

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE

geschäftsführender Direktor:
Professor Dr. Dr. F. Holsboer

**Expression, Lokalisation und funktionelle Bedeutung von PDGF
und PDGF-Rezeptoren in der Hypophyse und in
Hypophysentumorzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Markus Christian Kowarik

aus
München

2007

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München (LMU)

Berichterstatter: Prof. Dr. G.K. Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Uhl
Prof. Dr. F. Beuschlein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. U. Renner

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2007

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Die Hypophyse	6
1.2. Hypophysentumoren	8
1.3. Zelluläre Modelle für die Untersuchung der Hypophyse und deren Tumoren	9
1.4. PDGF (Plateled-Derived Growth Factor)	12
1.4.1. PDGF Isoformen	12
1.4.2. PDGF Rezeptoren	15
1.4.3. PDGF Signalwege	18
1.4.4. Physiologische Funktionen von PDGF	19
1.4.5. Rolle von PDGF bei Tumorwachstum	21
1.5. Zielsetzung der Arbeit	24
2. Methodik	25
2.1. Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen	25
2.1.1. Geräte und Materialien	25
2.1.2. Chemikalien	26
2.1.3. Lösungen	28
2.2. Zellkultur	29
2.3. Stimulation	30
2.4. Wachstumbestimmung mit WST-Assay	30
2.5. RNA-Extraktion	31
2.6. Reverse Transkriptase- und Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	32
2.7. Messung von VEGF und PDGF mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	34
2.8. Hormonbestimmung mittels RIA	35
2.9. Western Blot	36
2.10. Immunhistochemie (IHC)	38
2.11. Statistik	40

3. Ergebnisse	41
3.1. mRNA Expression von PDGF A/B und PDGF α -/ β -Rezeptor in der Rattenhypophyse und in Hypophysentumorzelllinien	41
3.2. Lokalisation von PDGF und PDGF-Rezeptoren im Vorderlappen der Rattenhypophyse	43
3.3. Regulation von PDGF in TtT-GF Zellen	47
3.4. Wirkung von PDGF in Hypophysenzellen.....	48
3.4.1. Wirkung von PDGF auf die Hormonsekretion	48
3.4.2. Wirkung von PDGF auf die Proliferation von Hypophysenzelllinien	49
3.4.3. Wirkung von PDGF auf die VEGF Sekretion in TtT-GF Zellen.....	52
3.5. Untersuchung zum Wirkungsmechanismus von PDGF in TtT-GF Zellen.....	54
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung.....	64
6. Referenzen.....	66
7. Danksagung.....	72
8. Lebenslauf	73

Abkürzungsverzeichnis:

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ak	Antikörper
Aqua. Dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
bFGF	Basic Fibroblastic Growth Factor
BMP-4	Bone Morphogenic Protein-4
Bp	Basenpaare
Cd	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRH	Kortikotropin-Releasing-Hormon
EGF	Endothelialer Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FSH	Follikel-Stimulierendes-Hormon
FS Zellen	Follikulostelläre Zellen
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GH	Wachstumshormon (Growth Hormone)
GHRH	Wachstumshormon-Releasing-Hormon
GHIH	Wachstumshormon-Inhibiting-Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
HVL	Hypophysen Vorderlappen
ICH	Immunhistochemie
IL 1/2/6	Interleukin 1/2/6
TSH	Thyroidea-Stimulierendes-Hormon
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia Inhibiting Factor
PAP	PDGF assoziiertes Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor (Platelet-Derived Growth Factor)
PI3K	Phosphatitylinositol-3-Kinase
PLC γ	Phospholipase C γ 1
PRL	Prolaktin
PRH	Prolaktin-Releasing-Hormon
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular endothelial Growth Factor)
VIP	Vasointestinales Peptid
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Hypophyse

Der Hypothalamus und die Hypophyse stellen die zentralen Organe des endokrinen Systems dar, wobei der Hypothalamus als Schnittstelle zwischen zentralnervösem System und Endokrinum fungiert. Des Weiteren finden auf Hypophysenebene modulierende, interaktive Prozesse zwischen Immunsystem und endokrinem System statt [Renner et al, 2001]. Die Hypophyse ist durch die Ausschüttung verschiedener Hormone entscheidend an der Aufrechterhaltung mehrerer homöostatischer Funktionen wie Metabolismus, Wachstum und Reproduktion beteiligt.

Die Hypophyse gliedert sich in den Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse), den Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) und den Hypophysenzwischenlappen, der beim Menschen nur rudimentär vorhanden ist (Abbildung 1).

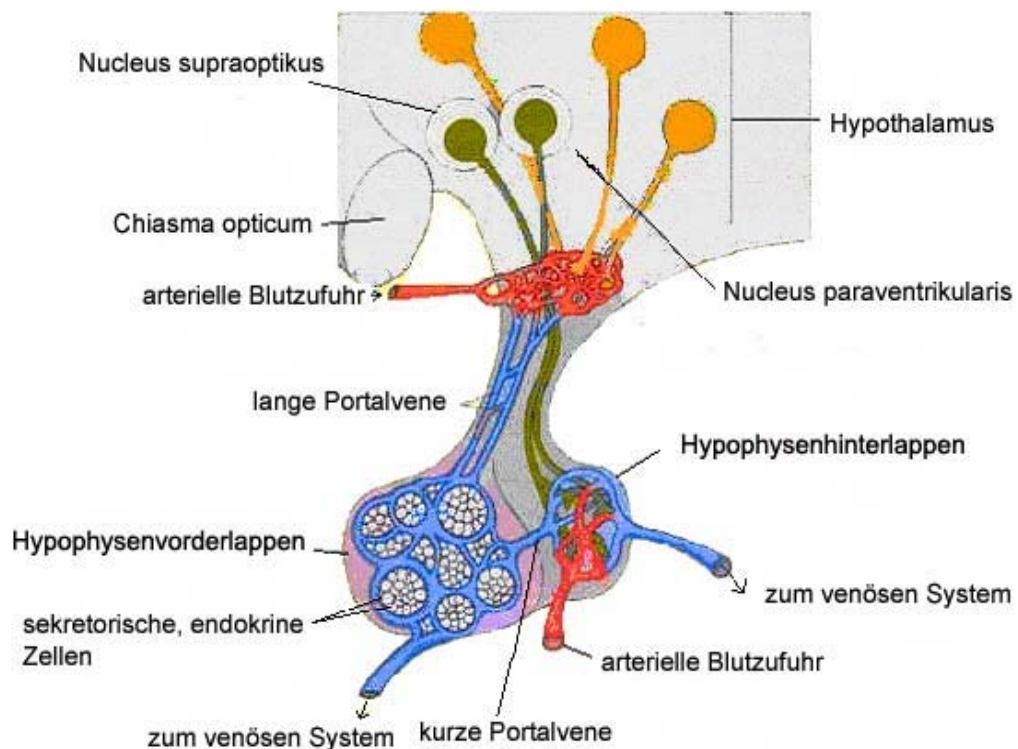


Abbildung 1: Anatomische Darstellung der Hypophyse mit Blutversorgung.

Die **Adenohypophyse** entwickelt sich während der Embryogenese aus der Rathkeschen Tasche (Ausstülpung des Oropharynx) und lässt sich histologisch in die azidophilen (eosinophilen) Zellen (bilden ACTH, FSH, TSH, LH), die basophilen Zellen (bilden GH, Prolaktin) und die neutrophilen (chromophoben) Zellen unterteilen. Mit Ausnahme von FSH und LH, die von einem Zelltyp gebildet werden, wird jedes Hormon durch einen jeweils speziellen Zelltyp gebildet. Ferner gibt es folliculostelläre Zellen (Sternzellen) die mit Mikrogliazellen verwandt sind und mittels Zytokinen endokrine Zellen parakrin modulieren [Renner et al, 1996]. Die Ausschüttung der vier glandotropen Hormone (ACTH, FSH, TSH, LH) sowie der zwei nichtglandotropen Hormone (GH, Prolaktin) wird durch hypothalamische Releasing Hormone (CRH, GnRH, TRH, GHRH) bzw. Inhibitor Hormone (Somatostatin (GHIH), Dopamin)(Abbildung 2), „feedback“ Mechanismen und Zytokine reguliert (Abbildung 3). Zusätzlich zu den Hormonen produzieren die Zellen des HVL auch viele unterschiedliche Peptide wie hypothalamische Releasing Hormone, gastrointestinale Peptide, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Peptide und Zytokine.

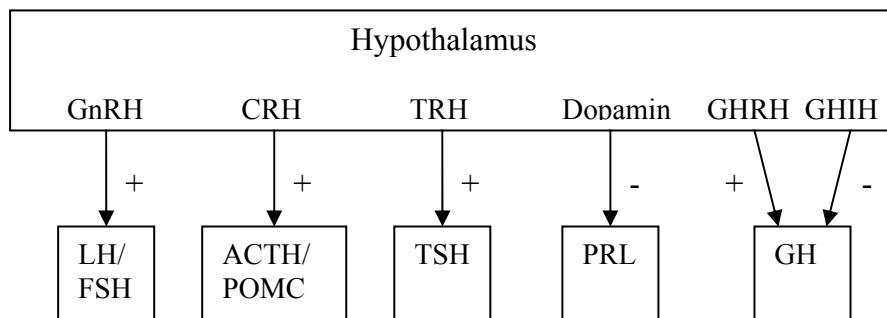


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hormonregulation durch hypothalamische Faktoren.

Die **Neurohypophyse** entsteht aus einer nach kaudal reichender Ausstülpung des Zwischenhirns und stellt eine Ansammlung von Axonendigungen dar, deren Perikarya im Hypothalamus liegen. In den Nuclei supraoptikus und paraventricularis hypothalami werden die beiden Hormone Oxytozin und ADH gebildet und über den Hypophysenhinterlappen ins Blut sezerniert. ADH sorgt für die Wasserrückresorption in der Niere, Oxytozin stimuliert die Wehentätigkeit und den Milchejektionsreflex.

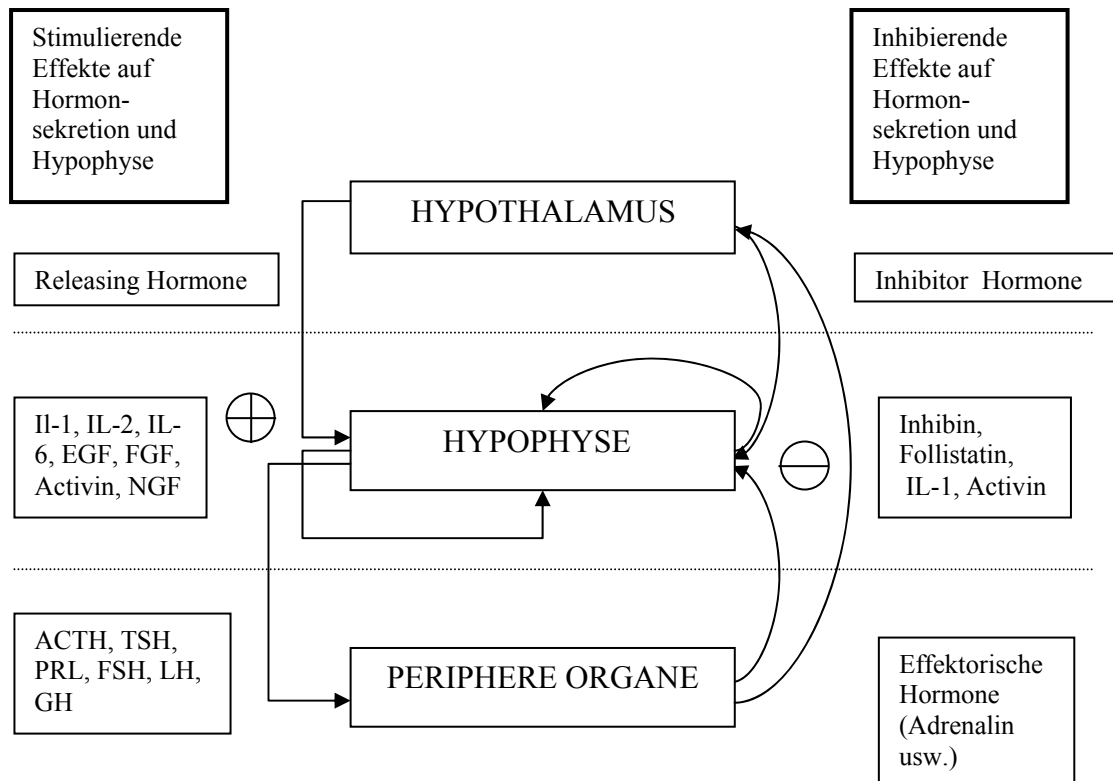


Abbildung 3: Regelkreis der Hormonsekretion. Auf Hypophysenebene modulieren zahlreiche Zytokine, Wachstumsfaktoren und vasogene Substanzen die Zellproliferation/ Hyperplasie und Hormonausschüttung.

1.2. Hypophysentumoren

Hypophysentumoren machen ca. 10%-15% aller intrakraniellen Tumoren aus und metastasieren in der Regel nicht. Es wird zwischen Mikro- (<10 mm Durchmesser) und Makroadenomen (>10 mm Durchmesser) und zwischen hormonaktiven und -inaktiven Tumoren unterschieden. Die Tumoren lassen sich in Prolaktinome (50%), inaktive Tumoren (22%), GH bildende Tumoren (22%), ACTH produzierenden (5%) und Tumoren die LH, FSH oder TSH bilden (1%) unterteilen [Renner et al, 2001].

Der Tumorentstehung liegt ein initiales Ereignis zugrunde, das dazu führt, dass sich die Tumorzellen den physiologischen Regulationsmechanismen entziehen. Ein solches initiales Ereignis ist eine somatische Mutation und die folgende klonale Expansion dieser einzelnen veränderten Zelle [Alexander et al, 1990]. Hormone, Wachstumsfaktoren und angiogenetische Substanzen sind nicht der initiale Auslöser, der zu einem intrazellulären Defekt (z.B. Veränderungen von Tumorsuppressoren wie Retinoblastom, Veränderungen von Rezeptoren

oder Signalwegen) führt [Asa et al, 2002], sie können jedoch zu Hyperplasie und Zellproliferation führen und dadurch die statistische Wahrscheinlichkeit für einen Zelldefekt erhöhen und das Auftreten einer Mutation triggern. Bei der Weiterentwicklung des Tumors scheinen dann diese Hormone (z.B. Releasing Hormone...), Wachstumsfaktoren und angiogenetische Substanzen (wie VEGF, TGF α/β , EGF usw.) eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Zell zu Zell Kommunikation von normalen Zellen des HVL durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasogene Substanzen ist ein wichtiger Regulationsmechanismus und geschieht auf autokrinem und parakrinem Weg. In frühen Schritten der Tumorentwicklung ist die Adenom-Stamm-Zelle von diesem Netzwerk normaler Zellen umgeben und wird auch von besagten Zytokinen beeinflusst. Abhängig von der Charakteristik der transformierten Zelle können Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Substanzen das Wachstum inhibieren (bei Mikroadenomen) oder verstärken (bei Makroadenomen) [Renner et al, 1996].

1.3. Zelluläre Modelle für die Untersuchung der Hypophyse und deren Tumoren

Als Modell für die normale Hypophyse dienten *Rattenhypophysen*, die nach Dekapitation von Ratten gewonnen wurden.

Als Modell für Hypophysenadenome wurden spezielle Hypophysentumorzelllinien verwendet, die charakteristische Merkmale der verschiedenen Tumoren aufweisen:

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien und deren Charakteristika

	TfT-GF	MtT-S	AtT-20	Alpha T3-1	GH 3	PDFS
Zellart	Follikulostelläre Tumorzelllinie	Somatotrope Tumorzelllinie	Kortikotrope Tumorzelllinie	Gonadotrope Tumorzelllinie, GnRH Rez. positiv	Laktosomatotrophe Tumorzelllinie	Follikulostelläre Tumorzelllinie
Spezies	Maus	Ratte	Maus	Maus	Ratte	Mensch
Hormone	keine	GH	ACTH	Alpha Subunit	PRL, GH	Keine
Zytokine, Wachstumsfaktoren	VEGF, IL 6, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, Follistatin u.a.

Follikulostelläre Zellen und die TfT-GF Zelllinie:

Follikulostelläre Zellen (FS Zellen) repräsentieren ca. 5-10% aller Zellen der Hypophyse und haben eine charakteristische sternförmige Morphologie. Sie formen ein zelluläres Netzwerk und umgeben mit ihren langen Zellausläufern endokrine Zellen des Vorderlappens. FS Zellen sind mit hormonproduzierenden Zellen und untereinander über Gap Junctions verbunden [Morand et al, 1996] und transduzieren elektrophysiologische Signale [Fauquier et al, 2001]. Die Expression des S100 Proteins und des Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) lassen auf einen neuroektodermalen Ursprung der Zellen schließen.

FS Zellen produzieren Interleukin 6 (IL-6), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), TGF- β , basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF), Leukemia Inhibiting Factor (LIF) und Follistatin. Im Gegensatz zu hormonproduzierenden Zellen sind FS Zellen multifunktional. FS Zellen sind eingebunden in die Zell zu Zell Kommunikation innerhalb der Hypophyse und modulieren das Antwortverhalten von endokrinen Zellen gegenüber neuroendokrinen und immunologischen Stimuli. Sie regulieren das Ionenmilieu, haben protektive sowie unterstützende Funktionen und können deshalb als eine Art „Glia“ für endokrine Zellen angesehen werden. Darüber hinaus sind FS Zellen zur Phagozytose befähigt und modulieren die extrazelluläre Matrix über Enzyme [Renner et al, 1998].

Aufgrund der Fähigkeit angiogenetische Faktoren (VEGF, bFGF) zu produzieren, spielen die FS Zellen wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Entwicklung, Aufrechterhaltung und Funktion des Gefäßsystems in der Hypophyse [Renner et al, 2001].

Die TtT-GF Tumorzellen entsprechen zum Großteil der Charakteristik von FS Zellen und sind damit zur weiteren Erforschung hervorragend geeignet [Inoue et al, 1992].

Die MtT-S Zelllinie:

Die MtT-S Zelllinie stammt von Tumoren in Fischer F344 Ratten ab, die durch Östrogenbehandlung der Ratten induziert wurden. MtT-S Zellen haben ein eckiges, spindelförmiges Aussehen und besitzen Zellausläufer. Die Proliferation der Zellen kann mit Östrogen stimuliert werden und diese Stimulation mit Tamoxifen inhibiert werden. Sie sezernieren GH und die Stimulation mit GRH induziert die Hormonproduktion. Sie besitzen damit charakteristische Eigenschaften von somatotropen Zellen [Inoue et al, 1990]. Eine weitere Eigenschaft ist, dass MtT-S Zellen in Nacktmäusen Tumoren bilden können. Werden MtT-S Zellen zusammen mit TtT-GF Zellen in Nacktmäusen injiziert, führt dies zu verstärktem Wachstum und größeren Tumoren als bei alleiniger Injektion von MtT-S Zellen. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch die oben beschriebenen TtT-GF Zellen zurück zu führen [Graciarena et al, 2004].

Die AtT-20 Zelllinie:

Die AtT-20 Zelllinie entstammt Hypophysentumoren von Mäusen. Die Zellen sezernieren ACTH, sind CRH- responsiv und dienen als Model für kortikotrope Hypophysentumoren (zentraler Morbus Cushing) [Gamby et al, 1996].

Die alpha T3-1 Zelllinie:

Alpha T3-1 Zellen sind GnRH sensibel und durch gezielte Onkogenese in transgenen Mäusen hergestellt. Sie produzieren die α -Untereinheit der Glykoproteinhormone TSH, FSH und LH. Die Zelllinie hat ähnliche Charakteristiken wie gonadotrope Zellen und ist geeignet, das Antwortverhalten auf GnRH zu untersuchen [Horn et al, 1991].

Die GH 3 Zelllinie:

Die GH 3 Zelllinie wurde aus radioaktiv induzierten Rattenhypophysentumoren gewonnen. Es handelt sich um mammosomatotrope Zellen, die PRL und GH sezernieren und Rezeptoren für die Hormone Dopamin, TRH, Somatostatin, Östradiol, EGF und VIP ausbilden. Die Zellen dienen vor allem als Modell für Prolaktinome, da die PRL Sekretion ähnlich wie in laktotropen Zellen gesteuert wird [Tashjian et al, 1970].

Die PDFS Zelllinie:

Die PDFS Zelllinie wurde aus einem menschlichen, gonadotropen Makroadenom isoliert. Es handelt sich um follikulostelläre Zellen der Hypophyse. Die Zellen haben zytoplasmatische Ausläufer, besitzen interzelluläre Junctions (Desmosomen) sowie die Marker Vimentin und S-100. PDFS Zellen haben eine maligne Transformation durchlaufen, die wahrscheinlich auf einem Defekt des p53 Tumorsuppressors beruht. Sie exprimieren Follistatin und Activin die beide eine wichtige Rolle bei parakriner und autokriner Stimulation spielen. Die Zelllinie dient als Modell für weitere Untersuchungen, die die Mechanismen von Wachstumsfaktoren und deren Regulation betreffen [Danila et al, 2000].

1.4. PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)

1.4.1. PDGF Isoformen

Der Platelet-Derived Growth Factor wurde 1974 entdeckt [Ross et al, 1974] und in den späten 70iger Jahren als ein Faktor identifiziert, der von Blutplättchen abstammt und die Proliferation von mesenchymalen Zellen fördert [Antoniades et al, 1979]. Es sind 5 verschiedene PDGF Isoformen bekannt: PDGF AA, PDGF AB, PDGF BB, PDGF CC und PDGF DD.

