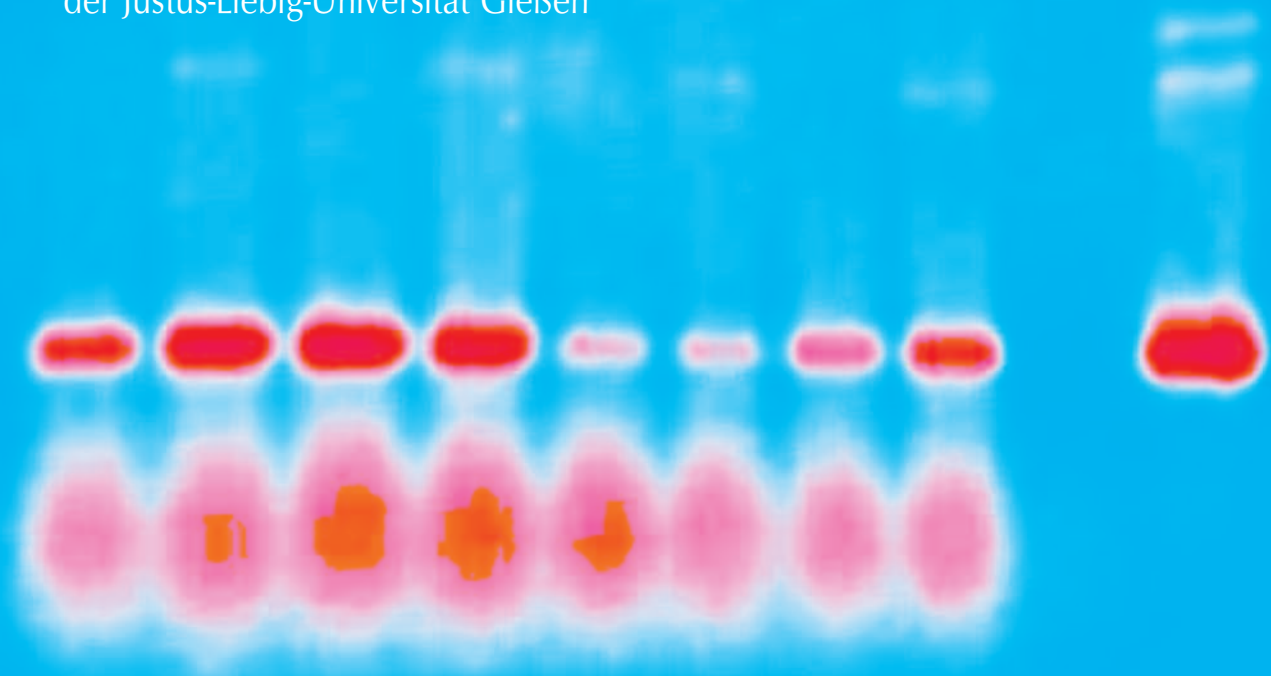


Überprüfung der Expression des Proopiomelanocortin (POMC)-Gens in HaCaT- und A 431-Zellkulturen unter Basal- und Stimulationsbedingungen

KATHRIN WAGNER

INAUGURAL-DISSERTATION

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



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

**Überprüfung der Expression des Proopiomelanocortin
(POMC)-Gens in HaCaT- und A 431-Zellkulturen unter
Basal- und Stimulationsbedingungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

KATHRIN WAGNER

aus Rudolstadt

Gießen 2004

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

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

Gutachter: PD Dr. R. Haberberger

Tag der Disputation: 22.04.2005

3.3 Geräte und Zubehör.....	20
3.3.1 Zellkultivierung und -stimulation.....	20
3.3.2 Untersuchungen zur POMC-Genexpression.....	21
3.3.3 Aufarbeitung von Zellkulturüberständen und Zellen für die Extraktion von POMC-Derivaten	21
3.3.4 Entwicklung und Durchführung von RIAs	22
3.4 Zelllinien.....	22
3.5 Software	22
4 METHODEN.....	23
4.1 Zellkultur	23
4.1.1 Zelllinien.....	23
4.1.1.1 Keratinozytenzelllinie HaCaT	23
4.1.1.2 Humane epidermale Karzinomzelllinie A 431.....	23
4.1.1.3 Bronchialkarzinomzelllinie DMS 79.....	23
4.1.2 Züchtung der Zelllinien HaCaT, A 431 und DMS 79	23
4.2 Stimulation der Zellen	24
4.2.1 Unterschiedliche Glucosekonzentrationen.....	25
4.2.2 Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)	25
4.2.3 Haloperidol	26
4.3 Überprüfung der Expression des hypophysären POMC in HaCaT- und A 431-Zellkulturen	26
4.3.1 Grundlagen der PCR.....	26
4.3.2 Gewinnung von mRNA.....	27
4.3.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA.....	27
4.3.2.2 Überprüfung des RNA-Extrakts mittels Northern Blot	27
4.3.3 RT-PCR.....	27
4.3.3.1 Reverse Transkription der Gesamt-RNA, Amplifikation von Nukleotidsequenzen der hypophysären POMC-cDNA	28

4.3.3.2 Agarosegel-Elektrophorese	30
4.3.3.3 Standardisierung des Verfahrens	30
4.4 Überprüfung der Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten in HaCaT- und A 431-Zellkulturen	31
4.4.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen für die Bestimmung von POMC-Derivaten.....	31
4.4.2 Gewinnung von Zellmaterial für die Bestimmung von POMC-Derivaten.....	31
4.4.2.1 Ablösen der Zellen	31
4.4.2.2 Lyse der Zellen	31
4.4.2.3 Vorbereitung der Zellysate zur Extraktion.....	32
4.4.3 Zellzählung	32
4.4.4 Standardisierung des Verfahrens zur Bestimmung von POMC-Derivaten.....	32
4.4.4.1 Filtration von Zellkulturüberständen und Zellysaten.....	33
4.4.4.2 Erstellung von Standardkurven	33
4.4.5 Extraktion	34
4.4.6 Fluid-phase-one-site-Radioimmunoassays (FP-RIAs).....	35
4.4.6.1 Prinzip und Durchführung	35
4.4.6.2 Entwicklung von zwei FP-one-site RIAs zur Bestimmung von α -MSH- und CLIP-immunoreaktivem Material (IRM).....	38
4.4.6.2.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen α -MSH und CLIP	38
4.4.6.2.1.1 Antigene	38
4.4.6.2.1.2 Versuchstiere.....	39
4.4.6.2.1.3 Kopplung des Antigens an ein Trägerprotein.....	39
4.4.6.2.1.4 Immunisierung.....	40
4.4.6.2.1.5 Blutentnahmen	40
4.4.6.2.1.6 Herstellung radioaktiv markierter Peptide	41
4.4.6.2.1.7 Titerbestimmung.....	41
4.4.6.2.1.8 Auswahl und Lagerung der Antiseren	41
4.4.6.3 Charakterisierung der neu entwickelten RIAs	41
4.4.6.3.1 Reproduzierbarkeit („inter-assay coefficient of variation“)......	42

4.4.6.3.2 Präzision („intra-assay coefficient of variation“)	42
4.4.6.3.3 Nachweisgrenze („detection limit“)	42
4.4.6.3.4 Spezifität („cross reactivities“)	43
4.4.6.4 Durchführung der neu entwickelten RIAs	43
4.4.6.4.1-MSH-IRM	43
4.4.6.4.2 CLIP-IRM	43
4.4.6.5 Bereits entwickelte RIAs zur Bestimmung von β_{H} -Endorphin-IRM und N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM	44
4.4.6.5.1 β_{H} -Endorphin-IRM	44
4.4.6.5.2 N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM	44
5 ERGEBNISSE	45
5.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung: Charakteristika der neu entwickelten RIAs zur Bestimmung von α -MSH- und CLIP-IRM	45
5.1.1 RIA zur Bestimmung von α -MSH-IRM	45
5.1.2 RIA zur Bestimmung von CLIP-IRM	47
5.2 Ausschluß der Expression des hypophysären POMC in HaCaT-Zellen	51
5.2.1 Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens unter Basal- oder Stimulationsbedingungen	52
5.2.2 Ausschluß der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten unter Basal- oder Stimulationsbedingungen	56
5.2.2.1 Stimulation mittels Glucosedefizit	56
5.2.2.2 Stimulation mittels Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)	64
5.2.2.3 Stimulation mittels Haloperidol	68
5.3 Ausschluß der Expression des hypophysären POMC in A 431-Zellen	72
5.3.1 Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens unter Basal- oder Stimulationsbedingungen	73
5.3.2 Ausschluß der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten unter Basal- oder Stimulationsbedingungen	76
5.3.2.1 Stimulation mittels Glucosedefizit	76
5.3.2.2 Stimulation mittels Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)	79

5.3.2.3 Stimulation mittels Haloperidol.....	83
6 DISKUSSION	87
6.1 Methoden	87
6.1.1 Methoden zur Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens	87
6.1.1.1 Zelllinien.....	87
6.1.1.2 Stimulation.....	88
6.1.1.3 RNA-Extraktion.....	89
6.1.1.4 RT-PCR-Kit.....	89
6.1.1.5 Primer.....	90
6.1.1.6 Kontrollen	90
6.1.2 Methoden zur Überprüfung der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten	91
6.1.2.1 Zellen und Zellüberstände.....	91
6.1.2.2 POMC-Derivate	92
6.1.2.2.1 Gewinnung von Antiseren gegen α -MSH und CLIP	92
6.1.2.2.1.1 Charakteristika des α -MSH-RIAs	93
6.1.2.2.1.2 Charakteristika des CLIP-RIAs.....	95
6.1.2.2.2 Bereits vorhandene RIAs	96
6.2 Ergebnisse	97
6.2.1 Expression des hypophysären POMC-Gens.....	97
6.2.2 Ausschluß der Freisetzung von POMC-Derivaten	103
6.3 Kontroverse Literaturdaten: Einordnung der eigenen Ergebnisse	104
7 ZUSAMMENFASSUNG	109
8 SUMMARY	111
9 LITERATURVERZEICHNIS	113

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Aminosäuren:

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

weitere Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ak	Antikörper
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
B ₀	Nullstandard
BDB	Bis-diazobenzidine
Bl	Leerwert (Blank)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

°C	Grad Celsius
CDI	(1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid
cDNA	Komplementäre DNA
ca.	circa
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
cpm	counts per minute (gemessene Zerfälle eines Radioisotops pro Minute)
CT	Total counts (insgesamt eingesetzte Radioaktivität pro Ansatz)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	10^{-15} , femto
FCS	Fetales Kälberserum
FP-RIA	Fluid phase one-site-Radioimmunoassay
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
h	Stunde
IRM	Immunoreaktives Material
kg	Kilogramm
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
M	molar
μ	10^{-6} , mikro
min	Minute
NHK	normale humane Keratinozyten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-RNA)
N	normal
PBS	Phosphate-buffered Saline
PC1, PC2	Prohormon-Konvertase 1, Prohormon-Konvertase 2
PCR	polymerase chain reaction
pH	Potencia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)

POMC	Proopiomelanocortin
RT	reverse Transkription
s	Standardabweichung
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
V	Variationskoeffizient
V_r	relativer Variationskoeffizient
$X_{(\text{mean})}$	Mittelwert

1 EINLEITUNG

1.1 Expression des Proopiomelanocortin (POMC)-Gens beim Menschen

Proopiomelanocortin (POMC) ist das Precursormolekül für eine Reihe bioaktiver Peptide, die in der menschlichen Hypophyse und in peripheren Geweben gefunden wurden. Dazu gehören unter anderen Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), β -Endorphin, β -Lipotropin (β -LPH), α -, β - und γ -Melanotropin (-MSH) und corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP).

Das POMC-Gen ist mehr als 500 Millionen Jahre „alt“ und kommt wahrscheinlich schon bei Würmern, Mollusken, Gliederfüßlern und sogar Einzellern vor (Deneff et al., 1998; Salzet et al., 1997; LeRoith et al., 1982).

Das menschliche POMC-Gen umfaßt 7665 Basenpaare, ist auf Chromosom 2 (p23) lokalisiert und besteht aus 3 Exons und 2 Introns (Abb. 1). Exon 1 enthält eine nicht-kodierende Region, Exon 2 kodiert hauptsächlich das für zelluläre Translokation und Sekretion wichtige N-terminale Signalpeptid und Exon 3 die verschiedenen bioaktiven Peptide (Bertagna et al., 1994; Höllt et al., 1993).

Die Umschreibung (Transkription) des POMC-Gens in mRNA erfolgt im menschlichen Organismus in Abhängigkeit vom Ort seiner Expression.

In der menschlichen Hypophyse führt der Transkriptionsprozeß zu einer mRNA von 1072 Basen (Takahashi et al., 1983). Die Translation zum Protein führt dann zum 267 Aminosäurereste umfassenden Prä-POMC und die Abspaltung des Signalpeptids vom N-Terminus führt schließlich zum 241 Aminosäuren umfassenden POMC (Bertagna et al., 1994; Höllt et al., 1993).

Die Expression in den peripheren Geweben unterscheidet sich sowohl qualitativ als auch quantitativ von der hypophysären Expression. Während das POMC-Gen in der Hypophyse und im ZNS abzüglich der Introns vollständig (ca. 1,1 Kilobasen) transkribiert wird, ist das Transkript in den peripheren Geweben mit

meist nur 0,8-0,9 Kilobasen deutlich kürzer. Dem Translationsprodukt dieses kurzen Transkripts fehlt nach dem derzeitigen Kenntnisstand das N-terminale Signalpeptid, welches unter anderem für das Ausschleusen aus dem Synthesekompartiment verantwortlich gemacht wird (Autelitano et al., 1989; Lacaze-Masmonteil, 1987). Es ist also anzunehmen, daß im peripheren Gewebe exprimiertes POMC eher lokal, also intrazellulär, einen Funktionsbereich hat.

Lange Transkripte außerhalb der Hypophyse wurden beim Menschen unter anderem in ACTH-bildenden Tumoren (Clark et al., 1989; deKreyzer et al., 1985) gefunden. Auch die Prozessierung dieser Transkripte erfolgt offensichtlich anders als in der Hypophyse.

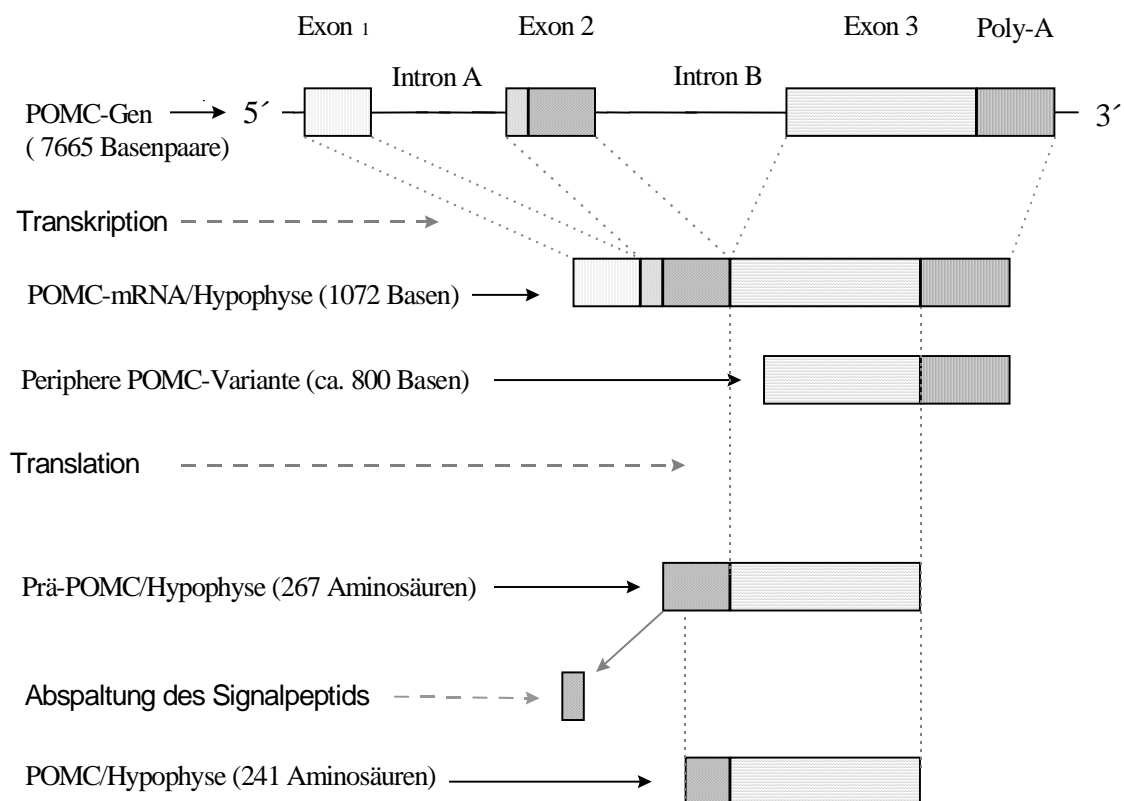


Abb. 1 Expression von Proopiomelanocortin beim Menschen: Transkription des POMC-Gens (DNA) in POMC-mRNA, Translation der POMC-mRNA in die Aminosäuresequenz des Prä-POMC und Überführung des Prä-POMC unter Abspaltung des Signalpeptids in POMC (nach: Teschemacher, 2003)

1.2 Vorkommen des POMC im menschlichen Organismus

Der ursprünglich untersuchte Ort der POMC-Expression war die Hypophyse. Die Existenz von POMC-mRNA und POMC-Derivaten außerhalb der Hypophyse wurde jedoch später von vielen Autoren beschrieben. POMC findet sich im Hypothalamus, in der Amygdala und in der Großhirnrinde. Zum endokrinen System gehörend sind männliche und weibliche Gonaden (Chen et al., 1986) und die Placenta (Grigorakis et al., 2000 zu nennen. Außerdem wurden POMC und seine Derivate in Zellen des Immunsystems, wie Monozyten/Makrophagen der Hoden (Pintar et al., 1984), in der Lunge, sowie in Bronchialkarzinomen und in der Milz, in Thymozyten bzw. T-Zellen (Blalock et al., 1985) und in Thy-1+Zellen (Farooqui et al., 1995) sowie in Geweben der inneren und äußeren Körperbegrenzung, d.h. in der Haut (Slominski et al., 2000a, 2000b, 1998, 1995, 1993, 1992; Luger et al., 1999a, 1999b, 1998; Chakraborty et al., 1996; Schauer et al., 1994;) und im Gastrointestinaltrakt sowie in für die Steuerung von Stoffwechsel und Wasser- und Elektrolythaushalt relevanten Organen (Leber, Niere) gefunden (Zhou et al., 1993; DeBold et al., 1988, 1982).

1.2.1 Hypophyse

Expression und post-translationale Prozessierung des POMC wurden am Beispiel des hypophysären POMC am genauesten untersucht (Abb. 2).

POMC-mRNA wurde erstmals mittels Northern Blot 1979 aus dem Hypophysenmittellappen von Rindern isoliert (Nakanishi et al., 1979). Bis zu diesem Zeitpunkt gab es nur radioimmunologische und immunhistochemische Nachweismethoden für POMC und seine Fragmente.

1.2.1.1 Corticotrophes und melanotrophes System

POMC unterliegt posttranslationalen Spaltungsmechanismen (Abb. 2). Die Prozessierung des POMC erfolgt mittels zweier unterschiedlicher Enzymsysteme, dem corticotrophen, welches sich bei niederen Säugern wie der Ratte in

corticotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens befindet, und dem melanotropen System, welches bei der Ratte in melanotropen Zellen des Hypophysenmittellappens lokalisiert ist (Bertagna et al., 1994).

Beim erwachsenen Menschen ist der Hypophysenmittellappen nicht mehr vorhanden, eine klare anatomische Trennung des corticotrophen vom melanotropen System gibt es nicht mehr. Trotzdem verfügt der Mensch über beide Prozessierungssysteme, die nach wie vor unterschiedlich reguliert und beide von Zellen des Hypophysenvorderlappens exprimiert werden (Teschmacher, 2003).

Durch das corticotrophe Enzym-System der Hypophyse wird POMC in einige wenige Fragmente wie das N-terminale 16K-Fragment, ACTH und β -LPH gespalten, wobei ein kleiner Teil von β -LPH wiederum in β -Endorphin und γ -LPH gespalten wird (Abb. 2) (Bertagna et al., 1994; Zhou et al., 1993). Diese Spaltungsprozesse erfolgen hauptsächlich durch das Enzym Prohormon-Konvertase 1 (PC1). Die Weiterprozessierung in kleinere Fragmente durch das melanotrophe Enzym-System erfolgt über die Prohormon-Konvertase 2 (PC2). Zu dieser „melanotropen“ Gruppe der POMC-Derivate gehören α -, β - und γ -MSH, joining peptide, corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) und β -Endorphin-Fragmente (Abb. 2). Diese POMC-Derivate werden weiter modifiziert. ACTH wird N-terminal, soweit nicht bereits erfolgt, phosphoryliert (Mains et al., 1983), joining peptide und α -MSH werden C-terminal amidiert (Seidah et al., 1981) und die β -Endorphin-Fragmente und α -MSH werden N-terminal acetyliert. Die Amidierung führt im Falle von α -MSH zur biologischen Aktivierung, die anschließende N-terminale Acetylierung erhöht die Aktivität von α -MSH (Slominski et al., 2000a). Im Gegensatz dazu verlieren die β -Endorphin-Fragmente durch den N-Acetylierungsschritt ihre Opioid-Aktivität, für die der N-Terminus verantwortlich ist (Slominski et al., 2000a).

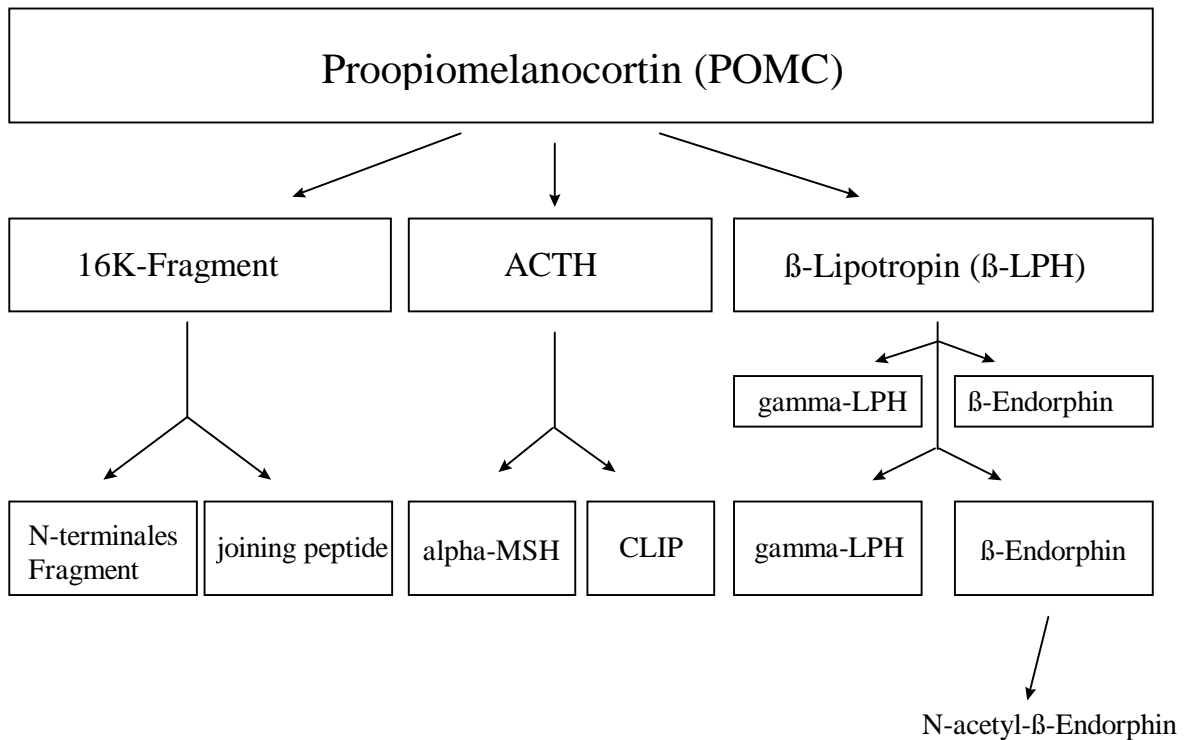


Abb. 2 Domänen und Prozessierung des POMC

In der Mitte des POMC-Moleküls liegt das aus 39 Aminosäureresten bestehende ACTH, welches in α -MSH und CLIP gespalten werden kann. Der C-Terminus des POMC entspricht dem 31 Aminosäurereste umfassenden β -Endorphin, welches wiederum aus β -Lipotropin abgespalten wird und durch das melanotrophe Enzymsystem in kleinere, im weiteren Verlauf der Prozessierung N-Acetylierte Fragmente umgewandelt wird. Das 16K-Fragment entspricht dem N-Terminus des POMC und wird seinerseits in N-terminales Fragment, joining peptide und γ -MSH gespalten.

Auch in den peripheren Geweben ist die Prozessierung von POMC nach corticotrophem und melanotrophem Muster offenbar möglich (Teschemacher, 2003). Die dafür notwendigen Prohormonkonvertasen wurden auch in der Peripherie gefunden (Schiller et al. 2001; Bloomquist et al., 1991; Lindberg et al., 1991). Einzelheiten hierzu sind bislang jedoch unbekannt.

1.2.1.2 Stimulatoren und Repressoren der Freisetzung von POMC-Derivaten

Die Produktion und Sekretion von POMC-Derivaten in das kardiovaskuläre Kompartiment wird multihormonal kontrolliert. Hauptstimulatoren sind Corticotropin Releasing Hormone (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP) (Slominski et al., 2000a; Kjaer, 1996; Saland et al., 1992); weitere Stimulatoren sind Serotonin, Oxytocin, Bradykinin, Interleukine 1, 2 und 6, $TNF\alpha$ (Tumornekrosefaktor α), $INF\gamma$ (Interferon γ), Leptin (Slominski et al., 2000a), Haloperidol (Roubos, 1997; Jaber et al., 1994) und TRH (Schwartz et al., 2002; Vazquez-Martinez et al., 2001; Roubos, 1997; Ishibashi et al., 1981). Die Freisetzung der POMC-Derivate erfolgt offenbar nicht gleichmäßig, sondern periodisch (Tag/Nacht-Rhythmus der ACTH- und damit Cortisolausschüttung). Zur Freisetzung führen weiterhin entzündliche oder maligne Krankheitszustände. Die stärksten wirksamen Freisetzungstimulatoren sind körperliche und psychische Belastungssituationen, z.B. azidotische Zustände, wie sie beim Extremsport (Harbach et al., 2000; Schulz et al., 2000; Taylor et al., 1994) oder Mangelernährung (Leonhardt et al., 2002; Sebaai et al., 2002; Torri et al., 2002; Chisari et al., 2001; Giovambattista et al., 2000; Jacobson et al., 1997;) vorkommen. Ein Glucosedefizit kann ebenfalls zu einer Stimulation der Freisetzung von POMC-Derivaten führen. Dies wurde bislang jedoch nur indirekt beschrieben (Gunzo et al., 1994; Zelissen et al., 1991). Auch bei Schmerzen (Matejec, 2002) wurden erhöhte Mengen an POMC-Derivaten im Plasma gemessen.

Als Repressoren fungieren Glucocorticoide im Sinne einer negativen Rückkopplung im Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde, GABA (γ -Amino-Buttersäure)- (Roubos, 1997; Dotman et al., 1996; Torpy et al., 1995; ; Saland et al., 1992; Schurmeyer et al., 1987; Wilkins et al., 1986) und Dopamin-Agonisten (Roubos, 1997; Dotman et al., 1996; Kjaer, 1996; Murburg et al., 1993; Saland et al., 1992; Meador-Woodruff et al., 1990), Glucoseüberschuß (Gunzo et al., 1994; Zelissen et al., 1991) sowie PGE_2 (Prostaglandin) (Slominski et al., 2000a).

Das POMC-System unterliegt offenbar sowohl zentral als auch in der Peripherie komplizierten Regulationsmechanismen. Welche Stimulatoren unter welchen Bedingungen zur Expression des POMC-Gens und zur Ausschüttung von POMC-Derivaten in peripheren Geweben oder im ZNS führen, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt.

1.2.1.3 Funktionelle Bedeutung der hypophysären POMC-Derivate

Man geht davon aus, daß es sich beim POMC-System um ein komplexes „Streß“-Adaptationssystem des Organismus handelt. POMC-Derivate werden unter Streß-Bedingungen ins Blut freigesetzt, ohne daß man ihren Wirkungen bisher eine bestimmte Funktion zuordnen kann.

Für ACTH gibt es die einzige, wenn auch sehr widersprüchliche Erklärung über den Zusammenhang zwischen Stimulatoren der Freisetzung und Effekten der freigesetzten Verbindungen: Wird der Organismus einem „Stressor“ ausgesetzt, kommt es zur ACTH-Ausschüttung aus der Hypophyse mit der Folge der Freisetzung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde. Diese haben Wirkung auf Stoffwechsel und Mineralhaushalt und bewirken die Suppression des Immunsystems. Welchen Sinn eine Immunsuppression im Falle von Verletzung, Schmerzen, Angst, Gewebeerstörung oder extremer körperlicher Belastung (wenn man diese Ereignisse als „Streß“ definiert) hat, bleibt offen.

α -MSH und β -Endorphin sind wohl nach ACTH die meistuntersuchten Derivate des POMC im menschlichen Organismus. α -MSH scheint eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Immunsystem und neuroendokrinem System zu spielen. Es besitzt lokal antiinflammatorische (Oktar et al., 2002; Lipton et al., 1999, 1993) und zentral antipyretische (Huang et al., 1997; Feng et al., 1987) Eigenschaften. Es ist als Interleukin-1-Antagonist (Oktar et al., 2002; Dayers et al., 1987) beschrieben. Ein Einfluß von α -MSH auf Verhalten, Lernen und Gedächtnis (Eberle, 1988; DeWied et al., 1982) ist beschrieben worden. Weiterhin spielt es eine Rolle im Leptin-Regelkreis (Schwartz et al., 2000). Erhöhte Serumspiegel an α -MSH fanden sich bei Menschen mit fortgeschrittenen Melanomen (Ghanem et al., 1986).

β -Endorphin löst ebenfalls eine Reihe von Effekten an Zellen des Immunsystems aus (Teschemacher et al., 1990). Die angebliche analgetische Wirkung von unter Stress ins Blut freigesetztem β -Endorphin ist aber bis heute nicht bewiesen (Matejec et al., 2003; Teschemacher, 2003).

Über die Bedeutung von β -Lipotropin, joining peptide und CLIP im menschlichen Organismus weiß man zum gegenwärtigen Zeitpunkt nichts.

Alle oben genannten Peptide entstehen aus dem gleichen Precursormolekül, POMC. Es ist also anzunehmen, daß sie ähnliche Aufgaben haben wie die anderen POMC-Derivate, d.h. ACTH oder β -Endorphin.

1.2.2 Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und als äußere Körperbegrenzung einer Vielzahl von Stressoren (mechanische und chemische Schädigung, Strahlung, etc.) ausgesetzt. Es müssen also im Organismus Mechanismen zur Verfügung stehen, um durch diese Einflüsse entstandene Zellschäden zu reparieren.

Es wurde berichtet, daß in der Haut unter bestimmten Umständen das POMC-Gen exprimiert und POMC-Derivate prozessiert würden. Die notwendigen Prohormon-Konvertasen wurden nachgewiesen (Schiller et al. 2001; Bloomquist et al., 1991; Lindberg et al., 1991). Auch für Hautzellen (NHK), pathologisch veränderte Hautzellen (Basalzellcarzinom) und Hautzelllinien (A 431) wurde die POMC-Genexpression bzw. die Freisetzung von POMC-Derivaten beschrieben (Wintzen et al., 2001, 2000, 1996; Chakraborty et al., 1999, 1996; Luger et al., 1999a, 1999b, 1998; Farooqui et al., 1998; Slominski et al., 1995, 1993; Schauer et al., 1994). UV-Bestrahlung wurde als Stimulus für die Expression des POMC-Gens sowie die Freisetzung von POMC-Derivaten an der Haut beschrieben (Wintzen et al., 2001, 2000, 1996; Chakraborty et al., 1999, 1996; Schauer et al., 1994).

1.2.2.1 Expression des POMC-Gens in der Haut, in isolierten Hautzellen und in Hautzelllinien

Die Expression des POMC-Gens in der Haut wurde erstmals bei Mäusen beschrieben (Slominski et al., 1992, 1991). Schauer und Kollegen beschrieben den Nachweis eines POMC-spezifischen Transkripts (1.3 kb) in normalen humanen Keratinozyten (NHK) und in A 431-Zellkulturen mittels Northern Blot Analyse nach Stimulation mit UV-Bestrahlung und Interleukin-1 (IL-1) (Schauer et al., 1994). Etwa zeitgleich wiesen auch andere Gruppen POMC-mRNA mittels Northern Blot in menschlichen Keratinozyten (Chakraborty et al., 1996; Wintzen et al., 1996; Slominski et al., 1995, 1993) und Melanozyten (Funasaka et al., 1999; Farooqui et al., 1998; Slominski et al., 1998; Wakamatsu et al., 1997) nach. Im selben Jahr wurde über den Nachweis von humaner hypophysärer POMC-mRNA in menschlicher Haut mit spezifischen Primern (beide Primer entsprechen Nucleotidsequenzen im Exon 3) (Slominski et al., 1995) berichtet. Mit dem gleichen Primerpaar wurde auch in NHK POMC-mRNA, auch hier stimuliert durch UV-Bestrahlung, beobachtet (Chakraborty et al., 1999).

In der anagenen Phase des Haarzyklus der Maus wurde POMC-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen (Ermak et al., 1997). Dieser Nachweis gelang jedoch nur mit einem von drei eingesetzten Primerpaaren, dessen Nucleotidsequenzen wiederum beide auf Exon 3 lokalisiert waren. Der Nachweis gelang nicht mit Intron A (Primer aus Exon 1 und Exon 3) bzw. Intron B (Primer aus Exon 2 und Exon 3) übergreifenden Primerpaaren (Ermak et al., 1997). Über den POMC-mRNA-Nachweis mittels Intron B (Primer aus Exon 2 und 3) übergreifenden Primerpaaren in menschlicher Haut liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur widersprüchliche Daten vor. Wintzen et al., (1996) veröffentlichten eine Arbeit, in der sie die Expression von POMC in NHK beschrieben. Diese Ergebnisse konnten 4 Jahre später von der gleichen Gruppe so nicht bestätigt werden. Es wurde eine Abhängigkeit der POMC-Expression vom Kulturmedium beschrieben. Nur in einem von fünf Kulturmedien, unter nährstoffarmen Bedingungen, ließen sich geringe Mengen an POMC-Derivaten nachweisen (Wintzen et al., 2000).

Can et al., (1998) veröffentlichten Daten, die die Expression einer POMC-Nucleotidsequenz von 300 bp in menschlichen normalen Melano- und Keratinozyten belegten; sie zeigte jedoch nur 85% Übereinstimmung mit der menschlichen hypophysären POMC-cDNA. Die Arbeitsgruppe wurde von Ancans et al., (1998) kritisiert. Ancans et al., (1998) argumentierten, es müsse sich um eine Verunreinigung mit Mäuse-DNA handeln, da die nachgewiesene POMC-Sequenz zu 100% der von Mäusen entspreche. „Aufgrund der Versuchsanordnung sei eine Verunreinigung mit Maus-DNA extrem unwahrscheinlich“, konterten Farooqui et al., (1998). AT 20 Zellen (aus einer Mäuse-Hypophysenzelllinie) seien zwar als Positivkontrolle benutzt worden, die Sequenzanalysen seien aber ohne Einsatz dieser Zellen mehrmals in unterschiedlichen Laboratorien wiederholt worden und hätten alle das gleiche Ergebnis erbracht. Wahrscheinlich sind diese Resultate mit der Existenz eines nicht mit dem hypophysären POMC-Gen übereinstimmenden, bislang unbekanntem POMC-Gen der Haut des Menschen zu erklären. Auch als Erklärungsansätze für die unaufgeklärten Mechanismen der POMC-Transkription in der Peripherie könnte das von Can et al., (1998) beschriebene Phänomen dienlich sein. Sollte es tatsächlich ein -auf die Hypophyse bezogen- aberrantes POMC-Gen in der Haut geben, was nach Farooqui et al., (1998) anzunehmen ist, wäre vorstellbar, daß in der Tat Prozessierungsprodukte des Translationsproduktes dieses POMC-Gens nachgewiesen werden können, soweit sie nur zufällig mit denjenigen des hypophysären POMC-Gens identisch sind; die aberrante POMC-mRNA muß dabei mit den „hypophysären Primern“ nicht nachweisbar sein. Vice versa wäre auch der Nachweis des aberranten Gens möglich, ohne daß Prozessierungsprodukte des aberranten Proteins nachweisbar würden, wenn sie mit den hypophysären nicht identisch sind.

1.2.2.2 Freisetzung von POMC-Derivaten in der Haut, sowie aus Hautzellen und Hautzelllinien

Thody fand 1983 erstmals ein POMC-Derivat in menschlicher Haut - α -MSH in Melanomzellen (Thody et al., 1983). In gesunder Haut wurden bislang keine POMC-Derivate gefunden. Lediglich Furkert et al., (1997) gelang mittels RP-HPLC und RIA der Nachweis von unterschiedlichen β -Endorphin-IRM-Konzentrationen in der Haut von C57BL/6-Mäusen während des Haarzyklus'. β -Endorphin wurde ausschließlich in den Talgdrüsen und nur während der anagenen Phase des Haarzyklus gefunden. Es konnte in keiner anderen Hautstruktur nachgewiesen werden (Furkert et al., 1997). Dies könnte ein Beleg dafür sein, daß die Freisetzung von POMC-Derivaten nicht kontinuierlich erfolgt, sondern physiologischen Schwankungen unterliegt. Ebenso scheint die Freisetzung von POMC-Derivaten in der Haut an Krankheitszustände geknüpft zu sein. Slominski et al., (1993) zeigten ein gehäuftes Vorkommen von POMC-Derivaten bei Hauterkrankungen, wie Psoriasis, Basalzellkarzinom, Melanom, Keloid-Gewebe und narbiger Alopezie. Auch diese Gruppe fand in normaler, gesunder Haut keine POMC-Derivate. Viele Gruppen berichteten über die Entdeckung von POMC-Derivaten in Hautzellen, wie z.B. menschlichen Keratinozyten (Wintzen et al., 2001, 2000, 1996; Slominski et al., 2000a, 2000b, 1998, 1995, 1993; Wakamatsu et al., 1997; Chakraborty et al., 1996; 1995; Schauer et al., 1994), Melanozyten (Nagahama et al., 1998; Chakraborty et al., 1996; Farooqui et al., 1993) und Hautzelllinien, wie der Zelllinie A 431 (Schauer et al., 1994) sowie in Hautbiopsien pathologisch veränderter Haut (Slominski et al., 1999, 1998, 1993).

