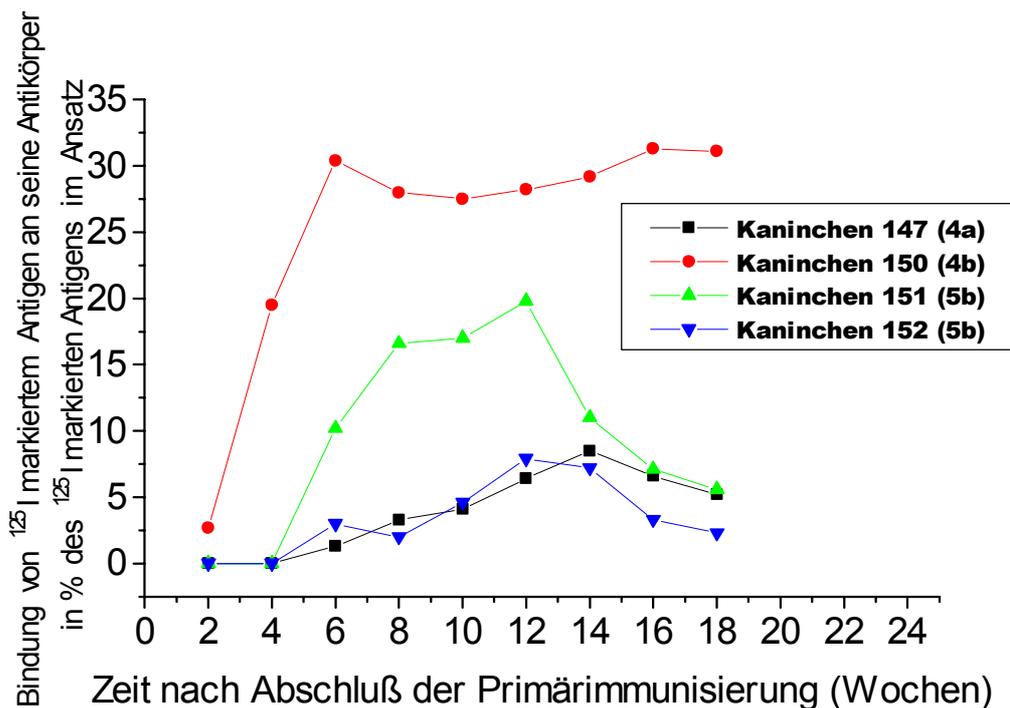


Abb. 5.05 *Titerverlaufskurven der Antiseren aus Kaninchenserie 2*

(1:100 – Verdünnungen der Antiseren)

Kaninchen 147 wurde gegen FR 4a immunisiert, was dem N-terminalen Fragment des Joining Peptide_H ([Tyr⁵] JP_H (1-5)) entspricht. Kaninchen 150 wurde gegen FR 4b immunisiert, was dem acetylierten N-terminalen Fragment des Joining Peptide_H (Ac-N-[Tyr⁵] JP_H (1-5)) entspricht. Kaninchen 151 und 152 wurden gegen FR 5b immunisiert, was dem N-terminalen Fragment von α _H-MSH ([Tyr⁵] α _H-MSH (1-5)) entspricht. Die Blutentnahmen erfolgten im Abstand von 2 Wochen nach Abschluß der Primärimmunisierung.

Wenn in den Kaninchen Antikörpertiter von über 30 Bindungsprozent gefunden wurden und die Titer nicht mehr weiter anstiegen, so wurden sie nach dem unter 4.4.5.1.1.6 beschriebenen Verfahren entblutet. Das gewonnene Blut wurde zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Danach wurden die zuvor und bei der Entblutung gewonnenen Seren gepoolt, aliquotiert und bei –20° C eingefroren.

Zur weiteren Verwendung eigneten sich Antiseren, die gegen die POMC-Fragmente FR 3b (Kaninchen Nr. 136), FR 4b (Kaninchen Nr. 150), FR 6 (Kaninchen Nr. 141

und 142), FR 7b (Kaninchen Nr. 139 und 140), FR 8 (Kaninchen Nr. 143), gerichtet waren.

Eine genauere Charakterisierung der gewonnenen Antiseren wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt. Sie sollten bei Untersuchungen im Rahmen eines weiteren Projektes charakterisiert und eingesetzt werden. Im Rahmen dieses Projektes wurden einige, auf die beschriebene Art gewonnene und bereits charakterisierte, Antiseren in den entsprechenden RIAs eingesetzt.

5.2.1.2 Monoklonale Antikörper aus Mäusen

5.2.1.2.1 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von γ_H -MSH

Nachdem Mäuse nach dem unter 4.4.5.1.2.1 beschriebenen Schema mit mittels CDI an KLH gekoppeltem N-terminalem Fragment von γ_H -MSH (FR 3a) immunisiert worden waren, wurde ein Dot Blot-Test auf gebildete Antikörper durchgeführt.

Anhand des Ergebnisses wurde eine positiv getestete Maus (laufende Nr. 35) ausgewählt. Die Maus wurde getötet und eine Zellfusion der Lymphozyten aus der Milz der Maus mit Myelomzellen durchgeführt. Bei der anschließenden Testung der fusionierten Zellen im ELISA wurde ein positiver, d.h. Antikörper produzierender Klon (mit hoher Extinktion) ausgewählt und in die 10er Klonierung überführt (Klon 1D2). Auf den Klonierungsstufen der 10er- und 1er- Klonierung wurden jeweils ELISA-Tests durchgeführt und ein Teil der positiv getesteten Proben jeweils in die nächste Klonierungsstufe überführt. Die Klonierung konnte auf diese Weise problemlos bis zur 0,1er Klonierung geführt werden:

In der 10er Klonierung wurde der Klon 1D2E2 positiv getestet und in die 1er Klonierung eingeschleust. Hier wurden die Klone 1D2E2B5, 1D2E2F4, 1D2E2A7, 1D2E2B8, 1D2E2C1, 1D2E2C6, 1D2E2C8, 1D2E2D2, 1D2E2F3 und 1D2E2F10, 1D2E2H3, 1D2E2H6 positiv getestet. Der Klon 1D2E2F3 wurde ausgewählt und in die 0,1er Klonierung eingeschleust. Positiv getestet wurden hier die Klone 1D2E2F3A1, 1D2E2F3B8, 1D2E2F3C7, 1D2E2F3E3, 1D2E2F3F5.

Durch den Einsatz von „Absorbern“ sollte überprüft werden, ob der Antikörper an das N-terminale Fragment von γ_H -MSH gebunden hatte.

Dazu wurden zu jeweils 100 µl des Zellüberstandes der Klone 1D2E2F3A1, 1D2E2F3B8, 1D2E2F3C7, 1D2E2F3D5, 1D2E2F3E3 und 1D2E2F3F5 200 µg des Kopplungsproduktes FR 3a-BDB-BSA, gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und die Proben über Nacht bei 4° C inkubiert.

Weiterhin wurden zu jeweils 100 µl der Zellüberstände 200 µg ungekoppeltes FR 3a ([Tyr⁵] γ _H-MSH (1-5)), gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und die Proben über Nacht bei 4° C inkubiert. Darüber hinaus wurden zu jeweils 100 µl Zellüberstand 200 µg eines Kopplungsproduktes von FR 1-BDB-BSA (γ _H-MSH (1-12)), gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und die Proben über Nacht bei 4° C inkubiert (4.4.5.1.2.1.9a).

Anschließend wurden jeweils 100 µl dieser Ansätze im ELISA getestet.

Eine spezifische Bindung der Antikörper an die drei als „Absorber“ eingesetzten Substanzen sollte eine geringere Extinktion bei der photometrischen Messung, im Vergleich zu den Kontrollen, denen lediglich 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig) zugegeben worden waren, zur Folge haben.

Bei Einsatz des Kopplungsproduktes FR 3a-BDB-BSA als „Absorber“ im Zellüberstand aller 6 Klone kam es tatsächlich zu einer deutlich geringeren Extinktion im Vergleich zur Kontrolle. Das freie Kopplungsprodukt FR 3a-BDB-BSA hatte die Antikörper absorbiert, so daß sie nicht mehr an das Kopplungsprodukt FR 3a-BDB-BSA, das zur Beschichtung der wells eingesetzt worden war, binden konnten.

Jedoch kam es bei Einsatz von ungekoppeltem FR 3a und auch bei Einsatz des Kopplungsproduktes FR 1 (YVMGHFRWDRFG, Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly: γ _H-MSH(1-12))-BDB-BSA als „Absorber“ im Zellüberstand aller 6 Klone nicht zu der erwarteten geringeren Extinktion. Die gemessene Extinktion war bei allen 6 eingesetzten Klonen vergleichbar zu der Extinktion der Kontrollen oder lag sogar noch darüber.

Es schien sich also nicht um einen spezifischen Antikörper gegen das N-terminale Fragment von γ _H-MSH zu handeln.

Die spezifische Bindung des Antikörpers an das N-terminale Fragment von γ _H-MSH sollte zudem durch Kreuzreaktivitätsversuche (4.4.5.1.2.1.9b) überprüft werden.

Eine Mikrotiterplatte mit 96 wells wurde mit verschiedenen Kopplungsprodukten beschichtet (siehe Abb. 5.06).

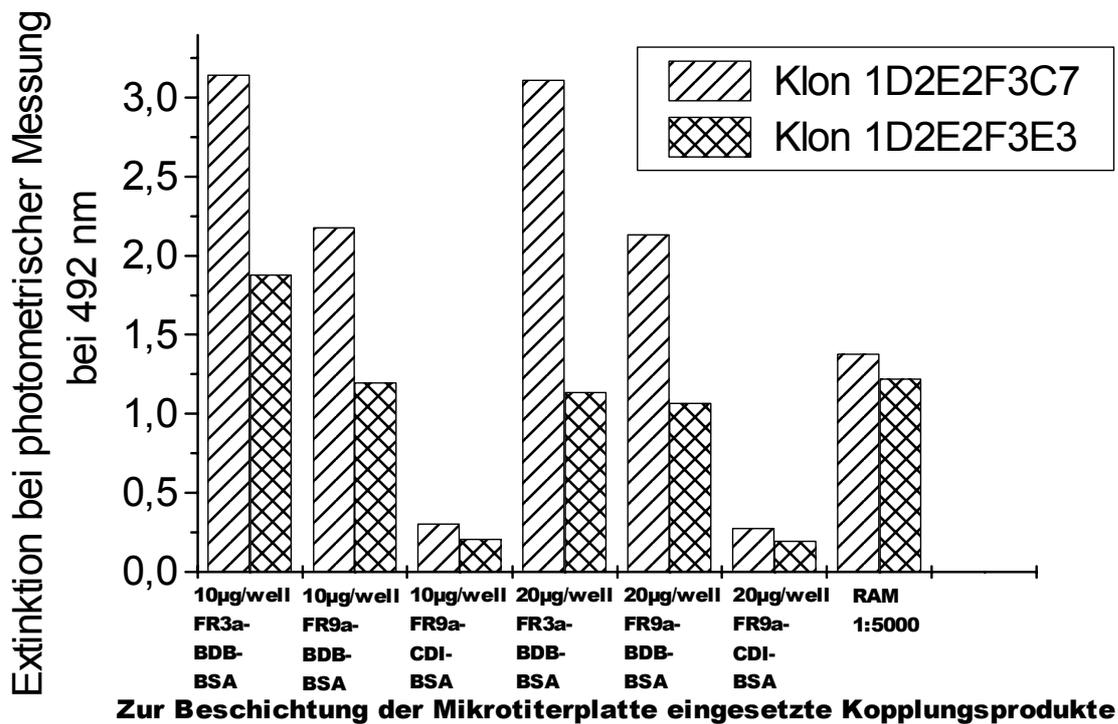


Abb. 5.06 Kreuzreaktivitäten der Antikörper gegen das zur Immunisierung der Balb/c Maus Nr. 35 eingesetzte Kopplungsprodukt FR 3a-CDI-KLH bei 2 Klonen (1D2E2F3C7; 1D2E2F3E3) aus der 0,1er Klonierung mit weiteren Kopplungsprodukten

10µg/well FR3a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10µg des Kopplungsproduktes FR 3a-BDB-BSA eingesetzt worden. 10µg/well FR9a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10µg des Kopplungsproduktes FR 9a-BDB-BSA eingesetzt worden. 10µg/well FR9a-CDI-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10µg des Kopplungsproduktes FR9a-CDI-BSA eingesetzt worden. 20µg/well FR3a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 20µg des Kopplungsproduktes FR 3a-BDB-BSA eingesetzt worden. 20µg/well FR9a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 20µg des Kopplungsproduktes FR 9a-BDB-BSA eingesetzt worden. 20µg/well FR9a-CDI-BSA: zur Beschichtung der wells waren 20µg des Kopplungsproduktes FR9a-CDI-BSA eingesetzt worden. RAM 1 : 5000: zur Beschichtung der wells war Rabbit-Anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 5000 eingesetzt worden.

Als Kontrolle kam eine Beschichtung mit 10 µg und 20 µg des Kopplungsproduktes von FR 3a-BDB-BSA pro well zum Einsatz. Hier wurde eine deutliche Extinktion erwartet.

Zur orientierenden Testung wurde als Fremdpeptid FR 9a ([Tyr⁵] β_H-LPH (1-5)) ausgewählt. Die Platte wurde mit jeweils 10 µg und 20 µg der Kopplungsprodukte FR 9a-BDB-BSA und FR 9a-CDI-BSA pro well beschichtet. In diesen Versuchsansätzen sollte keine Extinktion nachweisbar sein, da die Aminosäuresequenzen von FR 3a und FR 9a mit Ausnahme einer Aminosäure keine Übereinstimmung aufweisen, die Antikörper also keine Angriffstelle finden sollten. Da die Maus mit FR 3a mittels CDI an KLH gekoppelt immunisiert worden war, waren keine Antikörper gegen die Struktur der Kopplungsprodukte von BSA-BDB zu erwarten. Um Maus IgG in den Zellüberständen nachzuweisen, erfolgte zusätzlich eine Beschichtung einiger wells mit Rabbit-Anti-Mouse-Antikörper (RAM) 1:5000. Bei Vorhandensein von Antikörpern im Zellüberstand der getesteten Klone musste hier eine deutliche Extinktion nachweisbar sein.

Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung. Jeweils 150 µl Zellüberstand von 2 Klonen aus der 0,1er Klonierung (1D2E2F3C7; 1D2E2F3E3) wurden im ELISA (4.4.5.1.2.1.8) getestet.

Bei beiden eingesetzten Klonen zeigte sich eine deutliche Extinktion nicht nur bei dem mittels BDB an BSA gekoppelten Fragment FR 3a, gegen das der Antikörper sich eigentlich richten sollte, sondern auch bei dem Kopplungsprodukt FR 9a-BDB-BSA. Bei dem mittels CDI an BSA gekoppelten FR 9a fand sich nur eine geringe Extinktion.

Auch bei dem eingecoateten Rabbit-Anti-Maus-Antikörper fand sich eine Extinktion, die Farbreaktion schien tatsächlich durch eine Antikörperbindung zu entstehen. Es waren also Antikörper im Zellüberstand nachweisbar, die sich jedoch nicht spezifisch gegen das N-terminale Fragment von γ_H-MSH (FR 3a), sondern eher gegen das Kopplungsprodukt von BDB mit BSA richteten. Es sollte nun geprüft werden, wogegen diese Antikörper gerichtet sein könnten.

Zur weiteren Untersuchung wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 wells mit weiteren Kopplungsprodukten, jeweils 10 µg/well, beschichtet (siehe Abb. 5.07).

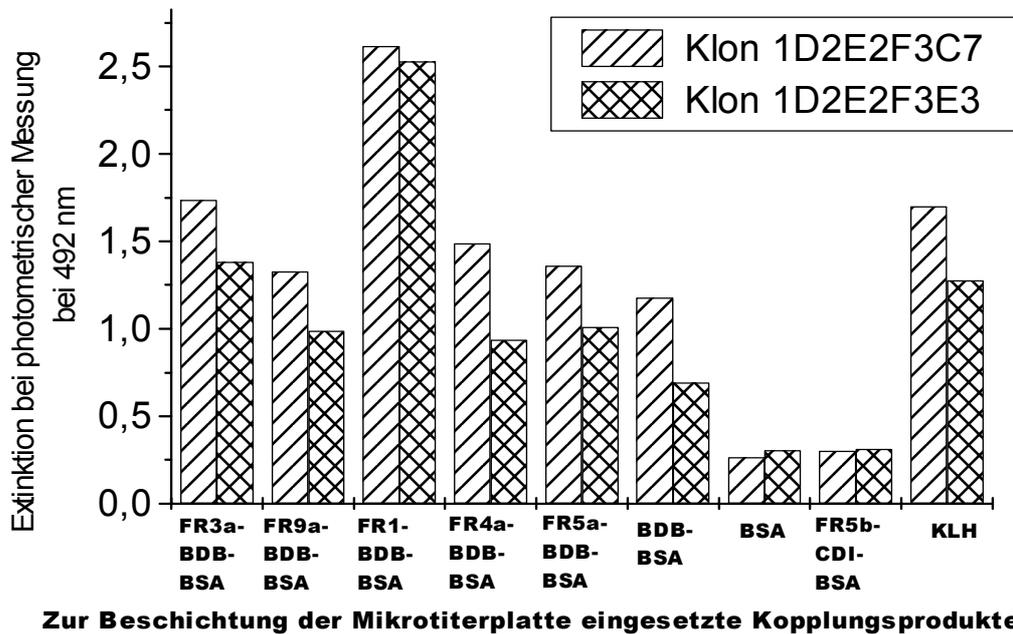


Abb. 5.07 Kreuzreaktivitäten der Antikörper gegen das zur Immunisierung der Balb/c Maus Nr. 35 eingesetzte Kopplungsprodukt FR 3a-CDI-KLH bei 2 Klonen (1D2E2F3C7; 1D2E2F3E3) aus der 0,1er Klonierung

FR3a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10 µg des Kopplungsproduktes FR 3a-BDB-BSA eingesetzt worden. FR9a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10 µg des Kopplungsproduktes FR 9a-BDB-BSA eingesetzt worden. FR1-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10 µg des Kopplungsproduktes FR 1-BDB-BSA eingesetzt worden. FR4a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10µg des Kopplungsproduktes FR 4a-BDB-BSA eingesetzt worden. FR5a-BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10 µg des Kopplungsproduktes FR 5a-BDB-BSA eingesetzt worden. BDB-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10 µg des Kopplungsproduktes BDB-BSA ohne POMC-Fragment eingesetzt worden. BSA: zur Beschichtung der wells war BSA eingesetzt worden. FR5b-CDI-BSA: zur Beschichtung der wells waren 10 µg des Kopplungsproduktes FR5b-CDI-BSA eingesetzt worden. KLH: zur Beschichtung der wells war KLH eingesetzt worden.

