

**Interaktion der Proopiomelanocortin-Fragmente
β-Endorphin und β-Lipotropin mit Monozyten einer
Leukämie-Zelllinie des Menschen, THP-1**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von Björn Groenhagen
aus Emden

Gießen 2009

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. M. Kracht
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

Gutachter: Prof. Dr. Tikkanen

Tag der Disputation:

15. 09. 2009

Abkürzungsverzeichnis

Dimensionen:

Ci	Curie
Da	Dalton
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
mm	Millimeter
s	Sekunde
m	milli-(10 ⁻³)
μ	mikro-(10 ⁻⁶)
n	nano-(10 ⁻⁹)
w/v	weight/volume (Konzentration eines gelösten Feststoffes
in	einer Flüssigkeit)

Weitere Abkürzungen:

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
β-END (β _H -END)	(Humanes) β-Endorphin (β _H -Endorphin(1-31))
β-LPH (β _H -LPH)	(Humanes) β-Lipotropin (β _H -Lipotropin(1-89))
B _{max}	maximale Konzentration an gebundener Substanz bei einer Bindungsstelle = Konzentration der Bindungsstellen im Bindungssystem
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
C5b-7	Vorstufe des terminalen Komplementkomplexes C5b-9, bestehend aus den Komplementfaktoren C5, C6, C7
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
C9	Komplementfaktor 9
cpm	gemessene Zerfälle eines Radioisotops in einer Minute (counts per minute)
DAMGO	{D-Ala,MePhe,Gly-ol}enkephalin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetales Kälberserum

fMLF	N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-Phenylalanin
ggf.	gegebenenfalls
Glc	Glucose
GLY	Glycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Histo-Kompatibilitäts-Antigen
IL	Interleukin
K _D	Dissoziationskonstante (Equilibriumkonstante)
KON	Kontrolle
McCoy's 5A	nährstoffreiches Vollmedium
mRNA	Messenger-Ribonuclein-Säure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHE	Phenylalanin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POMC	Proopiomelanocortin
RANTES (CCL5)	Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RPMI	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten, entwickelt von Moore et al., Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TYR	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Proopiomelanocortin und Proopiomelanocortinfragmente.....	1
1.1.1 Vorkommen.....	1
1.1.2 Physiologische Bedeutung.....	2
1.1.2.1 Stress-Antwort.....	2
1.1.2.2 Stress-Adaptation.....	3
1.2 β-Endorphin und β-Lipotropin.....	4
1.2.1 Struktur.....	4
1.2.2 Immunologische Bedeutung.....	5
1.2.3 Interaktion mit Monozyten.....	7
1.2.3.1 Vorkommen von Monozyten im Organismus.....	7
1.2.3.2 Bedeutung der Monozyten innerhalb des Immunsystems.....	8
1.2.3.3 Nachgewiesene Bindungsstellen des β -Endorphins auf Monozyten.....	8
1.2.3.4 Nachgewiesene Effekte des β -Endorphins auf Monozyten.....	10
1.2.3.5 Nachgewiesene Bindungsstellen des β -Lipotropins auf Monozyten.....	11
1.2.3.6 Nachgewiesene Effekte des β -Lipotropins auf Monozyten.....	13
1.2.4 Interaktion mit dem Chemokinrezeptor CCR5 auf Monozyten.....	13
1.2.5 Interaktion mit Hautzellen.....	14
2 Aufgabenstellung.....	15
3 Methodik.....	17
3.1 Geräte, Materialien, Substanzen, Lösungen, Computerprogramme.....	17
3.1.1 Geräte und Materialien.....	17
3.1.2 Substanzen.....	18
3.1.3 Lösungen für Zellbindungsversuche (Zentrifugationsassay).....	19

3.1.4 Medien für Zellkulturen.....	19
3.1.5 Computerprogramme.....	20
3.2 Methoden.....	20
3.2.1 Bindungsversuche mit Monozyten der Zelllinie THP-1.....	20
3.2.1.1 Binder.....	20
3.2.1.1.1 Monozytenzelllinie THP-1.....	20
3.2.1.1.2 Kultivierung von Monozyten der Zelllinie THP-1.....	20
3.2.1.1.3 Präparation der Zellsuspension.....	21
3.2.1.2 Liganden.....	21
3.2.1.2.1 Radioaktiv markierte Liganden.....	21
3.2.1.2.1.1 Markierung mit ¹²⁵ Jod.....	21
3.2.1.2.1.2 Vorbereitung des Tracers für die Bindungsversuche.....	22
3.2.1.2.2 Nicht markierte Liganden.....	22
3.2.1.3 Durchführung der Bindungsversuche.....	23
3.2.1.3.1 Versuchsdurchführung.....	23
3.2.1.3.2 Auswertung.....	26
3.2.1.3.3 Bestimmung der Bindung unter Einfluss von Antikörpern und Stimulatoren.....	26
3.2.1.4 Charakterisierung der Bindung.....	27
3.2.1.4.1 Strukturspezifität.....	27
3.2.1.4.2 Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{max}	27
3.2.1.5 Statistik.....	28
3.2.2 Versuche zur Internalisierung von β_H -Endorphin in Monozyten der Zelllinie THP-1.....	29
3.2.2.1 Versuchsdurchführung.....	29
3.2.2.1.1 Inkubation der Ansätze.....	29
3.2.2.1.2 Ablösung des an die Zellmembran gebundenen Tracers.....	29
3.2.2.2 Auswertung.....	30
3.2.2.3 Statistik.....	30
3.2.3 Untersuchungen zur chemotaktischen/chemokinetischen Wirkung von β -Endorphin.....	31
3.2.3.1 Eingesetzte Zellen.....	31
3.2.3.1.1 Zellen der Zelllinien THP-1, G-361, HaCaT und A431.....	31

3.2.3.1.2 Native Monozyten.....	32
3.2.3.1.3 Behandlung der Monozyten der Zelllinie THP-1 mit dem Phorbol-12-Myristat-13-Acetat(PMA).....	32
3.2.3.2 Versuchsdurchführung.....	33
3.2.3.3 Auswertung.....	35
4 Ergebnisse.....	36
4.1 Ausschluss einer Internalisierung von β-Lipotropin (β_H-Lipotropin(1-89), β_H-LPH) in Monozyten der Zelllinie THP-1.....	36
4.1.1 Bindung von β _H -LPH an Monozyten der Zelllinie THP-1.....	36
4.1.2 Untersuchungen zur Internalisierung von β _H -LPH in Monozyten der Zelllinie THP-1.....	39
4.2 Nachweis der Internalisierung von β-Endorphin (β_H-Endorphin(1-31), β_H-END) in Monozyten der Zelllinie THP-1.....	45
4.2.1 Bindung von β _H -END an Monozyten der Zelllinie THP-1.....	46
4.2.2 Internalisierung von β _H -END in Monozyten der Zelllinie THP-1.....	48
4.3 Weiterführende Charakteristika der Bindung und Internalisierung von β_H-Endorphin(1-31)(β_H-END) in Monozyten der Zelllinie THP-1.....	52
4.3.1 Bindung von β _H -END an den Chemokinrezeptor CCR5.....	53
4.3.2 Blockade der Bindungsstellen von β _H -END auf CCR5 durch den Antikörper 2D7.....	55
4.3.3 Induktion der Expression des Chemokin-Rezeptors CCR5 durch Morphin in Monozyten der Zelllinie THP-1.....	58
4.3.4 Ausschluss der Interaktion von β _H -END mit Vitronektin.....	60
4.3.5 Internalisierung von β _H -END in Monozyten der Zelllinie THP-1 über den Chemokinrezeptor CCR5.....	62
4.4 Untersuchungen zur chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung von β-Endorphin auf Monozyten und Keratinozyten.....	64
4.4.1 Untersuchungen zur chemotaktischen Wirkung von β -Endorphin auf native Monozyten und auf Monozyten der Zelllinie THP-1.....	64

4.4.2 Untersuchungen zur chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung von β -Endorphin auf Zellen der Hautzelllinien; G-361, HaCat und A431: Änderung der Zellmorphologie und Chemokinese.....	69
5 Diskussion.....	73
5.1 Methodik.....	73
5.1.1 Die Monozytenzelllinie THP-1.....	73
5.1.2 Bindungs- und Internalisierungsversuche mit THP-1 Zellen.....	74
5.1.3 Versuche zur chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung des β -Endorphins.....	75
5.1.3.1 Versuchsdurchführung.....	75
5.1.3.2 Behandlung der THP-1 Zellen mit Phorbol ester.....	76
5.2 Ergebnisse.....	76
5.2.1 Interaktion von β -Endorphin und β -Lipotropin mit Zellen der Monozytenzelllinie THP-1.....	76
5.2.1.1 Charakteristika der Interaktion von β -Endorphin und β -Lipotropin mit THP-1 Zellen.....	77
5.2.1.1.1 Strukturspezifität der Bindung von β -Endorphin und β -Lipotropin an THP-1 Zellen bei 4 °C.....	77
5.2.1.1.2 Strukturspezifität der Interaktion von β -Endorphin und β -Lipotropin mit THP-1 Zellen bei 37 °C.....	78
5.2.1.2 Beeinflussung des Bindungsverhaltens von β -Endorphin an Zellen der Monozytenzelllinie THP-1 durch den Antikörper 2D7 und durch Morphin.....	79
5.2.1.2.1 Änderung von B_{\max} -Werten unter 2D7 – Einfluss als Evidenz für die Lokalisation der β -Endorphin-Bindungsstelle auf CCR5.....	79
5.2.1.2.2 Nachweis der Stimulation der CCR5 Expression durch Morphin an Monozyten der Zelllinie THP-1.....	81
5.2.2 Untersuchungen zur Internalisierung von β -Endorphin und β -Lipotropin in Zellen der Monozytenzelllinie THP-1 über den Chemokin-Rezeptor CCR5.....	82
5.2.2.1 Ausschluss der Internalisierung von β -Lipotropin.....	83
5.2.2.2 Nachweis der Internalisierung von β -Endorphin.....	83
5.2.2.2.1 Beteiligung von CCR5 an der Internalisierung von β -Endorphin.....	84

5.2.2.2	Ausschluss der Beteiligung von Vitronektin an der Internalisierung von β -Endorphin.....	85
5.2.3	Untersuchungen zur chemotaktischen Wirkung von β -Endorphin an Zellen des Immunsystems.....	86
5.2.3.1	Chemotaktische Wirkung von β -Endorphin auf native Monozyten.....	86
5.2.3.2	Chemotaktische Wirkung von β -Endorphin auf Monozyten und ausdifferenzierte Zellen der Zelllinie THP-1.....	88
5.2.4	Chemokinetische Wirkung von β -Endorphin auf die Hautzelllinien G-361, HaCat und A431.....	90
6	Zusammenfassung	91
7	Summary	93
8	Literaturverzeichnis	95

1 Einleitung

1.1 Proopiomelanocortin und Proopiomelanocortinfragmente

Das Alter des Proopiomelanocortin (POMC)-Gens wird auf etwa 500 Millionen Jahre (DENEFF and VAN BAEL, 1998) datiert. Es findet sich von den höchsten bis zu den niedrigsten Wirbeltieren und sogar bei Wirbellosen (LEROITH et al., 1981; SALZET et al., 1997; SHEN et al., 2003). POMC stellt ein Vorläufermolekül für eine Reihe von bioaktiven Peptiden dar, die vor allem in der menschlichen Hypophyse gefunden werden (SMITH and FUNDER, 1988). Dazu gehören unter anderen adrenocorticotropes Hormon (ACTH), β -Endorphin (β -END), β -Lipotropin (β -LPH), α -, β - und γ -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH) und corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP).

1.1.1 Vorkommen

Proopiomelanocortin wurde beim Menschen im Hypophysenvorderlappen - dem Hauptort seiner Expression - sowie in Bereichen des zentralen Nervensystems wie auch in peripheren Organen nachgewiesen. Im ZNS waren dies unter anderem in der hypothalamischen Region (WARDLAW et al., 1996) der Nucleus arcuatus (CHEUNG and HAMMER, 1995), in der Pons der Locus coeruleus (REYES et al., 2006) und in der Medulla oblongata der Nucleus tractus solitarii (JOSEPH et al., 1983; KHACHATURIAN et al., 1983). Zahlreiche periphere Organe wie z.B. die Milz (LOLAIT et al., 1986), die Lunge, die Leber, die Niere, das Nebennierenmark, die Gonaden (SOVERCHIA et al., 2006), die Placenta (CHEN et al., 1986), die Schilddrüse (DEBOLD et al., 1988), die Haut (WINTZEN et al., 1996) sowie der Gastrointestinaltrakt (DEBOLD et al., 1988) und das Immunsystem (OATES et al., 1988; BUZZETTI et al., 1989; ANDERSEN et al., 2005) stellen weitere POMC-exprimierende Orte und dementsprechend Entstehungsorte der POMC-Abkömmlinge.

Das Gen, welches für das POMC kodiert, liegt auf Chromosom 2 (p23) und umfasst 7665 Basenpaare (HÖLLT 1993; BERTAGNA 1994). Es besteht aus drei Exons, die durch zwei Introns voneinander getrennt werden. Die Transkription des Gens führt in der Hypophyse zu einer mRNA von 1072 Basen. Deren Translation führt zu Prä-Proopiomelanocortin mit 267 Aminosäureresten, welches nach Signalpeptidabspaltung durch weitere enzymatische Endoproteolyse mittels Prohormonkonvertasen in 16K-Fragment, ACTH, β -Endorphin, β -

Lipotropin, und γ -Lipotropin gespalten wird. Die weitere Prozessierung einschließlich Amidierungs- und Acetylierungsreaktionen führt zu bioaktiven Peptiden wie α -MSH (CASTRO and MORRISON, 1997).

1.1.2 Physiologische Bedeutung

Die physiologische Bedeutung der verschiedenen POMC-Systeme innerhalb des menschlichen Organismus ist Gewebe-spezifisch (MARCINKIEWICZ et al., 1993).

Im Hypothalamus beispielsweise sind POMC und seine Derivate an der Regulation des Körpergewichts durch Einfluss auf Nahrungsaufnahme und Stoffwechsel beteiligt (MARKS et al., 2006; SMART et al., 2006). Patienten, die Mutationen im POMC-Gen aufwiesen und ein POMC mit Funktionsdefizit synthetisierten, besaßen orange-rote Haarfarbe, eine sehr helle Hautfarbe und litten an Adipositas sowie an Nebennierenrindeninsuffizienz (KRUDE et al., 1998). Im Rahmen dieses Syndroms scheint das Defizit an adrenocorticotropem Hormon (ACTH) für die Insuffizienz der Nebenniere, der Mangel an α -MSH, β -MSH und ACTH für die typische Haut- und Haarfarbe verantwortlich zu sein. Neben der Aufgabe der Pigmentierung der Haut werden dem Peptid α -MSH lokale immunmodulatorische Effekte zugeschrieben (SLOMINSKI et al., 2000a).

Neben dem zentralen Nervensystem mit dort stattfindender Biosynthese und vermutlich „lokaler“ Funktion der POMC-Fragmente ist die Hypophyse der Hauptort der Expression von POMC, dessen Fragmente von dort aus unter Stressbedingungen vermehrt in den Blutkreislauf freigesetzt und somit dem gesamten Organismus zur Verfügung gestellt werden (LIM and FUNDER, 1983).

1.1.2.1 Stress-Antwort

Körperliche und psychische Belastungssituationen führen zur vermehrten Freisetzung von POMC-Derivaten aus der Hypophyse.

Physische Trigger sind beispielsweise sportliche Belastungen (HEITKAMP et al., 1993; HARBACH et al., 2000; SCHULZ et al., 2000) oder azidotische Zustände, wie sie beim Extremsport (TAYLOR et al., 1994) oder bei Mangelernährung (LEONHARDT et al., 2002) vorkommen.

Belastende Zustände, die vornehmlich die Psyche betreffen wie Angst, Erregung oder Bedrohung führen ebenfalls zur Ausschüttung von POMC-Abkömmlingen wie ACTH, β -Lipotropin oder β -Endorphin (SCHEDELOWSKI et al., 1995).

Neben diesen erwähnten Stimuli sind Attacken auf den Organismus mit der Folge von Gewebeerletzungen wie Traumata durch Operationen ein Anlass dafür, POMC-Peptide in das kardiovaskuläre System freizusetzen (MATEJEC et al., 2006).

Die physiologische Bedeutung der Freisetzung von POMC-Derivaten unter Stressbedingungen ist noch weitgehend ungeklärt, als gesichert gelten die im Folgenden beschriebenen Erkenntnisse.

1.1.2.2 Stress-Adaptation

Im Rahmen einer Stresssituation wird vermehrt ACTH ausgeschüttet. ACTH führt zu gesteigerter Synthese und Freisetzung von Glucokortikoiden aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Glucokortikoide wiederum üben vielfältige Wirkungen aus:

1. Glucokortikoide greifen in den Stoffwechsel ein, sie führen zum Abbau von Proteinen (kataboler Effekt) und von Fett (Lipolyse).
2. Sie fördern die Glykogensynthese in der Leber und erhöhen die Glukosekonzentration im Blut.
3. Sie wirken auf das Immunsystem supprimierend und antiinflammatorisch.

Weiterhin wird über ACTH die Zona glomerulosa der Nebenniere stimuliert, so dass vermehrt Mineralokortikoide freigesetzt werden, die in den Wasser- und Elektrolythaushalt eingreifen.

Zusätzlich wirkt ACTH direkt über spezifische Rezeptoren immunmodulierend auf Monozyten und Lymphozyten (JOHNSON et al., 2005).

Diese Wirkungen von ACTH auf den Organismus stellen offenbar eine Adaptation an den Einfluß eines Stressors wie psychische und/oder körperliche Belastung, Schmerz oder Hypoglykämie dar; doch weshalb der Organismus bei einer Bedrohung mit einer Immunsuppression reagieren sollte, bleibt unklar.

Im Rahmen einer Stressreaktion werden jedoch nicht nur ACTH, sondern ebenso die Peptide β -Endorphin und β -Lipotropin, deren Funktionen viel weniger klar sind, ins Blut freigesetzt. Beispielweise ist die häufig vertretene Behauptung, β -Endorphin wirke unter Stress analgetisch, bis heute nicht belegt worden (Matejec et al., 2003; Teschemacher, 2003). Über

die Funktion von β -Lipotropin im Rahmen einer Stress-Adaptation existieren in der Literatur nicht einmal Hypothesen.

1.2 β -Endorphin und β -Lipotropin

1.2.1 Struktur

β -Lipotropin und β -Endorphin stammen aus dem Precursormolekül Proopiomelanocortin (POMC) (Abb.1). β -Lipotropin (β -LPH, β -Lipotropin(1-89)) geht aus diesem durch posttranslationale, enzymatische Abspaltung des C-terminalen POMC-Fragments (89 Aminosäurereste) hervor (Position 179-267).

Durch weitere Abspaltung des endständigen Teils des β -Lipotropins (Position 237-267) entsteht β -Endorphin (β -END, β -Endorphin(1-31)).

Mit seinem N-Terminus, den Aminosäuren Tyrosin-Glycin-Glycin-Phenylalanin, vermag β -Endorphin(1-31) an Opioidrezeptoren zu binden; des Weiteren ist β -Endorphin(1-31) in der Lage, sowohl über sein Mittelfragment als auch über den C-Terminus an Zellen bzw. bioaktive Makromoleküle zu binden (siehe unter 1.2.3.3).

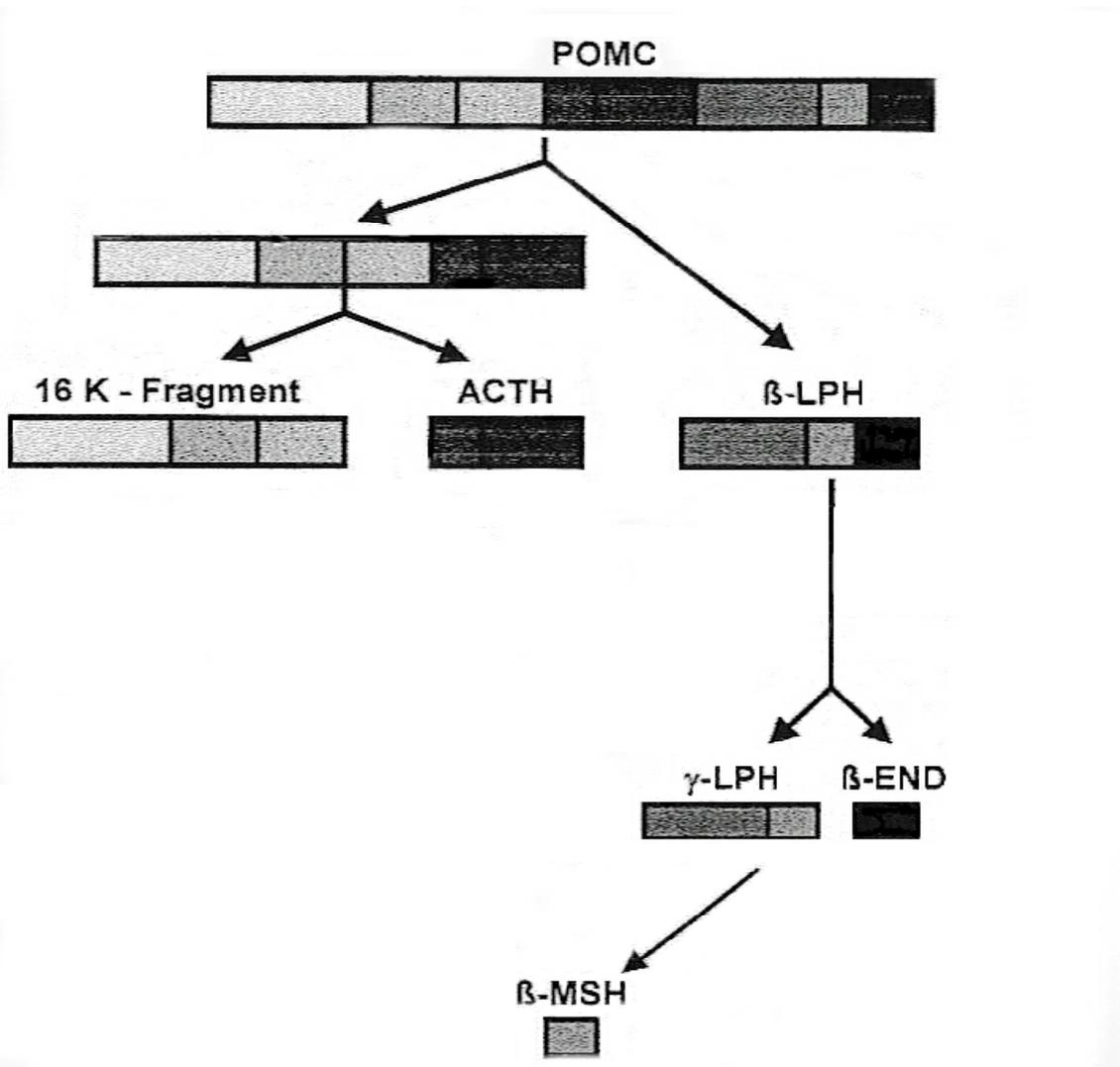


Abb.1: POMC und dessen Prozessierung zu β -Lipotropin (β -LPH) und den β -LPH-Fragmenten γ -LPH, β -MSH und β -Endorphin

1.2.2 Immunologische Bedeutung

β -Endorphin:

Zahlreiche Untersuchungen konnten Wirkungen von β -Endorphin auf verschiedene Zellen des Immunsystems zeigen.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass β -Endorphin einen chemotaktischen Faktor für Monozyten - sowohl in vitro (VAN EPPS et al., 1983; VAN EPPS and SALAND, 1984; RUFF et al., 1985) als auch in vivo (SALAND et al., 1983) - und für Lymphozyten (VAN EPPS. et al., 1983; MANFREDA et al., 1998) darstellt. In der Veröffentlichung von YE et al. (1989) wurde ein unterschiedlicher Effekt von β -Endorphin auf B- und T-Lymphozyten beobachtet: β -Endorphin verstärkte die Motilität von B-Lymphozyten, die

Motilität von T-Lymphozyten wurde durch β -Endorphin hingegen abgeschwächt. Berichte über einen chemotaktischen Effekt durch β -Endorphin bei neutrophilen Granulozyten sind kontrovers: WIEDERMANN et al. (1994) wiesen Chemotaxis nach, eine Verstärkung der Migration zeigten SIMPKINS et al. (1984), die Ergebnisse von MASON and VAN EPPS (1989) zeigten keinen chemotaktischen Effekt durch β -Endorphin.

β -Endorphin kann die Proliferation von Lymphozyten (GILMAN et al., 1982) sowie die Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten (CARR and KLIMPEL, 1986) steigern. SHARP et al. (1985) konnten zeigen, dass β -Endorphin die Bildung von Radikalen wie Superoxidanionen in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten stimuliert. Darüber hinaus wurde unter Einfluss von β -Endorphin eine Suppression von γ -Interferon in Concanavalin A-stimulierten mononukleären Zellen nachgewiesen (PETERSON et al., 1987), eine verstärkte Produktion dieses Zytokins wurde von BROWN and VAN EPPS (1986) in Gegenwart von β -Endorphin beobachtet. Die Ausschüttung anderer Zytokine wie Interleukin-1 und Interleukin-2 wird durch β -Endorphin ebenfalls stimuliert (GILMORE and WEINER, 1988; BESSLER et al., 1990; APTE et al. 1990). β -Endorphin ist zudem in der Lage, die Zellmorphologie neutrophiler Granulozyten (FALKE and FISCHER, 1985a) zu verändern und deren Oberflächenadhärenz (VAN EPPS and KUTVIRT, 1987) zu verstärken. Widersprüchliche Aussagen finden sich hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität von Natürlichen Killerzellen. Es wurde sowohl über eine Verstärkung der Aktivität durch β -Endorphin (KAY et al., 1984, 1987) als auch über eine Verringerung (PRETE et al., 1986) berichtet.

Ebenfalls unklar sind Befunde, die sich auf die Produktion von Antikörpern beziehen. So konnten JOHNSON et al. (1982) eine Suppression der Antikörper-Antwort auf Schafserythrozyten durch β -Endorphin zeigen, die Antikörper-Antwort auf das Bakterium *Staphylococcus aureus* wurde durch β -Endorphin ebenso herabgesetzt (MORGAN et al., 1990), eine Verstärkung der Zweitantwort trat hingegen bei Tetanustoxoid auf (MUNN and LUM, 1989).

Untersuchungen, die in vivo durchgeführt wurden, lassen auf einen durch β -Endorphin erzeugten immunsuppressiven Effekt schließen. LEVY et al. (1986) beobachteten bei einem Konzentrationsanstieg von β -Endorphin im Plasma nach traumatischer Verletzung eine Suppression unterschiedlicher Immun-Parameter, ASTRAUSKAS and LEONAVICIENE (1987) zeigten eine unterdrückte Arthritis-assoziierte Entzündung nach Gabe von β -Endorphin, SIMON et al. (1984) stellten schließlich eine Ausdehnung metastatischen Tumorwachstums nach Injektionen von β -Endorphin in den Nucleus raphe magnus fest.

An Mäusen, die ein in der Funktion eingeschränktes β -Endorphin synthetisierten, wurden nach Gabe verschiedener Zell-Mitogene (Lipopolysaccharid(LPS), Concanavalin A(Con A), Pokeweed Mitogen(PWM)) erhöhte Werte an Zytokinen (TNF- α , IL-6, IL-2 mRNA) sowie eine verstärkte Proliferation der Milz im Vergleich zum Wildtyp gemessen (REFOJO et al. 2002).

Neuere Studien befassen sich mit der Interaktion von Nervenfasern, die nachweislich β -Endorphin synthetisieren, und Immunozyten im entzündeten Gewebe (STEIN et al., 1990; PRZEWLOCKI et al., 1992; CABOT et al., 1997; MACHELSKA et al., 1998). Diese Zellen, vor allem Granulozyten und Monozyten, wandern an den Ort der Entzündung und schütten β -Endorphin aus, welches an die hochregulierten Opioid-Rezeptoren der lokalen Nervenfasern bindet und damit Schmerzen inhibiert (MOUSA et al., 2001; RITTNER et al., 2001; MOUSA et al., 2004).

β -Lipotropin:

Über die immunologische Bedeutung des POMC-Derivates β -Lipotropin ist bis heute sehr wenig bekannt. Dass auch dieses Peptid vermehrt in Stresssituationen wie bei septischem Schock (McLOUGHLIN et al. 1988), postoperativem Schmerz (MATEJEC et al. 2006) oder nach Radius-Frakturen (JOHANSEN et al. 2004) in das Blut freigesetzt wird, lässt auf eine eventuell immunologisch relevante Funktion schließen. KAY et al. (1984) konnten nachweisen, dass β -Lipotropin die Aktivität Natürlicher Killerzellen zu steigern vermag. Weitere Untersuchungen zur Interaktion von β -Lipotropin mit dem Immunsystem sind nicht erfolgt.

Die geschilderten Befunde weisen auf eine physiologische Funktion des β -Endorphins auf der Ebene des Immunsystems hin. Aufgrund der Vielfalt der gesammelten Daten sowie der Gegensätzlichkeit (Suppression versus Verstärkung) mancher Befunde lässt sich jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt eine einheitliche Funktion weder im Bereich des Immunsystems noch im Hinblick auf die Stressadaptation ableiten.

1.2.3 Interaktion mit Monozyten

1.2.3.1 Vorkommen von Monozyten im Organismus

Monozyten gehören zu den weißen Blutkörperchen, den Leukozyten - neben den Granulozyten und den Lymphozyten; Ihr Anteil beträgt 4-8 % der Leukozyten.

Die Monozyten stellen mit einem Durchmesser von 12 – 25 µm die größten Zellen im Blut dar. Nach ihrer Entstehung im blutbildenden roten Knochenmark (Leukopoese) unter Einwirken verschiedener Wachstumsfaktoren (GM-CSF: granulocyte-monocyte colony stimulating factor; M-CSF: monocyte colony stimulating factor) verweilen sie im Blut etwa 2-3 Tage, ehe sie in verschiedene Organe einwandern und sich dort in Gewebemakrophagen, auch Histozyten genannt, umwandeln.

Je nach Lokalisation werden die dort jeweils vorgefundenen Makrophagen zum Beispiel als Alveolarmakrophagen (Lunge), als Langerhans-Zellen (Haut), als Kupffer-Zellen (Leber), als Mikroglia (ZNS) oder als Osteo- oder Chondroklasten (Knochen bzw. Knorpel) bezeichnet.

1.2.3.2 Bedeutung der Monozyten innerhalb des Immunsystems

Innerhalb des Immunsystems sind Monozyten als Vorläuferzellen der Makrophagen sowohl an der unspezifischen als auch an der spezifischen Immunantwort beteiligt. Durch Einfluss von Zytokinen im Rahmen von Entzündungen reifen Monozyten zu Makrophagen heran, die anschließend in der Lage sind, in das Gewebe einzuwandern (Diapedese) und dort körperfremde Proteine zu erkennen und in sich aufzunehmen (zu phagozytieren). Anschließend werden die phagozytierten Proteine durch Sauerstoff- und Stickstoffradikale und Enzyme gespalten und zerstört. Da Makrophagen jede Art von potentiellen Körperfremden phagozytieren, stellen sie einen wichtigen Teil der unspezifischen Immunantwort dar.

Durch Ausschüttung verschiedener Zytokine (Interleukin-1, TNF u.a.) durch Makrophagen können andere Leukozyten unspezifisch angelockt werden.

Makrophagen sind darüber hinaus in der Lage, phagozytierte und aufgearbeitete Proteine auf ihrer Zelloberfläche Lymphozyten zu präsentieren (Antigenpräsentation), so dass eine für das jeweilige Antigen spezifische Immunantwort eingeleitet werden kann.

1.2.3.3 Nachgewiesene Bindungsstellen des β-Endorphins auf Monozyten

Opioidrezeptoren:

Es existieren drei verschiedene Opioidrezeptortypen, µ-, δ- und κ-Rezeptoren, von denen auch Subtypen bekannt sind. In der Literatur mit gentechnologischem Bezug werden sie auch

als $OP_1/DOR(\delta\text{-Rezeptor})$, $OP_2/KOR(\kappa\text{-Rezeptor})$ und $OP_3/MOR(\mu\text{-Rezeptor})$ bezeichnet. Die Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bewirken durch Modulation (Hemmung oder Aktivierung) der Adenylatzyklase eine Inhibition beziehungsweise einen Anstieg der Bildung von cAMP. Ein weiterer second messenger ist offenbar NO (cGMP-Anstieg). Eine Übersicht über Opioidrezeptoren und anschließende Signalkaskaden in Zellen des Immunsystems geben MARTIN-KLEINER et al. (2006). Bereits Ende der siebziger und Anfang der achtziger Jahre konnten Opioidrezeptoren auf Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden (LOPKER et al., 1980; MEHRISHI and MILLS, 1983), an die das endogene Opioid β -Endorphin zu binden vermag (FALKE and Fischer, 1985b). Eine Übersicht über Opioide, u.a. β -Endorphin, und deren Interaktionen mit Immunzellen geben SIBINGA and GOLDSTEIN (1988), CARR (1991) und BRYANT and HOLADAY (1993). Durch den Antagonisten Naloxon können die Wirkungen, die über Opioidrezeptoren auf die Immunzellen vermittelt werden, in unterschiedlichem Maße aufgrund unterschiedlicher Affinitäten der Opioide zu ihren Rezeptoren aufgehoben werden. κ -Rezeptoren konnten auf menschlichen aus dem Blut entnommenen Monozyten durch GAVERIAUX et al. (1995) nachgewiesen werden, CHUANG et al. (1995) gelang der Nachweis von mRNA für den μ -Rezeptor in menschlichen Monozyten und Makrophagen. Zahlreiche Effekte wie die chemotaktische Wirkung von β -Endorphin auf Monozyten können durch den Opioidantagonisten Naloxon aufgehoben werden (RUFF et al., 1985), so dass sie als über Opioidrezeptoren vermittelt zu betrachten sind (s.1.2.3.4).

Non-Opioid-Bindungsstellen:

Neben den verschiedenen Typen von Opioidrezeptoren auf Monozyten sind eine Reihe weiterer Bindungsstellen bekannt, sog. Non-Opioid-Bindungsstellen. Non-Opioid-Bindungsstellen können durch Naloxon nicht besetzt werden, so dass die β -Endorphin-Bindung über Non-Opioid-Bindungsstellen nicht durch Naloxon beeinflusst werden kann. Charakteristisch für diese Bindungsstellen ist, dass β -Endorphin mit diesen nicht über seine N-terminale Sequenz, mit der es an Opioidrezeptoren bindet, sondern über das C-terminale oder das Mittelfragment (POLOCZEK, 2002) interagiert. POLOCZEK konnte eine Bindung des β -Endorphins via Mittelfragment an den Chemokinrezeptor CCR5 der Monozytenzelllinie THP-1 zeigen. Erstmals konnten HAZUM et al. (1979) solche Non-Opioid-Bindungsstellen für β -Endorphin auf Lymphozyten nachweisen. Der Nachweis einer Non-Opioid-Bindungsstelle für β -Endorphin auf der Monozytenzelllinie U937 gelang SHAHABI et al. (1990). Dabei handelt es sich um eine hochaffine Bindungsstelle ($K_D = 1.2$

$\pm 0,5 \times 10^{-8}$ M), an die der C-Terminus des β -Endorphins bindet und keine Verdrängung des β -Endorphins aus der Bindung durch Naloxon, Morphin oder selektive Opiat-Rezeptor-Agonisten erzielt werden kann. Die Anzahl der Bindungsstellen kann durch Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verringert werden (SHAHABI and SHARP, 1993).

Eine Bindungsstelle mit vergleichbaren Charakteristika konnten WOODS et al. (1997) auf Peritonealmakrophagen von Mäusen nachweisen.

1.2.3.4 Nachgewiesene Effekte des β -Endorphins auf Monozyten

Bereits im Abschnitt 1.2.2 wurden einige Effekte des β -Endorphins auf Monozyten erwähnt. VAN EPPS and SALAND (1984) und RUFF et al. (1985) zeigten einen chemotaktischen Effekt von β -Endorphin auf Blut-Monozyten, der durch den Opioidantagonisten Naloxon antagonisiert werden konnte. SACERDOTE and PANERAI (1989) untersuchten die chemotaktische Wirkung einzelner β -Endorphin-Fragmente. Sowohl N-terminale als auch C-terminale Fragmente führten zu einer chemotaktischen Wirkung auf Monozyten, eine Inhibition der Chemotaxis konnte bei den N-terminalen Teilfragmenten durch Naloxon erzielt werden, nicht jedoch bei den C-terminalen Fragmenten. Fehlten hingegen sowohl der N- als auch der C-Terminus, war keine chemotaktische Wirkung messbar.

Weitere Effekte des β -Endorphins auf menschliche Monozyten zeigten AYMERICH et al. (1998) und KOVALOVSKY et al. (1999).

AYMERICH et al. (1998) zeigten, dass die Expression der induzierbaren NO-Synthetase in mit β -Endorphin inkubierten Monozyten anstieg, einen Anstieg der Expression des Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) durch β -Endorphin wiesen KOVALOVSKY et al. (1999) nach. Beide Effekte konnten mit Naloxon aufgehoben werden. Ebenfalls an Blut-Monozyten zeigten PRIETO et al. (1989) eine Verminderung der Phagozytosefähigkeit, eine verminderte Expression von Vimentin-Filamenten sowie eine verminderte Expression der Oberflächenmoleküle HLA-DR und CR3 durch β -Endorphin und andere Opioide. Vimentin-Filamente sowie die genannten Oberflächenmoleküle scheinen an der Regulation von Membranprozessen, Zellmotilität und phagozytotischen Prozessen beteiligt zu sein. In der Studie wurde nicht untersucht, über welchen Rezeptor (Opioid- versus Non-Opioid-Rezeptor) die Veränderung vermittelt wurde.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen CASTILLA-CORTAZAR et al. (1998). Sie untersuchten Patienten mit Depressionen und Angststörungen und fanden erhöhte β -

Endorphin-Plasmaspiegel, die mit einer Naloxon-reversiblen Monozytendysfunktion einhergingen. Diese definierte sich durch eine verminderte Anzahl an Monozyten, die *Candida albicans* oder Latex-Partikel phagozytierten und zytoskeletale Filamente sowie Oberflächenmoleküle wie CR1-Rezeptoren und HLA-DR-Antigene exprimierten.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluß von β -Endorphin auf die Phagozytose von Peritonealmakrophagen der Maus.

CASELLAS et al (1991) zeigten eine Inhibition der Phagozytose von Schafserythrozyten durch Peritonealmakrophagen der Maus, die durch Opioid-Agonisten bewirkt und Naloxon-reversibel war. δ -Opioid-Rezeptor- selektive Agonisten wie Leukenkephalin und Metenkephalin inhibierten die Phagozytose am effektivsten.

ICHINOSE et al. (1995) wiesen eine β -Endorphinkonzentrations-abhängige Verstärkung der Phagozytose von Latex-Partikeln nach, die nicht Naloxon-reversibel war und damit über einen Non-Opioid-Rezeptor vermittelt wurde.

Eine weitere Arbeitsgruppe (ORTEGA et al. 1996) untersuchte den Effekt von β -Endorphin an Peritonealmakrophagen der Maus in Bezug auf Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytose von *Candida albicans*. Die Adhärenz der Zellen blieb durch β -Endorphin unbeeinflusst. Dagegen verstärkte β -Endorphin sowohl die Chemotaxis als auch die Phagozytose. Über welchen Rezeptor (Opioid versus Non-Opioid Rezeptor) der jeweilige Effekt ausgelöst wurde, wurde nicht untersucht. Untersuchungen zur zytotoxischen Aktivität an den gleichen Makrophagen ergaben keine Beeinflussung dieses Parameters durch β -Endorphin (KOWALSKI, 1997).