Auch die Freisetzung von POMC-Derivaten unterliegt offenbar den für die Genexpression schon beschriebenen komplizierten Regulationsmechanismen. Wintzen und Kollegen widerlegten 2000 praktisch ihre eigene Arbeit von 1996, in der die ständige gleichmäßige Freisetzung der POMC-Derivate β -Endorphin und β -LPH in NHK und deren Hochregulation durch Stimulation mit UV-Bestrahlung und IL-1 beschrieben ist. In der Arbeit von 2000 konnte nur unter einer von fünf

Kulturbedingungen eine geringe β -Endorphin-IRM-Konzentration nachgewiesen werden. Auch hier wurde der verstärkende Effekt von UV-Bestrahlung beschrieben (Wintzen et al., 2000, 1996). 2001 gelang ihnen der Nachweis von β -Endorphin-IRM mittels immunhistochemischer Verfahren in UV-bestrahlter menschlicher Haut, auch hier jedoch nur in follikulären Keratinozyten und Schweißdrüse, nicht in epidermalen Keratinozyten (Wintzen et al., 2001). Die Freisetzung von POMC-Derivaten sowohl in der Haut als auch in Zellkulturen von Hautzellen scheint zudem von unterschiedlichen Stimulatoren abhängig zu sein. Luger et al., (1999b) fanden unter basalen Bedingungen keine POMC-Derivate in menschlichen Keratinozyten. Bestimmte Reize scheinen diese Zellen jedoch zur Produktion von POMC-Derivaten anregen zu können. So beschrieben Luger et al., (1999b) nach Stimulation der Keratinozyten mit UV-Licht den Nachweis von α -MSH wie bereits den Nachweis von POMC-mRNA. Als weitere Stimulatoren der Freisetzung von POMC-Derivaten in Keratinozyten sind wie bereits bei der Genexpression IL-1, proinflammatorische Zytokine und Endotoxin beschrieben (Wintzen et al., 1996; Schauer et al., 1994). Unter der Annahme eines aberranten POMC-Gens in der Haut erscheint der Nachweis von Prozessierungsprodukten des Translationsproduktes dieses aberranten POMC-Gens möglich, ohne daß mit den „hypophysären Primern“ ein POMC-Gen nachweisbar sein müßte. In der bisher veröffentlichten Literatur wurde nie von etwas anderem als dem hypophysären POMC-Gen und seinen Derivaten ausgegangen. Die von der Gruppe um Farooqui 1998 veröffentlichten Daten rücken alle bisherigen Interpretationsversuche der unklaren Befunde in ein neues Licht.

1.2.2.3 Funktionelle Bedeutung von POMC-Derivaten in der Haut

Das in der Haut wohl bedeutendste POMC-Fragment ist das α -MSH. Daß α -MSH einen Einfluß auf die Regulation der Hautpigmentierung hat, wird schon lange diskutiert. Einerseits gibt es Daten, die besagen, daß α -MSH eine Dunklung der menschlichen Haut bewirkt, andererseits wurde von einigen Gruppen berichtet, daß α -MSH keinen Einfluß auf die Melanogenese von Melanozytenkulturen hat. Es sieht so aus, als seien die Kulturbedingungen der Melanozyten dafür

verantwortlich, daß unter bestimmten Bedingungen ein Ansprechen der Zellen auf α -MSH gefunden wurde und in anderen Fällen nicht (Thody et al., 1998). Hinsichtlich einer melanogenen Wirkung von α -MSH sollte bedacht werden, daß α -MSH von der Hypophyse nur in sehr kleinen Mengen produziert wird. ACTH, welches in der Haut ebenso wie α -MSH an den Melanocortin (MC-1)-Rezeptor (welcher wiederum für die Regulation der Hautdunklung verantwortlich ist) bindet, wird dagegen in sehr viel größeren Mengen produziert. Es liegt also die Vermutung nahe, daß auch in der Hypophyse gebildetes ACTH an der Melanogenese beteiligt sein könnte (Thody et al., 1998).

α -MSH wird weiterhin eine lokal antiinflammatorische und antiinvasive Wirkung zugesprochen (Eves et al., 2003). Es gab Versuche an Mäusen, die zeigten, daß sowohl eine lokale als auch eine systemische Behandlung mit α -MSH das Entstehen einer Kontaktallergie hemmen konnten (Rheins et al., 1989). Sein Einfluß auf die Sekretion von Mastzellen in menschlicher Haut und damit das Auslösen akuter inflammatorischer Prozesse der Haut durch Histaminfreisetzung wurde aber ebenfalls beschrieben (Grutzkau et al., 2000). α -MSH steht im Verdacht, die Proliferation von Melanomzellen und deren Metastasierung zu stimulieren. Es wird ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von POMC-Derivaten in den erkrankten Arealen und der Progression von Melanomen vermutet (Nagahama et al., 1998). Neuere Daten sprechen für eine α -MSH-bedingte Reduktion der UV-induzierten DNA-Schäden und somit einer möglichen Melanom-Prävention durch α -MSH (Kadekaro et al., 2003).

β -Endorphin wird eine Schlüsselrolle bei der Reepithelialisierung und Geweberegeneration während der Wundheilung zugesprochen (Bigliardi et al., 2002). Weiterhin scheint β -Endorphin einen Einfluß auf das periphere Schmerzempfinden zu haben (Khodorova et al., 2003) und, ebenso wie ACTH und α -MSH, an der Regulation der Hautpigmentierung beteiligt zu sein (Kauser et al., 2003).

Die Tatsache, daß POMC-Derivate (α -MSH, ACTH und β -Endorphin) immer wieder in pathologisch veränderten Hautarealen gefunden wurden (Kono et al.,

2001; Slominski et al., 1999, 1998, 1993), spricht für einen Zusammenhang zwischen ihrer Existenz in diesen Geweben und ihrem Einfluß auf die Pathogenese von Hautveränderungen. Ob sie dabei als Ursache oder Wirkung anzusehen sind, läßt die bisher publizierte Literatur ebenso offen wie die Frage, ob sie lokal produziert und prozessiert werden, oder ob sie über das Blut aus der Hypophyse an ihren Wirkungsort transportiert werden. Auch die Frage, ob es sich überhaupt um hypophysäres POMC handelt, oder ob ein aberrantes POMC-Gen in der Haut vorliegt, muß berücksichtigt werden.

2 FRAGESTELLUNG

Über die Expression des hypophysären POMC-Gens und die Freisetzung von POMC-Derivaten aus der Hypophyse liegen sehr viele Informationen vor. „Streß“ im Sinne physischer und psychischer Belastung spielt für die Freisetzung der hypophysären POMC-Derivate eine große Rolle. Auch zur Expression des POMC-Gens und zur Freisetzung von POMC-Derivaten in der Haut gibt es eine beträchtliche Anzahl von Untersuchungen. Die Funktion der hypophysären wie der dermalen POMC-Derivate ist jedoch weitgehend unklar, auch wenn eine Reihe von Effekten von ACTH, α -MSH oder β -Endorphin bekannt sind.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, zu einigen in der Literatur aufgeworfenen Fragen weiterführende Untersuchungen durchzuführen. Anfänglich wurde der Nachweis der Expression des humanen hypophysären POMC-Gens in der Haut mittels Northern Blot mit aus Exon 3 stammenden Sonden geführt. 1995 wurde erstmals der Nachweis der Expression von humanem hypophysären POMC mittels RT-PCR mit aus Exon 3 des hypophysären POMC stammenden Primern beschrieben (Slominski et al, 1995). Die in dieser Arbeit von Slominski verwandten Primer waren Grundlage sehr vieler Arbeiten in den darauf folgenden Jahren. Dabei wurde immer davon ausgegangen, daß es sich bei der gefundenen POMC-mRNA um ein Transkript des hypophysären POMC-Gens handelte. Mit Primern, die Intron A und B (Primer aus Exon 1 und 3) bzw. Intron B (Primer aus Exon 2 und 3) des hypophysären POMC übergriffen, also die Nukleotidsequenz einschlossen, die für das auf Exon 2 gelegene Signalpeptid codiert, konnten jedoch keine positiven Befunde erhoben werden. Dies gelang erstmals 1998, als mit Exon 2 und 3 übergreifenden Primern in Keratino- und Melanozyten ein POMC-Gen gefunden wurde, bei dem es sich offenbar um ein (bezogen auf das hypophysäre) aberrantes POMC-Gen handelte. Dieser Befund führte erstmals zur Beachtung der Tatsache, daß bis zu diesem Zeitpunkt der Nachweis hypophysärer POMC-mRNA oder der Nachweis hypophysärer POMC-Derivate in der Haut immer auf (nur einigen) Primerpaaren aus der hypophysären Exon-3-Nukleotidsequenz oder auf POMC-Derivate aus dem Exon-3-Bereich des hypophysären POMC

gerichteten Antikörpern beruht hatte. Diese Daten sorgten für kontroverse Diskussionen, gaben schlußendlich aber Anhalt zu der Annahme, daß in der Haut eine Variante des hypophysären POMC existiert. Als Beitrag zur Klärung dieser Diskrepanz sollten in dieser Arbeit eine Keratinozytenzelllinie (HaCaT) und eine Epidermoidzelllinie (A 431) hinsichtlich der Expression des POMC-Gens sowohl im mutmaßlich aberranten Bereich (mittels Primerpaaren aus Exon 2 und 3) als auch im mutmaßlich hypophysär-identischen Bereich (mittels Primerpaaren aus Exon 3) mittels RT-PCR untersucht werden. Weiterhin sollte nach POMC-Derivaten, d.h. den Prozessierungsprodukten des Translationsproduktes, sowohl in den Zellen, d.h. vor eventueller Freisetzung, als auch in den Zellkulturüberständen, d.h. nach eventueller Freisetzung, gesucht werden. Zur Überprüfung des letzteren sollten nicht nur bekannte, sondern auch neu entwickelte RIAs eingesetzt werden. Dabei sollte die Prozessierung über eine Bestimmung „corticotropher“ wie „melanotropher“ POMC-Derivate berücksichtigt werden: Zur Überprüfung des corticotrophen Prozessierungsweges sollte ein bereits bestehender β_{H} -Endorphin-IRM-RIA eingesetzt werden, zur Überprüfung des melanotrophen Prozessierungsweges sollten neben dem bereits etablierten N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM-RIA, zwei im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte RIAs (α -MSH-IRM-RIA und CLIP-IRM-RIA) eingesetzt werden.

Im Hinblick darauf, daß Regulationsmechanismen und Stimulatoren der Bildung und Freisetzung dermalen POMC-Derivate völlig unklar waren und sogar das Nährmedium eine Rolle zu spielen schien, sollte nicht nur die basale Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten, sondern auch der Einfluß von Stimulatoren geprüft werden. Hierfür sollten die Zelllinien mit Substanzen, die als Stimulatoren der hypophysären POMC-Expression bekannt waren, inkubiert werden. Exemplarisch sollten drei Substanzen auf ihre Wirkungen untersucht werden: TRH, mit nachgewiesener melanotroph-stimulierender Wirkung, Haloperidol, mit als Dopaminantagonist nachgewiesener melanotroph- und corticotroph-stimulierender Wirkung, und glucosedefizitäres Nährmedium unter der Vorstellung, daß Glucose melanotroph und corticotroph inhibierend wirkt.

3 MATERIAL

3.1 Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen

3.1.1 Zellkultivierung und -stimulation

Albumine, bovine (BSA)	Sigma, München
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma, München
FCS (fetal calf serum)	PAA, Cölbe/Marburg
Penicillin	Serva, Heidelberg
RPMI 1640	Sigma, München
Stimulatoren:	
D-Glucose-Monohydrat	Novabiochem, Löffelfingen
Haloperidol	Janssen-Cilag, Neuss
Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)	Bachem, Heidelberg
Streptomycin	Serva, Heidelberg

3.1.2 Untersuchungen zur POMC-Genexpression

Agarose	Roth, Karlsruhe
Bromthymolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
DNA-Marker	Prometa, Eurogentec, Belgien
Ethidiumbromid	Sigma, München
Gelatine	ICN Biochemicals Inc., Ohio
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glyoxal	Sigma, München
Isopropanol	Sigma, München
Primer:	Roth, Karlsruhe
EXO21; HPO1; HPO2; HPO10; HPO13; FARO1A; FARO1B; SLO1A; SLO1B	
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	Quiagen, Hilden
RNase freies Wasser	Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz
Thiomersal	Merck, Darmstadt
Tri-Reagent	Sigma, München
Xylene cyanol	Sigma, München

3.1.3 Aufarbeitung von Zellkulturüberständen und Zellen für die Extraktion von POMC-Derivaten

Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck, Darmstadt
Enzymhemmer:	
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Bacitracin	Serva, Heidelberg
Leupeptin N-1000	Bachem, Heidelberg
PMSF	Böhringer, Mannheim
Trypsin-Inhibitor T-9003	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
1-Propanol	Merck, Darmstadt
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Böhringer, Mannheim
Trypsin	Biochrom, Berlin

3.1.4 Entwicklung und Durchführung von RIAs

Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Albumine, bovine (BSA)	Sigma, München
Bis-diazobenzidine (1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-butamine)(BDB)	Sigma, München
Carbodiimid (1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimid) (CDI)	Sigma, München
Chloramin T	Merck, Darmstadt
Dinatriumdecaaborat (Borax)	Sigma, München
Finalgon Creme	Thomae, Ingelheim am Rhein
Freund'sches Adjuvans, complete	Behring, Marburg
Freund'sches Adjuvans, incomplete	Behring, Marburg
HCl	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Ketamin	Ratiopharm, Ulm
Keyhole limpet Hemocyanine (KLH)	Bachem, Heidelberg
NaOH	Merck, Darmstadt

Peptide (human):	
ACTH (1-10)	Peninsula, Heidelberg
ACTH (1-24)	Bachem, USA
ACTH (1-39)	Bachem, Heidelberg
ACTH (18-39) = CLIP	Bachem, Heidelberg
ACTH (18-39)	Fr. U.Friedrich, JLU Gießen
ACTH (22-39)	Fr. U.Friedrich, JLU Gießen
ACTH (29-39)	Fr. U.Friedrich, JLU Gießen
ACTH (30-39)	Fr. U.Friedrich, JLU Gießen
(Tyr ³⁵)-ACTH (35-39)	Fr. U.Friedrich, JLU Gießen
Des-Ac-N- α -MSH (ACTH 1-13)-NH ₂	Bachem, Heidelberg
Ac-N-(Tyr ⁵)- α -MSH (1-5)	Fr. U.Friedrich, JLU Gießen
(Tyr ⁹)- α -MSH (9-12)	Fr. U.Friedrich, JLU Gießen
β _H -Endorphin (1-31)	Calbiochem/Novabiochem, Löffelfingen
N-Acetyl- β _H -Endorphin (1-31)	Bachem, Heidelberg
β -MSH	Saxon Biochemicals, Hannover
γ -MSH	Bachem, Heidelberg
Salze:	
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg

3.2 Lösungen

3.2.1 Untersuchungen zur POMC-Genexpression

Agarosegel	1,2% Agarose in autoklaviertem Laufpuffer, pH 6,5 einstellen
Denaturierungslösung	127 μ l Glyoxal, 8 μ l 1M NaPO ₄ Puffer 405 μ l DMSO
Ethidiumbromid	0,05% Ethidiumbromid in H ₂ O
Laufpuffer	0,02M Na ₂ HPO ₄ , 0,02M Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O mit Phosphorsäure auf pH 6,5 einstellen
Ladungspuffer	500 μ l Glycerin 50%, 500 μ l Laufpuffer 50%, Bromphenolblau 0,25%, Xylene cyanol 0,25%

3.2.2 Aufarbeitung von Zellkulturüberständen und Zellen für die Extraktion von POMC-Derivaten

Enzymhemmercocktail für Zellkulturüberstände: vor Abpipettieren der Zellüberstände in Auffangbehälter pipettieren

Aprotinin	0,01% der Endkonzentration
PMSF	1 mM in Isopropanol
Leupeptin	10 µg/ml (1% der Endkonzentration)
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ml (1% der Endkonzentration)
Bacitracin	50 µg/ml (5% der Endkonzentration)

Enzymhemmercocktail für Zellysate: Tris-Puffer/Enzymhemmercocktail

(v:v=10:1)

Tris-Puffer	10 mM Tris in 1l H ² O lösen, pH 7,4 einstellen
Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin 0,05%, EDTA 0,02% in PBS defic

3.2.3 Entwicklung und Durchführung von RIAs

Boratpuffer:	61 g Dinatriumdecaborat (Borax), 7,6 g NaCl in 1 l H ₂ O lösen, pH 9 einstellen
PBS defic::	136,9 mM KCl, 1,5 mM NaCl, 8,1 mM K ₂ HPO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4 einstellen, auf 5 l mit Aqua bidest auffüllen, 500 ml Aliquots autoklavieren
Puffer C:	0,02 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,4, 0,02 M Na ₂ HPO ₄ , 0,15 M NaCl, 0,1% Gelatine, 0,01% BSA, 0,01% Thiomersal
Puffer D:	Puffer C, 0,1% Triton X-100, pH 7,5 einstellen

3.3 Geräte und Zubehör

3.3.1 Zellkultivierung und -stimulation

Autoklav	H&P Labortechnik GmbH, Oberschleisheim
Brutschrank	Heraeus Instruments, Inc.

Glasfaserfilter GF/B (Filteraufsatz für Spritzen)	Whatman internationalLtd., Maidstone, England
Glasmaterialien (Erlenmeyerkolben, Meßkolben, Bechergläßer, etc.)	Schott, Mainz
Mikroskop Wilkovert S	Hund GmbH, Wetzlar
Mischer 5432	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Rührer	Heidolph, Kelheim
Waagen:	
Feinwaage M5	Mettler, Zürich, Schweiz
Tischwaage AT 250	Mettler, Zürich, Schweiz
Wasserbad GFL	GFL, Hannover-Vinnhorst
Zellkulturschalen (verschiedene Größen)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge Sovall RC-5B	Du Pont, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Sovall SM24 und SS34	Du Pont Company, Newton, USA
Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg

3.3.2 Untersuchungen zur POMC-Genexpression

PCR-Gerät (Thermocycler)	Perkin Elmer, Norwalk, USA
PCR-Gelkammer	Roth, Karlsruhe

3.3.3 Aufarbeitung von Zellkulturüberständen und Zellen für die Extraktion von POMC-Derivaten

Extraktionsanlage:	
Filtrationskasten	Werkstatt des MZI, JLU Gießen
Vakuumpumpe DIVAC 2,4l	Leybold AG, Köln
Kartuschen (Sep-Pak-C18-Cartidges)	Waters, Milford, USA
Kunststoffspatel	Nunc, Wiesbaden
Lyophilisator GT 02	Leybold Heraeus, Köln
Magnetrührer, IKA	Janke und Kunkel KG, Staufen
Ultraschallbad Sonorex RK 102H	Bandelin, Berlin
Zählkammer	Kalensee, Gießen

3.3.4 Entwicklung und Durchführung von RIAs

Combitips	Eppendorf, Hamburg
Dialyseschlauch (12-16kD)	Biomol, Hamburg
Dispenser-Tips nerbe	Nerbe plus, Winsen/Luhr
Dispensetten	Brand, Melsungen
Einmalkanülen	Braun, Melsungen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Gammazähler 1282 Compugamma CS	LKB Wallac, Turku, Finnland
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen aus Polypropylen (verschiedene Größen)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator Varishaker AM 169	Dynatech, Denkendorf
Speed-vac-Konzentrator Savant RH 200-13	Savant instruments inc., Hicksville, N.Y.

3.4 Zelllinien

A 431	DSMZ, Braunschweig
HaCaT	Prof. Fusenig, KFZ Heidelberg
DMS 79	ECACC, Salisbury, Wiltshire, U.K

3.5 Software

Origin 3.5 und 5.0	Microcal, Northhampton, USA
Power point 7.0	Microsoft Corporation, USA
Word 7.0	Microsoft Corporation, USA

4 METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zelllinien

4.1.1.1 Keratinozytenzelllinie HaCaT

Bei der Zelllinie HaCaT handelt es sich um eine robuste, immortalisierte, nicht maligne epitheliale Zelllinie des adulten Menschen. Aufgrund ihrer normalen Differenzierung in vitro, wird sie als Werkzeug zum Studium der Regulation und Funktion der menschlichen Haut genutzt (Egeling, 2003; Boukamp et al., 1988).

4.1.1.2 Humane epidermale Karzinomzelllinie A 431

Bei der Zelllinie A 431 handelt es sich um eine aus einem soliden Tumor einer 85-jährigen Patientin isolierte immortalisierte epidermale Karzinomzelllinie, die epithelial als Monolayer und adhärent wächst. Die Zelllinie wurde bereits mehrfach zum Studium der Regulation und Funktion der menschlichen Haut eingesetzt (Schauer et al., 1994; Teofoli et al., 1993).

4.1.1.3 Bronchialkarzinomzelllinie DMS 79

Bei der Zelllinie DMS 79 handelt es sich um eine Zelllinie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms des Menschen, welche humanes hypophysäres POMC produziert (Newell-Price, 2003; Picon et al., 1999) und deshalb als Positivkontrolle verwendet wurde.

4.1.2 Züchtung der Zelllinien HaCaT, A 431 und DMS 79

Die Züchtung der Zelllinie HaCaT erfolgte in Standardmedium für Keratinozyten: DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) mit 4,5 g/l Glucosegehalt, 1% FCS und je 100 units/ml Penicillin und Streptomycin. Die Zelllinie A 431 wurde in RPMI 1640 mit einem Glucosegehalt von 2 g/l, 5% fetalem Kälberserum (FCS) und je 100 units/ml Penicillin und Streptomycin gezüchtet. Die Kultivierung erfolgte in

60 mm großen Kulturschalen jeweils bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank. Pro Schale wurden 5 ml Medium eingesetzt. Aufgrund der Vielzahl der Versuche wurden so viele Zellen benötigt, daß unterschiedliche Passagen für die einzelnen Versuche verwendet werden mußten. Als Passage wurden die Tochterkulturen bezeichnet, die durch Herauslösen von Zellen aus dem Zellverband und erneuter Kultivierung gewonnen wurden. Auf oben genannte Weise wurden die Zellen beider Zelllinien vermehrt. Jede so entstandene Tochterkultur wurde numeriert.

Die Zelllinie DMS 79 wurde in RPMI 1640 (mit Zusatz von 2 mM Glutamin und 10 % FCS, sowie je 100 units/ml Penicillin und Streptomycin) bei 37°C in einem mit 5% CO₂ -begasten Brutschrank gezüchtet.

4.2 Stimulation der Zellen

Auf hypophysärer Ebene wurde beschrieben, daß ein Glucoseüberangebot inhibierend auf die Ausschüttung von β -Endorphin ins Blut wirkt (Zelissen et al., 1991), ein Glucosedefizit (indirekt durch reaktiv gesteigerte Insulinausschüttung erzeugt) jedoch als Stimulator der POMC-Expression wirkt. Bei TRH (Ishibashi et al., 1981; Roubos, 1997; Schwartz et al., 2002; Vazquez-Martinez et al., 2001) und Haloperidol (Jaber et al., 1994) handelt es sich um Substanzen, die als direkte Stimulatoren der Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten beschrieben wurden. TRH wirkt melanotroph stimulierend und Haloperidol als Dopaminantagonist wirkt melanotroph und corticotroph stimulierend auf die Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten. Die Aussaat beider Zelllinien erfolgte einen Tag vor der Stimulation in 60 mm Zellkulturschalen so, daß am Tag der Stimulation eine 50%-ige Konfluenz der Zellen pro Schale erreicht wurde. Die Stimulation erfolgte nach 2 unterschiedlichen Prinzipien:

1. Einsatz unterschiedlicher Glucosekonzentrationen im Nährmedium als Stimuli.
2. Einsatz von Thyrotropin Releasing Hormone (TRH 10⁻⁶M) bzw. Haloperidol (10⁻⁶M) als Stimuli.

4.2.1 Unterschiedliche Glucosekonzentrationen

Die Standardmedien DMEM bzw. RPMI wurden mit Glucose in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und die Zellkulturmedien durch die so geänderten Medien ersetzt. Die jeweiligen Konzentrationen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Medium (Zellen)	DMEM (HaCaT)	RPMI (A 431)
Standardglucose-Gehalt	4,5 g/l	2 g/l
Kontrollen	4,5 g/l	2 g/l
Glucosegehalt unter Stimulationsbedingungen	0 g/l 1 g/l ; 2 g/l	0 g/l 1 g/l ; 4 g/l

Tab. 1 Glucosekonzentrationen in DMEM- und RPMI- Medium

Die Standardglucosekonzentration lag in DMEM bei 4,5 g/l, in RPMI bei 2 g/l. Als Stimulationskonzentrationen wurden jeweils 3 zusätzliche Konzentrationen gewählt. Die restlichen Medium-Bestandteile blieben ebenso unverändert wie die Inkubationsbedingungen. Als Kontrollen dienten 2 Schalen, bei denen das Medium verworfen und gegen Standardmedium ausgetauscht wurde, sowie 2 weitere Schalen, die während der gesamten Zeit bis zur Aufarbeitung im Brutschrank verblieben. Die Zellkulturschalen wurden zur Stimulation (Mediumwechsel) für etwa 5 min aus dem Brutschrank entnommen. Diese Zeit wurde möglichst kurz und konstant gehalten, um Temperaturschwankungen zu vermeiden. Dann wurden die Zellen 24 h unter diesen Bedingungen im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

4.2.2 Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)

TRH wurde 10⁻⁴M in Puffer C gelöst. 50 µl dieser Lösung wurde den Zellkulturschalen (mit je 5 ml Medium) zugesetzt, so daß im Medium eine 10⁻⁶M Konzentration der Substanz erreicht wurde. Als Kontrollen wurden 2 Schalen am Tag der Stimulation je 50 µl Puffer C zugesetzt. Die Zellkulturschalen wurden zur

Stimulation für etwa 2 min aus dem Brutschrank entnommen. Diese Zeit wurde möglichst kurz und konstant gehalten, um Temperaturschwankungen zu vermeiden. Die Stimulationsdauer betrug 24 h.

4.2.3 Haloperidol

Analog zu der in 4.2.2 beschriebenen Methode wurden weitere Zellkulturschalen schalen mit Haloperidol stimuliert.

4.3 Überprüfung der Expression des hypophysären POMC in HaCaT- und A 431-Zellkulturen

4.3.1 Grundlagen der PCR

Die PCR ist eine 1983 von K. Mullis entwickelte Methode zum Nachweis von sehr kleinen Mengen DNA, die heute in vielen Bereichen (Forschung, Diagnostik, etc.) häufig angewandt wird. Im folgenden soll das Prinzip der PCR kurz dargestellt werden: Die Bildung eines komplementären Strangs zu einem DNA-Strang, die zum Doppelstrang der DNA führt, erfolgt mittels der DNA-Polymerase. Diese benötigt einen kurzen Doppelstrang als Ausgangssequenz und verlängert das angefangene Stück in Richtung des 5' zum 3' Ende. Um nach einem bekannten DNA-Abschnitt suchen zu können, müssen kurze Nukleotidsequenzen (20-30 bp) am 5' Ende dieses DNA-Abschnitts bzw. komplementäre Sequenzen (in Richtung 5' nach 3' Ende umgeordnet), sogenannte Primer, synthetisiert und paarweise dem Reaktionsansatz zugeführt werden. Damit die Primer sich anlagern können (Primer-Annealing), muß ein doppelsträngiger DNA-Abschnitt (falls bereits vorliegend) denaturiert und in zwei Einzelstränge getrennt werden. Dies geschieht üblicherweise bei ca. 95°C. Das Annealing der Primer ist ebenfalls temperaturabhängig und erfolgt je nach Primer bei 40-60°C. Bei 72°C verlängert die DNA-Polymerase anschließend vom freiliegenden 3' Ende her die Primer und synthetisiert somit einen komplementären Strang (Extension). Im nächsten Schritt werden die so entstandenen Doppelstränge wieder denaturiert. Denaturierung, Primerannealing und Extension stellen einen PCR-Zyklus dar. Über eine größere

Anzahl an Zyklen kann eine bestimmter Sequenzabschnitt eines Gens amplifiziert werden.

4.3.2 Gewinnung von mRNA

4.3.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Das Medium wurde von den Zellkulturschalen abgesaugt, verworfen und die Zellkulturschalen anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit je 1 ml Tri-Reagenz pro Schale lysiert und das Lysat je einer Schale in ein autoklaviertes 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zur Fällung der Nukleinsäuren zugegeben und nach Mischen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Die obere der 3 entstandenen Phasen enthielt die RNA und wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert, mit 500 µl Isopropanol versetzt, geschüttelt und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur 10 min bei 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das entstandene Pellet mit 1 ml 75% Ethanol versetzt. Anschließend wurde noch einmal 5 min bei 7500 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wieder dekantiert und die Eppendorfgefäße bei 45°C auf einem Heizblock fast vollständig getrocknet. Im Anschluß wurden die Pellets in je 10 µl RNase freiem Wasser gelöst und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

4.3.2.2 Überprüfung des RNA-Extrakts mittels Northern Blot

Um zu überprüfen, ob im unter 4.3.2 beschriebenen Schritt tatsächlich RNA extrahiert wurde, wurde eine konventionelle Northern Blot Analyse (Alwine et al., 1977) durchgeführt.

4.3.3 RT-PCR

Um die Transkription eines Gens nachzuweisen, muß die mRNA dieses Gens (das DNA-Transkript) gewonnen und in cDNA umgeschrieben werden. Üblicherweise wird die Gesamt-RNA extrahiert, revers transkribiert und dann gezielt ein cDNA-Abschnitt des betreffenden Gens mit spezifischen Primern

amplifiziert. Hierzu wurde das One-step-RT-PCR-Kit von Qiagen verwendet. Der Enzymmix dieses Kit enthält zwei reverse Transkriptasen (Enzyme: Omniscript™ und Sensiscript™ Reverse Transkriptase), die ein möglichst effizientes, fehlerfreies Lesen gewährleisten sollen, sowie Taq-DNA-Polymerase, die für die Amplifizierung der cDNA verantwortlich ist. Beide Reaktionen laufen nacheinander im gleichen Gefäß ab. Der sogenannte Master Mix bestehend aus 400,8 µl RNase freies Wasser, 120 µl 5xPuffer, 24 µl dNTPs, 3,6 µl Primer 1, 3,6 µl Primer 2 und 24 µl Enzym-Mix wurde mit 48 µl pro Reaktionsansatz vorgelegt. Er enthielt alle für die RT-PCR notwendigen Reagenzien. Von der extrahierten mRNA wurden 2 µl zugegeben und mit der Pipette vorsichtig gemischt.

4.3.3.1 Reverse Transkription der Gesamt-RNA, Amplifikation von Nukleotidsequenzen der hypophysären POMC-cDNA

Es wurden immer 2 identische Proben pro Reaktionsansatz hergestellt, eine wurde transkribiert, die zweite wurde erst nach der RT-Reaktion in das System eingebracht und diente so als Negativkontrolle. Diese Proben würden hier unerwünschte DNA-Kontaminationen, die schon vor der RT-Reaktion als Verunreinigungen in der Proben enthalten wären, sichtbar werden lassen. Die zu transkribierenden Proben wurden 30 min im auf 50°C vorgewärmten Thermocycler inkubiert. In dieser Inkubationsphase schrieben die beiden Transkriptasen, die Enzyme Omniscript™ und Sensiscript™ Reverse Transkriptase die vorhandene mRNA in cDNA um. Die Denaturierung der cDNA erfolgte bei 94°C. Die Proben wurden 15 min bei dieser Temperatur inkubiert. Hierdurch wurden auch die Reversen Transkriptasen inaktiviert, während die Taq-Polymerase aktiviert wurde. Das Annealing (Anlagern der Primer) erfolgte dann bei einer Temperatur von 58°C für 1 min (immer mit dem 5' Ende des Primers am 3' Ende des zu amplifizierenden Bereichs). Die Extension (Verlängerung des Primers zum komplementären Strang) erfolgte bei 72°C für 1 min. Als Primerpaare wurden folgende jeweils einzelsträngigen Nukleotidsequenzen eingesetzt:

EXO21/ HPO10: 5'-GAA GAT GCC GAG ATC GTG CT 3'-/ 5'-TGC CCT CAC

TCG CCC TTC TTG TAG-3', EXO 21 ist eine 20 Basen lange Sequenz, die den auf Exon 2 gelegenen Basen mit der Position 4491-4510 des POMC-Gens entspricht. HPO 10 ist eine 24 Basen lange Sequenz, die dem komplementären und vom 5' nach 3' Ende geschriebenen Strang der auf Exon 3 gelegenen Basen mit der Position 8166-8189 des POMC-Gens entspricht. Einschließlich dieser Primersequenz wurde eine 813 bp lange Nukleotidsequenz des POMC-Gens (ohne Intron B) in den Proben aus Zellmaterial der Positivkontrolle amplifiziert bzw. in den Proben aus Zellmaterial der Zelllinien HaCaT und A 431 erwartet.

HPO1/ HPO2: 5'-TGT CAG GAC CTC ACC ACG GA 3'-/ 5'-CCA TGG AGT AGG AGC GCT TG-3', HPO1 entspricht den 20 auf Exon 2 gelegenen Basen mit der Position 4594-4613 des POMC-Gens, HPO2 dem komplementären, von 5' nach 3' geschriebenen Strang der 20 auf Exon 3 gelegenen Basen mit der Position 7785-7804 des POMC-Gens. Mit diesem Primerpaar wurde ein 319 Basen großes Amplifikat erwartet.

HPO13/ HPO10: 5'-AAG CGG CGC CCA GTG AAG GT-3'/ 5'-TGC CCT CAC TCG CCC TTC TTG TAG-3', HPO13 entspricht den 20 auf Exon 3 gelegenen Basen mit der Position 7837-7856 des POMC-Gens, HPO 10 siehe oben. Mit diesem Primerpaar wurde ein 353 Basen großes Amplifikat erwartet.

FARO1A/ FARO1B: 5'-AGG ACC TCA CCA CGG AAA GCA ACC T-3'/ 5'-AGT GCT CCA TGG AGT AGG AGC GCT T-3', dieses Primerpaar wurde der Arbeit von Can et al. (1998) entnommen. Es wurde ein 300 Basen großes Amplifikat erwartet.

SLO1A/ SLO1B: 5'-GAG GGC AAG CGC TCC TAC TCC-3'/ 5'-GGG GCC CTC GTC CTT CTT CTC-3', dieses Primerpaar wurde der Arbeit von Slominski et al. (1995) entnommen. Es wurde ein 260 Basen großes Amplifikat erwartet.

Alle Exons des hypophysären POMC und die verwendeten Primer wurden zur besseren Übersicht in Abb. 39 dargestellt.

35 Zyklen wurden wie folgt durchgeführt: Denaturierung 50 sec bei 94°C, Annealing 1 min bei 58°C, Extension 1 min bei 72°C. Für die letzte Extension wurde 10 min bei 72°C inkubiert, um alle begonnenen Amplifikationen

abzuschließen.

4.3.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Trennung der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. 1,2 g Agarose wurden in 100 ml Laufpuffer gelöst und in die Gelkammer gegossen. Ein Kunststoffkamm wurde in das flüssige 1,2%-ige Agarosegel eingesetzt, der nach Aushärten des Gels vorsichtig entfernt wurde. Die Kammer wurde vollständig mit Laufpuffer gefüllt. In die entstandenen Taschen wurden 18 µl Probe einpipettiert (15 µl der jeweiligen Probe und 3µl 6fach-Puffer). In eine Tasche wurde anstelle der Probe 7,5 µl eines Markers zur Größenbestimmung der Amplifikate einpipettiert. Die Elektrophorese wurde etwa 1 h bei 90 V durchgeführt. Danach wurde das Gel für 30 min in einer 0,05%-igen Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und die unter UV-Licht erscheinenden Banden fotodokumentiert.

4.3.3.3 Standardisierung des Verfahrens

Als Positivkontrolle wurde die POMC-exprimierende Bronchialkarzinomzelllinie DMS 79 (Newell-Price, 2003; Picon et al., 1999) verwendet. Bei der Sequenzierung des etwa 800 Basen langen Amplifikates durch die Arbeitsgruppe von Prof. Chakraborty, Institut für Mikrobiologie der JLU, Gießen, konnte sichergestellt werden, daß es sich mit Sicherheit um die Nukleotidsequenz des humanen hypophysären POMC-Gens handelte. Als Negativkontrollen dienten die nicht transkribierten Ansätze des jeweiligen Versuchs sowie eine Probe, die ausschließlich RNase freies Wasser enthielt. Zur Bestimmung der Größe der Amplifikate wurde ein Gemisch von Substanzen definierter Basenlänge (1000/800/700/600/00/400/300/200/100 bp) eingesetzt (DNA-Marker).

4.4 Überprüfung der Bildung und Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten in HaCaT- und A 431-Zellkulturen

4.4.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen für die Bestimmung von POMC-Derivaten

Das Zellkulturmedium (5 ml entsprechend dem Überstand von 2,5 Millionen HaCaT-Zellen bzw. 1,65 Millionen A 431-Zellen pro Zellkulturschale) wurde in 13 ml Sarstedt-Röhrchen mit Enzymhemmer-Cocktail (3.2.2) pipettiert und anschließend mit 1/25 des Überstandsvolumens 1N HCl versetzt. Die Proben wurden 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben 30 sec bei 4°C im Ultraschallbad behandelt, 30 min bei 16000 g zentrifugiert und extrahiert (4.4.5).