Die seit längerem bekannt Faktoren PDGF AA, AB und BB setzen sich aus kationischen Homo- und Heterodimeren der Polypeptid A- und B-Ketten zusammen (Abbildung 4). Die jeweiligen Ketten sind über Disulfid-Brücken miteinander verbunden. Die beiden A- und B-Ketten durchlaufen eine proteolytische Reifung, sind ca. 100 Aminosäuren lang und zeigen eine ca. 60% Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen. Die Gene für die A- und B-Ketten von PDGF sind auf den Chromosomen 7 und 22 lokalisiert. Die Struktur von PDGF zeigt Ähnlichkeiten zu VEGF.

In den letzten 5 Jahren wurden zwei weitere Proteine der PDGF Familie entdeckt: PDGF CC und PDGF DD. Sie werden als inaktive Formen sezerniert [Tallquist et al, 2004] und können erst an den Rezeptor binden, wenn die CUB Domäne durch extrazelluläre Proteasen abgespalten wird. Die CUB Domäne ist ein neues strukturelles Modul der PDGF/VEGF Familie und befindet sich an den N-Termini der PDGF C-/D-Ketten. Die CUB Domäne kommt in zahlreichen Proteinen vor (Komplement-Kaskade, extrazelluläre Proteasen, Zelloberflächenproteine ...) und spielt eine Rolle bei Protein-Protein Interaktionen. Ist die CUB Domäne nur bei einer Kette der homodimern PDGF C-/D-Ketten abgespalten, so fungiert dieser Hemidimer als schwacher Antagonist, da die Rezeptordimerisation und Signalinduktion ausbleibt [Fredriksson et al, 2004]. Da über PDGF CC und DD noch wenig bekannt ist, wurden sie in dieser Arbeit nicht untersucht.

PDGF wird von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet (Tabelle 2). Die Synthese wird oftmals durch externe Stimuli wie niedrige Sauerstoffspannung, Thrombin, zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine erhöht. Die meisten Zellen exprimieren sowohl die A-Kette als auch die B-Kette, die Expression der beiden Ketten ist aber unabhängig reguliert.

PDGF interagiert mit Komponenten der extrazellulären Matrix (verschiedene Kollagentypen, Thrombospondin und BM-40/Osteopontin/SPARC). Die Bindung erfolgt dabei über Heparan-Sulfat und dem Carboxy-Ende. PDGF bindet außerdem an α 2-Makroglobulin und PDGF-assoziiertes Protein (PAP) [Heldin et al, 1999].

Tabelle 2 Vorkommen der PDGF Isoformen

	PDGF A	PDGF B	PDGF C	PDGF D
Hämatopoetische Zellen und Gefäßzellen	Gefäßendothelzellen, glatte Gefäßmuskulzellen, Makrophagen, Blutblättchen	Gefäßendothelzellen, glatte Gefäßmuskulzellen, Makrophagen, Blutblättchen	glatte Gefäßmuskulzellen	Fibroblastische Adventitia
Nervensystem	Astrozyten, Schwannzellen, Neurone	Astrozyten, Schwannzellen, Neurone		
Lunge	Epithelzellen		Epithelzellen, Mesenchymzellen, glatte Muskelzellen, Bronchien	
Niere	Mesangiale Zellen, Henle-Sche Schleife	Mesangiale Zellen		
Fortpflanzungsorgane	Leydigzellen, Oozyte, Uterusendometrium, Zytotrophoblasten	Leydigzellen, Uterusendometrium, Zytotrophoblasten		
sonstige	Fibroblasten, Intestinales Epithel	Fibroblasten	Intestinales Epithel	

1.4.2. PDGF Rezeptoren

Die PDGF-Isoformen übermitteln ihre Effekte auf die Zielzellen, indem sie gleichzeitig zwei PDGF Rezeptoren und die jeweilige Tyrosinkinase aktivieren. Die α - und β -Rezeptoren haben eine molekulare Größe von ca. 170 und 180 kDa und durchlaufen jeweils einen Reifungsprozess. Jeder Rezeptor bildet extrazellulär fünf immunglobulinartige Domänen aus, intrazellulär befindet sich eine Tyrosinkinase Domäne [Matusi et al, 1989]. Das humane α -Rezeptor Gen befindet sich auf Chromosom 4q12 [Spritz et al, 1994](in der Nähe der VEGF und SCF Rezeptor Gens), das β -Rezeptor Gen auf Chromosom 5 [Yarden et al, 1986].

Da die Isoformen von PDGF Dimere sind, binden sie zwei Rezeptoren gleichzeitig und verbinden dadurch zwei Rezeptoren. Die ligandenbindenden Domänen der PDGF α - und β -Rezeptoren befinden sich an den äußersten drei Ig-artigen Domänen [Heidaran et al, 1990]. Die Aktivierung der Tyrosinkinase wird durch die veränderte Anordnung der beiden Rezeptorteile zueinander möglich. Zusätzlich zu der verbindenden Wirkung des Liganden PDGF wird der Rezeptorkomplex durch direkte Rezeptor-Rezeptor Interaktion der jeweiligen Ig Domäne 4 stabilisiert (Abbildung 4) [Omura et al, 1997], [Lokker et al, 1997]. Welche Isoform an welchen Rezeptor bindet ist in Abbildung 4 gezeigt.

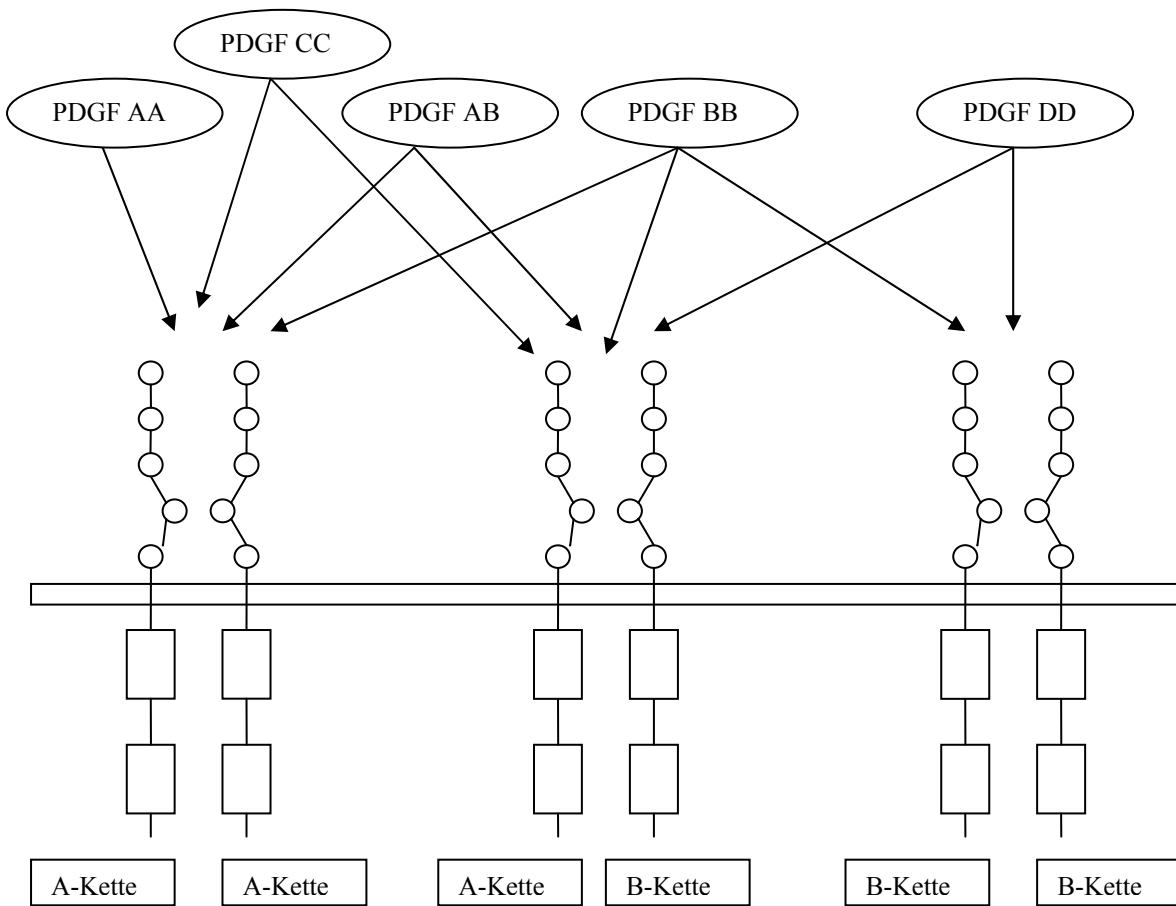


Abbildung 4: Die unterschiedlichen PDGF-Isoformen binden als Ligand nur an bestimmte PDGF-Rezeptoren. Der PDGF-Rezeptor ist extrazellulär aus fünf immunglobulinartigen Domänen aufgebaut, intrazellulär befindet sich Tyrosinkinase-Domänen. PDGF bindet an die drei äußeren Ig-artigen Domänen, die vierte stabilisiert die beiden Ketten untereinander.

Tabelle 3 Vorkommen der PDGF Rezeptoren

	PDGF α-Rezeptor	PDGF β-Rezeptor
Hämatopoetische Zellen und Gefäßzellen	glatte Gefäßmuskulzellen, Blutplättchen	glatte Gefäßmuskulzellen, Gefäßendothelzellen, Perizyten, T-Zellen, Makrophagen, myeloische hämatopoetische Zellen
Nervensystem	Astrozyten, Neurone, Schwannzellen	Neurone, Schwannzellen, postnatale Neurone
Lunge	Mesenchymzellen	
Niere	Mesangiale Zellen	Mesangiale Zellen
Fortpflanzungsorgane	Leydigzellen, intestinale Zellen, Gonaden	Leydigzellen, intestinale Zellen, Gonaden
sonstige	Fibroblasten, Epithelzellen	Fibroblasten, Myoblasten, Epithelzellen
Leber	Sinusoidale Leberzellen	Ito-Zellen

1.4.3. PDGF Signalwege

Die durch Liganden induzierte PDGF Rezeptor Dimerisation und Aktivierung führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors [Kazlauskas et al, 1991] und Suppression der Phosphatase Aktivität [Kovalenko et al, 2003]. Dies bewirkt eine erhöhte Aktivität der Kinase und eine Formation von Andockstellen für Signaltransduktionsmoleküle (z.B. SH2).

Innerhalb von Minuten werden mehrere Signalsysteme aktiviert, wie die Signaltransduktionsmoleküle PI3K, Ras, Phospholipase C γ 1 (PLC γ) und Src. Während die Phosphorylierung innerhalb der Kinasen Domäne essentiell für die Erhöhung der katalytischen Effektivität der Kinasen ist, spielt die Phosphorylierung des PDGF Rezeptors außerhalb der Kinase Domäne eine wichtige Rolle für die Aktivierung von PI3K, PLC γ und Src. Diese drei Signalenzyme besitzen eine SH2 Domäne, über die sie mit hoher Affinität an den Rezeptor binden. Neben diesen Signalenzymen können eine Reihe weiterer Enzyme über ihre SH2 Domäne an den PDGF-Rezeptor binden (SHP-2, GAP, Shc, Grb2/7, Crk usw.) [Tallquist et al, 2004].

Die Aktivierung der **PI3K** erfolgt in zwei Schritten: Der erste Schritt beinhaltet die Bindung an den phosphorylierten Rezeptor und die Translokation von PI3K zur Plasmamembran, was einen höheren Zugriff auf Substrate der Plasmamembran ermöglicht. Der zweite notwendige Schritt zur vollen Aktivierung der PI3K ist die Akkumulation von aktivem Ras, welches an die katalytische Untereinheit der PI3K bindet [Schlessinger et al, 1993]. Das bevorzugte Substrat ist Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat das zu Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat phosphoryliert wird. Die PI3K spielt eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion, kann durch mehrere verschiedene Signale aktiviert werden und führt unter anderem zu Aktin Reorganisation, Chemotaxis, Zellwachstum und Antiapoptose.

Bei der Aktivierung der **Ras** Kaskade werden zunächst die Adapterproteine Grb2 und Shc an die Plasmamembran rekrutiert. Dadurch entsteht eine Translokation des Nukleotid Exchange Faktor Sos in die Nähe von RAS-GDP, welches dadurch zu Ras-GTP aktiviert wird. Die Aktivierung von Ras nimmt Einfluss auf Zellwachstum, Migration und Zelldifferenzierung.

Zwischen den beiden Signalwegen PI3K und Ras besteht ein „Cross-talk“, der die Signalkaskaden jeweils beeinflussen kann [Hu et al, 1995].

1.4.4. Physiologische Funktionen von PDGF

Wesentliche Wirkungen von PDGF sind die Förderung von Migration, Proliferation und Überleben von Zellen. PDGF entfaltet seine Wirkung meist auf parakrinem und autokrinem Weg.

Allgemein sind PDGF B und der PDGF β -Rezeptor vermehrt im Gefäßsystem wirksam, während PDGF A und der PDGF α -Rezeptor in einem breiteren Spektrum an der Embryogenese, im ZNS und der Organentwicklung beteiligt sind.

PDGF und PDGF Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der **embryonalen Entwicklung**. Die Inaktivierung der Gene für die A- und B-Ketten bzw. für die α - und β -Rezeptoren bei Mäusen hat dabei Einblicke in die in Vivo Funktionen ermöglicht [Betsholtz et al, 2004]. Werden beispielsweise die Gene für die B-Kette und den β -Rezeptor inaktiviert, führt dies zu einem Fehlen von Mesangium Zellen der Nieren, zur fehlerhaften Entwicklung von Blutgefäßen und zu charakteristischen Blutungen während der Geburt [Leveen et al, 1994]. Die Blutungen beruhen auf einer fehlerhaften Rekrutierung von Perizyten zu den Blutgefäßen, deren Gefäßwand dadurch an Stabilität verliert.

Der Knock-out der A-Kette führt zur defekten Entwicklung der Lunge mit einem emphysemartigen Phänotyp [Bostrom et al, 1996]. Die Inaktivierung des α -Rezeptorgens bewirkt schwerer ausgeprägte Defekte als die Inaktivierung der A-Kette (kranialen Malformationen und fehlerhafte Entwicklung der Somiten) [Soriano et al, 1997]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass PDGF-B Ketten ebenfalls an den α -Rezeptor binden und das Fehlen der PDGF-A Kette kompensieren können.

Auch im **ZNS** scheinen PDGF und seine Rezeptoren eine Rolle während der Entwicklung zu spielen. Die Expression der A-Kette in Neuronen und Astrozyten beeinflusst beispielsweise die Entwicklung von Oligodendrozyten [Yeh et al, 1993]. Ein weiterer Aspekt ist, dass im olfaktorischen System des ZNS die Expression der B-Kette während der Embryonalentwicklung aber auch im Erwachsenenalter sehr hoch ist. Da die sensorischen Neurone im olfaktorischen System zeitlebens die Fähigkeit der Regeneration besitzen, scheint PDGF ein neurotropher Faktor zu sein. Darüber hinaus scheint PDGF eine Rolle bei der Myelinisierung zu spielen [Fressinaud et al, 1996] und neuroprotektive Funktionen zu haben.

Im **vaskulärem System** sind die PDGF Rezeptoren auf Endothelzellen der Kapillaren und in Perizyten zu finden [Beitz et al, 1991]. PDGF hat darüber hinaus einen angiogenetischen Effekt, der jedoch schwächer als der von VEGF und bFGF (Fibroblast Growth Factor) ist [Battegay et al, 1994]. Für die initiale Bildung von Blutgefäßen scheint PDGF nicht

verantwortlich zu sein, in spezifischen Organen ist PDGF für die physiologische Angiogenese jedoch sehr wichtig. Die PDGF B-Kette, die von Endothelzellen gebildet wird und der PDGF β -Rezeptor, der auf Perizyten ausgebildet wird, sind für die Rekrutierung von Perizyten von entscheidender Bedeutung (Abbildung 5) und beeinflussen dadurch die strukturelle Integrität der Gefäße [Lindahl et al, 1997]. PDGF spielt außerdem eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und bei der Feedbackkontrolle der Plättchenaggregation.

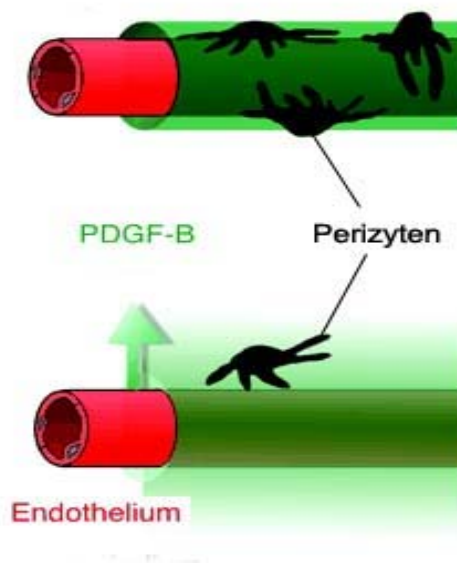


Abbildung 5: Die Perizyten bilden eine zweite lückenhafte Zellschicht um die Endothelzellen. Sie bilden Zellfortsätze, liegen der Basallamina an und gelten als kontraktile Elemente. Perizyten bilden den PDGF β -Rezeptor aus und werden durch PDGF B zum Endothel rekrutiert. PDGF B wird von Endothelzellen aber auch Tumoren sezerniert. Für den regelrechten Einbau der Perizyten ist jedoch die lokalisierte, spezifische Sekretion von PDGF B durch die Endothelzellen von entscheidender Bedeutung.

Der **interstitielle Gewebedruck** wird ebenfalls durch PDGF reguliert [Heuchel et al, 1999]. Ermöglicht wird dies durch die Fähigkeit von PDGF, Interaktionen zwischen Zellen und Molekülen der extrazellulären Matrix zu stimulieren.

Zur **Wundheilung** trägt PDGF ebenfalls einen wichtigen Teil bei. PDGF wird durch Makrophagen und Blutplättchen sezerniert. Es stimuliert Zellteilung, Chemotaxis von Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen. Darüber hinaus wird die Freisetzung anderer Gewebshormone durch Makrophagen sowie die Produktion von Matrixmolekülen (Fibronectin, Kollagen,

Proteoglykane, Hyaluronsäure) stimuliert. Die Kollagenmatrix wird in Vitro durch PDGF kontrahiert [Clark et al, 1989].

1.4.5. Rolle von PDGF bei Tumorwachstum

PDGF als Mediator für autokrines Tumorwachstum

Erste Hinweise dafür, dass die autokrine Aktivierung von PDGF Rezeptoren bei der Tumorentwicklung eine Rolle spielen kann, lieferte die Entdeckung der Homologie zwischen dem Simian Sarcoma Viral Oncogen Produkt v-Sis und der PDGF B-Kette. Sowohl v-Sis als auch PDGF Isoformen können transformierende Effekte auf Zellen ausüben [Doolittle et al, 1983].

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass einige maligne Tumoren eine Assoziation mit der mutagenen Aktivierung von PDGF oder PDGF Rezeptoren aufweisen. Beispiele sind das **Dermatofibrosarkom Protuberans (DFSP)** und das verwandte **Juvenile großzellige Fibrosarkom (GCF)**. Es handelt sich um seltene dermale Neoplasien von mittelgradiger Malignität, die mit einer chromosomalen 17/22 Translokation assoziiert sind, welche zu einer Überexpression von PDGF-B führt [Simon et al, 1997]. Bei **gastrointestinalen Stromatumoren** wurde in vielen Fällen eine Punktmutation im Gen für den PDGF α -Rezeptor gefunden, was zu einer Liganden unabhängigen Rezeptorphosphorylierung und Aktivierung der Signalkaskaden führt [Heinrich et al, 2003]. Weitere Beispiele sind die **Bcr-Abl-positive chronisch myeloische Leukämie**, bei der es zur Aktivierung des PDGF β -Rezeptors aufgrund einer Translokation kommt [Steer et al, 2002] und das **Hypereosinophile Syndrom**, bei dem es aufgrund einer Deletion auf Chromosom 4 zu einem PDGF α -Rezeptor Fusionsprotein kommt [Gotlib et al, 2004].

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Coexpression von PDGF und PDGF Rezeptoren in malignen Tumoren, die aus PDGF responsiven Zellen hervorgehen, an der Tumorentwicklung beteiligt ist. Ein Beispiel hierfür sind Gliome, die die häufigsten primären Hirntumoren im ZNS darstellen. Das **Glioblastom multiforme (GBM)** ist die aggressivste Variante und wird in zwei Formen unterteilt: die erste Form ist durch eine Amplifikation des EGF Rezeptors und durch eine PTEN Mutation charakterisiert, bei der zweiten Form kommt es zur autokrinen Rezeptoraktivierung des PDGF α -Rezeptors und zur Mutation des Tumorsuppressors p53 [Maher et al, 2001]. In den meisten Fällen gibt es keinen Anhalt dafür, dass PDGF α -Rezeptoren durch Mutationen aktiviert werden, auch wenn dies in einzelnen

Fällen beschrieben wurde [Clarke et al, 2003]. Allgemein scheint die autokrine Aktivierung von PDGF Rezeptoren in einem kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung von Hirntumoren zu stehen.

Die autokrine Aktivierung von PDGF Rezeptoren spielt ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von **Sarkomen**, da PDGF starke mitogene und chemotaktische Wirkung auf Fibroblasten und Myofibroblasten hat.

