

**Untersuchungen zur Expression von Proopiomelanocortin (POMC) in den Hautzelllinien  
des Menschen HaCaT, Colo 679 und A 431**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Birgit Hain  
aus Duisburg

Giessen 2005

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie  
Leiter Prof. Dr. med. F. Dreyer  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Teschemacher

Gutachter: Prof. Dr. med. P. Mayser

Tag der Disputation: 05.12.2005

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Proopiomelanocortin (POMC) und POMC-Derivate</b>	<b>5</b>
1.1.1. Expression des POMC-Gens	5
1.1.2. Steuerung der Genexpression	7
1.1.3. Vorkommen im menschlichen Organismus	9
1.1.4. Physiologische Bedeutung von POMC und POMC-Derivaten	9
1.1.4.1. Melanocortine	9
1.1.4.2. $\beta_H$ -Endorphin	10
1.1.4.3. N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin	12
<b>1.2. POMC und POMC-Derivate der Haut</b>	<b>12</b>
1.2.1. Zellen der Haut	13
1.2.1.1. Native Hautzellen	14
1.2.1.1.1. Keratinozyten	14
1.2.1.1.2. Melanozyten	14
1.2.1.2. Hautzelllinien	15
1.2.1.2.1. HaCaT	15
1.2.1.2.2. Colo 679	16
1.2.1.2.3. A 431	16
1.2.2. Expression von POMC und Freisetzung von POMC-Derivaten	16
1.2.2.1. Expression des POMC-Gens in Hautzellen	16
1.2.2.2. Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten	18
1.2.3. Physiologische Bedeutung von POMC und POMC-Derivaten in der Haut	20
<b>2. FRAGESTELLUNG</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIALIEN</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Geräte und Zubehör</b>	<b>25</b>
3.1.1. Kultivierung und Stimulation von Zellkulturen	25
3.1.2. Suche nach POMC-mRNA	26
3.1.3. Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen für die Extraktion von POMC-Derivaten	26
3.1.4. Durchführung von RIA's	27
<b>3.2. Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen</b>	<b>28</b>
3.2.1. Kultivierung und Stimulation von Zellkulturen	28
3.2.2. Suche nach POMC-mRNA	28

3.2.3. Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen für die Extraktion von POMC-Derivaten	29
3.2.4. Durchführung von RIA's	29
<b>3.3. Lösungen</b>	<b>30</b>
3.3.1. Kultivierung und Stimulation von Zellkulturen	30
3.3.2. Suche nach POMC-mRNA	30
3.3.3. Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen für die Extraktion von POMC-Derivaten	31
3.3.4. Durchführung von RIA's	31
<b>3.4. Computerprogramme</b>	<b>31</b>
<b>4. METHODEN</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Kultivierung der untersuchten Zelllinien</b>	<b>32</b>
4.1.1. Die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT	32
4.1.2. Die humane Melanomzelllinie Colo 679	32
4.1.3. Die humane Epidermoidzelllinie A 431	32
4.1.4. Die humane Bronchialcarzinomzelllinie DMS 79	32
<b>4.2. Stimulation der Zellkulturen mittels UVB-Bestrahlung</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Suche nach m-RNA des hypophysären POMC in HaCaT-, Colo 679- und A 431-Zellen</b>	<b>34</b>
4.3.1. RNA-Extraktion	34
4.3.2. RT-PCR	35
4.3.2.1. RT-PCR-Ansätze	35
4.3.2.2. Gelelektrophorese	37
4.3.2.3. Dokumentation	37
<b>4.4. Suche nach Derivaten des hypophysären POMC in HaCaT Zellkulturen</b>	<b>38</b>
4.4.1. Aufarbeitung der Zellkulturen	38
4.4.1.1. Probenherstellung aus Zellkulturüberständen	38
4.4.1.2. Probenherstellung aus Zellen	38
4.4.1.3. Zellzählung	39
4.4.2. Standardisierung des Aufbereitungsverfahrens	40
4.4.2.1. Herstellung von Überstandpräparaten	40
4.4.2.2. Herstellung von Zellysaten	40
4.4.2.3. Filtration	41
4.4.2.4. Herstellung von Standardproben	41
4.4.3. Extraktion der Standard- und Testproben	42
4.4.3.1. Durchführung der Extraktion	42

4.4.3.2. Weitere Arbeitsschritte	42
4.4.4. Bestimmung von POMC-Derivaten in den Probenextrakten mittels Radioimmunoassay (RIA)	42
4.4.4.1. Durchführung	43
4.4.4.2. Inkubationsansätze	43
4.4.4.3. Auswertung der Ergebnisse	45
<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>5.1. Ausschluss der Expression des hypophysären POMC in HaCaT-Zellen</b>	<b>46</b>
5.1.1. Ausschluss einer basalen oder UVB-stimulierten Transkription des POMC-Gens	46
5.1.1.1. Primerpaar HPO 10/HPO 13	47
5.1.1.2. Primerpaar HPO 10/HPO 14	48
5.1.1.3. Primerpaar HPO 10/EXO 21	49
5.1.2. Ausschluss einer basalen oder UVB-stimulierten Bildung oder Freisetzung von POMC-Derivaten	51
5.1.2.1. Nicht konfluente HaCaT Zellkulturen	51
5.1.2.2. Konfluente HaCaT-Zellkulturen	52
5.1.2.2.1. $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM	52
5.1.2.2.2. N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM	53
<b>5.2. Ergebnisse zur Untersuchung der Expression von hypophysärem POMC in Colo 679- und A 431-Zellen</b>	<b>55</b>
5.2.1. Ausschluss der Expression des hypophysärem POMC in Colo 679-Zellen	55
5.2.1.1. Primerpaar HPO 10/HPO 13	56
5.2.1.2. Primerpaar HPO 10/HPO 14	57
5.2.1.3. Primerpaar HPO 10/EXO 21	58
5.2.2. Hinweise auf die Expression eines aberranten POMC-Gens in A 431-Zellen	59
5.2.2.1. Primerpaar HPO 10/HPO 13	60
5.2.2.2. Primerpaar HPO 10/HPO 14	61
5.2.2.3. Primerpaar HPO 10/EXO 21	63
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>6.1. Methodik</b>	<b>65</b>
6.1.1. Die Zelllinien HaCaT, A 431 und Colo 679 als Untersuchungsobjekte	65
6.1.2. Stimulationsversuche	66
6.1.2.1. Zellpräparation	67
6.1.2.2. Zellzählung	67
6.1.2.3. Standardisierung der Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen	67
6.1.2.4. Intensität der UVB-Bestrahlung	68

6.1.3. RT-PCR	68
6.1.3.1. Amplifikationsfehler bei der PCR	69
6.1.4. RIA	69
<b>6.2. Ergebnisse</b>	<b>70</b>
6.2.1. Widersprüchliche Literaturbefunde zur Expression des hypophysären POMC auf Transkriptionsebene	70
6.2.1.1. Ausschluss der Transkription des hypophysären POMC-Gens in HaCaT- und Colo 679-Zellen	74
6.2.1.2. Hinweise auf die Transkription eines aberranten POMC-Gens in A 431-Zellen	75
6.2.1.3. Befunde zur Expression eines aberranten POMC-Gens in HaCaT-Zellen auf Post-Translationsebene	76
<b>6.3. Neuere Erkenntnisse</b>	<b>78</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>80</b>
7.1. Summary	82
<b>8. LITERATUR</b>	<b>84</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>95</b>
9.1. Abkürzungsverzeichnis	95
9.2. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	98
9.3. Lebenslauf	99
9.4. Danksagung	100

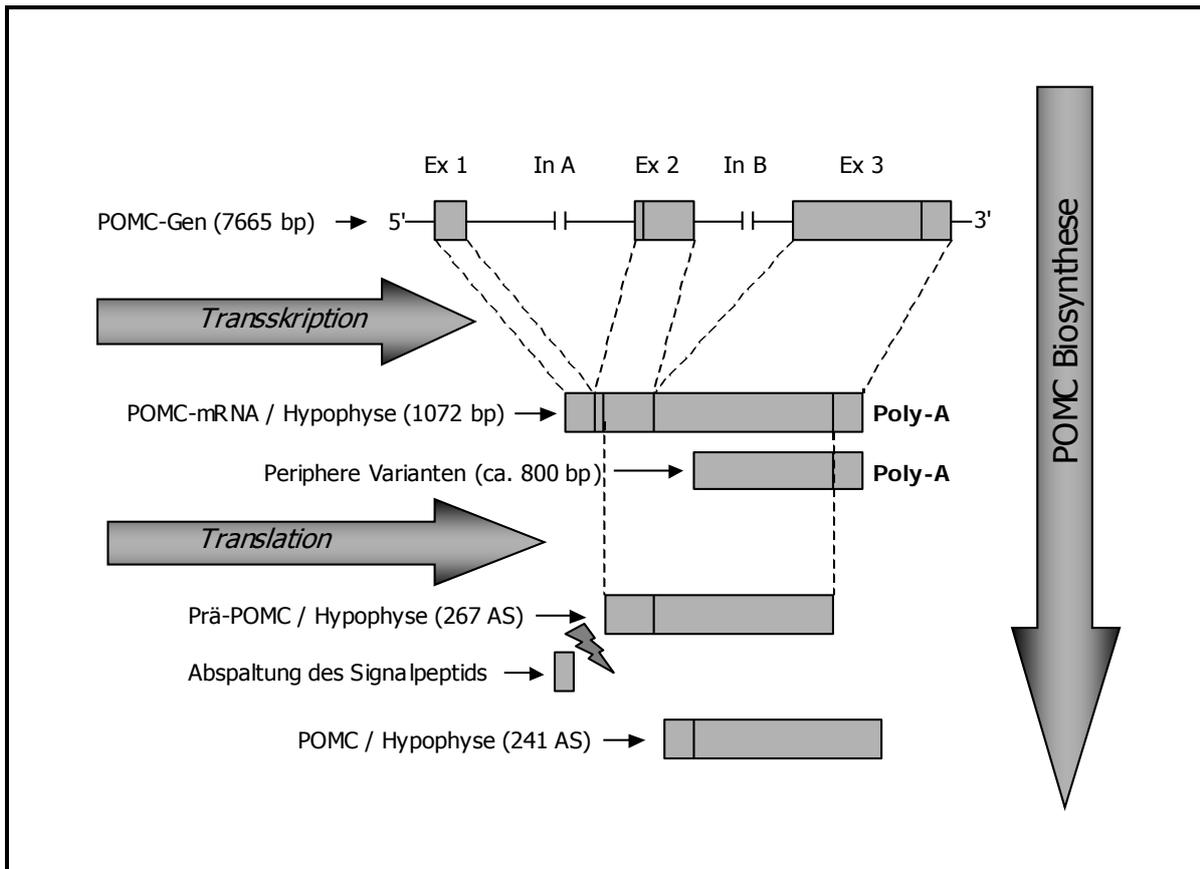
## **1. Einleitung**

### **1.1. Proopiomelanocortin (POMC) und POMC-Derivate**

#### **1.1.1. Expression des POMC-Gens**

Der Mensch besitzt pro Chromosomensatz (väterlich bzw. mütterlich) ein POMC-Gen, das auf Chromosom 2 (p23) lokalisiert ist (Whitfield et al., 1982). Es ist vollständig sequenziert, umfasst 7665 Basenpaare (siehe Abb. 1) und besteht aus 3 Exons und 2 Introns (Takahashi et al., 1983). Das Exon 1 umfasst ca. 87 Basenpaare und enthält den 5'-untranslatierten Abschnitt der mRNA. Das Exon 2 umfasst 152 Basenpaare, es enthält auch einen Teil des 5'-untranslatierten Abschnitts, kodiert das Signalpeptid, das für die Proteinsynthese und Sekretion Bedeutung hat und stellt die ersten Aminosäuren des NH<sub>2</sub>-terminalen Fragmentes von POMC (Autelitano et al., 1989). Das 833 Basenpaare umfassende Exon 3 kodiert den größten Anteil der translatierten mRNA, aus dem NT-F (N-terminales POMC Fragment),  $\gamma$ -MSH ( $\gamma$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon), JP („Joining Peptide“), ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und  $\beta$ -LPH ( $\beta$ -Lipotropin) hervorgehen. Die Länge der mRNA variiert in Abhängigkeit vom Ort der Gentranskription im menschlichen Organismus. Da POMC und seine Derivate in größeren Mengen in der Hypophyse gefunden wurden, wurden Transkription, Translation und post-translationale Prozessierung in der Hypophyse zuerst und im Detail untersucht (Eipper et al., 1980). POMC wird bei niederen Säugern wie z.B. der Ratte in zwei Zelltypen, den corticotrophen Zellen des Vorderlappens und in den melanotrophen Zellen des Intermediärlappens exprimiert und in diesen zwei Zelltypen unterschiedlich prozessiert; beim Menschen existieren beide Prozessierungssysteme zum Teil in der gleichen Zelle im Hypophysenvorderlappen. Im Folgenden wird die POMC-Expression in der Hypophyse des Menschen beschrieben. Durch Transkription des POMC-Gens entsteht eine mRNA von 1072 Nukleotiden mit einer Poly-A-Sequenz von unterschiedlicher Länge (DeBold et al., 1988; Oates et al., 1988; Van Woudenberg, 1991). Die Translation zum Protein führt zu einem Prä-POMC aus 267 Aminosäuren. Anschließend wird das am NH<sub>2</sub>-Terminus lokalisierte Signalpeptid abgespalten, so dass schließlich das POMC mit 241 Aminosäuren übrig bleibt (Höllt et al., 1983; 1993; Bertagna et al., 1994). Aus diesem entstehen durch post-translationale Prozessierung verschiedene biologisch aktive Peptide wie ACTH, MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon),  $\beta$ -LPH und  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin (Smith and Funder, 1988).

In den corticotropen Zellen des Vorderlappens niederer Säugerspezies entstehen nach Modifizierung (Glycosylierung, Phosphorylierung und enzymatischer Spaltung) das 16 kDa NH<sub>2</sub>-terminale Segment, ACTH und  $\beta$ -LPH (Fenger et al., 1990) (siehe Abb. 2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -LPH zu einem kleinen Teil in  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin und  $\gamma$ -LPH gespalten wird (Burbach et al., 1984). Dieser Prozess wird hauptsächlich über die „prohormone convertase 1“ (PC1) gesteuert (Seidah et al., 1990). Die POMC-Prozessierung der melanotropen Zellen wird von 2 Enzymsystemen koordiniert. Die „prohormone convertase 1“ (PC 1) produziert die gleichen Fragmente wie in den corticotropen Zellen, zusätzlich existiert hier noch die „prohormone convertase 2“ (PC 2), die diese Peptide in viele kleinere Fragmente spaltet. Die „prohormone convertase 2“ setzt aus ACTH  $\alpha$ -MSH und CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide), aus  $\beta$ -LPH  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin  $\gamma$ -LPH und  $\beta$ -MSH und aus dem N-terminalen Fragment  $\gamma$ -MSH und JP frei (Bloomquist et al., 1991; Lindberg et al., 1991); weitere Enzymsysteme sind für die Acetylierung und Amidierung einiger dieser POMC-Fragmente zuständig.



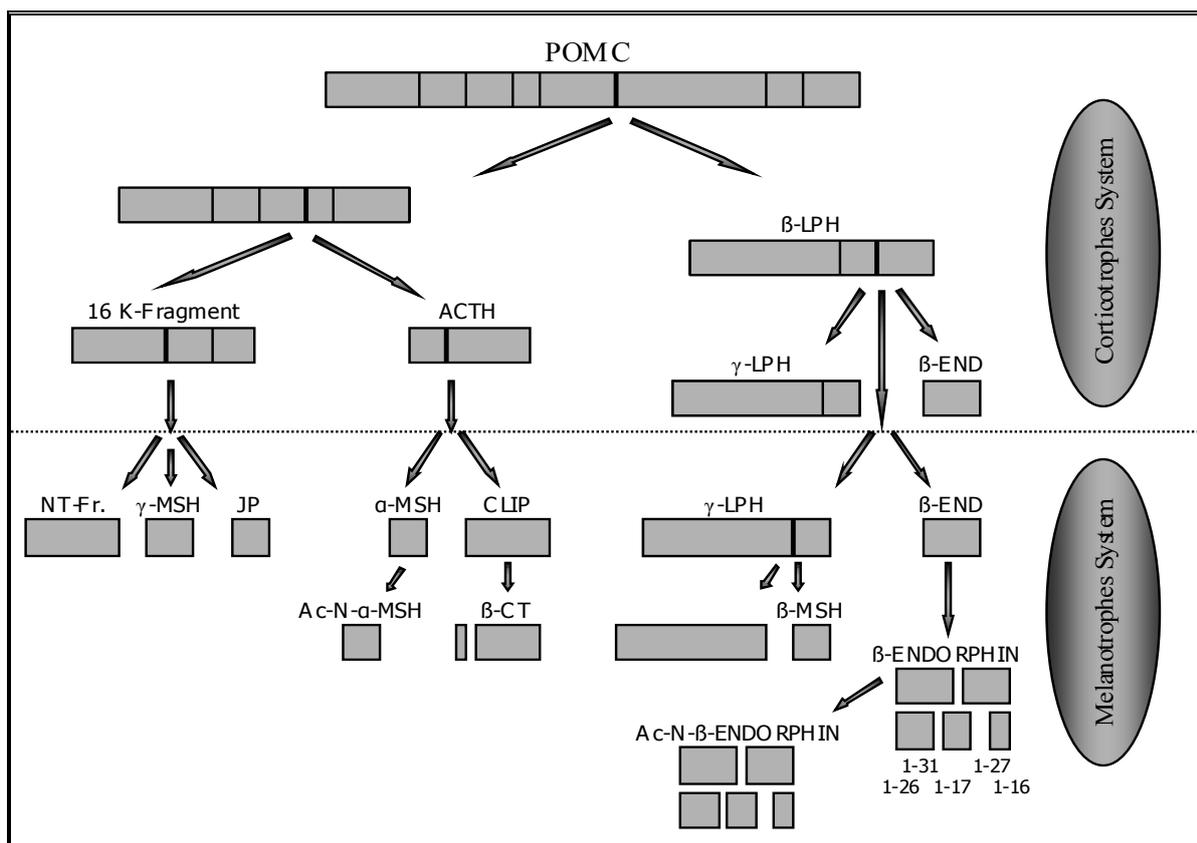
**Abbildung 1: Biosynthese des hypophysären POMC: Ex: Exon; In: Intron; bp: Basenpaare; AS: Aminosäuren. Durch die Transkription in der Hypophyse entsteht eine m-RNA von 1072 bp mit einer Poly A-Sequenz unterschiedlicher Länge. Die anschließende Translation zum Protein führt zum Prä-POMC mit 267 Aminosäuren. Nach Abspaltung eines Signalpeptids entsteht schließlich POMC mit 241 Aminosäuren (nach Bertagna, 1994)**

### 1.1.2. Steuerung der Genexpression

Die Produktion von POMC ist organspezifisch und wird von vielen Hormonen gesteuert, wobei in der Hypophyse CRH (Corticotropin-releasing Hormone) stimulierend und Glukokortikoide inhibierend wirken. Die hypophysäre Expression des POMC-Gens wird durch Belastungssituationen getriggert, welche die Homöostase des Organismus bedrohen. Die Reizschwelle ist individuell unterschiedlich hoch anzusetzen. Aus einer Vielzahl von Studien aus verschiedenen medizinischen Bereichen werden nachfolgend einige Stressoren aufgeführt. POMC-Fragmente des „corticotrophen“ Musters werden beispielsweise bei psychischen Belastungen wie Angst, Spannung, Erregung und Schmerzen freigesetzt. Auch Verletzungen, extreme thermische Schwankungen, große sportliche Belastungen, Operationen und Mangelzustände wie Hypoglykämie zählen zu diesen Stressoren. In Situationen mit

eingeschränkter Energieversorgung und Anhäufung von Stoffwechselprodukten durch Gewebszerstörung und Nekrosen werden offenbar sowohl „corticotrophe“ als auch „melanotrophe“ Derivate freigesetzt. Wie die Abbildung 2 zeigt, gehört  $\beta_H$ -Endorphin zu einem Produkt des „corticotrophen Systems“ und N-Ac- $\beta_H$ -Endorphin (1-31) zu einem Produkt des „melanotrophen Systems“ der Hypophyse. Die Stimulation der Expression des Vorläufermoleküls POMC erfolgt durch CRH (Lü et al., 1994).

Auch proinflammatorische Zytokine wie IL1, IL2, IL6, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  stimulieren die hypophysäre POMC-Gen-Expression und POMC-Fragment-Freisetzung (Autelitano et al., 1989). Die Wirkung der Zytokine auf die POMC-Gen-Expression wird durch die Tyrosin-Phosphorylierungs-Kaskade gesteuert. Leukemia inhibitory factor (LIF) wirkt synergistisch zu CRH (Auerhammer et al., 1998).



**Abbildung 2: Prozessierung des hypophysären POMC:** Ac-N: N-Acetyl; ACTH: Adrenokortikotropes Hormon;  $\beta$ -CT:  $\beta$ -Cell-Tropin; CLIP: Corticotropin-like intermediate lobe peptide;  $\beta$ -END:  $\beta$ -Endorphin; JP: Joining Peptide; LPH: Lipotropin; MSH: Melanozyten-stimulierendes Hormon; NT-Fr.: N-terminales Fragment; POMC: Proopiomelanocortin (nach Castro und Morrison, 1997)

### **1.1.3. Vorkommen im menschlichen Organismus**

Im menschlichen Organismus wird POMC in vielen Geweben exprimiert. Neben dem hauptsächlichen Expressionsort, der Hypophyse, wurde POMC im Gehirn in den hypothalamischen Kerngebieten wie z.B. im Nucleus arcuatus und im Nucleus tractus solitarii, sowie in endokrinen Geweben wie der Schilddrüse, den männlichen Gonaden (Keimzellen / Spermien), den weiblichen Gonaden (Granulosazellen), der Plazenta, dem Nebennierenmark und dem Pankreas nachgewiesen (Pintar et al., 1984; Chen et al., 1986; Kilpatrick et al., 1987).

Neben den für Entgiftung und Homöostase wichtigen Organen, Leber und Nieren, wurde POMC auch in Zellen der Immunabwehr wie den Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten nachgewiesen (Gee et al., 1983). Auch in den inneren Körperbegrenzungen wie in der Wand des Magen-Darm-Trakts, und der äußeren Körperbegrenzung, der Haut, konnte POMC nachgewiesen werden. Von den Hautzellen und Hautanhangsgebilden sind Keratinozyten, Melanozyten, Schweißdrüsen, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen zu nennen (Can et al., 1998; Ermak et al., 1997; Farooqui et al., 1993; Slominski et al., 1993).

Durch die mRNA-Analyse der peripheren Gewebe im Menschen konnte gezeigt werden, dass die mRNA dort in der Regel ca. 200-300 Basenpaare kürzer ist als die in der Hypophyse und im Hypothalamus und dass dies auf das Fehlen von Exon 1, Exon 2 und einem Teil des 5' Endes von Exon 3 zurückzuführen ist (De Bold et al., 1988).

### **1.1.4. Physiologische Bedeutung von POMC und POMC-Derivaten**

POMC-Derivate werden unter „Stress“ freigesetzt (siehe Abschnitt 1.1.2.). Vermutlich haben sie verschiedene Schlüsselfunktionen in der Koordination von komplexen neuroendokrinen und immunologischen Vorgängen, wie der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Kontrolle von „stressinduziertem Gewebsschaden“.

#### **1.1.4.1. Melanocortine**

Die Wirkung der „Melanocortine“ (ACTH und MSH-Varianten) wird über Membranrezeptoren vermittelt, die zu den heptahelicalen Rezeptoren zählen. Bisher sind 5 Rezeptortypen bekannt, MCR1 bis MCR5. Das NH<sub>2</sub>-terminale Ende der Rezeptorsequenz liegt extrazellulär, wohingegen das COOH-terminale Ende intrazellulär liegt. Melanocortinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Über die Rezeptor-/Ligand-

Interaktion wird der Rezeptor aktiviert, was zur Folge hat, dass dieser in der Lage ist, über das G-Protein mit der Adenylatcyclase zu interagieren. Über die Adenylatcyclase wird ATP in cAMP umgewandelt. Erhöhte cAMP-Spiegel sind vermutlich in Verbindung mit weiteren Mechanismen für die MCR-vermittelten physiologischen Antworten verantwortlich (Haskell-Luevano et al., 1997). Über den MC-1 Rezeptor wird mittels  $\alpha$ -MSH in den Melanozyten und Keratinozyten die Haut- und Haarpigmentierung gesteuert (Lerner et al., 1961/1964). ACTH interagiert mit dem MC 2 Rezeptor. CRH steuert die ACTH-Ausschüttung und somit über die NNR die Glukokortikoidausschüttung. Die Ausschüttung von Glukokortikoid wird an den Hypothalamus übermittelt, so dass CRH bei niedrigem Glukokortikoidspiegel vermehrt ausgeschüttet wird. Bei dem mit Hyperpigmentierung einhergehenden M. Addison ist diese negative Rückkopplung besonders aktiv. Auch ektopes ACTH, wie es beim kleinzelligen Bronchialkarzinom vorkommt, bewirkt eine Hyperpigmentierung. Die verstärkte Pigmentierung kommt aufgrund der ähnlichen Struktur von ACTH und  $\alpha$ -MSH zustande (Gantz et al., 1993). Die Funktion des MC 3 Rezeptors ist bis heute nicht bekannt. Er wurde im Gehirn, dem Verdauungstrakt und der Plazenta gefunden, wobei er in den Nebennieren und malignen Melanomen überraschenderweise nicht gefunden wurde (Gantz et al., 1993).

Der fast ausschließlich im Gehirn gefundene MC 4 Rezeptor scheint, wie in vielen Tierversuchen gezeigt werden konnte, wichtig in Bezug auf Nahrungsaufnahme und Gewichtsregulierung zu sein (Huszar et al., 1997). Pharmakologisch wurde dies genutzt, um die Obesitas zu bekämpfen (Lu et al., 1994; Fan et al., 1997). Der MC 5 Rezeptor ist in vielen exokrinen Organen gefunden worden. Neben den oben aufgeführten Funktionen konnte gezeigt werden, dass MT-II, ein sehr stark und lang wirksames und widerstandsfähiges Peptid nach Injektion sowohl in Tierversuchen als auch bei menschlichen Probanden zur Erektion führt (Sahu A., 1998). Weiterhin sollen Melanocortine das Abwehrverhalten, die Entzündungsreaktionen, das Sexualverhalten sowie den Verlauf von Nervenschäden beeinflussen.

#### **1.1.4.2. $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin**

Die Suche nach endogenen Opioiden wurde durch den Nachweis spezifischer Opiatrezeptoren im Jahre 1973 angestoßen. Bereits 2 Jahre später gelang es John Hughes und Hans Kosterlitz, die ersten Vertreter dieser Substanzklasse nachzuweisen. Die Benennung der Peptide erfolgte unter Berücksichtigung des Gewebes, in dem sie gefunden worden waren, dem Gehirn: „Enkephaline“ (Huges et al., 1975). Kurze Zeit später wurden zwei weitere Gruppen von

Opioidpeptiden, die  $\beta$ -Endorphine (Li et al., 1976) und die Dynorphine (Goldstein et al., 1979) beschrieben. Das  $\beta$ -Endorphin wurde erstmals aus der Hypophyse von Kamelen extrahiert. Heute sind die Aminosäuresequenzen von  $\beta$ -Endorphin der verschiedensten Spezies bekannt. Die bedeutendste Quelle des  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphins im menschlichen Organismus ist das hypothalamisch-hypophysäre System. Im Hypophysenvorderlappen und im Nucleus arcuatus des Hypothalamus erfolgen sowohl die Synthese als auch die Speicherung und ggf. die Freisetzung einer Reihe von Botenstoffen (Watson and Barchas et al., 1979). Das  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin besteht aus 31 Aminosäuren und bildet das COOH-terminale Ende des POMC-Precursors. Durch Abspaltung COOH-terminaler  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Sequenzen entstehen Fragmente des  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (1-31), nämlich  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (1-27), (1-26), (1-17) und (1-16). Eine Gemeinsamkeit aller  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphine ist demnach die amino-terminale Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-Met. Der Verlust des Tyr-Restes beseitigt die Opioidwirkung. Die verschiedenen Fragmente des  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphins können auch N-terminal acetyliert vorkommen. Diese acetylierten  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphinderivate sind nicht in der Lage, mit Opioidrezeptoren zu interagieren.

Die Aminosäuresequenz von  $\beta$ -Endorphin kann in einige funktionell bedeutende Bereiche eingeteilt werden (Kaiser und Kézdy et al., 1984; Taylor und Kaiser et al., 1986):

- N-Terminus mit spezifischer Opioidrezeptor-Erkennungssequenz
- Hydrophile Spacerregion (Aminosäurereste 6-12)
- Zwischen den Aminosäuren Pro<sup>13</sup> und Gly<sup>30</sup>, liegt eine Sequenz von 16 Aminosäuren, die ein amphiphile  $\alpha$ - und  $\pi$ -Helix formen.
- C-Terminus für die Interaktion mit Bindungsstellen auf Vitronectin und Immunzellen

Das aus der endogenen Opioidfamilie stammende  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin spielt im ZNS vermutlich eine Rolle bei der Nozizeption, Schmerzverarbeitung, Nahrungsaufnahme und bei Verhaltensmustern (Panerai et al., 1988). Seine analgetische Wirksamkeit zählt zu den stärksten der natürlichen Substanzen (Birdsall et al., 1976).

In der Peripherie sind  $\beta$ -Endorphin und  $\beta$ -LPH vermutlich wichtig für die Immunglobulinsynthese, die Lymphozytenstimulation, die „Natürliche-Killerzellaktivität“ und andere Funktionen des Immunsystems (Gilman et al., 1982; Kay et al., 1984). Weiterhin soll  $\beta$ -Endorphin die IL-1 Produktion anregen (Apte et al., 1990).

### **1.1.4.3. N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin**

N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin und weitere acetylierte  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphinderivate sind nicht in der Lage, mit Opioidrezeptoren zu interagieren. Ihre Funktion ist nicht bekannt. Sie werden zu den Produkten des „melanotropen Systems“ der Hypophyse gezählt.

