

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE, MÜNCHEN

**Untersuchung von Adenohypophysentumoren auf ihre  
quantitative und qualitative IL-6 Sekretion  
sowie dessen Einfluß auf die  
Wachstumshormonausschüttung**

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

vorgelegt von  
Jan-Oliver Thiele  
Crivitz  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G.K. Stalla .

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. König .

Priv. Doz. Dr. H. Schmidt .

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. U. Renner .

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt .

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 03. 2005 .

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Die Hypophyse.....	5
1.2	Das Cytokin Interleukin-6 und seine Wirkung.....	6
1.3	IL-6 in der Hypophyse.....	9
1.4	Die follikulostellare Zelle.....	10
1.5	Hypophysentumoren.....	12
1.5.1	Klinik, Diagnostik, Therapie.....	12
1.5.2	Pathogenese.....	14
1.6	Fragestellung und Zielstellung der Dissertation.....	16
2	Methodik.....	17
2.1	Material.....	17
2.2	Geräte, Medien und Lösungen.....	20
2.3	Methoden.....	24
2.3.1	Zellkultur.....	24
2.3.2	Sekretionsstudien.....	25
2.3.3	ELISA für die IL-6 Bestimmung.....	26
2.3.4	RIA für die Wachstumshormon (GH) Bestimmung.....	26
2.3.5	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	27
3	Ergebnisse.....	29
3.1	IL-6 Basalsekretion kultivierter Hypophysenadenomzellen.....	29
3.2	IL-6 Sekretion kultivierter Hypophysenadenomzellen.....	32
3.2.1	Wirkung von Octreotid (SMS).....	33
3.2.2	Wirkung von IGF-1.....	35
3.2.3	Wirkung von Estradiol.....	37
3.2.4	Wirkung von Bromocriptin.....	39
3.2.5	Wirkung von PACAP.....	41
3.2.6	Wirkung von TGF $\alpha$ .....	44
3.2.7	Wirkung von TGF $\beta$ .....	46
3.3	IL-6 Sekretion kultivierter Hypophysenadenomzellen nach Behandlung mit Dexamethason.....	48
3.4	GH Sekretion kultivierter somatotroper Hypophysenadenomzellen nach Behandlung mit IL-6.....	53
4	Diskussion.....	55
5	Zusammenfassung.....	63

Abkürzungsverzeichnis .....	65
Abbildungsverzeichnis .....	67
Tabellenverzeichnis .....	68
Literaturverzeichnis .....	69

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Hypophyse

Die Hypophyse ist die etwa haselkerngroße, von einer Bindegewebskapsel umschlossene Hirnanhangdrüse am Boden des Zwischenhirns. Sie liegt in der Vertiefung der Fossa hypophysialis der Sella turcica. Die Hypophyse ist ein inkretorisches, mehrere Hormone produzierendes, beziehungsweise die Hypothalamushormone Oxytocin und Vasopressin speicherndes und über den Pfortaderkreislauf in den Körperkreislauf abgebendes Organ.

Man unterscheidet entwicklungsphysiologisch zwei aus ursprünglich unabhängigen embryonalen Geweben entstandene Anteile, den Hypophysenvorderlappen (HVL, Adenohypophyse), und den Hypophysenhinterlappen (HHL, Neurohypophyse).

Die Hypophyse ist von einem engmaschigen Kapillarnetz durchsetzt, in Fortsetzung der – auf das Kapillargeflecht des Hypothalamus und des Infundibulums folgenden – Portalvenen des Pfortaderkreislaufs.

Die Adenohypophyse, der aus einer Ausstülpung des oralen Ektoderms entstandene vordere Hauptteil der Hypophyse, unterteilt sich in die Pars distalis als größten Teil, Pars tuberalis (Pars infundibularis, Hypophysentrichterlappen) und Pars intermedia (Hypophysenmittellappen). Man unterscheidet azidophile Alpha-, basophile Beta- und chromophobe Gammazellen, ferner Delta-, Epsilon- und Etazellen.

Eine andere Unterscheidung benennt neben den 5 endokrinen Zellarten noch Endothelzellen, Fibroblasten und follikulostellare Zellen (FS-Zellen).

Der Hypophysenvorderlappen macht etwa 80% des hypophysären Gewichts aus und ist der Bildungsort der Peptidhormone: Somato- (STH,GH), Cortico- (ACTH), Thyreotropin (TSH) sowie follikelstimulierendes (FSH), luteinisierendes (LH) Hormon und Prolactin (PRL). Die Sekretion der Vorderlappenhormone wird durch Releasing- und Inhibiting-Hormone des Hypothalamus (Hypothalamus-Infundibulum-System) und durch Feedback-Mechanismen peripherer Hormone gesteuert (Ray u. Melmed 1997).

Der hintere, dem Hypophysen-Zwischenhirn-System zugehörige, aus dem Boden des Dienzephalons entstandene Teil der Hypophyse, bestehend aus Neuroglia, Pituizyten und marklosen Nervenfasern, gliedert sich in den eigentlichen Hypophysenhinterlappen (HHL, entspricht Lobus nervosus) und das Infundibulum. Er ist von der Pars tuberalis des Vorderlappens umgeben welche, gemeinsam den »Hypophysenstiel« bildend, in den Recessus infundibuli des 3. Ventrikels hineinragt. Dem HHL werden durch »axoplasmatischen Fluß« über Axone der Zellen der Nuclei supraopticus und paraventricularis des Hypothalamus die Hormone Oxytocin und Vasopressin als Neurosekret zur örtlichen Speicherung beziehungsweise zur Abgabe in das Blut zugeführt (Melmed 2002).

Der HVL ist das zentrale Organ im endokrinen System und gleichzeitig ein Angriffspunkt für die Interaktion von Endokrinium mit dem Immunsystem. Die Proliferation und Sekretion des HVL wird nicht nur direkt durch die hypothalamische Regulation sowie durch Rückkopplungsmechanismen gesteuert, sondern ebenfalls durch Faktoren (Cytokine) des Immunsystems sowie durch systemische und, oder in der Hypophyse selbst gebildete, parakrin wirksame Cytokine und Wachstumsfaktoren (Ray u. Melmed 1997).

## **1.2 Das Cytokin Interleukin-6 und seine Wirkung**

Interleukin-6 (IL-6) wird von aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten sowie Endothelzellen gebildet und ist ein Glykoprotein mit einer Molmasse von 21 kDa. Seine wesentliche Funktion ist die Wirkung als »colony stimulating factor« (CSF) und Wachstumsfaktor für Plasmazellen, Keratinozyten und Mesangiumzellen, des weiteren induziert es die Synthese von Akute-Phase-Proteinen.