Zum Einsatz kamen dabei folgende Kopplungsprodukte: FR 3a-BDB-BSA, FR 9a-BDB-BSA, FR1(YVMGHFRWDRFG)-BDB-BSA, FR 4a-BDB-BSA, FR 5a-BDB-BSA, FR 5b-CDI-BSA, ein Kopplungsprodukt von BSA und BDB ohne zusätzliches POMC-Fragment, sowie BSA und KLH.

Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung. Jeweils 150 µl des Zellüberstandes von 2 Klonen (1D2E2F3C7; 1D2E2F3E3) aus der 0,1er Klonierung wurden eingesetzt.

Hier zeigten sich nun deutliche Extinktionen bei allen POMC-Derivaten die mit BDB an BSA gekoppelt worden waren - auch bei dem Kopplungsprodukt von BSA-BDB ohne POMC-Fragment. Dagegen fanden sich bei dem mit CDI an BSA gekoppelten FR 5b und bei purem BSA nur geringe Extinktionen. Deutlich war die Farbreaktion auch bei purem KLH.

Es handelte sich bei dem nachgewiesenen Antikörper also offenbar um einen Antikörper, der gegen eine Molekularstruktur gerichtet war, die sowohl BDB in seiner an BSA gekoppelten Form, als auch nicht gekoppeltes KLH gemeinsam hatten.

Durch Kopplung von BDB und BSA entsteht vermutlich eine Struktur, die Ähnlichkeiten mit einer Teilstruktur von KLH hat: Offenbar war bei der Immunisierung ein Antikörper gegen letztere entstanden.

5.2.1.2.2 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von β_H -LPH

Die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein N-terminales Fragment von β_H -LPH erfolgte wie unter 4.4.5.1.2.2 beschrieben. Die Mäuse wurden mit mittels CDI an KLH gekoppeltem N-terminalen Fragment von β_H -LPH immunisiert (FR 9a).

Hier wurde als semiquantitativer Titerest auf Antikörper in Maus-Seren ein Solid-phase-one-site-RIA mit mittels BDB an BSA gekoppeltem N-terminalem Fragment von β_H -LPH durchgeführt.

Aus den positiv getesteten Mäusen wurde eine Maus (laufende Nr. 46) ausgewählt. Die Lymphozyten aus der Milz konnten problemlos mit Myelomzellen fusioniert werden. Bei den unmittelbar nach Fusion im ELISA positiv getesteten Klonen wurden teilweise Extinktionen im Bereich der Positivkontrolle gemessen. Diese wurden

ausgewählt und eine Reihe von Verdünnungen hiervon wurde erneut im ELISA untersucht.

Um bei den Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuchen auswertbare Ergebnisse zu erhalten, mussten Zellüberstandsverdünnungen gewählt werden, bei denen Extinktionen im mittleren Bereich gemessen werden konnten. Anhand der Höhe der Extinktionen in dieser Verdünnungsreihe konnte so eine günstige Verdünnung für den Zellüberstand des jeweiligen Klons ausgewählt werden.

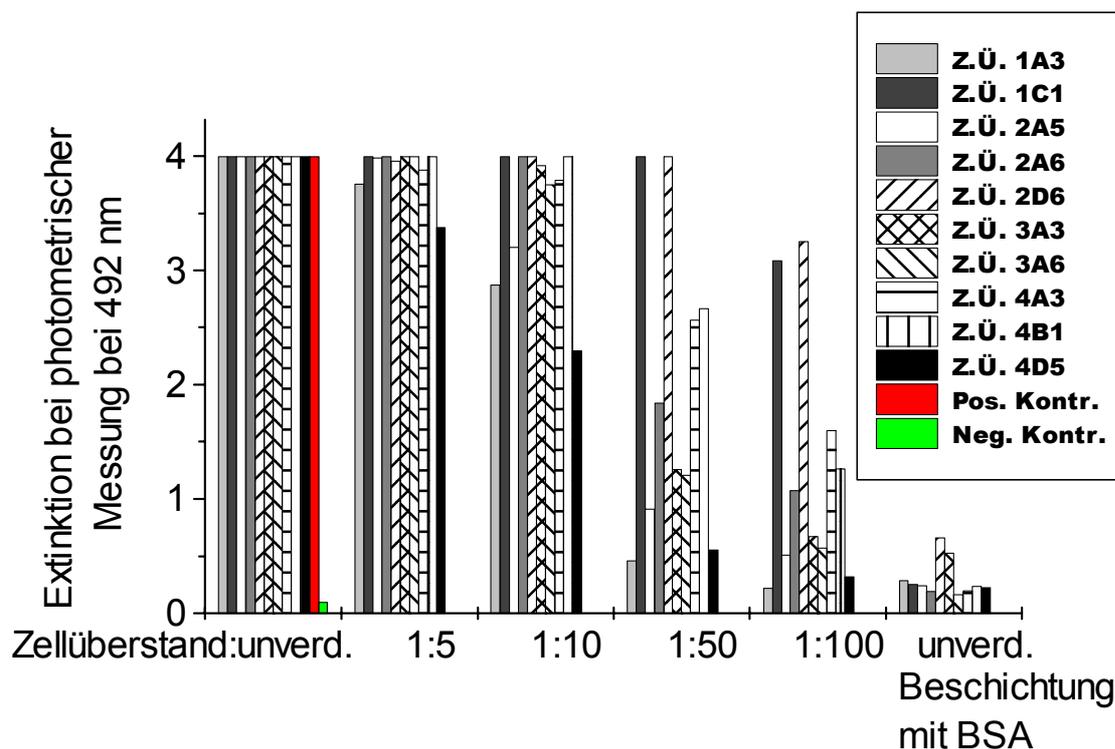


Abb. 5.08 Verdünnungsreihe mit verschiedenen nach Fusion positiv getesteten Zellüberständen (Z.Ü.)

Die Beschichtung der wells erfolgte mit 10 µg des Kopplungsproduktes FR9a-BDB-BSA pro well. Die Blockung erfolgte mit BSA (5 %ig)

Es wurden jeweils 100 µl Zellüberstand (unverd.) oder Verdünnungen desselben in Verdünnungsstufen von 1:5 bis 1:100 eingesetzt.

Beschichtung mit BSA: Die Beschichtung und Blockung der wells erfolgte mit BSA, hier wurde unverdünnter (unverd.) Zellüberstand eingesetzt.

Eine Mikrotiterplatte mit 96 wells wurde mit 10 µg des Kopplungsproduktes FR 9a-BDB-BSA pro well beschichtet. Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung.

Der Zellüberstand wurde unverdünnt sowie in den Verdünnungsstufen 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 eingesetzt. Zusätzlich wurden die unverdünnten Zellüberstände auch auf wells ohne Beschichtung getestet, die nur mit BSA (5 %ig) geblockt worden waren.

Bei einigen Zellüberständen zeigte sich auch bei den mit BSA beschichteten wells relativ deutliche Farbreaktionen oberhalb der der Negativkontrolle. Verglichen mit den Extinktionen der unverdünnten Zellüberstände im Falle der Beschichtung mit dem Kopplungsprodukt FR 9a-BDB-BSA waren sie jedoch vernachlässigbar gering. Anhand dieses Versuches wurde für die einzelnen Klone eine günstige Verdünnungsstufe des Zellüberstandes für die folgenden Absorptions- und Kreuzreaktivitätsversuche ausgewählt.

Durch den Einsatz von „Absorbern“ sollte die spezifische Bindung des Antikörpers an das N-terminale Fragment von β_{H} -LPH (FR 9a) überprüft werden (siehe Abbildung 5.09).

Eine Mikrotiterplatte mit 96 wells wurde mit 10 μg des Kopplungsproduktes FR 9a-BDB-BSA pro well beschichtet. Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung. Die Zellüberstände wurden in Verdünnungen eingesetzt, die Extinktionen im optimalen Messbereich erwarten ließen.

Zu 100 μl Zellüberstand wurden als „Absorber“ jeweils 200 μg ungekoppeltes FR 9a, gelöst in 20 μl PBS-Tween (0,05 %ig), gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Als Kontrolle wurden 20 μl PBS-Tween (0,05 %ig) ohne darin gelöste Substanz zu 100 μl Zellüberstand gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Von diesen Inkubaten wurden dann je 100 μl in den ELISA eingeschleust.

Hier zeigte sich nun bei fast allen Klonen eine fast komplette Absorption der Antikörper durch das ungekoppelte FR 9a. Diese Antikörper konnten dann nicht an das Kopplungsprodukt FR 9a-BDB-BSA in der Beschichtung der wells binden. Eine nur geringe Absorption zeigte sich lediglich bei Klon 4A3.

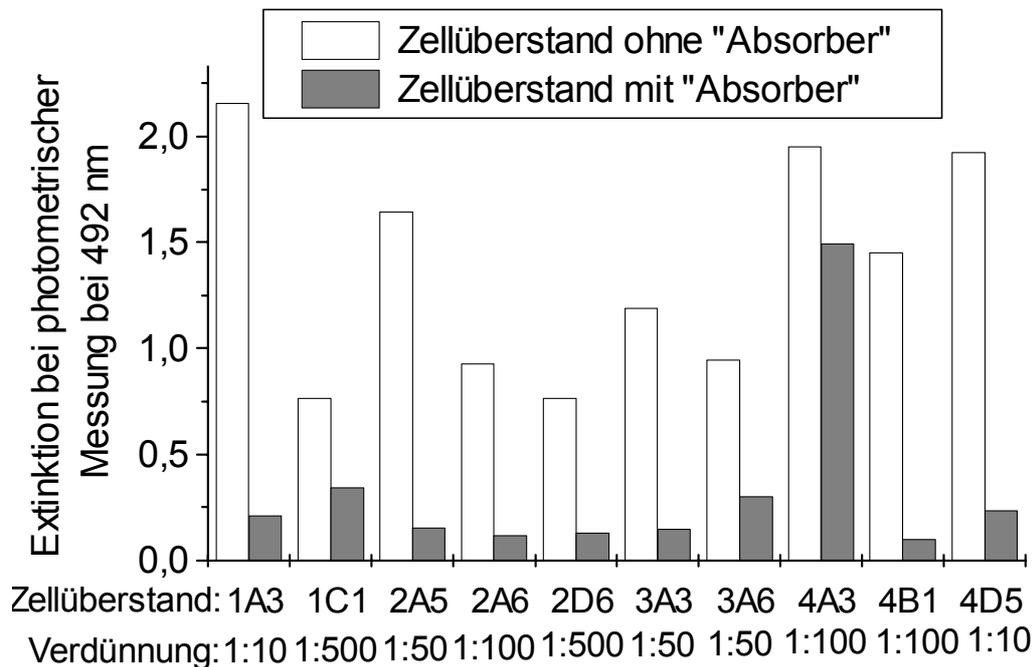


Abb. 5.09 Absorptionsversuch mit verschiedenen nach Fusion positiv getesteten Zellüberständen

Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt FR9a-BDB-BSA pro well. Die Blockung erfolgte mit BSA (5 %ig). Zu 100 µl der jeweiligen Zellüberstand-Verdünnung wurden entweder 200 µg FR 9a gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig) (als „Absorber“: graue Säulen) oder 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig) (als Kontrolle: weiße Säulen) gegeben und die Proben über Nacht bei 4° C inkubiert. Von diesen Inkubaten wurden jeweils 100 µl im ELISA eingesetzt. Zellüberstand 1A3 wurde in einer Verdünnung von 1:10, Zellüberstand 1C1 wurde in einer Verdünnung von 1:500, Zellüberstand 2A5 wurde in einer Verdünnung von 1:50, Zellüberstand 2A6 wurde in einer Verdünnung von 1:100; Zellüberstand 2D6 wurde in einer Verdünnung von 1:500, Zellüberstand 3A3 wurde in einer Verdünnung von 1:50, Zellüberstand 3A6 wurde in einer Verdünnung von 1:50, Zellüberstand 4A3 wurde in einer Verdünnung von 1:100, Zellüberstand 4B1 wurde in einer Verdünnung von 1:100; Zellüberstand 4D5 wurde in einer Verdünnung von 1: 10 eingesetzt.

Die spezifische Bindung des Antikörpers an das N-terminale Fragment von β_H -LPH (FR 9a) sollte zudem durch weiterführende Kreuzreaktivitätsversuche (4.4.5.1.2.2.9b) überprüft werden (siehe Abb. 5.10).

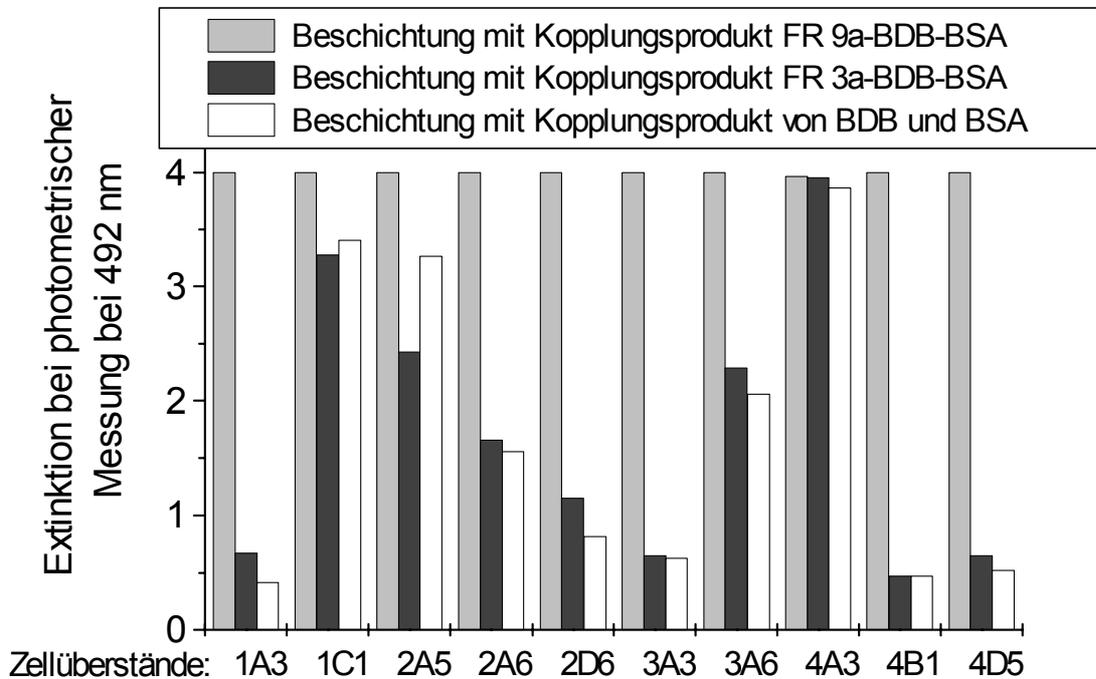


Abb. 5.10 Kreuzreaktivitätsversuch mit verschiedenen nach Fusion positiv getesteten Zellüberständen

Graue Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 μ g Kopplungsprodukt FR 9a-BDB-BSA pro well.

Schwarze Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 μ g Kopplungsprodukt FR 3a-BDB-BSA pro well.

Weißer Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 μ g Kopplungsprodukt von BDB und BSA pro well.

Die Blockung erfolgte immer mit BSA (5 %ig).

Es wurden jeweils 100 μ l Zellüberstand der Klone 1A3, 1C1, 2A5, 2A6, 2D6, 3A3, 3A6, 4A3, 4B1 und 4D5 unverdünnt eingesetzt.

Zur weiteren Untersuchung wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 wells mit verschiedenen Kopplungsprodukten, jeweils 10 μ g/well beschichtet.

Zum Einsatz kamen die Kopplungsprodukte: FR 9a-BDB-BSA als Kontrolle, FR 3a-BDB-BSA als Fremdpeptid, sowie ein Kopplungsprodukt von BSA und BDB ohne zusätzliches POMC-Fragment.

Die Blockung erfolgte mit 5 %iger BSA-Lösung. Es wurden jeweils 100 µl unverdünnter Zellüberstand eingesetzt.

Die Klone zeigten ein sehr unterschiedliches Kreuzreaktivitätsmuster (Abbildung 5.10). Die Antikörper einiger Klone zeigten eine hohe Kreuzreaktivität mit dem Kopplungsprodukt FR 3a-BDB-BSA und mit dem Kopplungsprodukt von BDB und BSA. Andere Antikörper reagierten dagegen recht spezifisch nur mit dem Kopplungsprodukt FR 3a-BDB-BSA. Eine geringe Reaktion mit dem Kopplungsprodukt von BDB und BSA war jedoch immer nachweisbar.

Nur die Klone mit hoher Antikörperproduktion und mit spezifisch gegen FR 9a gerichteten Antikörpern sollten in die nächste Klonierungsstufe eingeschleust werden. Für weiterführende Versuche wurde der Klon 3A3 ausgewählt und in die erste Klonierungsstufe eingebracht.

Aufgrund der Erfahrungen mit den Antikörper gegen Fr 3a produzierenden Zellen wurde dieses Versuchsschema bei allen Klonierungsstufen wiederholt.

Nach der 10er Klonierung sollte analog zu den Versuchen unmittelbar nach Fusion durch den Einsatz von „Absorbern“ (siehe Abbildung 5.11) und mit Kreuzreaktivitätsversuchen (siehe Abbildung 5.12) die spezifische Bindung des Antikörpers an das N-terminalen Fragment von β_H -LPH (FR 9a) überprüft werden.

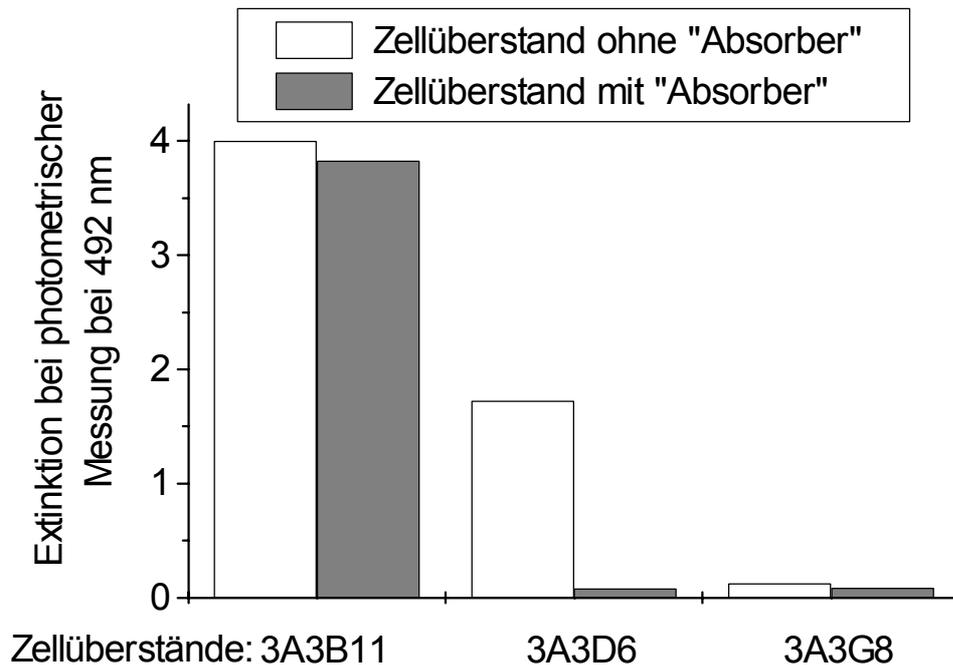


Abb. 5.11 Absorptionsversuch mit verschiedenen nach 10er Klonierung positiv getesteten Zellüberständen

Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt FR9a-BDB-BSA pro well. Die Blockung erfolgte mit BSA (5 %ig).