1.2.3.5 Nachgewiesene Bindungsstellen des β -Lipotropins auf Monozyten

Im Gegensatz zu dem Opioidpeptid β -Endorphin, welches ein endständiges Spaltprodukt des β -Lipotropins darstellt, wurde das um 58 Aminosäuren längere β -Lipotropin selbst bis heute wenig untersucht.

Die Aminosäuresequenz TYR-GLY-GLY-PHE, die für die Bindung an Opioidrezeptoren benötigt wird, liegt beim β -Lipotropin nicht wie beim β -Endorphin endständig vor, sondern liegt im mittleren Bereich des Moleküls und kann daher nicht mit Opioidrezeptoren interagieren.

Die Aminosäuresequenz des C-terminalen β -Lipotropinfragments ist jedoch mit der des β -Endorphins identisch, so dass auch β -Lipotropin über die Non-Opioid-Bindungsstellen des β -Endorphins mit Zellen des Immunsystems interagieren kann. LINDNER (2004) wies eine

Non-Opioid-Bindungsstelle auf der humanen Monozytenzelllinie THP-1 nach, wobei der C-Terminus des β -Lipotropins die bindungsrelevante Struktur darstellte. Es handelte sich um eine hochaffine Bindungsstelle ($K_D = 4,8 \times 10^{-8} \text{ M}$), die im Bereich des Chemokinrezeptors CCR5 auf den THP-1 Zellen gelegen war.

Weiterhin konnte LINDNER (2004) eine zweite Bindungsstelle von β -Lipotropin(1-89) auf Monozyten der Zelllinie THP-1 nachweisen. Diese Bindungsstelle befand sich im Bereich des Vitronektin-Rezeptors der Monozyten. Die direkte Interaktion des β -Lipotropins mit Vitronektin wurde nachgewiesen.

Vitronectin:

Vitronectin ist ein multifunktionelles Glykoprotein, das als Bindeglied zwischen Zelladhäsionsvorgängen, Gerinnungs- und Immunsystem fungieren kann. Das in der Leber synthetisierte Vitronectin besitzt ein Molekulargewicht von 75kDa und umfasst 459 Aminosäuren. Vitronectin kann in mehrere Domänen untergliedert werden: ein Aminoterminus, eine Zelladhäsionsdomäne, eine Hämopexin-artige Sequenz und schließlich einen C-terminalen Abschnitt. Zahlreiche Liganden wie z.B. Plasminogen, Heparin, Komplementfaktoren, Kollagen u.a. können mit den verschiedenen Domänen des Vitronektins interagieren und Komplexe bilden, woraus seine Multifunktionalität resultiert. Neben der Fähigkeit der Zelladhäsion (BARNES et al., 1983) und einer komplexen funktionellen Bedeutung innerhalb des Gerinnungssystems (PREISSNER et al., 1985) wird dem Vitronectin ein bedeutender Einfluß im Bereich des Immunsystems zugesprochen. So ist Vitronectin in der Lage, an bestimmte grampositive Bakterien wie Streptokokken und Staphylokokkus aureus und gramnegative Bakterien wie Escherichia coli zu binden (CHHATWAL et al., 1987), was eine Opsonierung der Bakterien für Makrophagen ermöglichen könnte.

Darüber hinaus greift Vitronectin inhibierend in die Komplement-vermittelte Lyse von Zellen ein (KOLB and MÜLLER-EBERHARD, 1975; PODACK and MÜLLER-EBERHARD, 1978), indem es an den C5b-7 Komplex bindet und zusätzlich die Polymerisation von C9 (PODACK et al., 1984) hemmt.

β -Lipotropin und β -Endorphin binden über ihr gemeinsames C-terminales Fragment an Vitronectin und könnten somit in die genannten Funktionen des Vitronektins eingebunden sein.

1.2.3.6 Nachgewiesene Effekte des β -Lipotropins auf Monozyten

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind in der Literatur keine Effekte des β -Lipotropins auf Monozyten beschrieben worden. Es ist jedoch vorstellbar, dass Effekte des β -Endorphins (s. 1.2.3.3), die über Non-Opioid-Bindungsstellen vermittelt werden, ebenso durch β -Lipotropin erzielt werden können; dies wäre insofern von Bedeutung, als dieses Peptid ebenfalls vermehrt in Stresssituationen aus der Hypophyse freigesetzt wird (s. 1.2.2). Bekannt ist, dass β -Lipotropin die Aktivität Natürlicher Killerzellen zu steigern vermag (KAY et al., 1984).

1.2.4 Interaktion mit dem Chemokinrezeptor CCR5 auf Monozyten

Chemokine sind kleine, lösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 8-14 kDa und stellen eine Gruppe von Zytokinen dar, die nach ihrer Freisetzung durch verschiedenste Zellen ins periphere Blut, Prozesse der Migration in Leukozyten (Makrophagen, T-Lymphozyten und Granulozyten) an Orte der Entzündung auslösen. Unterteilt werden die Chemokine nach ihrer Struktur in vier Typen, nämlich die C-Chemokine, die CC-Chemokine, die CXC-Chemokine sowie die CX₃C-Chemokine. Bis heute sind mehr als 50 Chemokine und fast 20 verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt.

Die CC-Chemokine (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP 1-4, Eotaxin u.a.) binden nach ihrer Freisetzung an dazugehörige CC-Chemokinrezeptoren, die hauptsächlich auf T-Lymphozyten, eosinophilen bzw. basophilen Granulozyten und auf Monozyten lokalisiert sind. CC-Chemokinrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie sind aus sieben Membran-durchspannenden Domänen zusammengesetzt, die durch drei extra- und 3 intrazelluläre Schleifen verbunden sind; das N-terminale Ende der Sequenz liegt extrazellulär, das C-terminale Ende intrazellulär.

Von den CC-Chemokin-Rezeptoren sind bis heute 13 verschiedene Rezeptoren bekannt, deren Affinität zu den verschiedenen Chemokinen unterschiedlich ist. Der CC-Chemokin-Rezeptor CCR5 stellt eine Bindungsstelle für die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und MCP-2 (RAPORT et al. 1996) dar, wobei der Rezeptor für den Liganden MIP-1 β spezifisch ist. Neben der Vermittlung proinflammatorischer Prozesse wie Chemotaxis, Degranulation und Integrinaktivierung über Chemokinrezeptoren konnte der CCR5-Rezeptor zusätzlich als Co-Rezeptor für den Eintritt M-troper HIV-1 Stämme in Makrophagen nachgewiesen werden (ALKHATIB et al., 1996).

Als weitere Liganden für den Chemokinrezeptor CCR5 konnten die endogenen Opioide β -Endorphin (POLOCZEK, 2002) und β -Lipotropin (LINDNER, 2004) identifiziert werden, wobei die immunologische Bedeutung dieser Interaktion bis heute unklar ist.

1.2.5 Interaktion mit Hautzellen

Zahlreiche Arbeitsgruppen berichteten über das Vorkommen von POMC-Derivaten in Hautzellen wie z.B. in menschlichen Keratinozyten (SCHAUER et al. 1994, SLOMINSKI et al., 1995, 2000b; WINTZEN et al., 2000, 2001) in Hautzelllinien wie der Zelllinie A431 (SCHAUER et al., 1994) und in Hautbiopsien pathologisch veränderter Haut (SLOMINSKI et al., 1993, 1999).

WINTZEN et al. (2000) zeigten in ihren Untersuchungen, dass Keratinozyten lediglich unter bestimmten Bedingungen wie UV-Bestrahlung und Zugabe nahrungsarmen Mediums POMC-Derivate wie β -Endorphin und β -Lipotropin synthetisieren. Weitere Stimulatoren der Synthese und Freisetzung von POMC-Derivaten in Hautzellen stellen Zytokine wie Interleukin-1 und Endotoxin dar (SCHAUER et al., 1994; WINTZEN et al., 1995).

Im Rahmen von Untersuchungen der Interaktion von β -Endorphin mit Hautzellen wird diesem Peptid eine Rolle bei der Reepithelisierung und Geweberegeneration während der Wundheilung zugesprochen. So konnten BIGLIARDI et al. (2002) nachweisen, dass β -Endorphin die Migration menschlicher Keratinozyten - über μ -Opioid-Rezeptoren (BIGLIARDI et al., 1998) vermittelt - stimuliert. Darüber hinaus führt β -Endorphin zu einem Anstieg der Expression von Transforming Growth Factor β Type II Rezeptor (TGF- β type II Rezeptor) sowie Cytokeratin 16, beides Marker der Differenzierung von Hautzellen während der Wundheilung (BIGLIARDI et al., 2003). In derselben Studie wurde ein Konzentrationsanstieg von β -Endorphin in Hautzellen von Wundbereichen mit einem Abfall der μ -Opioid-Rezeptor-Dichte einhergehend gemessen, was im Sinne einer negativen Rückkopplung zu interpretieren ist.

Ebenso scheint β -Endorphin einen Einfluss auf das periphere Schmerzempfinden zu haben (BIGLIARDI-Qi et al., 2004) und ebenso wie ACTH und α -MSH an der Regulation der Hautpigmentierung beteiligt zu sein (KAUSER et al., 2003)

2 Aufgabenstellung

Seit langem ist bekannt, dass POMC-Fragmente sowohl in psychischen wie auch in physischen Stresssituationen vermehrt aus der Hypophyse ins Blut freigesetzt werden. Über die funktionelle Bedeutung dieser Fragmente in der Peripherie besteht allerdings, abgesehen von der des ACTH, nach wie vor Unklarheit.

Untersuchungen, die sich mit der Interaktion von β -Endorphin mit Zellen des Immunsystems befassten, konnten aufzeigen, dass β -Endorphin Funktionen im Komplex immuno-neuroendokriner Vorgänge übernimmt. So ist beispielsweise bekannt, dass β -Endorphin einerseits über seinen N-Terminus an Opioid-Rezeptoren und andererseits über sein Mittel- oder C-terminales Fragment an sog. Non-Opioid-Bindungsstellen (Dissertation A.Poloczek, 2002) von Monozyten zu binden vermag. Auch das POMC-Fragment β -Lipotropin, dessen C-Terminus mit β -Endorphin identisch ist, bindet über Non-Opioid-Bindungsstellen an Monozyten.

Orientierende Experimente wiesen auf eine sehr geringe Internalisierung des β -Lipotropins in Monozyten hin (Dissertation U.Lindner, 2004). Nachweise einer Internalisierung von β -Endorphin in Monozyten lagen bislang jedoch nicht vor. Über Internalisierung hätten sich jedoch Wirkungen des β -Endorphins –durch intrazelluläre Mechanismen ausgelöst- erklären lassen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte eine Internalisierung von β -Endorphin nur in Granulozyten (FALKE and FISCHER, 1986) und in Thymom-Zellen (SCHWEIGERER et al., 1985) nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb zunächst die Klärung der Frage, inwieweit die POMC-Fragmente β -Endorphin und β -Lipotropin bei physiologischer Temperatur in Monozyten internalisiert werden. Experimentelle Basis für die Untersuchung der Möglichkeit der Internalisierung bei 37 °C war die Untersuchung der Bindung von β -Endorphin und β -LPH bei 0 °C an die Monozyten in einer zusammenhängenden Versuchsserie. Als Modell für Monozyten wurde die humane Monozytenzelllinie THP-1 gewählt: Die Bindungs- und Internalisierungsversuche mussten mit Zellmengen durchgeführt werden, wie sie nur bei Einsatz einer Zelllinie zu erhalten waren.

Nachdem der Nachweis einer Internalisierung von β -Endorphin in Monozyten gelungen war, konnte im Weiteren nach der für den Internalisierungsprozess verantwortlichen Bindungsstelle gesucht werden. In der Tat wurde der Chemokinrezeptor CCR5 als verantwortliche Bindungsstelle identifiziert. Von dem Befund ausgehend, dass β -Endorphin über eine Non-Opioid-Bindungsstelle internalisiert wurde, wurde der Fragestellung der

funktionellen Bedeutung des Internalisierungsprozesses nachgegangen.. Dabei wurde insbesondere eine mögliche chemotaktische Wirkung von β -Endorphin auf Monozyten geprüft: Zum einen deshalb, weil Chemotaxis über Chemokinrezeptoren wie CCR5, der Bindungsstelle von β -Endorphin, vermittelt wird, zum anderen, weil eine ganze Reihe von Hinweisen aus der Literatur auf die Möglichkeit einer chemotaktischen Wirkung von β -Endorphin auf Monozyten vorlag.. Die Migrationsversuche ließen den Einsatz geringer Zellmengen zu. Hierfür boten sich neben den THP-1 Zellen auch Präparationen nativer Monozyten an.

Darüberhinaus sollten mögliche Effekte wie beispielsweise Chemokinese durch β -Endorphin bei Zellen der Hautzelllinien G-361, A431 und HaCat geprüft werden, da diesbezügliche Befunde aus der neueren Literatur vorlagen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war somit, weiterführende Informationen über die Wirkungen von β -Endorphin und β -LPH auf Monozyten sowie die Mechanismen dieser Wirkungen zu erhalten - insbesondere im Hinblick auf die Freisetzung von β -Endorphin und β -LPH ins Blut im Rahmen verschiedenster Stresssituationen.

3 Methodik

3.1 Geräte, Materialien, Substanzen, Lösungen, Computerprogramme

3.1.1 Geräte und Materialien

Brutschrank	Heraeus Instruments Inc., Hanau
Companion-Platte, 24 Vertiefungen (24 well)	Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Digitalkamera TK-C 1360B	Victor Company of Japan (JVC), Japan
Dispenser-Tips (0,5 / 2,5 / 5 / 12,5 ml)	nerbe plus GmbH Winsen/Luhe
Filtereinsätze (8.0 µm Porengröße)	Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Gamma-Zähler 1282 Compugamma CS	LKB, Wallac, Turku; Finnland
Glasmaterialien :	Schott, Mainz
Messkolben	
Erlenmeyerkolben	
Glasbecher	
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Kelheim
Mikroproberöhrchen /(400µl)Typ „Beckman“	Beckman, Palo Alto, USA
Mikroskop WILL	Wilovert S, Wetzlar
Mikroskop Leica DM-IRB	Leitz, Wetzlar
Mischer 5432	Eppendorf, Hamburg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Kalensee, Gießen
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
„Eppendorf“-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen Cellstar (50ml)	Greiner GmbH, Frickenhausen
Roller-Flaschen (Roller-Bottles)	Corning, New York, USA
Sarstedt-Röhrchen aus Polystyrol (3,5; 4,5; 13 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Schüttelinkubator Varishaker AM 169	Dynatech Deutschland, Denkendorf
Taumler	Heidolph, Kelheim
Tischrührer (Vortexer) REAX 1 DR	Heidolph, Kelheim
Tischschüttler	Braun, Melsungen
Waagen:	
Feinwaage M5	Mettler, Zürich, Schweiz
Tischwaage AT 250	Mettler, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen

Zentrifugen:
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400e
Microfuge B

Heraeus Instruments Inc.,
Hanau
Beckman, Palo Alto, USA

3.1.2 Substanzen

Albumin aus Rinderserum (BSA)

Sigma, München

Antikörper (monoklonal):

Monoklonaler Antikörper gegen CCR5
Klon 2D7

Pharmingen International,
Hamburg

Monoklonaler Antikörper gegen VN-Rezeptor
Klon 23C6

Santa Cruz Biotechnologie,
Santa Cruz, CA, USA

Antiserum (polyklonal):

Polyklonales Vitronektin-Antiserum
aS 66/67

Prof. Dr. K.T.Preißner,
Biochem. Inst., Gießen
Sigma, München

Dimethylsulfoxid

Enzymhemmer:

Aprotinin

Bayer, Leverkusen

Bacitracin

Serva Feinbiochemika,
Heidelberg

Leupeptin N-1000

Bachem, Heidelberg

Pefabloc SC

Boehringer, Mannheim

[4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonylfluorideHCl]

Fetales Kälberserum (FCS)

PAA, Cölbe/Marburg

N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-

Sigma, München

Phenylalanin (fMLF)

Glucose

Merck, Darmstadt

2-Deoxy-D-Glucose

Sigma, München

Morphin-Hemisulfat

Mundipharma, Limburg

Natrium-Azid

Merck, Darmstadt

Natriumhypochlorit

Merck, Darmstadt

Peptide:

β _H-Endorphin(1-31)

Novabiochem, Bad Soden

β _H-Endorphin(18-27)

Dr. U.Friedrich, Zentr. Med.

Mikrobiol. und Virol. Gießen

β _H-Endorphin(18-31)

Dr. U.Friedrich, Zentr. Med.

Mikrobiol. und Virol. Gießen

β _H-Endorphin(27-31)

Dr. U.Friedrich, Zentr. Med.

Mikrobiol. und Virol. Gießen

β _H-Lipotropin(1-89)

Dr. Parlow, NHPP, Torrance, CA,
USA

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)

Sigma, München

Saccharose

Merck, Darmstadt

Salze:

CaCl₂

Merck, Darmstadt

KCl

Merck, Darmstadt

KH₂PO₄

Merck, Darmstadt

MgSO₄

Merck, Darmstadt

NaCl

Merck, Darmstadt

Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethan]	Boehringer, Mannheim
Trypanblau	Sigma, Münche

3.1.3 Lösungen für Zellbindungsversuche (Zentrifugationsassay)

BSA (bovines Serumalbumin) – Lösung:

0,1% (w/v) BSA in Aqua bidest.

Phosphatpuffer (für die Jodierung):

0,5 M bzw. 0,05 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,5

Inkubationspuffer [KRTB (Krebs-Ringer-Tris-BSA)-Puffer mit Enzymhemmern]:

2,54 mM CaCl₂, 4,75 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 130,0 mM NaCl, 50,0 mM Tris, 11,0 mM Glucose, 0,1% (w/v) BSA, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin, 1mM Pefabloc pH 7,4

Kompensationspuffer [KRTB- Puffer mit Enzymhemmern (Inkubationspuffer, doppelt konzentriert, zum Erhalt der Zusammensetzung des Inkubationspuffers im Inkubationsansatz)]:

5,08 mM CaCl₂, 9,5 mM KCl, 2,4 mM KH₂PO₄, 2,4 mM MgSO₄, 260,0 mM NaCl, 100,0 mM Tris, 22,0 mM Glucose, 0,1% (w/v) BSA, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Aprotinin, 2 mM Pefabloc pH 7,4

Saccharose – Lösung:

20% (w/v) Saccharose in Aqua bid.

Phosphat Buffered Saline(PBS) defic.-Lösung:

136,9 mM KCl, 1,5 mM NaCl, 8,1 mM KH₂PO₄, Na₂HPO₄, pH 7,4

Trypsin-EDTA Lösung

0,05% Trypsin / 0,02% EDTA in PBS defic.

3.1.4 Medien für Zellkulturen

Je nach Zellkultur kamen unterschiedliche Nährmedien zur Kultivierung zum Einsatz.

Für der Melanomzelllinie G-361 wurde McCoy's 5A Medium, für die Keratinozyten der Zelllinie HaCat- DMEM eingesetzt. Die Zelllinie A431 und Monozyten der Zelllinie THP-1 wurden mit RPMI-1640 Medium kultiviert (3.2.1.1.2 und 3.2.3.1.1)

3.1.5 Computerprogramme

EBDA (equilibrium binding data analysis; including LIGAND), Version 3.0	G.A McPherson, 1986 Elsevier-Biosoft, Cambridge, GB
Microcal ORIGIN 3.5 und 5.0	MicroCal Software, Inc.
LIGAND Word für Windows 2000	Munson and Rodbard Microsoft Software, Inc.
AviEdit	Shareware

3.2 Methoden

3.2.1 Bindungsversuche mit Monozyten der Zelllinie THP-1

3.2.1.1 Binder

3.2.1.1.1 Monozyten der Zelllinie THP-1

Die Zellen der Zelllinie THP-1 waren aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen, der an akuter Monozytenleukämie erkrankt war, isoliert worden. Bei den Zellen handelt es sich um Monozyten, die in Suspension gehalten werden. Sie sind zur Phagozytose fähig und sind in der Lage, Lysozym zu produzieren.

Die Zellen wurden von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abt. Menschliche und Tierische Zellkulturen“ (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

3.2.1.1.2 Kultivierung von Monozyten der Zelllinie THP-1

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 5% FCS (fetales Kälberserum), Penicillin (100 iU/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) in Rollerflaschen bei 5% CO₂ und 37⁰ Celsius kultiviert. Die Zellkonzentration betrug 1 x 10⁶ bis 1,5 x 10⁶ Zellen/ml. Nach 4 bis 6 Tagen wurden die THP-1 Zellen unter sterilen Bedingungen umgesetzt. 50 ml der Zellsuspension wurden entnommen, in Cellstar[®]-Röhrchen pipettiert und bei 200xg 6 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet

mit 10ml frischem Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit weiteren 140ml frischen Mediums in die Roller-Flasche überführt. Die verbliebene Zellsuspension in der Roller-Flasche war zuvor zwecks Einsatz in Versuchen entfernt worden. Nach 2 Tagen wurden etwa 100ml Medium hinzugegeben. Ein Austausch der Roller-Flaschen fand alle 2 Wochen statt.

3.2.1.1.3 Präparation der Zellsuspension

Die Zellen wurden aus den Roller-Flaschen entnommen und in 50ml Polypropylen-Röhrchen drei Minuten lang bei 280xg zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen zweimal mit 10 ml Inkubationspuffer bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend auf Eis gestellt. Bei jedem Waschschrift wurden die Zellen jeweils 3 Minuten lang bei 280xg zentrifugiert. Für die Bindungsversuche wurde eine Zellkonzentration von 30×10^6 Zellen/ml benötigt. Um diese Konzentration zu erlangen, wurden 50 μ l Zellsuspension mit 50 μ l einer 1%igen Trypanblau-Lösung vermischt, daraufhin 20 μ l dieses Gemisches mit weiteren 180 μ l Inkubationspuffer versetzt. Diese verdünnte Zellsuspension wurde nun in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und vier Quadranten ausgezählt. Nach Bestimmung der Zellzahl durch Summation der Zellen und Multiplizieren mit Faktor 200000 konnte nun die entsprechende Menge an Inkubationspuffer zu den Zellen gegeben werden, um die gewünschte Zellkonzentration einzustellen.

3.2.1.2 Liganden

3.2.1.2.1 Radioaktiv markierte Liganden

Radioaktiv markiert wurden die Peptide β_{H} -Endorphin(1-31) sowie β_{H} -Lipotropin(1-89)

3.2.1.2.1.1 Markierung mit ^{125}Jod

Die Markierung des jeweiligen Peptids mit ^{125}Jod erfolgte an den Tyrosin-Resten des Peptids nach der Chloramin-T-Methode (HUNTER and GREENWOOD, 1962; HAZUM et al. 1979) mit geringen Modifikationen (WIEDEMANN and TESCHEMACHER, 1983). In ein

silikonisiertes 2 ml Glasröhrchen wurden nacheinander 50 µl Phosphatpuffer (0,5 M Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, pH 7,5), 10 µl Peptid-Lösung (5 x10⁻⁵M) und 10 µl Na¹²⁵I in NaOH (entsprechend 1mCi) einpipettiert. Die Jodierungsreaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Chloramin-T-Lösung (20 µg Chloramin T/10µl 0,05 M Phosphatpuffer) gestartet; das Gemisch wurde im Anschluß 30 s geschüttelt, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Natriummetabisulfit-Lösung (20 µg Na₂S₂O₅/10 µl 0,05 M Phosphatpuffer) gestoppt. Alle Lösungen mit Ausnahme von Na¹²⁵I wurden eisgekühlt angesetzt und bereitgehalten, die Jodierungsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur. Der Tracer wurde nach Zusatz von jeweils einem Milliliter 1-Propranolol und Essigsäure (einprozentig) bei 4 °C gelagert.

3.2.1.2.1.2 Vorbereitung des Tracers für die Bindungsversuche

Der Tracer wurde mit Inkubationspuffer so verdünnt, dass 50 µl dieser Verdünnung eine Radioaktivität von ca. 120000 cpm (counts per minute) enthielten.

3.2.1.2.2 Nicht markierte Liganden

In den Bindungsversuchen wurden folgende (potentiell) kompetitive Inhibitoren eingesetzt, um die Bindung der radioaktiv markierten Liganden charakterisieren zu können.

Die verwendeten Peptide waren:

β_H-Endorphin(1-31)

β_H-Endorphin(18-27)

β_H-Endorphin(18-31)

β_H-Endorphin(27-31)

Um Informationen über die Bindungsstellen von β_H-Endorphin(1-31) und β_H-Lipotropin(1-89) zu erhalten, wurden Antagonisten gegen bestimmte Strukturen eingesetzt, die als Bindungsstellen in Frage kamen:

Monoklonaler Antikörper gegen den Chemokinrezeptor CCR5:

Klon 2D7

Monoklonaler Antikörper gegen den Vitronektin-Rezeptor α_vβ₃:

Klon 23C6

Polyklonales Antiserum gegen Vitronektin:

α S 66/67

3.2.1.3 Durchführung der Bindungsversuche

3.2.1.3.1 Versuchsdurchführung

Die Bindungsversuche wurden nach der Methode eines Zentrifugationsassays (SCHWEIGERER et al., 1985) mit geringen Modifikationen durchgeführt. Die Konzentrationsangaben der in den Puffern eingesetzten Enzymhemmer wurden von GELFAND et al. (1995) übernommen: Statt PMSF wurde auf Grund der geringeren Toxizität Pefabloc verwendet.

Die verschiedenen Inkubationsansätze wurden auf Eis unter Verwendung eisgekühlter Lösungen hergestellt. Dabei wurden mit Ausnahme des CT-Ansatzes, welcher in 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert wurde, 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verwendet.

Da 20 μ l bovines Serumalbumin (BSA 0,1 %) in elektrolytfreiem Wasser zugegeben wurden, wurden zwecks Erhaltung von Osmolarität und Zusammensetzung des Inkubationspuffers 20 μ l eines Kompensationspuffers (siehe 3.1.3) zum Inkubat dazugegeben.

Die Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der Inkubationsansätze:

Inkubationsansätze					
	Kontroll-Ansatz (B ₀)	Blank-Ansatz (BL)	Kompetitions-Ansatz (VD)	Total-Counts-Ansatz (CT)	Viabilitäts-Ansatz (VIA)
Zellen in Inkubations-Puffer	130 µl	-	130 µl	-	130 µl
Inkubations-Puffer	-	130 µl	-	-	50 µl
BSA 0,1%	20 µl	20 µl	-	-	20 µl
Kompetitor in BSA 0,1%	-	-	20 µl	-	-
Kompensations-Puffer	20 µl	20 µl	20 µl	-	20 µl
Tracer in Inkubations-Puffer	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	-

Tab.1: Zusammensetzung der Inkubationsansätze für die Bindungsversuche mit THP-1 Zellen mit Zusatz des Kompensationspuffers zur Erhaltung der Osmolarität und Zusammensetzung des Inkubationspuffers

Beschreibung der Ansätze:

-Kontrollansätze (BO): Mit diesen Ansätzen wurde die Gesamtbindung (spezifische und unspezifische Bindung) des radioaktiv markierten Peptids an die Zellen bestimmt.

-Blank-Ansätze (BL): Hiermit wurde die Menge an freier, nicht zellgebundener Radioaktivität gemessen, die nach der Durchführung des Versuchs in Ansätzen ohne Zellen verblieben war.

-Kompetitionsansätze (VD): Diese Ansätze dienten zur Bestimmung der spezifischen Bindung bzw. eines bestimmten Anteils der spezifischen Bindung des radioaktiv markierten Peptids an die Zellen

-Total-Counts-Ansätze (CT): Mit diesem Ansatz wurde die in jedes Inkubat eingebrachte Gesamtradioaktivität gemessen. Das entsprechende Tracervolumen wurde direkt in ein für den Messvorgang im Gammazähler benutztes 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert. Die im Gammazähler gemessene Radioaktivität lag zwischen 120000 und 150000 cpm.

-Viabilitätsansätze (VIA):Die Überlebensrate der Zellen nach Durchführung des Versuchs konnte hiermit bestimmt werden. Nach Versuchsende wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen ermittelt (siehe 3.2.1.1.3).

Die Inkubationsansätze mit sämtlichen Komponenten mit Ausnahme des Tracers wurden 20 Sekunden lang mit einem Eppendorf-Mischer 5413 durchmischt und anschließend 30 Minuten lang vorinkubiert (Präinkubation). Nach der Aufgabe des Tracers wurden die Inkubationsansätze für 180 Minuten auf einem Dynatech Varishaker (Stufe 5,5) bei 4 Grad Celsius inkubiert.

Danach wurden die einzelnen Zellsuspensionen nochmals resuspendiert, 190 µl entnommen und auf 200 µl einer eisgekühlten 20 %igen Saccharoselösung, die in ein 400 µl Mikroprobe-Röhrchen vom Typ „Beckman“ einpipettiert worden war, aufgeschichtet.

Im Anschluss daran erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation in einer Beckman Microfuge B bei 8000xg, um zellgebundene von freier Radioaktivität zu trennen: Die freie Radioaktivität verblieb im Überstand und in der Saccharoselösung, während die Zellen mit daran gebundener Radioaktivität in die Spitze des Röhrchens abzentrifugiert wurden.

Die Spitzen der Mikroprobe-Röhrchen mit den Zell-Pellets wurden nun bei Raumtemperatur abgeschnitten und in 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen überführt.

Im Gammazähler wurde die Radioaktivität der verschlossenen Sahrstedt-Röhrchen für 3 min gemessen.

3.2.1.3.2 Auswertung

Für die Darstellung der Versuchsergebnisse wurden die Daten sowohl prozentual als auch herkömmlich in Zählraten pro Minute (cpm) angegeben.

Dabei berechnete sich die Bindung (B) des Tracers an die Zellen – unter „4 Ergebnisse“ als „KON“ bezeichnet - als Differenz zwischen dem Wert des Kontrollansatzes (BO) und dem Wert des Blank-Ansatzes (BL):

$$B = BO - BL$$

In Versuchen, in denen Substanzen eingesetzt wurden, die den Tracer von der Zellbindungsstelle verdrängten (sog. Kompetitoren) oder die Bindung des Tracers andersweitig beeinflussen konnten (s. 3.2.1.3.3), ergab sich die verbleibende unspezifische Bindung als VD-BL bzw. wurde die verbleibende unspezifische Bindung prozentual wie folgt ausgedrückt:

$$B = [(VD - BL)/(BO - BL)] \times 100 \quad [\%]$$

3.2.1.3.3 Bestimmung der Bindung unter Einfluss von Antikörpern und Stimulatoren

Antikörper und Antiseren, die spezifisch bestimmte Strukturen der Zelloberfläche besetzten, wurden wie unter 3.2.1.3.1 beschrieben als Verdränger (VD) eingesetzt – jedoch mit dem Unterschied, dass sie zusammen mit den übrigen Inkubatkomponenten 30 Minuten vorinkubiert wurden, bevor der Tracer zugesetzt wurde. Die Konzentration der Antikörper bzw. Antiseren betrug im Inkubat für:

Antikörper 2D7	45,5 µg/ml
Antikörper 23C6	36×10^{-5} µg/ml
Antiserum αS66/67	1,25 mg Protein/ ml.

Die Auswertung erfolgte wie unter 3.2.1.3.2 beschrieben.

Bei Versuchen, bei denen Morphin als Stimulans der CCR5-Expression in THP-1 Zellen eingesetzt wurde, wurde diese Substanz 12 bzw. 24 Stunden vor dem eigentlichen Versuch der Zellsuspension im Brutschrank unter Zellkulturbedingungen zugesetzt. Die Konzentration in der Suspension betrug 10^{-9} M (MIYAGI et al., 2000a).

3.2.1.4 Charakterisierung der Bindung

Für die Bestimmung der Charakteristika einer Bindung wurden die Prinzipien von Ligand-Binder-Interaktionen nach BURT (1978) berücksichtigt.

3.2.1.4.1 Strukturspezifität

Bei den Bindungsversuchen wurden zusätzlich zu β_H -Endorphin(1-31) als kompetitive Verdränger Fragmente des β_H -Endorphins, nämlich das Mittelfragment β_H -Endorphin(18-27) und das C-terminale Fragment β_H -Endorphin (18-31) eingesetzt, um Informationen darüber zu erhalten, ob die β -Endorphin-Bindung über das Mittel- oder das C-terminale β_H -Endorphin-Fragment erfolgte.

3.2.1.4.2 Ermittlung der Bindungsparameter K_D und B_{max}

Mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND (MUNSON and RODBARD, 1980) konnte aus den im folgenden beschriebenen Sättigungsexperimenten die Dissoziationskonstante K_D (Equilibriumkonstante), die ein Maß für die Affinität eines Liganden zu seiner Bindungsstelle darstellt, sowie die Konzentration an Bindungsstellen B_{max} ermittelt werden. Voraussetzung für die Berechnung dieser Bindungsparameter ist das Vorliegen eines dynamischen Gleichgewichts zwischen den Interaktionspartnern nach den Bedingungen des Massenwirkungsgesetzes. Das Programm ermittelt die Bindungsparameter durch iterative Anpassung des jeweils gewählten Bindungsmodells an die Experimentaldaten. Zusätzlich können Modelle unterschiedlicher Komplexität mit einer oder mehreren Bindungsstellen statistisch verglichen werden.

Die Sättigungsexperimente wurden als Bindungsversuche wie in 3.2.1.3.1 beschrieben durchgeführt. Sättigbarkeit bedeutet, dass spezifische Bindungsstellen durch ihre Liganden sättigbar sein müssen, da jene nur in endlicher Anzahl vorliegen. Um die Sättigbarkeit der untersuchten Bindungsstelle nachzuweisen, wurden in eine Reihe von Inkubationsansätzen jeweils gleiche Mengen an (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) gegeben. Durch Zugabe steigender Mengen an nicht markiertem β_{H} -Endorphin(1-31) in die verschiedenen Inkubationsansätze wurde die Gesamtmenge des Liganden von Ansatz zu Ansatz erhöht (der prozentuale Anteil des radioaktiv markierten Liganden wurde dabei verringert). Bei Bindung somit steigender Gesamtmengen an Ligand kam es zur Sättigung der Bindungsstellen. Mit zunehmendem Anteil nicht-gebundener Substanz verringerte sich auch die Menge des gebundenen radioaktiv markierten Liganden. Zusätzlich zum Peptid β_{H} -Endorphin(1-31) wurde in der ersten Versuchsreihe β_{H} -Endorphin(27-31) in einer fixen Konzentration von 10^{-6} molar, d.h. im Überschuß, den Inkubationsansätzen zugesetzt, um die Bindung des β -Endorphins über seinen C-Terminus an die Bindungsstelle von vorneherein zu blockieren, in der zweiten dagegen β_{H} -Endorphin(18-27), um die Bindung des β_{H} -Endorphins an die Bindungsstelle über sein Mittelfragment von vorneherein zu blockieren. In beiden Versuchsreihen wurde außerdem zu einem Teil der Ansätze der CCR5-Rezeptor Antikörper 2D7 zugesetzt, um den Einfluß des Antikörpers auf das Bindungsverhalten unter diesen Bedingungen zu bestimmen.

3.2.1.5 Statistik

Für Kontroll (KON)- und Testwerte aus Bindungs- und Internalisierungsversuchen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils mindestens zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment) bestimmt. Die Prüfung der Messwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem parameterfreien Test nach Mann und Whitney für unpaare Stichproben. (Dabei wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit mit $p \leq 0,05$ gewählt.)

3.2.2 Versuche zur Internalisierung von β_H -Endorphin in Monozyten der Zelllinie THP-1

3.2.2.1 Versuchsdurchführung

Bei den Internalisierungsversuchen wurde folgendermaßen vorgegangen:

3.2.2.1.1 Inkubation der Ansätze:

Bei einem Teil der Versuche wurde verfahren wie bei den Bindungsversuchen in 3.2.1.3.1. Zusätzlich zur beschriebenen Versuchsdurchführung wurde ein Teil der Proben jedoch auch bei 37° Celsius inkubiert. Um eine Internalisierung von β_H -Endorphin(1-31) in THP-1 Zellen nachweisen zu können, enthielten zudem einige Inkubate 2-Deoxy-D-Glucose in einer Konzentration von 30 mM (anstelle von Glucose) und Natriumazid (0,01%), um Stoffwechselprozesse der Zellen und damit eine Internalisierung zu inhibieren. Die Vorinkubation mit 2-Deoxy-D-Glucose und Natriumazid bis zur Traceraufgabe betrug bei diesen Versuchen wie bei Experimenten mit Antikörpern 30 Minuten, die Inkubationszeit 60 Minuten.

3.2.2.1.2 Ablösung des an die Zellmembran gebundenen Tracers

In Weiterführung der unter 3.2.2.1.1 beschriebenen Methode wurde das Ziel verfolgt, unter Ausschluß der membrangebundenen Radioaktivität lediglich die innerhalb der Zelle vorhandene Radioaktivität zu messen. Auch bei diesem Versuchsaufbau wurde das Pipettierschema wie in 3.2.1.3.1 beschrieben durchgeführt. Ebenso wurde bei 4° Celsius sowie bei 37° Celsius gearbeitet. In Anlehnung an die Methodik von SCHWEIGERER et al. (1985) wurden jedoch zusätzlich bestimmte Proben nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten mehrfach gewaschen und zentrifugiert, um die Membran-gebundene Radioaktivität zu entfernen.

Im ersten Schritt wurden alle Proben 5 Minuten bei 8000xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen in 500 μ l einer eisgekühlten 10%igen Saccharose-Lösung resuspendiert, abermals zentrifugiert (5 min) und der Überstand mit dem nicht gebundenen radioaktiv markierten Liganden verworfen. Anschließend erfolgte die Messung der

Radiokativität eines vorgesehenen Anteils der Inkubate im Gamma-Counter (im Ergebnisteil Abb. 7 bzw. Abb.13 als „Saccharose-Behandlung“ bezeichnet).

Im zweiten Schritt wurden die Zellen der übrigen, nicht für die erste Messung bestimmten Inkubate weiterverarbeitet und 30 Minuten lang in 200 µl eines auf pH 3.0 eingestellten Inkubationspuffers bei 4 °C inkubiert, um den an der Membran gebundenen radioaktiv markierten Liganden abzulösen. Nach erfolgter 30 minütiger Inkubation wurde ein definierter Anteil der Inkubate 5 Minuten bei 8000xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität in den Zellpellets gemessen (im Ergebnisteil Abb. 7 bzw. Abb.13 als „Saccharose/Säure-Behandlung“ bezeichnet).

Der dritte und letzte Schritt war wie schon beschrieben so gestaltet, dass 190 µl der in dem Inkubationspuffer (pH 3.0) befindlichen restlichen Zellsuspensionen nach Resuspension auf 200 µl einer eisgekühlten 20 %igen Saccharoselösung aufgeschichtet wurden, die in einem 400 µl Mikroproberöhrchen vom Typ „Beckman“ vorgelegt worden war. Im Anschluß daran erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation in einer Beckman Microfuge B bei 8000xg. Die Radioaktivität im Zellpellet in den abgeschnittenen Spitzen der Röhrchen wurde im Gamma-Counter bestimmt (im Ergebnisteil Abb. 7 bzw. Abb.13 als „Saccharose/Säure-Behandlung und Zentrifugation“ bezeichnet).

