

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Direktor: Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer

Expression und Funktion der TGF- β -Isoformen in Hypophysentumorzellen

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Oliver Sarkar

aus Augsburg

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. K. Stalla

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. Uhl
Prof. Dr. H. Künzle

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. Ulrich Renner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	3
2	Einleitung.....	5
2.1	Anatomie und Physiologie der Hypophyse.....	5
2.2	Pathophysiologie der Hypophyse.....	8
2.2.1	Pathogenese der Hypophysenadenome.....	8
2.2.2	Prolaktinome und die GH-3-Zelllinie.....	9
2.2.3	Somatotrope Adenome und die MtT/S-Zelllinie.....	11
2.2.4	ACTH-Zell-Adenome und die AtT-20-Zelllinie.....	12
2.2.5	Sonstige Hypophysentumoren.....	13
2.3	Auto- und parakrin wirkende Faktoren der Hypophyse.....	15
2.4	Die TGF- β -Familie.....	17
2.5	Die TGF- β -Rezeptoren.....	20
2.6	Die Signaltransduktion.....	21
2.7	Zielsetzung der Arbeit.....	23
3	Material und Methoden.....	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Geräte und Material.....	24
3.1.2	Chemikalien.....	25
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	Tumorgewebe.....	26
3.2.2	Immunhistochemie.....	27
3.2.3	RNA-Extraktion und reverse Transkription.....	29
3.2.4	Untersuchung der Expression von TGF- β und seiner Rezeptoren mittels PCR und Gelelektrophorese.....	30
3.2.5	Zellkultur der AtT-20-, MtT/S-, GH-3- und TtT/GF-Zelllinie.....	32
3.2.6	Stimulation der Zelllinien mit den TGF- β -Isoformen.....	32
3.2.7	Hormonmessung mittels RIA.....	33
3.2.8	Bestimmung der Zellproliferation mittels WST-Assay.....	33
3.2.9	Statistik.....	34
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Expression der TGF- β -Isoformen in humanen Hypophysentumoren.....	35

4.1.1	TGF- β -1-Expression.....	36
4.1.2	TGF- β -2-Expression.....	38
4.1.3	TGF- β -3-Expression.....	40
4.2	Expression der TGF- β -Isoformen und Rezeptoren in AtT-20-, MtT/S- und GH-3-Zellen.....	42
4.3	Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation von TtT/GF-, AtT-20 und GH-3-Zellen.....	44
4.3.1	Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation der TtT/GF-Zellen.....	45
4.3.2	Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation der GH-3-Zellen.....	47
4.3.3	Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation der AtT-20-Zellen.....	49
4.4	Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von GH-3- und AtT-20-Zellen.....	51
4.4.1.	Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von GH-3-Zellen.....	52
4.4.2	Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von AtT-20-Zellen.....	54
5	Diskussion.....	55
5.1	TGF- β -1.....	56
5.2	TGF- β -2.....	58
5.3	TGF- β -3.....	59
6	Zusammenfassung.....	62
7	Literaturverzeichnis.....	64

Danksagung

Lebenslauf

1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ARAS	Aufsteigendes retikuläres aktivierendes System
BMP	Knochen Morphogenetisches Protein
BSA	Bovines Albumin Serum
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
DAB	3,3'Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Serum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleinsäuretriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstums Factor
ELISA	Enzymimmuno-Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstums Faktor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FS-Zellen	Follikulostellare Zellen
GAP-DH	Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GH	Wachstums-Hormon
GHRH	Growth Hormon Releasing Hormon
GnRH	Gonatotropin Releasing Hormon
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
Kb	Kilobasen
LH	Luteotropes Hormon
MEN	Multiple Endokrine Neoplasien
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
Ncl	Nucleus

NGF	Nervenwachstumsfaktor
PAS	Peroxidase Reaktion
PBS	Phosphat - gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
POMC	Proopiomelanocortin
PRH	Prolactin Releasing Hormon
RIA	Radio-Immuno-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
STH	Somatotropes Hormon (= GH)
T ₃	L-Trijodthyronin
TBS	Tris – gepufferte Kochsalzlösung
TGF-β	Transformierender Wachstumsfactor-β
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
UV	ultraviolett
VEGF	Vasoendothelialer Wachstumsfaktor
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

2 Einleitung

2.1 Anatomie und Physiologie der Hypophyse

Die Hypophyse stellt einen zentralen Knotenpunkt im endokrinen System von Säugetieren dar. Sie nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation des Stoffwechsels, des Wachstums, des Immunsystems und des Reproduktionssystems ein.

Die Hypophyse, ein walzenförmiger Körper von etwa 0,7g, der sich in Fossa hypophysialis der Sella turcica des Os sphenoidale befindet, besteht aus zwei funktionell und entwicklungs-geschichtlich unterschiedlichen Teilen: Dem Vorderlappen, der Adenohypophyse, die aus ektodermalem Gewebe des Oro-

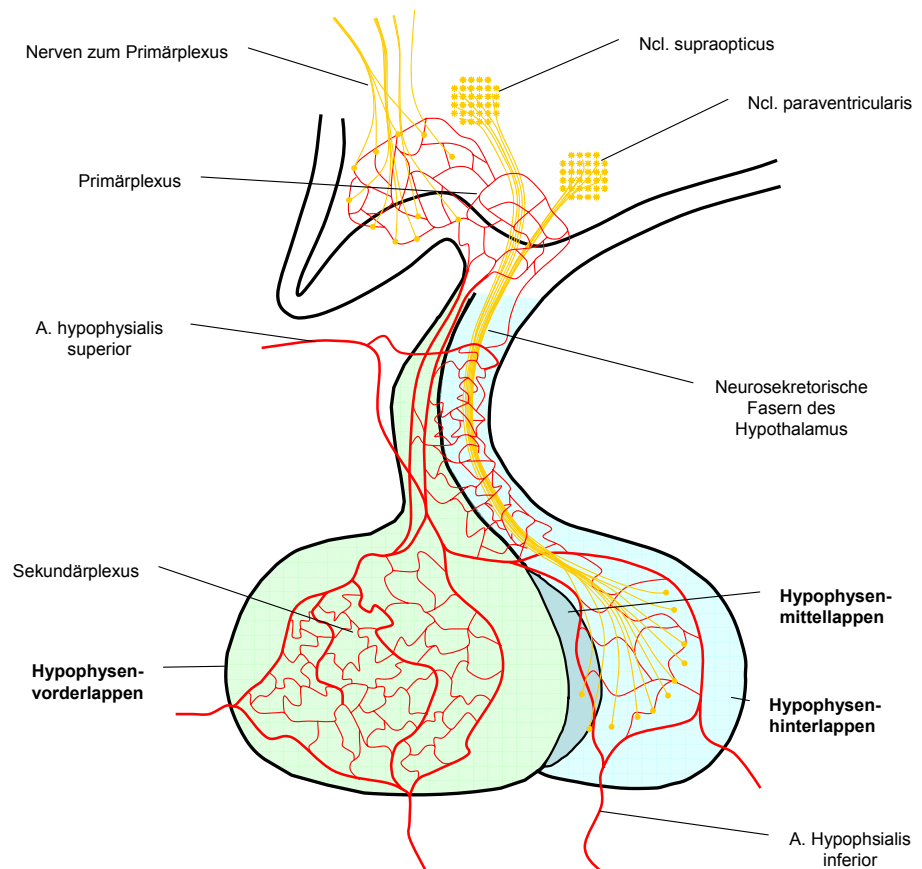


Abb.1: Anatomie der Hypophyse und des Portalgefäßsystems

pharynx, der so genannten Rathke-Tasche entsteht, und dem Hinterlappen, der Neurohypophyse, die entwicklungsgeschichtlich ein Teil des Zwischenhirns ist (siehe Abb.1) (1;31;48;62;66).

Beim Menschen nur rudimentär angelegt ist der Hypophysenzwischenlappen, der Bildungsort des MSH, das, wie ACTH, aus dem Vorläuferpeptid POMC entsteht.

In der Neurohypophyse enden die marklosen Axone neurosekretorischer Zellen des Hypothalamus. Der Ncl. Supraopticus ist für die Produktion des ADH, der Ncl. Paraventricularis für die Produktion von Oxytocin verantwortlich. Die Sekretion beider Hormone erfolgt über

weitergeleitete Aktionspotenziale, die die Exozytose und damit Abgabe ins Blut auslösen (53;66).

Die Adenohypophyse ist eine typische Hormondrüse aus retikulärem Bindegewebe, zahlreichen Sinusoiden, die an ein Pfortadersystem angeschlossen sind, und verzweigten Strängen von Drüsenzellen. Letztere werden nach ihren Färbereigenschaften eingeteilt (Tab.1) (31).

Die verschiedenen Zelltypen produzieren 4 glandotrope (ACTH, TSH, FSH, LH) und zwei nichtglandotrope Hormone (GH, Prolaktin) (66).

Des Weiteren befinden sich in der Hypophyse Endothelzellen, Fibroblasten und follikulostellare Zellen (31). Letztere, wahrscheinlich mit Mikroglia verwandte Zellen, sind zur Phagozytose befähigt, sezernieren zahlreiche Zytokine und sind vermutlich an der lokalen Regulation der endokrinen Funktion der Hypophyse beteiligt (32).

Tab.1: Einteilung der Drüsenzellen der Adenohypophyse nach dem Färbeverhalten und Funktionsverteilung

Färbereigenschaft	Zelltyp	Hormon
Acidophil	<ul style="list-style-type: none"> ▪ α-Zellen ▪ ϵ-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Somatotropin (GH) ▪ Prolaktin (PRL)
Basophil	<ul style="list-style-type: none"> ▪ β_1-Zellen ▪ β_2-Zellen ▪ δ-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Corticotropin (ACTH), <ul style="list-style-type: none"> β-Lipotropin (β-LPH), Melanotropin (MSH) ▪ Thyrotropin ▪ Gonadotropine (LH, FSH)
Chromophob	<ul style="list-style-type: none"> ▪ γ-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ möglicherweise <ul style="list-style-type: none"> Umwandlung in chromophile Zellen nach Hormongabe

Die Sekretion der Hormone wird durch unterschiedliche Regelkreise zwischen Hypothalamus, Hypophyse und peripherem Zielgewebe gesteuert. Nach Integration verschiedener Reize höherer Zentren (Cortex, limbisches System, Thalamus, ARAS und Rückenmark) sowie unter Einfluss der biologischen Uhr setzt der Hypothalamus hypophysiotrope Hormone (CRH, TRH, GnRH, GHRH, Somatostatin, PRH, Dopamin) frei, die über das hypophysäre Portalvenennetz zur Hypophyse gelangen. Dort werden die Drüsenzellen zur Ausschüttung der Polypeptidhormone angeregt oder inhibiert. Über den Blutkreislauf erreichen die Hormone das Zielgewebe. Die Regulation der Hormonausschüttung des Hypothalamus und der Hypophyse erfolgt einerseits durch einen long loop feedback im Sinne einer negativen Rückkopplung durch die durch das periphere Zielgewebe ausgeschüttete Hormone, Gewebemetaboliten und Stoffwechselfsubstrate, andererseits durch einen short loop feedback durch die ausgeschütteten

Polypeptidhormone der Hypophyse, durch die der Hypothalamus in der Sekretion der Releasing Hormone gehemmt wird (66).

Eine schematische Darstellung des klassischen endokrinen Regelkreises am Beispiel der Hypothalamo-Hypophyse-Thyreoidalen-Achse gibt Abb.2 (33;47;53;66;69).

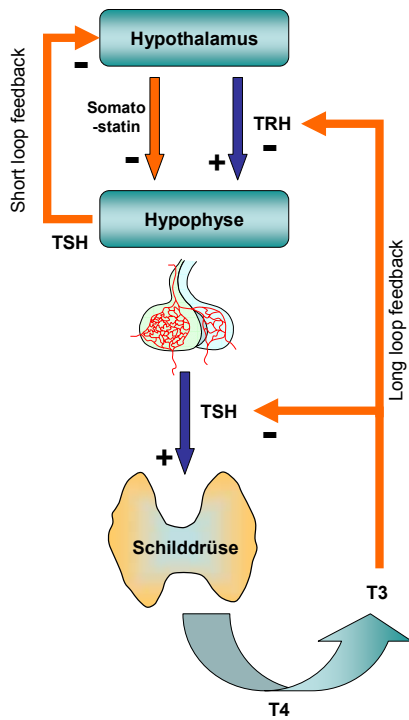


Abb.2: Schematische Darstellung des klassischen endokrinen Regelkreises am Beispiel des Hypothalamo-hypophyso-thyreoidalen Regelkreises. Hypothalamische Neurone produzieren das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH), das über das portale Gefässnetz zur Hypophyse gelangt und diese zur Sekretion des thyroideastimulierenden Hormon (TSH) anregt. TSH bewirkt in der Schilddrüse die Produktion von Thyroxin und T3. T3 wirkt hemmend auf Hypophyse und Hypothalamus im Sinne eines long loop feedback. Auch Stoffwechselmetaboliten des peripheren Zielgewebes wirken inhibierend. TSH wirkt ebenfalls hemmend auf den Hypothalamus im Sinne eines short loop feedback. Vermittelt wird dieser Effekt zentral durch das hypothalamische Somatostatin.

2.2 Pathophysiologie der Hypophyse

2.2.1 Pathogenese der Hypophysenadenome

Unter den neoplastischen Läsionen der Sellaregion sind die, meist intrasellär gelegenen Hypophysenadenome, am häufigsten. Es handelt sich um Tumoren, die von den endokrinen Zellen der Adenohypophyse ausgehen und mit einem Anteil von 15% die zweithäufigste intrakranielle Neoplasie nach den Meningiomen darstellen, während neurohypophysäre und hypothalamische Tumoren eine Rarität sind (53;54). Hypophysenadenome können sporadisch oder, seltener, im Rahmen eines multiplen endokrinen Neoplasiesyndroms (MEN Typ I) auftreten (25).

Formalpathogenetisch wird allgemein von einem mehrschrittigen Prozess ausgegangen, wobei es zunächst zu einem initialen Ereignis mit Mutation und Transformation kommt, dem weitere Veränderungen wie klonale Expansion, Neovaskularisation und Invasion folgen, was als Tumorprogression zusammengefasst wird (2;53).

Kausalpathogenetisch stehen sich zwei kontrovers diskutierte Theorien gegenüber: Die eine geht von einer primären hypothalamischen Dysregulation im Sinne einer exzessiven hormonellen Stimulation bzw. fehlender Inhibition aus, was über eine noduläre Hyperplasie schließlich zur Tumorenstehung führt (2;54). So zeigen Frauen, die östrogenhaltige Präparate zur Kontrazeption einnehmen, eine sieben- bis achtfach höhere Inzidenz für die Entwicklung von Prolaktinomen (19). Östrogen gilt als Wachstumstimulator lactotroper Zellen und führt in der Schwangerschaft unter physiologisch erhöhtem Plasmaspiegel zu einer lactotropen Hyperplasie. In östrogensensitiven Fischer-344-Ratten konnte die Entstehung von Prolaktinomen unter Östrogenbehandlung provoziert werden. Eine Überexpression der Releasing-Faktoren GHRH, CRH, TRH und GnRH führen ebenfalls zur Hyperplasie entsprechender endokriner Zielzellen bis hin zur neoplastischen Entartung.

Auch eine hypothalamische Dysregulation im Sinne einer Dopaminresistenz lactotroper Zellen könnte die Tumorentstehung erklären. Dopamin ist der wichtigste Inhibitor der Prolaktinsekretion und der Proliferation lactotroper Zellen. In Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Dopaminresistenz lactotroper Zellen ebenfalls zur Hyperplasie und Tumorenstehung führen. Dieser Mechanismus scheint beim Menschen jedoch keine Rolle zu spielen (2;27;53;55).

Im Gegensatz zu dieser Theorie konnte in vielen STH-produzierenden Tumoren ein intrinsischer hypophysärer Defekt im Sinne einer Punktmutation eines Onkogens festgestellt werden, wie es von der zweiten Theorie favorisiert wird (54). Andere Tumoren zeigen

wiederum ein verändertes Expressionsmuster im ras-, Rb-, p16-, p18-, p27-, p53- und Alterationen im Cyclinsystem, das für die Regulation und Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich ist und gegebenenfalls die Apoptose einleitet (2;12;45;58;59). Regelmäßig auftretende Deletionen auf Chromosom 11 (11q13), 13 (13q 12-14) und 10 (10q26) deuten auf eine Bedeutung intrinsischer Faktoren bei der Tumorgenese hin. Auch die Erkenntnis, dass es sich bei sporadischen Hypophysenadenomen um monoklonale Tumoren handelt, die sich aus einer transformierten Hypophysenzelle entwickeln, handelt, stützt diese Theorie (7;8).

Letztlich muss ein Zusammenspiel der den beiden Theorien zugrunde liegenden Mechanismen angenommen werden (53).

Die klinische Einteilung der Hypophysenadenome kann zunächst kernspinttomographisch nach Größe in Mikro- (<10 mm) und Makroadenome (>10 mm) und nach hormonaktiv und –inaktiv erfolgen. Die hormoninaktiven Tumoren, zu denen auch Tumoren mit sellanahem Sitz, wie das Kraniopharyngeom zählen, machen etwa 20% der Hypophysentumoren aus, während die hormonaktiven einen Anteil von 80% einnehmen (2;20). Da das biologische Verhalten der hypophysären Adenome weitgehend unabhängig vom histologischen Typ ist, wurde die klassische lichtmikroskopische Einteilung in chromophobe, eosinophile und basophile Adenome weitgehend verlassen. Stattdessen hat sich inzwischen die klinisch relevantere Klassifikation nach immunhistochemischen und damit funktionellen Kriterien durchgesetzt. Dabei wird Art und Anzahl der produzierten Hormone sowie die Art der Granulierung berücksichtigt. Somit können folgende Adenome differenziert werden: Prolaktinome, Somatotrope Adenome, ACTH-Zell-Adenome, TSH-Zell-Adenome und Hormoninaktive Adenome.

2.2.2 Prolaktinome und die GH-3-Zelllinie

Prolaktinome, die auch lactotrope Adenome genannt werden, stellen mit einem Anteil von etwa 50% die häufigsten hormonaktiven Hypophysenadenome dar. Sie treten als Mikroadenome gehäuft bei Frauen in der 4. Lebensdekade, als Makroadenom häufiger bei Männern, auf und fallen durch Hyperprolaktinämie mit den typischen Leitsymptomen Sterilität, Oligo- bis Amenorrhoe, Libido- und Potenzstörungen, Galaktorrhoe sowie lokale Zeichen der Raumforderung, wie zum Beispiel bilaterale Hemianopsie durch Kompression des Chiasma opticum und Kopfschmerz, auf (51;56;68). Etwa 20% aller sekundären Amenorrhöen werden durch Hyperprolaktinämie verursacht. Prolaktinome sind in der Regel einer Langzeittherapie mit Dopaminagonisten, wie Bromocriptin und Lisurid, sehr gut zugänglich, unter welcher es in

90% der Fälle zu einer Abnahme des Zellvolumens und einer Normalisierung des Prolaktinspiegels kommt, da diese, wie der physiologische Inhibitor Dopamin, hemmend auf lactotrope Zellen wirken (4;5;20;37;54). Neuere Präparate der 2. Generation wie Quinagolid und Cabergolin oder neuerdings Pramipexol und Ropinirol weisen durch eine höhere D₂-Rezeptor-Affinität eine bessere Verträglichkeit bei günstigerem Nebenwirkungsprofil auf (26). Die Ausnahme bilden Makroadenome, die mit einem exzessiv erhöhten Prolaktinspiegel einhergehen, häufig invasiv wachsen, resistent gegen Dopamin sind und ein chirurgisches Vorgehen nötig machen (4;5;56;68).

Allgemein handelt es sich um Tumoren, welche aus prolaktinproduzierenden Zellen bestehen (lactotropes Adenom). Sie können in Form des sehr seltenen, dicht-granulierten, azidophilen Adenoms oder in dem wesentlich häufigeren wenig-granulierten, chromophoben Adenom in Erscheinung treten (54).

Die Pathogenese von Prolaktinomen ist weitgehend ungeklärt. Studien anhand von Microarrays und PCR geben jedoch Hinweise darauf, dass die Überexpression von Trichohyalin, TGF- β -Rezeptor III und dem Proteasen Inhibitor 12 sowie Alterationen verschiedener Protoonkogene eine Rolle spielen, wobei der TGF- β -Rezeptor III keinen klassischen TGF- β -Rezeptor darstellt (35). In Fischer-344-Ratten konnten Prolaktinome unter Östrogenbehandlung provoziert werden. Auch die sieben- bis achtfach erhöhte Inzidenz von Prolaktinomen bei Frauen, die östrogenhaltigen Präparaten einnehmen, weist auf eine Mitbeteiligung von Östrogenen, deren mitogener Effekt auf lactotrope Zellen seit längerem bekannt ist, an der Pathogenese hin (19;44;70).

Eine Mutation mit Funktionsverlust der D₂-Rezeptoren, die in Knockout-Mouse-Experimenten ebenfalls zur Adenomenstehung führte, scheint für die Pathogenese im Menschen nicht relevant und somit als Modell nicht übertragbar zu sein (53). Jedoch konnte gezeigt werden, dass erst die Kombination aus chronischer Östrogenstimulation und Dopaminresistenz einen stark mitogenen Effekt hat (27;55).

Es wird angenommen, dass Prolaktin als parakrin wirkender Faktor ebenfalls an der Tumorenstehung beteiligt ist (57).

Da Prolaktinome meist gut auf die medikamentöse Therapie ansprechen, ist eine operative Entfernung selten nötig. Deswegen stehen nur ungenügend Tumoren zu Forschungszwecken zu Verfügung. Aus diesem Grund dient die GH-3-Zelllinie als Modell, die aus radioaktiv induzierten Rattenhypophysentumoren etabliert wurde. Der GH-3-Zellklon wurde 1969 von A.H.Tashjian, Jr., et al. etabliert und aus einem Hypophysentumor einer Wistar-Furth-Ratte gewonnen. Sie entsprechen in der Expression ihrer Rezeptoren für Dopamin, TRH,

Somatostatin, Östradiol, EGF und VIP normalen lactotropen Zellen und werden deswegen funktionell entsprechend reguliert. Zusätzlich zu Prolaktin sezernieren sie auch Somatotropin, weswegen sie auch für somatotrope Tumore als Modell dienen können.

2.2.3 Somatotrope Adenome und die MtT/S-Zelllinie

Die auch als STH-Zell-Adenome bezeichneten Tumoren machen 20% der hypophysären Adenome aus. Sie treten ohne Bevorzugung eines Geschlechts gehäuft in der 5. Lebensdekade auf. Physiologischerweise wird Somatotropin, v.a. in der Pubertät, am stärksten während des Schlafes sezerniert. Auch Hypoglycämie, körperliche Anstrengung und Stress wirken als Stimulus auf die Ausschüttung des hypothalamischen GH-Releasing-Hormons, das die Hypophyse wiederum zur Sekretion des Somatotropins anregt. Auch das von den endokrinen Zellen des Magens synthetisierte Ghrelin stimuliert die Freisetzung des STH's (66). Als Gegenspieler des GHRH fungiert das ebenfalls hypothalamische Somatostatin, das die Somatotropin-Ausschüttung, zum Beispiel bei Nahrungsaufnahme, hemmt und somit den Regelkreis vervollständigt.

Die Wirkung des GH wird u.a über das hepatische IGF-1, das auch als Somatomedin C bezeichnet wird, vermittelt, welches ebenfalls über einen negativen Feedback hemmend auf die GH-Sekretion wirkt (53;60).

Wird dieser Regelkreis durch eine autonome Sekretion eines somatotropen Adenoms umgangen, kommt es zum Hyperpituitarismus, der sich je nach Lebensalter unterschiedlich äußert. Bei Auftreten vor dem Abschluss des Längenwachstums, kommt es zum Gigantismus mit Körperlängen über 2 Meter. Im Erwachsenenalter zeigt sich der GH-Exzess in der Akro- und Viszeromegalie.

Die medikamentöse Behandlung mit Somatostatin-Analoga (Octreotid) und GH-Rezeptor-Antagonisten (Pegvisomat) oder in letzter Instanz auch mit Dopaminagonisten (Bromocriptin) ist nur eingeschränkt erfolgreich (20). Die Variabilität des Ansprechens wird mit der unterschiedlichen Expression des Somatostatin-Rezeptor-Typ 2 (sst 2) erklärt, wobei ein positiver Rezeptorstatus mit einem gutem Ansprechen auf Octreotid oder Lanreotid hoch korreliert (21).