4.4.2 Gewinnung von Zellmaterial für die Bestimmung von POMC-Derivaten

4.4.2.1 Ablösen der Zellen

Die Zellen wurden nach Abpipettieren des Überstandes mit 2,5 ml PBS defic. gespült und dann mit einem Kunststoffschaber von der Schalenoberfläche gelöst und in insgesamt 2,5 ml (50% des Überstandsvolumens) 10 mM Trispuffer/Enzymhemmer-Cocktail (3.2.2) aufgenommen und in ein vorbereitetes 13 ml Röhrchen pipettiert.

4.4.2.2 Lyse der Zellen

Die wie unter 4.4.2.1 beschrieben abgelösten Zellen wurden 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

4.4.2.3 Vorbereitung der Zellysate zur Extraktion

Nach dem Auftauen wurden die Proben 30 sec bei 4°C im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die somit erhaltenen Zellysate im Verhältnis 1:2 mit 0,005 M HCl (50% des Überstandsvolumens) verdünnt und damit ein pH-Wert von 3-3,5 eingestellt. Die Proben wurden dann bei 16000 g 30 min zentrifugiert, der entstandene Überstand wurde wie unter 4.4.5 beschrieben, extrahiert.

4.4.3 Zellzählung

Pro Versuch wurde exemplarisch je eine Zellkulturschale benutzt, um die Anzahl der Zellen pro Kulturschale festzustellen. Dazu wurden fest haftende HaCaT- und A 431-Zellen kurz mit PBS defic abgespült, mit 2,5 ml (50% des Überstandsvolumens) EDTA/Trypsin-Lösung versetzt und bei 37°C im 5%-CO₂-Begasungsbrutschrank 15 min inkubiert. Danach waren die Zellen abgelöst, also nicht mehr adhärent (flach mit Ausläufern), sondern sie erschienen unter dem Mikroskop rund. Die Zellsuspension wurde mit einer 1000 ml-Pipette vorsichtig gemischt, 20 µl der Suspension wurden zur Zellzählung entnommen. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (1 Quadrat x 10000 = Zellen/ml). Es wurden jeweils 4 Quadrate ausgezählt und der Mittelwert $x_{(\text{mean})}$ bestimmt. Die für die Zellzählung verwendeten Zellkulturen gingen nicht direkt in den Versuch ein, sondern wurden verworfen. Zusätzlich durchgeführte zahlreiche Vorversuche und die Zellzählungen der im Rahmen der Arbeit beschriebenen Versuche ergaben im Mittel 2,5 Millionen HaCaT-Zellen bzw. 1,65 Millionen A 431-Zellen pro 60 mm Zellkulturschale.

4.4.4 Standardisierung des Verfahrens zur Bestimmung von POMC-Derivaten

Um Standards für Zellüberstände und -lysate zu erhalten, wurden HaCaT- und A 431-Zellen in 100 mm Zellkulturschalen gezüchtet. Das Überstandsvolumen betrug 12-14 ml. Die Zellzählung entfiel. Die Zellkulturüberstände der einzelnen Zellkulturschalen wurden gepoolt und nicht mit HCl versetzt. Die Zellen wurden wie unter 4.4.2 beschrieben abgelöst und in 50% des Überstandsvolumens 10

mM Trispuffer/Enzymhemmer-Cocktail (3.2.2) aufgenommen und gepoolt. Alle Proben wurden 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Lysatproben 30 sec bei 4°C im Ultraschallbad behandelt. Alle Proben wurden 30 min bei 16000 g zentrifugiert und anschließend filtriert.

4.4.4.1 Filtration von Zellkulturüberständen und Zellysaten

Die so gewonnenen Zellkulturüberstände und -lysate wurden über Sep-Pak Kartuschen gereinigt. Möglicherweise vorhandene POMC-Derivate wurden an das Octadecasilyl-Material der Kartuschen gebunden. Analog zur Extraktion (4.4.5) wurden Sep-Pak Kartuschen für die Filtration mit 5 ml Methanol, 5 ml Harnstoff (8 mol/l) und 10 ml Aqua bidest. aktiviert. Pro Kartusche wurden 5 ml Probe filtriert. Die Filtrate wurden gesammelt und gepoolt.

4.4.4.2 Erstellung von Standardkurven

Überstand-Standardproben

POMC-Derivate wurden zu je 5 Konzentrationen (1/10/100/1000/10000 fmol/Ansatz) in Puffer-D gelöst. 10 µl der jeweiligen Verdünnung des POMC-Derivates wurden in 13 ml Röhrchen vorgelegt. 5 ml des Überstandfiltrats, 1/10 (500 µl) des Volumens an Enzymhemmer-Cocktail und 1/25 des Volumens (200 µl) an 1N HCl wurden zugegeben.

Lysat-Standardproben

POMC-Derivate wurden zu je 5 Konzentrationen (1/10/100/1000/10000 fmol/Ansatz) in Puffer-D gelöst. 20 µl der jeweiligen Verdünnung des POMC-Derivates wurden in 13 ml Röhrchen vorgelegt. 2,5 ml des Lysatfiltrates und 2,5 ml 0,005 N HCl wurden zugegeben und gemischt. Alle Proben wurden bis zur radioimmunologischen Analyse bei -20°C gelagert.

Zusätzlich wurden sogenannte Leerextrakte von Zellkulturüberständen und Zellysaten hergestellt, die für Blank (BI)- und B₀-Werte der jeweiligen Standardkurven benötigt wurden. Hierzu wurden filtrierte, aber sonst

„unbehandelte“ Zellkulturüberstände und Zellysate extrahiert und analog zu den Standardproben weiterbehandelt.

4.4.5 Extraktion

Zellüberstände und -lysate aus den Versuchen, sowie die filtrierten Überstand- und Lysatstandardproben und -leerextrakte (4.4.4), wurden vor der radioimmunologischen Bestimmung der POMC-Derivate über Sep-Pak-C18-Kartuschen gereinigt. Dazu wurden die POMC-Derivate an das Octadecasilyl-Material der Kartuschen gebunden und durch mit Säure versetztes organisches Lösungsmittel wieder desorbiert. Alle Proben wurden unmittelbar vor der Extraktion 30 min bei 16000 g zentrifugiert. Alle Extraktionsschritte erfolgten bei Temperaturen von 0-4°C (alle Lösungsmittel wurden ebenfalls auf 4°C gekühlt). Die Sep-Pak Kartuschen wurden mit 5 ml Methanol, 5 ml Harnstoff (8 mol/l) und 10 ml Aqua bidest. aktiviert. Die Überstände der aufgetauten, zentrifugierten Proben (5 ml) wurden durch ein Vakuum, erzeugt durch eine Wasserstrahlpumpe, mit einer Flußrate von etwa 1 ml/min durch die Kartuschen gesaugt. Im Anschluß wurden die Kartuschen mit je 10 ml Aqua bidest. und 4%-iger Essigsäure gewaschen. Die auf den Kartuschen adsorbierten POMC-Derivate wurden durch 10 ml einer 1-Propanol/Essigsäurelösung (v/v=96/4) von den Kartuschen desorbiert und in Probenröhrchen aufgefangen. Somit enthielten die Eluate die Menge an POMC-Derivaten, die aus je 5 ml Überstand bzw. Lysat (entsprechend 2,5 Millionen HaCaT- bzw. 1,65 Millionen A 431-Zellen) sowie den Überstand- und Lysatstandardproben, extrahiert werden konnten. Das organische Lösungsmittel wurde durch Vakuum-Zentrifugation des Eluates bei etwa 18°C in einem Speed Vac Concentrator verdampft. Dem in den Röhrchen verbleibenden Rückstand wurden 0,5 ml Aqua bidest. zugegeben und die Proben im Lyophilisator gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in je 0,5 ml Puffer C gelöst (2 h bei 4°C auf einem Rüttler) und auf 4 Aliquots (Überstand) à 100 µl (entsprechend 20% der Zellmenge pro Schale bzw. 500000 HaCaT-Zellen bzw. 330000 A 431-Zellen) bzw. 9 Aliquots (Lysat) à 50 µl (entsprechend 10% der Zellmenge pro Schale bzw. 250000 HaCaT-Zellen bzw. 165000 A 431-Zellen) in

1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Restvolumina wurden verworfen. Die Proben wurden bis zur radioimmunologischen Analyse bei -20°C eingelagert.

4.4.6 Fluid-phase-one-site-Radioimmunoassays (FP-RIAs)

4.4.6.1 Prinzip und Durchführung

Eine konstante Menge an radioaktiv markiertem Antigen (Tracer) und eine zu bestimmende Menge an nicht radioaktiv markiertem Antigen konkurrieren um eine begrenzte Menge an Bindungsstellen an im Anti-Serum enthaltenen Antikörpern. Je höher die Konzentration an nicht markiertem Antigen ist, desto weniger Tracer wird an den Antikörper gebunden. Zur Messung von antikörpergebundener Radioaktivität erfolgt ein Trennschritt. Das freie radioaktiv markierte Antigen wird an Aktivkohle adsorbiert. Diese feste Phase wird von der flüssigen Phase mittels Zentrifugation getrennt. Die antikörpergebundene Radioaktivität im Überstand wird im Gamma-Zähler gemessen. Für alle Versuchsansätze wurden 1,5 ml Eppendorfgefäße bzw. 3,5 ml Sarstedt-Röhrchen sowie RIA Puffer C (PC) und D (PD) (3.2) nach Guillemin et al., (1977) benutzt. Die RIAs setzen sich aus folgenden Inkubationsansätzen zusammen (jeweils Doppelbestimmung):

Gesamtradioaktivität (CT-Wert): Dieser Wert diente der Bestimmung der Gesamtmenge an Radioaktivität im Inkubationsansatz.

Blank-Wert (BI-Wert): Dieser Leerwert diente der Ermittlung der unspezifischen Radioaktivität im Überstand. Hier wurden sowohl nicht an Antikörper gebundene Radioaktivität als auch der Geräteleerwert erfaßt. Der Blank-Wert wurde von allen anderen Werten abgezogen.

Null-Standard (B_0 -Wert): Der Null-Standard diente zur Bestimmung der Menge an radioaktiv markiertem Peptid, das in Abwesenheit von nicht radioaktiv markiertem Peptid vom Antikörper gebunden werden konnte. B_0 entsprach dem 100%-Bindungswert des Tracers.

Standardwerte: Diesen Inkubationsansätzen wurden definierte, in 10er-Potenzen ansteigende Mengen an nicht markiertem Peptid zugesetzt (4.4.4). Aus diesen Werten wurden Standardkurven mit ORIGIN, einem technisch-wissenschaftlichen

Zeichenprogramm, erstellt, anhand derer die Substanzmenge in einer zu analysierenden Probe ermittelt werden konnte.

Probenwerte: In diesen Ansätzen wurden die Konzentrationen an α -MSH-IRM, N-Acetyl- β -Endorphin-IRM, β -Endorphin-IRM und CLIP-IRM in einer Probe (z.B. Serum, Extrakte von Zellkulturüberständen und Zellysaten) gemessen. Das in der jeweiligen Probe enthaltene nicht radioaktiv markierte Antigen sollte das radioaktiv markierte, zugegebene Peptid (Tracer) von seiner Bindungsstelle am Antikörper verdrängen. Anhand des Ausmaßes der Verdrängung des Tracers konnte mit Hilfe der Standardkurve die Konzentration des jeweiligen Peptids in der Probe bestimmt werden. Alle RIAs wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei 4°C angesetzt. Die einzelnen Bestandteile des Versuchsansatzes wurden nach dem in Tab. 2 (Assaycharakterisierung und Titerbestimmung) bzw. Tab. 3 und Tab. 4 (Nachweis von POMC-Derivaten in Zellkulturüberständen und Lysaten) dargestellten Schema pipettiert. Das Volumen pro Ansatz betrug mit Ausnahme des CT-Wertes (540 μ l PC) immer 240 μ l. Die Antiseren wurden in Puffer C soweit verdünnt, daß 50 μ l dieser Verdünnung eine Antikörperkonzentration aufwies, die ausreichend war, um ca. 30% des zugegebenen Tracers zu binden. Der Tracer selbst wurde in Puffer D soweit verdünnt, daß in 20 μ l dieser Lösung etwa 3000 cpm gemessen werden konnten. Nach dem Einpipettieren der Tracers wurden alle Proben 20 sec geschüttelt und anschließend 20-24 h bei 4°C inkubiert.

Analog zu den Proben wurden bei den Lysat- bzw. Überstand-Extrakt-Standardkurven jeweils 50 bzw. 100 μ l Puffer C gegen Zellysatstandardextrakt bzw. Zellkulturüberstandextrakt ausgetauscht (Tab. 3 und Tab. 4). Für die jeweiligen B_1 - und B_0 -Werte wurden Zellysatleerextrakte bzw. Zellkulturüberstandleerextrakte in den entsprechenden Volumina anstelle von Puffer C eingesetzt (Tab. 3 und Tab. 4). Danach erfolgte die Trennung des freien vom antikörpergebundenen Peptid mittels Adsorption des freien Peptids an Aktivkohle. Hierzu wurden den Inkubationsansätzen, mit Ausnahme des CT-Wertes je 300 μ l Kohlesuspension (1% Aktivkohle und 0,5% BSA in Puffer C) zugesetzt; dann wurde sie 20 sec geschüttelt, anschließend 15 min inkubiert und

bei 8800 g 4 min zentrifugiert. 450 µl des Überstandes wurden in Counterröhrchen (3,5 ml Sarstedt-Röhrchen) abpipettiert und die darin enthaltene Radioaktivität 1 min im Gammazähler gemessen.

	CT	BI	B ₀	Standard	Probe
1. Puffer C (PC)	500 µl	200µl	150µl	150 µl	100 µl
2. Puffer D (PD)	20 µl	20 µl	20 µl	-	20 µl
3. Standard in PD	-	-	-	20 µl	-
4. Probe (Serum)	-	-	-	-	50 µl
4. Antiserum in PC	-	-	50 µl	50 µl	50 µl
5. Tracer in PD	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
6. Kohle in BSA	-	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Tab. 2 Zusammensetzung der Inkubationsansätze im FP-RIA zur Assaycharakterisierung bzw. Antikörpertiterbestimmung

	CT	BI-L	B ₀ -L	Probe-L	Standard-L
Leerextrakt-L in PC	-	50 µl	50 µl	-	-
Standardextrakt-L in PC	-	-	-	-	50 µl
Probenextrakt in PC	-	-	-	50 µl	-
Puffer C (PC)	500 µl	150 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Puffer D (PD)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Antiserum in PC	-	-	50 µl	50 µl	50 µl
Tracer in PD	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Kohle in BSA	-	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Tab. 3 Zusammensetzung der Inkubationsansätze in den FP-RIAs zum Nachweis von POMC-Derivaten in Zellysaten
Proben aus Zellysaten sind in der Tabelle mit mit „L“ bezeichnet

	CT	BI-Ü	B ₀ -Ü	Probe-Ü	Standard-Ü
Leerextrakt-Ü in PC	-	100 µl	100 µl	-	-
Standardextrakt-Ü in PC	-	-	-	-	100 µl
Probenextrakt in PC	-	-	-	100 µl	-
Puffer C (PC)	500 µl	100 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Puffer D (PD)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Antiserum in PC	-	-	50 µl	50 µl	50 µl
Tracer in PD	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Kohle in BSA	-	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Tab. 4 Zusammensetzung der Inkubationsansätze in den FP-RIAs zum Nachweis von POMC-Derivaten in Zellkulturüberständen
 Proben aus Zellkulturüberständen sind in der Tabelle mit „Ü“ bezeichnet

4.4.6.2 Entwicklung von zwei FP-one-site RIAs zur Bestimmung von α -MSH- und CLIP-immunoreaktivem Material (IRM)

4.4.6.2.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen α -MSH und CLIP

4.4.6.2.1.1 Antigene

H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂ entspricht der Aminosäuresequenz von Des-Ac-N- α -MSH (Ac-N-ACTH 1-13)-NH₂.

Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe entspricht der Aminosäuresequenz von CLIP (ACTH 18-39)

Als Antigene zur Erzeugung der Antikörper dienten die Peptide Des-Ac-N- α -MSH (ACTH 1-13)-NH₂ und CLIP (ACTH 18-39) mit den o.g. Aminosäuresequenzen. Die Antigene entsprechen den kompletten Aminosäuresequenzen von α -MSH und CLIP. Die in beiden Peptiden enthaltene Aminosäure Tyrosin diente der radioaktiven Markierung mit I-125.

4.4.6.2.1.2 Versuchstiere

Für die Gewinnung der Antiseren gegen α -MSH und CLIP wurden je 3 Kaninchen verwandt (Kaninchen Nr.174,175 und 176 für α -MSH und Nr. 165, 166 und 167 für CLIP). Die Immunisierung erfolgte bei Nr. 165 und 174 mit CDI- und bei 166, 167, 175 und 176 mit BDB-gekoppeltem Antigen.

4.4.6.2.1.3 Kopplung des Antigens an ein Trägerprotein

Aufgrund der geringen immunogenen Eigenschaften der eingesetzten Oligopeptide wurden sie als Haptene an ein Trägermolekül, KLH, gekoppelt. Dies erfolgte nach der oft erfolgreich bei der Kopplung von POMC-Derivaten angewandten Methode von Weber et al., (1982) mit Modifikationen nach Wiedemann und Teschemacher (1986).

Kopplung mit Carbodiimid (Beschreibung für 1 Kaninchen)

Das betreffende Peptid wurde wegen seiner voraussichtlich geringen immunogenen Eigenschaften an ein Trägermolekül, keyhole limpet hemocyanin (KLH), gekoppelt. 20 mg KLH wurden in 3 ml Aqua bidest. gelöst. Parallel wurden 5 mg α -MSH in 0,5 ml Aqua bidest gelöst und dieser Lösung wurden anschließend 1,5 ml der KLH-Lösung beigemischt. Die Probe wurde 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Als Koppler diente 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (CDI). 5 mg dieser Substanz wurden in 1 ml Aqua bidest. gelöst und der Probe zugesetzt. Mit 0,2 molarer HCl wurde der pH-Wert auf 4,5-5 eingestellt. Das Gemisch aus Träger, Peptid und Koppler wurde 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt und weitere 16-20 h bei 4°C inkubiert. Das entstandene Konjugat wurde mit 1 ml Aqua bidest. verdünnt und in 10 Aliquots a 0,4 ml bis zur Immunisierung bei -20°C eingefroren.

Kopplung mit BDB (Beschreibung für 1 Kaninchen)

Als Koppler wurde hier Bisdiazobenzidine (BDB), als Trägermolekül ebenfalls KLH eingesetzt. 20 mg KLH wurden in 40 ml Boratpuffer gelöst. Anschließend wurden 5 mg Peptid in 25 ml der KLH-Boratpuffer-Lösung auf einem Rührer vollständig gelöst, 0,5 ml BDB zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur

weitergerührt. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Ansatzes geschah dies unter Abdunklung und wegen der Toxizität unter einem Abzug. Danach wurde das Konjugat in Dialyseschläuche abgefüllt und 36 h gegen 5 l Aqua bidest. dialysiert. In dieser Zeit erfolgten 4 Wasserwechsel, nach dem letzten wurde noch 4 h dialysiert. Der Inhalt der Schläuche wurde gepoolt und in 1 ml Aliquots aufgeteilt. Diese wurden eingefroren und anschließend im Lyophilisator gefriergetrocknet. Die Aliquots wurden bis zur Immunisierung bei -20°C eingefroren.

4.4.6.2.1.4 Immunisierung

Für die Primärimmunisierung wurden 0,4 ml des CDI-gekoppelten Peptids mit der gleichen Menge an komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt und dem betreffenden Kaninchen an mehreren Stellen am Rücken subkutan injiziert. 4 Aliquots des BDB-gekoppelten lyophilisierten Peptids wurden mit 0,5 ml an komplettem Freund'schen Adjuvans und 0,4 ml PBS vermischt und dem betreffenden Kaninchen subkutan injiziert. Es erfolgten 3 weitere Primärimmunisierungen pro Kaninchen im Abstand von je 1 Woche und anschließend bis zu 10 Boosterungen im Abstand von je 4 Wochen. Bei den Boosterungen wurde inkomplettes Freund'sches Adjuvans anstelle von komplettem verwendet. Die Immunisierung erfolgte nach der von Weber et al., (1982) beschriebenen Methode mit Modifikationen nach Wiedemann und Teschemacher (1986).

4.4.6.2.1.5 Blutentnahmen

Die erste Blutentnahme zur Antikörpertiterbestimmung erfolgte sechs Wochen nach der ersten Primärimmunisierung. Jeweils 2 Wochen nach einer Boosterung erfolgten ebenfalls Blutabnahmen zur Titerbestimmung. Zur Blutabnahme wurde die Ohraußenseite des jeweiligen Kaninchens mit Finalgon-Creme eingerieben. Nach dem Hervortreten der Gefäße erfolgten die Desinfektion des Ohres mit Softasept und Blutabnahme mittels Kanüle. Das Ohr wurde anschließend zur Blutstillung mit Vaseline eingerieben. Die Blutproben wurden 1 h bei Raumtemperatur und weitere 24 h bei 4°C inkubiert und anschließend 15 min bei

1000 g zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abpipettiert und bei -20°C eingefroren bzw. direkt weiterverarbeitet.

4.4.6.2.1.6 Herstellung radioaktiv markierter Peptide

Zur Bestimmung der Antikörpertiter in den Kaninchenseren war es notwendig, die beiden Peptide Ac-N- α -MSH(1-13)-NH₂ und CLIP(1-22) radioaktiv zu markieren. Für die radioaktive Markierung wurde ¹²⁵Jod (γ -Strahler, Halbwertszeit 60 Tage) an die aromatische Ringstruktur des im Peptid enthaltenen Tyrosins gebunden. Die Jod-Markierung wurde bei Zimmertemperatur mit eisgekühlten Reagenzien durchgeführt. Die Markierung erfolgte nach der Chloramin-T-Methode (Hazum et al., 1979; Hunter and Greenwood. 1962) mit Modifikation (Wiedemann und Teschemacher, 1986)

4.4.6.2.1.7 Titerbestimmung

Der Antikörpertiter wurde in verschiedenen Antiserumverdünnungen (1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000) in einem FP-RIA durch Zugabe von radioaktiv markiertem Antigen ermittelt. Für die Serumverdünnung 1:100 wurde zusätzlich die Verdrängbarkeit des radioaktiv markierten Antigens durch das jeweilige nicht markierte Antigen und damit die Reversibilität der Antikörperbindung bestimmt.

4.4.6.2.1.8 Auswahl und Lagerung der Antiseren

Wies ein Kaninchen einen ausreichend hohen Antikörpertiter auf, wurde es durch Legen eines Katheters in die Arteria carotis in Ketamin-Narkose entblutet. Die Serumfraktionen eines Kaninchens mit dem höchsten Antikörpertiter wurden gepoolt, aliquotiert (je 1 ml) und bei -20°C eingefroren.

4.4.6.3 Charakterisierung der neu entwickelten RIAs

Zur Charakterisierung der neuen Methoden wurden der relative „inter-assay coefficient of variation“ als Maß für die Reproduzierbarkeit und der relative „intra-assay coefficient of variation“ als Maß für die Präzision des Assays berechnet. Außerdem wurden die Nachweisgrenze des Assays („detection limit“) sowie die Spezifität („cross reactivities“) bestimmt. Die nachfolgenden Parameter wurden

nach dem gleichen Prinzip jeweils für die neu entwickelten Radioimmunoassays für α -MSH-IRM (Antiserum 174E) und CLIP-IRM (Antiserum 167E) bestimmt.

4.4.6.3.1 Reproduzierbarkeit („inter-assay coefficient of variation“)

Die Bestimmung des „inter-assay coefficient of variation“ erfolgte mittels 10 unabhängig voneinander angesetzter Standardkurven. Die Werte wurden mit dem Computerprogramm ORIGIN sigmoidal (Unterprogramm LOGISTIC) zu Standardkurven gefittet. Der IC_{50} -Wert der sigmoidal verlaufenden Kurve entspricht dabei der Menge an nicht radioaktiv markiertem Peptid, die unter den gegebenen Bedingungen zu einer 50%-igen Verdrängung des radioaktiv markierten Peptids führt. Bei jeder der 10 Standardkurven wurde die Menge an Peptid in fmol pro Inkubationsansatz ermittelt, durch die eine 50%-ige Verdrängung des Tracers durch das nicht radioaktiv markierte Peptid erreicht wurde. Aus den erhaltenen 10 Werten (n) wurden Mittelwert ($x_{(mean)}$) und Standardabweichung (s) berechnet. Der „inter-assay coefficient of variation“ ergibt sich als Quotient aus der Standardabweichung und dem Mittelwert, der relative „inter-assay coefficient of variation“ (V_r) ergab sich wie folgt:

$$V_r[\%] = [s/(x \cdot \sqrt{n})] \cdot 100$$

4.4.6.3.2 Präzision („intra-assay coefficient of variation“)

Zur Bestimmung des „intra-assay coefficient of variation“ wurden für 10 gleiche Ansätze mit einer definierten Menge an Peptid (50 fmol) die Meßsignale (cpm) bestimmt und über die gefittete Standardkurve (4.4.6.3.1) die zugehörige fmol-Menge ermittelt. Auch hier wurden aus den 10 Werten wieder Mittelwert ($x_{(mean)}$), Standardabweichung (s) und daraus der relative „intra-assay coefficient of variation“ (V_r) bestimmt: $V_r[\%] = [s/(x \cdot \sqrt{n})] \cdot 100$

4.4.6.3.3 Nachweisgrenze („detection limit“)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des Assays wurden zu einer Standardkurve zusätzlich 10 B_0 -Werte angesetzt und jedem Meßsignal (cpm) derselben eine

Substanzmenge (in fmol) zugeordnet. Aus diesen B_0 -Werten wurden Mittelwert ($x_{(\text{mean})}$) und Standardabweichung (s) gebildet. Die Werte $x_{(\text{mean})} - s$ entsprachen der Nachweisgrenze des jeweiligen Assays.

4.4.6.3.4 Spezifität („cross reactivities“)

Die Spezifität eines Assays gibt mittels Kreuzreaktivitäten an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine bestimmte Substanz nachgewiesen werden kann. Um die Spezifität der entwickelten Assays zu bestimmen, wurde eine Reihe von Peptiden, von denen eine Kreuzreaktivität mit den gewonnenen Antikörpern zu erwarten war, auf die Verdrängbarkeit der betreffenden Tracer getestet. Dazu wurden die jeweiligen Peptide in 7 Konzentrationsstufen (0,1 - 100000 fmol/50 μ l- Ansatz) eingesetzt und die Bindung des betreffenden Peptids an den Antikörper über die Verdrängbarkeit des betreffenden Tracers vom Antikörper getestet. In Abb. 3, Abb. 4 und Abb. 5 sind die auf Kreuzreaktivitäten getesteten Peptide dargestellt. Die Bindung des Tracers, d.h. das Meßsignal des RIAs wurde mit den Signalen der jeweiligen Standardkurve verglichen und die Kreuzreaktivität als Prozentsatz der Bindung des Antikörpers an das jeweilige Peptid angegeben (Tab. 5, Tab. 6., Abb. 3, Abb. 4).

4.4.6.4 Durchführung der neu entwickelten RIAs

4.4.6.4.1 α -MSH-IRM

Das zur Bestimmung von α -MSH-IRM gewonnene polyklonale Antiserum 174E wurde in allen Versuchen in der Verdünnung 1:10000 eingesetzt. Als Tracer wurde radioaktiv markiertes α -MSH (1-13)-NH₂ verwendet. Der RIA wurde, wie in Tab. 2 und Abschnitt 4.4.6.1 beschrieben, durchgeführt.

4.4.6.4.2 CLIP-IRM

Auch dieser RIA wurde analog den Angaben unter Tab. 2 und Abschnitt 4.4.6.1 durchgeführt. Das neu gewonnene Antiserum 167E wurde in der Verdünnung 1:800 eingesetzt, als Tracer diente radioaktiv markiertes CLIP (1-22).

4.4.6.5 Bereits entwickelte RIAs zur Bestimmung von β_{H} -Endorphin-IRM und N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM

In der Arbeitsgruppe lagen bereits polyklonale Antiseren zur Bestimmung von β_{H} -Endorphin (84E) (Harbach et al., 2000; Kramer, 1988,) und N-Acetyl- β_{H} -Endorphin (27P) vor.

4.4.6.5.1 β_{H} -Endorphin-IRM

Antiserum 84E wurde in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Die Antikörper dieses Serums sind gegen die Aminosäuresequenz von β_{H} -Endorphin (17-26) - LFKNAIIKNA- gerichtet. Alle Substanzen, die diese Aminosäuresequenz beinhalten (β -Endorphin, β -Lipotropin und β -Endorphin-Fragmente, die diese Determinante tragen), kreuzreagieren mit dem Antiserum 84E. Als Tracer diente radioaktiv markiertes β_{H} -Endorphin (1-31). Die Nachweisgrenze des Assays lag bei 2-10 fmol/ml.

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

Antiserum 27P wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt. Die Antikörper des Antiserums 27P waren gegen Ac-N- β_{H} -Endorphin (1-4) gerichtet und kreuzreagierten mit sämtlichen acetylierten N-terminalen Fragmenten des β -Endorphins. Als Tracer diente radioaktiv markiertes Ac-N- β_{H} -Endorphin (1-31). Die Nachweisgrenze des Assays lag bei 5-10 fmol/ml.

Die Nachweisgrenzen der einzelnen Assays wurden für den jeweiligen Versuch mitbestimmt. Dafür wurde vom Mittelwert der pro Assay bestimmten B_0 -Werte die einfache Standardabweichung s abgezogen und dieser Wert anhand der jeweiligen Standardkurve in fmol umgerechnet. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Werte zu erreichen, wurden auch die Nachweisgrenzen und die Konzentration der POMC-Derivate in den Lysaten wie in den Überständen in fmol/ml (entsprechend 20% der Zellmenge pro Schale) dargestellt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung: Charakteristika der neu entwickelten RIAs zur Bestimmung von α -MSH- und CLIP-IRM

5.1.1 RIA zur Bestimmung von α -MSH-IRM

Mit dem vorliegenden Antiserum 174E sollte ein Assay zum Nachweis von α -MSH-IRM entwickelt werden. Hierzu wurden mehrere Antiserumverdünnungen getestet, um eine optimale Antikörperkonzentration bei einer ausreichenden Bindung des Tracers an die Antikörper zu erreichen. Die Charakterisierung des Assays erfolgte bei einer Serumverdünnung 1:200000. Diese Titerbestimmungen wurden regelmäßig wiederholt um eine gleichbleibend 30% Bindung des Tracers an die Antikörper sicherzustellen. Für die späteren Versuche wurde eine Verdünnung von 1:10000 verwendet.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit kennzeichnet den Grad der Übereinstimmung wiederholter Messungen. Die Berechnung erfolgte wie unter 4.4.6.3.1 beschrieben.

Mittelwert der Kontrollstandards: $x_{(\text{mean})}$ = 47,5 fmol α -MSH/Ansatz

Standardabweichung: s = 16,3 fmol α -MSH/Ansatz

Varianzkoeffizient: V = 0,35

Relativer Varianzkoeffizient: V_r = 11,06%

Präzision

Die Präzision kennzeichnet den Grad der Übereinstimmung mehrerer Werte innerhalb eines Assays. Die Berechnung erfolgte wie unter 4.4.6.3.2 beschrieben.

Mittelwert der Kontrollstandards: $x_{(\text{mean})}$ = 67,35 fmol α -MSH/Ansatz

Standardabweichung: s = 7,42 fmol α -MSH/Ansatz

Varianzkoeffizient: V = 0,11

Relativer Varianzkoeffizient: V_r = 3,49 %

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze eines konventionellen FP-one-site-RIAs ist die Konzentration an nachzuweisender Substanz, die signifikant vom Nullstandard unterschieden werden kann. Nach dem unter 4.4.6.3.3 beschriebenen Vorgehen ergaben sich folgende Werte für die Nachweisgrenze des Assays:

Nachweisgrenze (-1s) = 3,23 fmol α -MSH/Ansatz

Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität des Assays wurden die Kreuzreaktivitäten ausgewählter POMC-Derivate mit dem Antiserum 174E ermittelt. Diese sind in Abb. 3 sowie in Tab. 5 dargestellt. Es besteht neben α -MSH lediglich für ACTH (1-24) und (Tyr⁹)- α -MSH (9-12) eine geringe Wahrscheinlichkeit des Nachweises mit dem vorliegenden Antiserum. Die anderen Substanzen wurden von den im Antiserum enthaltenen Antikörpern nicht erkannt. Dieser Assay ermöglicht infolge des axialen Antikörper-Angriffs am C-Terminus des Peptides einen hochspezifischen Nachweis von α -MSH (10-13)-IRM: Es wird nur die C-terminal amidierte Aminosäuresequenz des α -MSH-C-Terminus erkannt (Abb. 5, 6.1.2.2.1.1).

POMC-Peptid	Kreuzreaktivität in %
β -MSH	0
α -MSH (Ac-N-ACTH 1-13-NH ₂)	100
γ -MSH	0
ACTH (1-10)	0
ACTH (1-24)	<0,6
Ac-N-(Tyr ⁵)- α -MSH (1-5)	0
(Tyr ⁹)- α -MSH (9-12)	2,0

Tab. 5 Kreuzreaktivitäten der POMC-Derivate mit Antiserum 174E in %

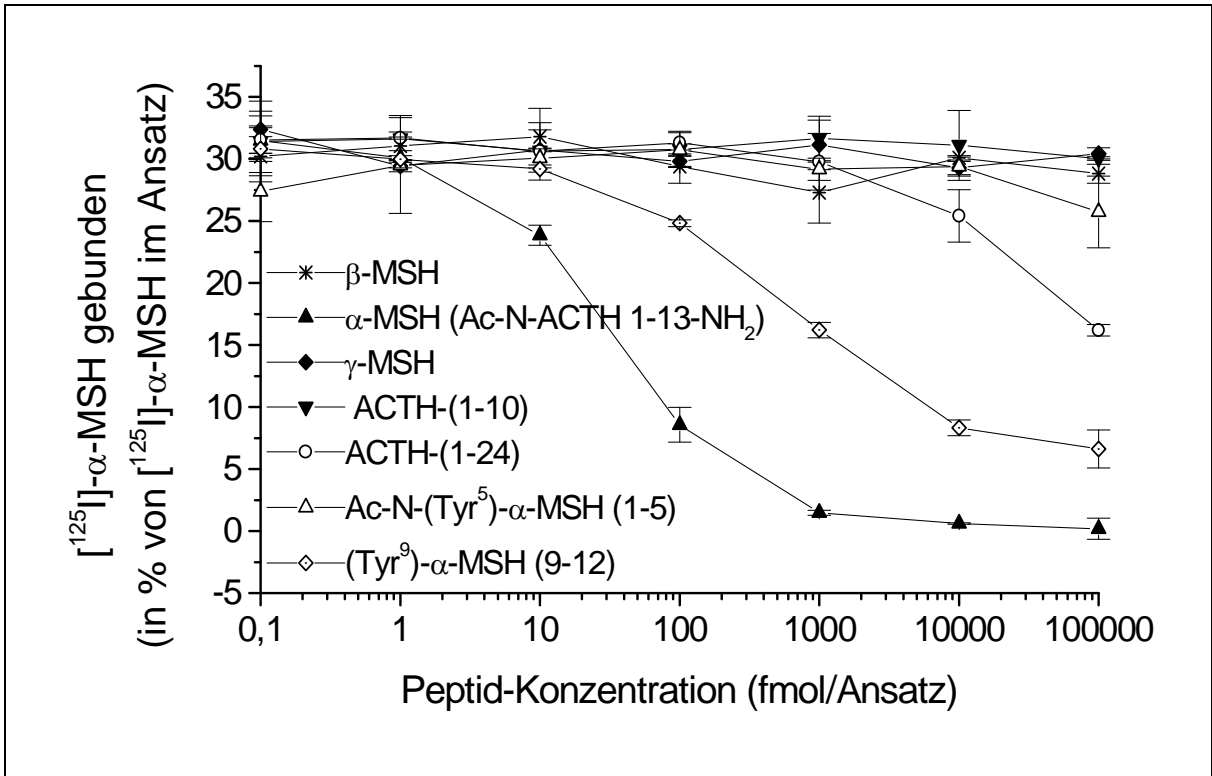


Abb. 3 Kreuzreaktivitäten des Antiserums 174E

Die Kreuzreaktivität κ berechnet sich aus der dem Wendepunkt der Standardkurve entsprechenden Konzentration von α -MSH und der dem Wendepunkt der Verdrängungskurve entsprechenden Konzentration eines anderen Peptids.

Beispiel $(\text{Tyr}^9)\text{-}\alpha\text{-MSH (9-12)}$: Der Wendepunkt der α -MSH-Standardkurve entspricht einer Peptidkonzentration von 60 fmol, der Wendepunkt der $(\text{Tyr}^9)\text{-}\alpha\text{-MSH (9-12)}$ -Verdrängungskurve einer Konzentration von 3000 fmol. Es ergibt sich eine Kreuzreaktivität von $\kappa = (60/3000) \cdot 100 = 2,0 \%$

5.1.2 RIA zur Bestimmung von CLIP-IRM

Antiserum 167E wurde nach Titerkontrollen in einer Konzentration 1:800 für alle Versuche verwendet. Erläuterungen zur Charakterisierung siehe 5.1.1.

Reproduzierbarkeit

Mittelwert der Kontrollstandards:	$x_{(\text{mean})}$	=	40,65 fmol CLIP/Ansatz
Standardabweichung:	s	=	15,3 fmol CLIP/Ansatz
Varianzkoeffizient:	V	=	0,38
Relativer Varianzkoeffizient:	V_r	=	11,9%

Präzision

Mittelwert der Kontrollstandards:	$x_{(\text{mean})}$	=	79,16 fmol CLIP/Ansatz
Standardabweichung:	s	=	24,09 fmol CLIP/Ansatz
Varianzkoeffizient:	V	=	0,30
Relativer Varianzkoeffizient:	V_r	=	9,62 %

Nachweisgrenze

Nachweisgrenze (-1s) = 2,43 fmol CLIP/Ansatz

Spezifität

Auch hier wurde die Kreuzreaktivität gegenüber ausgewählten Peptiden als Maß für die Spezifität des Assays mit dem Antiserum 167E bestimmt. Es handelt sich um ein relativ unspezifisches Antiserum, welches neben CLIP in hohem Maße ACTH (1-39) und ACTH (22-39) erkennt. Abb. 4 und Tab. 6 zeigen die Kreuzreaktivitäten der verwendeten POMC-Derivate mit dem Antiserum 167E. Die verwendeten POMC-Derivate sind in Abb. 5 dargestellt. Der Assay ist nicht hochspezifisch, dient aber dem Nachweis von CLIP (13-17)-IRM bzw. ACTH (30-34)-IRM. Er kann als Screeningverfahren zum Nachweis von ACTH und/oder CLIP eingesetzt werden.