Durch die „Wanderung“ der Zellsuspensionen durch die 20 %ige Saccharose konnte eine weitere Reduktion der freien Radioaktivität erreicht werden.

3.2.2.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte analog zu den Ausführungen unter Abschnitt 3.2.1.3.2

3.2.2.3 Statistik

Der Einsatz deskriptiver bzw. analytischer statistischer Methoden erfolgte wie unter 3.2.1.5 beschrieben.

3.2.3 Untersuchungen zur chemotaktischen/chemokinetischen Wirkung von β -Endorphin

3.2.3.1 Eingesetzte Zellen

Als Zellmaterial wurden die Zelllinien THP-1, G-361, HaCat, A431 sowie native Monozyten eingesetzt.

3.2.3.1.1 Zellen der Zelllinien THP-1, G-361, HaCaT und A431

Die Monozytenzelllinie THP-1 wurden wie in 3.2.1.1.1 beschrieben gewonnen und wie in 3.2.1.1.2 geschildert kultiviert.

G-361 Zellen sind maligne Melanomzellen, die von einem einunddreißig Jahre alten kaukasischen Mann stammen. Die Zellen sind in der Lage, Melanin zu produzieren.

Sie wurden von der „European Collection of Cell Cultures“ (ECACC) bezogen.

Zellen der Melanomzelllinie G-361 wurden in McCoy's 5A Medium mit 5% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin bei 37 °C mit 5% CO₂ in Zellkulturschalen mit 96 mm Durchmesser kultiviert.

Bei der Zelllinie des Typs HaCaT handelt es sich um eine immortalisierte, nicht maligne Keratinozyten-Zelllinie des adulten Menschen. Diese Zelllinie wurde von Prof. Fusenig, Krebsforschungszentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Kultiviert wurden diese Zellen unter denselben Bedingungen wie G-361 Zellen, allerdings mit der Ausnahme, dass anstelle von McCoy's 5A Medium DMEM Medium verwendet wurde.

Die Zelllinie A431 ist eine epidermale Karzinomzelllinie aus einem soliden Tumor einer fünfundachtzigjährigen Patientin, die epithelial und somit adhärent wächst. Diese Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

RPMI-1640 Medium war für diese Zellen das geeignete Medium.

3.2.3.1.2 Native Monozyten

Native Monozyten wurden freundlicherweise von Dr. Konstantin Mayer und Prof. Dr. Lohmeyer (Abt. Innere Medizin, JLU-Gießen) zur Verfügung gestellt.

Diese Monozyten wurden durch Ficoll-Dichtezentrifugation und anschließende Elutriationszentrifugation aus antikoaguliertem Blut von Versuchspersonen isoliert. Bei der Ficoll-Dichtezentrifugation wurden beim Zentrifugieren Erythrozyten und Granulozyten durch Polysaccharose aggregiert und rasch sedimentiert, Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen verblieben in der Plasma-Zwischenschicht und konnten somit isoliert werden. Thrombozyten wurden durch langsames Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen entfernt.

Mit der Elutriationszentrifugation konnte eine weitere Auftrennung mononukleärer Zellen in Lymphozyten und Monozyten erzielt werden. Eine Elutriationszentrifuge funktioniert folgendermaßen:

In der Trennkammer einer Elutriationszentrifuge sind Zellen zwei einander entgegengerichteten Kräften ausgesetzt: der Zentrifugalkraft durch den sich drehenden Rotor und der Kraft der die Trennkammer durchströmenden Flüssigkeit mit ihrer zentripetalen Ausrichtung. Die in der Trennkammer befindlichen Zellen wandern entsprechend ihrer Dichte an den Ort, an dem ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Kräften besteht. Durch Einstellung der Durchflussgeschwindigkeit mit Einsatz einer vorgeschalteten Pumpe und Variation der Rotorgeschwindigkeit können Zellen unterschiedlicher Dichte aus der Kammer ausgewaschen und fraktioniert werden.

Nach der Aufreinigung wurden die mit einem Reinheits-Gehalt von >95 % gewonnenen Monozyten in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10% FCS (fetales Kälberserum), Penicillin (100 iU/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) etwa eine bis zwei Stunden im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37° C gehalten und am gleichen Tag für Versuchszwecke verwendet.

3.2.3.1.3 Behandlung der Monozyten der Zelllinie THP-1 mit dem Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)

Monozyten der Zelllinie THP-1 wurden aus den Roller-Flaschen entnommen und auf Zellkulturschalen ausgesät. Ca. 2×10^6 Zellen wurden in RPMI 1640-Medium unter Zusatz

von 5% FCS (fetales Kälberserum), Penicillin (100 iU/ml) und Streptomycin (100µg/ml) mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) in einer 10^{-8} molaren Konzentration drei Tage lang inkubiert, um die Monozyten zu Makrophagen-ähnlichen Zellen auszudifferenzieren (SCHWENDE et al., 1996). PMA war in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und wurde mit dem oben genannten Medium auf eine Konzentration von 10^{-8} M verdünnt, die Konzentration an DMSO im Medium betrug hierbei 0,1 %.

Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen, die an der Schale haftenden Zellen mit 10ml PBS defic.-Lösung gespült und mit 3ml Trypsin-EDTA-Lösung ca. 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturschale abzulösen. Nach Resuspension in RPMI-1640 Medium mit BSA(0,1 %) und 20mM HEPES wurden die Zellen auf die Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen in 300 µl verdünnt und im Versuch verwendet.

3.2.3.2 Versuchsdurchführung

Für die chemotaktischen bzw. chemokinetischen Versuche wurden die adhären wachsenden Zellen (A431, G-361, HaCaT), die auf Zellkulturschalen mit 96 mm Durchmesser kultiviert worden waren, mit 10 ml PBS defic.-Lösung gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung ca 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, um ein Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale zu erreichen.

Nachdem die jeweiligen Zellen von der Zellkulturschale abgelöst bzw. aus der Rollerflasche entnommen worden waren, wurden sie in Cellstar®-Röhrchen mit dem entsprechendem Medium (RPMI-1640-Medium für A431 Zellen und Monozyten, McCoy's 5a für G-361 Zellen, DMEM Medium für HaCaT-Zellen), welches BSA (0,1%) und 20mM HEPES enthielt, überführt. In der Neubauer-Zählkammer wurde die vorhandene Zellkonzentration bestimmt. Anschließend wurden die Suspensionen drei Minuten lang bei 280xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit dem oben genannten Medium so resuspendiert, dass 1×10^5 Zellen in 300 µl vorhanden waren.

Für den Migrationsversuch wurden Falcon™-Filtereinsätze der Firma Becton-Dickinson mit einer Porengröße von 8,0 µm verwendet, die in speziell dafür vorgesehene 24-well Platten eingesetzt werden konnten.

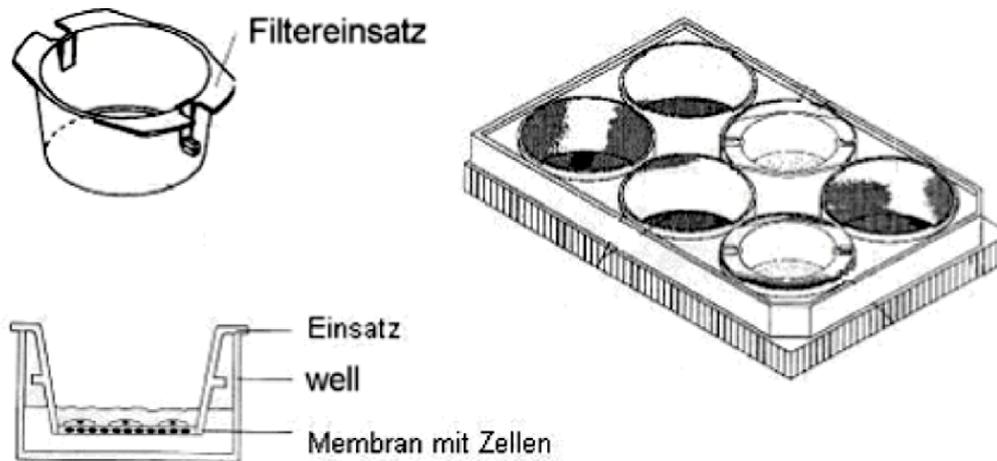


Abb.2: Aufbau des chemotaktischen bzw. chemokinetischen Versuchs mit einer 6-well Platte (modifizierte Abbildung von Becton-Dickinson)

Zunächst wurden 300 μl der Zellsuspension (1×10^5 Zellen) in die Einsätze auf die Membranen pipettiert, anschließend in die entsprechenden wells 700 μl des entsprechendem Mediums, 700 μl Medium mit N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-Phenylalanin (fMLF) (10^{-8} molar) oder 700 μl Medium mit verschiedenen Konzentrationen von β -Endorphin(1-31) (10^{-8} bis 10^{-12} molar).

Dabei diene das Medium ohne Zusatz als Negativkontrolle einer durch chemotaktische Substanzen induzierten Migration der Zellen; als Positivkontrolle einer Migration diene der Ansatz mit dem üblicherweise verwendeten Chemotaxin fMLF.

β -Endorphin(1-31) wurde in Konzentrationen von 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M und 10^{-12} M eingesetzt, um die Konzentrationsabhängigkeit einer chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung des β -Endorphins zu prüfen.

Während der Inkubationszeit hatten die Zellen die Möglichkeit, durch den Filter hindurch in das well mit der entsprechenden Konzentration an β -Endorphin(1-31) überzutreten. Innerhalb einer Versuchsreihe wurden Dreifachproben angesetzt.

Die Inkubationstemperatur betrug 37°C , die Inkubationszeit 90 bis 180 Minuten - abhängig vom jeweiligen Zelltyp.

Mit Hilfe eines Mikroskopes der Firma Leitz vom Typ Leica DM-IRB, einer Digitalkamera der Firma JVC vom Typ TK-C 1360B und dem Computerprogramm AviEdit wurden

Aufnahmen einzelner Filter angefertigt, um Chemotaxis bzw. Chemokinese Zellen dokumentieren zu können.

3.2.3.3 Auswertung

Als Nachweis für eine Chemotaxis der Zellen wurden nach Abschluß der Inkubation die Zellmengen in den wells bestimmt, da diese Zellen während der Inkubationszeit von der Oberseite des Filters durch die Poren desselben hindurch in das well gewandert sein mussten. Die in dem well vorhandenen Zellen wurden mikroskopisch bei 320facher Vergrößerung gezählt. Dabei diente ein Raster, welches auf dem Objektträgertisch angebracht wurde, als Auswertungshilfe, um zehn Felder der Oberfläche des wells auszuzählen.

Zusätzlich wurden wie in 3.2.3.3 erwähnt, Aufnahmen einzelner Filter in minütigen Abständen über insgesamt 5 Stunden angefertigt, die mit dem Programm AviEdit zu einer Filmdatei zusammengefasst wurden. Die Aufnahmen erlaubten die Dokumentation morphologischer Veränderungen und chemokinetischer Reaktionen der untersuchten Zellen unter dem Einfluß von fMLF und β -Endorphin. Filme, in den HaCat-Zellen entweder mit Medium im well ohne Zusatz, mit dem Zusatz von β -Endorphin (10^{-9} molar) oder mit Zusatz des Chemotaxin fMLF (10^{-8} molar) zu betrachten sind, sind auf der beiliegenden CD-ROM anzusehen.

4 Ergebnisse

4.1 Ausschluss einer Internalisierung von β -Lipotropin (β_{H} -Lipotropin(1-89), β_{H} -LPH) in Monozyten der Zelllinie THP-1

Im ersten Abschnitt der Untersuchungen sollte die Interaktion von β -Lipotropin mit THP-1 Zellen untersucht werden, um Hinweise auf die Internalisierung von β -Lipotropin (LINDNER 2004) bestätigen oder widerlegen zu können.

Die Bindung von β_{H} -LPH an die THP-1 Zellen wurde als Basisbefund für die Untersuchung der Internalisierung des β -Lipotropins benötigt. Die Befunde zur β_{H} -LPH-Bindung sollten dann ggf. für die Untersuchung des Mechanismus der Internalisierung verwendet werden – z.B. im Sinne spezifischer Blockaden durch interagierende Fragmente des β_{H} -LPH.

4.1.1 Bindung von β_{H} -LPH an Monozyten der Zelllinie THP-1

Zur Bestimmung der Bindung von β_{H} -Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen wurden Proben mit Binder und Ligand 10 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Inkubationszeit vor Traceraufgabe (als Präinkubationzeit bezeichnet) betrug 30 Minuten. Neben Kontrollansätzen (KON), die lediglich Zellen mit entsprechenden Zusätzen enthielten wie in der Tab.1 in 3.2.1.3.1 beschrieben, enthielten einige Inkubate zusätzlich β_{H} -Endorphin(1-31), welches als kompetitiver Verdränger eingesetzt wurde, um eine Verdrängung und damit die spezifische Bindung von β_{H} -Lipotropin(1-89) zu erhalten. Die Aminosäuresequenz 59-89 des β_{H} -Lipotropins(1-89) ist identisch mit der des β_{H} -Endorphins(1-31).

Abbildung 3 zeigt spezifische und unspezifische Bindung von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen während einstündiger Inkubation:

Das Peptid war zum Teil durch β_{H} -Endorphin(1-31) kompetitiv verdrängbar.

Aus Vergleichsgründen wurde für die Ordinate in der Abb.3 die gleiche Skalierung gewählt wie für die Abbildungen zur Darstellung der Bindung (und Internalisierung) von β -Endorphin (Abb.9).

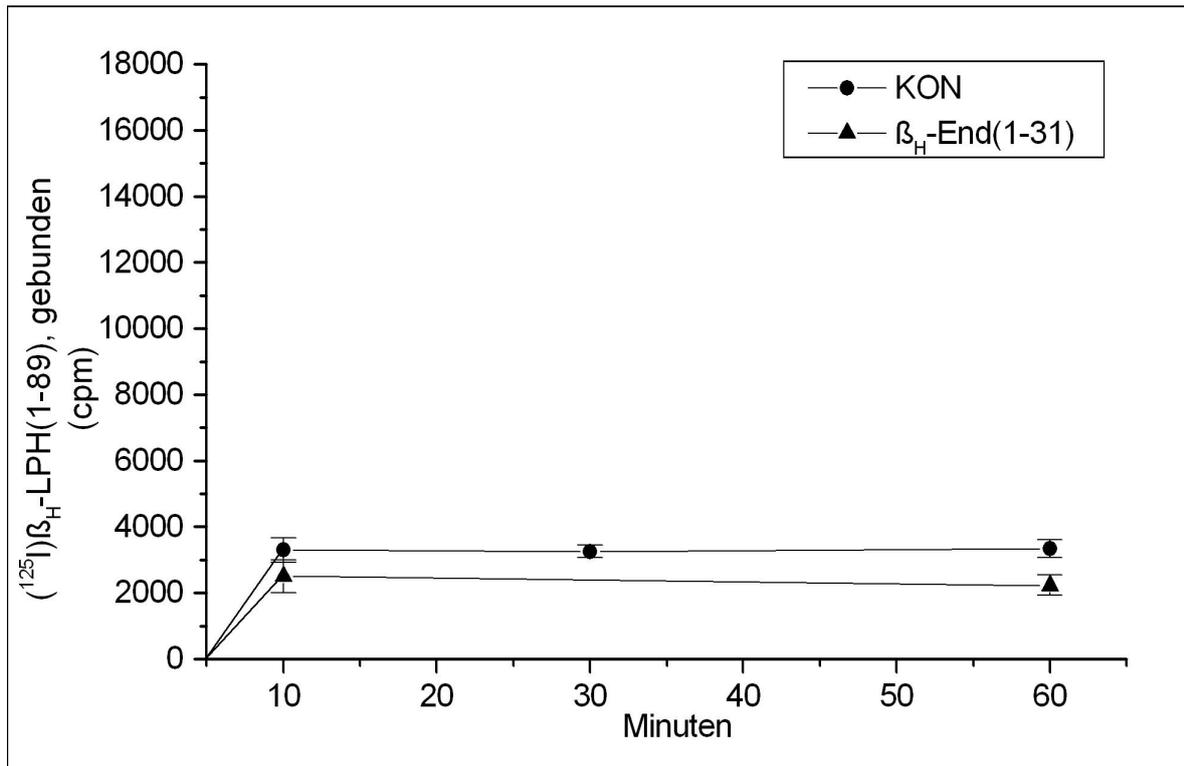


Abb.3: Bindung von (¹²⁵I)β_H-Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen bei 4 °C in Abwesenheit (-●-, Kontrolle KON) und in Anwesenheit (-▲-) des kompetitiven Verdrängers β_H-Endorphin(1-31). Die Konzentration des Verdrängers betrug 9x10⁻⁶ M im Inkubat. Angabe der Bindungswerte in cpm. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Die folgende Abbildung zeigt die Strukturspezifität der Bindung. Um diese bestimmen zu können, wurde die Bindung von (¹²⁵I)β_H-Lipotropin(1-89) in Anwesenheit verschiedener β_H-Endorphin(1-31)-Fragmente gemessen. β_H-Endorphin ist identisch mit dem C-terminalen Fragment des β_H-Lipotropins. Eingesetzt wurden β_H-Endorphin(18-27), das Mittelfragment des β_H-Endorphins, und β_H-Endorphin(18-31), das C-terminale Fragment des β_H-Endorphins. In der Abbildung 4 wurde die Bindung des markierten Liganden in Abwesenheit von Verdrängern, KON (Kontrolle), gleich 100 % gesetzt und die weiteren Bindungswerte in Anwesenheit nicht markierter Liganden (Verdränger) prozentual darauf bezogen. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten.

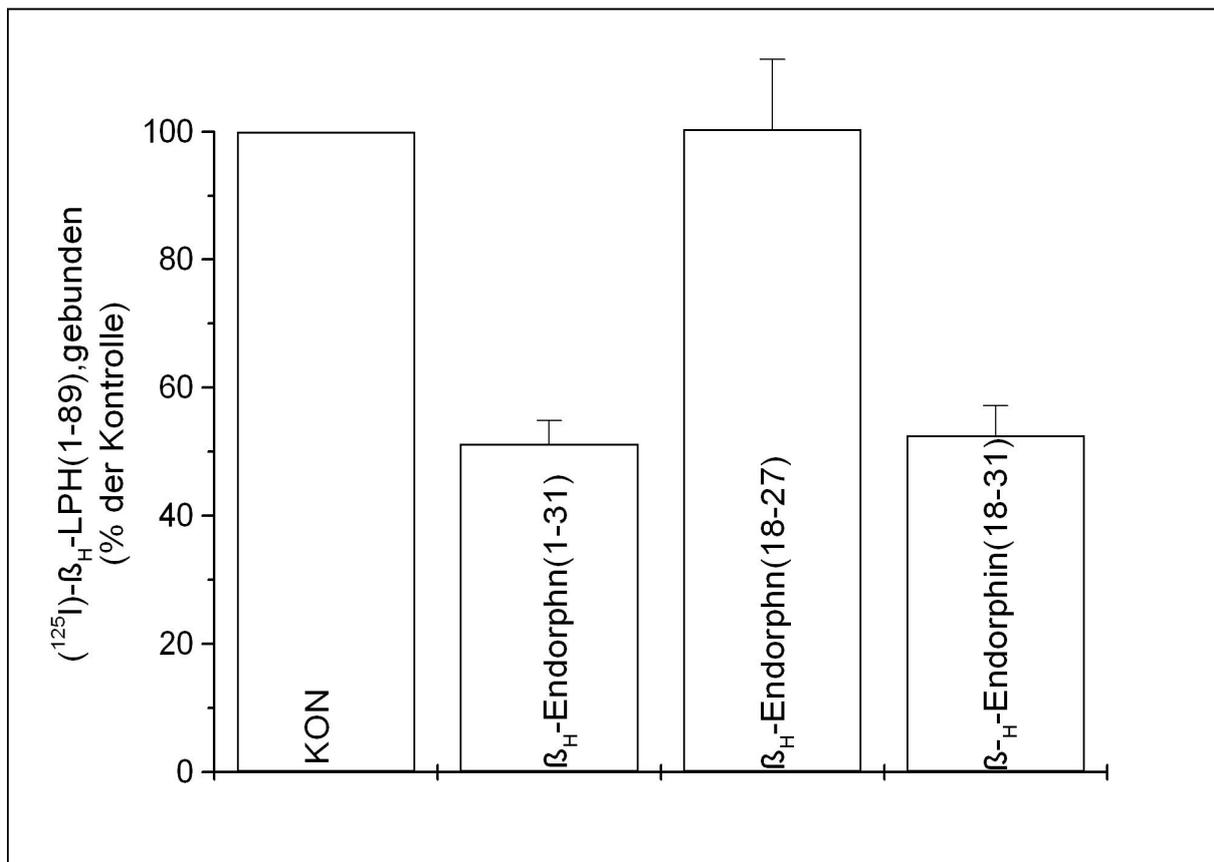


Abb.4: Bindung von (¹²⁵I)β_H-Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrolle KON) oder in Gegenwart von β_H-Endorphin(1-31), β_H-Endorphin(18-27) bzw. β_H-Endorphin(18-31) [die Zahlen in Klammern entsprechen den Aminosäurepositionen des jeweils eingesetzten Fragments] nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 4 °C. Die Konzentration der Verdränger betrug 9x10⁻⁶ M im Inkubat. Angabe der Bindungswerte in Prozent der Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment)

β_H-Endorphin(1-31) bewirkte eine Verdrängung des Tracers von ca. 50%; das C-terminale Fragment β_H-Endorphin (18-31) bewirkte ebenfalls eine Verdrängung von ca. 50%, das Mittelfragment β_H-Endorphin(18-27) bewirkte keine Verdrängung. Demnach handelte es sich um eine Bindung von (¹²⁵I)β_H-Lipotropin(1-89) über die C-terminale Aminosäuresequenz seines C-terminalen Fragments (β_H-Endorphin (18-31)) an Bindungsstellen auf THP-1 Zellen.

4.1.2 Untersuchungen zur Internalisierung von β_{H} -LPH in Monozyten der Zelllinie THP-1

Um die Internalisierung von β_{H} -Lipotropin(1-89) in Monozyten der Zelllinie THP-1 zu erfassen, wurden Proben wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C 10 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten inkubiert.

Wie in 3.2.2.1 beschrieben wurden weitere Proben bei 37°C mit Na-azid (0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose (30 mM) inkubiert, mit der Absicht, die Stoffwechsellleistungen der Zellen und damit die Internalisierung von Substanzen zu blockieren.

Diese Proben dienten damit als Negativ-Kontrolle für den Fall einer Internalisierung.

In der Abb. 5 ist die nach Zentrifugation der Zellen in der Spitze der Beckman-Röhrchen (s. 3.2.1.3.1) vorgefundene Menge an Radioaktivität dargestellt, die nach Inkubation bei 37 °C sowohl auf Membran-gebundenes als auch auf internalisiertes (^{125}I) β_{H} -LPH(1-89) zurückzuführen sein konnte und deshalb im Folgenden als „Zell-assoziiert“ bezeichnet wird. Im Gegensatz hierzu war davon auszugehen, dass bei Inkubation bei 4 °C ausschließlich Bindungsprozesse stattfanden.

Zum besseren Vergleich mit den für (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) erhaltenen Ergebnissen wurde die Skalierung der Ordinate in Abb. 5 derjenigen in Abb.11 angeglichen. Bei 37°C stellten sich die Assoziations-Zeitverläufe wie folgt dar:

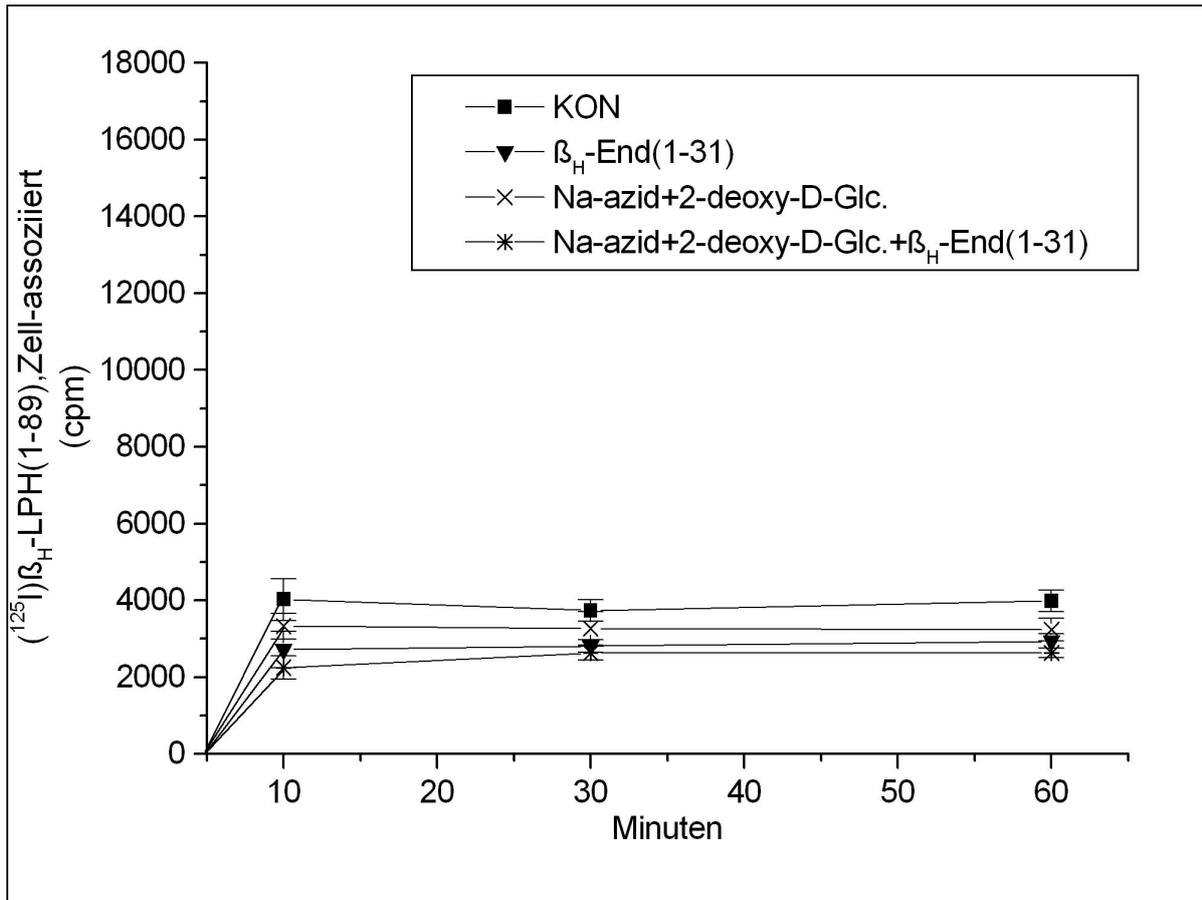


Abb.5: Assoziation (Bindung und ggf. Internalisierung) von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen bei 37°C in Abwesenheit (KON) und Anwesenheit des Verdrängers β_{H} -Endorphin(1-31), in Anwesenheit der Stoffwechsellinhibitoren Na-azid(0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose(30 mM) und in Anwesenheit aller drei Stoffe. Die Konzentration des Verdrängers betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Zell-Assoziationswerte in cpm. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment)

Wie aus den Abbildungen 3 und 5 ersichtlich, war ein Anstieg der Assoziation von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) an die THP-1 Zellen innerhalb 10minütiger Inkubation zu erkennen, der nach weiterer Inkubation in ein Plateau überging. Das bei 37 °C erreichte „Assoziationsniveau“ (Abb. 5) lag dabei geringfügig über dem bei 4 °C erreichten „Bindungsniveau“ (siehe Abb. 6).

Ein Vergleich der Abbildungen 5 und 11 vorab zeigt große Unterschiede der Assoziation von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) und (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31). (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) erreichte einen Assoziationswert von ca. 4000 cpm nach einer Inkubationszeit von 60 min, (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) dagegen einen Assoziationswert von ca. 16000 cpm.

Zur Übersicht sind die nach 60minütiger Inkubation bei 4 °C und bei 37 °C erhaltenen Messwerte einander in Abb. 6 gegenübergestellt.

Die Ordinate in Abb.6 wurde der Abb.12 zwecks Vergleichs der Daten für markiertes β_{H} -Lipotropin(1-89) und β_{H} -Endorphin(1-31) angeglichen.

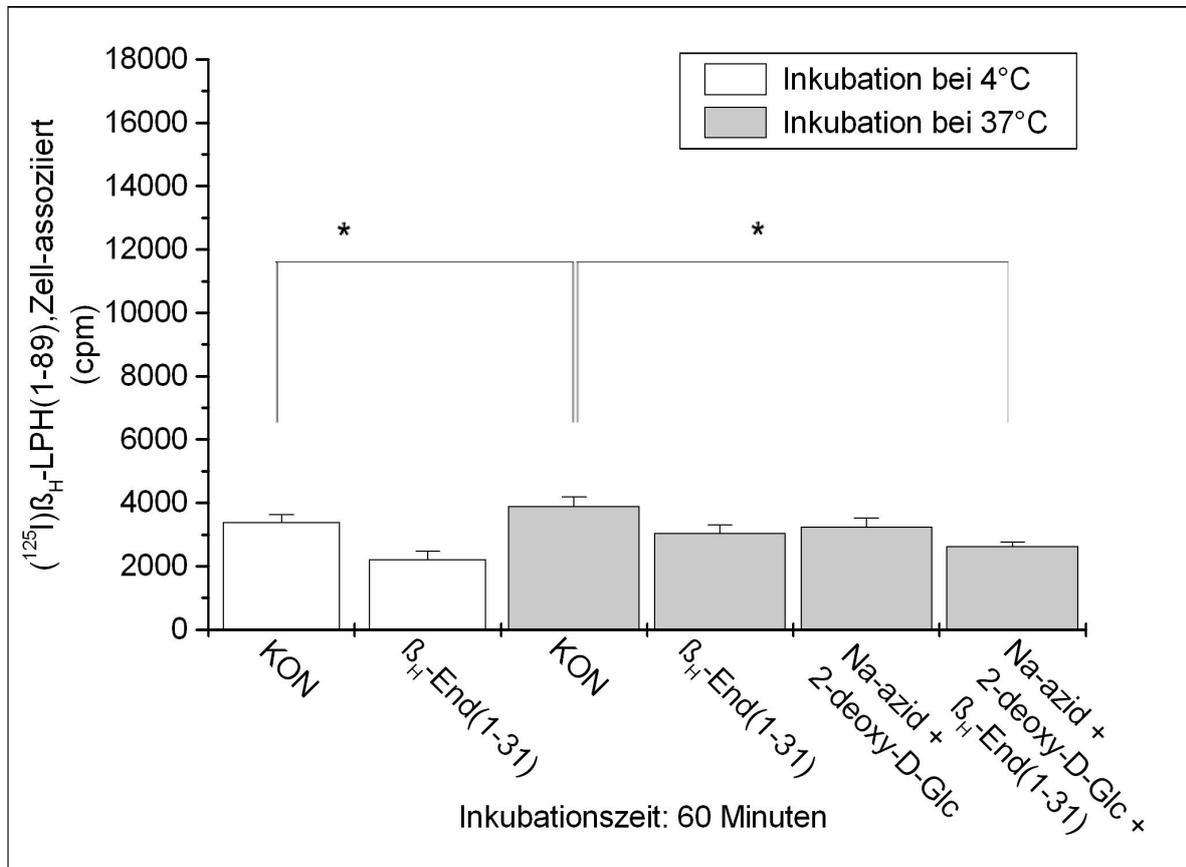


Abb.6: Assoziation (Bindung und ggf. Internalisierung) von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}$ -Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrollen KON) und in Anwesenheit des Verdrängers β_{H} -Endorphin(1-31), in Anwesenheit der Stoffwechsellinhibitoren Na-azid(0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose(30 mM) und in Anwesenheit aller drei Stoffe nach 60minütiger Inkubation bei 4 °C bzw. 37 °C. Die Konzentration des Verdrängers betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. *: statistische Signifikanz für die Differenzen zwischen den betreffenden Werten mit $p < 0,05$. Angabe der Zellassoziationswerte in cpm. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Bei 37 °C betrug die Verdrängung des Tracers durch β_{H} -Endorphin(1-31) auf ca. 85% und war damit nicht so ausgeprägt wie bei 4 °C auf ca. 65 %. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Messwerten wurden mit Hilfe des parameterfreien Rangtests von Mann und Whitney auf Signifikanz überprüft. Das Signifikanzniveau lag bei $p = 0,05$. Der Vergleich beider Kontrollwerte KON ergab einen signifikanten Unterschied. Ebenso erwiesen sich der Inkubationswert mit Na-azid und 2-deoxy-D-Glucose + β_{H} -Endorphin(1-31) und der Kontrollwert bei 37 °C mit $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich. Um lediglich die spezifische Bindung zu erfassen, wurden die bei 4 °C ermittelten Messwerte der Kontrolle

KON von den Messwerten, die zusätzlich β_{H} -Endorphin(1-31) als Verdränger enthielten, subtrahiert. Anschließend wurden diese Daten der spezifischen Bindung mit den Assoziationswerten aus den Differenzen der Messdaten für die Kontrolle KON einerseits und der Messdaten für Na-azid und 2-deoxy-D-Glucose + β_{H} -Endorphin(1-31) andererseits statistisch verglichen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der spezifischen Bindung und der „spezifischen Assoziation“ mit $p > 0,05$, d.h. die „spezifische Assoziation“ bei 37 °C ließ sich durch spezifische Bindung bei 37 °C erklären. Die Ergebnisse wiesen somit darauf hin, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Internalisierung des β -LPH nicht oder nur in geringem Ausmaß stattfindet.

Die Messwerte der Abbildungen 6 und 12 zeigen jedoch deutliche Unterschiede der Gesamtassoziation in Bezug auf die Gesamtbindung für markiertes β -Lipotropin und β -Endorphin. Nach einer Inkubationszeit von 60 min stieg der Gesamtassoziationswert von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) in Bezug auf die Gesamtbindung an THP-1 Zellen um ca. 10 % an, der Gesamtassoziationswert von (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) dagegen um ca. 137 %.

Um die Befunde zur Internalisierung von β_{H} -Lipotropin(1-89) in THP-1 Zellen weiter abzuklären, wurden Versuche wie in 3.2.2.2 beschrieben in Anlehnung an die Methode von SCHWEIGERER et al. (1985) durchgeführt. Ziel war es, den an der Zellmembran haftenden Tracer zu entfernen. Durch eine Reihe von Zentrifugations- und Waschschritten wurde erreicht, den auf der Zellmembran haftenden Tracer auf ein Minimum zu reduzieren.

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse im Einzelnen:

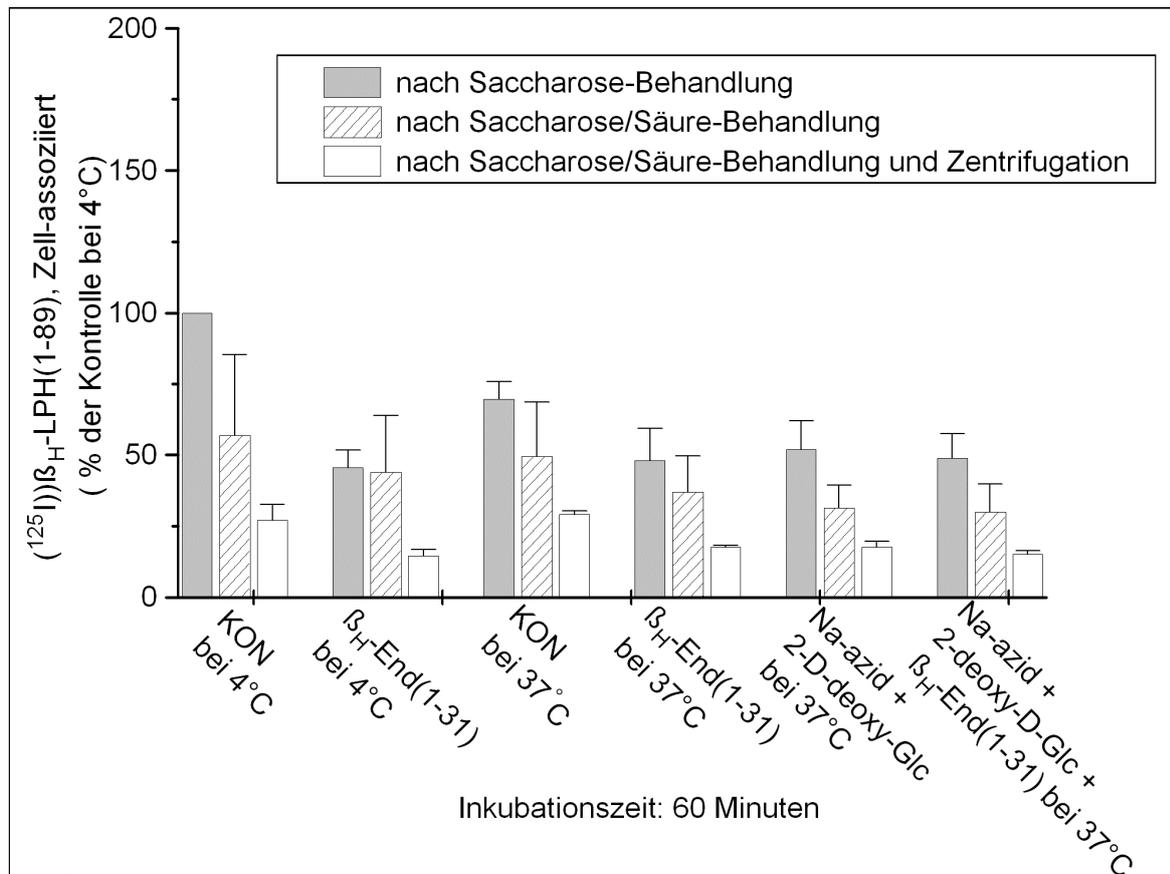


Abb.7: Assoziation (Bindung und evtl. Internalisierung) von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Lipotropin(1-89)}$ an THP-Zellen in Abwesenheit (Kontrollen KON) und in Anwesenheit des Verdrängers $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin(1-31)}$, in Anwesenheit der Stoffwechsellinhibitoren Na-azid(0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose(30 mM) und in Anwesenheit aller drei Stoffe nach 60minütiger Inkubation. Die Konzentration des Verdrängers betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Zellassoziationswerte in Prozent der Kontrolle (KON) bei 4°C nach Saccharose-Behandlung. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Deutlich erkennbar ist die prozentuale Abnahme der Bindung und der Assoziation von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Lipotropin(1-89)}$ an die Monozyten nach den einzelnen Behandlungsschritten.

Entscheidend für die Frage nach einer eventuellen Internalisierung sind die gewonnenen Messdaten nach allen Wasch- und Zentrifugationsschritten. Die vor Saccharose-/Säure-Behandlung und Zentrifugation ermittelten Assoziationsdaten innerhalb der Versuchsdurchführung (3.2.2.2) demonstrieren aufgrund der Streuung der Messdaten (siehe auch Abb. 13) lediglich die intermittierende Abnahme der Radioaktivität während der einzelnen Behandlungsschritte.

Die Kontrolldaten KON bei 4 °C und KON bei 37 °C nach allen Behandlungsschritten (Saccharose/Säure-Behandlung und Zentrifugation) lagen beide bei etwa 30 % (KON bei 4

°C 27 (± 5 SD)%, KON bei 37 °C 29(± 1 SD) % des Kontrollwertes KON bei 4°C nach Saccharose-Behandlung und waren mit einem ($p=0,89$) nicht signifikant unterschiedlich. Trotz des Temperaturunterschiedes lag somit keine Differenz der Kontrollwerte im Rahmen dieser Versuchsanordnung und somit kein Hinweis auf eine Internalisierung von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) in Monozyten der Zelllinie THP-1 vor.