## **1.2. POMC und POMC-Derivate der Haut**

Von den POMC-Derivaten sind  $\alpha$ -MSH, ACTH und  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin die bekanntesten.  $\alpha$ -MSH wurde bereits in den 60iger Jahren entdeckt und hat offenbar eine bedeutende Funktion bei der Hautfärbung vieler Vertebraten (Lerner and McGuire et al., 1961; Thody and Graham et al., 1998). In menschlicher Haut ist nach UV-Bestrahlung eine verstärkte Melaninausschüttung zu finden, welche die Haut vor strahlungsbedingten Schäden schützt. Die Antwort auf die UV-Bestrahlung beinhaltet neben einer Zunahme der Melanozytenzahl und Melaninsynthese auch den Transfer von Melaningranula in die umgebenen Keratinozyten (Goldsmith et al., 1991). 1989 wurde zum ersten Mal vermutet, dass die Zunahme der Melanogenese nach UVB-Bestrahlung auf  $\alpha$ -MSH-Rezeptorstimulation zurückzuführen ist. Diese Vermutung basierte auf der Beobachtung, dass „Cloudman Melanomzellen“ in Kultur auf UV-Bestrahlung eine deutliche Zunahme der  $\alpha$ -MSH Bindungskapazität sowie eine deutlichere Reaktion auf  $\alpha$ -MSH zeigten (Bologna et al., 1989). Diese Hypothese wurde von vielen Arbeitsgruppen bestätigt, die kürzlich sogar zeigten, dass  $\alpha$ -MSH- und ACTH-Injektionen zu verstärkter Bräunung an sonnenexponierten Hautstellen führt (Levine et al., 1991). Von Bedeutung sind auch viele neuere Studien, die zeigen, dass  $\alpha$ -MSH wichtige immunologische Abläufe steuert, die möglicherweise die Immunantwort und Entzündungsreaktion der Haut regeln (Slominski et al., 2000).

Im Gegensatz zu  $\alpha$ -MSH liegen über die Bedeutung von ACTH und  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin in der Haut weit weniger Informationen vor. Bekannt ist, dass Patienten mit Psoriasis und atopischem Ekzem erhöhte Plasmaspiegel von  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin aufweisen (Glinski et al., 1994). Klinische Beobachtungen zeigen, dass psychischer Stress und Angstzustände die Hauterkrankungen verschlimmern. Dies führte zu der Vermutung, dass die Haut sowohl Ursprungs- als auch Zielorgan für Neuropeptide wie ACTH und  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin sein könnte. Nachdem schon einige Neurotransmitter- und Hormon-Rezeptoren in gesunder und erkrankter Haut gefunden wurden, z.B. für Substance P (Pincielli et al., 1992); ACTH (Slominski et al., 1996) oder  $\alpha$ -MSH (Chakraborty and Pawelek et al., 1993), konnte 1998 der  $\mu$ -Opiat-Rezeptor in

Keratinocyten nachgewiesen werden (Bigliardi et al., 1998). Die Entdeckung, dass der endogene  $\mu$ -Opioidrezeptorligand  $\beta_H$ -Endorphin im Serum von Psoriasispatienten erhöht ist ließ vermuten, dass das  $\mu$ -opioiderge System eine Rolle in der Pathophysiologie der Haut spielen könnte. Dies wurde durch eine Entdeckung von Bigliardi-Qi und Kollegen bestätigt (Bigliardi-Qi et al., 2000).

Sie zeigten, dass Cytokeratin 16, welches ein wichtiger Marker für Hyperproliferation in psoriasisgeschädigter Haut und anderen Hauterkrankungen ist, durch  $\beta_H$ -Endorphin in den oberen Hautschichten vermehrt wird und die  $\mu$ -Rezeptorenexpression abnimmt (Bigliardi-Qi et al., 2000). Stimulationen der Keratinocyten mit UV-Strahlung, Interleukin 1- $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA) führten Literaturberichten zufolge andererseits zu einer Zunahme von  $\beta_H$ -Endorphin (Wintzen et al., 1995; 1996); einige Jahre später wurden diese Beobachtungen allerdings nicht mehr in dieser Form bestätigt. Wintzen berichtete 2000, dass  $\beta_H$ -Endorphin-IRM in Keratinocyten nur unter eingeschränkten spezifischen Konditionen detektiert werden konnte. Ihr war es beispielsweise nur noch möglich,  $\beta_H$ -Endorphin in nährstoffarmem Medium nachzuweisen (Wintzen et al., 2000). Bei der Suche nach einer Rechtfertigung für die revidierten Forschungsergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass  $\beta_H$ -Endorphin als bekanntes Stresshormon nur unter maximalen Stresssituationen in Keratinocyten vorkommt. Der Nachweis der Bildung und Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin in Hautzellen ist demnach bis jetzt nicht eindeutig geführt worden, hinsichtlich ACTH und  $\alpha$ -MSH ist die Evidenz erheblich stärker (s. u.).

### **1.2.1. Zellen der Haut**

Die Haut stellt mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m<sup>2</sup> die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Sie dient dem mechanischen, chemischen und thermischen Schutz des Körpers, spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Temperaturregulation, Elektrolyt- und Wasserhaushalt, beherbergt Sinnesorgane und ist bei zahlreichen immunologischen Prozessen von großer Bedeutung. Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel, welches sich zu 90% aus Keratinocyten und zu etwa 10% aus Merkel-Zellen, Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphocyten sowie Nerven und kleinen Gefäßen zusammensetzt. Histologisch sind das Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und nach außen hin das Stratum corneum zu unterscheiden. Die aus dem Ektoderm stammende Epidermis schließt sich der aus dem Mesoderm stammenden Dermis an. Sie zusammen bilden die Cutis. Durch die enge Verzahnung der beiden Schichten, die durch

Papillenzapfen der Dermis zustande kommt, werden die Berührungsflächen zwischen beiden Schichten vergrößert, die Ernährung der Epidermis und die mechanische Stabilität verbessert.

### **1.2.1.1. Native Hautzellen**

#### **1.2.1.1.1. Keratinozyten**

Entwicklungsgeschichtlich entstammen die Keratinozyten dem Ektoderm. Die Epidermis besteht zum größten Teil aus mehrschichtigem, verhorntem (keratinisiertem) Plattenepithel. In ihr lassen sich mehrere Schichten voneinander unterscheiden, da die Keratinozyten unter Veränderung ihrer Struktur (Basalzelle, Stachelzelle, Körnerzelle, Hornzelle) zur Hautoberfläche wandern, wo sie als Hornschuppe abgeschilfert werden. Diese Wanderung vom Stratum basale bis zur Hornschuppe wird als epidermale Differenzierung bezeichnet und dauert etwa 5 Wochen. Keratinozyten machen nicht nur den Hauptteil der Zellen in der Epidermis aus, sondern spielen bei den Immunfunktionen der Haut eine wichtige Rolle. Neben der Produktion von immunmodulierenden Zytokinen und Chemotaxinen sind aktivierte Keratinozyten in der Lage, MHC-Klasse-II-Antigene und Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, denen eine entscheidende Aufgabe bei der Interaktion mit T-Lymphozyten zukommt. Eine mögliche T-Zellaktivierung durch die Keratinozyten wird diskutiert (Barker et al., 1991).

#### **1.2.1.1.2. Melanozyten**

Die Melanozyten sind Zellen, die in der Fetogenese von der Neuralleiste in die Haut einwandern. Sie kommen in der Basalschicht der Epidermis, im Haarfollikel und vereinzelt in der Dermis vor. Ihre Dichte ist interindividuell und lokalisationsabhängig variabel, wobei man von einer durchschnittlichen Dichte von 1100-1500 Melanozyten/mm<sup>2</sup> ausgeht. Die Brustwarzen und die Genitoanalregion gehören zu den physiologisch stärker pigmentierten Arealen mit einer größeren Melanozytendichte als die hellen Körperstellen wie Handteller und Fußsohlen. Der Unterschied zwischen hellhäutigen und dunkelhäutigen Menschen liegt dagegen nicht in der Melanozytenzahl, sondern in der stärkeren Melaninproduktion bei dunkelhäutigen Rassen. Diese Zellen gehören zu den sekretorisch aktiven Zellen. Die in den Melanozyten enthaltenen Melanosomen speichern und synthetisieren das Hautpigment Melanin. Dieses wird an die benachbarten Keratinozyten abgegeben. Im Mittel versorgt ein Melanozyt 36 Keratinozyten. Diese strukturelle und funktionelle Einheit bezeichnet man als

epidermale Melanineinheit. Die Melaninproduktion wird durch UV-Strahlung, Östrogene, POMC-Derivate (ACTH,  $\alpha$ -MSH) und unspezifische Hautentzündungen stimuliert.

### **1.2.1.2. Hautzelllinien**

Zur Erforschung von Funktionsabläufen auf zellulärer Ebene wird, um den notwendigen Bedarf an Zellmaterial zu decken, häufig auf in vitro kultivierbare Zelllinien zurückgegriffen.

#### **1.2.1.2.1. HaCaT**

Die HaCaT Zelllinie ist die erste beständige Hautzelllinie aus der Haut des Erwachsenen, die in vitro eine komplette epitheliale Differenzierung aufzeigt. Sie ist eine sehr robuste, immortalisierte und nicht maligne Zelllinie. HaCaT-Zellen sind den Keratinozyten sehr ähnlich, so wird das differenzierungsspezifische Keratin (1 und 10) sowie weitere Marker (Involuzin und Filaggrin) exprimiert und lokalisiert vorgefunden (Boukamp et al., 1988). Alle oben aufgeführten Eigenschaften verdeutlichen, dass es sich hier um ein viel versprechendes Arbeitsmaterial zum Studium der Regulation und der Funktion der menschlichen Hautzellen handelt. Unserem Labor wurde diese Zelllinie freundlicherweise von Prof. N. E. Fusenig (DKFZ-Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es wurden Zellen in Passagen von p39-p46 verwendet. Unter einer Passage werden das Herauslösen von Zellen aus dem Zellverband und das anschließende Kultivieren dieser Zellen verstanden. Boukamp zeigte bereits 1988, dass die HaCaT Zelllinie über mehr als 140 Passagen kultivierbar ist.

Nachdem HaCaT-Zellen viele Jahre nur in Monokulturen untersucht wurden, wurden kürzlich Untersuchungen an Hautäquivalenten durchgeführt. Es zeigte sich, dass HaCaT-Zellen zwar ein mehrschichtiges Epithel, jedoch keine differenzierte Architektur wie die Epidermis bilden (Boelsma et al., 1999). Bezüglich des Melanosomentransfers sind HaCaT-Zellen in der Lage, die von den Melanozyten abgegebenen Melanosomen aufzunehmen, wobei die Melanozyten nicht wie in Hautkulturen nur in der Basalschicht zu finden waren, sondern in allen Hautschichten. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse müssen Einschränkungen in Bezug auf die Verwendung von HaCaT Zelllinien für Pigmentierungsstudien gemacht werden (Lee et al., 2001).

#### **1.2.1.2.2. Colo 679**

Diese Tumorzelllinie entstammt einem menschlichen malignen Melanom und wurde 1985 von einer 47-jährigen Frau gewonnen. Morphologisch handelt es sich um eine adhärente, fibroblastische Zelllinie, die ein vielschichtiges Wachstum zeigt.

#### **1.2.1.2.3. A 431**

Die A 431 Tumorzelllinie gehört den menschlichen Epidermoidtumoren an. Sie wurde von einem soliden Tumor einer 85-jährigen Patientin gewonnen. Bei diesen Zellen wurde die Expression von EGF (epidermal growth factor) nachgewiesen. Diese Zelllinie wurde hauptsächlich für die Untersuchung der TGF (tissue growth factor)-Bindung benutzt. Morphologisch handelt es sich um eine adhärente Zelllinie, die ein einschichtiges Wachstum zeigt.

### **1.2.2. Expression von POMC und Freisetzung von POMC-Derivaten**

Es existieren Daten, die den POMC-Derivaten aus Keratinozyten und Melanozyten eine entscheidende Rolle in der Kommunikation zwischen lokalem Immunsystem und neuroendokrinem System zuschreiben. Es wurde über den Nachweis von POMC-Derivaten in menschlichen und tierischen Melanomzelllinien sowie in stimulierten menschlichen Melanomzellen berichtet (Slominski et al., 1991, Mason et al., 1989). Weiterhin wurde auch POMC-mRNA in stimulierten und unstimulierten Keratinozytenkulturen und der Epithelzelllinie A 431 gefunden (Slominski et al., 1992; Farooqui et al., 1993).

#### **1.2.2.1. Expression des POMC-Gens in Hautzellen**

In der Vergangenheit war man viele Jahre davon ausgegangen, dass POMC ausschließlich in der Hypophyse existiert, bis POMC-mRNA und POMC-Derivate auch außerhalb der Hypophyse entdeckt worden waren (Schauer et al., 1994). So wurde beispielsweise von Schauer et al. berichtet, dass bei der humanen Epidermoidzelllinie A 431 und humanen Keratinozyten durch UV-Bestrahlung, IL-1 und TPA eine verstärkte POMC Expression zu beobachten sei.

Unklar ist trotz der nachfolgend aufgeführten Veröffentlichungen, ob es sich bei der in der Haut gefundenen POMC-mRNA um „hypophysäre POMC-mRNA“ (mRNA, wie sie in der Hypophyse gefunden wurde) oder um eine Variante, d.h. das Transkript eines aberranten POMC-Gens handelt. Die in der Haut gefundene POMC-mRNA war darüber hinaus mit 0,9

kb kürzer als die in der Hypophyse gefundene (1,1 kb) (Slominski et al., 1992; Autelitano et al., 1989). Da jedoch auch POMC-mRNA entsprechend der Größe der hypophysären POMC-mRNA gefunden wurde, bleibt die Frage offen, wie diese widersprüchlichen Befunde zu erklären sind.

Farooqui demonstrierte mittels der Northern Blot Analyse das Vorkommen von POMC-mRNA in menschlichen Melanozyten. Die Melanozytenkulturen wurden entweder mit bFGF (basic fibroblast growth factor) oder TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate) kultiviert. Es zeigten sich spezifische Banden des hybridisierten POMC-Trankripts, was auf eine Expression des hypophysären POMC hinwies (Farooqui et al., 1993).

1996 wurde von Wintzen et al. über Versuche zur POMC-Expression berichtet, die mittels Northern Blot Analyse durchgeführt worden waren. Diese wiesen auf eine basale POMC-Expression in menschlichen Keratinozyten hin, die sich nach Stimulation mit UVB-Strahlung, IL-1 $\alpha$  und TPA verstärkte. Wintzen ging davon aus, dass das in Keratinozyten gefundene POMC identisch mit dem in der Hypophyse gefundenen war (Wintzen et al., 1996).

Zuvor war bereits über POMC-mRNA mit einer Länge von 1,2 kb in IL-1 stimulierten Keratinozyten, die in Medien mit niedrigem Calciumgehalt kultiviert wurden, berichtet worden (Schauer et al., 1994).

Andere Arbeitsgruppen fanden in menschlichen Geweben eine POMC-mRNA von nur 0,9 kb (Jeannotte et al., 1987).

In Fibroblasten wurde über erhöhte POMC-mRNA Produktion nach Zugabe von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) berichtet, wohingegen der Zusatz von TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) in Fibroblasten und Keratinozyten zu einer Abnahme von mRNA führte. Die Ergebnisse wurden mittels Northern Blot und RT-PCR erzielt. Die Primer stammten aus dem Bereich des Exon 3 des hypophysären POMC-Gens (Teofoli et al., 1997).

Bei Versuchen, in denen RT-PCR unter Verwendung von Primern aus dem Exon 3 des hypophysären POMC-Gens durchgeführt worden war, konnte POMC-mRNA nachgewiesen werden, die mit der hypophysären POMC-mRNA identisch schien, zum Beispiel in Melanozyten und Keratinozyten (Slominski et al., 1995).

Die Versuche von Funasaka wiesen auf, das Vorkommen von POMC-mRNA in Melanozyten und insbesondere Melanomen (Funasaka et al., 1999) hin.

Chakraborty et al. berichteten darüber, in menschlichen Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung und TPA-Stimulation hypophysäre POMC-mRNA detektiert zu haben. Die

verwendeten Primer wurden aus dem Bereich des Exon 3 des menschlichen hypophysären POMC-Gens ausgewählt; sie überspannten ein 260 bp großes Fragment. Es wurde in der Tat ein 260 bp großes Fragment amplifiziert (Chakraborty et al., 1996).

Einige Jahre später untersuchte die Arbeitsgruppe von Chakraborty, ob neben UVB-Strahlung auch Calcium die Transkription des POMC-Gens in Keratinozyten erhöht. Wie schon in den Vorversuchen ergab sich der Hinweis darauf, dass UVB-Strahlung die POMC-Gen Expression erhöht. Eine Calciumexposition während der Differenzierung zeigte keine Veränderung in der POMC-mRNA Ausbeute (Chakraborty et al., 1999).

Weiteren Berichten zufolge ist IL-1 und UVB in der Lage, in HDMECs (human dermal microvascular endothelial cells) die Menge an PC1 mRNA zeit- und konzentrationsabhängig zu beeinflussen. Die Ergebnisse basieren auf dem Einsatz von RT-PCR und Northern Blot. Ebenso wurde das Vorkommen von mRNA des PC2 Bindungsproteins 7B2 nachgewiesen (Scholzen et al., 2000).

Interessanterweise stützen sich die positiven Ergebnisse hinsichtlich der Expression von hypophysärem POMC in der Haut ausschließlich auf Untersuchungen mittels RT-PCR, bei denen die Primer aus dem Exon 3 des hypophysären POMC-Gens stammten. Anders sah das Ergebnis aus, wenn Primer-Sequenzen aus dem Exon 2 des hypophysären POMC-Gens in die RT-PCR einbezogen wurden. In diesen Untersuchungen zeigte sich entweder überhaupt kein Ergebnis oder es ergab sich der Hinweis auf ein - bezogen auf das hypophysäre POMC-Gen - aberrantes POMC-Gen (Can et al., 1998). Diesem Ergebnis der Arbeitsgruppe von Farooqui wurde von der Arbeitsgruppe von Thody vehement widersprochen (Ancans et al., 1998). Thody geht von einer Kontamination in den Proben der Arbeitsgruppe von Farooqui (Keratinozyten und Melanozyten der menschlichen Haut) aus, da die veränderten 28 Basenpaare und die daraus resultierende Sequenz derjenigen des Mäuse POMC-Gens entsprachen (Ancans et al., 1998, Can et al., 1998).

#### **1.2.2.2. Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten**

Melanozyten als auch Keratinozyten werden zu Mitgliedern des neuroendokrinen Systems und des Immunsystems der Haut gezählt. Sowohl in Keratinozyten als auch Melanozyten wurden POMC-Derivate, wie  $\alpha$ -MSH, ACTH und  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin, nach Stimulation mit UV-Licht, IL-1 $\alpha$  und Phorbol ester nachgewiesen (Schauer et al., 1994).

Neben der Frage nach dem Vorkommen von POMC-Derivaten in der Haut war die Frage ihres Wirkprinzips in der Haut ein wichtiger Anstoß für viele Arbeiten.

Die erste Veröffentlichung über das Vorkommen des POMC-Derivates  $\alpha$ -MSH in menschlicher Haut erfolgte bereits 1983 (Thody et al., 1983).

Die Arbeitsgruppe um Kippenberger berichtete über  $\alpha$ -MSH Bildung in Melanozyten- und Keratinozytenkulturen (Kippenberger et al., 1995).

In menschlichen Hautbiopsien konnte  $\alpha$ -MSH in Keratinozyten, in geringen Mengen in Langerhanszellen und in großer Menge in Melanozyten gefunden werden. ACTH wurde im Gegensatz zu  $\alpha$ -MSH in der höchsten Konzentration in Keratinozyten gefunden. Neben dem Ort des Vorkommens dieser POMC-Peptide untersuchte die Arbeitsgruppe um Kippenberger weiterhin ihre Wirkungsweise. So konnte gezeigt werden, dass sowohl  $\alpha$ -MSH als auch ACTH über MC-R wirken. Weiterhin wurden in menschlichen Hautbiopsien sowohl PC1 als auch PC2 gefunden (Wakamatsu et al., 1997). Anhand dieser Untersuchungen könnte man vermuten, dass ACTH und  $\alpha$ -MSH eine zentrale Aufgabe in den Melanozyten spielen. Da nicht in allen Melanozytenkulturen der MC1-R gefunden wurde, stellt sich die Frage, ob es nicht Varianten des MC1-R gibt. Bereits zwei Jahre vor der Veröffentlichung von Wakamatsu et al. wurde von einer anderen Arbeitsgruppe von einer großen Anzahl von MC1-R Varianten (20) bei Menschen mit rotem Haar und heller Haut berichtet (Valverde et al., 1995). Anschließend untersuchte eine weitere Arbeitsgruppe diese Fragestellung und fand heraus, dass Melanozyten bei Menschen dieses Phänotyps eine MC1-R Variante trugen und nicht auf  $\alpha$ -MSH ansprachen (Hunt et al., 1996).

In fortgeschrittenen malignen Melanomen konnte mittels immunhistochemischer Untersuchungen eine starke Anreicherung von  $\alpha$ -MSH festgestellt werden. Obwohl bekannt ist, dass verschiedene Gewebe über MC-R und Melanozyten über MC1-R auf  $\alpha$ -MSH reagieren, ist bis heute nicht bekannt, auf welchem Weg POMC-Peptide an der Entstehung von malignen Melanomen beteiligt sind (Nagahama et al., 1998).

Einige Arbeitsgruppen wie die von Chakraborty und Wintzen berichteten, dass  $\alpha$ -MSH und ACTH nach UVB-Strahlung verstärkt in Keratinozyten und Melanozyten gefunden wurden (Chakraborty et al., 1996, Wintzen et al., 1996).

Nicht nur in Hautzellen wie den Keratinozyten und Melanozyten konnten POMC-Peptide demonstriert werden,  $\alpha$ -MSH und ACTH wurden beispielsweise auch in Schweißdrüsen nachgewiesen (Thody et al., 1989).

Die Befunde zur Bildung und Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin aus Hautzellen wurden zum Teil widerrufen. Auch die Arbeitsgruppe um Wintzen, die zu den ersten gehörte, die von einer UVB-stimulierten  $\beta_H$ -Endorphin Freisetzung aus Keratinozyten berichtet hatten, publizierte 5 Jahre später, dass Einschränkungen in der Konstanz der Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin gemacht werden müssen. So konnte  $\beta_H$ -Endorphin nur in Keratinozytenkulturen detektiert werden, die in einem nährstoffarmen Medium kultiviert wurden (Wintzen et al., 1996; 2000). In malignen Melanomen und Plattenepithelkarzinomen konnte  $\beta_H$ -Endorphin gefunden werden (Slominski et al., 1998).

Auch in Naevi konnte  $\beta_H$ -Endorphin gefunden werden (Nagahama et al., 1998).

Trotz widersprüchlicher Aussagen über das Vorkommen von  $\beta_H$ -Endorphin in Keratinozyten wurden wiederholt Vermutungen geäußert, dass  $\beta_H$ -Endorphin in der Haut eine entscheidende Rolle bei der UVB-induzierten Melanogenese und der Immunmodulation der Haut spiele. Die grundsätzliche Frage jedoch bleibt, ob in Keratinozyten überhaupt  $\beta_H$ -Endorphin gebildet und freigesetzt wird.

Es wurde vermutet, dass die POMC-Derivat-Produktion zusätzlich zur UVB-Stimulation durch cAMP (cyclic adenosine monophosphate) und „active oxygen spezies“ (AOS) reguliert wird (Wintzen et al., 1996; Chakraborty et al., 1996).

Einige Arbeitsgruppen berichten vom Vorhandensein von POMC-Peptiden in der Dermis, wo sie in der anagenen Phase in Zellen der Haarfollikel vorkommen und sich dann in der äußeren Haarwurzelscheide und in Keratinozyten anreichern. In der Epidermis wurden POMC-Derivate in der Kopfhaut nachgewiesen (Slominski et al., 1993). Uneinheitlich sind die Veröffentlichungen hinsichtlich des Vorkommens von POMC-Derivaten in der Epidermis der Extremitäten und des Rumpfes. Wakamatsu konnte Peptide detektieren, Slominski hingegen konnte diesen Nachweis nicht führen (Wakamatsu et al., 1997; Slominski et al., 1993).

Auch Wintzen berichtete 1996, dass Keratinozyten nach Stimulation mit UV-Bestrahlung, IL-1 $\alpha$ , dbcAMP und Phorbol ester  $\beta_H$ -Endorphin-IRM und  $\beta$ -LPH-IRM produzieren.

### **1.2.3. Physiologische Bedeutung von POMC und POMC-Derivaten in der Haut**

POMC und POMC-Derivate spielen in verschiedenen physiologischen Funktionsabläufen eine entscheidende Rolle. In der Haut wird  $\alpha$ -MSH, neben der Bräunung der Haut als

Schutzreaktion, eine Reihe von wichtigen Immunfunktionen zugesprochen (Lerner, Mc Guire et al., 1961; Thody, Slominski et al., 2000).

Zu nennen sind hier die Suppression von IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Synthese sowie der Aktivität von CD86 und CD40 Zellen (Catania et al., 1993; Luger et al., 1993; 1999; Bhardwaj et al., 1997). Weitere antiinflammatorische Effekte sind die Blockade der neutrophilen Granulozyten, die Inhibition der Aktivität der B- und T- Lymphozyten, die Hemmung der Freisetzung von „akute Phase Proteinen“, die Hemmung einer Fieberreaktion und die Minderung von Entzündungsreaktionen verursacht durch Chemikalien, UV-Bestrahlung, Psoralen-UVA oder einer Kontaktdermatitis.

Seit 1989 ist bekannt, dass UV-Bestrahlung zu einer Erhöhung der Melanozytenzahl und Melaninproduktion in der Haut führt, was einen Schutzmechanismus vor strahlungsbedingter Schädigung darstellt. Dieser Effekt ist auf die UV-induzierte  $\alpha$ -MSH-Rezeptorstimulation zurückzuführen (Bolognia et al., 1989; Chakraborty et al., 1996). Injektionen von ACTH und MSH führen beim Menschen an sonnenexponierten Stellen zu einer verstärkten Hautbräunung (Lerner et al., 1961, Wintzen and Gilchrest et al., 1996).

In Keratinozyten menschlicher Haut, welche Schweißdrüsen und deren Ausführungsgängen benachbart sind, wurde  $\gamma$ -MSH-IRM entdeckt. Es wird daher vermutet, dass  $\gamma$ -MSH in der Haut eine wichtige Funktion bezüglich der Regulation des Elektrolythaushaltes ausübt (Donatien et al., 1992).

Nachdem 1998 bekannt wurde, dass Keratinozyten  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren besitzen, wurde nach einem pathogenetischen Zusammenhang zwischen  $\beta_H$ -Endorphin und dem Vorhandensein einer Psoriasis gesucht. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte  $\beta_H$ -Endorphinspiegel im Serum mit einem Rückgang der  $\beta_H$ -Endorphin Rezeptordichte in psoriasisgeschädigten Hautarealen einhergehen und dass die Expression von Cytokeratin 16, einem Marker, der ausschließlich bei hyperproliferativen Hauterkrankungen wie bei der Psoriasis, dem atopischem Ekzem, der progressiven systemischen Sklerodermie und den Hautkrebserkrankungen gefunden wird, dagegen deutlich erhöht ist (Bigliardi-Qi et al., 2000). Diese Erkenntnis stützt die Vermutung, dass POMC und insbesondere der  $\mu$ -Opioid-Rezeptor in der Pathogenese der Psoriasis eine Rolle spielen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass  $\beta_H$ -Endorphin die Migration der Keratinozyten sowie die Granulation und somit die Reepithelisation bei der Wundheilung fördert (Bigliardi et al., 2002).

In neueren Untersuchungen wurde nach einer funktionellen Beziehung zwischen  $\beta_H$ -Endorphin und dem  $\mu$ -Opioid-Rezeptor in Melanozyten gesucht. Es zeigte sich, dass sowohl  $\beta_H$ -Endorphin als auch der  $\mu$ -Opioid-Rezeptor in Melanozyten exprimiert werden (Kauser et al. 2003). Noch bleibt die Frage unbeantwortet, in wieweit  $\beta_H$ -Endorphin zusätzlich zu den für die Pigmentierung wichtigen POMC-Derivaten (ACTH und  $\alpha$ -MSH), unabhängig vom MC1-R, an der Hautbräunung und Melanomentstehung beteiligt ist.

Kürzlich erschienen Arbeiten, die in menschlichen Fibroblasten neben den POMC-Derivaten die Expression von Prohormon Convertase 1 (PC1) und Prohormon Convertase 2 (PC2) sowie von Faktor 7B2, der einen wichtigen Co-Faktor für die Aktivität der PC2 darstellt, nachweisen konnten. Das Vorkommen dieser Enzyme, welche die post-translationale Prozessierung der POMC-Derivate steuern, erklärt die Befunde zur POMC-Expression und zur Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten in der Haut (Schiller et al., 2001). Insgesamt muss jedoch konstatiert werden, dass die physiologische Bedeutung der POMC-Derivate noch keineswegs geklärt ist.

## 2. Fragestellung

Ausgangspunkt der Fragestellung waren Literaturberichte, denen zufolge das hypophysäre POMC-Gen in der Haut exprimiert und denen zufolge einige POMC-Derivate wie  $\alpha$ -MSH oder  $\beta$ -Endorphin aus Hautzellen freigesetzt werden sollten. Wie sich später herausstellte, waren alle Befunde zur Expression des hypophysären POMC-Gens mittels Northern Blot oder RT-PCR unter Zuhilfenahme von Sonden oder Primern aus dem Bereich des Exon 3 der Nukleotidsequenz des POMC-Gens erhoben worden. Erst 1998 wurde eine Arbeit publiziert, in der über ein offensichtlich nicht mit dem hypophysären übereinstimmendes POMC-Gen in Hautzellen berichtet wurde; dieser Befund war mit Primern erhoben worden, die das Exon 2 des POMC-Gens miteinbezogen (Can et al., 1998). Dieser Befund wurde von einer anderen Arbeitsgruppe angegriffen (Ancans et al., 1998); danach sollte es sich um eine Kontamination handeln. Seit diesem Zeitpunkt sind zu dieser diskrepanten Befundsituation keinerlei Publikationen mehr erschienen. Die Frage, inwieweit in der Haut das hypophysäre oder ein -bezogenes darauf - aberrantes POMC-Gen exprimiert wird, blieb ungeklärt.