Zu 100 µl der unverdünnten Zellüberstände von 3A3B11, 3A3D6 und 3A3G8 wurden jeweils entweder 200 µg FR 9a gelöst in 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig) (als „Absorber“: graue Säulen) oder 20 µl PBS-Tween (0,05 %ig) (als Kontrolle: weiße Säulen) gegeben und über Nacht bei 4 ° C inkubiert. Von diesen Inkubaten wurden jeweils 100 µl im ELISA eingesetzt.

Lediglich im Zellüberstand des Klonen 3A3D6 kam es zu einer deutlichen, fast kompletten Absorption der Antikörper durch das ungekoppelte FR 9a. Im Zellüberstand des Klons 3A3B11 kam es zu einer minimalen Absorption an das ungekoppelte FR 9a. Hier reagierten die Antikörper mit dem Kopplungsprodukt FR 9a-BDB-BSA mit dem die wells beschichtet worden waren – unabhängig davon, ob der Zellüberstand mit Fr 9a vorinkubiert worden war oder nicht. Im Zellüberstand von Klon 3A3G8 gelang nur ein minimaler Antikörpernachweis.

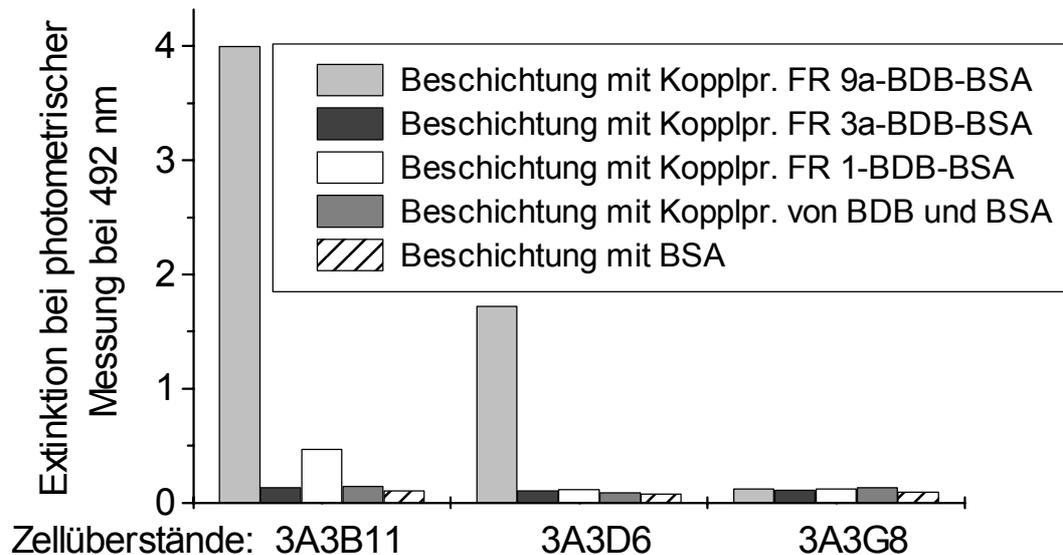


Abb. 5.12 Kreuzreaktivitätsversuch mit verschiedenen nach 10er Klonierung positiv getesteten Zellüberständen

Hellgraue Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt (Kopplpr.) FR 9a-BDB-BSA pro well.

Schwarze Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt FR 3a-BDB-BSA pro well.

Weißer Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt FR 1-BDB-BSA pro well.

Dunkelgraue Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt von BDB und BSA pro well.

Schraffierte Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit BSA.

Die Blockung erfolgte immer mit BSA (5 %ig).

Es wurden jeweils 100 µl Zellüberstand der Klone 3A3B11, 3A3D6 und 3A3G8 unverdünnt eingesetzt.

Bei den Zellüberständen der eingesetzten Klone fand sich nur eine geringe Kreuzreaktivität zu anderen BDB-BSA-gekoppelten POMC-Fragmenten. Im Zellüberstand von Klon 3A3G8 fanden sich nur geringe Mengen an Antikörpern (siehe Abb. 5.12).

Die Klone 3A3B11 und 3A3D6 wurden ausgewählt und in die 1er Klonierung eingebracht.

Nach der 1er Klonierung sollte analog zu den Versuchen unmittelbar nach Fusion und nach 10er Klonierung durch den Einsatz von „Absorbern“ (siehe Abbildung 5.13) und mit Kreuzreaktivitätsversuchen (siehe Abbildung 5.14) die spezifische Bindung des Antikörpers an das N-terminalen Fragment von β_H -LPH (FR 9a) überprüft werden.

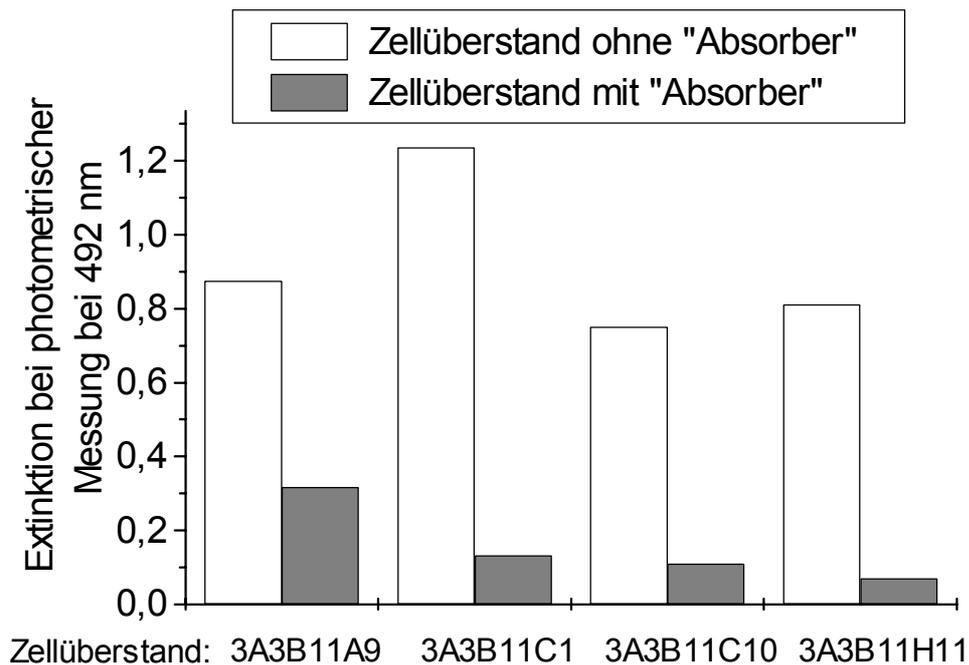


Abb. 5.13 Absorptionsversuch mit verschiedenen nach 1er Klonierung positiv getesteten Zellüberständen

Die Beschichtung erfolgte mit 10 μ g Kopplungsprodukt FR9a-BDB-BSA pro well. Die Blockung erfolgte mit BSA (5 %ig).

Zu 100 μ l der unverdünnten Zellüberstände von 3A3B11A9, 3A3B11C1, 3A3B11C10 und 3A3B11H11 wurden jeweils entweder 200 μ g FR 9a gelöst in 20 μ l PBS-Tween (0,05 %ig) (als „Absorber“: graue Säulen) oder 20 μ l PBS-Tween (0,05 %ig) (als Kontrolle: weiße Säulen) gegeben und über Nacht bei 4 ° C inkubiert. Von diesen Inkubaten wurden jeweils 100 μ l im ELISA eingesetzt.

Bei den Zellüberständen aller eingesetzter Klone kam es zu einer Absorption der Antikörper durch das ungekoppelte FR 9a. Lediglich bei Klon 3A3B11A9 war die Absorption weniger deutlich.

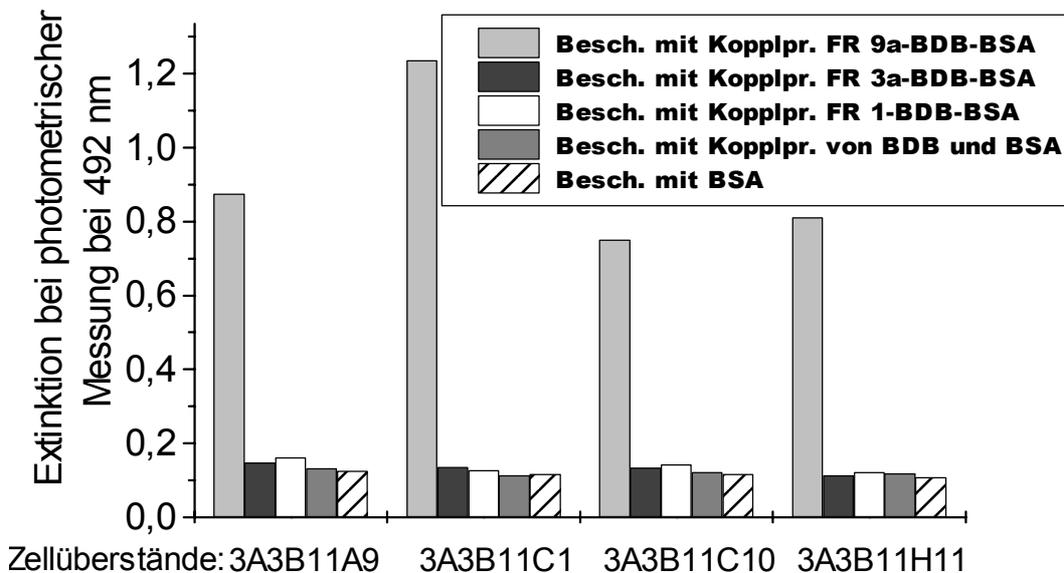


Abb. 5.14 Kreuzreaktivitätsversuch mit verschiedenen nach 1er Klonierung positiv getesteten Zellüberständen

Hellgraue Säulen: Die Beschichtung (Besch.) erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt (Kopplpr.) FR 9a-BDB-BSA pro well.

Schwarze Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt FR 3a-BDB-BSA pro well.

Weiße Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt FR 1-BDB-BSA pro well.

Dunkelgraue Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg Kopplungsprodukt von BDB und BSA pro well.

Schraffierte Säulen: Die Beschichtung erfolgte mit BSA.

Die Blockung erfolgte immer mit BSA (5 %ig).

Es wurden jeweils 100 µl Zellüberstand der Klone 3A3B11A9, 3A3B11C1, 3A3B11C10 und 3A3B11H11 unverdünnt eingesetzt.

Bei den Zellüberständen der eingesetzten Klone fand sich nur eine geringe Kreuzreaktivität zu anderen BDB-BSA-gekoppelten POMC-Fragmenten.

Die durchgeführte Serie von Spezifitäts-Tests erbrachte also den Nachweis eines spezifischen Antikörpers gegen das N-terminale Fragment von β_{H} -LPH (Fr 9a).

Die ausgewählten Klone wurden in die 0,1er Klonierungsstufe eingebracht.

Nach Anzucht kam es zunächst zu einem normalen Wachstum, dann starben die Zellen aus nicht bekannten Gründen ab oder stellten die Antikörperproduktion ein.

Die Zellen des ebenfalls in die 1er Klonierung eingebrachten Klon 3A3D6 starben bereits unmittelbar nach der Anzucht in der 1er Klonierung ab.

5.2.2 Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung von N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM, β_{H} -Endorphin-IRM, β_{H} -LPH-IRM und β_{H} -Endorphin (1-31)

Nach Versuch der Stimulation mit CRH und der Suppression mit Dexamethason sowie gleichzeitigem Einsatz von CRH und Dexamethason wurden die Zellen der Zelllinien HaCaT und Colo 679 wie beschrieben geerntet und aufgearbeitet. Die Extrakte wurden in die beschriebenen Radioimmunoassays eingeschleust.

5.2.2.1 Keratinozyten der Zelllinie HaCaT

5.2.2.1.1 N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM

Bei der Auswertung der drei identisch durchgeführten Versuche zeigte sich, daß in 2 Versuchen die im RIA gemessenen Werte von N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM in den Zellüberständen der HaCaT-Zellkulturen innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte lagen.

In zwei von drei Versuchen konnte also in den Zellüberständen der HaCaT-Zellen kein N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM nachgewiesen werden.

Lediglich in einem Versuch war es möglich N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM in den Zellüberständen der HaCaT-Zellkulturen nachzuweisen.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 5.15 dargestellt.

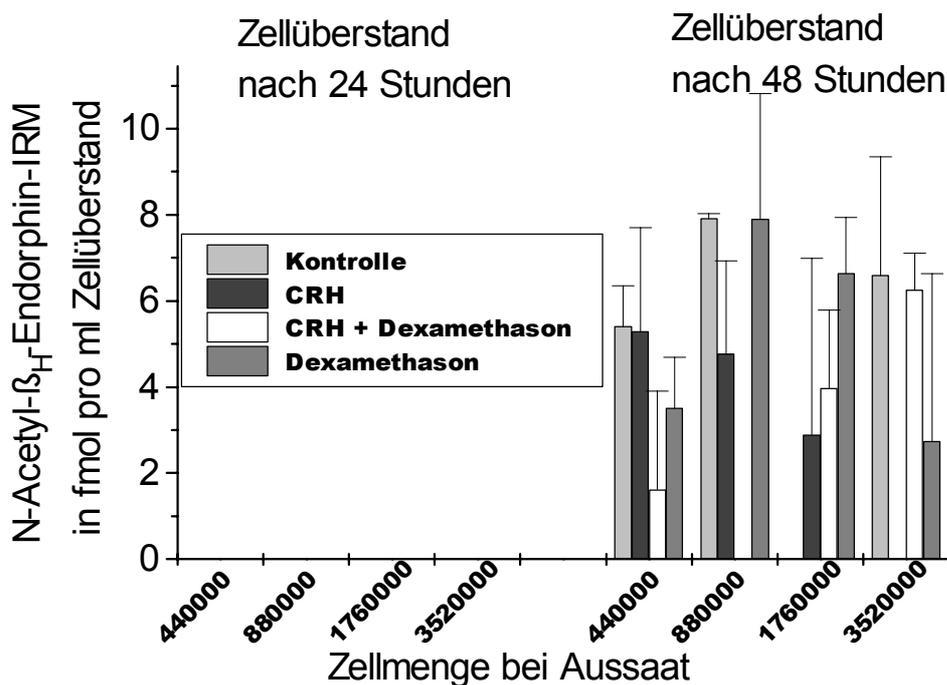


Abb. 5.15 *N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM im Zellüberstand von HaCaT-Zellkulturen in Anwesenheit von CRH (10⁻⁸M) und/oder Dexamethason (10⁻⁶M) 24 und 48 Stunden nach Versuchsbeginn (Mittelwerte ± Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen)*

Auffällig war, daß 24 Stunden nach Versuchsbeginn noch kein N-Acetyl-β_H-Endorphin-Immunoreaktives-Material in den Zellüberständen nachzuweisen war. Eine Abhängigkeit der Werte von der Anwesenheit von CRH oder Dexamethason war ebenso wenig festzustellen wie eine Abhängigkeit von der bei Aussaat der Zellen eingesetzte Zellmenge.

Die Nachweisgrenze für N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM in diesem Versuch lag bei 3,5 fmol pro ml Zellüberstand.

Bei den Lysaten von HaCaT-Zellen zeigte sich in der Auswertung der drei identisch durchgeführten Versuche, daß in 2 Versuchen die im RIA gemessenen Werte von N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM innerhalb der doppelten Standardabweichung des B₀-Wertes lagen.

In zwei von drei Versuchen konnte also in den Lysaten der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT kein N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden.

Lediglich in einem Versuch war es möglich N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM in den Zelllysaten aus HaCaT-Zellkulturen nachzuweisen. Die Werte zeigten sich jedoch sowohl unabhängig von der Anwesenheit von CRH oder Dexamethason als auch unabhängig von der Zellmenge bei Aussaat der Zellen.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 5.16 dargestellt.

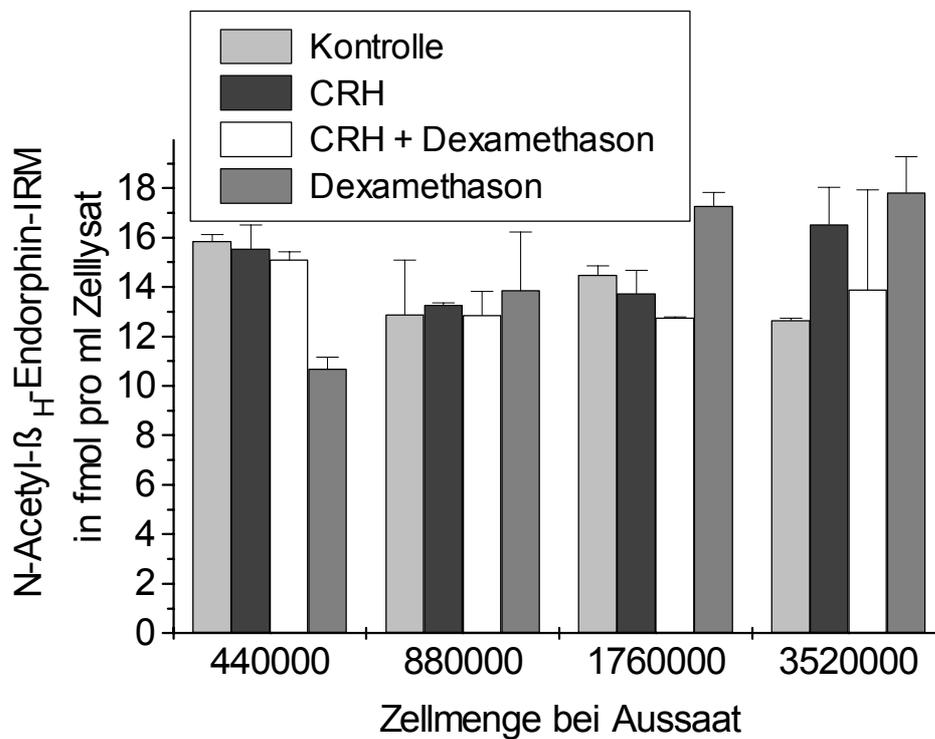


Abb. 5.16 *N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM im Zelllysate von HaCaT-Zellkulturen in Anwesenheit von CRH ($10^{-8}M$) und/oder Dexamethason ($10^{-6}M$) 48 Stunden nach Versuchsbeginn*
(Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen)

Die Nachweisgrenze für N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM in diesem Versuch lag bei 7,8 fmol pro ml Zelllysate.