Ebenso lag kein signifikanter Unterschied ($p=0,3$) beim Vergleich der Inkubate nach allen Behandlungsschritten (Saccharose/Säure-Behandlung und Zentrifugation) mit dem Verdränger β_{H} -Endorphin(1-31) bei 4 °C und bei 37 °C vor, die Verdrängung von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) durch β_{H} -Endorphin(1-31) betrug bei 4 °C 54 (± 7 SD)% und bei 37 °C 65 (± 2 SD)%. Dass überhaupt eine Verdrängung verzeichnet werden konnte, beweist, dass die Affinität der Bindung von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) an die spezifischen Bindungsstellen auf den THP-1 Zellen so hoch war, dass das Peptid durch die Wasch- und Zentrifugationsschritte nicht vollständig abgelöst werden konnte.

Vergleicht man allerdings die Daten der Abbildungen 7 und 13 miteinander, so wird im Gegensatz zu den gleichbleibenden Kontrollwerten von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) bei 4 °C und 37 °C eine Steigerung der Kontrollwerte von (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) bei 4 °C auf das Zweieinhalbfache bei 37 °C deutlich. Dies ist im Sinne einer Internalisierung des (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) zu interpretieren, da der Assoziationswert für die Stoffwechselblockade, d.h. der Wert, der unspezifische und spezifische Bindung beinhaltet, in der gleichen Größenordnung liegt wie der Bindungskontrollwert bei 4 °C, der ja auch unspezifische und spezifische Bindung beinhaltet.

Abschließend sollte die Strukturspezifität der Zellassoziation analog Abschnitt 4.1.1 bei 37 °C untersucht werden. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse bei 4 °C (siehe auch Abb.4) und bei 37 °C:

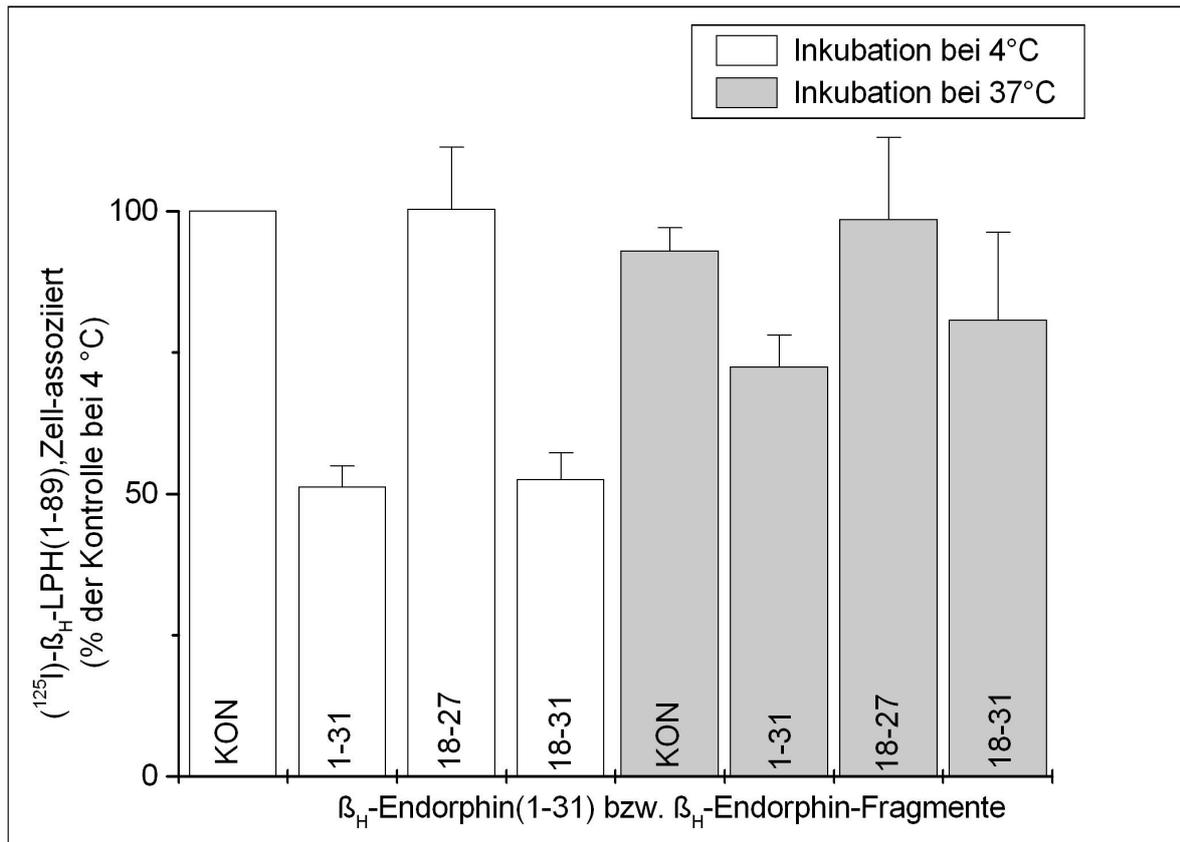


Abb.8: Assoziation (Bindung und ggf. Internalisierung) von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Lipotropin}(1-89)$ an THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrollen KON) oder in Gegenwart von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$, $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(18-27)$ bzw. $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(18-31)$ bei 4°C und 37 °C. [die Zahlen in Klammern entsprechen den Aminosäurepositionen des jeweils eingesetzten Fragments von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$] nach 60 Minuten Inkubation. Die Konzentration der Verdränger betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Zellassoziationswerte in Prozent der Kontrolle (KON) bei 4 °C. Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment)

Im Unterschied zur Verdrängung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Lipotropin}(1-89)$ durch das $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ -Fragment(18-31) bei 4 °C konnte dieses bei 37°C keine signifikante Verdrängung erzielen.

Aus diesem Experiment konnte hinsichtlich der Strukturspezifität der Assoziation bei 37 °C aufgrund der Streuung keine exakte Aussage abgeleitet werden, näherungsweise zeigt sich aber analog zur C-terminalen-Bindung bei 4 °C eine C-terminale Assoziation bei 37 °C (siehe Diskussion).

4.2 Nachweis der Internalisierung von $\beta\text{-Endorphin}$ ($\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$, $\beta_{\text{H}}\text{-END}$) in Monozyten der Zelllinie THP-1

Die Untersuchungen der Bindung von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ an Monozyten der Zelllinie THP-1 waren einerseits Basis der Untersuchungen zur Internalisierung; andererseits sollten die

Bindungsbefunde auch dazu verwendet werden, ggf. den Mechanismus der Internalisierung zu studieren.

4.2.1 Bindung von β_H -END an Monozyten der Zelllinie THP-1

Analog zu den Angaben in 4.1.1 wurden Bindungsversuche mit (125 I) β_H -Endorphin(1-31) durchgeführt.

(125 I) β_H -Endorphin(1-31) wurde mit THP-1 Zellen 10, 30 und 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur war nur Bindung, aber keine Internalisierung des β_H -Endorphins möglich. Abb.9 zeigt das Ergebnis dieser Versuche. Als potentiell kompetitive Verdränger wurden die gleichen Substanzen eingesetzt wie bei den Bindungsversuchen mit β_H -LPH – es handelte sich schließlich um β_H -Endorphin-Fragmente.

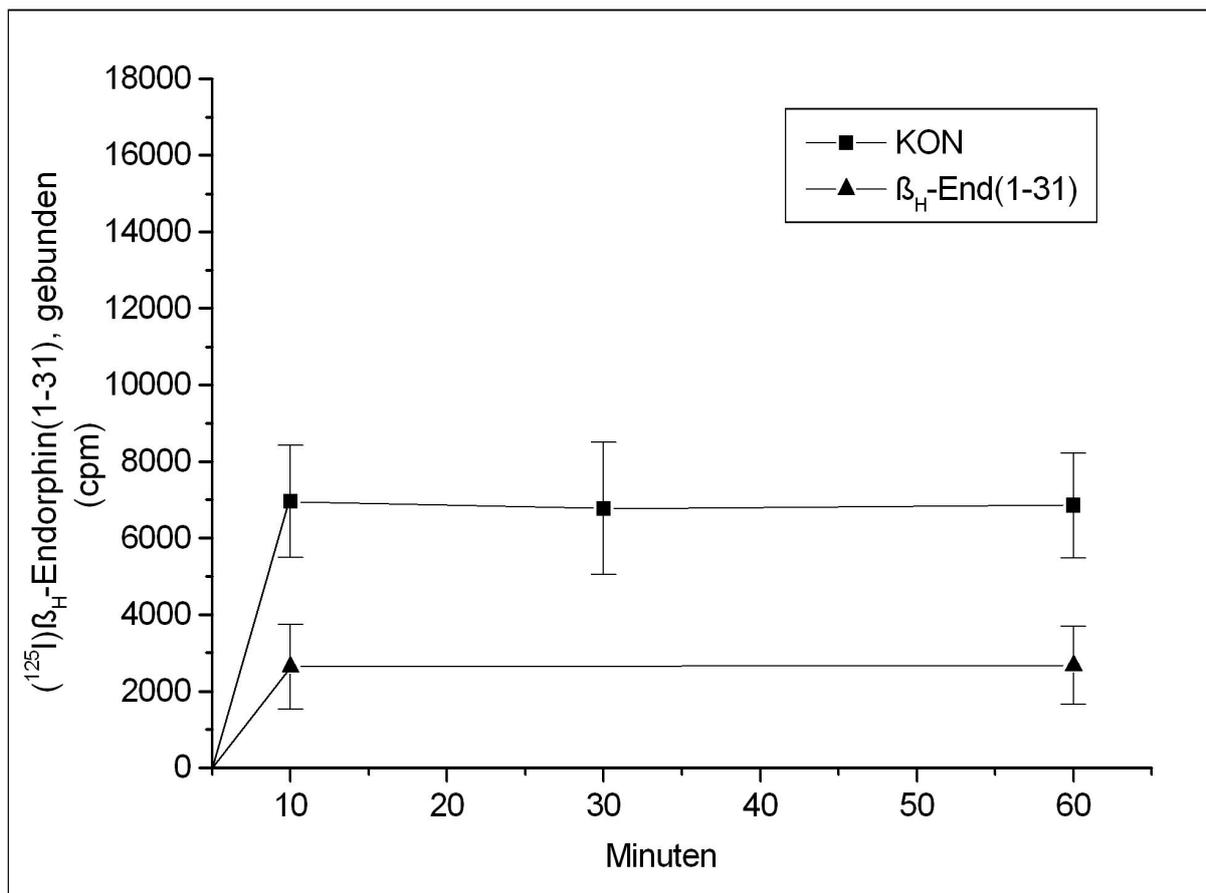


Abb.9: Bindung von (125 I) β_H -Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen bei 4 °C in Abwesenheit (-■-, Kontrolle KON) und in Anwesenheit (-▲-) des Verdrängers β_H -Endorphin(1-31). Die Konzentration des Verdrängers betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Bindungswerte in cpm. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Das markierte β_{H} -Endorphin(1-31) ließ sich durch das unmarkierte zum Teil verdrängen. Die Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) war somit zum größeren Teil spezifisch. Die unspezifische Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) lag jedoch fast genauso hoch wie die unspezifische Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}$ -Lipotropin(1-89) (s. Abb.3). Ähnlich wie für β_{H} -LPH (Abb.4) sollte auch für β_{H} -Endorphin die Strukturspezifität der Bindung untersucht werden. Das Ergebnis ist aus der Abbildung 10 ersichtlich.

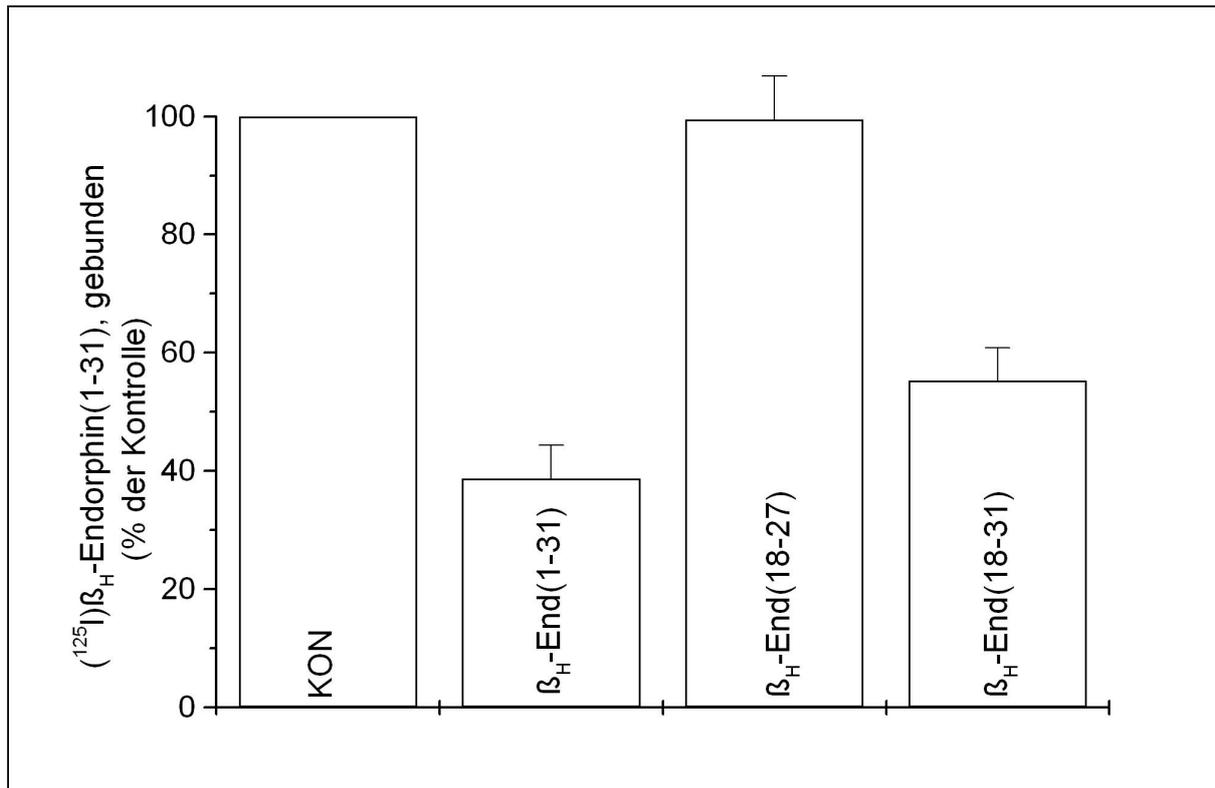


Abb.10: Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrolle KON) oder in Gegenwart von β_{H} -Endorphin(1-31), β_{H} -Endorphin(18-27) bzw. β_{H} -Endorphin(18-31) [die Zahlen in Klammern entsprechen den Aminosäurepositionen des jeweils eingesetzten Fragments] nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 4 °C. Die Konzentration der Verdränger betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Bindungswerte in Prozent der Kontrolle (KON). Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Sowohl β_{H} -Endorphin(1-31) als auch β_{H} -Endorphin(18-31) konnten eine Verdrängung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) erzielen. Die Verdrängung durch das vollständige Peptid lag bei etwa 61 %, durch das Fragment (18-31) etwa bei 45 %. Die Ergebnisse dieses Versuchs waren mit einer C-terminalen Bindungsstelle des β_{H} -Endorphins(1-31) auf den THP-1 Zellen kompatibel.

4.2.2 Internalisierung von β_H -END in Monozyten der Zelllinie THP-1

Wie im Fall von β_H -Lipotropin(1-89) (4.1.2) wurden ebenso Versuche mit β -Endorphin(1-31) bei 37 °C zur Prüfung auf Internalisierung in THP-1 Zellen durchgeführt. Bei diesen Versuchen mit Einsatz von (125 I) β_H -Endorphin(1-31) lag der Kontrollwert KON bei 37 °C (Abb.11) weit über dem Kontrollwert KON bei 4 °C (Abb.9). Darüber hinaus war die β_H -Endorphin(1-31)-Assoziation an THP-1 Zellen durch die eingesetzten Stoffwechsellinhibitoren hemmbar. Diese Erhöhung der Assoziation des β_H -Endorphins(1-31) bei 37 °C über die spezifische Bindung des β_H -Endorphins(1-31) bei 4 °C hinaus ist demnach Stoffwechselprozessen der THP-1 Zellen zuzuordnen und kompatibel mit einer Internalisierung von β_H -Endorphin(1-31) in THP-1 Zellen.

Abbildung 11 stellt den Zeitverlauf der Bindung bzw. Internalisierung des (125 I) β_H -Endorphins(1-31) über 60 min bei 37 °C dar

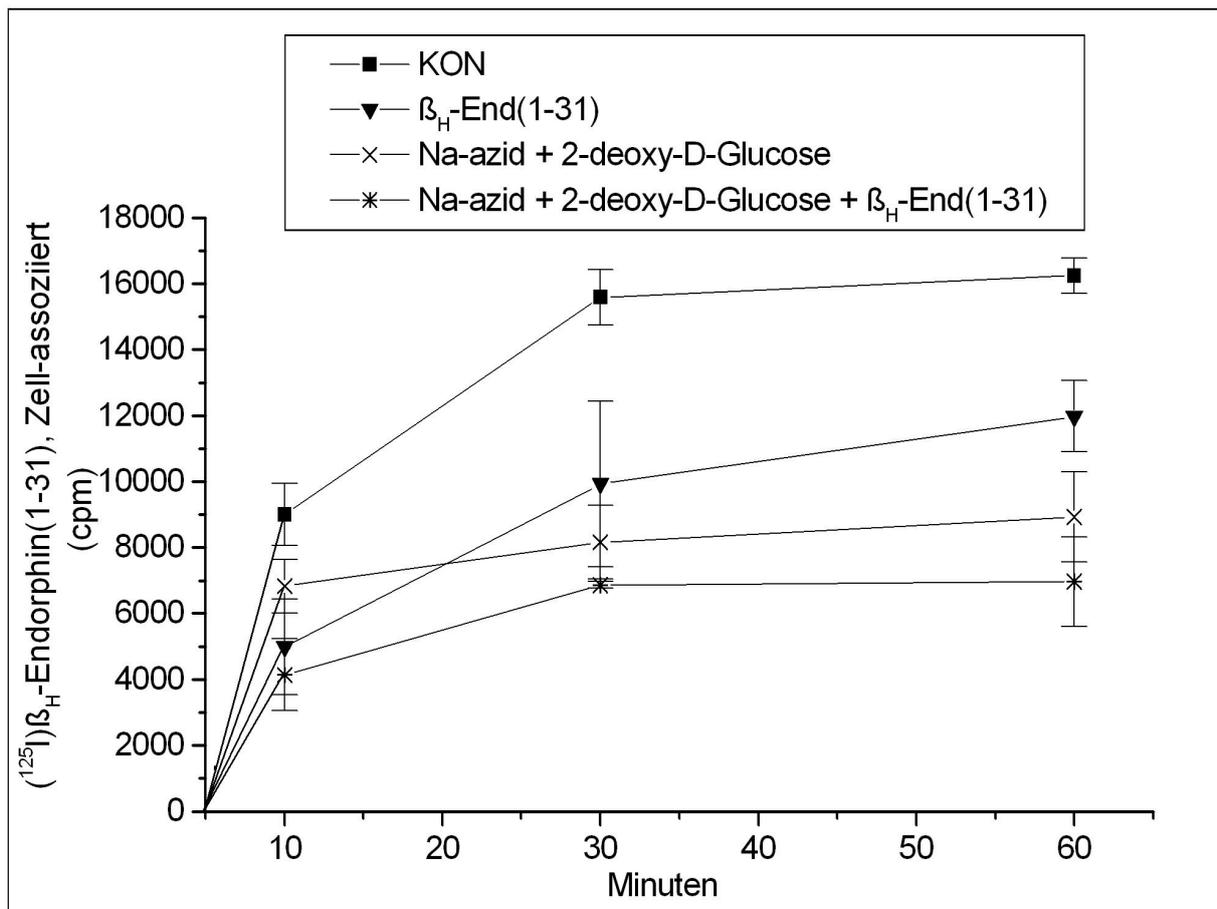


Abb.11: Assoziation (Bindung und Internalisierung) von (125 I) β_H -Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen bei 37 °C in Abwesenheit (KON) und in Anwesenheit des Verdrängers β_H -Endorphin(1-31), in Anwesenheit der Stoffwechsellinhibitoren Na-azid(0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose(30 mM) und in Anwesenheit aller drei Stoffe. Die

Konzentration des Verdrängers betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Zellassoziationswerte in cpm. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment)

Im Gegensatz zu den Versuchen mit $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Lipotropin(1-89)}$ (Abb. 5) stiegen die jeweiligen Werte in diesen Versuchen mit $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin(1-31)}$ erheblich stärker an.

Bezogen auf die spezifische Bindung des $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphins(1-31)}$ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ betrug die offenbar auf Internalisierung zurückzuführende Zellassoziation des $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphins(1-31)}$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ etwa das Doppelte bis Zweieinhalbfache.

Um einen besseren Vergleich zwischen den in Abb. 11 erhaltenen Messwerten zu ermöglichen, sind in der Abbildung 12 die bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Inkubation erhaltenen Daten zum 60 Minuten-Zeitpunkt einander gegenübergestellt.

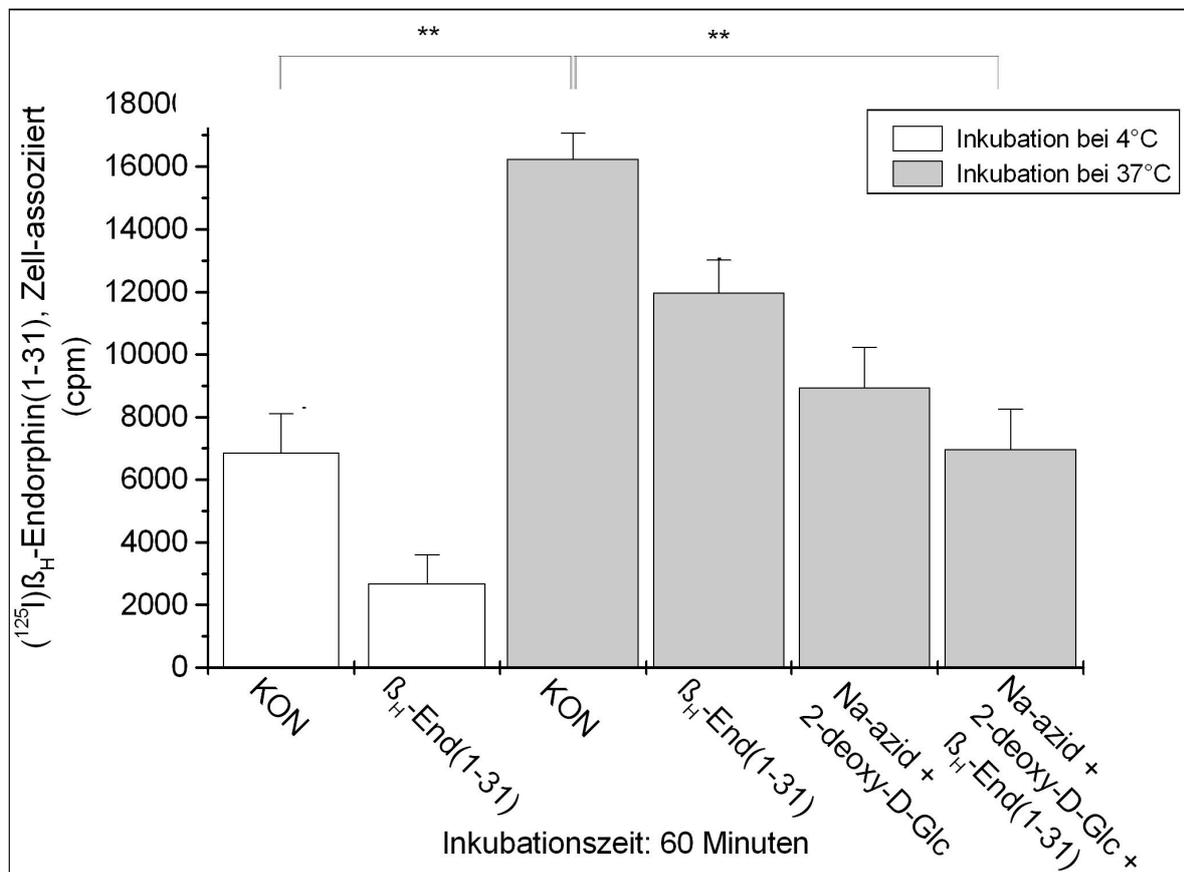


Abb.12: Assoziation (Bindung und evtl. Internalisierung) von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin(1-31)}$ an THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrollen KON) und in Anwesenheit des Verdrängers $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin(1-31)}$, in Anwesenheit der Stoffwechsellinhibitoren Na-azid(0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose(30 mM) und in Anwesenheit aller drei Stoffe nach 60 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Konzentration des Verdrängers betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. **: statistische Signifikanz der Differenzen zwischen den betreffenden Werten mit $p < 0,01$. Angabe der Zellassoziationswerte in cpm. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment)

Ähnlich wie bei der Überprüfung der Internalisierung von β_H -Lipotropin(1-89) in THP-1 Zellen (s. Abb.6) wurden die Messdaten mit dem Mann-Whitney Test auf statistische Signifikanz überprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0,05$ festgelegt. Der Vergleich beider Kontrollwerte KON nach Abzug der unspezifischen Bindung bzw. unspezifischen Assoziation ergab ein $p<0,01$ und damit einen signifikanten Unterschied. Um die Internalisierung von β_H -Endorphin(1-31) weiterführend zu belegen, wurden der Kontrollwert KON bei 37 °C mit dem Inkubat Na-azid und 2-deoxy-D-Glucose + verglichen. Hierfür ergab sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied ($p<0,01$).

Analog zu den Untersuchungen zur Internalisierung von $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Lipotropin(1-89) (4.1.2) wurden Proben mit dem Tracer $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) 60 Minuten inkubiert und anschließend nach der in 3.2.2.2 beschriebenen Methodik behandelt, um eine Internalisierung von $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) in THP-1 Zellen zu prüfen.

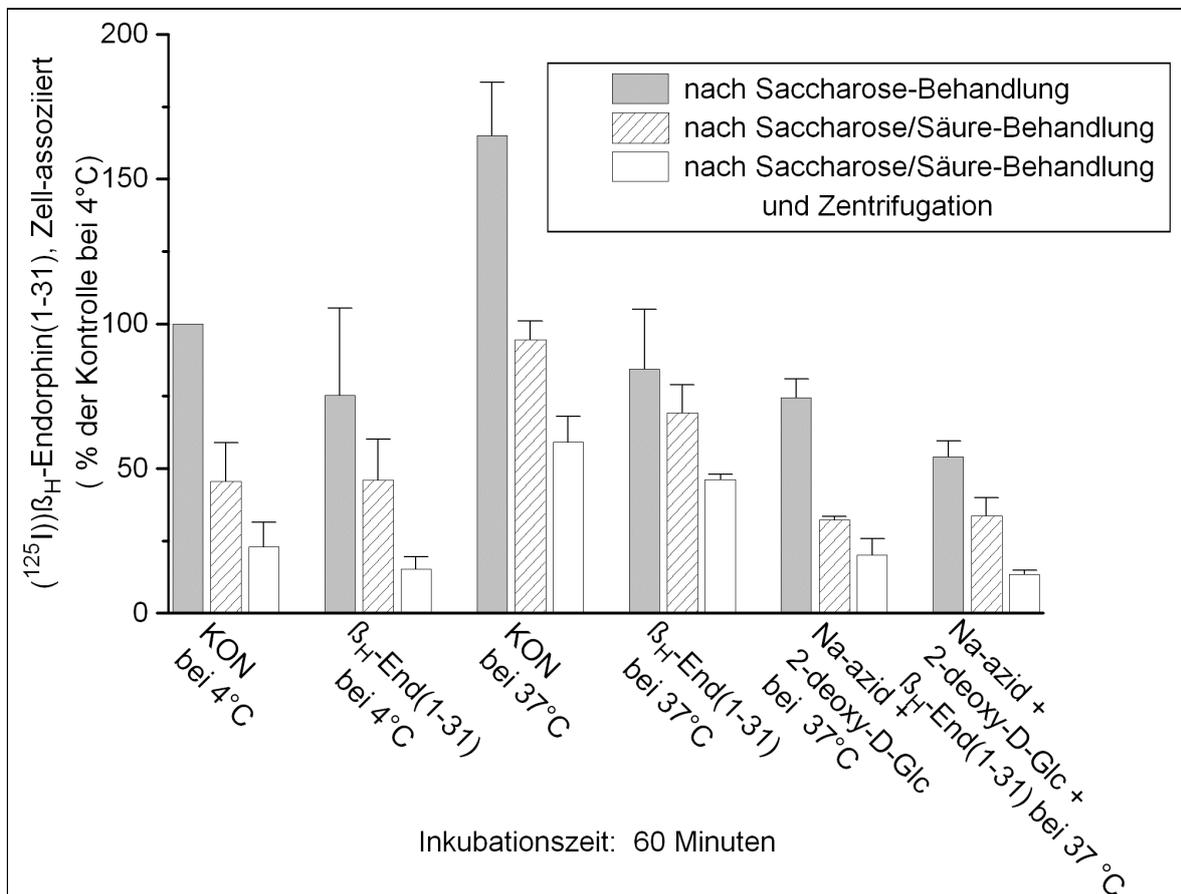


Abb.13: Assoziation (Bindung und Internalisierung) von $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen in Abwesenheit Kontrollen (KON) und in Anwesenheit des Verdrängers β_H -Endorphin(1-31), in Anwesenheit der Stoffwechsellinhibitoren Na-azid(0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose(30 mM) und in Anwesenheit aller drei Stoffe nach 60minütiger Inkubation. Die Konzentration des Verdrängers betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Zellassoziationswerte in Prozent der Kontrolle (KON) bei 4°C nach Saccharose-Behandlung. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Ähnlich wie in der Abbildung 7 ist eine stetige Abnahme der Zell-assoziierten Radioaktivität durch die einzelnen Behandlungsschritte zu sehen. Im Unterschied zu Abb. 7 und im Einklang mit Abb. 12 unterscheidet sich nach Behandlung der Zellen mit Saccharose, Säure und Zentrifugation der Kontrollwert KON bei 37 °C um mehr als das Doppelte vom Kontrollwert bei 4 °C, was durch die Aufnahme von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) in die THP-1 Zellen zu erklären ist.

Dass (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) in die THP-1 Zelle eingeschleust wurde, ergibt sich daraus, dass die Messwerte der mit Na-azid/ 2-deoxy-D-Glucose-inkubierten THP-1 Zellen in der gleichen Größenordnung wie die Messwerte der Kontrolle bei 4 °C lagen (p=0,71).

Mit den Proben, die Na-azid/ 2-deoxy-D-Glucose und zusätzlich β_H-Endorphin(1-31) als Verdränger enthielten, konnte sowohl die Internalisierung als auch die spezifische Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an den THP-1 Zellen blockiert werden.

Nach der Untersuchung und Verifizierung der Internalisierung von β_H-Endorphin(1-31) in THP-1 Zellen wurde abschließend der Frage nach der Strukturspezifität der Assoziation nachgegangen. Das Ergebnis ist in der Abbildung 14 dargestellt.

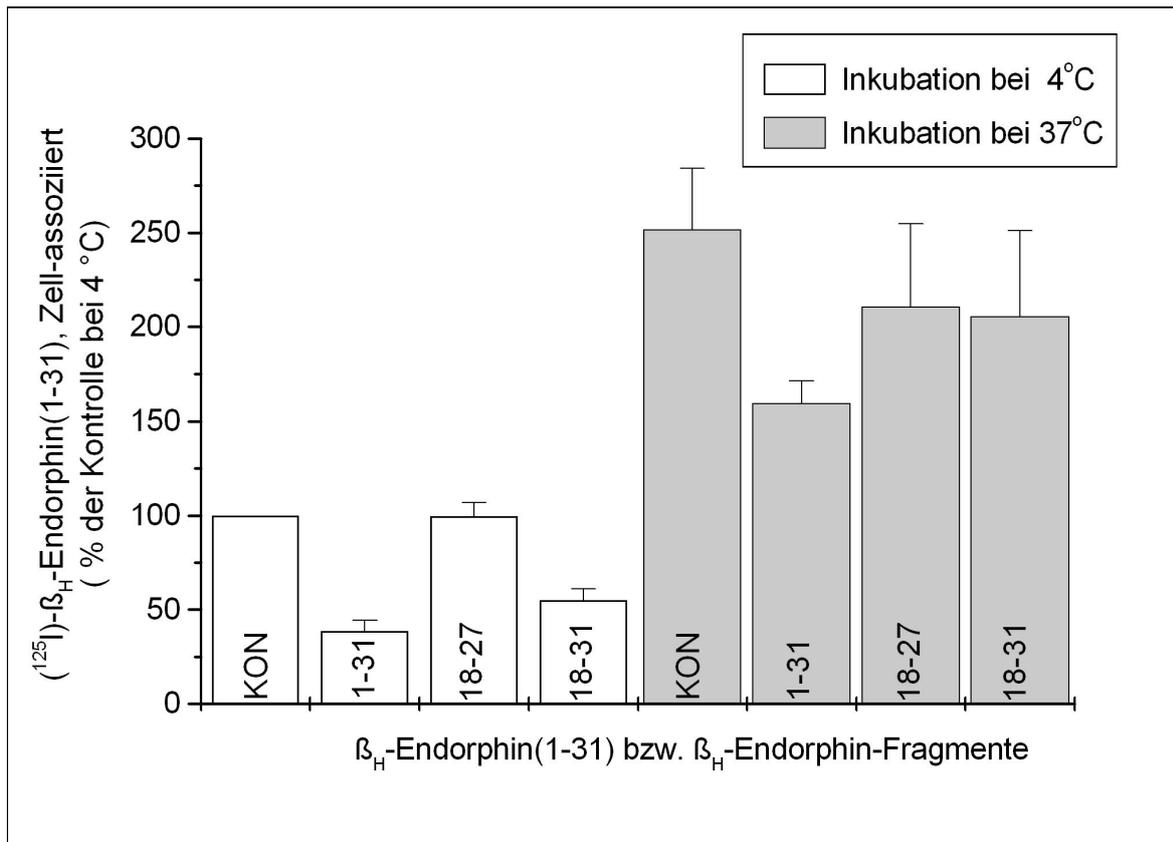


Abb.14: Assoziation (Bindung und Internalisierung) von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ an THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrollen KON) oder in Gegenwart von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$, $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(18-27)$ bzw. $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(18-31)$ bei 4 °C und 37 °C. [die Zahlen in Klammern entsprechen den Aminosäurepositionen des jeweils eingesetzten Fragments von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$] nach 60 Minuten Inkubation. Die Konzentration der Verdränger betrug 9×10^{-6} M im Inkubat. Angabe der Zellassoziationswerte in Prozent der Kontrolle (KON) bei 4 °C. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment)

Ähnlich wie bei der Untersuchung zur Strukturspezifität der Assoziation von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Lipotropin}(1-89)$ (Abb.8) war auch hier keines der $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ -Fragments imstande, eine signifikante Verdrängung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ bei 37 °C zu erzielen (siehe Diskussion).

4.3 Weiterführende Charakteristika der Internalisierung von β -Endorphin ($\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$, $\beta_{\text{H}}\text{-END}$) in Monozyten der Zelllinie THP-1

Anhand der in den vorherigen Abschnitten dargestellten Befunde konnte erstmals gezeigt werden, dass $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ in Monozyten der Zelllinie THP-1 internalisiert wird.

Im Folgenden sollte nun detailliert der Fragestellung nachgegangen werden, über welchen Rezeptor der THP-1 Zellen β_H -Endorphin(1-31) internalisiert wird. Ausgangspunkt der Frage nach dem für den Internalisierungsprozeß relevanten Rezeptor war zunächst der Nachweis des Rezeptors, über den die Bindung erfolgte.

Informationen über die Bindung von β_H -Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen bot die Dissertation von POLOCZEK (2002): POLOCZEK (2002) hatte zeigen können, dass β_H -Endorphin(1-31) über den Chemokin-Rezeptor CCR5 an die THP-1 Zellen bindet.

4.3.1 Bindung von β_H -END an den Chemokin-Rezeptor CCR5

Zum Nachweis des für die Bindung von β_H -Endorphin(1-31) an die THP-1 Zellen relevanten Rezeptors wurden Bindungsversuche (3.2.1.3.1) mit dem gegen den CCR5-Rezeptor gerichteten Antikörper Klon 2D7 (3.2.1.3.3) durchgeführt. Diese Bindungsdaten waren letztendlich Voraussetzung für die weitere Untersuchung des Mechanismus der Internalisierung von β_H -END in THP-1 Zellen.

Abbildung 15 stellt das Ergebnis dieser Bindungsversuche dar:

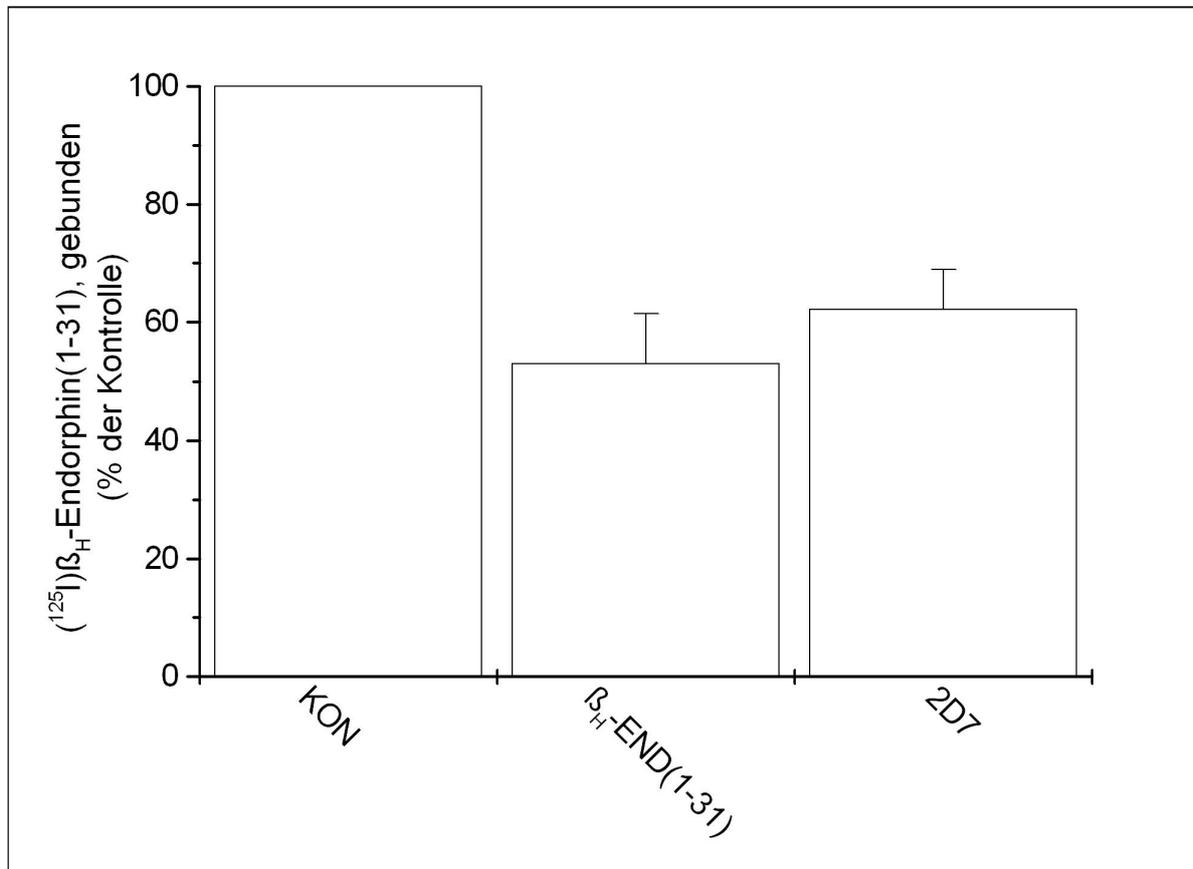


Abb.15: Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen bei 4 °C in Abwesenheit (Kontrolle KON) oder in Gegenwart von β_H-Endorphin(1-31) und Antikörper 2D7. Die Konzentration von β_H-Endorphin(1-31) betrug 9x10⁻⁶ M, von 2D7 45,5 µg/ml im Inkubat. Angabe der Bindungswerte in Prozent der Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Mit dem Zusatz des monoklonalen Antikörpers 2D7 gegen den CCR5-Rezeptor von Monozyten war eine Verringerung der Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen um ca. 38 % zu erreichen, mit β_H-Endorphin(1-31) als kompetitivem Verdränger konnte die Bindung im Mittel um 47 % gesenkt werden. Ein signifikanter Unterschied der Reduktion der Bindung mit β_H-Endorphin(1-31) und dem Antikörper 2D7 zeigte sich nicht (p=0,36).