Auch Berichte über die Freisetzung von POMC-Derivaten aus Hautzellen lagen vor. Eine Reihe von Befunden zur Freisetzung von ACTH und  $\alpha$ -MSH aus nativen Hautzellen und Hautzelllinien wie beispielsweise der Epidermoidzelllinie A 431 waren veröffentlicht worden (Schauer et al., 1994, Slominski et al., 1993, Farooqui et al., 1993). Ebenfalls war über die Bildung und Freisetzung von  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin aus Hautzellen berichtet worden, wobei ein Teil dieser Befunde widerrufen wurde (Slominski et al., 1991, 1993). So erschienen Arbeiten, wonach POMC-Derivate in der Haut nicht konstant, sondern nur unter bestimmten Versuchsanordnungen (niedrigen Calcium-Konzentrationen im Nährstoffmedium) nachgewiesen werden konnten (Wintzen et al., 2000).

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Aufklärung der Frage der Expression des hypophysären POMC und Bildung und Freisetzung von dessen Derivaten in der Haut des Menschen leisten. Als Modelle menschlicher Hautzellen fanden die humane Hautzelllinie HaCaT, die humane Epidermoidzelllinie A 431 und die humane Melanomzelllinie Colo 679 Verwendung.

Zum einen sollte mittels RT-PCR unter Zuhilfenahme von Primerpaaren, die sowohl Teile von Exon 3 als auch von Exon 2 des hypophysären POMC-Gens in die zu replizierende

Nukleotidsequenz einbezogen, geklärt werden, ob in den untersuchten Zelllinien das hypophysäre POMC-Gen oder eine Variante desselben exprimiert wurden. Die RT-PCR sollte mit Zellmaterial aus Zellen unter Basalbedingungen sowie aus Zellen nach Stimulation mit UVB 10 mJ/cm<sup>2</sup> durchgeführt werden.

Bei der gentechnologischen Suche nach dem Transkript des human-hypophysären POMC-Gens in den drei Zelllinien sollten DMS 79-Zellen (Zelllinie aus einem kleinzelligen Bronchialkarzinom) mit untersucht werden. Diese Zellen exprimieren bekanntermaßen das hypophysäre POMC und sollten somit als Positivkontrolle dienen.

Es sollte ferner die Freisetzung von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin- und N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-immunoreaktivem Material nach UVB-Stimulation mit Strahlungsintensitäten von 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 25 mJ/cm<sup>2</sup> und 50 mJ/cm<sup>2</sup> aus Zellen der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT mittels Radioimmunoassay (RIA) untersucht werden. Unter Berücksichtigung der Literaturberichte schien die Untersuchung auf der Ebene der Translationsprodukt-Prozessierung ( $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin und N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin) insbesondere in Bezug auf das Vorliegen eines eventuell aberranten Gens von besonderer Bedeutung.

### 3. Materialien

#### 3.1. Geräte und Zubehör

##### 3.1.1. Kultivierung und Stimulation von Zellkulturen

Autoklav (Varioklav Dampfsterilisator)	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Brutschrank	Heraeus Instruments Inc., Osterode
Glasmaterialien (Messkolben, Erlenmeyerkolben, Glasbecher)	Schott, Mainz
Einmalspritzen Luer	Braun, Melsungen
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer IKA	Janke und Kunke KG, Staufen
Mikroskop Wilkovert S	Hund GmbH, Wetzlar
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Kalensee, Gießen
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Radiolab, Dreieich
Pipettenspitzen mit Filter gestopft	Biozym, Hess-Oldenburg
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen Cellstar (50 ml)	Greiner GmbH, Frickenhausen
Sarstedt-Röhrchen (3,5,; 4,5; 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spannungsquelle	Elektrowerkstatt des MZI, Gießen
Tischmischer 5432	Eppendorf, Hamburg
Tischrührer (Vortexer)	Heidoph, Kelheim
UVB-Lampe mit Eich-Sensor (UV-Meter)	Waldmann, Villingen
Waagen (Feinwaage, Tischwaage):	Mettler, Zürich
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zellkulturschalen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifuge: Biofuge 13;15R	Heraeus, Köln
Zentrifuge: Labofuge 400e	Heraeus Instruments, Inc.

### 3.1.2. Suche nach POMC-mRNA

Autoklav (Varioklav Dampfsterilisator)	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Glasmaterialien (Messkolben, Erlenmeyerkolben, Glasbecher)	Schott, Mainz
Gelelektrophoresekammer Agagel-Mini	Whatman Biometra, Göttingen
Gene Amplification PCR System 2400	Perkin Elmer, Norwalk USA
Einmalspritzen Luer	Braun, Melsungen
Magnetrührer IKA	Janke und Kunke KG, Staufen
Mikroproberöhrchen (1ml)	Beckman, München
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Radiolab, Dreieich
Pipettenspitzen mit Filter gestopft	Biozym, Hess-Oldenburg
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße für PCR mit Deckel (0,2 ml)	Perkin Elmer, Beltsville USA
Sarstedt-Röhrchen (3,5,; 4,5; 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spannungsquelle	Elektrowerkstatt des MZI, Gießen
Spannungsgeber Biometra Power Pack P25	Whatman Biometra, Göttingen
Tischrührer (Vortexer)	Heidoph, Kelheim
Transluminator	Kodak Company, Rochster, N.Y.
Waagen (Feinwaage, Tischwaage):	Mettler, Zürich
Zentrifuge: Mikrofuge 22R(RNA-Zentrifuge)	Beckman, München

### 3.1.3. Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen für die Extraktion von POMC-Derivaten

Autoklav (Varioklav Dampfsterilisator)	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Extraktionsanlage	Werkstatt des MZG, Gießen
Glasmaterialien, (Messkolben, Erlenmeyerkolben, Glasbecher)	Schott, Mainz
Einmalspritzen Luer	Braun, Melsungen
Lyophilisator GT 02	Leybold Heraeus, Köln

Magnetrührer IKA	Janke und Kunke KG, Staufen
Mikroproberöhrchen (1ml)	Beckman, München
Mikrowelle	Sharp, X
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Radiolab, Dreieich
Pipettenspitzen mit Filter gestopft	Biozym, Hess-Oldenburg
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sarstedt-Röhrchen (3,5; 4,5; 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator Varishaker AM 169	Dynatech, Denkendorf
Spannungsquelle	Elektrowerkstatt des MZI, Gießen
Speed-Vac-Konzentrator	Savant, Hicksville, USA
Tischmischer 5432	Eppendorf, Hamburg
Tischrührer (Vortexer)	Heidoph, Kelheim
Ultraschallbad Sonorex RK 102	Bandelin, Berlin
Waagen (Feinwaage, Tischwaage):	Mettler, Zürich
Zentrifuge: Kühlzentrifuge Sovall RC-5B	Du Pont, Bad Homburg
Zentrifuge: Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Mikrofuge B	Beckman, München

### 3.1.4. Durchführung von RIA's

Autoklav (Varioklav Dampfsterilisator)	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Gamma-Zähler 1282 Compugamma CS	LKB, Wallac, Truku, Finnland
Einmalspritzen Luer	Braun, Melsungen
Magnetrührer IKA	Janke und Kunke KG, Staufen
Mikroproberöhrchen (1ml)	Beckman, München
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Radiolab, Dreieich
Pipettenspitzen mit Filter gestopft	Biozym, Hess-Oldenburg
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sarstedt-Röhrchen (3,5; 4,5; 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Spannungsquelle	Elektrowerkstatt des MZI, Gießen
Tischmischer 5432	Eppendorf, Hamburg
Tischrührer (Vortexer)	Heidoph, Kelheim
Waagen (Feinwaage, Tischwaage):	Mettler, Zürich
Zentrifuge: Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Mikrofuge B	Beckman, München

### **3.2. Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen**

#### **3.2.1. Kultivierung und Stimulation von Zellkulturen**

Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma, München
Enzymhemmer: Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe/Marburg
Glucose	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Serva, Heidelberg
Saccharose	Merck, Darmstadt
Tris	Boehringer, Mannheim

#### **3.2.2. Suche nach POMC-mRNA**

Agarose Ultra	Roth GmbH, Karlsruhe
DNA-Marker	Prometa, Eurogentec, Belgien
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Primer: HPO 10	Roth, Karlsruhe
Primer: HPO 13	Roth Karlsruhe
Primer: HPO 14	Roth Karlsruhe
Primer: EXO 21	Roth Karlsruhe
Puffer 6 fach	Sigma, München
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
TRI REAGENT T9424	Sigma, Missouri, USA

Zelllinien: A 431	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) und Zellkulturen, Braunschweig
Zelllinien: Colo 679	ECACC (European Collection of Cell Cultures), Salisbury, UK
Zelllinien: DMS 79	ECACC (European Collection of Cell Cultures), Salisbury, UK
Zelllinien: HaCaT	Prof. E. Fusenig, Heidelberg

### 3.2.3. Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen für die Extraktion von POMC-Derivaten

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt

### 3.2.4. Durchführung von RIA's

Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
Chloroform	Sigma, München
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma, München
Peptide: $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (1-27); (1-31)	Novabiochem, Läfelfingen, Schweiz
Peptide: $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (1-5); (1-9); (27-31); (18-31); (2-17);	Friedrich, Virologie, Gießen
Peptide: $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (1-16)	Bachem, Heidelberg
Peptide: $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (28-31)	Saxon, Hannover
Peptide: $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (29-31); (30-31)	Sigma, München
Peptide: N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (1-31)	Bachem, Heidelberg
Salze: $\text{CaCl}_2$	Merck, Darmstadt
Salze: KCL	Merck, Darmstadt

Salze: $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ ,	Merck, Darmstadt
Salze: $\text{MgSO}_4$ ,	Merck, Darmstadt
Salze: $\text{NaCl}$	C.Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salze: $\text{NaHCO}_3$ ,	Merck, Darmstadt
Salze: $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,	Merck, Darmstadt
Salze: $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,	Merck, Darmstadt
Salze: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Zelllinien: HaCaT	E. Fusenig, Heidelberg

### 3.3. Lösungen

#### 3.3.1. Kultivierung und Stimulation von Zellkulturen

Enzymhemmercocktail:	<p>① 25 mg 4-2-Aminoethyl-Benzosufonyl-Gluconide-HCL (20 mM Pefablock) in 5,2 ml <math>\text{H}_2\text{O}</math> lösen</p> <p>② 400 <math>\mu\text{l}</math> Aprotinin 0,2% (Trasylol) in 5200 <math>\mu\text{l}</math> <math>\text{H}_2\text{O}</math> lösen</p> <p>③ Beide Lösungen 1:1 mischen</p>
PBS-Defic (Phospat gepufferte Kochsalzlösung ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ )	2,68mM KCL, 136,9mM NaCL, 1,5mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4
Trispuffer	1,2113 g/l Tris (-hydroxymethyl) aminomethan
Trypsin-Lösung:	Trypsin 0,05%, EDTA 0,02%
Triscocktail	12 ml Enzymhemmercocktail mit 120 ml Trispuffer lösen (generell: 1/10 Enzymhemmercocktail zum Trispuffer geben)

#### 3.3.2. Suche nach POMC-mRNA

Agarose Gel:	1,2g Agarose mit 100 ml autoklavierten 0,01M $\text{NaPO}_4$ Puffer (Laufpuffer pH 6,5) mischen
--------------	---

Ethidiumbromid:	Stock: 10 mg/ml, 1:20 verdünnt (1 ml auf 19 ml H <sub>2</sub> O) 1:1000 eingesetzt (250µg auf 250 ml H <sub>2</sub> O)
Laufpuffer für RT-PCR:	0,01M Na-PO <sub>4</sub> -Puffer pH 6,5 H <sub>2</sub> O 20 ml NaPP-Puffer Stocklösung auf 2 l H <sub>2</sub> O auf pH 6,5 ggf. mit Phosphorsäure einstellen
Laufpuffer für Gelelektrophorese:	221 g Trispuffer mit 28,5 ml Eisessig mit 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0 mit 18,6 g 0,5M EDTA in 100 ml H <sub>2</sub> O gelöst mit 6 ml 5M NaOH auf pH 8,0 titrieren und auf 500 ml auffüllen

### **3.3.3. Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen für die Extraktion von POMC-Derivaten**

Siehe 3.3.1.

### **3.3.4. Durchführung von RIA's**

Puffer C:	20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 0,01% (w/v) bovines Serumalbumin, 0,1% (w/v) Gelatine, 0,01% (w/v) Thiomerosal, pH 7,5
Puffer D:	Entspricht Puffer C, zusätzlich 0,1% Triton X-100 (v/v)

### **3.4. Computerprogramme**

Microcal ORIGIN Version 3.5	Microcal Software, Inc.
Windows XP	Microsoft Software Inc.
Microsoft EXCEL XP	Microsoft Software Inc.
Microsoft WORD XP	Microsoft Software Inc.

## **4. Methoden**

### **4.1. Kultivierung der untersuchten Zelllinien**

#### **4.1.1. Die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT**

Die HaCaT-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 1% fetalem Kälberserum (FCS), 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in einem begasten (5% CO<sub>2</sub>) und auf 37°C temperierten Brutschrank kultiviert. Sollte 100%ige Konfluenz zum Versuchstag erreicht werden, wurden diese Zellen 48 Stunden vor dem Versuchsbeginn aus dem Zellverband herausgelöst und auf (35 mm oder 60 mm) Zellkulturschalen ausgesät. Bei erwünschter 50%iger Konfluenz wurden die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn abgelöst und neu gesät. Bei variierender Versuchsanordnung betrug die Konfluenz am Stimulationstag 50% oder 80%. Die Zelllinie HaCaT wurde uns freundlicherweise von Prof. Fusenig, DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt.

#### **4.1.2. Die humane Melanomzelllinie Colo 679**

Diese Zellen wurden in 90% RPMI 1640 (Rosswill Park Memorial Institute) mit 10% FCS, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin im begasten (5% CO<sub>2</sub>), auf 37°C temperierten Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden in dieser Arbeit nur zu gentechnologischen Untersuchungen herangezogen. Die Konfluenz dieser Zellen lag am Stimulationstag bei ca. 80%. Die Zelllinie COLO 679 wurde von der ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) bezogen.

#### **4.1.3. Die humane Epidermoidzelllinie A 431**

Diese Zellen wurden in 90% RPMI 1640 (Rosswill Park Memorial Institute) mit 10% FCS, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin im begasten (5% CO<sub>2</sub>), auf 37°C temperierten Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden in dieser Arbeit nur zu gentechnologischen Untersuchungen herangezogen. Die Konfluenz dieser Zellen lag am Stimulationstag bei ca. 80%. Die Zelllinie A 431 wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen.

#### **4.1.4. Die humane Bronchialcarzinomzelllinie DMS 79**

Diese Zellen wurden in 90% RPMI 1640 (Rosswill Park Memorial Institute) mit 2 mM Glutamine und mit 10% FCS, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin im begasten (5% CO<sub>2</sub>), auf 37°C temperierten Brutschrank kultiviert. Die von einem

kleinzelligen Bronchialcarzinom stammende Zelllinie DMS 79 (ICLC HTL08009) wurde als Positivkontrolle bei gentechnologischen Untersuchungen benutzt. Die Konfluenz dieser Zellen lag am Stimulationstag bei ca. 80%. Die Zelllinie DMS 79 wurde von ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) bezogen.

#### **4.2. Stimulation der Zellkulturen mittels UVB-Bestrahlung**

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte in enger Anlehnung an die von Chakraborty 1996 veröffentlichten Ergebnisse, die zeigten, dass Keratinozyten im Gegensatz zu Melanozyten eine höhere Bestrahlungsdosis benötigen, um POMC zu exprimieren (Chakraborty et al., 1996). Die Stimulation der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 50% oder 80% mit UVB-Bestrahlung in drei verschiedenen Intensitäten (10 mJ/cm<sup>2</sup>, 25 mJ/cm<sup>2</sup> und 50 mJ/cm<sup>2</sup>). Es wurde eine PL-Lampe mit einem UVB-Strahler „Typ UV21“ verwendet. Diese Lampe hat ein Strahlungsspektrum von 280 nm bis 360 nm mit einem Maximum bei 313 nm.

Die Lampe wurde bei allen Versuchen konstant in einer Höhe von 15 cm über dem Boden der Zellkulturschale angebracht. Bei den Zellkulturschalen handelte es sich in der Regel um 60 mm Schalen. Vor Bestrahlung der Schalen musste die Leistung der Lampe mittels dreiminütiger Vorbestrahlung eines UV-Meters der Firma Waldmann gemessen werden. Bei somit festgestellter Leistung der Lampe und festgelegtem Abstand vom Objekt wurden verschiedene Stufen der Bestrahlungsenergie durch Variation der Bestrahlungszeit erreicht. Die Bestrahlungszeit in Sekunden ergab sich durch folgende Berechnung:

*Erwünschte Bestrahlungsenergie, z.B. 10 (mJ/cm<sup>2</sup>) / gemessene Leistung der UV-Lampe, z.B. 0,37 (mW/cm<sup>2</sup>) => Bestrahlungszeit in Sekunden, z.B. 27 sec.*

Nachdem die Bestrahlungszeiten ermittelt waren, erfolgte die Abnahme des Kulturmediums (DMEM) und die Aufgabe von auf 37°C temperiertem D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline solution) (50% des Volumens des Kulturmediums). Grund für den Medienwechsel war die Absorption der UV-Strahlung durch DMEM (rote Färbung). Es wurden jeweils 3 Schalen aus dem Brutschrank genommen und mit der gleichen Bestrahlungsenergie bei Raumtemperatur bestrahlt. Im Anschluss an die Bestrahlung wurde der Puffer sofort abgenommen und die Zellen mit neuem vortemperiertem Kulturmedium entsprechend dem Ausgangsvolumen beschickt. Hierbei war es besonders wichtig, schnell und präzise zu

arbeiten, um Nährstoffdefizit oder eine Schädigung infolge Temperaturwechsels zu vermeiden.

Um festzustellen, ob der Medienwechsel vor bzw. nach der Bestrahlung Einfluss auf das Zellverhalten hat, wurde bei einem Teil der Zellen kein Medienwechsel vorgenommen, ein Teil nach der Bestrahlung mit frischem Medium und ein weiterer Teil mit zuvor abgenommenem Medium versorgt. Bei den Kontrollen, die nicht mit UV-Licht bestrahlt wurden, wurde zum Teil ein Medienwechsel vorgenommen, bei einem weiteren auf den Medienwechsel verzichtet.

Nach Stimulation und Medienwechsel verblieben die Zellen bis zur Aufarbeitung im 37°C temperierten und mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank. In der Regel wurden die Zellen 24 Stunden nach der Stimulation aufgearbeitet. Eine Ausnahme war ein Versuch, bei dem die Zellen nach Intervallen von 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden aufgearbeitet wurden. Zellkulturschalen, die nicht mit UV-Licht stimuliert wurden, sonst aber gleich behandelt wurden, dienten als Kontrollen.

### **4.3. Suche nach m-RNA des hypophysären POMC in HaCaT-, Colo 679- und A 431-Zellen**

Für den Einsatz dieser Methodik waren besondere Voraussetzungen notwendig. So war es besonders wichtig, dass steril gearbeitet wurde, d.h. Handschuhe benutzt und diese regelmäßig gewechselt wurden. Gefäße, Röhrchen, Spitzen und Glaspipetten mussten autoklaviert, und einige Lösungen wie Natriumacetat steril filtriert werden.

#### **4.3.1. RNA-Extraktion**

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS-defic (3 ml) gewaschen. Danach folgte die Zugabe von 1 ml Tri-Reagent zur Ablösung und Lyse der Zellen. Mit Abimed-Pipetten (sterile Pipettenspitzen) wurde das Lysat zusammen mit 200 µl Chloroform in 2 ml Eppendorfgefäße pipettiert, kurz geschüttelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4°C für 15 Minuten bei 12000g zentrifugiert. Es zeigten sich 3 Phasen. Die rote organische Phase enthielt Protein, die Zwischenphase DNA und der Überstand (die wässrige Phase) RNA. Die wässrige Phase (ca. 650 µl) wurde zusammen mit 500 µl Isopropanol in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Dieses

wurde geschüttelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte das Zentrifugieren bei 12000g für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgegossen und die verbleibenden Pellets mit 1 ml 75% Ethanol pro ml Tri-Reagent versetzt und geschüttelt. Danach wurde für 5 Minuten bei 7500g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und abgetropft und das verbleibende Pellet auf dem Heizblock bei 45°C getrocknet. An dieser Stelle war es wichtig, das Pellet nicht zu trocken werden zu lassen, da es sonst im nächsten Schritt, in dem 10 µl RNase-freies Wasser aufgegeben wurden, nur schwer löslich war. Die Wiederaufnahme erfolgte unter Zuhilfenahme des Heizblocks (45°C). Die RNA-Probe wurde bis zur Durchführung der RT-PCR bei -80°C gelagert.

#### **4.3.2. RT-PCR**

Bei der reversen Transkription (RT) wird die (extrahierte) RNA unter Zuhilfenahme einer reversen Transkriptase in die komplementäre cDNA umgeschrieben. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, unter Verwendung von synthetischen Oligonucleotiden (Primern), die mit jeweils einem der Stränge an beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, beliebige DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Zu einer Anreicherung des DNA-Abschnitts zwischen den beiden Primerbindungsstellen kommt es durch wiederholtes Durchlaufen der Arbeitsschritte: DNA-Denaturierung, Primerbindung, und Synthese unter Einsatz von DNA-Polymerase. Ein nützliches Anwendungsgebiet dieser RT-PCR ist die Messung der Mengenverhältnisse einer mRNA in verschiedenen Geweben oder zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die mRNA-Menge in einer Zelle ein Indikator für die Menge des gebildeten Translationsprodukts, d.h. des Proteins ist. Diese Erfassung der mRNA erfolgte früher ausschließlich durch Northern-Hybridisierung. Die RT-PCR ist wesentlich spezifischer und benötigt kleinere Mengen an Untersuchungssubstrat.

##### **4.3.2.1. RT-PCR-Ansätze**

Es wurden drei Zelllinien (HaCaT, Colo 679 und A 431) verwendet, um die POMC-Expression auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Als Positivkontrolle wurden die DMS 79-Zellen mitgeführt. Aus dem hypophysären POMC-Gen wurden 3 Primerpaare gewählt. Der am 3'-Ende von Exon 3 liegende Primer HPO 10 wurde mit den anderen Primern kombiniert. Die Primerpaare HPO 10/HPO 13 und HPO 10/HPO 14 schlossen Nukleotidsequenzen aus dem Exon 3 ein. HPO 10 und der aus dem Exon 2 stammende Primer

EXO 21 überspannten zusätzlich Intron B. Die Struktur der Primer stellt sich folgendermaßen dar:

HPO 10 5' > TGC CCT CAC TCG CCC TTC TTG TAG < 3'

HPO 13 5' > AAG CGG CGC CCA GTG AAG GT < 3'

HPO 10 5' > TGC CCT CAC TCG CCC TTC TTG TAG < 3'

HPO 14 5' > GCC GAC CTG GAG CAC AGC CT < 3'

HPO 10 5' > TGC CCT CAC TCG CCC TTC TTG TAG < 3'

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

Für alle RT-PCR-Reaktionen wurde das Qiagen OneStep RT-PCR Kit verwendet. Bei der Errechnung der benötigten Lösungsmenge wurde eine zusätzliche Probe eingerechnet, was bei Versuchsgrößen von 9-11 Proben ungefähr der empfohlenen Reserve von 10% entsprach. In Tabelle 1 sind die Komponenten des Reaktionsgemisches aufgeführt. Es war wichtig, erst das RNase freie Wasser mit dem 5xPuffer zu mischen. Die Zugabe der anderen Komponenten folgte der in Tabelle 1 aufgeführten Reihenfolge, wobei der RNA-Extrakt erst nach Erstellung und Verteilung der anderen Komponenten des Reaktionsgemisches (48 µl) in jedes PCR-Reaktionsgefäß zugegeben wurde. In jedem Versuch wurde ein PCR-Blank mit RNase freiem Wasser (ohne RNA-Extrakt) angesetzt, die RNA-Proben wurden jeweils doppelt erstellt (RT+/RT-).

Komponenten	Volumen/Probe
RNase-freies Wasser	33,4 µl
5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	10,0 µl
dNTP Mix 10 mM	2,0 µl
Primer A	0,3 µl (0,6 µM)
Primer B	0,3 µl (0,6 µM)
Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix	2,0 µl
m-RNA der Hautzelllinien	2,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

**Tabelle 1: Reaktionsgemisch der RT-PCR-Ansätze**

Tabelle 2 zeigt das Beispiel einer Probenzusammenstellung. Die mit ungeraden Ziffern belegten Proben wurden 30 Minuten bei 50°C zur Aktivierung der Transkriptase in den Thermocycler gestellt (RT[+]-Proben). Anschließend wurden die restlichen Proben (mit geraden Ziffern = RT[-]-Proben) dazugestellt und 15 min. zur Inaktivierung der Transkriptase und Aktivierung der Polymerase bei 95° inkubiert. In diesem Schritt wurde gleichzeitig die cDNA denaturiert. Es folgten 35 Zyklen der folgenden Sequenz: 50 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 1 Minute „Primer-Annealing“ bei 58°C und 1 Minute DNA-Synthese bei 72°C. Beendet wurde die PCR mit 10 Minuten Inkubation bei 72°C und einer abschließenden Konservierung bei 4°C.

Nummer der Probe	Volumen pro Probe	Zellinie/Material
1	2 µl	RNase freies Wasser
2 + 3	Je 2 µl	A 431 UVB-bestrahlt
4 + 5	Je 2 µl	A 431 Kontrolle-unbestrahlt
6 + 7	Je 2 µl	Colo 679 UVB-bestrahlt
8 + 9	Je 2 µl	Colo 679 Kontrolle-unbestrahlt
10 + 11	Je 2 µl	DMS 79

**Tabelle 2:** Beispiel für die Anordnung von Proben auf einem Agarosegel (s.u.); Zellmaterial und Testansätze variierten, nicht aber die Art der Verarbeitung oder die RT+ und RT-Kontrollen.

#### 4.3.2.2. Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte auf einem 1,2% Agarosegel. In die erste Kammaussparung wurden 7,5 µl eines Nucleotidsequenz-Längenmarkers aufgetragen. Daneben wurden die PCR-Proben in die Geltaschen aufgetragen, wobei jeweils 15 µl PCR-Probe mit 3 µl 6-fach-Puffer gemischt wurden. Die Auftrennung erfolgte bei 90V über ca. 60 Minuten. Um die Position der Nucleotidsequenzen zu markieren, wurde das Gel für weitere 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung gelegt.

#### 4.3.2.3. Dokumentation

Unter einer UV-Lampe konnten die Nucleotidbanden sichtbar gemacht werden. Nach photographischer Dokumentation erfolgte die Ergebnisanalyse.

#### **4.4. Suche nach Derivaten des hypophysären POMC in HaCaT Zellkulturen**

##### **4.4.1. Aufarbeitung der Zellkulturen**

###### **4.4.1.1. Probenherstellung aus Zellkulturüberständen**

Nach Herausnehmen der Zellkulturschalen aus dem Brutschrank erfolgte die Aufarbeitung im Zellkultur-Labor bei Raumtemperatur. Die Überstände der mit gleicher Intensität bestrahlten Schalen wurden abgenommen und gepoolt. Bei Schalen mit 35 mm Durchmesser waren es 2 ml pro Schale und bei Schalen mit 60 mm Durchmesser 4 ml pro Schale. Die gesammelten Zellkulturüberstände wurden mit Enzymhemmercocktail (1/10 des Zellkulturüberstandsvolumens) versetzt. Durch zusätzliches Ansäuern mit 1/25 des Zellkulturüberstandsvolumens mit 1 N HCL stellte sich ein pH-Wert von 3,0 – 3,5 ein. Diese Proben wurden bis zur Extraktion bei -20°C gelagert. Vor der Extraktion, welche den nächsten Schritt der Weiterverarbeitung darstellte, wurden die aufgetauten Proben bei 16000g für 30 Minuten zentrifugiert.

###### **4.4.1.2. Probenherstellung aus Zellen**

Die von dem Zellkulturüberstand befreiten, am Boden der Zellkulturschale haftenden Zellen wurden einmal mit PBS-defic gespült. Die Spülmenge betrug 50% des Zellkulturüberstandsvolumens, d.h. 1 ml bei 35er Schalen und 2 ml bei 60er Schalen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurde die gleiche Menge an 0,05% Trypsin-Lösung wie zuvor an Spüllösung aufgegeben und die Zellkulturschalen für weitere 15 Minuten in den Brutschrank zurückgestellt. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurde pro Ansatz eine Schale verwendet um die Zellkonzentration in der „Neubauer-Zählkammer“ zu bestimmen.

An diesem Punkt wurde die Durchführung der Zellysat-Herstellung im Laufe der Untersuchungen geändert. So wurden zwar zu Beginn der Versuche die Zellen, die mit einer bestimmten Energie, z.B. 10 mJ, bestrahlt worden waren, gezählt, und die unterschiedlichen Zellkonzentrationen registriert, jedoch ungeachtet der Abnahme der Zellkonzentration bei hohen Strahlungsintensitäten gepoolt und weiterverarbeitet. Die unterschiedlichen Zellmengen wurden bei der Auswertung der Versuchsdaten entsprechend berücksichtigt.

Um von gleichen Zellmengen und somit von absolut vergleichbaren Versuchsansätzen ausgehen zu können, wurden spätere Versuche so durchgeführt, dass gleich viele Zellen pro Kontrolle und Bestrahlungsansatz aufgearbeitet wurden. Um auf gleiche Zellzahlen zu

kommen, wurden hierbei Schalen gleicher Strahlungsintensität gepoolt. Dieses Vorgehen machte die Ergebnisse durch Ihre Vergleichbarkeit valide.

Nach dem Poolen der Zellen folgte das Zentrifugieren in der Biozentrifuge für 5 Minuten bei 285g. Die Trypsin-Lösung wurde sehr vorsichtig abpipettiert und verworfen und die verbleibenden Zellpellets mit 10 mM „Trispuffer-Enzymhemmercocktail“ resuspendiert. Das aufgegebene Volumen betrug 50% des Zellkulturüberstandvolumens. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C inkubiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen 30 Sekunden bei 4°C im Ultrasonic-Bad beschallt und anschließend mit 50% des Zellüberstandvolumens an 0,005 N HCL angesäuert. Durch das Ansäuern stellte sich, entsprechend den Überständen, ein pH-Wert von 3,0 – 3,5 ein. Dann wurden die Zellysate für 30 Minuten bei 16000g zentrifugiert und im Anschluss daran die Überstände abpipettiert und extrahiert.