5.2.2.1.2 β_H -Endorphin-IRM

Die im RIA gemessenen Werte für β_H -Endorphin-IRM in den Überständen der HaCaT-Zellkulturen lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte. Somit konnte in den Überständen der HaCaT-Zellkulturen kein β_H -Endorphin-IRM nachgewiesen werden.

Auch die Werte für β_{H} -Endorphin-IRM in den Lysaten der HaCaT-Zellkulturen lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte.

Es konnte also auch in den Lysaten der HaCaT-Zellkulturen kein β_{H} -Endorphin-IRM nachgewiesen werden.

5.2.2.1.3 β_{H} -LPH-IRM

Die Werte für β_{H} -LPH-IRM in den Lysaten der HaCaT-Zellkulturen lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte.

In den Lysaten von HaCaT-Zellkulturen konnte somit kein β_{H} -LPH-IRM nachgewiesen werden.

Die Überstände der HaCaT-Zellkulturen wurden nicht auf das Vorhandensein von β_{H} -LPH-IRM getestet.

5.2.2.1.4 β_{H} -Endorphin (1-31)

Die im RIA gemessenen Werte für β_{H} -Endorphin (1-31) in den Lysaten der HaCaT-Zellkulturen lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte.

In den Lysaten von HaCaT-Zellkulturen konnte somit kein β_{H} -Endorphin (1-31) nachgewiesen werden.

Die Überstände der HaCaT-Zellkulturen wurden nicht auf das Vorhandensein von β_{H} -Endorphin (1-31) untersucht.

5.2.2.2 Melanomzellen der Zelllinie Colo 679

5.2.2.2.1 N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM

Die im RIA gemessenen Werte für N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM in den Überständen der Zellkulturen der Melanom-Zelllinie Colo 679 lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte. In den Zellkulturüberständen der Colo 679-Zellen konnte somit kein N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM nachgewiesen werden.

Bei der Auswertung der drei identisch durchgeführten Stimulationsversuche zeigte sich, daß in 2 Versuchen die im RIA gemessenen Werte von N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM in den Lysaten der Colo 679-Zellen deutlich außerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte lagen (Abb. 5.17 und 5.18).

Eine gesetzmäßige Abhängigkeit der Werte von der Anwesenheit von CRH oder Dexamethason war in beiden Versuchen nicht erkennbar. Während im ersten der beiden Versuche auch keine Abhängigkeit der Werte von der Zellmenge bei Aussaat der Zellen feststellbar war, stiegen im zweiten der beiden Versuche die Werte mit steigenden Zellmengen bei Aussaat der Zellen an.

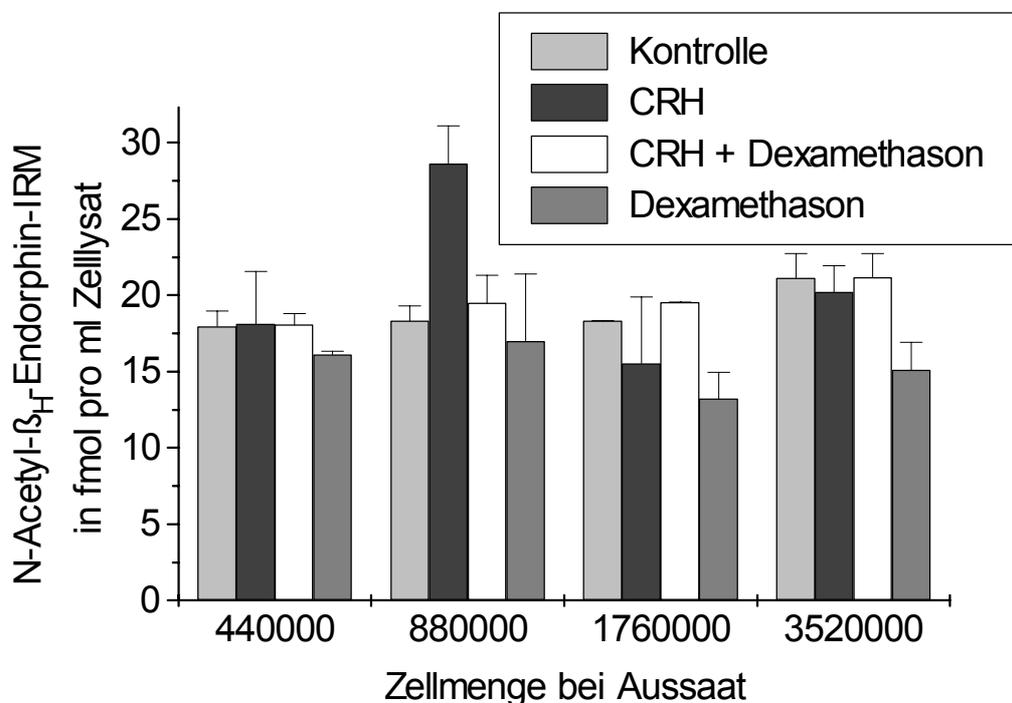


Abb. 5.17 *N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM im Zelllysat von Colo 679-Zellkulturen in Anwesenheit von CRH ($10^{-8}M$) und/oder Dexamethason ($10^{-6}M$) 48 Stunden nach Versuchsbeginn*
(Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen)

Die Nachweisgrenze für N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM im ersten der beiden Versuche lag bei 8,76 fmol pro ml Zelllysat.

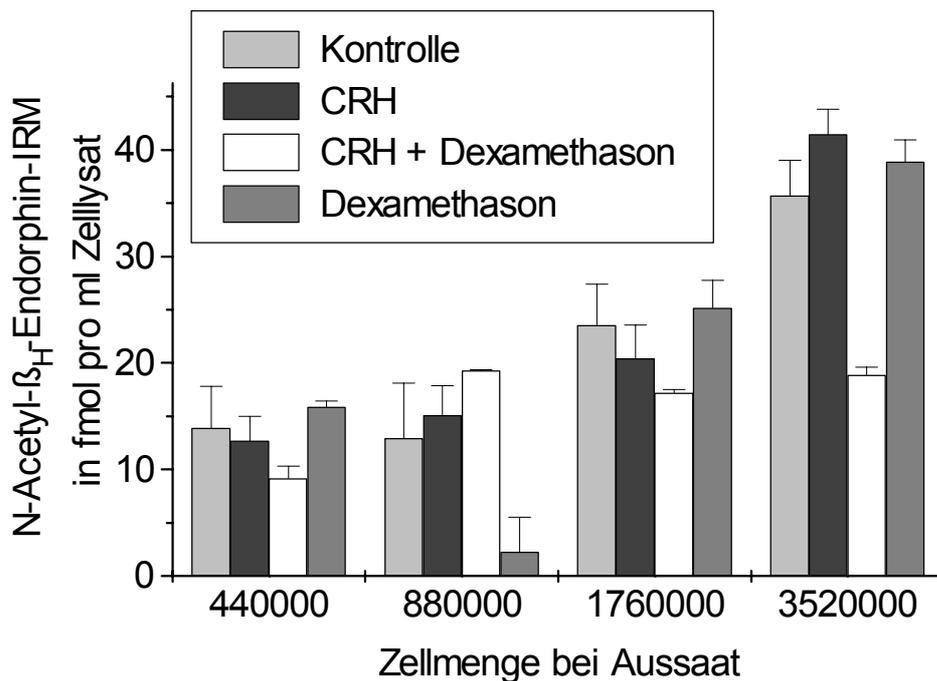


Abb. 5.18 *N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM im Zelllysat von Colo 679-Zellkulturen in Anwesenheit von CRH (10⁻⁸M) und/oder Dexamethason (10⁻⁶ M) 48 Stunden nach Versuchsbeginn*
(Mittelwerte ± Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen)

Die Nachweisgrenze für N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM im zweiten der beiden Versuche lag bei 0,1 fmol pro ml Zelllysat.

In zwei von drei Versuchen konnte also in den Lysaten von Colo 679-Zellen N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden.

Das Ergebnis dieser beiden positiven Versuche ist in den Abb. 5.17 und Abb. 5.18 dargestellt.

5.2.2.2.2 β_H-Endorphin-IRM

Die Werte für β_H-Endorphin-IRM in den Überständen der Colo 679-Zellkulturen lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B₀-Werte. Somit konnte kein β_H-Endorphin-IRM in den Zellkulturüberständen der Colo 679-Zellen nachgewiesen werden.

Auch die Werte für β_{H} -Endorphin-IRM in den Lysaten der Colo 679-Zellkulturen lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte. Es konnte also auch in den Lysaten von Colo 679-Zellen kein β_{H} -Endorphin-IRM nachgewiesen werden.

5.2.2.2.3 β_{H} -Endorphin (1-31)

Die im RIA gemessenen Werte für β_{H} -Endorphin (1-31) in den Lysaten der Kulturen von Colo 679-Zellen lagen alle innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte. In den Lysaten von Colo 679-Zellkulturen konnte somit kein β_{H} -Endorphin (1-31) nachgewiesen werden.

Die Überstände der Colo 679-Zellkulturen wurden nicht auf das Vorhandensein von β_{H} -Endorphin (1-31) untersucht.

6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis oder Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens und der Nachweis oder Ausschluß der Bildung von POMC-Derivaten des hypophysären Proopiomelanocortins in menschlichen Hautzellen. Nachweis oder Ausschluß der Expression des hypophysären POMC-Gens bzw. Hinweise auf die Expression eines nicht-hypophysären POMC-Gens sollten einen Beitrag zu der 1998 aufgeworfenen und noch immer nicht beantworteten Frage nach dem POMC-Typ liefern, der in der Haut exprimiert wird. Experimentell sollte die Fragestellung sowohl auf der Transkriptions- (Can et al. 1998) als auch auf der Translationsebene der POMC-Gen-Expression angegangen werden.

6.1 Diskussion der Methodik

Von Bedeutung war die Auswahl der zu verwendenden Zellen bzw. Zelllinien.

Neben der Untersuchung unter Basalbedingungen sollte überdies der Versuch unternommen werden, durch den Einsatz verschiedener Substanzen, die für die Expression des hypophysären POMC-Gens Bedeutung besitzen, eine Stimulation oder Suppression der Transkription des dermalen POMC-Gens und der Freisetzung der dermalen POMC-Derivate zu erreichen. Des weiteren war die Aufarbeitung der verwendeten Zellen und die Standardisierung der Nachweismethoden von Bedeutung.

Die Auswahl der eingesetzten Antikörper im RIA (Prüfung der POMC-Expression auf Translationsebene) und der Primerpaare bei der RT-PCR (Prüfung der POMC-Expression auf Transkriptionsebene) war besonders wichtig. Bei der RT-PCR kamen verschiedene Primerpaare zum Einsatz. Neben nur auf Exon 3 gelegenen Primerpaaren, wie 1995 von Slominski (et al.) beschrieben, sollten auch Primerpaare verwendet werden, die Intron B (Primer aus Exon 2 und 3) übergriffen (Can et al. 1998). Zur Bestimmung von POMC-Derivaten (N-Ac- β _H-Endorphin, β _H-Endorphin und β _H-LPH) wurden bereits etablierte RIAs eingesetzt.

6.1.1 Charakteristika der verwendeten Zellen

Zur Versuchsdurchführung sollte eine Situation in vitro geschaffen werden, die Rückschlüsse auf die Situation in vivo zuließ.

Da die nativen Keratinozyten in der Zellkultur nur wenige Tage überlebensfähig waren und eine Vermehrung der Keratinozyten nicht unbegrenzt möglich war, mußten auf Grund der Größe der Versuchsansätze Zelllinien eingesetzt werden. Nur durch die Verwendung von Zelllinien konnten Zellen in ausreichenden Mengen für Stimulationsversuche mit Bestimmung der POMC-Derivate mittels RIA produziert werden.

6.1.1.1 Keratinozyten der Zelllinie HaCaT

Aufgrund der ähnlichen Wachstums- und Verhornungseigenschaften im Vergleich zu nativen Keratinozyten kam in der vorliegenden Arbeit die Zelllinie HaCaT zum Einsatz. Die Zelllinie HaCaT war durch spontane Transformation nativer, histologisch normaler, Keratinozyten aus dem Randbereich eines Melanoms an der oberen Hälfte des Rückens eines 62 Jahre alten Mannes entstanden. Die Keratinozyten waren nach einem bestimmten Schema mit veränderten Kulturmedien kultiviert worden. Die Zellen der Zelllinie HaCaT bildeten in vitro ein differenziertes epitheliales Gewebe und zeigten annähernd normale Wachstums- und Verhornungseigenschaften (Boukamp et al. 1988).

Im Vergleich zur Zelllinie HaCaT waren andere immortalisierte Keratinozyten-Zelllinien z.B. durch eine Infektion mit simian virus-40 (SV40), oder Transfektion mit seiner isolierten DNA produziert worden. Diese Keratinozyten-Zelllinien zeigten jedoch deutliche Unterschiede in der Differenzierung im Vergleich zu nativen Keratinozyten. Insbesondere fanden sich bei diesen Zelllinien andere Wachstums- und Verhornungseigenschaften und erneut auftretende charakteristische Eigenschaften fötaler Zellen.

Die vergleichsweise hohe Ähnlichkeit der Zellen der Zelllinie HaCaT zu nativen Keratinozyten war der Grund für die Verwendung dieser Zelllinie.

6.1.1.2 Melanomzellen der Zelllinie Colo 679

In der Literatur ist das Vorkommen von POMC-Derivaten auch in malignen Melanomen beschrieben (Nagahama et al. 1998).

Die Melanom-Zelllinie Colo 679 war 1985 etabliert worden. Sie entstand aus Zellen einer Weichteilmetastase eines malignen Melanoms einer 47 Jahre alten Frau.

Diese Zelllinie zeigte adhärenzte fibroblastische Eigenschaften, war aber nicht an ein Wachstum als Monolayer gebunden.

Da zwischen den verschiedenen Melanom-Zelllinien starke Unterschiede bestehen, können durchaus auch die Befunde bezüglich einer Expression des POMC-Gens und der POMC-Derivat-Produktion zwischen den verschiedenen Melanom-Zelllinien variieren. Es ist möglich, daß die Zelllinie Colo 679 die Fähigkeit zur Expression des hypophysären POMC-Gens und zur Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten bei der Transformierung von einer nativen Zelle in eine Zelllinie verloren hat.

6.1.2 Zellkultur und Kulturmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturen mit den beschriebenen Medien kultiviert. Die Kultivierung erfolgte unter standardisierten Bedingungen. In der Literatur ist eine Abhängigkeit der POMC-Derivat Produktion in Hautzellen von den verwendeten Kulturmedien beschrieben (Wintzen und Zanello 2000). Es kann also durchaus unterschiedliche Ergebnisse geben, wenn Modifikationen in den Kulturmedien vorgenommen werden. Über eine mögliche Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse kann allenfalls spekuliert werden.

6.1.3 Stimulation der Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Expression eines dermalen POMC-Gens in den Zellen mit CRH zu stimulieren.

Auch wenn unter basalen Bedingungen keine POMC-Gen-Expression und keine Synthese von POMC-Derivaten in den Hautzellen nachzuweisen wäre, könnte dies mit Stimulatoren erreicht werden, welche die Expression des hypophysären POMC-Gens und die Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate bewirken.

Das im Hypothalamus gebildete Polypeptidhormon CRH steuert in der Hypophyse die Expression des POMC-Gens und die Produktion und Freisetzung von POMC-Derivaten. In der Literatur ist die Stimulierung der POMC-Gen-Expression und die Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten in den Zellen der menschlichen Haut wie Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten mit CRH mehrfach beschrieben (Zouboulis 2000, 2004; Slominski et al. 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Stimulation der eingesetzten Zelllinien mit CRH versucht.

In der Nebennierenrinde steuert ACTH die Freisetzung von Glukokortikoiden. Glukokortikoide hemmen ihrerseits in der Hypophyse die Expression von POMC und damit die Synthese und Freisetzung von ACTH, β _H-Endorphin und anderer POMC-Derivate. Deshalb wurde das Glukokortikoid Dexamethason (20fache Glukokortikoid Aktivität im Vergleich zu Kortison) als potentieller Suppressor der Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC Derivaten aus den untersuchten Zellen ausgewählt.

Durch den Einsatz eines Gemischs aus CRH und Dexamethason wurde eine mögliche Wechselwirkung von potentiellm Stimulator und potentiellm Suppressor untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 3 Versuche mit der unter 4.2 beschriebenen Versuchsanordnung durchgeführt.

6.1.4 RT-PCR

Zum Nachweis oder Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens in den untersuchten Zelllinien musste zunächst die RNA aus den Zellen gewonnen werden. Die RNA-Extraktion erfolgte aus Zellen mit und ohne vorausgegangener Stimulation mit CRH nach der unter 4.3.1. beschriebenen standardisierten Methode. Zur Transkription von mRNA und anschließender Amplifizierung bestimmter transkribierter DNA-Abschnitte hat sich die RT-PCR in Medizin und Forschung etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Qiagen OneStep RT-PCR Kit verwendet. Alle für die reverse Transkription und die eigentliche PCR notwendigen Enzyme waren in diesem Kit enthalten und die Reaktionen liefen nacheinander im gleichen Reaktionsgefäß ab. Die beiden reversen Transkriptasen Omniscript™ und Sensiscript™ ermöglichten eine effiziente, fehlerfreie Transkription der RNA. Mit Hilfe der Taq-Polymerase (HotStar) erfolgte die Amplifizierung der cDNA. Die

Wahrscheinlichkeit des Einbaus eines falschen Nucleotids durch die Polymerasen lag bei ca. einer falschen Base je 9000 Nucleotiden.

Bei der Auswahl der Primer im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf geachtet nicht nur Primerpaare aus dem Bereich von Exon 3 zu wählen (Slominski et al. 1995), sondern auch Primerpaare aus Exon 2 und Exon 3 (Can et al. 1998).

Als Positivkontrolle für die Funktionstüchtigkeit der RT-PCR diente die aus einem kleinzelligen Bronchialcarcinom stammende Zelllinie DMS 79. Diese Zelllinie exprimiert erwiesenermaßen das hypophysäre POMC-Gen.