Dieses Ergebnis war kompatibel mit der Bindung von β_H-Endorphin(1-31) über den Chemokin-Rezeptor CCR5 an die THP-1 Zellen und bestätigte die Befunde von POLOCZEK (2002).

4.3.2 Blockade der Bindungsstellen von β_H -END auf CCR5 durch den Antikörper 2D7

Der Antikörper 2D7 könnte die Bindungsstelle des β -Endorphins auf THP-1 Zellen direkt blockiert haben – dann wären β -Endorphin-Bindungsstelle und CCR5 sehr wahrscheinlich identisch – oder er könnte die Konformation der β -Endorphin-Bindungsstelle geändert und dadurch ihre Affinität zu β -Endorphin verringert haben – dann könnte die β -Endorphin-Bindungsstelle dem CCR5-Rezeptor lediglich direkt benachbart lokalisiert gewesen sein. Um Informationen darüber zu erhalten, ob der Antikörper 2D7 die (^{125}I) β_H -Endorphin(1-31)-Bindung über eine Verringerung der Bindungsstellenkonzentration (d.h. über eine direkte Blockade der Bindungsstellen) oder nur über eine Verringerung der β_H -Endorphin(1-31)-Affinität zu den Bindungsstellen (d.h. eventuell über die Besetzung eines Bindungsstellen-nahen Bereichs) abgesenkt hatte, sollte die Dissoziationskonstante K_D sowie die in der THP-1-Zellsuspension vorhandene Bindungsstellenkonzentration B_{\max} in An- und Abwesenheit des CCR5 Antikörpers 2D7 bestimmt werden (3.2.1.4.2).

Dazu wurden Sättigungsexperimente bei 4 °C durchgeführt, in denen ansteigende Mengen unmarkierten Peptids zum Inkubationsansatz hinzugefügt wurden. Die Menge an markiertem Peptid blieb konstant.

β_H -Endorphin(1-31) wurde in Konzentrationen von 10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-9} M im Inkubationsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurde in der ersten Versuchsreihe β -Endorphin(27-31) (10^{-6} M) hinzugefügt, um die Bindung des β_H -Endorphins(1-31) über seinen C-Terminus zu blockieren, in der zweiten Versuchsreihe β_H -Endorphin(18-27) (10^{-6} M), um die Bindung des β_H -Endorphin(1-31) über sein Mittelfragment zu blockieren.

Die Ergebnisse dieser Experimente wurden mit Hilfe des Programms ORIGIN graphisch als Scatchard-Plot dargestellt und die Bindungsparameter K_D und B_{\max} mit dem Computerprogramm LIGAND berechnet.

Abbildung 16 stellt das Ergebnis mit β_H -Endorphin(27-31) (10^{-6} M) als Inhibitor der Bindungsstelle dar:

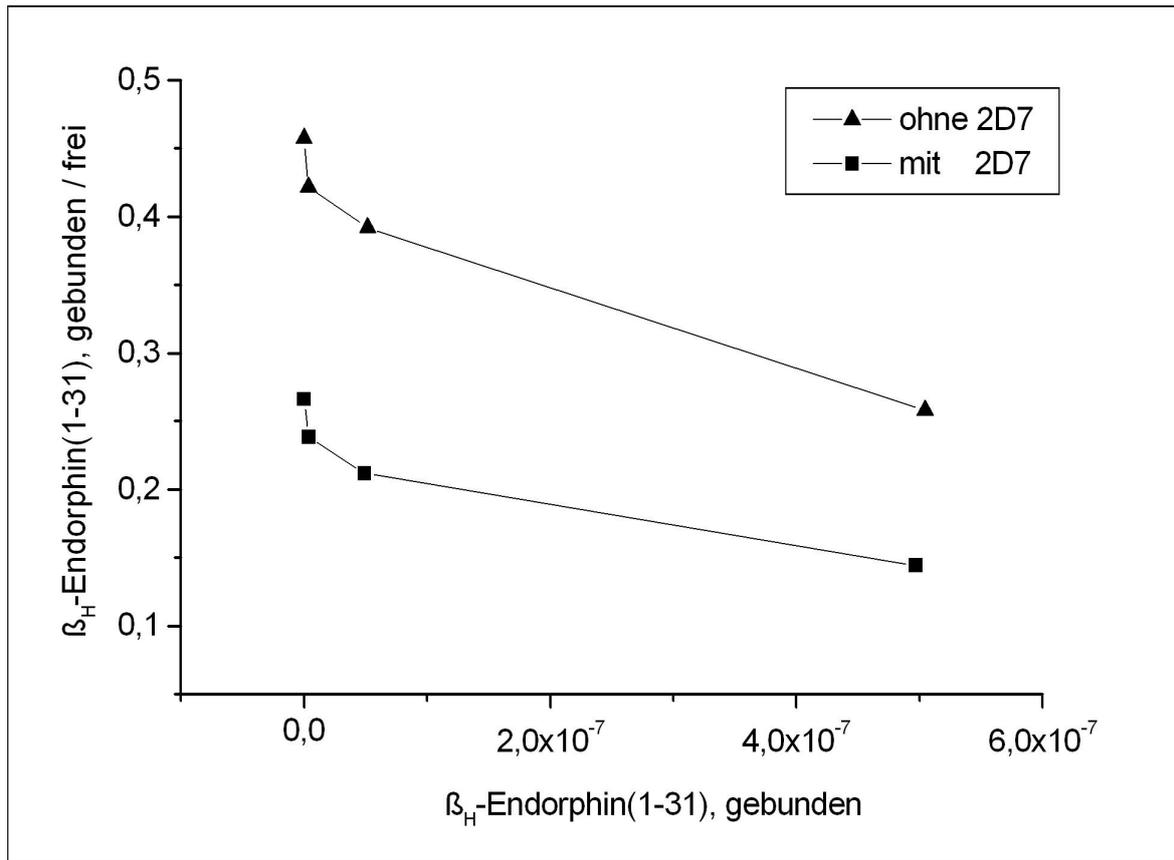


Abb.16: Scatchard-Diagramm zur graphischen Darstellung der Bindungsdaten aus den Mittelwerten zweier Sättigungsexperimente (mit β_H -Endorphin(27-31) 10^{-6} M als Inhibitor zwecks Blockade C-terminaler Bindung des β_H -Endorphins(1-31)) in Anwesenheit [■] und in Abwesenheit [▲] des Antikörpers 2D7 (45,5 $\mu\text{g/ml}$)

Mit dem Programm LIGAND wurde bei Blockade der C-terminalen Bindungsstelle eine K_D von $1,7 \times 10^{-7}$ M und eine Bindungsstellenkonzentration (B_{max}) von $7,1 \times 10^{-8}$ M ohne Zusatz des Antikörpers 2D7 berechnet (Mittelwerte aus zwei Versuchen).

In Gegenwart von 2D7 ergab sich etwa die gleiche Dissoziationskonstante K_D ($1,5 \times 10^{-7}$ M), jedoch eine erheblich geringere B_{max} von $1,9 \times 10^{-8}$ M.

Die Bindungsstellenkonzentration konnte somit durch den Antikörper 2D7 bei Blockade der Bindung über den C-Terminus mittels β_H -Endorphin(27-31) beträchtlich herabgesetzt werden. Dies spricht dafür, dass der Antikörper eine Bindungsstelle für das Mittelfragment von β_H -Endorphin(1-31) direkt blockiert, d.h. unzugänglich gemacht hatte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde β_H -Endorphin(18-27) (10^{-6} M) hinzugegeben, um die Bindung des β_H -Endorphins(1-31) über sein Mittelfragment auszuschalten.

Abbildung 17 gibt den Scatchard-Plot wieder:

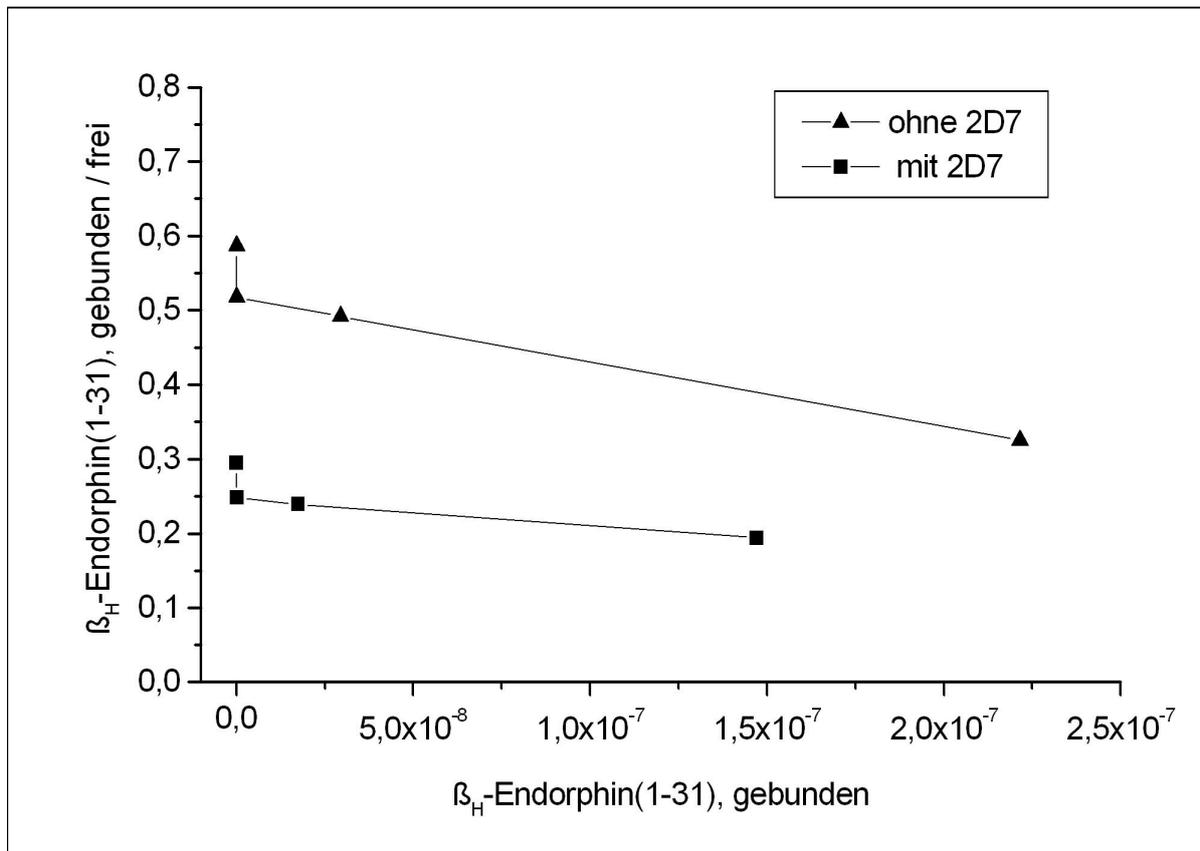


Abb.17: Scatchard-Diagramm zur graphischen Darstellung der Bindungsdaten aus den Mittelwerten zweier Sättigungsexperimente mit β_{H} -Endorphin(18-27) 10^{-6} M als Inhibitor zwecks Blockade der Mittelfragment Bindung des β_{H} -Endorphins(1-31) in Anwesenheit [■] und in Abwesenheit [▲] des Antikörper 2D7 (45,5 $\mu\text{g/ml}$)

Hierbei errechnete sich in Abwesenheit von 2D7 eine K_{D} von $2,9 \times 10^{-7}$ M und eine B_{max} von $1,2 \times 10^{-7}$ M.

In Gegenwart des Antikörpers 2D7 wurde eine wiederum in der gleichen Größenordnung liegende K_{D} von $1,4 \times 10^{-7}$ M, jedoch eine um eine Zehnerpotenz abgesenkte B_{max} von $1,2 \times 10^{-8}$ M bestimmt.

Die Hemmung der β_{H} -Endorphin(1-31)-Bindung durch 2D7 erfolgte sowohl unter Blockade der C-terminalen als auch der Mittelfragment-Bindung über eine Blockade der Bindungsstellen durch 2D7 und nicht durch eine Verringerung der Affinität des β_{H} -Endorphins zu seinen Bindungsstellen. Der Effekt war jedoch bei freigelassener C-terminaler Bindungsstelle (Blockade der Bindung über das Mittelfragment) doppelt so stark (siehe Nachweis der Strukturspezifität der Bindung, Abb. 10) (siehe Diskussion).

4.3.3 Induktion der Expression des Chemokin-Rezeptors CCR5 durch Morphin in Monozyten der Zelllinie THP-1

In Anlehnung an die Publikation von MIYAGI et al. (2000a), in der dargestellt wurde, dass Lymphozyten der Zelllinie CEM x174 nach Inkubation mit Morphinsulfat einen Anstieg der CCR5-Expression zeigten, sollte untersucht werden, ob Morphin auch bei THP-1 Zellen die Expression von CCR5 und damit von Bindungsstellen für β -Endorphin induzieren würde. Dazu wurden Monozyten der Zelllinie THP-1 12 bzw. 24 Stunden mit Nährmedium inkubiert, welches eine Konzentration von 10^{-9} molarem Morphinsulfat enthielt (siehe 3.2.1.3.3).

Mit den mit Morphin (10^{-9} molar) inkubierten THP-1 Zellen wurden anschließend Bindungsversuche, wie in 3.2.1.3.1 beschrieben, durchgeführt.

Die Abbildung 18 zeigt die Bindung von (125 I) β _H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen, die zuvor 12 Stunden mit Morphinsulfat (10^{-9} molar) inkubiert worden waren im Vergleich zur Bindung an nicht vorbehandelte Zellen (KON) in zwei getrennten Experimenten.

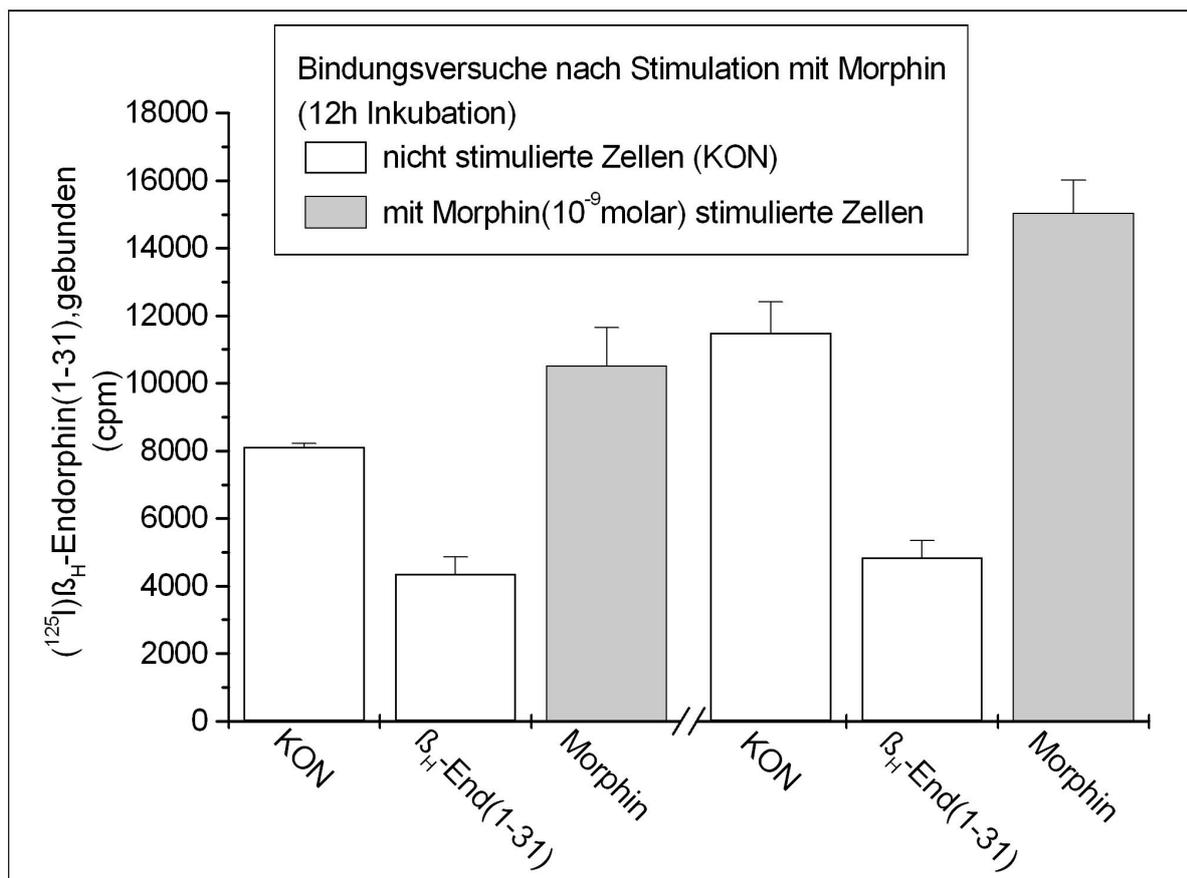


Abb.18: Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an nicht stimulierte THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrollen KON) oder in Gegenwart von β_H-Endorphin(1-31) (9x10⁻⁶ M), sowie an THP-1 Zellen in Abwesenheit von β-Endorphin(1-31) nach Stimulation mit Morphinsulfat (10⁻⁹ molar) über 12 Stunden. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier getrennter Versuche (Jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen(SD) aus sechs Werten).

In beiden Versuchen konnte tatsächlich ein Anstieg der Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) beobachtet werden. In beiden Versuchen war ein Anstieg des Kontrollwertes um etwa 30 % zu verzeichnen.

Die mit der Methode (3.2.1.3.1) erhobenen Daten waren mit den Ergebnissen von MIYAGI et al. (2000a), die eine Morphin-induzierte Expression des CCR5-Rezeptors bei humanen CEM x174 Lymphozyten gentechnologisch und durchflußzytometrisch nachweisen konnten, kompatibel.

Neben dem erstmaligem Nachweis, dass die Expression des CCR5-Rezeptors in THP-1 Zellen durch Morphin induziert werden kann, lieferte dieses Ergebnis weitere Evidenz dafür, dass β_H-Endorphin(1-31) via CCR5-Rezeptor an THP-1 Zellen bindet.

Die Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) nach 24stündiger Inkubation mit Morphinsulfat (10⁻⁹ molar) in vier verschiedenen Experimenten wird in der Abbildung 19 gezeigt.

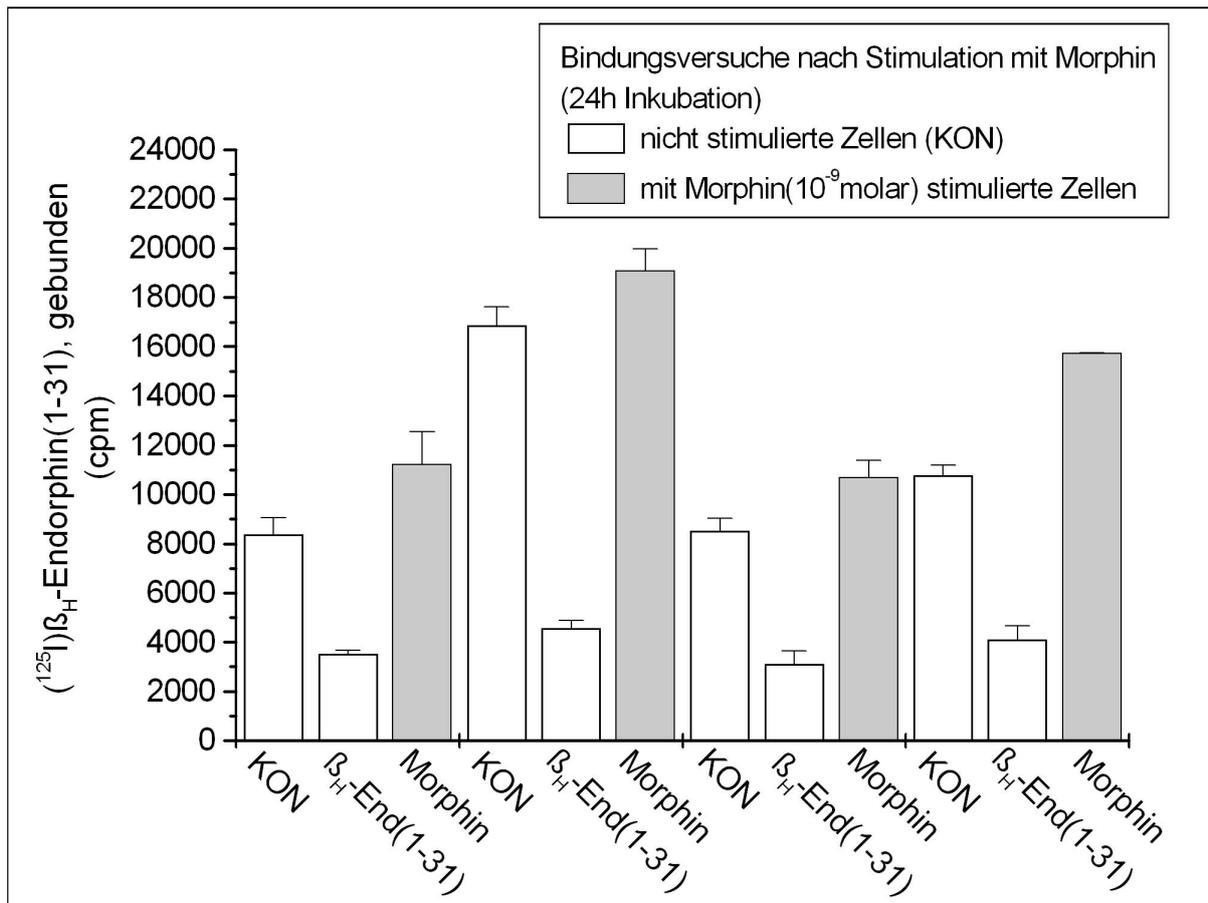


Abb.19: Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an nicht stimulierte THP-1 Zellen in Abwesenheit (Kontrollen KON) oder in Gegenwart von β_H-Endorphin(1-31) (9x10⁻⁶ M), sowie an THP-1 Zellen in Abwesenheit von β_H-Endorphin(1-31) nach Stimulation mit Morphinsulfat (10⁻⁹ molar) über 24 Stunden. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier getrennten Versuchen (Jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen(SD) aus sechs Werten).

In allen vier Versuchen war ein Anstieg der Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen nach einer 24stündigen Inkubation der Zellen mit Morphinsulfat messbar.

Im ersten Versuch war ein Anstieg auf 134 %, im zweiten auf 113 %, im Weiteren auf 125 % und im letzten Versuch auf 146 % zu verzeichnen. Das arithmetische Mittel ergab einen Bindungsanstieg auf 130 %. Dieses Ergebnis bestätigt somit das Ergebnis des Versuchs mit 12stündiger Inkubation.

4.3.4 Ausschluss der Interaktion von β_H-END mit Vitronektin

U.LINDNER (2004) hatte nachweisen können, dass eine Bindung von β_H-Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen nicht nur über den Chemokinrezeptor CCR5, sondern auch über Vitronektin

erfolgte, und zwar über ein Fragment des β_{H} -Lipotropins(1-89), welches mit β_{H} -Endorphin(1-31) identisch war.

Um deshalb zu überprüfen, ob weitere Bindungsstellen in Bezug auf den Internalisierungsprozeß von β_{H} -Endorphin(1-31) in die THP-1 Zellen von Bedeutung sein könnten, wurden Bindungsversuche (3.2.1.3.1) auch mit dem Antikörper 23C6 gegen den Vitronektin-Rezeptor $\alpha_{\text{v}}\beta_3$ und mit dem gegen Vitronektin gerichtete Antiserum aS 66/67 durchgeführt.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse dieser Bindungsversuche.

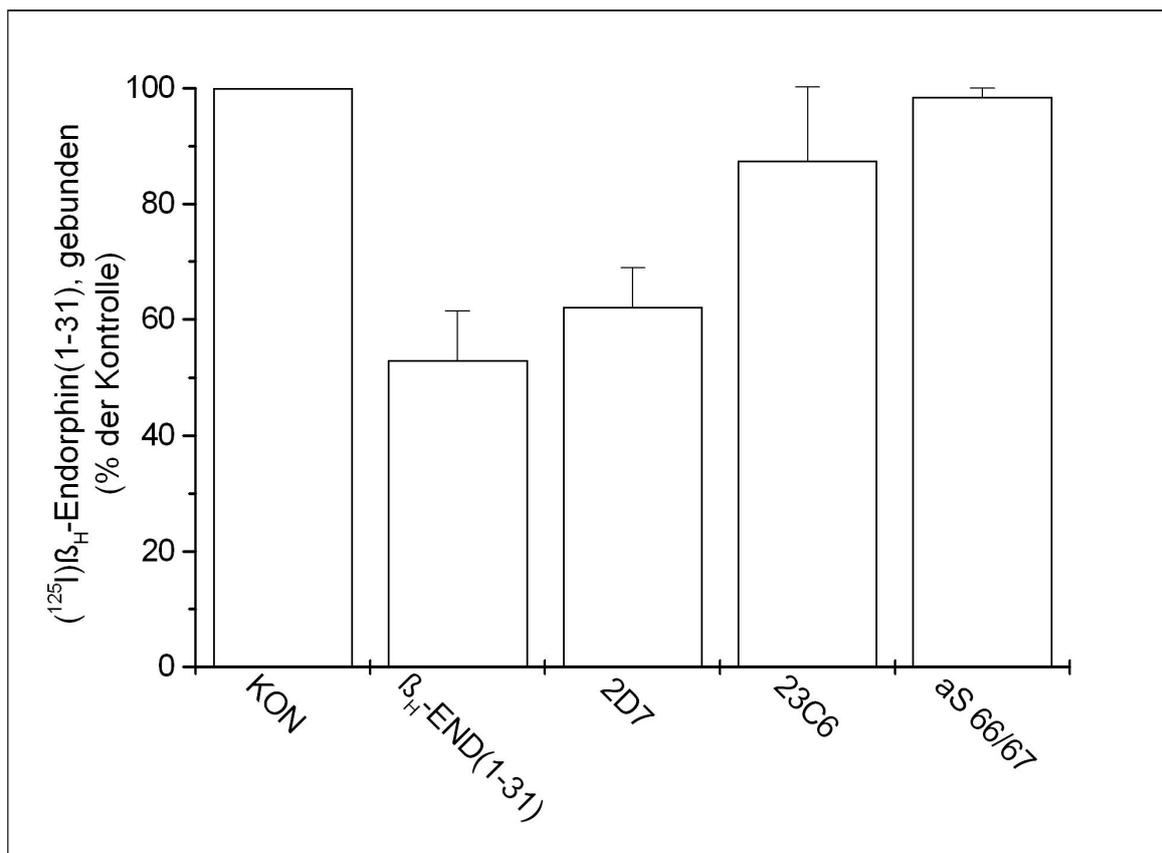


Abb.20: Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen bei 4 °C in Abwesenheit (Kontrolle KON) oder in Gegenwart von β_H-Endorphin(1-31), Antikörper 2D7, Antikörper 23C6 und Antiserum aS 66/67. Die Konzentration von β_H-Endorphin(1-31) betrug 9×10^{-6} M, von 2D7 45,5 µg/ml, von 23C6 36×10^{-5} µg/ml und von aS 66/67 1,25 mg/ml im Inkubat. Angabe der Bindungswerte in Prozent der Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Weder durch den Antikörper 23C6 gegen den Vitronektin Rezeptor $\alpha_{\text{v}}\beta_3$ noch durch das gegen Vitronektin gerichtete Antiserum aS66/67 war eine signifikante Hemmung der(¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31)-Bindung möglich. Ein Hinweis auf die Beteiligung von Vitronektin an der

Bindung von (¹²⁵I)β_H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen ergab sich aus diesen Versuchen nicht.

Im Hinblick auf die nachgewiesene Internalisierung des β-Endorphins in THP-1 Zellen (4.2.2) stellte sich die Frage, inwieweit der CCR5-Rezeptor auch bei der Internalisierung des β-Endorphins eine Rolle spielt.

4.3.5 Internalisierung von β_H-END in Monozyten der Zelllinie THP-1 über den Chemokinrezeptor CCR5

Um zu prüfen, inwieweit der Chemokinrezeptor CCR5 eine Rolle für den Internalisierungsprozeß von β_H-Endorphin(1-31) bei THP-1 Zellen spielte, wurden Experimente bei 37 °C sowie parallel dazu bei 4 °C mit dem monoklonalen Antikörper 2D7 durchgeführt. Auch der Antikörper gegen den Vitronektinrezeptor 23C6 und das Antiserum gegen Vitronektin αS 66/67 wurden nochmals in diese Versuche einbezogen. Zum Vergleich mit den bereits gezeigten Internalisierungsergebnissen wurden zusätzlich Proben, die als Verdränger β_H-Endorphin(1-31) enthielten, sowie Proben mit den Stoffwechsellinhibitoren Na-azid und 2-deoxy-D-Glucose angesetzt.

Die Inkubationszeiten betragen 60 min, die Präinkubationszeit 30 min.

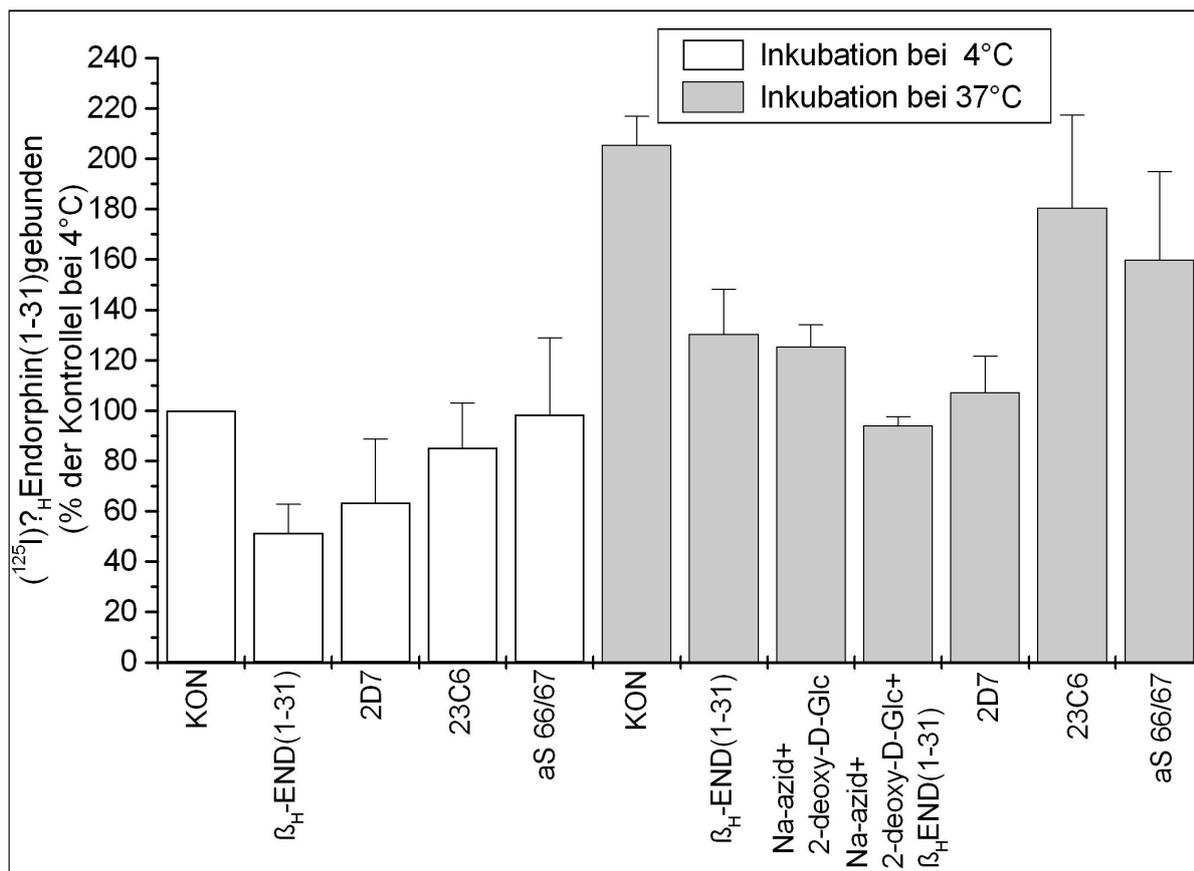


Abb.21: Bindung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ an THP-1 Zellen bei 4 °C bzw. Internalisierung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ in THP-1 Zellen bei 37 °C in Abwesenheit (Kontrollen KON) oder in Gegenwart von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$, Antikörper 2D7, Antikörper 23C6, Antiserum aS 66/67, in Anwesenheit der Stoffwechsellinhibitoren Na-azid(0,01 %) und 2-deoxy-D-Glucose(30 mM) und in Anwesenheit der drei Stoffe Na-azid, 2-deoxy-D-Glc, $\beta\text{-Endorphin}(1-31)$. Die Konzentration von $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ betrug 9×10^{-6} M, von 2D7 45,5 $\mu\text{g/ml}$, von 23C6 36×10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ und von aS 66/67 1,25 mg/ml im Inkubat. Angabe der Bindungswerte in Prozent der Kontrolle KON bei 4 °C. Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten (Dreifachwerte pro Experiment).

Der Vergleich der spezifischen Bindung bei 4°C (Differenz Kontrollwert KON – Verdrängungswert $\beta_{\text{H}}\text{-END}(1-31)$) in Höhe von 49 % mit der spezifischen Bindung und Internalisierung bei 37 °C (Differenz Kontrollwert KON – Na-azid+2-deoxy-D-Glc+ $\beta_{\text{H}}\text{-END}(1-31)$) in Höhe von 112 % zeigt die Internalisierung von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ bei 37 °C mit einer Signifikanz von $p < 0,001$.

Bei 4 °C war die Reduktion der Bindung durch den Antikörper 2D7 nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,32$) zu der Verdrängung durch $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ (siehe auch Abb.20). Durch Zusatz des Antikörpers 2D7 zu den Inkubaten bei 37 °C wurde eine Reduktion der Assoziation von $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ an die THP-1 Zellen in der gleichen Größenordnung erreicht, wie sie bei Zusatz von Naazid+2-deoxy-D-Glc+ $\beta_{\text{H}}\text{-END}(1-31)$ zu

beobachten war, was der Blockade der spezifischen β_H -Endorphin(1-31)-Bindung und Internalisierung entspricht.. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,056$) zwischen dem Antikörper 2D7-Wert und dem Na-azid+2-deoxy-D-Glc+ β_H -END(1-31)-Wert. Damit konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Internalisierung über den CCR5-Rezeptor erfolgte. Sowohl der Antikörper 23C6 als auch das Antiserum aS 66/67 hemmten den Internalisierungsprozeß nicht: Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den betreffenden Werten und den jeweiligen Kontrollwerten. Vitronektin spielte demnach bei dem beobachteten Internalisierungsprozeß keine Rolle, wie schon aufgrund der Bindungsdaten (Abb.20) zu erwarten war.

4.4 Untersuchungen zur chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung von β_H -Endorphin auf Monozyten und Keratinozyten

Nachfolgend sind die Ergebnisse von Untersuchungen dargestellt, in denen die chemotaktische Wirkung von β_H -Endorphin auf Zellen des Immunsystems und der Haut untersucht werden sollte. Die Ausführung der Versuche ist unter 3.2.3.2 beschrieben. In der Literatur (siehe 1.2.3.4) wird von VAN EPPS and SALAND (1984), RUFF et al. (1985) sowie SACERDOTE and PANERAI (1989) ein chemotaktischer Stimulus von β_H -Endorphin auf Monozyten, eine Stimulation von Keratinozyten von BIGLIARDI et al. (2002) beschrieben.

4.4.1 Untersuchungen zur chemotaktischen Wirkung von β_H -Endorphin auf native Monozyten und auf Monozyten der Zelllinie THP-1

Als Zellmaterial wurden THP-1 Zellen verwendet. Im Rahmen der chemotaktischen Versuchsanordnung wurden die untersuchten Zellen auf den Filter eines Filtereinsatzes gebracht, durch dessen Poren sie in das darunter befindliche Medium wandern konnten, das einen definitiven Stimulator (Positivkontrolle) oder die Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt.

Abbildung 22 zeigt die mikroskopische Aufnahme von THP-1 Zellen, die sich oberhalb des Filters befanden. Unterhalb des Filters befand sich Nährmedium, welches 10^{-9} molares β -Endorphin enthielt. Die schwarzen Ringe stellen Porenöffnungen des Filters dar.