Daher bietet sich häufig eine operative Entfernung des Tumors an, was in bis zu 90% der Fälle zur Remission mit Normalisierung der GH- und IGF-Werte führt. Alternativ kann auf die konventionelle Röntgenbestrahlung, die Protonenbestrahlung oder die stereotaktische Radiochirurgie mit dem Gamma-knife zurückgegriffen werden (56).

Allgemein handelt es sich bei somatotropen Adenomen um Tumoren aus wachstumshormon-bildenden Zellen. Ein geringer Teil dieser Tumoren besteht aus gut differenzierten azidophilen Zellen und weist einen hohen Gehalt an endokriner Granula auf. Bei dem weitaus größeren Teil handelt es sich um wenig-granulierte, chromophobe Adenome, die aus pleomorphen Zellen bestehen (54).

Pathogenetisch wird in ca. 40% der Fälle eine Störung der GHRH-induzierten Signaltransduktion angenommen, indem es infolge einer Punktmutation des *gsp*-Onkogens, welches für eine Kette des G-Proteins kodiert, zur Dauerstimulation der STH-produzierenden Zellen kommt (54).

Als Modell wird die MtT/S-Zelllinie verwendet. Es handelt sich um eine Zelllinie, die aus somatotropen Tumoren der Rattenhypophyse etabliert wurde (Inoue *et al.*). Sie weist weitgehend die Merkmale normaler somatotroper Zellen auf. Sie produzieren ausschließlich GH und reagieren auf Stimulation bzw. Inhibition durch GHRH und IGF-1 (23;40;43).

Wie erwähnt wird auch häufig die GH-3-Zelllinie als Modell benutzt, da diese sowohl Somatotropin produzieren als auch den Somatostatin-Rezeptor exprimieren. Es konnte jedoch kein GHRH-Rezeptor nachgewiesen werden, was die Aussagekraft des Modells einschränkt.

2.2.4 ACTH-Zell-Adenome und die AtT-20-Zelllinie

Die auch als kortikotrope Adenome bezeichneten Tumoren machen 7% aller endokrin wirksamen Hypophysenadenome aus und treten bevorzugt bei Frauen in der 4. Lebensdekade auf (20). Physiologischerweise folgt die ACTH-Ausschüttung einem schlafunabhängigen zirkadianen Rhythmus mit einem Maximum in den frühen Morgenstunden. Auf Stimulation durch das hypothalamische CRH, das die Hypophyse über das portale Gefäßsystem erreicht, wird in den so genannten POMC-Zellen aus dem Vorläuferprotein POMC β -Endorphin, α -MSH und ACTH enzymatisch abgespalten und in äquimolaren Mengen sezerniert (66;69). Das ACTH gelangt über den allgemeinen Kreislauf an die Nebennierenrinde und stimuliert hier in erster Linie die Sekretion der Glukokortikoide. Diese hemmen wiederum die ACTH-Ausschüttung. Glukokortikoide spielen eine wichtige Rolle bei Stressreaktionen. Ihre metabolische Wirkung dient u.a. der raschen Bereitstellung von Energie. Als Summe aller Wirkungen resultiert eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Dafür werden Proteine aus Muskelgewebe und freie Fettsäuren für die hepatische Gluconeogenese bereitgestellt, sowie die periphere Glucoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe gehemmt (69). Die Leitsymptome der Stammfettsucht, des Vollmondgesichts und des Büffelnackens lassen sich also durch die

exzessiv erhöhten Kortisonspiegel erklären. Des Weiteren bestehen Osteoporose, Atrophie von Muskeln und Haut, arterielle Hypertonie und Wundheilungsstörungen bzw. erhöhte Infektanfälligkeit durch die antiphlogistische-immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide (20).

85% der Fälle eines endogenen Cushing-Syndroms sind ACTH-abhängig. In 70% der Fälle handelt es sich um ein zentrales Cushingsyndrom (= Morbus Cushing), d.h. in 80% um ein Mikroadenom des Hypophysenvorderlappens. Bei den restlichen Fällen wird eine primär hypothalamische Überfunktion bzw. eine Dysregulation des CRH-Rezeptor I diskutiert (11). Seltener Ursache eines Hyperkortisolismus ist eine ektope, paraneoplastische ACTH-Sekretion, meist im Rahmen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (20).

Das kortikotrope Adenom besteht aus ACTH-produzierenden Zellen. Diese zeichnen sich durch PAS-positive Granula aus. Pathogenetisch wird eine verminderte Expression des p27-Tumorsuppressorgens mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht (30;42). Möglicher pathogenetischer Faktor ist auch eine Überexpression des CRH-Rezeptors sowie des V_{1b}-Rezeptors, die in einigen kortikotropen Tumoren festgestellt werden konnte (28). Neuerdings wird eine verminderte Expression von BMP-4, das eine wichtige Rolle in der Organogenese der Hypophyse, sowie der Entstehung von Prolaktinomen spielt, als möglicher pathogenetischer Faktor angenommen (17).

Die AtT-20-Zelllinie hat sich als Modell für kortikotrope Hypophysentumoren bewährt. Sie wurde aus Hypophysenadenomen von Mäusen gewonnen und sezerniert ACTH (6;15).

2.2.5 Sonstige Hypophysentumoren

Die zentrale Hyperthyreose aufgrund eines TSH-produzierenden Hypophysenadenoms ist äußerst selten. Aus diesem Grund bestehen auch nur unzureichende Erkenntnisse über die Pathogenese. Drei verschiedene Erklärungsmodelle gehen von einer Hyperplasie-Adenom-Sequenz aus, wobei die erste Hypothese eine Überstimulation durch das hypothalamische TRH annimmt, die zweite eine Mutation des TSH-Rezeptors als Ursache sieht und die dritte von einem Schilddrüsenhormon-Resistenz-Syndrom aufgrund eines fehlerhaft gespliceten Thyreoid-Rezeptors ausgeht, wodurch das negative Feedback durch das Schilddrüsenhormon unterbrochen wird (28). Sehr selten ist auch eine paraneoplastische TSH-Produktion Ursache. Folge ist eine gesteigerte Ausschüttung von TSH und in deren Folge erhöhte Werte des Schilddrüsenhormons, was zu den typischen Symptomen der Struma, psychomotorischen Unruhe, Sinustachykardie, Gewichtsverlust und Wärmeintoleranz führt, da das

Schilddrüsenhormon durch Stimulation des gesamten Metabolismus des gesamten Körpers den Energieumsatz des Organismus steigert (56;69). Da eine kausale Therapie nicht bekannt ist, kann eine medikamentöse Therapie mit Thyreostatika (Propylthiouracil, Thiamazol, Carbimazol) versucht werden. Alternativ besteht die Möglichkeit eines operativen Vorgehens oder einer Radiatio (56).

Bei gonadotropen Adenomen handelt es sich um eine absolute Rarität und es soll nicht weiter darauf eingegangen werden.

Klinisch hormoninaktive Hypophysenadenome sind mit bis zu 30% sehr häufig. Man unterscheidet zwei Gruppen: Einerseits Tumore, deren Zellen in ihrer Ultrastruktur und Immunreaktivität den normalen Hypophysenzellen ähneln, jedoch klinisch stumm sind, und andererseits solche, deren Zellen keine Kennzeichen normaler Zellen der Adenohypophyse aufweisen (56).

Zu ersterer Gruppe gehören klinisch inaktive somatotrope, kortikotrope und gonadotrope Adenome. Zu letzteren zählen Null-Zell-Adenome und Oncocytome, die eine Variante der Null-Zell-Adenome darstellen. Beide leiten sich von pluripotenten Vorläuferzellen ab, die sich in meisten Fällen zu FSH-produzierenden Zellen differenzieren (3).

In dieser Arbeit wurden hormoninaktive Adenome v.a. immunhistochemisch untersucht.

2.3 Auto- und parakrin wirkende Faktoren der Hypophyse

Die Hypophyse wird nicht nur durch extrahypophysäre Einflüsse reguliert, sondern unterliegt auch der Kontrolle eines intrinsischen Systems. In den letzten Jahren konnten zahlreiche Wachstumsfaktoren, Zytokine, vasoaktive Substanzen und Neuropeptide nachgewiesen werden, die von den endokrinen und den follikulostellaren Zellen der Hypophyse synthetisiert und sezerniert werden. Letztere nehmen eine Schlüsselrolle in der parakrinen Kontrolle der Hypophysenfunktion ein (22;52). So wurden sie u.a. als Hauptquelle von bFGF (14), VEGF (13), Interleukin-6 (13) und Interferon- γ (63;64) identifiziert. Als Modell hat sich die TtT/GF-Zelllinie bewährt (29).

Einen Überblick über die wichtigsten Substanzen, die nachweislich von normalen oder adenomatösen Hypophysenzellen synthetisiert werden, gibt Tab.2. Da auch in den meisten Fällen entsprechende Rezeptoren exprimiert werden, wird eine auto- bzw. parakrine Wirkungsweise dieser Faktoren angenommen (47).

Das intrinsische System erfüllt zahlreiche Aufgaben. So spielt es eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung der Hypophyse. Später wirkt es modulierend auf die endokrinen Regelkreise, die hypophysäre Antwort auf extrinsische Stimuli sowie auf interaktive Prozesse zwischen Immunsystem und endokrinem System auf Hypophysenebene (51). Allgemein ist das intrahypophysäre System an der physiologischen Anpassung der Hypophyse während der Entwicklung und Gestation, der zelluläre Organisation des Organs, der Regeneration und Proliferation, d.h. die Kontrolle des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Mitose, sowie der Kontrolle der Angiogenese beteiligt (52;65).

Daraus wird verständlich, dass es sich bei der Expression dieser Faktoren und ihrer Rezeptoren um einen dynamischen Prozess handelt, der durch extrahypophysäre Einflussgrößen und Rahmenbedingungen wie Embryogenese und postnatale Entwicklung, aber auch im Laufe des Menstruationszyklus, der Schwangerschaft, während Stress oder infektiöser Prozess gehemmt oder verstärkt wird und somit stärkeren Schwankungen unterliegt (51;52).

Da Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener Faktoren und Rezeptoren in zahlreichen Hypophysenadenomen festgestellt werden konnten, wird ihnen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie und Progression hypophysärer Neoplasien zugeschrieben, auch wenn ein kausalpathogenetischer Zusammenhang als eher unwahrscheinlich gilt (47).

Tab.2: Auswahl auto- und parakrin wirksamer Substanzen, die in normalen und/oder adenomatösen Hypophysenzellen nachgewiesen wurden, und ihre Wirkung. Bei FGF, EGF, PDGF und TGF- α handelt es sich um sog. Kompetenzfaktoren, die die Überführung der Zelle von der G₀- in die G₁-Phase fördern, während IGF auch als Progressionsfaktor bezeichnet wird, weil er den Beginn der S-Phase einleitet

Substanzgruppe	Substanz	Wirkung
Polypeptidwachstumsfaktoren	IGF 1	· Mitogene Wirkung auf viele Zellen · Modulation der Zelldifferenzierung
	bFGF	· Mitogene Wirkung auf viele Zellen · Modulation der Zelldifferenzierung
	EGF	· Mitogen für viele Zellarten
	NGF	· Förderung des Überleben und der Differenzierung sympathischer und sensorischer Neurone · Förderung der Regeneration motorischer Neuronen
	PDGF	· Mitogene Wirkung auf mesenchymale Zellen
	TGF- α	· Mitogen für viele Zellarten
	TGF- β	· Wachstumsinhibitor für viele Zellarten · Chemotaktische Wirkung
	VEGF	· Regulierung der Gefäßpermeabilität und der Angiogenese
Zytokine	Interleukine	· Mitogene und differenzierende Wirkung auf verschiedene Zelltypen · Stimulation der Hormonsekretion in Hypophysenzellen

2.4 Die TGF- β -Familie

Die TGF- β -Familie umfasst mehr als 30 Mitglieder, zu denen unter anderem TGF- β , Activin, Inhibin und BMP-4 zählen (17;51). Sie regulieren Wachstum, Differenzierung, Apoptose, Migration, die Sekretion wichtiger Moleküle wie Bestandteile der extrazellulären Matrix, Adhäsionsmoleküle, Hormone und Zytokine in einer Vielzahl verschiedener Zellen, die an der Morphogenese, Wundheilung, Tumorsuppression und Immunregulation beteiligt sind (44). Pathogenetisch wird eine Beteiligung an der Tumorgenese des Mamma-Karzinoms, des Lymphoms und des kolorektalen Karzinoms angenommen (9). In der Hypophyse spielen sie eine wichtige Rolle als Modulatoren der Funktion und des Wachstums normaler und adenomatöser Zellen (51).

Die Entdeckung von TGF- β -1 vor zwanzig Jahren führte zu einem tieferen Einblick in zahlreiche zelluläre Vorgänge (19). Inzwischen wurden drei TGF- β -Isoformen (TGF- β -1, TGF- β -2, TGF- β -3) mit verschiedenen biologischen Effekten auf das Epithel, Endothel, lymphatisches, myeloisches und mesenchymales Gewebe, differenziert (50). Sie werden aus drei verschiedenen Precursor-Proteinen von 124 Aminosäuren, die über weite Strecken Homologien aufweisen, synthetisiert. In biologisch aktiver Form liegen sie als Homodimere vor (39;67).

Die Mechanismen, über die TGF- β seine komplexen, zum Teil gegensätzlichen regulierenden und modulierenden Wirkungen entfaltet, sind noch nicht vollständig geklärt (19). So sind die TGF- β -Isoformen an zahlreichen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen in unterschiedlichsten Geweben beteiligt. Allgemein spielen sie eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und Organogenese, der Kontrolle von Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose, bei der Wundheilung und dem Remodelling und der Carcinogenese. Beispielsweise sind sie für den Immunglobulinklassenwechsel zu IgA in B-Lymphozyten verantwortlich und an der Regulation der Synthese von Akut-Phase-Proteinen beteiligt. TGF- β beeinflusst auch die autokrine Stimulation von Osteoblasten und die Biosynthese und Abbau von Kollagen und Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix, weswegen ihm auch eine pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung von Atherosklerose und Kardiomyopathien zugesagt wird (36).

In der Hypophyse wurden bisher hauptsächlich die TGF- β -Expression und ihre Wirkung in lactotropen Zellen bzw. Prolaktinomen sowie in follikulostellaren Zellen untersucht. Über ein komplexes Gleichgewicht aus externen Stimuli und im Expressionsmuster der TGF- β -Isoformen sowie ihrer Rezeptoren scheint der Gesamteffekt in einer Inhibition der

Zellproliferation und –funktion zu liegen, während in Adenomen das Überwiegen eines stimulierenden Effektes festgestellt werden konnte (51).

In normalen lactotropen Zellen inhibiert TGF- β -1 die Prolaktinproduktion und Proliferation der Zellen, während TGF- β -3 eine antagonistische Wirkung hat. Die Suppression der Zellproliferation und Differenzierung erfolgt über eine gesteigerte Expression des Retinoblastom-Tumor-Suppressor-Gens, was wiederum eine verminderte Expression des c-myc Protoonkogens zur Folge hat. Dadurch wird der Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus verhindert und sie verweilt in der späten G₁-Phase. In Tumorzellen kann TGF- β -1 die c-myc-Expression nicht mehr unterdrücken, es überwiegen die stimulierenden Effekte von TGF- β -3 und es kommt zur Zellproliferation. Da festgestellt werden konnte, dass in Prolaktinomzellen die Expression von TGF- β -1 und des TGF- β -Rezeptor Typ II, über den die inhibitorischen Effekte von TGF- β -1 vermittelt werden, reduziert ist, nimmt man an, dass die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den TGF- β -Isoformen und ihren Rezeptoren zu Gunsten von TGF- β -3 und dem TGF- β -Rezeptor Typ I, einen pathogenetischen Faktor in der Tumorgenese und insbesondere in der Tumorprogression von Hypophysenadenomen darstellt. Dieser Expressionsshift ist östrogenabhängig. Es konnte gezeigt werden, dass mit Östrogen behandelte lactotrope Zellen eine verminderte Expression von TGF- β -1 und des TGF- β -Rezeptor Typ II aufweisen. Dies könnte den pathogenetischen Mechanismus der Entstehung östrogen-induzierter Prolaktinome darstellen, wie sie an Fisher-344-Ratten gezeigt werden konnte. Über TGF- β -2 ist bisher wenig bekannt. Diese Isoform scheint in normalen sowie adenomatösen lactotropen Zellen die Prolaktin-RNA-Expression zu unterdrücken. Der genaue Mechanismus ist unbekannt (10;19).

Wie erwähnt, stellen die follikulostellaren Zellen eine weitere Quelle für TGF- β dar. Auch sie exprimieren beide TGF- β -Rezeptor Typen. Über sie werden die indirekten Wirkungen von TGF- β vermittelt. TGF- β -1 reguliert die Proliferation und die Leptinexpression in FS-Zellen, während TGF- β -3 die bFGF-Expression fördert. Beide Isoformen regen die VEGF-Produktion an. Dieser Prozess ist durch Östrogen induzierbar und durch Glukokortikoide hemmbar (50). Damit lassen sich die indirekte Wirkung von TGF- β und die Beteiligung an der Tumorenstehung erklären. bFGF stellt nicht nur einen potenten angiogenetischen Faktor da, sondern stimuliert außerdem die Prolaktinproduktion sowie die Proliferation lactotroper Zellen. Patienten mit sporadischen Hypophysentumoren sowie Adenomen im Rahmen einer MEN1 wiesen signifikant erhöhte Spiegel an bFGF auf, was ebenfalls ein Hinweis auf die pathogenetische Bedeutung dieses Faktors in der Tumorgenese darstellt (52). VEGF ist der wichtigste Regulator der Gefäßpermeabilität und der Angiogenese. VEGF wird in der

normalen Hypophyse ausschließlich in FS-Zellen gebildet, während in Adenomen auch Tumorzellen zur Herstellung dieses Faktors befähigt sind. Da VEGF-Rezeptoren vorwiegend von Endothelzellen exprimiert werden, könnte VEGF eine wichtige Rolle in der Angiogenese in Tumoren und damit bei deren Progression spielen (52).

Eine vereinfachte Darstellung der Interaktion zwischen FS-Zellen und lactotropen Zellen via TGF- β sowie des Einflusses durch Östrogen bzw. Östradiol zeigt Abb.3.

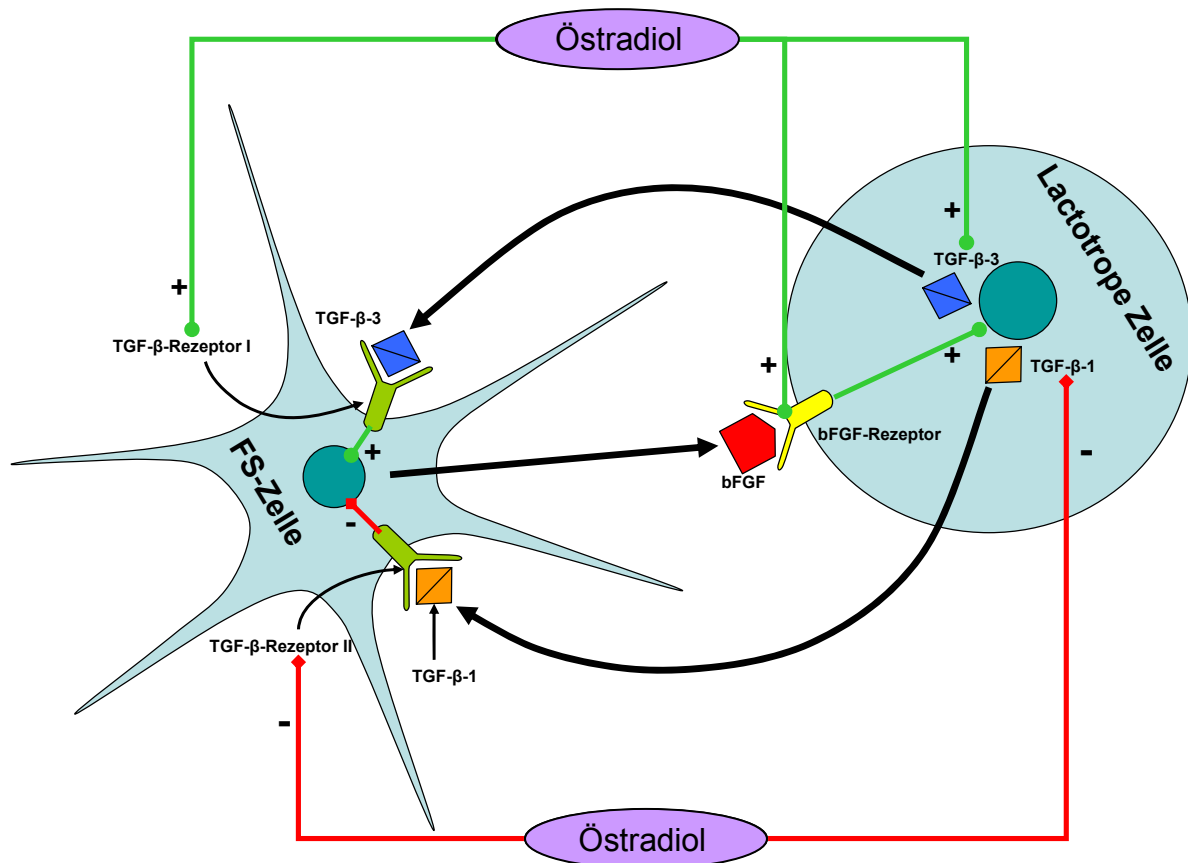


Abb.3: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen FS-Zellen und lactotropen Zellen. TGF- β -1 hemmt über den TGF- β -Rezeptor Typ II die bFGF-Ausschüttung durch FS-Zellen, während TGF- β -3 über den TGF- β -Rezeptor Typ I die bFGF-Sekretion fördert. bFGF bewirkt eine Steigerung der Proliferation und der Prolaktinproduktion in lactotropen Zellen. Gesteuert werden diese Prozesse durch Östradiol, das einerseits die TGF- β -1-Expression und des TGF- β -Rezeptor Typ II hemmt, andererseits die Expression von TGF- β -3, des TGF- β -Rezeptor Typ I sowie die des bFGF-Rezeptors fördert.

2.5 Die TGF- β -Rezeptoren

TGF- β -Isoformen entfalten ihre Wirkung über einen heterodimeren Komplex aus TGF- β -Rezeptor Typ I und II. Es handelt sich um transmembrane Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Beide Rezeptoren sind ubiquitär vorhanden, jedoch scheint der TGF- β -Rezeptor Typ II in verschiedenen Tumoren wie dem Retinoblastom, Neuroblastom, dem Leberzelladenom, in einigen Brustkrebs-Zelllinien sowie in Prolaktinomen und der GH-3-Zelllinie reduziert zu sein (19).

Das Vorhandensein beider Rezeptoren ist für ihre Funktion notwendig. Der TGF- β -Rezeptor Typ I scheint den TGF- β -Rezeptor Typ II für die Ligandenbindung zu benötigen, während der TGF- β -Rezeptor Typ I für die Signaltransduktion unabdingbar ist. Nach Ligandenbindung phosphoryliert der TGF- β -Rezeptor Typ II den TGF- β -Rezeptor Typ I, worauf dieser zytoplasmatische, TGF- β -Rezeptor spezifische Proteine der Signaltransduktion phosphoryliert (9;19;41).

TGF- β -1 und 3 haben antagonistische Wirkungen. TGF- β -1 hemmt Proliferation und Funktion verschiedener Zellen, während TGF- β -3 diese fördert. Diese gegensätzliche Wirkungsweise lässt sich durch die unterschiedliche Affinität der TGF- β -Isoformen zu den Rezeptoren erklären. TGF- β -1 kann nur durch sehr hohe Konzentrationen von TGF- β -3 vom TGF- β -Rezeptor Typ II verdrängt werden, was für eine höhere Affinität von TGF- β -1 zu diesem Rezeptor spricht. In hohen Konzentrationen wirkt TGF- β -3 ebenfalls hemmend auf die Proliferation und Funktion. Die inhibierende Wirkung von TGF- β -1 scheint auch hauptsächlich durch den TGF- β -Rezeptor Typ II vermittelt zu werden. Diese Annahme wird verstärkt durch die Feststellung, dass in vielen Tumorzellen die TGF- β -Rezeptor-Typ-II-Dichte stark reduziert ist, was ein fehlendes Ansprechen auf TGF- β -1 zur Folge hat. Eine Mutation des TGF- β -Rezeptors Typ II als Ursache der TGF- β -1-Resistenz in Hypophysentumoren konnte nicht bestätigt werden (18).