6.1.5 Verwertbarkeit der Zellysate und Zellüberstände bei unterschiedlicher Aufarbeitung

Zunächst wurde ein Verfahren entwickelt, um eine quantitative Bestimmung der POMC-Derivate in Zellkulturüberständen und Zellysaten der verwendeten Zelllinien zu ermöglichen.

Um weitere Enzymaktivitäten, und damit mögliche Veränderungen der POMC-Derivat-Konzentrationen zu verhindern, wurden die Zellüberstände nach Abnahme aus den Zellkulturen mit Enzymhemmercocktail versetzt und angesäuert. Nach einer Inkubation bei 4° C für 30 min wurden sie bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Nach Ablösen der Zellen aus der Kulturschale mit EDTA-Trypsin-Lösung wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen mit dem Enzymhemmercocktail vermischt und 30 Minuten bei 4° C inkubiert, um weitere Enzymaktivität zu verhindern. Danach wurde die Zellsuspension eingefroren. Nach Wiederauftauen der Zellen wurden sie für 30 Sekunden im Ultraschallbad bei 4° C behandelt, um die Zellen weiter zu zerstören. Anschließend wurden die Zellysate mit 2500 µl 0,005 N HCl angesäuert.

Vor Testung der Zellkulturüberstände und der Zellen im RIA erfolgte eine Extraktion.

Um einen eventuellen Peptidverlust durch die Extraktion erfassen zu können, wurden Standardextraktionswerte mitbestimmt.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die messbare Peptidkonzentration wurde durch flankierende Untersuchungen, bei denen Standardkurven bei verschiedenen pH Werten erstellt wurden, untersucht. Es zeigte sich dabei kein Einfluß des pH-Wertes (zwischen pH 4 und pH 9) auf die nachweisbare Peptidkonzentration.

6.1.6 Herstellung polyklonaler Antiseren aus Kaninchen

Zur Gewinnung von polyklonalen Antiseren gegen bestimmte Aminosäuresequenzen der POMC-Derivate wurde Kaninchen KLH-CDI gekoppeltes Antigen injiziert. Durch diese Art der Immunisierung erhielt man ein Antiserum mit polyklonalen Antikörpern. Es lagen also keine spezifisch gegen ein Epitop des jeweiligen Antigens gerichteten Antikörper vor sondern eine Mischung von verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope des jeweiligen Antigens. Diese unspezifischen Antikörper zeigten deshalb auch kein einheitliches Bindungsverhalten.

Beim Einsatz dieser unspezifischen Antiseren in one-site-fluid-phase RIAs ließ sich also nur eine Aussage über die Menge der immunoreaktiven Äquivalente (immunoreaktives Material) treffen. Die Menge der zu bestimmenden spezifischen POMC-Derivate konnte mithilfe des one-site-fluid-phase RIAs nicht gemessen werden.

Es ist hier von Bedeutung, ob die Antikörper axial (d.h. vom Ende her) an das Peptid binden oder sich lateral an die entsprechenden Epitope (in der Regel kurze Aminosäuresequenzen) anlagern. Binden sich die Antikörper axial an die Epitope, so steigt die Wahrscheinlichkeit, daß sie das spezifische POMC-Derivat gegen das sie gerichtet sind erkennen. Bei einer seitlichen Anlagerung erkennen die Antikörper auch andere POMC-Derivate mit ganz unterschiedlicher Sequenzlänge, wenn sie nur die gleiche Epitopsequenz beinhalten.

Am wenigsten spezifisch ist also ein polyklonales Antiserum mit lediglich lateral bindenden Antikörpern. Axial bindende Antikörper in polyklonalen Antiseren sind zwar etwas spezifischer; das Antiserum kann jedoch Antikörper, die an andere Epitope des Peptids binden, enthalten, was die Spezifität wieder relativiert.

Um im Serum befindliche Störfaktoren zu entfernen, und um die Antikörper konzentriert in definierter Menge im RIA einsetzen zu können, muß eine Reinigung des Antiserums erfolgen. Hierzu bietet sich das Protein A-Sepharose-Verfahren an.

Diese Reinigung der Antiseren und ihre weitere Charakterisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Nachdem in den durchgeführten Versuchen mit bereits etablierten RIAs (Antikörper 84E, 93E) keine hypophysären POMC-Derivate nachgewiesen werden konnten – dieses Ergebnis wurde im Rahmen weiterer Untersuchungen bestätigt (Wagner, Dissertation 2005, Hain, Dissertation 2005) – schien der Einsatz weiterer im Rahmen dieser Arbeit hergestellter Antikörper gegen

hypophysäre POMC-Derivate nicht sinnvoll. Die gewonnenen polyklonalen Antiseren standen für die Etablierung neuer RIAs zur Verfügung.

6.1.7 Herstellung monoklonaler Antikörper aus Mäusen

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Aminosäuresequenzen der POMC-Derivate wurden Mäuse mit einem mit CDI an KLH gekoppeltem Antigen immunisiert.

Anhand der Ergebnisse des Dot Blot-Testes wurde eine Maus ausgewählt, in deren Blut die gewünschten Antikörper nachgewiesen werden konnten. Nach Zellfusion der Lymphozyten aus der Milz der Maus mit Myelomzellen und der anschließenden Testung der fusionierten Zellen im ELISA wurden positive Klone ausgewählt und in die 10er Klonierung überführt.

Mit Hilfe von ELISA Tests wurden auf jeder Klonierungsstufe Klone ausgewählt, die die gewünschten Antikörper produzierten. Diese Klone wurden anschließend in die nächste Klonierungsstufe überführt.

Monoklonale Antikörper haben den Vorteil, daß sie sich nur gegen ein einziges Epitop eines Antigens richten. Diese Antikörper zeigen ein einheitliches Bindungsverhalten an das betreffende Epitop.

Werden diese hochspezifischen Antikörper in einem unspezifischen One-site-RIA eingesetzt, so liefert die betreffende Methode, z.B. im RIA oder im ELISA, dennoch kein spezifisches Ergebnis, da der monoklonale Antikörper an ein Epitop binden kann, das in vielen Peptiden enthalten ist. Um verlässlich ein Peptid, z.B. ein bestimmtes hypophysäres POMC-Derivat nachzuweisen zu können, benötigt man ein Testverfahren, bei dem 2 verschiedene Antikörper eingesetzt werden, von denen einer an das N-terminale und der andere an das C-terminale Epitop bindet.

Zwei derartige Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit in einem two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA eingesetzt. Das Peptid - β_{H} -Endorphin (1-31), das mit diesem two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA bestimmt wurde, trug die entsprechenden Epitope am N- und am C-Terminus. Die Kreuzreaktivität mit anderen Peptiden war nachgewiesenermaßen praktisch gleich Null. Der hier eingesetzte two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA erwies sich somit als hochspezifisch.

Wie beschrieben, konnte bei der Testung der Extrakte aus den durchgeführten Stimulationsversuchen mit dem two-site-fluid-phase-immunoprecipitation-RIA kein hypophysäres POMC-Derivat, nämlich β_{H} -Endorphin, nachgewiesen werden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Bereitstellung polyklonaler Antiseren

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, polyklonale Antiseren herzustellen, deren Antikörper gegen das acetylierte N-terminale Fragment von γ_{H} -MSH (FR 3b: Ac-N-[Tyr⁵] γ_{H} -MSH (1-5)), gegen das acetylierte N-terminale Fragment des Joining Peptide_H (FR 4b: Ac-N-[Tyr⁵] JP_H (1-5)), gegen das C-terminale Fragment von α_{H} -MSH (FR 6: [Tyr⁹] α_{H} -MSH (9-13)), gegen das acetylierte N-terminale Fragment von CLIP_H (FR 7b: Ac-N-CLIP_H (1-5)), sowie gegen das C-terminale Fragment von CLIP_H (FR 8: [Tyr¹⁸] CLIP_H (18-22)) gerichtet waren.

Nachdem jedoch bereits mit Hilfe von etablierten RIAs (Antikörper 27P, 84E, 93E) keine hypophysären POMC-Derivate in den Zellen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 nachgewiesen werden konnten, wurden die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antiseren gegen hypophysäre POMC-Derivate nicht weiter charakterisiert und neue RIAs damit hergestellt. Die gewonnenen polyklonalen Antiseren standen für die spätere Etablierung weiterer RIAs zur Verfügung.

6.2.2 Hinweis auf methodische Lücken bei der Herstellung monoklonaler Antikörper

Wie unter 5.2.1.2.1 beschrieben richtete sich der im Rahmen dieser Arbeit gewonnene Antikörper nicht wie gewünscht gegen die Aminosäuresequenz des N-terminalen Fragmentes von γ_{H} -MSH (FR 3a: [Tyr⁵] γ_{H} -MSH (1-5)).

Offenbar handelte es sich um einen Antikörper, der gegen eine Molekularstruktur gerichtet war, die sowohl BDB in seiner an BSA gekoppelten Form, als auch nicht gekoppeltes KLH gemeinsam hatten. Durch Kopplung von BDB und BSA entsteht vermutlich eine Struktur, die Ähnlichkeiten mit einer Teilstruktur von KLH hat.

Es ist üblich, das eigentliche Immunogen, gegen das Antikörper gebildet werden sollen (die dann über die verschiedenen Klonierungsstufen isoliert und gezüchtet werden) für die Elisa-Tests nicht mittels desjenigen Kopplers (CDI) an dasjenige Protein (KLH) zu koppeln, wie sie zur Herstellung des Kopplungsproduktes für die Immunisierung (FR3a-CDI-KLH) verwendet worden waren, sondern mit einem anderen Koppler (BDB) an ein anderes Protein (BSA). Wie jedoch das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, ist die Verwendung unterschiedlicher Kopplungsmethoden zur Immunisierung der Mäuse und zur Testung der Antikörper anscheinend kein ausreichender Schutz, um die Klonierung von Antikörpern zu verhindern, die gegen das Protein des immunisierenden Kopplungsproduktes gerichtet sind. Durch Kopplung von BDB und BSA entstehen offenbar Strukturen, die Ähnlichkeiten mit Bestandteilen von KLH haben.

Bei künftigen Versuchen, monoklonale Antikörper herzustellen, muß also sehr darauf geachtet werden, ob der produzierte Antikörper auch tatsächlich gegen das Hapten gerichtet ist.

6.2.3 Hinweis auf die essentielle Funktion von β_H -LPH in bestimmten Zellen

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen monoklonalen Antikörper, der sich gegen das N-terminale Fragment von β_H -LPH (FR 9a: [Tyr⁵] β_H -LPH (1-5)) richtete, kam es in der 0,1er Klonierungsstufe zunächst zu einem normalen Wachstum, dann starben die Zellen aus nicht bekannten Gründen ab, oder stellten die Antikörperproduktion ein.

Beides spricht dafür, daß der nachgewiesene Antikörper gegen eine Struktur gerichtet war, die für die Funktion der Zellen essentiell ist. Derivate des Proopiomelanocortins könnten demnach maßgeblich an essentiellen Steuerfunktionen der Zelle beteiligt sein. Ihr Verlust, in diesem Fall durch die Bindung an den Antikörper gegen FR 9a, führt das Absterben der Zelle herbei. Anscheinend kann die Zelle jedoch auch die gegenteilige Option wahrnehmen: Sie stellt die Produktion des Antikörpers ein.

Weiterführende Untersuchungen müssen klären, welcher Art diese Steuerungsfunktionen der POMC-Derivate in der Zelle sind.

Bei zukünftigen Versuchen, monoklonale Antikörper gegen Derivate des POMC zu produzieren, muß man darauf gefasst sein, daß die gebildeten Antikörper zum Absterben der produzierenden Lymphozyten führen könnten.

Richten sich die gewünschten Antikörper gegen POMC-Derivate, die essentiell für die Steuerungsfunktionen in den Lymphozyten sind, wird es nicht gelingen, diese Antikörper in ausreichenden Mengen zu produzieren, um sie in RIAs einzusetzen. In wieweit andere Zellen zur Produktion dieser Antikörper herangezogen werden könnten, müsste geklärt werden. Dies kann aber erst gelingen, wenn uns mehr Informationen über die grundlegenden Funktionen von POMC-Derivaten in den unterschiedlichen Zelltypen vorliegen.

6.2.4 Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens in den untersuchten Hautzellen

In einer Reihe von Veröffentlichungen wurde die Expression des hypophysären POMC-Gens in den Zellen der menschlichen Haut beschrieben (Schauer et al 1994, Slominski et al. 1995, Wintzen et al. 1996, Chakraborty et al. 1996, Wakamatsu et al. 1997, Teofoli et al. 1997). Diese Befunde entstanden teils mittels Northern Blot Analyse mit Hilfe von Sonden aus dem Exon 3 des POMC-Gens, teils mittels RT-PCR unter Einsatz von Primerpaaren aus dem Exon 3 des POMC-Gens. Wurden in RT-PCR-Versuchen dagegen Primer aus dem Bereich Exon 2 oder auch Exon 1 in Kombination mit Primern aus Exon 3 eingesetzt, konnte die Expression des hypophysären POMC-Gens (in Zellen der Haut der Maus) nicht nachgewiesen werden (Ermak und Slominski 1997).

Can (et al. 1998) beschrieben erstmals den Nachweis einer aberranten POMC mRNA in menschlichen Keratinozyten und Melanozyten in RT-PCR-Versuchen mit Hilfe von Primerpaaren aus Exon 2 und 3, (d.h. Intron B übergreifenden Primern). Eine Sequenzanalyse dieses RT-PCR Produktes zeigte eine Übereinstimmung von ca. 85 % im Vergleich zur entsprechenden Nucleotidsequenz aus dem POMC-Gen der menschlichen Hypophyse. Dieser Befund wurde von Ancans et al. (1999) angegriffen. Er bezeichnete die von der Gruppe um Farooqui (Can et al. 1998) gefundene mRNA als eine Kontamination der Proben, da die veränderten 28 Basenpaare und die daraus resultierende Nucleotidsequenz derjenigen des POMC-Gens der Maus entsprach. Dieser Einwand wurde wiederum von der Farooqui-

Gruppe fundiert wiederlegt (Farooqui, 1999). Bislang wurden keine weiteren Arbeiten veröffentlicht, die zu einer Klärung dieser diskrepanten Befunde führen könnten. Weiterhin unklar ist, ob tatsächlich eine oder mehrere Varianten des hypophysären POMC-Gens in der Haut existieren und ob Varianten der hypophysären POMC-Derivate gebildet und freigesetzt werden oder eine Weiterprozessierung dieser Derivate in der Haut erfolgt. Es wird jedenfalls erwogen, daß gewebespezifische POMC-Varianten existieren könnten, deren Länge sich vom 1100 bp langen POMC Transkript der Hypophyse unterscheidet. Dabei werden von verschiedenen Untersuchern sowohl längere als auch kürzere Sequenzen beschrieben (Autelitano et al. 1989, Schauer et al. 1994, Farooqui et al. 1995, Chakraborty et al. 1996, Slominski et al. 2000). Dem Translationsprodukt des häufig in der Peripherie beschriebenen kleineren Transkriptes (etwa 800 – 900 bp) fehlt das Signalpeptid (Clark et al. 1989, DeBold et al. 1988).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Versuchen mit den Primerpaaren HPO 10 / HPO 13, HPO 10 / EXO 21 und HPO 1 / HPO 2 konnte eine Transkription des hypophysären POMC-Gens unter Basalbedingungen und nach Stimulation mit CRH in Keratinozyten der Zelllinie HaCaT und in Melanomzellen der Zelllinie Colo 679 nicht nachgewiesen werden. Dies schließt allerdings die Expression eines nicht-hypophysären („aberranten“) POMC-Gens nicht aus; andererseits konnte auch kein Hinweis darauf aus den RT-PCR-Befunden abgeleitet werden.

In der Positivkontrolle (DMS 79-Zellen) konnte die Expression des hypophysären POMC-Gens zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die korrekte Durchführung der RT-PCR und die richtige Auswahl der Primerpaare konnte damit belegt werden.

Zu erwähnen ist nun allerdings, daß den meisten oben erwähnten Veröffentlichungen zu diesem Thema Untersuchungen mit nativen Keratinozyten und Melanozyten zu Grunde liegen. Aufgrund des enormen Bedarfs an Zellen für die Versuchsansätze im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch Zelllinien (Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und Melanom-Zelllinie Colo 679) eingesetzt und keine nativen Keratinozyten oder Melanozyten. Prinzipiell scheint möglich, daß die Zelllinien HaCaT und Colo 679 die Fähigkeit zur Expression des hypophysären oder eines nicht-hypophysären POMC-Gens und zur Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten bei der Transformierung von nativen Zellen in Zelllinien verloren hatten.

Auch die starken Unterschiede zwischen verschiedenen Melanom-Zelllinien könnten durchaus die negativen Befunde bezüglich einer Expression des POMC-Gens und POMC-Derivat-Produktion im Rahmen dieser Arbeit erklären.

Es besteht auch die Möglichkeit, daß die eingesetzten Zelllinien HaCaT und Colo 679 prinzipiell die Möglichkeit der Transkription des hypophysären POMC-Gens besitzen, jedoch nicht unter den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kulturbedingungen.

Dies scheint durchaus möglich im Hinblick auf Berichte, nach denen die Expression des POMC-Gens in den Zellen der menschlichen Haut unter speziellen Bedingungen wie UV-Bestrahlung oder Stimulation mit CRH und Interleukin 1 verstärkt wurde (Schauer et al. 1994, Wintzen et al. 1996, Chakraborty et al. 1996, Zouboulis 2000, 2004; Slominski et al. 2004). Auch die Auswahl des Kulturmediums kann offenbar einen Einfluß auf die POMC-Genexpression haben; so konnte im Rahmen einer Studie die Expression des POMC-Gens nur in nährstoffarmen und Calciumarmen Kulturmedien nachgewiesen werden (Wintzen et al. 2000).

Die Ergebnisse orientierender Untersuchungen, bei denen die Primerpaare HPO 10 / HPO 13 und HPO 10 / EXO 21 in RT-PCR-Versuchen mit RNA-Extrakten aus nativen Keratinozyten eingesetzt wurden, erwiesen sich mit den geschilderten Befunden an den HaCaT- und Colo 679-Zellen kompatibel: Es war ebenfalls kein Nachweis einer Expression des hypophysären POMC-Gens unter Basalbedingungen sowie unter Stimulation mit CRH oder auch UV-Bestrahlung zu erbringen (siehe Tabelle 6.1).

Zur Bewertung dieser Ergebnisse muß auch der Herkunftsort der hier verwendeten nativen Keratinozyten berücksichtigt werden (aus der menschlichen Vorhaut). In unterschiedlichen Hautregionen könnten die Ergebnisse durchaus von den hier vorliegenden Ergebnissen abweichen. Am menschlichen Körper finden sich sehr unterschiedliche Hautregionen. Es gibt sonnenexponierte Körperregionen und Regionen an der die Haut üblicherweise nicht direkter Sonnenbestrahlung ausgesetzt wird. Auch die Dicke der Epidermis variiert. Es ist also anzunehmen, daß auch regionale Unterschiede in der Biochemie der Haut bestehen. Befunde, die an Keratinozyten einer Körperregion erhoben werden können, müssen nicht zwangsläufig identisch mit Befunden an einer anderen Körperregion sein (Rees 2003).