#### **4.4.1.3. Zellzählung**

Die Zellzählung erfolgte im Sinne einer Viabilitätsprüfung. Wie oben bereits beschrieben, war dies besonders für die späteren Versuche, welche die gleiche Zellmenge pro Ansatz vorsahen, von großer Bedeutung. Von den Schalen, in denen sich die stimulierten Zellen befanden, wurde je eine Schale pro Ansatz ausgezählt. Die Zellen in den Kontrollschalen, die nicht mit UVB-Strahlung stimuliert aber sonst gleich behandelt wurden, galten als Vorgabe für das spätere pooling. Die Präparation der Zellen entsprach prinzipiell der bereits oben beschriebenen Vorgehensweise. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, die adhären Zellen mit PBS-defic (die Hälfte des Überstandvolumens) gespült und anschließend zum Ablösen mit 0,05% Trypsin-Lösung (die Hälfte des Überstandvolumens) versetzt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation in dem mit 5% CO<sub>2</sub> begasten und auf 37°C temperierten Brutschrank. In der Regel waren die Zellen dann komplett vom Boden abgelöst und schwammen in der Trypsin-Lösung. Zur Kontrolle wurden die Schalen vor Suspensatabnahme mikroskopisch betrachtet und die Inkubationszeit bei Vorhandensein nicht abgelöster Zellen verlängert. Nach Abnahme der Zellsuspension wurde diese gut durchmischt und ein Aliquot zum Zählen auf die „Neubauer-Zählkammer“ gegeben. Auf diese Weise konnte die Gesamtzellkonzentration ermittelt werden. Die Werte schwankten zwischen 2 Mio. und 50 Tsd. Zellen/ml je nach Bestrahlungsintensität.

#### **4.4.2. Standardisierung des Aufbereitungsverfahrens**

Die Erstellung von Standardkurven war notwendig, um die Peptidkonzentration in den Proben der Stimulationsversuche bestimmen zu können. Zwecks Standardisierung wurden Proben erstellt, die eine definierte Peptidkonzentration enthielten.

Die HaCaT-Zellen wurden wie unter 4.1. beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden 48 Stunden vor Versuchsbeginn aus dem Zellverband herausgelöst und auf 145 mm oder 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Konfluenz betrug bei Versuchsbeginn zwischen 80% und 100%. Die Aufarbeitung erfolgte ohne UVB-Stimulation.

##### **4.4.2.1. Herstellung von Überstandpräparaten**

Die Überstände wurden von den Schalen abgenommen und gepoolt. Bei den 145 mm (100 mm) Zellkulturschalen waren es pro Schale 20 ml (12 ml). Zum Gesamtvolumen wurden 10% dieses Volumens an Enzymhemmercocktail zugegeben. Im Gegensatz zu der unter 4.4.1.1. beschriebenen Aufarbeitung wurde hier nicht mit HCL angesäuert. Dann wurde für 30 Minuten bei 16000g zentrifugiert und anschließend wie unter 4.4.2.3. beschrieben, filtriert. Nachfolgend wurden die Überstand-Filtrate bei 4°C für 30 Minuten im Kühlraum aufbewahrt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Standards (4.4.2.4.).

##### **4.4.2.2. Herstellung von Zellysaten**

Die Zellen (145 mm Schalen) wurden mit 10 ml PBS-defic gewaschen (Hälfte des abgenommenen Überstandvolumens) und mit 10 ml Trypsin-Lösung (ebenso 50% des Überstandvolumens) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten in dem mit 5% CO<sub>2</sub> begasten und auf 37°C temperierten Brutschrank wurden die abgelösten, in Trypsin-Lösung befindlichen Zellen von der Zellkulturschale abgenommen, gut resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Es folgte das Zentrifugieren in der Biozentrifuge für 5 Minuten bei 285g. Die Trypsin-Lösung wurde sehr vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die verbleibenden Zellpellets wurden mit 10 mM „Trispuffer-Enzymhemmercocktail“ resuspendiert, wobei die aufgegebene Menge bei 145 mm Schalen 10 ml (50% des Zellüberstandvolumens) betrug. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C inkubiert und dann für mindestens 10 Stunden bei -20°C eingefroren. Vor der Filtration wurden die Proben aufgetaut, im Kühlraum für ca. 30 sec. im Ultrasonic-Bad beschallt und im Anschluss daran für 30 Minuten bei 16000g zentrifugiert. Die Überstände aus dieser

Zentrifugation wurden filtriert (4.4.2.3.) und zu den Lysat-Filtraten Standards zugesetzt (4.4.2.4.).

#### **4.4.2.3. Filtration**

Die Filtration der Lysate und Überstände erfolgte über die Extraktionsanlage. Die Kartuschen der Extraktionsanlage wurden durch Aufgabe folgender Lösungen aktiviert: 5 ml Methanol, 5 ml Harnstoff (8M) und 10 ml Aqua bidestillata. Anschließend wurden jeweils 5 ml Überstand- bzw. Lysat-Probe auf die Kartuschen aufgegeben und die Filtrate in den zuvor eingeschobenen Sammelröhrchen aufgefangen. Bis zum Pipettieren der Standards wurden die Überstand- bzw. Lysatproben-Filtrate bei 4°C gelagert und für die Herstellung der Extraktionsstandardproben gepoolt.

#### **4.4.2.4. Herstellung von Standardproben**

Von dem zuvor gepoolten Überstandfiltrat wurden je 5 ml in Sarstedt-Röhrchen pipettiert und 10 µl Peptidlösung ( $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin bzw. N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin) in ansteigenden Konzentrationen zugesetzt (1 – 10.000 fmol/Ansatz). Leerproben für die Herstellung von Leerextrakten wurden ohne Peptid angesetzt. Dann wurden die Überstand-Filtrate mit je 200 µl HCL (1,0 N) angesäuert, für wenige Sekunden auf dem Rüttler durchmischt und anschließend bei -20°C eingefroren. Die Standardisierung des Aufarbeitsverfahrens der Testproben erfolgte im Falle der Überstände demnach unter Einschluss sämtlicher Aufarbeitungsschritte.

Von dem filtrierten und gepoolten Lysat-Filtrat wurden nun je 2,5 ml sowie 2,5 ml HCL (0,005 N) und 20 µl Peptidlösung in ein Sarstedt-Röhrchen pipettiert. Die Peptide und Konzentrationen entsprachen denen der Überstände. Leerproben für die Herstellung von Leerextrakten wurden ohne Peptid angesetzt. Die Lysat-Filtrate wurden wie die Überstand-Filtrate für wenige Sekunden auf dem Rüttler durchmischt und dann bei -20°C eingefroren. Die Standardisierung des Aufarbeitsverfahrens der Testproben erfolgte somit im Falle der Zellen unter Einschluss sämtlicher Lösungskomponenten, jedoch unter Ausschluss von Einfrier- und Auftauprozess, Ultraschall und Zentrifugation der Proben bei 16000g für 30 Minuten vor der Filtration.

### **4.4.3. Extraktion der Standard- und Testproben**

#### **4.4.3.1. Durchführung der Extraktion**

Vor der Extraktion wurden alle Test- und Standardproben (Zellysate und Zellüberstände) aufgetaut und für 30 Minuten bei 16000g zentrifugiert. Von den Überständen dieser Zentrifugation wurden 5 ml auf die Kartuschen einer Extraktionsanlage aufgegeben, die zuvor mit 5 ml Methanol, dann mit 5 ml Harnstoff (8M) und zuletzt mit 10 ml Aqua bidestillata aktiviert worden waren. Anschließend wurden die Kartuschen mit 10 ml Aqua bidestillata und 10 ml 4%iger Essigsäure gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Desorption der an das Kartuschenmaterial adsorbierten Peptide (Elution). Die Sammelröhrchen wurden unter den Kartuschen platziert und 10 ml 1-Propanol (96%) / Essigsäure (4%) -Gemisch aufgegeben. Das Eluat wurde aufgefangen und die Sammelröhrchen entfernt. Danach wurden die Kartuschen mit 10 ml Essigsäure (4%), gefolgt von 10 ml Aqua bidestillata und zuletzt mit 5 ml Harnstoff (8M) gespült. Zur Fortsetzung der Extraktion mit anderen Proben musste die Anlage wieder wie oben beschrieben aktiviert werden. Zur Beendigung der Extraktion wurden an dieser Stelle 5 ml Methanol aufgegeben.

#### **4.4.3.2. Weitere Arbeitsschritte**

Im Anschluss an die Extraktion wurden alle Extrakte, sowohl die der Überstände als auch die der Lysate für 2 Stunden im Kühlraum bei 4°C gelagert. Über Nacht (ca. 12 Stunden) wurde das organische Lösungsmittel im Speed-Vac-Konzentrator entfernt. Am nächsten Morgen wurden auf alle Proben 500 µl Aqua bidestillata aufgegeben. Danach wurden sie erneut für mindestens 2 Stunden bei -20°C eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden im nächsten Schritt über Nacht (ca. 12 Stunden) lyophilisiert. Auf die Lyophilisate wurden 500 µl Puffer C aufgegeben, darauf folgend wurden sie für 2 Stunden im Kühlraum bei 4°C auf dem Rüttler gelöst und anschließend aliquotiert.

### **4.4.4. Bestimmung von POMC-Derivaten in den Probenextrakten mittels Radioimmunoassay (RIA)**

Der konventionelle One-Site Fluid-Phase-Radioimmunoassay ist eine empfindliche und bewährte Methode zum Nachweis von Peptiden. Bei dieser Methode konkurrieren ein radioaktiv markiertes und ein nicht markiertes Antigen um die Bindungsstelle eines Antikörpers.

#### **4.4.4.1. Durchführung**

Die Radioimmunoassays wurden in 1,5 ml Eppendorffgefäßen bei 4°C durchgeführt. Das Ansetzen der Inkubationsansätze erfolgte durch Pipettieren der einzelnen Komponenten in der Reihenfolge wie in Tabelle 3 und 4 angegeben. Anschließend wurden die Inkubationsansätze gut durchmischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde allen Inkubationsansätzen, mit Ausnahme der CT-Werte, 300 µl Kohlesuspension (1% Aktivkohle, 0,5% BSA in Puffer C) zugegeben, um freies, nicht an Antikörper gebundenes Peptid an Aktivkohle zu adsorbieren. Erneut wurde für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze für 4 Minuten bei 8800 g zentrifugiert und für weitere 10 Minuten auf Eis stehend gekühlt, bis anschließend aus jedem Reaktionsgefäß 450 µl Überstand in ein Polystyrol-, „RIA-Röhrchen“ abpipettiert wurden. Es folgte die Bestimmung der Radioaktivität, d.h. des an den Antikörper gebundenen radioaktiv markierten Peptids, im Gamma-Counter. Die Dauer der Messung betrug 1 Minute pro Röhrchen.

#### **4.4.4.2. Inkubationsansätze**

Die in den Inkubationsansätzen enthaltenen Komponenten sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt. Das Inkubationsvolumen betrug bei allen Überständen und Lysaten 240 µl.

#### **Erläuterung der mittels der Inkubationsansätze ermittelten Werte:**

##### **C<sub>T</sub>-Wert: Total Counts**

Mit diesem Wert wurde die Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz bestimmt.

##### **Blank (BL)-Wert: Leerwert**

Dieser Wert diente zur Bestimmung unspezifischer Radioaktivität im Überstand, die nicht auf die Bindung des markierten Peptids an Komponenten des Antiserums zurückzuführen war. Der Geräteleerwert ging mit in den Blank-Wert ein. Die Auswertung der C<sub>T</sub>-, B<sub>0</sub>- und Standardwerte erfolgte nach Subtraktion des B<sub>L</sub>-Wertes.

##### **B<sub>0</sub>-Wert: Kontrollstandard**

Er diente zur Bestimmung derjenigen Menge an radioaktiv markiertem Peptid, die vom Antikörper in Abwesenheit nicht radioaktiv markierter Liganden gebunden werden konnte.

**Standard-Werte**

Diesen Inkubationsansätzen wurden festgelegte Mengen an nicht markiertem Peptid zugesetzt, um Standardkurven zu erstellen. Mit Hilfe dieser Kurven konnte die Konzentration des Peptids ( $\beta_H$ -Endorphin) in einer zu untersuchenden Probe bestimmt werden.

	C <sub>T</sub> -Wert	Blank/ Lysat	B <sub>0</sub> / Lysat	Standard/ Lysat	Probe/ Lysat
Standardextrakt/ Lysat (in Puffer C)				50 $\mu$ l	
Leerextrakt/ Lysat (in Puffer C)		50 $\mu$ l	50 $\mu$ l		
Probenextrakt (in Puffer C)					50 $\mu$ l
Puffer C	500 $\mu$ l	150 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Puffer D	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Antikörper in Puffer C	-	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
( <sup>125</sup> I)markiertes Antigen in Puffer D (Tracer)	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Inkubation					
Kohlesuspension	-	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l

**Tabelle 3: Inkubationsansätze zur Bestimmung von  $\beta_H$ -Endorphin-IRM oder N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-IRM in Zellysaten**

	C <sub>T</sub> -Wert	Blank/ Überstand	B <sub>0</sub> / Überstand	Standard/ Überstand	Probe/ Überstand
Standardextrakt/ Überstand (in Puffer C)				100 $\mu$ l	
Leerextrakt/ Überstand (in Puffer C)		100 $\mu$ l	100 $\mu$ l		
Probenextrakt (in Puffer C)					100 $\mu$ l
Puffer C	500 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Puffer D	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Antikörper in Puffer C	-	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
( <sup>125</sup> I)markiertes Antigen in Puffer D (Tracer)	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Inkubation					
Kohlesuspension	-	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l

**Tabelle 4: Inkubationsansätze zur Bestimmung von  $\beta_H$ -Endorphin-IRM oder N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-IRM in Zellkulturüberständen**

#### 4.4.4.3. Auswertung der Ergebnisse

Zur Interpretation der im Gamma-Counter gemessenen Radioaktivität (cpm) wurde die Radioaktivität in den Überständen der Standardansätze gegen die Konzentrationen an unmarkierten Liganden (unter Benutzung des Fitprogramms „Logistic“ im technisch-wissenschaftlichen Zeichenprogramm ORIGIN) in einem Koordinatensystem aufgetragen. Es ergab sich eine sigmoidal verlaufende, sich asymptotisch an die X-Achse annähernde Kurve. Die Parameter dieser Fit-Kurve ( $p$ ,  $x_0$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ) konnten in die folgende, durch Umformung der Logistischen Gleichung erhaltenen Formel eingesetzt werden:

Gleichung des ORIGIN-Fit-Programms „Logistic“:

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

Umstellung ORIGIN-codiert:

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

[P: Steigung,  $X_0$ : Wendepunkt,  $A_1$ : initialer Y-Wert (in Abwesenheit von Verdrängern des  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptids),  $A_2$ : endgültiger Y-Wert (in Anwesenheit eines Überschusses an Verdrängern des  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptids)]

Das Erstellen der Standardkurven im ORIGIN-Programm ermöglichte es, im nächsten Schritt die Radioaktivitäten (cpm) der Test-Probenwerte aus den Stimulationsversuchen bestimmten Peptidmengen in den Ansätzen zuzuordnen. Es war sowohl die graphische Auswertung über die Standard-Fit-Kurve mittels eines „toolreaders“, als auch die arithmetische Umrechnung über die Formel in die Peptidmenge möglich. Es wurden jeweils Doppelwerte an Radioaktivität bzw. an Peptidmengen bestimmt, aus denen dann Mittelwerte ( $x_{\text{mean}}$ )/- Standardabweichung (SD) berechnet wurden.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Ausschluss der Expression des hypophysären POMC in HaCaT-Zellen

#### 5.1.1. Ausschluss einer basalen oder UVB-stimulierten Transkription des POMC-Gens

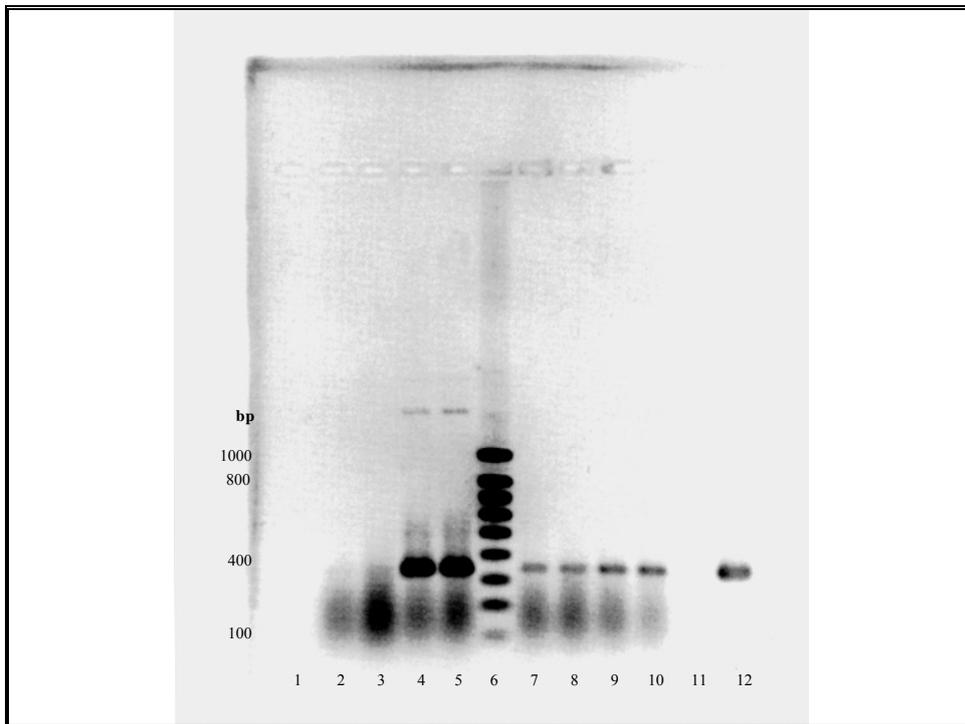
In der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde mittels RT-PCR nach mRNA von human-hypophysärem POMC gesucht. Wie unter 4.3.2.1. beschrieben, wurden 3 Primerpaare verwendet. Die erwarteten Nukleotidsequenzen bei Expression des human-hypophysären POMC-Gens lagen unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/HPO 13 bei 353 bp, für HPO 10/HPO 14 bei 203 bp und für HPO 10/EXO 21 bei 813 bp. Die DMS 79-Zellen dienten als Positivkontrolle. Diese Zellen exprimieren human-hypophysäres POMC.

Die in Abb. 3, Abb. 4 und Abb. 5 dokumentierten Ergebnisse zeigt Tab. 5 im Überblick. Aufgrund der Ergebnisse kann die Expression des human-hypophysären POMC-Gens in der humanen Hautzelllinie HaCaT mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

<u>Zellen</u>	<u>Bedingung</u>	<u>Bei Expression des hypophysären POMC zu erwartende bzw. mit RT-PCR gefundene Nukleotidsequenzen (Anzahl bp)</u>		
		<u>Primer:</u> HPO 10 HPO 13	<u>Primer:</u> HPO 10 HPO 14	<u>Primer:</u> HPO 10 EXO 21
	Aus der Basensequenz des human-hypophysären POMC-Gens abgeleitete Nukleotidsequenzlänge (Takahashi et al., 1983)	353	203	813
<u>HaCaT</u>	UVB-Test			RT+: ca. 500
<u>HaCaT</u>	UVB-Test			RT+: ca. 500
<u>HaCaT</u>	UVB-Test			RT+: ca. 500
<u>HaCaT</u>	UVB-Kontrolle		RT+: ca. 450	RT+: ca. 500
<u>DMS 79</u>	Positivkontrolle	RT+: 350	RT+: ca. 200	RT+: ca. 500 RT+: ca. 800

Tabelle 5: Übersichtstabelle aller RT-PCR-Ergebnisse, die bei Prüfung der HaCaT Zelllinie auf Expression des hypophysären POMC-Gens unter Verwendung der Primerpaare HPO 10/HPO 13, HPO 10/HPO 14 und HPO 10/EXO 21 erhalten wurden: Angaben zur Länge der Basensequenzen (nach Literaturangaben zu fordern bzw. mittels Gelelektrophorese bestimmt).

### 5.1.1.1. Primerpaar HPO 10/HPO 13

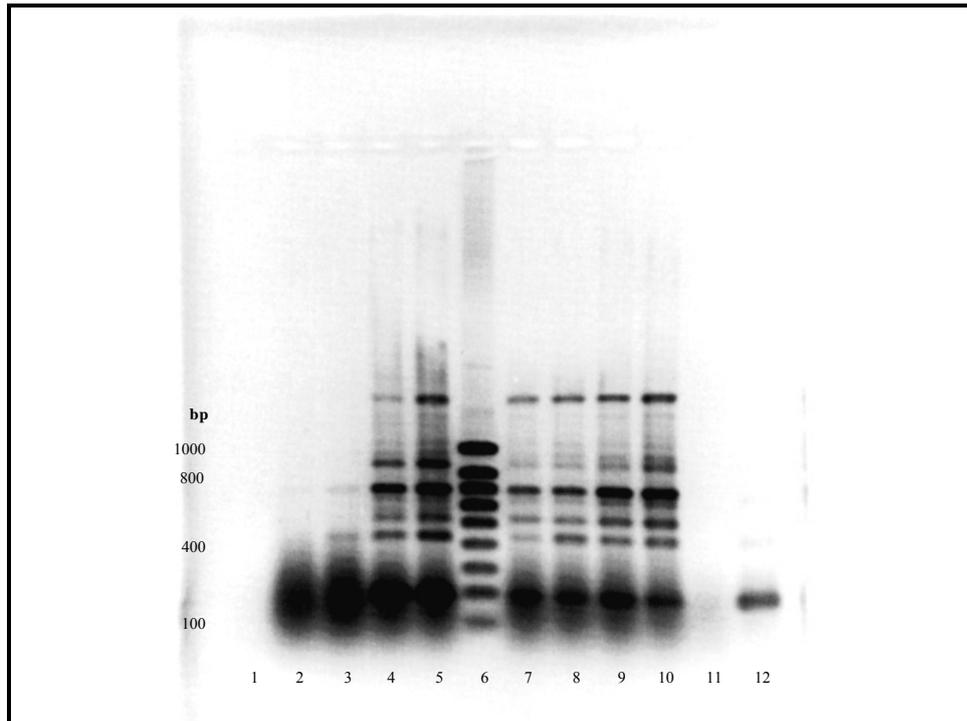


**Abbildung 3:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/HPO 13 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 RNase freies Wasser = Negativkontrolle; In der Mitte auf Spur 6 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; auf den Spuren 2 und 3 PCR-Produkte von nichtstimulierten HaCaT-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 4, 5 und 7-10 PCR-Produkte von HaCaT Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 11 und 12 die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen aus DMS 79-Zellen. Auf den Spuren 2, 4, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung (RT-); auf den Spuren 3, 5, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+). Auf der Spur 12 (RT+) ist die Bande einer Nukleotidsequenz von ~350-400 bp zu erkennen, die unter (RT-) Bedingungen (Spur 11) nicht erscheint. Die Spuren 2 bis 5 und 7 bis 10 zeigen im Bereich von ca. 350 bp keine bzw. jeweils gleichstarke Banden.

Wie in der Abbildung 3 erkennbar, ergab die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+), ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge von ca. 350 bp; die nicht mit reverser Transkriptase behandelten RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen dagegen erbrachten kein Signal. Die RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen lieferten also, wie erwartet, eine Positivkontrolle. Die PCR-Produkte der UVB-stimulierten und nichtstimulierten HaCaT-Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne RT-Behandlung eine diffuse Amplifikation und ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge

von ca. 350 bp; hierbei handelte es sich demnach um Kontaminationen mit genomischer DNA. Es konnte somit kein Nachweis einer Expression von human-hypophysärem POMC bei HaCaT-Zellen unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/HPO 13 geführt werden.

#### 5.1.1.2. Primerpaar HPO 10/HPO 14

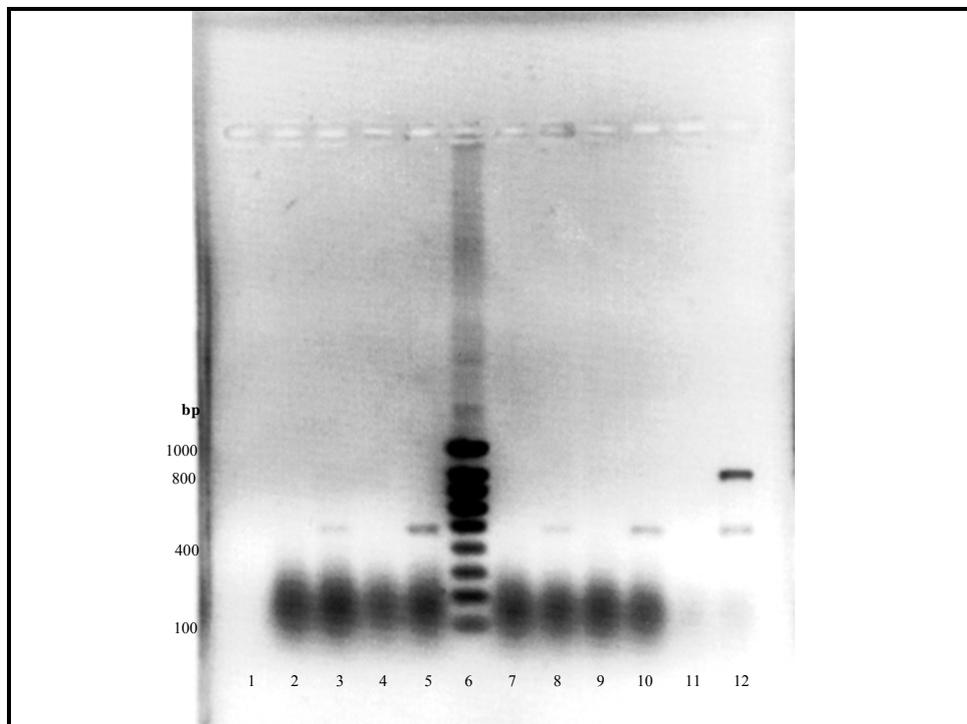


**Abbildung 4:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/HPO 14 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 RNase freies Wasser = Negativkontrolle; In der Mitte auf Spur 6 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; auf den Spuren 2 und 3 PCR-Produkte von nichtstimulierten HaCaT-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 4, 5 und 7-10 PCR-Produkte von HaCaT Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 11 und 12 die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen aus DMS 79-Zellen. Auf den Spuren 2, 4, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung (RT-); auf den Spuren 3, 5, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+). Auf der Spur 12 (RT+) ist eine Bande mit einer Nukleotidsequenz von ~ 200 bp erkennbar, die auf Spur 11 (RT-) nicht erscheint. Die Spuren 2 bis 5 sowie 7 bis 10 zeigen für die (RT+) und (RT-) -Ansätze identische Banden.

Wie in der Abbildung 4 erkennbar, ergab die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+), ein Amplifikat mit einer Nukleotidsequenzlänge von 200 bp (Positivkontrolle); die (RT-)-Proben der DMS 79-

Zellen erbrachten kein Signal. Die übrigen PCR-Produkte der UVB-stimulierten und der nicht stimulierten HaCaT-Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne RT-Behandlung im kritischen Bereich von ca. 200 bp eine diffuse Amplifikation bzw. Banden, die auf Kontamination mit genomischer DNA oder auf Amplifikation (hinsichtlich der hier untersuchten Fragestellung) irrelevanter Nukleotidsequenzen zurückzuführen waren. Es konnte somit kein Nachweis einer Expression von human-hypophysärem POMC bei HaCaT-Zellen unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/HPO 14 geführt werden.

### 5.1.1.3. Primerpaar HPO 10/EXO 21



**Abbildung 5:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/EXO 21 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 RNase freies Wasser = Negativkontrolle; In der Mitte auf Spur 6 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; auf den Spuren 2 und 3 PCR-Produkte von nichtstimulierten HaCaT-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 4, 5 und 7-10 PCR-Produkte von HaCaT Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 11 und 12 die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen aus DMS 79-Zellen. Auf den Spuren 2, 4, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung (RT-); auf den Spuren 3, 5, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+). Auf den Spuren 3, 5, 8, 10 und 12 (RT+ Ansätze) erkennbare Banden mit einer Nukleotidsequenz von ~500 bp. Auf der Spur 12 (RT+) eine Bande mit einer Nukleotidsequenz von ca. 800 bp (Positivkontrolle).

Bei der Suche nach einer Expression von human-hypophysärem POMC in der HaCaT Zelllinie zeigte sich zwar unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/EXO 21 in den RNA-Extrakten der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren, eine Nukleotidsequenz von ca. 800 bp (Positivkontrolle). Die PCR-Produkte der UVB-stimulierten und nichtstimulierten HaCaT-Zellen zeigen jedoch sowohl mit als auch ohne RT-Behandlung lediglich eine diffuse Amplifikation sowie jeweils auf der RT+-Spur eine Bande mit der Nukleotidsequenzlänge von etwa 500 bp, die auch auf der RT+-Spur der Positivkontrolle zu sehen ist. Die Sequenzierung des Materials dieser Bande zeigte, dass es sich hier um ein 501 bp großes Fragment des WD40-CIAO1-Gens handelt. Es liegt ca. 70 Millionen bp vom POMC-Gen entfernt; ein Zusammenhang zwischen der Expression der beiden Gene ist nicht anzunehmen. Es konnte somit auch unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/EXO 21 in HaCaT-Zellen kein Nachweis einer Expression von human-hypophysärem POMC geführt werden.

