

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Reziproke Reaktion von Melanozyten und Fibroblasten auf
die Stimulation mit α -MSH in Abhängigkeit von MC1R
Polymorphismen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2011

Vorgelegt von Hedwig Stanisz
Geboren am 25.09.1981 in Saybusch, Polen

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
1.1	Zusammenfassung englisch	7
1.2	Zusammenfassung deutsch	8
2	EINLEITUNG	9
2.1	Das Proopiomelanocortin (POMC) - System der Haut	10
2.1.1	Rezeptoren des POMC-Systems in der Haut: Der Melanocortin 1 Rezeptor	10
2.1.1.1	Aufbau	10
2.1.1.2	Polymorphismen	11
2.1.1.3	Expression	12
2.1.2	Regulation der MC1R Funktionalität	12
2.1.2.1	Intrinsische Aktivität	13
2.1.2.2	MC1R Desensibilisierung und Internalisierung	13
2.1.3	Signalkaskade des MC1R	14
2.1.4	α -MSH: Entstehung durch POMC Prozessierung	16
2.1.5	Regulation der Genexpression des POMC	17
2.1.6	Effekte von alpha MSH	18
2.1.6.1	Effekt auf das Pigmentsystem:	18
2.1.6.2	Effekt auf die Epidermis	18
2.1.6.3	Effekte auf die Dermis	18
2.1.6.4	Effekte auf das Immunsystem	18
2.2	Fragestellung	19
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Material	20
3.1.1	Substanzen	20
3.1.2	Medien und Puffer	20
3.1.3	Geräte und Zellkulturplatten	20
3.2	Methoden	21
3.2.1	Zellkultur	21
3.2.1.1	Isolierung humaner Melanozyten und Fibroblasten	21
3.2.1.2	Etablierung von Melanozyten- und Fibroblastenreinkulturen	21
3.2.1.3	Kultivierung der Zelllinien	22

3.2.2	Molekularbiologische Methodik	22
3.2.2.1	Sequenzierung des Melanocortinrezeptor-Gens.....	22
3.2.2.1.1	<i>Isolation genomischer DNA</i>	22
3.2.2.1.2	<i>Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren</i>	22
3.2.2.1.3	<i>Amplifikation der spezifischen MC1R DNA durch Polymerasekettenreaktion.....</i>	23
3.2.2.1.4	<i>Aufreinigung des PCR Produkts</i>	24
3.2.2.1.5	<i>Sequenzierung des MC1R durch Polymerasekettenreaktion.....</i>	24
3.2.2.1.6	<i>Präzipitation des Sequenzierungsansatzes.....</i>	24
3.2.3	Zellbiologische Methodik	25
3.2.3.1	Messung der Intrazellulären cAMP Konzentration mit Enzymimmunoassay (EIA)	25
3.2.3.2	Proliferationsexperimente mit dem Celltiter-blue Cell Viability Assay.....	25
3.2.4	Datenanalyse und Statistik	26
4	ERGEBNISSE	27
4.1	Vergleich der Rezeptorfunktion von Melanozyten und Fibroblasten.....	27
4.1.1	Messung der intrazellulären cAMP Konzentration in Melanozyten und Fibroblasten	27
4.1.1.1	cAMP Konzentration in Melanozyten	28
4.1.1.2	cAMP Konzentration in Fibroblasten.....	29
4.1.2	Proliferationsexperimente.....	30
4.1.2.1	Proliferation Melanozyten.....	31
4.1.2.2	Proliferation Fibroblasten	32
4.2	Einfluss von Polymorphismen im MC1R auf die Reaktionsweise von Melanozyten und Fibroblasten.....	33
4.2.1	Sequenzierung des MC1R.....	34
4.2.1.1	Auswahl der Primer in der regulatorischen Region des MC1R und PCR.....	34
4.2.1.2	Aufreinigung der amplifizierten DNA	34
4.2.1.3	Sequenzierungs-PCR.....	35
4.2.2	Zusammenhang zwischen Zelltyp, MC1R Polymorphismus, Rezeptorfunktionalität und Proliferationsverhalten	37
4.2.2.1	Korrelation der Melanozyten	37
4.2.2.1.1	<i>Melanozytenlinie B-011 (MC1R Wildtyp).....</i>	37
4.2.2.1.2	<i>Melanozytenlinie M-012 (MC1R Wildtyp).....</i>	39
4.2.2.1.3	<i>Melanozytenlinie E-013 (MC1R R142H heterozygot).....</i>	41
4.2.2.1.4	<i>Melanozytenlinie I-014 (MC1R V92M homozygot)</i>	43
4.2.2.2	Korrelation der Fibroblasten:.....	45
4.2.2.2.1	<i>Fibroblastenlinie H-211 (MC1R T).....</i>	45
4.2.2.2.2	<i>Fibroblastenlinie C-212 (MC1R R163Q heterozygot).....</i>	47

4.2.2.2.3	<i>Fibroblastenlinie D-213 (MC1R R151C heterozygot)</i>	49
4.2.2.2.4	<i>Fibroblastenlinie K-214 (MC1R V60L heterozygot)</i>	51
4.3	Zusammenfassung:	53
5	DISKUSSION	54
5.1	Bedeutung des Melanocortin-1 Rezeptors für Melanozyten und Fibroblasten der Haut: Aktuelle Daten	54
5.2	Reaktion der Fibroblasten und Melanozyten auf die Stimulation mit α-MSH im Vergleich	55
5.3	Einfluss der MC1R Polymorphismen auf das Reaktionsverhalten von Melanozyten und Fibroblasten	56
5.3.1	Ergebnisse der Sequenzierung	56
5.3.2	Ergebnisse des cAMP-ELISA.....	56
5.3.3	Ergebnisse aus den Proliferationsversuchen:.....	58
5.4	Fazit	59
6	LITERATURANGABEN	61

Abkürzungen

MC1R	Melanocortin 1 Rezeptor
α -MSH	Alpha Melanozyten Stimulierendes Hormon
CAMP	Cyklisches Adenosin Monophosphat
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
POMC	Proopiomelanocortin
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
RHC	Red Hair Colour (Rote Haarfarbe)
ASIP	Agouti Signaling Protein
CBP	Calcium Binding Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GRK	GPCR Kinasen
PKA	Proteinkinase A
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
CRE	cAMP Responsive Element
MITF	Mikrophthalmia Transcription Factor
BHLH	Basic-Helix-Loop-Helix
NT	NH ₂ -Endfragments der mRNA
LPH	β -Lipotropin
PC1	Prohormonkonvertasen 1
PC2	Prohormonkonvertasen 2
IL-1	Interleukin 1
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TGF- β	Tumor Growth Faktor beta

LPS	Lipopolysacharid
VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
DMSO	Dimethylformamid
FCS	Fetales Kälberserum
G418	Genetecin
TNS	Trypsin Neutralisation Solution
R (Arg)	Arginin
W (Trp)	Tryptophan
D (Asp)	Asparaginsäure
H (His)	Histidin
E (Glu)	Glutaminsäure
V (Val)	Valin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
Q (Gln)	Glutamin
RFU	Relative Fluoreszent Unit (relative Fluoreszenzeinheit)
SEM	Standart Error of the Mean (Standartfehler des Mittelwertes)

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung englisch

Reciprocal responses of fibroblasts and melanocytes to α -MSH depending on MC1R polymorphisms

Melanocortin 1 receptor (MC1R) polymorphisms play a major role in the regulation of several physiological and pathological signaling pathways in melanocytes. Alpha melanocyte stimulating hormone (α -MSH), which initiates the MC1R mediated activation of cAMP signaling pathway, has recently been shown to have impact not only on melanocyte but also on fibroblast function.

In the present study we investigated human native melanocyte and fibroblast cell lines with different MC1R polymorphisms. To evaluate the effect of MC1R polymorphisms on the receptor function we measured the intracellular cAMP concentration and the cellular proliferation upon stimulation with α -MSH. Our results indicate that fibroblasts, as well as melanocytes show differences in the receptor function depending on MC1R polymorphisms. In wild type fibroblasts the intracellular cAMP concentration and the cellular proliferation decrease upon α -MSH stimulation, whereas in fibroblasts with mutations in the MC1R gene both effects are significantly diminished. The same stimulation in wild type melanocytes results in an increase of cAMP concentration and cellular proliferation. Interestingly in cell lines with MC1R polymorphisms the increase of cAMP is less intense. However, cell proliferation is comparable with wild type melanocytes.

We conclude that the MC1R polymorphisms are not only important for the regulation of the skin pigmentary system (i.e. melanocytes) but also have an impact on the function of connective tissues (i.e. fibroblasts). Our findings can potentially be of importance in better understanding of individual tendencies towards several processes and diseases like wound healing, keloids, fibrosis and even aging.

1.2 Zusammenfassung deutsch

Melanocortin 1 Rezeptor (MC1R) Polymorphismen spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung verschiedener physiologischer und pathologischer Signalwege in Melanozyten.

Neuere Studien zeigen, dass alpha Melanozyten Stimulierendes Hormon (α -MSH), das über die Aktivierung des MC1R zum Anstieg des intrazellulären cAMP Spiegels führt, nicht nur Auswirkungen auf die Funktion von Melanozyten hat, sondern auch Fibroblasten in ihrer Funktion beeinflusst.

Wir haben humane Melanozyten und Fibroblasten mit unterschiedlichen MC1R Polymorphismen untersucht. Um den Effekt der MC1R Polymorphismen auf die Rezeptorfunktionalität zu charakterisieren, wurden die intrazellulären cAMP Spiegel sowie die Proliferation der Zellen nach Stimulation mit α -MSH gemessen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Melanozyten als auch die Fibroblasten in Abhängigkeit ihres MC1R Polymorphismus Unterschiede in der Rezeptorfunktionalität aufweisen. In Fibroblasten, die den Wildtyp-MC1R exprimieren, nimmt sowohl der intrazelluläre cAMP Spiegel als auch die Proliferation nach Behandlung mit α -MSH signifikant ab. In Fibroblasten mit MC1R-Polymorphismen sind beide Effekte hingegen deutlich vermindert. Die gleiche Stimulation bewirkt in Melanozyten eine Zunahme der intrazellulären cAMP Konzentration sowie eine Proliferationssteigerung. Interessanterweise zeigen die Melanozytenlinien mit Polymorphismen im MC1R-Gen zwar einen geringeren Anstieg des intrazellulären cAMP Spiegels, während sich dennoch eine signifikante Proliferationssteigerung aufweisen.

Zusammenfassend geben unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass sich der MC1R und dessen Polymorphismen nicht nur auf die Melanozyten der Haut auswirken, sondern auch auf die Fibroblasten. Unsere Ergebnisse könnten zu einem besseren Verständnis beitragen, wie eine individuelle Veranlagung auf verschiedene physiologische bzw. pathologische Prozesse wie beispielsweise Wundheilung, Keloide, Fibrose und Hautalterung Einfluß nehmen könnten.

2 Einleitung

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Die unterschiedlichen am Aufbau der Haut beteiligten Zellen übernehmen unterschiedliche physiologische Aufgaben, sind aber auch an pathologischen Prozessen beteiligt.

Fibroblasten sind die vorherrschenden Zellen des Binde- und Stützgewebes. Sie sind für die Synthese von elastischen und kollagenen Fasern zuständig und für die Wundheilung von Bedeutung. Eine verstärkte Aktivierung von Fibroblasten kann zur Keloidbildung führen. Ebenso sind Fibroblasten an der Entstehung fibrosierender Dermatosen beteiligt (Morphea, Sklerodermie).

Melanozyten sind durch die Melaninbiosynthese physiologisch für den Schutz der Haut vor UV-Schäden verantwortlich. Aus ihnen kann sich der bösartigste aller Hauttumoren, das maligne Melanom, entwickeln.

Die Keratinozyten bilden das verhornende Plattenepithel der Haut. Als größter Anteil der epidermalen Zellen können sie zu Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen entarten.

Diese unterschiedlich spezialisierten Zellen stehen in der menschlichen Haut in enger Verbindung miteinander und sind über verschiedene Signalwege in ständiger Kommunikation. Einen dieser Kommunikationsmechanismen stellt das Proopiomelanocortinsystem (POMC-System) dar. Hierbei handelt es sich um das Zusammenspiel von Peptidhormonen (Melanozyten stimulierende Hormone = MSH, Adrenocorticotrophes Hormon = ACTH, Endorphine), denen das Vorläufermolekül Proopiomelanocortin (POMC) gemeinsam ist und den zugehörigen Rezeptoren (Melanocortinrezeptoren, Endorphinrezeptoren). Einige Studien weisen darauf hin, dass unter anderem das POMC-System, das ubiquitär in der Haut exprimiert wird, eine wichtige Rolle bei vielen der oben beschriebenen Krankheitsprozesse spielt.

In normaler humaner Haut ist die Expression des POMC-Gens niedrig bzw. liegt unter der Nachweisgrenze [6, 7]. Im Gegensatz dazu wird die Genexpression unter pathologischen Umständen wie z. B. bei Keloiden, Psoriasis, Basalzell- und Spindelzellkarzinomen, Vitiligo und Melanom nachweisbar [6, 8-10].

Insbesondere wird auch eine erhöhte Produktion von POMC-Peptiden in fortgeschritteneren oder aggressiveren Formen des Melanoms gefunden [4, 8, 11-15].

2.1 Das Proopiomelanocortin (POMC) - System der Haut

2.1.1 Rezeptoren des POMC-Systems in der Haut: Der Melanocortin 1 Rezeptor

Im POMC-System der Haut spielen die Melanocortinrezeptoren, vor allem der Melanocortin 1 Rezeptor (MC1R) eine wichtige Rolle. Der MC1R wird auf nahezu allen Zellen der Dermis und Epidermis exprimiert (rev. in [16, 17]).

Die Melanocortinrezeptoren (MC-R) gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und wurden 1992 zum ersten Mal geklont [13, 18].

Es handelt sich um eine Familie von 5 Rezeptoren (MC1R bis MC5R) die über 7 Transmembran-Domänen verfügen und eine 39-61%ige Homologie auf der Aminosäureebene aufweisen. Die Expression der einzelnen Rezeptorsubtypen ist gewebe- bzw. zellspezifisch. Außerdem unterscheiden sich die Rezeptoren in ihrer Affinität für ihre Agonisten, den Melanocortinen (α -, β -, γ -MSH und ACTH). Die Rezeptoren vermitteln ein sehr breites Spektrum physiologischer Prozesse.

Zelltyp	MC Rezeptor
Epidermale Keratinozyten	MC1
Follikuläre Keratinozyten	MC1
Epidermale Melanozyten	MC1, MC2 [†]
Follikuläre Melanozyten	MC1
Dermale Naevocyten	MC1
Sebozyten	MC5
Schweissdrüsenzellen	MC1, MC5
Endothelzellen	MC1
Langerhanszellen	MC1
Monozyten	MC1
Makrophagen	MC1
Lymphozyten	MC1
Fibroblasten	MC1
Adipozyten	MC2, MC5

Legende: Expression des MC1R auf verschiedenen Zellarten

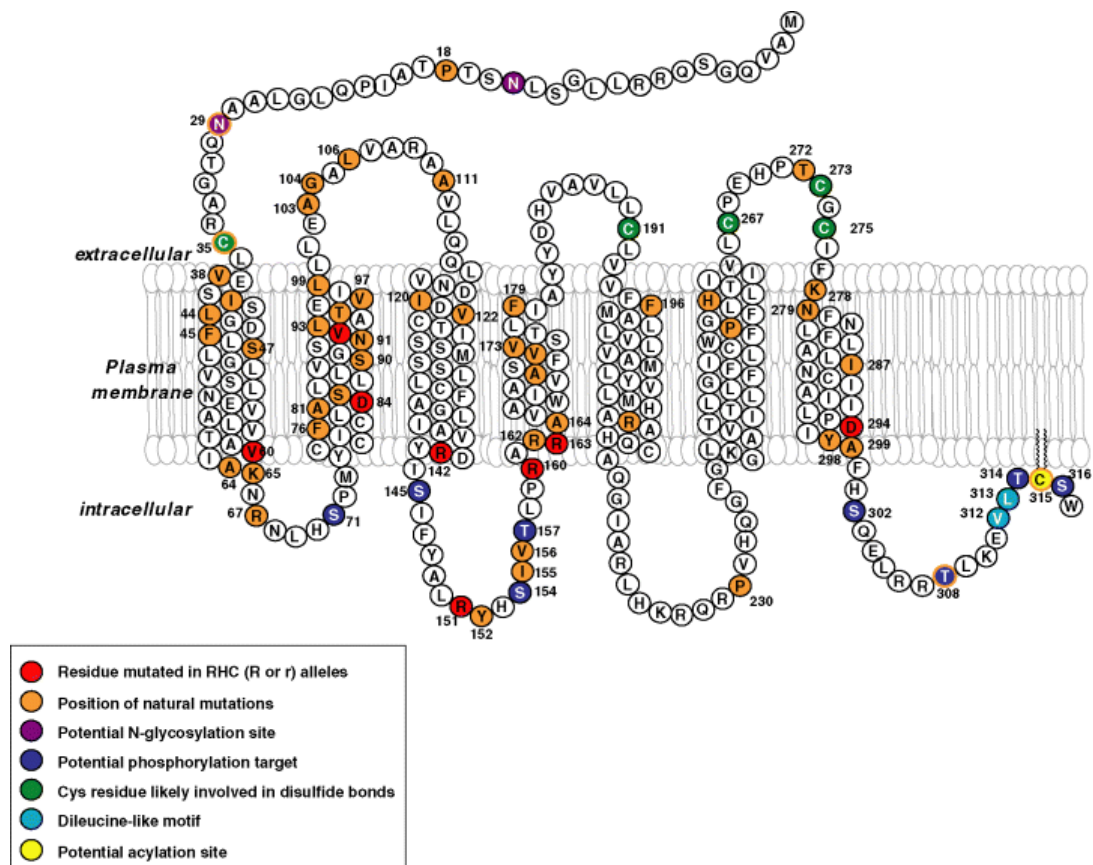
Quelle: Slominski et al 2000

2.1.1.1 Aufbau

Das MC1R Gen liegt auf dem Telomerarm von Chromosom 16 (Locus:16q24.3) [19, 20].

Das Gen ist in der codierenden Region intronlos. Die vollständige Transkriptionseinheit der Genregion des Rezeptors ist bereits erforscht und mögliche Promotor-Motive, Wiederholungssequenzen und die 5'cap und der Poly-A-Schwanz

des Locus wurden definiert [21, 22]. Das MC1R Gen ist sehr polymorph. Beim Menschen sind mehr als 60 verschiedene Varianten beschrieben (Liste mit Rezeptor-Varianten und Erstbeschreiber siehe [23]).



Legende: Aminosäuresequenz des MC1R

Quelle: Garcia-Borrón, Sanchez-Laorden et al 2005

2.1.1.2 Polymorphismen

Robbins et al. stellten 1993 einen Zusammenhang zwischen MC1R Polymorphismen, der Rezeptorfunktionalität und deren Auswirkung auf die Fellfarbe von Mäusen her [24]. Ausgehend von dieser Entdeckung wurde die Untersuchung der Funktionalität unterschiedlicher MC1R Varianten beim Menschen durchgeführt. Bevölkerungsstudien haben gezeigt, dass bestimmte Allele mit roter Haarfarbe und heller Hautfarbe (RHC Phänotyp) in Zusammenhang stehen [25-28]. Die Allele unterschieden sich in ihrer Penetranz bezogen auf den Phänotyp [29, 30]. Die starken RHC Allele zeigen eine Odds Ratio von 50 bis 120 für rotes Haar. Diese Allele sind die häufigen Polymorphismen R151C, R160W und D294H und die seltenen Polymorphismen D84E und R142H. Die schwächeren RHC Allele V60L,

V92M, R163Q haben eine Odds Ratio für rote Haarfarbe, die zwischen 2 und 6 liegt. Die Polymorphismen R142H, R151C, R160W und D294H und das Allel V60L kommen bei 30% der nordeuropäischen Bevölkerung vor und sind für 30% aller Phänotypen mit roter Haarfarbe verantwortlich [31].