Die Wirkung von IL-6 und einer Gruppe weiterer Cytokine (IL-11, LIF, Onkostatin M, CNTF, Cardiotropin-1) wird mittels jeweils spezifischer Rezeptoren (Tadamitsu et al. 1995) über das transmembrane gp130, als gemeinsames initiales Signalprotein, an die Zellen vermittelt (IL-6-type cytokines, gp130 cytokine receptor family) (Perez Castro et al. 2003). Im Umkehrschluß können die Wirkungen aller Cytokine der IL-6 Proteinfamilie durch gp130 neutralisierende Antikörper inhibiert werden (Arzt 2001). Die Signaltransduktion läuft nach Homo- beziehungsweise Heterodimerisation von einem Cytokin/Rezeptorkomplex mit gp130 über die Aktivierung von JAK (Janus

Kinase) Tyrosin Kinase und damit zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT (signal transducers and activators of transcription)–Familie. Ein weiterer Weg ist die MAPK (mitogen-activated protein kinase)–Kaskade (Arzt 2001, Heinrich et al. 2003).

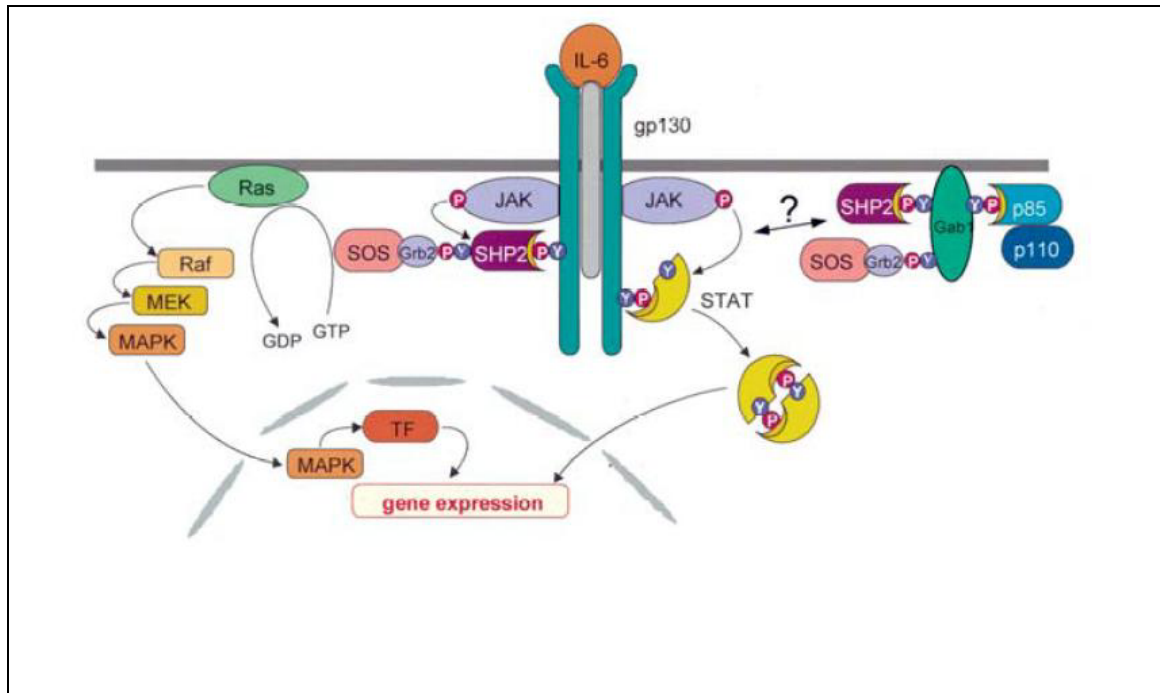


Abbildung 1: Die zwei Hauptaktivierungswege von IL-6 (Heinrich et al. 2003) Die Signaltransduktion führt über die JAK Tyrosin Kinase zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (rechter Weg), bzw. zum Anschalten der MAPK Kaskade mittels SHP2 Adaptermolekül (links).

Die IL-6 Wirkung wird ebenfalls über einen eigenen Rezeptor vermittelt. Dieser IL-6 Rezeptor (IL-6R) ist ein 80 kDa großes Protein, die glykosilierte Form eines 50 kDa Precursors (Holub et al. 1999). Die cDNA codiert ein 468 Aminosäuren großes Protein mit einem Signalpeptid, einem extrazellulären Anteil (3 Domänen, D1, D2, D3), einer transmembranen Domäne und einem kurzen cytoplasmatischen Anteil (Varghese et al. 2002, Schuster et al. 2003).

Der transmembrane und der cytoplasmatische Anteil scheinen für die Signaltransduktion nicht benötigt zu werden (Varghese et al. 2002). Dafür spricht auch die Wirksamkeit eines frei im Plasma nachweisbaren solublen Rezeptors (sIL-6R). Die Aktivierung des gp130 und dessen Signalweiterleitung in das Zellinnere erfolgt auch durch einen IL-6/sIL-6R-Komplex (März et al. 1998, März et al. 1999). In sehr niedrigen Konzentrationen kann man diesen alternativen (aufgrund von unterschiedlichen Gensplicing entstandenen) Rezeptor in gesunden Individuen im Urin und im Serum nachweisen (Rose-John 2003). Das bedeutet, daß sich die

Wirksamkeit von IL-6 nicht nur auf Zellen reduziert, die einen eigenen IL-6 Rezeptor aktiv exprimieren, sondern (vorausgesetzt der Anwesenheit von sIL-6R) auf gp130 positive Zellen erweitert (Igaz et al. 2000). Das transmembrane gp130 konnte bis jetzt schon in allen murinen Organen, inklusive Herz, Leber, Niere und Hirn (Tadamitsu et al. 1995) sowie in humanen Geweben, wie der Hypophyse (Shimon et al. 1997) nachgewiesen werden.