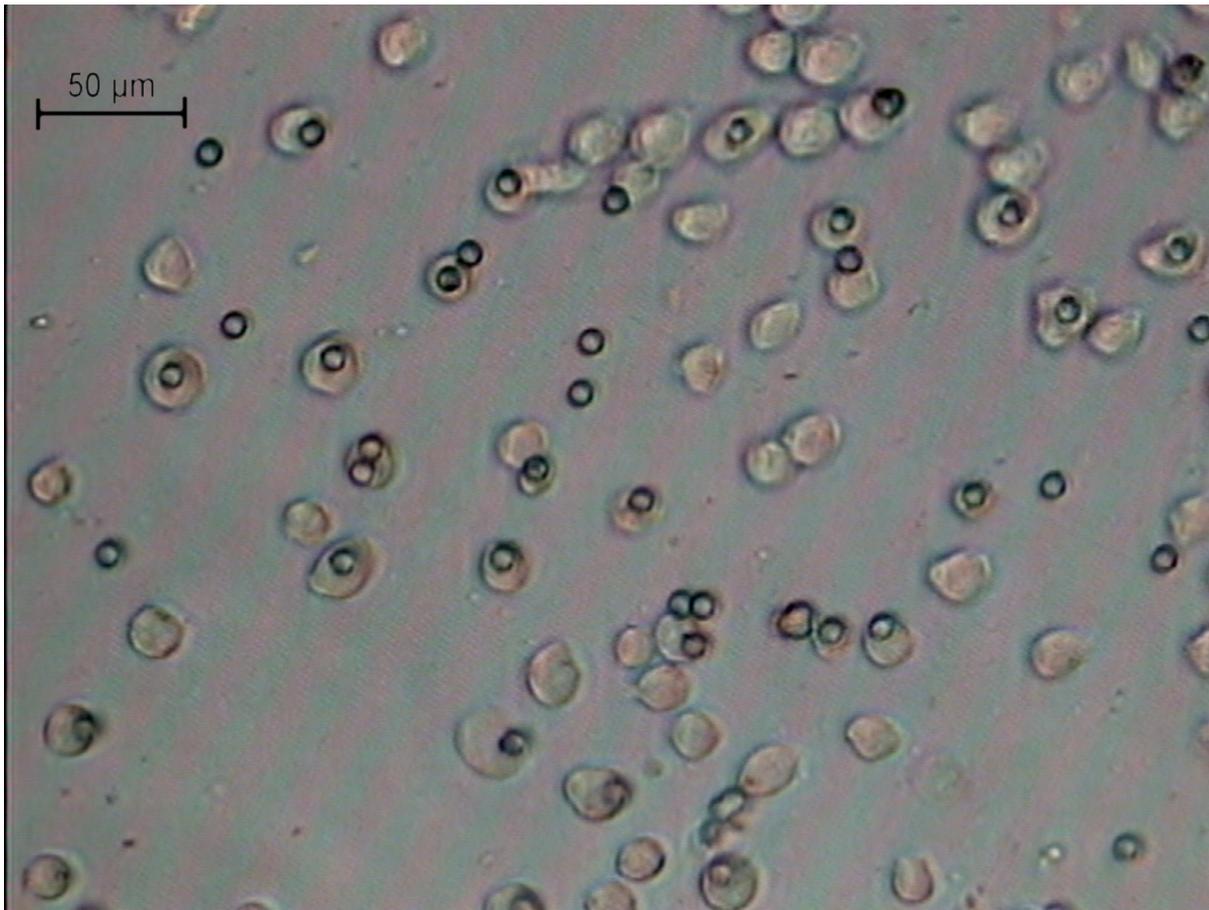


Abb.22: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit THP-1 Zellen bei 320facher Vergrößerung nach 90minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters RPMI-1640-Medium mit BSA (0,1%), unterhalb des Filters RPMI-1640 Medium mit BSA (0,1%) und β -Endorphin (10^{-9} molar))

Die THP-1 Zellen waren jedoch nicht chemotaktisch beeinflussbar - weder nach Gabe von fMLF (die übliche Chemotaxis-Positivkontrolle in einer Standard-Konzentration von 10^{-8} molar) noch durch unterschiedliche Konzentrationen (10^{-12} bis 10^{-8} molar) von β -Endorphin(1-31). Da die Zellen offenbar nicht chemotaktisch stimulierbar waren, wurden diese Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (10^{-8} molar) ausdifferenziert (SCHWENDE et al., 1996). Phorbol-12-Myristat-13-Acetat aktiviert die Proteinkinase C, was letztendlich zum Ausdifferenzieren der THP-1 Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen führt (3.2.3.2).

Die so ausdifferenzierten THP-1 Zellen wurden anschließend im Chemotaxis-Versuch eingesetzt.

Als chemotaktisch wirkende Positivkontrolle diente hierbei wiederum fMLF(10^{-8} molar); β -Endorphin wurde in Konzentrationen 10^{-12} bis 10^{-8} molar eingesetzt.

Abbildung 23 stellt einen Ausschnitt der mit PMA behandelten Zellen bei 320facher Vergrößerung dar.

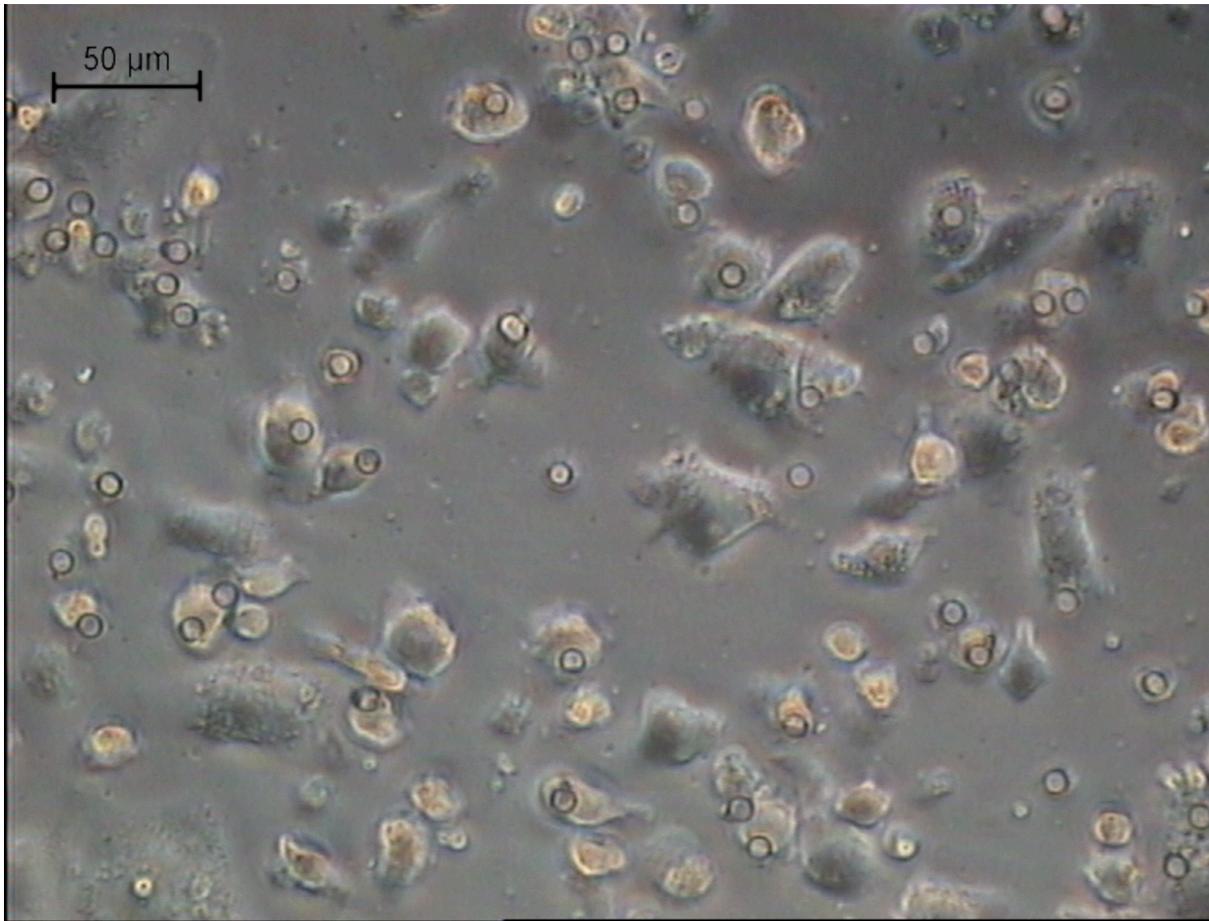


Abb.23: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit durch PMA(10^{-8} molar) ausdifferenzierten THP-1 Zellen bei 320facher Vergrößerung nach 90minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters RPMI-1640-Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters RPMI-1640 Medium mit BSA (0,1%) und β_H -Endorphin (10^{-9} molar))

Deutlich erkennbar ist der Unterschied in der Morphologie zwischen den ausdifferenzierten (Abb. 23) und nicht ausdifferenzierten THP-1 Zellen (Abb. 22). Die THP-1 Zellen in der Abb. 23 ähneln aufgrund ihrer spindelartigen Form und der Ausbildung von Pseudopodien Makrophagen sehr.

Die mit PMA behandelten Zellen reagierten jedoch ebenso wenig auf chemotaktische Reize (fMLF, β_H -Endorphin(1-31)) wie unbehandelte THP-1 Zellen (siehe Diskussion).

Da sich chemotaktische Effekte bei den THP-1 Zellen nicht auslösen ließen, wurden native Monozyten, die aus antikoaguliertem Blut gewonnen wurden, eingesetzt (3.2.3.1.2).

In diesen Versuchen konnte in der Tat ein chemotaktischer Effekt von fMLF gezeigt werden. β_H -Endorphin löste jedoch keinen statistisch signifikanten ($p > 0,05$) chemotaktischen Effekt gegenüber der Negativkontrolle (Medium) aus.

Die folgenden Aufnahmen (Abbildungen 24-26) stellen Beispiele aus dieser Versuchsreihe dar. Es handelt sich um Ausschnitte der Unterseite des Filters bei 320facher Vergrößerung nach 90 minütiger Inkubationszeit und damit Ausschnitte der durch den Filter gewanderten und im well befindlichen Zellen.

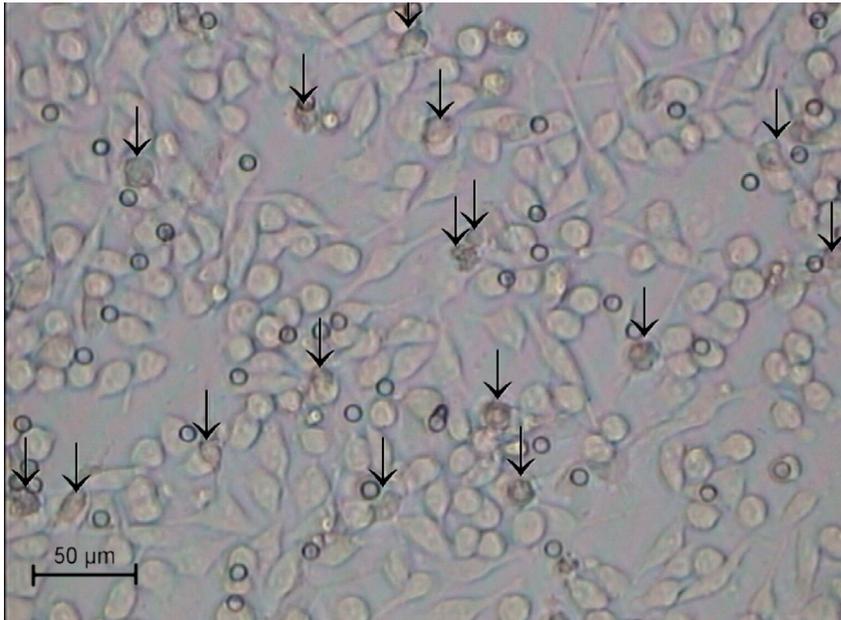


Abb.24: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit nativen Monozyten bei 320facher Vergrößerung nach 90minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters RPMI-1640-Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters RPMI-1640 Medium mit BSA (0,1%) (Negativkontrolle)). Die Pfeile markieren durch den Filter migrierte Zellen

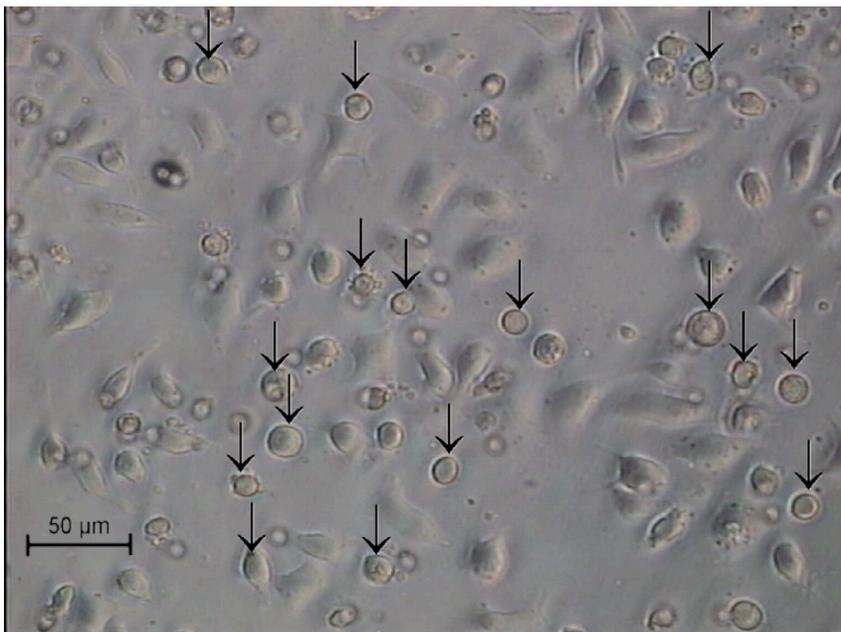


Abb.25: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit nativen Monozyten bei 320facher Vergrößerung nach 90minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters RPMI-1640-Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters RPMI-1640 Medium mit BSA (0,1%) und β_H -Endorphin (10^{-9} molar) als Chemotaxin). Die Pfeile markieren durch den Filter migrierte Zellen

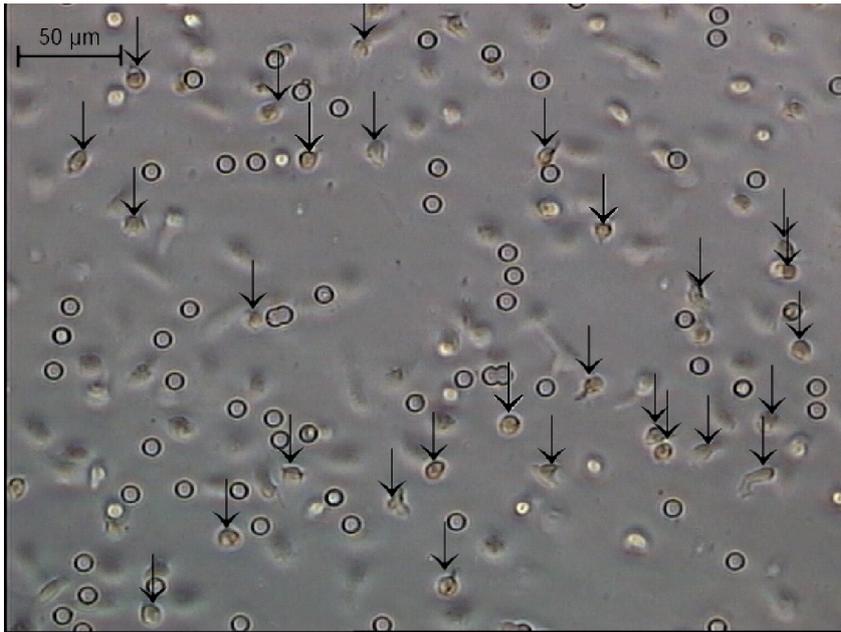


Abb.26: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit nativen Monozyten bei 320facher Vergrößerung nach 90minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters in RPMI-1640-Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters RPMI-1640 Medium mit BSA (0,1%) und fMLF (10^{-8} molar) (Positivkontrolle)). Die Pfeile markieren durch den Filter migrierte Zellen

Wie aus den Abbildungen 24, 25 und 26 ersichtlich, wanderten mit fMLF (10^{-8} M) als Chemotaxin 28 Zellen durch die Filterporen hindurch, mit β_H -Endorphin(1-31) (10^{-9} M) 16 Zellen, ebenso viele Zellen wie bei der Negativkontrolle (Medium ohne Zusatz).

Dieses Ergebnis ist mit dem Sammelergebnis der gesamten Versuchsreihe kompatibel, in der keine Chemotaxis von β -Endorphin an nativen Monozyten nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse sind in der Abb. 27 zusammengefaßt.

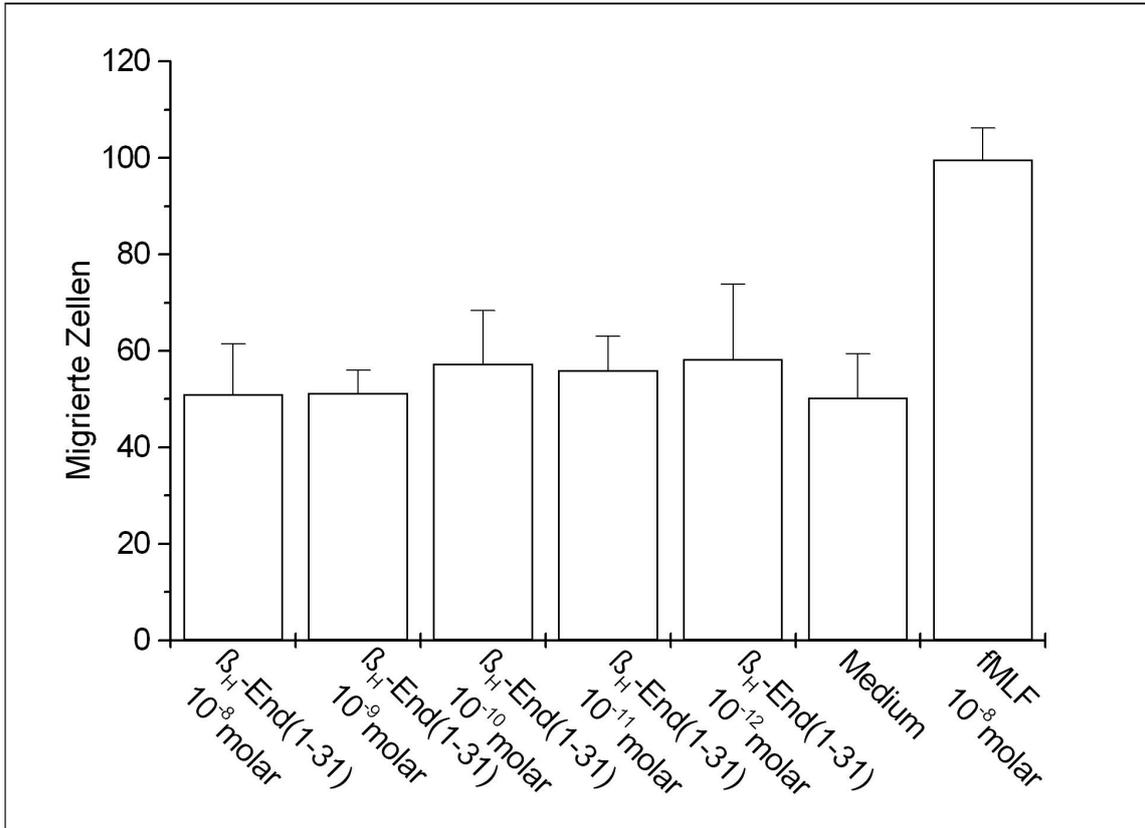


Abb.27: Durch den Filter gewanderte native Monozyten bei Einsatz von β_H -Endorphin (10^{-12} - 10^{-8} molar) als potentielles Chemotaxin, Medium als Negativkontrolle, fMLF (10^{-8} molar) als Positivkontrolle. Zählung der durch den Filter gewanderten Zellen im well innerhalb von 10 Feldern eines Rasters bei 320facher Vergrößerung. Mittelwerte und Standardabweichungen(SD) aus drei Versuchen (Dreifachwerte pro Experiment).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die der einschlägigen Literatur zu entnehmenden Befunde zu chemotaktischen Eigenschaften von β -Endorphin nicht stimmen oder – sehr viel wahrscheinlicher – korrekt erhoben, aber zu allgemein interpretiert worden sind. Bei genauerer Durchsicht der betreffenden Arbeiten ist zumindest einer davon zu entnehmen, dass es sich bei den eingesetzten Monozyten um eine Subpopulation handelt, die für die erhobenen Befunde verantwortlich ist (siehe Diskussion).

4.4.2 Untersuchungen zur chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung von β_H -Endorphin auf Zellen der Haut G-361, HaCat und A431: Änderung der Zellmorphologie und Chemokinese

Untersuchungen zur Chemotaxis:

BIGLIARDI et al. (2002) wiesen eine durch β_H -Endorphin stimulierbare Migration nativer Keratinozyten, die Naltrexon-reversibel war, nach. Vor diesem Hintergrund wurden Migrationsversuche durchgeführt, um eine chemotaktische Eigenschaft des β_H -Endorphins am Modell der Hautzelllinien G361, HaCat und A431 zu untersuchen.

Bei den erwähnten Zelllinien zeigte sich jedoch keine gerichtete Migration, weder mit β_H -Endorphin(1-31) noch mit dem bekannten Chemotaxin fMLF.

Die Abbildungen 28-30 zeigen Aufnahmen der einzelnen Zelllinien bei 320facher Vergrößerung.

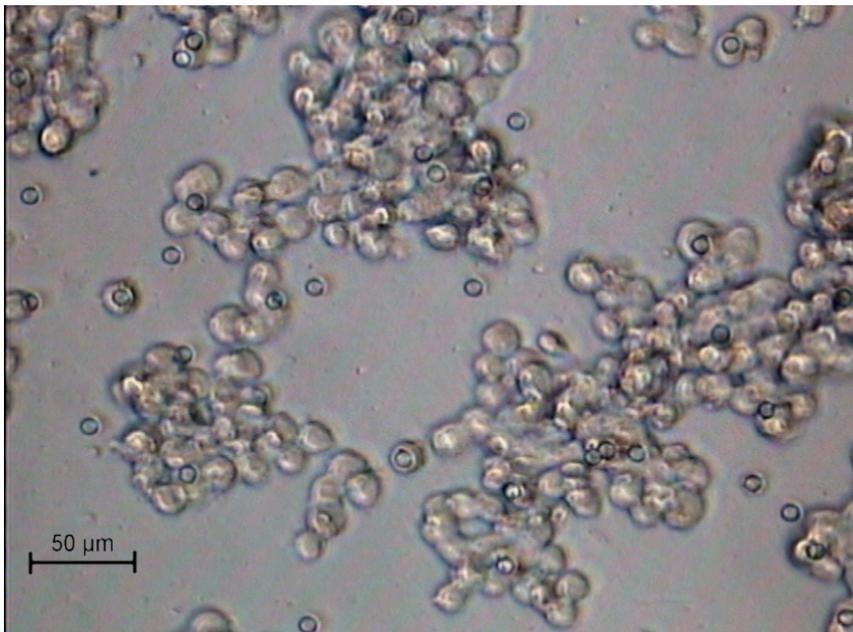


Abb.28: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit G-361 Zellen bei 320facher Vergrößerung nach 180minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters McCoy's 5A Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters McCoy's 5A Medium mit BSA(0,1%) und β_H -Endorphin (10^{-9} molar) als Chemotaxin

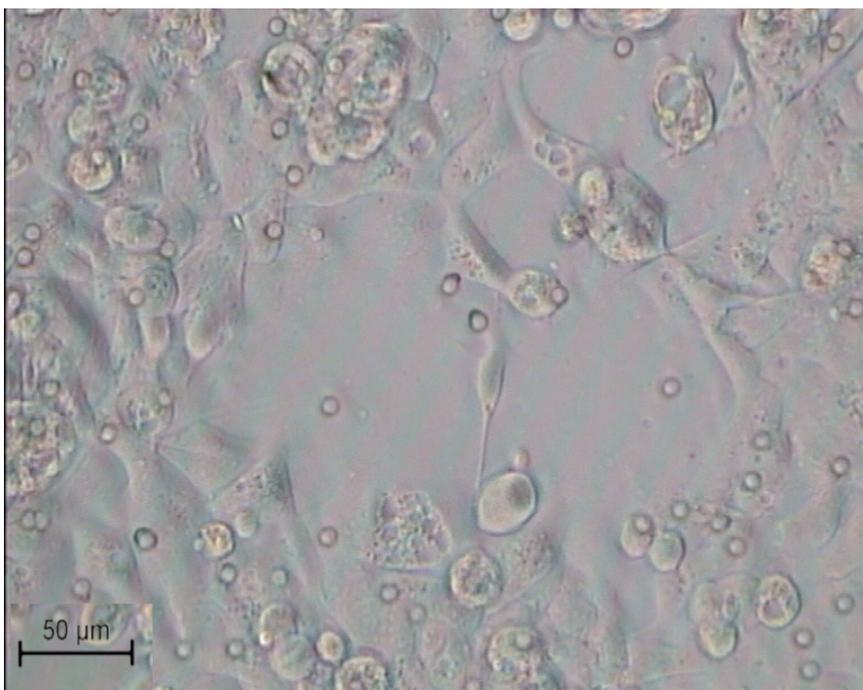


Abb.29: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit HaCaT Zellen bei 320facher Vergrößerung nach 180minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%) und β_H -Endorphin (10^{-9} molar) als Chemotaxin

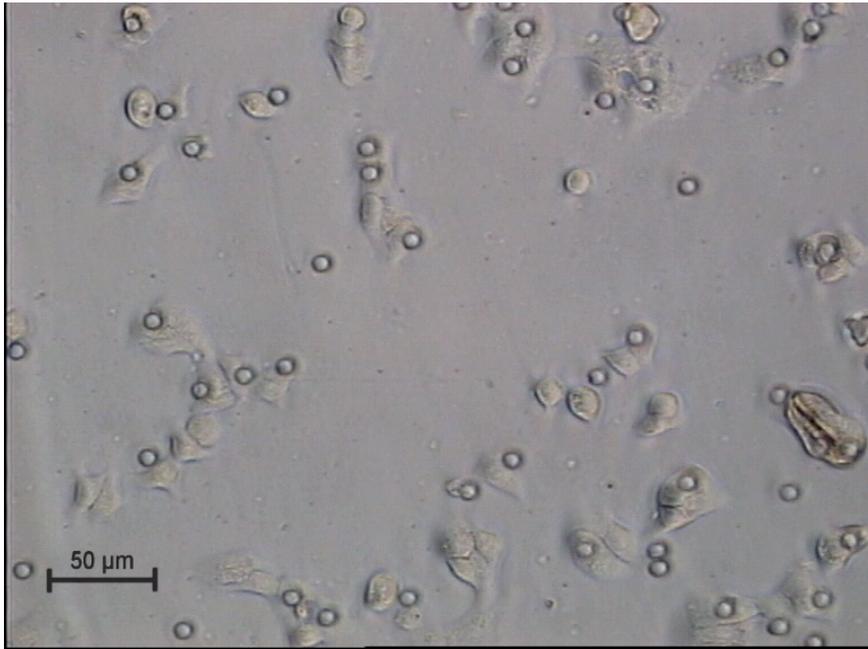


Abb.30: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit A431 Zellen bei 320facher Vergrößerung nach 180minütiger Inkubationszeit (oberhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%) und β_{H} -Endorphin (10^{-9} molar) als Chemotaxin

Untersuchungen zur Chemokinese:

Zur Untersuchung der chemokinetischen Wirkung des β -Endorphins wurden Aufnahmen des Filters in einminütigem Abstand über insgesamt 5 Stunden durchgeführt und zu einem Film zusammengefasst (siehe CD; 3.2.3.4).

In Filteraufnahmen von Keratinozyten (HaCaT-Zellen) (siehe CD) konnte ein chemokinetischer Effekt von β -Endorphin nachgewiesen werden. Mit Zusatz von β -Endorphin (10^{-9} molar) im well zeigten sich die HaCaT-Zellen deutlich beweglicher, änderten ihre Morphologie, indem sie Pseudopodien ausbildeten, und migrierten ungerichtet im Gegensatz zum Kontrollversuch und zum Versuch, in dem fMLF als Chemotaxin hinzugegeben worden war.

Die folgenden Abbildungen zeigen Aufnahmen von HaCaT-Zellen bei 320facher Vergrößerung mit Zusatz von β -Endorphin (10^{-9} molar) im well zum Zeitpunkt $t=0$ (Abb. 31), zum Zeitpunkt $t=2,5$ Std (Abb. 32) und zum Zeitpunkt $t=5$ Std (Abb. 33).

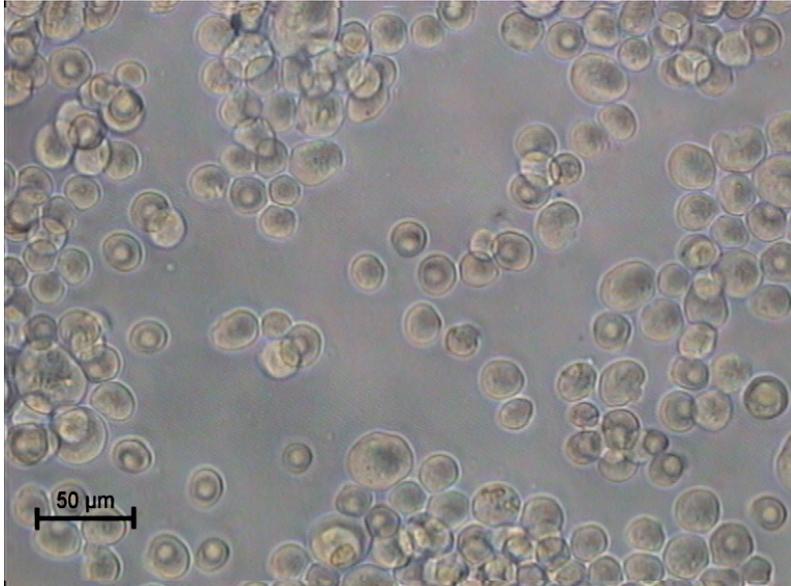


Abb.31: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit HaCaT Zellen bei 320facher Vergrößerung zum Zeitpunkt $t=0$ min (oberhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%) und β_H -Endorphin (10^{-9} molar) als Chemotaxin

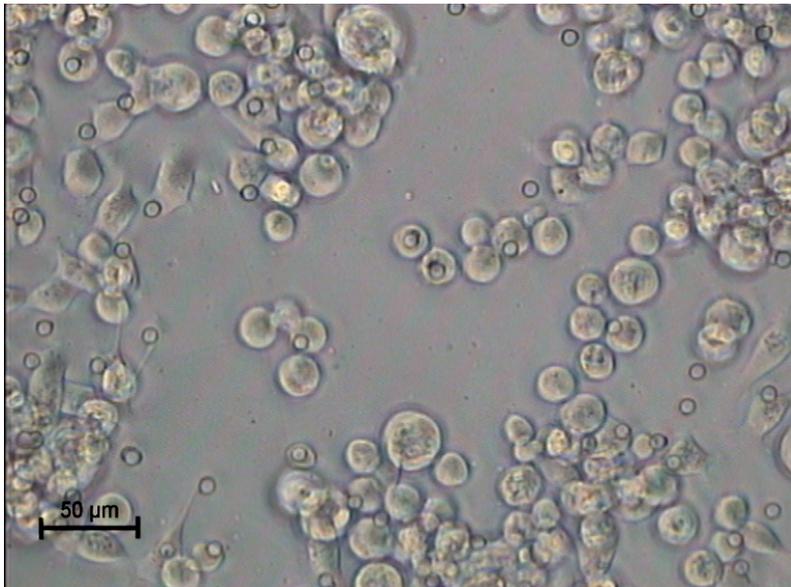


Abb.32: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit HaCaT Zellen bei 320facher Vergrößerung zum Zeitpunkt $t=150$ min (oberhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%) und β_H -Endorphin (10^{-9} molar) als Chemotaxin

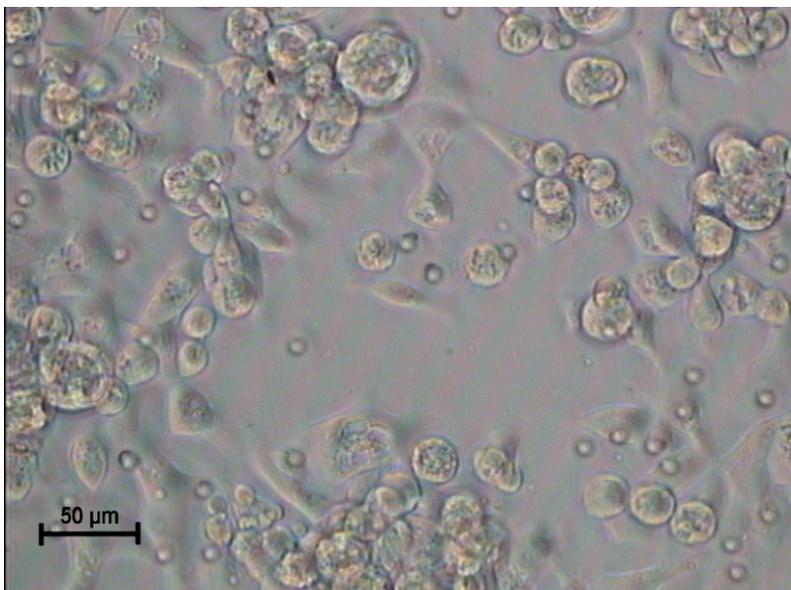


Abb.33: Aufnahme (Mikroskop Leica DM-IRB / Inversionsmikroskop) des Filters (von unten) mit HaCaT Zellen bei 320facher Vergrößerung zum Zeitpunkt $t=300$ min (oberhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%), unterhalb des Filters DMEM Medium mit BSA(0,1%) und β_H -Endorphin (10^{-9} molar) als Chemotaxin

5 Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Die Monozyten-Zelllinie THP-1

Um über den bisherigen Stand der Information hinausführende Erkenntnisse zur Funktion der POMC-Derivate β_H -Endorphin und β_H -Lipotropin in Bezug auf das Immunsystem zu gewinnen, wurden Untersuchungen an der Monozyten-Zelllinie THP-1 durchgeführt.

Die Monozyten-Zelllinie THP-1 gleicht nativen Monozyten in Bezug auf ihre Morphologie, die sekretorischen Produkte, die Expression von Onkogenen, die Expression von Oberflächenantigenen und in Bezug auf die Expression von in den Lipid-Stoffwechsel eingebunden Genen (RAJORA et al., 1996). Für die Durchführung der Bindungs- und Internalisierungsversuche waren hohe Zellkonzentrationen erforderlich (30×10^6 Zellen/ml), wie sie nur durch die Anzucht von Zellen einer Zelllinie und nicht durch Präparation und Züchtung von Primärkulturen erreichbar waren.

Die THP-1 Zelllinie ist in der Lage, CCR1- (KIM et al., 2004), CCR2- (KIM et al., 2004; PHILLIPS et al., 2005), CCR5-Rezeptoren (MUELLER et al., 2002) sowie die Rezeptoren CXCR4 (SCHOLS et al., 1997) und CD4 (PASTERNAK and PASTERNAK, 1994) zu exprimieren.

Aus der Tatsache, dass THP-1 Zellen darüber hinaus κ -Opioid Rezeptoren (KAM et al., 2004) exprimieren und das POMC-Derivat α -MSH (RAJORA et al., 1996) produzieren, ließ sich schließen, dass sie wie Blut-Monozyten (ANDERSEN et al., 2005) fähig sein müssten, Proopiomelanocortin und damit β -Endorphin(1-31) und β -Lipotropin(1-89) zu synthetisieren. Unter diesen Voraussetzungen war die THP-1 Zelllinie besonders geeignet, opioidpeptidgerge Modulationen an Monozyten zu erforschen.

Die Zelllinie THP-1 wurde von POLOCZEK (2002) und LINDNER (2004) im Rahmen ihrer Dissertationen verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde bauen auf die Ergebnisse dieser vorhergehenden Arbeiten auf und erweitern die Kenntnisse auf diesem Arbeitsgebiet.

5.1.2 Bindungs- und Internalisierungsversuche mit THP-1 Zellen

Die Bindungs- und Internalisierungsversuche wurden nach der Methode eines Zentrifugationsassays (SCHWEIGERER et al., 1985) mit geringen Modifikationen durchgeführt. Die Konzentrationsangaben der in den Puffern eingesetzten Enzymhemmer wurden mit einer Ausnahme von GELFAND et al. (1995) übernommen: Statt Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) wurde auf Grund der geringeren Toxizität 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (Pefabloc) verwendet.

Im Rahmen der Bindungsversuche wurde auf die Versuchstemperatur von 4 °C geachtet, bei der Stoffwechsel und Enzymaktivität als weitestgehend blockiert anzusehen waren.

Bei den Untersuchungen zur Internalisierung von β_H -Lipotropin(1-89) und β_H -Endorphin(1-31) hingegen wurden die Versuche bei 37 °C durchgeführt, da für den Prozeß der Internalisierung die Stoffwechselaktivität der Zelle obligat war. In Vorversuchen zur Internalisierung, in denen die Inkubationszeit 120 min betrug, wurde unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen keine signifikante Steigerung der Internalisierung von β -Endorphin(1-31) gegenüber einer Inkubationszeit von 60 min beobachtet, so dass die Inkubationszeit auf 60 Minuten festgelegt wurde.

Um ggf. eine Hemmung der Internalisierung der POMC-Peptide bei 37 °C in die THP-1 Zellen zu erreichen, waren Natriumazid und 2-deoxy-D-Glucose (SCHWEIGERER et al. 1985; KÖCK et al., 1996; McCLAIN et al., 2000) anstelle von Glucose in den Inkubationspuffer eingebracht worden. Diese Substanzen führen zu einer Blockade der ATP-Synthese der Zellen, so dass energieabhängige Abläufe wie eine Internalisierung zum Stillstand gebracht werden sollten. Die am Ende jedes Versuches bestimmte Mortalitätsrate der mit Natriumazid und 2-deoxy-D-Glucose inkubierten Zellen war derjenigen der ohne Natriumazid und mit Glucose inkubierten Zellen vergleichbar und betrug weniger als 15 %. Um eine Anlagerung von Peptiden an die Wände der Reaktionsgefäße zu verhindern, enthielten alle Inkubate bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0,1 % (w/v). Mit dem Zusatz von BSA sollten unspezifische Bindungsstellen blockiert und die Peptide in Lösung gehalten werden.

Kompetitoren wurden den betreffenden Inkubationsansätzen in 20 μ l BSA (0,1 %) zugegeben, das in elektrolytfreiem Wasser vorlag. Den übrigen Ansätzen wurden zwecks Vergleichbarkeit der Ansätze 20 μ l BSA (0,1 %) zugesetzt (Tab.1, Abschnitt 3.2.1.3.1). Zwecks Konstanthaltung der Osmolarität und Zusammensetzung des Inkubationspuffers wurde dann sämtlichen Ansätzen ein Kompensationspuffer zugegeben. Dieser enthielt

dieselben Bestandteile wie der Inkubationspuffer, allerdings in doppelter Konzentration mit Ausnahme von 0,1 % BSA. Um die Bestandteile dieses Puffers vollständig zu lösen, musste der pH-Wert beim Ansetzen des Puffers zunächst auf pH 2 gesenkt werden. Nach anschließender Titration auf den für die Zellen physiologischen pH-Wert von 7,4 kam es zu keiner Ausfällung der Puffer-Bestandteile.

5.1.3 Versuche zur chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung von β -Endorphin

5.1.3.1 Versuchsdurchführung

Im Rahmen der Versuche zur chemotaktischen bzw. chemokinetischen Wirkung des β -Endorphin(1-31) wurden Falcon™Companion-Platten mit 24 Vertiefungen (wells) und entsprechenden Filtern verwendet, die in der Regel für derartige Untersuchungen eingesetzt werden (SOLTYS et al., 1999; TSUJI et al., 2002; HANSON and QUINN, 2002).

Die Filter besaßen eine Porengröße von 8 μ m, um eine Migration von Monozyten zu ermöglichen. (WILKINSON, 1988).

Das RPMI-1640-Medium, welches in den Migrationsversuchen der Monozyten eingesetzt wurde, enthielt 0,1 % BSA, um – wie in den Bindungs- und Internalisierungsversuchen - unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Im Rahmen von Vorversuchen zeigten sich sowohl eine Zellkonzentration von 10^5 Zellen in 300 μ l als auch die Volumina an Medium in Filter und well, wie sie von der Firma Becton Dickinson empfohlen worden waren, als geeignet.

Insbesondere wurde darauf geachtet, dass das Medium langsam in das well pipettiert wurde, um eine Durchmischung der beiden Kompartimente (Filter/well) zu Beginn des Versuches zu verhindern und damit den Nachweis eines möglichen chemotaktischen Effekts des β -Endorphins(1-31) zu ermöglichen.