In den letzten Jahren ist die Funktionalität der unterschiedlichen MC1R Allele in das Blickfeld der Wissenschaft gerückt. Es besteht Einigkeit darüber, dass die RHC Allele R142H, R151C, R160W und D294H eine eingeschränkte Funktionalität des Rezeptors bedingen. Allerdings sind der Grad der Beeinträchtigung und die molekularbiologischen Mechanismen noch unklar. Die Feststellung, dass sich die Varianten in ihrer Fähigkeit cAMP zu produzieren unterscheiden, und zwar in der absteigenden Reihenfolge Wildtyp (WT)>R160W~R151C>R142H~D294H, lässt darauf schließen, dass es sich um einen Defekt in der Aktivierung des G_s-Proteins handelt. Andererseits haben neuere Studien auch eine Retention des Rezeptors in der Zelle bzw. eine verminderte Rezeptordichte auf der Plasmamembran aufgezeigt. Dies legt wiederum eine veränderte Prozessierung der unterschiedlichen Polymorphismen und eine daraus resultierende verminderte Funktionalität des Rezeptors nahe [32, 33]. Da heterozygote Varianten bezogen auf ihre Rezeptorfunktionalität zwischen Wildtyp und homozygoten Varianten anzusiedeln sind, spricht dies für einen Gen-Dosis-Effekt [34, 35].

2.1.1.3 Expression

Auf der Plasmamembran normaler humaner Melanozyten beträgt die Rezeptordichte wenige hundert MC1R Moleküle pro Zelle [36].

Melanomzellen weisen eine deutliche Überexpression des Rezeptors auf. Aber auch hier sind nur wenige tausend Bindungsstellen pro Zelle zu verzeichnen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Rezeptordichte für das Ausmaß der Signaltransduktion ein entscheidender Faktor ist [13, 37, 38].

2.1.2 Regulation der MC1R Funktionalität

Der humane MC1R ist sehr polymorph und viele der natürlichen Varianten sind funktionell von Bedeutung [45, 46].

Beim Menschen ist der Genotyp des MC1R die erste Stufe, die sich regulatorisch auf die Rezeptorfunktion auswirkt. Ferner wird die Aktivität des MC1R durch verschiedene weitere Mechanismen moduliert. Diese beinhalten neben der

Genexpression, mRNA Stabilität bzw. Effizienz bei der Translation auch den Grad der posttranslationalen Prozessierung des Rezeptorproteins bzw. seinen Weg durch die einzelnen Stationen des Sekretionsmechanismus.

An der Plasmamembran angekommen bestimmt die Bindung der Agonisten bzw. Antagonisten die Rezeptoraktivität. Zusätzlich triggert die Ligandenbindung weitere regulatorische Mechanismen wie homologe Desensibilisierung der Signaltransduktion und Rezeptorinternalisierung.

2.1.2.1 Intrinsische Aktivität

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verfügen oft über eine Grundaktivität, die die Signalkaskade auch in Abwesenheit des Agonisten aktiviert. So verfügt auch der MC1R über eine Basalaktivität [39].

Inverse Agonisten konkurrieren mit rezeptoraktivierenden Liganden um dieselbe Bindungsstelle bei Rezeptoren mit konstitutiver Aktivität. Ferner stabilisieren sie die inaktive Rezeptorkonformation und vermindern somit die agonistunabhängige Grundaktivität [40].

Die hohe konstitutionelle Aktivität des MC1R ist sowohl für den inversen Agonismus von ASIP (agouti signaling protein) verantwortlich, als auch für die Signaltransduktion in Abwesenheit eines Agonisten [41-43].

Die Bindung von α -MSH an den α -MSH Rezeptor mit nachfolgender Aktivierung der Adenylatzyklase ist abhängig von der Anwesenheit von Calcium in der Rezeptorumgebung. Calcium binding protein (CBP) aktiviert den Rezeptor sogar teilweise auch in der Abwesenheit des Liganden [44].

2.1.2.2 MC1R Desensibilisierung und Internalisierung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) unterliegen nach Ligandenbindung oft einer homologen Desensibilisierung mit einer starken Abschwächung der Signaltransduktion schon wenige Minuten nachdem ein Ligand an den Rezeptor gebunden hat. Der homologen Desensibilisierung liegt eine Phosphorylierung des agonistbesetzten Rezeptors durch spezifische GPCR Kinasen (GRK) zugrunde [47, 48].

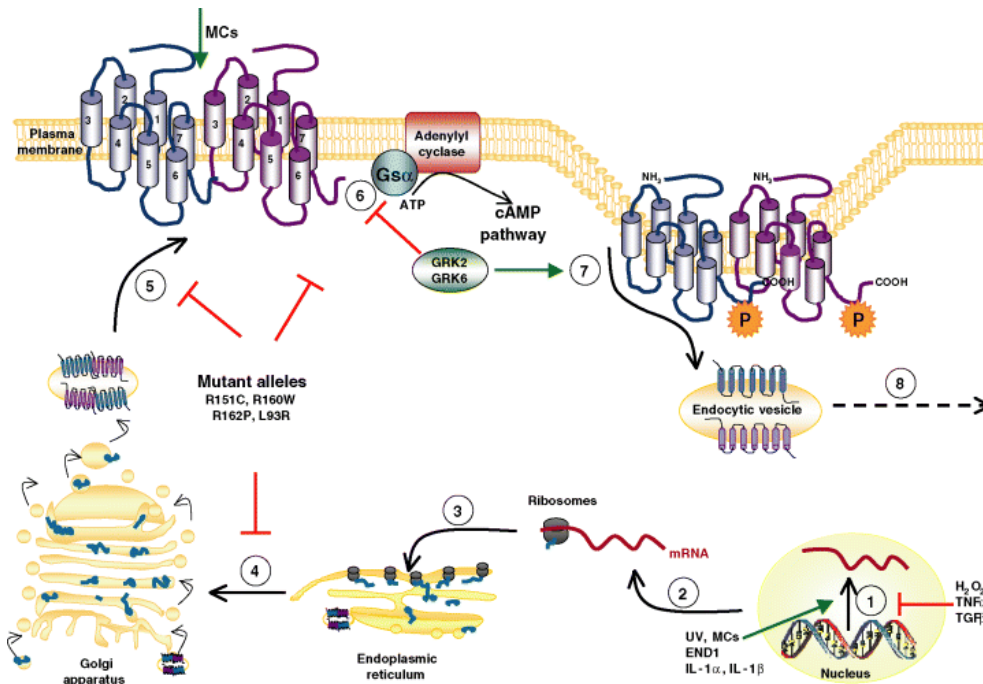
Phosphorylierte Rezeptoren sind nicht mehr in der Lage ihre Signalkaskade zu aktivieren. Dies wurde für den MC1R in der Maus und in humanen Melanomzellen belegt [39].

Wahrscheinlich spielen bei der Desensibilisierung der MC1R die GRK2 und die GRK6 eine wesentliche Rolle, da diese Kinasen sowohl in Melanozyten als auch in Melanomzellen nachweisbar sind und untersucht wurden [39].

Der Phosphorylierung von GPCRs folgt oft eine endozytotische Aufnahme des Rezeptors, was wiederum weitere Signalwege modulieren kann [47, 48]. Die Internalisierung des Rezeptors kann entweder zum lysosomalen Abbau führen oder aber zum Recycling des Rezeptors zurück an die Plasmamembran. Die phosphorylierungsabhängige Internalisierung konnte bereits für den MC4R belegt werden und liegt auch für den MC1R nahe [49].

Obwohl wenig Zweifel an der Rezeptorinternalisierung besteht, ist unklar was mit dem MC1R in der Zelle geschieht. Es gibt Hinweise für den lysosomalen Abbau des Rezeptors während Hinweise für ein Rezeptorrecycling bislang fehlen [50].

Vermutlich ist die Rezeptordichte auf der Plasmamembran abhängig von einem Gleichgewicht zwischen Rezeptorabbau nach Ligandenbindung und gleichzeitiger Aktivierung der Genexpression. Dieses Gleichgewicht könnte zellspezifisch sein und würde so die Heterogenität der Aktivierungsmuster erklären [23].

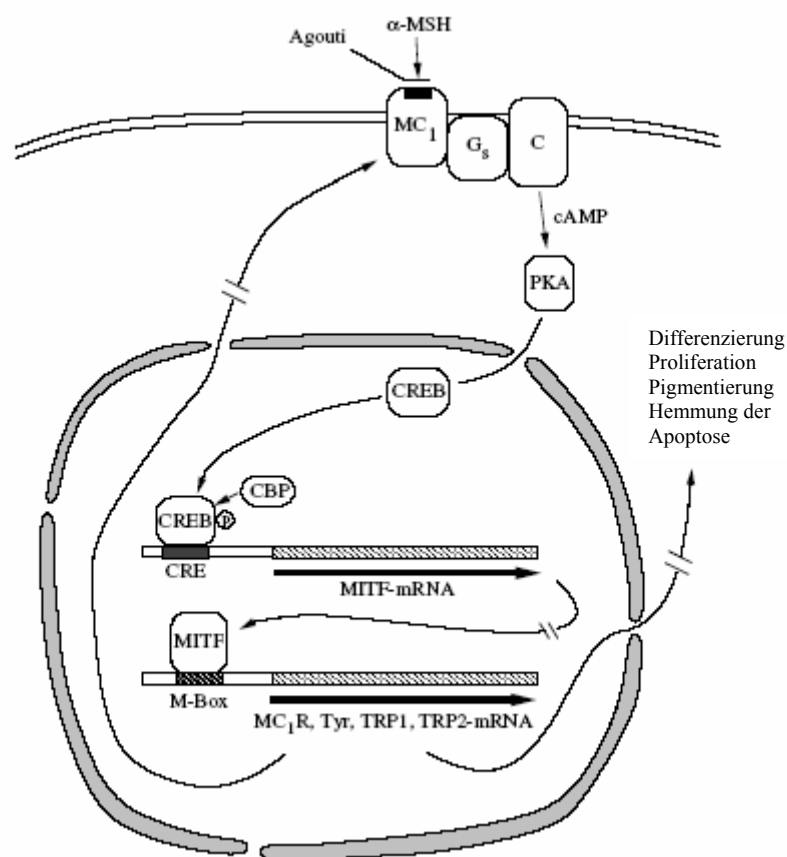


Legende: Desensibilisierung und Internalisierung des MC1R
Quelle: Garcia-Borron, Sanchez-Laorden et al. 2005

2.1.3 Signalkaskade des MC1R

Wie bereits erwähnt ist der MC1R ebenso wie die anderen MC-R ein G-Protein gekoppelter 7-Transmembran-Rezeptor. Die Signaltransduktion erfolgt über die Aktivierung des heterotrimeren Gs-Proteins und der Adenylyl cyclase. Die daraus

resultierende Erhöhung des intracellulären cAMP-Spiegels triggert die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese wiederum phosphoryliert das cAMP Responsive Element Binding Protein (CREB). Phosphoryliertes CREB bindet an das cAMP Responsive Element (CRE) in der Promotorregion des Mikrophtalmia Transkription Factor (MITF). Für die vollständige Aktivierung des MITF-Promotors durch CREB ist allerdings noch die Bindung des CREB Binding Protein (CBP) an CREB erforderlich. Das MITF Protein ist wiederum in der Lage weitere Gene zu aktivieren, die unter anderem für die Pigmentierung (Tyrosinase), Proliferation von Melanozyten (z. B. Tyrosinase related peptides) oder den Kollagenstoffwechsel von Bedeutung sind, indem es an die M-Boxen in deren Promotoren bindet [51]. MITF ist ein Mitglied der Myc-Superfamilie die den basic-helix-loop-helix (bHLH)Zipper-Transkriptionsfaktoren angehört [52, 53]. Es gibt mehrere Isoformen, deren Expression zellspezifisch ist. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren oft mehr als einen Signalweg und so führt der MC1R über die Aktivierung der PKA zu einer Aktivierung der PKB, wobei diese Aktivierung PI3-Kinase unabhängig ist [53, 54].



Legende: Signalkaskade des MC1R
 Quelle: Wikberg, J. E., R. Muceniece, et al. 2000

2.1.4 α -MSH: Entstehung durch POMC Prozessierung

α -MSH entsteht neben weiteren Neuropeptiden aus einem Vorläuferprotein, dem Proopiomelanocortin (POMC).

Das POMC Gen ist beim Menschen auf Chromosom 2 lokalisiert [55]. Das Gen besteht bei Säugern aus drei Exons und zwei Introns. Exon 1 entspricht der 5'-untranslatierten mRNA. Exon 2 beinhaltet den restlichen Teil der 5'-untranslatierten mRNA, die Sequenz des Signalpeptids und die Startsequenz des NH₂-Endfragments (NT); Exon 3 codiert schließlich für das COOH-Ende des NT, das Verbindungspeptid (joining peptide), ACTH, β -Lipotropin (LPH) und die 3'-untranslatierte mRNA [56-62]. Im Gehirn und in der Hypophyse werden die POMC-Transkripte zu ca. 1,1 kb langen mRNA Fragmenten gespliced [56-62]. Kürzere und längere mRNAs existieren, werden aber nur in außercerebralen Geweben gefunden, unter anderem in der Haut [14, 56, 59, 63-66].

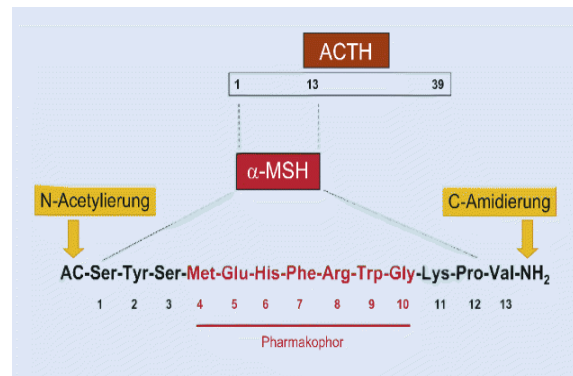
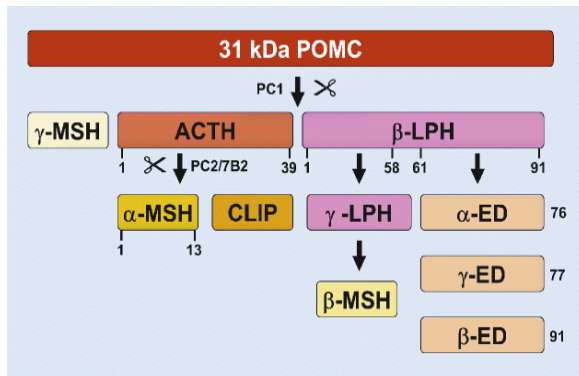
Die Heterogenität in der Länge der POMC mRNA wurde durch alternatives Splicing, Unterschiede in der Länge des Poly-A-Schwanzes und unterschiedliche Startpunkte der Transkription erklärt [56, 59, 60, 63, 64]. Es ist allgemein akzeptiert, dass die Translation der POMC mRNA die volle Länge des Gentranskripts erfordert, bestehend aus den drei Exons, wobei Exon 1 das Signalpeptid enthält [56, 60, 61, 67]. In humaner Haut hat das POMC Transkript eine Größe von 1,2 oder 1,3 kb, ähnlich dem im Hypothalamus und in der Hypophyse [68-70].

Die POMC mRNA wird zu einem 30-kDa Protein umgeschrieben. Dieses Protein ist das Vorläufermolekül von ACTH, Endorphinen, Melanotropinen und Lipotropinen [55, 58, 61, 67].

Diese Neuropeptide werden posttranslational durch Konvertasen jeweils unterschiedlich und durch aufeinander folgende Schritte vom Vorläufermolekül abgespalten. Die Spaltvorgänge sind zellspezifisch.

Die Produktion der Endprodukte ACTH, MSH und Endorphine ist demzufolge ein komplizierter vielschichtiger Prozess, der eine Spaltung des POMC bzw. der entstandenen Neuropeptide durch Endo- und Exopeptidasen (Prohormonkonvertasen PC1 und PC2) erfordert.

Des weiteren erfolgt eine posttranslationale Modifizierung in Form von Amidierung und Acetylierung [55, 56, 61, 67, 71, 72].



Legende: Prozessierung des POMC

Quelle: Böhm, M and Luger, T. A. Hautarzt 2004

2.1.5 Regulation der Genexpression des POMC

Die Genexpression des POMC wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Vor allem scheint der Regulation durch die Cytokine des Immunsystems eine besondere Rolle zuzukommen. Allerdings modifizieren die unterschiedlichen Cytokine und Wachstumsfaktoren, die ihre Wirkung in der Haut sehr lokal beschränkt entfalten können, die POMC Genexpression bzw. Peptidbildung in einer von Zelltyp zu Zelltyp spezifischen Art und Weise. Um nur einige Beispiele zu nennen: IL-1 stimuliert die POMC Genexpression in ortsständigen Hautzellen, aber auch in zirkulierenden Immunzellen einschließlich Makrophagen [68, 70, 73-78].

IL-1 erhöht die POMC mRNA Spiegel in kultivierten normalen und malignen epidermalen Melanozyten und Keratinozyten [68-70, 73, 74, 79].

In normalen dermalen Fibroblasten erhöht TNF- α die POMC mRNA Spiegel während TGF- β im gleichen Zellsystem sowie in Keratinozyten hemmend wirkt. Andererseits zeigt TGF- β auf Fibroblasten in Keloiden keine inhibierende Wirkung [80]. Weder TNF- α noch Endothelin-1 wirken sich auf die POMC Peptidproduktion in Melanozyten und Keratinozyten aus [79].

Ein wichtiger Stimulator der kutanen POMC Genexpression in humanen normalen und malignen Melanozyten und Keratinozyten ist auch das UV-Licht [68-70, 74, 79, 81, 82].

So können im Blut von Menschen, die der Sonne exponiert waren, erhöhte Serumspiegel von α -MSH und ACTH gemessen werden [12, 83].

2.1.6 Effekte von alpha MSH

2.1.6.1 Effekt auf das Pigmentsystem:

Wiederholte parenterale Gaben von supraphysiologischen Dosen α -MSH oder NDP-MSH lösen beim Menschen eine generalisierte Hyperpigmentierung aus. Diese ist an den UV-exponierten Arealen des Körpers besonders betont [84]. ACTH ist für die Hyperpigmentierung beim Morbus Addison bzw. beim Nelson Syndrom verantwortlich [85-88].

Die Effekte beider Neuropeptide werden über den MC1R und die daran gekoppelte Signalkaskade vermittelt. Diese wiederum bewirkt über die Hochregulierung der Tyrosinase und anderer an der Melaninsynthese beteiligter Proteine eine Steigerung der Melaninsynthese sowie den Wechsel von Phäo- zu Eumelaninsynthese [43, 89-91].

Ferner zeigen die Melanocortine, vor allem α -MSH, eine proliferationsfördernde Wirkung auf Melanozyten und sie fördern die Ausbildung von dendritischen Zellausläufern [88, 92, 93].

2.1.6.2 Effekt auf die Epidermis

Humane Keratinozyten exprimieren sowohl das MC1R Gen als auch MSH-Rezeptoren [68, 81, 94-96].

Weitere Studien ergaben, dass α -MSH die Zytokinproduktion in Keratinozyten modulieren kann [68, 82, 97].

2.1.6.3 Effekte auf die Dermis

Humane dermale Fibroblasten stellen ebenfalls ein Ziel für α -MSH dar und exprimieren MC1R [98, 99, 100]. Es gibt Hinweise dafür, dass α -MSH immunmodulatorische bzw. entzündungsregulierende Effekte auf Fibroblasten hat. Außerdem scheint sich α -MSH auf die Synthese und den Abbau von Kollagen auszuwirken [99, 101, 102].

2.1.6.4 Effekte auf das Immunsystem

Die vom POMC abgeleiteten Proteine β -Endorphin, ACTH und α -MSH besitzen ein starkes immunmodulierendes Potential [76, 77, 103-105].