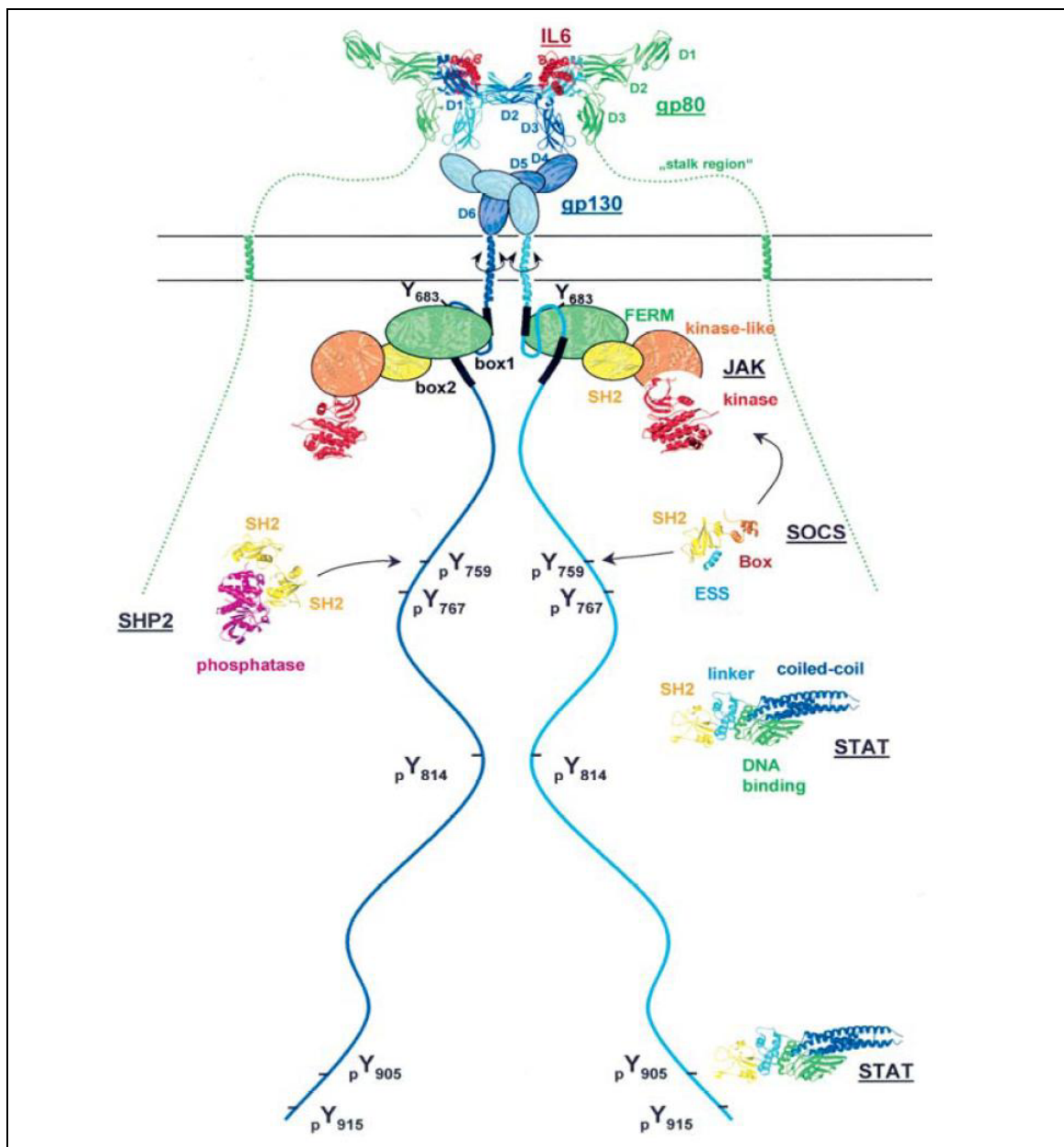


Abbildung 2: Strukturmodell des IL-6 Rezeptorkomplexes (Heinrich et al. 2003) Das IL-6 (rot) ist an seinem Rezeptor (grün, gp80) gebunden. Für die Signaltransduktion wird das transmembrane gp130 (blau) benötigt, welches intrazellulär über die JAK Kinase die STAT Transkriptionsfaktoren aktiviert. Die MAPK Kaskade ist nicht abgebildet.



Auf dem oben beschriebene Signaltransduktionsweg erfüllt die IL-6 Proteinfamilie eine Funktion als Lymphozytenmessenger bei Inflammation und Verletzung. Sie spielen eine Rolle in der Interaktion zwischen Immunsystem und dem endokrinen System, genauso wie in der Hämatopoese, der neuronalen Regeneration und in der embryonalen Entwicklung (Shimon et al. 1997, Ben-Shlomo et al. 2003). Der IL-6 Proteinfamilie ist eine Wirkung bei Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis, Osteoporose, Morbus Crohn und verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen worden (Jones et al. 2001). Erhöhte IL-6 Werte konnten bisher bei der Mehrzahl der genannten Erkrankungen sowie bei weiteren gemessen werden, zum Beispiel HIV und Asthma bronchiale (Simon et al. 2001). Ebenso zeigte sich eine herausragende Rolle des Cytokins in der Pathologie von neurodegenerativen Erkrankungen (März et al. 1996). Die Wirkung des Interleukin-6 auf die Hypophyse wird im folgenden Kapitel (Kap.1.3) ausführlicher beleuchtet. An der Nebennierenrinde, beziehungsweise verschiedenen NNR-Zellkulturen, konnte eine Glucocorticoid Sekretionsinduktion des IL-6 nachgewiesen werden (Päth et al. 1997). Ebenso wurde eine, durch das Cytokin vermittelte, ACTH Wirkungssteigerung beschrieben (Turnbull u. Rivier 1999).

### **1.3 IL-6 in der Hypophyse**

Das Cytokin IL-6, dessen Rezeptor sowohl in der gesunden Hypophyse, als auch in Hypophysenadenomen nachgewiesen werden konnte (Turnbull u. Rivier 1999, Bethin et al. 2000), induziert eine Reihe von unterschiedlichen Aktionen (pleiotroper Faktor). In der gesunden Hypophyse ist IL-6 als Wachstumsfaktor identifiziert worden, der inhibierend auf die Proliferation von normalen endokrinen Hypophysenzellen wirkt (Arzt et al. 1993). Parallel dazu bewirkt IL-6 eine Ausschüttung von HVL-Hormonen wie GH, PRL, FSH und ACTH (Renner et al. 1996, Arzt u. Stalla 1996, Arzt et al. 1999).