## **5.1.2. Ausschluss einer basalen oder UVB-stimulierten Bildung oder Freisetzung von POMC-Derivaten**

### **5.1.2.1. Nicht konfluente HaCaT Zellkulturen**

Bei diesen Vorversuchen wurde, in enger Anlehnung an die bereits 1996 von Chakraborty et al. etablierte Methode, der Versuch unternommen, die Bildung bzw. Freisetzung von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin- und N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin- immunoreaktivem Material (IRM) aus Zellen der humanen Hautzelllinie HaCaT nachzuweisen. In Analogie zur hypothalamischen Steuerung der Freisetzung von POMC-Fragmenten aus der Hypophyse sollte mittels Bestimmung von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM die mögliche Aktivierung eines „corticotrophen“ Systems und von N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM die Aktivierung eines „melanotropen“ Systems untersucht werden. Nachdem neben der Arbeitsgruppe um Chakraborty et al. 1996 auch Wintzen und Mitarbeiter 1996 über eine vermehrte POMC-Gen-Expression nach Stimulation mit UVB-Strahlung berichtet hatten, wurde die von uns verwendete Hautzelllinie HaCaT mit UVB-Bestrahlungsintensitäten von 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 25 mJ/cm<sup>2</sup> und 50 mJ/cm<sup>2</sup> stimuliert. Der Versuchsaufbau sah vor, dass die Zellen wie unter 4.2.1. beschrieben bestrahlt wurden. Ein Teil der Zellen wurde bei einer Konfluenz von ~50% und ein anderer Teil bei ~80% bestrahlt. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte im Abstand von 2, 4, 8 und 24 Stunden nach der Bestrahlung. Eine Zellzählung wurde bei beiden Konfluenzen sowohl bei den Kontrollwerten, als auch bei den mit verschiedenen Intensitäten (10 mJ/cm<sup>2</sup>, 25 mJ/cm<sup>2</sup>, 50 mJ/cm<sup>2</sup>) bestrahlten Zellen durchgeführt. Neben einem möglichen Einfluss des Zeitraums zwischen Bestrahlung und Aufarbeitung sollte hier der Einfluss der Konfluenz der Zellen auf die Bildung und Freisetzung der POMC-Derivate untersucht werden. Wie unter 5.1.2.2. beschrieben nahm die Konzentration der Zellen, bezogen auf die nicht bestrahlten Kontrollen, mit zunehmender Bestrahlungsenergie ab. Dies konnte sowohl bei Konfluenzen von 50% als auch von 80% festgestellt werden. Der Zeitpunkt der Aufarbeitung nach UVB-Bestrahlung zeigte in Bezug auf die Zellkonzentration keinen bedeutenden Einfluss.

Bei der Suche nach  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM konnte weder bei einer 50%igen Konfluenz noch bei einer 80%igen Konfluenz der Keratinozyten eine UVB-stimulierte Bildung oder Freisetzung festgestellt werden. Eine basale Bildung bzw. Freisetzung von ca. 6 fmol/Ansatz hat jedoch möglicherweise stattgefunden.

Bei der Suche nach N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM zeigten sich bei den Lysaten weder bei einer 50%igen Konfluenz noch bei einer 80%igen Konfluenz der Keratinozyten eine UVB-stimulierte Freisetzung von POMC-Derivaten.

Bei den Überständen wurde sowohl für die Kontrollen als auch für die UVB-stimulierten Ansätze 2, 4 und 8 Stunden nach der Stimulation eine Freisetzung von N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM beobachtet. Wie für  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM beobachtet, hat auch möglicherweise eine basale Freisetzung von N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM von ca. 6 fmol/Ansatz stattgefunden.

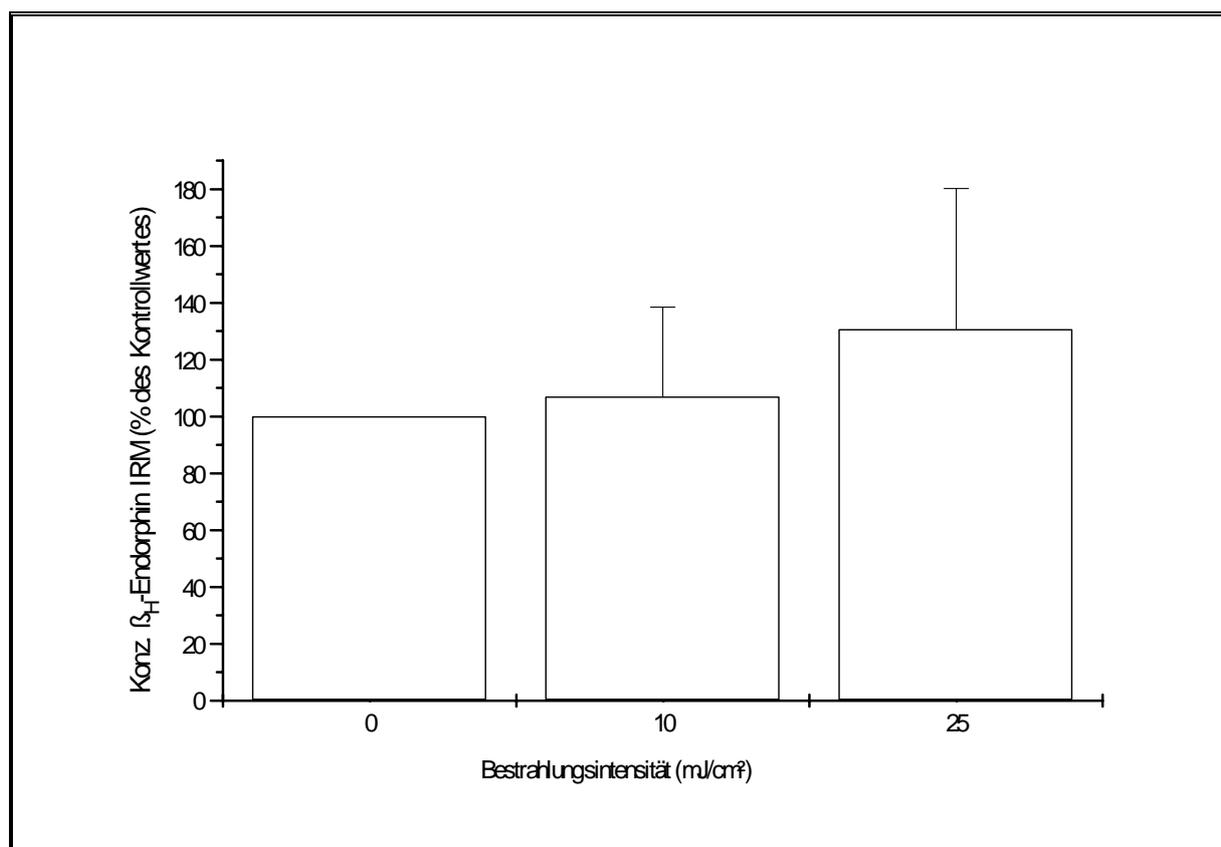
### **5.1.2.2. Konfluente HaCaT-Zellkulturen**

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden unter Einsatz aus verbesserter Methodik mit modifizierter Anordnung wiederholt und überprüft. Wie schon unter 5.1.2.1. erläutert, nahm bei steigender Bestrahlungsdosis die Anzahl der Zellen während einer Beobachtungszeit von 24 Stunden ab. Bei folgendem Versuchsansatz wurden die Zellen wie unter 4.2.1. beschrieben bestrahlt und anschließend nach 24 Stunden aufgearbeitet. Um bei der Aufarbeitung von gleichen Zellkonzentrationen in den verschiedenen Versuchsanordnungen, unabhängig von der Bestrahlungsdosis, ausgehen zu können, wurden im Falle der bestrahlten Ansätze jeweils so viele Ansätze gepoolt, bis sowohl bei Kontroll- wie bei Bestrahlungsansätzen gleiche Zellmengen vorlagen und somit miteinander exakt vergleichbare Ansätze aufgearbeitet werden konnten. Das Ergebnis zeigte, dass weder bei den Lysaten noch bei den Überständen die Peptidkonzentration nach UVB-Bestrahlung anstieg. Die große Streubreite der  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM-Konzentration in Keratinozytenlysaten bei 10 und 25 mJ/cm<sup>2</sup> Bestrahlungsintensität lässt die Aussage eines UVB-stimulierten Anstiegs der Peptidkonzentration nicht zu. Wie bei den nicht konfluenten HaCaT Zellkulturen hat jedoch auch hier eine basale Freisetzung von IRM stattgefunden.

#### **5.1.2.2.1. $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM**

Die Keratinozyten wurden wie unter 4.4. beschrieben vorbereitet. Mittels FP-RIA wurde die Konzentration von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM in Lysat- und Überstandsextrakten von HaCaT-Zellen bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM der mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> und 25 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten Zellen wurden auf die Konzentrationswerte der Kontrolle bezogen dargestellt. Zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführte Versuche wurden zusammengefasst und sind in Abbildung 6 dargestellt. Bei den Lysaten konnte ein

signifikanter Anstieg der Peptidkonzentration in den Zellen mit steigender Bestrahlungsdosis nicht festgestellt werden. So lag bei 10 mJ/cm<sup>2</sup> eine Streuung von ca. 30% und bei 25 mJ/cm<sup>2</sup> eine von ca. 40% bezogen auf den Mittelwert vor. Eine Biosynthese des Peptids unter Basalbedingungen hat aber offenbar stattgefunden; sie lag bei ca. 50 fmol/Ansatz. In den Überständen war wie bei den Lysaten kein UVB-induzierter Anstieg der Peptidkonzentration feststellbar. Die basale Freisetzung lag bei ca. 40 fmol/Ansatz (keine Abbildung).



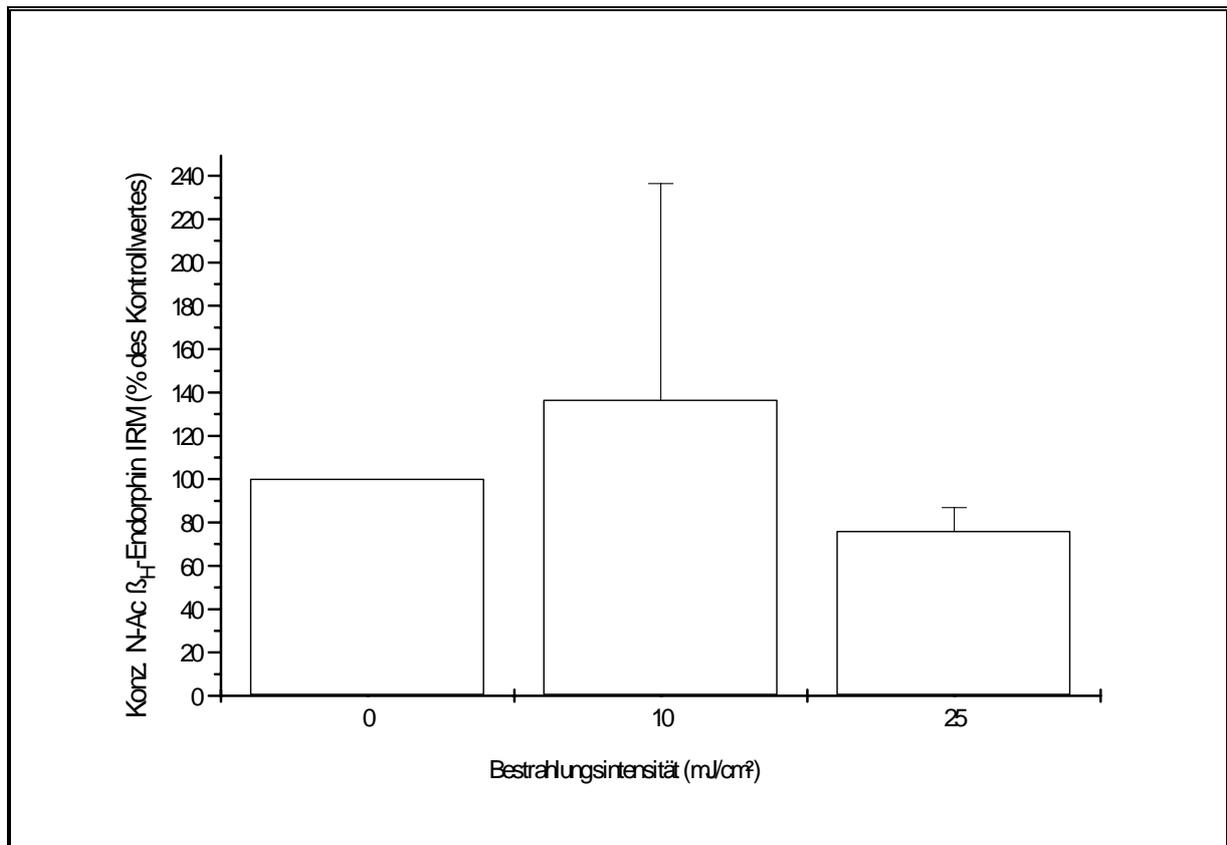
**Abbildung 6: Konzentrationen von  $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material in Prozent des Kontrollwerts (Bestrahlungsintensität: 0) 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Dosen (10 mJ/cm<sup>2</sup> und 25 mJ/cm<sup>2</sup>) in Keratinozytenlysaten (Keratinozytenzelllinie HaCaT, gepoolte Ansätze); Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.**

#### 5.1.2.2.2. N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-IRM

Bei gleichem Versuchsaufbau sollte auch die Konzentration von N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-IRM in Lysat und Überstand von UVB-stimulierten Keratinozytenzellkulturen (HaCaT) mittels FP-RIA bestimmt werden. Die zusammengefassten Ergebnisse zweier Versuche sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Konzentration von N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-IRM wurde auf

den Kontrollwert (100%) bezogen. Bei 10 mJ/cm<sup>2</sup> ergibt sich kein signifikanter Anstieg der Konzentrationen von N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-IRM. Bei 25 mJ/cm<sup>2</sup> dagegen fällt die Peptidkonzentration unter den Kontrollwert ab. Wie bei  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-IRM hat auch bei N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-IRM eine basale Freisetzung stattgefunden, diese lag bei den Lysaten bei ca. 2 fmol/Ansatz.

Die Überstände zeigten die gleichen Ergebnisse, allerdings lag die basale Freisetzung hier bei ca. 1,5 fmol/Ansatz (keine Abbildung).



**Abbildung 7: Konzentrationen von N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-immunoreaktivem Material in Prozent des Kontrollwertes (Bestrahlungsintensität: 0), 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Dosen (10 mJ/cm<sup>2</sup> und 25 mJ/cm<sup>2</sup>) in Keratinozytenlysaten (Keratinozytenzelllinie HaCaT, gepoolte Ansätze); Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichungen aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.**

## 5.2. Ergebnisse zur Untersuchung der Expression von hypophysärem POMC in Colo 679- und A 431-Zellen

### 5.2.1. Ausschluss der Expression des hypophysärem POMC in Colo 679-Zellen

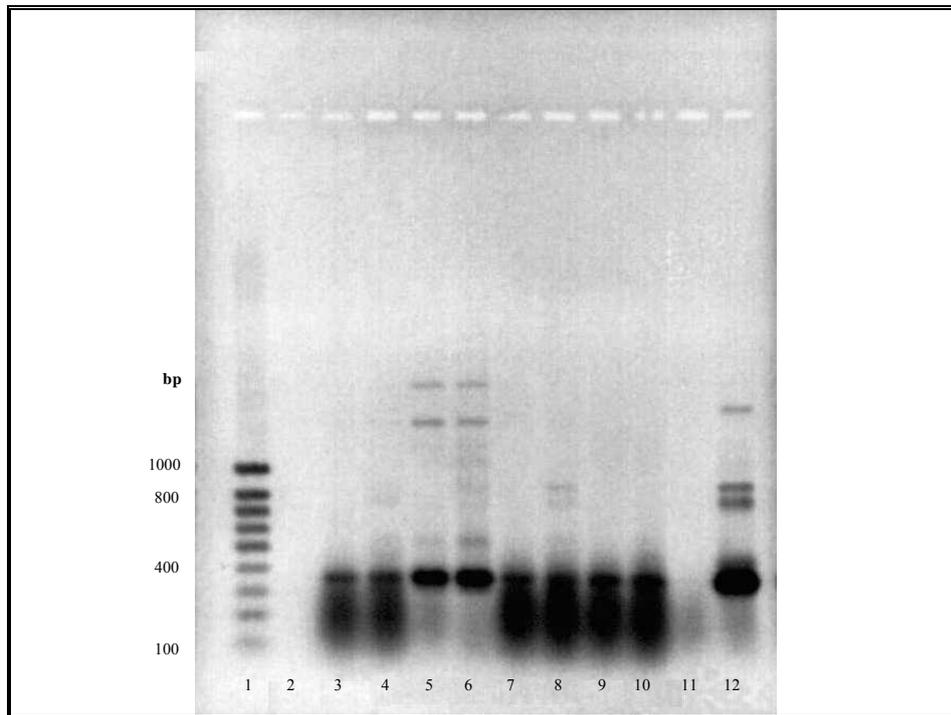
Die humane Melanomzelllinie Colo 679 ist mittels RT-PCR auf das Vorliegen von mRNA des human-hypophysären POMC untersucht worden. Dies erfolgte wiederum unter Kontrollbedingungen und nach UVB-Stimulation.

Die in Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10 dokumentierten Ergebnisse zeigt Tab. 6 im Überblick. Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Expression des hypophysären POMC-Gens in der humanen Melanomzelllinie COLO 679 mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

<u>Zellen</u>	<u>Bedingung</u>	<u>Bei Expression des hypophysären POMC zu erwartende bzw. mit RT-PCR gefundene Nukleotidsequenzen (Anzahl bp)</u>		
		<u>Primer:</u> HPO 10 HPO 13	<u>Primer:</u> HPO 10 HPO 14	<u>Primer:</u> HPO 10 EXO 21
	Aus der Basensequenz des human-hypophysären POMC-Gens abgeleitete Nukleotidsequenzlänge (Takahashi et al., 1983)	353	203	813
<u>COLO 679</u>	UVB-Test			RT+: ca. 500
<u>COLO 679</u>	UVB-Test	RT +/-: 350		RT+: ca. 500
<u>COLO 679</u>	UVB-Test			RT+: ca. 500
<u>COLO 679</u>	UVB-Kontrolle			RT+: ca. 500
<u>DMS 79</u>	Positivkontrolle	RT+: ca. 350	RT+: ca. 200	RT+: ca. 500 RT+: ca. 800

Tabelle 6: Übersichtstabelle aller RT-PCR-Ergebnisse, die bei Prüfung der Colo 679 Zelllinie auf Expression des hypophysären POMC-Gens unter Verwendung der Primerpaare HPO 10/HPO 13, HPO 10/HPO 14 und HPO 10/EXO 21 erhalten wurden: Angaben zur Länge der Basensequenzen (nach Literaturangaben zu fordern bzw. mittels Gelelektrophorese bestimmt).

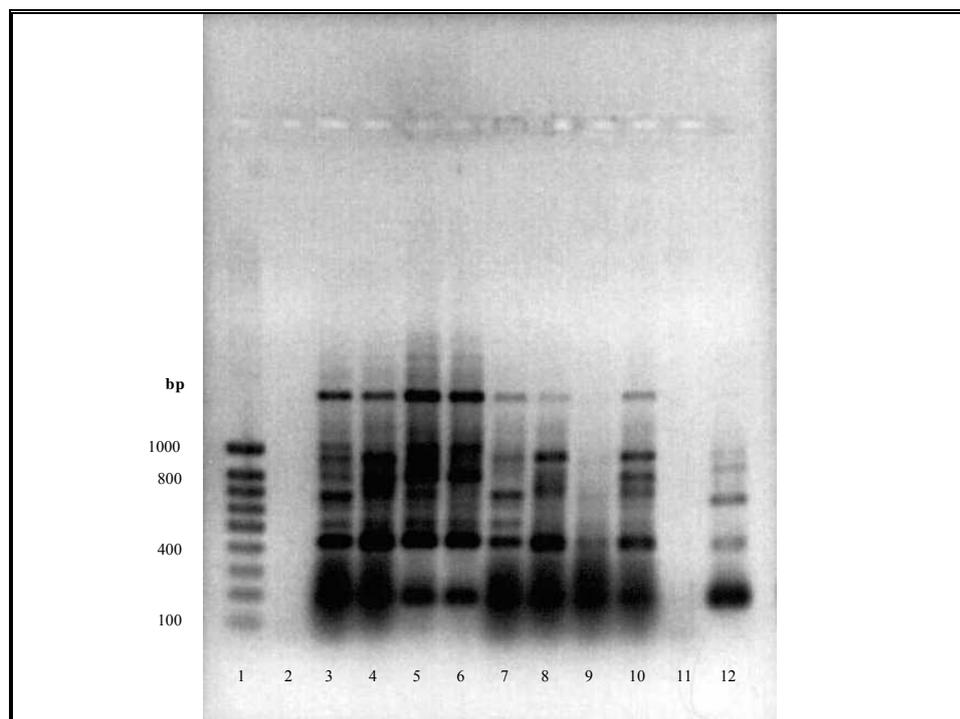
### 5.2.1.1. Primerpaar HPO 10/HPO 13



**Abbildung 8:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/HPO 13 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; Spur 2: RNase freies Wasser = Negativkontrolle; auf den Spuren 3, 5, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung; auf den Spuren 4, 6, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren; auf den Spuren 3-8 PCR-Produkte von COLO 679-Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 9-10 PCR-Produkte von nichtstimulierten COLO 679-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 11 (RT-) und 12 (RT+) die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen von DMS 79-Zellen. Auf der Spur 12 ist die Bande einer Nukleotidsequenz von ~350 bp zu erkennen, die unter RT-- Bedingungen (Spur 11) nicht erscheint.

Wie in Abbildung 8 erkennbar, ergab ausschließlich die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+) ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge von ca. 350 bp. Die RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen lieferten wie erwartet, eine Positivkontrolle. Die PCR-Produkte der UVB-stimulierten und nichtstimulierten COLO 679-Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne RT-Behandlung lediglich eine diffuse Amplifikation bzw. auf (RT-)- und (RT+) -Spuren identische Banden. Es konnte somit kein Nachweis einer Expression von human-hypophysärem POMC bei COLO 679-Zellen unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/HPO 13 geführt werden.

### 5.2.1.2. Primerpaar HPO 10/HPO 14



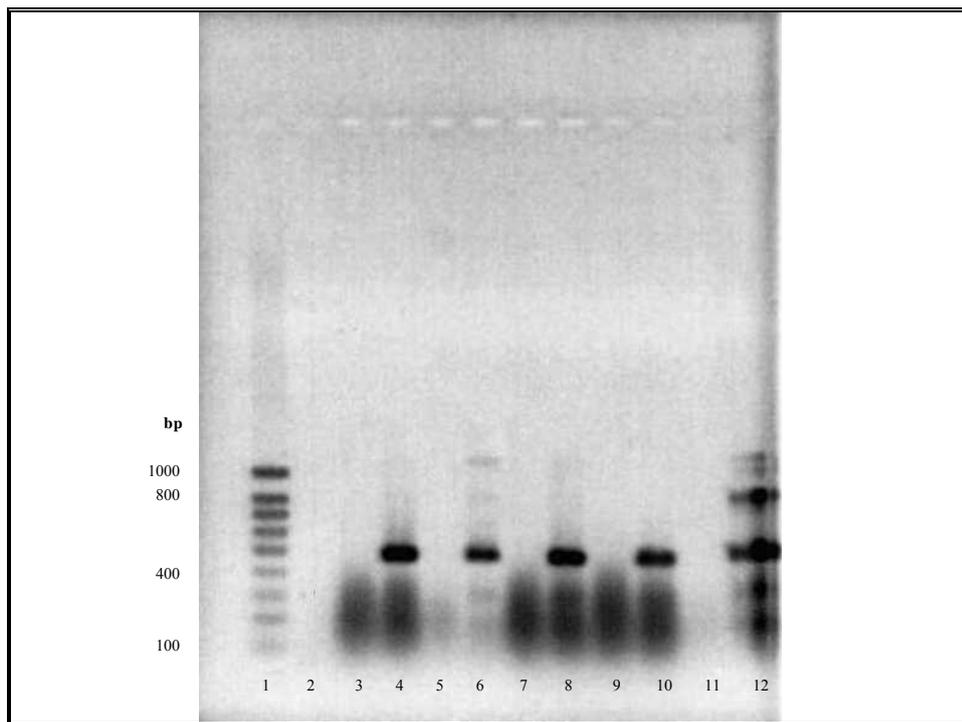
**Abbildung 9:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/HPO 14 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; Spur 2: RNase freies Wasser = Negativkontrolle; auf den Spuren 3, 5, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung; auf den Spuren 4, 6, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren; auf den Spuren 3-8 PCR-Produkte von COLO 679-Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 9-10 PCR-Produkte von nichtstimulierten COLO 679-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 11 (RT-) und 12 (RT+) die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen von DMS 79-Zellen. Auf der Spur 12 ist unter anderem eine Bande mit einer Nukleotidsequenz von ~200 bp erkennbar. Die Spuren 3-8 zeigen für die (RT+) und (RT-) -Ansätze identische Banden.

Wie in Abbildung 9 erkennbar, ergab die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren, ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge von ca. 200 bp. Die betreffende Bande war auf der RT- -Spur (11) nicht zu finden. RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen lieferten, wie erwartet, eine Positivkontrolle.

Die PCR-Produkte der UVB-stimulierten und nichtstimulierten COLO 679-Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne RT-Behandlung eine diffuse Amplifikation bzw. Banden, die auf

Kontamination mit genomischer DNA zurückzuführen waren. Es handelt sich demnach nicht um amplifizierte mRNA-Transkripte. Es konnte somit kein Nachweis einer Expression von human-hypophysärem POMC bei COLO 679-Zellen unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/HPO 14 geführt werden.

### 5.2.1.3. Primerpaar HPO 10/EXO 21



**Abbildung 10:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/EXO 21 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; Spur 2: RNase freies Wasser = Negativkontrolle; auf den Spuren 3, 5, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung; auf den Spuren 4, 6, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren; auf den Spuren 3-8 PCR-Produkte von COLO 679-Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 9-10 PCR-Produkte von nichtstimulierten COLO 679-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 11 (RT-) und 12 (RT+) die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen von DMS 79-Zellen. Auf den Spuren 4, 6, 8, 10 und 12 (RT+ Ansätze) Banden mit einer Nukleotidsequenz von ~ 500 bp. Zusätzlich ist auf der Spur 12 eine Bande mit einer Nukleotidsequenz von ca. 800 bp zu finden (Positivkontrolle).

Wie in Abbildung 10 erkennbar, ergab ausschließlich die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren, ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge von ca. 800 bp. Die PCR-Produkte der UVB-stimulierten und nichtstimulierten COLO 679-Zellen zeigten bei allen Ansätzen die mit RT behandelt worden waren, ebenso wie die DMS 79-Zellen eine Nukleotidsequenz von ca. 500 bp. Es handelt sich hierbei um eine Nukleotidsequenz aus dem „WD40-CIAO1-Gen“ (siehe 5.1.1.3.). Es konnte somit kein Nachweis einer Expression von human-hypophysärem POMC bei COLO 679-Zellen unter Verwendung des Primerpaares HPO 10/EXO 21 geführt werden.

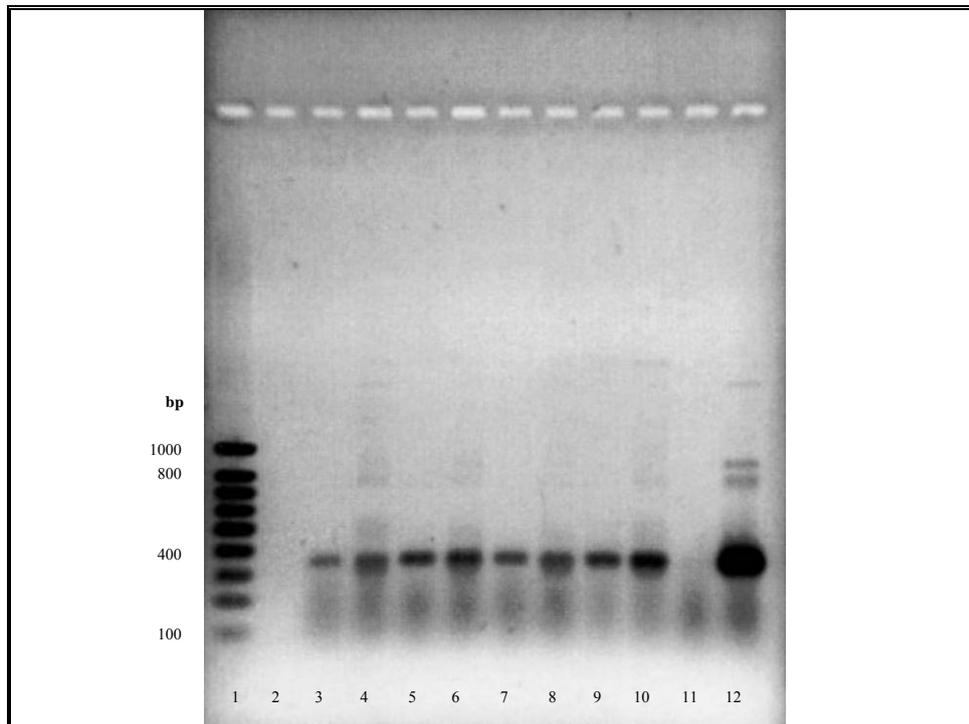
### 5.2.2. Hinweise auf die Expression eines aberranten POMC-Gens in A 431-Zellen

Die in Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13 dokumentierten Ergebnisse zeigt Tabelle 7 im Überblick.

<u>Zellen</u>	<u>Bedingung</u>	<u>Bei Expression des hypophysären POMC zu erwartende bzw. mit RT-PCR gefundene Nukleotidsequenzen (Anzahl bp)</u>		
		<u>Primer:</u> HPO 10 HPO 13	<u>Primer:</u> HPO 10 HPO 14	<u>Primer:</u> HPO 10 EXO 21
	<b>Aus der Basensequenz des human-hypophysären POMC-Gens abgeleitete Nukleotidsequenzlänge (Takahashi et al., 1983)</b>	<b>353</b>	<b>203</b>	<b>813</b>
<u>A 431</u>	UVB-Test	RT(-)/+: 350	RT+: 200	RT+: ca. 500
<u>A 431</u>	UVB-Test	RT(-)/+: 350	RT+: 200	RT+: ca. 500
<u>A 431</u>	UVB-Test	RT(-)/+: 350	RT+: 200	RT+: ca. 500
<u>A 431</u>	UVB-Kontrolle	RT(-)/+: 350	RT+: 200	
<u>DMS 79</u>	Positivkontrolle	RT+: 350	RT+: 200	RT+: ca. 500 RT+: ca. 800

Tabelle 7: Übersichtstabelle aller RT-PCR-Ergebnisse, die bei Prüfung der A 431 Zelllinie auf Expression des hypophysären POMC-Gens unter Verwendung der Primerpaare HPO 10/HPO 13, HPO 10/HPO 14 und HPO 10/EXO 21 erhalten wurden: Angaben zur Länge der Basensequenzen (nach Literaturangaben zu fordern bzw. mittels Gelelektrophorese bestimmt).