Zellen der Immunantwort, darunter Zellen der monozytischen Linie, sowie Neutrophile, Mastzellen, Endothelzellen und Keratinozyten exprimieren den MC1R.

Bei vaskulären Endothelzellen hemmt α -MSH die Lipopolysacharid(LPS-)induzierte Expression des vaskulären Adhäsionsmoleküls-1 (VCAM-1) und des E-Selektins [106].

Auf molekularer Ebene blockiert α -MSH die TNF- α , IL-1 β - oder LPS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in einer Vielzahl von Targetzellen, was die Vielfalt immunmodulierender Effekte von α -MSH erklärt [107].

2.2 Fragestellung

Ziel unserer Arbeit war es:

- Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Reaktionsweise von Melanozyten und Fibroblasten nach Stimulierung mit α -MSH zu untersuchen.
- Die Bedeutung des MC1-Rezeptorpolymorphismus für die Funktionalität des Rezeptors in Melanozyten und Fibroblasten zu evaluieren.
- Die Auswirkung der Rezeptorfunktionalität auf die Physiologie der Zellen, gemessen an ihrem Proliferationsverhalten nachzuweisen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Agarose	Sigma
α -MSH	Sigma
CellTiterBlue	Promega
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Amphotericin B	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
dNTPs	Sigma
Taq-Polymerase	Sigma
L-Glutamin	Sigma
FCS (Fetales Kälberserum)	Promocell
Penicillin/Streptomycin (100x)	Sigma
Poly-Ornithin	Sigma
G418 (Geneticin)	Sigma
Trockenmilch, fettfrei	Sigma
Tween-20	Sigma
Trypsin	Sigma
Trypan Blau	Sigma
TNS (Trypsin neutralisation solution)	Sigma
HPLC H ₂ O	Sigma
Readyreactionmix für die Sequenzierung	Sigma
Ladepuffer für PCR	Sigma
50 Basenpaar Marker, Größenstandard	Sigma
Forskolin	Sigma
EDTA	Sigma

3.1.2 Medien und Puffer

RPMI-1640	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
Melanocyte Growth Medium/Supplement mix	Promocell
Melanocyte Growth Medium/Supplement kit	Promocell
10 X PBS	Sigma

3.1.3 Geräte und Zellkulturplatten

Photometer: Ultrospec 1000
PCR-Gerät: Gene Amp PCR System 240C, Perkin Elmer
Sequenziergerät: ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems
Zentrifugen: Biofuge fresco, Heraeus instruments
Universal-Mikroplattenmessgerät: Genius Pro, Tecan
ELISA Reader: Titertek Multiscan MCC/340

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Isolierung humaner Melanozyten und Fibroblasten

Sowohl Melanozyten, als auch Fibroblasten wurden aus humaner Vorhaut gewonnen. Es handelte sich hierbei um gesunde frische Operationspräparate aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Zur Präparation der Zellen wurde das Hautstück zunächst - mit der Epidermis nach unten - auf einer 10 cm Kulturschale ausgebreitet. Dann wurde mit einem Präparationsbesteck das Subkutangewebe entfernt. Die so gewonnene Kutis (Dermis und Epidermis) wurde in 5 X 5 cm große Stücke geschnitten, in ein 50 ml Falconröhrchen mit 5 ml 10X Trypsin überführt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden die Hautstücke entnommen, auf einer trockenen Zellkulturschale (Epidermis nach unten) hin und her gerollt, sodass die Epidermis auf dieser haften blieb. Auf diese Weise wurde die Dermis von der Epidermis getrennt. Die Epidermis wurde nun von der Unterlage abgelöst und in ein 15 ml Falconröhrchen mit 0,7 mM EDTA in PBS gegeben. Die epidermale Seite der Dermis wurde zusätzlich mit dem Skalpell abgekratzt, um so noch anhaftende Teile basal gelegener epidermaler Anteile abzulösen. Diese Anteile wurden ebenfalls in das Falconröhrchen überführt. Im Anschluss wurde das Gewebegemisch vorsichtig mittels Vortexer homogenisiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, und dann bei 240 x g 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 8 ml Melanocyte growth Medium/Supplement mix aufgenommen und auf zwei 6 cm Zellkulturschalen verteilt. Um das Anwachsen der Zellen zu fördern, wurden 500 µl FCS zugegeben. Anschließend wurde bei 37° C, 5% CO₂ und 95% inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht angewachsene Zellen oder Zelldebris zu entfernen.

3.2.1.2 Etablierung von Melanozyten- und Fibroblastenreinkulturen

Durch oben beschriebenes Protokoll zur Isolierung humaner Hautzellen wurde eine Mischkultur aus Melanozyten und Fibroblasten gewonnen. Um Melanozyten und Fibroblasten in Reinkultur zu erhalten, wurde auf die unterschiedlichen Proliferationseigenschaften der beiden Zelltypen zurückgegriffen.

Um eine Reinkultur von Fibroblasten zu erhalten, wurde das ursprüngliche Medium auf DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin umgestellt.

Um eine Reinkultur von Melanozyten zu erhalten, wurde die Mischkultur für zwei Tage mit 400 ng/ml G418 behandelt und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Absterben der Fibroblasten wurde an den drei folgenden Tagen mikroskopisch kontrolliert und täglich ein Mediumswechsel mit Melanocyte growth Medium/Supplement-Mix durchgeführt. Falls am sechsten Tag noch vitale, adhärenente Fibroblasten mikroskopisch in der Kultur zu beobachten waren, wurde die Behandlung mit Geneticin erneut durchgeführt.

3.2.1.3 Kultivierung der Zelllinien

Für die Kultivierung aller Zelllinien wurden 6 cm und 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Als Kulturmedium diente bei den primären Fibroblasten DMEM. Dem Medium wurde 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin zugegeben. Für die Kultivierung der Melanozyten wurde Melanocyte growth Medium mit Supplement mix (0,4% BPE, 1 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 10 ng/ml Phorbol-Myristat-Acetat) verwendet. Dem Medium wurde zusätzlich 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin B (Stocklösung 0,25 mg/ml) zugesetzt. Alle drei Tage erfolgt ein Mediumwechsel.

Die Fibroblasten wurden bei einer Konfluenz von 95% passagiert. Zum Ablösen der Zellen wurde 1X Trypsin eingesetzt. Das Passagieren der Melanozyten erfolgte bei einer Konfluenz von 75%. Das verwendete 1X Trypsin wurde mit TNS neutralisiert, da das Melanocyte growth Medium kein Serum enthält. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen) kultiviert.

3.2.2 Molekularbiologische Methodik

3.2.2.1 Sequenzierung des Melanocortinrezeptor-Gens

3.2.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Die Isolation der DNA erfolgte mit dem High Pure PCR Preparation Kit von Roche. Die Zellzahl lag zwischen 10⁵ und 10⁶ Zellen pro Ansatz. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

3.2.2.1.2 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung im Photometer, wurden die DNA-Proben 1:50 verdünnt (2 µl DNA mit 98 µl H₂O dest.). Dann wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Dabei gilt für

doppelsträngige DNA: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$, damit ergibt sich die Konzentration X aus $X = \text{gemessene Absorption}_{260} * \text{VF} (=50) * 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Von jeder Probe wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.2.1.3 Amplifikation der spezifischen MC1R DNA durch Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde mit genomischer DNA durchgeführt, da zum einen das MC1R Gen keine Introns enthält, und zum anderen die Polymorphismen auf genomischer Ebene zu finden sind. Die PCR wurde mit den in Tabelle 1 angegebenen Primersequenzen und den entsprechenden Amplifikationsprogrammen durchgeführt. Ein 50 μl Reaktionsansatz enthielt jeweils 1 μl forward und reverse Primer (10 pM), 1 μl dNTPs (10 mM), 0,5 μl TaqPolymerase (5 U/ μl), 5 μl 10X Puffer und 2 μl DNA (50 ng/ μl). Das Reaktionsvolumen wurde mit H₂O auf 50 μl aufgefüllt. Es wurde eine Negativkontrolle mit H₂O anstelle von DNA mitgeführt. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Es wurden 35 Zyklen nach der in Tabelle 1 beschriebenen Bedingungen zur DNA-Amplifikation durchgeführt.

Tabelle 1: Primer und Amplifikationsprogramm

PRIMER	BASENSEQUENZ	AMPLIFIKATIONSPROGRAMM
MC1R P1F	5' - gTgACCggACAgACTgg-3'	2
MC1R P1R	5' - gCCTgCCTCCTTCCATCT-3'	2
MC1R P2F	5' - ggTAgATgCCAggAggTgTC-3'	2
MC1R P2R	5' - ACCAgCAggTCCgACAAg-3'	2
MC1R P3F	5' - TgCACTCACCCATgTACTgC-3'	1
MC1R P3R	5' - CCAgCAgAggAAgAAAATgC-3'	1
MC1R P4F	5' - CgTggTCTTCTTCCCTggCTA-3'	1
MC1R P4R	5' - ggACCAgggAggTAaggAAC-3'	1

AMPLIFIKATIONSPROGRAMM 1		AMPLIFIKATIONSPROGRAMM 2	
95° C	1 Minute	95° C	2 Minuten
94° C	30 Sekunden	94° C	20 Sekunden
55° C	30 Sekunden	65° C	20 Sekunden
72° C	45 Sekunden	72° C	45 Sekunden
72° C	7 Minuten	72° C	10 Minuten
4° C	∞	4° C	∞

Die PCR Produkte wurden auf einem 2%-igen Agarosegel, dem 1 $\mu\text{l/ml}$ Ethidiumbromid beigefügt wurde, aufgetrennt und mit UV Licht bei 366 nm sichtbar gemacht. Dazu wurden 12 μl Probe auf das Gel aufgetragen (5 μl PCR Produkt, 5 μl

H₂O, 2 µl 6xLadepuffer). Parallel dazu wurde ein 50 Basenpaar-Größenstandard aufgetragen.

3.2.2.1.4 Aufreinigung des PCR Produkts

Die Spezifität der PCR-Reaktion wurde mittels Gel-Elektrophorese überprüft. Entweder konnte das PCR Produkt direkt aufgereinigt werden oder es mußte eine Gelextraktion der entsprechenden Bande durchgeführt werden. Dazu wurde entweder der Qiaquick PCR Purification Kit (direkte Aufreinigung) oder der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) eingesetzt. Die beiden Protokolle unterscheiden sich lediglich in der Aufarbeitung der Probe.

Bei der direkten Aufreinigung des PCR Produkts wurde die gesamte PCR-Reaktion eingesetzt. Bei der Gelextraktion wurde das PCR Produkt zunächst auf einem 2,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Bande mit der zu erwartenden Größe wurde unter Sichtkontrolle (UV-Lampe) mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und dann dem Protokoll des Herstellers entsprechend aufgereinigt.

3.2.2.1.5 Sequenzierung des MC1R durch Polymerasekettenreaktion

Für einen 20 µl Sequenzierungsansatz wurden 2 µl ready reaction mix, 3,2 µl Primer (entweder forward oder reverse Primer; (1 pM)), 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (10 ng/µl) verwendet. Der Ansatz wurde mit H₂O (HPLC-gereinigt) auf 20 µl aufgefüllt. Es wurden 25 Amplifikationszyklen nach den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2: Amplifizierungsprogramm für die Sequenzierung

94 °C	5 Sekunden
96 °C	10 Sekunden
50 °C	5 Sekunden
60 °C	4 Minuten
4 °C	∞

3.2.2.1.6 Präzipitation des Sequenzierungsansatzes

Der Sequenzierungsansatz wurde wie folgt gefällt: 20 µl Sequenzierungsansatz, 2 µl NaOAc (3M, pH 4,6) und 50 µl 95% Ethanol wurden kurz gevortext und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Zentrifugationen erfolgten in einer Eppifuge. Dann erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, und das Pellet wurde mit 250 µl Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wiederum

entfernt und das Pellet zunächst bei Raumtemperatur und dann für 1 Minute im Heizblock bei 90°C getrocknet.

Die Ansätze wurden im Sequenzierer des Humangenetischen Instituts der Universität des Saarlandes gemessen und mit dem Softwareprogramm ChromasPro ausgewertet. Die Polymorphismen wurden durch Vergleich mit der Basensequenz der Genbank ermittelt.

3.2.3 Zellbiologische Methodik

3.2.3.1 Messung der Intrazellulären cAMP Konzentration mit Enzymimmunoassay (EIA)

Die Messung der intrazellulären cAMP Konzentration erfolgte mit Hilfe des cAMP Biotrak Enzymimmunoassay (EIA) System der Firma Amersham Biosciences. Die Zellen wurden in dem jeweiligen Kulturmedium in 96-well-Flachbodenplatten ausgesät und für zwei Tage bei Standardbedingungen inkubiert. Die Melanozyten wurden an Tag 1 nach Aussaat auf BPE-freies Medium umgestellt. Es wurde mit Zellkonzentrationen von 5×10^5 Melanozyten/ml und 2×10^4 Fibroblasten/ml gearbeitet. Pro Well wurden 100 µl Zellsuspension eingesetzt. An Tag 3 wurde für 20 Minuten 1 µM α -MSH zugegeben und dem Protokoll folgend die Zellen über Nacht lysiert.

3.2.3.2 Proliferationsexperimente mit dem Celltiter-blue Cell Viability Assay

(Der Universalmikroplattenleser Genios pro wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Hoth, Fachrichtung Physiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, zur Verfügung gestellt)

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät. Es wurde mit Zellkonzentrationen von 1000 Fibroblasten/ml und $1,6 \times 10^4$ Melanozyten/ml gearbeitet. Pro Well wurde 1 ml Zellsuspension eingesetzt. Die Melanozyten wurden zunächst bei Standardbedingungen für 2 Tage inkubiert, bevor sie auf BPE-freies Medium umgestellt wurden. Daraufhin erfolgte die Stimulierung der Zellen mit α -MSH (10^{-6} M). Als Kontrollen wurden Melanozyten bzw. Fibroblasten in dem jeweiligen Kulturmedium mitgeführt. Der Tag der Stimulation mit α -MSH wurde als Tag Null definiert. Weitere Messzeitpunkte waren Tag zwei bei den Melanozyten und Tag zwei sowie vier bei den Fibroblasten.

An den entsprechend definierten Messzeitpunkten wurde die Messung der Proliferation wie folgt durchgeführt:

Das Volumen pro Well wurde auf 500 µl reduziert und es wurde jeweils 100 µl CellTiter-Blue Reagenz zugegeben. Das CellTiter-Blue Reagenz wird von vitalen Zellen aufgenommen, in seine fluoreszierende Form umgewandelt und wieder in das umgebende Medium abgegeben, ohne die Vitalität der Zellen zu beeinträchtigen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Standardbedingungen wurden jeweils 200 µl der Überstände in schwarze 96-Well-Flachbodenplatten überführt und die Fluoreszenz im Universalmikroplattenleser Genios pro gemessen. Die Fluoreszenz, wiedergegeben in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), ist ein Maß für die vorhandene Anzahl vitaler Zellen und aus den gemessenen Werten im Vergleich kann die Proliferation der Zellen ermittelt werden.

3.2.4 Datenanalyse und Statistik

Für die Datenanalyse wurde Excel (Microsoft) und Igor Pro (WaveMetrics) verwendet. Für die Sequenzanalyse wurde das Programm ChromasPro (frei erhältlich) eingesetzt. Die Mittelwerte sind angegeben als Mittelwerte +/- SEM. Es wurden jeweils die relativen Änderungen für die c-AMP-Konzentration und für die Zellproliferation berechnet.

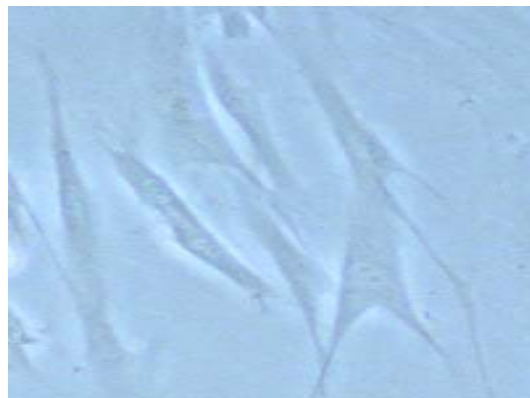
4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Rezeptorfunktion von Melanozyten und Fibroblasten

Melanozyten und Fibroblasten unterscheiden sich morphologisch voneinander, entsprechend der unterschiedlichen physiologischen Funktionen, die sie in der menschlichen Haut erfüllen (Abbildung 1).



Melanozyten



Fibroblasten

Abbildung 1: Lichtmikroskopische Bilder von humanen Melanozyten und Fibroblasten in vitro

Im Folgenden sind zunächst die gepoolten Experimente aller Melanozytenlinien bzw. Fibroblastenlinien dargestellt um einen Vergleich zwischen den beiden unterschiedlichen Zelltypen zu ermöglichen.

4.1.1 Messung der intrazellulären cAMP Konzentration in Melanozyten und Fibroblasten

Der MC1R ist ein G_s-Protein gekoppelter Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration führt. Somit ist der Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration nach Zugabe eines Rezeptoragonisten ein Maß für die Rezeptorfunktion. Um die Funktionalität des Rezeptors in den einzelnen Zelltypen zu beurteilen, wurden in einem ELISA-System die Änderungen der intrazellulären cAMP Konzentration nach Aktivierung des Rezeptors gemessen.

4.1.1.1 cAMP Konzentration in Melanozyten

Melanozyten zeigen mit 44% einen signifikanten cAMP Anstieg nach Stimultaion mit α -MSH ($p=0,01$) (Abbildung 2).

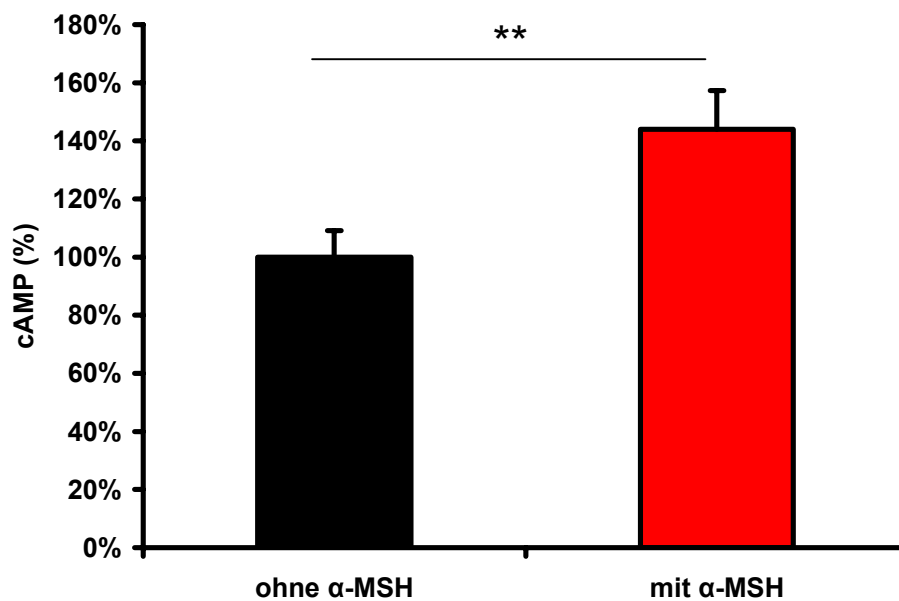


Abbildung 2: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Melanozyten. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=20$, $p=0,01$, Fehlerindikator=standard error of mean)

4.1.1.2 cAMP Konzentration in Fibroblasten

Die Fibroblasten reagieren im ungestressten Zustand kaum auf die Stimulation mit α -MSH. Es ist eine Verminderung der zellulären cAMP Konzentration um 11% ablesbar ($p=0,2$) (Abbildung 3).