IL-6 erreicht die Hypophyse zum einen über den Blutkreislauf, zum Beispiel bei Inflammation, zum anderen wird es auch in der Hypophyse selbst gebildet (Spangelo et al. 1990). Dies übernehmen die FS-Zellen, denen aufgrund einer Vielzahl von eigenen Rezeptoren für Cytokine, Wachstumsfaktoren, Endotoxine und Hormone eine Vermittlerrolle in der immun-endokrinen Interaktion zugeschrieben wird (Inoue et al. 1999).

Von diesem Normalbefund abweichend wurde beobachtet, daß in Adenomen des Hypophysenvorderlappens, auch bei erwiesener Abwesenheit von FS-Zellen, IL-6 in zum Teil erheblicher Konzentration vorhanden ist (Jones et al. 1991, Jones et al. 1993, Velkeniers et al. 1994, Ray u. Melmed 1997). Des weiteren konnte man nachweisen, daß das IL-6 auf die Adenomzellen wachstumstimulierend wirkt (Arzt et al. 1999, Borg et al. 2003).

Die Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem neuroendokrinen System ist ausführlich beschrieben worden (Arzt 2001, Chesnokova u. Melmed 2002, Graciarena et al. 2003). Die von den Immunzellen produzierten Cytokine haben eine direkte Wirkung auf das Sekretionsverhalten der endokrinen Zellen. Umgekehrt beeinflussen ausgeschüttete Hormone die Immunzellen und steuern deren Cytokinproduktion. Hierbei handelt es sich um einen Rückkopplungsmechanismus, dem in der Pathophysiologie einer Entzündung und deren Immunantwort eine bedeutende Rolle zuzuschreiben ist (Renner et al. 1998, Venihaki et al. 2001).

Durch die bei der Inflammation mittels Cytokinen aktivierte Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) kommt es zu einem systemischen Anstieg des Glucocorticoidspiegels. Dies geschieht mittels hypothalamischer CRH Sekretion, hypophysärer ACTH Ausschüttung und direkter Nebennierenrindenstimulation (Gloddek et al. 2001, Chesnokova u. Melmed 2002). Die Glucocorticoide wiederum schützen den Organismus durch ihre immunsupprimierende Wirkung vor einem Überschießen der Immunreaktion und damit vor einem letalen septischen Schock. Das steht für einen Rückkopplungseffekt, da die immunsupprimierende Wirkung der Glucocorticoide auf einer Hemmung der Cytokinfreisetzung aus Makrophagen und Monozyten beruht (Turnbull u. Rivier 1999).

#### **1.4 Die folliculostellare Zelle**

Bis vor wenigen Jahren war von der folliculostellaren Zelle (FS-Zelle), die in den fünfziger Jahren erstmalig in der Hypophyse beschrieben wurde, nur sehr wenig bekannt, obwohl sie mit bis zu 10% aller Zellen einen nicht unerheblichen Anteil im HVL ausmacht.

In Form und Funktion zeigen die Zellen Ähnlichkeiten zur Mikroglia (Allaerts et al. 1997), wobei hier noch weiterführende Arbeiten erforderlich sind, da andere Autoren sie eher der Makroglia (Astrozyten) zuordnen (Inoue et al. 1999). Die FS-Zellen bilden mit ihrer sternförmigen Morphologie ein Netzwerk im HVL und sind sowohl untereinander als auch mit den endokrinen Zellen mittels gap-Junctions verbunden.

Die Untersuchungen weisen diesem Zelltyp eine multifunktionelle Aufgabe in der Adenohypophyse zu. So haben sie unter anderem eine phagozytorische Fähigkeit, die sie bei der Entfernung von Zelldebris nutzen. Die FS-Zellen spielen eine Rolle in der intrahypophysären Kommunikation, wo sie auf die anderen Zellen modulierend einwirken, indem sie unter anderen Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Follistatin und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) produzieren (Inoue et al. 1999).

Weiterhin sind die FS-Zellen in der gesunden Hypophyse der Produktionsort von IL-6 (Allaerts et al. 1997).

Die Regulation dieser IL-6 Produktion in den FS-Zellen stellt sich folgendermaßen dar: bei Aktivierung des Immunsystems werden die FS-Zellen mittels  $TNF\alpha$  und IL-1 zur Sekretion von IL-6 stimuliert. Wenn die Hypophyse der zeitlich versetzte Anstieg von IL-6 aus dem Plasma erreicht, wird diese parallel von intrahypophysär gebildetem IL-6 überflutet. Man kann annehmen, daß erst die Summe von zirkulierendem und autokrinem IL-6 eine wirksam stimulierende Konzentration bildet.

In den FS-Zellen konnten ebenfalls Glucocorticoid-Rezeptoren nachgewiesen werden. Also unterliegt die FS-Zelle dem gleichen Rückkopplungseffekt, wie die Monozyten und Makrophagen, um eine überoptimale IL-6 Produktion zu vermeiden.

Inzwischen hat man noch PACAP (Nagashima et al. 2003, Matsumoto et al. 1993) und VIP (Spangelo et al. 1990) als potente Stimulatoren der IL-6 Produktion in der FS-Zelle identifiziert.

In in vitro Experimenten konnte ebenfalls eine IL-6 freisetzende Wirkung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) nachgewiesen werden (Renner et al. 1998). Die Aktivität des LPS wird unter Anwesenheit von Serum um ein Vielfaches verstärkt. Es hat sich gezeigt, daß der Verstärkung eine deutlich höhere Affinität des membranständigen mCD14 für den LPS/LBP Komplex (Lipopolysaccharid/LPS binding protein Komplex) zugrunde liegt, als zum freien LPS. Die Signalübertragung

in die Zelle wird über den transmembranen Toll like Rezeptor Tlr4 vermittelt (Lohrer et al. 2000).