POMC-Peptid	Kreuzreaktivität in %
CLIP (ACTH 18-39)	100
ACTH (1-39)	146,6
ACTH (22-39)	62,86
ACTH (30-39)	24,44
ACTH (29-39)	1,91
(Tyr ³⁵)-ACTH (35-39)	0

Tab. 6 Kreuzreaktivitäten der POMC-Derivate mit Antiserum 167E in %

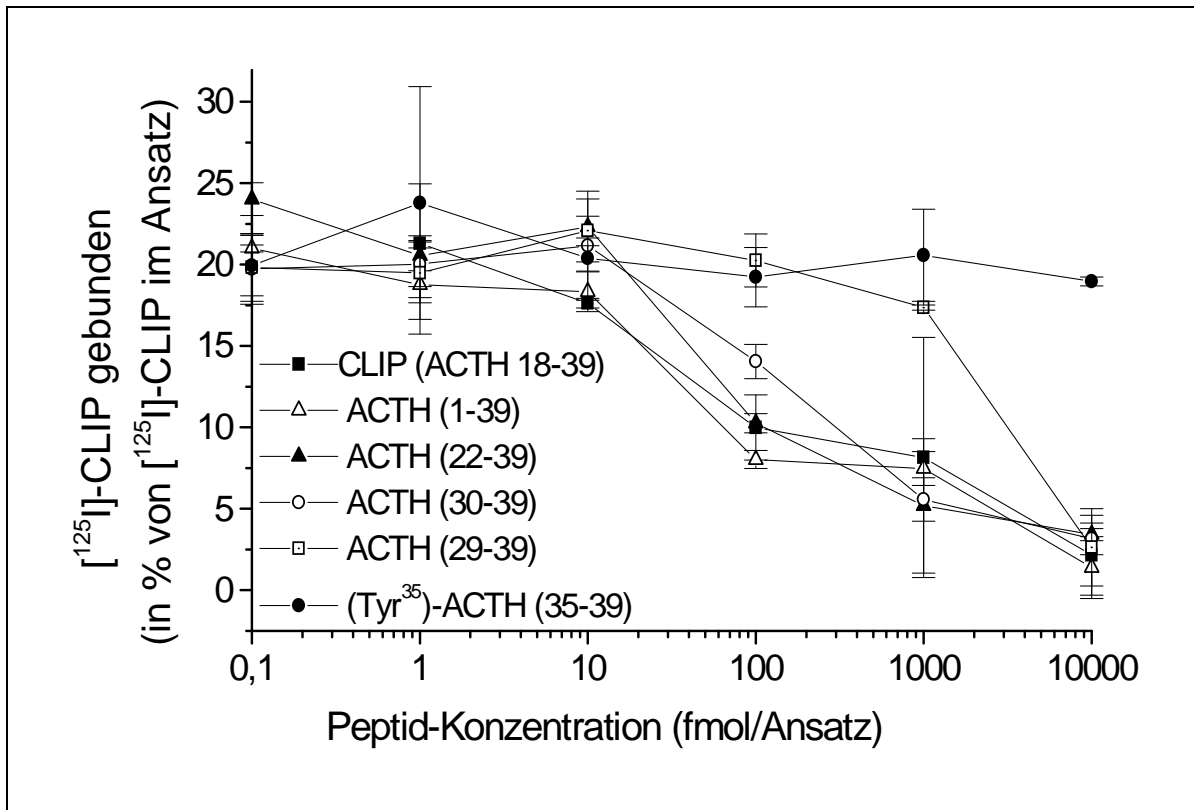


Abb. 4 Kreuzreaktivitäten des Antiserums 167E

Die Kreuzreaktivität κ berechnet sich aus der dem Wendepunkt der Standardkurve entsprechenden Konzentration von α -MSH und der dem Wendepunkt der Verdrängungskurve entsprechenden Konzentration eines anderen Peptids.

Beispiel ACTH (29-39): Der Wendepunkt der CLIP-Standardkurve entspricht einer Peptidkonzentration von 44 fmol, der Wendepunkt der ACTH (29-39)- Verdrängungskurve einer Konzentration von 2300 fmol. Es ergibt sich eine Kreuzreaktivität von $\kappa = (44/2300) \cdot 100 = 1,91 \%$.



Abb. 5 Aminosäuresequenz von Proopiomelanocortin

Kennzeichnung der Fragmente sowie ihrer Modifikationen, die zur Testung der Spezifität der entwickelten RIAs eingesetzt wurden.

5.2 Ausschluß der Expression des hypophysären POMC in HaCaT-Zellen

In Tab. 7 sind alle Ergebnisse zur POMC-Genexpression dargestellt, die mit den eingesetzten Primerpaaren an HaCaT-Zellkulturen erhoben worden sind.

Zelltyp	Bedingung	Primer	Primer	Primer
		HPO10 HPO13	HPO10 EXO21	HPO1 HPO2
	POMC-Expression (Hypophyse/Mensch)	353	813	319
HaCaT	Glucose Ø	RT +/-: ca.350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier RT+: ca. 550
HaCaT	TRH 10 ⁻⁶ M	RT +/-: ca.350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier RT+: ca. 550
HaCaT	Haloperidol 10 ⁻⁶ M	RT +/-: ca.350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier RT+: ca. 550
HaCaT	Kontrolle	RT +/-: ca.350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier RT+: ca. 550
DMS 79	Positiv-Kontrolle	RT +: ca. 350	RT+: ca. 500 RT+: ca. 800	RT+: ca. 300

Tab. 7 Untersuchung auf POMC-Expression:

Länge der Nukleotidsequenzen (Anzahl bp) der mittels RT-PCR erhaltenen Amplifikate aus den RNA-Extrakten der untersuchten Zellen im Vergleich mit den bei der Expression des hypophysären POMC-Gens des Menschen zu erwartenden Nukleotidsequenzlängen (RT+: Reverse Transkription; RT-: keine Reverse Transkription; Schmier: diffuse Amplifikate)

5.2.1 Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens unter Basal- oder Stimulationsbedingungen

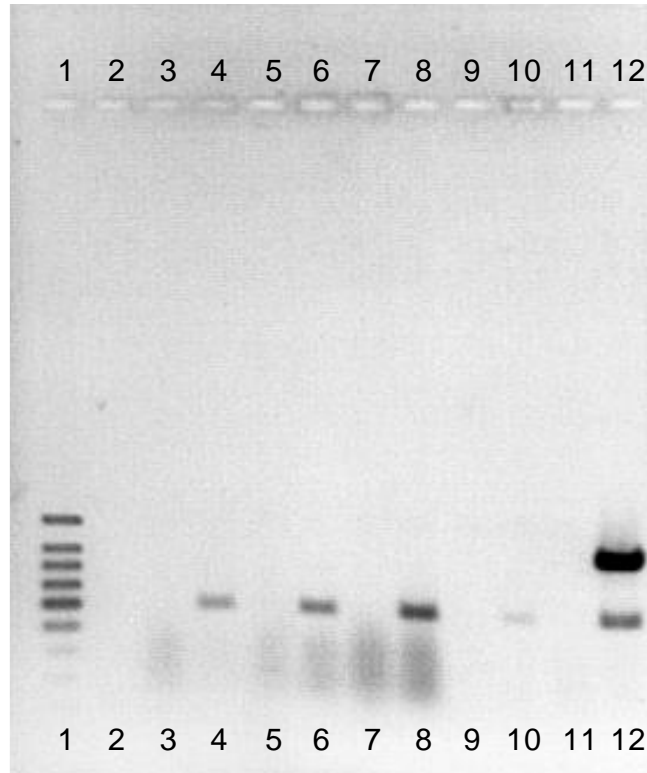


Abb. 6 Ergebnis der RT-PCR mit RNA-Extrakten von HaCaT-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer HPO 10/ EXO 21

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mit TRH 10⁻⁶M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10⁻⁶M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

In HaCaT-Zellkulturen konnte weder unter basalen Bedingungen noch nach den durchgeführten Stimulationen eine Expression des hypophysären POMC-Gens nachgewiesen werden (Abb. 6) Die als Primer benutzten Nukleotidsequenzen 5'-GAA GAT GCC GAG ATC GTG CT 3' (EXO21) und 5' TGC CCT CAC TCG CCC TTC TTG TA-3' (HPO10) führten bei der Positivkontrolle (humane Lungenkarzinomzelllinie DMS 79) zur Amplifikation einer etwa 800 bp langen Sequenz, was der erwarteten Größe des hypophysären POMC-Transkripts entsprach. Die Sequenzierung (durch Chakraborty, Institut für Mikrobiologie, Gießen) ergab 95% Übereinstimmung des Amplifikates mit der betreffenden Sequenz des humanen POMC-Gens. In keiner der Proben, weder unter Basalbedingungen noch nach Stimulation mit TRH, Haloperidol oder unter glucosedefizitären Bedingungen, wurde ein 800 bp großes Amplifikat gefunden. Das in allen transkribierten Proben enthaltene, etwa 500 bp lange Amplifikat wurde sequenziert. Ein BLAST-Search im menschlichen Genom ergab, daß es sich hierbei um das Amplifikat eines Fragmentes aus der Nucleotidsequenz des WD40-CIAO1-Gens handelte. POMC und WD40-CIAO1 haben offensichtlich nichts miteinander zu tun, beide liegen auf Chromosom 2, jedoch ca. 70 Millionen Basen voneinander entfernt. Außer im Bereich der Primer gibt es weder auf Gen- noch auf Proteinebene Sequenzhomologien (Peter Mayer, Magdeburg).

Abb. 7 und Abb. 8 zeigen ,daß auch mit zwei weiteren Primerpaaren mittels RT-PCR mit RNA-Extrakten von HaCaT-Zellen keine Expression des hypophysären POMC-Gens nachgewiesen werden konnte. Die Primer 5'-TGC CCT CAC TCG CCC TTC TTG TA-3' (HPO10) und 5'-AAG CGG CGC CCA GTG AAG GT-3' (HPO13) führten in der Positivkontrolle (Lungenkarzinomzelllinie DMS 79) zur Amplifikation einer etwa 350 bp langen Sequenz, was der erwarteten Größe des hypophysären POMC-Transkripts mit diesem Primerpaar entsprach. Da diese Bande zwar auch auf den Spuren der HaCaT-Zell-RNA-Extrakte, jedoch jeweils sowohl auf der RT+ -Spur als auch auf der RT- -Spur erscheint, handelt es sich dabei offensichtlich um Kontaminationen mit genomischer DNA und nicht um transkribierte cDNA-Fragmente.

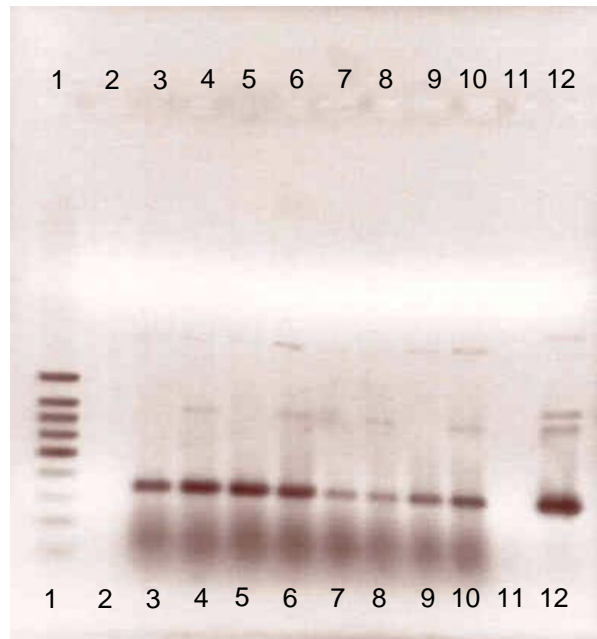


Abb. 7 Ergebnis der RT-PCR mit RNA-Extrakten von HaCaT-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer HPO 10/HPO 13

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mit TRH 10^{-6} M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10^{-6} M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

Die Primer 5'-TGT CAG GAC CTC ACC ACG GA-3' (HPO1) und 5'-CCA TGG AGT AGG AGC GCT TG-3' (HPO2) führten in der Positivkontrolle (Lungenkarzinomzelllinie DMS 79) zur Amplifikation einer etwa 300 bp langen Sequenz, was auch hier der erwarteten Größe des hypophysären POMC-Transkripts entsprach. Alle übrigen Spuren dieses Gels zeigten „Schmier“, die

RT+-Spuren zeigten zusätzlich ein unspezifisches, ca. 550 bp großes Amplifikat. Es konnte keine Expression des hypophysären POMC nachgewiesen werden (Abb. 8).

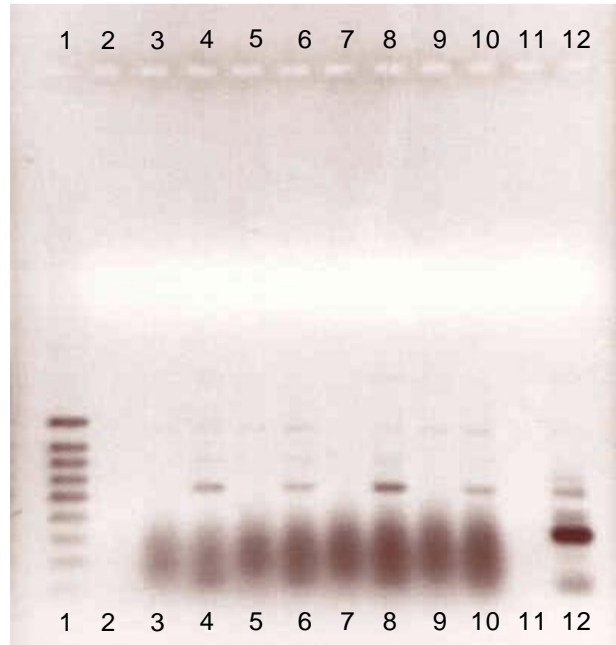


Abb. 8 Ergebnis der RT-PCR mit RNA-Extrakten von HaCaT-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer HPO 1/HPO 2

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mit TRH 10^{-6} M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus HaCaT-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10^{-6} M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

5.2.2 Ausschluß der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten unter Basal- oder Stimulationsbedingungen

5.2.2.1 Stimulation mittels Glucosedefizit

In HaCaT-Zellkulturen konnte unter basalen Bedingungen keine Bildung oder Freisetzung von POMC-Derivaten beobachtet werden. Auch nach Glucosedefizit-Stimulation waren die HaCaT-Zellen nicht in der Lage, POMC-Derivate zu bilden oder freizusetzen. Das Standard-Medium für die Züchtung der Zelllinie HaCaT enthielt 4,5 g Glucose/l. Stimuliert wurde mit 3 Glucosekonzentrationen (0, 1 und 2 g/l). Die 4,5 g/l-Probe entsprach in ihrer Zusammensetzung exakt der der DMEM-Kontrolle.

Die folgenden Abbildungen zeigen Ergebnisse, die freundlicherweise von Dr. Bödeker (Institut für Medizinische Informatik, Gießen) mittels Multivarianzanalyse auf Signifikanz getestet wurden. Es wurde ein 95% Konfidenzintervall gewählt. In keinem der durchgeführten Versuche ließ sich ein signifikanter Unterschied der einzelnen Werte voneinander zeigen. Abb. 9 und Abb. 10 zeigen die Ergebnisse der α -MSH-IRM RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkulturen mittels Glucosedefizit. Die Nachweisgrenze des α -MSH-IRM-RIAs wurde in HaCaT-Zellkulturüberstand und -Zellysat bestimmt und lag in den Überständen bei 6,15 fmol/ml. Sowohl die B_0 -Werte, die der Nachweisgrenze zugrunde liegen, als auch die Probenwerte, die sich aus Zellkulturüberständen oder Zellysaten aus stimulierten oder nicht stimulierten Zellkulturen ableiten, beziehen sich auf 500 000 HaCaT-Zellen (entsprechend 20% der Zellmenge pro Zellkulturschale). Die Nachweisgrenze bei den Lysaten betrug 16,2 fmol/ml. Die dargestellten Befunde streuen um diese Nachweisgrenzen.

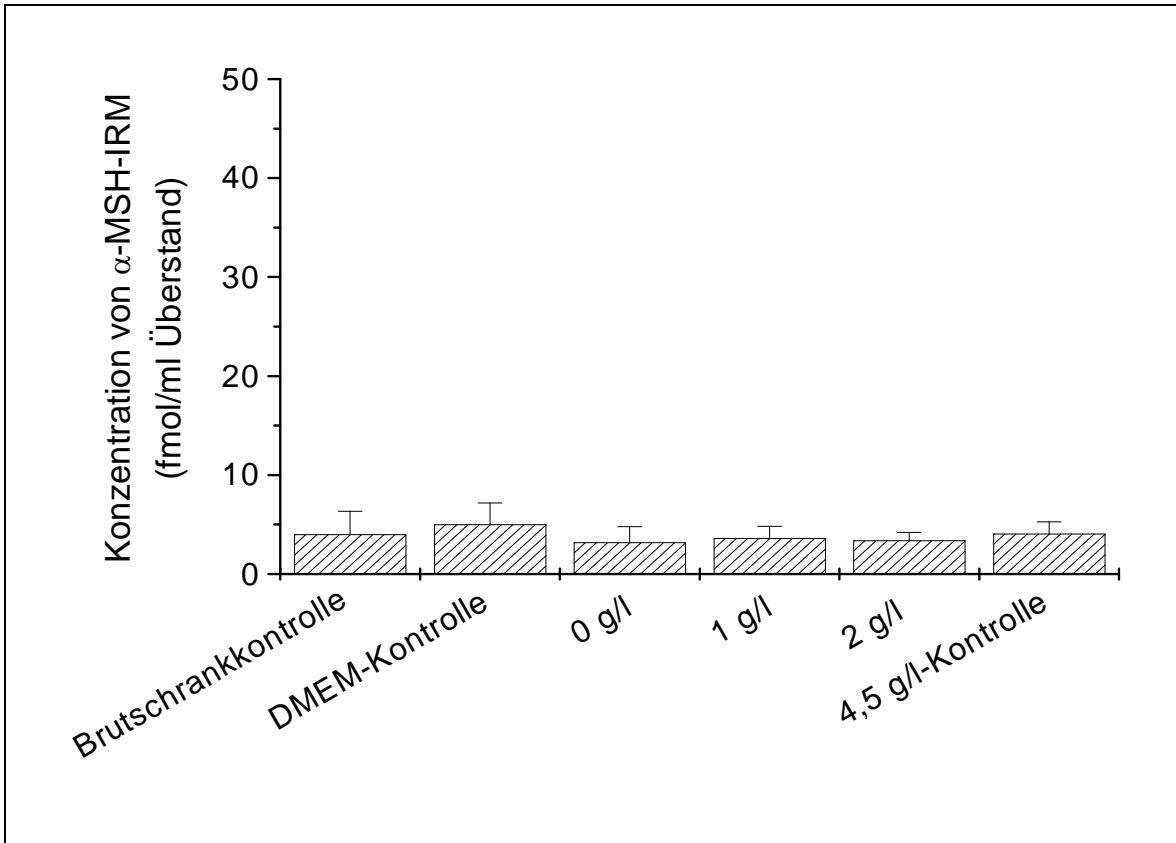


Abb. 9 α -MSH-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von HaCaT-Zellkulturen

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Brutschrank-, DMEM- und 4,5 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen im Kulturmedium (0, 1, 2 g/l) in Überständen von HaCaT-Zellkulturen. In der DMEM-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 4,5 g/l identisch mit der 4,5 g/l-Probe. ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 6,15 fmol/ml.

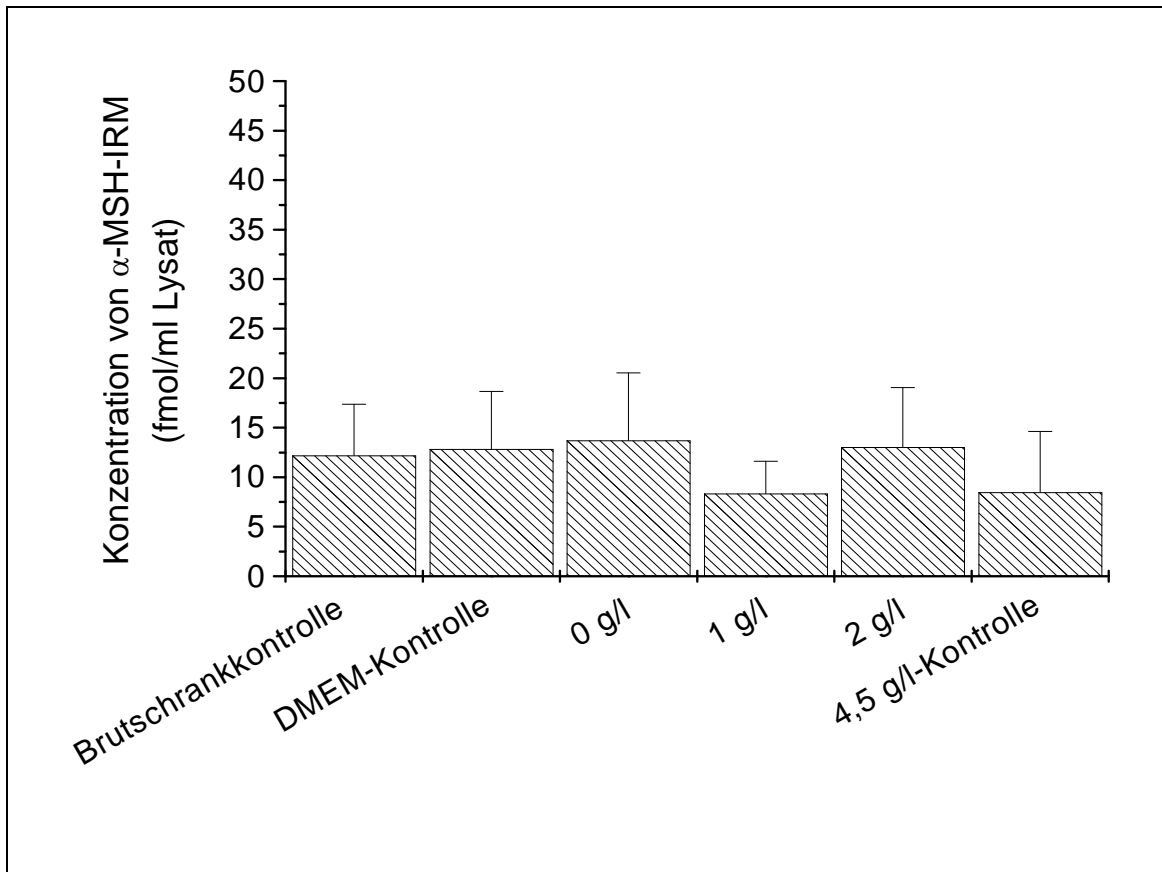


Abb. 10 α -MSH-IRM-Konzentration in Zelllysaten unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von HaCaT-Zellkulturen

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Brutschrank-, DMEM- und 4,5 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen im Kulturmedium (0, 1, 2 g/l) in Lysaten von HaCaT-Zellen. In der DMEM-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 4,5 g/l identisch mit der 4,5 g/l-Probe. ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 16,2 fmol/ml.

Abb. 11 und Abb. 12 zeigen die Ergebnisse der Ac-N- β _H-Endorphin RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkulturen mittels Glucosedefizit. Die Nachweisgrenze von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM lag in den Überständen bei 5,5 fmol/ml und in den Lysaten bei 10,5 fmol/ml (entsprechend fmol/500 000 HaCaT-Zellen). Die dargestellten Überstand-Befunde liegen unter dieser Nachweisgrenze, die Lysat-Befunde liegen im Streubereich.

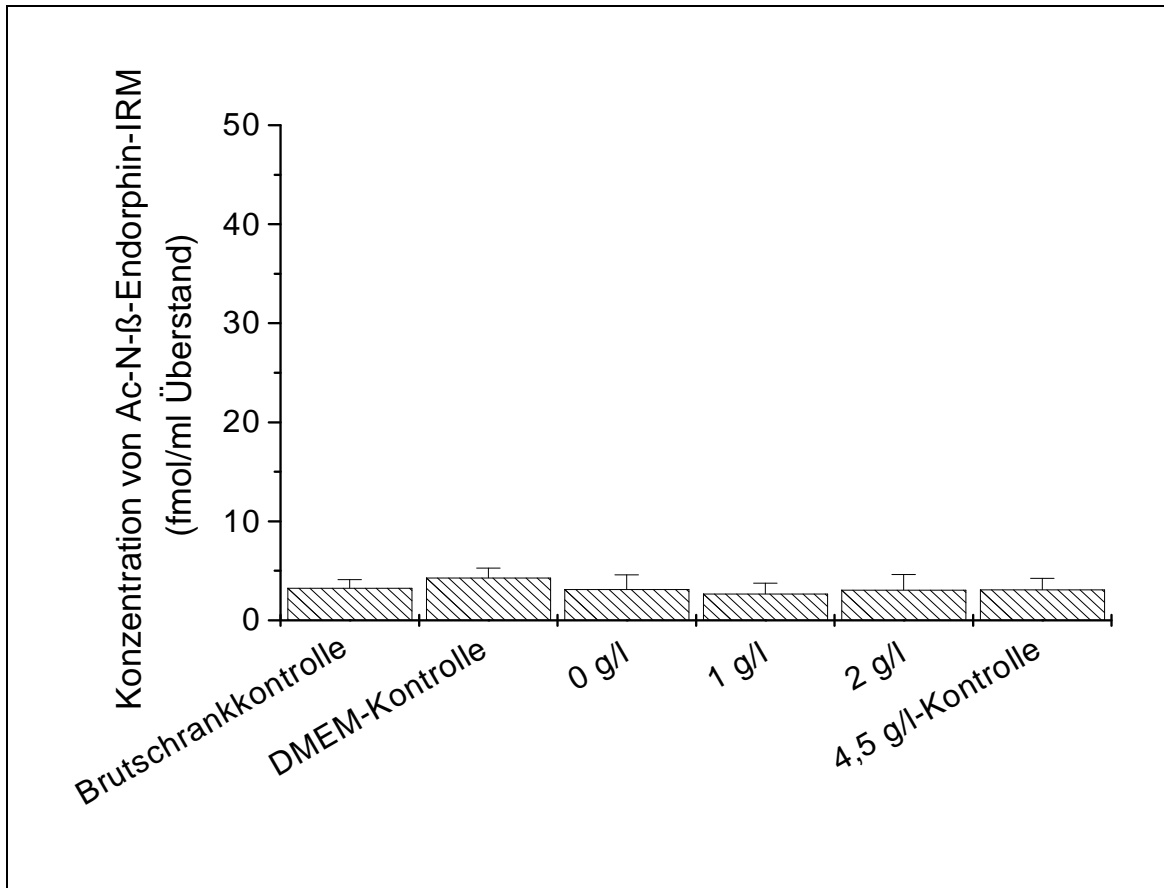


Abb. 11 Ac-N- β _H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellkultur-überständen unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von HaCaT-Zellkulturen

Konzentrationen von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Brutschrank-, DMEM- und 4,5 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen im Kulturmedium (0, 1, 2 g/l) in Überständen von HaCaT-Zellkulturen. In der DMEM-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 4,5 g/l identisch mit der 4,5 g/l-Probe. ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 5,5 fmol/ml.

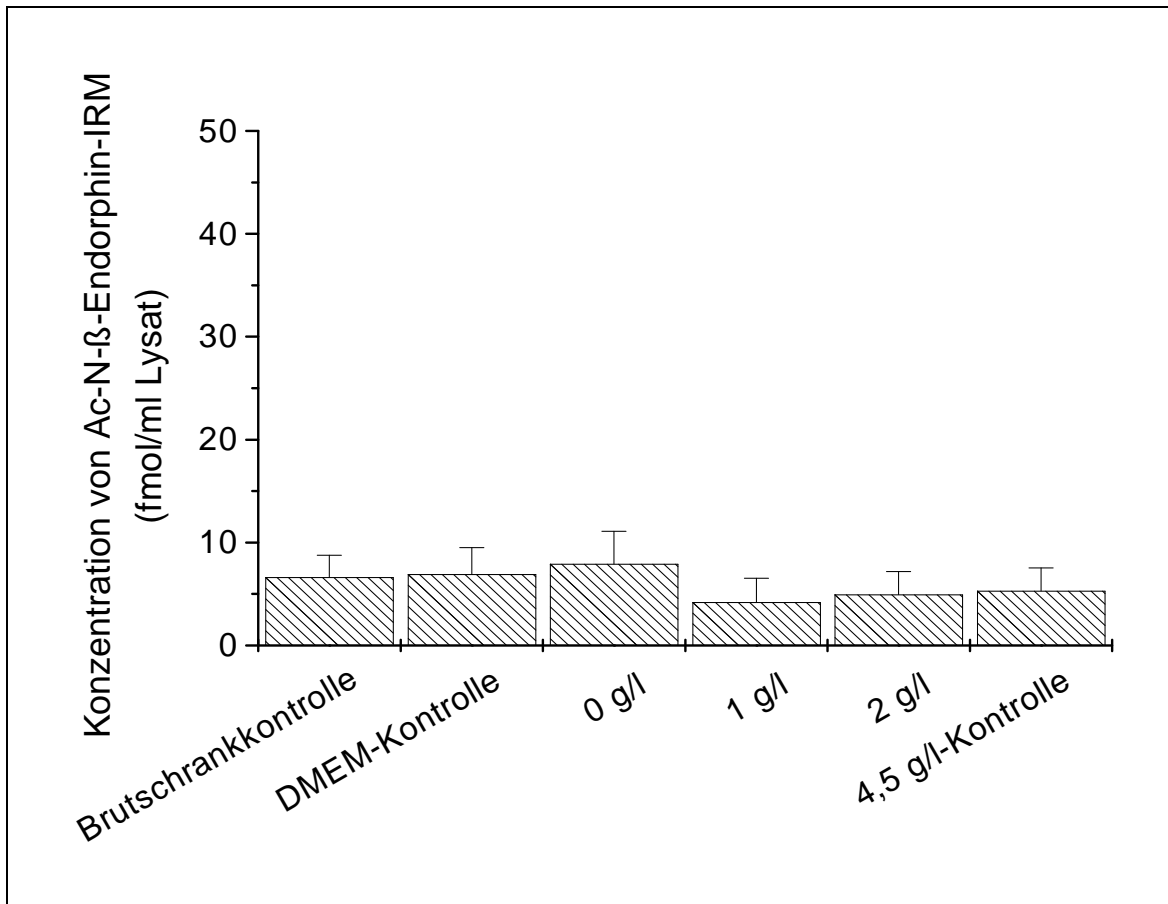


Abb. 12 Ac-N- β _H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellysaten unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von HaCaT-Zellkulturen

Konzentrationen von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Brutschrank-, DMEM- und 4,5 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen im Kulturmedium (0, 1, 2 g/l) in Lysaten von HaCaT-Zellen. In der DMEM-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 4,5 g/l identisch mit der 4,5 g/l-Probe. ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 10,5 fmol/ml.

Abb. 13 und Abb. 14 zeigen die Ergebnisse der β_H -Endorphin RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkulturen mittels Glucosedefizit. Die Nachweisgrenze von β_H -Endorphin-IRM lag in den Überständen bei 8,3 fmol/ml und in den Lysaten bei 8,8 fmol/ml. Die dargestellten Befunde liegen im Streubereich dieser Nachweisgrenzen.

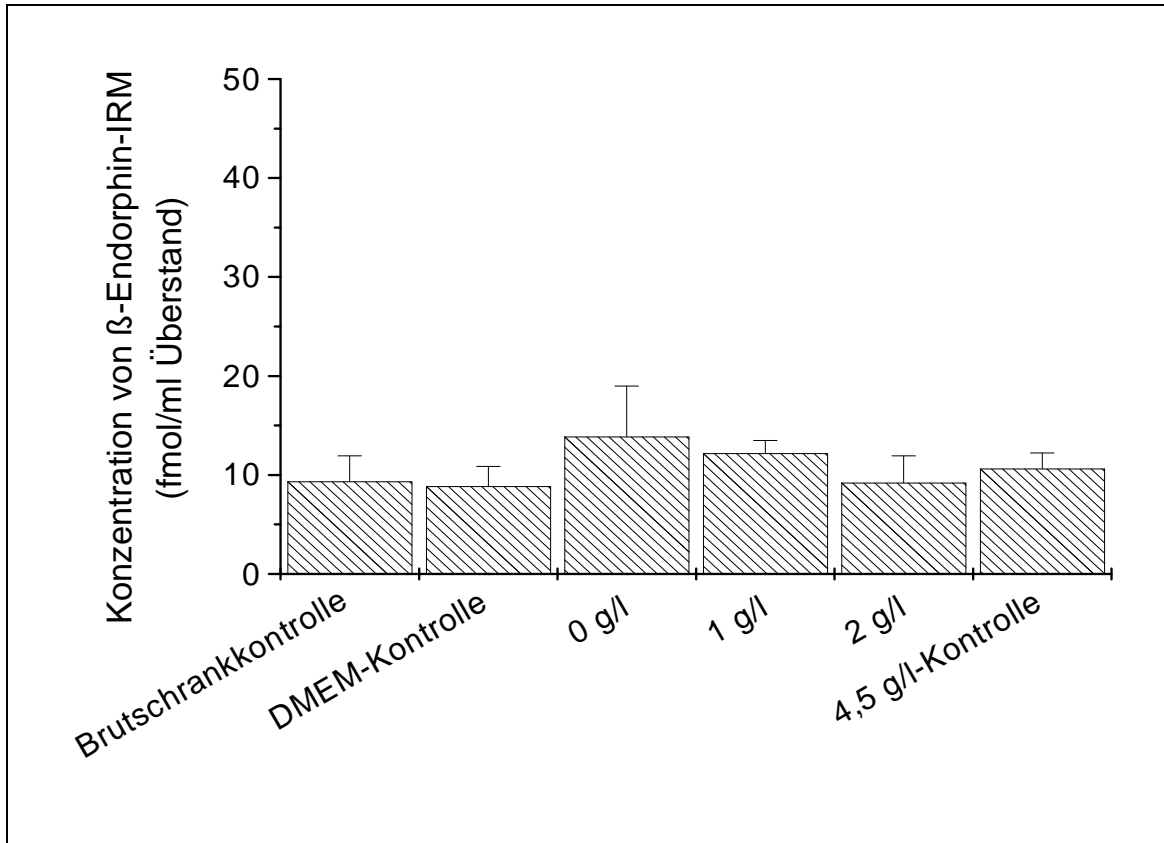


Abb. 13 β_H -Endorphin-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von HaCaT-Zellkulturen

Konzentrationen von β_H -Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Brutschrank-, DMEM- und 4,5 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen im Kulturmedium (0, 1, 2 g/l) in Überständen von HaCaT-Zellkulturen. In der DMEM-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 4,5 g/l identisch mit der 4,5 g/l-Probe. ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 8,3 fmol/ml.

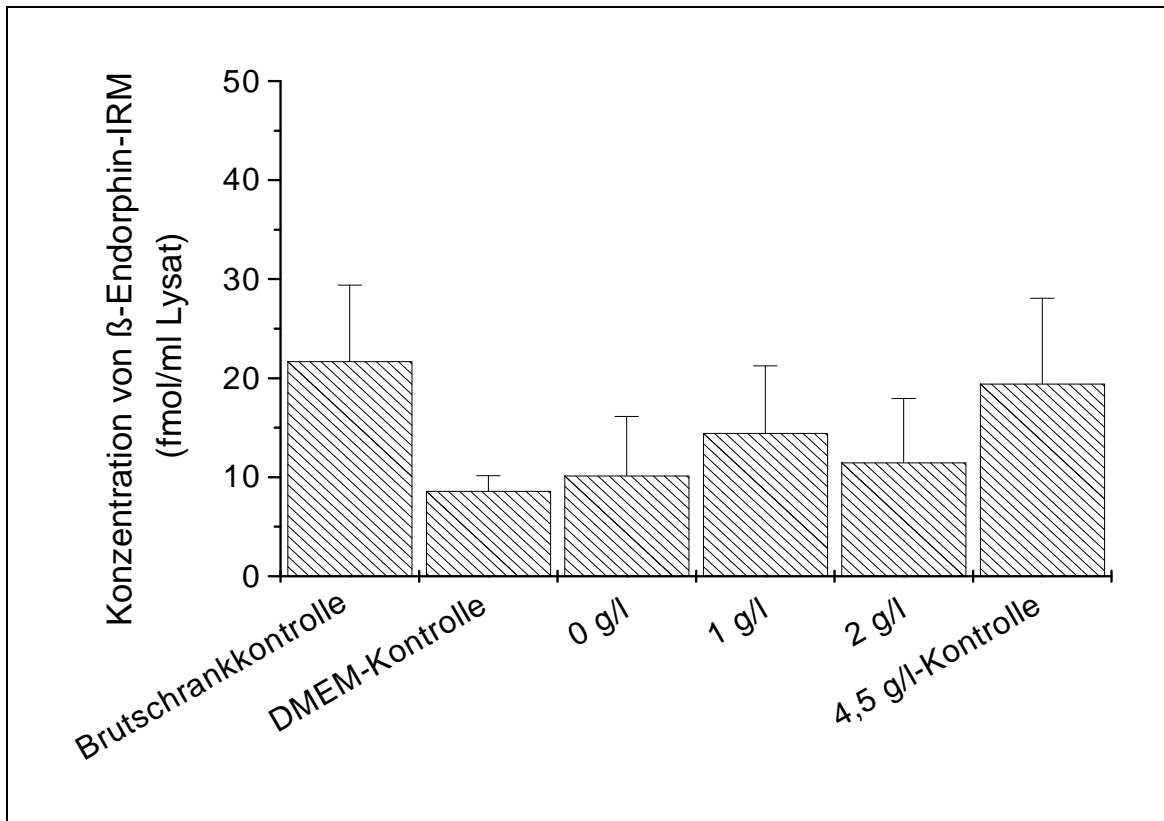


Abb. 14 β_H -Endorphin-IRM-Konzentration in Zellysaten unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von HaCaT-Zellkulturen

Konzentrationen von β_H -Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Brutschrank-, DMEM- und 4,5 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen im Kulturmedium (0, 1, 2 g/l) in Lysaten von HaCaT-Zellen. In der DMEM-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 4,5 g/l identisch mit der 4,5 g/l-Probe. ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 8,8 fmol/ml.

Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der CLIP/ACTH-RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkultur mittels Glucosedefizit. Die Befunde streuen um die Nachweisgrenze von 2,8 fmol/ml Lysat.

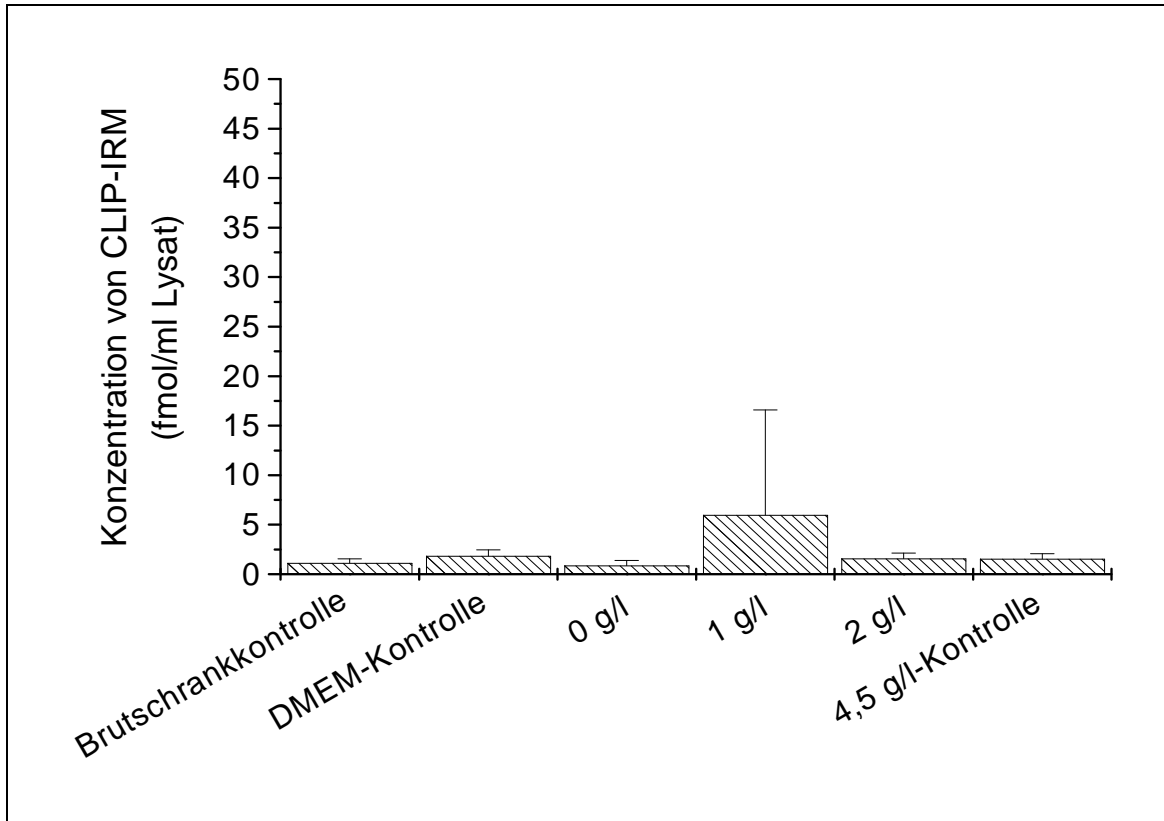


Abb. 15 CLIP/ACTH-IRM-Konzentration in Zellysaten unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von HaCaT-Zellkulturen

Konzentrationen von CLIP-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Brutschrank-, DMEM- und 4,5 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen im Kulturmedium (0, 1, 2 g/l) in Lysaten von HaCaT-Zellen. In der DMEM-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 4,5 g/l identisch mit der 4,5 g/l-Probe. ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 2,8 fmol/ml.

5.2.2.2 Stimulation mittels Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)

Alle erhobenen Befunde liegen im Streubereich der Nachweisgrenze.

Abb. 16 und Abb. 17 zeigen die Ergebnisse der α -MSH RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkulturen mittels TRH.

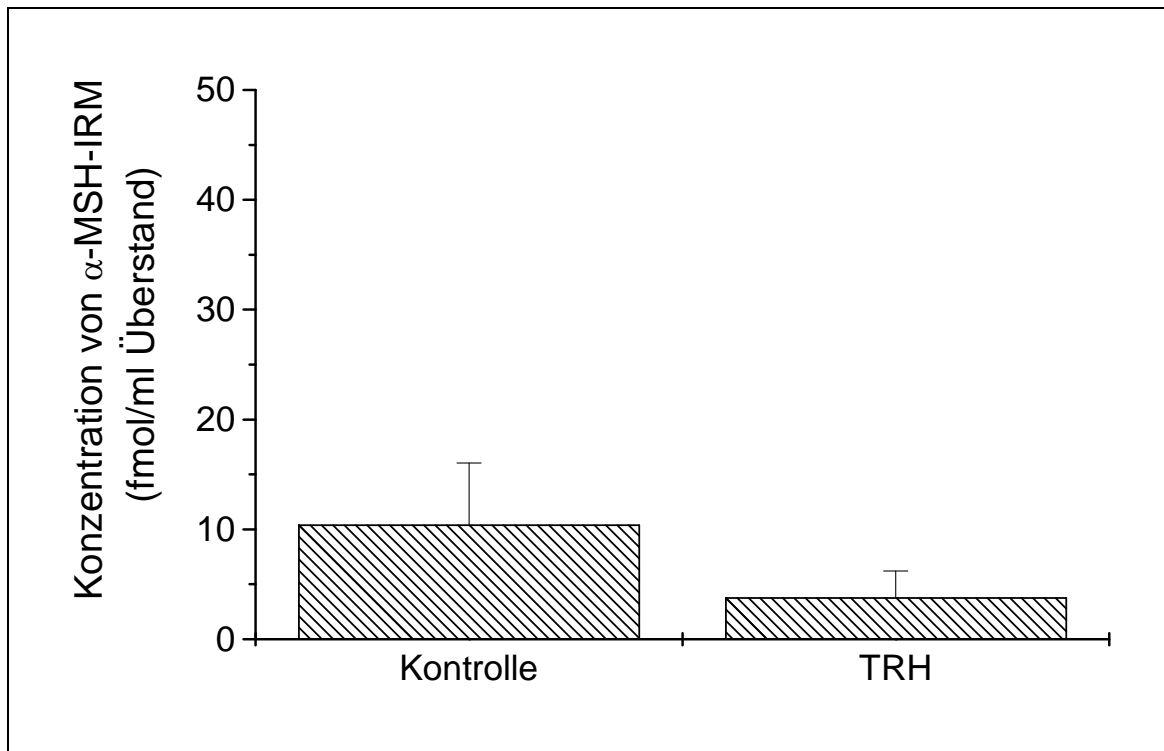


Abb. 16 α -MSH-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit TRH (10^{-6} M)

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10^{-6} M) in Überständen von HaCaT-Zellkulturen, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von zwei Versuchen). Nachweisgrenze: 6,15 fmol/ml.

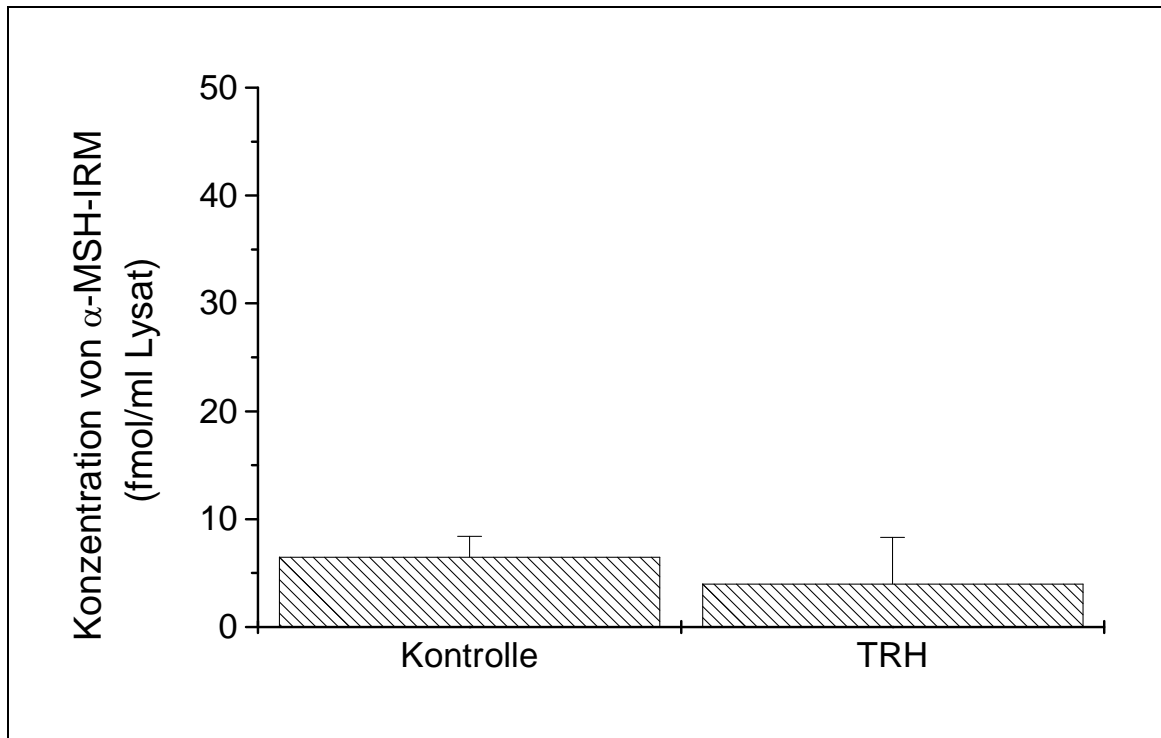


Abb. 17 α -MSH-IRM-Konzentration in Zelllysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit TRH (10^{-6} M)

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10^{-6} M) in Lysaten von HaCaT-Zellen, ($x_{\text{mean}} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von zwei Versuchen). Nachweisgrenze: 16,2 fmol/ml.

Abb. 18 und Abb. 19 zeigen die Ergebnisse der Ac-N- β _H-Endorphin RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkulturen mittels TRH.

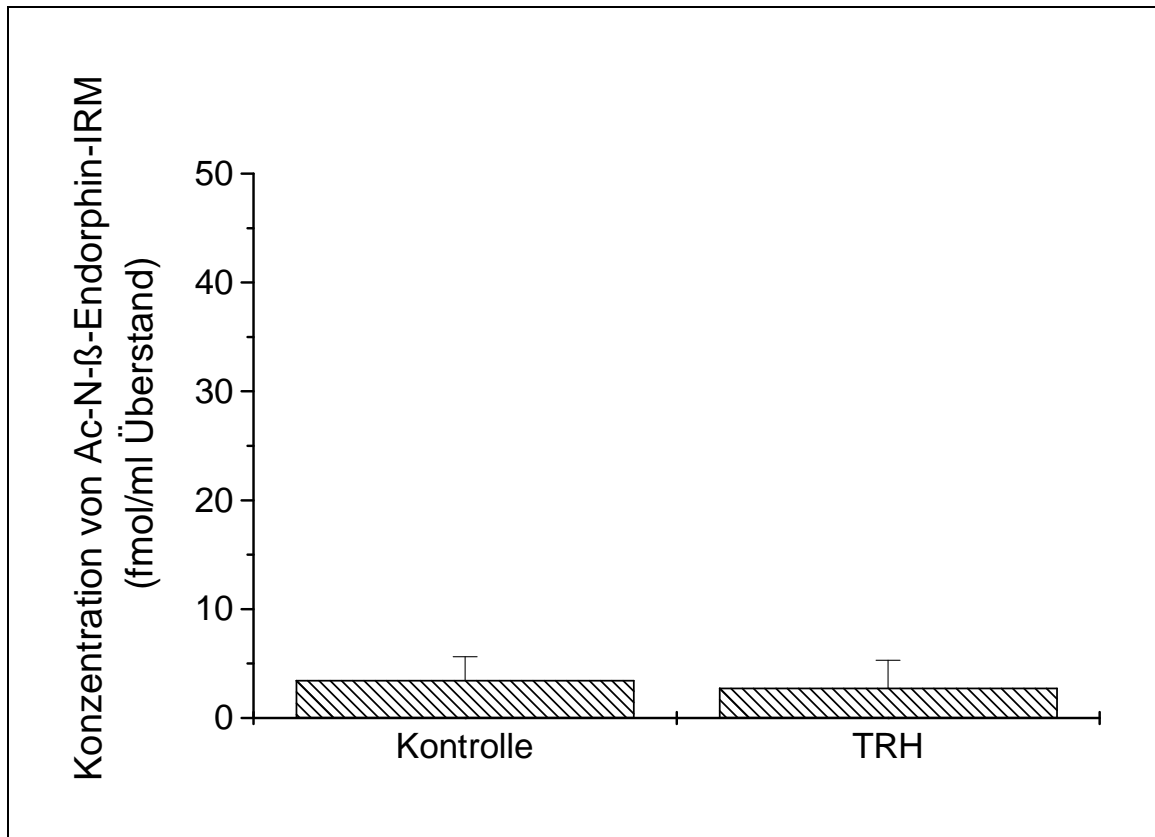


Abb. 18 Ac-N- β _H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellkultur-überständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit TRH (10^{-6} M)

Konzentrationen von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10^{-6} M) in Überständen von HaCaT-Zellkulturen, ($x_{\text{mean}} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von zwei Versuchen). Nachweisgrenze: 5,5 fmol/ml.

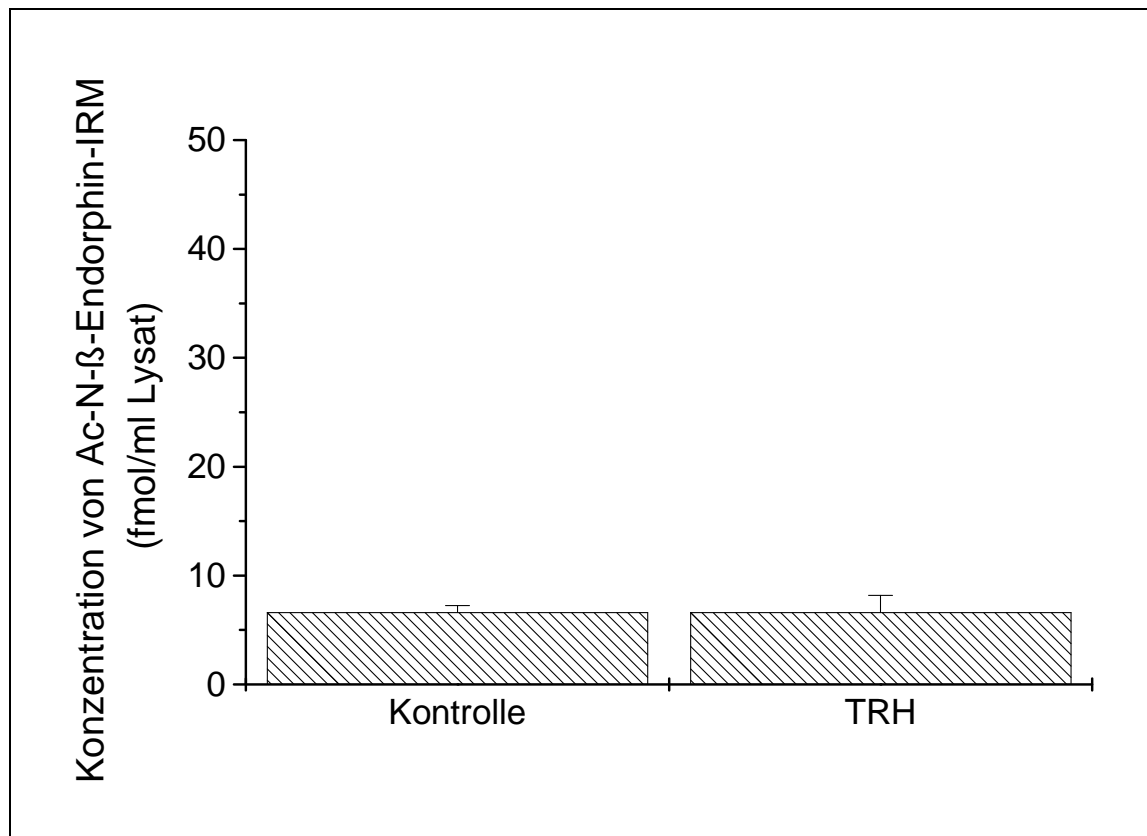


Abb. 19 Ac-N-β_H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit TRH (10⁻⁶M)

Konzentrationen von Ac-N-β_H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10⁻⁶M) in Lysaten von HaCaT-Zellen, ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von zwei Versuchen). Nachweisgrenze: 10,5 fmol/ml.

5.2.2.3 Stimulation mittels Haloperidol

Die erhobenen Befunde liegen bis auf den Basalwert im α -MSH-RIA (Kontrolle in Abb. 20) im Streubereich der Nachweisgrenze. Dieser Basalwert spricht jedoch nicht für eine basale Bildung von α -MSH in HaCaT-Zellkulturen, da sich dieser Wert nicht reproduzieren lässt (siehe bisherige α -MSH-Ergebnisse). Abb. 20 und Abb. 21 zeigen die Ergebnisse der α -MSH-RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkulturen mittels Haloperidol.

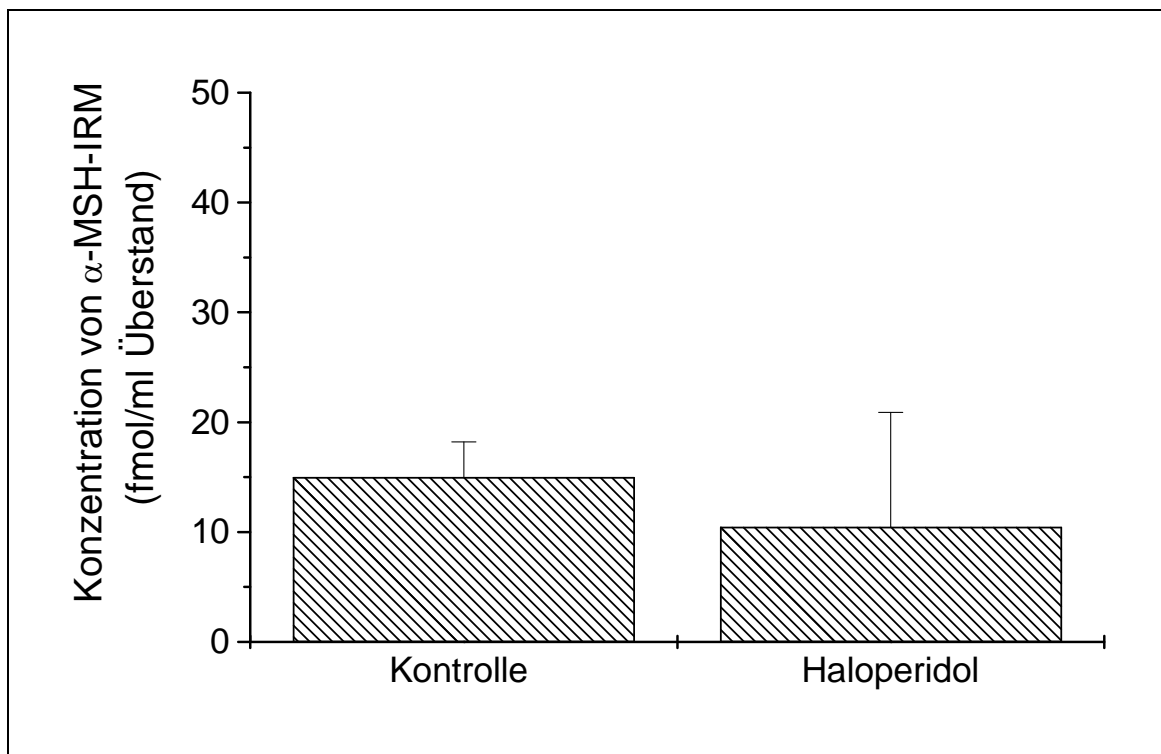


Abb. 20 α -MSH-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit Haloperidol (10^{-6} M)

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10^{-6} M) in Überständen von HaCaT-Zellkulturen, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 6,15 fmol/ml.

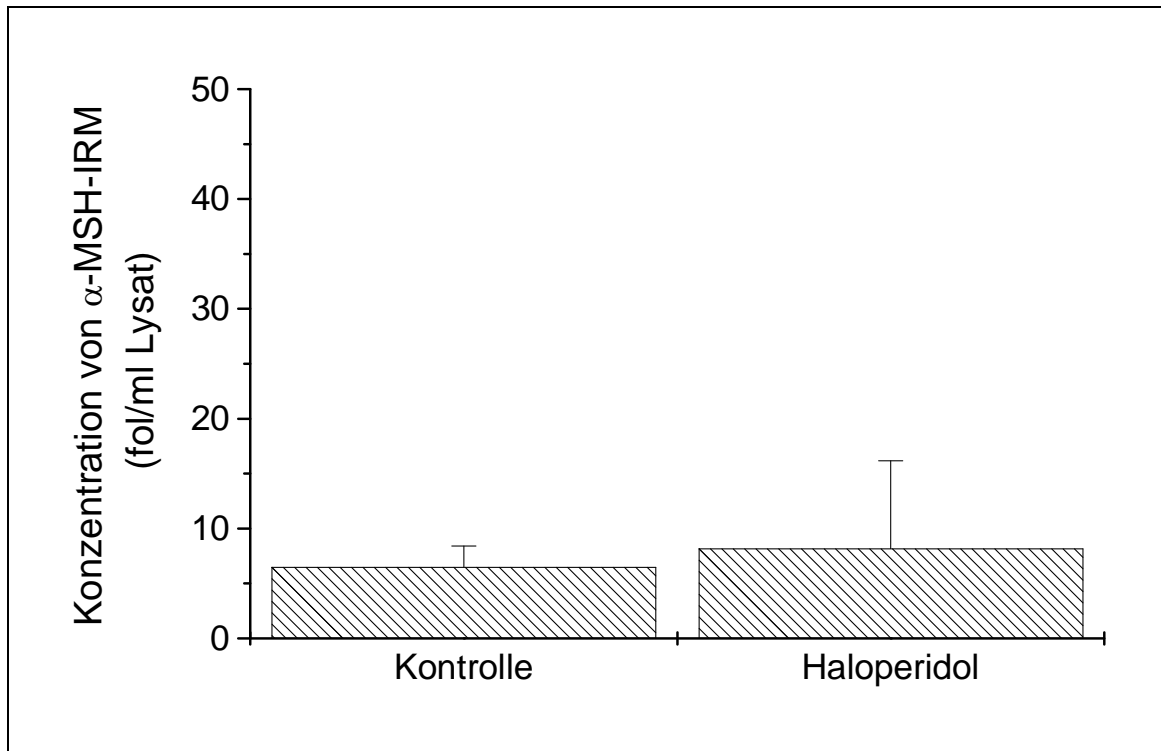


Abb. 21 α -MSH-IRM-Konzentration in Zelllysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit Haloperidol (10^{-6} M)

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10^{-6} M) in Lysaten von HaCaT-Zellen, ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 16,2 fmol/ml.

Abb. 22 und Abb. 23 zeigen die Ergebnisse der Ac-N- β _H-Endorphin RIAs nach der Stimulation von HaCaT-Zellkulturen mittels Haloperidol.

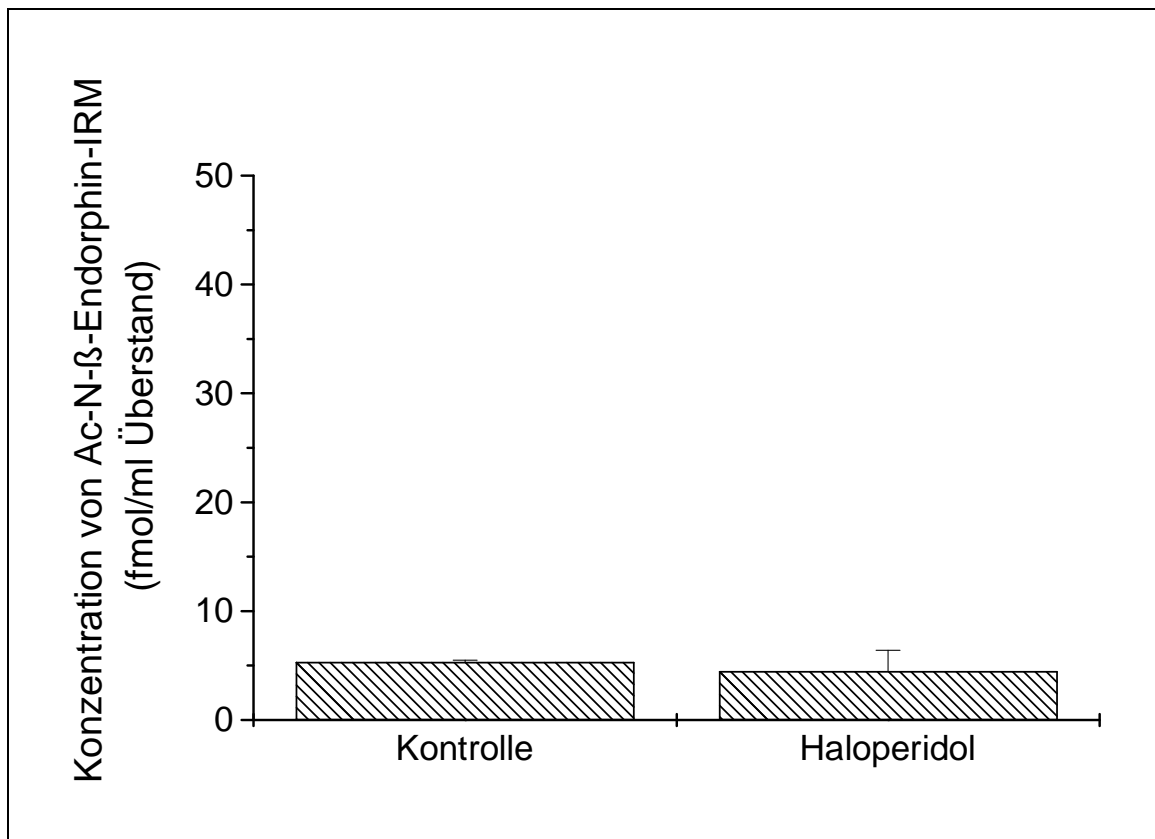


Abb. 22 Ac-N- β _H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellkultur-überständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit Haloperidol (10^{-6} M)

Konzentrationen von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10^{-6} M) in Überständen von HaCaT-Zellkulturen, ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 5,5 fmol/ml.

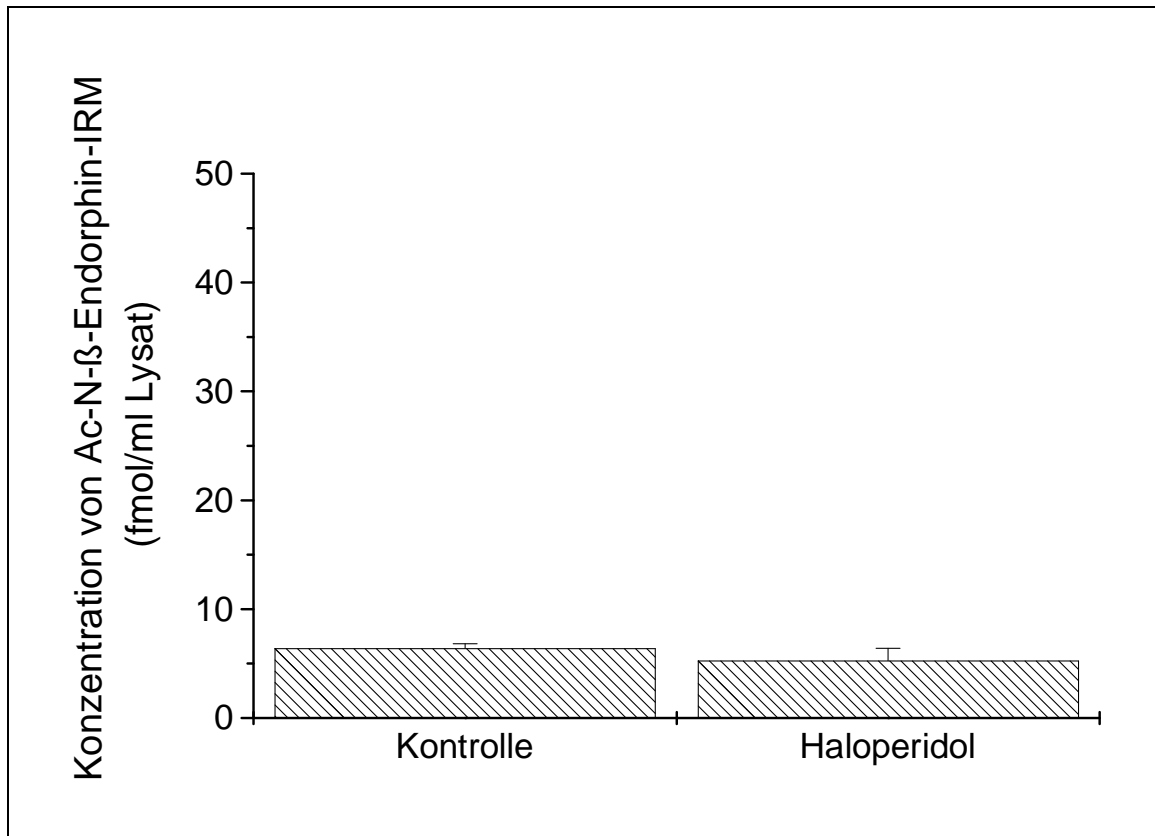


Abb. 23 Ac-N-β_H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der HaCaT-Zellkulturen mit Haloperidol (10⁻⁶M)

Konzentrationen von Ac-N-β_H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/500000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10⁻⁶M) in Lysaten von HaCaT-Zellen, ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 10,5 fmol/ml.

5.3 Ausschluß der Expression des hypophysären POMC in A 431-Zellen

In Tab. 8 sind alle Ergebnisse zur POMC-Genexpression dargestellt, die mit den eingesetzten Primerpaaren an A 431-Zellkulturen erhoben worden sind.

Zelltyp	Bedingung	Primer	Primer	Primer
		HPO10 HPO13	HPO10 EXO21	HPO1 HPO2
	POMC-Expression (Hypophyse/Mensch)	353	813	319
A 431	Glucose Ø	RT+/-: ca. 350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier/ diffus
A 431	TRH 10⁻⁶M	Schmier RT+/-: ca. 350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier/ diffus
A 431	Haloperidol 10⁻⁶M	Schmier RT+/-: ca. 350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier/ diffus
A 431	StimulationKontrolle	Schmier RT+/-: ca. 350	Schmier RT+: ca. 500	Schmier/ diffus
DMS 79	Positiv-Kontrolle	RT+: ca. 350	RT+: ca. 500 RT+: ca. 800	RT+: ca. 300

Tab. 8 Untersuchung auf POMC-Expression:
Länge der Nukleotidsequenzen (Anzahl bp) der mittels RT-PCR erhaltenen Amplifikate aus den RNA-Extrakten der untersuchten Zellen im Vergleich mit den bei der Expression des hypophysären POMC-Gens des Menschen zu erwartenden Nukleotidsequenzlängen (RT+: Reverse Transkription; RT-: keine Reverse Transkription; Schmier: diffuse Amplifikate)

5.3.1 Ausschluß der Transkription des hypophysären POMC-Gens unter Basal- oder Stimulationsbedingungen

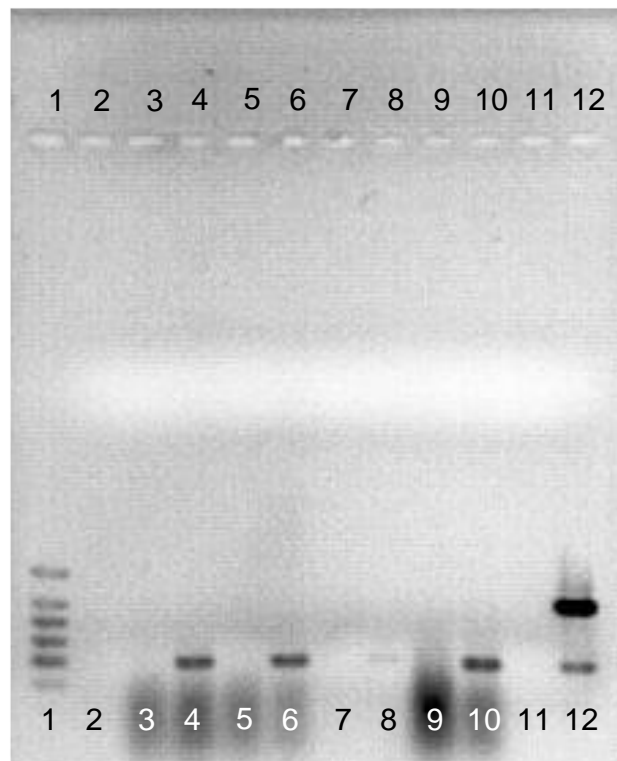


Abb. 24 Ergebnis der RT-PCR mit RNA-Extrakten von A 431-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer HPO 10/EXO 21

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit TRH 10^{-6} M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10^{-6} M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

Abb. 24, Abb. 25 und Abb. 26 zeigen in A 431-Zellen keinen Hinweis auf die Expression des hypophysären POMC-Gens. Die Befunde stellen sich für die Zelllinie A 431 dar, wie bereits für die Zelllinie HaCaT beschrieben (5.2.1).

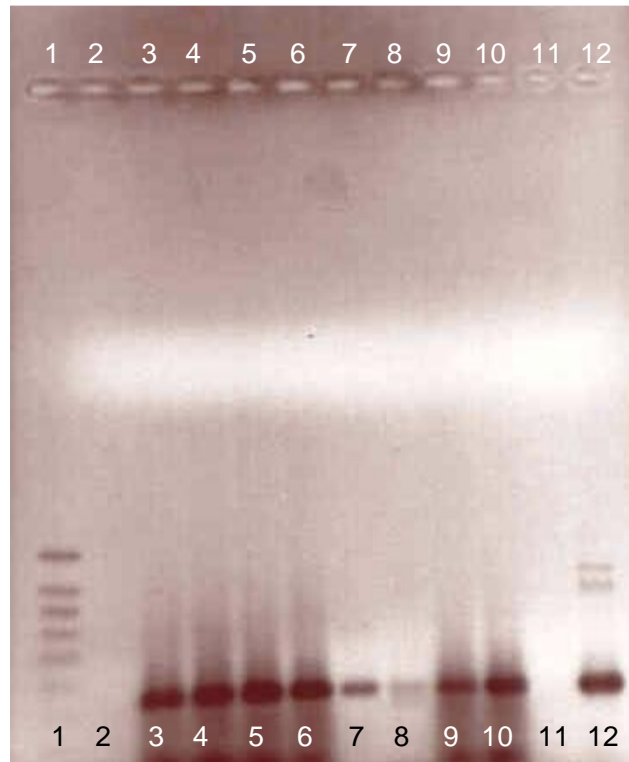


Abb. 25 Ergebnis der RT-PCR mit RNA-Extrakten von A 431-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer HPO 10/HPO 13

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit TRH 10^{-6} M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10^{-6} M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

Die Primer HPO1/ HPO2 führten in der Positivkontrolle (Lungenkarzinomzelllinie DMS 79) zur Amplifikation einer etwa 300 bp langen Sequenz, was auch hier der erwarteten Größe des hypophysären POMC-Transkripts mit diesem Primerpaar entsprach. Alle übrigen Banden dieses Gels zeigten nur diffuse Amplifikate und Schmier, sodaß auch hier keine Expression des hypophysären POMC nachgewiesen werden konnte.



Abb. 26 Ergebnis der RT-PCR mit RNA-Extrakten von A 431-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer HPO 1/HPO 2

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit TRH 10^{-6} M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10^{-6} M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

5.3.2 Ausschluß der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten unter Basal- oder Stimulationsbedingungen

5.3.2.1 Stimulation mittels Glucosedefizit

In A 431-Zellkulturen konnte weder unter basalen Bedingungen noch nach Stimulation der Zellkulturen mittels unterschiedlicher Glucosemangel-Konzentrationen (0 g/l und 1 g/l) eine Bildung oder Freisetzung von POMC-Derivaten beobachtet werden. Die Nachweisgrenze von α -MSH-IRM und Ac-N- β -_H-Endorphin wurde in A 431-Zellkulturüberstand und -lysat wie bereits in HaCat-Zellkulturüberstand und -lysat bestimmt und lag in den Überständen und Lysaten für α -MSH bei 9,4 fmol/ml (entsprechend fmol/330 000 A 431-Zellen). Für Ac-N- β -_H-Endorphin lag die Nachweisgrenze in den Überständen bei 13,3 fmol/ml und für die Lysate bei 7,0 fmol/ml. Alle dargestellten Befunde streuen um diese Nachweisgrenzen. Die Schalen mit 2 g Glucose/l Kulturmedium entsprechen in ihrer Zusammensetzung exakt der RPMI-Kontrolle, es wurde jedoch nicht das Standardmedium verwendet, sondern im Sinne einer weiteren Kontrolle dem glucosefreien RPMI-Medium diese Glucosemenge (2 g/l) zugegeben. Die Diskrepanz der Menge an nachgewiesenem α -MSH-IRM in im Prinzip gleichen Ansätzen (RPMI und 2 g/l) ist in diesem Versuch sehr groß und weist auf unbekannte Einflußfaktoren auf der Ebene der Zellkulturen hin.