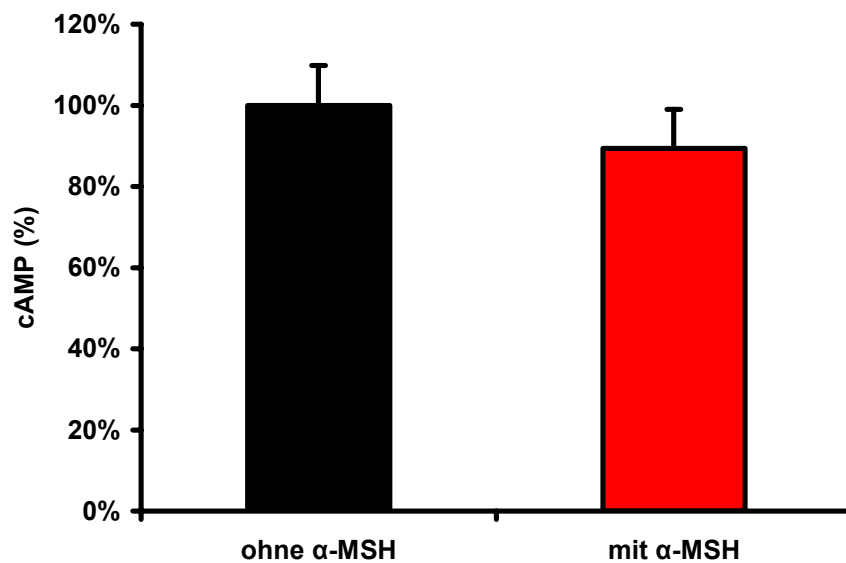


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Fibroblasten. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle und der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=0,2$, Fehlerindikator=standard error of mean)

4.1.2 Proliferationsexperimente

Um zu beobachten, welchen Einfluss die Aktivierung des MC1R mit dem Rezeptoragonisten α -MSH auf das Wachstumsverhalten der Melanozyten bzw. Fibroblasten hat, wurden Proliferationsexperimente durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde als Kontrolle in α -MSH freiem Medium kultiviert, während ein anderer Teil der Zellen mit dem Rezeptoragonisten α -MSH (10^{-6} M) behandelt wurde.

Als Messzeitpunkte wurden jeweils Tag 0 und Tag 2 bei den Melanozyten bzw. Tag 0, Tag 2 und Tag 4 bei den Fibroblasten festgelegt, wobei Tag 0 durch die Zugabe des Rezeptoragonisten α -MSH definiert wurde.

Der zusätzliche Messzeitpunkt Tag 4 bei den Fibroblasten sollte dazu dienen, Veränderungen des Proliferationsverhaltens trotz der geringeren Funktion des Rezeptors (siehe cAMP ELISA) deutlicher aufzuzeigen.

4.1.2.1 Proliferation Melanozyten

Bei den Melanozyten (Abbildung 4) zeigen die Kontrollzellen von Tag 0 auf Tag 2 einen Zuwachs von 42%. Die mit α -MSH behandelten Melanozyten zeigen einen Zuwachs von 64%. Somit bewirkt die Stimulation der Zellen mit dem MC1R Agonisten eine signifikante Proliferationssteigerung um 22% ($p=1,2 \times 10^{-28}$).

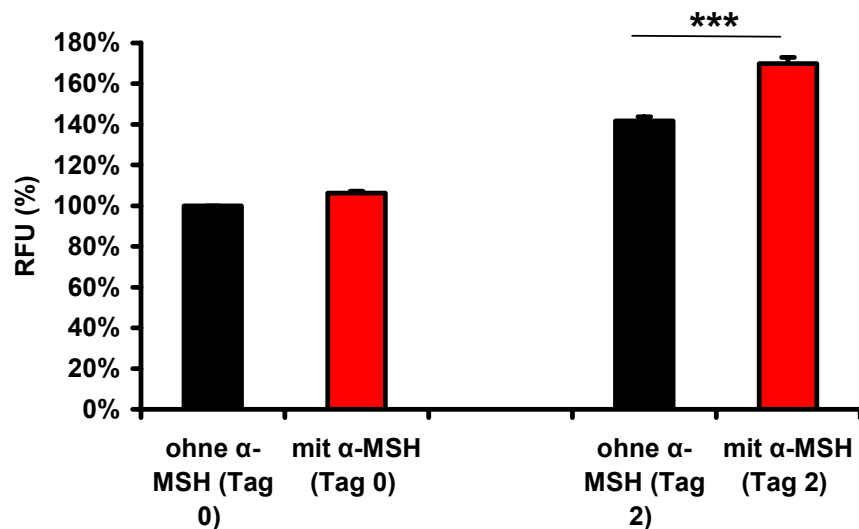


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus allen Proliferationsexperimenten der Melanozyten. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurde Tag null (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M) und Tag zwei gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag null wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=78$, $p=1,2 \times 10^{-28}$, Fehlerindikator=standard error of mean)

4.1.2.2 Proliferation Fibroblasten

Die Kontrollzellen der Fibroblasten zeigen von Tag 0 bis Tag 2 einen Zuwachs von 128%. Vergleicht man das Wachstum der Zellen von Tag 0 mit Tag 4 zeigt sich ein Zuwachs von 401%. Die mit α -MSH behandelten Fibroblasten wachsen von Tag 0 bis Tag 2 um 119%. Von Tag 0 bis Tag 4 zeigt sich eine Proliferation um 383%. Somit lässt sich ablesen, dass die mit dem Rezeptoragonisten behandelten Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Von Tag 0 bis Tag 2 zeigen die mit α -MSH stimulierten Zellen eine Wachstumsreduktion um 9% ($p=1,03 \times 10^{-5}$). Der Effekt zeigt sich mit 18% ($p=4,5 \times 10^{-6}$) deutlicher im Messintervall Tag 0 bis Tag 4 (Abbildung 5).

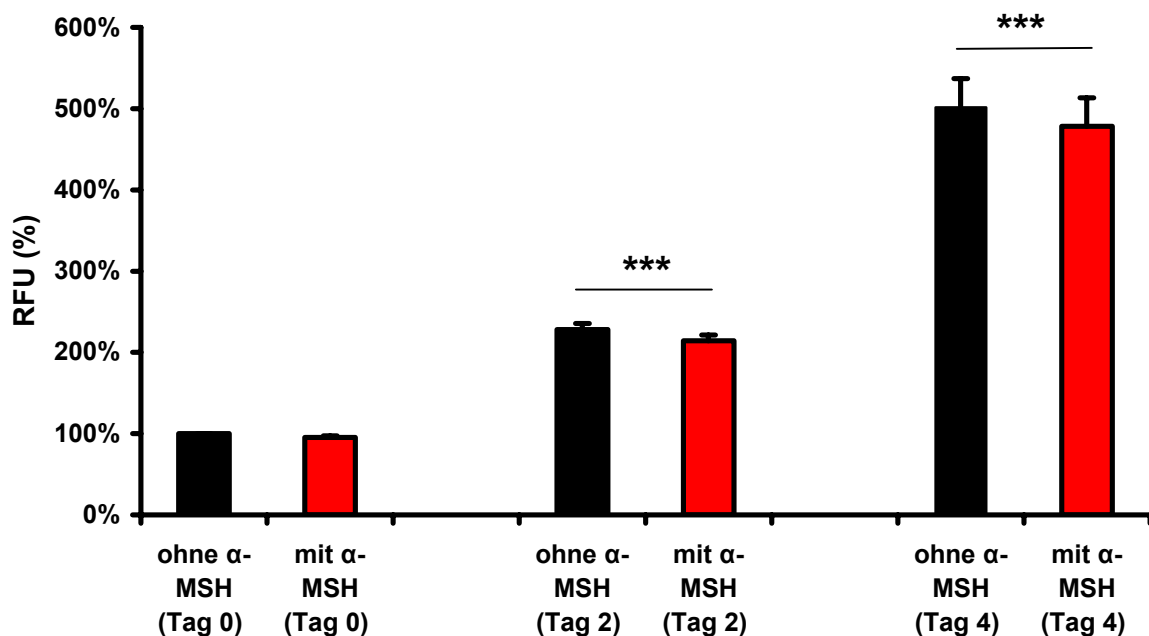


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus allen Proliferationsexperimenten der Fibroblasten. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurde Tag null (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M), Tag zwei und Tag vier gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag null wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=78$, $p=1,03 \times 10^{-5}$ (d2), $p=4,5 \times 10^{-6}$ (d4), Fehlerindikator = standard error of mean)

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Melanozyten durch die Stimulation mit α -MSH in ihrer Proliferation gefördert werden, während die Behandlung der Fibroblasten mit dem MC1R Agonisten zu einer Wachstumshemmung führt.

4.2 Einfluss von Polymorphismen im MC1R auf die Reaktionsweise von Melanozyten und Fibroblasten

Aus den zuvor beschriebenen Daten ist zu ersehen, dass das MC1R System Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Melanozyten und Fibroblasten nimmt. Der Effekt ist je nach Zelltyp unterschiedlich.

Da der MC1R außerordentlich polymorph ist, wird in den folgenden Experimenten zunächst der jeweilige Polymorphismus in den Zelllinien der Melanozyten, und Fibroblasten durch Sequenzierungsexperimente charakterisiert. Dann wird im cAMP ELISA untersucht, wie die Zelllinien auf die Stimulierung mit α -MSH reagieren, um so einen Zusammenhang zwischen Rezeptorpolymorphismus und Funktion in der jeweiligen Zelllinie herzustellen. Hierbei wird auch darauf geachtet, inwieweit der Zelltyp die Korrelation zwischen Polymorphismus und Funktion beeinflusst. Anschließend wird in den Proliferationsexperimenten überprüft, wie sich Rezeptorpolymorphismus und Rezeptorfunktion auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien auswirken und welche Rolle hierbei die Zellart spielt. Hierbei wird als Ausgangsgröße das Wachstum unbehandelter Kontrollzellen ermittelt und in Bezug dazu dann die Einflussnahme des MC1R Systems durch Stimulation mit α -MSH gemessen.

4.2.1 Sequenzierung des MC1R

4.2.1.1 Auswahl der Primer in der regulatorischen Region des MC1R und PCR

Für die Sequenzierung des MC1R wurden Primer gewählt, die sowohl in der regulatorischen als auch codierenden Region des MC1R liegen.

Als Ausgangsmaterial für die Sequenzierung wurde eine PCR mit den Primerpaaren 1-4 zur Amplifizierung des MC1R Gens durchgeführt. Als Substrat wurde die genomische DNA der jeweiligen Zelllinien eingesetzt. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte zusammen mit einem 50 bp Stepladder auf ein Agarosegel aufgetragen und im UV-Licht sichtbar gemacht (Abbildung 6).

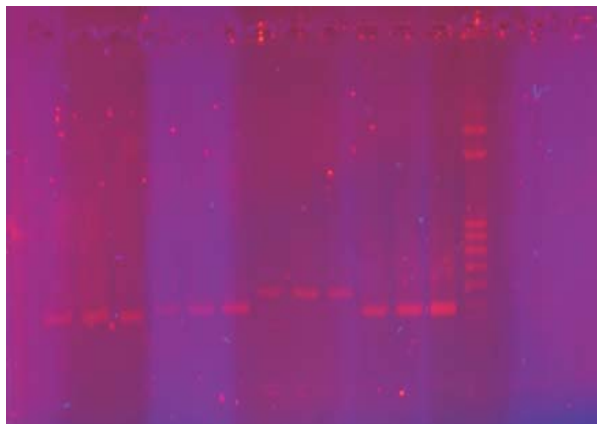


Abbildung 6: Agarosegel im UV-Licht mit der amplifizierten MC1R DNA

4.2.1.2 Aufreinigung der amplifizierten DNA

Um die in der PCR amplifizierten Genabschnitte für die Sequenzierung aufzubereiten, wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Nach der Kontrolle auf dem Agarosegel wurde entschieden, ob eine direkte Aufreinigung oder eine Gel-Extraktion erforderlich ist. War bei der Amplifikation ausschließlich eine Bande entstanden, wurde das PCR-Produkt direkt aufgereinigt. Sofern auf dem Gel mehr als eine Bande sichtbar wurde, erfolgte eine Gelextraktion. Die aufgereinigte DNA wurde wiederum auf einem Agarosegel kontrolliert (Abbildung 7).

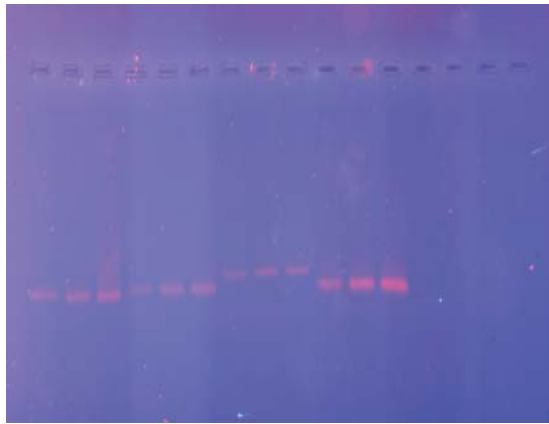


Abbildung 7: Agarosegel im UV-Licht mit dem aufgereinigten PCR-Produkt (MC1R DNA)

4.2.1.3 Sequenzierungs-PCR

Die Polymorphismen werden im Folgenden in Kombination mit der Rezeptorfunktion und dem Effekt auf die Proliferation anhand der Proliferationsversuche näher erörtert. Tabelle 3 gibt einen Überblick über den Zusammenhang zwischen den jeweils ausgetauschten Basen im MC1R-Gen und der Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des MC1R in den einzelnen Zelllinien.

Tabelle 3: In der Tabelle sind die Polymorphismen der jeweiligen Zelllinien zusammengefasst. Aus der Tabelle ist ersichtlich, welche Base in der regulatorischen bzw. codierenden Region im Vergleich zur Wildtyp-Basensequenz verändert und welcher Basenaustausch erfolgt ist, und ob es sich um einen heterozygoten oder homozygoten Basenaustausch handelt. Zusätzlich kann man ersehen, welchen Einfluss der jeweilige Basenaustausch auf die Aminosäuresequenz des jeweiligen Rezeptors nimmt oder ob es sich um eine stumme Mutation handelt.

Melanozytenlinie	Basenaustausch nicht kodierende Region	Basenaustausch kodierende Region	Bezeichnung des Polymorphismus
B-011	152 statt c -> c/t 286 statt a -> g	Base 1583 <u>aca</u> → <u>ac(g/a)</u> As 314 Thr→Stumm	WT
I-014	keine	Base 915 <u>gtg</u> → <u>atg</u> AS 92 Val→Met	V92M
M-012	152 statt c -> c/t 197 statt g -> a/g 416 statt a -> a/t	Base 1583 <u>aca</u> → <u>ac(g/a)</u> As 314 Thr→Stumm	WT
E-013	keine	Base 1066 <u>cgc</u> → <u>c(a/g)c</u> AS 142 Arg→ His Base 1583 <u>aca</u> → <u>acg</u> As 314 Thr→Stumm	R142H

Fibroblastenlinie	Basenaustausch nicht codierende Region	Basenaustausch codierende Region	Bezeichnung des Polymorphismus
H-211	152 statt c -> c/t 197 statt g -> a/g 416 statt a -> a/t	keine	WT
C-212	152 statt c -> c/t 197 statt g -> a/g 416 statt a -> a/t	Base 1129 cga → c(<u>a/g</u>)a AS 163 Arg → Gln	R163Q
K-214	152 statt c -> c/t 197 statt g -> a/g 416 statt a -> a/t	Base 819 gtg → (<u>t/g</u>)tg AS 60 Val → Leu	V60L
D-213	keine	Base 1092 <u>cgc</u> → (<u>t/c</u>)gc AS 151 Arg → Cys	R151C

4.2.2 Zusammenhang zwischen Zelltyp, MC1R Polymorphismus, Rezeptorfunktionalität und Proliferationsverhalten

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Sequenzierung mit den Ergebnissen des cAMP-ELISA, sowie den Proliferationsexperimenten der jeweiligen Zelllinie korreliert werden, um die Einflussnahme der MC1R Polymorphismen auf die Rezeptorfunktion und die Biologie der zwei unterschiedlichen Zelltypen Melanozyten bzw. Fibroblasten darzustellen.

4.2.2.1 Korrelation der Melanozyten

4.2.2.1.1 Melanozytenlinie B-011 (MC1R Wildtyp)

Die Melanozytenlinie **B-011** weist im MC1R-Gen die Wildtyp-Sequenz auf. Die Stimulierung dieser Rezeptorvariante mit α -MSH führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration um 53% ($p=0,034$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 8).

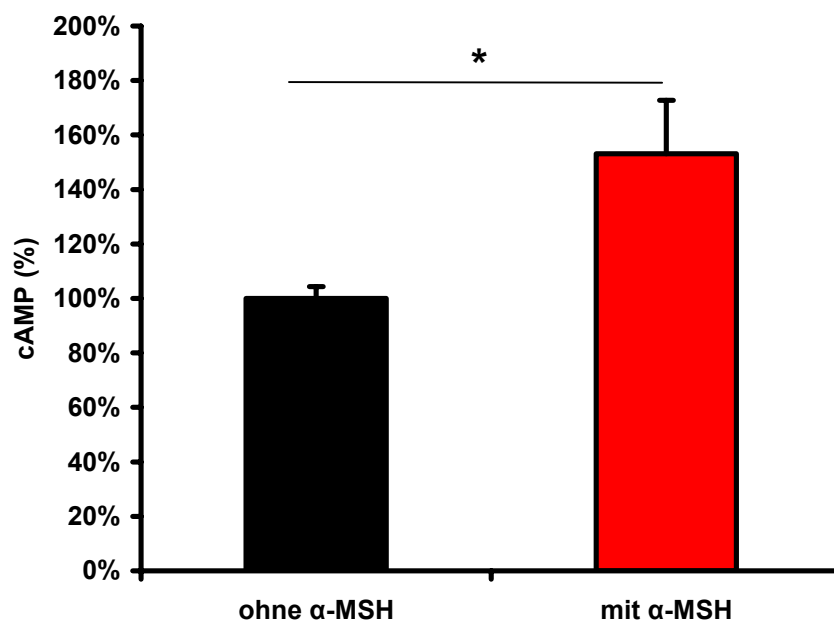


Abbildung 8: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Melanozytenlinie B-011. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=5$, $p=0,034$, Fehlerindikator=standard error of mean).

Betrachtet man das Proliferationsverhalten der Zelllinie, so lässt sich von Tag 0 zu Tag 2 bei den unbehandelten Kontrollzellen ein Zuwachs von 44% verzeichnen. Zellen, die mit α -MSH stimuliert wurden, zeigen einen Zuwachs von 56% von Tag 0 auf Tag 2. Demzufolge bewirkt die Stimulation der Zellen mit α -MSH eine signifikante Wachstumssteigerung um 12% ($p= 4,5 \times 10^{-9}$) (Abbildung 9).

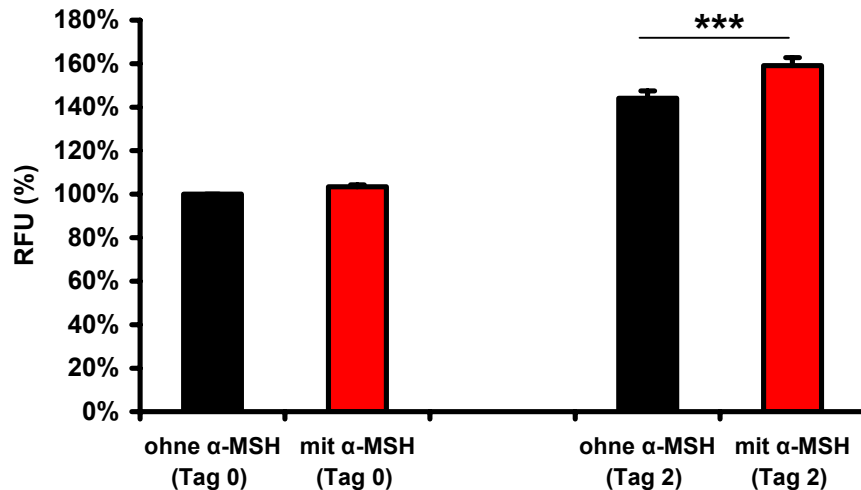


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Melanozytenlinie B-011. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurde Tag 0 (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M) und Tag 2 gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag 0 wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=4,5 \times 10^{-9}$, Fehlerindikator=standard error of mean)

4.2.2.1.2 Melanozytenlinie M-012 (MC1R WT)

Bei der Melanozytenlinie **M-012** ist ebenfalls die Wildtypsequenz im MC1R-Gen zu erkennen.