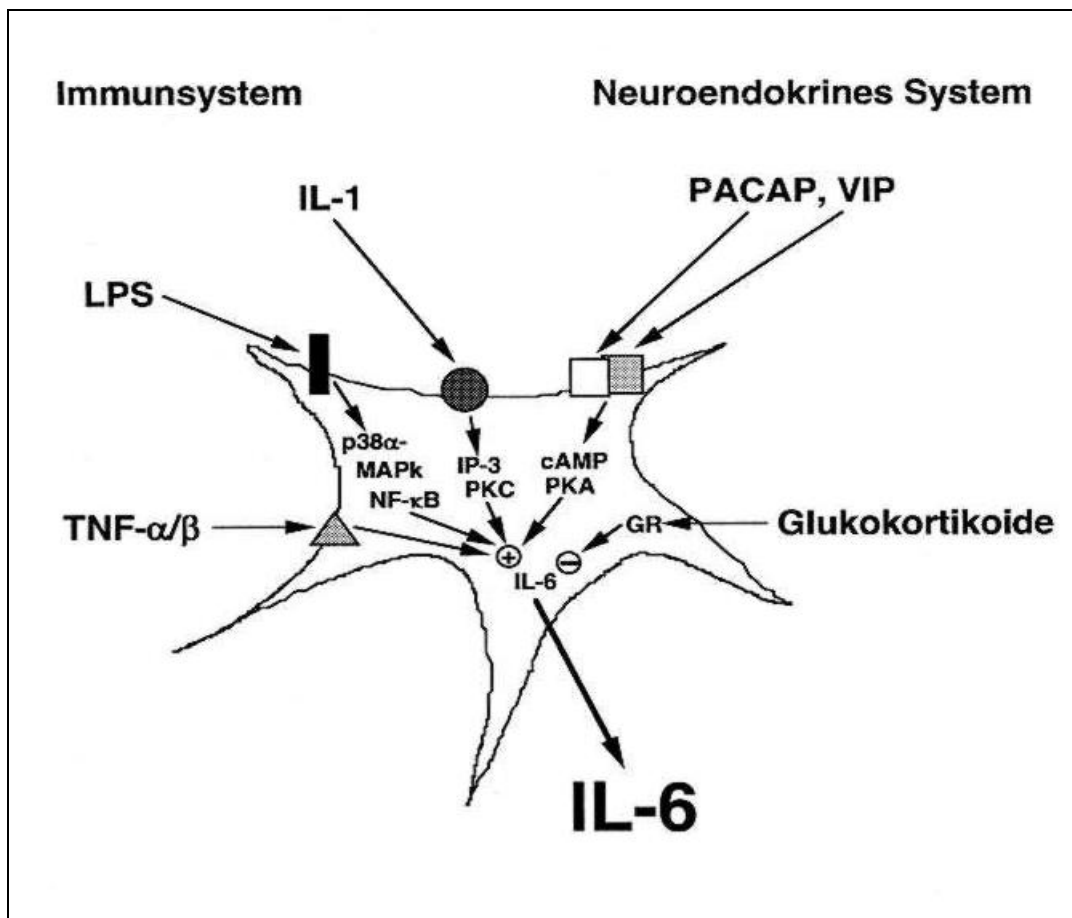


Abbildung 3: Regulation der IL-6 Produktion in der FS-Zelle der Hypophyse (Renner et al. 1998) Aktivierung der IL-6 Produktion in der FS-Zelle über das Immunsystem (links) und über das neuroendokrine System (rechts). Die Glucocorticoide inhibieren die IL-6 Sekretion.

## 1.5 Hypophysentumoren

### 1.5.1 Klinik, Diagnostik, Therapie

Patienten mit hypophysären Tumoren zeigen meistens eine Kombination von Symptomen, die zum einem durch die Raumforderung (Kopfschmerzen, Sehstörungen/ Gesichtsfelddefekte) und zum anderen durch die Hypersekretion von einem oder mehreren hypophysären Hormonen erklärt werden können. Ein Tumor im Bereich der Hypophyse muß vermutet werden, wenn sich auf der Röntgenaufnahme des Schädels eine erweiterte Sella turcica zeigt oder wenn neurologische Hinweise auf eine Kompression im Bereich des Chiasma opticum bestehen (zum Beispiel bilaterale Hemianopsie).

Die bei einer pathologisch gesteigerten Sekretion am häufigsten betroffenen adenohipophysären Hormone sind GH (Akromegalie), Prolactin (Galaktorrhoe) und ACTH (hypophysäres Cushing Syndrom).

Ein Überschießen der GH Produktion kann in jedem Lebensalter beginnen, liegt aber meistens im 3. bis 5. Lebensjahrzehnt. Wenn die Erkrankung im Kindesalter, vor dem Schließen der Epiphysenfugen, auftritt, kommt es zum Gigantismus (Körpergröße liegt über 2m) häufig kombiniert mit einem Hypogonadismus.

Sind die Wachstumsfugen beim Auftreten der Erkrankung schon geschlossen, treten als erste klinische Zeichen eine Vergrößerung der Gesichtszüge und Weichteilschwellungen an Händen und Füßen auf. Weitere Symptome sind Cutis gyrata, Vergrößerung von Händen, Füßen und Schädel, Vergrößerung der Zunge, Auseinanderweichen der Zähne (klosige Sprache) und Vergrößerung der inneren Organe sowie Atrophien an den Gelenken, Parästhesien, Kopfschmerzen und allgemeine Gelenkschmerzen.

Generell wird heute beim somatotropen Adenom eine ablativ Therapie mittels Operation oder Bestrahlung eingeleitet. Eine medikamentöse Therapie ist angezeigt, wenn die Bestrahlung beziehungsweise Operation nicht zu einem ausreichenden Ergebnis geführt hat, oder diese patientenbedingt kontraindiziert sind. Medikamentös kommen vor allem Somatostatinanaloga, zum Beispiel Octreotid (Melford et al. 1998, Newman et al. 1998), zur Anwendung.

Das Prolactinom ist der häufigste endokrin aktive Hypophysentumor. Die Klinik zeigt sich in einer sekundären Amenorrhoe, Galaktorrhoe und Libidoverlust. Bei Männern (20% der Erkrankten) steht der Libido- und Potenzverlust im Vordergrund, eventuell verbunden mit einer Gynäkomastie.

Bei einem positiven Befund (mehrfache Prolactinbestimmung, TRH-Belastungstest, Medikamentenanamnese, Ausschluß anderer Krankheiten, zum Beispiel Hypothyreose) erfolgt heute die medikamentöse Therapie. Dopamin ist der wichtigste Faktor in der Regulation des Prolactins. Wenn der Hypophysenstiel durchtrennt wird, nimmt einzig die Sekretion dieses Hormons zu. Alle anderen Hypophysenvorderlappenhormone nehmen in ihrer Sekretion ab. Diese Tatsache nutzt man für den medikamentösen Therapieansatz. Bei 95% der Patienten kommt

es unter der Gabe eines Dopaminagonisten (Bromocriptin, Lisurid) zu einer Normalisierung des Serumprolactins und einer Rückbildung der Tumorgröße.