PDGF spielt eine Rolle bei der Tumorangiogenese

Im Rahmen von Studien bezüglich antiangiogenetischer Therapiemöglichkeiten für maligne Tumoren, wurden bisher vorwiegend die angiogenetischen Faktoren VEGF und FGF untersucht. Es hat sich jedoch gezeigt, dass PDGF ebenfalls an der Tumorangiogenese beteiligt ist.

Perizyten sind Zellen, die eine lückenhafte zweite Zellschicht um die Endothelzellen von Blutgefäßen bilden. Die Ausbildung des PDGF β -Rezeptors auf Perizyten ist sehr konstant, während der PDGF β -Rezeptor auf Endothelzellen nur sporadisch in einigen Organen vertreten ist. Vergleiche zwischen normalen Kapillaren und Kapillaren von Tumorgefäßen haben gezeigt, dass die Perizyten in Blutgefäßen von Tumorzellen abnorm vertreten sind. Die Perizyten zeigen in Tumorgefäßen eine geringere Dichte, eine lockerere Verbindung zu den Endothelzellen und eine unorganisierte Ausrichtung der zytoplasmatischen Ausläufer [Baluk et al, 2003]. Die Rekrutierung von Perizyten zum Gefäßendothel hin ist Teil der Entwicklung funktionstüchtiger neuer Blutgefäße. Die Aktivierung des PDGF β -Rezeptors auf den Perizyten durch PDGF B und die Aktivierung der PI3K scheinen bei diesem Vorgang von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Überproduktion von PDGF durch Tumorzellen kann zu einem Überfluss an Perizyten führen, was wiederum ein gesteigertes Tumorwachstum hervorrufen kann [Guo et al, 2003]. Die vermehrte Dichte von Perizyten beeinflusst Prozesse wie Apoptose und Zellwachstum innerhalb des Tumors und indirekt die funktionale Qualität der Blutgefäße [Furuhashi et al, 2004]. Diese Effekte sind im Sinne einer parakrinen Stimulation der Endothelzellen durch von Perizyten sezernierten Wachstumsfaktoren und durch die erhöhte Dichte an Perizyten an sich zu sehen. Für den regelrechten Einbau der Perizyten ist jedoch die PDGF B Sekretion durch die Endothelzellen von entscheidender Bedeutung [Furuhashi et al, 2004], [Abramsson et al, 2003].

PDGF beeinflusst den interstitiellen Gewebedruck und die Medikamentenaufnahme von Tumoren

Das fibroblastenreiche Stroma spielt bei Tumorwachstum und der Tumorerhaltung eine wichtige Rolle. Im Stroma zahlreicher Tumoren ist der PDGF β -Rezeptor stark exprimiert und an der Rekrutierung von Fibroblasten beteiligt [Skobe et al, 1998]. Der PDGF β -Rezeptor ist außerdem an der Regulierung des interstitiellen Gewebedrucks beteiligt, der den transkapillären Stoffaustausch mitreguliert. Diese Erkenntnis basiert unter anderem auf Experimenten bezüglich der Medikamentenaufnahme in Abhängigkeit von der Höhe des interstitiellen Gewebedrucks. In Tumoren ist der interstitielle Druck in der Regel erhöht. Behandelt man nun diese Tumoren mit PDGF Rezeptorantagonisten, so wird der transkapilläre Stoffaustausch des Tumors und damit auch die Medikamentenaufnahme verbessert. Dies ist auf eine Erniedrigung des interstitiellen Druckes durch den Rezeptorantagonisten zurückzuführen [Pietras et al, 2001], [Pietras et al, 2002].

PDGF Rezeptoren als Ziele der Tumorbehandlung

Seit 1991 wurden eine Reihe spezifischer PDGF Rezeptor-Kinase Inhibitoren (AGL 2033/2043 (Quinoxalines), SU11248 (Indolonone) usw.) entwickelt, die speziell die Signalkaskade des PDGF Rezeptors unterbrechen sollen. Nur Gleevec (STI571) [Buchdunger et al, 2000] wurde bis jetzt klinisch getestet. In Fällen wie dem Dermatofibrosarkom Protuberans (DFSP) und der Bcr-Abl-positiven chronisch myeloischen Leukämie, bei denen es durch genetische Defekte zu einer Überaktivierung der PDGF Rezeptors kommt, wurde Gleevec erfolgreich eingesetzt. Der interstitielle Gewebedruck konnte ebenfalls durch Gleevec gesenkt und dadurch eine verbesserte Medikamentenaufnahme gewährleistet werden [Levitzki et al, 2004]. Gleevec scheint damit für die spezifische Bekämpfung von malignen Erkrankungen, vor allem auch in Kombination mit anderen Medikamenten, eine aussichtsreiche Perspektive aufzuzeigen.

Auch bei der Anti-angiogenetischen Therapie von Tumoren scheint der PDGF Rezeptor von Bedeutung zu sein. Bisher zielten Therapiestrategien vorwiegend auf VEGF Antagonisten ab, die jedoch hauptsächlich bei unreifen Gefäßen ohne die umgebende Schicht aus Perizyten wirksam waren. Die Kombination von VEGF und PDGF Antagonisten scheint deshalb besonders günstig zu sein, da PDGF Antagonisten speziell die Organisation der Perizyten behindern, während VEGF Antagonisten auf die Endothelzellen wirken [Bergers et al, 2003].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

PDGF ist ein Zytokin, das unter anderem bei der embryonalen Entwicklung und bei der Gefäßentwicklung des Menschen eine wichtige physiologische Rolle spielt. Auch in der Pathogenese einiger Erkrankungen, vor allem in der Tumorgenese ist PDGF von Bedeutung. Die Möglichkeit, die Signalwege von PDGF Rezeptoren mit einem spezifischen Tyrosinkinase Inhibitor zu blockieren und damit eine spezifische, nebenwirkungsarme Therapie von malignen Erkrankungen zu ermöglichen, hat PDGF zunehmend in den Fokus zahlreicher Untersuchungen gerückt.

In der Hypophyse und in Hypophysentumoren wurde bei bisherigen Untersuchungen die Expression von PDGF mRNA und PDGF Rezeptor mRNA mithilfe von Northern Blots in Adenomen und der normalen Hypophyse nachgewiesen [Leon et al, 1994]. Neben der mRNA Expression wurde die Präsenz von verschiedensten Wachstumsfaktoren in 50 humanen Hypophysen untersucht [Halper et al, 1992]. Die mitogene Aktivität von PDGF war in dieser Studie nicht nachweisbar oder hat zu widersprüchlichen Resultaten geführt. In einer weiteren Studie konnte PDGF B im Hypophysenhinterlappen jedoch nicht im Hypophysenvorderlappen nachgewiesen werden [Sasahara et al, 1991]. Über die Rolle von PDGF innerhalb der Hypophyse und Hypophysentumoren, bezüglich parakriner und autokriner Modulation der Ausschüttung von Hormonen, Zytokinen und des Zellwachstums ist kaum etwas bekannt. Auch die angiogenetische Funktionen von PDGF während der Entwicklung der Hypophyse und Hypophysentumoren und die genaue Lokalisation der verschiedenen Rezeptoren wurden bis jetzt nicht ausreichend untersucht. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Expression, Lokalisation und funktionelle Bedeutung von PDGF und der PDGF Rezeptoren in der Hypophyse und in Hypophysentumorzellen unter den zuvor genannten Gesichtspunkten zu untersuchen.

2. Methodik

2.1. Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen

2.1.1. Geräte und Materialien

Nachfolgenden werden in Tabelle 4 die verwendeten Geräte und Materialien dargestellt:

Tabelle 4 Verwendete Geräte

Brutschrank	Cytoperm 8080 (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
ELISA-Lesegerät	Dynatech MR 5000 (Dynatech, Denkendorf, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Sebatech Varifuge 3.2 RS (Heraeus, Osterode, Deutschland)
Kryostat	Leica CM 3050 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop	Axioskop 2 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland)
Multipipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage	1601 MP8 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Spektrophotometer	Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank	Laminar Flow Typ UVF 6.18 S (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland)
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Wasserbad	Köttermann Labortechnik (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zellkulturflaschen	Nunc (Dänemark)
Zellkulturmaterial	Nunc (Dänemark)
Zellkulturplatten	Falcon (Heidelberg, Deutschland)

Zellschaber	Renner (Dennstadt, Deutschland)
-------------	---------------------------------

2.1.2. Chemikalien

Nachfolgend werden in Tabelle 5 die verwendeten Chemikalien dargestellt:

Tabelle 5 Verwendete Chemikalien

ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingane, CA, USA)
AP-ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingane, CA, USA)
Amphotericin B	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Ampicillin	Roche (Mannheim, Deutschland)
Ampuwa Wasser	Frisenius (Deutschland)
Beta-Mercaptoethanol	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Biomax MR Filme	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Bovine serum albumin (BSA)	Invitrogen Corp. (Paisley, UK)
Chloroform	Sigma (St. Louis. MO, USA)
D-Glukose	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Diaminobenzidine (DAB)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Diethyl-pyrocbonat (DEPC)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
dNTP Mix	MBI Fermentas (Vilnius, Lithouania)
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Invitrogen Corp (Paisley, UK)
ECL Plus Western Blotting Detection system	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Ethylenediaminetetracetic Acid (EDTA)	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Entwickler	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Ethidium bromide	Sigma (St. Louis. MO, USA)
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco Europe (Karlsruhe, Deutschland)
Filterpapier 3MM	Whatmann International Ltd. (Meidstone, GB)

Fixer Lösung	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
HCL	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Hexanucleotid Mix	Roche (Mannheim, Deutschland)
Isoamylalkohol	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	Sigma (St. Louis. MO, USA)
KCl	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
LY 294002	Calbiochem (La Jolla, CA, USA)
Magnesiumchlorid	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Marker 1kb Plus	Life Technologies (Paisley, UK)
MEM-Vitamine	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na-Acetat	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na-Citrat	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Nitrocellulose Membran Hybond-ECL	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Paraformaldehyd	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
PBS	Gibco Europe (Karlsruhe, Deutschland)
PDGF AB Ratte	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
PDGF AB Human	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
PDGF BB	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
Penicillin+Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Phenol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Polyacrylamid	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membran (Immobilon)	Millipore (Billerica, Mass. USA)
Poly-L-lysine-coated Microscope Slides	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Protein assay Dye Reagent	Biorad (München, Deutschland)

Reverse Transkriptase (SuperScript II TM)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNAsin (RNAase Inhibitor)	Promega Corp. (Madison, WI, USA)
Roti-Histokitt	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Histol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Running Buffer (Western Blot)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Taq DNA polymerase	MBI Fermentas
TGF β 1-3	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
Toluidinblau	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Transferrin	Sigma (St. Louis, Mo, USA)
Transfer Buffer (Western Blot)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tris-Glycin 10% Gel	Anamed (Darmstadt, Deutschland)
Tris pure	ICN Pharmaceuticals (Aurora, OH, USA)
Trijodthyronin (T3)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Trypsin	Sigma (St. Louis, Mo, USA)
Tween 20	Sigma (St. Louis, Mo, USA)
Wasserstoff Peroxid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
WST-1	Roche Molecular Biochemicals (Penzberg, Deutschland)

2.1.3. Lösungen

Nachfolgend werden in Tabelle 6 die verwendeten Lösungen dargestellt:

Tabelle 6 Lösungen

DEPC Wasser	200 μ l DEPC/l Deionisiertes Wasser
Paraformaldehyd 4%	Paraformaldehyd: 4g/100ml Na-Phosphat Buffer: 20ml/100ml Ampuwa Wasser: 80 ml 1M NaOH bis pH=7,4 Erhitzen auf 56°C, filtern und kühlen vor Gebrauch
Lösung (Solution) D	4M Guanidiumthiocyanat 250g/ 337ml 0,75M Natrium-citrat pH= 7,0; 17,6ml/ 337ml

	<p>10% Sarkosyl: 26,4ml/ 337ml gelöst in 293 ml DEPC 180µl Beta-Mecaptoethanol/ 25ml kurz vor gebrauch</p>
Na-Acetat	<p>2M Na-Acetat: 27,2g/ 100ml DEPC: 20µl pH= 4,0</p>
Tris-based Puffer (TBS)	<p>1x Tris: 2,42 g/l NaCl: 8 g/l pH= 7,6</p>
Tris Puffer	<p>Tris: 12,114g/l pH= 7,6</p>

2.2. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien (TtT-GF, MtT-S, AtT-20, Alpha T3-1, GH3, PDFS) wurden in Zellkulturflaschen als Monolayer im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Kulturmedium wurde für alle Zelllinien, bis auf die MtT-S Zellen, DMEM-Medium verwendet, dem 10% FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 2,5 ng/ml Amphotericin B und 10⁵ U/ml Penicillin-Streptomycin hinzugefügt wurde. Für die MtT-S Zellen wurde diesem Medium zusätzlich 2 mM essentiellen Vitaminen, 40U/l Insulin, 20 ng/l Natriumselenat, 5 mg/l Transferrin, 30 pM Trijodthyronin (T₃) hinzu gegeben. Beim Zellensplitten wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung von den Zellflaschen gelöst. Anschließend wurde das Zellsuspensat bei 1200 rpm abzentrifugiert, mit dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in einem Teilungsverhältnis von 1:2 bis 1:10 rekultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3. Stimulation

Für die Stimulationsversuche wurden die resuspendierten Zellen gezählt, und anschließend in 48-Well Platten mit einer Dichte von 25000-50000 Zellen/Well und in 96-Well Platten mit einer Dichte von 5000 Zellen/Well ausgesät. Die Zelldichte in den Petrischalen betrug 250000-400000 Zellen/ Petrischale. Die zum Anwachsen an die Platten und zur Stimulation verwendeten Medien entsprechen den oben beschriebene Medien mit dem Unterschied, dass nur 0,5% FCS statt 10% FCS hinzugefügt wurde. In einem Zwischenschritt wurden die angewachsenen Zellen vor der Stimulation mit PBS gewaschen. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen mit PDGF AB in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 1ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml stimuliert. Zur Bestimmung der Hormone und Wachstumsfaktoren mittels RIA und ELISA wurden die Zellen in den 48-Well Platten kultiviert und der Überstand danach in neue 48-Well Platten pipettiert und anschließend bis zur Messung eingefroren.

2.4. Wachstumbestimmung mit WST-Assay

Der WST-Assay ist eine indirekte Methode zur Bestimmung der Zellzahl. Der WST-1 Farbstoff wird in die Zellen aufgenommen und mittels der mitochondrialen Succinatdehydrogenase zu Formazan metabolisiert. Die Lichtabsorption von Formazan kann photometrisch bei einer Wellenlänge zwischen 420-480 nm gemessen werden. Die Zellen wurden in den 96-Well Platten 24, 48 und 72 Stunden mit PDGF AB in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 1ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml stimuliert und das WST-1 Reagenz anschließen bei abgedunkelten Licht hinzu gegeben. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde der Farbumschlag mittels Photometer gemessen. Die TtT-GF und MtT-S Zellen wurden in einem weiteren Experiment zusätzlich mit PDGF BB in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 1ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml (bei TtT-GF bis 20 ng/ml) stimuliert. Der WST1-Assay wurde sonst in gleicher Weise durchgeführt.

2.5. RNA-Extraktion

Es wurden RNA-Extrakte der verschiedenen Zelllinien und der Rattenhypophyse angefertigt. Die Arbeitsschritte wurden stets auf Eis gekühlt durchgeführt. Für die RNA-Extraktion der Zelllinien wurden die jeweiligen Zellen in Petrischalen mit einer Dichte von 250000-400000 Zellen/Petrischale ausgesät und zwei bis drei Tage unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Die Petrischalen wurden auf Eis gestellt, das Medium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen.

Zunächst wurden ca. 3 ml Lösung D auf die Zellen gegeben und anschließend die Zellen mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst und homogenisiert. Die Rattenhypophyse wurde zunächst in 800µl Solution D und β -Mercaptoethanol mithilfe des Ultra TURRAX T8 (IKA Labortechnik) mechanisch homogenisiert. Die Solution D inhibiert dabei Reaktionen zwischen RNA und der RNase, die durch Zellzerstörung vermehrt ablaufen. Anschließend wurde jeweils 800µl des Lysats in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und 80µl Natriumacetat, 800µl Wasser gesättigtes Phenol und 160µl Chloroform/ Isoamylalkohol (49:1) zugegeben. Zwischen den Schritten wurden die Proben jeweils auf dem Vortex-Gerät gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt führt zur Bildung zweier Phasen: die obere Phase enthält die RNA während die untere Phase DNA und Proteine enthält. Die obere Phase wurde in neue Gefäße überführt und 600µl -20°C kaltes Isopropanol hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend zur RNA Präzipitierung über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die Proben wurden erneut für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde dann in 60-80µl bei 60 °C in DEPC-Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde Proben mit einer Verdünnung von 1µl RNA + 59µl DEPC-Wasser hergestellt. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei $\lambda_1 = 260$ nm und $\lambda_2 = 280$ nm gemessen. Der Quotient aus λ_1 / λ_2 sollte dabei zwischen 1,5 und 2 liegen. Die RNA-Konzentration wurde dann nach folgender Formel berechnet: $\lambda_1 \times 40 \times 60 / 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l RNA}$.

Alle RNA Proben wurden auf Ihre Reinheit überprüft. Hierfür wurden PCRs (unten beschrieben) mit den Primern GAPDH und β -Actin durchgeführt. Diese Sequenzen kommen in nahezu allen Gewebearten vor. Wenn im Gel nach erfolgter Elektrophorese keine Banden

zu sehen waren, bedeutete dies, dass keine DNA Vervielfältigung durch die PCR stattgefunden hat und die Proben somit frei von DNA waren. Zur Überprüfung der Reversen Transkription wurden ebenfalls PCRs mit diesen Primern durchgeführt. Wenn die RNA erfolgreich in cDNA umgeschrieben wurde, waren für diese Primer Banden im Gel zu sehen.

2.6. Reverse Transkriptase- und Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die gewonnene RNA wurde für die Polymerase Ketten Reaktion in c-DNA umgeschrieben. Für diesen Schritt wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt und für 1 Stunde bei 45°C und 5 Minuten bei 95°C inkubiert:

Tabelle 7 Reaktionsansatz für Reverse Transkription

Menge	Reagenz
1 µl	RNA
1 µl	dNTP Mix 2mM
2 µl	Hexanukleotide (Zufallsprimer)
2 µl	Dithiothreitol (DTT) 10 mM
1 µl	Reverse Transkriptase (200 U)
4 µl	Puffer
9 µl	DEPC Wasser

Für die PCR wurde für die jeweiligen Primer (Tabelle 9) folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Tabelle 8 Reaktionsansatz für PCR

Menge	Reagenz
1 µl	c-DNA
1,5 µl	10x PCR-Puffer
0,9 µl	Mg Cl ₂ 25 mM
1,5 µl	dNTP- Mix 2 mM
0,5 µl	Primer 1 (Sense) 10 pmol/µl
0,5 µl	Primer 2 (Antisense) 10 pmol/µl
0,15 µl	Thermus aquaticus (Taq) DNA Polymerase
8,95 µl	Destilliertes Wasser

Die PCR Reaktion umfasst 35 Zyklen, wobei jeweils einer dieser Zyklen folgende Schritte beinhaltet:

1. 94 °C für 1 min: Spaltung der Doppelstränge
2. 55 °C – 65 °C je nach Primer für 1 min: Anlagerung der Primer
3. 72 °C für 1 min: Elongation der Fragmente

Die vervielfältigten DNA-Fragmente (16 µl) wurden dann mit einem Loading Buffer (4 µl) in ein 1,5% Agarosegel geladen und mittels Elektrophorese für 40 min bei 80 Volt nach Größe aufgeteilt. Für die Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein 1 kb DNA Ladder Marker mit geladen. Unter UV-Licht können die Fragmente in Form von Banden fotografiert werden.

Um die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer zu finden, wurde für jeden Primer eine Gradienten PCR mit den Temperaturen 55 °C, 60 °C, 65 °C durchgeführt. Als DNA Probe diente dabei die c-DNA von Rattenhypophysen. Die Temperatur bei der die Banden am besten sichtbaren waren, wurde im Folgenden dann verwendet.

Tabelle 9 Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Temperatur	Amplifiziertes Fragment (bp)
PDGF A	CCC TGA GGG ATG GTA CTG AA sense AGG GCA TGG GCG AGG TAT antisense	55°C	157
PDGF B	TCG AGT TGG AAA GCT CAT CTC sense GCC ACA CCA GGA AGT TGG antisense	60 °C	153
PDGFR A	GGG GAG AGT GAA GTG AGC TG sense CAT CCG TCT GAG TGT GGT TG antisense	60°C	175
PDGFR B	TGT TCG TGC TAT TGC TCC TG sense TGT CAG CAC ACT GGA GAA GG antisense	60°C	203

β-actin human	ACG GGG TCA CCC ACA CTG TGC sense CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G antisense	60°C	660
GAPDH rat	ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G sense GTT GTC ATG GATGAC CTT GGC antisense	60°C	495

2.7. Messung von VEGF und PDGF mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Der ELISA ist eine Methode, um gelöste Substanzen in Serum, Urin und Zellüberständen in kleinen Konzentrationen (pg/ml bis ng/ml) nachzuweisen. Das Prinzip des ELISA Tests beruht auf einer quantitativen Sandwich Immunoassay Technik. In einer, mit spezifischen, polyklonalen Antikörpern beschichteten 96-Well Platte werden Standardkonzentrationen und Proben pipettiert. Bei zweistündiger Inkubationszeit können die zu untersuchenden Proben und Standardkonzentrationen an diese fixierten Antikörper binden. Nachdem die ungebundenen Substanzen in Waschschrinen entfernt werden, wird ein zweiter, für die zu untersuchende Substanz spezifischer Antikörper hinzu gegeben. Dieser zweite polyklonale Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt. Nachdem im zweiten Waschschrin auch die ungebundenen zweiten Antikörper entfernt sind, wird eine Substratlösung zugegeben, die durch das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym umgesetzt wird. Diese Reaktion bewirkt einen Farbumschlag der photometrisch bei 450 nm gemessen werden kann. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Menge des zu untersuchenden Substrats. Die Konzentrationen können mit Hilfe der Standardkurve berechnet werden.