Primerpaare		HPO 10 HPO 13	HPO 10 EXO 21	
Aus der Basensequenz des menschlichen hypophysären POMC-Gens abgeleitete Nucleotidsequenzlänge (Anzahl Basenpaare) (Takahashi et al 1983)		353	813	
Experiment Nummer	Experimentelle Bedingungen	Mit RT-PCR gefundene Nucleotidsequenzen (Anzahl Basenpaare)		
1	Native Keratinozyten	Kontrolle	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+/-: B.: ca. 350	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+: B.: ca. 500
	Native Keratinozyten	Stimulations-Kontrolle	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+/-: B.: ca. 350	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+: B.: ca. 500
	Native Keratinozyten	CRH (10 ⁻⁸ M)	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+/-: B.: ca. 350	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+: B.: ca. 500
	Native Keratinozyten	UVB		<i>Diff. Ampl.;</i> RT+: B.: ca. 500
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+: B.: ca. 350	RT+: B.: ca. 500 RT+: B.: ca. 800
2	Native Keratinozyten	Stimulations-Kontrolle	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+/-: B.: ca. 350	
	Native Keratinozyten	CRH (10 ⁻⁸ M)	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+/-: B.: ca. 350	
	Native Keratinozyten	Kontrolle	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+/-: B.: ca. 350	
	Native Keratinozyten	Kontrolle	<i>Diff. Ampl.;</i> RT+/-: B.: ca. 350	
	DMS 79-Zellen	Positivkontrolle	RT+: B.: ca. 350	

Tab. 6.1 *Übersichtstabelle der RT-PCR-Ergebnisse aus 2 Experimenten zur Prüfung nativer Keratinozyten auf die Transkription des menschlichen hypophysären POMC-Gens unter Verwendung der Primerpaare HPO10/HPO13 und HPO10/EXO21*

Diff. Ampl.: diffuse Amplifikate; B.: Bande; RT+: Reverse Transkription; RT-: keine Reverse Transkription

Eine Aussage über ein mögliches aberrantes POMC-Gen der Haut kann anhand der vorliegenden Untersuchungen mit RT-PCR nicht getroffen werden. Die positiven Ergebnisse bei der POMC-Derivat-Bestimmung auf der Post-Translationsebene in Kombination mit den Ergebnissen der RT-PCR sprechen aber für ein Vorhandensein eines aberranten POMC-Gens in der Haut.

6.2.5 Untersuchungen zur Bildung und Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate

Die Bildung und Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate in der Haut des Menschen wird in der Literatur vielfach beschrieben. So berichten erstmalig Thody et al. (1983) über den Nachweis von α -MSH in menschlicher Haut. Später wurden weitere POMC-Derivate wie ACTH, β -Endorphin und β -LPH in der menschlichen Haut in Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten (Schauer et al. 1994, Wintzen et al. 1995, Chakraborty et al. 1996, Farooqui et al. 1996, Wakamatsu et al. 1997, Nagahama et al. 1998, Slominski et al. 1998, Zanello et al. 1999, Elliot et al. 2004) nachgewiesen. Die Bildung und Freisetzung der POMC-Derivate in den Zellen der menschlichen Haut konnte mit Stimulation durch CRH (Zouboulis 2000, 2004; Slominski et al. 2004), Interleukin 1 und UV-Bestrahlung (Schauer et al. 1994, Chakraborty et al. 1996, Wintzen et al. 1996) gesteigert werden.

In Anlehnung an diese Befunde wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten [β_{H} -Endorphin (1-31), β_{H} -Endorphin-IRM, β_{H} -LPH-IRM und N-Ac- β_{H} -Endorphin-IRM,] in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und in der Melanom-Zelllinie Colo 679 nachzuweisen.

6.2.5.1 Ausschluß der Bildung der Bildung und Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate [β_{H} -Endorphin (1-31), β_{H} -Endorphin-IRM, β_{H} -LPH-IRM]

Unter Basalbedingungen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Bildung und Freisetzung der POMC-Derivate β_{H} -Endorphin (1-31), β_{H} -Endorphin-IRM und β_{H} -LPH-IRM in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und in der Melanom-Zelllinie Colo 679 nicht nachgewiesen werden.

Auch die Zugabe des potentiellen Stimulators CRH (10^{-8} M) und des potentiellen Suppressors Dexamethason (10^{-6} M) zu den HaCaT- und Colo 679-Zellkulturen führte in den vorliegenden Versuchen nicht zur Bildung und Freisetzung (bzw. zu deren Repression) der genannten POMC-Derivate. Bei den drei in identischer Weise durchgeführten Versuchen lagen alle im RIA gemessenen Werte innerhalb der doppelten Standardabweichung der B_0 -Werte.

Im Rahmen einer orientierenden Testung wurden den Zellen der HaCaT- und Colo 679-Zellkulturen zur potentiellen Stimulation AVP (10^{-6} M), ein Gemisch von AVP (10^{-6} M) und CRH (10^{-8} M), Histamin (10^{-5} M), sowie 5 pg Interleukin 1α (Il1 α) pro 5 ml Zellkulturüberstand zugegeben.

Diese Stimulierung erfolgte analog zur Stimulierung mit CRH wie unter 4.2.1 beschrieben. In diesen jeweils einmal durchgeführten Versuchen konnte ebenfalls kein β_H -Endorphin (1-31), β_H -Endorphin-IRM und β_H -LPH-IRM in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten von HaCaT- und Colo 679-Zellkulturen nachgewiesen werden.

Ebenfalls zur orientierenden Testung wurden die Zellen der HaCaT- und Colo 679-Zellkulturen mit 10 mJ UV-Licht bestrahlt und gleichzeitig versucht, eine Modulation der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten durch Zugabe von CRH (10^{-8} M), Dexamethason (10^{-6} M), Histamin (10^{-5} M) und 5 pg Interleukin 1α (Il1 α) pro 5 ml Zellkulturüberstand zu erreichen. Nach 24 Stunden wurden der Zellkulturüberstand und die Zellen in der üblichen Weise aufgearbeitet und in RIAs getestet. Auch in diesen jeweils einmal durchgeführten Versuchen konnte in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten von HaCaT- und Colo 679-Zellkulturen kein β_H -Endorphin (1-31), β_H -Endorphin-IRM und β_H -LPH-IRM nachgewiesen werden.

Da für diese Versuche keine ausreichenden Mengen an native Keratinozyten zur Verfügung standen, konnten die nativen Keratinozyten nicht in ähnlicher Weise untersucht werden.

6.2.5.2 Hinweis auf die Bildung und Freisetzung eines POMC-Derivates [N-Ac-β_H-Endorphin] aus dem Translationsprodukt eines nicht-hypophysären POMC-Gens

Keratinocyten-Zelllinie HaCaT:

Bei Verwendung des RIA zum Nachweis von N-Acetyl-β-Endorphin-IRM lagen die im RIA gemessenen Werte von N-Acetyl-β-Endorphin-IRM in den Zellüberständen und Zelllysaten von HaCaT-Zellkulturen bei zwei von drei mit identischer Versuchsanordnung durchgeführten Versuchen innerhalb der doppelten Standardabweichung der B₀-Werte. In diesen beiden Versuchen konnte also in den Zellüberständen und Zelllysaten von HaCaT-Zellkulturen kein N-Acetyl-β_H-Endorphin-immunoreaktives Material nachgewiesen werden.

Bei dem dritten der drei Versuche dagegen lagen die gemessenen Werte sowohl bei den Zelllysaten als auch bei den Zellüberständen der HaCaT-Zellkulturen deutlich außerhalb der doppelten Standardabweichung der B₀-Werte. In diesem Stimulationsversuch gelang also der Nachweis von hypophysärem N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM in den Zelllysaten und Zellüberständen der HaCaT-Zellkulturen.

Eine Modulation der Bildung und Freisetzung von N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM durch Zugabe von CRH (10⁻⁸ M) und/oder Dexamethason (10⁻⁶ M) im Vergleich zu Basalbedingungen gelang jedoch nicht.

In Versuchen zur orientierenden Testung wurden den Zellen der HaCaT-Zellkulturen zur potentiellen Stimulation AVP (10⁻⁶ M), ein Gemisch von AVP (10⁻⁶ M) und CRH (10⁻⁸ M), Histamin (10⁻⁵ M), sowie 5 pg Interleukin 1α (Il1α) pro 5 ml Zellkulturüberstand zugegeben. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zur Versuchsdurchführung, bei der die Zellen mit CRH stimuliert wurden (siehe unter 4.2.1). Mit dem entsprechenden RIA konnte nach Zugabe von AVP und dem Gemisch von AVP und CRH zu den Zellen der Zelllinie HaCaT sowohl im Zellüberstand als auch im Zelllysate N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte unter Basalbedingungen und nach versuchter Stimulation lagen im gleichen Bereich. Eine Stimulierbarkeit der Bildung und Freisetzung von N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM konnte nicht nachgewiesen werden.

Im orientierenden Bestrahlungsversuch mit UV-Licht (10 mJ UVB/cm²) und nach Zugabe von CRH (10⁻⁸ M), Dexamethason (10⁻⁶ M), Histamin (10⁻⁵ M) und 5 pg

Interleukin 1 α (Il1 α) pro 5 ml Zellkulturüberstand, konnte in den Lysaten der HaCaT-Zellen ebenfalls N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden. Es fanden sich keine Unterschiede der gemessenen Werte zwischen den Basalbedingungen und nach versuchter Stimulation.

In den Zellüberständen der HaCaT-Zellkulturen gelang der Nachweis von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM im Rahmen dieser orientierenden Testung nicht.

Melanom-Zelllinie Colo 679:

In den Zellüberständen von Colo 679-Zellkulturen konnte weder unter basalen Bedingungen noch nach versuchter Stimulation N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden. Alle im RIA gemessenen Werte von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM in den Zellüberständen von Colo 679-Zellkulturen lagen innerhalb der doppelten Standardabweichung der B₀-Werte.

Dagegen lagen bei zwei von drei mit identischer Versuchsanordnung durchgeführten Versuchen die im RIA gemessenen Werte von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM in den Lysaten von Colo 679-Zellkulturen außerhalb der doppelten Standardabweichung der B₀-Werte. In diesen Versuchen konnte also bei Colo 679-Zellen die Bildung von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den Basalbedingungen und nach Zugabe von CRH (10⁻⁸ M) und / oder Dexamethason (10⁻⁶ M) fanden sich nicht.

Nur bei einem der drei Versuche gelang der Nachweis von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM in den Lysaten von Colo 679-Zellen nicht: Die gemessenen Werte lagen innerhalb der doppelten Standardabweichung der B₀-Werte.

Im Rahmen von Versuchen zur orientierenden Testung wurden den Zellen der Colo 679-Zellkulturen AVP (10⁻⁶ M), ein Gemisch von AVP (10⁻⁶ M) und CRH (10⁻⁸ M), Histamin (10⁻⁵ M), sowie 5 pg Interleukin 1 α (Il1 α) pro 5 ml Zellkulturüberstand zugegeben. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zur Versuchsdurchführung, bei der die Zellen mit CRH stimuliert wurden (siehe unter 4.2.1). Wiederum konnte im entsprechenden RIA in diesen Versuchen im Zelllysat N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte unter Basalbedingungen und nach

versuchter Stimulation lagen im gleichen Bereich. Eine Stimulierbarkeit der Bildung und Freisetzung von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM konnte nicht nachgewiesen werden. Im orientierenden Bestrahlungsversuch mit UV-Licht (10 mJ UVB/cm²) und nach Zugabe von CRH (10⁻⁸ M), Dexamethason (10⁻⁶ M), Histamin (10⁻⁵ M) und 5 pg Interleukin 1 α (Il1 α) pro 5 ml Zellkulturüberstand, konnte auch in den Lysaten der Colo 679-Zellen N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM nachgewiesen werden. Es fanden sich auch hier keine Unterschiede der gemessenen Werte zwischen den Basalbedingungen und nach versuchter Stimulation.

In den Zellüberständen der Colo 679-Zellkulturen gelang der Nachweis von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM nicht.

6.2.5.3 Einordnung der Befunde

Die Expression des hypophysären POMC-Gens in Zellen der menschlichen Haut konnte, entgegen den in der Literatur vielfach publizierten Befunden, im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Zu betonen ist dabei, daß viele Arbeitsgruppen ihre Befunde mit den gleichen Primerpaaren erhoben hatten und es sich damit nicht um viele unabhängig voneinander erhobene Befunde handelte.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse widersprechen der Hypothese, daß in der menschlichen Haut das hypophysäre POMC-Gen transkribiert wird – zumindest unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit.

Nach Can et al. (1998) wäre dagegen ein „aberrantes“ POMC-Gen in der menschlichen Haut denkbar. Dieses würde durch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen RT-PCR-Befunde in der Tat nicht ausgeschlossen werden: Mit den in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten hypophysären Primern könnte eine „aberrante“ POMC-cDNA nicht nachgewiesen werden, wenn die verwendeten hypophysären Primer zufällig auf eine „aberrante“ Nucleotidsequenz stoßen. Es ist dagegen denkbar, daß die zu positiven Befunden führenden Primer (Slominski et al. 1995) eben zufälligerweise eine Nucleotidsequenz erkennen, die das hypophysäre und das postulierte „aberrante“ POMC-Gen der Haut gemeinsam haben.

Die hier vorgestellten positiven Befunde zum Nachweis von N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanozyten-Zelllinie Colo 679 stützen die Hypothese eines nicht-hypophysären, „aberranten“ POMC-Gens.

Einerseits konnten mit den hier verwendeten Antikörpern gegen hypophysäres β_H -Endorphin (1-31), hypophysäres β_H -Endorphin-IRM und hypophysäres β_H -LPH-IRM keine hypophysären POMC-Derivate nachgewiesen werden, andererseits gelang in einigen Fällen der Nachweis von N-Ac- β_H -Endorphin-IRM in den untersuchten Zelllinien. Trifft ein Antikörper, der gegen eine Aminosäuresequenz des hypophysären POMC-Proteins gerichtet ist, auf die „aberrante“ Aminosäuresequenz eines POMC-Proteins, welches das Translationsprodukt des angenommenen „aberranten“ POMC-Gens ist, so kann er nicht binden – der Nachweis des hypophysären POMC-Derivats bleibt also aus. Stimmt dagegen die Aminosäuresequenz des hypophysären POMC-Derivates, gegen die der Antikörper gerichtet ist, mit der des Post-Translationsprodukts des „aberranten“ POMC-Gens überein, so kann er binden – das POMC-Derivat kann nachgewiesen werden.

Die Kombination dieser positiven und negativen Befunde ist am ehesten mit der Existenz des postulierten „aberranten“ POMC-Gens in der menschlichen Haut zu erklären.

Auch die Kombination negativer RT-PCR-Befunde und positiver RIA-Befunde ist mit der Expression eines nicht-hypophysären POMC-Gens in den Hautzellen kompatibel: Ist keine mRNA des hypophysären POMC-Gens in den Hautzellen nachweisbar, so dürften auch keine Post-Translationsprodukte eines hypophysären POMC-Gens nachweisbar sein. Wenn dagegen, trotz des fehlenden Nachweises der hypophysären POMC-mRNA, POMC-Derivate nachgewiesen werden können, unterstützt dieser Befund die Annahme eines „aberranten“ POMC-Gens in der Haut des Menschen.

7. Zusammenfassung

Es liegen viele Informationen über die Expression des hypophysären POMC-Gens und die Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten in der Hypophyse des Menschen vor. Psychische und physische Belastungen („Stress“) scheinen bei der Bildung und Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate eine große Rolle zu spielen.

Die in der aktuellen Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Expression eines POMC-Gens in der Haut führten noch nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Einige Autoren beschrieben die Expression des hypophysären POMC-Gens und die Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten in den Zellen der menschlichen Haut. Neuerdings wird allerdings auch ein POMC-Gen in menschlichen Hautzellen postuliert, daß sich vom POMC-Gen der Hypophyse unterscheidet („aberrantes“ POMC-Gen).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Versuche durchgeführt, die einen Beitrag zur Klärung der kontroversen Datenlage bezüglich der Expression des hypophysären oder eines aberranten POMC-Gens und der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten im Organsystem Haut leisten sollten.

Auf der Transkriptionsebene sollte mittels RT-PCR hypophysäre POMC-mRNA in Zellen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

Auf der Post-Translationsebene wurde versucht, hypophysäre POMC-Derivate in Zellen und Zellkulturüberständen der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 mittels RIAs nachzuweisen oder auszuschließen. Hierzu sollten auch polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper gegen hypophysäre POMC-Derivate produziert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antiseren mit Antikörpern gegen hypophysäre POMC-Derivate wurden für Folgeprojekte bereitgestellt. Es gelang, Antiseren gegen das acetylierte N-terminale Fragment von γ _H-MSH (FR 3b: Ac-N-[Tyr⁵] γ _H-MSH (1-5)), gegen das acetylierte N-terminale Fragment des Joining Peptide_H (FR 4b: Ac-N-[Tyr⁵] JP_H (1-5)), gegen das C-terminale Fragment von α _H-MSH (FR 6: [Tyr⁹] α _H-MSH (9-13)), gegen das acetylierte N-terminale Fragment von

CLIP_H (FR 7b: Ac-N-CLIP_H (1-5)), sowie gegen das C-terminale Fragment von CLIP_H (FR 8: [Tyr¹⁸] CLIP_H (18-22)) zu produzieren.

Im Rahmen der Produktion eines monoklonalen Antikörpers gegen das N-terminale Fragment von γ _H-MSH (FR 3a: [Tyr⁵] γ _H-MSH (1-5)) konnten Hinweise auf methodische Lücken bei der Herstellung monoklonaler Antikörper aufgezeigt werden. So richtete sich der gewonnene Antikörper gegen eine Molekularstruktur, die sowohl BDB in seiner an BSA gekoppelten Form als auch nicht gekoppeltes KLH gemeinsam hatten. Da durch die Kopplung von BDB und BSA vermutlich eine Struktur entsteht, die Ähnlichkeiten mit einer Teilstruktur von KLH hat, besteht offenbar (auch bei Kopplung des Antigens an unterschiedliche Proteine mit unterschiedlichen Kopplern bei Herstellung von Kopplungsprodukten zur Immunisierung einerseits und zur Testung andererseits), die Gefahr, daß Antikörper gegen das Trägerprotein des Kopplungsprodukts zur Immunisierung fälschlicherweise als Antikörper gegen das Hapten (das Peptid, gegen das monoklonale Antikörper hergestellt werden sollen) interpretiert werden.