Die Indikation für eine transssphenoidale Hypophysenoperation besteht nur noch bei Nichtansprechen auf die konservative Therapie.

Beim zentralen (hypophysären) Cushing Syndrom handelt es sich in mehr als 80% der Fälle um ein Mikroadenom des HVL, welches neuroradiologisch oft nicht nachweisbar ist.

Im Rahmen der Erkrankung kommt es zu Störungen im Fett-, Eiweiß- und Kohlehydratstoffwechsel sowie des Hämatopoetischen Systems. Es kommt des weiteren zu Hautstörungen und Hypertrichose, Wachstumsstillstand bei Kindern und psychischen Veränderungen.

Die Therapie liegt in einer Bestrahlung (Hochvoltbestrahlung mit 50Gy oder Protonenbestrahlung mit 100Gy) oder einer operativen Adenomentfernung.

### **1.5.2 Pathogenese**

Definitionsgemäß sind Hypophysenadenome nichtmetastasierende Tumoren mit zellulärem Ursprung aus der Adenohypophyse. In der Pathogenese der Adenome werden zwei Entstehungswege diskutiert. Zum einen ist das die hormonelle Stimulation und zum anderen sind das intrinsische Defekte in der Hypophyse (Asa u. Ezat 1998). Man weiß unter anderem, daß die Tumoren im Hypophysenvorderlappen monoklonalen Ursprungs sind und eine exzessive hypophysäre Stimulation begünstigend auf die Entwicklung eines Tumors wirkt (Renner et al. 1994). Chromosomale Aberration und Imbalance sowie Neumutationen, so zum Beispiel am MEN-1 Gen, am LOH Gen , am FGF-2 und FGF-4 Gen sind vielfältig beschrieben worden, genauso wie Infektionen als Faktor für eine Tumorgenese bekannt sind (Asa et al. 1998, Asa et al. 2001, Melmed 2003). Dagegen waren bekannte Mutationen anderer humaner Malignome in nur einer sehr kleinen Zahl von Hypophysenadenomen gefunden worden (Asa und Ezat 1998).

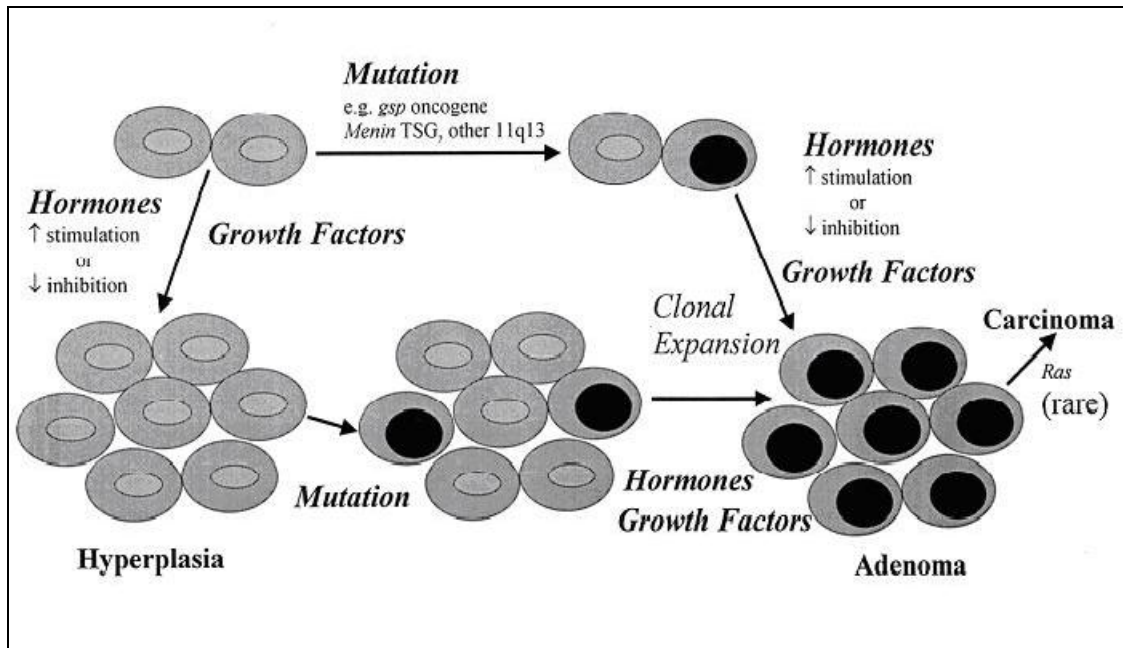


Abbildung 4: Tumorgenese-Modell der Hypophyse

(Asa und Ezat 1998) In der Abbildung sind beide Entstehungswege beschrieben. Der obere Weg zeigt einen intrinsischen Defekt, der zur Tumorentstehung führt (Zellen mit schwarzem Kern). Der untere Weg beschreibt die Tumorentstehung aufgrund einer hormonellen Stimulation.

Veränderungen in der intratumoralen Expression von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Neuropeptiden sowie deren Rezeptoren deuten darauf hin, daß diese Substanzen als Tumorprogressionsfaktoren von Bedeutung sind. Meist sind Veränderungen (Verlust eines inhibitorischen, parakrinen Regelkreises oder Überexpression stimulierender intrahypophysärer Faktoren) der intrinsischen Wachstumsfaktoren/Rezeptoren eine Folge der intratumoralen Transformation, tragen dann aber zum Teil in erheblichem Umfang zur Pathophysiologie und Progression von Hypophysentumoren bei. Es wird vermutet, daß auch IL-6 ein Progressionsfaktor für Hypophysenadenome ist, da es, im Unterschied zu seiner inhibierenden Wirkung auf gesunde hormonproduzierenden Zellen des HVL, die Proliferation von Tumorzellen stimuliert (Hanisch et al. 2000).

Dabei sind die FS-Zellen im Tumorgewebe nicht die IL-6 Donatoren (bis auf wenige Ausnahmen ist der Tumor frei von FS-Zellen) sondern es sind die Tumorzellen selbst.

## 1.6 Fragestellung und Zielstellung der Dissertation

Interleukin-6 ist ein Vertreter der Cytokinfamilie. Er wirkt als colony stimulating-, beziehungsweise als Wachstumsfaktor für verschiedene Zelltypen. Seine Synthese, und Freisetzung erfolgt überwiegend in aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten sowie Endothelzellen. Während hormonproduzierende Zellen der normalen menschlichen Hypophyse kein IL-6 bilden, wurde im Unterschied dazu beobachtet, daß tumoröse Hypophysenzellen IL-6 synthetisieren und freisetzen (Velkeniers et al. 1994, Rezai et al. 1994).