In dieser Arbeit wurden ELISA Tests für VEGF und PDGF eingesetzt. Für die Messung von VEGF wurden die Zelllinien in 48-Well Platten kultiviert (25000-50000 Zellen/Well) und mit PDGF stimuliert (siehe oben). Der Überstand wurde nach 24h Stimulation abgenommen und anschließen sofort bei -20 °C eingefroren. Zur Überprüfung der durch PDGF induzierten VEGF Stimulation wurden die Zellen mit dem PI3 Kinase Inhibitor LY 294002 in den Konzentrationen 0,01µM, 0,1µM und 1µM und mit PDGF AB 10ng/ml über 24h behandelt. Da LY 294002 in DMSO gelöst ist, wurden die Zellen für den Basalwert und den mit 10 ng/ml PDGF AB stimulierten Wert mit 0,1% DMSO behandelt. Die Konzentration von VEGF

in diesen Überständen wurden jeweils als Dreifach- oder Vierfachwerte mit dem Quantikine ELISA Kit für VEGF (R&D Systems) gemessen.

Für die Messung von PDGF wurden die Zelllinien in 48-Well Platten kultiviert (25000-50000 Zellen/Well) und mit Dexamethason, Östradiol (E2) und TGF- β (1-3) stimuliert. Der Überstand wurde nach 24h Stimulation abgenommen und anschließend sofort bei -20 °C eingefroren. Die Konzentration von PDGF in diesen Überständen wurden jeweils als Dreifach- oder Vierfachwerte mit dem Quantikine ELISA Kit für PDGF (R&D Systems) gemessen.

2.8. Hormonbestimmung mittels RIA

Der Radioimmunoassay (RIA) ist eine hoch sensitive Methode um Substanzen wie Enzyme, Proteine und Hormone in sehr niedrigen Konzentrationen nachzuweisen. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf dem Konkurrieren eines radioaktiv markierten Antigens mit der zu untersuchenden Substanz um die Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers. Die Anzahl der Bindungsstellen des Antikörpers ist bekannt. Die Markierung des Antigens erfolgt mit Jod¹²⁵ Isotopen und die Antikörper Antigen Reaktionen werden über einen Gammazähler detektiert.

Im ersten Schritt muss ein hochspezifischer Antikörper hergestellt werden. Ein N-terminaler spezifischer Antikörper gegen ACTH von Ratten wurde in zwei Schritten mit der Carbodiimid Methode [Stalla et al, 1989] in Kaninchen hergestellt. Die Standards wurden von Bachem (Bubendorf, Schweiz) hergestellt. Die Antikörper für Ratten-Prolaktin und -GH wurden mit den spezifischen Antigenen, Antiserum und Standards mit RIA Reagent Kits von National Hormon and Peptide Program (Baltimore, MD) erhalten. Zu einer bestimmten Menge von Antikörpern wurde eine bestimmte Menge von Proben (Zellüberstand) und radioaktiv markiertes Standardantigen hinzugefügt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit binden die Antikörper die Antigene (Hormone), wobei nur soviel Antikörper vorhanden sind, dass nicht alle Antigene binden können und somit die markierten mit den unmarkierten, zu untersuchende Antigenen (Hormonen) um die Bindungsplätze konkurrieren. Nachdem sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, wird die Menge an gebundenen, markierten Antigen (Hormon) mit Hilfe eines Gammazählers gemessen. Die Radioaktivität ist dabei umgekehrt proportional zur Menge der zu untersuchenden Hormone. Die Konzentration der zu untersuchenden Hormone kann durch den Vergleich der Radioaktivität mit einer Standardkurve berechnet werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob PDGF einen Einfluss auf die Hormonsekretion von Hypophysenzellen hat. Dazu wurden die Zellen der unterschiedlichen Zelllinien in 48 Well-Platten kultiviert, in der oben beschriebenen Form mit PDGF AB stimuliert und der Überstand für die Hormonmessung eingefroren.

2.9. Western Blot

Der Western Blot ist eine Technik um Proteine in Gewebe, Gewebe- oder Zellextrakten, Serum, Liquor oder Zellüberstand nachzuweisen. Die Proteine werden dabei mittels Elektrophorese nach der Größe separiert und auf eine Membran übertragen. Die Membran wird anschließend mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Nach den ersten Waschschrinen wird die Membran mit einem zweiten Antikörper inkubiert, der an den ersten Antikörper bindet und mit einer Peroxidase konjugiert ist (horseradish peroxidase). Diese Peroxidase setzt ein Substrat um das fluoresziert und über einen Film detektiert werden kann.

Für die Western Blots dieser Arbeit wurden nur die TtT-GF Zellen verwendet. Die Zellen wurden für die Proteinextraktion in Petri Schalen (350000 Zellen/Petrischale) unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Einen Tag vor der Extraktion wurden die Zellen dann mit einem Medium mit 0,5% FCS kultiviert und mit 10 ng/ml PDGF stimuliert. Die Zellen wurden zur Untersuchung von Komponenten des PI3K Signalwegs (PDK1, PTEN, Akt Ser473) und des phosphorylierten α -Rezeptors 5min, 10min, 15min, und 30min stimuliert. Die Zellen wurden zur Untersuchung des phosphorylierten β -Rezeptors für 5min, 10min, 15min, und 30min mit 10 ng/ml PDGF-BB stimuliert. Für die Untersuchung des PDGF α -Rezeptors wurden die TtT-GF Zellen 30min, 1h, 3h und 6h mit PDGF-AB stimuliert. Für die Versuche mit dem PI3K Inhibitor LY 294002 wurden vier Petrischalen mit TtT-GF Zellen (350000 Zellen/Schale) angelegt. Zwei Schalen wurden eine Stunde mit LY 294002 inkubiert, um das Eindringen von LY in die Zellen zu ermöglichen. Die beiden anderen Platten wurden für ebenfalls eine Stunde mit 0,1% DMSO inkubiert, da LY in DMSO gelöst ist. Anschließend wurden jeweils eine Platte mit LY und eine Platte mit DMSO mit 10 ng/ml PDGF für 30min stimuliert; die anderen beiden Platten dienten jeweils als Kontrolle.

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und von den Petrischalen abgekratzt. Nach dem Zentrifugieren der Zellen zu einem Pellet, wurde 60-100 μ l des Protease Inhibitor Cocktails (1:100 mit PBS verdünnt) zugegeben und die Zellmembranen anschließend durch auf- und abpipettieren mit einer Insulinspritze (feine Kanüle) zerstört.

Die Proteinkonzentration wurde anschließend mittels des Bradford Dye Assay [Bradford et al, 1976], [Schleicher et al, 1978] photometrisch bestimmt.

Für den Western Blot wurden die Proteine in einer Konzentration von 100µg/µl in ein vorgefertigtes 10% Gel (Polyacrylamid) geladen und in einem Invitrogen Elektrophorese Apparat nach Ihrer Größe aufgetrennt. Die Protein Banden wurden anschließend auf eine Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membran (Immobilon) übertragen. Das Gel ist bei diesem Prozess auf der negativen Seite während die Membran auf der positiven Seite der Elektrophoresekammer ist. Die negativ geladenen Proteine werden dabei auf die Membran übertragen. Die Membran wurde dann für 2h in 1x TBS Lösung mit 5% Milchpulver und 0,1% Tween durch langsames Schütteln geblockt. Der erste Antikörper (siehe Tabelle 10) wurde in 1x TBS Lösung mit 2,5% Milchpulver und 0,1% Tween gelöst und die Membran damit über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschsritten mit 1x TBS 0,1% Tween wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (gelöst in 1x TBS Lösung mit 2,5% Milchpulver und 0,1%) für 1h 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschsritten wurde die Membran mit dem Substrat des ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham) für 3min nach Anweisung des Herstellers inkubiert. Abschließend wurde ein Film (Amersham) in einer Autoradiographie Kassette für 15sec bis 7min belichtet. Durch das Enzym, das an den zweiten Antikörper gebunden ist, wird das Substrat umgesetzt und fluresziert. Nur die mit ersten und zweiten Antikörper gebundenen Stellen der Membran flureszieren somit und schwärzen den Film. Auf dem entwickelten Film sind dann die Proteine, die von erstem und zweitem Antikörper gebunden sind in Form von Banden sichtbar.

Tabelle 10 Verwendete Antikörper für den Western Blot

Antigen	Erster Antikörper	Zweiter Antikörper mit Horseradish Peroxidase konjugiert
PDGFR α	Kaninchen Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, CA)	Esel Anti-Kaninchen (Amersham Biosciences, Bucks, UK)
PDGFR β	Ziege Anti-Maus, -Ratte; 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, INC.)	Anti-Ziege (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)

p-PDGFR α	Kaninchen Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, INC.)	Esel Anti-Kaninchen (Amersham Biosciences, Bucks, UK)
p-PDGFR β	Ziege Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, INC.)	Anti-Ziege (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)
PDGF B	Kaninchen Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, INC.)	Esel Anti-Kaninchen (Amersham Biosciences, Bucks, UK)
p-PDK1	Rabbit Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:500 (Cell Signaling Tech., Beverly, MA)	Esel Anti-Kaninchen (Amersham Biosciences, Bucks, UK)
p-PTEN	Rabbit Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:500 (Cell Signaling Tech.)	Esel Anti-Kaninchen (Amersham Biosciences, Bucks, UK)
p-Akt (Ser473)	Rabbit Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:500 (Cell Signaling Tech.)	Esel Anti-Kaninchen (Amersham Biosciences, Bucks, UK)

2.10. Immunhistochemie (IHC)

Die IHC wird verwendet um die Lokalisation und Intensität eines Proteins in einem Gewebe nachzuweisen. Das Grundprinzip dieser Methode besteht in der Eigenschaft von Antikörpern, verschiedene Bereiche eines Proteins (=Epitope) zu binden. Um die spezifische Bindung eines ersten Antikörpers an das gewünschte Epitop unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, ist es nötig, das Signal durch die Bindung eines zweiten Antikörpers zu verstärken. Dieser zweite Antikörper ist wiederum spezifisch für den ersten und ist mit Biotin verknüpft. Biotin hat eine starke Affinität zu Avidin. Avidin ist mit einem Enzym assoziiert, das ein farbloses Substrat in farbiges Produkt umwandelt welches an den Stellen der Reaktion präzipitiert.

Für die IHC wurden 8µm dicke Scheiben aus Schock gefrorenen Hypophysen mit dem Kryostaten hergestellt. Diese Scheiben wurden dann in gefrorenen Zustand auf SuperFrost Plus Objektträger übertragen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert und in 96% Alkohol bei 4°C gelagert. Nach einem Waschschrift mit 1x TBS wurden die Scheiben 30min mit Serum

inkubiert, das identisch mit dem Serum des Tieres ist, in dem der zweite mit Biotin assoziierte Antikörper hergestellt wurde. Dieser Schritt verhindert ein unspezifisches Binden des zweiten Antikörpers. Danach wurden die Scheiben über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle 11) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurde der entsprechende zweite, mit Biotin assoziierte Antikörper bei Raumtemperatur für 30min zugegeben. Die Gewebsschnitte wurden erneut dreimal in TBS gewaschen und 30min mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC Komplex) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wurde mit 1mg/ml Chromogen Diaminobenzidine (DAB) mit 0,01% Hydrogenperoxid durchgeführt (es entsteht damit eine braune Färbung). Da DAB eine lichtempfindliche Substanz ist wurde der letzte Schritt im Dunkeln durchgeführt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS wurden die Gewebsschnitte für 15min in Toluidin Blau gegen gefärbt. Dies färbt die Nuclei des Gewebes blau an, was eine bessere Übersicht über die Gewebstrukturen erlaubt. Der Farbüberschuss wurde mit zwei Waschschritten in destilliertem Wasser und einem Waschschrift mit 70% Ethanol entfernt. Nach Dehydratation in 96% und 100% Ethanol wurden die Gewebsschnitte mit dem Roti-Histokitt fixiert. Negativ Kontrollen wurden durchgeführt, indem der ersten Antikörper weggelassen wurde. Bei den Negativkontrollen wurde keine ungewollte Färbung festgestellt.

Tabelle 11 Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Erster Antikörper	Zweiter Antikörper mit Biotin konjugiert
PDGFR α	Kaninchen Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; (Dianova, Hamburg, Deutschland)	Ziege Anti-Kaninchen (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)
PDGFR β	Ziege Anti-Maus, -Ratte; 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, INC.)	Pferd Anti-Ziege (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)
PDGF B	Kaninchen Anti-Maus, -Ratte, -Mensch; 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, INC.)	Ziege Anti-Kaninchen (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)

2.11. Statistik

Die Untersuchungen zur Sekretion von Wachstumsfaktoren und Hormonen sowie die Proliferationsversuche wurden statistisch ausgewertet. Jedes Einzelexperiment wurde mindestens mit Dreifachwerten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet.

Zur statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit einem Scheffe`s Test durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test bestimmt. P kleiner als 0,05 werden als Signifikant betrachtet. Der Signifikanzgrad wurde wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$ / ** $p < 0,005$ / *** $p < 0,001$

3. Ergebnisse

3.1. mRNA Expression von PDGF A/B und PDGF α -/ β -Rezeptor in der Rattenhypophyse und in Hypophysentumorzelllinien

Mit Hilfe der PCR wurden die Zelllinien auf das Vorkommen von PDGF A/B mRNA und PDGF α -/ β -Rezeptor mRNA untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei einigen hormonproduzierenden Zellen als auch bei den folliculostellären Zellen PDGF und PDGF Rezeptoren vertreten sind (Tabelle 12). In der Rattenhypophyse waren PDGF A/B und die PDGF α -/ β -Rezeptoren nachweisbar.

Im speziellen wird PDGF A von den TtT-GF Zellen und der Rattenhypophyse exprimiert (Abbildung 6), PDGF B trat in den Zelllinien TtT-GF, MtT-S, AtT20 und der Rattenhypophyse auf (Abbildung 7).

Der PDGF α -Rezeptor konnte in den Zelllinien TtT-GF, MtT-S, AtT20, PDFS und der Rattenhypophyse nachgewiesen werden (Abbildung 8), der PDGF β -Rezeptor wird von den TtT-GF, MtT-S Zellen und der Rattenhypophyse exprimiert (Abbildung 9).

Tabelle 12 Übersicht über den Nachweis von PDGF mRNA

	TtT-GF	MtT-S	AtT-20	Alpha T3-1	GH 3	PDFS	Rattenhypophyse
PDGF A	+	-	-	-	-	-	+
PDGF B	+	+	+	-	-	-	+
PDGFR α	+	+	+	-	-	+	+
PDGFR β	+	+	-	-	-	-	+

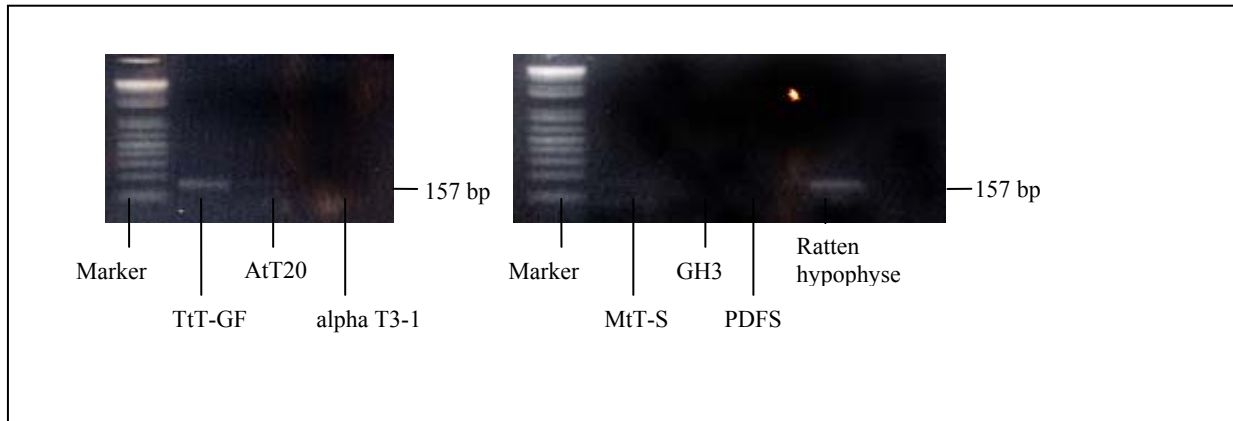


Abbildung 6: PDGF A

Untersuchung der Ziellinien auf PDGF A mRNA. Die PDGF A mRNA konnte in den TtT-GF Zellen und der Rattenhypophyse nachgewiesen werden (Banden).

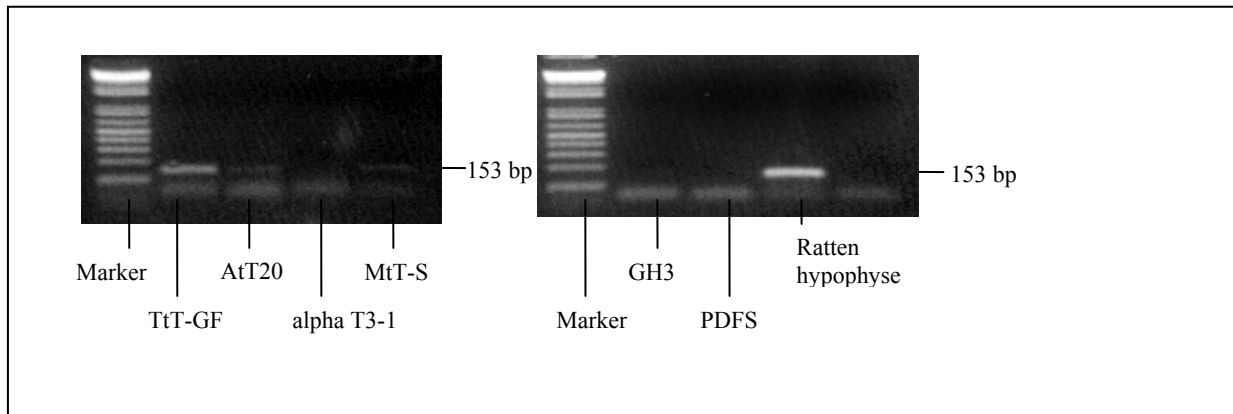


Abbildung 7: PDGF B

Untersuchung der Zelllinien auf PDGF B mRNA. Die PDGF B mRNA konnte in den Zelllinien TtT-GF, MfT-S und AtT20 sowie der Rattenhypophyse nachgewiesen werden.

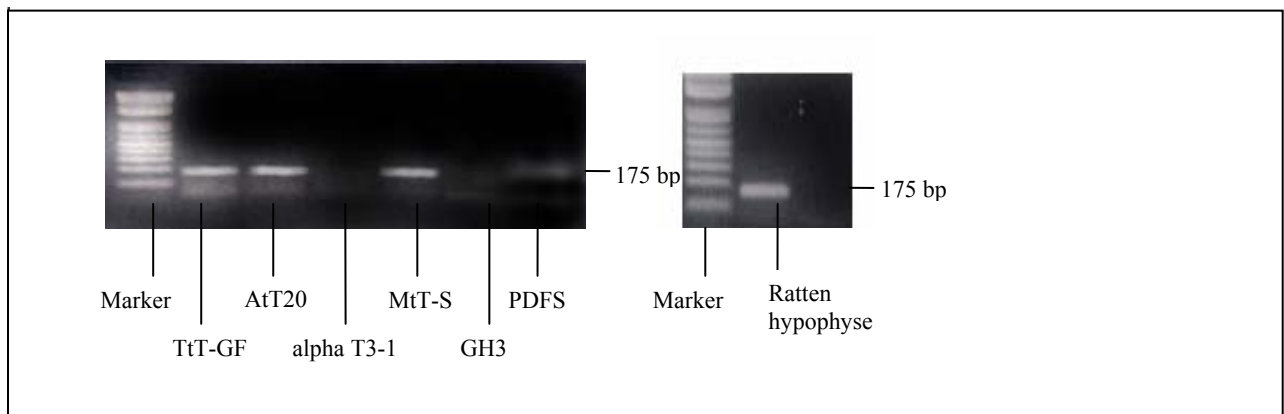


Abbildung 8: PDGF α -Rezeptor

Untersuchung der Zelllinien auf PDGF α -Rezeptor mRNA. Die PDGF α -Rezeptor mRNA konnte in den Zelllinien TtT-GF, AtT20, MtT-S, PDFS und der Rattenhypophyse nachgewiesen werden.