### 5.2.2.1. Primerpaar HPO 10/HPO 13

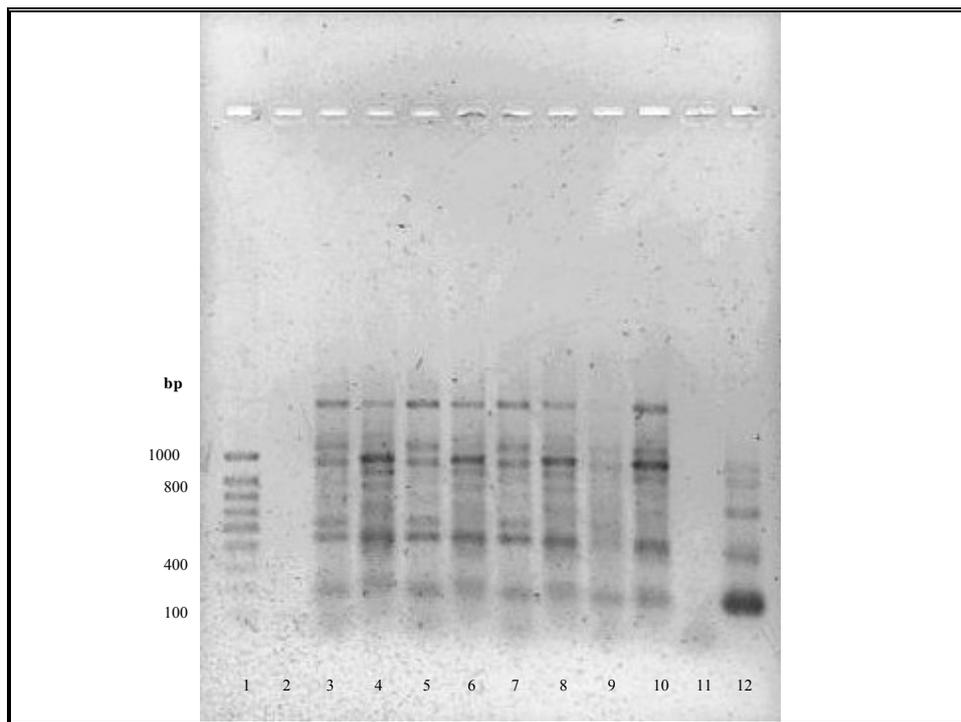


**Abbildung 11:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/HPO 13 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; Spur 2: RNase freies Wasser = Negativkontrolle; auf den Spuren 3, 5, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung; auf den Spuren 4, 6, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren; auf den Spuren 3-8 PCR-Produkte von A 431-Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 9-10 PCR-Produkte von nichtstimulierten A 431-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 11 (RT-) und 12 (RT+) die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen von DMS 79-Zellen. Auf der Spur 12 ist die Bande einer Nukleotidsequenz von ~350 bp zu erkennen, die unter RT-- Bedingungen (Spur 11) nicht erscheint. Auf den Spuren 4, 6, 8 und 10, Spuren mit RT-behandelten RNA-Extrakten, zeichnet sich jeweils eine deutlichere Bande mit einer Nukleotidsequenzlänge von ~ 350 bp ab als in den Spuren mit Material ohne RT-Behandlung.

Wie in der Abbildung 11 erkennbar, ergab die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+) ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge von ca. 350 bp. Die betreffende Bande war auf der DMS 79 RT- -Spur nicht zu finden. Die PCR erbrachte sowohl bei Proben aus UVB-stimulierten wie aus nichtstimulierten A 431-Zellen mit und ohne RT-Vorbehandlung ein Amplifikat mit ca. 350 bp. Die Banden der Nukleotidsequenzen mit einer Länge von ca. 350 bp bei den (RT+) PCR-

Produkten waren jedoch deutlicher als die entsprechenden Banden auf den Spuren der (RT-) PCR-Produkte. Außerdem erbrachten Folgeversuche unserer Arbeitsgruppe Hinweise auf ein 350 bp langes PCR-Produkt nach RT-Behandlung im Falle von A 431-Zellen. Dieser Befund ist mit der Expression des hypophysären POMC-Gens in A 431-Zellen kompatibel.

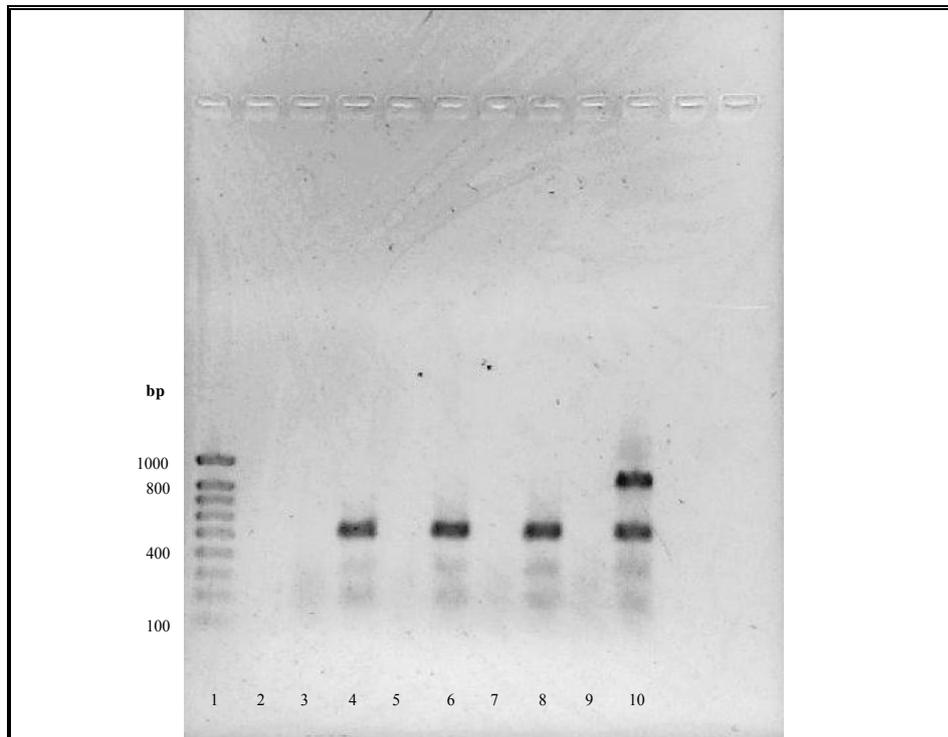
### 5.2.2.2. Primerpaar HPO 10/HPO 14



**Abbildung 12:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/HPO 14 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; Spur 2: RNase freies Wasser = Negativkontrolle; auf den Spuren 3, 5, 7, 9 und 11 Proben ohne RT-Behandlung; auf den Spuren 4, 6, 8, 10 und 12 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren; auf den Spuren 3-8 PCR-Produkte von A 431-Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 9-10 PCR-Produkte von nichtstimulierten A 431-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 11 (RT-) und 12 (RT+) die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen von DMS 79-Zellen. Auf der Spur 12 ist unter anderem eine Bande mit einer Nukleotidsequenz von ~ 200 bp erkennbar. Auf den Spuren 4, 6, 8 und 10, Spuren mit RT-behandelten RNA-Extrakten, zeichnet sich jeweils eine deutlichere Bande bei einer Nukleotidsequenz von ca. 200 bp ab als bei den Spuren mit Material ohne RT-Behandlung.

Wie in der Abbildung 12 erkennbar, ergab die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+) ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge von ca. 200 bp. Die betreffende Bande war auf der DMS 79 (RT- - Spur) nicht zu finden. Die PCR erbrachte sowohl bei Proben aus UVB-stimulierten, als auch bei nichtstimulierten A 431-Zellen, mit und ohne RT-Vorbehandlung ein Amplifikat von jeweils ca. 200 bp. Die Banden die Nukleotidsequenzen mit Längen von ca. 200 bp entsprachen, waren auf den Spuren der (RT+) PCR-Produkte jedoch deutlicher als diejenigen auf den Spuren der (RT-) PCR-Produkte. Außerdem erbrachten Folgeversuche unserer Arbeitsgruppe Hinweise auf ein 200 bp langes PCR-Produkt nach RT-Behandlung im Falle von A 431-Zellen. Dieser Befund ist mit der Expression des hypophysären POMC-Gens in A 431-Zellen kompatibel.

### 5.2.2.3. Primerpaar HPO 10/EXO 21



**Abbildung 13:** Aufnahme eines Gels, auf dem die Amplifikate einer RT-PCR mit dem Primerpaar HPO 10/EXO 21 (35 Zyklen: 50s/94°C, 60s/58°C und 60s/72°C) aufgetrennt wurden. Ganz links auf Spur 1 das Gemisch der DNA-Marker zur Bestimmung der Länge der Nukleotidsequenzen der Amplifikate; Spur 2: RNase freies Wasser = Negativkontrolle; auf den Spuren 3, 5, 7 und 9 Proben ohne RT-Behandlung; auf den Spuren 4, 6, 8, und 10 waren Proben aufgetragen worden, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren; auf den Spuren 3-6 PCR-Produkte von A 431-Zellen, die mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB-stimuliert worden waren (UVB-Test) und auf den Spuren 7-8 von nichtstimulierten A 431-Zellen (UVB-Kontrolle); auf den Spuren 9 (RT-) und 10 (RT+) die PCR-Produkte von RNA-Ansätzen aus DMS 79-Zellen. Auf den Spuren 4, 6, 8, und 10 (RT+ Ansätze) Banden mit einer Nukleotidsequenz von ~500 bp. Zusätzlich ist auf der Spur 10 eine Bande mit einer Nukleotidsequenz von ca. 800 bp zu finden (Positivkontrolle).

Wie in der Abbildung 13 erkennbar, ergab ausschließlich die PCR derjenigen RNA-Extrakte der DMS 79-Zellen, die mit reverser Transkriptase behandelt worden waren (RT+) ein Amplifikat mit der Nukleotidsequenzlänge von ca. 800 bp. Auf den Spuren mit den PCR-Produkten der UVB-stimulierten und nichtstimulierten A 431-Zellen sowie der DMS 79-Zellen nach RT-Behandlung zeigte sich jeweils eine Bande einer Nukleotidsequenzlänge von 500 bp. Es handelt sich hierbei um eine Nukleotidsequenz aus dem WD40-CIAO1-Gen (siehe 5.1.1.3.). Dieser Befund ist somit nicht kompatibel mit der Expression von human-

hypophysärem POMC in A 431-Zellen. Die mit den drei Primerpaaren HPO 10/HPO 13, HPO 10/HPO 14, HPO 10/EXO 21 erhobenen Befunde wären somit zusammen betrachtet, kompatibel mit der Expression eines mit dem hypophysären POMC-Gen nicht identischen, „aberranten“ POMC-Gens in A 431-Zellen.

## **6. Diskussion**

### **6.1. Methodik**

#### **6.1.1. Die Zelllinien HaCaT, A 431 und Colo 679 als Untersuchungsobjekte**

Die vorliegende Arbeit entstand in dem Bestreben, zu prüfen, in wieweit in den untersuchten Zelllinien hypophysäres oder evtl. ein vom hypophysären abweichendes POMC-Gen exprimiert würde und in wieweit, „hypophysäre“ POMC-Derivate nachweisbar sein würden. Diese Fragestellung sollte unter Basalbedingungen sowie unter Stimulationsbedingungen an den Zelllinien geprüft werden. Es wurde zur Durchführung von Stimulationsversuchen auf den in vitro kultivierbaren Zelltyp der HaCaT-Zellen zurückgegriffen. Diese HaCaT-Zellen stellen ein bewährtes Modell für Keratinozyten, die 90% der Hautzellen ausmachen, dar. Es handelt sich um eine immortalisierte Keratinozytenzelllinie, die von menschlicher Bauchhaut stammt und nach Transplantation in neugeborene Mäuse eine annähernd normale epitheliale Differenzierung zeigte (Boukamp et al., 1988; Breitkreutz et al., 1998). Die Vorteile in der Verwendung dieser Keratinozytenzelllinie im Vergleich zu isolierten Keratinozyten waren zum Einen der Ausschluss von Spendervarianten und zum Anderen die Verfügbarkeit großer Mengen an Untersuchungsmaterial. Um Schwankungen und Differenzierungsunterschiede gering zu halten, wurden nur Zellen der Passagen p39-46 verarbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte in der Regel 24 Stunden nach UVB-Stimulation. Eine Ausnahme stellten die Versuche dar, bei denen die Zellen 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Stimulation aufgearbeitet wurden. Sie sollten eine mögliche Abhängigkeit von der Zeit in Bezug auf eine POMC-Derivat-Freisetzung aufzeigen. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die nicht mit Monozellkulturen arbeiteten, zeigten, dass HaCaT-Zellen bei Versuchen an Hautäquivalenten eine „epidermale Melanineinheit“ mit den Melanozyten bilden. Sie lagern die „epidermale Melanineinheit“ aber nicht in die Basalschicht ein und weisen eine veränderte Epithelarchitektur auf (Lee et al., 2001). Dies ist ein Hinweis, dass in Bezug auf Pigmentierungsversuche für HaCaT-Zellen Einschränkungen gemacht werden müssen.

Bezüglich unserer Methodik arbeiteten wir in enger Anlehnung an das Vorgehen der Arbeitsgruppen um Wintzen, Slominski, und Chakraborty. Erwähnenswert ist, dass diese Arbeitsgruppen nicht mit einer Keratinozytenzelllinie, sondern mit nativen Keratinozyten gearbeitet haben. Es ist möglich, dass die von uns gewählte immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCaT nicht in der Lage ist auf UVB-Stimulation hin POMC zu exprimieren. Es ist nicht auszuschließen, dass bei der Überführung nativer Zellen in eine

Zelllinie nicht nur die Differenzierung Veränderungen aufzeigt, sondern noch weitere Fähigkeiten wie die der POMC-Expression und die der  $\beta_H$ -Endorphin-Freisetzung verloren gegangen sind.

Die oben aufgeführten Autoren beschrieben weiterhin Versuche an der Epidermoidzelllinie A 431. An dieser Zelllinie führten wir Versuche durch, bei denen wir teilweise vergleichbar positive Ergebnisse bezüglich der human-hypophysären POMC-Expression erhielten (Schauer et al., 1994).

Die Melanozytenzelllinie Colo 679 zeigte, wie auch schon die HaCaT Zelllinie, entgegen unseren Erwartungen negative Ergebnisse in Bezug auf die UVB-stimulierte POMC-Expression. Auch hier könnte der Verlust der Fähigkeit zur POMC-Expression bei der Transformierung von einer nativen Zelle in eine Zelllinie zugrunde liegen.

### **6.1.2. Stimulationsversuche**

Wir führten unsere Versuche zur Expression von POMC-Derivaten in Anlehnung an die Veröffentlichungen von Schauer et al., 1994 an der Keratinozytenzelllinie HaCaT durch. Schauer et al. hatten publiziert, dass in humanen Keratinozyten und A 431-Zellen eine ACTH- und  $\alpha$ -MSH-Freisetzung sowohl basal als auch verstärkt nach UVB-Bestrahlung zu finden sei.

Diese Ergebnisse waren von Wintzen et al. für das Vorkommen von  $\beta_H$ -Endorphin und  $\beta$ -LPH nach Stimulation mit UV-Bestrahlung, IL-1 $\alpha$  und Phorbol ester in humanen Keratinozyten und von Kippenberger et al., 1995 und Chakraborty et al., 1996 für Melanozyten bestätigt worden. Wintzen et al., 2000 berichteten in weiteren Veröffentlichungen einschränkend, dass der Nachweis von UVB-stimulierter POMC-Expression in Keratinozyten nicht in allen Experimenten gelungen war und dies stark von den Nährstoffbedingungen abhängig sei. Unsere Untersuchungen sollten einen Beitrag zur Klärung der Frage liefern, in wieweit die UVB-stimulierte POMC-Derivat-Freisetzung konstant nachweisbar ist. Trotz enger Anlehnung an das Vorgehen der oben genannten Arbeitsgruppen, konnte eine POMC-Derivat-Freisetzung aus HaCaT-Zellen nicht festgestellt werden. Ursache könnte, wie bereits schon von der Arbeitsgruppe um Wintzen geäußert, die Abhängigkeit vom Nährmedium sein. Ein Nährstoffmedium mit einem niedrigen Kalziumgehalt stellt einen weiteren Stressor für

die Zellen dar. Wintzen et al., 2000 berichteten nachträglich, dass eine POMC-Derivat-Freisetzung ausschließlich in Kulturen mit kalziumarmen Medien gefunden worden war.

#### **6.1.2.1. Zellpräparation**

Die Kultivierung der HaCaT-Zellen erfolgte mit DMEM-Kulturmedium. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung musste das Kulturmedium, aufgrund einer möglichen Beeinträchtigung durch die rötliche Färbung, abgenommen und durch farbloses DPBS ersetzt werden. Dieses war wie das DMEM-Medium auf 37°C temperiert, um einen zusätzlichen Stressor (Temperaturschock) zu vermeiden. Um ein Nährstoffdefizit zu verhindern, wurden immer nur 5 Schalen bearbeitet, so dass die nährstofffreie Zeit immer unter 15 Minuten gehalten werden konnte und eine Zellschädigung sich somit weitgehend vermeiden ließ. Ein Unterschied zum Vorgehen von Chakraborty et al., 1996 besteht in der von uns verwendeten Keratinozytenzelllinie der Passagen 39-46. Die Arbeitsgruppe von Chakraborty verwendete native Keratinozyten der Passage 2.

Differenzen in den Ergebnissen sind nicht nur durch unterschiedliche Zellpassagen, sondern auch durch die Verwendung von Zelllinien im Gegensatz zu nativen Zellen denkbar. In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in der native Keratinozyten verwendet wurden, konnte übrigens auch keine POMC-Expression nachgewiesen werden.

#### **6.1.2.2. Zellzählung**

Die UVB-Bestrahlung schien die Zellen so anzugreifen, dass 24 Stunden nach der UVB-Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> nur noch etwa 20% der Zellen gegenüber denen in den Kontrollschalen ohne UVB-Bestrahlung vital waren. Da die Kontrollschalen eine zum Teil 5-fach höhere Zellmenge aufzeigten, wurden die bestrahlten Ansätze mit verminderter Zellmenge auf die Zellmenge der Kontrollschalen adaptiert. So konnten vergleichbare Aufarbeitungsbedingungen geschaffen werden.

#### **6.1.2.3. Standardisierung der Aufarbeitung von Zellen und Zellüberständen**

Eine Standardisierung wurde sowohl für die Aufarbeitung der Zellen als auch für die der Zellüberstände durchgeführt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass bei der Aufarbeitung der Zellen einzelne Arbeitsschritte (Ultrabeschallung, Ein- Auftauprozesse) nicht standardisiert waren. Das für die Standardisierung eingesetzte Peptid wurde erst nach dem dritten Aufarbeitungsschritt dem Zellpräparat zugesetzt. Es besteht die Möglichkeit, dass das

gesuchte Peptid primär in der Zelle vorhanden war, aber im Verlauf der drei Aufarbeitungsschritte verloren ging. In den Zellen könnte somit ein höherer Anteil an Peptid vorgelegen haben, als mit der eingesetzten Methodik detektiert wurde.

Die Standardisierung der Aufarbeitung der Zellkulturüberstände erfolgte lückenlos. Das Peptid wurde durch alle Schritte der Überstandsaufarbeitung geschleust und die Eichung somit korrekt durchgeführt. Die Methodik der Überstandsaufarbeitung ergibt somit valide Werte.

#### **6.1.2.4. Intensität der UVB-Bestrahlung**

Für diese Arbeit wurden Bestrahlungsdosen von 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 25 mJ/cm<sup>2</sup> und 50 mJ/cm<sup>2</sup> gewählt. Literaturberichten war zu entnehmen, dass Keratinozyten eine höhere Bestrahlungsdosis als Melanozyten benötigen, um POMC zu exprimieren. In vergleichbaren Arbeiten lag diese bei 25 mJ/cm<sup>2</sup> (Chakraborty et al., 1993). Wir haben zur Komplettierung höhere und niedrige Dosen angewendet. Wir verwendeten zwar nicht den von Chakraborty et al., 1993 angegeben (UVM-57 LAMP UVP) mit einem peak bei 302 nm, aber einen ähnlichen Strahlertyp (PL-Lampe UVB; UV 21) mit einem peak von 313 nm. Unterschiedliche Ergebnisse aufgrund verschiedener Lampen können somit weitgehend ausgeschlossen werden.

#### **6.1.3. RT-PCR**

Ein Anwendungsgebiet der RT-PCR stellt die Messung von Mengenverhältnissen einer mRNA in verschiedenen Geweben oder in einem Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten dar. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die mRNA Menge in einer Zelle die Expression des zugehörigen Gens widerspiegelt. Früher wurde die mRNA mit der Northern-Hybridisierung bestimmt. Dieses Untersuchungsverfahren erforderte jedoch die Verwendung relativ großer Untersuchungsmengen.

Die RT-PCR erlaubt, selbst kleinste Mengen einer möglichen POMC-Expression beispielsweise in HaCaT-Zellen aufzuzeigen. Anders als bei Chakraborty et al., 1996 durchlief die RT-PCR bei unserer Untersuchung nach Aktivierung der reversen-Tanskriptase (bei 50°C/30min.) 35 Zyklen statt 30 Zyklen (50s/94°C, 1min./58°C, 1min./72°C), was für Unterschiede im Ergebnis nicht verantwortlich sein dürfte. Zum Schluss folgte ein zehnmütiger Zyklus bei 72°C, gefolgt von der 4°C Abschlusstemperatur. Die Einstellungen

der RT-PCR wurden dem verwendeten PCR-Kit und den Primern angepasst. Eine mögliche Fehlerquelle wäre natürlich eine falsche Auswahl des Primerpaares.

Neben den Sequenzen der Primer sind für den Erfolg des Experiments vor allem die genaue Einhaltung der Temperaturen in den einzelnen Stadien des Reaktionszyklus entscheidend. Das zu vervielfältigende RNA-Fragment sollte nicht länger als 3 kb sein, was in unseren Versuchen nicht der Fall war. Die optimale Länge der Primer liegt zwischen 17 und 30 Nukleotiden. Die verwendeten Primer hatten eine Länge zwischen 20 und 24 Nukleotiden. Die Effizienz der RT-PCR ist bei der von uns gewählten Primerlänge zu erwarten.

#### **6.1.3.1. Amplifikationsfehler bei der PCR**

Von besonderer Bedeutung für den Erfolg oder Misserfolg der PCR-Experimente ist die Auswahl der Primer. Aus diesem Grund ist eine sorgfältige Konstruktion des Primers von großer Bedeutung. Bezogen auf unsere Arbeit war es wichtig, sowohl Primerpaare aus dem Exon 3 Bereich zu wählen als auch Primerpaare aus Exon 2 und Exon 3 heranzuziehen. Da bei den DMS 79-Zellen (Positivkontrolle) eine POMC-Expression nachgewiesen werden konnte, führen wir das negative Ergebnis bei den COLO 679- und HaCaT-Zellen nicht auf die Auswahl der von uns verwendeten Primer zurück.

Es ist weiterhin unwahrscheinlich, dass durch Polymerasen während der Synthese Fehler eingebracht wurden, da diese durch eine „Korrekturlesefunktionen“ ausgebessert werden können. Die Wahrscheinlichkeit, dass es trotz dieser Kontrollfunktion zu einem Einbau eines falschen Nukleotids kommt, ist sehr gering, es liegt bei einer falschen Base je 9000 Nukleotiden.

#### **6.1.4. RIA**

Wir haben  $\beta_H$ -Endorphin-IRM und N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-IRM in Keratinozytenzellkulturen mittels des Radioimmunoassays bestimmt. Der RIA ist ein anerkanntes Verfahren zum Nachweis von Translationsprodukten. Neben den gentechnologischen Untersuchungen (RT-PCR) war es wichtig, Radioimmunoassays durchzuführen, um POMC-Derivate aus einem möglicherweise aberranten Haut-POMC-Gen-Translationsprodukt zu erfassen.

## 6.2. Ergebnisse

### 6.2.1. Widersprüchliche Literaturbefunde zur Expression des hypophysären POMC auf Transkriptionsebene

Es gibt eine Reihe von Literaturberichten über die Expression von hypophysärem POMC in Hautzellen. Zu nennen sind jedoch auch kontroverse Befunde, insbesondere die daraus resultierende Auseinandersetzung zwischen Ancans et al. (1998) und Can et al. (1998). Can et al. gehen von dem Vorhandensein einer Variante des human-hypophysären POMC in menschlicher Haut aus, die offenbar zumindest partiell dem POMC entspricht, das bei Hypophysenvorderlappen-Tumorzellen der Maus (AT-20 Zellen) gefunden wurde (Uhler et al., 1983). Ancans wirft der Arbeitsgruppe um Can unsauberes Arbeiten vor und bekräftigt, dass in nativen Hautzellen wie den Melanozyten und den Keratinozyten human-hypophysäres POMC exprimiert wird.

Arbeitsgruppen, die Zellen (Keratinozyten und A 431-Zellen) mittels PCR unter Verwendung von Primern untersuchten, die ausschließlich Teile aus dem Exon 3 in die zu replizierende Nukleotidsequenz einbezogen, konnten positive Ergebnisse in Bezug auf die Expression von hypophysärem POMC sowie Bildung und Freisetzung von dessen Derivaten erzielen (Teofoli et al., 1993; Schauer et al., 1994; Ancans et al., 1998). Unter Verwendung von Primerpaaren aus dem Exon 2- und Exon 3-Bereich konnte die Expression des human-hypophysären POMC-Gens nicht nachgewiesen werden. Auch Can et al. (1998) haben ihre Versuche unter Verwendung von Primerpaaren aus dem Exon 2- und Exon 3- Bereich durchgeführt.

Auch die Arbeitsgruppe um Wintzen berichtet über Expression von hypophysärem POMC in Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung. Allerdings wurden 4 Jahre nach dieser Bekanntmachung Einschränkungen bezüglich der POMC-Expression geäußert. Eine POMC-Expression konnte von dieser Arbeitsgruppe bei Keratinozyten danach nur in Nährmedien mit geringem Calciumgehalt festgestellt werden. Es wird eine 1,5 -fache Steigerung der POMC-mRNA-Konzentration in Keratinozytenkulturen 24 h nach UV-Stimulation beschrieben (Wintzen et al., 1996; 2000).

Über die Größe der POMC-Transkripte in menschlichen Hautzellen gibt es unterschiedliche Angaben. Neben den Größen, die der in der Hypophyse und dem Hypothalamus produzierten POMC-mRNA entsprechen, wurden auch kürzere Varianten nachgewiesen (Autelitano et al., 1989; Luger et al., 1998; Schauer et al., 1994; Chakraborty et al., 1996; Wintzen et al., 1996; Slominski et al., 2000).