Für die vorliegende Arbeit leitete sich daraus ab, diesen Befund zunächst zu verifizieren und IL-6 in Zellüberständen von standardisierten Zellkulturen humaner hypophysärer Vorderlappentumoren, unter Ausschluß eventuell anderer IL-6-Donorzellen, qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

Weiter sollte nach Einflußfaktoren auf das IL-6 Sekretionsverhalten der Tumorzellkulturen gesucht werden. Unter diesem Aspekt wurden verschiedene Wachstumsfaktoren (IGF-1, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) und das Peptid PACAP, des weiteren Medikamente aus dem Arsenal der Hypophysenadenomtherapie (Bromocriptin, Octreotid und Dexamethason) sowie das Steroidhormon Estradiol untersucht (Melmed et al. 1998).

Im dritten Teil der Arbeit sollte die Wirkung von artifiziell zugesetztem IL-6 auf die Hormonproduktion der Adenome am Beispiel von Wachstumshormon produzierenden Tumorzellkulturen geprüft werden. Das Ergebnis war mit einer parallel durchgeführten Untersuchung (Páez Pereda et al. 2000) über IL-6 und das Sekretionsverhalten von ACTH produzierenden Adenomzellkulturen zu vergleichen.



## 2 Methodik

### 2.1 Material

Die für die vorliegenden Untersuchungen genutzten Tumoren sind aus vier verschiedenen Neurochirurgischen Kliniken in Italien und Deutschland eingesandt worden. Für die Materialbereitstellung war eine geänderte Operationstechnik zur Gewinnung eines möglichst kompakten Gewebestückes aus dem Zentrum des Tumors notwendig, was von den jeweiligen Chirurgen konsequent eingehalten worden ist.

Die beteiligten Kliniken waren:

- Klinikum Großhadern / München
- Hospitale San Raffaele / Mailand (Italien)
- Klinikum Villingen-Schwenningen
- Klinikum Freiburg

Von allen Untersuchungsmaterialien liegen die Patienten-Klarden vor. Die Diagnose wurde jeweils nicht nur durch deren klinische Symptomatik, sondern auch durch den histopathologischen Befund sowie Laborergebnisse gesichert.

Die Zellaufbereitung und Kultivierung ist unter 2.3.1. beschrieben.

Tabelle 1: Für die Untersuchung verwendete Tumoren

TUMOR	BEZEICHNUNG	ART	GESCHL.	GEB.-JAHR	KLINIK
TU 548	AK0/1	SOMATOTROP	W	1955	München
TU 553	AK0/2	SOMATOTROP	M	1966	Mailand
TU 554	AK0/4	SOMATOTROP	M	1979	Mailand
TU 555	AK0/3	SOMATOTROP	W	1946	Mailand
TU 559	AK 1	SOMATOTROP	W	1963	Mailand
TU 564	AK 2	SOMATOTROP	M	1969	München

<b>TUMOR</b>	<b>BEZEICHNUNG</b>	<b>ART</b>	<b>GESCHL.</b>	<b>GEB.- JAHR</b>	<b>KLINIK</b>
TU 572	AK 3	SOMATOTROP	W	1933	Mailand
TU 575	AK 4	SOMATOTROP	M	1934	Mailand
TU 581	AK 5	SOMATOTROP	M	1970	Mailand
TU 588	AK 6	SOMATOTROP	M	1975	Mailand
TU 590	AK 7	SOMATOTROP	M	1943	Vill.-Schw.
TU 615	AK 8	SOMATOTROP	W	1950	Mailand
TU 624	AK2/1	SOMATOTROP	W	1940	Mailand
TU 636	AK 9	SOMATOTROP	W	1929	München
TU 640	AK 10	SOMATOTROP	W	1932	München
TU 670	AK 11	SOMATOTROP	W	1947	Mailand
TU 725	AK2/2	SOMATOTROP	M	1970	München
TU 563	CU 1	CUSHING	W	1974	München
TU 589	CU 2	CUSHING	W	1976	Mailand
TU 631	CU 3	CUSHING	W	1966	München
TU 655	CU 4	CUSHING	W	1945	Mailand
TU 664	CU 5	CUSHING	W	1961	Mailand
TU 671	CU 6	CUSHING	M	1954	Mailand
TU 682	CU 7	CUSHING	W	1955	Mailand
TU 551	HI 0/1	HORMON INAKTIV	W	1963	Mailand
TU 558	HI 1	HORMON INAKTIV	M	1945	Mailand
TU 566	HI 2	HORMON INAKTIV	M	1922	München
TU 574	HI 3	HORMON INAKTIV	M	1938	München
TU 582	HI 4	HORMON INAKTIV	W	1967	Mailand
TU 585	HI 5	HORMON INAKTIV	M	1949	Mailand
TU 586	HI 6	HORMON INAKTIV	W	1934	München
TU 587	HI 7	HORMON INAKTIV	W	1961	Mailand

<b>TUMOR</b>	<b>BEZEICHNUNG</b>	<b>ART</b>	<b>GESCHL.</b>	<b>GEB.- JAHR</b>	<b>KLINIK</b>
TU 601	HI 8	HORMON INAKTIV	M	1946	München
TU 611	HI 9	HORMON INAKTIV	W	1926	Vill.-Schw.
TU 612	HI 10	HORMON INAKTIV	M	1940	Mailand
TU 621	HI 11	HORMON INAKTIV	M	1924	Vill.-Schw.
TU 625	HI 12	HORMON INAKTIV	M	1957	Mailand
TU 637	HI 13	HORMON INAKTIV	M	1946	München
TU 645	HI 14	HORMON INAKTIV	W	1965	Mailand
TU 686	HI 15	HORMON INAKTIV	M	1956	München
TU 571	PR 1	PROLACTINOM	W	1949	Mailand
TU 591	PR 2	PROLACTINOM	W	1955	München

Unmittelbar nach der Extraktion wurden die Tumoren entweder persönlich abgeholt, oder mittels Expreßdienst in das Labor versendet.

Für den Transport wurden mit Nährlösung gefüllte Plastikflaschen der Marke Nunc genutzt. Ein Zusammenhang zwischen Transportzeit und Basalsekretion oder Reaktivität der Zellkulturen gegenüber Stimulatoren war nicht zu beobachten.