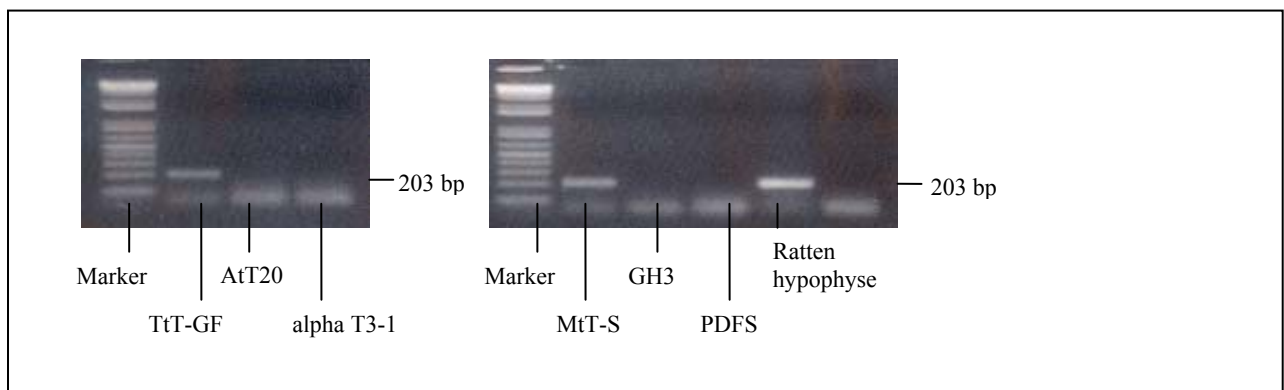


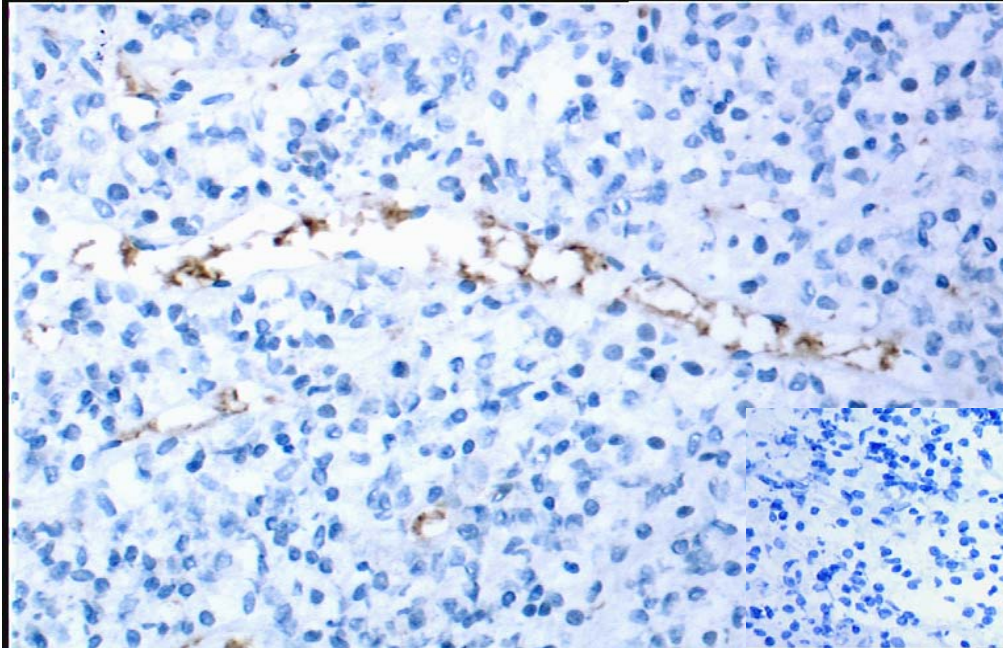
Abbildung 9: PDGF β -Rezeptor

Untersuchung der Zelllinien auf PDGF β -Rezeptoren mRNA. Die PDGF β -Rezeptoren mRNA konnte in den Zelllinien TtT-GF, MtT-S und der Rattenhypophyse nachgewiesen werden.

3.2. Lokalisation von PDGF und PDGF-Rezeptoren im Vorderlappen der Rattenhypophyse

Mit Hilfe der PCR konnte die mRNA-Synthese von PDGF A/B und der PDGF α -/ β -Rezeptoren in der Rattenhypophyse allgemein nachgewiesen werden. Um die genaue Lokalisation von PDGF und seinen Rezeptoren innerhalb der Rattenhypophyse zu bestimmen, wurden mit der Immunhistochemie Gewebsschnitte von Rattenhypophysen auf PDGF B und die PDGF α -/ β -Rezeptoren untersucht. PDGF B konnte dabei vor allem an den Gefäßwänden (Endothelzellen) nachgewiesen werden (Abbildung 10). Bei den Rezeptoren zeigte sich, dass der PDGF α -Rezeptor auf Hormon produzierenden Zellen der Rattehypophyse zu finden ist (Abbildung 11). Der PDGF β -Rezeptor war vorwiegend an den Gefäßzellen nachweisbar (Abbildung 12).

A



B

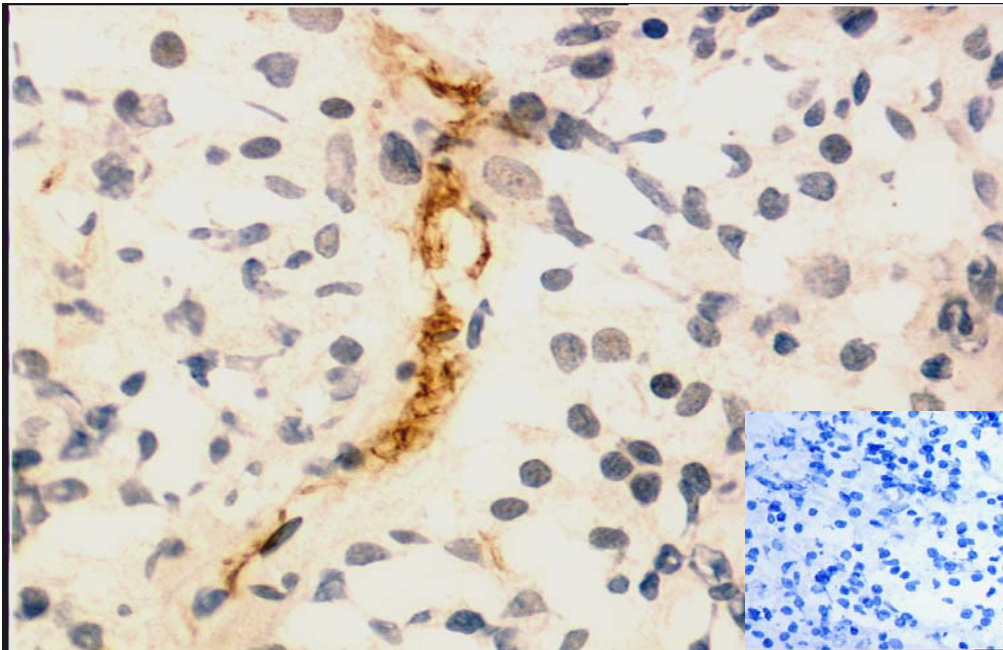


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von PDGF B in der Rattenhypophyse (Vorderlappen). PDGF B ist in den Gefäßwänden als auch in den an den Gefäßen haftenden Blutplättchen nachweisbar (braune Färbung). In Abbildung A (Vergrößerung: x 200) ist ein Gefäß im Längsschnitt sowie mehrere Gefäße im Querschnitt zu sehen. In Abbildung B (Vergrößerung: x 400) ist ein Gefäß in höherer Vergrößerung zu sehen. In der rechten unteren Ecke ist jeweils die Negativkontrolle zu sehen.

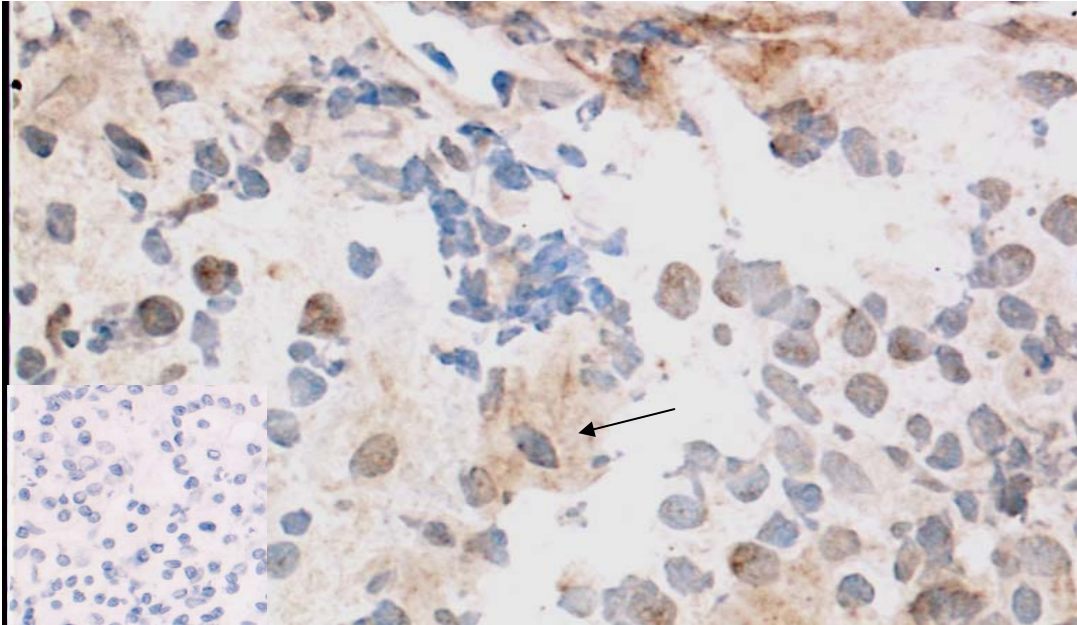
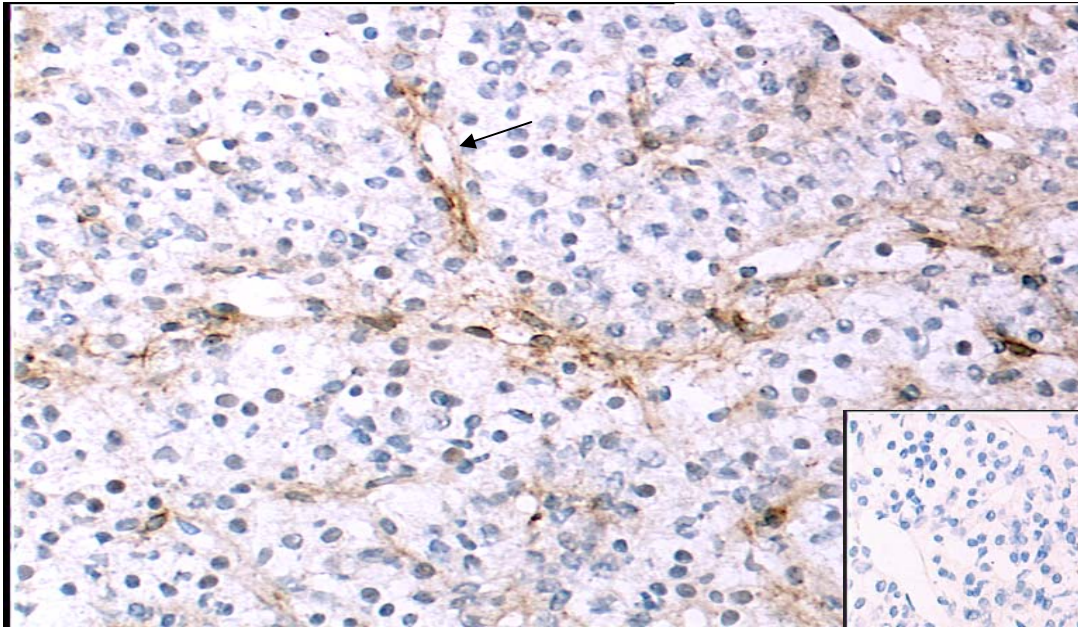


Abbildung 11: Nachweis des PDGF α -Rezeptor in der Rattenhypophyse. Die mit dem Pfeil gekennzeichnete Zelle ist PDGF α -Rezeptor positiv (Vergrößerung: x 400). In der linken untern Bildecke ist die Negativkontrolle zu sehen.

A



B

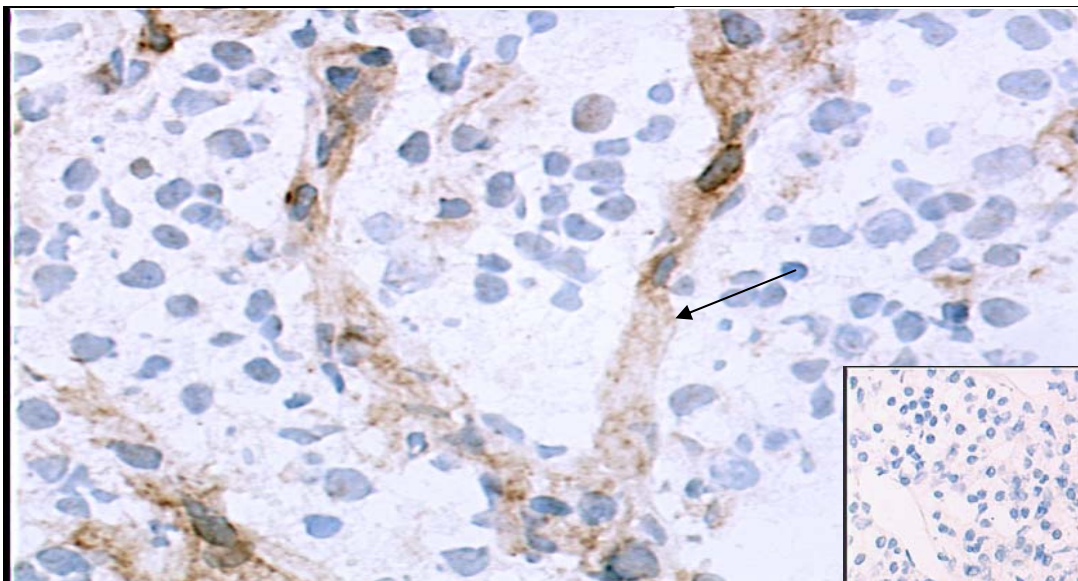


Abbildung 12: Nachweis des PDGF β -Rezeptors in der Rattenhypophyse. Der β -Rezeptor ist vor allem auf den Gefäßen der Hypophyse und den folliculostellären Zellen zu finden (braune Färbung). Im Ausschnitt A (Vergrößerung: x 200) ist ein Gefäß mit deutlich sichtbarem Lumen markiert. Ausschnitt B zeigt ein Gefäß in einer stärkeren Vergrößerung (x 400). Im rechten untern Bildeck ist jeweils die Negativkontrolle zu sehen.

3.3. Regulation von PDGF in TtT-GF Zellen

Nachdem PDGF mRNA in TtT-GF, MtT-S, AtT-20 Zellen und in der Rattenhypophyse vorhanden war, wurde in den TtT-GF Zellen mit Hilfe des Western Blots nochmals das PDGF B Protein nachgewiesen, um zu überprüfen, ob die mRNA auch in das Protein translatiert wird.

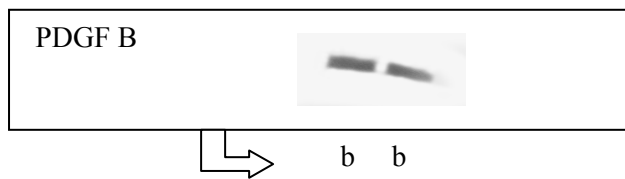


Abbildung 13: Nachweis von PDGF B Protein in unstimulierten TtT-GF Zellextrakten.

Im nächsten Schritt wurden die TtT-GF Zellen auf ihre PDGF Sekretion mittels ELISA untersucht. Es zeigte sich, dass PDGF AB (Graph nicht gezeigt) und PDGF BB sezerniert werden und diese Sekretion mit Dexamethason ab einer Konzentration von 1 nM signifikant inhibiert wird (Abbildung 14). Weitere Stimulationsversuche mit Östradiol (E2) und TGF β 1-3 zeigten keine signifikanten Veränderungen der PDGF Produktion (Graphen nicht gezeigt).

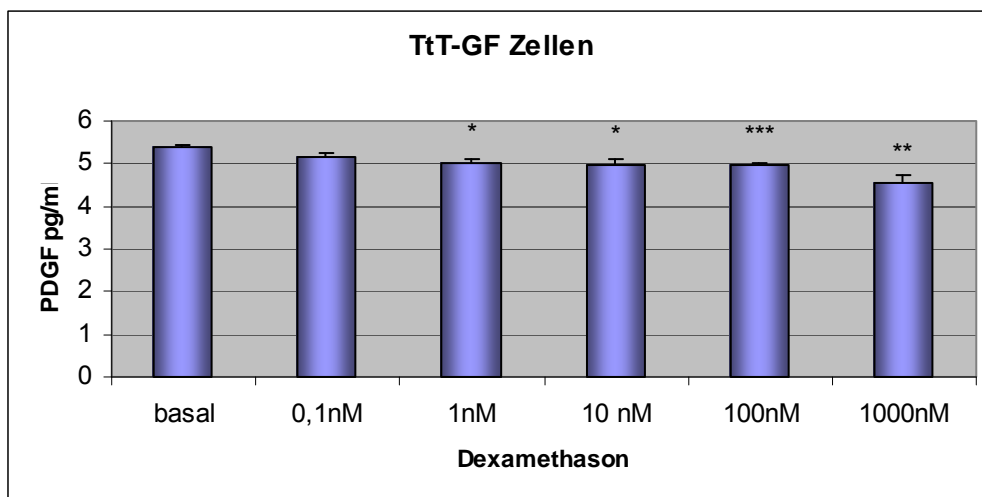


Abbildung 14: Wirkung von Dexamethason auf die PDGF BB Produktion von TtT-GF Zellen. Die PDGF BB Produktion lässt sich durch Dexamethason signifikant, dosisabhängig inhibieren. Die Zellen wurden für 24h mit Dexamethason stimuliert.

* $p < 0,05$ / ** $p < 0,005$ / *** $p < 0,001$ vs. basal.

3.4. Wirkung von PDGF in Hypophysenzellen

3.4.1. Wirkung von PDGF auf die Hormonsekretion

Mit Hilfe des Radioimmunoassay wurden die Zelllinien, bei denen der PDGF Rezeptor nachgewiesen wurde, auf eine veränderte Hormonproduktion unter PDGF AB Stimulation untersucht.

Die AtT20 Zellen wurden auf eine veränderte ACTH Produktion nach PDGF AB Stimulation untersucht. Es zeigte sich, dass die Hormonproduktion nicht signifikant verändert wird (siehe Abbildung 15).

Des Weiteren wurde die GH Produktion der MtT-S Zellen gemessen. Auch hier zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Hormonproduktion durch die PDGF Stimulation (Daten nicht gezeigt).

Bei den GH3 Zellen konnte kein PDGF Rezeptor und folglich auch keine veränderte Hormonproduktion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde keine Beeinflussung der Hormonproduktion durch PDGF AB festgestellt.

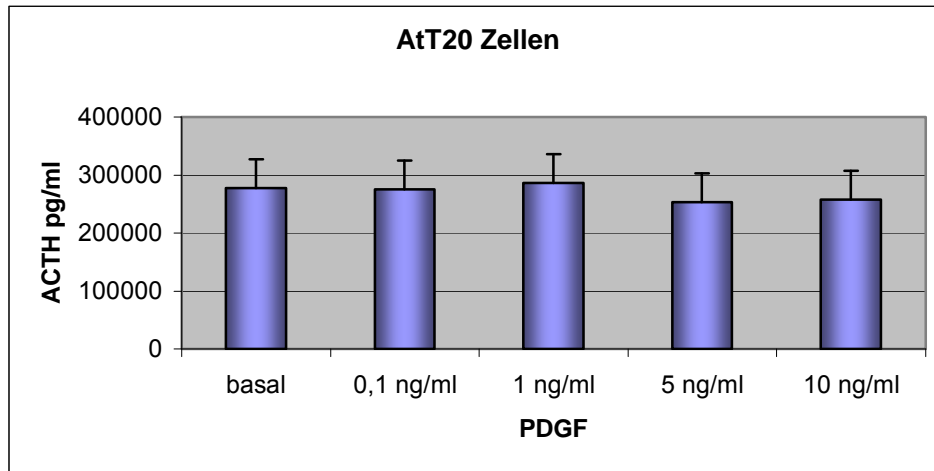


Abbildung 15: Messung von ACTH in AtT20 Zellen. Die Zellen wurden mit PDGF AB in den angegebenen Konzentrationen für 24h stimuliert. Die ACTH Produktion zeigt keine signifikante Änderung unter PDGF Stimulation.