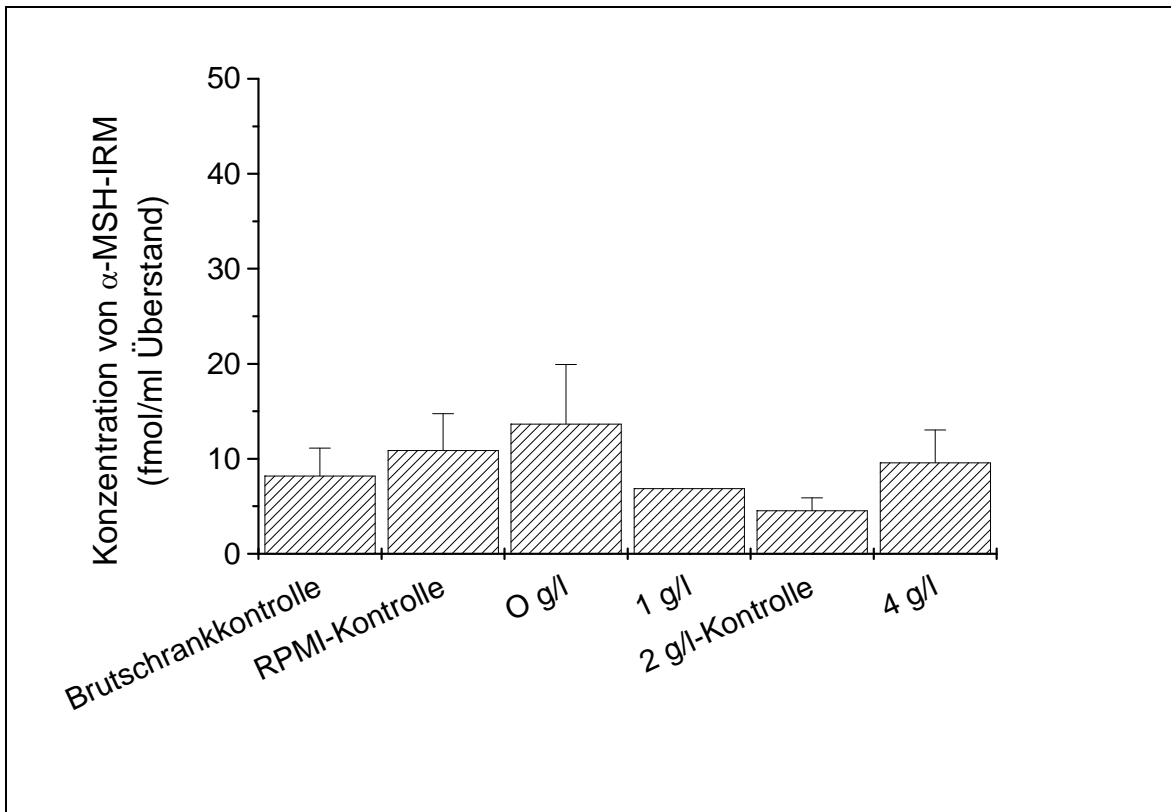


Abb. 27 α -MSH-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von A 431-Zellkulturen

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Brutschrank-, RPMI- und 2 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen (0, 1, 4 g/l) in Überständen von A 431-Zellkulturen. In der RPMI-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 2 g/l identisch mit der 2 g/l-Probe. ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 9,4 fmol/ml.

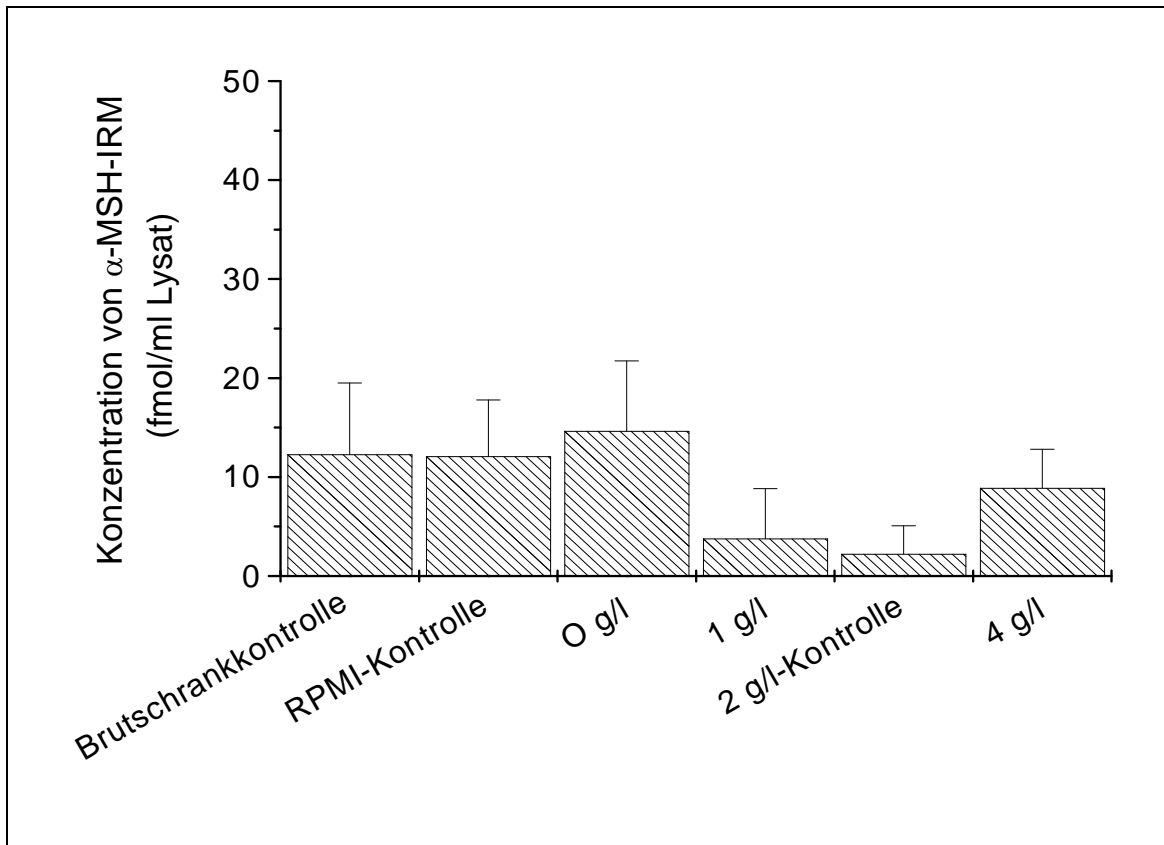


Abb. 28 α -MSH-IRM-Konzentration in Zelllysaten unter Basalbedingungen und nach Glucosedefizitstimulation von A 431-Zellkulturen

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Brutschrank-, RPMI- und 2 g/l-Kontrolle) und nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen (0, 1, 4 g/l) in Lysaten von A 431-Zellen. In der RPMI-Kontrolle ist der Glucosegehalt von 2 g/l identisch mit der 2 g/l-Probe, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ von RIA-Doppelbestimmungen aus einem Versuch). Nachweisgrenze: 9,4 fmol/ml.

5.3.2.2 Stimulation mittels Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)

Auch in diesem Versuch konnten keine POMC-Derivaten in Zellkulturüberständen und Zellysaten von A 431-Zellen gefunden werden. In den Abb. 29 und Abb. 30 sind die Ergebnisse der α -MSH RIAs nach der Stimulation von A 431-Zellen mittels TRH dargestellt.

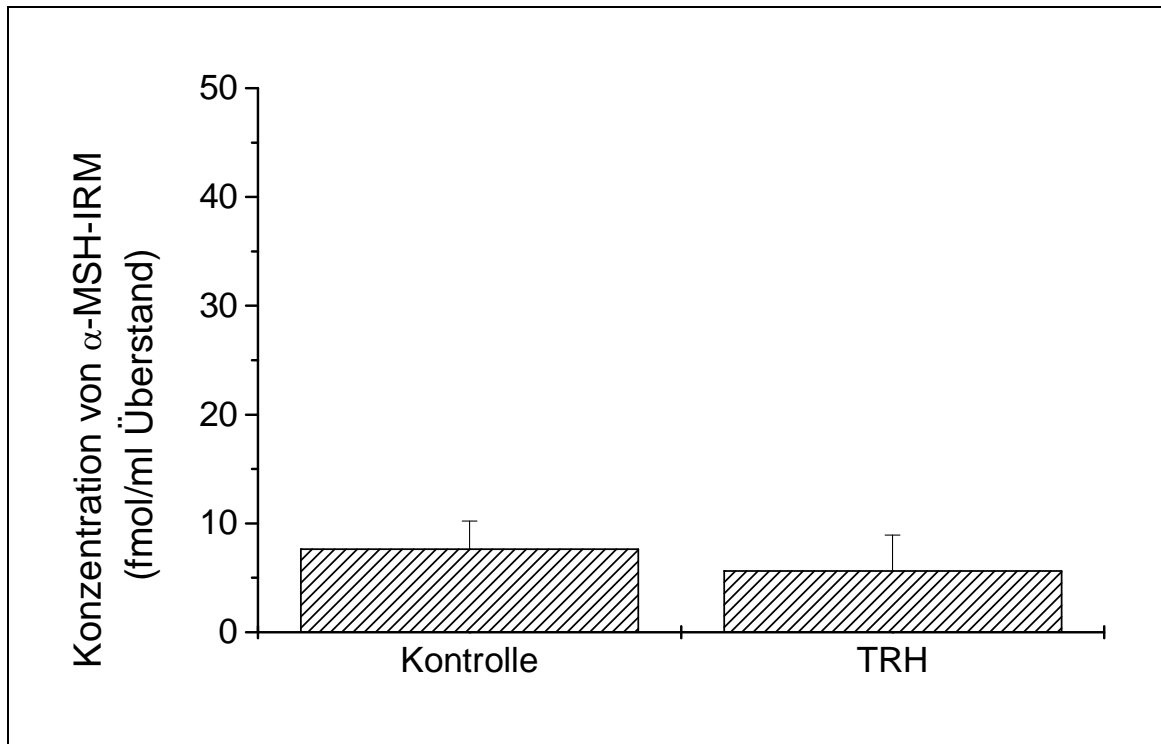


Abb. 29 α -MSH-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit TRH (10^{-6} M)

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10^{-6} M) in Überständen von A 431-Zellkulturen, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 9,4 fmol/ml.

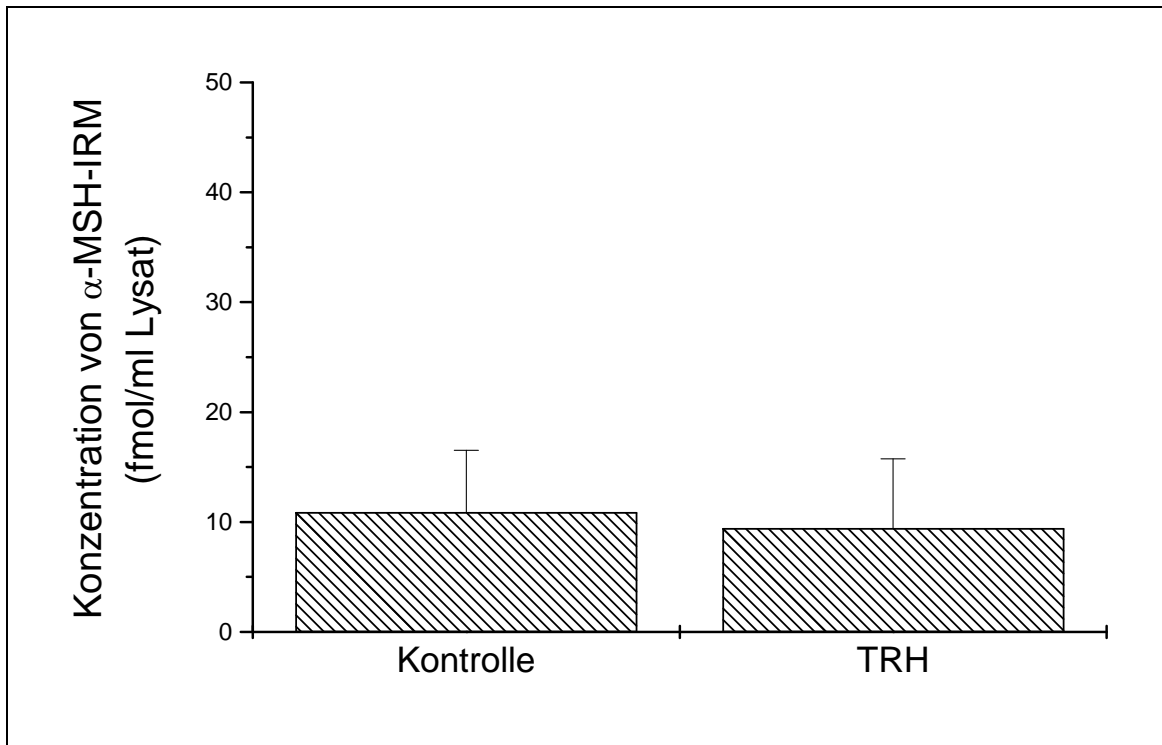


Abb. 30 α -MSH-IRM-Konzentration in Zelllysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit TRH (10^{-6} M)

Konzentrationen von α -MSH in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10^{-6} M) in Lysaten von A 431-Zellen, ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von drei Versuchen). Nachweisgrenze: 9,4 fmol/ml.

Abb. 31 und Abb. 32 zeigen die Ergebnisse der Ac-N- β _H-Endorphin RIAs nach der Stimulation von A 431-Zellkulturen mittels TRH.

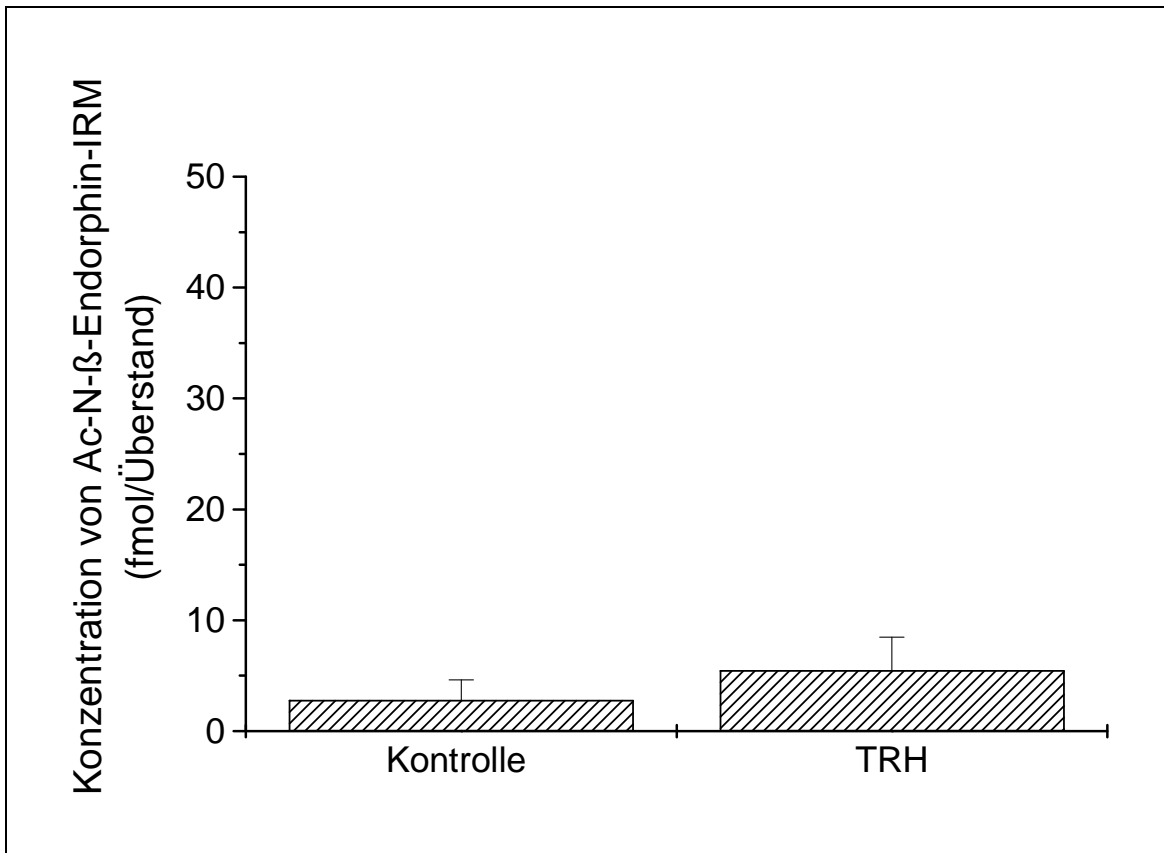


Abb. 31 Ac-N- β _H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellkultur-überständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit TRH (10^{-6} M)
Konzentrationen von Ac-N- β _H-Endorphin in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10^{-6} M) in Überständen von A 431-Zellkulturen, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 13,3 fmol/ml.

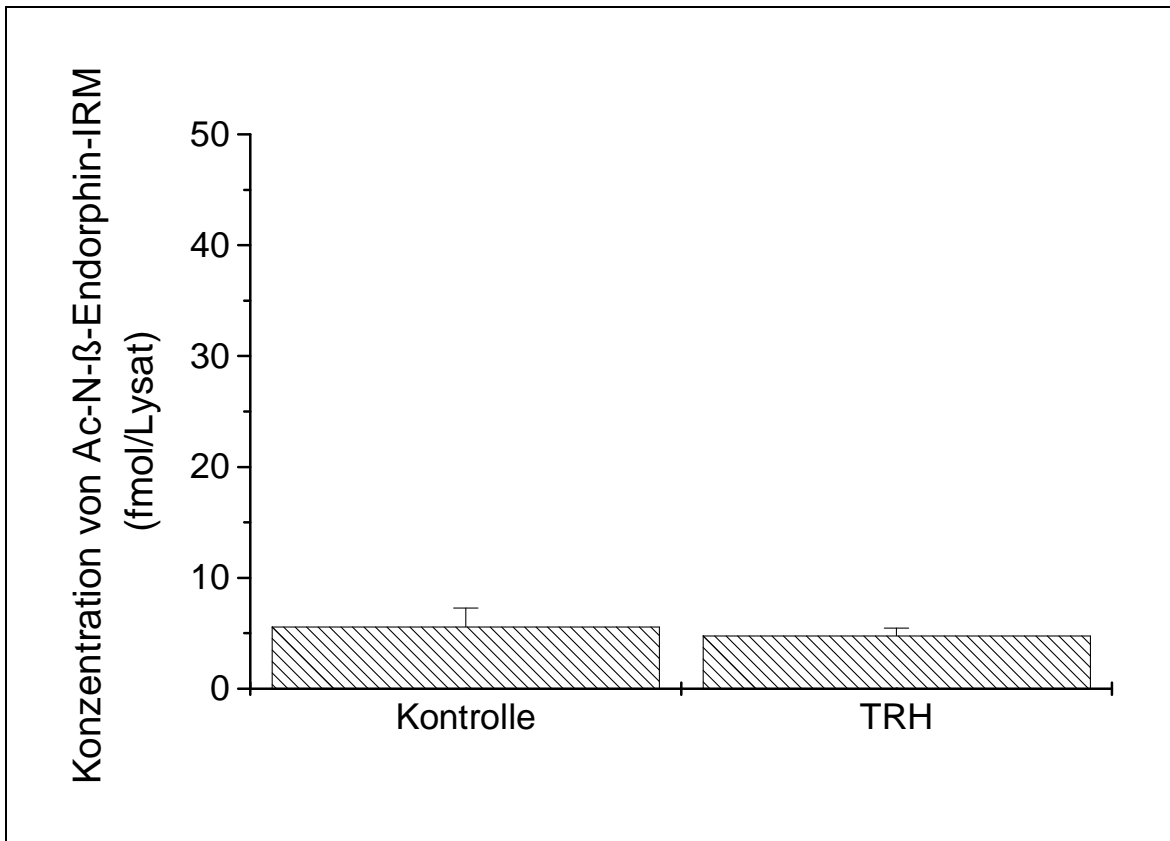


Abb. 32 Ac-N-β_H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit TRH (10⁻⁶M)

Konzentrationen von Ac-N-β_H-Endorphin in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit TRH (10⁻⁶M) in Lysaten von A 431-Zellen, ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 7,0 fmol/ml.

5.3.2.3 Stimulation mittels Haloperidol

Auch in diesem Versuch konnten keine POMC-Derivaten in Zellkulturüberständen und Zellysaten von A 431-Zellen gefunden werden. Abb. 33 und Abb. 34 zeigen die Ergebnisse der α -MSH RIAs nach der Stimulation von A 431-Zellkulturen mittels Haloperidol.

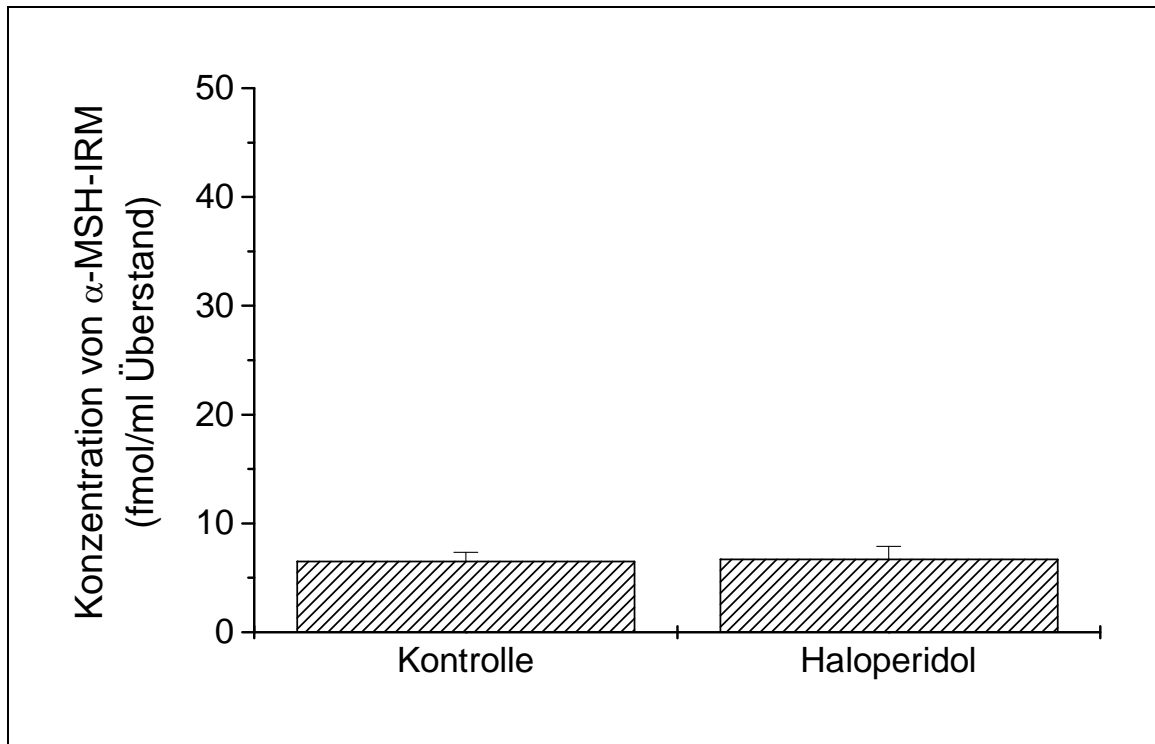


Abb. 33 α -MSH-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit Haloperidol (10^{-6} M)

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10^{-6} M) in Überständen von A 431-Zellkulturen, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 9,4 fmol/ml.

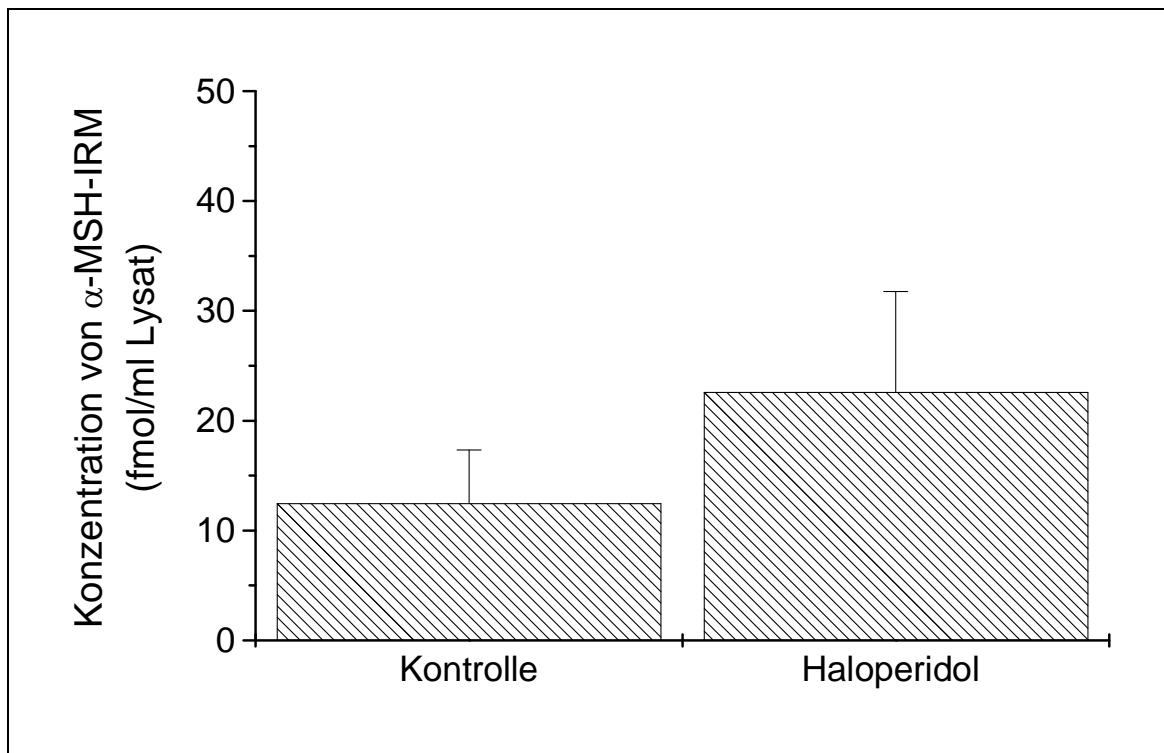


Abb. 34 α -MSH-IRM-Konzentration in Zelllysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit Haloperidol (10^{-6}M)

Konzentrationen von α -MSH-IRM in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10^{-6}M) in Überständen von A 431-Zellen, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 9,4 fmol/ml.

Abb. 35 und Abb. 36 zeigen die Ergebnisse der Ac-N- β _H-Endorphin RIAs nach der Stimulation von A 431-Zellkulturen mittels Haloperidol.

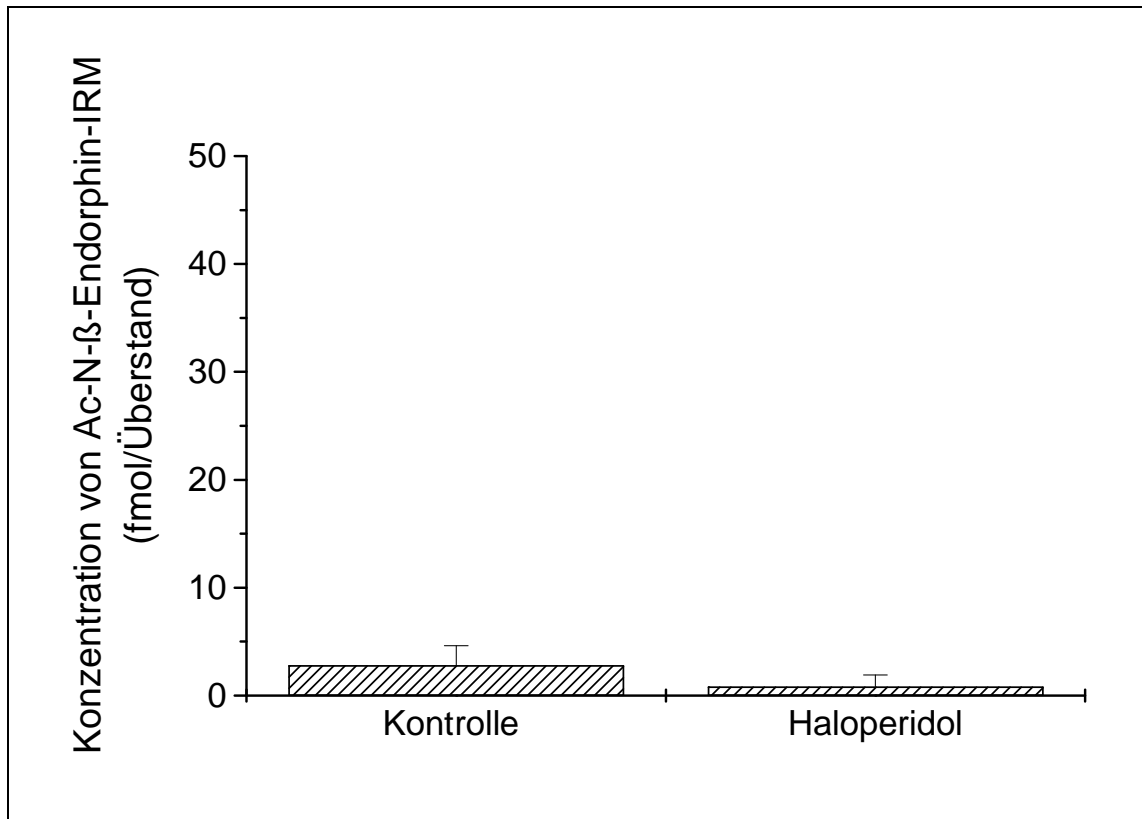


Abb. 35 Ac-N- β _H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellkulturüberständen unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit Haloperidol (10^{-6} M)

Konzentrationen von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10^{-6} M) in Überständen von A 431-Zellkulturen, ($x_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 13,3 fmol/ml.

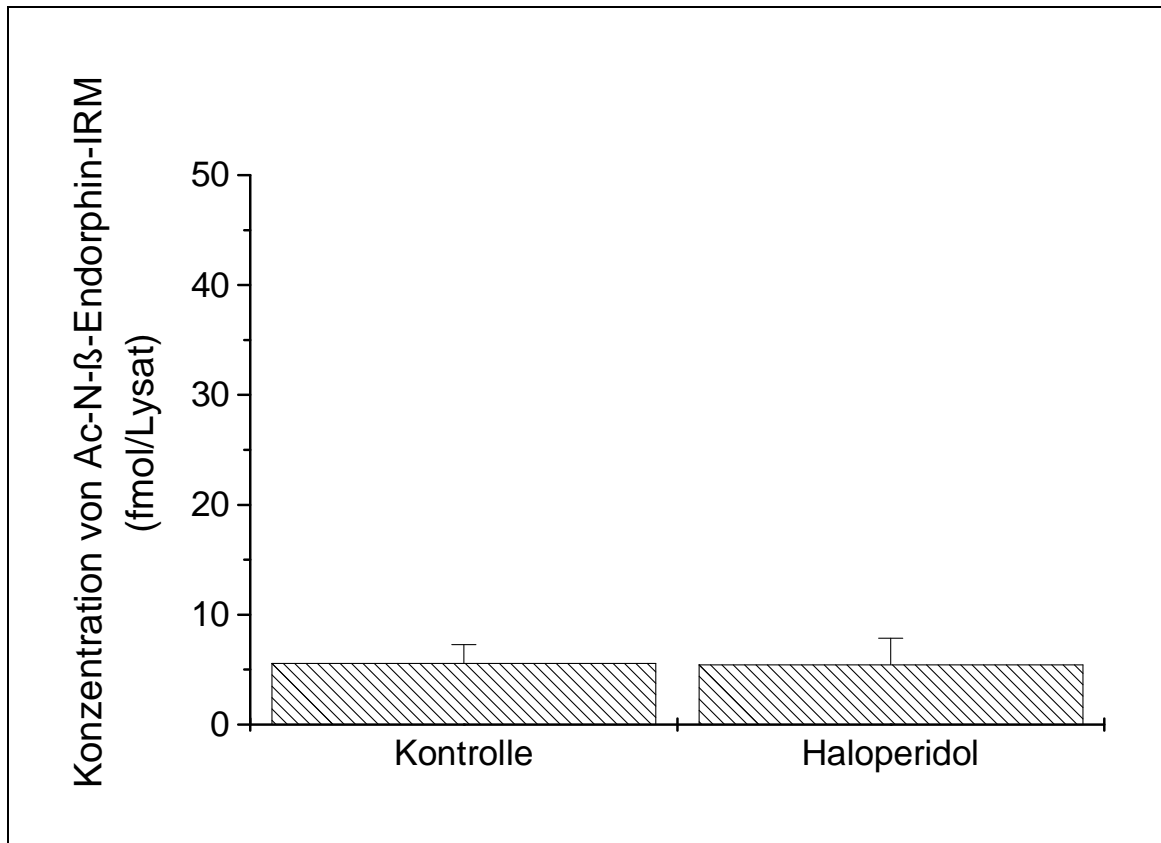


Abb. 36 Ac-N-β_H-Endorphin-IRM-Konzentration in Zellysaten unter Basalbedingungen und nach Stimulation der A 431-Zellkulturen mit Haloperidol (10⁻⁶M)

Konzentrationen von Ac-N-β_H-Endorphin-IRM in fmol/ml (fmol/330000 Zellen) ohne (Kontrolle) und nach Stimulation mit Haloperidol (10⁻⁶M) in Lysaten von A 431-Zellen, ($\bar{x}_{(\text{mean})} \pm s$ aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen von einem Versuch). Nachweisgrenze: 7,0 fmol/ml.

6 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die beiden Zelllinien HaCaT und A 431 in der Lage sind, hypophysäres POMC unter basalen Kulturbedingungen und/oder nach Stimulation mit an der Hypophyse als Stimulatoren bekannten Substanzen (Glucosedefizitäre Bedingungen, TRH und Haloperidol) zu exprimieren. Auch die Bildung und Freisetzung von Derivaten des POMC wurde unter den oben genannten Bedingungen untersucht. Grund hierfür war das Vorhaben zu überprüfen, ob in der Haut ein POMC-Gen existiert, welches möglicherweise nicht das hypophysäre POMC-Gen, sondern eine Variante des hypophysären POMC-Gens darstellt (Can et al., 1998). Untersucht wurde dies mittels one-step-RT-PCR unter Einsatz verschiedener Primerpaare, unter anderem auch unter Einsatz der in der Literatur beschriebenen, Intron B (Primer aus Exon 2 und 3) übergreifenden (Can et al., 1998; Farooqui et al., 1998) bzw. nur auf Exon 3 gelegenen (Slominski et al., 1995) Primerpaare.

Um die Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung von α -MSH-IRM und CLIP-IRM Fluid-phase-one-site RIAs entwickelt. Zur Bestimmung von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM und β _H-Endorphin-IRM wurde bereits etablierte RIAs eingesetzt.

6.1 Methoden

6.1.1 Methoden zur Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens

6.1.1.1 Zelllinien

Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen, ob das Organ Haut bzw. die Epidermis der Haut in der Lage ist, das hypophysäre POMC-Gen zu exprimieren und/oder hypophysäre POMC-Derivate zu bilden und freizusetzen. Um Untersuchungen dazu durchführen zu können, wurde ein adäquates Zellmodell benötigt. Aufgrund

der Größe der Versuchsansätze wurden große Zellmengen benötigt. Um diese hohe Anzahl von Zellen bereitstellen zu können, mußte auf in vitro kultivierbare Zelllinien zurückgegriffen werden.

Bei der Zelllinie HaCaT handelt es sich um eine immortalisierte Keratinozytenzelllinie des erwachsenen Menschen. Diese robuste, epitheliale Zelllinie bildet in vitro ein differenziertes epitheliales Gewebe und ist als Werkzeug zum Studium humaner Hautzellen seit langem etabliert (Boukamp et al., 1988). Bei der Zelllinie A 431 handelt es sich um eine menschliche epidermale Karzinomzelllinie. Ihre Eigenschaften, epithelartig, adhärent und als Monolayer zu wachsen, machten sie zu einem Modell zum Studium der Regulation und Funktion der menschlichen Haut. Die Expression des POMC-Gens sowie die Freisetzung von POMC-Derivate in A 431-Zellkulturen wurde bereits beschrieben (Schauer et al., 1994).

Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten, die aus Stammzellen der Basalschicht entstehen. Sie unterliegen streng regulierten Differenzierungsmechanismen, während sie die Epidermis durchwandern und an die Oberfläche der Haut gelangen. Somit ist eine ständige Veränderung der Zelloberfläche und auch eine unterschiedliche Reaktion der sich in verschiedenen Differenzierungsstadien befindlichen Keratinozyten auf Stimulationsreize anzunehmen. Für die Versuche mußten also in etwa gleiche Bedingungen (Differenzierungsgrad, Zeitpunkt der Stimulation, Dauer der Stimulation) für die Zellkulturen geschaffen werden, um die Ergebnisse der durchgeführten Versuche vergleichbar zu machen. Dazu wurden ausschließlich Zellen der Passagen p41-p48 (HaCaT) und p8Gi-p16Gi (A 431) einen Tag nach deren Aussaat stimuliert und 24 h später aufgearbeitet.

6.1.1.2 Stimulation

Es wurden bereits eine Reihe von Versuchen an Hautzellen und -zelllinien durchgeführt, bei denen durch Stimulation mit unterschiedlichen Substanzen die Expression von POMC und die Freisetzung von POMC-Derivaten beschrieben wurde (Slominski et al., 2000a, 2000b 1998, 1995, 1993, 1992; Wintzen et al.,

2000, 1996; Chakraborty et al., 1999, 1996; Farooqui et al., 1998; Schauer et al., 1994). Dabei kam es immer wieder zu kontroversen Ergebnissen. Zum momentanen Zeitpunkt ist vollkommen unklar, ob es sich bei den beschriebenen Positiv-Befunden bezüglich der Expression des POMC-Gens tatsächlich um hypophysäres POMC oder um eine aberrante Form des hypophysären POMC handelt. In dieser Arbeit sollten neben der basalen Expression des hypophysären bzw. eines aberranten POMC-Gens und der basalen Bildung und Freisetzung von hypophysären bzw. aberranten POMC-Derivaten auch die Einflüsse von verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht werden. Es liegen Daten vor, die für glucosedefizitäre Bedingungen (Gunzo et al., 1994; Zelissen et al., 1991) eine POMC-stimulierende Wirkung an der menschlichen Hypophyse beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Zellkulturen mit unterschiedlichen glucosedefizitären Bedingungen stimuliert werden. Glucose wurde in vier Konzentrationen (4,5-2-1-0 g/l bei HaCaT und 4-2-1-0 g/l bei A 431) eingesetzt. Zur Stimulation wurde das komplette Inkubations-Medium gegen das mit entsprechender Glucosekonzentration (auf 37°C vorgewärmt) ausgetauscht. Für TRH (Schwartz et al., 2002; Roubos, 1997; Ishibashi et al., 1981) und Haloperidol (Roubos, 1997; Dotman et al., 1996; Kjaer, 1996; Jaber et al., 1994; Saland et al., 1992) wurde eine POMC-stimulierende Wirkung an der menschlichen Hypophyse beschrieben. TRH wurde 10^{-6} M (in möglichst physiologischer Konzentration) und Haloperidol ebenfalls 10^{-6} M eingesetzt.