TGF- β -2 scheint dagegen insgesamt eine niedrigere Affinität als TGF- β -1 und 3 zum TGF- β -Rezeptor Typ II zu haben (49)

Zusammenfassend, scheint die deutlich reduzierte Anzahl des TGF- β -Rezeptors Typ II in Prolaktinomen eine wichtige pathogenetische Rolle in der Tumorgenese zu spielen. So entwickelten TGF- β -Rezeptor Typ-II Knock-out-Mäuse im Gegensatz zur Kontrollgruppe unter Östrogenbehandlung rasch lactotrope Hypophysenadenome (18).

An der Bindung der TGF- β -Isoformen ist auch das Betaglycan (der auch TGF- β -Typ-III-Rezeptor genannt wird, jedoch nicht zu den klassischen TGF- β -Rezeptoren gehört) und Endoglin beteiligt, deren genaue Bedeutung jedoch noch unklar ist (49).

2.6 Die Signaltransduktion

Nach Ligandenbindung phosphoryliert und aktiviert, wie unter 2.5 beschrieben, der TGF- β -Rezeptor Typ II den TGF- β -Rezeptor Typ I. Der aktivierte Rezeptor wiederum phosphoryliert nun zytoplasmatische, an der Signaltransduktion beteiligte, rezeptorspezifische Proteine, die sog. Smads. Der Name leitet sich von dem Drosophila- MAD- und dem C. elegans- SMA-Gen ab, als deren Produkt sie als erstes identifiziert werden konnten. Sie bilden das einzige Substrat des TGF- β -Rezeptor Typ I und vermitteln somit die komplexen Wirkungen von TGF- β . Das menschliche Genom kodiert für acht Smad-Proteine, die während der gesamten Entwicklung sowie im adulten Gewebe exprimiert werden. Smad 2, 4, 5 und 8 werden durch alternatives RNA-Splicing hergestellt (41).

Funktionell werden die Smads in drei Gruppen eingeteilt: rezeptoraktivierte Smads (R-Smads: Smad 1, 2, 3, 5 und 8), common mediator Smad (Co-Smad: Smad 4), das auch an der Signaltransduktion anderer Mitglieder der TGF- β -Superfamilie beteiligt ist (50), und inhibitorische Smads (I-Smads: Smad 6 und 7) (41).

Unphosphorylierte Smads liegen als Monomere vor. Nach Aktivierung durch den TGF- β -Rezeptor Typ I bilden R-Smads zunächst Homo-Oligomere und schließlich Hetero-Oligomere. Die Phosphorylierung wird durch akzessorisch Proteine sowie Gerüstproteine, wie zum Beispiel SARA, unterstützt und reguliert.

Zunächst bilden Smad 2 und Smad 3 einen Komplex und gehen dann eine Bindung mit dem phosphorylierten Co-Smad ein. Hierauf wird der hetero-oligomere Komplex Co-Smad-vermittelt in den Zellkern transloziert. Dort interagiert er mit verschiedenen DNA-Bindungsproteinen, Coaktivatoren bzw. -repressoren und induziert oder supprimiert somit die Transkription zahlreicher Zielgene. I-Smads übernehmen eine kompetitive Rolle zu den R-Smads am Rezeptor im Sinne eines negativen Feedbacks und markieren den Rezeptor mit Ubiquitin für die Degradierung, während die R-Smads unter dem Einfluss von sog. Smurf inaktiviert werden (41).

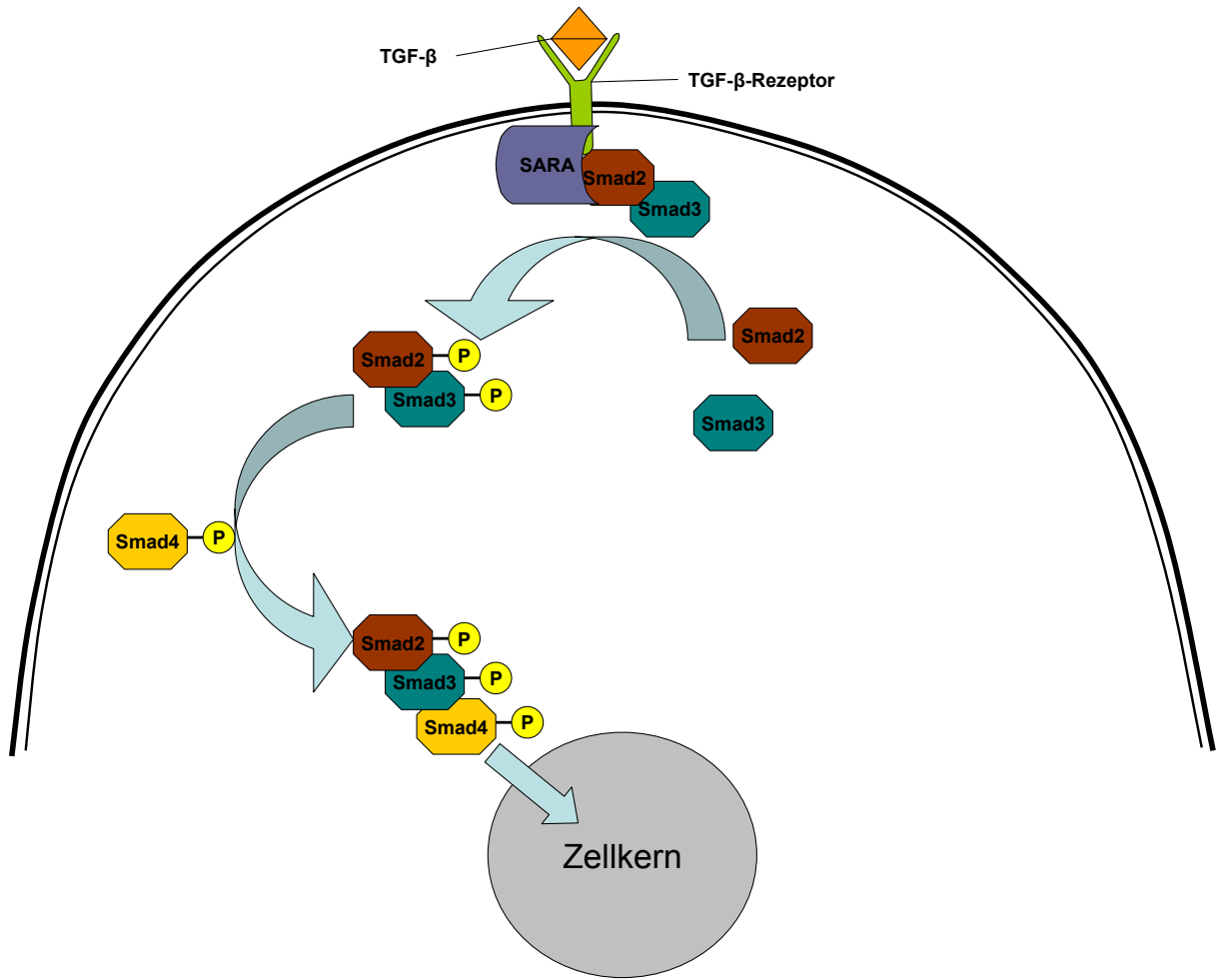


Abb.4: Schematische Darstellung der TGF-β-vermittelten Signaltransduktion durch Smad-Proteine. Einzelheiten siehe Text.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Schon seit einigen Jahren wurde man sich der Bedeutung einer hormoneller Dysregulation von proliferationsfördernden und –hemmenden Faktoren als pathogenetischer Mechanismus in der Tumorgenese bewusst. In letzter Zeit fiel das Augenmerk insbesondere auf para- und autokrin wirkende Faktoren und deren Rezeptoren, die die Funktion, Angiogenese und Proliferation von Zellen steuern. Es konnte eine Veränderung bzw. eine Dysbalance verschiedener Faktoren und Rezeptoren festgestellt werden, die darauf hindeutet, dass sie an der Pathophysiologie und Progression von Tumoren beteiligt ist. Dies trifft auch auf Hypophysenadenome zu (51).

Insbesondere TGF- β scheint eine entscheidende Rolle in der Entstehung und beim Wachstum von Hypophysentumoren zu spielen. Bisher beschränkten sich die Untersuchungen fast ausschließlich auf Prolaktinome. Hier konnte am Modell der Fischer-344-Ratte gezeigt werden, dass es unter Östrogeneinfluss zu einer Verschiebung der Balance der Rezeptorisoformen sowie dem Verhältnis der Expression zwischen den TGF- β -Isoformen zu Gunsten von TGF- β 3 kommt, wodurch der antiproliferative Effekt von TGF- β 1 reduziert wird, was als pathogenetischer Faktor in der Entstehung von Prolaktinomen gedeutet wurde (19).

In dieser Arbeit möchte ich eine Dysregulation im Sinne eines veränderten Verhältnisses in der Expression bzw. Funktion der TGF- β -Isoformen und seiner Rezeptoren in menschlichen Hypophysentumoren unterschiedlicher Entität und in entsprechenden Zelllinien nachweisen. In bisherigen Arbeiten konnte ein pathogenetischer Zusammenhang ausschließlich im Tierexperiment und v.a in Prolaktinomen festgestellt werden. Hier sollen systematisch verschiedene menschliche Tumoren untersucht werden. Zunächst soll mittels Immunhistochemie die relative Quantität TGF- β -positiver Zellen von Hypophysentumoren verschiedener Entität im Vergleich zum Normalgewebe untersucht werden. Auf molekularer Ebene soll mittels PCR nachgewiesen werden, ob in entsprechenden Zelllinien, die als Modell dienen sollen, die TGF- β -Isoformen und ihre Rezeptoren tatsächlich exprimiert werden. Schließlich wird anhand von Stimulations- und Wachstumsexperimenten gezeigt werden, welchen Einfluss die TGF- β -Isoformen auf das Wachstum und die Hormonsekretion der o.g. Zelllinien haben. Insbesondere auf die bei bisherigen Studien weitgehend ignorierte Isoform TGF- β 2 soll eingegangen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Material

Brutschrank	Cytoperm 8080. (Heraeus GmbH, Hanau , Deutschland)
ELISA-Reader	Dynatech MR 5000, (Dynatech, Denkendorf, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Sebatech Varifuge 3.2 RS, (Heraeus, Osterode, Deutschland)
Mikroskop	Axioskop 2, (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland)
Mikrotom	Kryostat Leica CM 3050 S, (Leica Microsystem Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)
Multipipetten	Eppendorf, (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage	1601 MP8, (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Rundschüttler	Infors, (Bottmingen, Schweiz)
Spektrophotometer	Pharmacia, (Freiburg, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank	Laminar Flow Typ UVF 6.18 S, (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Genkingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 C, (Eppendorf- Nethler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge	J2-21 M/E Zentrifuge, (Beckmann Instr., Fullerton, CA, USA)
UV-Transilluminator	Herolab UVT 2035 (Herolab GmbH Laborgeräte, Ludwig Wagnerstr.12, Wiesloch)
Wasserbäder	Köttermann Labortechnik, (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zellkulturflaschen	Nunc, (Dänemark)

Zellkulturmaterial	Nunc, (Dänemark)
Zellkulturplatten	Falcon, (Heidelberg, Deutschland)
Zellschaber	Renner, (Dennstadt, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Falcon, (Heidelberg, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien

Amphotericin B	Biochrom, (Berlin, Deutschland)
Ascorbinsäure	Sigma, (St.Louis, Mo, USA)
BSA	Paesel, (Frankfurt, Deutschland)
DMEM	Sigma, (St.Louis, Mo, USA)
FCS	Gibco Europe, (Karlsruhe, Deutschland)
Insulin Actrapid HM	Novo, (Mainz, Deutschland)
PCR-Reagenzien	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, (Berlin, Deutschland)
Roti-®-Histokit	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe, Deutschland)
RT-Reagenzien	Invitrogen GmbH, (Karlsruhe, Deutschland)
Steriles Wasser	B.Braun Melsungen AG, (Melsungen, Deutschland)
T3	Sigma, (St.Louis, Mo, USA)
Transferrin	Sigma, (St.Louis, Mo, USA)
Trypsin	Sigma, (St.Louis, Mo, USA)
Glutamin	Sigma, (St.Louis, Mo, USA)
PBS	Gibco Europe, (Karlsruhe, Deutschland)
WST- Reagenz	Roche Molecular Biochemicals, (Penzberg, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde aus verschiedenen neurochirurgischen Zentren bezogen. Dabei wurde ein Teil des Gewebes bei -80°C für die RNA-Extraktion aufbewahrt, ein anderer Teil für die immunhistochemische Untersuchung schockgefroren. Es wurden Gefrierschnitte humaner lactotroper (7), somatotroper (6), kortikotroper (3), TSH-produzierender (2) sowie hormoninaktiver Hypophysenadenome (22) verwendet. Als Kontrolle dienten Schnitte normaler Hypophysen (2), die mit freundlicher Unterstützung von *Prof. Eisenmenger* von der Gerichtsmedizin München zur Verfügung gestellt wurden. Einen Überblick über den Ursprung und die Art des Tumorgewebes gibt Tab.3.

Tab.3: Die Tabelle gibt Auskunft über die Tumornummer, die Patienten, das Operationsdatum bzw. das Datum des Erhalts des Tumorgewebes sowie Art des Tumors. HI = hormoninaktives Adenom, Acro = somatotropes Adenom, PRL = Prolaktinom, Cush = kortikotropes Adenom.

	NR	Alter	OP	TYP
1	496	29	05.09.1997	TSH
2	498	51	10.09.1997	HI
3	519	64	29.10.1997	TSH
4	523	37	05.11.1997	HI
5	535	49	09.12.1997	HI
6	538	46	11.12.1997	HI
7	551	35	11.02.1998	HI
8	552	68	10.02.1998	HI
9	558	53	10.03.1998	HI
10	566	76	27.04.1998	HI
11	567	39	24.04.1998	HI
12	569	47	01.05.1998	HI
13	571	49	07.04.1998	MakroPRL
14	574	60	18.05.1998	HI
15	579	61	08.06.1998	HI
16	582	31	19.06.1998.	HI
17	585	49	30.06.1998	HI
18	587	37	15.07.1998	HI
19	591	43	14.08.1998	PRL
20	600	51	08.09.1998	HI

	NR	Alter	OP	TYP
21	609	59	29.10.1998	HI
22	610	1	29.10.1998	HI
23	623	28	10.12.1998	PRL
24	624	58	09.12.1998	Acro
25	629	65	11.01.1999	HI
26	644	29	19.02.1999	MakroPRL
27	693	46	26.08.1999	Cush
28	706	41	12.11.1999	PRL
29	709	38	22.11.1999	MakroPRL
30	712	38	01.12.1999	Acro
31	719	69	12.01.2000	HI
32	721	60	17.01.2000	Cush
33	722	50	21.01.2000	HI
34	725	30	23.02.2000	Acro
35	738	29	02.05.2000	Acro
36	748	52	18.07.2000	Cush
37	749	26	25.07.2000	Micro PRL
38	750	52	25.07.2000	Acro
39	842	43	18.12.2001	HI
40	861	60	05.02.2002	Acro

3.2.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Nachweisverfahren werden zur Überprüfung der Proteinexpression und zur Visualisierung der Proteinverteilung bzw. der Intensität ihrer Expression in Zellen und im Gewebe eingesetzt. Die Technik beruht auf einer Immunreaktion eines ersten Antikörpers (Primärantikörper), der spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Ein zweiter Antikörper (Sekundär-Antikörper), der zur Katalysierung der Farbreaktion Enzym- oder Chromogen-gekoppelt ist, reagiert hierauf mit dem ersten. Der Sekundär-Antikörper muss gegen das Protein des Tieres gerichtet sein, aus dem der Primär-Antikörper gewonnen wurde, um diesen spezifisch zu markieren. In dieser Arbeit handelt es sich bei dem Primär-Antikörper um polyklonales Immunglobulin G, das aus Kaninchen gewonnen wurde und spezifisch gegen die jeweilige TGF- β -Isoform gerichtet ist, während der Sekundär-Antikörper aus Ziege gewonnen und in diesem Fall mit Peroxidase als Enzym gekoppelt wurde. Zur Visualisierung wurde die Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode angewandt (siehe Abb.5). Zunächst wurden im Mikrotom 8 μ m dicke Gefrierschnitte hergestellt, auf einen Objektträger übertragen und für eine Stunde getrocknet. Im zweiten Schritt erfolgte eine Fixierung in 4% Paraformaldehyd für 5 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und dann 5 Minuten in 70% Ethanol inkubiert. Hierauf erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (80% Ethanol, 70% Ethanol und 50% Ethanol) für jeweils 5 Minuten, worauf die Schnitte erneut zweimal in PBS-Pufferlösung gewaschen wurden. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten in mit 3% H₂O₂ versetztem PBS inkubiert. Nach erneutem 5 minütigen Waschen in TBS (Trispuffer) wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift umfahren und anschließend, zur Blockierung unspezifischer Epitope, mit jeweils 100 μ l Ziegenserum für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abschütteln des Serums wurden die Schnitte bei 4°C für zwölf Stunden mit jeweils 100 μ l des verdünnten Primär-Antikörper inkubiert. Die Verdünnung in TBS erfolgte für den Nachweis der einzelnen TGF- β -Isoformen folgendermaßen:

Tab.4: Verdünnungsverhältnis der Antikörper

Antikörper	Verdünnungsverhältnis
TGF- β -1	1 : 100
TGF- β -2	1 : 500
TGF- β -3	1 : 100

Dann wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS gewaschen. Hierauf wurden die Schnitte mit jeweils 100µl des im Verhältnis 1 : 100 in TBS verdünnten Sekundär-Antikörper für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde der ABC-Komplex vorbereitet (je nach Menge der zu färbenden Schnitte unterschiedliche Volumen aus Avidin, Biotin und TB(NaPO₄ 0.05M pH 7,4) nach Angaben des Herstellers). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS, wurde für 30 Minuten mit dem ABC-Komplex inkubiert und dann erneut gewaschen. Dann wurden die Präparate in einer Lösung aus 2 ml DAB (Diaminobenzidin), 98ml TB und 33µl H₂O₂ unter Lichtausschluss inkubiert, welches dabei durch die Antikörpergebundene Peroxidase in ein braunes, mikroskopisch fassbares Präzipitat übergeht. Die Inkubationszeit wurde fallweise unter mikroskopischer Kontrolle der Färbeintensität festgelegt.

Zur Erhöhung des Kontrastes der Präparate wurde abschließend eine Kerngegenfärbung durchgeführt. Zuerst wurden die Schnitte für 5 Minuten in Aqua dest. getaucht, um anschließend für 15 Minuten mit 1%igem Toluidinblau gegengefärbt zu werden. Hierauf erfolgte ein erneutes kurzes zweimaliges Spülen in Aqua dest. und dann eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96% und 100%) für jeweils 30 Sekunden. Abschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation in Xylol mit anschließendem Eindecken und Aushärten der Präparate.

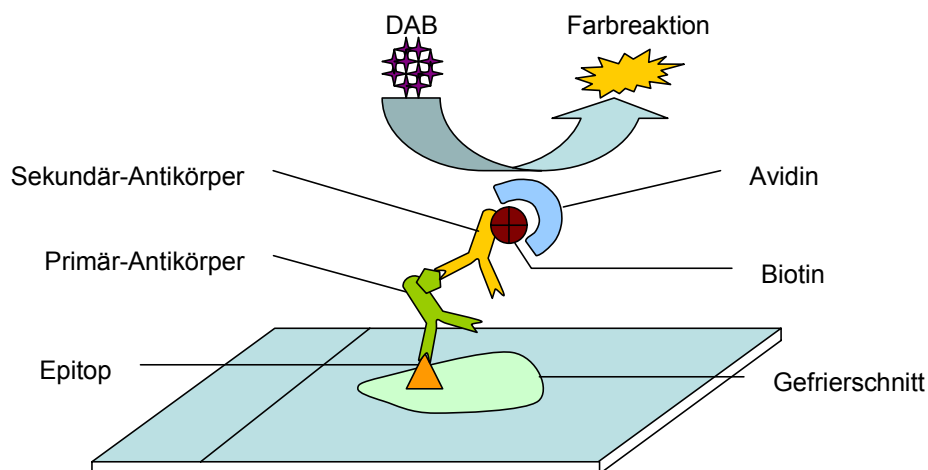


Abb.5: Schematische Darstellung des Prinzips der Immunhistologie nach der Avidin-Biotin Methode.

3.2.3 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Zur Isolierung der RNA werden die zum Monolayer gewachsenen Zellen der jeweiligen Zelllinie zunächst mit Trypsin vom Kulturflaschenboden gelöst, in 10ml Kulturmedium für 4 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Nach Resuspendierung in Kulturmedium und Umfüllung in 2ml-Eppendorf-Tubes, erfolgt wiederum eine Zentrifugation mit anschließender Abpipettierung des Überstandes. Hierauf werden die Zellen in 1ml Trizol resuspendiert und anschließend bei 4°C und 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in frische Tubes transferiert. Zur Phasentrennung werden die Proben zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, worauf pro Tube 200µl Chloroform hinzugefügt werden und anschließend per Hand gut durchgeschüttelt wird. Es folgt eine weitere Inkubation von 3 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend eine Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm für 15 Minuten.

Als nächster Schritt folgt die RNA-Präzipitation. Dazu wird die wässrige Phase in ein frisches Tube pipettiert und 500µl Isopropylalkohol hinzugegeben. Es folgt eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm für 10 Minuten.

Nachdem der Überstand verworfen wurde, werden die Proben gewaschen. Dazu wird 1ml 80%iger Alkohol zugegeben, gut geschüttelt und anschließend wieder bei 4°C und 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Im letzten Schritt wird das RNA-Extrakt wieder gelöst. Dazu wird das Zentrifugat bei 65 °C im Termoblock getrocknet, anschließend in 30 µl sterilem DEPC-Wasser gelöst und für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Es folgt eine Überprüfung auf DNA-Kontamination mittels PCR (siehe 4.4). Als Kontrolle dient das ubiquitär vorhandene β -Actin oder die GAP-DH (Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase).

Da für die PCR jedoch DNA und keine RNA benötigt wird, erfolgt nun eine Umschreibung mittels RT. Dazu wird zunächst die RNA-Konzentration der Proben mittels Photometrie gemessen. Entsprechend der Konzentration wird in ein 1,5ml-Eppendorf-Tube ein Volumen pipettiert, das 1µg RNA enthält und anschließend mit Aqua dest. auf ein Zielvolumen von 10µl aufgefüllt wird. Hierauf werden 4 µl Puffer, 1µl dNTPs, 2µl DTT, 2 µl Hexanucleotide sowie 1µ RT hinzugegeben und gut geschüttelt. Es folgt eine Inkubation für 60 Minuten bei 45 °C. Abschließend wird das Reaktionsgemisch für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Die somit erhaltene DNA kann nun für den nächsten Schritt, die PCR, verwendet werden.

3.2.4 Untersuchung der Expression von TGF- β und seiner Rezeptoren mittels PCR und Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion, die 1984 durch Kary Mullis etabliert wurde, kann eine Nukleotidsequenz selektiv und schnell in großen Mengen aus jeder DNA, in der sie enthalten ist, repliziert werden. Diese Technik wird in der Klinik vielfach bei diagnostischen Tests, wie zum Nachweis von Viren, eingesetzt, da es sich um eine äußerst empfindliche Methode handelt, die selbst eine einzige Virus-Kopie nachweisen kann. Allerdings ist deshalb auch die Gefahr der Amplifizierung unspezifischer Signale durch Kontamination sehr groß. In der Forschung lassen sich mit ihr u.a. neue Gene identifizieren oder auch charakteristische DNA-Sequenzen einzelner Zellen bestimmen (35). Die PCR läuft in drei Grundschritten ab: Denaturierung, Anheften der Oligonukleotide und Extension (siehe Abb.6). Sie basiert auf der Verwendung thermostabiler DNA-Polymerase, die aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* gewonnen wird und deswegen auch Taq-Polymerase genannt wird. Sie machte es möglich, viele PCR-Zyklen in Sequenz laufen zu lassen, da sie den Schritt der Denaturierung bei über 90 °C unbeschadet übersteht, so dass nicht nach jedem Zyklus erneut Polymerase hinzugegeben werden muss.