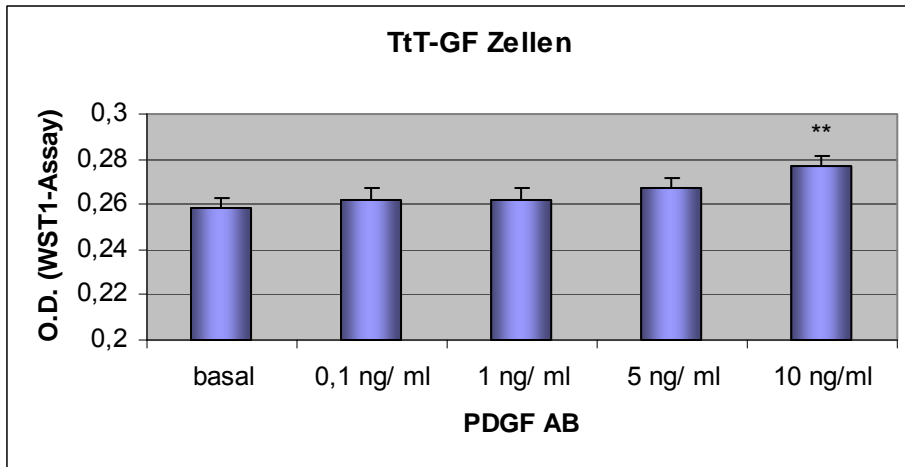
3.4.2. Wirkung von PDGF auf die Proliferation von Hypophysenzelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden mittels WST1-Assay auf Zellwachstum unter PDGF-Stimulation untersucht. Das Wachstum der TtT-GF und MtT-S Zellen wurde durch die Stimulation mit PDGF AB signifikant gesteigert (Abbildung 16) während das Wachstum der AtT-20 Zellen durch PDGF AB signifikant inhibiert wurde (Abbildung 18). Da die Zelllinien TtT-GF und MtT-S ebenfalls den PDGF β -Rezeptor ausbilden und PDGF AB lediglich an die $\alpha\beta$ -Rezeptoren und α -Rezeptoren bindet, wurden diese beiden Zelllinien in einem weiteren Versuch mit PDGF BB stimuliert. Auch bei diesem Versuch zeigten die TtT-GF und MtT-S Zellen ein signifikantes Wachstum (Abbildung 17).

Die Zelllinie PDFS, die den PDGF α -Rezeptor ausbildet, zeigte weder eine signifikante Wachstumstendenz noch eine Inhibition des Zellwachstums (Daten nicht gezeigt).

Die Zelllinien alpha T3-1 und GH3 bilden keinen PDGF Rezeptor aus und reagierten in ihrem Wachstum dementsprechend nicht auf die Stimulation mit PDGF.

A



B

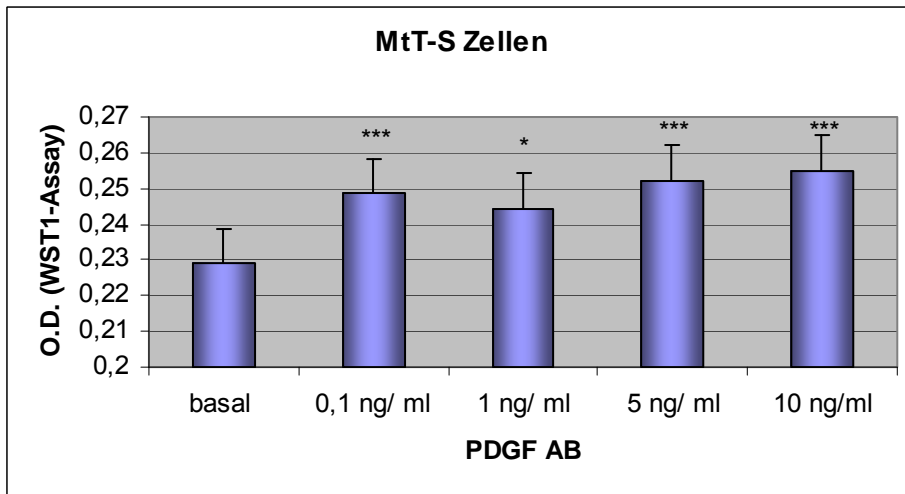
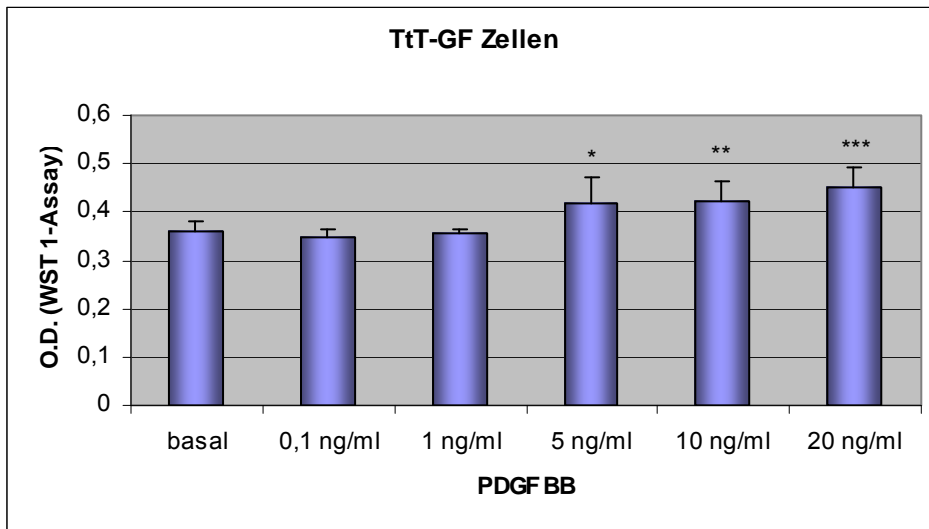


Abbildung 16: Zellwachstum der TtT-GF (A) und MtT-S (B) Zelllinien nach 24h Stimulation mit PDGF AB. Beide Zelllinien zeigen unter PDGF Stimulation ein signifikantes, dosisabhängiges Wachstum verglichen mit dem Basalwert. * p<0,05 / **p<0,005 / * p<0,001 vs. basal.**

A



B

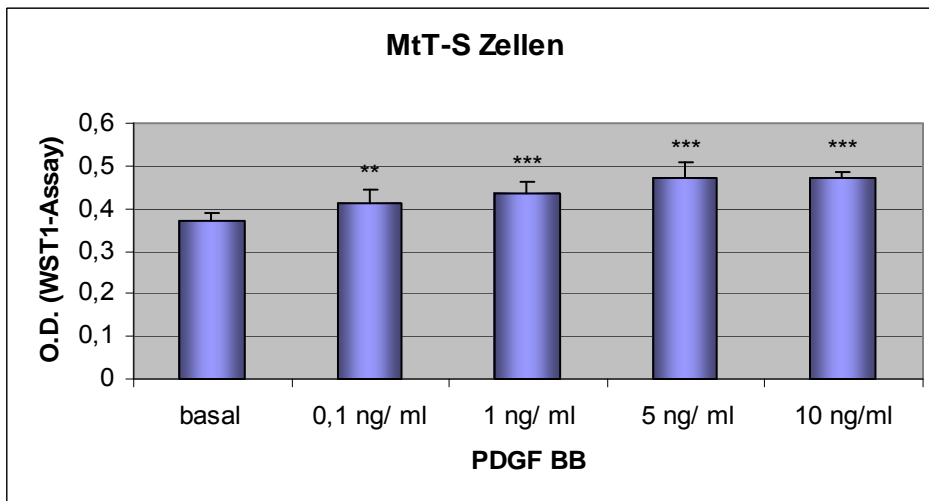


Abbildung 17: Zellwachstum der TtT-GF (A) und MtT-S (B) Zelllinien nach 24h Stimulation mit PDGF BB. Beide Zelllinien zeigen unter PDGF Stimulation ein signifikantes, dosisabhängiges Wachstum verglichen mit dem Basalwert. * p<0,05 / **p<0,005 / * p<0,001 vs. basal.**

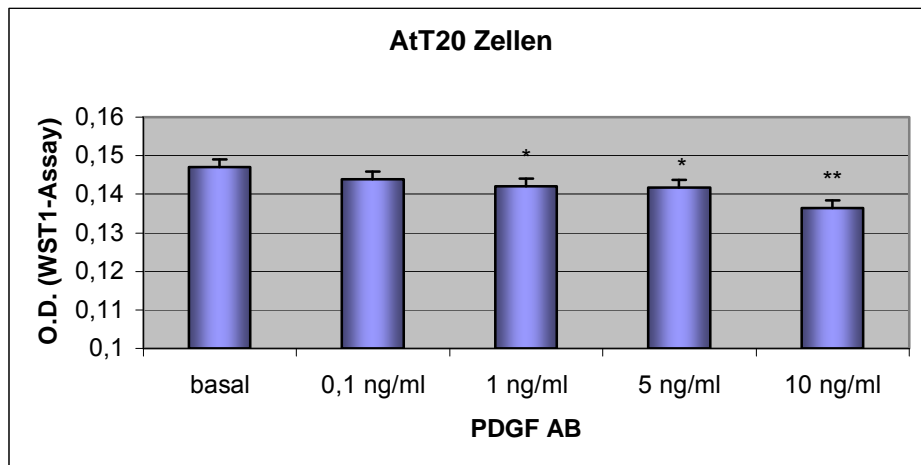


Abbildung 18: Zellwachstum der AtT20 Zelllinie nach 24h Stimulation mit PDGF AB. Die Zelllinie zeigt unter PDGF Stimulation eine signifikante, dosisabhängige Inhibition des Wachstums verglichen mit dem Basalwert. * $p < 0,05$ / ** $p < 0,05$ vs. basal.

3.4.3. Wirkung von PDGF auf die VEGF Sekretion in TtT-GF Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit Hilfe des ELISA Tests auf Veränderungen der VEGF Produktion unter PDGF AB Stimulation untersucht. Dabei zeigte sich, dass die VEGF Produktion bei der TtT-GF Zelllinie signifikant ansteigt (Abbildung 19). Bei Stimulation mit 10 ng/ml PDGF über 24h konnte mehr als eine Verdopplung der VEGF Produktion erreicht werden. Im Folgenden wurden ausschließlich die TtT-GF Zellen weiter untersucht.

Da es sich bei dem PDGF Rezeptor um einen Rezeptor mit PI3K Aktivität handelt, wurden die TtT-GF Zellen in einem weiteren Versuch mit 10ng/ml PDGF AB und dem PI3K Inhibitor LY 294002 stimuliert. Bei diesem Versuch zeigte sich, dass die durch PDGF AB Stimulation herbeigeführte Steigerung der VEGF Produktion durch LY 294002 signifikant inhibiert werden kann (Abbildung 20). Die Stimulation mit 10 ng/ml PDGF AB (+ DMSO) ergab erneut eine signifikante Steigerung der VEGF Produktion gegenüber dem Basalwert (+ DMSO). Die VEGF Produktion bei Inkubation mit 1 μ M LY + 10 ng/ml PDGF war signifikant kleiner als bei alleiniger Stimulation mit 10 ng/ml PDGF (+ DMSO). Dieses Ergebnis zeigt, dass durch PDGF die PI3K des Rezeptors und damit die intrazelluläre Signaltransduktion aktiviert wird. Die ersten Schritte dieser Signalkaskade wurden auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blots weiter untersucht.

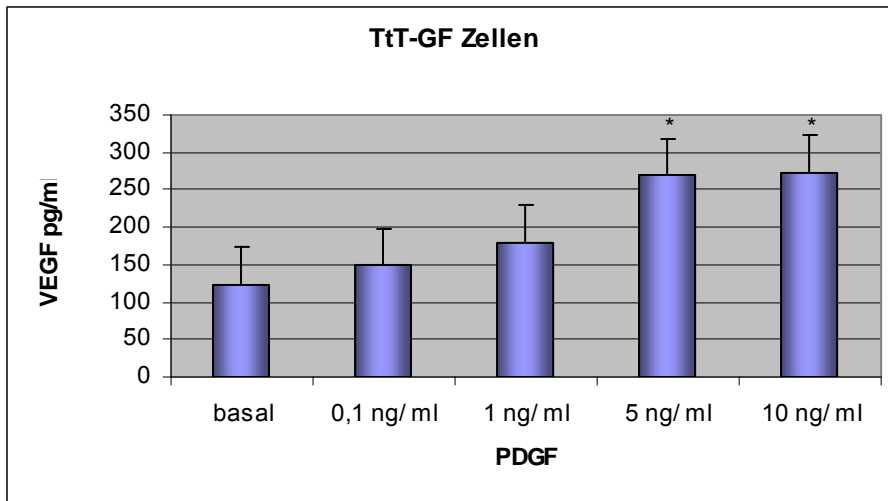


Abbildung 19: Wirkung von PDGF AB auf die VEGF Produktion von TtT-GF Zellen. Nach 24h Stimulation mit PDGF AB wurde ein signifikanter, dosis-abhängiger Anstieg der VEGF Sekretion beobachtet. * $p < 0,05$ vs. basal.

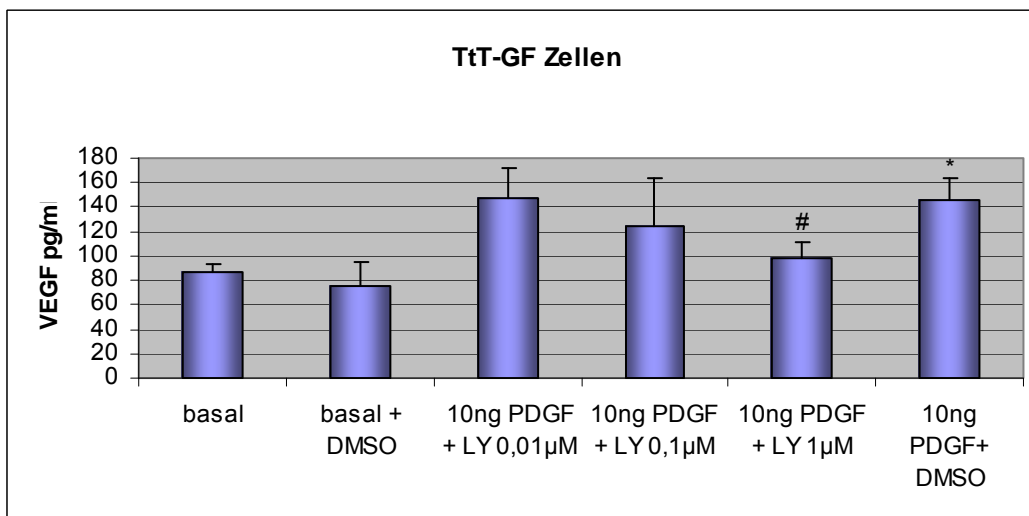


Abbildung 20: Wirkungen des PI3K Inhibitors LY 294002 und PDGF AB auf die VEGF Sekretion in TtT-GF Zellen.

Die durch PDGF AB stimulierte VEGF Produktion lässt sich durch den PI3K Inhibitor LY 294002 inhibieren. Der Anstieg der VEGF Produktion unter PDGF (10 ng/ml) + DMSO Stimulation gegenüber dem Basalwert + DMSO ist signifikant. Der Abfall der VEGF Produktion unter Stimulation mit PDGF (10 ng/ml) + LY (1µM) gegenüber PDGF (10 ng/ml) + DMSO ist dosisabhängig und ebenfalls signifikant. Die TtT-GF Zellen wurden zuerst für eine Stunde mit LY 294002 bzw. mit DMSO in den entsprechenden Konzentrationen inkubiert und anschließend mit 10 ng/ml PDGF AB für 30 min stimuliert. * $p < 0,05$ vs. basal+DMSO/ # $p < 0,05$ vs. 10ng PDGF+DMSO

3.5. Untersuchung zum Wirkungsmechanismus von PDGF in TtT-GF Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass die VEGF Produktion in TtT-GF Zellen durch PDGF AB Stimulation signifikant gesteigert werden kann und dies durch den PI3K Inhibitor LY 294002 wiederum inhibiert wird, wurde die Phosphorylierung des PDGF Rezeptors und der ersten Schritte der PI3K Signalkaskade mittels Western Blot untersucht.

Die Phosphorylierung des PDGF α - und β -Rezeptors konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden. Es wurden Proteinextrakte verwendet, bei denen die Zellen zum Nachweis des phosphorylierten PDGF α -Rezeptors mit PDGF AB und zum Nachweis des phosphorylierten PDGF β -Rezeptors mit PDGF BB für 5min, 10min, 15min und 30min stimuliert wurden. Die Intensität der Banden und damit auch die Phosphorylierung nimmt nach 5min Stimulation deutlich zu (Abbildung 21 A: 1 und 2).

Im nächsten Schritt wurden die in der Kaskade folgenden Signalproteine PDK1, Akt (Ser473) und PTEN untersucht. Die Proteinextrakte wurde mit PDGF AB für 5min, 10min, 15min und 30min stimuliert. Auch hier zeigte sich, dass die Intensität der Banden nach 5min Stimulation deutlich zunimmt (Abbildung 21 A: 3 und 4). Der Phosphorylierungsstatus des Signalproteins PTEN, das Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat zu Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zurück verwandelt, bleibt während der Stimulation gleich (Abbildung 21 A: 5). Diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass der Rezeptor nach PDGF Stimulation phosphoryliert und die PI3K mit den folgenden Signalproteinen PDK1 und Akt (Ser473) aktiviert wird.

Um die Inhibition der durch PDGF Stimulation erhöhten VEGF Produktion durch LY 294002 auch im Signalweg nachvollziehen zu können, wurden die mit LY behandelten Proteinextrakte erneut auf die Phosphorylierung von PDK1 und Akt (Ser473) untersucht. Unter Stimulation mit LY 294002 zeigten sich jeweils abgeschwächte Banden für die Proteine PDK1 und Akt (Ser473) (Abbildung 21B: 6 und 7). Die mit PDGF stimulierten Zellen zeigten erneut gegenüber den basalen Zellen auch unter LY Inhibition stärkere Banden. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass die Signalkaskade der PI3K durch LY 294002 inhibiert wird. Der PI3K Signalweg spielt demnach eine entscheidende Rolle bei der Stimulation von VEGF durch PDGF.

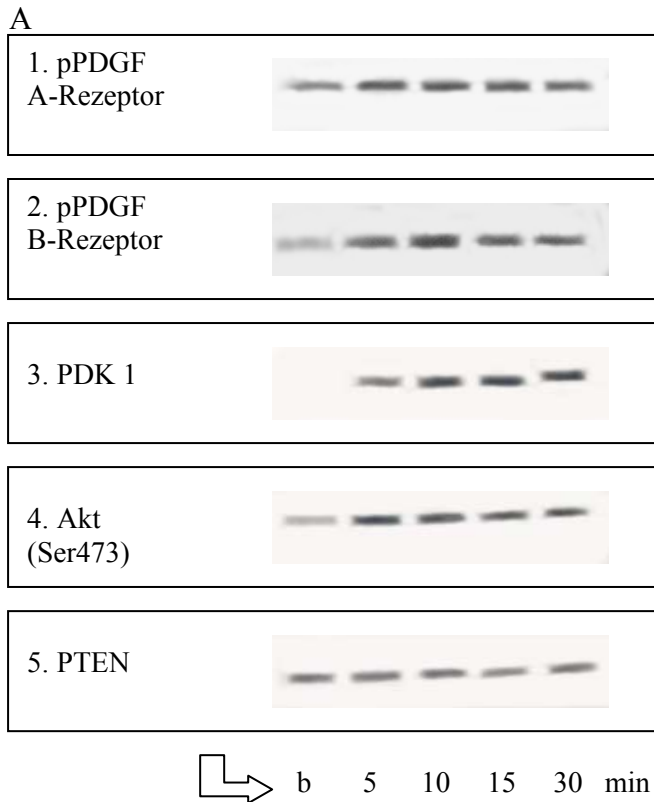


Abbildung 21 A:
 Nachweis der ersten Schritte in der Signalkaskade der PI3K. Die Phosphorylierung der α -/ β -Rezeptoren nimmt nach 5min Stimulation zu (1 und 2). Auch die Intensität der Signalproteine PDK1 und Akt (Ser473) nimmt nach 5min zu. Die PTEN ist ein Regulationsprotein der PI3K, die Intensität bleibt gleich. Bis auf den Nachweis des pPDGF β -Rezeptors wurden die Zellen mit PDGF AB 10ng/ml für 5min, 10min, 15min und 30min stimuliert. Der pPDGF β -Rezeptor wurde mit PDGF BB zu den oben erwähnten Zeiten stimuliert.

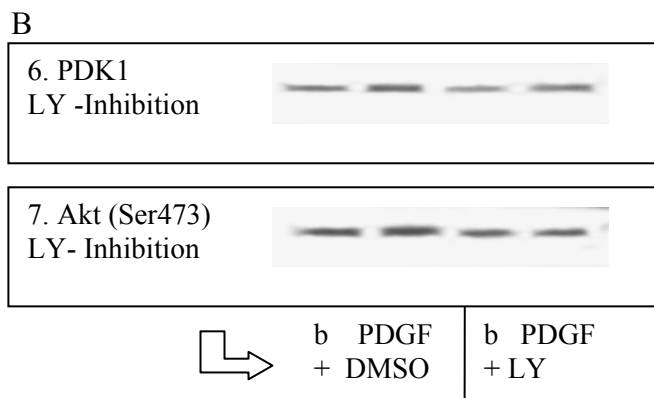


Abbildung 21 B:
 Die Signalkaskade kann durch den PI3K Inhibitor LY inhibiert werden. Die Banden der mit LY behandelten Zellen sind schwächer. Behandlung mit PDGF führt jeweils zu verstärktem Signal von PDK1 und Akt (Ser473). Die Zellen wurden zunächst eine Stunde mit LY 294002 bzw. DMSO behandelt und anschließend für 30 min mit PDGF AB stimuliert.

Abbildung 21: Wirkmechanismus von PDGF in TtT-GF Zellen.

4. Diskussion

Es hat sich gezeigt, dass zahlreiche Wachstumsfaktoren (TGF- α , TGF- β , VEGF, EGF, TNF- α , IL6, u.a.) modulierende Effekte auf die Hormonausschüttung und das Zellwachstum in der Hypophyse haben und an der Entstehung von Hypophysentumoren beteiligt sind. Die Wachstumsfaktoren wirken neben der externen Kontrolle durch den Hypothalamus über autokrine und parakrine Mechanismen auf die Homöostase der Hypophyse ein.