5.1.3.2 Behandlung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)

THP-1 Zellen wurden 72 Stunden lang auf einer Zellkulturschale mit dem Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) in einer Konzentration von 10^{-8} M inkubiert, um die THP-1 Zellen zu Makrophagen-ähnlichen-Zellen auszdifferenzieren.

Innerhalb der Inkubationszeit verloren die THP-1 Zellen die Fähigkeit zu proliferieren (die Zellzahl blieb nahezu konstant), hafteten an der Schale und veränderten sich in ihrer Morphologie.

Physiologische Veränderungen wie die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b und CD 14, die Freisetzung von Radikalen (O_2^-), Prostaglandin E_2 (PGE_2) und Tumor-Nekrosis-Faktor α ($TNF-\alpha$) sowie die Fähigkeit zur Phagozytose von Latex-Partikeln, welches Eigenschaften von Makrophagen sind, hatten SCHWENDE et al. (1996) bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen nachgewiesen.

PMA wurde in einer Konzentration von 10^{-3} molar in Dimethylsulfoxid gelöst. Beim Ansetzen des Inkubationsmediums mit PMA war das DMSO in einer Konzentration von 0,1 % vorhanden. Obschon DMSO selbst Enzym-induzierend und Zell-differenzierend wirkt (COLLINS et al., 1978; SHAM et al., 1995), konnte in dieser Verdünnung nicht von einem durch DMSO hervorgerufenen Effekt ausgegangen werden (ZIMBER et al., 2000),

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Interaktion von β -Endorphin und β -Lipotropin mit Zellen der Monozytenzelllinie THP-1

Bei den Bindungsversuchen mit (^{125}I) β_H -Lipotropin(1-89) und (^{125}I) β_H -Endorphin(1-31) war die Bindung an THP-1 Zellen durch β_H -Endorphin(1-31) zum Teil hemmbar (siehe Abb. 3 und Abb. 9).

Diese Hemmung beruhte auf einer Verdrängung der markierten Liganden aus ihrer Bindungsstelle durch den jeweils unmarkierten Liganden. Es handelte sich dabei demnach um eine spezifische Bindung an die THP-1 Zellen.

Auf die Unterschiede zwischen der spezifischen Bindung von β_H -Endorphin(1-31) und der von β_H -Lipotropin(1-89) an THP-1 Zellen soll im Folgenden eingegangen werden.

5.2.1.1 Charakteristika der Interaktion von β -Endorphin und β -Lipotropin mit THP-1 Zellen

5.2.1.1.1 Strukturspezifität der Bindung von β -Endorphin und β -Lipotropin an THP-1 Zellen bei 4 °C

Hinsichtlich der Strukturspezifität der Bindung von β _H-Lipotropin(1-89) sowie der Bindung von β _H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen stellte sich der C-Terminus, der bei beiden Peptiden identisch ist (siehe Abschnitt 1.2.1), als bindungsrelevante Struktur dar (siehe Abb. 4 und Abb. 10).

In den Bindungsexperimenten mit (¹²⁵I) β _H-Lipotropin(1-89) wurde eine Verdrängung durch β _H-Endorphin(1-31) von 49 %, durch das C-terminale Fragment, β _H-Endorphin (18-31), von 47 % nachgewiesen. Da das Mittelfragment β _H-Endorphin(18-27) keine Verdrängung von (¹²⁵I) β _H-Lipotropin(1-89) aus der Bindung bewirkte, musste die bindende Struktur das β _H-Lipotropin(86-89) bzw. β _H-Endorphin (28-31) mit der endständigenden Aminosäuresequenz Lysin-Lysin-Glycin-Glutaminsäure sein.

Ähnliche Bindungscharakteristika wies die Bindung von (¹²⁵I) β _H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen auf (mit einer Verdrängung durch das C-terminale-Fragment β _H-Endorphin(18-31) von 45 %). Dieser prozentuale Anteil der Verdrängung von (¹²⁵I) β _H-Endorphin(1-31) durch β _H-Endorphin(18-31) war dem Anteil der Verdrängung von (¹²⁵I) β _H-Lipotropin(1-89) vergleichbar.

Die Verdrängung von (¹²⁵I) β _H-Endorphin(1-31) durch das vollständige Peptid betrug allerdings ca.61 % und lag damit um ca.12 % höher als bei der Verdrängung von (¹²⁵I) β _H-Lipotropin(1-89) durch β _H-Endorphin(1-31).

Ursächlich dafür könnte die unterschiedliche Größe der Peptide sein: β _H-Lipotropin(1-89) ist um 58 Aminosäurereste länger als β _H-Endorphin(1-31). Mit dieser zusätzlichen Aminosäuresequenz vermag β _H-Lipotropin(1-89) offenbar seine C-terminale Bindung zu stabilisieren und ist folglich dadurch schlechter aus der Bindung durch β _H-Endorphin(1-31) zu verdrängen als das markierte β _H-Endorphin(1-31).

Dass β _H-Endorphin(1-31) an THP-1 Zellen nicht nur über seinen C-Terminus, sondern in geringem Maße auch über ein anderes Fragment bindet, ist nichtsdestoweniger anzunehmen. In den Bindungsversuchen zur Ermittlung der Dissoziationskonstante und der Bindungsstellenkonzentration wurde zwar eine erhebliche Reduktion der Bindungsstellenkonzentration bei Vorblockade durch das Mittelfragment erreicht, jedoch

auch eine geringe Reduktion der Bindungsstellenkonzentration durch den Antikörper 2D7 bei Vorblockade der Bindungsstellen durch das C-terminale Fragment. Dies spricht dafür, dass in den betreffenden Versuchen β_{H} -Endorphin in geringerem Maße auch über sein Mittelfragment (18-27) an die THP-Zellen gebunden hat.

Es scheint sich hierbei um eine Zellcharge gehandelt zu haben, die im Gegensatz zu denjenigen Chargen, mit denen die meisten Versuche durchgeführt wurden, Mittelfragment-Bindungsstellen für β -Endorphin exprimierte. Auch POLOCZEK (2002) und LINDNER (2004) beobachteten die Expression von Mittelfragment-Bindungsstellen für β -Endorphin.

5.2.1.1.2 Strukturspezifität der Interaktion von β -Endorphin und β_{H} -Lipotropin mit THP-1 Zellen bei 37 °C

Analog zur Untersuchung der Strukturspezifität der Bindung von β_{H} -Endorphin(1-31) und β_{H} -Lipotropin(1-89) bei 4 °C wurde versucht, die Interaktionen der Peptide mit den THP-1 Zellen ebenso bei 37 °C zu charakterisieren (siehe Abb. 8 und Abb. 14).

In den Bindungsexperimenten bei 37 °C konnte hinsichtlich der Strukturspezifität der Bindung beider Peptide keine exakte Aussage getroffen werden, da weder das C-terminale Fragment β -Endorphin(18-31) noch das Mittelfragment β_{H} -Endorphin(18-27) in der Lage waren, (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) oder (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) aus seiner Assoziation an THP-1 Zellen signifikant zu verdrängen.

Bei 37 °C genügten die für die Bindung des radioaktiv markierten Peptids entscheidenden Sequenzabschnitte – als Verdränger eingesetzt - anscheinend nicht mehr, um die Assoziation des markierten Peptids an THP-1 Zellen zu inhibieren. Lediglich das vollständige β_{H} -Endorphin(1-31) bewirkte eine signifikante Verdrängung des markierten β_{H} -Endorphins(1-31) bzw. des markierten β_{H} -Lipotropins(1-89) von den THP-1 Zellen bei 37 °C.

Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Zellmembran der THP-1 Zellen sowie die Peptidstruktur des markierten Peptids bei einer Temperatur von 37 °C im Gegensatz zu 4 °C sehr beweglich werden.

Damit genügt die Verdrängung einer Teilsequenz des Peptids (β -Endorphin) bzw. des bindenden Peptidfragments (β -Endorphin-Sequenz von β -LPH) nicht mehr, um das Gesamtpeptid bzw. das Gesamtpeptid-bindende Peptidfragment von sämtlichen Teilbindungsstellen zu verdrängen; eine oder mehrere Teilsequenzen verbleiben in ihren

Bindungsstellen. Nur das Gesamtpeptid kann gleichzeitig das gebundene Gesamtpeptid bzw. das bindende Fragment des Gesamtpeptids aus allen Bindungsstellen verdrängen.

5.2.1.2 Beeinflussung des Bindungsverhaltens von β -Endorphin an Zellen der Monozytenzelllinie THP-1 durch den Antikörper 2D7 und durch Morphin

Der Antikörper 2D7 stellt einen monoklonalen Antikörper gegen den Chemokin-Rezeptor CCR5 dar. Der Chemokin-Rezeptor und HIV-1(Makrophagen-trope) Korezeptor CCR5, der auf Monozyten und T-Lymphozyten zu finden ist, gehört zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und umfasst eine N-terminale Domäne, drei extra- und intrazelluläre Schleifen sowie ein zytoplasmatisches C-terminales Ende (OPPERMANN, 2004). An den Rezeptor CCR5 binden Chemokine wie MIP (makrophage-inflammatory-protein)-1 α , MIP-1 β , RANTES(regulated on activation normal T cell expressed and secreted), MCP(monocyte chemotactic protein)-2, MCP-3 und MCP-4. Die Bindung der Chemokine an Leukozyten führt zu proinflammatorischen Effekten wie Chemotaxis, Degranulation und Integrinaktivierung. POLOCZEK (2002) konnte erstmals die Bindung von β_H -Endorphin(1-31) an den CCR5-Rezeptor der Monozytenzelllinie THP-1 nachweisen. Eine Bestätigung und Weiterführung dieses Befundes ergeben die Daten dieser Arbeit (Abb.15).

Mit Einsatz des Antikörpers 2D7 konnte die Bindung von (¹²⁵I) β_H -Endorphin(1-31) um ca. 38 %, durch Zugabe des unmarkierten Liganden β_H -Endorphin(1-31) um ca. 47 % gesenkt werden (ohne einen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$)).

Der Einfluss des Antikörpers 2D7 auf die Bindung von β_H -Endorphin(1-31) an den CCR5-Rezeptor wird im folgenden beschrieben, daran anschließend wird auf die Stimulation der CCR5-Expression mit Morphin eingegangen.

5.2.1.2.1 Änderung von B_{max} -Werten unter 2D7 – Einfluss als Evidenz für die Lokalisation der β -Endorphin-Bindungsstelle auf CCR5

Wie in den Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt, wurde anhand von Sättigungsexperimenten überprüft, ob der Antikörper 2D7 über eine Verringerung der Affinität der β_H -Endorphin(1-31)-Bindung an die Bindungsstelle (Erhöhung der K_D) oder über die Absenkung der

Bindungsstellen-Konzentration (Verringerung von B_{\max}) die Bindung von β_H -Endorphin(1-31) an die THP-1 Zellen beeinflusste. Eine Absenkung der Bindungsstellenkonzentration durch den Antikörper 2D7 würde bedeuten, dass der Antikörper die Bindungsstelle, den CCR5-Rezeptor, direkt blockierte, eine Verringerung der Affinität des β -Endorphins zur β -Endorphin-Bindungsstelle durch den Antikörper 2D7 würde offenlassen, inwieweit die β -Endorphin-Bindungsstelle mit der Bindungsstelle von 2D7, dem CCR5-Rezeptor, oder einer benachbarten Struktur identisch wäre.

Ausgehend von den in dieser Arbeit erhobenen Befunden, in denen gezeigt wurde, dass β -Endorphin(1-31) über seinen C-Terminus (Abb.10) an den CCR5-Rezeptor bindet (Abb.15) und von den von POLOCZEK (2002) erhobenen Befunden, in denen das Mittelfragment des β_H -Endorphins(1-31) die bindende Struktur an den CCR5-Rezeptor darstellte, wurden sowohl das C-terminale Fragment, β_H -Endorphin(27-31), als auch das Mittelfragment, β_H -Endorphin(18-27), eingesetzt, um mit einer Vorblockade einer der beiden Bindungsstellen durch das jeweilige Fragment den Einfluß des Antikörpers 2D7 auf die Bindung über das jeweils andere Fragment des β -Endorphins zu charakterisieren. Die mit dem Programm LIGAND berechneten Dissoziationskonstanten K_D lagen unter Blockade C-terminaler Bindung ebenso wie unter Blockade der Mittelfragment-Bindung sowohl in An- wie in Abwesenheit von 2D7 in etwa der gleichen Größenordnung. Der Antikörper 2D7 hatte demnach keinen Einfluss auf die Affinität der Bindung von (^{125}I) β_H -Endorphin(1-31) an die THP-1 Zellen, die Affinität des Liganden β_H -Endorphin(1-31) zu seiner Bindungsstelle auf dem CCR5-Rezeptor blieb demnach konstant.

Daraus kann geschlossen werden, dass 2D7 die Konformation der Bindungsstelle nicht in der Weise veränderte, dass dem Liganden β_H -Endorphin(1-31) der Zutritt zur Bindungsstelle unter Einfluss von 2D7 erschwert wurde. Das hätte der Fall sein können, wenn die β -Endorphin-Bindungsstelle dem CCR5-Rezeptor, dem Epitop des Antikörpers 2D7, nur benachbart gelegen hätte.

Anhand der ermittelten Bindungsstellenkonzentrationen B_{\max} konnte gezeigt werden, dass der Antikörper 2D7 die Konzentration an Bindungsstellen zu senken vermochte. Das bedeutet, dass der Antikörper 2D7 die β -END-Bindungsstelle direkt blockierte. Da der Antikörper 2D7 seinen Angriffspunkt im Bereich der ersten Hälfte der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2a) des CCR5-Rezeptors besitzt, konnte angenommen werden, dass die Bindungsstelle für β_H -Endorphin(1-31) innerhalb oder in der Nähe dieser Domäne des CCR5-Rezeptors lag. Unter Vorblockade C-terminaler Bindung mit dem Fragment β_H -Endorphin(27-31) wurde die Konzentration an Bindungsstellen durch 2D7 um mehr als das Dreifache gesenkt, bei

Blockade der Mittelfragment-Bindung sogar um das Zehnfache. Da der C-Terminus des β_H -Endorphins(1-31) die bindungsrelevante Struktur darstellt (Abb.10), war unter Vorblockade des C-terminalen Fragments der größte Teil der Bindungsstellen bereits abgesättigt.

Wie unter 5.2.1.2.1 angesprochen, können unterschiedliche THP-1 Zellchargen unterschiedliche Bindungsstellen exprimieren. In diesen Versuchen hatte offenbar eine Zellcharge vorgelegen, die in geringem Maße Mittelfragment-Bindungsstellen für β -Endorphin exprimierte, da eine geringe zusätzliche Reduktion der Bindungsstellen mit dem Fragment β -Endorphin(18-27) unter Vorblockade C-terminaler Bindung erzielt wurde.

5.2.1.2.2 Nachweis der Stimulation der CCR5 Expression durch Morphin an Monozyten der Zelllinie THP-1

In der Literatur werden zahlreiche immunsuppressive Effekte beschrieben, die durch exogene Opioide wie Morphin an Zellen des Immunsystems hervorgerufen werden.

So wurde über eine Depression der Aktivität Natürlicher Killerzellen bei Heroinabhängigen (NOVICK et al., 1989) berichtet, die über das zentrale Nervensystem vermittelt wird (SHAVIT et al., 1986).

Morphin wirkt ebenso auf Funktionen von B- und T-Lymphozyten wie auf Funktionen phagozytotischer Zellen (Makrophagen und Granulozyten) supprimierend, wobei Morphin hierbei direkt mit den Zellen interagiert. Sowohl die Chemotaxis von mononukleären Zellen (STEFANO et al., 1993; PEREZ-CASTRILLON et al., 1992) und von Granulozyten (MAKMAN et al., 1995) als auch die Phagozytose (CASELLAS et al., 1991) werden durch Morphin inhibiert. Über den Rahmen der immunsuppressiven Effekte hinaus wird Opioiden zunehmend die Funktion immunregulativer Moleküle bzw. Zytokine zugesprochen (PETERSON et al., 1998). Übersichten über Interaktionen von Morphin mit dem Immunsystem geben EISENSTEIN and HILBURGER (1998), MELLON and BAYER (1998) sowie SHARP et al. (1998).

Ausgehend von der Publikation von MIYAGI et al. (2000a), die zeigen konnten, dass Morphin die Expression des CCR5-Rezeptors von CEMx174 Lymphozyten steigert, wurde der Einfluß von Morphin auf die Monozytenzelllinie THP-1 untersucht. Dabei wurden sowohl nach 12stündiger wie auch nach 24stündiger Inkubationszeit mit 10^{-9} molarem Morphin ein Bindungsanstieg von (^{125}I) β_H -Endorphin(1-31) um ca. 30 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen (Abb.18 und Abb.19). Da (^{125}I) β_H -Endorphin(1-31) wie gezeigt an CCR5

bindet, konnte somit erstmals nachgewiesen werden, dass Morphin ebenso die Expression des CCR5-Rezeptors auf Monozyten der Zelllinie THP-1 zu steigern vermag. Dieses Ergebnis ist mit den Daten von STEELE et al. (2003) kompatibel, die einen Anstieg von CCR5 in Monozyten durch den μ -Rezeptor Opioidagonisten DAMGO nachweisen konnten.

Dieser Befund besitzt klinische Relevanz. Neben der Tatsache, dass Morphin die Replikation von HI-Viren steigert (PETERSON et al., 1994; STEELE et al., 2003), bietet die durch Morphin erhöhte CCR5-Dichte auf Immunzellen eine Erklärung für das erhöhte Risiko von Patienten mit einem Opioid-Abusus, eine HIV Infektion zu erleiden (MIYAGI et al., 2000a; STEELE et al., 2003), da HIV-1 den CCR5 als Korezeptor für den Eintritt des Virus in die Zelle benutzt (ALKHATIB et al., 1996; CHOE et al., 1996; DORANZ et al., 1996; DRAGIC et al., 1996).

5.2.2 Untersuchungen zur Internalisierung von β -Endorphin und β -Lipotropin in Zellen der Monozytenzelllinie THP-1 über den Chemokin-Rezeptor CCR5

Im Rahmen der Untersuchungen zur Internalisierung von β _H-Endorphin(1-31) und β _H-Lipotropin(1-89) in Zellen der Monozytenzelllinie THP-1 konnte erstmals gezeigt werden, dass β _H-Endorphin(1-31) im Gegensatz zu β _H-Lipotropin(1-89) über den Chemokinrezeptor CCR5 in die Monozyten in beträchtlichem Ausmaß internalisiert wird.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte eine Internalisierung von β _H-Endorphin in Zellen des Immunsystems von FALKE and FISCHER (1986) und von SCHWEIGERER et al. (1985) nachgewiesen werden.

FALKE and FISCHER (1986) untersuchten die Interaktion von β _H-Endorphin(1-31) mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und zeigten eine Opioid-Rezeptor-vermittelte Internalisierung des β _H-Endorphins in diese Zellen: Der Prozeß konnte durch den Opioid-Antagonisten Diprenorphin inhibiert werden. Über welchen Opioid-Rezeptor (μ -, δ -, κ -Rezeptor) die Bindung und Internalisierung vermittelt wurde, konnte nicht bestimmt werden (FALKE and FISCHER 1985b).

SCHWEIGERER et al. (1985) wiesen eine über den C-Terminus des β _H-Endorphins(1-31) vermittelte Internalisierung in EL 4 Thymom Zellen nach. Über einen Non-Opioid-Rezeptor wurde β _H-Endorphin(1-31) in diese Zellen lymphozytären Ursprungs aufgenommen.

5.2.2.1 Ausschluß der Internalisierung von β -Lipotropin

Wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben wurde β_{H} -Lipotropin(1-89) nicht in die THP-1 Zellen internalisiert, sondern lediglich gebunden. Die Bindung erfolgte innerhalb der ersten zehn Minuten und erreichte danach ihr bis zum Ende der 60minütigen Inkubationszeit anhaltendes Maximum (Abb. 5).

Der Vergleich der Assoziationsdaten in der Abbildung 6 ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied der Differenzen „KON - β_{H} -END(1-31)“ bei 4 °C und „KON – Nazid + 2-deoxy-D-Glucose + β_{H} -END(1-31)“ bei 37 °C. Danach liegt eine Erhöhung der unspezifischen Assoziation der Kontrolle KON bei 37 °C gegenüber der Kontrolle KON bei 4 °C vor. Bestätigt wurden diese Auswertungen durch die Befunde (Abb.7) nach der in 3.2.2.2 beschriebenen Methode. In den Assoziationsversuchen mit Ablösung des (^{125}I) β_{H} -Lipotropins(1-89) von der Zellmembran und damit der Reduktion der spezifischen wie auch der unspezifischen Bindung waren beide Kontrolldaten nicht signifikant unterschiedlich. Der Unterschied der Assoziationsdaten in der Abb.6 war durch die höhere unspezifische Bindung von β_{H} -Lipotropin(1-89) bei 37 °C erklärbar.

Es kann spekuliert werden, warum β_{H} -Lipotropin(1-89) im Unterschied zu β_{H} -Endorphin(1-31) nicht in die Zelle internalisiert wird. An die Bindungsstelle im Bereich des CCR5-Rezeptors binden beide POMC-Derivate über ihren C-Terminus gleichermaßen. Dass β_{H} -Lipotropin(1-89) im Gegensatz zu β_{H} -Endorphin(1-31) nicht internalisiert wird, mag an der unterschiedlichen Molekülgröße oder an der unterschiedlichen Aminosäuresequenz der beiden Peptide liegen. β_{H} -Lipotropin(1-89) besitzt eine um 58 Aminosäurereste längere Struktur als β_{H} -Endorphin(1-31). Diese verhindert eventuell die Internalisierung eines CCR5/ β -LPH-Komplexes in die THP-1 Zellen – eventuell durch Bindung an nicht internalisierte Komponenten der Zellmembran..

5.2.2.2 Nachweis der Internalisierung von β -Endorphin

Im Unterschied zum Ausschluß der Internalisierung von (^{125}I) β_{H} -Lipotropin(1-89) bei 37 °C konnte eine Internalisierung von (^{125}I) β -Endorphin(1-31) in die Monozytenzelllinie THP-1 gezeigt werden (Abb. 11; Abb.12; Abb 13).

Innerhalb der Inkubationszeit von 10 Minuten wurden ca. 29 % des (^{125}I) β_{H} -Endorphins(1-31) gebunden und internalisiert, in den nächsten 20 Minuten 95 % und in den letzten 30 Minuten ca. weitere 9 %.

Man kann davon ausgehen, dass der Prozeß der Internalisierung von (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) in die THP-1 Zellen zwischen 10 und 30minütiger Inkubationszeit sein Maximum erreichte - im Gegensatz zur Bindung bei 4 °C, die bereits nach 10minütiger Inkubationszeit abgeschlossen war.

5.2.2.2.1 Beteiligung von CCR5 an der Internalisierung von β -Endorphin

Die Bindung von (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) erfolgte, wie in unseren Versuchen und bereits von POLOCZEK (2002) gezeigt, über den CCR5-Rezeptor (Abb.15). Dass der Prozeß der Internalisierung von (^{125}I) β_{H} -Endorphin(1-31) in die THP-1 Zellen ebenso über den Rezeptor vermittelt wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit (Abb.21) gezeigt werden.

Die Interaktion von Chemokinen mit dem CCR5-Rezeptor wird zur Zeit intensiv erforscht (KRAFT et al. 2001; MUELLER et al., 2002; OPPERMANN, 2004; MUELLER and STRANGE, 2004), zumal dieser Rezeptor zusammen mit CD4 eine Eintrittspforte für Makrophagen-trope HI-Viren (ALKHATIB et al., 1996; CHOE et al., 1996; DORANZ et al., 1996; DRAGIC et al., 1996) darstellt.

Die Bindung von Chemokinen wie MIP-1 α , MIP-1 β sowie RANTES an den CCR5-Rezeptor löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Nach Bindung erfolgt ein Calcium-Einstrom (MUELLER et al., 2002) in die Zelle, sodann eine Phosphorylierung des CCR5-Rezeptors durch G Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) (PITCHER et al., 1998) sowie eine Bindung des Proteins β -Arrestin an CCR5 und schließlich eine Desensibilisierung durch Trennung des Rezeptors vom G Protein. β -Arrestin wiederum fungiert dabei als Adapter zwischen dem Rezeptor und Proteinen wie Adapter-Protein-2 (AP-2) und Clathrin (CARMAN and BENOVIC, 1998; LEFKOWITZ, 1998), was zur Internalisierung des Rezeptors und damit zu einer Reduktion der CCR5-Dichte auf der Zelloberfläche führt. Ein Rücktransport des Rezeptors vom Zellinneren in die Zellmembran wird durch endosomalen Transport ermöglicht (SIGNORET et al., 2000).

Eine detaillierte Beschreibung des Mechanismus der Internalisierung und des Recyclings des CCR5-Rezeptors publizierten MUELLER and STRANGE (2004).

Da β_H -Endorphin(1-31) ebenso an den CCR5-Rezeptor bindet, war anzunehmen, dass die anhand von Chemokinen am CCR5-Rezeptor untersuchte Signalkaskade auch durch β -Endorphin(1-31) ausgelöst werden könnte.

Ergebnisse anderer Gruppen zeigten tatsächlich, dass β_H -Endorphin(1-31) wie die Chemokine Chemotaxis an Monozyten auslöst. Dies konnte allerdings in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden. Unter unseren Versuchsbedingungen scheint die Signaltransduktionskaskade wie für Chemokine berichtet, nicht ausgelöst zu werden. Dies schließt allerdings eine CCR5/ β -Endorphin-Internalisierung und ganz andere Sekundäreffekte als bei den Chemokinen nicht aus (Abschnitt 5.2.3.2). Chemokinese könnte einer davon sein.

5.2.2.2 Ausschluss der Beteiligung von Vitronektin an der Internalisierung von β -Endorphin

Im Rahmen der Untersuchungen der Bindungsstellen für β_H -Lipotropin(1-89) auf THP-1 Zellen konnte LINDNER (2004) neben der Bindung von β_H -Lipotropin(1-89) an den CCR5-Rezeptor der Monozytenzelllinie eine Bindung von β_H -Lipotropin(1-89) an Vitronektin und über dieses an den Vitronektinrezeptor, das Integrin $\alpha_V\beta_3$ (CD 51/61) (FELDING-HABERMANN and CHERESH, 1993), der Zellen nachweisen. Dass Vitronektin von humanen Monozyten synthetisiert und sezerniert wird (HETLAND et al., 1989) und dass β_H -Endorphin(1-31) über seinen C-Terminus mit Vitronektin interagieren kann (HILDEBRAND, 1988; HILDEBRAND et al., 1989), konnte ebenfalls gezeigt werden.

Da der C-Terminus des β_H -Endorphins(1-31) als bindungsrelevante Struktur identifiziert werden konnte (Abb. 10), wurde überprüft, ob β -Endorphin(1-31) neben der CCR5-Bindungsstelle den Vitronektinrezeptor für seine Internalisierung nutzte. Im Falle einer Internalisierung würde β_H -Endorphin(1-31) über seinen C-Terminus zunächst an Vitronektin binden und anschließend über den Vitronektin-Rezeptor der THP-1 Zellen eingeschleust werden.

Mit Einsatz des monoklonalen Antikörpers Klon 23C6 wurde die Beteiligung des Vitronektin-Rezeptors an der Internalisierung von (125 I) β_H -Endorphin untersucht. Der Antikörper 23C6 ist gegen das Integrin $\alpha_V\beta_3$ (CD51/61) des Vitronektin-Rezeptors gerichtet, an das Vitronektin mit seiner Zelladhäsionsdomäne, der RGD(Arg-Gly-Asp)-Sequenz, bindet.

Die Interaktion von Vitronektin mit β_H -Endorphin(1-31) konnte mit dem gegen Vitronektin gerichteten Antiserum α S 66/67 überprüft werden.

Wie in der Abb. 21 dargestellt, konnten weder der Antikörper 23C6 noch das Antiserum α S 66/67 die Internalisierung von (125 I) β_H -Endorphin(1-31) in die THP-1 Zellen signifikant inhibieren.

Eine Beteiligung von Vitronektin an der Internalisierung konnte demzufolge nicht nachgewiesen werden.

5.2.3 Untersuchungen zur chemotaktischen Wirkung von β_H -Endorphin(1-31) auf Zellen des Immunsystems

5.2.3.1 Chemotaktische Wirkung von β -Endorphin auf native Monozyten

Ausgehend von den Befunden aus den Bindungsversuchen, in denen β_H -Endorphin(1-31) an den Chemokinrezeptor CCR5 der Monozytenzelllinie THP-1 bindet und über diesen internalisiert wird, wurde der Fragestellung nachgegangen, welche Effekte β_H -Endorphin(1-31) im Rahmen der Internalisierung auf die Monozyten auslöst. Falls β_H -Endorphin(1-31) an den CCR5-Rezeptor binden und primär eine G-Protein-Signalkette mit nachfolgender Rezeptorinternalisierung auslösen würde, wie bei den Chemokinen gezeigt, so wäre dies mit einer chemotaktischen Eigenschaft des β_H -Endorphins(1-31) an nativen Monozyten kompatibel. Ebenso könnte aber auch eine primäre Rezeptorinternalisierung eines CCR5/ β -Endorphin-Komplexes mit nachfolgender Signalkaskade ähnlich der Bindungs- und Signalkaskade, wie sie bei Glukokortikoiden vorkommt, erfolgen, die nachgewiesenermaßen nukleäre Effekte auslöst. Befunde, dass β -Endorphin auch nukleäre Effekte auslösen kann, werden in der Literatur beschrieben (TAKEBA et al., 2001).

Berichte über eine Stimulation der Chemotaxis durch β_H -Endorphin(1-31) an Monozyten publizierten bereits vor über 20 Jahren VAN EPPS and SALAND (1983; 1984), RUFF et al. (1985) sowie SACERDOTE und PANERAI (1989).

VAN EPPS and SALAND konnten in ihren Studien eine chemotaktische Eigenschaft von β_H -Endorphin(1-31) und Met-Enkephalin(1-5), welches mit den ersten 5 Aminosäuren des β_H -Endorphins(1-31) identisch ist, an mononukleären Zellen nachweisen. Die in den Migrationsversuchen der Monozyten eingesetzten Zellen enthielten einen prozentualen Gehalt an Monozyten von 20-40 % (1984) bzw. 18-30 % (1983), den überwiegenden Anteil

der Zellen stellten Lymphozyten dar. In weiteren Versuchen, in denen ausschließlich Lymphozyten verwendet wurden, war der chemotaktische Effekt geringer als bei den mononukleären Zellen, so dass die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass hauptsächlich Monozyten durch β_H -Endorphin(1-31) und Met-Enkephalin(1-5) stimulierbar waren. Eine möglicherweise durch die Peptide ausgelöste Interaktion zwischen den Monozyten und Lymphozyten oder die mögliche chemotaktische Aktivierung der Monozyten durch Lymphozyten innerhalb der Versuche wurde dabei nicht untersucht.

Eine ähnliche Studie führten RUFF et al. (1985) durch. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Migration mononukleärer Zellen unter Einfluss von β_H -Endorphin(1-31), Dynorphin, D-Ala-D-Leu-enkephalin und anderer Opioiden und zeigte eine durch β_H -Endorphin(1-31) stimulierbare und durch Naloxon blockierbare Chemotaxis.

SACERDOTE and PANERAI (1989) untersuchten die Chemotaxis von „Monozyten“ in Anwesenheit von β_H -Endorphin(1-31) und seinen Fragmenten, wobei die Angaben im Methodenteil der Publikation lediglich eine Auftrennung in mononukleäre Zellen beschreiben. Es wurden sowohl β_H -Endorphin(1-31), N-acetyl- β_H -Endorphin, N-terminale Fragmente wie β_H -Endorphin(1-16), β_H -Endorphin(1-17), β_H -Endorphin(1-27) C-terminale Fragmente wie β_H -Endorphin(6-31) und β_H -Endorphin(28-31) als auch β_H -Endorphin(2-17), welches weder den N- noch den C-Terminus besitzt, als chemotaktile Substanzen eingesetzt. Die Chemotaxis dieser „Monozyten“ war durch das vollständige Peptid β_H -Endorphin(1-31) in einer Konzentration von $10^{-10}/10^{-9}$ M am stärksten ausgeprägt mit einer ca. 60%igen Migration bezogen auf die Positivkontrolle (fMLF 10^{-8} M). Der Einfluß N-terminaler Fragmente auf die Migration, der durch Naloxon blockiert werden konnte, lag über dem des C-terminalen Fragments β -Endorphin(6-31), die Fragmente β_H -Endorphin(28-31) sowie β_H -Endorphin(2-17) zeigten keinen signifikanten chemotaktischen Effekt.

In der vorliegenden Arbeit wurden in den Migrationsversuchen native Monozyten (Gehalt an Monozyten >95 % der Zellsuspension (3.2.3.1.2)) verwendet.

Die mit Einsatz dieser Zellsuspensionen erhobenen Befunde können eine direkte chemotaktische Eigenschaft des β_H -Endorphins(1-31) nicht bestätigen, da sich die Migration der Monozyten unter β_H -Endorphin(1-31) von der der Negativkontrolle nicht signifikant unterschied.

In der vor kürzerer Zeit erschienenen Literatur wurden Interaktionen zwischen Opioiden und Chemokinen mit Auswirkung auf die Chemotaxis von Monozyten beschrieben (GRIMM et al., 1998a, 1998b; ROGERS et al., 2000; MIYAGI et al., 2000b; SZABO et al., 2002). Danach sind endogene Opioiden in der Lage, über Opioid-Rezeptoren eine Desensibilisierung

von Chemokinrezeptoren zu bewirken. Als Inhibitoren einer durch die Chemokine MIP-1 α , MCP-1 und RANTES induzierten Chemotaxis von Monozyten wurden Morphin und Met-Enkephalin (GRIMM et al., 1998a, 1998b) eingesetzt. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Opioide -über Opioid-Rezeptoren vermittelt- eine Phosphorylierung der CC-Rezeptoren bewirkten, welche zur Desensibilisierung dieser Rezeptoren mit eingeschränkter Chemotaxis der Monozyten führte. Dabei wurde die Bindung (Rezeptordichte, Affinität) der Chemokine an die Chemokinrezeptoren durch 60minütige Vorinkubation mit Met-Enkephalin nicht gesenkt (GRIMM et al. 1998b). Die durch MIP-1 β - welches ausschließlich an den CCR5-Rezeptor bindet - ausgelöste Chemotaxis konnte allerdings durch Met-Enkephalin nicht supprimiert werden, der CCR5-Rezeptor blieb durch Met-Enkephalin unbeeinflusst (GRIMM et al., 1998b)

Im Gegensatz zu Met-Enkephalin(1-5) kann β_H -Endorphin(1-31) über seinen C-Terminus direkt an den CCR-5 Rezeptor binden und anschließend in die THP-1 Zellen internalisiert werden. Eine Chemotaxis der Monozyten wurde durch β_H -Endorphin(1-31) in unseren Versuchen dabei nicht ausgelöst (s. 5.2.3.2).. Insofern sind die Befunde der vorliegenden Arbeit durchaus kompatibel mit den neueren Befunden aus der einschlägigen Literatur, durch die eine chemotaktische Wirkung von β -Endorphin eher unwahrscheinlich gemacht wird. Welche Funktion β_H -Endorphin(1-31) im Komplex regulativer Zell-Funktionen bei Monozyten besitzt, bleibt letztendlich offen. Dass eine Down-Regulation des CCR5-Rezeptors durch Internalisierung eines CCR5-/ β -Endorphin-Komplexes und damit eine Zellfunktions-regulierende Wirkung ausgelöst wird, ist durchaus möglich. Ebenso könnte β -Endorphin anstelle cytosolischer Eingriffe in die Zellfunktion im Rahmen der CCR5- β -Endorphin-Internalisierung nukleäre Effekte auslösen (Takeba et al., 2001).

5.2.3.2 Chemotaktische Wirkung von β -Endorphin auf Monozyten und ausdifferenzierte Zellen der Zelllinie THP-1

THP-1 Zellen:

Wie an nativen Monozyten wurde die chemotaktische Eigenschaft des β_H -Endorphins(1-31) ebenso an Monozyten der Zelllinie THP-1 überprüft.

In den durchgeführten Migrationsversuchen migrierten diese Zellen weder unter β_H -Endorphin(1-31) noch unter fMLF.

In der Literatur sind die Angaben zur Migration von THP-1 Zellen kontrovers.

DENHOLM and STANKUS (1995) wiesen eine konzentrationsabhängige Chemotaxis von THP-1 Zellen unter humanem rekombinanten MCP-1 nach.

VADDI and NEWTON (1994) verglichen unter anderem die Chemotaxis der Chemokine MCP-1, MIP-1 α sowie RANTES an nativen Monozyten und Monozyten der Zelllinie THP-1 und konnten im Unterschied zu nativen Monozyten keine Migration von THP-1 Zellen nachweisen, obwohl ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Bindung der Chemokine ebenso an THP-1 Zellen gemessen wurde. Die Autoren sahen den Grund der fehlenden Migration in einer lückenhaften Signaltransduktion von THP-1 Zellen.

Bindungs- und Internalisierungsversuche mit radioaktiv markiertem MCP-1 hingegen, die an nativen Monozyten und THP-1 Zellen durchgeführt wurden, zeigten vergleichbare Ergebnisse (WANG et al., 1993).

Ausdifferenzierte THP-1 Zellen:

Die durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) ausdifferenzierten THP-1 Zellen wurden adhärent, änderten die Morphologie von einer kugeligen in eine spindelartige Form (Abb. 24) und bildeten Pseudopodien aus.

Diese Makrophagen-ähnlichen Zellen waren zwar amöboid beweglich, wanderten jedoch nicht in die Richtung einer auf Chemotaxis zu prüfenden Substanz, wie die Untersuchungen zeigten.

DENHOLM and STANKUS (1995) zeigten vergleichbare Ergebnisse an PMA-behandelten THP-1 Zellen, die - einhergehend mit einer Reduktion der Rezeptor-Anzahl - die Fähigkeit der Migration unter MCP-1 verloren. Da MCP-1 nachweislich an den CCR2-Rezeptor der Monozyten bindet, wurde wahrscheinlich dieser Rezeptor mit der Differenzierung herunterreguliert. Dass auch eine Reduktion der CCR5 Rezeptor-Anzahl stattfand, ist wahrscheinlich, wurde aber in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Reduktion der Rezeptordichte von Monozyten während der Zelldifferenzierung zu Makrophagen und damit die Fähigkeit zu migrieren, erscheint plausibel, da Monozyten zu Makrophagen am Ort der Entzündung differenzieren und durch den Verlust eines möglichen chemotaktischen Einflusses ortsständig bleiben. Ihre Aufgabe am Ort der Entzündung besteht in der Phagozytose potentieller Krankheitserreger.

5.2.4 Chemokinetische Wirkung von β -Endorphin auf die Hautzelllinien G-361, HaCat und A431

Zunächst sollte die Wirkung von β_{H} -Endorphin(1-31) auf Hautzellen untersucht werden. Ausgangspunkt war die Publikation von BIGLIARDI et al. (2002), die zeigte, dass β -Endorphin(1-31) die Migration von nativen Keratinozyten zu stimulieren vermag.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsanordnung wurde das Ziel verfolgt, festzustellen, ob β_{H} -Endorphin ebenso eine chemotaktische Wirkung auf die Hautzelllinien G-361, HaCat und A431 auslösen könnte. Es wurde eine Konzentration von 1 nM als chemotaktische Konzentration gewählt, die im Rahmen der Wundheilung von Keratinozyten eine Rolle spielen könnte (WINTZEN et al., 1995).