Diese Zelllinie zeichnet sich ebenfalls durch einen Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration um 48% ($p=0,012$) nach Inkubation mit dem Agonisten α -MSH aus (Abbildung 10).

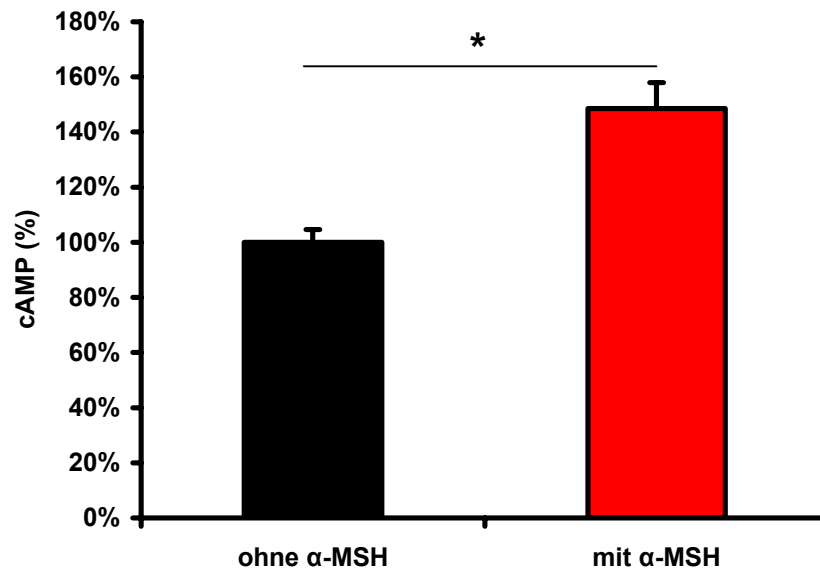


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Melanozytenlinie M-012. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=5$, $p=0,012$, Fehlerindikator=standard error of mean)

Das Proliferationsverhalten der Zelllinie ist durch einen Anstieg von 53% von Tag 0 auf Tag 2 gekennzeichnet. Nach der Zugabe von α -MSH zeigt sich ein Wachstum von 94% von Tag 0 auf Tag 2. Daraus kann man ablesen das die Proliferation durch Zugabe von α -MSH signifikant um 41% gesteigert wird ($p=1,7 \times 10^{-10}$) (Abbildung 11).

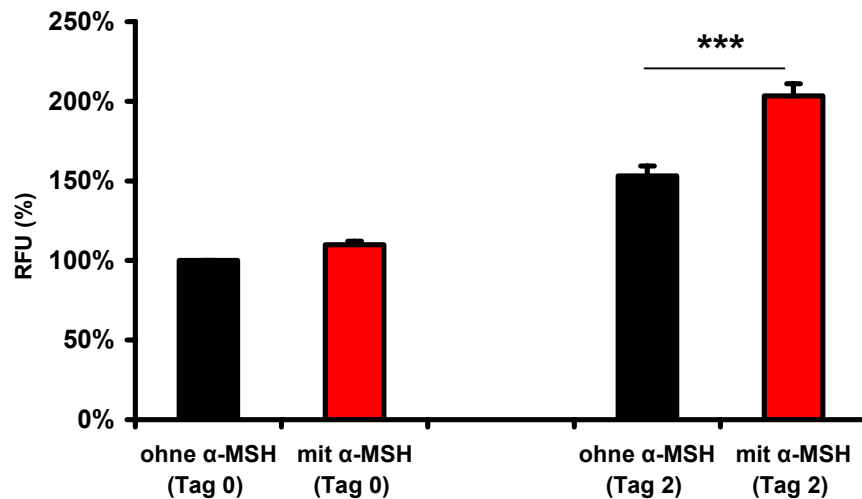


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Melanozytenlinie M-012. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurde Tag 0 (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M) und Tag 2 gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag 0 wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=1,7 \times 10^{-10}$, Fehlerindikator=standard error of mean).

4.2.2.1.3 Melanozytenlinie E-013 (MC1R R142H heterozygot)

Die Melanozytenlinie **E-013** weist einen heterozygoten Polymorphismus an Base 1066 mit dem Ersatz von Guanin durch Adenin auf. Daraus ergibt sich in der Aminosäuresequenz ein partieller Austausch von Arginin durch Histidin an Position 142 (**R142H**). Nach Stimulierung des Rezeptors mit α -MSH kommt es zu einem nicht signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP um 2,5% ($p=0,326$) (Abbildung 12).

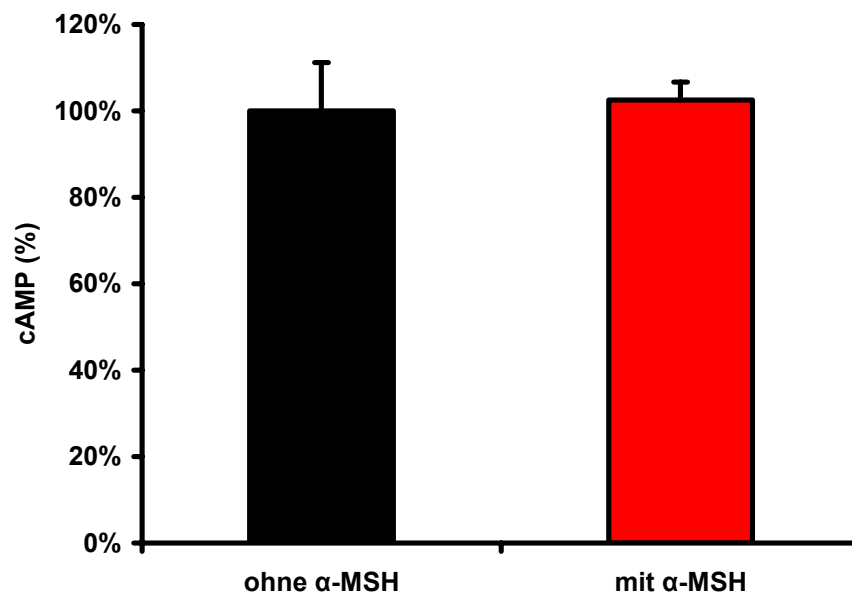


Abbildung 12: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Melanozytenlinie E-013. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=5$, $p=0,326$, Fehlerindikator=standard error of mean).

Das Wachstum dieser Melanozyten liegt von Tag 0 auf Tag 2 gemessen an unbehandelten Zellen bei 37%. Bei Stimulation der Zellen mit α -MSH zeigt sich eine Proliferation von 60%. Demzufolge wird die Wachstumsrate durch die Behandlung mit α -MSH signifikant um 23% gesteigert ($p=2,2 \times 10^{-7}$) (Abbildung 13).

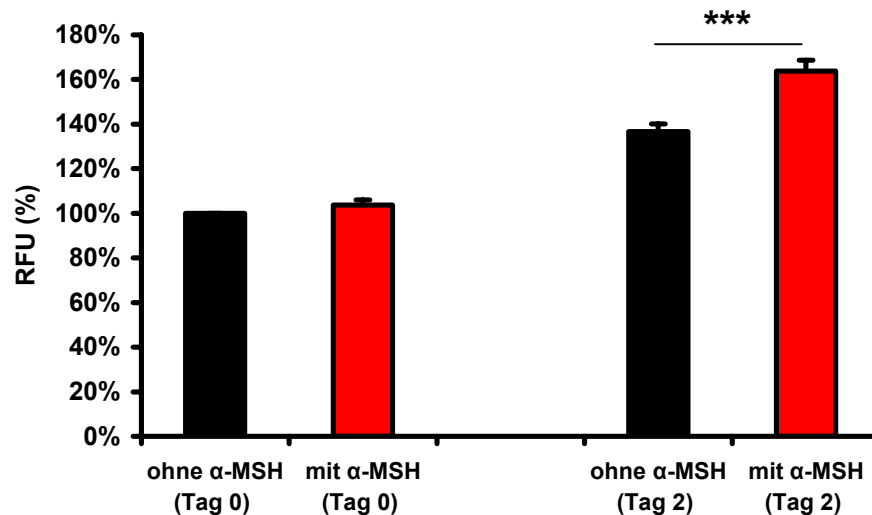


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Melanozytenlinie E-013. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurde Tag 0 (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M) und Tag 2 gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag 0 wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=2,2 \times 10^{-7}$, Fehlerindikator=standard error of mean).

4.2.2.1.4 Melanozytenlinie I-014 (MC1R V92M homozygot)

Die Zelllinie I-014 zeigt in der Basensequenz einen homozygoten Basenaustausch an Base 915 (Guanin durch Adenin). Für die Aminosäuresequenz bedeutet dies den Austausch von Valin durch Methionin an Position 92 (V92M). Diese Zelllinie zeigt einen nicht signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP um 10,5 % ($p=0,32$) nach Behandlung mit α -MSH (Abbildung 14).

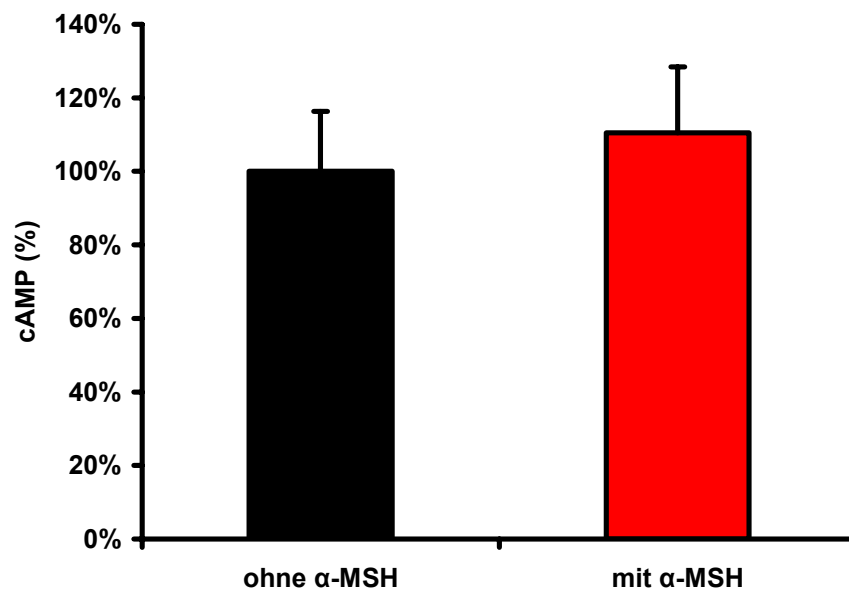


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Melanozytenlinie I-014. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=5$, $p=0,32$, Fehlerindikator=standard error of mean).

Die Proliferation der Zellen steigt von Tag 0 auf Tag 2 um 42% an. Nach Behandlung mit α -MSH erhöht sich die Zuwachsrate signifikant auf 54% von Tag 0 auf Tag 2. Demzufolge steigert sich das Wachstum der Zellen um 12% durch die Behandlung mit dem MC1R Agonist ($p=1,5 \times 10^{-6}$) (Abbildung 15).

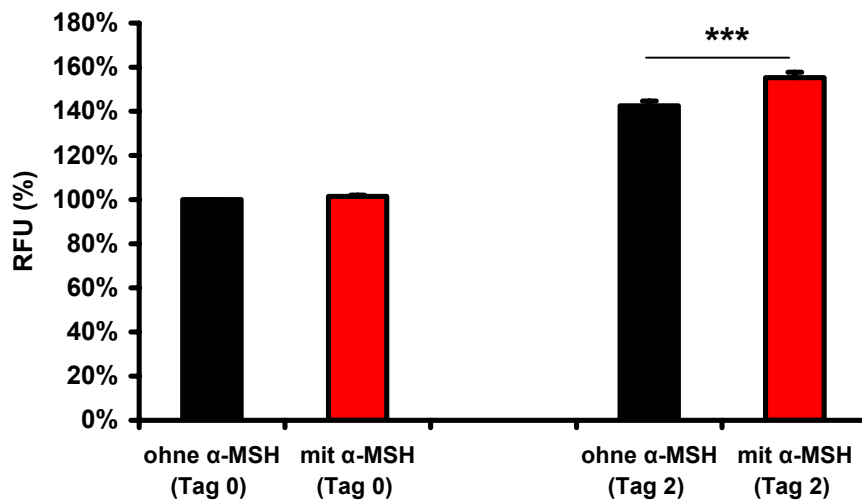


Abbildung 15: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Melanozytenlinie I-014. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurde Tag 0 (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M) und Tag 2 gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag 0 wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=9$, $p=1,5 \times 10^{-6}$, Fehlerindikator=standard error of mean)

4.2.2.2 Korrelation der Fibroblasten:

4.2.2.2.1 Fibroblastenlinie H-211 (MC1R WT)

Bei der Fibroblastenlinie **H-210** findet sich die Wildtyp-Sequenz im MC1R-Gen. Wird diese Fibroblastenlinie mit α -MSH stimuliert, reagiert sie mit einer Reduktion der intrazellulären cAMP Konzentration um 60% ($p=0,007$)(Abbildung 16).

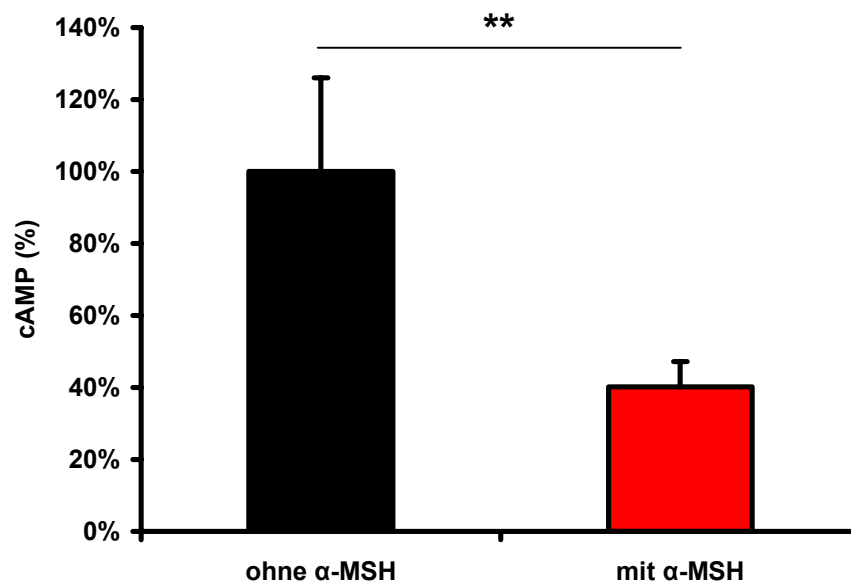


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Fibroblastenlinie H-211. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=3$, $p=0,007$, Fehlerindikator=standard error of mean)

Die Proliferation der Zelllinie gemessen an den Kontrollzellen zeigt von Tag 0 auf Tag 2 einen Anstieg von 179%. Die mit α -MSH behandelten Zellen wachsen von Tag 0 auf Tag 2 um 160%. Daraus ergibt sich eine Wachstumsminderung von 19% nach Stimulation mit α -MSH ($p=2,4 \times 10^{-6}$). Verlängert man das Messintervall von Tag 0 auf Tag 4 zeigt sich bei den Kontrollzellen ein Zuwachs von 483% und bei den stimulierten Zellen ein Zuwachs von 434%. Hier beträgt die Wachstumsminderung 49% durch die Behandlung mit α -MSH ($p=5 \times 10^{-5}$) (Abbildung 17).

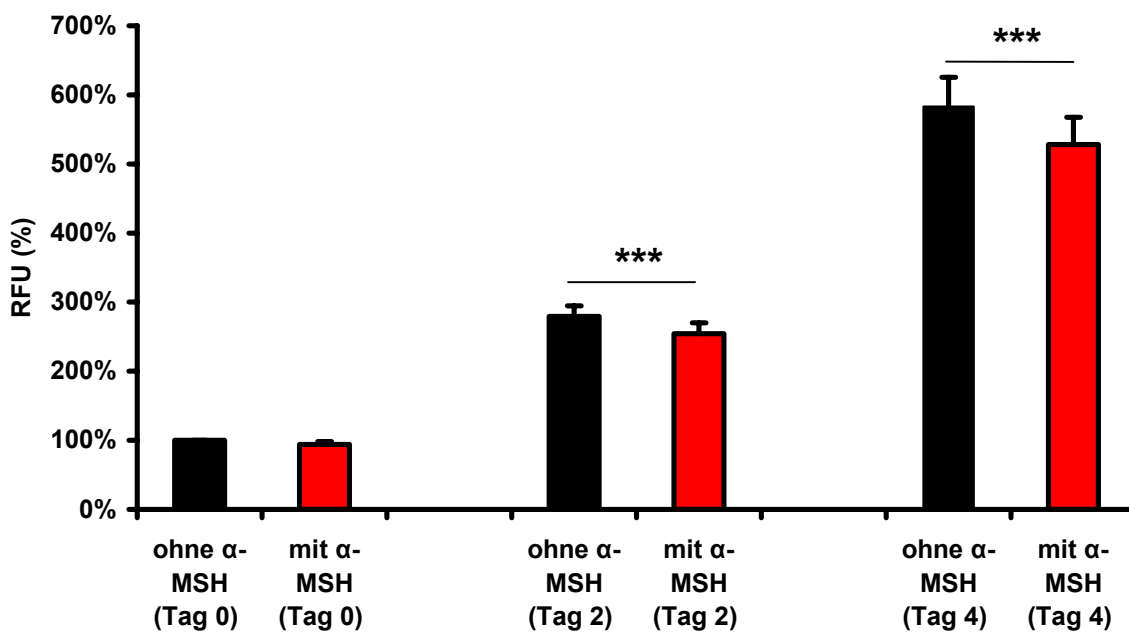


Abbildung 17: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Fibroblastenlinie H-211. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurden Tag 0 (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M), Tag 2 und Tag 4 gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag 0 wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=2,4 \times 10^{-6}$ (d2), $p=5 \times 10^{-5}$ (d4), Fehlerindikator=standard error of mean).

4.2.2.2 Fibroblastenlinie C-212 (MC1R R163Q heterozygot)

Die Fibroblastenlinie **C-212** weist einen heterozygoten Polymorphismus an Base 1129 (Guanin durch Adenin) auf, der auf Aminosäureebene an Position 163 den partiellen Ersatz von Arginin durch Glycin bewirkt (**R163Q**). Der Effekt von α -MSH auf diese Rezeptorvariante zeigt im Trend eine Verminderung des intrazellulären cAMP Spiegels um 26% ($p=0,1$) (Abbildung 18).