## POMC-Gen

1	ctgctcttca	cagcatcacc	ctctccccat	ttaatggttt	aggttaacag	gactttttcc
61	ttgaggcttg	ggacacggaa	gggagcctcc	cctaaaccag	gcccttggag	agcaggcccc
121	aggggagcag	tgcaactcac	cttcacaccc	acaagacggc	tcctgacttc	tgctccctcc
181	tcccctcccc	aaagtggaac	agagagaata	tgattcccca	cgacttccac	atcacagttt
241	ccaaacaatg	gggaaatcgg	aggcctcccc	gtgtgcagac	ggtgatattt	accgccaaat
301	gcgaaccagg	cagatgccag	ccccagcacg	cacgcaggta	acttcaccct	cgctcaacg
361	acctcagagg	ctgcccggcc	tgccccacac	gggggtgcta	agcctcccgc	ccgttctaag
421	cggagacca	acgccatcca	taattaagtt	cttctgagg	gcgagcggcc	aggtagcgct
481	tcggcaggac	agtgctaatt	ccagcccctt	tccagcgcgt	ctccccgcgc	tcgtcccccg
541	tctggaagcc	cccctcccac	gccccgcggc	cccccttccc	ctggcccggg	gagctgctcc
601	ttgtgctgcc	gggaaggtea	aagtcccgcg	cccaccagga	gagctcggca	agtatataag
661	gacagaggag	cgcgggacca	<b>agcggcggcg</b>	<b>aaggaggggga</b>	<b>agaagagccg</b>	<b>cgaccgagag</b>
<b>EXON 1</b>						
721	<b>aggccgcccga</b>	<b>gcgtccccgc</b>	<b>cctcagagag</b>	<b>cagcctcccg</b>	<b>agacagg</b> taa	ggcgcagcg
781	tgggggaccc	gtgctctttc	cccgggatcc	cctgtccccg	tcctcgcgat	gcagtggcc
841	ggctccggct	ccgaaggcgg	acctgggcgc	ctctggctct	ccgcggtccc	gagttctcga
901	caacttttct	gcgccgactg	cggcatgaga	agccgccagt	agctgagctg	gagggccac
961	gtccggcccc	tgggcggacg	gcccgcgaagc	tgcaaggcgt	gtctccaggg	agccggcggc
1021	ctcctctccc	ccaggggctc	gcccgcggctc	ggaggctccg	agagcttgct	aggaggctct
1081	gggacaaccc	ggtctttttt	tttttttttg	agacggagtt	tcgctcttgt	tgccccatgt
1141	ggagagcaaa	gggggtgatct	ctgctcaccg	caaccttcgc	ctcccgggtt	caagcgattc
1201	tcctgcttca	gcctcccagag	tagctgggat	tacaggcatg	cgccaccacg	cccggctaata
1261	ttttgtattt	ttagtagtga	cgagttttct	ccatgttggg	caggctggct	tcaaactccc
1321	gacaacaggt	gatccgcccc	cctttgcccc	ccaaagtctc	ggcattacag	gcgcgagcca
1381	ccgccccggg	ccagcccggg	cttttagtat	ctcttgctcc	cagtttcacg	gataggtgtc
1441	acatcttgaa	agtcaaattc	catacacgct	atcgcaaatt	aatggtggaa	acggggcagc
1501	agagaaaagg	ataaaaagtca	taatgaacgc	cctgccttcc	ggattttttc	ggattcagac
1561	ccctgaatcc	ttgtttcctt	gcccacctta	gcgcacccga	ggtggcccgcg	ctatgataat
1621	tacatgataa	ctgggtcaat	tacaatgcag	aatagttggg	tctcttctct	ccaagaccta
1681	gctgggggta	aaaacagggtg	gcccggggcgg	gagctgtcct	agatcctgaa	acgcactgtc
1741	tagtttcgga	tgccctcaac	agaaccgggg	tggacggttt	atggcgcaga	tcctgggttg
1801	agggcacggg	cagccatttg	gaatgatcaa	ggctcaggta	aggggcggtt	ccagcgaagg
1861	agagacagtc	cacttggcat	ttggattccc	caaattcttc	atgtttaaata	ggggcagggg
1921	gggttcttac	agaatggctg	gaaggagcca	agggaaaata	aagtgtgtgt	ggattttttt
1981	tgtgtgtgtg	tcagtttata	aactctgcac	agattatggc	cactttaatg	acttactggt
2041	cctttgatgc	ttttgttata	ggactcgatg	catgtatgtc	atgggtgtaag	gacaaaaactc
2101	ggccccctgtg	ctcctctaat	ctttacaaaa	ggtcatggcc	agcgtgcagt	tttacagtaa
2161	caagcaaaat	gatttgttga	gctcatagag	agccccctcac	acctatgaag	ttctaataag
2221	tgtagttcta	ctataaagtt	aatctcagga	tgagcaaatt	tcaagtttct	atttttccag
2281	agctttccat	ttttggatta	taatactttc	cctacttaaa	aaagcacaac	atttgatatt
2341	tccccaaata	ttgtttgctt	taaaaatgac	acaaaaggta	ctatttgttc	atgtagaga
2401	actgaaaata	cacataagca	aatacacata	cacataagca	aaatatacaa	tacaaacaca
2461	agaccatctt	tcaggggaaga	atctgaagtt	ttagcaatag	cagccatcta	accagtttag
2521	caacagaata	taagctctga	gaggggtggga	gtgaatatgt	taccacattg	tacaacacag
2581	cacatagggc	ataaggaggg	gaaatgctct	ctggggcctt	ccaggaaggc	ctgaagtcat
2641	tgcttctagc	aaatggaaat	cactccagag	tagttatctt	tgacaagaat	tgaaatataa
2701	ttgagggaac	tatcagacct	gtaagatttt	gttttttctt	ttactaataat	gttactttac
2761	atttgcattt	ggtgacatac	gtaactacca	ttttctgtg	actgtaacat	ctgggcattt
2821	ttcagagcta	aatgtgctat	ggtcaacttg	gagctttaat	ctaattgcct	ggtccaccaa
2881	gttctggctg	tgtacttgaa	tagatcactg	gcaggggtaca	atgggaacag	cctgtccctt
2941	ggagccagga	gaggacacca	aggttgacca	aagctcgttc	agttgcccct	ttagccgaag
3001	cgcacctggg	ccagtcactg	gctgccagtg	ccatctaata	gctgctctga	aaatgctcag
3061	ccttgcccgg	caacccttca	gaagctagca	ccgtgcaggc	ccagcgcctg	gggaaataggg
3121	cgaggggtggg	gtagagagaa	ggaagtggcc	tcctgaagta	gaaatcagcg	cttcagagga
3181	ctttcacttc	caaagcctcc	cctatataaa	aaagatttgg	cccacgcctc	cccaaatgag
3241	agatttattt	taggcaaaact	tattttaaaa	tgcccagcgtt	cattaggagt	gacaagacac

3301	ttagtcatcc	acgctttaat	gtgaattact	tttctcatct	aattacattt	ctttctagca
3361	gctggctgag	aagatcttct	gaaatccaaa	atgattgtag	ggttggcggg	gagctgatct
3421	ccggcctcga	ggtggcttca	gggggcccac	ctggttaagg	gaaatttggc	agtgcgaggg
3481	tagtgctgga	gagaggggtg	ggtacagggg	gctaggggca	ccatggatgc	cccctcctta
3541	ctgtcccctg	gtgtcttgac	ctcagcttct	gcccacaggc	acttgctgga	ttctccaaaa
3601	gtatctgcag	tggctgttcc	accaggaggt	aattcccttc	tggctctctt	cccctccaca
3661	tctgcatect	cttcaaatec	tgccatttca	gaccacattt	gagagctcta	gagaacaaga
3721	catctgacac	gtgacgtgtc	cagaagatga	gccagatttc	aaagaactga	gatctgcttt
3781	aaaaacgaag	ctctccaaag	ttactggagt	ctgggtaata	gtgatcacca	gagtaatttg
3841	tgtgcaggac	atcaaatcag	gctgctcgaa	atgctgccta	aattggccag	tggttttatt
3901	tgcttttctg	tcaacctaat	attcatagga	aatagagttt	cagaggaatg	ataggatcct
3961	ggtggaataa	aaagggaaaa	gaccatcttg	agcaggagtt	tcagggctct	ccgtttttcc
4021	caagttactt	tcaactcctga	gatcttgcac	gttagaacta	cagcttaatg	tagtgaaata
4081	ggaaagtctc	ctgttaggag	cttagcctta	ccttgtcatg	gacattaaag	taattgtctc
4141	tctttgggct	tcaattttcc	catctctcat	gggaagggct	gaaccaagca	atccccaaaa
4201	tagcttccag	ccttaacctt	tttaggggtc	tcgtttaaat	agaagataac	agggaaatgg
4261	tcacagttta	cccaggtcca	ttccctcttc	cttatccaaa	cttataccac	cgctgtagct
4321	cacacctcct	ttctcagcat	tgtgtgtgtc	cttaaaatgc	ctttaactcc	acaagagagt
4381	gtgttggtta	tgttggtcca	aggtocttcc	tggtgagtgg	ccaacattgt	tttgcctcct
					-M--P-	
4441	gcaggggtcc	caccaatott	gtttgcttct	gcagagcctc	agcctgcctg	gaagatgccc
<b>EXON 2</b>						<b>EXO21.....</b>
						-----R-----
4501	agatcgtgct	gcagccgctc	gggggcctcg	ttgctggcct	tgctgcttca	ggcctccatg
						.....
4561	gaagtgcgtg	gctgggtgct	ggagagcagc	cagtgtcagg	acctcaccac	ggaaagcaac
4621	ctgctgggtac	gtggggccatg	actgccatct	tggcttagac	attagatggg	actggagctg
4681	ggaaagctca	aaagaaaagg	gtgtggggaa	agggaaattc	attcccagtg	ataggcgtga
4741	ttcaatccag	ggcaggagca	aaactttgca	gtgaagtaag	aatggggaga	agaaatcagg
4801	gaaggaagca	gcttcagggg	gaggggttga	gtccacaatt	tctgcttggg	tatccttact
4861	tcttgcccca	tcttttatgg	agaccttgaa	ccctttaagc	tagagatggg	gctataagag
4921	caataatgga	cccctcaatc	tattctgtac	tttaccatct	tagcttccca	aactattcct
4981	ttttaagaag	ctcatatcac	ttgccatttt	cattccatat	ttcttaccct	tttatctact
5041	accggttgca	aaaccagcca	ggtagtctct	caaatcatct	ctggaagaag	gaaaaaccag
5101	gggccctttt	ttttttttct	ttaattgggtg	ccaaatgtct	catgtttatt	ctggaggact
5161	ggccttctgc	tgtgttctct	tacagctctt	ccagagcatg	tgaaggcctt	tgcatcaggc
5221	aggagctccc	tccaggtcac	cacaggggtg	atgtatctgc	ctgtgggggg	tgtgtgtgtg
5281	tgtgtgttgg	ggggcataaa	tgagtaatga	tgccaaatcc	agagattaaa	aggcacactg
5341	agaccaggcg	agatggctca	tggctgtaat	cccagcactt	ttagatgcta	agggtggagg
5401	attgcttgag	cccagggatt	caagacaagc	ctgggcaaca	tagtgagacc	tccacttcta
5461	caaaaaataa	aaaagttagc	cagatgtggg	ggcatgtgcc	tgtagtccta	gctacttggg
5521	aggttcactt	gaggccagga	gtctgacgac	acagtaagct	atgatcacac	cattgcactc
5581	cagtctgggt	aacagaatga	gaccttgtct	caaaacaaaa	caaaatgaaa	caaacaaaaa
5641	aacaaacccc	catactgtta	gtgtcagtg	ccggaatctt	aatcttgttg	ccatcacctg
5701	gcaggtgctg	aggggtggaat	gtacataact	acattctgtg	tattttgtca	atgcagaagc
5761	tgagttaagg	tgaagataga	atgaggtcct	caaagacaca	gaccagtctt	catgtgtaat
5821	ataaaataga	aacaaagagc	ccaggggatt	ctgtgagttc	cagtttggaa	agaccaaga
5881	gtctcttgac	ttgagacacc	cacagcacag	ctcaccaggg	agggctcact	ggcacacgtc
5941	aggaccctag	ggttctagac	ccagtttga	gggtgtgggac	cttgaccagc	tcctatcacc
6001	tctctgagtc	tctgttttca	ctatctgtcc	acgggagggg	agtgtaaatt	agttttttcc
6061	attgttaacg	ttccacagag	ttgtaattct	gaacacctgg	agtaggcaat	gtccagctca
6121	acagagtggg	taggatcctt	ttattttctc	ctttgctatt	cccaagaaa	agagcagcca
6181	gtgagctttt	catcttttta	tcaactgaaa	ctcaaggctg	cagcctatgc	agccattttc
6241	ctaagctaat	atgtaccaca	atagagtctc	ctagggacaa	ggagcagaga	cacaggttcc
6301	acagacggtg	caatggaaat	aacgctagct	ttccaccctc	ccctccagtc	agaatgagat
6361	tacagggaaa	taagcttgcc	ccagagctca	ctgggggatc	tctcagaaat	cagctcagaa
6421	gtcgtgaaag	aaccaaggtg	cagttttgga	ggcttagtgc	agagatggag	ctggggtagg



```

8581 attttccaca cactccactg agtgggagac tgctcagcta gcacacgtgt aaaggcagga
8641 ttcttgcaag agtgaccc

```

**Abbildung 14: POMC-Gen mit Kennzeichnung der verwendeten Primer (gelb unterlegt) HPO 10/ HPO13/ HPO 14/ EXO 21 und Antikörpern (violett unterlegt) 84E ( $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM) und 27 P (N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-IRM); CODIERUNGEN:**

**Rot: EXON-Bereiche / transkribiert (POMC-mRNA)**

**Blau: EXON-Bereiche / transkribiert (POMC-mRNA) und translatiert (POMC-Protein)**

### **6.2.1.1. Ausschluss der Transkription des hypophysären POMC-Gens in HaCaT- und Colo 679-Zellen**

Die kontroverse Literaturbasis bezüglich der Expression von POMC und der Bildung von POMC-Derivaten in der Haut veranlasste uns, in 3 Zelllinien, der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT, der humanen Epidermoidzelllinie A 431 und der humanen Melanomzelllinie Colo 679 nach der Expression von human-hypophysärem POMC zu suchen. Die verwendeten Primerpaare wurden sowohl aus dem Bereich des Exon 2 als auch des Exon 3 gewählt. Berichte von Arbeitsgruppen die ausschließlich mit Primern aus dem Bereich des Exon 3 gearbeitet haben, beschreiben den Nachweis von hypophysärer mRNA (Slominski et al., 1996).

Unter Verwendung der Primerpaare HPO10/HPO 13, HPO 10/HPO 14 und HPO 10/EXO 21, deren Sequenz und Position im hypophysären POMC-Gen in Abbildung 14 gezeigt werden, konnte sowohl in den HaCaT-Zellen als auch in den Colo 679-Zellen keine POMC-Expression nachgewiesen werden. Entgegen der uns vorliegenden Information aus der Literatur, wonach Keratinozyten in der Lage sind, POMC zu exprimieren, fanden wir weder eine basale, noch eine UVB-stimulierte POMC-Expression in den von uns gewählten Hautzelllinien HaCaT und Colo 679 mittels Einsatz von RT-PCR (Chakraborty et al., 1996; Teofoli et al., 1997; Thody et al., 1998; Scholzen et al., 2000). Allerdings haben die Arbeitsgruppen, deren Veröffentlichungen uns vorlagen, nicht mit HaCaT- oder Colo 679-Zellen, sondern mit nativen Zellen oder A 431-Zellen gearbeitet. Es ist jedoch durchaus möglich, dass beide Zelllinien in der Lage sind, ein aberrantes POMC-Gen zu exprimieren, welches lediglich unter den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen nicht exprimiert werden konnte. Um einen technischen Artefakt handelt es sich jedenfalls nicht: Die korrekte Durchführung der RT-PCR wird durch das positive Ergebnis bei DMS 79-Zellen bewiesen, deren POMC-Expression belegt ist (Picon et al., 1995); sie wurde in der Tat auch im Rahmen dieser Untersuchungen beobachtet.

### **6.2.1.2. Hinweise auf die Transkription eines aberranten POMC-Gens in A 431-Zellen**

Bei der humanen Epidermoidzelllinie A 431 konnte, wie im Ergebnisteil gezeigt, nur unter Verwendung der hypophysären Primerpaare aus dem Exon 3-Bereich, HPO 10/HPO 13 sowie HPO 10/HPO 14, eine geringe Menge an PCR-Amplifikat eines hypophysären POMC-mRNA-Transkripts nachgewiesen werden. Bei Einsatz des aus den Exons 2 und 3 des hypophysären POMC-Gens stammenden Primerpaares HPO 10/EXO 21 waren die Befunde jedoch negativ. Die positiven Befunde mit Primern aus dem Exon 3-Bereich sind kompatibel mit der Expression eines hypophysären POMC-Gens und beweisen damit zumindest die Expression irgendeines POMC-Gens. Die negativen Befunde mit hypophysären Primern aus Exon 2 und 3 zeigen jedoch, dass es sich dabei nicht um das hypophysäre, sondern um ein „aberrantes“ POMC-Gen handeln muss. Die positiven Befunde mit Primern aus dem Exon 3-Bereich waren nicht durchgehend reproduzierbar. Die Expression des „aberranten“ POMC-Gens erfolgt also unter Bedingungen, die zur Zeit noch nicht bekannt sind.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien scheint, insgesamt betrachtet, die Epidermoidzelllinie A 431 am ehesten ein aberrantes POMC-Gen zu exprimieren.

Generell ist es aber möglich, dass auch die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT und die humane Melanomzelllinie COLO 679 unter bestimmten Bedingungen ein aberrantes, vielleicht sogar, wenn auch kaum anzunehmen, ein hypophysäres POMC-Gen exprimieren. Jedenfalls scheint ein hoher Grad an Homologie für das hypophysäre und das aberrante POMC-Gen im Bereich des Exon 3 zu bestehen, während der Exon 2-Bereich der beiden POMC-Gene, soweit als solcher existent, absolut divergent zu sein scheint.

Einige Arbeitsgruppen publizierten Ergebnisse, die mit den unsrigen kompatibel sind. So publizierte die Arbeitsgruppe um Slominski Ergebnisse, nach denen sie an Zellen der Epidermoidzelllinie A 431, unter Verwendung von Primern aus dem Exon 3 Bereich, einen Hinweis auf die Expression des hypophysären POMC-Gens erhalten hatten (Slominski et al., 1996). Auch die Arbeitsgruppen von Teofoli et al. und Ancans et al. konnten ausschließlich POMC-mRNA-Transkripte unter Verwendung von Primern aus dem Exon 3 Bereich nachweisen (Teofoli et al., 1994, Ancans et al., 1998). Der Nachweis einer POMC-Expression mittels RT-PCR unter Einbeziehung von Primern aus dem Exon 2-Bereich ist bis jetzt keiner Arbeitsgruppe gelungen (Can et al., 1998).

### **6.2.1.3. Befunde zur Expression eines aberranten POMC-Gens in HaCaT-Zellen auf Post-Translationsebene**

Hypophysäre POMC-Derivate entstehen unter der Einwirkung von Prohormon-Convertase 1 (PC1) und 2 (PC2) in Kombination mit dem PC2 aktivierenden Bindungsprotein 7B2. Möglich wäre, dass die Prohormon-Convertasen in Hautzelllinien nicht aktiviert werden oder gar nicht existieren und aus diesem Grund trotz Transkription eines aberranten POMC-Gens keine posttranslationalen Prozessierungsprodukte entstehen. So konnte in der Haut bis heute nur PC1 nachgewiesen werden. Eine verstärkte Bildung von PC1 wurde interessanterweise in UV-stimulierten Keratinozyten festgestellt (Brzoska et al., 1997). Sollte PC2 in der Haut nicht existent sein, so wäre auch eine unterschiedliche Aufspaltung des POMC in der Hypophyse und der Haut denkbar. Stimmig mit dieser Arbeitshypothese ist die für die Haut beschriebene Aufspaltung von ACTH 1-39 in kleinere Fragmente wie ACTH 1-10 und ACTH 1-17 (Wakamatsu et al., 1997). In der Hypophyse dagegen erfolgt die Spaltung von POMC durch PC1 in ACTH und  $\beta$ -LPH und anschließend die  $\beta$ -LPH-Spaltung in  $\beta_H$ -Endorphin und  $\gamma$ -LPH.

Auf gentechnologischer Ebene konnte lediglich für die A 431-Zellen unter Verwendung von Primerpaaren aus dem Exon 3-Bereich sowie Primerpaaren aus dem Bereich von Exon 2 und 3 der Beweis für die Expression eines aberranten POMC-Gens geführt werden. Weiterführende Untersuchungen mit Bestimmung von POMC-Derivaten wurden durchgeführt, um die zum Teil positiven Befunde der A 431-Zellen auf gentechnologischer Ebene auf Translationsebene zu bestätigen.

Basierend auf einer 1996 von Wintzen publizierten Studie, in der eine gesteigerte Freisetzung von  $\beta$ -LPH und  $\beta_H$ -Endorphin in nativen Hautzellen nach Stimulation mit TPA, IL-1 $\alpha$  und UVB-Strahlung beschrieben worden war, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch unternommen, durch UVB-Stimulation eine gesteigerte Bildung und Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin- und N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material bei der humanen Hautzelllinie HaCaT nachzuweisen. Tatsächlich konnte für die gepoolten und ungepoolten HaCaT-Zellen (incl. Zeitversuchen) eine basale Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin- und N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material festgestellt werden. Eine UVB-stimulierte Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material ließ sich nicht nachweisen. Demgegenüber konnte in einem Vorversuch mit ungepoolten HaCaT-Zellen (Zeitversuch) in den Zellüberständen eine UVB-stimulierte Freisetzung von N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-

immunoreaktivem Material festgestellt werden. Hier konnte ein Anstieg des immunoreaktiven Materials in ansteigender Menge nach 2, 4 und 8 Stunden gefunden werden, nach 24 Stunden fiel die Konzentration wieder ab.

Trotz negativer Befunde auf gentechnologischer Ebene (hypophysäres POMC-Gen ausgeschlossen, aberrantes POMC-Gen nicht ausgeschlossen) ist ein positiver Befund auf Post-Translationsebene (aberrantes POMC-Gen damit nachgewiesen) möglich, wenn die „hypophysären“ Antikörper eine „hypophysäre“ Aminosäuresequenz im aberranten POMC finden. Wird zusätzlich zu diesem positiven Befund ein negativer Befund auf posttranslationaler Ebene erhoben, dann zählen die beiden Befunde insgesamt wiederum als Beweis für die Expression eines „aberranten“ POMC. Werden nur positive Befunde im Sinne eines hypophysären POMC auf posttranslationaler Ebene erhoben, so beweisen negative Ergebnisse im Sinne eines hypophysären POMC auf gentechnologischer Ebene die Expression eines „aberranten“ POMC-Gens. Ein Nebeneinander von Ergebnissen (auf der Transkriptionsebene hypophysäre“ Primer, die an „aberrante“ POMC-Sequenzen nicht binden konnten und „hypophysären“ Antikörper, die „hypophysäre“ POMC-Fragmente im aberranten POMC gebunden haben) ist durchaus möglich.

In der Tat zeigten die mit HaCaT-Zellen erhaltenen Ergebnisse, dass in diesen Zellen eine basale Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin- und N-Ac- $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem-Material stattfand. Diese basale Freisetzung wird nicht durch die Stimulationsfreisetzung ergänzt, was mit dem Vorhandensein eines aberranten POMC-Gens zusammenhängen könnte. Es ist möglich, dass sich diese aberrante Form des POMC nicht mit UVB stimulieren lässt.

Schlussendlich bleibt die Frage offen, warum in der HaCaT Zelllinie mittels UVB-Stimulation keine gesteigerte Bildung und Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin und N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material erzielt werden konnte.

Allerdings wurden auch für native Keratinozyten bezüglich der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten in neuerer Literatur Einschränkungen gemacht. Die Arbeitsgruppe um Wintzen veröffentlichte 1996 eine Untersuchung, in der ein erhöhter  $\beta_H$ -Endorphinspiegel nach UV-Stimulation in Keratinozyten gemessen wurde. Eine später veröffentlichte Studie dieser Arbeitsgruppe beschrieb, dass eine gesteigerte  $\beta_H$ -Endorphin-Freisetzung in

Keratinocyten nach UV-Bestrahlung nur noch in Versuchen, die mit calciumarmem Nährmedium kultiviert worden waren, nachgewiesen werden konnte (Wintzen et al.; 2000). Es ist zu überdenken, ob die zum Teil negativen, zum Teil positiven Ergebnisse der Veröffentlichungen von Wintzen nicht auch als Hinweis auf das Vorliegen eines „aberranten“ POMC in der Haut gewertet werden können.

### 6.3. Neuere Erkenntnisse

Betrachtet man den aktuellen Stand der Forschung, scheinen POMC und POMC-Derivate an einer Vielzahl von Regulationsmechanismen beteiligt zu sein. Wie oben aufgeführt, werden unter bestimmten Bedingungen in bestimmten Hautzellen oder in bestimmten Hautzelllinien POMC bzw. POMC-Derivate oder ein aberrantes POMC exprimiert.

Unter diesem Gesichtspunkt ist eine Reihe von Erkenntnissen über die physiologische Bedeutung des POMC-Systems in der Haut interessant. So wie das hypophysäre POMC-System durch Stress aktiviert wird und ein Stressadaptationssystem darstellt, scheint auch ein solches System in der Haut zu existieren. Grundsätzlich müssen bestimmte Reaktionssysteme in der Haut existieren, damit dort eine „Adaptation“ an „Stress-Situationen“ stattfinden kann. Sowohl der CRH-Rezeptor als auch der  $\mu$ -Opiat-Rezeptor konnten in menschlicher Haut (Keratinocyten und Melanozyten) nachgewiesen werden (Slominski et al., 2000; Bigliardi et al., 1998). Dem Anschein nach sind Melanozyten und in der Haut freigesetztes  $\alpha$ -MSH sowohl an der Anpassung des Pigmentschutzes als auch an Aktivitäten des lokalen Immunsystems beteiligt. Untersuchungen über die Regulation der menschlichen Melanozyten durch  $\beta_H$ -Endorphin haben ergeben, dass Melanozyten sowohl  $\mu$ -Opiat-Rezeptoren als auch  $\beta_H$ -Endorphin exprimieren. Die  $\mu$ -Opiat-Rezeptoren und  $\beta_H$ -Endorphin partizipieren somit eventuell an der Regulierung der Hautpigmentierung (Kausser et al., 2003). Eine durch UV-Bestrahlung induzierte Hautbräunung ist als ein lokaler Schutzmechanismus zu verstehen und fungiert somit als ein „Stressadaptationssystem“. Studien über die Entstehung von Hautkrebs konnten einen Zusammenhang zwischen ungeschützter häufiger Sonnenexposition und Sonnenbränden und der Entstehung von Hautkrebs feststellen. Es konnte gezeigt werden, dass UV-Strahlung zu einer DNA-Schädigung führt und diese eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielt (Gilchrest et al., 1999). Hier ist ein weiterer Reparatursmechanismus neben dem „Thymidine dinucleotide“ denkbar, nämlich das POMC-System. Besonders durch die Aktivierung des Immunsystems könnte hier lokal eingegriffen werden. Untersuchungen an humanen Keratinocyten konnte beispielsweise zeigen, dass  $\beta_H$ -

Endorphin als Opiat-Rezeptor-Agonist die Immunantwort in humanen Keratinozyten moduliert und somit die Granulation und Reepithelialisation fördert. Naloxon als Opiat-Rezeptor-Antagonist konnte diesen Effekt entscheidend reduzieren. Bigliardi et al. (2002) gehen daher von einem spezifischen Effekt aus, der besonders wichtig für die Regeneration der Haut und deren Wundheilung sein könnte. Es ist denkbar, dass ein schwerer Sonnenbrand auf unserem größten Sinnesorgan, der Haut, dann zur Entartung führt, wenn die durch diesen Stress aktivierten Systeme (POMC) nicht mehr in der Lage sind, die entstandenen Schäden adäquat zu reparieren. Die offensichtlich durch  $\beta_H$ -Endorphin mit gesteuerte Reepithelialisation hätte damit möglicherweise eine entscheidende Schlüsselfunktion. Die neuen Erkenntnisse auf dem Gebiet der POMC-Forschung könnten auch für die Pharmaforschung im Hinblick auf Medikamentenentwicklung von Bedeutung sein. Die von Bigliardi im Jahre 2003 veröffentlichten Arbeiten, in denen von einer unterschiedlichen Expression von  $\mu$ -Opiat-Rezeptoren in chronischen und akuten Wunden berichtet wurde, zeigten, dass die  $\mu$ -Opiat-Rezeptordichte in chronischen Wunden im Gegensatz zu akuten Wunden deutlich reduziert war. Da  $\beta_H$ -Endorphin die Expression von „Transforming Growth Faktor  $\beta$  type II R“ (TGF  $\beta$ -Typ II) in Hautzellen erhöht, ist dies ein weiterer Hinweis auf die Mechanismen der Wundheilung.  $\beta_H$ -Endorphin partizipiert somit offenbar an der Regulation der Wundheilung, indem es die Fibroblastentätigkeit, Kapillareinsprossung, Granulation und Epithelialisierungsrate erhöht.

Schlussendlich bleiben dennoch viele Fragen zur Existenz eines POMC-Systems in der menschlichen Haut und dessen potentiellen Aufgaben offen und sollten somit Gegenstand weiterer Forschung sein.

## 7. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Klärung der kontroversen Datenlage in Bezug auf die Expression des hypophysären POMC sowie der Bildung und Freisetzung von dessen Derivaten in der Haut des Menschen zu leisten. Als Modelle menschlicher Hautzellen fanden die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT, die humane Epidermoidzelllinie A 431 und die humane Melanomzelllinie COLO 679 Verwendung. Zum einen sollte mittels RT-PCR unter Zuhilfenahme von Primerpaaren, die sowohl Teile von Exon 3 als auch von Exon 2 des hypophysären POMC-Gens in die zu replizierende Nukleotidsequenz einbezogen, geklärt werden, ob in den untersuchten Zelllinien das hypophysäre POMC-Gen oder eine Variante desselben exprimiert wird. Zum anderen sollte in der Keratinozytenzelllinie HaCaT mittels Radioimmunoassay (RIA) die basale und UVB-stimulierte Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material und N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material untersucht werden.

Entgegen der uns vorliegenden Information aus der Literatur, wonach Keratinozyten in der Lage sind, hypophysäres POMC zu exprimieren, konnte eine basale oder UVB-stimulierte Expression des hypophysären POMC-Gens in den von uns gewählten Hautzelllinien HaCaT und Colo 679 mittels RT-PCR nicht bestätigt werden. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die oben erwähnten Zelllinien in der Lage sind, ein aberrantes POMC-Gen zu exprimieren.

Bei der humanen Epidermoidzelllinie A 431 konnte jedoch nur unter Verwendung von Primerpaaren, aus dem Exon 3-Bereich des hypophysären POMC-Gens eine geringe Menge an PCR-Amplifikat eines POMC-mRNA-Transkripts nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind zwar kompatibel mit der Expression eines hypophysären POMC Gens, beweisen jedoch zunächst nur die Expression irgendeines POMC-Gens. Bei Einsatz des Primerpaares aus den Exons 2 und 3 des hypophysären POMC-Gens waren die Befunde dann negativ, was den Schluss auf ein „aberrantes“ POMC-Gen, eine Variante des hypophysären POMC-Gens, nahe legt.

Auf Post-Translationsebene zeigten die mit der HaCaT Zelllinie erhaltenen Ergebnisse, dass in diesen Zellen eine basale Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin- und N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktivem Material stattfand. Die auf Transkriptions- und Post-Transkriptionsebene erhaltenen Ergebnisse bei der HaCaT Zelllinie weisen also – insgesamt betrachtet, – ebenfalls

auf die Expression einer Variante des hypophysären POMC-Gens bei HaCaT-Zellen hin. Eine UVB-stimulierte Freisetzung ließ sich übrigens bei den HaCaT-Zellen nicht nachweisen, was wiederum mit dem Vorhandensein eines „aberranten“ POMC-Gens zusammenhängen könnte. Die Epidermoidzelllinie A 431 exprimiert von den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien am ehesten ein aberrantes POMC-Gen. Es ist aber offenbar möglich, dass auch die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT und vielleicht sogar die humane Melanomzelllinie COLO 679 unter bestimmten Bedingungen ein aberrantes POMC-Gen exprimieren.

Um das POMC-System der Haut in seiner komplexen Form und seinen vielfältigen Funktionen verstehen zu können, sind weitere Arbeiten auf diesem Gebiet nötig.

### 7.1. Summary

The expression of a POMC gene identical with that found in the pituitary gland as well as the release of its derivatives in human skin remains a disputed issue. The aim of this research work was to further illuminate this field of interest.

The human keratinocyte cell line HaCaT, the epidermoid cell line A 431 and the melanoma cell line COLO 679 served as models for human skin cells. By RT-PCR, using primer pairs from exon 3 and exon 2 spanning intron B of the pituitary POMC gene the three cell lines were examined for transcripts of pituitary POMC mRNA or for a variant thereof.