Für einen μl Probe werden 8,95 μl steriles Wasser, 1,5 μl 10xPuffer, 0,9 μl MgCl_2 (25mM), 1,5 μl dNTPs (2mM), 0,5 μl Primer (10 pmol/ μl) sense, 0,5 μl Primer (10 pmol/ μl) antisense sowie 0,15 μl Taq-Polymerase. Einen Überblick über die verwendeten Primer gibt Tab.5.

Tab.5: Sequenz der verwendeten Primer und Produktlänge des amplifizierten cDNA-Fragments. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie sich sowohl für Genmaterial aus Ratte wie auch Mäusen eignen.

Ziel	Primer-Sequenz (5'→3')	Produktlänge (bp)
TGF- β -1	5': GCT GCG CTT GCA GAG ATT AAA 3': TTG CTG TAC TGT GTG TCC AG	552
TGF- β -2	5': CCG AAG ACT TAA CAT CTC CCA CC 3': GTT CGA TCT TGG GCG TAT TTC	684
TGF- β -3	5': GCT CTT CCA GAT ACT TCG AC 3': AGC AGT TCT CCT CCA GGT TG	440
TGF- β -Rezeptor Typ I	5':ATC CAT CAC TAG ATC GCC CT 3': CGA TGG ATC AGA AGG TAC AAG A	824
TGF- β -Rezeptor Typ II	5': CGT GTG GAG GAA GAA CAA CA 3':TCT CAA ACT GCT CTG AGG TG	560

Die einzelnen Reaktionszyklen dauern jeweils 60 Sekunden und werden automatisiert durch den Thermocycler durchgeführt. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94 °C aufgeschmolzen, so dass nur noch Einzelstränge vorliegen (Denaturierung). Nach Abkühlen auf 65 °C im Falle der TGF- β -Isoformen und auf 57 °C im Falle der Rezeptoren können nun die Primer an DNA-Einzelstränge spezifisch binden (Annealing). Es handelt sich um Oligonukleotide, die der Taq-Polymerase als Startsequenz dienen.

Im dritten Schritt wird Sequenz an den Primern beginnend bei 72 °C unter Verwendung der dNTPs als Bausteine durch die Taq-Polymerase verlängert (Extension). Es werden 35 Zyklen durchgeführt. Zum Ausschluss von Kontaminationen diente als Kontrolle ein Ansatz ohne cDNA-Probe. Um die amplifizierten Fragmente sichtbar zu machen wird nun eine Gelelektrophorese durchgeführt. Da Moleküle je nach Größe und Ladung in unterschiedlicher Geschwindigkeit im elektrischen Feld wandern, können sie auf diese Weise aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist auch abhängig von der Porengröße bzw. Dichte des verwendeten Trägermediums. Für die TGF- β -Isoformen wurde 1,5 %iges, für die Rezeptoren ein 1,8 %iges Polyacrylamidgel verwendet, um optimale Banden zu erhalten. Zur Markierung der Banden wurde zu 100ml Agarose-Gel 100 μ l Ethidiumbromid hinzugefügt. Zur Abschätzung der Produktlänge diente ein 1 kbp Referenzmarker. Die Auftrennung erfolgte bei 80 Volt für etwa 45 Minuten. Das Gel wurde abschließend unter UV-Beleuchtung abfotografiert.

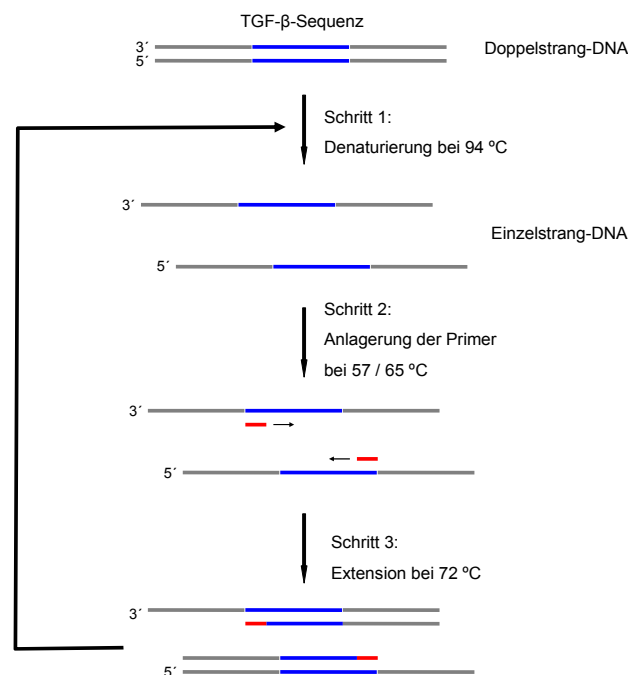


Abb.6: Prinzip der PCR. Schritt 1: Die Doppelstrang-DNA wird bei 94 °C denaturiert, d.h. zu Einzelsträngen aufgeschmolzen. Schritt 2: Nach Abkühlung lagern sich die Primer an (Annealing). Schritt 3: Hierauf verlängert die Taq-Polymerase mittels dNTPs von den Primern ausgehend die Sequenz (Extension).

3.2.5 Zellkultur der AtT-20-, MtT/S-, GH-3- und TtT/GF-Zelllinie

Die Kultivierung der vier Zelllinien AtT-20 (kortikotrop, Maus), MtT/S (somatotrop, Ratte), GH-3 (lactotrop, Ratte) und TtT/GF (follikulostellar, Maus) erfolgte als Monolayer in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Für alle Zelllinien wurde DMEM-Medium mit 10% FCS, 2,4 g/L Glutamin, 2,5 ng/L Amphotericin B und 10⁵ U/L Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden regelmäßig mit PBS gewaschen, dann mit Trypsin/EDTA Lösung von den Zellflaschen gelöst, in 10 ml Medium suspendiert und anschließend bei 1200 rpm für 4 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde hierauf verworfen, die Zellen erneut in Medium resuspendiert und dann im Teilungsverhältnis 1:3 ausgesät. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Sowohl AtT-20-, als auch GH-3-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (Rockville MD, USA) bereitgestellt (49;61). MtT/S- und TtT/GF-Zellen wurden durch Prof. K. Inoue (Saitama Universität, Urawa, Japan) etabliert (23;24).

3.2.6 Stimulation der Zelllinien mit den TGF- β -Isoformen

Die AtT-20-, GH-3- und MtT/S-Zellen wurden kultiviert, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten. Nachdem die Zellen vom Flaschenboden gelöst, zentrifugiert und in 10 ml Medium resuspendiert wurden, erfolgte nach Zugabe von Ethidiumbromid-Acridinorange eine Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. Anschließend wurden die Zellen in 48-Well-Platten ausgesät. Zur Bestimmung der Hormonsekretion bei einer Stimulationsdauer von 4 Stunden wurden 50000 Zellen pro Well, für die 24 Stunden Stimulation nur 25000 Zellen pro Well ausplattiert. Anschließend ließ man die Zellen zwei Tage im Brutschrank anwachsen. Hierauf wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit den TGF- β -Isoformen in den Konzentrationen 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml und 10 pg/ml stimuliert. Mit jeder Konzentration wurden jeweils vier Wells beschickt. Es standen weitere 4 Wells zur Bestimmung des Basalwertes zur Verfügung. Als Stimulationsmedium wurde DMEM-Medium mit 0,5% FCS verwendet.

Nach 4 bzw. 24 Stunden wurde das Medium abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Messung aufbewahrt.

3.2.7 Hormonmessung mittels RIA

Die Entdeckung des Prinzips immunologischer Hormonbestimmung durch Solomon Berson und Roslyn Yalow Anfang der 60er Jahre stellt einen Meilenstein für die Endokrinologie dar, da nur diese Methode die notwendige Spezifität und Sensitivität liefert. Die Methode beruht auf der Reaktion des zu bestimmenden Hormons mit spezifischen Antikörpern. Beim Radioimmunoassay handelt es sich um ein kompetitives Verfahren, wobei eine definierte Menge eines radioaktiv markierten Tracers mit unterschiedlichen Mengen des zu messenden nicht markierten Hormons um die limitierten Bindungsstellen einer konstanten Menge spezifischer Antikörper konkurrieren. Somit bestimmt die Menge an nicht markiertem Hormon der Probe nach dem Masse-Wirkungs-Gesetz den Anteil des an Antikörper gebundenen Tracers (34).

Es wurden Kaninchen-Antikörper sowie ein radioaktiv markiertes Antigen als Tracer verwendet, die mit 0.05 M Phosphatlösung und 1% Rinder Albumin verdünnt wurden. Die zu messende Probe wurde mit dieser Lösung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden gegen Kaninchen-Antikörper gerichtete Ziegen-Antikörper, ebenfalls in Phosphat-Albumin-Lösung verdünnt, zugegeben. Durch Zugabe von 1 ml 6% PEG und Abzentrifugieren wurde der im Gamma-Counter zu messende radioaktive Antigen-Antikörper Niederschlag gewonnen. Die Menge an gebundenem markiertem Antigen ist umgekehrt proportional der Menge an unmarkiertem Antigen (je Größer die Menge an unmarkiertem Hormon in der Probe desto mehr radioaktiv markierter Tracer wird aus der Bindung verdrängt und desto weniger radioaktiv ist der Antigen-Antikörper Niederschlag).

Gleichzeitig wurde eine Eichkurve erstellt, indem definierte Mengen nicht markierten Antigens mit dem Tracer um die Bindung am spezifischen Antikörper konkurrieren. Durch Ablesen an der Standardkurve konnte nun die Hormonmenge der Proben bestimmt werden.

Für die Bestimmung der Hormone wurden von Stalla et al. etablierte RIAs verwendet.

3.2.8 Bestimmung der Zellproliferation mittels WST-Assay

Zur quantitativen Beurteilung des Effekts der TGF- β -Isoformen auf die Zellproliferation wurde der WST-Assay angewendet. Das Prinzip beruht auf der Metabolisierung des WST-1-Farbstoffes, dem Salz des Tetrazolium, durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase zu Formazan, dessen Lichtabsorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge zwischen 420 und

480 nm gemessen werden kann. Die Aktivitätszunahme mitochondrialer Enzyme korreliert mit der Proliferationsrate der Zelle und kann somit indirekt aus der photometrisch ermittelten Zunahme an Formazan abgeleitet werden.

Der Test wurde mit AtT-20-, TtT/GF- und GH-3-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach Bildung eines konfluenten Monolayers auf 96-Well-Platten mit 5000 Zellen pro Well ausgesät und nach einem Tag Anwachszeit mit den TGF- β -Isoformen in den Konzentrationen 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml und 1 pg/ml in Medium mit 0,5% FCS stimuliert. Jeder Wert lag dreifach vor und als Referenz dienten Basalwerte ohne TGF- β im Medium. Die Messung erfolgte in drei verschiedenen Platten nach 24, 48 und 72 Stunden. Dazu wurden unter Lichtausschluss 10 μ l WST-1-Reagenz pro Well zugegeben und dann nach 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten die optische Dichte im ELISA-Reader bei 440 nm gemessen. Die gemessene Extinktion ist indirekt proportional zur Proliferationsrate der Zellen.

3.2.9 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt, wobei jedes Einzelexperiment mit Dreifach- oder Vierfachwerten durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden als Mittel +/- Standardabweichung berechnet.

Zur statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen und deren Signifikanz wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. P-Werte kleiner als 0.05 wurden als signifikant betrachtet. Hierbei dient die Regressionsanalyse zur Feststellung eines Zusammenhangs, während durch die anschließend durchgeführte Varianzanalyse (ANOVA) die Signifikanz der gefundenen Unterschiede nachweist.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der TGF- β -Isoformen in humanen Hypophysentumoren

Der Nachweis der unterschiedlichen Expression der TGF- β -Isoformen in humanen Hypophysentumoren auf Proteinebene erfolgte mittels Immunhistochemie. Als Bezugsgruppe dienten Schnitte normaler (nicht adenomatöser) humaner Hypophysen (2). Es wurden hormoninaktive Adenome (22), Prolaktinome (7), somatotrope Adenome (6), kortikotrope Adenome (3) und TSH-Zell-Adenome (2) untersucht. Signifikante Unterschiede wurden mittels Regressions- und Varianzanalyse festgestellt. Auf Grund der geringen Verfügbarkeit einiger Tumorarten konnte in Folge geringer Fallzahl auch bei signifikantem Gesamttest in einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.1.1 TGF- β -1-Expression

Die normale Hypophyse zeigt einen Anteil von 15 % TGF- β -1-positiver Zellen. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0.01$) in der Expression der einzelnen Tumoren festgestellt werden. Hormoninaktive Hypophysenadenome zeigten eine um 13% geringere Expression (absolut 3%). In Prolaktinomen scheint die Expression vollständig supprimiert (relativ -15%, absolut 0%), während sie in somatotropen Tumoren um 33,6% (absolut 48,6%) gesteigert ist. In kortikotropen Hypophysenadenomen findet sich eine nur gering gesteigerte Anzahl TGF- β -1-positiver Zellen (relativ +3,33%, absolut 18,33%), während die Zahl positiver Zellen in TSH-Zell-Adenomen im Vergleich zur normalen Hypophyse deutlich um 13,83% (absolut 1,16%) verringert ist.

Alle Tumoren sowie die Normalhypophyse weisen eine deutliche TGF- β -1-Expression in Gefäßendothelien auf (nicht gezeigt).

Eine Darstellung der prozentuellen Anteile TGF- β -1-positiver Zellen in den einzelnen Tumoren gibt Abb.7.

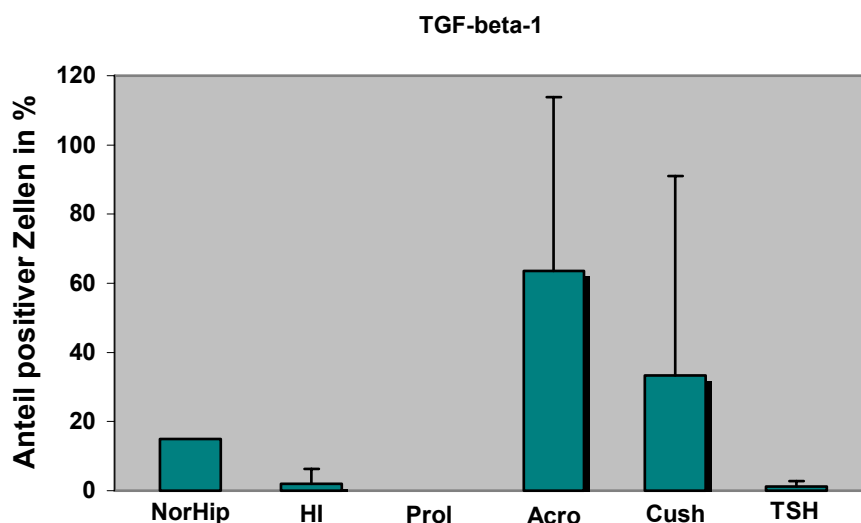


Abb.7: Darstellung des prozentuellen Anteils TGF- β -1-positiver Zellen in der normalen Hypophyse (Norhip), hormoninaktiven Hypophysentumoren, Prolaktinomen (Prol), somatotropen Adenomen (Acro), kortikotropen Adenomen (Cush) und TSH-Zell-Adenomen (TSH). Während in hormoninaktiven Adenomen, Prolaktinomen und TSH-Zell-Adenomen die TGF- β -1-Expression supprimiert ist, zeigen somatotrope und kortikotrope Adenome im Vergleich zur normalen Hypophyse eine deutliche Überexpression.

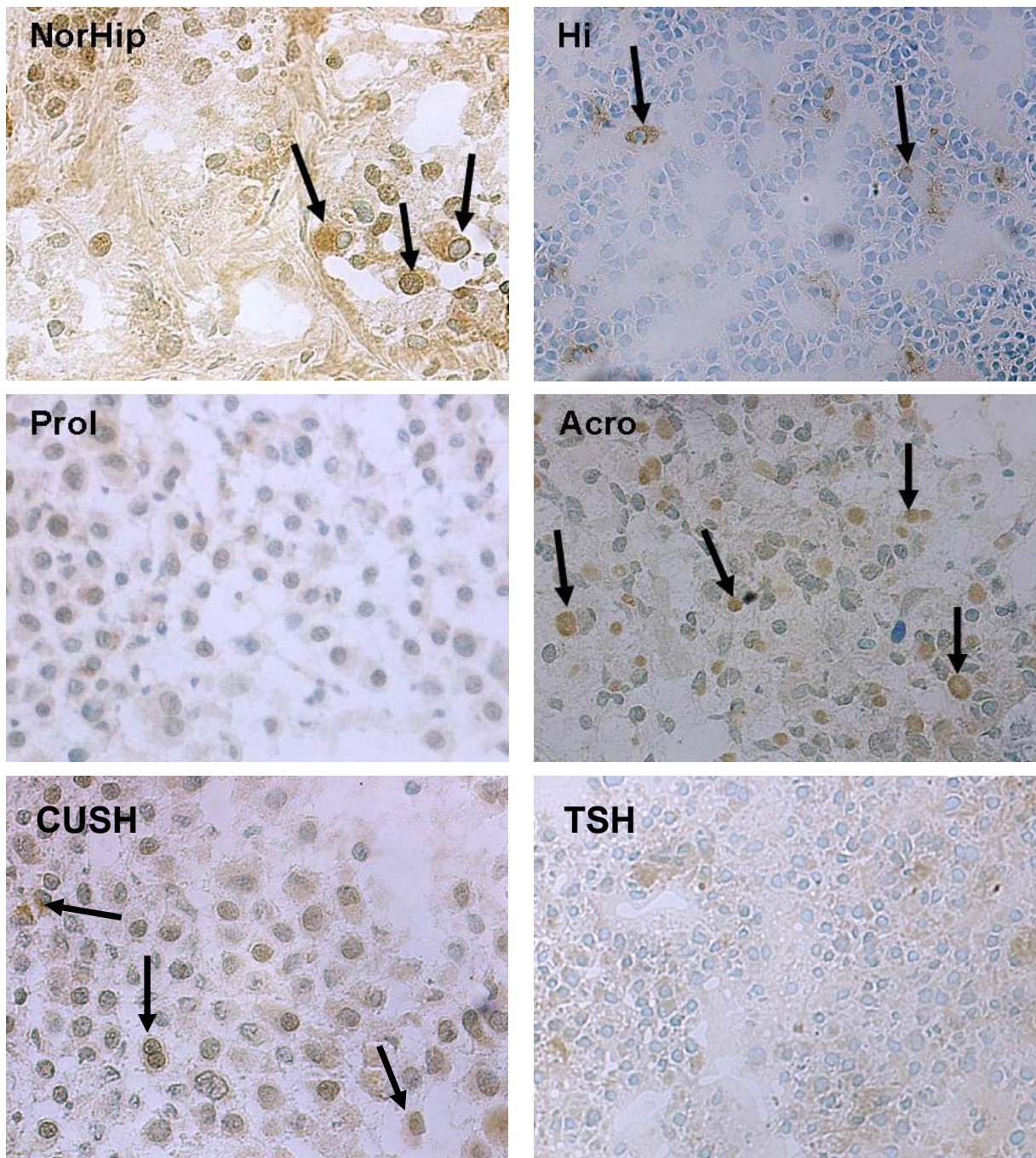


Abb.8: Immunhistochemische Darstellung von TGF- β -1 in der normalen Hypophyse (Norhip), hormoninaktiven Hypophysentumoren, Prolaktinomen (Prol), somatotropen Adenomen (Acro), kortikotropen Adenomen (Cush) und TSH-Zell-Adenomen (TSH). Während in hormoninaktiven Adenomen, Prolaktinomen und TSH-Zell-Adenomen die TGF- β -1-Expression deutlich supprimiert ist, zeigen somatotrope und kortikotrope Adenome im Vergleich zur normalen Hypophyse einen deutlich erhöhten Anteil TGF- β -1-positiver Zellen. Beispiele für positive Zellen sind mit einem Pfeil markiert.

4.1.2 TGF- β -2-Expression

In der normalen Hypophyse zeigen 24% der Zellen eine positive TGF- β -2-Färbung. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der einzelnen Tumoren festgestellt werden, jedoch zeigen alle Adenome, bis auf kortikotrope Tumoren, eine deutlich verminderte TGF- β -2-Expression im Vergleich zur Normalhypophyse. So ist der Anteil TGF- β -2-positiver Zellen in hormoninaktive Hypophysenadenome um 15,6% (absolut 8,4%), in Prolaktinomen um 23,5% (absolut 0,5%), in somatotropen Tumoren um 13,1% (absolut 10,9%) und in TSH-Zell-Adenomen um 24% (absolut 0%) im Vergleich zur Normalhypophyse verringert, während kortikotropen Hypophysenadenomen nur gering gesteigerte TGF- β -2-Expression (relativ +0,4%, absolut 24,4%) zeigen.

Auch hier zeigen Gefäßendothelien in allen Tumoren sowie die Normalhypophyse ein deutlich positives TGF- β -2-Signal (nicht gezeigt).

Eine Darstellung der prozentuellen Anteile TGF- β -1-positiver Zellen in den einzelnen Tumoren gibt Abb.9.

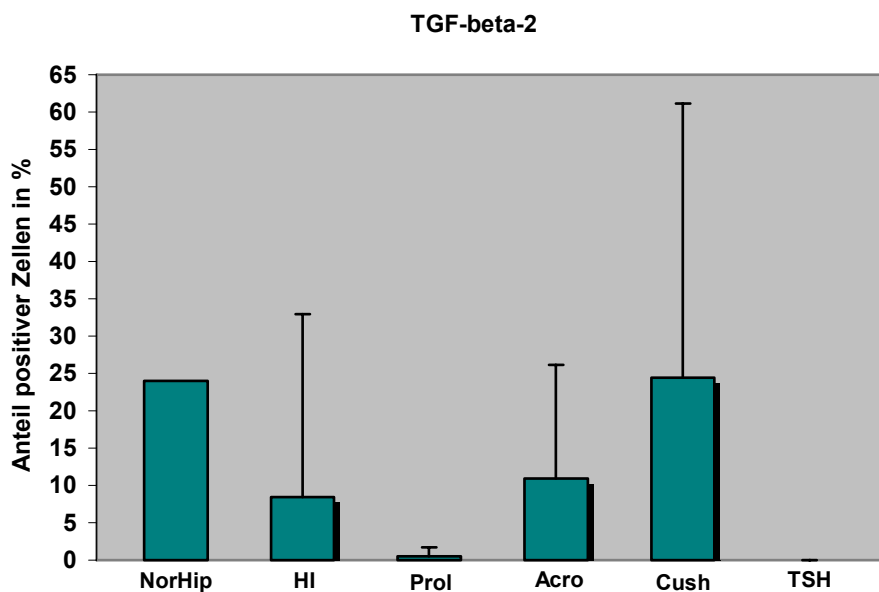


Abb.9: Darstellung des prozentuellen Anteils TGF- β -2-positiver Zellen in der normalen Hypophyse (Norhip), hormoninaktiven Hypophysentumoren, Prolaktinomen (Prol), somatotropen Adenomen (Acro), kortikotropen Adenomen (Cush) und TSH-Zell-Adenomen (TSH). Während in hormoninaktiven Adenomen, Prolaktinomen, somatotropen Hypophysentumoren und TSH-Zell-Adenomen die TGF- β -2-Expression deutlich supprimiert ist, zeigen kortikotrope Adenome im Vergleich zur normalen Hypophyse einen leicht erhöhten Anteil TGF- β -2-positiver Zellen. Beispiele für positive Zellen sind mit einem Pfeil markiert.