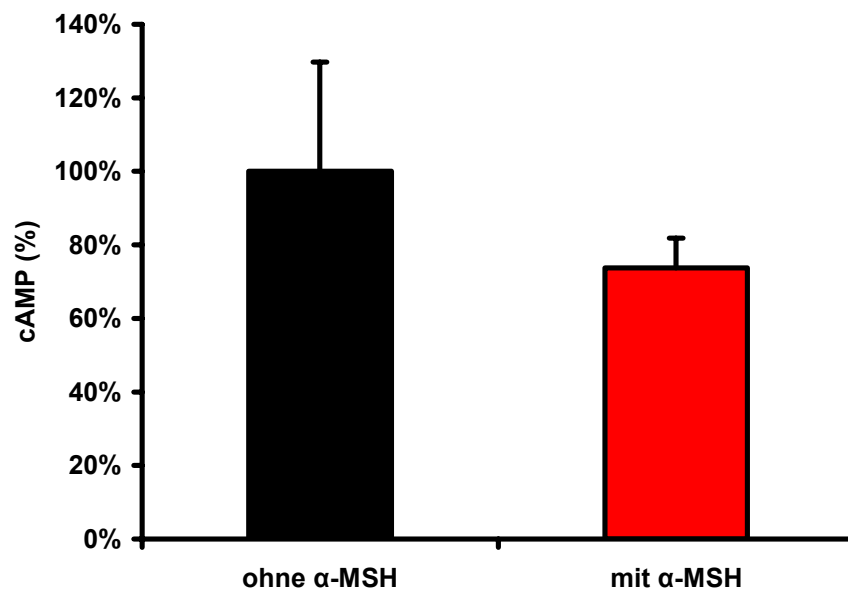


Abbildung 18: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Fibroblastenlinie C-212. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=3$, $p=0,1$, Fehlerindikator=standard error of mean)

Das Wachstum der Kontrollzellen beträgt gemessen von Tag 0 auf Tag 2 89%. Zellen die mit α -MSH behandelt wurden, wachsen um 87%. Durch die Behandlung mit dem MC1R Agonisten zeigt sich demzufolge eine nicht signifikante Proliferationsminderung um 2% ($p=0,09$). Bei verlängertem Messintervall von Tag 0 bis Tag 4 zeigt sich bei den Kontrollzellen ein Wachstum von 720% und bei den behandelten Zellen ein Zuwachs von 712%. Die Proliferationsminderung beträgt hier 8% und ist ebenfalls nicht signifikant ($p=0,06$) (Abbildung 19).

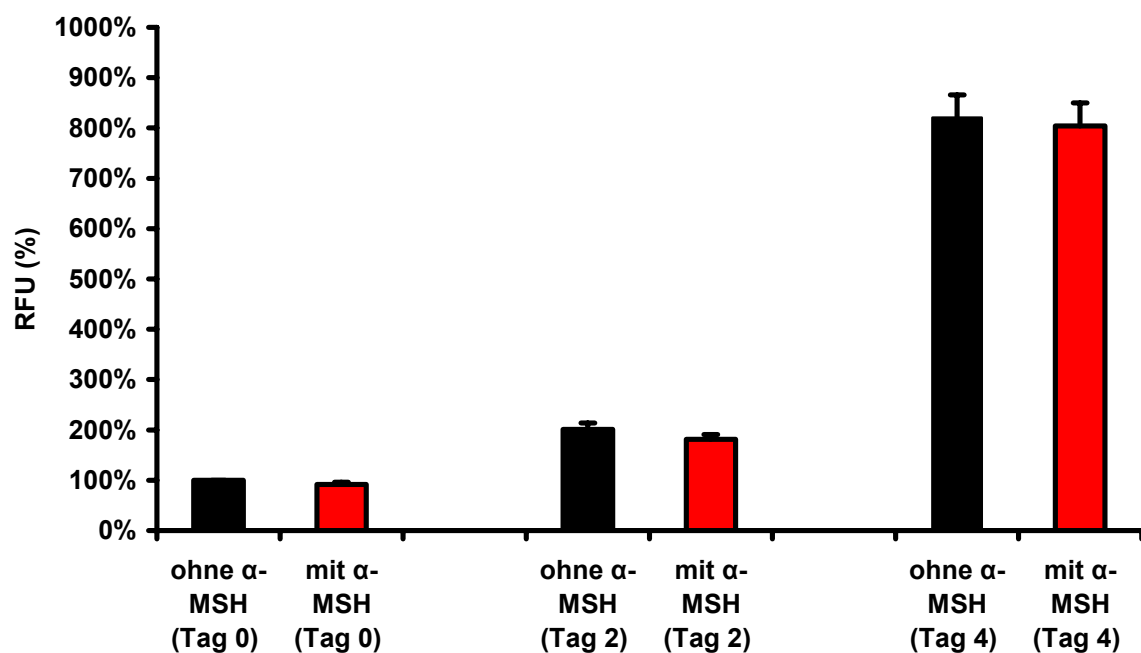


Abbildung 19: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Fibroblastenlinie C-212. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurden Tag 0 (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M), Tag 2 und Tag 4 gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag 0 wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=0,09$ (d2), $p=0,06$ (d4), Fehlerindikator=standard error of mean).

4.2.2.2.3 Fibroblastenlinie D-213 (MC1R R151C heterozygot)

Die Fibroblastenlinie **D-213** zeigt eine Variante des MC1R, die charakterisiert ist durch den heterozygoten Basenaustausch an Position 1092 (Cytosin durch Thymin). In der Aminosäuresequenz spiegelt sich das an Position 151 durch den Austausch von Arginin durch Cystein (**R151C**) wieder. Diese Zelllinie reagiert auf die Zugabe von α -MSH mit einem nicht signifikanten cAMP Anstieg von 0,6% ($p=0,49$) (Abbildung 20).

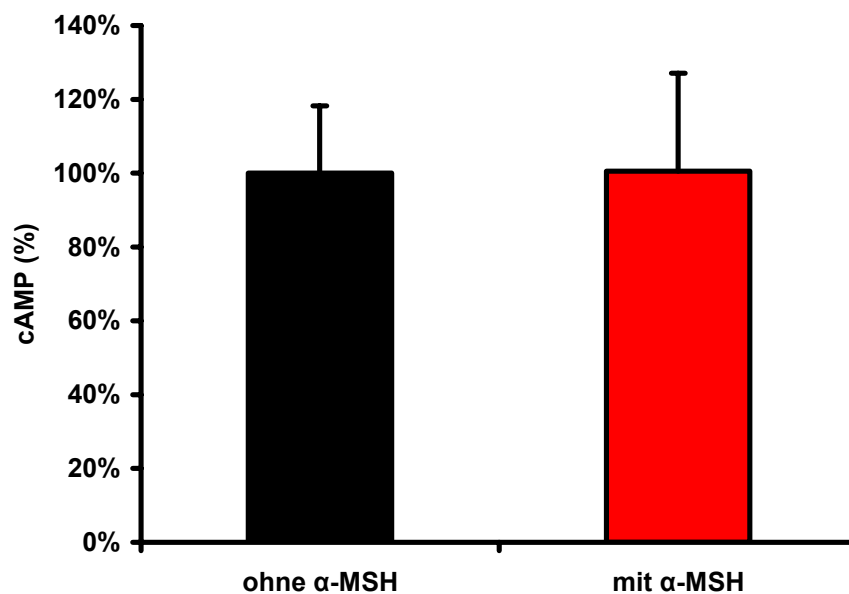


Abbildung 20: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Fibroblastenlinie D-213. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=3$, $p=0,49$, Fehlerindikator=standard error of mean).

Die Proliferation ist gekennzeichnet durch einen Zuwachs von 153% von Tag 0 bis Tag 2 bei den Kontrollzellen und von 150% bei den stimulierten Zellen. Die Wachstumshemmung durch α -MSH liegt demnach bei 3% ($p=0,16$). Im verlängerten Messintervall von Tag 0 bis Tag 4 zeigt sich ein Proliferationszuwachs von 259% bei den unbehandelten Zellen und 253% bei den behandelten Zellen. Hier beträgt die Wachstumshemmung demnach 6% ($p=0,07$). Somit kann kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation der Fibroblastenlinie **D-213** durch α -MSH nachgewiesen werden (Abbildung 21).

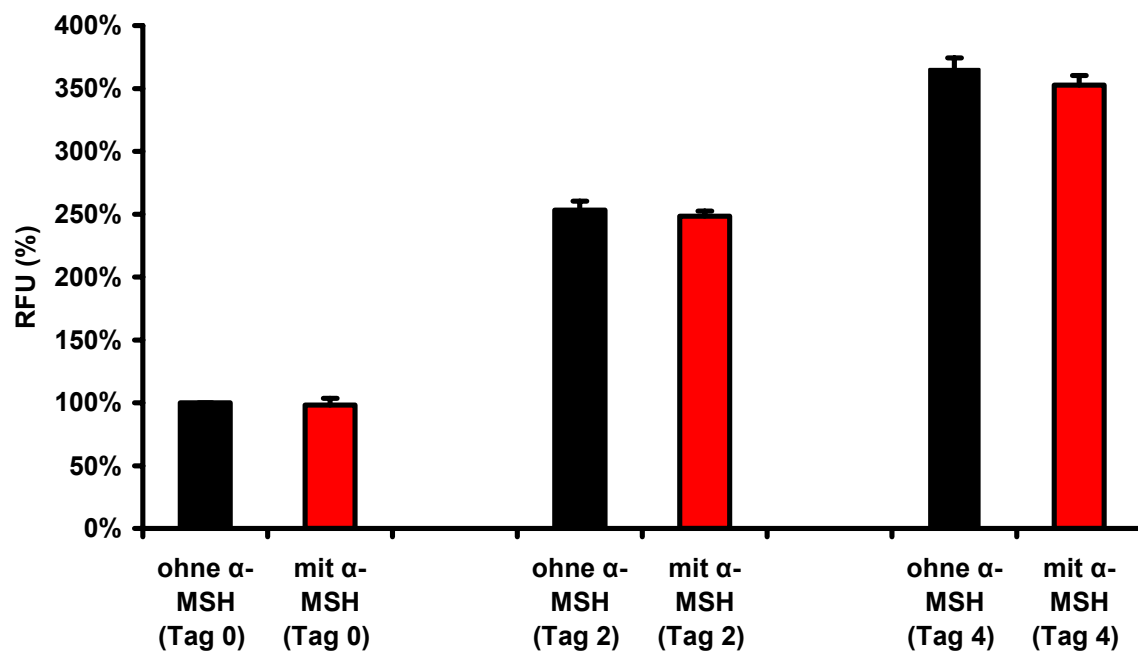


Abbildung 21: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Fibroblastenlinie D-213. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurden Tag null (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M), Tag zwei und Tag vier gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag null wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=0,16$ (d2), $p=0,07$ (d4), Fehlerindikator=standard error of mean).

4.2.2.2.4 Fibroblastenlinie K-214 (MC1R V60L heterozygot)

Die Fibroblastenlinie **K-214** ist in der Basensequenz durch den heterozygoten Austausch von Guanin zu Thymin an Base 819 gekennzeichnet. Für die Abfolge der Aminosäuren bedeutet dies einen partiellen Austausch von Valin zu Leucin an Position 60 (**V60L**). Die Reaktion der Zellen auf die Stimulierung mit α -MSH resultiert in einem Anstieg des intrazellulären cAMP um 26% ($p=0,26$) (Abbildung 22).

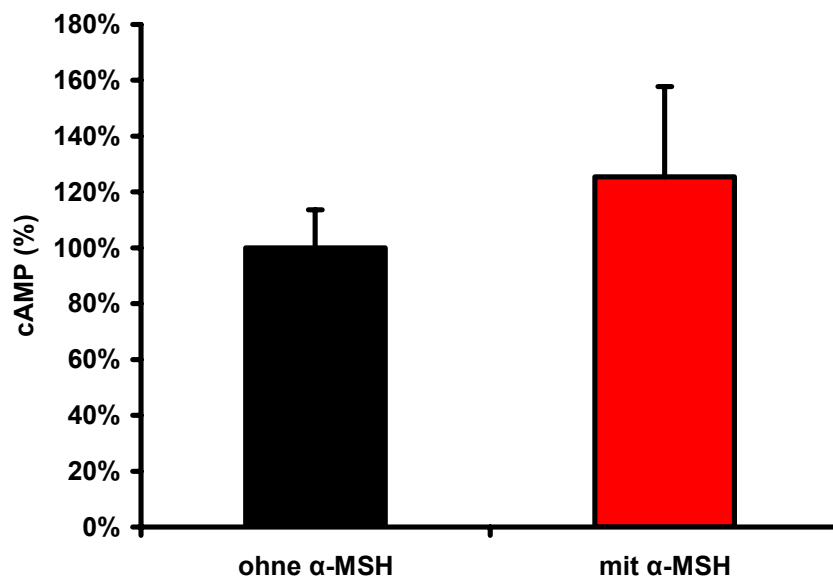


Abbildung 22: Die Abbildung zeigt die intrazelluläre cAMP Konzentration der Fibroblastenlinie K-214. Der schwarze Balken zeigt die unbehandelte Kontrolle, der rote Balken zeigt die Konzentration nach Behandlung mit α -MSH (10^{-6} M) für 20 min. Die Kontrollzellen wurden jeweils als 100% gesetzt und die stimulierten Zellen darauf bezogen, um die Werte von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=3$, $p=0,26$, Fehlerindikator=standard error of mean).

Die Proliferation der Zellen zeigt sich in einem Zuwachs um 79% im Intervall Tag 0 bis Tag 2 bei den Kontrollzellen und 76% bei den mit α -MSH behandelten Zellen. Demnach bewirkt die Behandlung mit α -MSH eine Proliferationshemmung von 3% im Zeitintervall Tag 0 bis 2 ($p=0,06$). Im verlängerten Messintervall von Tag 0 bis Tag 4 zeigt sich bei den Kontrollzellen ein Zuwachs von 137% und bei den stimulierten Zellen ein Wachstum von 131%. Hier liegt die Proliferationshemmung durch α -MSH bei 6% ($p=0,06$). Somit kann kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation der Fibroblastenlinie **K-214** durch α -MSH nachgewiesen werden (Abbildung 23).

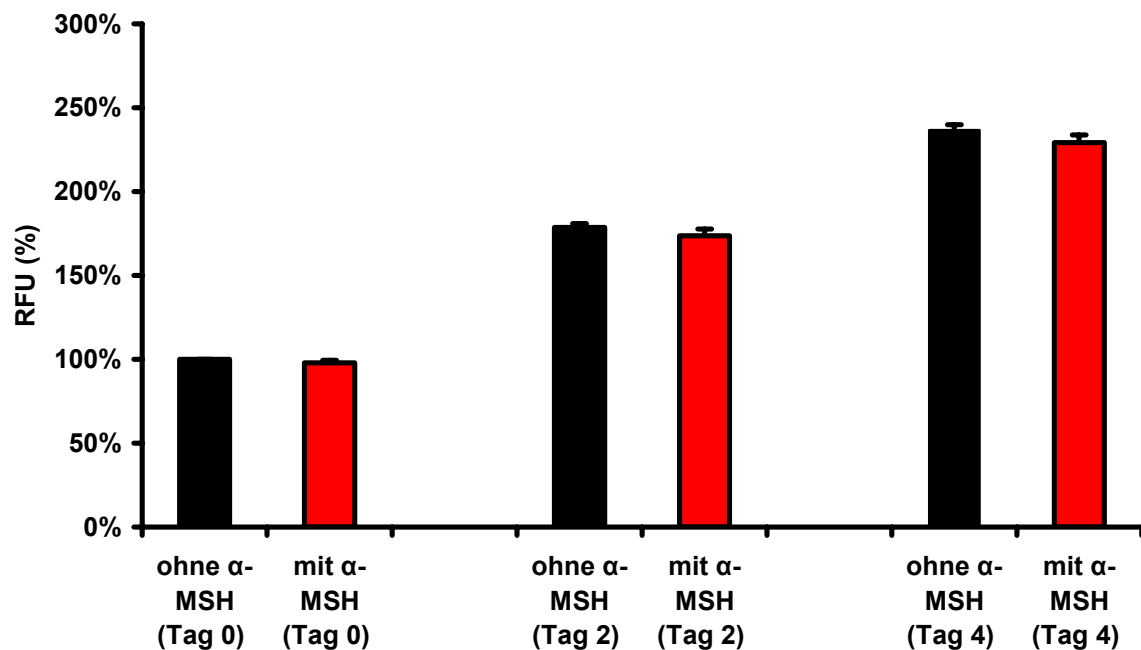


Abbildung 23: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus den Proliferationsexperimenten der Fibroblastenlinie K-214. Die Proliferation der Zellen ist als Änderung der relativen Fluoreszenz erkennbar. Als Messzeitpunkte wurden Tag 0 (Zugabe von α -MSH 10^{-6} M), Tag 2 und Tag 4 gewählt. Die unbehandelten Kontrollzellen an Tag null wurden als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen, um die Ergebnisse von den Zellzahlen unabhängig zu machen. ($n=12$, $p=0,06$ (d2), $p=0,06$ (d4), Fehlerindikator=standard error of mean).

4.3 Zusammenfassung:

Melanozyten und Fibroblasten zeigen in Abhängigkeit vom MC1R Polymorphismus eine unterschiedliche Rezeptorfunktion.

Die Melanozyten mit der MC1R Wildtyp-Gensequenz zeigen einen signifikanten Anstieg in der intrazellulären cAMP Konzentration nach Stimulation mit α -MSH, während Melanozyten mit homo- oder heterozygoten Polymorphismen im MC1R einen deutlich geringeren cAMP Anstieg aufweisen, der zudem nicht signifikant ist. Bei den Fibroblasten zeigt sich im Gegensatz zu den Melanozyten eine signifikante Reduktion des intrazellulären cAMP Spiegels bei der MC1R-Wildtyp-Zelllinie **H-211**. In Bezug auf die Proliferation der Zellen zeigt sich, dass die Melanozyten generell mit einer Wachstumssteigerung auf die Stimulation mit α -MSH reagieren, während sich bei den Fibroblasten eher eine Wachstumshemmung zeigt. Während dieser Effekt bei den Melanozyten trotz eingeschränkter Rezeptorfunktion erhalten bleibt, zeigt sich bei den Fibroblasten lediglich eine signifikante Wachstumsminde rung bei signifikanter Minderung des cAMP Spiegels in der MC1R-Wildtyp-Linie **H-211**. Dieses reziproke Muster ist nach Stimulation der Fibroblasten mit α -MSH in den drei Linien mit heterozygoten Polymorphismen des MC1R (**C-212, D-213, K-214**) jedoch nicht nachweisbar: es zeigen sich keine signifikanten Änderungen weder in den intrazellulären cAMP-Spiegeln, noch im Rahmen der Proliferationsassays.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung des Melanocortin-1 Rezeptors für Melanozyten und Fibroblasten der Haut: Aktuelle Daten

- Das POMC System insbesondere der MC1R und sein Ligand α -MSH spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in der Haut [108-111]. Der MC1R wird auf nahezu allen Zellarten der Haut exprimiert [84, 102]. Ausserdem ist die Haut in der Lage α -MSH zu synthetisieren [84].
- Zunächst standen Untersuchungen an Melanozyten im Vordergrund, da α -MSH durch Bindung an den MC1R und dessen Aktivierung eine Schlüsselrolle im Pigmentsystem der Haut und somit im Schutzsystem gegen UV-Schäden spielt [53]. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dysfunktionalen MC1R Polymorphismen und einem erhöhten Hautkrebsrisiko hergestellt werden.
- Neuere Untersuchungen zeigen, dass der MC1R bzw. α -MSH ebenfalls eine Rolle im kutanen Immunsystem spielen und Fibroblasten in ihrer Funktion beeinflussen können [84, 102]. Daher liegt der Einfluss von α -MSH auf pathologische Prozesse des kutanen Immunsystems und des Kollagenstoffwechsels nahe. Unter anderem scheint α -MSH in dermalen Fibroblasten die TGF- β 1 vermittelte Kollagensynthese zu beeinflussen, indem es durch eine Hochregulation interstitieller Kollagenasen einen antifibrotischen Effekt entfaltet [102]. Im Mausmodell der Sklerodermie reduziert α -MSH die Bleomycin-induzierte Kollagensynthese und die damit verbundene Gewebsfibrose [112]. Ebenso gibt es Hinweise für eine zytoprotektive und antiapoptotische Wirkung von α -MSH auf dermale Fibroblasten [113]. Es wird postuliert, dass die Effekte von α -MSH auch bei Fibroblasten über den MC1R mit nachfolgender Aktivierung der Adenylatcyclase und intrazellulärem cAMP-Anstieg hervorgerufen werden [102].
- Zur Rolle der MC1R Polymorphismen bei Melanozyten liegen umfangreiche Untersuchungen vor [25, 28, 31, 34, 114, 115]. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Varianten, insbesondere Arg142His, Arg151Cys, Arg160Trp und Asp294His mit einem hellen Hauttyp, rotem Haar sowie schlechtem Bräunungsvermögen assoziiert sind. Funktionelle Analysen der unterschiedlichen Rezeptorvarianten zeigten eine eingeschränkte Rezeptorfunktion abhängig von den Polymorphismen [34, 53]. Es konnte aufgezeigt werden, dass eine eingeschränkte

MC1R Rezeptorfunktion nicht nur die Pigmentierung beeinflusst, sondern auch DNA-Reparatur und Apoptose und dadurch ein erhöhtes Hautkrebsrisiko bedingt [53].