Bei der Herstellung des spezifischen Antikörpers gegen das N-terminale Fragment von β _H-LPH (FR 9a: [Tyr⁵] β _H-LPH (1-5)), im Rahmen dieser Arbeit, kam es auf der 0,1er Klonierungsstufe, nach zunächst normalem Wachstum, zu einem Absterben der Zellen oder zu einem Ausbleiben der Antikörperproduktion.

Beides spricht dafür, daß der nachgewiesene Antikörper gegen ein Peptid gerichtet war, das für die Funktion der Zellen essentiell ist. Das liefert Hinweise darauf, daß Derivate des Proopiomelanocortins maßgeblich an essentiellen Steuerfunktionen bestimmter Zellen beteiligt sind. Der Verlust dieser POMC-Derivate, in diesem Falle das N-terminale β _H-LPH-Fragment, durch die Bindung an spezifische Antikörper, führt das Absterben der Zelle herbei. Jedoch kann die Zelle anscheinend auch die gegenteilige Option wahrnehmen und die Produktion des Antikörpers einstellen.

Es sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die Art und Weise dieser Steuerungsfunktionen der POMC-Derivate in der Zelle abzuklären.

In unserer Versuchserie konnten wir keine Transkription des hypophysären POMC-Gens in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679, unter Basalbedingungen oder nach versuchter Stimulation mit CRH (10⁻⁸ M), mittels RT-PCR-Versuchen mit den hier eingesetzten Primerpaaren nachweisen. Auch in

nativen Keratinozyten war in orientierenden Untersuchungen der Nachweis der Transkription des hypophysären POMC-Gens mittels RT-PCR-Versuchen mit den eingesetzten Primerpaaren nicht möglich.

In den hier vorgestellten Versuchen auf der Post-Translationsebene konnte mittels RIAs keine Bildung und Freisetzung von hypophysärem β_H -Endorphin (1-31), hypophysärem β_H -Endorphin-IRM und hypophysärem β_H -LPH-IRM in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Melanom-Zelllinie Colo 679 nachgewiesen werden. Weder unter Basalbedingungen, noch nach Zugabe des potentiellen Stimulators CRH (10^{-8} M) und/oder Zugabe des potentiellen Suppressors Dexamethason (10^{-6} M) waren die genannten POMC-Derivate nachweisbar.

In einem von drei Versuchen gelang der Nachweis der Bildung und Freisetzung von N-Ac- β_H -Endorphin-IRM in den Zellüberständen und Zelllysaten der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT. Eine Modulation der Bildung und Freisetzung von N-Ac- β_H -Endorphin-IRM durch Zugabe des potentiellen Stimulators CRH (10^{-8} M) und/oder Zugabe des potentiellen Suppressors Dexamethason (10^{-6} M) wurde nicht beobachtet.

In zwei von drei Versuchen gelang der Nachweis der Bildung von N-Ac- β_H -Endorphin-IRM in den Zelllysaten der Melanom-Zelllinie Colo 679. Eine Modulation der Bildung und Freisetzung von N-Ac- β_H -Endorphin-IRM durch Zugabe des potentiellen Stimulators CRH (10^{-8} M) und/oder Zugabe des potentiellen Suppressors Dexamethason (10^{-6} M) konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.

Unsere Ergebnisse widersprechen in ihrer Gesamtheit der Hypothese der Expression des hypophysären POMC-Gens in der menschlichen Haut. Sie sind jedoch gut vereinbar mit Hypothese der Expression eines vom POMC-Gen der Hypophyse verschiedenen, also „aberranten“ POMC-Gens.

Um die möglichen vielfältigen Funktionen des komplexen POMC-Systems der menschlichen Haut zu verstehen, sind weitere Untersuchungen zu diesem Thema notwendig.

8. Summary

The expression of pituitary POMC gene and the release of POMC-derived peptides from the human pituitary are widely described. Physiological and psychological strain ("stress") show significant influence on the release of pituitary POMC-derived peptides.

Unfortunately, sufficient information about the situation in human skin is currently lacking. Some authors described the expression of the pituitary POMC gene and pituitary POMC-derived peptides in cells of human skin (Slominski et al. 1995). However, recently there is a report of a putative variant of pituitary POMC gene in human epidermis and epidermal cells (Can et al. 1998).

Our investigations were intended to contribute to the information about the expression of an epidermal POMC gene.

At the transcription level pituitary POMC-mRNA in the human keratinocyte cell line HaCaT and the human melanoma cell line Colo 679 should be detected or ruled out by RT-PCR.

At the post-translational level, the presence of pituitary POMC-derived peptides in the human keratinocyte cell line HaCaT and the human melanoma cell line Colo 679 should be proven or disproven by RIA. In the frame of this investigation, polyclonal antisera and monoclonal antibodies recognising pituitary POMC-derived peptides had to be generated.

Such new antisera directed against pituitary POMC-derived peptides have been generated and can be utilized in further research projects. We were able to produce antisera binding to the acetylated N-terminal fragment of γ_H -MSH (FR 3b: Ac-N-[Tyr⁵] γ_H -MSH (1-5)), binding to the acetylated N-terminal fragment of human Joining Peptide (FR 4b: Ac-N-[Tyr⁵] JP_H (1-5)), binding to the C-terminal fragment of α_H -MSH (FR 6: [Tyr⁹] α_H -MSH (9-13)), binding to the acetylated N-terminal fragment of human CLIP (FR 7b: Ac-N-CLIP_H (1-5)), and binding to the C-terminal fragment of human CLIP (FR 8: [Tyr¹⁸] CLIP_H (18-22)).

While generating a monoclonal antibody directed against the N-terminal fragment of γ_H -MSH (FR 3a: [Tyr⁵] γ_H -MSH (1-5)) we found hints for methodical gaps in the generation of monoclonal antibodies. This new antibody was binding to a molecular

structure shared by BDB linked to BSA and nonlinked KLH. If BDB is linked to BSA probably a structure is generated which is similar to a partial structure of KLH. Even by using different methods of linking an antigen to a carrier protein and using different carrier proteins for immunisation and examination, there might be antibodies binding to molecular structures common to these different carrier proteins, or their coupling products. Thus, antibodies against the carrier protein used by immunisation may be interpreted as antibodies against the antigen searched for.

While generating an antibody specific for the N-terminal fragment of β_{H} -LPH (FR 9a: [Tyr⁵] β_{H} -LPH (1-5)) we found indication that POMC-derived peptides might have crucial functions in some type of cells. At the 0,1 level of cloning the hybrid cells first showed normal growth, then they died or stopped antibody production. Both are reasons to assume that this antibody was directed against a peptide which is essential for cell function. The loss of these peptides, in this case by binding to a FR 9a specific antibody, caused death of these cells. However these cells made use of a different option also: They stopped their antibody production to prevent apoptosis. Further investigations are needed to learn more about POMC-derived peptides and their crucial role in cell function.

The expression of pituitary POMC gene in the human keratinocyte cell line HaCaT and the human melanoma cell line Colo 679 could not be confirmed in a series of RT-PCR experiments, neither under basal conditions nor after stimulation with CRH (10^{-8} M). In pilot experiments using native human keratinocytes no pituitary POMC-mRNA could be detected in our RT-PCR experiments.

At the post-translational level, a release of pituitary β_{H} -Endorphin (1-31), pituitary β_{H} -Endorphin-IRM or pituitary β_{H} -LPH-IRM into conditioned media or their presence in cells of the human keratinocyte cell line HaCaT or the human melanoma cell line Colo 679 could not be shown. Neither under basal conditions nor after cell treatment with a potential stimulator, CRH (10^{-8} M), and/or a potential suppressor, Dexamethasone (10^{-6} M), these POMC-derived peptides were detectable in RIAs.

In one out of three assays we were able to detect a release of pituitary N-Ac- β_{H} -Endorphin-IRM into conditioned media and its presence in cells of the human

keratinocyte cell line HaCaT. A previous cell treatment with a potential stimulator, CRH (10^{-8} M), and/or a potential suppressor, Dexamethasone (10^{-6} M), did not modulate production or release of this peptide.

In two out of three assays we observed the presence of pituitary N-Ac- β _H-Endorphin-IRM in cells of the human melanoma cell line Colo 679. We could not provoke a modulation of the amounts of this peptide found in the cells by previous cell treatment with a potential stimulator, CRH (10^{-8} M), and/or a potential suppressor, Dexamethasone (10^{-6} M).

Synopsis of our results contradicts the hypothesis of an expression of pituitary POMC gene in human skin. But, in fact, our results are coherent with the hypothesis of an expression of a putative variant of POMC gene in human epidermis (different from POMC gene in pituitary gland).

Further investigations are required to better understanding the complex POMC-system in human skin and its physiologic functions.

9. Literatur

Adams, H.A., Hempelmann, G.:

Die endokrine Stressreaktion in Anästhesie und Chirurgie – Ursprung und Bedeutung
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 26: 294-305, 1991

Ancans, J.; Thody, A.J.; Wood, J.M.; Bazley, W.D.; Schallreuther, K.U.:

Human epidermal Proopiomelanocortin (POMC) cDNA variant is identical to Mouse
POMC cDNA

J Invest Dermatol 112: 516-517, 1999

Autelitano, D.J.; Lundblad, J.R.; Blum, M.; Roberts, J.L.:

Hormonal regulation of POMC gene expression

Annu Rev Physiol 51: 715-726, 1989

Bertagna, X.:

Proopiomelanocortin-derived peptides

Endocrinol Metab Clin North Am 23: 467-485, 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.; Büchner, St.; Rufli, T.; Bigliardi-Qi, M.:

Specific stimulation of migration of human keratinocytes by μ -opiate receptor
agonists

J Receptors and Signal Transduction Vol. 22: 191-199, 2002

Bigliardi P.L.; Sumanovski, L.T.; Büchner, St.; Rufli, T.; Bigliardi-Qi, M.:

Different Expression of μ -Opiate receptor in chronic and acute wounds and the effect
of β -Endorphin on transforming Growth Factor β Type II receptor and Cytokeratin 16
Expression

J Invest Dermatol 120: 145-152, 2003

Bigliardi-Qi, M.; Bigliardi P.L.; Eberle, A.N.; Buechner, S.; Ruffli, T.:

β_H -Endorphin stimulates cytokeratin 16 expression and downregulates μ -opiate receptor expression in human epidermis

J Invest Dermatol 114: 527-532, 2000

Boukamp, P.; Petrussevska, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusinig, N.E.:

Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid Keratinocyte cell line

J cell biol 106: 761-771, 1988

Busca, R.; Ballotti, R.:

Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation

Pigm Cell Res 13: 60-69, 2000

Can, G.; Abdel-Malek, Z.; Porter-Gill, P.; Boyce, S.; Grabowski, H.; Nordlund, J.; Farooqui, J.:

Identification and sequencing of a putative variant of Proopiomelanocortin in human epidermis and epidermal cells in culture

J Invest Dermatol 111: 485-491, 1998

Cannon, J.G.; Tatro, J.B.; Reichlin, S.; Dinarello, C.A.:

Alpha-melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1

J Immunol 137: 2232-2236, 1986

Castro, M.G., Morrison, E.:

Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain

Crit Rev Neurobiol 11: 35-57, 1997

Catania, A.; Lipton, J.M.:

Alpha-melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions

Endocrinol Rev 14: 564-576, 1993

Catania, A.; Lipton, J.M.:

The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone: A key component of neuroimmunomodulation

Neuroimmunomodulation 1: 93-99, 1994

Chakraborty A.K., Funasaka, Y.; Slominski, A.; Ermak, G.; Hwang, J.; Pawelek, J.M.; Ichihashi, M.:

Production and release of POMC derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B

Biochem Biophys Acta 1313:130-138, 1996

Challis, J.R.; Matthews, S.G.; Van Meir, C.; Ramirez, M.M.:

Current topic: The placental corticotrophin-releasing hormone-adrenocorticotrophin axis

Placenta 16: 481-502, 1995

Chard, T.:

An introduction to Radioimmunoassay and related Techniques

In: Van der Vliet, P.C. editor Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 6 Part III, Elsevier p. 169-171, 1995

Clark, A.L.; Lavander, P.M.; Besser, G.M.; Rees, L.H.:

Proopiomelanocortin mRNA size heterogeneity in ACTH-dependent Cushing's syndrome

J Mol Endocrinol 2: 3-9, 1989

DeBold, C.R.; Menefee, J.K.; Nicholson, W.E.; Orth, D.N.:

Proopiomelanocortin gene is expressed in many normal human tissues and in tumors not associated with ectopic adrenocorticotropin syndrome

J Mol Endocrinol 2: 862-870, 1988

De Keyser Y.; Bertagna X.; Lenne F.; Girard, F.; Luton, J.P.; Kahn, A.:
Altered proopiomelanocortin gene expression in adrenocorticotropin-producing
nonpituitary tumors. Comparative studies with corticotropic adenomas and normal
pituitaries

J Clin Invest 76: 1892-1898, 1985

Denef, C., Van Bael, A.:

A new family of growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain
of proopiomelanocortin (N-POMC).

Comp Biochem Physiol Part C 119: 317-324, 1998

Eipper, B.A.; Mains, R.E.:

Structure and Biosynthesis of Pro-Adrenocorticotropin/Endorphin and related
Peptides

Endocrinol Rev 1/1: 1-27, 1980

Elliott, R.J.; Szabo, M.; Wagner, M.J.; Kemp, E.H.; McNeil, S.; Haycock, J.W.:

α -Melanocyte-Stimulating Hormone, MSH11-13 KPV and Adrenocorticotropic
Hormone signaling in human keratinocyte cells

J Invest Dermatol 122: 1010-1019, 2004

Ermak, G.; Slominski, A.:

Production of POMC, CRH-R1, MC1 and MC2 receptor mRNA and expression of
tyrosinase gene in relation to hair cycle and dexamethasone treatment in C57BL/6
mouse skin

J Invest Dermatol 108: 160-165; 1997

Evans, R.V.; Manning, A.B.; Bernard, L.H.; Chronwall, B.M., Millington, B.R.:

Alpha-melanocyte-stimulating hormone and N-acetyl-beta-endorphin
immunoreactivities are localized in the human pituitary but are not restricted to the
zona intermedia

Endocrinology 134: 97-106, 1994

Facchinetti, F.; Panerai, A.E.; Petraglia, F.; Radi, D.; Setti, T.; Storchi, A.R.; Genazzani, A.R.:

Proopiomelanocortin-related peptides in fetoplacental structures throughout pregnancy

Exp Clin Endocrinol 89: 48-54, 1987

Farooqui, J.Z.; Medrano, E.E.; Boissy, R.E.; Tigelaar, R.E.; Nordlund, J.J.:

Thy-1+ dendritic cells express truncated form of POMC-mRNA

Exp Dermatol 4: 297-301, 1995

Farooqui, J.Z.; Gong, C.; Boyce, S.; Nordlund, J.J.:

Expression of Proopiomelanocortin and its peptides in human epidermis and epidermal skin

J Invest Dermatol 106: 883, 1996

Farooqui, J.Z.:

Reply to: Human epidermal POMC cDNA variant is identical to mouse POMC cDNA

J Invest Dermatol 112: 517, 1999

Ferin, M.; Van Vugt, D.; Wardlaw S.:

The hypothalamic control of the menstrual cycle and the role of endogenous opioid peptides

Recent Progr. Horm. Res. 39: 441, 1984

Gantz, I.; Konda, Y.; Tashiro, T.; Yang, Y.K.; Miller, D.E.; Dierick, H.A.; Yamada, T.:

Molecular cloning of a novel melanocortin receptor

J Biol Chem 268: 8246-8250, 1993

Glinski, W.; Brodecka, H.; Glinska-Ferenz, M.; Kowalski, D.:

Increased concentration of beta-endorphin in sera of patients with psoriasis and other inflammatory dermatoses

Br J Dermatol 131: 260-264, 1994

Glinski, W.; Brodecka, H.; Glinska-Ferenz, M.; Kowalski, D.:

Increased concentration of beta-endorphin in the sera of patients with severe atopic dermatitis

Acta Derm Venerol 75: 9-11, 1995

Grutzkau, A.; Henz, B.M.; Kirchhof, L.; Luger, T.; Artuc, M.:

Alpha-melanocyte stimulating hormone acts as a selective inducer of secretory functions in human mast cells

Biochem Biophys Res Commun 278: 14-19, 2000

Gunoz, H.; Dindar, A.; Neyzi, O.:

beta-Endorphin and some hormonal levels in children with acute stress hyperglycemia

Diabetes Res Clin Pract 24: 97-101, 1994

Gurll, N.J.; Vargish, Th.; Reynolds, D.G.; Lechner, R.B.:

Opiate receptors and endorphins in the pathophysiology of hemorrhagic shock

Surgery 89: 364, 1981

Hain, B.:

Untersuchungen zur Expression von Proopiomelanocortin (POMC) in den Hautzelllinien des Menschen HaCaT, Colo 679 und A431

Med. Dissertation der JLU Giessen, 2005

Hakanson, R.; Thorell, J.:

Biogenetics of Neurohormonal Peptides

Academic Press New York, 1985

Harbach, H.; Hell, K.; Gramsch, Ch.; Katz, N.; Hempelmann, G.; Teschemacher, H.:

Beta-endorphin (1-31) in the plasma of male volunteers undergoing physical exercise

Psychoneuroendocrinology 25: 551-562, 2000

Herbert, E.; Roberts, J.; Phillips, M.; Allan, R.; Hinman, M.; Budarf, M., Policastro, P.; Rosa, P.:

Biosynthesis, Processing and Release of Corticotropin, β -Endorphin and Melanocyte-Stimulating Hormone in pituitary cell culture systems

In: Frontiers in Neuroendocrinology Vol. 6, Raven Press NY p. 67-101, 1980

Herz A.:

Biochemie und Pharmakologie des Schmerzgeschehens

In: Schmerz, Konzepte und ärztliches Handeln. Heidelberg: Springer Verlag, 1984

Höllt, V.:

Regulation of opioid peptide gene expression

In: Herz A., Akil H., Simon E.J. editors Handb Exp Pharm 104/I (Opioids I) Berlin: Springer p. 307-346, 1993

Holsboer, F.; Barden, N.:

Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation

Endocrine review 17: 187-205, 1996

Hunt, G.; Donatien, P.D.; Lunec, J.; Kyne, S.; Thody, A.J.:

Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH

Pigment Cell Research 7: 217-221, 1994a

Hunt, G.; Todd, C.; Cresswell, J.E.; Thody, A.J.:

α -Melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle⁴Dphe⁷ α -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes

Journal Cell Sci 107: 205-211, 1994b

Hunt, G.; Todd, C.; Thody, A.J.:

Unresponsiveness of human epidermal melanocytes to melanocyte-stimulating hormone and its association with red hair

Mol Cell Endocrinol 116: 131-136, 1996

Hunter, W.M.; Greenwood, F.C.:

Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity

Nature 194: 495-496, 1962

Huszar, D.; Lynch, C.A.; Fairchild-Huntress, V.; Dunmore, J.H.; Fang, Q.; Berkemeier, L.R.; Gu, W.; Kersterson, R.A.; Boston, B.A.; Cone, R.D.; Smith, I.; Camperfield, L.A.; Burn, P.; Lee, F.:

Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice

J Cell 88: 131-141, 1997

Johnstone, R.W.; Wang, J.; Tommerup, N.; Vissing, H.; Roberts, T.; Shi, Y.:

Ciao 1 is a novel WD40 protein that interacts with the tumor suppressor protein WT1

J Biol Chem 273: 10880-7, 1998

Kauser, S.; Schallreuther, K.U.; Thody, A.J.; Gummer, Ch.; Tobin, D.J.:

Regulation of human epidermal melanocyte biology by β -Endorphin

J Invest Dermatol 120: 1073-1080, 2003

Kauser, S.; Thody, A.J.; Schallreuther, K.U.; Gummer, Ch.; Tobin, D.J.:

A fully functional Proopiomelanocortin/Melanocortin-1 receptor system regulates the differentiation of human scalp hair follicle melanocytes

Endocrinol 146: 532-543, 2005

Kehlet H.:

The endocrine-metabolic response to postoperative Pain

Acta Anaesth Scand 74 (Suppl): 173-175, 1982

Khodorova, A.; Navarro, B.; Jouaville, L.S.; Murphy, J.-E.; Rice, F.L.:

Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgetic cascade at sites of peripheral injury

Nature Medicine, Volume 9, Number 8: 1055-1061, 2003

Kieffer, B.L.:

Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides:
receptors for opioid peptides

Cell Mol Neurobiol 15: 615-635, 1995

Knigge, K.M.; Joseph, S. A.:

Anatomy of the opioid systems of the brain

Can J Neurol Sci 11: 14-23, 1984

Krieger, D.T.; Brownstein, M.J.; Martin, J.B.:

Brain peptides

Wiley and Sons, New York, 1983

Krieger D.T.:

The multiple faces of pro-opiomelanocortin, a prototype precursor molecule.