In bisherigen Untersuchungen konnte PDGF und PDGF Rezeptor mRNA in Hypophysenadenomen nachgewiesen werden [Leon et al, 1994]. Weitere Studien konnten keinen klaren Hinweis dafür liefern, dass PDGF und seine Rezeptoren in Prozesse der Hypophyse oder an der Adenomentwicklung beteiligt sind [Halper et al, 1992], [Sasahara et al, 1991]. Über die Expression, Lokalisation und funktionelle Bedeutung von PDGF, PDGF Rezeptoren innerhalb der Hypophyse ist bislang wenig bekannt. Auch in Hypophysentumoren ist die Rolle von PDGF und PDGF Rezeptoren noch weitgehend unklar. In dieser Arbeit dient die Rattenhypophyse als Modell der normalen humanen Hypophyse, die verschiedenen Zelllinien dienen als Modell für humane Hypophysentumoren. Anhand dieser beiden Modelle konnte erstmals gezeigt werden, wo und in welchen Zelllinien PDGF und die PDGF Rezeptoren exprimiert werden und welche Wirkung PDGF auf die Hormonsekretion, Zellwachstum und auf die Produktion von VEGF hat.

PDGF

PDGF A mRNA war in der Zelllinie TtT-GF und in der Rattenhypophyse vorhanden, die mRNA für PDGF B konnte in den TtT-GF, MtT-S, AtT-20 Zelllinien und der Rattenhypophyse nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Rattenhypophyse auf PDGF B mit Hilfe der Immunhistochemie ergab, dass PDGF B vor allem im Bereich der Gefäßwände vertreten ist. Nachdem die Endothelzellen als ein Ort der PDGF Sekretion bekannt sind [Reinmuth Niels et al, 2001], ist anzunehmen, dass auch die Endothelzellen in der Hypophyse PDGF sezernieren.

In den TtT-GF Zellen konnte das PDGF B Protein auch direkt mit dem Western Blot nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die mRNA für PDGF in den Zellen in das Protein translatiert worden ist. Die ELISA Kits zeigten, dass auch eine Sekretion von PDGF B durch die TtT-GF Zellen auftritt. Wie auch bei anderen Zellen, z.B. glatte Gefäßmuskelzellen [Nakano et al, 1993] wird die PDGF Sekretion von TtT-GF Zellen durch Dexamethason

inhibiert. Inwiefern die Menge an sezernierten PDGF innerhalb der Interzellulärräume ausreicht um signifikante Effekte auf die umliegenden Zellen auszuüben, ist spekulativ.

Somit sind die follikulostellären Zellen als auch die Endothelzellen als eine mögliche Quelle für PDGF identifiziert und es ist wahrscheinlich, dass diese beiden Zellen aktiv an der Angio- und Neoangiogenese beteiligt sind. Inwiefern die Tumorzellen von Hypophysenadenomen PDGF sezernieren bleibt offen.

PDGF Rezeptoren

Mit Hilfe der PCR wurde die mRNA des PDGF α -Rezeptors in den Hormon produzierenden Zelllinien AtT20 und MtT-S, sowie in den follikulostellären Tumorzelllinien (TtT-GF und PDFS) und der Rattenhypophyse nachgewiesen. Die mRNA des PDGF β -Rezeptors war vor allem auf den follikulostellären Zellen (TtT-GF), auf den weniger differenzierten MtT-S Zellen und der Rattenhypophyse vorhanden. In der immunhistochemischen Untersuchung der Rattenhypophyse zeigte sich, dass der PDGF α -Rezeptor sporadisch auf einigen Hormon produzierenden Zellen lokalisiert ist, während der PDGF β -Rezeptor vor allem auf den Gefäßzellen vertreten ist.

Der PDGF α -Rezeptor scheint dabei vor allem auf Hormon produzierenden Zellen der Hypophyse vorhanden und auch von funktioneller Bedeutung zu sein. Dies wird zum einen durch die Immunhistochemie gezeigt und zum anderen durch das Vorhandensein auf den Hormon produzierenden Tumorzelllinien AtT-20 und MtT-S bestätigt. Wie auch in anderen Tumoren gezeigt (z.B. Glioblastom und Gastrointestinale Stroma Tumore) [Ostman et al, 2004] scheint der PDGF α -Rezeptor auch in der Hypophyse in autokrine und parakrine Wachstumsprozesse und somit direkt an der Tumorentwicklung beteiligt zu sein.

Der PDGF β -Rezeptor ist dagegen vor allem an Gefäßzellen und mesenchymalen Zellen (TtT-GF Zellen) vorhanden und in deren Regulationsmechanismen involviert. Über Effekte auf die Angiogenese und die Beeinflussung des mesenchymalen Gewebes scheint der PDGF β -Rezeptor damit indirekt am Tumorgeschehen beteiligt zu sein. Um weitere Informationen über die Rolle von PDGF Rezeptoren bei Hypophysenadenomen zu erhalten, wäre die Untersuchung von Hypophysentumoren bezüglich der PDGF Rezeptoren nötig.

Wirkungen

Viele Wachstumsfaktoren wirken modulierend auf die Hormonsekretion der Hypophyse ein. Die Hormonsekretion der Zelllinien wurde unter PDGF Stimulation jedoch nicht signifikant verändert.

Bei den Wachstumsversuchen hingegen zeigte sich, dass einige Zelllinien auf die Stimulation mit PDGF reagieren. Die Stimulation mit PDGF AB und PDGF BB führte bei den Zelllinien TtT-GF und MtT-S zu signifikantem Wachstum. Diese beiden Zelllinien bilden sowohl den PDGF α -Rezeptor als auch den β -Rezeptor aus. PDGF AB bindet jedoch nur an den α -Rezeptor nicht an den β -Rezeptor während PDGF BB an beide Rezeptoren bindet. Somit ist gezeigt, dass zum einem die alleinige Aktivierung des PDGF α -Rezeptor durch PDGF AB als auch die Aktivierung beider Rezeptoren durch PDGF BB in den Zelllinien TtT-GF und MtT-S zu Zellwachstum führt. Die beiden Rezeptoren haben überlappende Funktionen in der Signaltransduktion. Die AtT-20 Zelllinie, die nur den PDGF α -Rezeptor ausbildet, wurde durch die Stimulation mit PDGF AB in ihrem Wachstum inhibiert. Neben PDGF hat ebenfalls BMP-4 (Bone Morphogenic Protein-4), ein Mitglied der TGF β Familie, inhibitorische Effekte auf das Zellwachstum von kortikotrophen Zellen [Giacomini et al, 2006]. Diese Beobachtungen könnten Gründe dafür sein, dass sich ACTH bildende Adenome meist als Mikroadenome manifestieren.

Auch in der komplexen Verknüpfung der Wachstumsfaktoren untereinander zeigte PDGF eine Wirkung: die VEGF Produktion in TtT-GF Zellen wird durch PDGF AB Stimulation signifikant gesteigert. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die durch PDGF erhöhte VEGF Sekretion durch den PI3K Inhibitor LY 294002 inhibiert werden kann. Diese Inhibition spricht für eine Aktivierung der PI3K durch PDGF in den TtT-GF Zellen. Diese Signalkaskade wurde mit Hilfe des Western Blots genauer nach verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass der PDGF α -Rezeptor nach Stimulation mit PDGF AB und der PDGF β -Rezeptor nach Stimulation mit PDGF BB phosphoryliert werden. In den weiteren Schritten konnte eine vermehrte Aktivität der Signalproteine PDK1 und Akt (Ser473) nach PDGF AB Stimulation beobachtet werden. Die PDK reguliert die Phosphorylierung von Akt. Das Signalmolekül Akt vermittelt antiapoptotische Funktionen (über Caspase 9), Effekte auf das Zellüberleben, auf den Zellmetabolismus (über das Signalprotein GSK3), die Proteinsynthese und auf die Motilität [Brader et al, 2004]. Die Phosphorylierung des Regulatorproteins PTEN

blieb nach PDGF AB Stimulation gleich. Auch die Inhibition der PI3K durch LY 294002 wurde anhand einer verminderten Aktivität der PDK1 und Akt (Ser473) durch den Western Blot bestätigt. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass PDGF in TtT-GF Zellen wie auch in anderen Zellen über die PI3K seine Effekte weiterleitet (Abbildung 22). Zu den durch die PI3K vermittelten Effekten gehören die Actin Reorganisation, Chemotaxis, Zell Wachstum und Antiapoptosis [Vanhaesebroeck et al, 1997]. Diese Effekte sind auch für Tumorwachstum von Bedeutung.

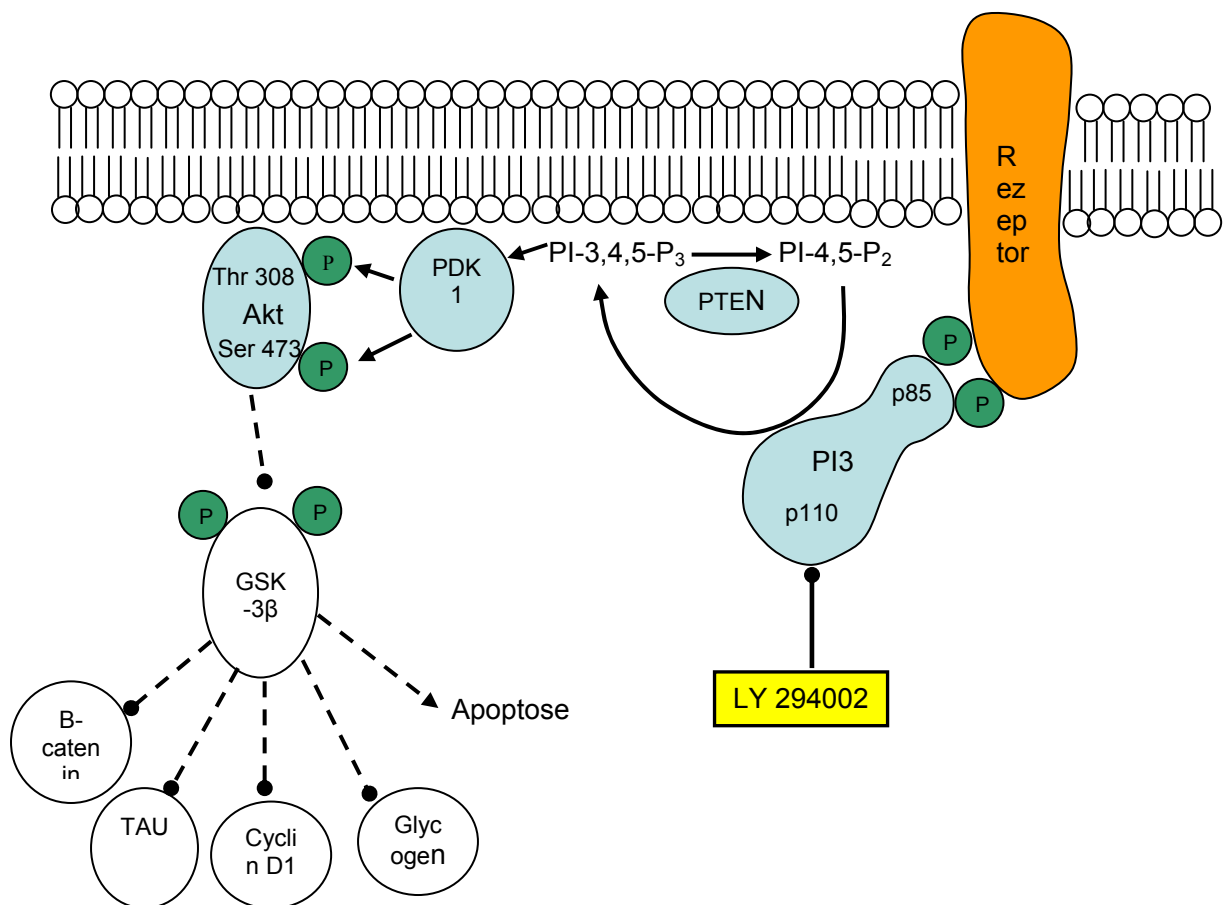


Abbildung 22: Schematische Darstellung der PI3K Signalkaskade in TtT-GF Zellen. Die Phosphorylierung der PDGF α - β -Rezeptoren war nach PDGF AB/BB Stimulation ebenso wie Aktivität der Signalproteine PDK1 und Akt (Ser473) nach PDGF AB Stimulation verstärkt nachweisbar. Die Aktivität der PTEN blieb gleich. Durch den Tyrosinkinase Inhibitor LY 294002 konnten die Signalproteine PDK1 und Akt (Ser473) und die daraus resultierende VEGF Erhöhung inhibiert werden. Es ist möglich, dass PDGF über die Aktivierung dieses Signalweges Effekte auf Apoptose, Zellüberleben, Metabolismus, Proteinsynthese und Motilität der TtT-GF ausübt.

Tumorwachstum

PDGF und PDGF Rezeptoren sind bei verschiedenen Tumoren auf **direkte** und **indirekte** Weise an der Tumorentwicklung beteiligt. Das **direkte Wachstum** ist durch autokrine und parakrine Stimulation des Zellwachstums, Überexpression und Überaktivierung von PDGF und PDGF Rezeptoren und Mutationen des Rezeptors verursacht. Bei der Tumorentwicklung kann die gesteigerte Synthese von PDGF und die damit verbundene autokrine Wachstumsstimulation ein wichtiger Schritt in der neoplastischen Umwandlung von PDGF Rezeptor positiven Zellen sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PDGF das Wachstum der TtT-GF und MtT-S Zelllinien steigert während die Proliferation von AtT20 Zellen inhibiert wurde. Die Aktivierung der PI3K in den TtT-GF Zellen und die damit verbundenen Proliferations Effekte sind ebenfalls ein Hinweis darauf, dass PDGF an Wachstumsprozessen beteiligt ist. Ein Wachstumseffekt durch PDGF und PDGF α -Rezeptoren über autokrine und parakrine Mechanismen innerhalb der Hypophyse ist somit denkbar. Auf der anderen Seite konnte bislang jedoch keine Korrelation zwischen Tumorgroße und mRNA Expression von PDGF und PDGF Rezeptoren gefunden werden [Leon et al, 1994]. Um die Bedeutung von PDGF in der Adenomentwicklung der Hypophyse genauer zu verstehen sind weitere Untersuchungen an Hypophysentumoren bezüglich PDGF und des PDGF α -Rezeptors notwendig. Die Rolle des spezifischen Tyrosinkinase Inhibitors Gleevec ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Ein Therapieerfolg mit Gleevec wäre jedoch entscheidend davon abhängig, wie stark PDGF das Tumorwachstum alleine fördert, wie ausgeprägt die PDGF Rezeptorenexpression in den Tumorzellen ist und in wie weit PDGF nur im Zusammenspiel der zahlreichen Wachstumsfaktoren zu Tumorwachstum führt.

Das **indirekte Wachstum** durch PDGF wird über angiogenetische Wirkungen, die Proliferation des mesenchymalen Tumorgewebes und über die Veränderung des intestinalen Gewebedrucks herbeigeführt. Diese Effekte werden vorwiegend über PDGF BB und den PDGF β -Rezeptor vermittelt. Bei den indirekten Effekten innerhalb der Hypophyse scheint PDGF vor allem eine Bedeutung für die Angiogenese zu spielen.

Bei der Angiogenese wirkt PDGF BB als Mitogen für glatte Muskelzellen und Perizyten und ist bei der Reifung von Blutgefäßen von Bedeutung [Distler et al, 2003]. Die Perizyten werden über parakrine Mechanismen rekrutiert wobei das Endothel wie auch der Tumor selbst als Quelle für PDGF BB dienen kann. In der immunhistochemischen Untersuchung der

Rattenhypophyse konnte PDGF BB vermehrt an den Gefäßen nachgewiesen werden und es ist anzunehmen, dass die Endothelzellen auch hier PDGF BB sezernieren. Wird von einem Tumor PDGF sezerniert, so kann die Perizytenkonzentration im Tumor und um die Gefäße ansteigen und zu gesteigertem Tumorwachstum führen [Guo et al, 2003]. Die Perizyten können das Tumorwachstum und das Überleben der Endothelzellen beeinflussen, indem sie selbst Wachstumsfaktoren sezernieren [Reinmuth et al, 2001] und auf der anderen Seite die funktionale Qualität der Gefäße verändern [Furuhashi et al, 2004]. Eine extrazelluläre Retention von PDGF durch die Endothelzellen, und das Binden von PDGF an Moleküle der extrazellulären Matrix ist jedoch für die regelrechte Integration der Perizyten in die Blutgefäße [Kurup et al, 2006] und für eine ausreichende Zahl an Perizyten von entscheidender Bedeutung [Lindahl et al, 1997]. Es ist somit möglich, dass die follikulostellären Zellen eine entscheidende Rolle für die Angio- und Neoangiogenese spielen indem sie PDGF BB sezernieren und direkt die Perizyten beeinflussen.

Ein weiterer Aspekt der Angiogenese bezogen auf die Hypophyse ist, dass die VEGF Produktion der follikulostellären Zellen durch Stimulation mit PDGF signifikant gesteigert werden kann. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits bei Stimulation der TtT-GF Zellen mit TGF- β beobachtet werden. Auch hier kam es zu einer signifikant gesteigerten VEGF Sekretion der TtT-GF Zellen [Renner et al, 2002]. Innerhalb der VEGF Familie sind fünf verschiedene VEGF Formen bekannt: VEGF, VEGF-B, PlGF (Plazenta growth factor), VEGF-C und VEGF-D. Es existieren drei verschiedene VEGF Rezeptoren (VEGFR 1/2/3), die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem PDGF Rezeptor aufweisen. VEGF spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Blut- und Lymphgefäßen und ist an der Tumorentwicklung über neoangiogenetische Prozesse beteiligt [Tammela et al, 2005]. In der Rattenhypophyse steigert VEGF die Prolaktin und ACTH Sekretion, führt zur Proliferation von MtT-S Zellen und reguliert die Gefäßpermeabilität [Onofri et al, 2006]. PDGF führt durch die Erhöhung der VEGF Sekretion indirekt zur Proliferation von Endothelzellen und zu oben genannten Effekten. Es ist ebenfalls bekannt, dass PDGF die VEGF Produktion von Perizyten steigern kann [Reinmuth et al, 2001]. Somit könnte PDGF über die follikulostellären Zellen als auch durch die Perizyten zu einer erhöhten VEGF Sekretion führen, was für die Angiogenese als auch für das Überleben der Endothelzellen in Tumoren von Bedeutung sein könnte (Abbildung 23). Aus diesem Grund ist eine Doppeltherapie mit Tyrosinkinase Inhibitoren die sowohl auf PDGF als auch VEGF Rezeptoren wirken besonders interessant. Durch die Inhibition des PDGF Rezeptors würde auch die VEGF Produktion von Perizyten inhibiert und

somit die Wirkung des Tyrosinkinase Inhibitors, der auf den VEGF Rezeptor wirkt, verstärkt.
 [Reinmuth et al, 2001]

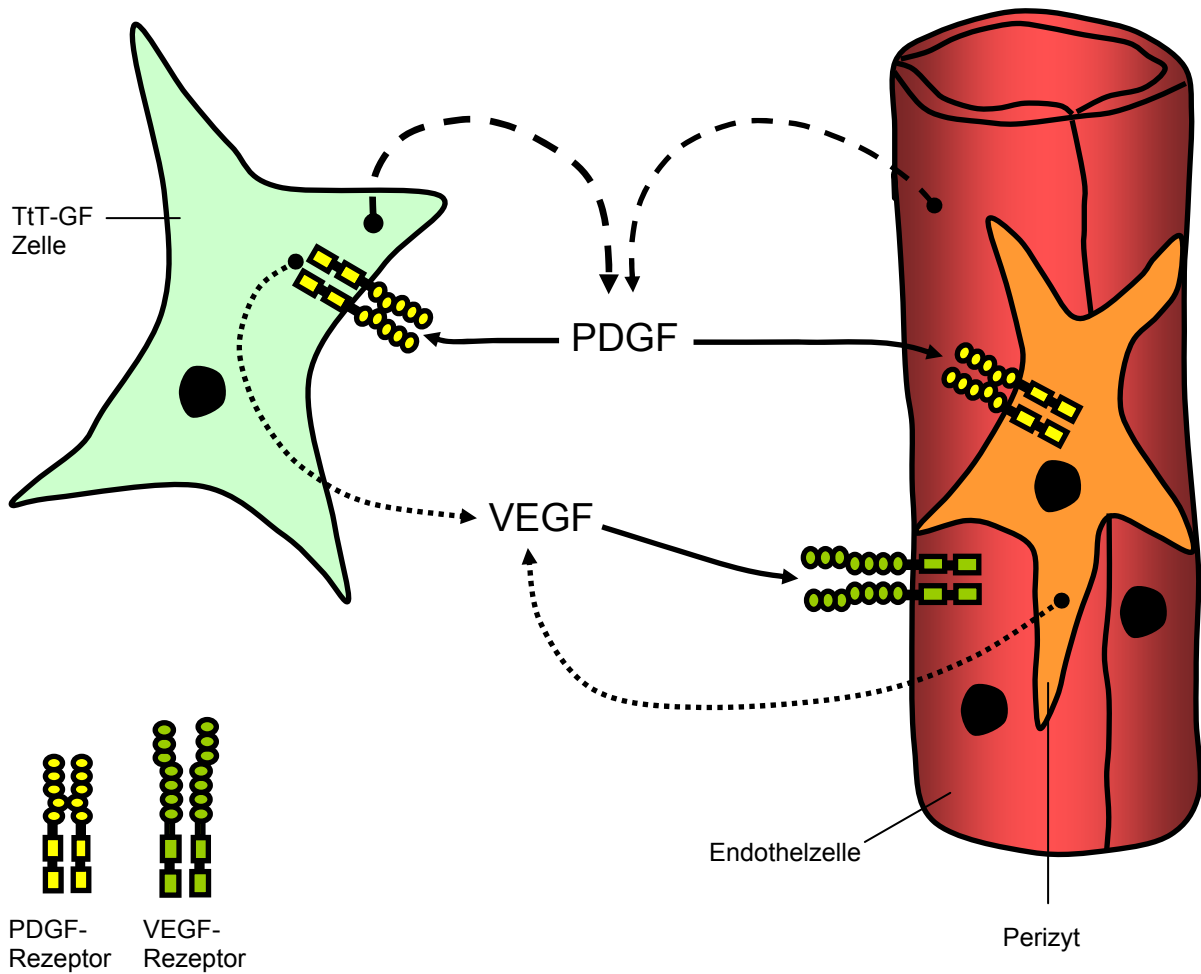


Abbildung 23: Darstellung der Interaktion zwischen follikulostellären Zellen und Endothelzellen bzw. Perizyten. PDGF ist in Verbindung mit VEGF in zahlreiche parakrine und autokrine Regulationsmechanismen involviert.