6.1.1.3 RNA-Extraktion

Um eine mögliche Expression des hypophysären POMC-Gens nachzuweisen, mußte die RNA aus den vorbehandelten Zellen gewonnen werden. Dies geschah nach einer standardisierten Methode (4.3.2.1).

6.1.1.4 RT-PCR-Kit

Die PCR ist inzwischen ein in Medizin und Forschung gut etabliertes Verfahren zum selektiven Amplifizieren von transkribierten DNA-Abschnitten. Die Versuche zur Expression des hypophysären POMC-Gens in dieser Arbeit wurden mit dem Qiagen OneStep RT-PCR Kit durchgeführt. Der Vorteil dieses Kit lag darin, daß

alle notwendigen Enzyme für die Reverse Transkription und die eigentliche PCR enthalten sind. Der Enzymmix dieses Kit enthält 2 Reverse Transkriptasen (die Enzyme Omniscript™ und Sensiscript™ Reverse Transkriptase), die ein möglichst effizientes, fehlerfreies Lesen auch von RNA-Sekundärstrukturen, gewährleisten und Taq-DNA-Polymerase (HotStar), die für die Amplifizierung der cDNA verantwortlich ist. Beide Reaktionen laufen nacheinander im gleichen Gefäß ab.

6.1.1.5 Primer

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf Wert gelegt, daß sie an DNA-Stücke im POMC-Gen binden, die zum Teil auf 2 Exons (Primerpaar aus Exon 2 und 3, Intron B übergreifend), zum Teil nur auf Exon 3 gelegen sind (4.3.3). Exon 2 kodiert hauptsächlich für das N-terminale Signalpeptid und Exon 3 für die verschiedenen bioaktiven Peptide (Bertagna et al., 1994; Höllt et al., 1993).

Der in der Literatur häufig zitierte Befund über die Expression des POMC-Gens und die Bildung seiner Derivate in menschlichen Hautzellen von Slominski et al. (1995) wurde mit hypophysären Primern erbracht, die auf Exon 3 gelegen sind. Can et al., (1998) beschrieben ein –bezogen auf das hypophysäre- aberrantes Gen des POMC mittels eines auf Exon 2 und 3 lokalisierten und demnach Intron B übergreifenden Primerpaares. Mit diesen beiden Primerpaaren wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die POMC-Genexpression in HaCaT- und A 431-Zellkulturen untersucht. Alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Primersequenzen sind in Abschnitt 4.3.3.1 dargestellt.

6.1.1.6 Kontrollen

Bei der als Positivkontrolle verwendeten Zelllinie DMS 79 handelt es sich um eine nachgewiesenermaßen das hypophysäre POMC-Gen exprimierende Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms des Menschen. Aufgrund dieser Eigenschaft stellte diese Zelllinie einen optimalen Kontrollparameter für die Funktionstüchtigkeit der Primer und der RT-PCR dar.

Als Negativkontrollen dienten RNase freies Wasser und ein nicht transkribierter Ansatz der jeweiligen Probe.

6.1.2 Methoden zur Überprüfung der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten

6.1.2.1 Zellen und Zellüberstände

Die Inkubationsmedien (Zellüberstände) wurden zur weiteren Aufarbeitung von den Zellkulturschalen abpipettiert und direkt mit Enzymhemmercocktail gemischt, angesäuert und bei 0-4°C gelagert, damit keine weiteren Enzymreaktionen in den Zellüberständen ablaufen konnten, die das Untersuchungsergebnis hätten beeinflussen können. Das Ablösen und Weiterverarbeiten der Zellen erfolgte bei 0-4°C, ebenfalls um mögliche Enzymaktivitäten auszuschließen.

Ein Problem stellte sich bei den beiden verwendeten Zelllinien gleichermaßen dar: Durch die Adhärenz der Zellen war es schwierig, sie in Suspension zu bringen bzw. zu halten. Die deutliche Neigung der Zellen zur Aggregation in Kultur entspricht ihrem Verhalten in vivo. Um die Zellzahlen pro Schale möglichst für jeden Versuch zu kennen, mußten die Zellen gezählt werden. Hierfür wurden zum einen zahlreiche Vorversuche durchgeführt, bei denen analog zu den eigentlichen Versuchen Zellkulturen beider Zelllinien stimuliert und am Tag der Aufarbeitung gezählt wurden. Zum anderen wurden Zellen einzelner Schalen des jeweiligen Versuchs mit EDTA/Trypsin-Lösung von den Schalen abgelöst und in Suspension gebracht und anschließend gezählt. Diese Schalen wurden aufgrund der nicht mehr möglichen standardisierten Aufarbeitung verworfen. Im Mittel ergab sich so für HaCaT-Zellen ein Wert von 2,5 Millionen Zellen pro Schale, für A 431-Zellen von 1,65 Millionen Zellen pro Schale. Die Zellen für die Versuche wurden mittels Kunststoffschabern vorsichtig aus den Schalen gelöst und in dem betreffenden Enzymhemmer/Tris-Gemisch aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, die Bearbeitungszeit nach Entnahme der Zellkulturschalen aus dem Brutschrank konstant zu halten, um große Temperaturschwankungen zwischen den einzelnen Schalen zu vermeiden. Kritisch zu beurteilen sind die extrem kleinen Fallzahlen. Mit der freundlichen Hilfe von Dr. Bödeker (Institut für Medizinische Informatik der JLU, Gießen) wurden die Ergebnisse, die zur Überprüfung der Bildung und Freisetzung von POMC-Derivaten aus den jeweils drei

Glucosestimulationsversuchen vorlagen, Multivarianzanalysen unterzogen. Diese Analyse ergab, daß keinerlei POMC-Derivate nachweisbar waren. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß die negativen Daten für Zellüberstände zwar verlässlich sind, da die Methode ihrer Aufarbeitung einwandfrei standardisiert wurde, daß aber andererseits die Bildung von POMC-Derivaten in den Zellen nicht ausgeschlossen werden kann, weil ein Verlust an POMC-Derivaten im Verlauf der Aufarbeitung infolge Lücken in der Methodik nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

6.1.2.2 POMC-Derivate

Es sollte untersucht werden, ob ausgewählte hypophysäre POMC-Derivate von Hautzelllinien gebildet und ins Inkubationsmedium freigesetzt werden können. Dabei sollten sowohl Fragmente des corticotrophen, z.B. β _H-Endorphin (1-31) wie auch des melanotrophen Systems, z.B. N-Acetyl- β _H-Endorphin, α -MSH und CLIP, der Hypophyse bestimmt werden. Zum Nachweis von α -MSH-IRM und CLIP-IRM wurden im Rahmen dieser Arbeit Assays entwickelt. Die Assays zur Bestimmung von β _H-Endorphin (1-31)-IRM (Kramer 1988; Harbach et al., 2000) und N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM waren bereits etabliert.

6.1.2.2.1 Gewinnung von Antiseren gegen α -MSH und CLIP

Da es sich bei α -MSH und CLIP um Fragmente mit geringen Molekulargewichten und damit geringen immunogenen Eigenschaften handelt, war es notwendig, sie an ein immunogenes Trägerprotein zu koppeln, um eine Immunantwort zu induzieren. Als Trägermolekül wurde „keyhole limpet haemocyanin“ (KLH) gewählt. Die Kopplung, die Immunisierung der Kaninchen, die Blutentnahmen, die Bestimmung der Antikörpertiter in den Kaninchenseren sowie die Herstellung der radioaktiv markierten Peptide erfolgte nach fest etablierten Methoden von Weber et al. (1982) mit Modifikationen nach Wiedemann und Teschemacher (1986) und Scheffler (1995). Wie erhofft, bildeten die Kaninchen Antikörper sowohl gegen das α -MSH/CDI/KLH-Konjugat als auch gegen CLIP/BDB/KLH-Konjugat. Es war

davon auszugehen, daß es sich bei den gewonnenen Antiseren um polyklonale Antiseren mit jeweils mehreren Antikörperpopulationen handelte.

6.1.2.2.1.1 Charakteristika des α -MSH-RIAs

Antiserum 174E wurde in konventionellen Fluid-Phase-one-site Radioimmunoassays in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

Reproduzierbarkeit

Der „Inter-assay coefficient of variation“ dient als Maß für die Reproduzierbarkeit, die Streuanfälligkeit der Meßmethode bei ihrem Einsatz in verschiedenen, voneinander unabhängigen Durchführungen des gleichen Versuchs. Der relative Variationskoeffizient V_r kann jeden Wert zwischen 0%-100% annehmen und betrug hier 11,06% (5.1.1). Der relative Variationskoeffizient V_r (berechnet nach der in 4.4.6.3.1 angegebenen Formel) zeigt an, wie stark die einzelnen Meßwerte bei gleicher Bestimmungsmethode in den verschiedenen Durchführungen streuen und wieviele Bestimmungen (Einfach- oder Doppelbestimmungen) notwendig sind, um eine genaue Konzentrationsbestimmung durchzuführen. Da der erhaltene relative Variationskoeffizient V_r größer als 5% war, waren für eine ausreichend genaue Konzentrationsbestimmung Doppelbestimmungen notwendig (Sachs, 1984).

Präzision

Der „Intra-assay coefficient of variation“ (4.4.6.3.2) dient als Maß für die Präzision der Meßmethode. Hier wurde die Streuanfälligkeit der Meßmethode innerhalb eines einzigen Assays, also die Frage, wie stark ein und derselbe theoretisch gleiche Meßwert innerhalb eines Assays streut, untersucht. Der hier berechnete relative Variationskoeffizient V_r war mit 3,49% sehr zufriedenstellend.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze von α -MSH (gelöst in Puffer C) betrug 3,23 (-s) fmol/Ansatz, wobei hier etwa 30% des eingesetzten radioaktiv markierten Peptids im Ansatz

von dem Antiserum 174 E gebunden wurden. Die Nachweisgrenzen wurden für Überstände und Lysate der jeweiligen Zelllinie pro Assay mitbestimmt und lagen für HaCaT-Überstand bei 6,15 fmol/ml und -Lysat bei 16,2 fmol/ml (entsprechend fmol/ 500 000 HaCaT-Zellen), für A 431-Überstand und -Lysat bei jeweils 9,4 fmol/ml (entsprechend fmol/ 330 000 A 431-Zellen).

Spezifität

Um die Aminosäuresequenz innerhalb des α -MSH-Moleküls zu bestimmen, gegen die das Antiserum 174E gerichtet ist, mußten die Kreuzreaktivitäten bestimmt werden. In Abb. 5 und Tab. 9 sind die Aminosäuresequenz (Primärstruktur) des Proopiomelanocortins und die ausgetesteten Aminosäuresequenzen, die als Determinanten des Antiserums 174E in Frage kommen, dargestellt.

Bezeichnung	POMC-Fragment	Kreuzreaktivität in %
β -MSH	-AEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD-	0
α -MSH	Ac-N-SYSMEHFRWGKPV-NH ₂	100
γ -MSH	-YVMGHFRWDRFG-	0
ACTH (1-10)	-SYSMEHFRWG-	0
ACTH (1-24)	-SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP-	<0,6
(Tyr ⁵)- α -MSH (1-5)	SYSMY	0
(Tyr ⁹)- α -MSH (9-12)	YGKP-	2,0

Tab. 9 Kreuzreaktivitäten des Antiserums 174E

Kreuzreaktivitäten des Antiserums 174E in einem Fluid-Phase one-Site-Radioimmunoassay bezogen auf die Avidität des Antiserums 174E zu α -MSH (100%).

Aus diesen Kreuzreaktivitäten ist zu schließen, daß es sich bei 174E um ein Antiserum handelt, das hochspezifisch gegen den C-Terminus von α -MSH gerichtete Antikörper enthält. Das Antiserum weist α -MSH (1-13) zu 100% nach, gegen ACTH (1-24) besteht nur eine minimale Kreuzreaktivität von 0,6%. Gegen die modifizierte Sequenz von α -MSH (9-12) besteht nur eine sehr geringe

Kreuzreaktivität von 2%. Dies läßt darauf schließen, daß das Antiserum gegen den freiliegenden amidierten C-Terminus von α -MSH gerichtet ist.

Es ist auszuschließen, daß Antikörper des Antiserums 174E gegen den N-Terminus von α -MSH gerichtet sind. Gegen Ac-N-(Tyr⁵)- α -MSH(1-5) und ACTH (1-10) liegen keine Kreuzreaktivitäten vor. Auch gegen die MSH-spezifische Aminosäuresequenz -MEHFRW-, die α -, β - und γ -MSH gemeinsam haben, liegen im Serum offenbar keine Antikörper vor. Es lassen sich keine Kreuzreaktivitäten gegenüber β - und γ -MSH nachweisen.

6.1.2.2.1.2 Charakteristika des CLIP-RIAs

Analog zu Abschnitt 6.1.2.2.1.1 wurde auch für das Antiserum 167E vorgegangen. Antiserum 167E wurde in einer 1:800 Verdünnung eingesetzt.

Reproduzierbarkeit

Der „Inter-assay coefficient of variation“ betrug $V_r = 11,9\%$. Hier wurden zur Konzentrationsmessung von CLIP ebenfalls Doppelbestimmungen durchgeführt.

Präzision

Der „Intra-assay coefficient of variation“ betrug $V_r = 9,26\%$. Die Streuanfälligkeit der Meßmethode innerhalb eines einzigen Assays war damit zufriedenstellend.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des Assays lag in Puffer C bei 2,43 (-1s) fmol CLIP/Ansatz, in HaCaT-Lysat bei 2,8 fmol/ml (entsprechend 500 000 HaCaT-Zellen).

Spezifität

Es ist anzunehmen, daß keine Antikörper des Antiserums 167E gegen den C-Terminus von CLIP bzw. ACTH gerichtet sind; eine Kreuzreaktivität mit der Aminosäuresequenz Tyr-ACTH (35-39) liegt nicht vor. Kürzere Sequenzen bieten möglicherweise durch eine andere Sekundär-/Tertiärstruktur andere Epitope an und werden von den Antikörpern des Antiserums 167E schlechter erkannt als das vollständige CLIP bzw. ACTH. Abb. 5 und Tab. 10 geben einen Überblick über die zur Testung der Kreuzreaktivitäten eingesetzten Peptide.

Bezeichnung	Kreuzreaktivität in %
ACTH (18-39) = CLIP (1-22)	100
ACTH (1-39)	146,6
ACTH (22-39)	62,86
ACTH (30-39)	24,44
ACTH (29-39)	1,91
Tyr-ACTH (35-39)	0

Tab. 10 Kreuzreaktivitäten des Antiserums 167E

Kreuzreaktivitäten des Antiserums 167E in einem Fluid-Phase one-Site-Radioimmunoassay bezogen auf die Avidität des Antiserums 167E zu CLIP (100%).

6.1.2.2 Bereits vorhandene RIAs

Assays zur Bestimmung von Ac-N- β _H-Endorphin-IRM und β _H-Endorphin-IRM lagen bereits vor (4.4.6.5) und wurden bereits zur Bestimmung der POMC-Derivate im Blutplasma (Matejec, 2002) in Stressituationen eingesetzt. Da es von Interesse war, ob POMC-Derivate des melanotrophen und des corticotrophen Systems in den Hautzelllinien gebildet und freigesetzt werden, wurden die beiden gut etablierten Assays im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich eingesetzt. Die Nachweisgrenzen wurden für Überstände und Lysate der jeweiligen Zelllinie pro Assay mitbestimmt und lagen für HaCaT-Überstand bei 5,5 fmol Ac-N- β _H-Endorphin-IRM/ml, HaCaT-Lysat bei 10,5 fmol Ac-N- β _H-Endorphin-IRM/ml; bei 8,3 fmol β _H-Endorphin-IRM/ml für HaCaT-Überstand und bei 8,8 fmol β _H-Endorphin-IRM/ml HaCaT-Lysat (jeweils entsprechend fol/ 500 000 HaCaT-Zellen), für A 431-Überstand bei 13,3 fmol Ac-N- β _H-Endorphin-IRM/ml und -Lysat bei 7,0 fmol Ac-N- β _H-Endorphin-IRM/ml (entsprechend fmol/ 330 000 A 431-Zellen).

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Expression des hypophysären POMC-Gens

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Primerpaaren konnte die Expression des hypophysären POMC-Gens weder in Kulturen der Zelllinie HaCaT noch in A 431-Zellkulturen gezeigt werden. Es machte dabei keinen Unterschied, ob die Zellen sich in ihrem basalen Zustand befanden oder 24 h vorher mit den verschiedenen Substanzen, von denen eine POMC-stimulierende Wirkung an der Hypophyse bekannt ist, behandelt wurden.

Aufgrund der momentanen Datenlage in der Literatur sind folgende Ursachen für dieses Ergebnis zu diskutieren: Den meisten Veröffentlichungen zu diesem Thema liegen Untersuchungen mit nativen Keratinozyten zu Grunde, im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch aus Gründen des Materialbedarfs auf zwei Zelllinien zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um Keratinozyten (HaCaT) bzw. um menschliche, epithelial (einen Zellverband bildende Zellen) wachsende epidermale Karzinomzellen (A 431), aber eben nicht um native Keratinozyten. Die Expression des POMC-Gens und der Nachweis von mRNA in der Haut scheinen von vielen verschiedenen Umständen abhängig zu sein: z. B. scheinen Differenzierungsgrad der Zellen (Chakraborty et al., 1999) und Zusammensetzung des Mediums (Wintzen et al., 2000) einen Einfluß auf Expression oder Nicht-Expression von POMC zu haben. Wintzen et al. (2000) relativierten ihre eigenen Daten von 1996. In der Arbeit von 2000 ist nur noch unter einer von fünf Kulturbedingungen eine POMC-Expression zu sehen. Es gibt also Reaktionen der Zellen auf uns unbekannte Stimulatoren, von denen abhängig zu sein scheint, ob Hautzellen in der Lage sind, POMC zu exprimieren. Abhängigkeiten vom Haarzyklus (Furkert et al., 1997) sind ebenso bekannt wie die vermehrte Expression in pathologisch veränderten Hautarealen (Slominski et al., 1993).

Kritik an der gewählten Versuchsanordnung als Ursache des negativen Untersuchungsbefundes kann insofern begegnet werden, als die eingesetzte

Positivkontrolle, die Bronchialkarzinomzelllinie DMS 79, die nachweislich POMC exprimierte (Picon et al., 1999; Newell-Price, 2003) auch in unserem Fall in sämtlichen Experimenten einen positiven Befund lieferte. Die RT-PCR inclusive Primern arbeitete also einwandfrei. Die Sequenzierung des etwa 800 bp großen Transkripts aus DMS 79-Material ergab, daß es sich bei der transkribierten und amplifizierten Nucleotidsequenz tatsächlich um humane hypophysäre POMC-cDNA handelte. Als Negativkontrollen wurden ein jeweils nicht transkribierter Ansatz sowie RNase freies Wasser eingesetzt. In diesen Proben zeigte sich nichts. Die Negativkontrolle funktionierte also ebenfalls perfekt.

Es gibt einige Arbeiten, die sowohl die POMC-Genexpression als auch POMC-Derivate in Zellkulturen beschreiben. Schauer et al. (1994) beschrieb beispielsweise die Expression eines 1,3 kb großen POMC-Gen-Transkripts (gefunden mittels Northern Blot Analyse) sowohl in normalen humanen Keratinozyten als auch in der Zelllinie A 431. Die hierfür verwendete Sonde stammt aus Exon 3, sodaß auch dieser Befund bereits für den Nachweis eines - bezogen auf das hypophysäre- aberranten humanen POMC sprechen könnte, da dieser Befund nichts darüber aussagt, ob das gefundene POMC die auf Exon 2 gelegene Nucleotidsequenz für das Ausschleusen aus dem Synthesekompartiment notwendige Signalpeptid enthält. Weiterhin wurde eine Verstärkung der Expression durch Stimulation der Zellen mit UV-Bestrahlung und Interleukin-1 beschrieben. Diese Ergebnisse bestätigten auch andere Arbeitsgruppen (Wintzen et al., 1996; Farooqui et al., 1993; Teofoli et al., 1993).

Inzwischen wird der Nachweis von mRNA mittels PCR geführt. Dabei sind die eingesetzten Primer von zentraler Bedeutung. Für sehr viele Arbeiten, die mit positivem Ergebnis veröffentlicht wurden, wurden die von Slominski et al. (1995) bei einer Arbeit über die POMC-Expression in menschlicher Haut eingesetzten, aus Exon 3 stammenden Primer benutzt (Funasaka et al., 1999; Chakraborty et al., 1996; 1999; Ermak et al., 1997; Slominski et al., 1996). Mit einem Intron B übergreifenden Primerpaar (die Primer stammten aus Exon 2 und 3) wurde von der o.g. Arbeitsgruppe (Ermak et al., 1997), im Gegensatz zu der Gruppe um Farooqui (Can et al., 1998), keine POMC-Expression nachgewiesen.

Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte in einigen Ansätzen mit den von Slominski et al., 1995) verwendeten aus Exon 3 stammenden Primern, bei der Zelllinie A 431 unter basalen Bedingungen POMC-mRNA nachgewiesen werden. Die betreffenden cDNA-Banden auf dem Gel waren jedoch nicht kontinuierlich nachweisbar und sehr schwach ausgeprägt (Tab. 11, Abb. 37).

Zelltyp	Bedingung	Primer	Primer
		FARO1A FARO1B	SLO1A SLO1B
	POMC-Expression (Hypophyse/Mensch)	300	260
A 431	Glucose Ø	Schmier	Schmier RT+/-: ca. 260
A 431	TRH 10⁻⁶M	Schmier	Schmier RT+/-: ca. 260
A 431	Haloperidol 10⁻⁶M	Schmier	Schmier RT+/-: ca. 260
A 431	Stimulationkontrolle	Schmier	RT+/-: ca. 260
DMS 79	Positiv-Kontrolle	RT+: ca. 300	RT+: ca. 260

Tab. 11 Untersuchung auf POMC-Expression:

Länge der Nukleotidsequenzen (Anzahl bp) der mittels RT-PCR erhaltenen Amplifikate aus den RNA-Extrakten der untersuchten Zellen im Vergleich mit den bei der Expression des hypophysären POMC-Gens des Menschen zu erwartenden Nukleotidsequenzlängen (RT+: Reverse Transkription; RT-: keine Reverse Transkription; Schmier: diffuse Amplifikate)

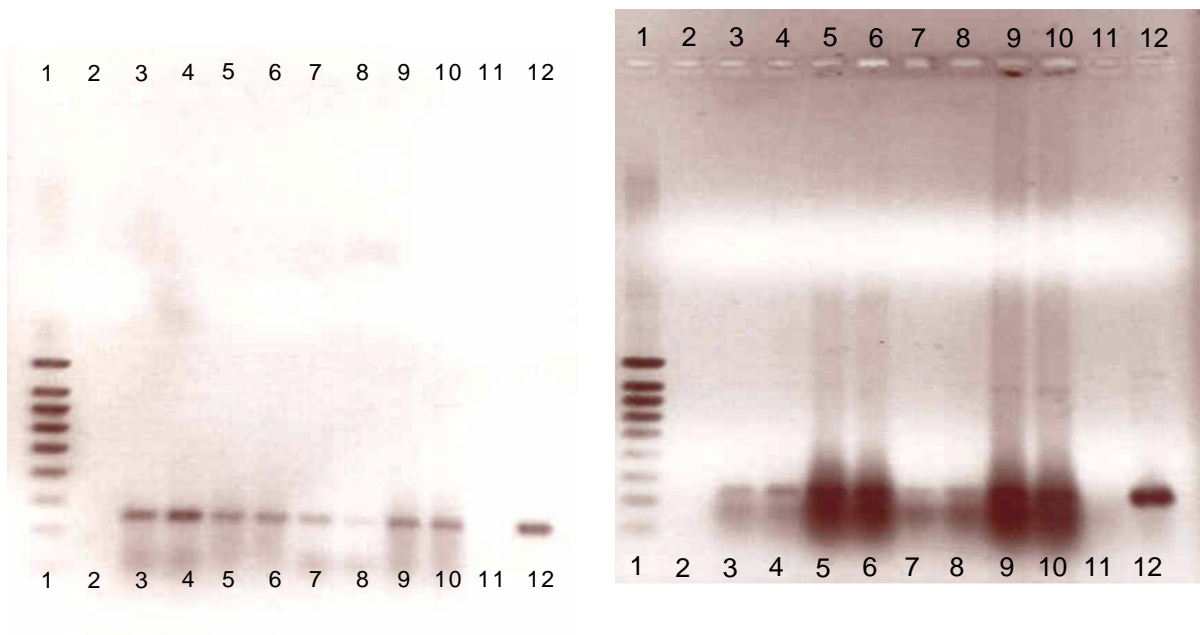


Abb. 37 2 Ergebnisse der RT-PCR mit RNA-Extrakten von A 431-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer SLO1A/SLO1B

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit TRH 10^{-6} M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10^{-6} M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

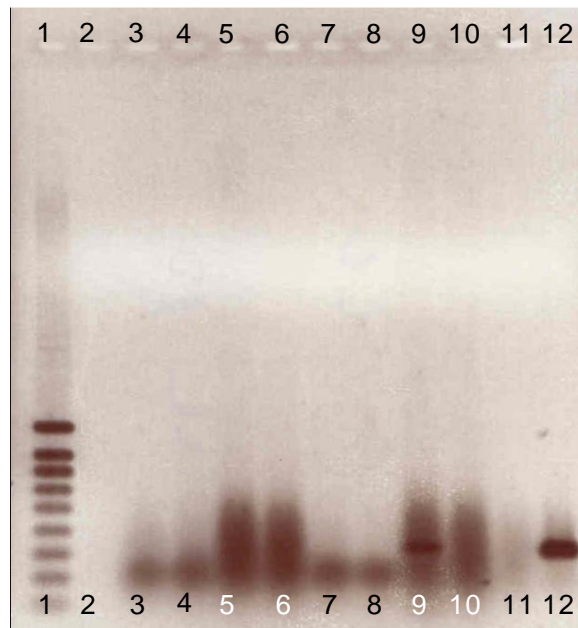


Abb. 38 Ergebnis der RT-PCR mit RNA-Extrakten von A 431-Zellen zwecks Überprüfung der Expression des hypophysären POMC-Gens, Primer FARO1A/FARO1B

Die Spuren sind von 1-12 nummeriert. Transkription: RT+; keine Transkription: RT-

1: Marker zur Bestimmung der Größe der Nukleotidsequenzen (1000/800/700/600/500/400/300/200/100 bp)

2: Negativkontrolle: RNase freies Wasser

3 und 4: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen, die nicht stimuliert worden waren = Kontrolle (Spur 3: RT-; Spur 4: RT+)

5 und 6: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit TRH 10^{-6} M (Spur 5: RT-; Spur 6: RT+)

7 und 8: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mittels Glucosemangel (Spur 7: RT-; Spur 8: RT+)

9 und 10: RNA-Extrakte aus A 431-Zellen nach Stimulation mit Haloperidol 10^{-6} M (Spur 9: RT-; Spur 10: RT+)

11 und 12: Positivkontrolle: RNA-Extrakte aus DMS 79-Zellen (Spur 11: RT-; Spur 12: RT+)

Farooqui et al. (1998) berichteten erstmals über ein -bezogen auf das hypophysäre- aberrantes POMC-Gen (Can et al., 1998). Hier wurde mittels RT-PCR und dem Intron B übergreifenden Primerpaar **FARO1A** (Exon 2)/**FARO1B**

(Exon 3) (5'-AGG ACC TCA CCA CGG AAA GCA ACC T 3'/-5' AGT GCT CCA TGG AGT AGG AGC GCT T-3') ein etwa 300 bp großes POMC-cDNA-Amplifikat in menschlicher Haut sowie in humanen Keratinozyten und Melanozyten nachgewiesen. Dieses cDNA-Amplifikat zeigte sich nach Sequenzierung zu 85% identisch mit menschlichem hypophysärem POMC und wurde von der Arbeitsgruppe als Variante des humanen hypophysären POMC verstanden. Die angewandten Methoden entsprachen denen von Slominski et al. (1995) und Kippenberger et al. (1995). In unserer Arbeitsgruppe konnte mit diesen Primern kein positiver Befund erhoben werden (Abb. 38). Auch mit allen anderen Primern konnte weder in HaCaT- noch in A 431-Zellkulturen hypophysäres POMC nachgewiesen werden (Tab. 7, Tab. 8).

Ob es tatsächlich eine oder gar mehrere Varianten des humanen hypophysären POMC gibt, ob POMC in peripheren Geweben gebildet und freigesetzt werden kann und/oder ob humanes hypophysäres POMC in der Peripherie weiterprozessiert wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt. Die Möglichkeit des Vorliegens von gewebespezifischen POMC-Varianten wird jedenfalls erwogen (Solomon, 1999; Jeanotte et al., 1987). Es sind viele unterschiedlich lange POMC-Transkripte von diversen Untersuchern beschrieben worden (Farooqui et al., 1995; Slominski et al., 1992; Lacaze-Masmonteil et al., 1987). So ist das in der Hypophyse beschriebene etwa 1100 bp groß, während in der Peripherie vielfach kleinere, etwa 800 bp große Transkripte, gefunden werden, deren Translationsprodukte kein Signalpeptid besitzen (1.1). Es ist davon auszugehen, daß mit Primerpaaren, die Intron B (Primerpaar aus Exon 2 und 3) oder gar Intron A und B (Primerpaar aus Exon 1 und 3) aus der hypophysären POMC-DNA übergreifen, kein Amplifikat eines kurzen Transkripts herzustellen ist. Die physiologische Bedeutung dieser unterschiedlich großen Transkripte ist ebenso offen wie die Antwort auf die Frage, ob es sich um weiterprozessierte große Transkripte handelt, oder um direkt als kleine Transkripte entstandene, ob sie demnach im peripheren Gewebe entstanden sind oder übers Blut an ihren Bestimmungsort transportiert werden (Grigorakis et al., 2000).

Insgesamt gibt es über die Expression des POMC-Gens in der Haut und in Hautzelllinien eine Vielzahl an Informationen. Die Bedingungen, unter denen dies geschieht, sind jedoch vielfältig. Slominski (1991) zeigte erstmals unterschiedlich lange POMC-mRNA-Transkripte (3,5 kb, 1,5 kb und 1,0 kb) in Melanomzellen von Mäusen und Hamstern sowohl in vivo als auch in vitro. Kono et al., (2001) konnten mittels RT-PCR in Kombination mit immunhistochemischen Nachweisverfahren zeigen, daß in Talgdrüsen, Naevi, entzündlichen Hautarealen und in der Peripherie benigner Hauttumoren produzierte POMC-mRNA und POMC-Peptide nachweisbar sind. Es sind aber auch längere (bis 1500 kb) Transkripte als das hypophysäre beschrieben. So z.B. in Tumoren (Texier et al., 1991; Clark et al., 1989; Hoppener et al., 1986), in der Placenta (Grigorakis et al., 2000) und in Ovar und Testis (DeBold et al., 1988; Chen et al., 1986).

Viele Autoren, die über den Nachweis von POMC-mRNA und POMC-Derivaten in Haut und Hautzelllinien berichtet haben, beschrieben die Verstärkung dieser Befunde durch UV-Bestrahlung oder IL-1-Stimulation (Wintzen et al., 2000, 1996; Chakraborty et al., 1999, 1996; Schauer et al., 1994).

Wir konnten weder unter Basalbedingungen noch nach Stimulation eine POMC-Genexpression in der menschlichen Haut nachweisen. Unsere Befunde können also die in der Literatur erhobene Behauptung, in der Haut werde humanhypophysäres POMC exprimiert, nicht stützen. Sie sind jedoch mit der Expression eines aberranten POMC-Gens kompatibel.

6.2.2 Ausschluß der Freisetzung von POMC-Derivaten

Das erste in der Haut (in Melanomzellen) beschriebene POMC-Fragment war α -MSH (Thody et al., 1983). Can et al. (1998) beschrieben ebenfalls eine erhöhte Ausschüttung von POMC-Derivaten, wie α -MSH und ACTH, Farooqui et al. (1996) POMC-Peptide in menschlicher Haut und in Keratinozyten.

β -Endorphin-IRM wurde als in Keratinozyten gebildet, prozessiert und ins Kulturmedium abgegeben und durch verschiedene Stimulatoren hochreguliert (Wintzen et al., 1996) beschrieben. Wie aber passen diese Ergebnisse zu der

These, daß in der Peripherie vor allem das kurze Transkript der POMC-mRNA vorliegt, welches die auf Exon 2 gelegene Sequenz des für die Ausschleusung von POMC aus dem Synthesekompartiment notwendige Signalpeptid nicht enthält (Grigorakis et al., 2000)? Wintzen et al. (2000) konnten die 1996 erhobenen Befunde zum Nachweis von β -Endorphin-IRM 4 Jahre später selbst nicht mehr reproduzieren. Zanello et al. (1999) konnten mittels immunhistochemischer Verfahren keinen UV-induzierten Anstieg der β -Endorphinspiegel in humanen Keratinozyten zeigen. Wintzen et al. (2001) beschrieben diesen o.g. Anstieg, allerdings nicht in epidermalen, sondern nur in follikulären Keratinozyten. Zu ACTH und α -MSH liegen hingegen nur positive Befunde vor. Die Datenlage ist insgesamt widersprüchlich.

Unsere Befunde zeigen weder unter basalen Bedingungen noch nach Stimulation eine Bildung und/oder Freisetzung von POMC-Derivaten in den Hautzelllinien HaCaT und/oder A 431. Es ist davon auszugehen, daß aus dem hypophysär identischen Bereich in diesen Hautzelllinien keine POMC-Derivate vorliegen. Sollte in der Haut ein -bezogen auf das hypophysäre- aberrantes POMC-Gen vorliegen, wäre jedoch der Nachweis von POMC-Derivaten in der Haut grundsätzlich denkbar, wenn diese nur zufällig mit den Prozessierungsprodukten des Translationsproduktes des hypophysären POMC-Gens übereinstimmen würden.

6.3 Kontroverse Literaturdaten: Einordnung der eigenen Ergebnisse

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann die vielfältig vorhandene Literatur, die auf die Expression des humanen hypophysären POMC-Gens in menschlicher Haut hinweist, nicht bestätigt werden. Nach genauerem Studium der Literatur wurde klar, daß viele Arbeitsgruppen ihre mit den gleichen Primern erhobenen Befunde gegenseitig stützen und publizieren, sodaß scheinbar sehr vielen Daten zu diesem Thema vorliegen von denen jedoch die meisten auf eine einzige Arbeit zurückgeführt werden können. Es gibt es jedoch auch einige Autoren, die sich dieser anerkannten Hypothese entgegenstellen. Unsere Daten konnten jedenfalls

zeigen, daß die beiden Zelllinien HaCaT und A 431 unter unseren Kulturbedingungen POMC offenbar nicht exprimieren. Unsere Daten würden demnach die o.g. anerkannte Hypothese in Frage stellen.

Sollte es nun tatsächlich ein -auf die Hypophyse bezogen- aberrantes POMC-Gen in der Haut geben, was nach Can et al. (1998) anzunehmen ist, wäre vorstellbar, daß in der Tat POMC-Derivate, d.h. Prozessierungsprodukte des Translationsproduktes dieses POMC-Gens nachgewiesen werden können, soweit sie mit den POMC-Derivaten des hypophysären POMC identisch sind. Die aberrante POMC-mRNA könnte dabei mit den hypophysären Primern nicht nachgewiesen werden, wenn ein „hypophysärer“ Primer zufällig auf eine „aberrante“ Nukleotidsequenz trifft. Vice versa könnte es ebenso möglich sein, daß der Nachweis eines aberranten POMC-Gens zufällig gelingt, wenn die „hypophysären“ Primer mit einer „hypophysär-identischen“ Sequenz des aberranten POMC-Gens interagieren, ohne daß POMC-Derivate des hypophysären Gens nachweisbar wären.

Abb. 39 stellt eine Synopsis der in dieser Arbeit eingesetzten Analytik auf Nukleotidsequenzebene (Genexpression) und auf Aminosäuresequenz-/Proteinebene (Antikörperangriff) dar. Mit der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Analytik wurde das human-hypophysäre POMC-Gen an mehreren Stellen abgetastet.

Hätte das human-hypophysäre POMC-Gen mit den 5 eingesetzten „hypophysären“ Primerpaaren nachgewiesen werden können, müßte weiterhin von der Expression des human-hypophysären POMC in der Haut ausgegangen werden, wobei allerdings auch ein aberrantes POMC-Gen vorstellbar wäre, dessen Nukleotidsequenz nur im Bereich der Primer zufällig mit der Sequenz des hypophysären POMC-Gens übereinstimmt. Da dies im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang, kann die Expression des human-hypophysären POMC in der Haut ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit der Expression eines - bezogen auf das hypophysäre - aberranten POMC-Gens bleibt hingegen bestehen.

Auch auf der Aminosäureebene wurde das human-hypophysäre POMC untersucht. Ein Nachweis von POMC-Derivaten mittels Antiseren, die human-hypophysäre Antikörperepitope nachweisen, hätte für die Existenz human-hypophysärer POMC-Derivate in den Hautzelllinien gesprochen. Diese kann aufgrund der vorliegenden Befunde ausgeschlossen werden. Es besteht aber weiter die Möglichkeit, daß POMC-Derivate in der Haut vorliegen, die Prozessierungsprodukte des Translationsproduktes eines -bezogen auf das hypophysäre- aberranten POMC-Gens sind und somit von den eingesetzten Antiseren nicht detektiert werden konnten.