- Welche Rolle die MC1R Polymorphismen in der Funktion der Fibroblasten spielen wurde bisher nicht untersucht.

In unserer aktuellen Studie wollten wir den Einfluss von MC1R Polymorphismen auf die Rezeptorfunktionalität und die Physiologie der Fibroblasten untersuchen und diese den bereits besser untersuchten Melanozyten gegenüberstellen. Ziel unserer Untersuchung war es, Hinweise zu erhalten, ob die Polymorphismen des MC1R nicht nur eine Bedeutung für die individuelle Pigmentierung haben, sondern ob sie sich auch auf physiologische bzw. pathologische Prozesse die Fibroblasten betreffend auswirken könnten. Dies wäre für die Entwicklung von Hypothesen zur Pathophysiologie und für therapeutische Ansätze beispielsweise im Rahmen von Wundheilung, Keloidbildung oder fibrosierenden Dermatosen interessant.

5.2 Reaktion der Fibroblasten und Melanozyten auf die Stimulation mit α -MSH im Vergleich

Zunächst haben wir untersucht, ob sich Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zweier unterschiedlicher Zellarten – Melanozyten und Fibroblasten – auf die Behandlung mit α -MSH aufzeigen lassen.

α -MSH aktiviert den MC1R und es kommt cAMP-vermittelt zur Induktion einer komplexen Signalkaskade, die unter anderem in die Aktivierung des MITF Transkriptionsfaktors mündet. MITF setzt wiederum die Transkription bestimmter Gene in Gang, die unter anderem für die Pigmentierung (Tyrosinase), Proliferation von Melanozyten (z. B. Tyrosinase related peptides) oder den Kollagenstoffwechsel von Bedeutung sind [51].

Wir konnten mit unseren Untersuchungen bestätigen, dass die Behandlung von **Melanozyten** mit α -MSH über den MC1R zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration führt und dass Melanozyten durch die Zugabe von α -MSH eine Stimulation der Proliferation erfahren [89, 90].

Im Gegensatz dazu ist die Änderung der intrazellulären cAMP Konzentration nach Stimulation mit α -MSH bei den **Fibroblasten** nicht signifikant. Unsere Untersuchungen zeigen insgesamt eine Tendenz zur Verminderung der intrazellulären cAMP Konzentration. Dieses mehrfach, im Rahmen der

Polymorphismen-Analyse, reproduzierte Ergebnis steht im Gegensatz zu bisher publizierten Daten, insbesondere von Böhm et al. [102].

Desweiteren konnten wir nachweisen, dass die Behandlung mit α -MSH eine signifikante Wachstumshemmung bei Fibroblasten bewirkt.

Dies war bisher noch nicht bekannt und könnte mit den bereits untersuchten antifibrotischen Eigenschaften von α -MSH zusammenhängen [102].

5.3 Einfluss der MC1R Polymorphismen auf das Reaktionsverhalten von Melanozyten und Fibroblasten

5.3.1 Ergebnisse der Sequenzierung

Im nächsten Schritt wurde die Rolle der MC1R Polymorphismen untersucht. Während über den Einfluss der MC1R Polymorphismen auf die Biologie der Melanozyten Daten vorliegen [34, 53], ist die Rolle der Varianten in der Rezeptorfunktionalität anderer Zelltypen der Haut wie den Fibroblasten bisher unbekannt.

Die genetische Sequenzierung von 4 Melanozytenlinien, sowie 4 Fibroblastenlinien bestätigte die ausgeprägte Polymorphität des MC1R Gens. Bei den Melanozyten wiesen zwei Zelllinien die Wildtypsequenz auf. Bei den Fibroblasten konnte ebenfalls eine Wildtypsequenz nachgewiesen werden. Ferner zeigten zwei melanozytäre Linien, sowie drei Fibroblastenlinien einen Polymorphismus im MC1R-Gen. Diese konnten bei den Melanozyten als R142H (heterozygot) und V92M (homozygot) und bei den Fibroblasten als R163Q, V60L sowie R151C (jeweils heterozygot) identifiziert werden.

Diese Allele sind statistisch teilweise stark (R151C) [30], teils schwächer (V60L, V92M, R163Q) [30] mit dem RHC-Phänotyp assoziiert, wobei für den R142H Polymorphismus statistische Daten fehlen.

5.3.2 Ergebnisse des cAMP-ELISA

Um die Auswirkung der identifizierten Polymorphismen auf die Rezeptorfunktionalität zu prüfen, bestimmten wir die intrazellulären cAMP Spiegel ohne und nach Stimulation durch α -MSH. Unsere Ergebnisse belegen, dass die Zellen, die die Wildtypsequenz aufweisen, mit einer signifikanten Änderung der cAMP Konzentration nach Zugabe von α -MSH reagieren. Die **Melanozyten** weisen nach Stimulation einen signifikanten Anstieg des intrazellulären cAMP Spiegels auf. Demgegenüber zeigt

sich bei der **Fibroblastenlinie** mit der MC1R-Wildtypsequenz eine signifikante Reduktion der cAMP Konzentration nach Zugabe von α -MSH.

Die **Melanozyten**, die einen MC1R Polymorphismus aufweisen, zeigten eine deutlich geringere, nicht-signifikante Reaktion auf α -MSH mit einem abgeschwächten intrazellulären cAMP Anstieg. Dabei war für die beiden unterschiedlichen Polymorphismen (*R142H heterozygot*, *V92M homozygot*) kein Unterschied erkennbar. Dies könnte durch einen Gen-Dosis-Effekt bedingt sein, da es sich beim V92M um ein schwaches RHC Allel handelt, wobei der R142H Polymorphismus bisher nicht ausreichend charakterisiert ist [30].

Bei den **Fibroblasten** mit einem MC1R Polymorphismus (alle heterozygot) ist die Reaktion auf α -MSH ebenfalls deutlich schwächer ausgeprägt. Allerdings scheint die Reaktionsweise hier heterogener. Während R163Q eine Tendenz zur Reduktion der cAMP Konzentration zeigt, bedingt R151C kaum eine Reaktion bzw. eine minimale Steigerungstendenz. V60L zeigt ebenfalls keine signifikante Änderung der cAMP Konzentration, hier ist die Steigerungstendenz der intrazellulären cAMP Konzentration aber deutlicher ausgeprägt. Insgesamt ist aber festzustellen, dass der Effekt von α -MSH, der in Wildtyp-Fibroblasten (signifikanter Abfall des cAMP Spiegels) zu beobachten ist, in Fibroblasten mit einem MC1R Polymorphismus teilweise bzw. vollständig aufgehoben wird. Diese Effekte lassen sich bei den Fibroblasten in unserer Untersuchung nicht mit der Stärke des RHC-Allels, wie bei den Melanozyten beschrieben, korrelieren.

Unsere Ergebnisse für die **Melanozyten** in Bezug auf die unterschiedliche Rezeptorfunktionalität in Abhängigkeit des MC1R Polymorphismus entsprechen den publizierten Daten [34].

Bezüglich der **Fibroblasten** stehen unsere Ergebnisse im Gegensatz zu dem von Böhm et al. 2004 postuliertem intrazellulärem cAMP Anstieg in Fibroblasten nach Behandlung mit α -MSH [102]. Signifikant ist dieser Gegensatz bei der Zelllinie mit der Wildtypsequenz. Dieser Effekt relativiert sich in den anderen Fibroblasten, die einen Polymorphismus im MC1R-Gen aufweisen. Es zeigt sich wie auch bei Böhm et al. eine Steigerungstendenz der intrazellulären cAMP Konzentration, jedoch in keinem Fall ein signifikanter Anstieg.

Unsere Ergebnisse geben also deutliche Hinweise darauf, dass die MC1R Polymorphismen in Fibroblasten, ebenso wie in Melanozyten, eine Auswirkung auf die Rezeptorfunktionalität haben und dass sich die Funktionsweise des MC1R in

Abhängigkeit vom Zelltyp grundlegend unterscheidet. Über welche Mechanismen die zelltypspezifische Rezeptorfunktionalität vermittelt wird ist bisher noch nicht untersucht. Mögliche Ansatzpunkte für eine Erklärung könnten in der intrinsischen Aktivität des MC1-Rezeptors und in dessen Regulierungsmechanismen (Rezeptorphosphorylierung, -internalisierung und Abbau/Recycling) liegen.

5.3.3 Ergebnisse aus den Proliferationsversuchen:

In einem nächsten Schritt wird die Auswirkung der MC1R Polymorphismen auf die Physiologie der Zellen untersucht. Daß α -MSH über den MC1R mitogen und melanogen auf Melanozyten wirkt, wurde beschrieben [90]. Ebenfalls ist bekannt, dass α -MSH sich auf die Kollagensynthese in Fibroblasten auswirkt [102]. Die Auswirkung von α -MSH auf die Proliferation von Fibroblasten wurde bislang jedoch nicht untersucht.

Die Proliferation ist ein weiterer Parameter, um die Physiologie zweier Zellarten mit unterschiedlichen Funktionen und unterschiedlicher Spezialisierung zu vergleichen.

Scott et al. postulierte eine Abhängigkeit der Proliferation vom MC1R Polymorphismus bei Stimulation mit α -MSH. Die Arbeitsgruppe zeigte auf, dass sowohl die Wildtyp-Melanozyten als auch die **Melanozyten** mit einem MC1R-Polymorphismus mit einer dosisabhängigen Proliferationssteigerung auf die Stimulation mit α -MSH in unterschiedlichen Konzentrationen reagieren. Der Proliferationsanstieg ließ sich allerdings nicht immer direkt mit der Rezeptorfunktionalität korrelieren [34].

Wir untersuchten in unseren Experimenten die Rolle der MC1R Polymorphismen auf die Proliferation der **Fibroblasten** im Vergleich zu Melanozyten.

Bei den **Melanozyten** zeigen die Proliferationsexperimente, dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Polymorphismen mit der jeweiligen Auswirkung auf die Rezeptorfunktion bzw. die Proliferationssteigerung besteht. Beide Zelllinien mit der Wildtypsequenz reagieren mit einer nahezu identischen Steigerung der intrazellulären cAMP Konzentration nach Stimulation mit α -MSH. Dies spricht für eine nahezu identische Rezeptorfunktionalität. Dies spiegelt sich bei beiden MC1R Wildtypmelanozyten in einer signifikanten Proliferationssteigerung wider. Allerdings zeigen die Zelllinien mit den heterozygoten Polymorphismen R142H und dem homozygoten Polymorphismus V92M ebenfalls eine signifikante Proliferationssteigerung, obwohl die Rezeptorfunktionalität (cAMP) bedeutend

eingeschränkt ist. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Scott [34].

Es läßt sich also folgern, dass bereits eine geringe Aktivierung des MC1R einen Stimulus für die Proliferation darstellt. Allerdings spielen bei der Proliferation sicherlich weitere Faktoren eine Rolle, sodass der durch die Rezeptoraktivierung gesetzte mitogene Stimulus in den unterschiedlichen Zelllinien individuell umgesetzt wird, beispielsweise bedingt durch individuelle Unterschiede in der Transkription verschiedenster an der Proliferation beteiligter Gene bzw. der Translation der entsprechenden Proteine.

Bei den **Fibroblasten** konnten wir erstmals zeigen, dass die Aktivierung des MC1R zu einer Proliferationshemmung führt. In Bezug auf die Funktionalität des Rezeptors zeigte sich ein heterogenes Aktivierungsmuster abhängig von den jeweiligen Polymorphismen. Wir konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass der Rezeptor mit der stärksten cAMP-Änderung (Wildtyp) mit der stärksten Wachstumshemmung assoziiert ist. Die Zelllinien die heterozygote Polymorphismen aufweisen reagierten ebenfalls mit einer, wenngleich schwächer ausgeprägten Tendenz zur Wachstumshemmung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des MC1R in Fibroblasten im Gegensatz zu Melanozyten keine promitogene Wirkung entfaltet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Stimulation des MC1R auf unterschiedlichen Zellarten unterschiedliche, an die spezielle Funktion der Zelle adaptierte Signalwege aktiviert, um so einen funktionellen Synergismus bzw. Antagonismus physiologischer Prozesse zu bewirken. Allerdings zeigt sich in den Fibroblasten, dass der Effekt von α -MSH auf die Proliferation eine stärkere Änderung der intrazellulären cAMP Spiegel erfordert.

5.4 Fazit

Es ist uns gelungen, erstmalig den Einfluss von MC1R Polymorphismen auf die Rezeptorfunktionalität und deren biologische Bedeutung an Fibroblasten darzustellen. Wir untersuchten diese Zellart parallel zu Melanozyten, in deren Physiologie die Schlüsselrolle der MC1R Polymorphismen bereits belegt ist und die daher als Positivkontrolle unserer Experimente dienten [34, 53]. Unsere Ergebnisse bestätigen die Überlegung, dass α -MSH über den MC1R sowohl in Melanozyten als auch in Fibroblasten funktionell bedeutsam ist, und dass die Rezeptorfunktionalität in

Assoziation mit dem MC1R Polymorphismus eine zellspezifisch unterschiedliche Rolle spielt.

Der gegensätzliche Effekt der Stimulation mit α -MSH auf die Proliferation der beiden Zellarten könnte ein Hinweis auf die Rolle des kutanen POMC Systems als wichtiges Kommunikationssystem, Adaptationssystem und Koordinationsystem der Haut sein.

Aus dieser Schlüsselrolle des POMC-Systems der Haut und dem ubiquitären Vorkommen sowohl der entsprechenden Liganden (u. a. α -MSH) bzw. Rezeptoren (u. a. MC1R) lässt sich auf seine Bedeutung für Veränderungen der Haut schließen.

Es ist belegt, dass das POMC-System durch die MC1R Polymorphismen eine Schlüsselrolle bei der individuellen Pigmentierung spielt und somit über die unterschiedlichen Hautphänotypen einen wesentlichen Risikofaktor für die Melanomentstehung darstellt [29]. In Bezug auf die Fibroblasten scheint α -MSH durch Modulierung des Kollagenstoffwechsels zunächst eine antifibrotische Wirkung zu entfalten [112]. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass diese antifibrotischen Eigenschaften möglicherweise auch durch eine Hemmung der Fibroblastenproliferation vermittelt werden. Dem POMC-System könnte so im Rahmen der chronischen UV-Exposition mit kontinuierlicher kutaner α -MSH Sekretion auch eine pathophysiologische Rolle bei der lichtinduzierten Hautalterung zukommen.

Unsere Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die MC1R Polymorphismen - neben der Bedeutung für die Melanomgenese - weitere pathologische Prozesse beeinflusst. Beispielsweise könnte die Assoziation zwischen Polymorphismus, Rezeptorfunktionalität und biologischem Zellverhalten einen möglichen Erklärungsansatz liefern, warum sich die Inzidenzen verschiedener Dermatosen und Tumoren in Bevölkerungen mit unterschiedlichem Hauttyp unterscheiden. Ausserdem könnte die Bestimmung der MC1R Polymorphismen zur Einschätzung der Prognose beispielsweise der Sklerodermie herangezogen werden. Diese Überlegungen könnten nur durch umfangreiche Bevölkerungs- und krankheitsbezogene Untersuchungen, die das gesamte Spektrum des MC1R Polymorphismus umfassend abbilden, belegt werden.

6 Literaturangaben

1. Aguilera G. (1998) Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab*, 9, 329-36.
2. O'Donohue TL, Dorsa DM. (1982) The opiomelanotropinergic neuronal and endocrine systems. *Peptides*, 3, 353-95.
3. Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE, Mihm M. (1995) Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett*, 374, 113-6.
4. Slominski A, Paus R, Wortsman J. (1993) On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol*, 93, C1-6.
5. Slominski A, Mihm MC. (1996) Potential mechanism of skin response to stress. *Int J Dermatol*, 35, 849-51.
6. Slominski A, Wortsman J, Mazurkiewicz JE, Matsuoka L, Dietrich J, Lawrence K, Gorbani A, Paus R. (1993) Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin. *J Lab Clin Med*, 122, 658-66.
7. Loir B, Bouchard B, Morandini R, Del Marmol V, Deraemaeker R, Garcia-Borrón JC, Ghanem G. (1997) Immunoreactive alpha-melanotropin as an autocrine effector in human melanoma cells. *Eur J Biochem*, 244, 923-30.
8. Ghanem G, Lienard D, Hanson P, Lejeune F, Fruhling J. (1986) Increased serum alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) in human malignant melanoma. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 22, 535-6.
9. Liu PY, Johansson O. (1995) Immunohistochemical Evidence of Alpha-Melanocyte-Stimulating-Hormone, Beta-Melanocyte-Stimulating-Hormone and Gamma-3-Melanocyte-Stimulating-Hormone Expression in Cutaneous Malignant-Melanoma of Nodular Type. *Journal of Dermatological Science*, 10, 203-212.
10. Liu PY, Lontz W, Bondesson L, Johansson O. (1995) The Possible Role of Alpha-3-Melanocyte, Beta-3-Melanocyte and Gamma-3-Melanocyte Stimulating Hormone-Containing Keratinocytes in the Initiation of Vitiligo Vulgaris. *European Journal of Dermatology*, 5, 625-630.
11. Ghanem G, Loir B, Hadley M, Abdel Malek Z, Libert A, Del Marmol V, Lejeune F, Lozano J, Garcia-Borrón JC. (1992) Partial characterization of IR-alpha-MSH peptides found in melanoma tumors. *Peptides*, 13, 989-94.
12. Ghanem G, Versteegen J, De Rijcke S, Hanson P, Van Onderbergen A, Libert A, Del Marmol V, Arnould R, Vercammen-Grandjean A, Lejeune F. (1989) Studies on factors influencing human plasma alpha-MSH. *Anticancer Res*, 9, 1691-6.
13. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257, 1248-51.
14. Slominski A. (1991) POMC gene expression in mouse and hamster melanoma cells. *FEBS Lett*, 291, 165-8.
15. Zubair A, Lakshmi MS, Sherbet GV. (1992) Expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and the invasive ability of the B16 murine melanoma. *Anticancer Res*, 12, 399-402.
16. Böhm M, Luger TA. (2000) The role of melanocortins in skin homeostasis. *Horm Res*, 54, 287-93.