Clin Res 31: 342, 1983a

Krieger D.T.:

Physiopathology of Cushing's disease

Endocrinol Rev 4: 22, 1983b

Kuljis, R.O.; Advis, J.P.:

Immunocytochemical and physiological evidence of a synapse between dopamine-
and luteinizing hormone releasing hormone-containing neurons in the ewe median
eminence

Endocrinol 124: 1579, 1989

Lerner A.B.; McGuire J.S.:

Effect of alpha- and beta-melanocyte stimulating hormone on the skin colour of man

Nature 189: 176-179, 1961

Lerner A.B.; McGuire J.S.:

Melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone. Their relation to pigmentation

N Engl J Med 270: 539-546, 1964

LeRoith, D.; Liotta, S.; Roth, J.; Shiloach, J.; Lewis, M.E.; Pert, C.B.; Krieger, D.T.:

Corticotropin and beta-endorphin materials are native to unicellular organisms

Proc Natl Acad Sci USA 79: 2086-2090, 1982

Levine, N.; Sheffel, S.N.; Eytan, T.; Dorr, R.T.; Hadley, M.E.; Weinrach, J.C., Ertl, G.A.; Toth, K.; McGee, D.L.; Hruby, V.J.:

Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin

JAMA 266: 2730-2736, 1991

Loh, Y.P.:

Molecular mechanisms of beta-endorphin biosynthesis

Biochem Pharmacol 44: 843-849, 1992

Lowry, P.J.; Estivariz, F.E.; Silas, L.; Linton, E.A.; McLean, C.; Corcombe, K.:

The case of pro- γ -MSH as the adrenal growth factor

Endocr Res 10: 243-258, 1984

Matejec, R.; Schulz, A.; Harbach, H.; Uhlich, H.; Hempelmann, G.; Teschemacher, H.:

Effects of tourniquet-induced ischemia on the release of Proopiomelanocortin Derivates determined in peripheral blood plasma

J Appl Physiol 97: 1040-1045, 2004

Matejec, R.; Harbach, H.; Bödeker R.-H.; Hempelmann, G.; Teschemacher, H.:

Plasma levels of corticotroph-type Proopiomelanocortin Derivates such as beta-Lipotropin, beta-Endorphin (1-31) or Adrenocorticotrophic Hormone are correlated with severity of postoperative pain

Clin J Pain Volume 22: 113-121, 2006

McLoughlin L., Medbak S., Grossmann A.B.:

Circulating opioids in man

In: Herz A., Akil H., Simon E.J. editors Handbuch Experimentelle Pharmakologie 104/II (Opioids II) Berlin: Springer Verlag p. 673-696, 1993

Miller, W.L.:

Molecular biology of steroid hormone synthesis

Endocr Rev 9: 295-318, 1988

Moustafa, M.; Szabo, M.; Ghanem, G.E.; Morandini, R.; Kemp, E.H.; McNeil, S.; Haycock, J.W.:

Inhibition of TNF- α stimulated NF- κ B/p65 in human keratinocytes by α -melanocyte stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone peptides

J Invest Dermatol 119: 1244-1253, 2002

Nagahama, M.; Funasaka, Y.; FernandezFrez, M.L.; Ohashi, A.; Chakraborty, A.K.; Ueda, M.; Ichihashi, M.:

Immunoreactivity of α -melanocyte stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone and β -endorphin in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi

J Dermatol 138: 981-985, 1998

Pert, C.B.; Snyder, S.H.:

Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue

Science 179: 1011-1014, 1973

Picon, A.; Leblond-Francillard, M., Raffin-Sanson, M.L.; Lenne, F., Bertagna, X.; de Keyzer, Y.:

Functional analysis of human pro-opiomelanocortin promoter in the small cell lung carcinoma cell line DMS-79

J Mol Endocrinol 2: 187-194, 1995

Polak, J.M.; Bloom, S.R.; Sullivan, S.N.; Fhazer, P.; Pearse, A.G.E.:

Enkephaline-like immuno reaktivty in the human gastrointestinal tract

Lancet 1: 972-974, 1977

Raffin-Sanson, M.L.; Massias, J.F.; Ankotche, A.; Coste, J.; de Keyser, Y.; Oliver, C.; Dumont, C.; Cabrol, D.; Ferré, F.; Bertagna, X.:

High precursor level in maternal blood results from the alternate mode of proopiomelanocortin processing in human placenta

Clin Endocrinol 50: 85-94, 1999

Rasmussen, D.D.; Gambacciani, M.; Swartz, W.; Tucros, V.S.; Yen, S.S.C.:

Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release from the human mediobasal hypothalamus in vitro: opiate receptor-mediated suppression

Neuroendocrinol 49: 150, 1989

Rees J.L.:

Genetics of hair and skin color

Annual Rev Genet 37: 67-90, 2003

Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Ehrlich, H.A.; Arnheim, N.:

Enzymatic amplification of β 3-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia

Science 230: 1350-1355, 1985

Salzet, M.; Salzet-Raveillon, B.; Cocquerelle, C.; Verger-Bocquet, M.; Pryor, S.C.; Rialas, C.M.; Laurent, V.; Stefano, G.B.:

Leech immunocytes contain proopiomelanocortin: nitric oxide mediates hemolymph proopiomelanocortin processing

J Immunol Vol 159: 5400-5411, 1997

Schauer, E.; Trautinger, F.; Kock, A.; Schwarz, A.; Bhardwaj, R.; Simon, M.; Amsel, J.C.; Schwarz, T.; Luger, T.A.:

Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes

J Clin Invest 93: 258-2262, 1994

Schedlowski, M.; Fluge, T.; Richter, S.; Tewes, U.; Schmidt, R.E.; Wagner, T.O.:
Beta-endorphin, but not Substance P, is increased by akute stress in humans
Psychoneuroendocrinology 20: 103-110, 1995

Schiller, M.; Raghunath, M.; Kubitscheck, U.; Scholzen, T.E.; Fisbeck, T.; Metze, D.;
Luger, T.; Böhm, M.:
Human dermal fibroblasts express prohormone convertases 1 and 2 and produce
proopiomelanocortin-derived peptides
J Invest Dermatol 117: 227-235, 2001

Schulz, A.; Harbach, H.; Katz, N.; Geiger, L.; Teschemacher, H.:
Beta-endorphin immunoreactive material and authentic beta-endorphin in the plasma
of males undergoing anaerobic exercise on a rowing ergometer
Int J Sport Med 21: 513-517, 2000

Schwartz, J.; Revskoy, S.; Redei, E.; Clifton, V.; Smith, R.; Cherny, R.:
Corticotrophs and peptides
Arch Physiol Biochem 110: 146-153, 2002

Schwartz, M.W.; Woods, S.C.; Porte, D. Jr.; Seeley, R.J.; Baskin, D.G.:
Central nervous system control of food intake
Nature 404: 661-671, 2000

Simon, E.J.; Hiller, J.M.; Edelman, J.:
Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [3H]-Etorphine to rat-brain
homogenate
Proc Natl Acad Sci USA 70: 1947-1949, 1973

Simon, E.J.; Gioannini, T.L.:
Opioid receptor multiplicity: Isolation, Purification and Chemical Characterisation of
binding sites
In: Herz A., Akil H., Simon E.J. editors Handb Exp Pharm 104/I (Opioids I) Berlin:
Springer p. 3-26, 1993

Slominski A.; Paus, R.; Mazurkiewicz, J.E.:

Proopiomelanocortin expression in the skin during induced hair growth in mice

Experienta 48: 50-54, 1992

Slominski A.; Paus, R.; Wortsmann, J.:

On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology

Mol Cell Endocrinol 93: C1-C6, 1993

Slominski A.; Ermak, G.; Hwang, J.; Chakraborty, A.; Mazurkiewicz, J.E.; Mihm, M.:

Proopiomelanocortin, Corticotropin releasing hormone and Corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin

FEBS Lett 374: 113-116, 1995

Slominski A.:

Identification of β -Endorphin, α -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.; Wortsmann, J.; Luger, T.; Paus, R.; Salomon, S.:

Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress

Physiol Rev 80: 979-1020, 2000

Slominski, A.; Wortsman, J.:

Neuroendocrinology of the Skin

Endocrinol Rev 21: 457-487, 2000

Slominski, A.; Zbytek, B.; Szczesniewski, A.; Semak, I.; Kaminski, J.; Sweatman, T.;

Wortsman, J.:

CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH

Am J Physiol Endocrinol Metab 288, E701-E706, 2004

Smith, A.I.; Funder, J.W.:

Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues

Endocrinol Rev 9: 159-179, 1988

Spennemann, V.:

Untersuchungen zur Funktion des β -Endorphins an malignen Melanozyten einer Melanomzelllinie des Menschen (G-361)

Med. Dissertation der JLU Giessen, 2002

Suzuki, I.; Cone, R.D.; Im, S.; Nordlund, J.; Abdel-Malek, Z.A.:

Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis

Endocrinol 137: 1627-1633, 1996

Takahashi, H.; Hakamata, Y.; Watanabe, Y.; Kikuno, R.; Miyata, T.; Numa, S.:

Complete nucleotide sequence of the human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene

Nucleic Acids Res. 11, 6847-6858, 1983

Taylor, D.V.; Boyajian, J.G.; James, N.; Woods, D.; Chicz-Demet, A.; Wilson, A.F.; Sandmann, C.A.:

Acidosis stimulates beta-endorphin release during exercise

Journal Appl. Physiology 77: 1913-1918, 1994

Teofoli, P.; Motoki, K.; Lotti, T.M.; Uitto, J.; Mauviel, A.:

Proopiomelanocortin (POMC) gene expression by normal skin and keloid fibroblasts in culture: modulation by cytokines

Exp Dermatol 6: 111-115, 1997

Terenius, L.:

Stereospecific interaction between narcotic analgetics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex

Acta Pharmacol Toxicol 32: 317-320, 1973

Teschemacher, H.:

Proopiomelanocortin: Welche Rolle spielt dieser ACTH- und β -Endorphin-Precursor für die „Stress-Adaptation“?

Internist Prax, Hans Marseille GmbH, München, 43: 605-615, 2003

Thody A.J.; Ridley, K.; Penny, R.J.; Chalmers, R.; Fisher, C.; Shuster, S.:

MSH peptides are present in mammalian skin

Peptides 4: 813-816, 1983

Thody A.J.; Fisher, C.; Kendal-Taylor, P. Jones, M.T.; Price, J.; Abraham, R.R.:

The measurement and characterisation by high pressure liquid chromatography of immunoreactive alpha-melanocyte stimulating hormone in human plasma

Acta Endocrinol 110: 313-318, 1985

Thody A.J.; Graham A.:

Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?

Pigment Cell Res 11: 265-274, 1998

Torpy, D.J.;; Grice, J.E.; Hockings, G.I.; Crosbie, G.V.; Walters, M.M.; Jackson, R.V.:

Effect of sodium valproate on naloxone-stimulated ACTH and cortisol release in humans

Clin Exp Pharmacol Physiol 22: 441-443, 1995

Tsatmali, M.; Yukitake, J.; Thody, A.J.:

ACTH1-17 is a more potent agonist at the human MC1 receptor than alpha-MSH

Cell Mol Biol 45: 1029-1034, 1999

Tsatmali, M.; Ancans, J.; Thody, A.J.:

Melanocyte function and its control by melanocortin peptides

J Histochem Cytochem 50: 125-133, 2002

Valverde, P.; Healy, E.; Jackson, I.; Rees, J.L.; Thody, A.J.:

Variants of the melanocyte stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans

Nature Genet 11: 328-330, 1995

van der Kraan, M.; Adan, R.H.A.; Entwistle, M.L.; Gispen, W.H.; Burbach, J.P.H.; Tatro, J.P.:

Expression of Melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in Exocrine and endocrine glands

Endocrinol Vol 139 No 5: 2348-2355, 1998

von Werder, K.; Scriba, P.C.:

Hypothalamus und Hypophyse

In: Siegenthaler W. (Hrsg.) Klinische Pathophysiologie Thieme Verlag p. 242-244, 1994

Wagner, K.:

Überprüfung der Expression des Proopiomelanocortin (POMC)-Gens in HaCaT und A431-Zellkulturen unter Basal- und Stimulationsbedingungen

Med. Dissertation der JLU Giessen, 2005

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

Wiedemann, K.; Teschemacher, H.:

Determination of β -endorphin and fragments thereof in human plasma using high performance liquid chromatography and a multiple radioimmunoassay system

Pharmaceutical Res 3: 142-149, 1986

Wilckens T.:

Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and the pathogenetic potential of hormonal dysfunction

Trends Pharmacol Sci 16: 193-197, 1995

Wilson, J.D.; Foster, D.W.:

William's Textbook of Endocrinology

W.B. Saunders Co. 7th Edition 1985

Wintzen, M.; Yaar M.; Avila, E.; Vermeer, B.J.; Gilchrest, B.A.:

Keratinocytes produce β -Endorphin and β -Lipotropin hormone after stimulation by UV, IL-1 α 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

Wintzen, M.; Zanello S.B.; Holick, M.F.; Wiegant, V.M.; Burbach, J.P.H.; Vermeer, B.J.:

Condition dependent presence of β -Lipotropin-like peptide in human keratinocytes

Peptides 21: 691-697, 2000

Wuttke, W.; Weindl, A.; Voigt, K.H.; Dries, R.-R.:

Brain and Pituitary Peptides

S. Karger, 1980

Yen, S.S.C.; Quigley, M.E.; Reidl, R.L.; Cetel, N.S.:

Neuroendocrinology of opioid peptides and their role in the control of gonadotropin and prolactin secretion

Amer J Obstet. Gynecol 152: 485, 1985

Young, E., Bronstein, D., Akil, H.:

Proopiomelanocortin biosynthesis, processing and secretion: Functional implications
In: Herz A., Akil H., Simon E.J. editors Handbuch Experimentelle Pharmakologie
104/I (Opioids I) Berlin: Springer Verlag p. 393-421, 1993

Zanello S.B.; Jackson D.M.; Holick, M.F.:

An immunocytochemical approach to the study of β -endorphin production in human
keratinocytes using confocal microscopy
Ann NY Acad Sci 885: 85-99, 1999

Zouboulis, C.C.:

Human skin: An independant peripheral endocrine organ
Hormone Res. 54: 230-242, 2000

Zouboulis, C.C.:

The human skin as a hormone target and a endocrine gland
Hormones 3: 9-26, 2004

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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“ niedergelgt sind, eingehalten.

Frankfurt, 05.08.2006

M. Tschischka

Lebenslauf

Name: Marcus Tschischka
Geburtsdatum und Geburtsort: 14.01.1972 in Friedberg / Hessen
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 07 / 1978 – 06 / 1982 Grundschule in Ober-Wöllstadt
07 / 1982 – 06 / 1991 Augustiner-Schule Friedberg,
Abschluß Abitur

Wehrdienst: 01 / 1992 – 12 / 1992 Nachschub-Kompanie 140,
Neustadt/Hessen

Studium: 04 / 1993 – 10 / 1999 Studium der Humanmedizin an
der Justus-Liebig-Universität
Gießen
04 / 1993 – 03 / 1995 Vorklinischer Studienabschnitt
04 / 1995 – 09 / 1998 Klinischer Studienabschnitt
10 / 1999 Abschluß des Studiums,
Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr: 10 / 1998 – 02 / 1999 Orthopädische Klinik der
Universität Gießen
02 / 1999 – 06 / 1999 Innere Medizin am
Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
06 / 1999 – 09 / 1999 Chirurgie am Kreiskrankenhaus
Bad Hersfeld

Arzt im Praktikum: 11 / 1999 – 05 / 2001 in der Chirurgischen Abteilung
am Kreiskrankenhaus Friedberg
(Bürgerhospital)

Assistenzarzt: seit 06 / 2001 in der Chirurgischen Abteilung
am St. Katharinen Krankenhaus
in Frankfurt/Main

Weiterbildung: am 07.12.2005 Annerkennung als Facharzt für
Chirurgie

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Hansjörg Teschemacher für das zur Verfügung gestellte Thema, sowie die kompetente und stets engagierte Betreuung.

Mein besonderer Dank geht an Frau Beate Dickopf für die Einführung in die Laborarbeit, sowie ihre stets hilfsbereite und geduldige Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Herrn Helmut Müller danke ich für seine Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen, sowie für seine ständige tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche mit Zellkulturen.

Bei Herrn Boris Karschunke bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit in unzähligen Laborstunden.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Institut für Pharmakologie danke ich für das nette Arbeitsklima und ihre stete Bereitschaft in Wort und Tat Hilfe zu leisten.