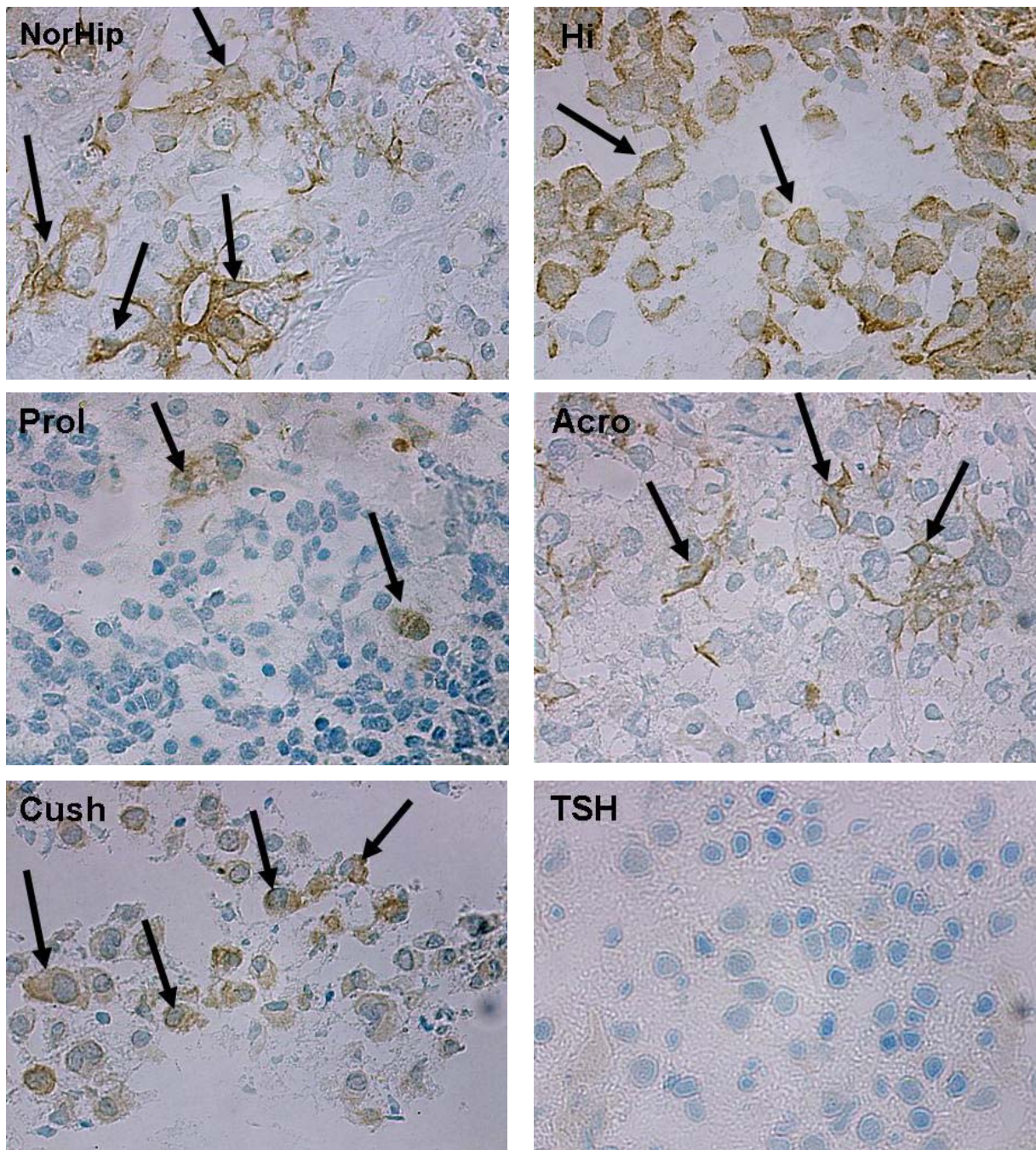


Abb.10: Immunhistochemische Darstellung von TGF- β -2 in der normalen Hypophyse (Norhip), hormoninaktiven Hypophysentumoren, Prolaktinomen (Prol), somatotropen Adenomen (Acro), kortikotropen Adenomen (Cush) und TSH-Zell-Adenomen (TSH). Während in hormoninaktiven Adenomen, Prolaktinomen, somatotropen Hypophysentumoren und TSH-Zell-Adenomen die TGF- β -2-Expression deutlich supprimiert ist, zeigen kortikotrope Adenome im Vergleich zur normalen Hypophyse einen leicht erhöhten Anteil TGF- β -2-positiver Zellen. Beispiele für positive Zellen sind mit einem Pfeil markiert.

4.1.3 TGF- β -3-Expression

Die normale Hypophyse zeigt einen Anteil von 20,3 % TGF- β -3-positiver Zellen. Die einzelnen Hypophysentumoren zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) in der Expression von TGF- β -3. Ein verringerter Anteil TGF- β -3-positiver Zellen im Vergleich zur Normalhypophyse konnte in hormoninaktiven Hypophysenadenomen (relativ -7,1%, absolut 13,2%) und TSH-Zell-Adenomen (relativ -19,8%, absolut 0,5%) festgestellt werden. Prolaktinomen zeigen eine nur gering gesteigerte Expression (relativ +1,9%, absolut 22,2 %), während somatotrope Tumoren mit 19,5 % (absolut 39,8%) und kortikotrope Hypophysenadenomen mit 78,8% (absolut 99,2%) einen deutlich gesteigerten Anteil TGF- β -3-positiver Zellen im Vergleich zur normalen Hypophyse aufweisen.

Alle Tumoren sowie die Normalhypophyse weisen eine deutliche TGF- β -3-Expression in Gefäßendothelien auf (nicht gezeigt).

Eine Darstellung der prozentuellen Anteile TGF- β -3-positiver Zellen in den einzelnen Tumoren gibt Abb.11.

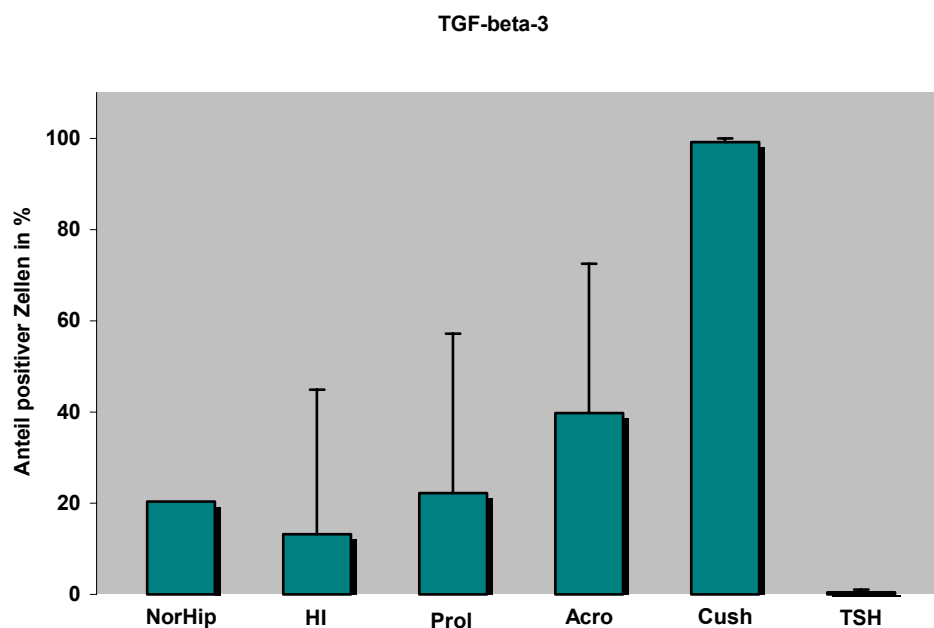


Abb.11: Darstellung des prozentuellen Anteils TGF- β -3-positiver Zellen in der normalen Hypophyse (Norhip), hormoninaktiven Hypophysentumoren, Prolaktinomen (Prol), somatotropen Adenomen (Acro), kortikotropen Adenomen (Cush) und TSH-Zell-Adenomen (TSH). Während in hormoninaktiven Adenomen und TSH-Zell-Adenomen die TGF- β -3-Expression supprimiert und in Prolaktinomen nur leicht gesteigert ist, zeigen somatotrope und kortikotrope Adenome im Vergleich zur normalen Hypophyse einen deutlich erhöhten Anteil TGF- β -3-positiver Zellen.

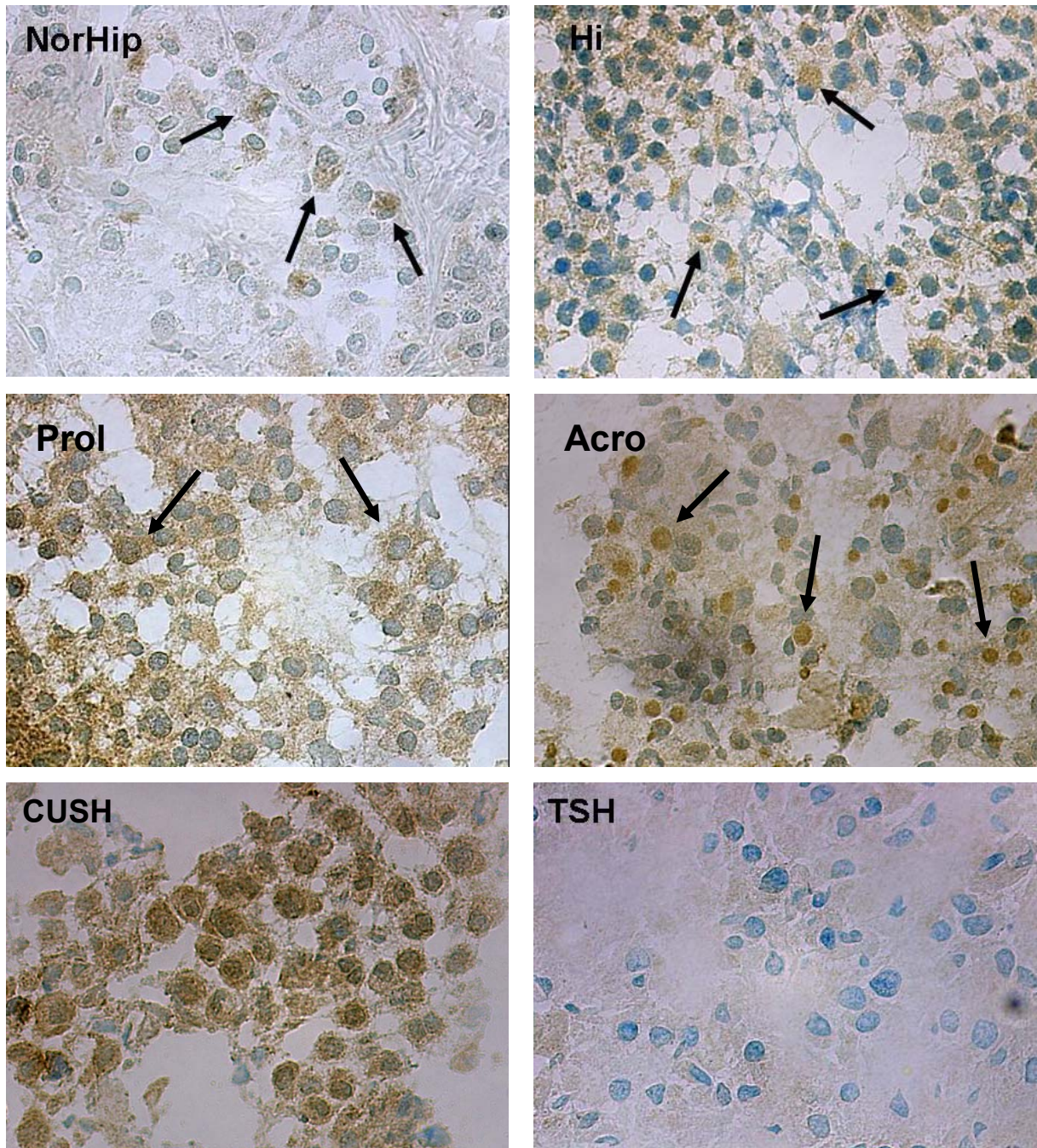


Abb.12: Immunhistochemische Darstellung von TGF- β -3 in der normalen Hypophyse (Norhip), hormoninaktiven Hypophysentumoren, Prolaktinomen (Prol), somatotropen Adenomen (Acro), kortikotropen Adenomen (Cush) und TSH-Zell-Adenomen (TSH). Während hormoninaktiven Adenome und TSH-Zell-Adenome einen verringerten Anteil TGF- β -3-positiver Zellen aufweisen, zeigen Prolaktinomen, somatotropen und kortikotrope Hypophysentumoren eine deutliche TGF- β -3-Überexpression. Beispiele für positive Zellen sind mit einem Pfeil markiert. In den kortikotropen Adenomen weisen fast 100% der Zellen eine TGF- β -3-Expression auf, weswegen auf exemplarische Pfeile verzichtet wurde.

4.2 Expression der TGF- β -Isoformen und Rezeptoren in AtT-20-, MtT/S- und GH-3-Zellen

Zum Nachweis der unterschiedlichen Expression der TGF- β -Isoformen und Rezeptoren in Prolaktinomen, GH- und ACTH-produzierenden Tumoren auf RNA-Ebene wurde die PCR angewendet. Als Modell dienten die AtT-20-, MtT/S- und GH-3-Zelllinien, aus denen RNA-Extrakte gewonnen wurden, die nach Ausschluss von DNA-Kontaminationen mittels reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurden.

TGF- β -1 konnte ausschließlich in AtT-20-Zellen nachgewiesen werden, während MtT/S- und GH-3-Zellen keine Expression zeigten, was die von *Sarkar et al.* postulierte Suppression von TGF- β -1 in lactotropen Tumoren bestätigt.

TGF- β -2 konnte in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden.

TGF- β -3 zeigte eindeutig positive Signale in AtT-20- und MtT/S-Zellen, jedoch nur eine schwache Bande in GH-3-Zellen.

Der TGF- β -Rezeptor Typ I war in AtT-20 und GH-3-Zellen vorhanden, jedoch nicht in MtT/S-Zellen. Dagegen konnte der TGF- β -Rezeptor Typ II nur in GH-3-Zellen nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tabelle 6:

Tab.6.: Expression der TGF- β -Isoformen und Rezeptoren in AtT-20-, MtT/S- und GH-3-Zellen

	AtT-20	MtT/S	GH-3
TGF-β-1	+	-	-
TGF-β-2	+	+	+
TGF-β-3	+	+	(+)
TGF-β-Rezeptor Typ I	+	-	+
TGF-β-Rezeptor Typ II	-	-	+

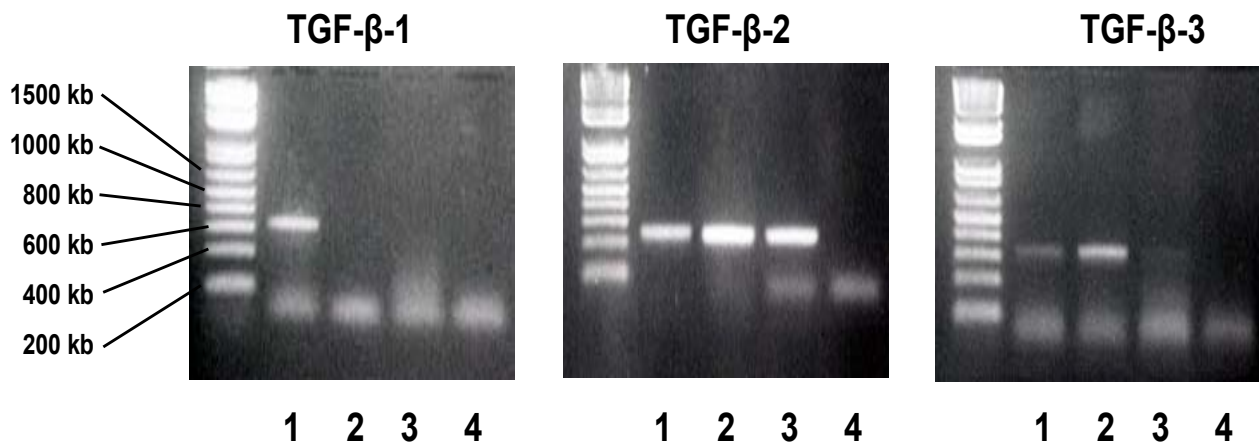


Abb.13: Nachweis der Expression von mRNA der TGF- β -Isoformen in AtT-20-Zellen (Bahn 1), MtT/S-Zellen (Bahn 2) und GH-3-Zellen (Bahn 3). Die Negativ-Kontrolle lief in Bahn 4. Alle drei Isoformen konnten in AtT-20-Zellen nachgewiesen werden, MtT/S-Zellen nur TGF- β -2 und 3 exprimieren. GH-3-Zellen zeigen ausschließlich eine eindeutige Bande bei TGF- β -2-Expression.

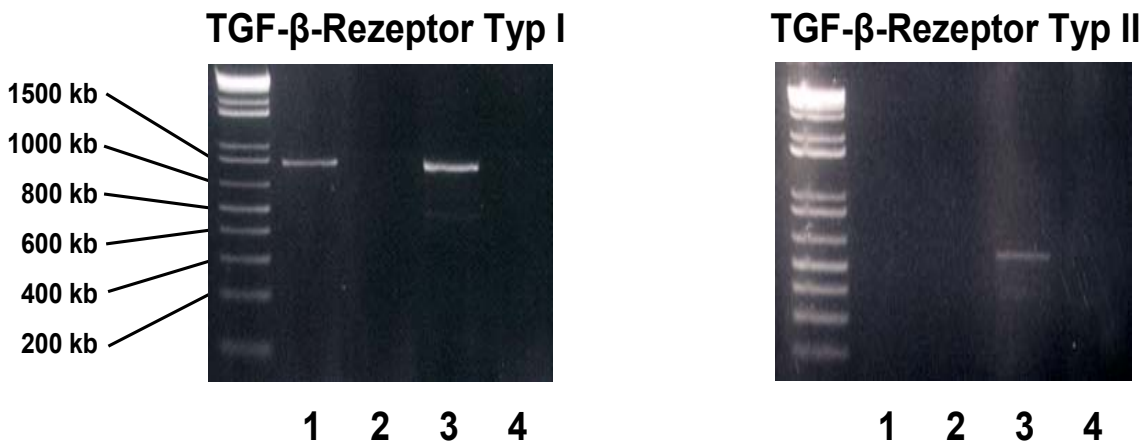


Abb.14: Nachweis der Expression von mRNA der TGF- β -Rezeptoren in AtT-20-Zellen (Bahn 1), MtT/S-Zellen (Bahn 2) und GH-3-Zellen (Bahn 3). Die Negativ-Kontrolle lief in Bahn 4. AtT-20-Zellen exprimieren ausschließlich den TGF- β -Rezeptor Typ I. In MtT/S-Zellen konnten keine Rezeptoren nachgewiesen werden, während GH-3-Zellen ein positives Signal bei TGF- β -Rezeptor Typ II zeigten.

4.3 Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation von TtT/GF-, AtT-20- und GH-3-Zellen

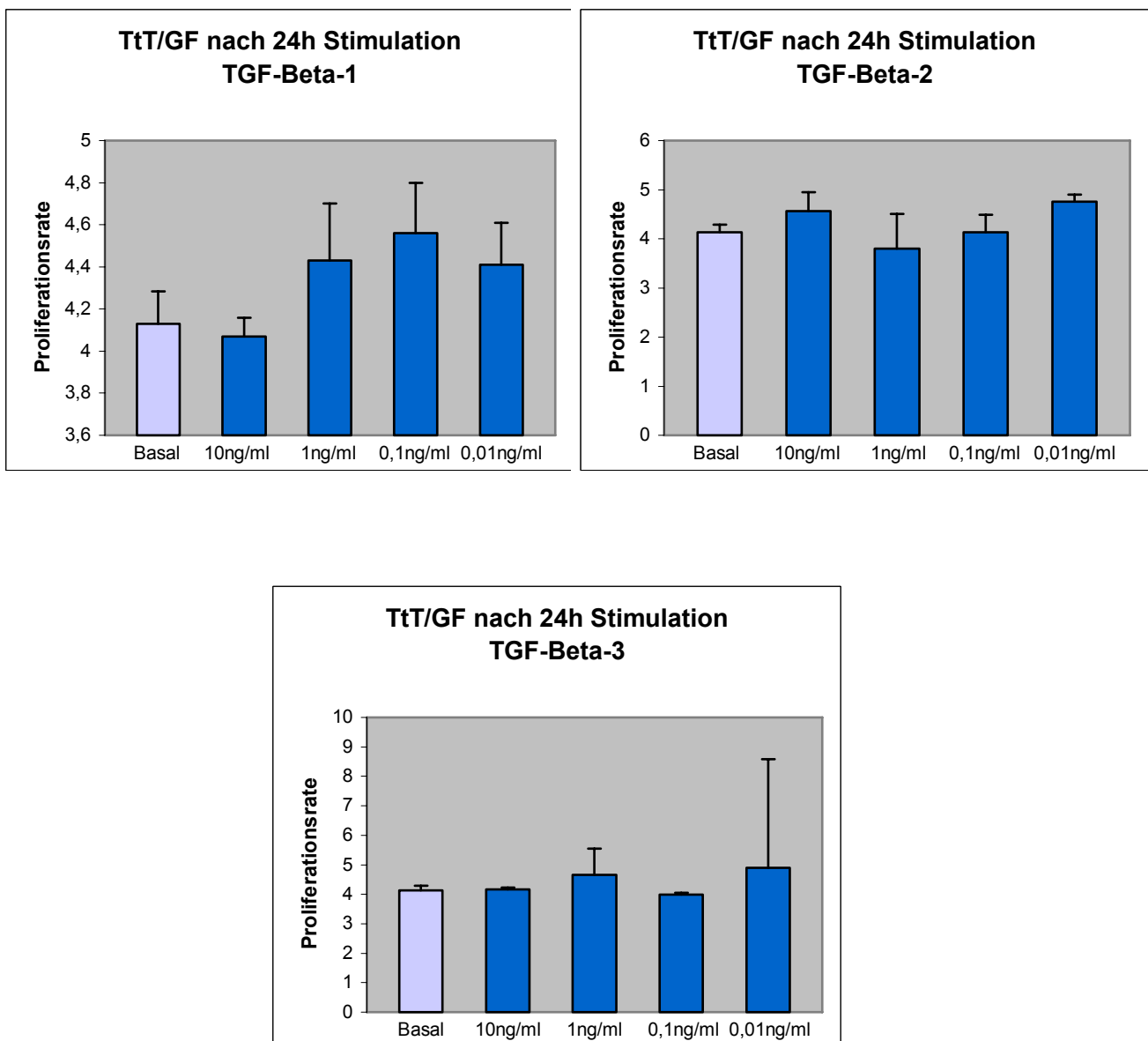
Zur Ermittlung des Einflusses der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation von TtT/GF-, AtT-20- und GH-3-Zellen wurden die Zellen in FCS-freiem Medium auf 96-Well-Platten mit 5000 Zellen pro Well ausgesät und anschließend mit den TGF- β -Isoformen in den Konzentrationen 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml und 1pg/ml für 24, 48 bzw. 72 Stunden stimuliert. Jede Konzentration lag als Dreifachwiederholung vor. Zur Bestimmung der basalen Proliferationsrate wurden Zellen mit Medium ohne TGF- β -Isoformen beschickt. Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationsdauer wurde die Extinktion nach Zugabe von WST-1 nach 15, 30, 60 und 120 Minuten im ELISA-Reader gelesen. Die erhaltenen Werte verhalten sich indirekt proportional zur Proliferationsrate der Zellen. Für die Auswertung wurden die 30-Minuten-Werte verwendet.

Da MtT/S-Zellen im Gegensatz zu ihrem physiologischen Vorbild, den somatotropen Zellen der Hypophyse, nur sehr geringe Mengen an Growth-Hormon (GH) produzieren, keine TGF- β -Rezeptoren exprimieren und sie somit nicht als adäquates Modell dienen konnten, wurde auf eine weitere Untersuchung verzichtet.

4.3.1 Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation der TtT/GF-Zellen

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Proliferationsrate von TtT/GF-Zellen nach Stimulation mit den TGF- β -Isoformen festgestellt werden.

Jedoch zeigt sich nach 48 Stunden Stimulationsdauer eine Hemmung der Proliferation unter steigender Konzentration aller TGF- β -Isoformen. Einen Überblick über die Proliferation von TtT/GF-Zellen, angegeben als Reziprokwert der Extinktion der ELISA-Messung, nach 24 bzw. 48 Stunden Stimulation mit den TGF- β -Isoformen gibt Abb. 15.