17. Slominski AT, Roloff B, Zbytek B, Wei ET, Fechner K, Curry J, Wortsman J. (2000) Corticotropin releasing hormone and related peptides can act as bioregulatory factors in human keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36, 211-6.
18. Chajlani V, Wikberg JE. (1992) Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett*, 309, 417-20.
19. Gantz I, Yamada T, Tashiro T, Konda Y, Shimoto Y, Miwa H, Trent JM. (1994) Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 (alpha-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24.3 by Fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 19, 394-5.
20. Magenis RE, Smith L, Nadeau JH, Johnson KR, Mountjoy KG, Cone RD. (1994) Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm Genome*, 5, 503-8.
21. Moro O, Ideta R, Ifuku O. (1999) Characterization of the promoter region of the human melanocortin-1 receptor (MC1R) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 452-60.
22. Makova KD, Ramsay M, Jenkins T, Li WH. (2001) Human DNA sequence variation in a 6.6-kb region containing the melanocortin 1 receptor promoter. *Genetics*, 158, 1253-68.
23. Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. (2005) Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res*, 18, 393-410.
24. Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Reh fuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, 72, 827-34.
25. Smith R, Healy E, Siddiqui S, Flanagan N, Steijlen PM, Rosdahl I, Jacques JP, Rogers S, Turner R, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL. (1998) Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Dermatol*, 111, 119-22.
26. Healy E, Flannagan N, Ray A, Todd C, Jackson IJ, Matthews JN, Birch-Machin MA, Rees JL. (2000) Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet*, 355, 1072-3.
27. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet*, 11, 328-30.
28. Box NF, Wyeth JR, O'Gorman LE, Martin NG, Sturm RA. (1997) Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet*, 6, 1891-7.
29. Sturm RA. (2002) Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res*, 12, 405-16.
30. Duffy DL, Box NF, Chen W, Palmer JS, Montgomery GW, James MR, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA. (2004) Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum Mol Genet*, 13, 447-61.
31. Healy E, Jordan SA, Budd PS, Suffolk R, Rees JL, Jackson IJ. (2001) Functional variation of MC1R alleles from red-haired individuals. *Hum Mol Genet*, 10, 2397-402.
32. Sanchez-Laorden BL, Sanchez-Mas J, Martinez-Alonso E, Martinez-Menarguez JA, Garcia-Borron JC, Jimenez-Cervantes C. (2006) Dimerization

- of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. *J Invest Dermatol*, 126, 172-81.
33. Beaumont KA, Newton RA, Smit DJ, Leonard JH, Stow JL, Sturm RA. (2005) Altered cell surface expression of human MC1R variant receptor alleles associated with red hair and skin cancer risk. *Hum Mol Genet*, 14, 2145-54.
 34. Scott MC, Wakamatsu K, Ito S, Kadakaro AL, Kobayashi N, Groden J, Kavanagh R, Takakuwa T, Virador V, Hearing VJ, Abdel-Malek ZA. (2002) Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci*, 115, 2349-55.
 35. Leonard JH, Marks LH, Chen W, Cook AL, Boyle GM, Smit DJ, Brown DL, Stow JL, Parsons PG, Sturm RA. (2003) Screening of human primary melanocytes of defined melanocortin-1 receptor genotype: pigmentation marker, ultrastructural and UV-survival studies. *Pigment Cell Res*, 16, 198-207.
 36. Donatien PD, Hunt G, Pieron C, Lunec J, Taieb A, Thody AJ. (1992) The expression of functional MSH receptors on cultured human melanocytes. *Arch Dermatol Res*, 284, 424-6.
 37. Loir B, Perez Sanchez C, Ghanem G, Lozano JA, Garcia-Borrón JC, Jimenez-Cervantes C. (1999) Expression of the MC1 receptor gene in normal and malignant human melanocytes. A semiquantitative RT-PCR study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 45, 1083-92.
 38. Salazar-Onfray F, Lopez M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, Korenblit C, Petersson M, Chhajlani V, Larsson O, Kiessling R. (2002) Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer*, 87, 414-22.
 39. Sanchez-Mas J, Hahmann C, Gerritsen I, Garcia-Borrón JC, Jimenez-Cervantes C. (2004) Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Res*, 17, 386-95.
 40. Kenakin T. (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *Faseb J*, 15, 598-611.
 41. Graham A, Wakamatsu K, Hunt G, Ito S, Thody AJ. (1997) Agouti protein inhibits the production of eumelanin and pheomelanin in the presence and absence of alpha-melanocyte stimulating hormone. *Pigment Cell Res*, 10, 298-303.
 42. Ollmann MM, Lamoreux ML, Wilson BD, Barsh GS. (1998) Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev*, 12, 316-30.
 43. Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Im S, Lamoreux ML, Hearing VJ, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA. (1997) Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol*, 108, 838-42.
 44. Eshel Y, Salomon Y. (1994) Calmodulin-binding peptides interfere with melanocyte-stimulating hormone receptor activity and stimulate adenosine 3',5'-monophosphate production in M2R mouse melanoma cells. *Endocrinology*, 134, 177-85.
 45. Ringholm A, Klovins J, Rudzish R, Phillips S, Rees JL, Schiöth HB. (2004) Pharmacological characterization of loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor that are associated with red hair. *J Invest Dermatol*, 123, 917-23.

46. Wong TH, Rees JL. (2005) The relation between melanocortin 1 receptor (MC1R) variation and the generation of phenotypic diversity in the cutaneous response to ultraviolet radiation. *Peptides*, 26, 1965-71.
47. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115, 455-65.
48. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*, 67, 653-92.
49. Shinyama H, Masuzaki H, Fang H, Flier JS. (2003) Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology*, 144, 1301-14.
50. Wong W, Minchin RF. (1996) Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle⁴, D-Phe⁷] alpha-MSH in B16 melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 28, 1223-32.
51. Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, Skottner A. (2000) New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res*, 42, 393-420.
52. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, 74, 395-404.
53. Kadarko AL, Kavanagh R, Kanto H, Terzieva S, Hauser J, Kobayashi N, Schwemberger S, Cornelius J, Babcock G, Shertzer HG, Scott G, Abdel-Malek ZA. (2005) alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Res*, 65, 4292-9.
54. Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, Van Obberghen E. (1999) Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*, 19, 4989-5000.
55. Bertagna X. (1994) Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 23, 467-85.
56. Autelitano DJ, Lundblad JR, Blum M, Roberts JL. (1989) Hormonal regulation of POMC gene expression. *Annu Rev Physiol*, 51, 715-26.
57. Bertagna X, Lenne F, Comar D, Massias JF, Wajcman H, Baudin V, Luton JP, Girard F. (1986) Human beta-melanocyte-stimulating hormone revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 9719-23.
58. Castro MG, Morrison E. (1997) Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol*, 11, 35-57.
59. Chang AC, Cochet M, Cohen SN. (1980) Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 4890-4.
60. Drouin J, Nemer M, Charron J, Gagner JP, Jeannotte L, Sun YL, Therrien M, Tremblay Y. (1989) Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome*, 31, 510-9.
61. Jones MT, Gillham B. (1988) Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic hormone. *Physiol Rev*, 68, 743-818.
62. Lundblad JR, Roberts JL. (1988) Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocr Rev*, 9, 135-58.

63. Clark AJ, Lavender PM, Besser GM, Rees LH. (1989) Pro-opiomelanocortin mRNA size heterogeneity in ACTH-dependent Cushing's syndrome. *J Mol Endocrinol*, 2, 3-9.
64. DeBold CR, Menefee JK, Nicholson WE, Orth DN. (1988) Proopiomelanocortin gene is expressed in many normal human tissues and in tumors not associated with ectopic adrenocorticotropin syndrome. *Mol Endocrinol*, 2, 862-70.
65. Jeannotte L, Burbach JP, Drouin J. (1987) Unusual proopiomelanocortin ribonucleic acids in extrapituitary tissues: intronless transcripts in testes and long poly(A) tails in hypothalamus. *Mol Endocrinol*, 1, 749-57.
66. Slominski A, Costantino R, Wortsman J, Paus R, Ling N. (1992) Melanotropic activity of gamma MSH peptides in melanoma cells. *Life Sci*, 50, 1103-8.
67. Smith AI, Funder JW. (1988) Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev*, 9, 159-79.
68. Luger TA, Scholzen T, Brzoska T, Becher E, Slominski A, Paus R. (1998) Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Ann N Y Acad Sci*, 840, 381-94.
69. Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA. (1994) Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest*, 93, 2258-62.
70. Wintzen M, Gilchrist BA. (1996) Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin. *J Invest Dermatol*, 106, 3-10.
71. Allen RG, Orwoll E, Kendall JW, Herbert E, Paxton H. (1980) The distribution of forms of adrenocorticotropin and beta-endorphin in normal, tumorous, and autopsy human anterior pituitary tissue: virtual absence of 13K adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab*, 51, 376-80.
72. Bateman A, Solomon S, Bennett HP. (1990) Post-translational modification of bovine pro-opiomelanocortin. Tyrosine sulfation and pyroglutamate formation, a mass spectrometric study. *J Biol Chem*, 265, 22130-6.
73. Luger TA, Schauer E, Trautinger F, Krutmann J, Ansel J, Schwarz A, Schwarz T. (1993) Production of immunosuppressing melanotropins by human keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 680, 567-70.
74. Luger TA, Schwarz T, Kalden H, Scholzen T, Schwarz A, Brzoska T. (1999) Role of epidermal cell-derived alpha-melanocyte stimulating hormone in ultraviolet light mediated local immunosuppression. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 209-16.
75. Can G, Abdel-Malek Z, Porter-Gill PA, Gill P, Boyce S, Grabowski GA, Nordlund J, Farooqui J. (1998) Identification and sequencing of a putative variant of proopiomelanocortin in human epidermis and epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol*, 111, 485-91.
76. Blalock JE. (1989) A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev*, 69, 1-32.
77. Blalock JE. (1994) The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*, 15, 504-11.
78. Besedovsky HO, del Rey A. (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17, 64-102.
79. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M. (1996) Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta*, 1313, 130-8.

80. Teofoli P, Motoki K, Lotti TM, Uitto J, Mauviel A. (1997) Proopiomelanocortin (POMC) gene expression by normal skin and keloid fibroblasts in culture: modulation by cytokines. *Exp Dermatol*, 6, 111-5.
81. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Bologna J, Sodi S, Ichihashi M, Pawelek JM. (1999) UV light and MSH receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 100-16.
82. Brzoska T, Kalden DH, Scholzen T, Luger TA. (1999) Molecular basis of the alpha-MSH/IL-1 antagonism. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 230-8.
83. Holzmann H, Altmeyer P, Stohr L, Chliff GN. (1983) [Modification of alpha-MSH by UVA irradiation of the skin]. *Hautarzt*, 34, 294-7.
84. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev*, 80, 979-1020.
85. Eberle AN. (1988) *The Melanotropins: Chemistry, Physiology, and Mechanisms of Action*. Karger.
86. Fitzpatrick TB. (1987) *Dermatology in General Medicine*. McGraw Hill, New York.
87. Goldsmith LA. (1991) *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin*. Oxford Univ. Press, New York.
88. Nordlund JJB, Raymond E.; Hearing, Vincent J.; King, Richard A.; and Ortonne, Jean-Paul. (1998) *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. Oxford Univ. Press, New York.
89. Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger MD, Boyce ST, Urabe K, Hearing VJ. (1995) Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1789-93.
90. Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA. (1996) Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology*, 137, 1627-33.
91. Hunt G. (1995) Melanocyte-stimulating hormone: a regulator of human melanocyte physiology. *Pathobiology*, 63, 12-21.
92. Hadley M. (1996) *Endocrinology*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
93. Hirobe T. (1992) Melanocyte stimulating hormone induces the differentiation of mouse epidermal melanocytes in serum-free culture. *J Cell Physiol*, 152, 337-45.
94. Böhm M, Metze D, Schulte U, Becher E, Luger TA, Brzoska T. (1999) Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. *Exp Dermatol*, 8, 453-61.
95. Orel L, Simon MM, Karlseder J, Bhardwaj R, Trautinger F, Schwarz T, Luger TA. (1997) alpha-Melanocyte stimulating hormone downregulates differentiation-driven heat shock protein 70 expression in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 108, 401-5.
96. Slominski A, Heasley D, Mazurkiewicz JE, Ermak G, Baker J, Carlson JA. (1999) Expression of proopiomelanocortin (POMC)-derived melanocyte-stimulating hormone (MSH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) peptides in skin of basal cell carcinoma patients. *Hum Pathol*, 30, 208-15.
97. Redondo P, Garcia-Foncillas J, Okroujnov I, Bandres E. (1998) Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 290, 425-8.

98. Böhm M, Schulte U, Kalden H, Luger TA. (1999) Alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates activation of NF-kappa B and AP-1 and secretion of interleukin-8 in human dermal fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 277-86.
99. Kiss M, Wlaschek M, Brenneisen P, Michel G, Hommel C, Lange TS, Peus D, Kemeny L, Dobozy A, Scharffetter-Kochanek K, et al. (1995) Alpha-melanocyte stimulating hormone induces collagenase/matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 376, 425-30.
100. Böhm M, Luger TA. (2004) Melanocortins in fibroblast biology--current update and future perspective for dermatology. *Exp Dermatol*, 13 Suppl 4, 16-21.
101. Teofoli P, Frezzolini A, Puddu P, De Pita O, Mauviel A, Lotti T. (1999) The role of proopiomelanocortin-derived peptides in skin fibroblast and mast cell functions. *Ann N Y Acad Sci*, 885, 268-76.
102. Böhm M, Raghunath M, Sunderkötter C, Schiller M, Ständer S, Brzoska T, Cauvet T, Schioth HB, Schwarz T, Luger TA. (2004) Collagen metabolism is a novel target of the neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Biol Chem*, 279, 6959-66.
103. Lipton JM, Catania A. (1998) Mechanisms of antiinflammatory action of the neuroimmunomodulatory peptide alpha-MSH. *Ann N Y Acad Sci*, 840, 373-80.
104. Fischer EG. (1988) Opioid peptides modulate immune functions. A review. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 10, 265-326.
105. Panerai AE, Sacerdote P. (1997) Beta-endorphin in the immune system: a role at last? *Immunol Today*, 18, 317-9.
106. Scholzen TE, Sunderkötter C, Kalden DH, Brzoska T, Fastrich M, Fisbeck T, Armstrong CA, Ansel JC, Luger TA. (2003) Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Endocrinology*, 144, 360-70.
107. Manna SK, Aggarwal BB. (1998) Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. *J Immunol*, 161, 2873-80.
108. Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA. (1986) Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol*, 137, 2232-6.
109. Clark WG, Holdeman M, Lipton JM. (1985) Analysis of the antipyretic action of alpha-melanocyte-stimulating hormone in rabbits. *J Physiol*, 359, 459-65.
110. Verhaagen J, Edwards PM, Jennekens FG, Schotman P, Gispen WH. (1986) Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates the outgrowth of myelinated nerve fibers after peripheral nerve crush. *Exp Neurol*, 92, 451-4.
111. Edwards PM, Kuiters RR, Boer GJ, Gispen WH. (1986) Recovery from peripheral nerve transection is accelerated by local application of alpha-MSH by means of microporous Accurel polypropylene tubes. *J Neurol Sci*, 74, 171-6.
112. Kokot A, Sindrilaru A, Schiller M, Sunderkötter C, Kerkhoff C, Eckes B, Scharffetter-Kochanek K, Luger TA, Böhm M. (2009) alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses bleomycin-induced collagen synthesis and reduces tissue fibrosis in a mouse model of scleroderma: melanocortin peptides as a novel treatment strategy for scleroderma? *Arthritis Rheum*, 60, 592-603.
113. Hill RP, Wheeler P, MacNeil S, Haycock JW. (2005) Alpha-melanocyte stimulating hormone cytoprotective biology in human dermal fibroblast cells. *Peptides*, 26, 1150-8.

114. Box NF, Duffy DL, Irving RE, Russell A, Chen W, Griffyths LR, Parsons PG, Green AC, Sturm RA. (2001) Melanocortin-1 receptor genotype is a risk factor for basal and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*, 116, 224-9.
115. Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA. (2000) Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet*, 66, 176-86.

PUBLIKATIONSLISTE

- **Stanisz H**, Seifert M, Tilgen W, Vogt T, Rass K. (2011) Reciprocal responses of fibroblasts and melanocytes to α -MSH depending on MC1R polymorphisms. *Dermato-Endocrinology*, in press.
- **Stanisz H**, Stark A, Kilch T, Müller CSL, Peinelt C, Hoth M, Niemeyer BA, Vogt T, Bogeski I (2011) ORAI1 Ca^{2+} channels control endothelin-1 induced mitogenesis and melanogenesis in primary human melanocytes, *submitted for publication*
- **Stanisz H**, Vogt T, Rass K (2011) Book: Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Melanoma Chapter: Chemotherapy for Melanoma, in press
- **Stanisz H**, Anagnostakos K, Pföhler C, Kohn D, Vogt T, Müller CSL. (2011) Cutaneous metastasis of a highly differentiated chondrosarcoma- review on a rare event in dermatopathology *Journal of Cutaneous Pathology*, in press
- Bogeski I, **Stanisz H**, Hultqvist M, Holmdahl R, Niemeyer B. (2010) Redox-Regulation der Immunzellen: Orai Ca^{2+} -Kanäle und NOX-Enzyme als potentielle therapeutische Zielmoleküle bei Autoimmunerkrankungen. *DZKF*, 50-53
- **Stanisz H**, Tilgen W, Rass K. (2009) Therapeutical options in malignant skin tumours. Therapeutische möglichkeiten bei malignen hauttumoren: Früh erkannt, ist auch das gefürchtete melanom heilbar, *MMW Fortschritte der Medizin* 151, 34-38.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Univ. -Prof. Dr. med. Wolfgang Tilgen und meinem Betreuer Dr. med. Knuth Rass bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Dr. Rass danke ich insbesondere für seine Geduld, seinen Rat, die produktive Zusammenarbeit und die Zeit, die er sich immer für mich nahm.

Des weiteren gilt mein besonderer Dank dem ganzen Laborteam der Dermatologie, insbesondere aber Prof. Dr. med. Jörg Reichrath, dem Laborleiter, Dr. Markus Seifert, der stets einen Ausweg wusste, Alexandra Stark, die mir stets mit großem Einsatz zur Seite stand, Annett Weinhold für ihren liebevollen Umgang mit den Melanozyten und Heike Palm für ihre ebenfalls tatkräftige Unterstützung.

Ebenso danke ich PD. Dr. med. Claudia Pföhler, die stets ein offenes Ohr hatte und meinen Kollegen in der Dermatologie für ihre Unterstützung.

Ein großes Dankeschön auch an das Institut für Biophysik, insbesondere an Prof. Markus Hoth und Frau Dr. Eva Schwarz sowie Frau Dr. Anna Wenning, die mir die Messung der Proliferationsexperimente ermöglichten und mir mit ihrer Freundschaft und viel Geduld zur Seite standen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Mutter Grazyna Stanisiz, meinem Vater Jacek Stanisiz und meinen Schwestern Anna und Marta, die mir immer Mut machen und an mich glauben. Auch danke ich meiner Omi Maria König, dass sie immer zur Stelle ist und einem immer die Wahrheit sagt.

An dieser Stelle danke ich auch meinen beiden Grossvätern Johann König und Jan Stanisiz sowie meiner Grossmutter Justina Stanisiz, die sehr stolz auf mich gewesen wären.

Besonders danke ich meinem Ivan, der mir immer eine Stütze ist und der immer die richtigen Worte findet, für seine Liebe in allen Lebenslagen und auch für seine tatkräftige Hilfe und Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Hedwig Stanisz
Anschrift	Welfenstr. 37 88281 Schlier-Fenken
Telefon	0176 23974230 oder 0751 352004
E-Mail	hedwigstanisz@yahoo.de
Geburtsdatum, -ort	25.09.1981 Saybusch
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1988 - 1992	Grundschule am Bildungszentrum St. Konrad Ravensburg
1992 - 2001	Gymnasium am Bildungszentrum St. Konrad Ravensburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife mit der Gesamtnote sehr gut (1,0)
10/2001	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
09/2003	Ärztliche Vorprüfung mit der Gesamtnote gut (2,33)
10/2004 – 07/2005	Auslandsstudium an der Universitat de La Laguna, Spanien
03/2006 – 07/2006	Auslandsstudium an der Universidad de La Laguna, Spanien
02/2007 – 06/2007	1.Tertial des praktischen Jahres in der Klinik für Dermatologie Universitätsklinik Homburg
06/2007 – 10/2007	2.Tertial des praktischen Jahres in den chirurgischen Kliniken der Universidad de Buenos Aires, Argentinien
10/2007 – 01/2008	3.Tertial des praktischen Jahres in der Klinik für Innere Medizin Universitätsklinik Homburg
05/2008	Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit dem zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote sehr gut (1,5)
05/2008	Approbation als Ärztin
06/2008 bis heute	Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätskliniken des Saarlandes in Hombur (Saar)