In der Versuchsanordnung konnte jedoch keine gerichtete Migration der oben erwähnten Zellen zur chemotaktilen Test-Substanz β_{H} -Endorphin(1-31) gemessen werden, da die Zellen nicht durch die Filterporen in das well, in dem β_{H} -Endorphin vorhanden war, gewandert waren. Es zeigte sich jedoch eine Chemokinese der HaCaT-Zellen unter β -Endorphin.

Anhand von fünfständigen Aufnahmen des Filters, auf dem sich HaCaT Zellen befanden, konnte nämlich eine verstärkte ungerichtete Mobilität der Zellen oberhalb des Filters bei einer 1 nM β_{H} -Endorphin(1-31) Konzentration im well festgestellt werden. HaCaT- Zellen, die sich in Medium ohne Zusatz befanden sowie Zellen mit fMLF als Zusatz blieben dagegen ortsständig. Neben der chemokinetischen Wirkung änderten HaCaT Zellen unter Einfluss von β -Endorphin auch ihre Morphologie, indem sie Pseudopodien ausbildeten.

β_{H} -Endorphin(1-31) scheint demzufolge chemokinetisch, jedoch nicht chemotaktisch auf die Migration von Keratinozyten zu wirken.

6 Zusammenfassung

Die Proopiomelanocortin(POMC)-Fragmente β -Endorphin und β -Lipotropin kommen im menschlichen Organismus sowohl im Zentralnervensystem wie auch in peripheren Kompartimenten vor. In Stresssituationen werden diese Fragmente vermehrt aus der Hypophyse ins Blut freigesetzt und in die Peripherie transportiert. Eine Reihe von Informationen deutet auf eine immunologische Bedeutung beider Fragmente hin; ihre Funktion ist jedoch bis jetzt ungeklärt.

Um weiterführende Informationen zur Interaktion von β -Endorphin und β -Lipotropin mit bestimmten Komponenten des Immunsystems zu gewinnen, wurden Versuche mit Monozyten der Zelllinie THP-1 durchgeführt; Monozyten besitzen eine zentrale Funktion innerhalb sowohl der unspezifischen als auch der spezifischen Immunantwort. Ergebnisse von Bindungsversuchen bestätigten bereits vorliegende Befunde, wonach die Bindung beider POMC-Fragmente über ihre C-Termini an Bindungsstellen auf den Monozyten erfolgte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das endogene Opioid β -Endorphin über diese Bindungsstellen in die Monozyten internalisiert wird - im Gegensatz zu dem (erheblich größeren) POMC-Fragment β -Lipotropin.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung des β -Endorphins über den Chemokinrezeptor CCR5 erfolgt. Unter dem Einfluß des Opioids Morphin konnte eine Steigerung der CCR5/ β -Endorphin-Bindung, d.h. der CCR5-Dichte auf den Monozyten, erreicht werden, was auf den Einfluss von Opioiden auf die Immunoregulation hinweist – bei Patienten wie bei Substanzabhängigen. Klinisch relevant ist dieser Befund darüberhinaus deshalb, weil dadurch das Risiko einer HIV-Infektion durch M-trope HIV-1 Stämme gesteigert sein könnte.

Ein chemotaktischer Einfluß von β -Endorphin über den Chemokinrezeptor CCR5 auf Monozyten oder auf zu Makrophagen ausdifferenzierte THP-1 Zellen sowie auf native Monozyten konnte in Migrationsversuchen nicht nachgewiesen werden. Die Funktion von β -Endorphin im Rahmen der CCR5/ β -Endorphin-Internalisierung könnte jedoch für andere Prozesse der Monozyten Bedeutung besitzen, wie neuere Befunde zum Komplex Chemokine versus Opiode an Monozyten zeigen: diese zeigen nämlich eine Wechselwirkung zwischen Chemokinen und Opioiden an Rezeptoren von Monozyten mit dem Resultat einer gegenseitigen Rezeptordesensibilierung. Auf diesem Wege könnte β -Endorphin regulative Wirkungen auf Komponenten des Immunsystems auslösen.

In Versuchen mit Keratinozyten zeigte sich jedoch unter dem Einfluss von β -Endorphin ein chemokinetischer Effekt. In Prozessen der Wundheilung könnte dieser chemokinetische Effekt von Bedeutung sein.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde konnten einen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Interaktion von POMC-Fragmenten mit Zellen des Immunsystems leisten, jedoch sind weiterführende Untersuchungen für das Verständnis der Funktionen dieser POMC-Fragmente erforderlich.

7 Summary

The POMC derivatives β -endorphin and β -lipotropin occur in the human organism in the central nervous system as well as in peripheral compartments. Under stress these peptides are released into the cardiovascular compartment. There is indication for an immunological significance of either POMC derivative; however, their functions have not been clarified in detail, as yet.

To obtain additional information on the immunological significance of β -endorphin and β -lipotropin, their interaction with the human monocytic cell line, THP-1, was studied, since monocytes exhibit major significance under specific or nonspecific host defence conditions. Results of binding studies confirmed earlier findings showing that β -endorphin and β -lipotropin binding to non-opioid binding sites on THP-1 cells occurred via their C-terminal fragments. In the present study the endogenous opioid, β -endorphin, could be demonstrated for the first time to be internalized into THP-1 cells via these non opioid binding sites – opposite to β -lipotropin, which was shown to be internalized to a negligible extent only.

Further, β -endorphin internalization was demonstrated to occur via the chemokine receptor CCR5. CCR5 density on the THP-1 cells again could be shown to be enhanced by morphine leading to increased β -endorphin binding to the THP-1 cells. Thus, exogenous opioids might influence certain functions of the immune system – in patients as well as in opioid addicts. Moreover, since M-tropic HIV strains are known to use the CCR5 receptor as a co-receptor to enter macrophages or T-cells carrying CCR5 receptors on their cell surface, opioid addicts may be subjected to increased risk of HIV infection.

Although β -endorphin has been reported to exert a chemotactic influence on monocytic cells, in this study no chemotactic effect of β -endorphin could be demonstrated in native monocytes or in THP-1 cells before or after treatment with PMA to stimulate cell differentiation. Nevertheless, recently report findings, which showed an intracellular interaction of exogenous opioids and chemokines resulting in a mutual receptor desensitization in monocytes, might indicate an intracellular function for an endogenous opioid like β -endorphin after its internalization into monocytes, as well.

Further experiments in keratinocytes showed that β -endorphin is able to elicit enhanced movement and certain structural alterations such as protrusion of pseudopods in the keratinocytes. Chemokinetic effects like these could be significant in case of wound healing processes.

Although the findings raised in this study, in fact, represent a contribution to open questions on the field of POMC derivative interactions with monocytes and keratinocytes, further

investigations are required for clarification of the immunological significance of those peptides apparently essential for reactions of the organism to stress.

8 Literaturverzeichnis

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996)

CC-CKR5: a RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1-beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1
Science 272:1955-1958

Andersen GN, Häggglund M, Nagaeva O, Frängsmyr L, Petrovska R, Mincheva-Nilsson L, Wikberg JES (2005)

Quantitative Measurement of the levels of melanocortin peptide gene expression in subsets of human peripheral blood leukocytes
Scandinavian Journal of Immunology 61:279-284

Apte RN, Durum SK, Openheim JJ (1990)

Opioids modulate interleukin-1 production and secretion by bone-marrow macrophages
Immun. Lett. 24:141-148

Astrauskas V, Leonaviciene L (1987)

Influence of injections of beta-endorphin in different doses into the lateral ventricle of brain on the development of adjuvant arthritis in rats
Ann. NY Acad. Sci. 496:170-172

Aymerich MS, Bengoechea-Alonso MT, Lopez-Zabalza MJ, Santiago E, Lopez-Moratalla N (1998)

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in human monocytes triggered by β -endorphin through an increase in cAMP
Biochem. Biophys. Res. Comm. 245:717-721

Barnes DW, Silnutzer J, See C, Shaffer M (1983)

Charakterization of human serum spreading factor with monoclonal antibody
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1362-1366

Bertagna X (1994)

Proopiomelanocortin-derived peptides
Endokrinol. Metab. Clin. North America 23:467-485

Bessler H, Sztejn MB, Serrate SA (1990)

IL-1 induced IL-2 production
Immunopharmacology 19:5-14

Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M, Büchner S, Rufli T (1998)

Expression of μ -opiate receptor in human epidermis and keratinocytes
J. Invest. Dermatol. 111:297-301

Bigliardi PL, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-Qi M (2002)

Specific stimulation of migration of human keratinocytes by μ -opiate receptor agonists
J. Receptors Signal Transduc. 22:191-199

- Bigliardi PL, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi-QI M (2003)
 Different expression of μ -opiaterceptor in chronic and acute wounds and the effect of β -endorphin on transforming growth factor β type II receptor and cytokeratin 16 expression
 J. Invest. Dermatol. 120: 145-152
- Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi PL (2004)
 Mu-Opiate receptor and beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin
 Dermatology 209:183-189
- Brown SL, Van Epps DE (1986)
 Opioid peptides modulate production of interferon γ by human mononuclear cells
 Cell. Immunol. 103:19
- Bryant HU, Holaday JW (1993)
 Opioids in immunologic processes
 Opioids II Handbook of Experimental Pharmacology, ed. A. Herz. Vol. 104/II., Berlin:Springer-Verlag. 361-392.
- Burt DR (1978)
 Criteria for receptor identification
 In Yamamura, Enna, and Kuhar, editors. Neurotransmitter Binding. New York: Raven Press 41-55
- Buzetti R, McLoughlin L, Lavender PM, Clark AJL, Rees LH (1989)
 Expression of proopiomelanocortin gene and quantification of adrenocorticotrophic hormone-like immunoreactivity in human normal peripheral mononuclear cells and lymphoid and myeloid malignancies
 J. Clin. Invest. 83: 733-737
- Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schäfer M, Loeffler JP, Stein C (1997)
 Immune cell-derived β -endorphin: production, release and control of inflammatory pain in rats
 J. Clin. Invest. 100:142-148
- Carman CV, Benovic JL (1998)
 G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs
 Curr. Opin. Neurobiol. 8:335-344
- Carr DJJ, Klimpel GR (1986)
 Enhancement of the generation of cytotoxic T-cells by endogeneous opiates
 J. Neuroimmunol. 12:75-87
- Carr DJJ (1991)
 The role of endogenous opioids and their receptors in the immune system
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 198:710-720
- Casellas AM, Guardiola H, Renaud FL (1991)
 Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages
 Neuropeptides 18:35-40

- Castilla-Cortazar I, Castilla A, Gurpegui M (1998)
Opioid peptides and immunodysfunction in patients with major depression and anxiety disorders
J. Physiol. Biochem. 54:203-215
- Castro MG, Morrison E (1997)
Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain
Crit. Rev. Neurobiol. 11:35-57
- Chen CL, Chang CC, Krieger DT, Bardin CW (1986)
Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis
Endocrinology 118:2382-2389
- Cheung S, Hammer RP Jr. (1995)
Gonadal steroid hormone regulation of proopiomelanocortin gene expression in arcuate neurons that innervate the medial preoptic area of the rat.
Neuroendocrinology 62:283-292
- Chhatwal GS, Preissner KT, Müller-Berghaus G, Blobel H (1987)
Specific binding of the human S protein (Vitronectin) to streptococci, staphylococcus aureus and escherichia coli
Infection and Immunity 55:1878-1883
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, Larosa G, Newman W, Gerard C, Sodroski J (1996)
The beta-chemokine CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates
Cell 85:1135-1148
- Chuang TK, Killam KF, Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang RY (1995)
Mu opioid receptor gene expression in immune cells
Biochem. Biophys. Res. Commun. 216:922-930
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC (1978)
Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(5):2458-2462
- Debold CR, Menefee JK, Nicholson WE, Orth DN (1988)
Proopiomelanocortin gene is expressed in many normal human tissues and in tumors not associated with ectopic adrenocorticotropin syndrome
Mol. Endocrinol. 2:862-870
- Denef C, Van Bael A (1998)
A new family of growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of proopiomelanocortin (N-POMC)
Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 119:317-324

- Denholm EM, Stankus GP (1995)
Changes in the expression of MCP-1 receptors on monocytic THP-1 cells following differentiation to macrophages with phorbol myristate acetate
Cytokine 7:436-440
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW (1996)
A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR2b as fusion cofactors
Cell 85:1149-1158
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996)
HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5
Nature 381:667-673
- Van Epps D, Saland L, Taylor C, Williams RC (1983)
In vitro and in vivo effects of β -endorphin and met-enkephalin on leukocyte locomotion
Prog. Brain Res. 59:361-74
- Van Epps D, Saland L (1984)
 β -Endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis
Journal of immunology 132:3046-3053
- Van Epps D, Kutvirt SL (1987)
Modulation of human neutrophil adherence by β -endorphin and met-enkephalin
J. Neuroimmunology 15:219-228
- Eisenstein TK, Hilburger ME (1998)
Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations
J. Neuroimmunol. 83:36-44
- Falke NE, Fischer EG (1985a)
Cell shape of polymorphonuclear leukocytes is influenced by opioids
Immunobiology 169:532-539
- Falke NE, Fischer EG, Martin R (1985b)
Stereospecific opiate binding in living human polymorphonuclear leukocytes
Cell Biol. Internat. Rep. 9:1041-1047
- Falke NE, Fischer EG (1986)
Opiate receptor mediated internalization of 125 I-beta-endorphin in human polymorphonuclear leukocytes
Cell Biol. Int. Rep. 10:429
- Felding-Habermann B and Cheresch DA (1993)
Vitronectin and its receptors
Curr. Opinion in Cell Biol. 5:864-868

- Gaveriaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, Kieffer B (1995)
Identification of κ - and δ -opioid receptor transcripts in immune cells
FEBS Lett. 369:272-276
- Gelfand RA, Wepsic HT, Parker LN, Jadus MR (1995)
Prostaglandin E₂ induces up-regulation of murine macrophage β -endorphin receptors
Immunology Letters 45:143-148
- Gilman SC, Schwartz JM, Milner RJ, Bloom FE, Feldman JD (1982)
 β -Endorphin enhances lymphocyte proliferative responses
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4226-4230
- Gilmore W, Weiner LP (1988)
 β -endorphin enhances interleukin-2 (IL-2) production in murine lymphocytes
J. Neuroimmunology 18:125-138
- Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, Howard OMZ, Resau JH, Wang JM, Ali H, Richardson R, Snyderman R, Oppenheim JJ (1998a)
Opiates transactivate chemokine receptors: δ and μ opiate receptor-mediated heterologous desensitization
J. Exp. Med. 188:317-325
- Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, Howard OM, Wang JM, Oppenheim, JJ (1998b)
Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis
Ann. NY. Acad. Sci. 840: 9-20
- Hanson AJ, Quinn MT (2002)
Effect of fibrin sealant composition on human neutrophil chemotaxis
J. Biomed. Mater Res. 61:474-481
- Harbach H, Hell K, Gramsch C, Katz N, Hempelmann G, Teschemacher H (2000)
 β -Endorphin(1-31) in the plasma of male volunteers undergoing physical exercise
Psychoneuroendocrinology 25:551-562
- Hazum E, Chang KJ, Cuatrecasas P (1979)
Specific nonopiate receptors for beta-endorphin
Science 205:1033-1035
- Heitkamp HC, Schmid K; Scheib K (1993)
 β -endorphin and adrenocorticotrophic hormone production during marathon and incremental exercise
Eur. J. Physiol. 66:269-274
- Hetland G, Petterson HB, Mollnes TE, Johnson E (1989)
S-protein is synthesized by human monocytes and macrophages in vitro
Scand. J. Immunol. 29:15-21
- Hildebrand A (1988)
Charakterisierung und Identifizierung von S-Protein(=Vitronectin) als spezifisches Bindungsprotein für β -Endorphin im Plasma des Menschen
Dissertation/ Fachbereich Medizin der JLU-Gießen

- Hildebrand A, Preissner KT, Müller-Berghaus G, Teschemacher H (1989)
A novel β -Endorphin binding protein
J. Biol. Chem. 264:15429-15434
- Höllt V (1993)
Regulation of opioid peptide gene expression
In: Herz A, Akil H, Simon EJ, Hrsg. Handb. Exp. Pharm 104/I, Springer:307-46
- Hunter WM, Greenwood FC (1962)
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity
Nature 194:495-496
- Ichinose M, Asai M, Sawada M (1995)
 β -endorphin enhances phagocytosis of latex particles in mouse peritoneal macrophages
Scand. J. Immunol. 42:311-316
- Johansen O, Winge J, Rikeras O, Jensen T, Knutsen G (2004)
Elevated plasma beta-endorphin/beta-lipotropin concentration following a radius fracture
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 64:635-640
- Johnson HM, Smith EM, Torres BA, Blalock JE (1982)
Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4171-74
- Johnson EW, Hughes TK, Smith EM (2005)
ACTH enhancement of T-lymphocyte cytotoxic responses
Cellular and molecular neurobiology 25:743-57
- Joseph SA, Pilcher WH, Bennett-Clarke C (1983)
Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system
Neurosci. Lett. 38:221-225
- Kam AYP, Chan ASL, Wong YH (2004)
 κ -opioid receptor signals through src and focal adhesion kinase to stimulate c-jun n-terminal kinases in transfected COS-7 cells and human monocytic THP-1 cells
J. Pharmacol. Exp. Ther. 310:301-310
- Kauser S, Schallreuter KU, Thody AJ, Gummer C, Tobin DJ (2003)
Regulation of human epidermal melanocyte biology by β -endorphin
J. Invest. Dermatol. 120:1073-1080
- Kay N, Allen J, Morley JE (1984)
Endorphins stimulate normal human peripheral blood lymphocyte natural killer activity
Life Sci. 35:53

- Kay N, Morley JE, van Ree JM (1987)
Enhancement of human lymphocyte natural killing function by non-opioid fragments of beta-endorphin
Life Sci. 40:1083-1087
- Khachaturian H, Alessi NE, Munfakh N, Watson SJ (1983)
Ontogeny of opioid and related peptides in the rat CNS and pituitary: an immunocytochemical study.
Life Sci. 33 Suppl 1:61-64
- Kim IS, Kim YS, Jang SW, Sung HJ, Han KH, Na DS, Ko J (2004)
Differential effects of 9-cis retinoic acid on expression of CC chemokine receptors in human monocytes.
Biochem. Pharmacol. 68:611-620
- Köck J, Borst EM, Schlicht HJ (1996)
Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment
J. Virology 70:5827-5831
- Kolb WP, Müller-Eberhard HJ (1975)
The membrane attack mechanism of complement
J. Exp. Med. 141:724-735
- Kovalovsky D, Paez Pereda M, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E (1999)
Differential regulation of interleukin-1 receptor antagonist by proopiomelanocortin peptides, adrenocorticotropic hormone and β -endorphin
Neuroimmunomodulation 6:367-372
- Kowalski J (1997)
Effect of enkephalins and endorphins on cytotoxic activity of natural killer cells and macrophages/monocytes in mice
Eur. J. Pharmacology 326: 251-255
- Kraft K, Olbrich H, Majouli I, Mack M, Proudfoot A, Oppermann M (2001)
Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization
The Am. Soc. For Biochem and Molecul. Biol. 276:34408-34418
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A (1998)
Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans
Nature genetics 19:155-157
- Lefkowitz RJ (1998)
G protein-coupled receptors III new roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization
J. Biol. Chem. 273:18677-18680

- Leonhardt M, Lesage J, Dufourny L, Dickes-Coopman A, Montel V, Dupouy JP (2002)
Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups
Neuroendocrinology 75:45-54
- LeRoith D, Shiloach J, Roth J, Liotta AS, Krieger DT, Lewis M, Pert CB (1981)
Evolutionary origins of vertebrate hormones: material very similar to adrenocorticotrophic hormone, beta-endorphin, and dynorphin in protozoa
Trans Assoc. Am. Physicians 94:52-60
- Levy EM, McIntosh T, Black PH (1986)
Elevation of circulating beta-endorphin levels with concomitant depression of immune parameters after traumatic injury
J. Trauma 26:246-249
- Lim ATW, Funder JW (1983)
Stress-induced changes in plasma, pituitary and hypothalamic immunoreactive β -Endorphin: Effects of diurnal variation, adrenalectomy, corticosteroids and opiate agonists and antagonists
Neuroendocrinology 36:225-234
- Lindner U (2004)
Nachweis spezifischer Bindungsstellen für das Hypophysenhormon β_H -Lipotropin auf dem Adhäsionsmolekül Vitronektin und auf Monozyten der humanen Zelllinie THP-1
Dissertation/ Fachbereich Medizin der JLU-Gießen
- Lolait SJ, Clements JA, Markwick AJ, Cheng C, McNally M, Smith AI, Funder JW (1986)
Proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of beta-endorphin in spleen macrophages
J. Clin. Invest. 77:1776-1779
- Lopker A, Abood LG, Hoss W, Lionetti FJ (1980)
Stereoselective muscarinic acetylcholine and opiate receptors in human phagocytic leukocytes
Biochem. Pharmacol. 29:1361-1365
- Machelska H, Cabot PJ, Mousa SA, Zhang Q, Stein C (1998)
Pain control in inflammation governed by selectins
Nat. Med. 4:1425-1428
- Makman MH, Bilfinger TV, Stefano GB (1995)
Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis
J. Immunol. 154:1323-1330
- Manfreda SE, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Buratti T, Reinisch N, Kähler CM, List WF, Wiedermann CJ (1998)
The chemotaxis of human peripheral blood B-lymphocytes by β -endorphin is reversible by naloxone
Anesth. Analg. 86:670-672

- Marcinkiewicz M, Day R, Seidah NG, Chretien M (1993)
Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4922-4926
- Marks DL, Hruby V, Brookhart G, Cone RD (2006)
The regulation of food intake by selective stimulation of the type 3 melanocortin receptor (MC3R)
Peptides 27:259-264
- Martin-Kleiner I, Balog T, Gabrilovac J (2006)
Signal transduction induced by opioids in immune cells: a review
Neuroimmunomodulation 13:1-7
- Mason MJ, Van Epps D (1989)
Modulation of IL-1, tumor necrosis factor and C5A-mediated murine neutrophil migration by melanocyte-stimulating hormone
Journal of Immunology 142:1646-1651
- Matejec R, Ruwoldt R, Bodeker RH, Hempelmann G, Teschemacher H (2003)
Release of beta-endorphin immunoreactive material under perioperative conditions into blood or cerebrospinal fluid: significance for postoperative pain?
Anesth Analg. 96:481-486
- Matejec R, Harbach HW, Bodeker RH, Hempelmann G, Teschemacher H (2006)
Plasma levels of corticotroph-type pro-opiomelanocortin derivatives such as beta-lipotropin, beta-endorphin(1-31), or adrenocorticotrophic hormone are correlated with severity of postoperative pain
Clin. J. Pain 22:113-121
- McClain M, Schraw W, Ricci V, Boquet P, Cover TL (2000)
Acid activation of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells
Mol. Microbiol. 37:433-442
- McLoughlin L, Evans SF, Watson JD, Hinds CJ, Rees LH (1988)
Characterization of circulating pro-opiomelanocortin-related peptides in human septic shock
J. Endocrinol. 119:159-165
- Mellon RD, Bayer BM (1998)
Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action
J. Neuroimmunol. 83:19-28
- Mehrishi JN, Mills IH (1983)
Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man
Cli. Immunol. Immunopathol. 27:240-249

- Miyagi T, Chuang LF, Doi RH, Carlos MP, Torres JV, Chuang RY (2000a)
Morphine induces gene expression of CCR5 in human CEMx174 lymphocytes
J. Biol. Chem. 275:31305-31310
- Miyagi T, Chuang LF, Lam KM, Kung H, Wang JM, Osburn BI, Chuang RY (2000b)
Opioids suppress chemokine-mediated migration of monkey neutrophils and monocytes – an instant response
Immunopharmacology 47:53-62
- Morgan EL, McClurg MR, Janda JA (1990)
Suppression of human B-lymphocyte activation by β -endorphin
J. Neuroimmunol. 28:209-218
- Mousa SA, Zhang Q, Sitte N, Ji RR, Stein C (2001)
 β -Endorphin-containing memory cells and μ -opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue
J. Neuroimmunol. 115:71-78
- Mousa SA, Shakibaei M, Sitte N, Schäfer M, Stein C (2004)
Subcellular pathways of β -Endorphin synthesis, processing and release from immunocytes in inflammatory pain
Endocrinology 145(3):1331-1341
- Mueller A, Mahmoud NG, Goedecke MC, McKeating JA, Strange PG (2002)
Pharmacological characterization of the chemokine receptor CCR5
Brit. J. Pharm. 135:1033-1043
- Mueller A, Strange PG (2004)
Mechanisms of internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5
Eur. J. Biochem. 271:243-252
- Munn NA, Lum LG (1989)
Immunoregulatory effects of α -endorphin, β -endorphin, methionine-enkephalin, adrenocorticotrophic hormone on anti-tetanus toxoid antibody synthesis by human lymphocytes
Clin. Immunol. Immunopathol. 52:376-385
- Munson PJ, Rodbard D (1980)
LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems
Analytical Biochemistry 107:220-239
- Novick DM, Ochshorn M, Ghali V, Crosson TS, Mercer WD, Chiorazzi N, Kreek MJ (1989)
Natural killer cell activity and lymphocyte subsets in parenteral heroin abusers and long-term methadone maintenance patients
J. Pharmacol. Exp. Ther. 250:606-610
- Oates EL, Allaway GP, Armstrong GR, Boyajian RA, Kehrl JH, Prabhakar BS (1988)
Human lymphocytes produce proopiomelanocortin gene-related transcripts
J. Biol. Chem. 263:10041-10044

- Oppermann M (2004)
Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function and regulation
Cellular signalling 16:1201-1210
- Ortega E, Forner MA, Barriga C (1996)
Effect of β -endorphin on adherence, chemotaxis and phagocytosis of *Candida albicans* by peritoneal macrophages
Comp. Immunol. Microbiol. And Infectious Diseases 19:267-274
- Pasternak G, Pasternak L (1994)
Behaviour in vitro of long-term cultured bone marrow or blood cells from chronic myeloid leukemia: Adhesion molecules and differentiation antigens as detected by immunocytochemistry
Folia Biologica (Praha) 40: 439-454
- Perez-Castrillon JL, Perez-Arellano JL, Garcia-Polomo JD, Jimenez-Lopez A, De-Castro S (1992)
Opioids depress in vitro human monocyte chemotaxis
Immunopharmacology 23:57-61
- Peterson PK, Sharp B, Gekker G, Brummit C, Keane WF (1987)
Opioid mediated suppression of interferon- γ production by cultured peripheral blood mononuclear cells
J. Clin. Invest. 80:824-831
- Peterson PK, Gekker G, Hu S, Anderson WR, Kravitz F, Portoghese PS, Balfour HH Jr., Chao CC (1994)
Morphine amplifies HIV-1 expression in chronically infected promonocytes cocultured with human brain cells
J. Neuroimmunol. 50:167-175
- Peterson PK, Molitor TW, Chao CC (1998)
The opioid-cytokine connection
J. Neuroimmunol. 83:63-69
- Phillips RJ, Lutz M, Premack B (2005)
Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation
J. Inflamm. (Lond) 2:14
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998)
G protein-coupled receptor kinases
Annu. Rev. Biochem. 67:653-692
- Podack ER, Müller-Eberhard HJ (1978)
Binding of deoxycholate, phosphatidylcholine vesicles, lipoprotein and of the S-protein to complexes of terminal complement components
J. Immunol. 121:1025-1030

- Podack ER, Preissner KT, Müller-Eberhard HJ (1984)
 Inhibition of C9 polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein
 Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Suppl. 284:89-96
- Poloczek A (2002)
 Lokalisation einer β_H -Endorphin-Bindungsstelle im Bereich des Chemokinrezeptors CCR5 auf Monozyten der Zelllinie THP-1
 Dissertation/ Fachbereich Humanmedizin der JLU-Gießen
- Prete P, Levin ER, Pedram A (1986)
 The in vitro effects of endogenous opiates on natural killer cells, antigen-specific cytolytic T cells and T-cell subsets
 Exp. Neurol. 92:349
- Preissner KT, Wassmuth R, Müller-Berghaus G (1985)
 Physicochemical characterization of human S-protein and its function in the blood coagulation system
 Biochem. J. 231:349-355
- Prieto J, Subira ML, Castilla A, Arroyo JL, Serrano M (1989)
 Opioid peptides modulate the organization of vimentin filaments, phagocytotic activity and expression of surface molecules in monocytes
 Scand. J. Immunol. 29:391-398
- Przewlocki R, Hassan AHS, Lason W, Epplen C, Herz A, Stein C (1992)
 Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue. Functional role in antinociception
 Neuroscience 48:491-500
- Rajora N, Ceriani G, Catania A, Star RA, Murphy MT, Lipton JM (1996)
 A-MSH production, receptors and influence on neopterin in a human monocyte/macrophage cell line
 J Leukoc. Biol. 59:248-253
- Raport CJ, Gosling J, Scweickart VL, Gray PW, Charo IF (1996)
 Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Human CC Chemokine Receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α
 J. Biol. Chem. 271:17161-17166
- Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, Stein C (2001)
 Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain
 Anesthesiology 95:500-508
- Refojo D, Kovalovsky, Young JI, Rubinstein M, Holsboer F, Reul JM, Low MJ, Arzt E (2002)
 Increased splenocyte proliferative response and cytokine production in β -endorphin-deficient mice
 J. Neuroimmunology 131:126-134

- Reyes BA, Glaser JD, Magtoto R, Van Bockstaele EJ (2006)
Proopiomelanocortin colocalizes with corticotropin-releasing factor in axon terminals of the noradrenergic nucleus locus coeruleus
Eur. J. Neurosci. 23:2067-77
- Rogers TJ, Steele, AD, Howard, OM, Oppenheim JJ (2000)
Bidirectional heterologous desensitization of opioid and chemokine receptors. *AU: Ann. NY. Acad. Sci.* 917: 19-28
- Ruff MR, Wahl SM, Mergenhagen S, Pert CB (1985)
Opiate receptor-mediated chemotaxis of human monocytes
Neuropeptides 5:363-366
- Sacerdote P, Panerai AE (1989)
Analysis of the β -endorphin structure-related activity on human monocyte chemotaxis: importance of the N- and C-Terminal
Peptides 10:565-569
- Saland LC, Van Epps D, Ortiz E, Samora A (1983)
Acute injections of opiate peptides into the rat cerebral ventricle:
A macrophage-like cellular response
Brain Research Bulletin 10:523-528
- Salzet M, Salzet-Raveillon B, Cocquerelle C, Verger-Bocquet M, Pryor SC, Rialas CM, Laurent V, Stefano GB (1997)
Leech immunocytes contain proopiomelanocortin: nitric oxide mediates hemolymph proopiomelanocortin processing.
J. Immunol. 159:5400-5411
- Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA (1994)
Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes
J. Clin. Invest. 93:2258-2262
- Schedlowski M, Fluge T, Richter S, Tewes U, Schmidt RE, Wagner (1995)
 β -endorphin, but not substance P, is increased by acute stress in humans
Psychoendocrinology 20:103-110
- Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este JA, Henson G, Declercq E (1997)
Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4
J. Exp. Med. 186:1383-1388
- Schulz A, Harbach H, Katz N, Geiger L, Teschemacher H (2000)
beta-Endorphin immunoreactive material and authentic beta-endorphin in the plasma of males undergoing anaerobic exercise on a rowing ergometer
Int. J. Sports Med. 21:513-517

- Schweigerer L, Schmidt W, Teschemacher H, Gramsch C (1985)
β-endorphin: surface binding and internalization in thymoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5751-5755
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P (1996)
Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃
J. Leukoc. Biology 59:555-561
- Shahabi NA, Sharp BM (1993)
Activatin of protein kinase C rapidly down-regulates naloxone-resistant receptors for β-endorphin on U937 cells
J. Pharmacol. Exp. Ther. 264:276-281
- Shahabi NA, Peterson PK, Sharp BM (1990)
β-Endorphin binding to naloxone-insensitive sites on a human mononuclear cell line (U937): effects of cations and guanosine triphosphate
Endocrinology 126:3006-3015
- Sham RL, Phatak PD, Belanger KA, Packman CH (1995)
Functional properties of HL60 cells matured with all-trans-retinoic acid and DMSO: differences in response to interleukin-8 and fMLP
Leuk. Res. 19:1-6
- Sharp BM, Keane WF, Suh HJ, Gekker G, Tsukayama D, Peterson PK (1985)
Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages
Endocrinology 117:793
- Sharp BM, Roy S, Bidlack JM (1998)
Evidence for opioid receptors on cells in host defense and the immune system
J. Neuroimmunol. 83:45-56
- Shavit Y, Depaulis A, Martin FC, Terman GW, Pechnik RN, Zane CJ, Gale RP, Liebeskind JC (1986)
Involvement of brain opiate receptors in the immune-suppressive effect of morphine
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7114-7117
- Shen ST, Lu LM, Chen JR, Chien JT, Yu JY (2003)
Molecular cloning of proopiomelanocortin (POMC) cDNA from mud turtle, *Pelodiscus sinensis*
Gen. Comp. Endocrinol. 131:192-201
- Sibinga NES, Goldstein A (1988)
Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system
Annual Review of Immunology 6:219-249
- Signoret N, Pelchen-Matthews A, Mack M, Proudfoot AE, Marsh M (2000)
Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5
J. Cell. Biol. 151:1281-1294

- Simon RH, Arbo TE, Lundy J (1984)
Beta-Endorphin injected into the nucleus of the raphe magnus facilitates metastatic tumor growth
Brain Res. Bull. 12:487-491
- Simpkins, CO, Dickey CA, Fink MP (1984)
Human neutrophil migration is enhanced by β -endorphin
Life Sci. 37:1381-1386
- Slominski A, Wortsman J, Mazurkiewicz JE, Matsuoka L, Dietrich J, Lawrence K, Gorbani A, Paus R (1993)
Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic skin
J. Lab. Clin. Med. 122:658-666
- Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty JE, Mazurkiewicz DC, Mihm M, (1995)
Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin
FEBS letters 374:113-116
- Slominski A, Heasley D, Mazurkiewicz JE, Ermak G, Baker J, Carlson JA (1999)
Expression of POMC-derived melanocyte-stimulating hormone (MSH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) peptides in skin of basal cell carcinoma patients
Hum. Pathol. 30:208-215
- Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S (2000a)
Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress
Phys. Rev. 80: 979-1020
- Slominski A, Szczesniowski A, Wortsman J (2000b)
Liquid chromatography-mass spectrometry detection of CRH and POMC-derived peptides in human skin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 85:3582-3588
- Smart JL, Tolle V, Low MJ (2006)
Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice
J. Clin. Invest. 116:495-505
- Smith AI, Funder JW (1988)
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues
Endocr. Rev. 9:159-179
- Soltys J, Swain SD, Sipes KM, Nelson LK, Hanson AJ, Kantele JM, Jutila MA, Quinn MT (1999)
Isolation of bovine neutrophils with biomagnetic beads: comparison with standard Percoll density gradient isolation methods
J. Immunol. Methods 226:71-84

- Soverchia L, Mosconi G, Buggeri B, Ballarini P, Catone G, Deglinnocenti S, Nabissi M, Polzonetti-Magni AM (2006)
 Proopiomelanocortin gene expression and β -endorphin localization in the pituitary, testis and epididymis of stallion
Molecular Reproduction and Development 73:1-8
- Steele AD, Henderson EE, Rogers TJ (2003)
 Mu-opioid modulation of HIV-1 coreceptor expression and HIV-1 replication
Virology 309:99-107
- Stefano GB, Digenis A, Spector S, Leung MK, Bilfinger TV, Makman MH, Scharrer B, Abumrad NN (1993)
 Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes and a role in immunosuppression
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11099-11103
- Stein C, Hassan AHS, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A (1990)
 Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5935-5939
- Szabo I, Chen H, Xin L; Adler MW; Howard OMZ, Oppenheim J J, Rogers TJ (2002)
 Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10276-81
- Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T (2001)
 Endorphin and enkephalin ameliorate excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis
J. Rheumatol. 28:2176-83
- Taylor AD, Loxley HD, Flower RJ, Buckingham JC (1994)
 The role of lipocortin 1 (LC1) in the steroid feedback control of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function. In vivo studies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 746:446-448
- Teschemacher H (2003)
 Proopiomelanocortin: Welche Rolle spielt dieser ACTH- und Endorphin-Präkursor für die Stressadaptation ?
Arzneim.-, Therapie-Kritik 35:233-242
- Tsuji T, Kawada Y, Kai-Murozono M, Komatsu S, Han SA, Takeuchi K, Mizushima H, Miyazaki, Irimura T (2002)
 Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and $\alpha 3\beta 1$ integrin (VLA-3)
Clin. Exp. Metastasis 19:127-134
- Vaddi K, Newton RC (1994)
 Comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the intercrine-beta family
J. Leukoc. Biol. 55:756-762

- Wang JM, Hishinuma A, Oppenheim JJ, Matsushima K (1993)
Studies of binding and internalization of human recombinant monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by monocytic cells
Cytokine 5:264-75
- Wardlaw SL, Kim J, Sobieszczyk S (1996)
Effect of morphine on proopiomelanocortin gene expression and peptide levels in the hypothalamus.
Brain Res. Mol. Brain 41:140-147
- Wiedemann K, Teschemacher H (1983)
beta-Endorphin immunoreactive materials in human plasma determined by a multiple radioimmunoassay system
Life Sci. 33 Suppl 1:89-92
- Wiedermann CJ, Schratzberger P, Kähler CM (1994)
Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with β -endorphin
Brain, Behavior and Immunity 8:270-277
- Wilkinson PC (1988)
Micropore filter methods
Methods-Enzymol. 162:38-50
- Wintzen M, Yaar M, Avila E, Vermeer BJ, Gilchrist BA (1995)
Keratinocytes produce β -endorphin and β -lipotropin hormone after stimulation by UV, IL-1 α or phorbol esters
J. Invest. Dermatol. 104:641
- Wintzen M, Yaar M, Burbach JPH, Gilchrist BA (1996)
Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes
J. Invest. Dermatol. 106: 673-678
- Wintzen M, Zanello BS, Holick MF, Wiegant VM, Burbach JPH, Vermeer BJ (2000)
Condition-dependent presence of β -lipotropin-like peptide in human keratinocytes
Peptides 21:691-697
- Wintzen M, de Winter S, Out-Luiting JJ, van Duinen SG, Vermeer BJ (2001)
Presence of immunoreactive beta-endorphin in human skin
Exp. Dermatol. 10:305-311
- Woods JA, Shahabi NA, Sharp BM (1997)
Characterization of a naloxone-insensitive β -endorphin receptor on murine peritoneal macrophages
Life Sciences 60:573-586
- Ye S, Applegren RR, Davis JM, Cheung HT (1989)
Modulation of lymphocyte motility by β -endorphin and met-enkephalin
Immunopharmacology 17:81-89

Zimber A, Chedeville A, Abita JP, Barbu V, Gespach C (2000)
Functional interactions between bile acids, all-trans retinoic acid and 1,25-dihydroxy-
vitamin D₃ on monocytic differentiation and myeloblastin gene down-regulation in
HL60 and THP-1 human leukemia cells
Cancer Research 60:672-678

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Teschemacher für die Überlassung des Themas, für seine sorgfältige wissenschaftliche Anleitung und seine stets konstruktive und entgegenkommende Betreuung.

Frau Beate Dickopf gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft und die immer tatkräftige Unterstützung in praktischen Fragestellungen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Andreas Koschinski für die Beratung und Unterstützung, insbesondere bei der Durchführung der Zellaufnahmen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Lohmeyer danke ich für die Überlassung nativer Monozyten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Rudolf-Buchheim-Institutes gilt mein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit und gute Arbeitsatmosphäre.