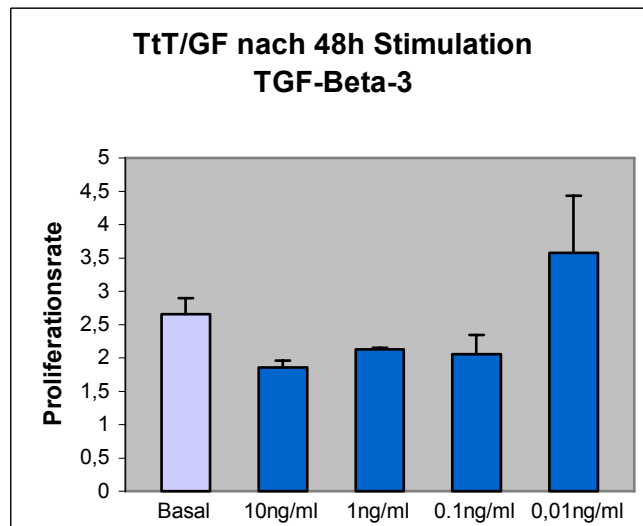
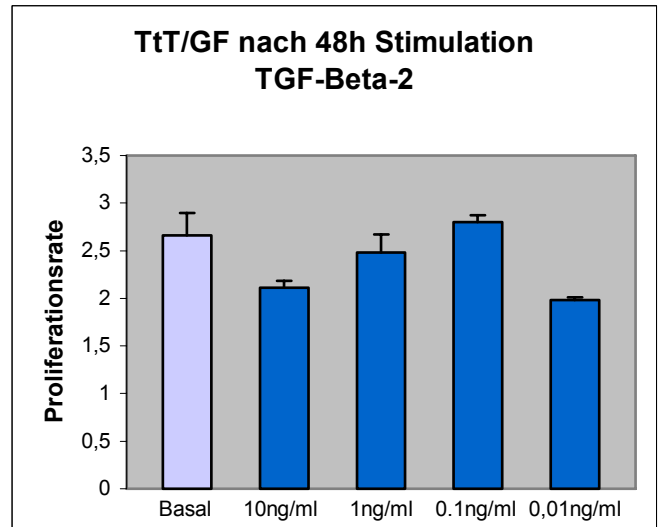
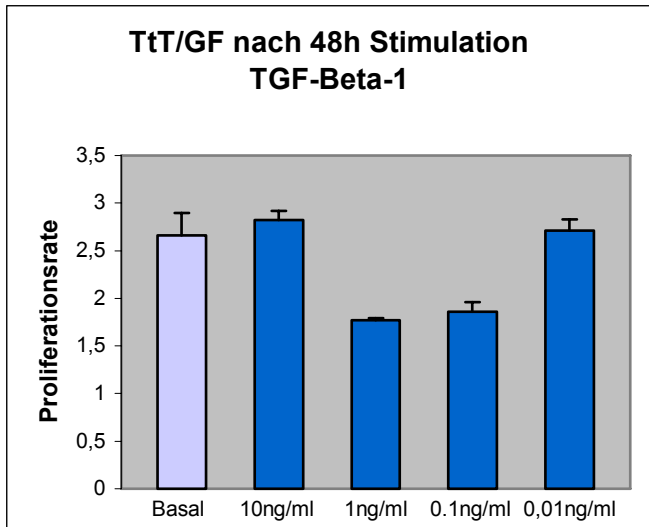
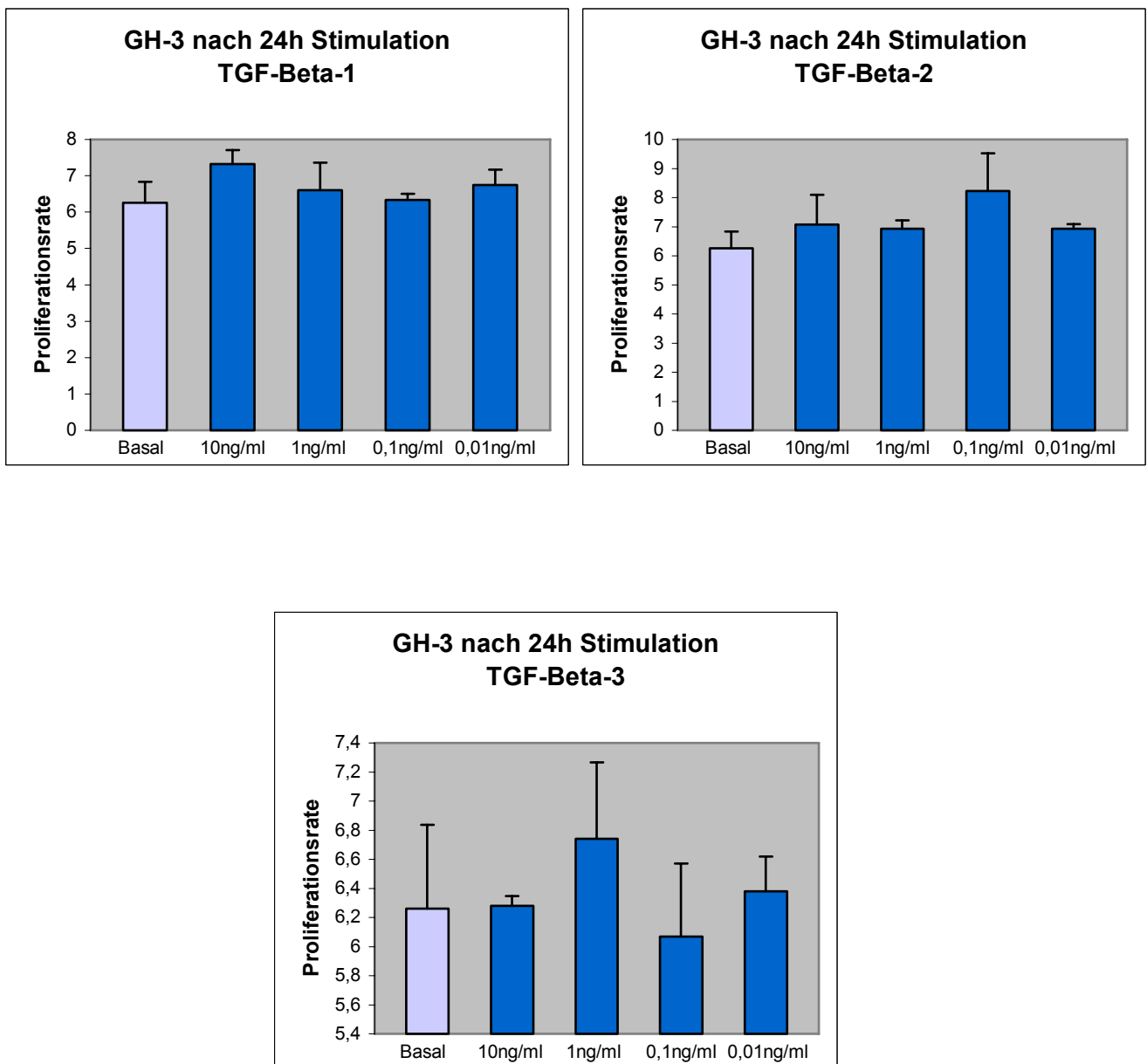


Abb.15: Darstellung des Einflusses der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation von TtT/GF-Zellen. Die Proliferationsrate entspricht den reziproken Werten der Extinktionsmessung. Alle Isoformen supprimieren mit zunehmender Konzentration und Stimulationsdauer die Proliferation der TtT/GF-Zellen.

4.3.2 Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation der GH-3-Zellen

Es konnte ein signifikanter Einfluss der Stimulationsdauer auf GH-3-Zellen festgestellt werden, während die Konzentration keine signifikante Einflussgröße darstellt.

TGF- β -2 scheint in hohen Konzentrationen die Proliferationsrate von GH-3-Zellen zu supprimieren, während TGF- β -1 und 3 sie steigern. Einen Überblick über die Proliferation von GH-3-Zellen, angegeben als Reziprokwert der Extinktion der ELISA-Messung, nach 24 bzw 48 Stunden Stimulation mit den TGF- β -Isoformen geben Abb. 16.



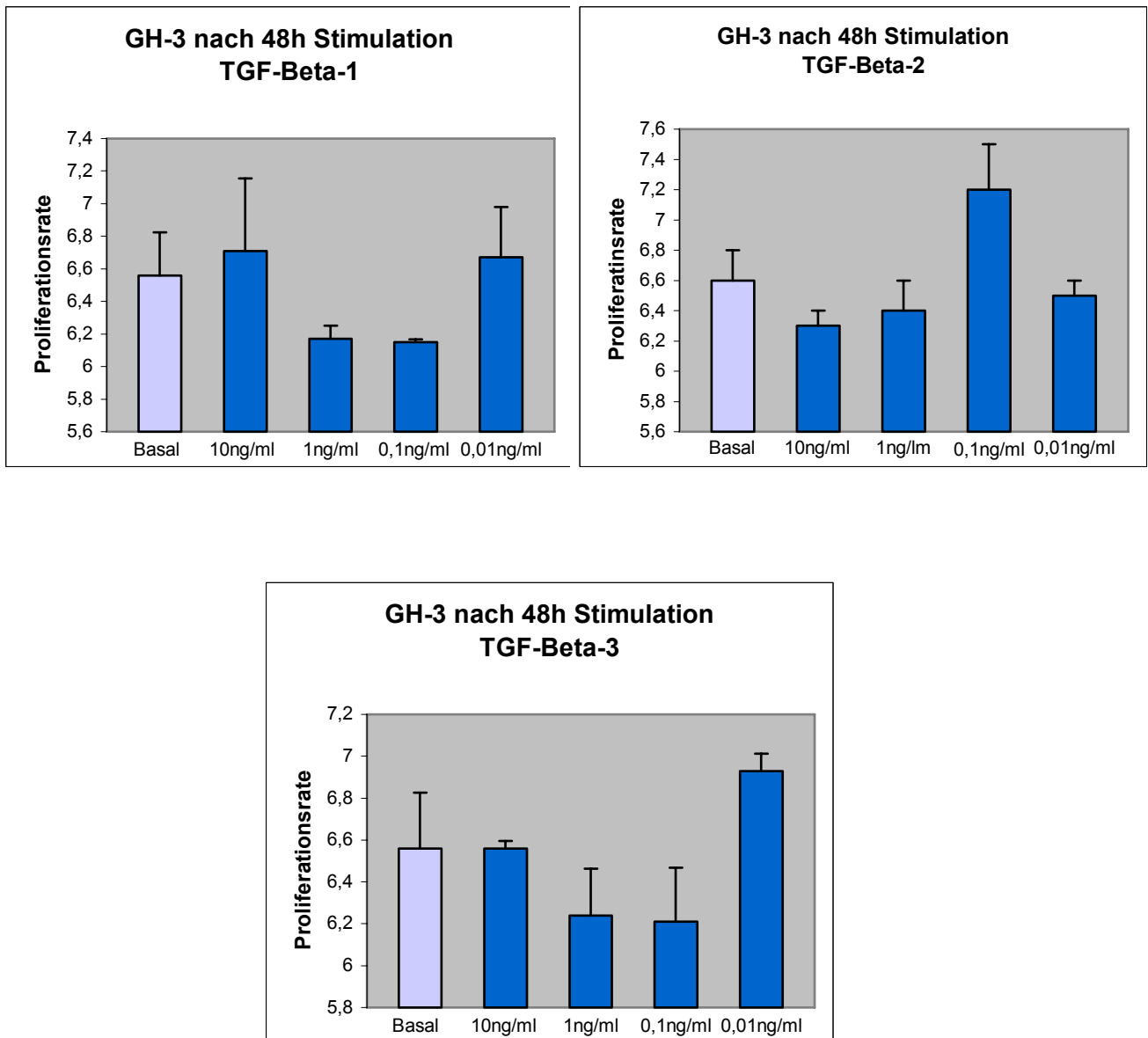
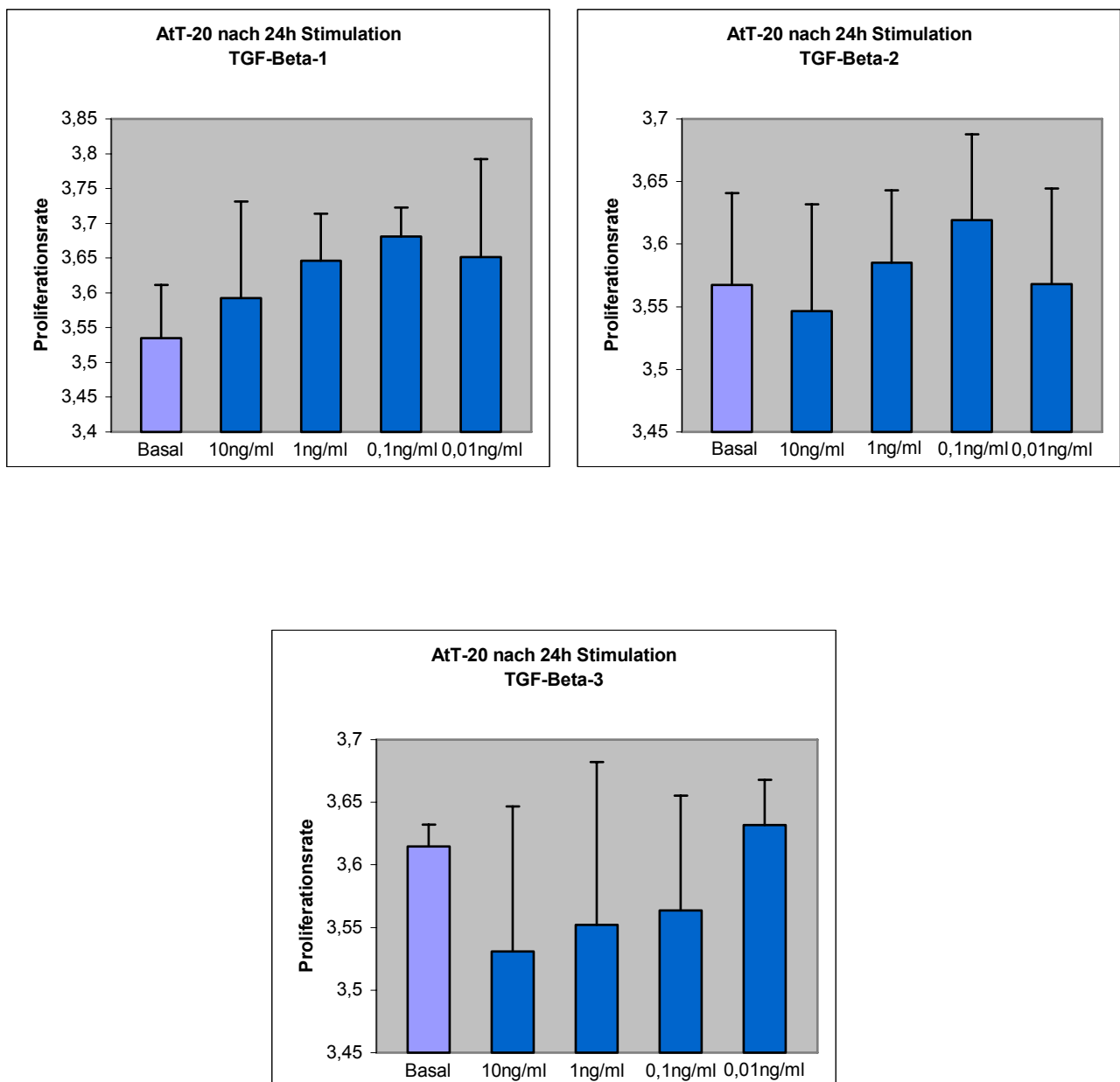


Abb.16: Darstellung des Einflusses der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation von GH-3-Zellen. Die Proliferationsrate entspricht den reziproken Werten der Extinktionsmessung. TGF- β -2 scheint in hoher Konzentration die Proliferation der GH-3-Zellen zu supprimieren, während sie TGF- β -1 und 3 sie steigern.

4.3.3 Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation der AtT/20-Zellen

Es konnte ein kein signifikanter Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation von AtT/20-Zellen festgestellt werden.

TGF- β -1 stimuliert die Proliferation von AtT/20-Zellen, während diese durch TGF- β -3 supprimiert wird. TGF- β -1 stimuliert. TGF- β -2 hat einen zunehmend stimulierenden Effekt im niedrigen Konzentrationsbereich mit einem Maximum bei 0,1ng/ml. Einen Überblick über die Proliferation von AtT/20-Zellen, angegeben als Reziprokwert der Extinktion der ELISA-Messung, nach 24 bzw. 48 Stunden Stimulation mit den TGF- β -Isoformen geben Abb. 17.



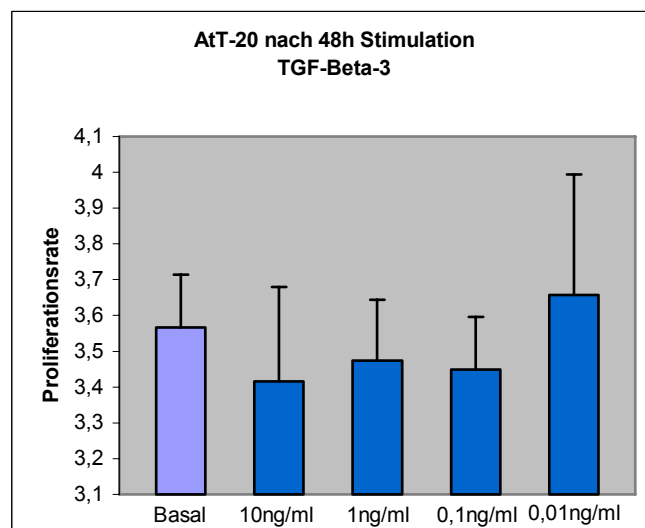
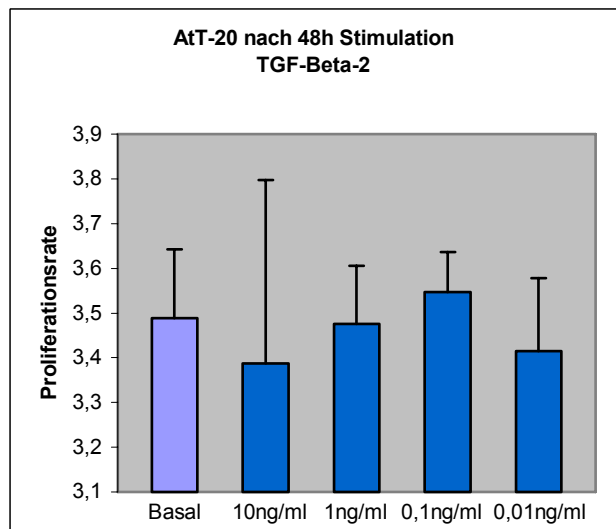
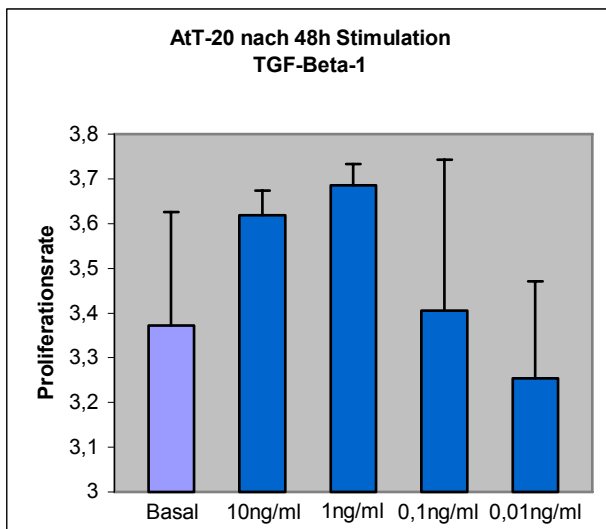


Abb.17: Darstellung des Einflusses der TGF- β -Isoformen auf die Proliferation von AtT-20-Zellen. Die Proliferationsrate entspricht den reziproken Werten der Extinktionsmessung. TGF- β -1 scheint die Proliferation der AtT-20-Zellen zu stimulieren, während TGF- β -3 diese hemmt. TGF- β -2 hat einen zunehmend stimulierenden Effekt im niedrigen Konzentrationsbereich mit einem Maximum bei 0,1ng/ml.

4.4 Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von GH-3- und AtT-20 -Zellen

Um die physiologische Funktion der TGF- β -Isoformen möglichst umfassend zu verstehen wurde nun ihr Einfluss auf die Hormonsekretion von GH-3 und AtT-20-Zellen untersucht.

Zunächst wurden die Zellen für 24h mit den TGF- β -Isoformen in den Konzentrationen 10ng, 1ng, 100pg und 10pg inkubiert. Des Weiteren wurde die Basalsekretion ohne Stimulation gemessen. Jeder Wert lag als Vierfachwiederholung vor.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Hormonsekretion mittels Radioimmunassay bestimmt. Die Angabe der Hormonmenge erfolgt in ng.

4.4.1 Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von GH-3-Zellen

Da GH-3 Zellen sowohl Growth-Hormon (GH) und Prolaktin produzieren wurden beide Hormone untersucht.

Die Prolaktinsekretion wird durch TGF- β -2 und TGF- β -3 Konzentrationsabhängig gehemmt, während TGF- β -1 keinen signifikanten Einfluss auf die Hormonsekretion zeigt.

Die GH-Sekretion wird durch TGF- β -2 und TGF- β -3 in hohen Konzentrationen gehemmt, während TGF- β -1 keinen signifikanten Einfluss auf die Hormonsekretion hat.

Einen Überblick über die Effekte der Stimulation mit den TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von GH-3-Zellen gibt Abb. 18 und 19.

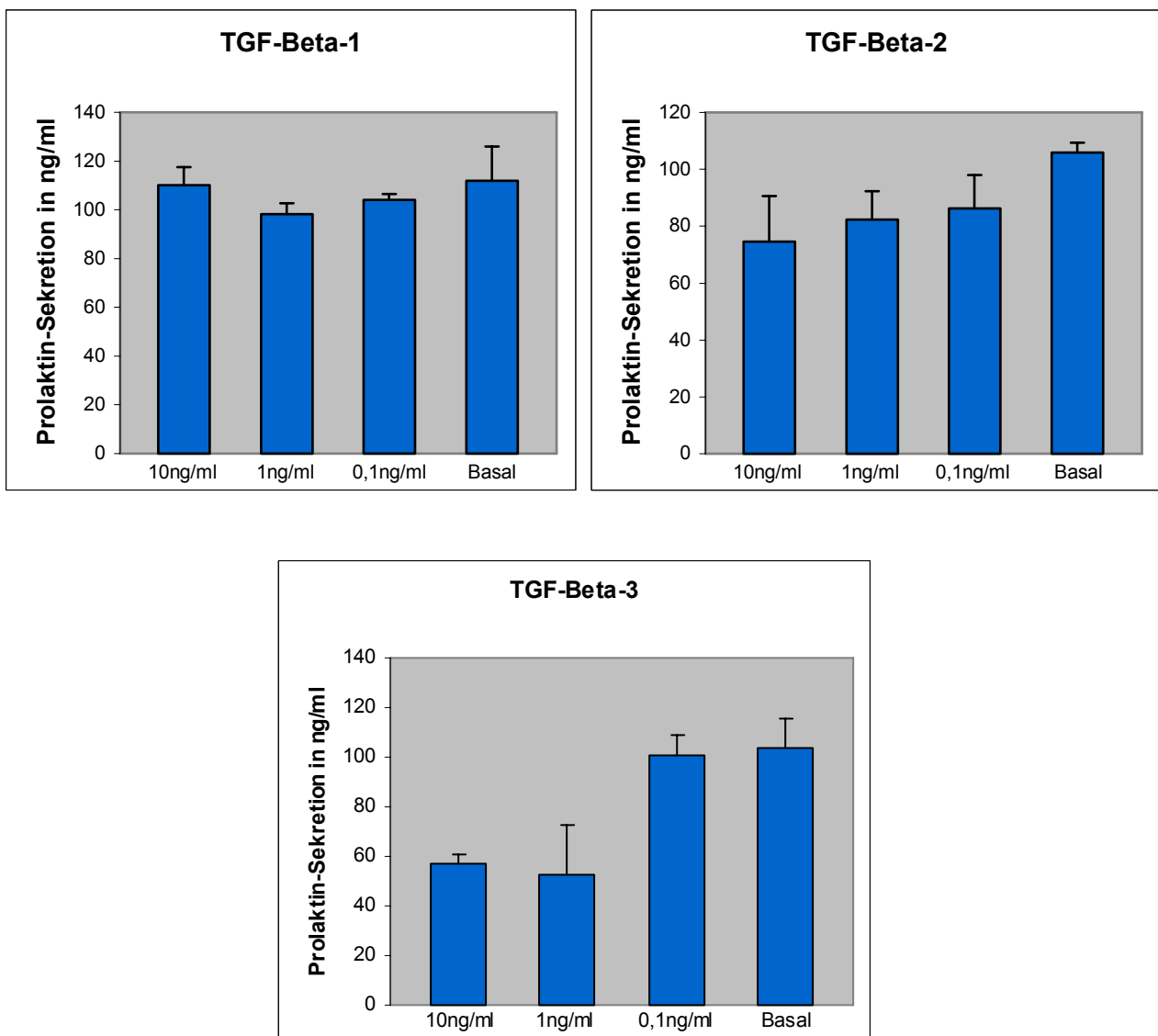


Abb.18: Darstellung des Einflusses der TGF- β -Isoformen auf die Prolaktinsekretion in ng durch GH-3-Zellen. Während TGF- β -2 und TGF- β -3 die Prolaktinsekretion hemmen, hat TGF- β -1 keinen signifikanten Einfluss.