Der einzige sehr schwach positive Befund konnte im Rahmen dieser Arbeit an der Zelllinie A 431 mit den von Slominski et al., (1995) erstmals eingesetzten Primern erhoben werden. Die Primer stammen aus Exon 3: Alle mit diesen „Slominski-Primern“ bisher publizierten Daten (Chakraborty et al., 1999, 1996; Funasaka et al., 1999; Ermak et al., 1997; Slominski et al. 1995) sprechen für hypophysäres POMC, das mit diesen Primern nachgewiesen wurde. Aber auch der POMC-Gennachweis mittels hypophysärer Primer ohne den Nachweis von POMC-Derivaten (Abb. 37) in den von uns untersuchten Zelllinien spricht am ehesten für die Existenz eines aberranten POMC-Gens. Die Nukleotidsequenzen von human-hypophysärem und aberrantem Gen stimmen wahrscheinlich rein zufällig im Bereich der „Slominski“-Primer überein, die dazwischenliegenden Bereiche sind unterschiedlich und so den „hypophysären“ Antiseren nicht zugänglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, daß ein aberrantes POMC-Gen in der Haut vorliegt. Über die Funktion dieses POMC-Systems in der Haut kann weiterhin nur spekuliert werden.

661 gacagaggag cgcgggacca **agcggcggcg aaggagggga agaagagccg cgaccgagag** EXON1
721 **aggccgccga gcgtccccgc cctcagagag cagcctcccc agacagg**taa gggcgcagcg

4381 gtgttgtaa tgttggtca aggtccttcc tggtagtg ccaacattgt tttgctcctt
-M--P-

4441 gcaggggtcc caccaatctt gtttgcttct gcag**agcctc agcctgcctg** **gaagatgccg** EXON2
EXO21.....

-R-----
4501 **agatcgtgct** gcagccgctc gggggcctg ttgctggcct tgetgcttca ggctccatg
.....
-----N-

4561 gaagtgcgtg gctggtgctt ggagagcagc cag**tgtaagg acctcaccac ggaagcaac**
HPO1.....
FARO1A.....

-L--L-

4621 **ctgctg**gtac gtgggcatg actgccatct tggcttagac attagatggg actggagctg
..

7501 gtcttcccc ag**gagtgcat** cggggcctgc aagcccagacc tctcggccga gactcccatg EXON3
7561 ttccgggaa atggcgacga gcagcctctg accgagaacc cccggaagta cgtcatgggc
7621 cacttccgct gggaccgatt cggccgcgc aacagcagca gcagcggcag cagcggcgca
7681 gggcagaagc gcgaggacgt ctcagcgggc gaagactgcg gcccgctgcc tgagggcggc
-S--Y--S-

7741 cccgagcccc gcagcgatgg tgccaagccg ggcccgcgcg **agggcaagcg ctctactcc**
SLO1A.....
HPO2.....
FARO1B.....

-M--E--H-- F--R--W--~~G~~ ~~K~~ ~~P~~ ~~V~~ ~~G~~ ~~K~~ ~~K~~ R--R--P--V --K--V--Y-

7801 **atggagcact** tccgctgggg caagccggtg ggcaag**aagc** **ggcggccagt gaaggt**gtac
..... 174E..... HPO13.....
.....

-P--N--G-- A--E--D--~~E~~ ~~S~~ ~~A~~ ~~E~~ ~~A~~ ~~F~~ ~~P~~ L--E--F--K --R--E--L-

7861 cctaaccggc cggaggacga gtcggccgag gccttcccc tggagttcaa gagggagctg
167E.....

-T--G--Q-- R--L--R--E --G--D--G- -P--D--G-- P--A--D--D --G--A--G-

7921 actggccagc gactccggga gggagatggc cccgacggcc ctgccgatga cggcgcaggg
-A--Q--A-- D--L--E--H --S--L--L- -V--A--A-- E--K--K--D --E--G--P-

7981 gccagggccg acctggagca cagcctgctg gtggcggccg **agaagaagga cgagggcccc**
SLO1B.....

-Y--R--M-- E--H--F--R --W--G--S- -P--P--K-- D--K--R--Y --G--G--F-
 8041 tacaggatgg agcacttccg ctggggcagc cgcgccaagg acaagcgcta cggcggtttc
P27

-M--T--S-- E--K--S--Q --T--P--L- -V--T--L-- F--K--N--A --I--I--K-
 8101 atgacctcgg agaagagcca gacgccctg gtgacgctgt tcaaaaacgc catcatcaag
84E

-N--A--Y-- K--K--G--E
 8161 aacgcctaca agaagggcga gtgagggcgc agcggggccc agggctaccc tccccagga
HPO10.....

8221 ggtcgacccc aaagccctt gctctccct gcctgtgtgc cgcctcccag cctgggggggt

Abb. 39 Ausschnitte aus der Nukleotidsequenz des humanen hypophysären POMC-Gens (Takahashi et al., 1983; NCBI, Accession V01510 K02406, HSACTH) **sowie Aminosäuresequenz des humanen hypophysären POMC** (SWISSPROT/P01189) Nukleotidsequenz, Aminosäuresequenz, Primer, Antikörperepitope und Antiseren sind wie folgt gekennzeichnet:

Nukleotidsequenzen: kleine Buchstaben, farbig=Exon, schwarz=Intron, am Zeilenanfang Position der Basen im Gen, z.B. **7681 gggcagaagc**

Aminosäuresequenzen: blaue Großbuchstaben oberhalb der Nukleotidsequenz, z.B. **--T--P--L-**

Primer: Bezeichnung des Primers und Punkte unterhalb der Nukleotidsequenzen, Basen eines Primerpaares sind in der gleichen Farbe dargestellt, z.B. **HPO10.....**

Antikörper-Epitope: mit Schattierung unterlegte schwarze Großbuchstaben oberhalb der Nukleotidsequenzen, z.B. **-G --K--P-**

Antiseren: Bezeichnung des Antiserums und Rauten in schwarz unterhalb der Nukleotidsequenzen, z.B. **167E**

Unsere Befunde können die in der Literatur erhobene Behauptung, in der Haut werde human-hypophysäres POMC exprimiert, nicht stützen. Sie sind jedoch mit der Expression eines aberranten POMC-Gens, wie von Can et al. (1998) beschrieben, kompatibel. Demnach liegt Evidenz vor, daß - gegenläufig zur allgemein vertretenen Ansicht -, in der Haut nicht ein human-hypophysäres, sondern ein - hierauf bezogen - aberrantes POMC-Gen exprimiert wird.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Über die Expression des hypophysären POMC-Gens und die Freisetzung von POMC-Derivaten aus der Hypophyse liegen sehr viele Informationen vor. „Stress“ im Sinne physischer und psychischer Belastung spielt für die Freisetzung der hypophysären POMC-Derivate eine große Rolle. Auch zur Expression des POMC-Gens und zur Freisetzung von POMC-Derivaten in der Haut gibt es eine beträchtliche Anzahl von Untersuchungen. Die Funktion der hypophysären wie der dermalen POMC-Derivate ist jedoch weitgehend unklar, auch wenn eine Reihe von Effekten von ACTH, α -MSH oder β -Endorphin bekannt sind.

Die Expression des hypophysären POMC in der Haut und die Freisetzung von hypophysären POMC-Derivaten (obligatorisch aus dem Exon 3-Bereich) sind „anerkannte Hypothese“ auf dem betreffenden Forschungsgebiet. Neuerdings wird diese „Lehrmeinung“ jedoch angegriffen und dieser die Hypothese eines (bezogen auf das hypophysäre) aberranten POMC-Gens bzw. eines aberranten POMC-Proteins in Keratinozyten und Melanozyten gegenübergestellt.

In dieser Arbeit konnte an der Keratinozytenzelllinie HaCaT weder die Expression von hypophysärem POMC noch die Bildung oder Freisetzung hypophysärer POMC-Derivate nachgewiesen werden. An der Epidermoidzelllinie A 431 konnte die Expression des hypophysärem POMC ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Lediglich der Einsatz eines der Primerpaare aus dem Bereich des Exon 3 ergab ein sehr schwach positives Signal; diese Befunde sind, insgesamt betrachtet, mit der Existenz einer Variante des hypophysären POMC-Gens in A 431-Zellen, wie sie in einer früher von der Arbeitsgruppe um Farooqi publizierten Arbeit bereits vorgeschlagen wurde (Can et al., 1998), kompatibel. Auch die Bildung und Freisetzung der hypophysärer POMC-Derivate konnte bei A 431-Zellen nicht nachgewiesen werden, was wiederum mit der Existenz eines „aberranten“ POMC-Gens vereinbar ist.

Die beiden für den Nachweis von α -MSH-IRM bzw. CLIP/ACTH-IRM entwickelten RIAs erfüllten ihre Aufgabe zuverlässig und stehen für weitere Versuche zur Verfügung.

Unsere Befunde stützen somit bis jetzt nur die von der Gruppe um Farooqui aufgestellte Hypothese: Sowohl der häufig erhobene Befund eines humanhypophysären POMC-Gens in der Haut als auch unsere diesbezüglich negativen Befunde an Zelllinien sind kompatibel mit der Expression eines -bezogen auf das hypophysäre POMC-Gen- aberranten POMC-Gens in der Haut.

8 SUMMARY

Plenty of information is available on the expression of pituitary POMC gene and the release of POMC-derived peptides from the pituitary. Physiological and psychological „stress“ shows significant impact on the release of POMC-derived peptides. Like wise, plenty of research has been conducted on the expression of the POMC gene and on the release of POMC-derived peptides in the skin. However, despite the number of proven effects of ACTH, α -MSH and β -endorphin, the function of pituitary and cutaneous POMC-derived peptides is largely unclear.

In the relevant field of POMC-research the expression of pituitary POMC in the skin and the release of POMC-derived peptides (always from the exon 3 region of POMC gene) constitute „common and accepted hypothesis“. They are, however, recently challenged when contrasting them with a divergent hypothesis about an isoform or variant of the (with regard to the pituitary) POMC gene or, respectively, a variant of the POMC-protein in keratinocytes and melanocytes.

Our research could not confirm either the expression of pituitary POMC or the production and release of pituitary POMC-derived peptides at the keratinocyte cell line HaCaT. The expression of pituitary POMC could also not be confirmed at the epidermal carcinoma cell line A 431. A weak positive signal could solely be produced by using primers of the exon 3 region of human POMC. Our research results prove in total compatible with the previously published opinion by researcher group around Farooqui (Can et al., 1998) about the existence of an isoform or variant of the pituitary POMC gene in A 431-cells. The fact that we could also not confirm the production and release of pituitary POMC peptides in A 431-cells is also regarded coherent with the existence of an isoform or variant of the POMC gene.

Both radioimmunoassays developed to test and confirm the existence of α -MSH-IRM, respectively CLIP-IRM, functioned properly, and can be utilized for further research projects.

Thus, our findings support so far only the hypothesis put forth by the researcher group around Farooqui: Both, the often stated existence of a human-pituitary POMC gene in the skin and our negative research results on the cell lines are coherent with the expression of a (with regard to the pituitary POMC gene) variant of the POMC gene in the skin.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Alwine** JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy-methyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc Nat Acad Sci* 1977; 74: 5350-5354.
- 2 **Ancans** J, Thody AJ, Wood JM, Beazley WD, Schallreuter KU. Human epidermal Proopiomelanocortin (POMC) cDNA variant is identical to mouse POMC cDNA. *J Invest Dermatol* 1998; 112: 516-517.
- 3 **Autelitano** DJ, Lundblad JR, Blum M, Roberts JL. Hormonal regulation of POMC gene expression. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 715-726.
- 4 **Bertagna** X. Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endokrinol Metab Clin North America* 1994; 23: 467-485.
- 5 **Bigliardi** PL, Büchner S, Ruffli T, Bigliardi-Qi M. Specific stimulation of migration of human keratinocytes by μ -opiate receptor agonists. *J Rec Sig Trans* 2002; 22: 191-199.
- 6 **Blalock** JE, Smith EM. A complete regulatory loop between the immune and neuroendokrine Systems. *Fed. Proc* 1985; 44: 108-111.
- 7 **Bloomquist** BT, Eipper BA, Mains RE: Prohormone-converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 2014-2024.
- 8 **Boukamp** P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106: 761-771.
- 9 **Can** G, Abdel-Malek Z, Porter-Gill P, Gill P, Boyce S, Grabowski MA, Nordlund J, Farooqui J. Identification and sequencing of a putative variant of proopiomelanocortin in human epidermis and epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 485-491.
- 10 **Chakraborty** AK, Slominski A, Ermak J, Hwang J Pawelek J. Ultraviolet B and melanocyte stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for α -MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 655-659.
- 11 **Chakraborty** AK, Funasaka Y, Slominski A, et al., Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313: 130-138.
- 12 **Chakraborty** AK, Funasaka Y, Pawelek JM, Nagahama M, Ito A, Ishihashi M. Enhanced expression of melanocortin-1 receptor (MC1-R) in normal human keratinocytes during differentiation: Evidence for increased expression of POMC peptides near suprabasal layer of epidermis. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 853-860.

- 13 **Chen** C-LC, Chang C-C, Krieger DT Bardin CW. Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis. *Endocrinol* 1986; 118: 2382-2389.
- 14 **Chisari** AN, Giovambattista A, Perello M, Spinedi E. Impact of maternal undernutrition on hypothalamo-pituitary-adrenal axis and adipocyte functions in male rat offspring. *Endocrine* 2001; 14: 375-382.
- 15 **Clark** AJL, Levander PM, Besser GM, Rees LH. Proopiomelanocortin mRNA size heterogeneity in ACTH secreting tumours. *J Mol Endocrinol* 1989; 2: 3-9.
- 16 **Dayers** RA, Robertson BA, Cho BH, Burnham DK, Newton R. α -melanocyte stimulating hormone exhibits target cell selectivity in its capacity to affect interleukin-1-inducible responses in vivo and in vitro. *J Immunol* 1987; 139: 103-109.
- 17 **DeBold** CR, Menefee JK, Nicholson WE, Orth DN. Proopiomelanocortin gene is expressed in many normal tissues and in tumors not associated with ectopic adrenocorticotropin syndrome. *Molec Endocrinology* 1982; 2: 862-870.
- 18 **DeBold** CR, Nicholson WE, Orth DN. Immunoreactive proopiomelanocortin peptides and POMC-like messenger ribonucleic acid are present in many rat nonpituitary tissues. *Endocrinology* 1988; 122: 2648-2657.
- 19 **Denef** C, Van Bael A. A new family of growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of proopiomelanocortin. *Comp Biochem Physiol Part C* 1998; 119: 317-324.
- 20 **DeWied** D, Jolles J. Neuropeptides derived from pro-opiomelanocortin: behavioral physiological and neurochemical effects. *Physiol Rev* 1982; 62: 976-1059.
- 21 **Dotman** CH, Cruijssen PM, Jenks BG, Roubos EW. Differential action of secretin-inhibitors on proopiomelanocortin biosynthesis in the intermediate pituitary of *Xenopus laevis*. *Endocrinology* 1996; 137: 4551-4557.
- 22 **Eberle** AN. Melanotropins, Chemistry, Physiology and Mechanisms of action, 1988, Eberle AN. ed., Karger, Basel.
- 23 **Egeling** KT. Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Proopiomelanocortin-Fragmenten: Nachweis spezifischer Bindungsstellen für β -Endorphin auf Keratinozyten und Vitronektin in Keratinozyten-Zelllinie HaCaT. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2003
- 24 **Ermak** G, Slominski A. Production of POMC, CRH-R1, MC1, and MC2 receptor mRNA and expression of tyrosinase gene in relation to hair cycle and dexamethasone treatment in the C57BL/6 mouse skin. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 160-165.
- 25 **Eves** P, Haycock C, Wagner M, Kemp H, Szabo M et al. Anti-inflammatory and anti-invasive effects of α -melanocyte stimulating hormone in human melanoma cells. *Brit J Cancer* 2003; 89: 2004-2015.

- 26 **Farooqui** JZ, Medrano EE, Abdel-Malek Z, Nordlund JJ. The Expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin. *Ann NY Acad Sci* 1993; 680: 508-510.
- 27 **Farooqui** JZ, Medrano EE, Boissy RE, Tigelaar RE, Nordlund JJ. Thy-1+ dendritic cells express truncated form of POMC-mRNA. *Exp Dermatol* 1995; 4: 297-301.
- 28 **Farooqui** JZ, Gong C, Boyce S, Nordlund J. Expression of proopiomelanocortin and its peptides in human epidermis and epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 883.
- 29 **Farooqui** JZ. Reply to Human epidermal POMC cDNA variant is identical to mouse POMC cDNA. *J Invest Dermatol* 1998; 112: 517.
- 30 **Feng** JD, Dao T, Lipton JM. Effects of preoptic microinjection of α -MSH on fever and normal temperature control in rabbits. *Brain Res Bull* 1987; 18: 473-477.
- 31 **Funasaka** Y, Sato H, Chakraborty AK, Ohashi A, Chrousos GP, Ichihashi M. Expression of Proopiomelanocortin, Corticotropin-Releasing Hormone (CRH), and CRH Receptor in Melanoma Cells, Nevus Cells, and Normal Human Melanocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 4: 105-109.
- 32 **Furkert** J, Klug U, Slominski A, Eichmüller S, Mehlis B, Kertscher U, Paus R. Identification and measurement of beta-endorphin levels in the skin during induced hair growth in mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1336: 315-322.
- 33 **Ghanem** G, Lienhard D, Hanson P, et al., Increased serum α -MSH in human malignant melanoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 536-536.
- 34 **Giovambattista** A, Chisari AN, Corro L, Gaillard RC, Spinedi E. Metabolic, neuroendocrine and immune functions in basal conditions and during the acute-phase response to endotoxic shock in undernourished rats. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7: 92-98.
- 35 **Grigorakis** SI, Anastasiou E, Dai K, Souvatzoglou A, Alevizaki M. Three mRNA transcripts of the proopiomelanocortin gene in human placenta at term. *European J Endocrinol* 2000; 142: 533-536.
- 36 **Grutzkau** A, Henz , Kirchof L, Luger T, Artuc M. alpha-melanocyte stimulating hormone acts as a selective inducer of secretory functions in human mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 14-19.
- 37 **Guillemin** R, Ling N, Vargo T. Radioimmunoassays for α -endorphin and β -endorphin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77: 361-366.
- 38 **Gunoz** H, Dindar A, Neyzi O. beta-Endorphin and some hormonal levels in children with acute stress hyperglycaemia. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 24: 97-101.
- 39 **Harbach** H, Hell K, Gramsch Ch, Katz N, Hempelmann G, Teschemacher H. β -endorphin in the plasma of male volunteers undergoing physical exercise. *Psychoneuroendocrinology* 2000; 25: 551-562.

- 40 **Hazum E**, Chang K, Cuatrecasas P. Specific nonopioid receptors for β -Endorphin. *Science* 1979; 205: 1033-1035.
- 41 **Höllt V**. Regulation of opioid peptide gene expression. In: Herz A, Akil H, Simon EJ, Hrsg. *Handb Exp Pharm* 104/I (Opioids I). Berlin: Springer; 1993; 307-346.
- 42 **Hoppener JWM**, Steenbergh PH, Moonen PJJ, Wagenaar S, Jansz HS, Lips CJM. Detection of mRNA encoding calcitonin gene related peptide and proopiomelanocortin in human tumors. *Mol Cell Endocrinol* 1986; 47: 125-130.
- 43 **Huang QH**, Emntwistle ML, Alvaro JD, Duman RS, Hruby VL, Tatro JB. Antipyretic role of endogenous melanocortins mediated by central melanocortin receptors during endotoxin-induced fever. *J Neuro Sci* 1997; 17: 3343-3351.
- 44 **Hunter WM**, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962; 194: 495-496.
- 45 **Ishibashi M**, Yamaji T. Direct effects of thyrotropin-releasing hormone, cyproheptadine, and dopamine on adrenocorticotropin secretion from human corticotropin adenoma cells in vitro. *J Clin Invest* 1981; 68: 1018-1027.
- 46 **Jaber M**, Tison F, Fournier MC, Bloch B. Differential influence of haloperidol and sulpiride on dopamine receptors and peptide mRNA levels in the rat striatum and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 23(1-2): 14-20.
- 47 **Jacobson L**, Zurakowski D, Majzoub JA. Protein malnutrition increases plasma adrenocorticotropin and anterior pituitary proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 1997; 138: 1048-1057.
- 48 **Jeanotte L**, Trifiro MA, Plante RK, Chamberland M, Drouin J. Tissue-specific activity of proopiomelanocortin promoter. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 4058-4064.
- 49 **Kadekaro AL**, Kanto H, Kavanagh B, Abdel-Malek ZA. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann NY Acad Sci*. 2003; 994: 359-365.
- 50 **Kauser S**, Schallreuter KU, Thody AJ, Gummer C, Tobin DJ. Regulation of human epidermal melanocyte biology by β -endorphin. *J Invest Dermatol*. 2003; 120: 1073-1080.
- 51 **Khodorova A**, Navarro B, Jouaville LS, Murphy J-E, Rice FL et al. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nature Medicine* 2003; 9: 1055-1061.
- 52 **Kippenberger S**, Bernd A, Loitsch S, Ramirez-Bosca A, Bereiter-Hahn J, Holzmann P. α -MSH is expressed in cultured human melanocytes and keratinocytes. *Eur Dermatol* 1995; 5: 395-397.
- 53 **Kjaer A**. Neurohypophysial peptides. Histaminergic regulation and function in adenohipophysial secretion. *Dan Med Bull* 1996; 43: 391-406.

- 54 **Kono** M, Nagata H, Umemura S, Kawana S, Osamura RY. In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin (POMC) genes in human skin. *FASEB-J* 2001; 15: 2297-2299.
- 55 **Kramer** D. Weiterentwicklung und Einsatz einer neuen Methode zur Bestimmung β -Endorphin immunoreaktiver Substanzen in menschlichem Plasma: Diskrepanz zwischen Peptid und Peptid-immunoreaktivem Material. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen 1988.
- 56 **de Kreyzer** Y, Bertagna X, Lenne F, Girard F, Luton JP, Kahn A. Altered proopiomelanocortin gene expression in adrenocorticotropin producing non-pituitary tumors. Comparative studies with corticotropic adenomas and normal pituitaries. *J Clin Invest* 1985; 76: 1892-1898.
- 57 **Lacaze-Masmonteil** T, Kreyzer Y, Luton JP, Kahn A, Bertagna X. Characterization of proopiomelanocortin transcripts in human nonpituitary tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 7261-7265.
- 58 **Leonhardt** M, Lesage J, Dufourny L, Dickes-Coopman A, Montel V, Dupouy JP. Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 45-54.
- 59 **LeRoith** D, et al., Corticotropin and beta-endorphin materials are native to unicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 2086-2090.
- 60 **Lindberg** I. The new eukaryotic precursor processing proteinases. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1361-1365.
- 61 **Lipton** JM, Macaluso A, Hiltz ME, Catania A. Central administration of the peptide α -MSH inhibits inflammation in the skin. *Peptides* 1993; 12: 795-798.
- 62 **Lipton** JM, Zhao H, Ichiyama T, Barsh GS, Catania A. Mechanisms of anti-inflammatory action of α -MSH peptides. In vivo and in vitro evidence. *Ann NY Acad Sci* 1999; 885: 173-182.
- 63 **Luger** TA, Scholzen T, Brzoska T, Becher E, Slominski A, Paus R: Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress response by α -melanocyte-stimulating hormone. *Ann NY Acad Sci* 1998; 840: 381-384.
- 64 **Luger** TA, Paus R, Slominski A, Lipton J: Cutaneous neuromodulation: The proopiomelanocortin system. *Ann NY Acad Sci* 1999a; 885: 1-479.
- 65 **Luger** TA, Schwarz T, Kalden H, Scholzen T, Schwarz A, Brzoska T. Role of epidermal cell-derived α -Melanocyte stimulating hormone in ultraviolet light mediated local immunosuppression. *Ann NY Acad Sci* 1999b; 855: 209-216.
- 66 **Mains** RE, Eipper BA. Phosphorylation of rat and human adrenocorticotropin related peptides: Physiological regulation and studies of secretion. *Endocrinology* 1983; 112: 1986-1995.

- 67 **Matejec** R. Fragmente des Proopiomelanocortins in Blutplasma und Liquor cerebrospinalis präoperativ, unter Spinalanästhesie sowie unter postoperativer Schmerzbelastung. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin; JLU Gießen 2002
- 68 **Matejec** R, Ruwoldt R, Boedeker RH, Hempelmann G, Teschemacher H. Release of beta-endorphin immunoreactive material under perioperative conditions into blood or cerebrospinal fluid: significance for postoperative pain? *Anesth Analg* 2003; 96: 481-486.
- 69 **Meador-Woodruff** JH, Pellerito B, Bronstein D, Lin HL, Ling N, Akil H. Differential effects of haloperidol on the rat pituitary: decreased biosynthesis, processing and release of anterior lobe pro-opiomelanocortin. *Neuroendocrinology* 1990; 51: 294-303.
- 70 **Murburg** MM, Wilkinson CW, Raskind MA, Veith RC, Dorsa DM. Evidence for two differentially regulated populations of peripheral beta-endorphin-releasing cells in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1033-1040.
- 71 **Nagahama** M, Funasaka Y, Fernandez-Frez ML, Ohashi A, Chakraborty AK, Ueda M, Ichihashi M. Immunoreactivity of α -melanocyte-stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone and β -endorphin in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi. *Brit J Dermatol* 1998; 138: 981-985.
- 72 **Nakanishi** S, Inoue A, Kita N, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 1979; 278: 423-427.
- 73 **Newell-Price** J. Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond. *J Endocrinol* 2003; 177: 365-372.
- 74 **Oktar** BK, Alican I. Modulation of the peripheral and central inflammatory Responses by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3: 623-628.
- 75 **Picon** A, Bertagna X, de Kreyzer Y. Analysis of proopiomelanocortin gene transkription mechanisms in bronchial tumour cells, *Mol Cell Endocrinol* 1999; 147: 93-102.
- 76 **Pintar** JE, Schachter BS, Herman AB, Durgerian S, Krieger DT. Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testis. *Science* 1984; 225: 632-634.
- 77 **Rheins** LA, Cotleur AL, Kleier RS, Hoppenjans WB, Sauder DN, Nordlund JJ. α -MSH modulates contact hypersensitivity responsiveness in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 511-517.
- 78 **Roubos** EW. Background adaption by *Xenopus leavis*: a model for studying neuronal information processing in the pituitary pars intermedia. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1997; 118: 533-550.

- 79 **Sachs** L. Angewandte Statistik. Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York Tokyo) 6. Auflage, 1984.
- 80 **Saland** LC, Carr JA, Samora A, Tejada D. Benzodiazepine suppression of corticotropin-releasing factor (CRF)-induced beta-endorphin release from neurointermediate pituitary. *Peptides* 1992; 13: 913-917.
- 81 **Salzet** M, et al., Leech immunocytes contain proopiomelanocortin. *J Immunol* 1997; 159: 5400-5411.
- 82 **Schiller** M, Raghunath M, Kubitscheck U, Scholzen T, Fisbeck T, Metze D, Luger T, Böhm M. Human dermal fibroblasts express prohormone convertases 1 and 2 and produce proopiomelanocortin-derived peptides. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 227-235.
- 83 **Schauer** E, Trautinger F, Köck A, et al., Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest* 1994; 93: 2258-2262.
- 84 **Scheffler** U, Entwicklung radioimmunometrischer Nachweisverfahren zur Bestimmung der Opioidpeptide Dynorphin A (1-8) und α -Neoendorphin (1-10). Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen 1995
- 85 **Schurmeyer** TH, Schulte HM, Avgerinos PC, Tomai TP, Loriaux DL, Gold PW, Chrousos GP. Pharmacology of ovine and human CRH. *Horm Metab Res Suppl* 1987; 16: 24-30.
- 86 **Schulz** A, Harbach H, Katz N, Geiger L, Teschemacher H. β -Endorphin in the Plasma of trained and untrained males undergoing anaerobic exercise on rowing ergometer. *Int J Sport Med* 2000; 21: 513-517.
- 87 **Schwartz** MW et al., Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-671.
- 88 **Schwartz** J, Revskoy S, Redei E, Clifton V, Smith R, Cherny R. Corticotrophs and peptides. *Arch Physiol Biochem* 2002; 110: 146-153.
- 89 **Sebaai** N, Lesage J, Vieau D, Alaoui A, Dupouy JP, Deloof S. Altered control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult male rats exposed perinatally to food deprivation and/or dehydration. *Neuroendocrinology* 2002; 76: 243-253.
- 90 **Seidah** NG, Rochemont J, Hamelin J, Benjannet S, Chretien M. The missing fragment of the pro-sequence of human pro-opiomelanocortin: Sequence and evidence for C-terminal amidation. *Biochem Biophys Res Communications* 1981; 102: 710-716.
- 91 **Slominski** A. POMC gene expression in mouse and hamster melanoma cells. *Febs letters* 1991; 291: 165-168.

- 92 **Slominski A**, Paus R, Mazurkiewicz J. Proopiomelanocortin expression in the skin during induced hair growth in mice. *Experientia* 1992; 48: 50-54.
- 93 **Slominski A**, Wortsman J, Mazurkiewicz JE, Matsuoka L, Dietrich J, Lawrence K, Gorbani A, Paus R. Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin. *J Lab Clin Med* 1993; 122: 658-666.
- 94 **Slominski A**, Ermak G, Hwang J, Chakraborty JE, Mazurkiewicz DC, Mihm M. Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone und corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS letters* 1995; 374: 113-116.
- 95 **Slominski A**, Wortsman J, Mazurkiewicz JE, et al., Identification of β -endorphin, α -MSH and ACTH peptides in cultured human melanocytes, melanoma, and squamous karzinomacells by RP-HPLC. *Exp Dermatol* 1998; 7: 213-216.
- 96 **Slominski A**, Heasley D, Mazurkiewicz JE, Ermak G, Baker J, Carlson JA. Expression of POMC-derived melanocyte-stimulating hormone (MSH) and adrenocortropic Hormone (ACTH) peptides in skin of basal cell karzinoma patients. *Hum Pathol* 1999; 30: 208-215.
- 97 **Slominski A**, Wortsman J, Luger T, Paus R, Salomon S. Corticotropin Releasing Hormone and Proopiomelanocortin Involvement in the cutaneous response to Stress. *Physiol Rev* 2000a; 80: 979-1020.
- 98 **Slominski A**, Szczesniewski A, Wortsman J. Liquid chromatography-mass spectrometry detection of CRH and POMC-derived peptides in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000b; 85: 3582-3588.
- 99 **Solomon S**. POMC-peptides and their biological action. *Ann NY Acad Sci* 1999; 885: 22-40.
- 100 **Takahashi H**, Hakamoto Y, Wantanabe Y, Kikuno R, Miyata T, Numa s. Complete nucleotid sequence of the human corticotropin precursor gene. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 6847-6858.
- 101 **Taylor DV**, et al., Acidosis stimulates β -Endorphin release during exercise. *J Appl Physiol* 1994; 77: 1913-1918.
- 102 **Teofoli P**, Lotti T, Guarcello V, Panconesi E. Detection of mRNA encordeing proopiomelanocortin (POMC) in the A 431 cell line. 3d Congress EADV, Copenhagen September 26-30, 1993: 352.
- 103 **Teschemacher H**, et al., Opioid peptides: immunological significance? *Ann NY Acad Sci* 1990; 594: 66-76.
- 104 **Teschemacher H**. Propiomelanocortin: Welche Rolle spielt dieser ACTH- und β -Endorphin-Precursor für die „Streß-Adaptation“? *Internist. Prax.*, Hans Marseille GmbH, München 2003; 43: 605-615.

- 105 **Texier** PL, de Kreyzer Y, Lacave R, Vieau D, Lenne F, Rojas-Miranda A et al., Proopiomelanocortin gene expression in normal and tumoral humal lung. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 414-420.
- 106 **Thody** AJ, Ridley K, Penny RJ, Chalmers R, Fisher C, Shuster S. MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides* 1983; 4: 813-820.
- 107 **Thody** AJ, Graham A. Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Piment Cell Res* 1998; 11: 265-274.
- 108 **Torpy** DJ, Grice JE, Hockings GI, Crosbie GV, Walters MM, Jackson RV. Effect of sodium valporate on naloxone-stimulated ACTH and cortisol release in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 441-443.
- 109 **Torri** C, Pedrazzi P, Leo G, Muller EE, Cocchi D, Agnati LF, Zoli M. Diet-induced changes in hypothalamic pro-opio-melanocortin mRNA in the rat hypothalamus. *Peptides* 2002; 23: 1063-1068.
- 110 **Vazquez-Martinez** R, Malagon MM, Castano JP, Tonon MC, Vaudry H, Gracia-Navarro F. Amphibian melanotrope subpopulations respond differentially to hypothalamic secretor-inhibitors. *Neuroendocrinology* 2001; 73: 426-434.
- 111 **Wakamatsu** K, Graham A, Cook D, Thody AJ. Charakterization of ACTH-peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1-receptor. *Pigment Cell Res* 1997; 10: 288-297.
- 112 **Weber** E, Evans CJ, Chang JK, and Barchas JD. Antibodies specific for α -Nacetyl- β -endorphins: Radioimmunoassays and detection of acetylated β -endorphins in pituitary extracts. *Journal of Neurochemistry (NY)* 1982; 38: 436-447.
- 113 **Wiedemann** K, Teschemacher H. Determination of β -endorphin and fragments therof in human plasma using high performance liquid chromatography and a multiple radioimmunoassay system. *Pharmceutical Research Community* 1986; 3: 142-149.
- 114 **Wilkins** JN, Gorelick DA. Clinical neuroendocrinology and neuropharmacology of alcohol withdrawal. *Resent Dev Alcohol* 1986; 4: 241-263.
- 115 **Wintzen** M, Yaar M, Burbach JPH, Gilchrest BA. Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 673-678.
- 116 **Wintzen** M, Zanello BS, Holick MF, Wiegant VM, Burbach JPH, Vermeer BJ. Condition-dependent presence of β -lipotropin-like peptide in human keratinozytes. *Peptides* 2000; 21: 691-697.
- 117 **Wintzen** M, de Winter S, Out-Luiting JJ, van Duinen SG, Vermeer BJ. Presence of immunoreaktive beta-endorphin in human skin. *Exp Dermatol* 2001; 10: 305-311.
- 118 **Zanello** SB, Jackson DM, Holick MF. An Immunocytochemical Approach to the Study of β -Endorphin Production in Human Keratinocytes using Confocal Microscopy. *Ann NY Acad Sci* 1999; 855: 85-99.

- 119** **Zelissen** PM, Koppeschaar HP, Thijssen JH, Erkelens DW. Beta-endorphin and insulin/glucose responses to different meals in obesity. *Horm Res* 1991; 36: 32-35.
- 120** **Zhou** A, Bloomquist BT, Mains RE. The prohormonconvertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. *J Biol Chem* 1993; 268: 1763-1769.

LEBENS LAUF

persönliche Angaben

Name: Kathrin Wagner
geboren am 18.08.1975
Geburtsort: Rudolstadt

Schul Ausbildung

1982-1990 Goetheschule Königsee
1991-1994 Friedrich-Fröbel-Gymnasium Bad Blankenburg
05/1994 Abitur

Hochschulstudium

1994-2001 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in
Gießen

Praktisches Jahr

10/2000-09/2001 im Kreiskrankenhaus Wetzlar-Braunfels, Wahlfach Gynäkologie

Ärztin im Praktikum

12/2001-06/2003 Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen

momentan ausgeübte Tätigkeit

seit 06/2003 Assistenzärztin in der Frauenklinik, Justus-Liebig-Universität
Gießen
11/2004-04/2005 Elternzeit (Sohn Leander geboren am 24.11.2004)

Tätigkeiten neben dem Studium

03/1995-11/1999 mobile Altenpflege bei der Diakonischen Pflegezentrale Gießen
SS1997/SS1998 Mentorin für Studienanfänger im Fach Humanmedizin an
der JLU Gießen
1998-2000 Animateurin beim Ravensburger Spieleverlag
1999-2001 Dozentin für „Allgemeine Krankheitslehre“ und „Krankheitslehre“
an der Theodora-Konitzky-Krankenpflegeschule Bad Nauheim
04/2000-07/2000 studentische Hilfskraft am Rudolph-Buchheim-Institut für
Pharmakologie an der JLU Gießen

Auslandsaufenthalt

09/1997 Sprachkurs (Englisch) in Dundee, Schottland
10-11/1997 Praktikum am Royal Infirmary und Queen`s Park Hospital in
Blackburn, England

Gießen, April 2005

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. H. Teschemacher möchte ich herzlich für das zur Verfügung gestellte Thema sowie die ausgezeichnete stets konstruktive und entgegenkommende Betreuung danken.

Frau Beate Dickopf gilt mein besonderer Dank für ihr stets offenes Ohr und die geduldige und hilfsbereite Begleitung durch alle Phasen dieser Arbeit.

Herrn Helmut Müller gilt mein herzlicher Dank für die Durchführung aller Zellkultur-Arbeiten. Ohne seine tatkräftige Unterstützung wäre das Durchführen der Versuche aufgrund der Vielzahl an benötigten Zellen nicht möglich gewesen.

Herrn Peter Mayer danke ich für die Hilfe beim Aufbau der Gentechnologie-Methoden und der Auswertung der Ergebnisse.

Herrn R.-H. Bödeker möchte ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten danken.

Herrn Andreas Koschinski und Herrn Holger Wenzlaff gilt mein Dank für die Beratung und Unterstützung in Computerfragen.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Institut danke ich für das nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Frau Wiebke Hoppensack danke ich herzlichst für die intensive Betreuung in der Endphase dieser Arbeit.

Meinem Freund, Herrn Jens-Carsten Otto, möchte ich dafür danken, daß er über Jahre geduldig meine Fortschritte und Niederlagen ertragen und daran geglaubt hat, daß diese Arbeit fertig wird.

Meinem Sohn Leander danke ich für die Energie zum Endspurt.

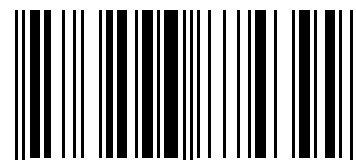
Meiner Familie gilt mein besonders herzlicher Dank für ihre bedingungslose Unterstützung in allen Belangen.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-439-X



9 783896 874399