PDGF stimuliert in TtT-GF Zellen die VEGF Produktion. VEGF ist bei der Neoangiogenese in Tumoren von entscheidender Bedeutung. Perizyten sind ebenfalls in der Lage VEGF zu sezernieren und tragen dadurch zum Überleben der Endothelzellen in neu gebildeten Tumorgefäßen bei.

PDGF wird von TtT-GF Zellen und den Endothelzellen sezerniert. Das von Tumorzellen gebildete PDGF kann zu einer erhöhten Dicht von Perizyten in Tumoren und an Gefäßen führen. Für den regelrechten Einbau der Perizyten in ein Gefäß ist jedoch ein ausreichender PDGF Stimulus durch das vom Endothel gebildeten PDGF nötig.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass PDGF und seine Rezeptoren in einigen Tumorzelllinien exprimiert werden und auch in der Rattenhypophyse nachweisbar sind. Zudem stellte sich heraus, dass PDGF und seine Rezeptoren das Wachstum einiger Tumorzelllinien steigern bzw. inhibieren, die VEGF Produktion der follikulostellären Zelllinie (TtT-GF) steigern kann und seine Effekte über die PI3K Signalkaskade weitergeleitet werden. Somit ist es möglich, dass PDGF und die PDGF Rezeptoren zum einen direkt über autokrine und parakrine Mechanismen am Tumorwachstum beteiligt sind und andererseits die Angio-/Neoangiogenese beeinflusst wird. Weitere Untersuchungen sind nötig um die Rolle von PDGF und PDGF Rezeptoren in Hypophysen Adenomen und die potentiellen Effekte von spezifischen PI3K Inhibitoren zu erforschen.

5. Zusammenfassung

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ist ein Wachstumsfaktor mit starker mitogener und chemotaktischer Potenz gegenüber mesenchymalen Zellen und zahlreichen anderen Zelltypen. Die Bedeutung von PDGF und PDGF Rezeptoren in der Hypophyse und in Hypophysentumoren ist noch weitgehend unklar. In dieser Arbeit wurde die Expression, Lokalisation und funktionelle Bedeutung von PDGF und PDGF Rezeptoren anhand von transformierten Hypophysenzelllinien und der Rattenhypophyse erstmals untersucht.

An Zelllinien wurden die follikulostellären TtT-GF Zellen (Maus), somatotropen MtT-S Zellen (Ratte), die kortikotropen AtT-20 Zellen (Maus), die gonadotropen alpha T3-1 Zellen (Maus), die laktosomatotropen GH3 Zellen (Ratte) und die follikulostellären PDFS (Mensch) Zellen als Modelle für die verschiedenen Hypophysenadenome verwendet.

Mit der RT-PCR wurden die Zelllinien und die Rattenhypophyse auf PDGF A/B und PDGF α -/ β -Rezeptor mRNA untersucht. PDGF A wird von den TtT-GF Zellen und der Rattenhypophyse exprimiert, PDGF B trat in den Zelllinien TtT-GF, MtT-S, AtT20 und der Rattenhypophyse auf. Der PDGF α -Rezeptor konnte in den Zelllinien TtT-GF, MtT-S, AtT20, PDFS und der Rattenhypophyse nachgewiesen werden, der PDGF β -Rezeptor wird von den TtT-GF, MtT-S Zellen und der Rattenhypophyse exprimiert.

Um die in vivo Lokalisation von PDGF BB und der PDGF Rezeptoren zu überprüfen, wurde die Rattenhypophyse mittels Immunhistochemie weiter untersucht. Es zeigte sich, dass PDGF BB hauptsächlich im Bereich der Gefäßwände lokalisiert ist. Der PDGF α -Rezeptor ist sporadisch auf hormonproduzierenden Hypophysenzellen und follikulostellären Zellen zu finden während der PDGF β -Rezeptor vor allem an den Gefäßwänden vertreten war.

Neben dem Nachweis über die RT-PCR konnte PDGF BB als Protein auch mit Hilfe des Western Blots in TtT-GF Zellen detektiert werden. Darüber hinaus wurde mittels ELISA Test eine PDGF BB Sekretion von TtT-GF Zellen beobachtet, die durch Dexamethason inhibiert werden konnte.

Untersuchungen zur Wirkung von PDGF auf Hypophysenzellen ergaben, dass PDGF die Hormonausschüttung der verwendeten Zellen nicht veränderte. Bei den Wachstumsversuchen hingegen zeigte sich, dass die Stimulation mit PDGF AB und PDGF BB bei den Zelllinien TtT-GF und MtT-S zu signifikantem Wachstum führt. Die AtT-20 Zelllinie wurde durch die Stimulation mit PDGF AB in ihrem Wachstum inhibiert. Die Zelllinien PDFS, GH3 und alpha T3-1 reagierten in ihrem Wachstum nicht auf Stimulation mit PDGF. Darüber hinaus

konnte nachgewiesen werden, dass PDGF die VEGF Sekretion in TtT-GF Zellen signifikant steigert. Durch den PI3K Inhibitor LY 294002 konnte die durch PDGF induzierte VEGF Sekretion wiederum inhibiert werden.

Zusätzlich wurde der Wirkungsmechanismus von PDGF in TtT-GF Zellen genauer untersucht. Mit Hilfe des Western Blots wurde der intrazelluläre Signalweg der PI3K nachverfolgt. So konnte gezeigt werden, dass der PDGF α -Rezeptor nach Stimulation mit PDGF AB und der PDGF β -Rezeptor nach Stimulation mit PDGF BB vermehrt phosphoryliert wurde. Auch der Phosphorylierungsstatus der in der Signalkaskade folgenden Signalproteine PDK1 und Akt (Ser473) nahm nach PDGF AB Stimulation zu. Die Aktivität des Regulatorproteins PTEN blieb nach PDGF AB Stimulation gleich. Auch die Inhibition der PI3K in TtT-GF Zellen durch LY 294002 wurde anhand einer verminderten Aktivität der PDK1 und Akt (Ser473) durch den Western Blot bestätigt. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass PDGF in TtT-GF Zellen über die PI3K seine Effekte wie die VEGF Sekretion weiterleitet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass einige der untersuchten Zelllinien PDGF A/B und PDGF α -/ β -Rezeptoren exprimieren und in ihrem Wachstum durch PDGF stimuliert bzw. inhibiert werden. In der TtT-GF Zelllinie konnte darüber hinaus die Expression und Sekretion von PDGF sowie die Aktivierung der PI3K durch PDGF erstmals nachgewiesen werden. Somit ist ein direkter Einfluss von PDGF auf das Wachstum von Hypophysentumoren über autokrine und parakrine Mechanismen möglich.

Neben dem direkten Einfluss auf das Tumorstadium scheint PDGF ebenfalls an der Angiogenese beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass in der Rattenhypophyse PDGF B und der PDGF β -Rezeptor vorwiegend an den Blutgefäßen nachweisbar waren und es in TtT-GF Zellen zur vermehrten Sekretion von VEGF nach PDGF AB Stimulation kommt. Dadurch ist zum einen durch das Einwirken von PDGF auf die Endothelzellen und Perizyten und zum anderen durch die vermehrte VEGF Sekretion ein Effekt auf die Angio- und Neoangiogenese denkbar.

6. Referenzen

1. Abramsson, A., P. Lindblom, and C. Betsholtz, *Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors*. J Clin Invest, 2003. **112**(8): p. 1142-51.
2. Alexander, J.M., et al., *Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin*. J Clin Invest, 1990. **86**(1): p. 336-40.
3. Antoniades, H.N., C.D. Scher, and C.D. Stiles, *Purification of human platelet-derived growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(4): p. 1809-13.
4. Asa, S.L. and S. Ezzat, *The pathogenesis of pituitary tumours*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(11): p. 836-49.
5. Baluk, P., et al., *Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 1801-15.
6. Bategay, E.J., et al., *PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors*. J Cell Biol, 1994. **125**(4): p. 917-28.
7. Beitz, J.G., et al., *Human microvascular endothelial cells express receptors for platelet-derived growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 2021-5.
8. Bergers, G., et al., *Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1287-95.
9. Betsholtz, C., *Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 215-28.
10. Bostrom, H., et al., *PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis*. Cell, 1996. **85**(6): p. 863-73.
11. Brader, S. and S.A. Eccles, *Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis*. Tumori, 2004. **90**(1): p. 2-8.
12. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
13. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 139-45.
14. Clark, R.A., et al., *Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices*. J Clin Invest, 1989. **84**(3): p. 1036-40.

15. Clarke, I.D. and P.B. Dirks, *A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming*. *Oncogene*, 2003. **22**(5): p. 722-33.
16. Danila, D.C., et al., *A human pituitary tumor-derived folliculostellate cell line*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(3): p. 1180-7.
17. Distler, J.H., et al., *Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis*. *Q J Nucl Med*, 2003. **47**(3): p. 149-61.
18. Doolittle, R.F., et al., *Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor*. *Science*, 1983. **221**(4607): p. 275-7.
19. Fauquier, T., et al., *Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8891-6.
20. Fredriksson, L., H. Li, and U. Eriksson, *The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. **15**(4): p. 197-204.
21. Fressinaud, C., J.M. Vallat, and A. Pouplard-Barthelaix, *Platelet-derived growth factor partly prevents chemically induced oligodendrocyte death and improves myelin-like membranes repair in vitro*. *Glia*, 1996. **16**(1): p. 40-50.
22. Furuhashi, M., et al., *Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate*. *Cancer Res*, 2004. **64**(8): p. 2725-33.
23. Gamby, C., et al., *Growth-associated protein-43 (GAP-43) facilitates peptide hormone secretion in mouse anterior pituitary AtT-20 cells*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(17): p. 10023-8.
24. Giacomini, D., et al., *Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action*. *Endocrinology*, 2006. **147**(1): p. 247-56.
25. Gotlib, J., et al., *The FIP1L1-PDGFRalpha fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management*. *Blood*, 2004. **103**(8): p. 2879-91.
26. Graciarena, M., et al., *Involvement of the gp130 cytokine transducer in MtT/S pituitary somatotroph tumour development in an autocrine-paracrine model*. *Eur J Endocrinol*, 2004. **151**(5): p. 595-604.

27. Guo, P., et al., *Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment*. Am J Pathol, 2003. **162**(4): p. 1083-93.
28. Halper, J., et al., *Presence of growth factors in human pituitary*. Lab Invest, 1992. **66**(5): p. 639-45.
29. Heidaran, M.A., et al., *Chimeric alpha- and beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity*. J Biol Chem, 1990. **265**(31): p. 18741-4.
30. Heinrich, M.C., et al., *PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors*. Science, 2003. **299**(5607): p. 708-10.
31. Heldin, C.H. and B. Westermark, *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1283-316.
32. Heuchel, R., et al., *Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11410-5.
33. Horn, F., et al., *Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage*. Mol Endocrinol, 1991. **5**(3): p. 347-55.
34. Hu, Q., et al., *Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase*. Science, 1995. **268**(5207): p. 100-2.
35. Inoue, K., et al., *Establishment of a series of pituitary clonal cell lines differing in morphology, hormone secretion, and response to estrogen*. Endocrinology, 1990. **126**(5): p. 2313-20.
36. Inoue, K., et al., *Establishment of a folliculo-stellate-like cell line from a murine thyrotropic pituitary tumor*. Endocrinology, 1992. **131**(6): p. 3110-6.
37. Kazlauskas, A., D.L. Durden, and J.A. Cooper, *Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit*. Cell Regul, 1991. **2**(6): p. 413-25.
38. Kovalenko, M.V. and K. Kazlauskas, *Signaling by the platelet-derived growth factor receptor family*. Handbook of cell signaling, ed. R.A. Bradshaw and E.A. Dennis. 2003, Amsterdam: Elsevier. 297- 404.
39. Kurup, S., et al., *Heparan sulphate requirement in platelet-derived growth factor B-mediated pericyte recruitment*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 454-5.

40. Leon, S.P., et al., *Messenger ribonucleic acid expression of platelet-derived growth factor subunits and receptors in pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(1): p. 51-5.
41. Leveen, P., et al., *Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities*. Genes Dev, 1994. **8**(16): p. 1875-87.
42. Levitzki, A., *PDGF receptor kinase inhibitors for the treatment of PDGF driven diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 229-35.
43. Lindahl, P., et al., *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice*. Science, 1997. **277**(5323): p. 242-5.
44. Lokker, N.A., et al., *Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33037-44.
45. Maher, E.A., et al., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1311-33.
46. Matsui, T., et al., *Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes*. Science, 1989. **243**(4892): p. 800-4.
47. Morand, I., et al., *Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells*. Endocrinology, 1996. **137**(8): p. 3356-67.
48. Nakano, T., et al., *Glucocorticoid inhibits thrombin-induced expression of platelet-derived growth factor A-chain and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22941-7.
49. Omura, T., C.H. Heldin, and A. Ostman, *Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12676-82.
50. Onofri, C., et al., *Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in normal and adenomatous pituitaries: detection of a non-endothelial function of VEGF in pituitary tumours*. J Endocrinol, 2006. **191**(1): p. 249-61.
51. Ostman, A., *PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 275-86.

52. Pietras, K., et al., *Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors*. *Cancer Res*, 2001. **61**(7): p. 2929-34.
53. Pietras, K., et al., *Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy*. *Cancer Res*, 2002. **62**(19): p. 5476-84.
54. Reinmuth, N., et al., *Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival*. *Faseb J*, 2001. **15**(7): p. 1239-41.
55. Renner, U., et al., *Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells*. *Domest Anim Endocrinol*, 1998. **15**(5): p. 353-62.
56. Renner, U., et al., *Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells*. *Endocrinology*, 2002. **143**(10): p. 3759-65.
57. Renner, U., et al., *Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review*. *Eur J Endocrinol*, 1996. **135**(5): p. 515-32.
58. Renner U, S.L., Stalla GK, *Endokrinopathien/ Hypothalamische und hypophysäre Erkrankungen*. *Endokrinopathien*, ed. D. Ganten and K. Ruckpaul. 2001, Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
59. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(4): p. 1207-10.
60. Sasahara, M., et al., *PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model*. *Cell*, 1991. **64**(1): p. 217-27.
61. Schleicher, E. and O.H. Wieland, *Evaluation of the Bradford method for protein determination in body fluids*. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1978. **16**(9): p. 533-4.
62. Schlessinger, J., *How receptor tyrosine kinases activate Ras*. *Trends Biochem Sci*, 1993. **18**(8): p. 273-5.
63. Simon, M.P., et al., *Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma*. *Nat Genet*, 1997. **15**(1): p. 95-8.
64. Skobe, M. and N.E. Fusenig, *Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(3): p. 1050-5.

65. Soriano, P., *The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites*. *Development*, 1997. **124**(14): p. 2691-700.
66. Spritz, R.A., et al., *A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12*. *Genomics*, 1994. **22**(2): p. 431-6.
67. Stalla, G.K., et al., *Nitroimidazole derivatives inhibit anterior pituitary cell function apparently by a direct effect on the catalytic subunit of the adenylate cyclase holoenzyme*. *Endocrinology*, 1989. **125**(2): p. 699-706.
68. Steer, E.J. and N.C. Cross, *Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31-35: role of the platelet-derived growth factor receptor Beta*. *Acta Haematol*, 2002. **107**(2): p. 113-22.
69. Sullivan, N.J. and A.H. Tashjian, Jr., *Platelet-derived growth factor selectively decreases prolactin production in pituitary cells in culture*. *Endocrinology*, 1983. **113**(2): p. 639-45.
70. Tallquist, M. and A. Kazlauskas, *PDGF signaling in cells and mice*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. **15**(4): p. 205-13.
71. Tammela, T., et al., *The biology of vascular endothelial growth factors*. *Cardiovasc Res*, 2005. **65**(3): p. 550-63.
72. Tashjian, A.H., Jr., F.C. Bancroft, and L. Levine, *Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts*. *J Cell Biol*, 1970. **47**(1): p. 61-70.
73. Vale, W., et al., *Culture of enzymatically dispersed pituitary cells: functional validation of a method*. *Endocrinology*, 1972. **91**(2): p. 562-72.
74. Vanhaesebroeck, B., et al., *Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(7): p. 267-72.
75. Yarden, Y., et al., *Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors*. *Nature*, 1986. **323**(6085): p. 226-32.
76. Yeh, H.J., et al., *Developmental expression of the platelet-derived growth factor alpha-receptor gene in mammalian central nervous system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(5): p. 1952-6.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stalla für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, die experimentelle Arbeit in der Gruppe durchführen zu können.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. U. Renner, sei für seine große Unterstützung während der experimentellen Durchführung der Arbeit und für seine stete Diskussionsbereitschaft gedankt, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. C. Onofri, die mich bei der praktischen Durchführung der Experimente vorbildhaft eingearbeitet und betreut hat und auch jederzeit für anregende Diskussionen bereit stand. Durch Ihre sehr freundliche und aufgeschlossene Art ergab sich eine hervorragende Zusammenarbeit.

Zudem bedanke ich mich bei Frau Dr. M. Theodoropoulou für die Unterstützung und Frau J. Stalla für die Durchführung der RIA Tests und die Hinweise für die praktische Durchführung der Experimente.

Allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei ebenfalls für die Zusammenarbeit gedankt.

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Markus Christian Kowarik
Geburtsdatum: 10. Mai 1980
Geburtsort: München
Adresse: Brunhildenstr.26a
85579 Neubiberg



Schulbildung:

1986 -1990 Grundschole Graflng/ Neubiberg
1990- 1999 Gymnasium Neubiberg:
• Abiturnote: 1,6
• 2. Platz im Bundeswettbewerb für Mathematik,
• Auszeichnung von der Gemeinde Neubiberg für soziales Engagement

Zivildienst:

09/1999- 08/2000: Zivildienst in der Kindertagesstätte Neubiberg

Studium:

Seit 10/2000 Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
08/2002 Physikum
08/2003 1. Staatsexamen (Note: 2)
10/2003- 02/2004 Präparationsassistent am anatomischen Institut der LMU
02/2005 – 10/2005 Experimentelle Doktorarbeit am Max Planck Institut für Psychiatrie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stalla
Thema: Expression, Lokalisation und funktionelle Bedeutung von PDGF und PDGF-Rezeptoren im Hypophysenvorderlappen und in Hypophysentumorzelllinien
14-15/10/2005 Poster Presentation: 9th Annual Meeting of the Neuroendocrinology Section of the German Society of Endocrinology (DGE), Dresden
04/2006 2. Staatsexamen (Note: 1,6)
04/2006- 03/2007 Praktisches Jahr
04/2007 3. Staatsexamen (Note: 2),
Gesamtnote: 1,8

Famulaturen:

03/2003	Famulatur, Neurologie, Universität Berlin
03-04/2004	fakultative Famulatur: sechswöchiger praktischer und theoretischer Kurs für Tropenmedizin an der Universität Leipzig
08/2004	Famulatur in der Hämatologie, Krankenhaus Schwabing, LMU
09/2005	Praxisfamulatur

Praktisches Jahr:

17/04 – 12/06/2006:	PJ Tertial Innere Medizin, Medizinischen Klinik, LMU
13/06 – 06/08/2006:	PJ Tertial Innere Medizin, Mount Sinai Medical School, New York
07/08 – 26/11/2006:	PJ Tertial Chirurgie, Wexford General Hospital, Irland
27/11/2006- 18/03/2007:	PJ Tertial Neurologie, Klinikum Großhadern, LMU

Fremdsprachen:

- Englisch: sehr gute Kenntnisse (9 Jahre Unterricht in der Schule und Abiturfach, 6 Monate Auslandsaufenthalt in USA/ Irland)
- Französisch: gute Kenntnisse (5 Jahre Unterricht in der Schule)

Sonstiges Engagement und Fähigkeiten:

- Computerkenntnisse: Word, Excel, Power Point, Photoshop
- Mitwirken in zahlreichen Bands (vor allem Jazzbereich)/ Einspielen mehrerer Studioaufnahmen
- Sportliche Aktivitäten: Rennradfahren, Windsurfen, Bergsteigen, Hockey