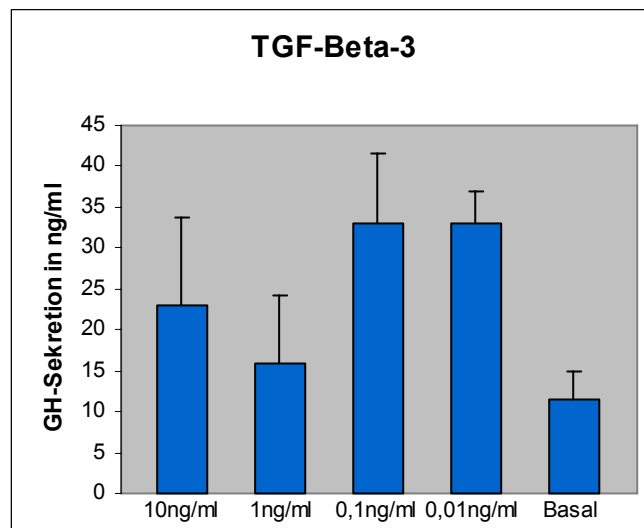
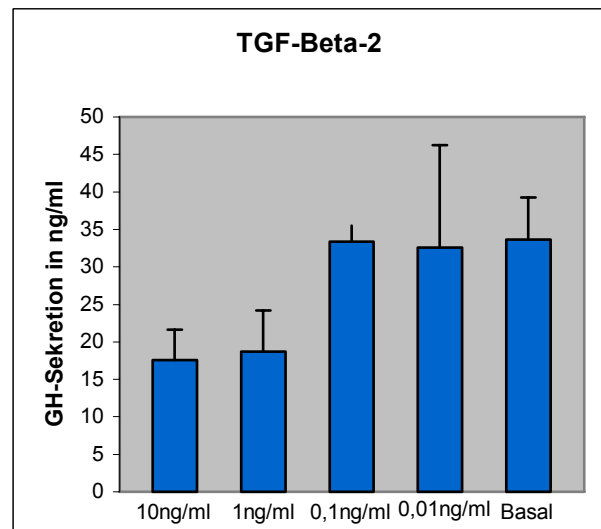
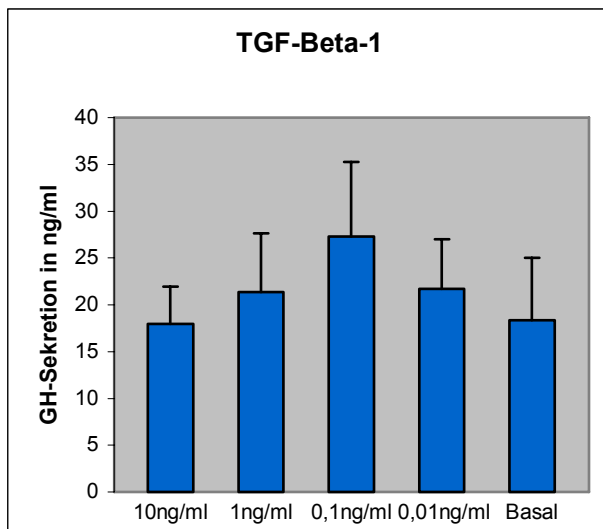


Abb.19: Darstellung des Einflusses der TGF- β -Isoformen auf die GH-Sekretion in ng durch GH-3-Zellen. Während TGF- β -2 die GH-Sekretion hemmt, hat TGF- β -1 und 3 keinen signifikanten Einfluss.

4.4.2 Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von AtT-20-Zellen

Es wurde die Sekretion von ACTH nach 24 Stunden Stimulation mit den TGF- β -Isoformen gemessen.

TGF- β -1 und TGF- β -3 stimulieren in hohen Konzentrationen die ACTH-Sekretion, während sie durch TGF- β -2 in niedrigen Konzentrationen gehemmt wird.

Einen Überblick über Einfluss der TGF- β -Isoformen auf die Hormonsekretion von AtT-20-Zellen gibt Abb.20.

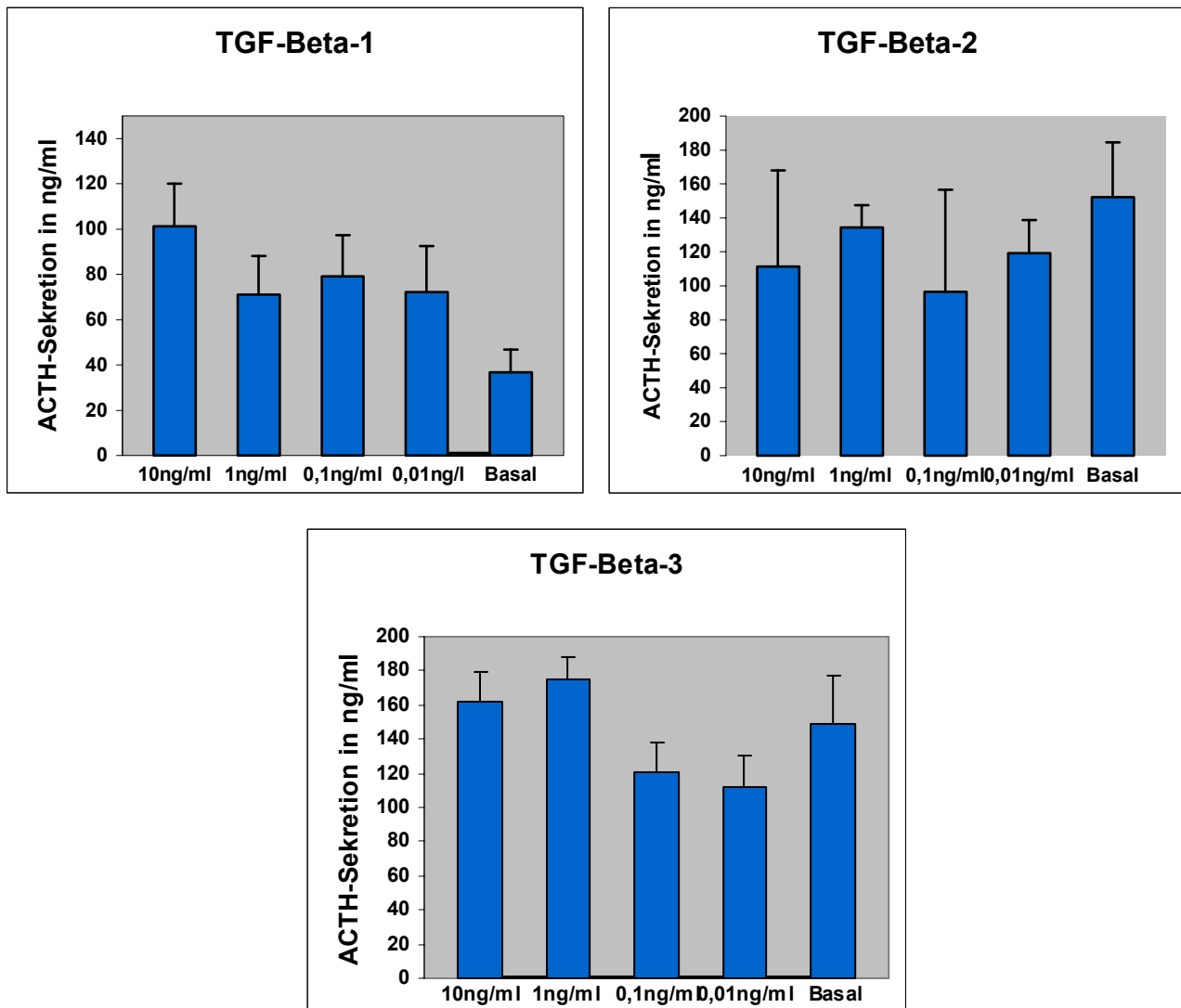


Abb.20: Darstellung des Einflusses der TGF- β -Isoformen auf die ACTH-Sekretion von AtT-20-Zellen. Während TGF- β -1 und TGF- β -3 die ACTH-Sekretion stimulieren, wird sie durch TGF- β -2 in niedrigen Konzentrationen gehemmt.

5 Diskussion

Die Hypophyse unterliegt nicht nur der Regulation durch übergeordnete Zentren und den klassischen Regelkreisen. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen zunehmend die Bedeutung von lokal produzierten Faktoren, die auf auto- und parakrinem Weg Einfluss auf Entwicklung (1;48;57;62), Wachstum und Funktion der normalen Hypophyse nehmen, aber auch an der Entwicklung und Progression von Hypophysentumoren beteiligt zu sein scheinen. Inzwischen konnte eine Vielzahl von Substanzen isoliert werden, deren genaue Bedeutung und Funktion meist jedoch unklar bleibt (13;14;22;47;51;52;64;65).

Die TGF- β -Familie, zu der auch BMP-4, Activin und Inhibin zählen, spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktion von Hypophysenzellen. Die Bedeutung TGF- β -Isoformen bei der Embryonalentwicklung der Organogenese, der Kontrolle von Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose und der Karzinogenese in unterschiedlichsten Geweben konnte in bisherigen Untersuchungen gezeigt werden (9;17;36;38;51).

In der Hypophyse wurden bisher hauptsächlich die TGF- β -Expression sowie die seiner Rezeptoren und ihre Wirkung in lactotropen Zellen bzw. in östrogeninduzierten Prolaktinomen der Fischer-344-Ratte, sowie follikulostellaren Zellen, die als Hauptquelle von TGF- β identifiziert wurden, untersucht. Der genaue Mechanismus, über den TGF- β seine zum Teil gegensätzlichen, regulierenden und modellierenden Wirkungen entfaltet, ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Hypophysenadenomen die z.T. antagonistischen Effekte auf die Prolaktinsekretion und Proliferation der Zellen von TGF- β -1 und TGF- β -3 zu Gunsten einer stimulierenden Wirkung verschoben ist, während in der normalen Hypophyse der inhibierende Effekt überwiegt. Dabei wurde als pathogenetischer Faktor eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den TGF- β -Isoformen und ihren Rezeptoren zu Gunsten von TGF- β -3 und dem TGF- β -Rezeptor Typ I angenommen. Die bisherigen Daten beziehen sich jedoch ausschließlich auf Prolaktinome.

Über TGF- β -2 ist bisher wenig bekannt. Ihm wird eine suppressive Wirkung auf die Prolaktinproduktion normaler und adenomatöser lactotroper Zellen zugeschrieben (10;19;51).

In dieser Arbeit soll die TGF- β -Expression, insbesondere auch TGF- β -2 in verschiedenen Typen menschlicher Hypophysenadenome untersucht werden. Im Vergleich zur normalen Hypophyse konnten signifikante Unterschiede in der Expression der TGF- β -Isoformen nicht

nur in Prolaktinomen, sondern auch in kortikotropen, somatotropen, TSH-sezernierenden und hormoninaktiven Hypophysenadenomen festgestellt werden. Das veränderte Expressionsmuster scheint einen Einfluss auf das Proliferations- und Hormonproduktionsverhalten zu haben, was anhand von Untersuchungen an Zelllinien nachgewiesen wurde. Es konnte ein sehr heterogenes Wirkungsspektrum der TGF- β -Isoformen auf verschiedene Zelllinien festgestellt werden. Dies bestätigt die Komplexität der multifaktoriellen Wirkungsweise dieser Substanzklasse, wie sie schon am Beispiel des BMP-4 gezeigt wurde. So konnte die sehr heterogene Wirkungsweise des BMP-4 in lactotropen, somatotropen und kortikotropen Hypophysenadenomen nachgewiesen werden. BMP-4 stimuliert die Proliferation von lactotropen und somatotropen Zellen, werden Wachstum und Hormonsekretion kortikotroper Zeller inhibiert wird (16;17;46). Die heterogene, z.T. auch gegensätzliche Wirkung in den verschiedenen Zelllinien kann durch Variationen in der Signaltransduktion erklärt werden, da Smad-1 mit verschiedensten Co-Faktoren interagieren kann (41).

5.1 TGF- β -1

TGF- β -1 wird in der normalen Hypophyse auf Proteinebene von 15% der Zellen exprimiert. Es konnte eine signifikante Überexpression von TGF- β -1 in kortikotropen Tumoren festgestellt werden. In denen als Modell dienenden AtT-20 konnte ebenfalls eine Expression von TGF- β -1 und des TGF- β -Rezeptors Typ I festgestellt werden. Es ist deswegen anzunehmen, dass sie auf eine Stimulation mit TGF- β in physiologischer Weise reagieren. Da AtT-20-Zellen auf Stimulation mit TGF- β -1 mit einer Zunahme der Proliferation und Hormonsekretion reagieren, könnte eine TGF- β -1-Überexpression in kortikotropen Tumoren einen pathogenetischen Faktor in der Tumorgenese darstellen.

Ähnliches könnte auch für somatotrope Tumoren zutreffen, die ebenfalls eine deutliche Überexpression von TGF- β -1 zeigen. Die hier als Modell dienende MtT/S-Zelle scheinen jedoch keine TGF- β -Rezeptoren zu exprimieren und auch nur in geringem Maße Growth Hormon zu sezernieren, so dass sich keine Aussage über Funktion und Wachstum unter TGF- β -Einfluss auf somatotrope Tumoren übertragen lässt.

Die Wirkung auf Prolaktinome bzw. die GH-3-Zelllinie ist heterogen. In Prolaktinomen scheint die TGF- β -1-Expression vollständig supprimiert. Auch in GH-3-Zellen ließ sich kein

TGF- β -1 nachweisen, obwohl Rezeptoren vorhanden sind. Bisher wurde auf Grund von Tierexperimenten angenommen, das TGF- β -1 eine hemmende Wirkung auf lactotrope Zellen hat. Hier konnte jedoch gezeigt werden, das TGF- β -1 in GH-3-Zellen einen proliferationsfördernden Effekt hat (19). Da auch Zweifel an der Übertragbarkeit der Tierexperimente wegen ungeklärter Heterogenität im Vergleich zu in-Vitro-Experimenten bestehen (19), muss eine andere Einflussgröße als Progressionsfaktor von Prolaktinomen angenommen werden. Diese konnte in TGF- β -2 gefunden werden, das eine antagonistische Wirkung hat und in lactotropen Tumoren ebenfalls supprimiert ist. Hierauf soll später genauer eingegangen werden.

In TSH-produzierenden Tumoren ist die TGF- β -1-Expression deutlich supprimiert. Da es sich bei TSH-produzierenden Tumoren um absolute Raritäten handelt, bestehen nur unzureichende Kenntnisse über deren Pathogenese. Da bisher keine Zelllinie als geeignetes Modell zur Verfügung steht, kann über kausalpathogenetischen Zusammenhang nur spekuliert werden. In zukünftigen Untersuchungen muss geklärt werden, welchen Einfluss TGF- β auf Proliferation und Sekretionsverhalten TSH-produzierender Zellen nimmt. Die in TSH-produzierenden Tumoren supprimierte Expression legt jedoch eine physiologischerweise hemmende Wirkung nahe. Jedoch müssen andere Einflussgrößen ausgeschlossen werden.

Hormoninaktive Tumoren weisen ebenfalls eine verminderte Expression von TGF- β -1 auf. Auch in diesem Fall ist nur wenig über die Pathogenese bekannt. Möglicherweise ist auch hier eine fehlende Proliferationshemmung durch TGF- β -1 von pathogenetischer Bedeutung.

Auf die regulatorische Bedeutung von follikulostellaren Zellen für Funktion und Wachstum von Hypophysenzellen wurde bereits hingewiesen. In bisherigen Untersuchungen konnten FS-Zellen als Quelle verschiedenster para- bzw. autokrin wirkender Faktoren identifiziert werden. FS-Zellen scheinen eine Hauptquelle von TGF- β -1 und 3 darzustellen (50). Andererseits exprimieren sie auch TGF- β -Rezeptoren. In Tt/GF-Zellen, die als Modell dienen, scheint TGF- β -1 die Proliferation zu hemmen. Da FS-Zellen über die Ausschüttung von bFGF und VEGF Einfluss auf die Angiogenese, und damit einen entscheidenden Faktor für die Tumorprogression nehmen, könnte eine verminderte Hemmung durch TGF- β -1 auf FS-Zellen eine pathogenetische Rolle in der Tumorprogression spielen (52).

Andererseits ist bekannt, dass TGF- β -1 die Ausschüttung von bFGF und VEGF fördert. Da sich immunhistochemisch in fast allen Tumoren alle TGF- β -Isoformen im Endothel von Gefäßen nachweisen ließen, könnte TGF- β tatsächlich direkt und auch indirekt an der

Angiogenese in Tumoren beteiligt sein. Ob dabei das Endothel Ursprungsort des TGF- β ist oder das TGF- β aus FS-Zellen stammt ist bisher noch unklar.

5.2 TGF- β -2

Über TGF- β -2 ist bisher nur wenig bekannt. Bisher wurde angenommen, dass diese Isoform nur eine untergeordnete Rolle spielt. Es wurde nur eine suppressive Wirkung auf die Prolaktinsekretion lactotroper Zellen festgestellt (19).

In dieser Arbeit konnte ein relativ hoher Anteil TGF- β -2-positiver Zellen in der normalen Hypophyse festgestellt werden.

In kortikotropen Tumoren ist TGF- β -2 in etwa gleichem Maße vorhanden, während diese Isoform in anderen Tumorarten stark supprimiert ist. Auch in der AtT-20-Zelllinie konnte TGF- β -2 nachgewiesen werden, das zwar im niedrigen Konzentrationsbereich einen stimulierenden Einfluss auf deren Proliferation hat, jedoch in höheren Konzentrationen hemmend auf Proliferation und Hormonsekretion wirkt. Die Ergebnisse legen die Theorie nahe, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den TGF- β -Isoformen einen pathogenetischen Faktor bei der Entstehung kortikotroper Tumoren darstellt. So würde die festgestellte Verminderung des proliferationshemmenden TGF- β -2 hin zu proliferationsfördernden Konzentrationen bei gleichzeitiger Überexpression des proliferationsfördernden TGF- β -1 in einem insgesamt wachstumsfördernden Effekt resultieren, was das Tumorstadium begünstigen würde.

Ein derartiger Expressionsshift wurde bisher nur zwischen TGF- β -1 und 3 angenommen (19). Die hier gezeigten Daten deuten jedoch auch auf eine entscheidende Rolle des TGF- β -2 hin, dessen Expressionsmuster auch in anderen Tumorarten verändert ist.

In lactotropen Tumoren scheint die TGF- β -2-Expression vermindert zu sein. Es konnte anhand der GH-3-Zelllinie, in der auch eine Expression von TGF- β -2 und seiner Rezeptoren nachgewiesen werden konnte, gezeigt werden, dass TGF- β -2 eine hemmende Wirkung sowohl auf die Proliferation als auch auf die Hormonsekretion hat, was die Daten von *Sarkar et al.* bestätigt. Diese Daten unterstützen die oben genannte Theorie eines Expressionsshifts als pathogenetischer Faktor in der Tumorentstehung (19). So scheint auch in lactotropen Tumoren der proliferationsfördernde Effekt des TGF- β -1 zu überwiegen.

Es konnte jedoch auch in somatotropen Tumoren eine verminderte TGF- β -2-Expression festgestellt werden. Es konnte in GH-3-Zellen, die, wie erwähnt, auch GH sezernieren, gezeigt werden, dass TGF- β -2 die Sekretion von GH signifikant supprimiert. Die gezeigte verminderte TGF- β -2-Expression könnte somit die gesteigerte Wachstumshormonsekretion somatotroper Adenome erklären.

In TSH-produzierenden Tumoren ist die TGF- β -2-Produktion völlig supprimiert. Auch in diesem Fall ist die Bedeutung des TGF- β -2 auf die Tumorentstehung noch unklar, da dessen physiologischer Einfluss auf TSH-produzierender Zellen noch nicht geklärt ist. Man muss jedoch davon ausgehen, dass TGF- β -2 zumindest indirekt an der Tumorgenese beteiligt ist, da die Expression im Vergleich zur Normalhypophyse in beeindruckender Weise verändert ist. Da TGF- β -2 in TSH-produzierenden Tumoren stark vermindert ist, könnte dessen fehlende hemmende Wirkung auf das Wachstum der TSH-produzierenden Zellen einen pathogenetischen Faktor darstellen.

Dies könnte auch auf hormoninaktive Tumoren zutreffen, in denen TGF- β -2 auch vermindert ist.

Interessanterweise scheint auch TGF- β -2 an dem regulatorischen Netzwerk der FS-Zellen beteiligt zu sein. Am Model der TtT/GF-Zelle konnte gezeigt werden, dass deren Wachstum durch TGF- β -2 gehemmt wird. Bisher ist jedoch nicht bekannt, welchen Einfluss TGF- β -2 auf die Sekretion von FS-Zellen hat. Da TGF- β -2 auch hier im Endothel der Gefäße der Tumoren nachweisbar war, und wie erwähnt, FS-Zellen eine Quelle des angiogenetisch bedeutenden bFGF und VEGF darstellen, könnte dies im Falle einer sekretionsfördernden Wirkung des TGF- β -2 das Tumorwachstum begünstigen, da eine entsprechend gesteigerte Angiogenese für die Tumorprogression von entscheidender Bedeutung ist.

5.3 TGF- β -3

In den bisherigen Untersuchungen an lactotropen Zellen bzw. Prolaktinomen ging man davon aus, dass es sich bei TGF- β -3 um einen Gegenspieler von TGF- β -1 handelt. So wirkt TGF- β -1 proliferationshemmend auf lactotrope Zellen, während TGF- β -3 deren Wachstum fördert (19). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass diese vereinfachte Darstellung der komplexen und heterogenen Wirkungsweise dieser Substanzgruppe nicht gerecht wird.

Zunächst konnte ein Anteil von 20% TGF- β -3-positiver Zellen in der normalen Hypophyse festgestellt werden. In den einzelnen Tumorarten konnte immunhistochemisch ein ähnliches Expressionsmuster festgestellt werden, wie es auch bei TGF- β -1 gefunden wurde.

So ist TGF- β -3 in kortikotropen Tumoren stark überexprimiert. Auch in der AtT-20-Zelllinie konnte TGF- β -3 nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen an AtT-20-Zellen ergaben eine proliferationshemmende Wirkung, was die Theorie der antagonistischen Beziehung zu TGF- β -1 stützt. Jedoch fördert auch TGF- β -3 ebenso wie TGF- β -1 die Hormonsekretion, was die heterogene Wirkungsweise der TGF- β -Familie zeigt. Die Überexpression beider sekretionsfördernder Faktoren in kortikotropen Tumoren könnte deswegen als mögliche Ursache der Hyperkortisolismus bei Patienten mit kortikotropen Tumoren in Betracht kommen. Eine möglicherweise kompensatorisch erhöhte Expression des TGF- β -3 könnte im Hinblick auf das ebenfalls überexprimierte TGF- β -1 angenommen werden, da dies dem proliferationsfördernden Effekt des TGF- β -1 entgegenwirken könnte. Dieser Mechanismus scheint in kortikotropen Tumoren das Wachstum nicht mehr ausreichend bremsen zu können.

In somatotropen Tumoren scheint TGF- β -3 ebenso wie TGF- β -1 überexprimiert zu sein. Da TGF- β -3 die Proliferation von MtT/S-Zellen zu hemmen scheint, muss wie bei TGF- β -2 davon ausgegangen werden, dass in somatotropen Tumoren die proliferationsfördernde Wirkung von TGF- β -1 überwiegt. Dies muss in zukünftigen Untersuchungen anhand eines suffizienten Modells geklärt werden, da sich hier noch keine eindeutige Aussage treffen lässt.