With the use of radioimmunoassays (RIA's) the keratinocyte cell line HaCaT was screened for basal and UVB-stimulated release of  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin and N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin immunoreactive material.

In contrast to the results of a series of investigations indicating that keratinocytes are able to express the POMC gene of the pituitary gland, in our study basal and UVB-stimulated expression of this gene could not be detected using RT-PCR in HaCaT- and COLO 679-cells, although the possibility that these cell lines may be able to express an aberrant POMC gene could not be excluded. However, in the human epidermoid cell line A 431 a pituitary POMC mRNA transcript was found using a pair of primers, whose corresponding nucleotide sequences were both located on Exon 3 of the pituitary POMC gene. Although these results were compatible with the expression of a pituitary type of POMC gene they actually just prove the existence of any POMC gene displaying the respective nucleotide sequences. In fact, using pairs of primers from exon 3 and exon 2 spanning intron B of the pituitary POMC gene an transcript of the pituitary POMC mRNA could be found in the human epidermoid cell line A 431 indicating the existence of a POMC gene in A 431 cells not identical with the hypophyseal POMC gene.

At the posttranslational level basal release of  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin and N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin immunoreactive material was detected in the HaCaT cell line. Altogether, the results at the transcriptional and the post-transcriptional level obtained with the human skin cell line HaCaT indicate a variant of the pituitary POMC gene expressed in this cell line. An UVB-stimulated release of  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin and N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin immunoreactive material in HaCaT cells was not observed, which again was compatible with a variant of the pituitary POMC gene expressed in HaCaT cells.

Out of the three human skin cell lines studied, the epidermoid cell line A 431 is most likely to express a POMC gene not identical with the hypophyseal one. However, under certain

conditions the keratinocyte cell line HaCaT as well as the human melanoma cell line COLO 679 might also be supposed to express an aberrant POMC gene.

To further elucidate the POMC system of the skin and its various functions further research in this field is required.

## 8. Literatur

- Ancans, J.; Thody, A.J.; Wood, J.M.; Bazley, W.D.; Schallreuter, K.U.: Human Epidermal Proopiomelanocortin (POMC) cDNA Variant is Identical to Mouse POMC cDNA  
Society for Invest. Dermatol., Letters to Editor 25.11.1998
- Apte, R.N.; Durum S.K.; Oppenheim J.J: Opioids modulate interleukin-1 production and secretion by bone-marrow macrophages  
Immunol. Lett. 24: 141-148, 1990
- Auerhammer, C.J.; Chesonokova, V.; Bousquet, C.; Melmed, S.: Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of proopiome-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion  
Mol. Endocrinol. 12: 954-961, 1998
- Autelitano, D.J.; Lundblad, J.R.; Blum, M.; Roberts, J.L.: Hormonal regulation of POMC gene expression  
Ann. Rev. Physiol. 51: 715-726, 1989
- Barker, J.N.; Mitra, R.S.; Griffiths, C.E.M.; Eixit, V.M.; Nickoloff, B.J.: Keratinocytes as initiators of inflammation  
Lancet 337: 211-4, 1991
- Bertagna, X.: Proopiomelanocortin-derived peptides  
Endocrinol. Metab. Clin. North. America 23: 467-485, 1994
- Bhardwaj, R.; Becher, E.; Mahnke, K.; Hartmeyer, M.; Schwarz, T.; Scholzen, T.; Luger, T.A.: Evidence for the differential expression of the functional  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes  
J. Immunol. 158: 3378-3384, 1997
- Bigliardi, P.L.; Bigliardi-Qi, M.; Buechner, S.; Ruffli, T.: Expression of  $\mu$ -opiate receptor in human epidermis and keratinocytes  
J. Invest. Dermatol. 111: 297-301, 1998
- Bigliardi Qi, M.; Bigliardi, P.L.; Eberle, A.N.; Buechner, S.; Ruffli, T.:  $\beta_H$ -Endorphin stimulates cytokeratin 16 expression and downregulates  $\mu$ -opiate receptor expression in human epidermis  
J. Invest. Dermatol. 114: 527-532, 2000
- Bigliardi, P.L.; Büchner, St.; Ruffli, T.; Bigliardi-Qi, M.: Specific stimulation of migration of human keratinocytes by  $\mu$ -opiate receptor agonists  
J. Receptors and signal Transduction Vol 22: 191-199, 2002
- Bigliardi, P.L.; Sumanovski, L.T.; Büchner, S.; Ruffli, T.; Bigliardi-Qi, M.: Different expression of  $\mu$ -opiate receptor in chronic and acute wounds and the effect of  $\beta$ -Endorphin on transforming growth factor  $\beta$  type II receptor and cytokeratin 16 expression  
J. Invest. Dermatol. 120: 145-152, 2003

- Birdsall, N.J.; Bradbury, A.F.; Burgen, A.S.; Hulme, E.C.; Smyth, D.G.; Snell, C.R.:  
Interactions of peptides derived from the c fragment of  $\beta$ -lipotropin with brain opiate  
receptors proceedings  
Br. J. Pharmacol.: 460-461, 1976
- Bloomquist, B.T.; Eipper, B.A.; Mains, R.E.: Prohormone-converting enzymes – regulation  
and evaluation of function using anti-sense RNA  
Mol. Endocrinol. 5: 2014-2024, 1991
- Boelsma, E.; Verhoeven, M.C.H.; Ponc, M.: Reconstruction of a human skin equivalent  
using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT)  
J. Invest. Dermatol. 112: 489-498, 1999
- Bolognia, J.; Murray, M.; Pawelek, J.: UVB-induced melanogenesis may be mediated through  
the MSH-receptor system  
J. Invest. Dermatol. 92: 651-656, 1989
- Boukamp, P.; Petrussevska, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusinig, N.E.:  
Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte  
cell line  
J. Cell-Biol. 106 (3): 761-671, 1988
- Breitkreutz, D.; Schopp, V.M.; Mirancea, N.; Baur, M.; Stark, H.J.; Fusenig, N.E.: Epidermal  
differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface  
transplants  
Eur. J. Cell-Biol. 75: 1-14, 1998
- Brzoska, T.; Scholzen, T.; Becher, E.: UVB irradiation regulates the expression of  
Proopiomelanocortin, prohormone convertase 1 and melanocortin receptor 1 by human  
keratinocytes  
J. Invest. Dermatol. 108: 622a, 1997
- Burbach, J.P.H.; Wiegant, V.M.: Isolation and characterisation of  $\beta$ -endorphin and  $\gamma$ -  
endorphin for single human pituitary glands  
FEBS Lett. 166: 267, 1984
- Can, G.; Abdel-Malik, Z.; Boyce, S.; Nordlund, J.; Farooqui, J.: Regulation of ACTH,  $\alpha$ -  
MSH and  $\beta$ -endorphin expression in cultures of normal human melanocytes and  
keratinocytes  
Pigment Cell. Res. Suppl. 5 83; 1996
- Can, G.; Abdel-Malik, 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
- 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
- Chakraborty, A.K.; Pawelek J.M.: MSH receptors in immortalized human epidermal melanocyte, keratinocyte: A potential mechanism for coordinate regulation of the epidermal melanin unit  
J. Cell. Physiol. 157: 344-350, 1993
- 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 UVB  
Biochem. Biophys. Acta. 1313: 130-138, 1996
- Chakraborty, A.K.; Funasaka, Y.; Pawelek, J.M.; Nagahama, M.; Ito, A.; Ichihashi, M.: Enhanced expression of melanocortin-1 receptor (MC1-R) in normal human keratinocytes during differentiation: evidence for increased expression of POMC peptides near suprabasal layer of epidermis.  
J. Invest. Dermatol. 112(6): 853-60, 1999
- Chen, C.L.C.; Chang, C.C.; Krieger, D.T.; Bardein, C.W.: Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis  
J. Endocrinol. 118: 2382-2387, 1986
- Crine, P.; Gianoulakis, C.; Seidah, N.G.; Grossand, F.; Pezalla, P.D.; Lis, M.; Chretien, M.: Biosynthesis of  $\beta$ -endorphin from  $\beta$ -lipotropin and a larger molecular weight precursor in rat pars intermedia  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4719-4722, 1978
- DeBold, C.R.; Nicholson, W.E.; Orth, D.N.: Immunoreactive proopiomelanocortin (POMC) peptides and POMC-like messenger ribonucleid acid are present in many rat nonpituitary tissues  
Endocrinol. 122: 2648-2657, 1988
- Donatien, P.D.; Hunt, G.; Pieron, C.; Lunec, J.; Taieb, A.; Thody, A.J.: The expression of functional MSH receptors on cultured human melanocytes  
Arch. Dermatol. Res. 284: 424-426, 1992
- Eberle, A.N.: The melanotropins: Chemistry, physiology and mechanism of action  
Karger, S.: 33-47, 1988
- Eipper, B.A.; Mains, R.E.: Structure and biosynthesis of pro adrenocorticotrophin/endorphin and related peptides  
Endocrinol. Rev. 1: 1-27, 1980
- 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 the C57Bl/6 mouse skin  
J. Invest Dermatol. 108: 160-165, 1997

- Fan, W.; Boston, B.A.; Kersterson, R.A.; Hruby, V.J.; Cone, R.D.: Role of melanocortinergetic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome  
Nature 385: 165-168, 1997
- Farooqui, J.Z.; Medrano, E.E.; Abdel-Malek, Z.; Nordlund, J.J.: The expression of POMC and various POMC-derived peptides in mouse and human skin  
Ann. NY Acad. Sci. 680: 508-510, 1993
- Farooqui, J.Z.; Medrano, E.E.; Boissy, R.E.; Tigelaar, R.E.; Nordlund, J.J.: Thy- + dendritic cells express truncated form of POMC mRNA  
Exp. Dermatol. 4: 297-301, 1995
- Farooqui, J.: Human Epidermal Proopiomelanocortin (POMC) cDNA Variant is Identical to Mouse POMC cDNA  
Society for Invest. Dermatol., Letters to Editor 25.11.1998
- Fenger, M.: Proopiomelanocortin:  $\alpha$ -amidated and related peptides.  
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 50: 229-245, 1990
- Fitzpatrick, T.B.; Eisen, A.Z.; Wolff, K.; Freedberg, I.M.; Austen, K.F.: Dermatology in General Medicine  
McGraw Hill, 1987
- Funasaka, Y.; Sato, H.; Chakraborty, A.K.; Ohashi, A.; Chrousos, G.P.; Ichihashi, M.: Expression of proopiomelanocortin, corticotropin-releasing hormone (CRH), and CRH receptor in melanoma cells, nervus cells, and normal human melanocytes  
J. Invest. Dermatol. 5: 105-109, 1999
- 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
- Gee, C.E.; Roberts, J.L.: In situ hybridization histochemistry: a technique for study of gene expression in single cells  
DNA 2: 157-168, 1983
- Gilchrest, B.A.; Eller, M.S.; Geller, A.C.; Yaar, M.: The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation  
N. Engl. J. Med. 340 (17): 1341-8, 1999
- Gilman, S.C.; Schwartz, J.M.; Milner, R.J.; Bloom, F.E.; Feldman, J.D.:  $\beta$ -Endorphin enhances lymphocyte proliferative responses  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4226-4230, 1982
- Glinski, W.; Brodecka, H.; Glinska-Ferenz, M.; Kowalski, D.: Increased concentration of  $\beta$ -endorphin in sera of patients with severe atopic dermatitis  
Br. J. Dermatol. 131: 260-264, 1994

- Goldsmith L.A.: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin  
Oxford University Press NY, 1991
- Goldstein, A.; Tachibana, S.; Lowney, L.I.; Hunkpiller, M.; Hood, L.: Dynorphin (1-13) - an extraordinary potent opioid peptide  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6666-6670, 1979
- Hadley, M.E.: Endocrinology  
Englewood Cliffs, 1988
- Haskell-Luevano, C.; Hendrata, S.; North, C.; Sawyer, T.K.; Hadley, M.E.; Hruby, V.J.; Dickinson, C.; Gantz, I.: Discovery of prototype peptidomimetic agonists at the human melanocortin receptors MC1R and MC4R  
J. Med. Chem. 40: 2133-2139; 1997
- Hölldt V.: Regulation of opioid peptide gene expression  
Handb: Exp. Pharma 104/I, Ed. A. Herz (Opioids), Springer-Verlag, 1993 p. 307-346
- Hölldt, V.; Mueller, O.A.; Gramsch, C.; Kleber, G.; Pasi, A.; Herz.:  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -Endorphin, ACTH and  $\alpha$ -MSH in human plasma, pituitary and brain  
Acta. Endocrinol. 91 suppl 225. 69, 1979
- Huges, J.; Smith, T.; Kosterlitz, H.; Fothergill, L.; Morgan, B.; Morris, H.: Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity  
Nature 258: 577-579, 1975
- 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
- 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: 131-41, 1997
- Jeannotte, L.; Burbach, J.P.H.; Drouin, J.: Unusual proopiomelanocortin ribonuclein acid in extrapituitary tissues: Intronless transcripts in testes and long poly A tails in hypothalamus  
Mol. Endocrinol. 1: 749-757, 1987
- Johansson, O.; Ljungberg, A.; Han S-W; Vaalasti, A.: Evidence for  $\gamma$ -MSH stimulation hormone containing nerves and neutrophilic granulocytes in the human skin by indirect immunofluorescence  
J. Invest. Dermatol. 96: 852-856, 1991
- Kaiser, E.T.; Kèzdy, F.J.: Amphiphilic secondary structure: Design of peptide hormones  
Science 223: 249-255, 1984

- Katahira, M.; Iwasaki, Y.; Aoki, Y.; Oiso, Y.; Saito, H.: Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells  
J. Endocrinol. 139: 2414-2422, 1998
- Kauser, S.; Schallreuter, K.U.; Thody, A.J.; Gummer, Ch.; Tobin, D.J.: Regulation of human epidermal melanocyte biology by  $\beta$ -Endorphin  
J. Invest. Dermatol. 120: 1073-1080, 2003
- Kay, N.; Allen, J.; Morley, J.E.: Endorphins stimulate normal human peripheral blood lymphocyte natural killer activity.  
Life Sci. 35 (1): 53-9, 1984
- Kilpatrick, D.L.; Borland, K.; Jin, D.F.: Differential expression of opioid peptide genes by testicular gene cells and somatic cells  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 5695-9, 1987
- Kippenberger, S.; Bernd, A.; Loitsch, S.; Ramirez-Bosca, A.; Bereiter-Hahn, J.; Holzmann, H.:  $\alpha$ -MSH is expressed in cultured human melanocytes and keratinocytes  
Eur. J. Dermatol. 5: 395-397, 1995
- Larsen Anästhesie: Opioide  
Urban & Schwarzenberg, 6. Auflage: 87-89, 1999
- Lee, S.Y.; Park, K.C.; Cho, K.H.: In a skin equivalent HaCaT cells have a preserved capacity to receive melanosomes but melanocytes do not remain in the basal location  
Arch. Dermatol. Res. 293: 268-273, 2001
- Lerner, A.B.; McGuire, J.S.: Effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormones on 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
- Levine, N.; Sheftel, 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
- Li, C.H.; Chung, D.; Doneen, B.A.: Isolation, characterisation and opiate activity of  $\beta$ -Endorphin from human pituitary glands  
Biochim. Biophys. Res. Com. 72: 1542-1547, 1976
- Lindenberg, I.: The new eukaryotic precursor processing proteinases  
Mol. Endocrinol. 5: 1361-1365, 1991

- Lu, D.; Willard, D.; Patel, I.R.; Kadwell, S.; Overton, L.; Kost, T.; Luther, M.; Chen, W.; Woychek, R.P.; Wilkison W.O.: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulation hormone receptor  
*Nature* 371: 799-802, 1994
- Lü, F.; Yang, K.; Challis, J.R.G.: Regulation of ovine fetal pituitary function by corticotrophin-releasing hormone, arginine, vasopressin and cortisol in vitro  
*J. Endocrinol.* 143: 199-208, 1994
- Luger, T.A.; Kalden, D.; Scholzen, T.E.; Brzoska, T.:  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating Hormone as a mediator of tolerance induction  
*Pathobiol.* 67: 318-321, 1999a
- Luger, T.A.; Schauer, E.; Trautinger, F.; Krutmann, J.; Ansel, J.; Schwarz, A.; Schwarz, T.: Production of immunosuppressing melanotropins by human keratinocytes  
*Ann. NY Acad. Sci.* 680: 567-570, 1993
- Lunec, J.; Pieron, J.P.; Sherbet, G.V.; Thody, A.J.: Alpha-melanocortin-stimulating hormone immunoreactivity in melanoma cell  
*Pathobiology* 58: 193-197, 1990
- Mains, R.E.; Wipper, B.A.; Ling, N.: Common precursor to corticotropins and endorphins  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3014-3018, 1977
- Mason, M.J.; Van Epps, D.: Modulation of IL-1, tumor nekrosis factor, and C5A-mediated murine neutrophil migration by  $\alpha$ -melanozyte stimulating hormone  
*J. Immunol.* 142: 1646-1651, 1989
- Morhenn, V.B.: The physiology of scratching involvement of Proopiomelanocortin gene-coded proteins in Langerhans cells  
*Prog. Neurol. Endocrinol. Immunol.* 4: 265-267, 1991
- Nagahama, M.; Funasaka, Y.; Fernandez-Frez, M.L.; Ohashi, A.; Chakraborty, A.K.; Ueda, M.; Ichihashi, M.: Immunoreactivity of  $\alpha$ -melanozyte-stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone and  $\beta$ -endorphin in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi  
*J. Dermatol.* 138: 981-985, 1998
- Nakanishi, S.; Inoue, A.; Kita, T.; Nakamura, M.; Chang, A.C.Y.; Cohen, S.N.; Numa, S.: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotrophin- $\beta$ -lipotropin precursor  
*Nature* 278: 423-427, 1979
- Oates, E.L.; Allaway, G.P.; Armstrong, G.R.; Boyajian, R.A.; Kehrl, J.H.; Prabhakar, B.S.: Human lymphocytes produce pro-opiomelanocortin gene-related transcripts  
*J. Biol. Chem.* 263: 10041-10044, 1988
- Pawelek, J.M.: Proopiomelanocortin in skin: new possibilities for regulation of skin physiology  
*J. Lab. Clin. Med.* 122: 627-628, 1993

- Panerai, A.E.; Freisen, H.G.: Opioid peptides and receptors  
 In Tolys G., ed. *Clinical Neuroendocrinology: a pathophysiological approach*. New York: Raven Press., 153-169, 1988
- Peters, E.M.; Tobin, D.J.; Seidah N.G.; Schallreuter, K.U.: Proopiomelanocortin-related peptides, prohormone convertase 1 and 2 and the regulatory peptide 7B2 are present in melanosomes of human melanocytes  
*J. Invest. Dermatol.* 114: 430-437, 2000
- Picon, A.; Leblond-Francillard, M.; Raffin-Sanson, M.L.; Lenne, F; Bertagna, X; De Keyzer, Y.: Functional analysis of the human pro-opiomelanocortin promoter in the small cell lung carcinoma cell line DMS-79  
*J. Mol. Endocrinol.* 2: 187-94, 1995
- Pincelli, C.; Fantini, F.; Romualdi, P.; Sevignani, C.; Lesa, G.; Benassi, L.; Giannetti, A.: Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on proliferation of cultured human keratinocytes  
*J. Invest. Dermatol.* 98: 421-427, 1992
- Pintar, J.E.; Schachter, B.S.; Herman, A.B.; Dugerman, S.; Krieger, D.T.: Characterization and localization of POMC messenger RNA in the adult rat tissues  
*Science* 225: 632-634, 1984
- Sahu, A. et al.: Evidence suggesting that galanin, melanin-concentrating hormone MSH, neurotensin NT, proopiomelanocortin POMC and neuropeptide Y (NPY) are target of leptins signalling in the hypothalamus  
*J. Endocrinol.* 139: 795-798, 1998
- Schauer, E.; Trautinger, F.; Kock, A.; Schwarz, A.; Bhardwaj, R.; Simon, M.; Ansel, J.C.; Schwarz, T.; Luger, T.A.: Proopiomelanocortin derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes  
*J. Clin. Invest* 93: 2258-2262, 1994
- Schiller, M.; Raghunath, M.; Kubitschek, U.; Scholzen, T.E.; Fisbeck, T.; Metze, D.; Luger, T.A.; Böhm, M.: Human dermal fibroblasts express prohormone convertase 1 and 2 and produce proopiomelanocortin-derived peptides  
*J. Invest. Dermatol.* 117: 227-235, 2001
- Scholzen, T.E.; Kalden, D.H.; Brzoska, T.; Fastrich, M.; Schiller, J.; Böhm, M.; Schwarz T.; Armstrong, C.A.; Ansel, J.; Luger, T.: Expression of proopiomelanocortin peptides in human dermal microvascular endothelial cells: Evidence for a regulation by ultraviolet light and interleukin-1  
*J. Invest. Dermatol.* 115: 1021-1028, 2000
- Schwartz, M.D.; Woods, S.C.; Porte, D.Jr.; Seeley, R.J.; Baskin, D.G.: Central nervous system control of food intake  
*Nature* 404: 661-671, 2000

- Schwartz, M.D.: Brain pathways controlling food intake and body weight  
Soc. for Biology and Medicine 226: 978-981, 2001
- Seidah, N.G.; Gaspar, L.; Mion, P.: cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to KEX 2 and furin gene products: Tissue-specific m-RNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases  
DNA Cell. Biol. 9: 415-425, 1990
- Slominski, A.; Paus, R.; Wortsman, J.: Can some melanotropins modulate keratinocyte proliferation?  
J. Invest. Dermatol. 97: 747, 1991
- Slominski, A.; Paus, R.; Mazurkiewicz, J.: Proopiomelanocortin expression in the skin during induced hair growth in mice  
Experientia 48: 50-54, 1992
- Slominski, A.; Ermak, G.; Hwang, J.; Mazurkiewicz, J.; Corliss, D.; Eastman, A.: The expression of proopiomelanocortin (POMC) and of corticotrophin releasing hormone receptor (CRH-R) genes in mouse skin  
Biochim. Biophys. Acta. 1289: 247-251, 1996
- Slominski, A.; Paus, R.; Plonka, P.; Handjinski, B.; Maurer, M.; Chakraborty, A.; Mihm, M.C. Jr.: Pharmacological disruption of hair follicle pigmentation as a model for studying the melanocyte response to and recovery from cytotoxic damage in situ  
J. Invest. Dermatol. 106: 1203-1211, 1996
- Slominski, A.; Moellmann, G.; Kuklinska, E.; Bomirski, A.; Pawelek, J.: Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway: L-tyrosine and L-dopa  
J. Cell. Sci. 89: 287-296, 1998
- Slominski, A.: Identification of  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin,  $\alpha$ -MSH and ACTH peptides in cultured human melanocytes, melanoma and squamous carcinoma cells by RP-HPLC  
Exp. Dermatol. 7: 213-216, 1998
- Slominski, A.; Wortsman, J.; Luger, T.; Paus, R.; Solomon, S.: Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress  
Physiol. Rev. 80: 979-1020, 2000
- Slominski, A.; Paus, R.; Wortsman, 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

- 
- Smith, A.I.; Funder, J.W.: Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues  
Endocrinol. Rev. 9 (1): 159-178, 1988
- Takahashi, H.; Hakamata, Y.; Watanabe, Y.; Kikuno, R.; Miyata, T.; Numa, S.: Complete nucleotide sequence of the human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene  
Nucl. Acids Res. 11: 6847-6858, 1983
- Taylor, J.W.; Kaiser, E.T.: The structural characterization of  $\beta$ -Endorphin and related peptide hormones and neurotransmitters.  
Pharmacol. Rev. 38: 291-293, 1986
- Teofoli, P.; Lotti, T.M.; Guarcello, V.; Panconiesi, E.: Detection of mRNA encoding proopiomelanocortin (POMC) in the A 431 cell line  
Congress EADV, Copenhagen September 26-30. 1993:352
- Teofoli, P.; Motoki, K.; Lotti, T.M.; Uitto, J.; Mauviel, A.: POMC gene expression by normal skin and keloid fibroblasts in culture: modulation by cytokines  
J. Exp. Dermatol. 6: 111-115, 1997
- 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.; Shusters, S.: Control and function of sebaceous glands.  
Physiol. Rev. 69 (2): 383-416, 1989
- Thody, A.J.; Hunt, G.; Donatien, P.D.; Todd, C.: Human melanocytes express functional melanocyte-stimulating hormone receptors  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 680: 381-390, 1993
- Thody, A.J.; Graham, A.: Does  $\alpha$ -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?  
Pigment Cell. Res. 11: 265-274, 1998
- Uhler, M.; Herbert, E.: Complete amino acid sequence of mouse pro-opiomelanocortin derived from the nucleotide sequence of pro-opiomelanocortin cDNA.  
J. Biol. Chem. 258 (1): 257-61, 1983
- 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 Woudenberg, A.D.:  $\beta$ -Endorphin and related peptides in human peripheral blood mononuclear cells: present or absent?  
Dissertation der Universität Utrecht, 1991
- Wakamatsu, K.; Graham, A.; Cook, D.; Thody, A.J.: Characterization of ACTH peptides in human skin and their activation of melanocortin-1 receptor  
Pigment Cell. Res. 10: 288-297, 1997
- Watson, S.J.; Akil, H.; Berger, P.A. Barchas. J.D.: Some observations on the opiate peptides and schizophrenia  
Arch. Gen. Psychiatry. 36: 35-41, 1979
- Whitfeld, P.; Seeburg, P.; Shine, J.: The human proopiomelanocortin gene: Organization sequence, and interspersion with repetitive DNA  
Dissertation der Universität Utrecht, 1991; DNA 1: 133-143, 1982
- Wintzen, M.; Yaar, M.; Avila, E.; Vermeer, B.J.; Gilchrest, B.A.: Keratinocytes produce  $\beta$ -endorphin and  $\beta$ -lipotropin hormone after stimulation by UV, IL-1a or phorbol esters  
J. Invest. Dermatol. 104: 641, 1995
- Wintzen, M.; Gilchrest, B.A.: Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin  
J. Invest. Dermatol. 106: 3-10, 1996
- 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  $\beta$ -lipotropin-like peptide in human keratinocytes  
Peptides 21: 691-697, 2000

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AOS	„active oxygen spezie“
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
$\beta$ -CT	$\beta$ -Cell-Tropin
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin	Humanes $\beta$ -Endorphin
$\beta$ -LPH	$\beta$ -Lipotropin
Bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CD40/ CD86	Oberflächenantigene
Clip	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRH	Corticotropin releasing hormone
d.h.	Das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline solution
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fetales Kälberserum
fmol	femtomolar
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
Gly	Glycin
$\gamma$ -MSH	$\gamma$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon
HCL	Chlorwasserstoff
HDMECs	Human dermal microvascular endothelial cells

IL-1	Interleukin 1
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1- $\alpha$
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
INF- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IRM	Immunoreaktives Material
JP	Joining peptide
Kb	Kilobases
KCL	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrophosphat
LIF	Leukemia inhibitory factor
MCR 1-5	Melanocortin-Rezeptoren 1-5
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC-Klasse-II-Antigene	“major histocompatibility complex” Histokompatibilitätskomplex
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -) MSH	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
NAC	N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Mononatriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriummonohydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Natriumthiosulfat
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
NT-F	N-terminales POMC Fragment
PBS-Defic	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>

---

PC 1	„prohormone convertase 1“
PC 2	„prohormone convertase 2“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POMC	Proopiomelanocortin
Pro	Prolin
RIA	Radioimmunoassay
RNA	“ribonucleic acid”, Ribonukleinsäure
RPMI	Rosswill Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
s.u.	Siehe unten
TGF	Tissue growth factor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
IFN- $\alpha$	Interferon $\alpha$
TPA	12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate
UV	Ultraviolettes Licht
UVB	Ultraviolettes Licht im Wellenlängenbereich von 290-320 nm

## **9.2. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

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

München, 3. Mai 2005

Birgit Hain

**9.3. Lebenslauf**

Name:		Birgit Hain
Geburtsdatum und Ort:		23.3.1971 in Duisburg
Familienstand:		ledig
Konfession:		evangelisch
Schulbildung:	1977-1981	Grundschule Duisburg-Süd
	1981-1990	Gesamtschule Duisburg-Süd
		Abschluss: Allg. Hochschulreife
Auslandserfahrungen:	1990-1991	U.S.A.
Beruf:	1991-1993	Kaufmännische Ausbildung (Mannesmann Handel AG Düsseldorf)
	1993-1994	Groß- und Außenhandelskauffrau
Studium:	1994-2000	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
	1996	Ärztliche Vorprüfung
	1997	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	2000	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	2001	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung Abschluss an der LMU-München
Praktisches Jahr:	2000-2001	Ludwig-Maximilians-Universität München 1. Terial Chirurgie (Dritter Orden) Dr. med. Pütterich 2. Terial Innere Medizin (KHS) Prof. Dr. med. Standl 3. Terial Anästhesie (Klinikum GH) Prof. Dr. Dr. Peter
Ärztin im Praktikum:	01.07.2001-31.12.2002	Rotkreuzkrankenhaus München, Abteilung für Innere Medizin, Prof. Dr. med. O.A. Müller
Assistenzärztin	seit 01.01.2003	Rotkreuzkrankenhaus München, Abteilung für Innere Medizin, Prof. Dr. med. O.A. Müller

#### **9.4. Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben und damit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Doktor Hansjörg Teschemacher für sein großes Engagent, die vielen positiven Diskussionen und seine stetige Bereitschaft Hilfestellungen zu leisten bedanken.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Beate Dickopf für die ruhige und geduldige Beratung bei der Durchführung der Laborarbeiten bedanken. Sie war mir bei vielen nicht einfachen Situationen während meiner Arbeit eine große Stütze.

Katharina Egeling und Alexander Poloczek danke ich für die gute Zusammenarbeit und die schönen Erinnerungen die uns verbinden.

Meinen Eltern Doris und Wolfgang Edmund Hain, meinem Bruder Michael und seiner Frau Christiane sowie meinem Lebensgefährten Florian Hanno Girg möchte ich mich für die moralische Unterstützung und die vielen nützlichen Ratschläge ganz herzlich bedanken. Dieser stabile Hintergrund hat ganz entscheidend dazu beigetragen, dass diese Arbeit vollendet werden konnte.