Die Untersuchungen an lactotropen Zellen ergeben wiederum ein heterogenes Bild. In Prolaktinomen ist die TGF- β -3-Expression nur unwesentlich gesteigert. Auch in der als Model dienenden GH-3-Zelllinie konnte eine Expression nicht eindeutig festgestellt werden, obwohl beide Rezeptortypen vorhanden waren. Es konnte die bisherige Annahme bestätigt werden, dass TGF- β -3 als Gegenspieler des TGF- β -1 die Proliferation lactotroper Zellen stimuliert (19). Während TGF- β -1 jedoch die Hormonsekretion alleine nicht beeinflusst, hemmt TGF- β -3 die Prolaktinsekretion. Diese heterogene Wirkungsweise kann auf verschiedene Bindungspartner der Smad-Proteine im Signaltransduktionsweg zurückgeführt werden. So kann die gleiche Substanzgruppe in verschiedenen Zellarten in spezifischer Weise wirken, je nachdem, welche Transkriptionsfaktoren durch Smads aktiviert werden (41).

Eine Überexpression von TGF- β -3 in lactotropen Tumoren könnte einen pathogenetischen Faktor in der Tumorprogression darstellen. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass

lactotrope Zellen unter Östrogeneinfluss vermehrt TGF- β -3 exprimieren. Auf autokrinem Weg könnte so die Proliferation und somit das Tumorwachstum stimuliert werden.

Über die Wirkung von TGF- β -3 in TSH-produzierenden Tumoren ist wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die TGF- β -3-Expression wie auch die der anderen Isoformen im Vergleich zur normalen Hypophyse stark supprimiert ist. Über die Bedeutung dieser Befunde für die Pathogenese kann bisher nur spekuliert werden. Offensichtlich haben die TGF- β -Isoformen im Zusammenspiel physiologischerweise einen proliferationshemmenden Effekt auf TSH-produzierende Zellen. In entartetem Gewebe könnte ein Ausfall dieser Faktoren also das Tumorwachstum begünstigen. Eine intensivere Untersuchung dieser Theorie ist in Zukunft nötig.

Gleiches gilt für hormoninaktive Hypophysenadenome, in denen ebenfalls eine verminderte Expression von TGF- β -3 und auch der anderen Isoformen festgestellt werden konnte. Auch hier bleibt die Bedeutung dieser Veränderungen im Expressionsmuster im Vergleich zur Normalhypophyse unklar und macht weitere Untersuchungen erforderlich.

Interessanterweise scheinen alle TGF- β -Isoformen einen synergistischen Effekt auf FS-Zellen zu haben. So konnte auch ein wachstumshemmender Effekt des TGF- β -3 auf TtT/GF-Zellen nachgewiesen werden. Es ist jedoch bekannt, dass TGF- β -3, das ebenfalls im Endothel der Gefäße aller Tumorarten festgestellt werden konnte, die Ausschüttung von bFGF fördert, das die Angiogenese und die Proliferation von lactotropen Zellen stimuliert (52). Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass Veränderungen der TGF- β -Expression indirekt die Angiogenese und damit die Tumorprogression fördern. Zur Klärung der genauen Mechanismen sind weitere Untersuchungen nötig.

6 Zusammenfassung

Die Hypophyse unterliegt zahlreichen extra- und intrahypophysären regulatorischen Einflüssen. Dabei wurde in den letzten Jahren zunehmend deutlich, dass lokal produzierte Faktoren dabei eine Schlüsselrolle in der Physiologie und Tumorgenese einnehmen. Zu diesen Faktoren zählt auch die TGF- β -Familie. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals systematisch die Expression der drei TGF- β -Isoformen in der normalen Hypophyse und verschiedenen Hypophysenadenomen untersucht.

TGF- β spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktion von Hypophysenzellen. Die hier gezeigte Untersuchung zeigt die Bedeutung autokrin- und parakrin wirkender Faktoren für intrahypophysäre regulatorische Vorgänge sowie die mögliche Auswirkung einer Dysregulation dieser Faktoren am Beispiel der TGF- β -Isoformen.

Es konnte hier gezeigt werden, dass die verschiedenen Hypophysentumoren im Vergleich zur normalen Hypophyse z.T. erhebliche Veränderungen im Expressionsmuster der TGF- β -Isoformen aufweisen, was einen möglichen pathogenetischen Faktor in der Tumorentstehung bzw. -progression darstellen könnte. Es konnte auch ein sehr heterogenes Bild der Wirkungen der TGF- β -Isoformen auf verschiedene Zellarten gezeigt werden, wie es auch schon bei anderen Mitgliedern dieser komplexen Substanzgruppe festgestellt wurde.

TGF- β -1, das einen stimulierenden Einfluss auf kortikotrope Zellen hat, ist in kortikotropen Tumoren überexprimiert, was einen Faktor für die Tumorentstehung darstellen könnte. Während die Bedeutung einer Überexpression in somatotropen Tumoren weiterhin unklar bleibt, konnte die Theorie eines Expressionsshift innerhalb der TGF- β -Isoformen als Ursache der Tumorentstehung untermauert werden.

In dieser Arbeit wird dabei erstmalig auf TGF- β -2 eingegangen, dessen Bedeutung bisher nicht erkannt wurde. In lactotropen Tumoren konnte eine verminderte Expression des wachstumshemmenden Faktors festgestellt werden. Aus dem Zusammenspiel aller Isoformen scheint ein proliferationsfördernder Effekt zu resultieren. Das Gleiche gilt auch für kortikotrope Tumoren.

Wie TGF- β -1, ist auch TGF- β -3 in kortikotropen und somatotropen Tumoren überexprimiert. Es konnte festgestellt werden, dass TGF- β -3 nicht als reiner Antagonist des TGF- β -1 agiert, sondern wesentlich heterogener wirkt. Auch hier bleibt die Bedeutung für somatotrope Tumoren unklar, während in kortikotropen Tumoren die Überexpression des

proliferationshemmenden TGF- β -3 möglicherweise einen Kompensationsmechanismus darstellt.

Dagegen wurde die proliferationsfördernde Wirkung von TGF- β -3 auf lactotrope Zellen am Modell der GH-3-Zelllinie bestätigt. Im Zusammenspiel mit dem veränderten Expressionsmuster der anderen Isoformen ist TGF- β -3 möglicherweise an der Pathogenese von Prolaktinomen beteiligt.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass neben Prolaktinomen auch andere Tumorarten der Hypophyse ein verändertes Expressionsmuster der TGF- β -Isoformen aufweisen. So wurde eine deutlich verringerte Expression aller Isoformen in TSH-produzierenden und hormoninaktiven Hypophysenadenomen festgestellt. Bleibt die genaue Bedeutung dieser Befunde bisher noch unklar, geben sie dennoch einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung von TGF- β an der Pathogenese dieser Hypophysentumoren.

Des Weiteren konnte ein proliferationshemmender Effekt aller Isoformen auf die TtT/GF-Zelle gezeigt werden. Diese dient als Modell für die follikulostellaren Zellen, die entscheidenden Anteil an der Regulation der Hypophysenzellen haben. Sie sind Quelle des bFGF und VEGF, die als wichtige Stimulatoren der Angiogenese pathogenetische Bedeutung für die Tumorprogression haben.

Zusammenfassend wurde in den verschiedenen Tumorentitäten der Hypophyse ein unterschiedlich verändertes Expressionsmuster der TGF- β -Isoformen festgestellt. Anhand von Zelllinien konnte die physiologische Bedeutung der einzelnen Isoformen untersucht werden und auf mögliche Auswirkungen auf die Pathogenese von Hypophysentumoren im Hinblick auf ihre veränderte Expression geschlossen werden.

Literatur

1. **Amar S, Weiss R:** Pituitary anatomy and physiology, in Neurosurgical Clinical Note of America, 14: 11-23, 2003
2. **Asa SL, Ezzat S:** The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas, in Endocrine Reviews, 19: 798-827
3. **Asa SL, Kovacs K:** Clinically non-functioning human pituitary adenomas, in Canadian Journal of Neurological Science, 19: 228-235, 1992
4. **Biller BM:** Hyperprolactinemia, in International Journal of Fertile Women's Medicine, 44: 74-77, 1999
5. **Biller BM, Luciano A, Crosignani PG, Molitch M, Olive D, Rebar R, Sanfilippo J, Webster J, Zacur:** Guidelines for the diagnosis and treatment of hyperprolactinemia, in Journal of Reproductive Medicine, 44: 1075-1084, 1999
6. **Buonassisi V, Sato G, Cohan A.I.:** Hormone-Producing Cultures of Adrenal and Pituitary Tumor Origin, in Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A., 48: 1184-1190, 1996
7. **Clayton RN, Farrell WE:** Pituitary Tumour Clonality Revisited, in George Kontogeorgos, Kalman Kavacs: Molecular pathology of the pituitary, 32, 2004; 186-204, 2004
8. **Clayton RN, Pfeifer M, Atkinson AB, Belchetz P, Wass JA, Kyrodimou E, Vanderpump M, Simpson D, Bicknell J, Farrell WE:** Clonality of pituitary tumours: more complicated than initially envisaged, in Brain Pathology, 11: 313-327, 2001
9. **D'Abronz FH, Swearingen B, Klibanski A, Alexander JM:** Mutational Analysis of Activin/Transforming Growth Factor β Type I and II Receptor Kinases in Human Pituitary Tumors, in The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84: 1716-1521, 1999

10. **De A, Hentges S, Boyadijieva N, Sarkar DK:** Effect of Antisense Suppression of Transforming Growth Factor- β 3 Gene on Lactotropic Cell Proliferation, *Journal of Neuroendocrinology*, 13: 324-327, 2001
11. **Dietrich KD, Gundelfinger ED, Ludecke DK, Lehnert H:** Mutation and expression analysis of corticotropin-releasing factor 1 receptor in adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas, in *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83: 3327-3331, 1998
12. **Farrel WE, Clayton RN:** Epigenetic change in pituitary tumorigenesis, in *Endocrine Related Cancer*, 10: 323-330, 2003
13. **Ferrara N, Henzel WJ:** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, in *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161: 851-858, 1989
14. **Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R, Gospodarowicz D:** Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor, in *Proceedings of the National Academy Science of the U.S.A.*, 84: S.5773-5777, 1987
15. **Gamby C, Waage MC, Allen RG, Baizer L:** Growth-associated Protein-43 (GAP-43) Facilitates Peptides Hormone Secretion in Mouse Anterior Pituitary AtT-20 Cells, in *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 271: 10023-10028, 1996
16. **Giacomini D, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Gerez J, Nagashima AC, Chervin A, Berner S, Labeur S, Refolo D, Renner U, Stalla GK, Arzt E:** Bone morphogenetic protein-4 control of pituitary pathophysiology, in *Frontiers of Hormone Research*, 35: 22-31, 2006
17. **Giacomini D, Páez-Pereda M, Theodoropoulou M, Labeur M, Refojo D, Gerez J, Chervin A, Berner S, Losa M, Buchfelder M, Renner U, Stalla GK, Arzt E:** Bone

- morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action, in *Endocrinology*, 147: 247-256, 2006
18. **Hentges S, Boyadjieva N, Sarkar DK:** Transforming growth factor- β 3 stimulates lactotrope cell growth by increasing basic fibroblast growth factor from folliculostellate cells, in *Endocrinology*, 121: 859-867, 2000
 19. **Hentges S, Sarkar DK:** Transforming Growth Faktor- β Regulation of Estradiol-Induced Prolactinomas, *Frontiers of Neuroendocrinology*, 22: 340-363, 2001
 20. **Herold G:** Endokrinologie, in *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*: 685-687, 2006
 21. **Hofland LJ, Lambert SWJ:** Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy, in *Molecular Pathology of the Pituitary*, 32: 235-252, 2004
 22. **Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S:** The structure and function of Folliculo-Stellate cells in the anterior pituitary gland, in *Archives Histology and Cytology*, 63: 205-218, 1999
 23. **Inoue K, Hattori M-A, Sakai T, Inukai S, Fujimoto N, Ito A:** Establishment of a series of pituitary clonal cell lines differing in morphology, hormone secretion, and response to estrogen, in *Endocrinology*, 126: 2313-2320, 1990
 24. **Inoue K, Matsumoto H, Koyama C, Shibata K, Nakazato Y, Ito A:** Establishment of a folliculo-stellate-like cell line from a thyrotropic pituitary tumor, in *Endocrinology*, 131: 3110-3116, 1992
 25. **Kameya T, Tsukada T, Yamaguchi K:** Recent Advance in MEN 1 Gene Study for Pituitary Tumor Pathogenesis, in *Pituitary Tumor Formation*, G. Kontogeorgos, Kalman Kavacs: *Molecular Pathology of the Pituitary*, 32: 265-283, 2004
 26. **Karow T, Lang-Roth R:** Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: 549-557, 2005

27. **Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ:** Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice, *Neuron*, 19: 103-113, 1997

28. **Korbonits M, Morris DG, Nanzer A, Kola B, Grossman AB:** Role of regulatory factors in pituitary tumor formation, *Molecular Pathology of the Pituitary*, 32: 63-95, 2004

29. **Koyama C, Matsumoto H, Sakai T, Wakabayashi K, Ito A, Couch EF, Inoue K:** Pituitary Folliculo-Stellate-Like cells stimulate somatotrophic pituitary tumor growth in nude mice, in *Endocrine Pathology*, 6: 67-75, 1995

30. **Lidhar K, Korbonits M, Jordan S, Khalimova Z, Kaldas G, Lu X, Clayton RN, Monson JP, Besser GM, Lowe DG, Grossman AB:** Low expression of cell cycle inhibitor p27^{Kip1} normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors, in *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84: 3823-3830, 1996

31. **Lippert H:** Lehrbuch Anatomie, 5.Auflage, Urban & Fischer Verlag: 491-494, 2000

32. **Lloyd RV:** Advance in Pituitary Pathology: Use of Novel Techniques, in George Kontogeorgos, Kalman Kavacs: *Molecular Pathology of the Pituitary*, 32: 146-174, 2004

33. **Löffler G:** Endokrine Gewebe I: Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen, in Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage: 763-765, 1998

34. **Löffler G:** Methoden zur Hormonbestimmung, in Löffler/ Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, 6.Auflage: 766-768, 1998

35. **Löffler G:** Replikation und Gentechnik, in Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage: 229- 231, 1998

36. **Löffler, Petrides:** Biochemie und Pathobiochemie, 6.Auflage: 743-50, 838, 919, 967, 1077, 1998
37. **Mah PM, Webster J:** Hyperprolactinemia: etiology, diagnosis and management, in Seminar of Reproductive Medicine, 20: 365-374, 2002
38. **Matsuda T, Yamamoto T, Muraguchi A, Saatcioglu F:** Cross-talk between transforming growth factor- β and estrogen receptor signaling through Smad3, in The Journal of Biological Chemistry, 276: 42908-42914, 2001
39. **Miller DA, Pelton RW, Derynck R, Moses HL:** Transforming growth factor β : a family of growth regulatory peptides. Annals of the New York Academy of Science, 593: 208-217, 1990
40. **Mogi C, Goda H, Mog K, Takaki A, Yokoyama K, Tomida M, Inoue K:** Multistep differentiation of GH-producing cells from their immature cells, in Journal of Endocrinology, 184: 41-50, 2005
41. **Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C-H:** Smad regulation in TGF- β signal transduction, in Journal of Cell Science, 114: 4359-4369, 2001
42. **Muşat M, Vax VV, Borboli N, Gueorguiev M, Bonner S, Korbonits M, Grossman SB:** Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis, in Molecular Pathology of the Pituitary, 32: 34-62, 2004
43. **Niiori-Onishi A, Iwasaki Y, Mutsuga N, Oiso Y, Inoue K, Saito H:** Molecular Mechanisms of the Negative Effect of Insulin Like Growth Faktor-I on Growth Hormone Gene Expression in MtT/S Somatotroph Cells, in Endocrinology, 140: 344-349, 1999

44. **Oomizu S, Chatrtrvedi K, Sarkar DK:** Folliculostellate cells determine the susceptibility of lactotropes to estradiol's mitogenic action, in *Endocrinology*, 145: 1473-1480, 2004
45. **Osamura RY, Egashira N, Miyai S, Yamazaki M, Takekoshi S, Sanno N, Teramoto A:** Molecular Pathology of the Pituitary, in George Kontogeorgos, Kalman Kovacs: *Molecular Pathology of the Pituitary*, 32: 20-33, 2004
46. **Paez-Pereda M, Giacomini D, Refojo D, Nagashima AC, Hopfner U, Grubler Y, Chervin A, Goldberg V, Goya R, Hentges ST, Low MJ, Holsboer F, Stalla GK, Arzt E:** involvement of bone morphogenic protein-4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk, in *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, 100: 1034-1039, 2003
47. **Petrides PE:** Hypothalamisch-hypophysäre Beziehung, in Löffler/ Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, 6.Auflage: 817, 1998
48. **Pschyrembel,** *Klinisches Wörterbuch*, 258 Auflage, Version 2, Porta Coeli Hyper Book
49. **Qian SW, Burmester JK, Tsang ML, Weatherbee JA, Hinck AP, Ohlsen DJ, Sporn MB, Roberts AB:** Binding affinity of transforming growth factor- β for its type II receptor is determined by the C-terminal region of the molecule, in *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 271: 30656-30662, 1996
50. **Renner U, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, Arzt E, Stalla GK:** Transforming growth factor- β stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells, in *Endocrinology*, 143: 3759-3765, 2002
51. **Renner U, Paez-Pereda M, Arzt E, Stalla GK:** Growth factors and cytokines: function and molecular regulation in pituitary adenomas, in G. Kontogeorgos, K. Kovacs: *Molecular Pathology of the Pituitary*, 32: 96-109, 2004

52. **Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK:** Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review, in *European Journal of Endocrinology*, 135: 515-532, 1996

53. **Renner U, Schaaf L, Stalla GK:** Hypothalamische und hypophysäre Erkrankungen: 11-40, 2001

54. **Riede UN, Saeger W:** Adenohypophyse, in U.-N. Riede, H.-E. Schaefer: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4. Auflage: 968-971, 1999

55. **Saiardi A, Bozzi Y, Baik J, Borrelli E:** Antiproliferative Role of Dopamine: Loss of D2-Receptors Causes Hormonal Dysfunction and Pituitary Hyperplasia, in *Neuron*, 19: 115-26, 1999

56. **Scherbaum WA, Drynda K, Fehm H-L:** Hypothalamus und Hypophyse, aus *Endokrine Erkrankungen*, in *Thiemes Innere Medizin: TIM*: 141-158, 1999

57. **Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly PA, Iuvone PM, Asa SL, Low MJ:** Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and –independent mechanisms, in *Journal of Clinical Investigation*, 110: 973-981, 2002

58. **Simpson DJ, Frost SJ, Bicknell JE, Broome JC, McNicol AM, Clayton RN, Farrell:** Aberrant expression of G(1)/S regulators is a frequent event in sporadic pituitary adenomas, in *Carcinogenesis*, 22: 1149-1154, 2001

59. **Simpson DJ, Fryer AA, Grossman AB, Wass JA, Pfeifer M, Kros JM, Clayton RN, Farrell WE:** Cyclin D1 (CCND1) genotype is associated with tumour grade in sporadic pituitary adenomas, in *Carcinogenesis*, 22: 1801-1807, 2001

60. **Stanko RL, Cohick WS, Shaw DW, Harvey RW, Clemmons DR, Whitacre MD, Armstrong JD:** Effect of somatotropin and equine chorionic gonadotropin on serum

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. G. K. Stalla, der mir die Gelegenheit gab, in seiner Arbeitsgruppe mit viel Freiraum und doch auch guter Unterstützung dieses interessante Thema zu untersuchen und alle mir wichtigen Techniken zu erlernen. Nicht zu letzt möchte ich ihm für die wunderbaren Weihnachtsfeste danken, die ein kulinarischer Genuss waren und sehr zur guten Atmosphäre beigetragen haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt vor allem Dr. Ulrich Renner, der mir mit viel Geduld und Rat und Tat immer zur Seite stand, der stets ein offenes Ohr und eine unterhaltsame Anekdote bereit hielt und von dem ich nicht nur in fachlicher Hinsicht viel lernen konnte. Insbesondere möchte ich ihm für die zuverlässige und rasche Korrektur der Arbeit danken.

Mein höchster Dank gilt Chiara Onofri, die mir mit unendlicher Geduld alle Techniken beibrachte und mit der man sich immer wunderbar unterhalten konnte. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte auch Dr. Marily Theodoropoulou für die Lösung spezieller und besonders komplexer Probleme danken.

Sehr dankbar bin ich Johanna Stalla für die Durchführung zahlreicher RIA's, ohne die ein Teil dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Sandra Laupheimer bedanken, die mich nicht nur bei der Durchführung der Experimente zuverlässig und mit viel Geduld unterstützte, sondern mir auch ein guter Freund geworden ist und mit der ich immer viel lachen konnte.

Dr. Marta Labeur möchte ich danken für die Unterstützung bei der Erstellung von geeigneten Primern, die netten Unterhaltungen und ein wunderbares argentinisches Grillfest.

Besonderer Dank gilt Julia Grübel für die geduldigen Erklärungen und Ausarbeitungen der Statistik.

Zuletzt möchte ich ganz herzlich Prof. Dr. L. Schaaf danken, der mir diese Arbeit vermittelte.

70. **Xu RK, Wu XM, Di AK, Xu JN, Pang CS, Pang SF:** Pituitary Prolactin-Secreting Tumor Formation: Recent Developments, in *Neuro-Signals*, 9: 1-20, 2000

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. G. K. Stalla, der mir die Gelegenheit gab, in seiner Arbeitsgruppe mit viel Freiraum und doch auch guter Unterstützung dieses interessante Thema zu untersuchen und alle mir wichtigen Techniken zu erlernen. Nicht zu letzt möchte ich ihm für die wunderbaren Weihnachtsfeste danken, die ein kulinarischer Genuss waren und sehr zur guten Atmosphäre beigetragen haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt vor allem Dr. Ulrich Renner, der mir mit viel Geduld und Rat und Tat immer zur Seite stand, der stets ein offenes Ohr und eine unterhaltsame Anekdote bereit hielt und von dem ich nicht nur in fachlicher Hinsicht viel lernen konnte. Insbesondere möchte ich ihm für die zuverlässige und rasche Korrektur der Arbeit danken.

Mein höchster Dank gilt Chiara Onofri, die mir mit unendlicher Geduld alle Techniken beibrachte und mit der man sich immer wunderbar unterhalten konnte. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte auch Dr. Marily Theodoropoulou für die Lösung spezieller und besonders komplexer Probleme danken.

Sehr dankbar bin ich Johanna Stalla für die Durchführung zahlreicher RIA's, ohne die ein Teil dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Sandra Laupheimer bedanken, die mich nicht nur bei der Durchführung der Experimente zuverlässig und mit viel Geduld unterstützte, sondern mir auch ein guter Freund geworden ist und mit der ich immer viel lachen konnte.

Dr. Marta Labeur möchte ich danken für die Unterstützung bei der Erstellung von geeigneten Primern, die netten Unterhaltungen und ein wunderbares argentinisches Grillfest.

Besonderer Dank gilt Julia Grübel für die geduldigen Erklärungen und Ausarbeitungen der Statistik.

Zuletzt möchte ich ganz herzlich Prof. Dr. L. Schaaf danken, der mir diese Arbeit vermittelte.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sarkar
Vorname: Oliver
Geburtsdatum: 18.06.1979
Geburtsort: Mering/Augsburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1986 – 06/1990 Grundschule in Burghausen
08/1990 – 06/1999 Kurfürst-Maximilian-Gymnasium, Burghausen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07/1999 – 07/2000 Kreiskrankenhaus Burghausen

Hochschulbildung:

10/2000 – 10/2006 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München
08/2002 *Ärztlich Vorprüfung* (Physikum) (Note: gut)
08/2003 *Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung* (Note: gut)
08/2005 *Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung* (Note: gut)
10/2005 bis 9/2006 Praktisches Jahr:
1.Tertial: Anästhesiologie/Intensivmedizin (Indien)
2.Tertial: Innere Medizin (München)
3.Tertial: Chirurgie (München)
24.10.2006 *Ärztliche Prüfung*

Beruf:

Seit 01.01.2007 Assistenzarzt am Klinikum Rechts der Isar, München