Von den 42 eingesandten Tumoren konnte jeweils die Basalsekretion an IL-6 bestimmt werden. An 34 Tumorzellkulturen wurden des weiteren Stimulationsversuche durchgeführt.

## 2.2 Geräte, Medien und Lösungen

### Geräte

Sterile Arbeitsbank	Laminar Flow Typ UVF 6.18 S, BDk Luft- und Reinraumtechnik GmbH Sonnenbühl, Genkingen, D
Brutschrank	Cytoperm 8080, Heraeus GmbH, Hanau, D
Coulter Counter ZF	Coulter Electronics Ltd., Dunstable, GB
Gewebekulturplatten, Pipetten	Greiner GmbH Frickenhausen, D
Kühlzentrifuge	Sepatech Verifuge 3.2 RS, Heraeus, Osterode, D
Mikroskop	Inverses Mikroskop IMT 2, Olympus, Hamburg, D
Photometer	Ultrospec II, Pharmacia LKB, Freiburg, D
Pipetten	Costar, Cambridge, Ma, U.S.A.
Präzisionswaage	1601 MP 8, Sartorius, Göttingen, D
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Wasserbäder	Köttermann Labortechnik, Ütze-Hänigsen, D
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten	Falcon, Heidelberg, D
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg, D

## Medien und Lösungen

Amphotericin B	Biochrom, Berlin, D
Bromphenolblau	Merck AG, Darmstadt, D
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck AG, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck AG, Darmstadt, D
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Flow Laboratories, Meckenheim, D
DNase II	Sigma, St. Louis, Mo, USA
Essigsäure	Merck AG, Darmstadt, D
Ethanol	Merck AG, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco Europe, Karlsruhe, D
D-Glucose	Merck AG, Darmstadt, D
Glutamin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Insulin Actrapid HM	Novo, Mainz, D
Jod 125	Amersham, Braunschweig, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck AG, Darmstadt, D
Methylenblau	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka AG, Buchs, Schweiz

Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck AG, Darmstadt, D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Natronlauge (NaOH)	Merck AG, Darmstadt, D
Nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin, D
PBS (Phosphat buffered saline)	Gibco Europe, Karlsruhe, D
Penizillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Selen	Paesel, Frankfurt/Main, D
Triiodthyronin (T <sub>3</sub> )	Sigma, St. Louis, Mo, USA
Transferrin	Sigma, St. Louis, Mo, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck AG, Darmstadt, D
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	Merck AG, Darmstadt, D
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, D
Trypsininhibitor	Sigma, St. Louis, Mo, USA
Dexamethason	Sigma, St. Louis, Mo, USA
hu IL-6	R&D Systems, Wiesbaden, D
PACAP 27	Bachem, Heidelberg, D
PACAP 38	Bachem, Heidelberg, D
Estradiol	Sigma, St. Louis, Mo, USA
IGF-1	R&D Systems, Wiesbaden, D
Bromocriptin	Biotrend, Köln, D
TGF $\alpha$	R&D Systems, Wiesbaden, D

TGFβ

R&D Systems, Wiesbaden, D

Octreotid

Biotrend, Köln, D

Medium für die Zellkulturen:

Minimal Essential Medium (MEM) mit D-Valin anstatt L-Valin

2,2g/l Glutamin

2,5mg/l Glutamin

10<sup>5</sup>U/l Penizillin/Streptomycin

5mg/l Insulin

5mg/l Transferrin

20µg/l Selen

30pM T<sub>3</sub>

HDB-Puffer:

137mM NaCl

5mM KCL

0,7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

10mM D-Glucose

15mM HEPES (pH 7,3)

2,5mg/l Amphotericin B

10<sup>5</sup>U/l Penizillin/Streptomycin

Verdauungslösung:

HDB-Puffer

4g/l BSA

4g/l Kollagenase

10mg/l DNase II

0,1g/l Trypsininhibitor

1g/l Hyaluronidase

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Zellkultur**

Das humane Adenomgewebe wurde freundlicherweise von den Neurochirurgischen Abteilungen der Kliniken Großhadern, Mailand, Villingen-Schwenningen und Freiburg zur Verfügung gestellt. Die Tumoren waren mittels transsphenoidaler Resektion entfernt und sofort für die Zellkultur vorbereitet worden. Parallel ging ein Teil des OP-Präparates in die Neuropathologie.

Das Hypophysenadenomgewebe lagerte während des Transports in Medium. Nach Ankunft im Labor war eine unverzügliche Verarbeitung garantiert.

Stichprobenweise unterlagen die eingegangenen Tumoren einer Untersuchung auf Verschmutzung mit Normalgewebe. Zum Ausschluß von Normalgewebe benutzte das Labor immunohistochemische Nachweismethoden, die durchgehend die Reinheit des eingesandten Tumormaterials bestätigten. Zur Testung kamen pit-1 (GH, PRL, TSH), Coup-TF1 (ACTH) und SF-1 (LH, FSH).

Die Anlage einer Zellkultur verlief nach einem laborinternen Standard. Die Präparate mußten 4x in HDB-Puffer gewaschen und danach in silikonisierten Petrischalen mit dem Skalpell in kleine Stücke zerschnitten werden. Anschließend wurden die Hypophysenadenome bei 37°C auf einem temperierten Schüttler in Verdauungslösung für 2 Stunden inkubiert. Um die enzymatische Dispersion mechanisch zu beschleunigen, wurde die Suspension mehrmals während dieses Vorgangs in silikonisierten Pipetten aufgezogen. Die Menge der verwendeten Verdauungslösung bemaß sich nach der Größe des vorliegenden Tumors. Die dispergierten Zellen mußten insgesamt 3 x 4 Minuten bei 1200 Upm zentrifugiert und jeweils in Medium resuspendiert werden. Nach dem letzten Resuspendierungsvorgang galt es die Zellen anzufärben und mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop auszuzählen. Zur Zellzahlbestimmung wurden 50µl der Zellsuspension zu 50 µl Acridinorange/Ethidiumbromid Färbelösung gegeben, kurz inkubiert und die Zellen unter dem Mikroskop im UV-Licht mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die toten Zellen zeigten sich im UV-Licht rot, während die vitalen Zellen grün fluoreszierten.



Berechnung der Zellzahl:

Anzahl der Zellen/Großquadrat x ml des Resuspensionsmediums x 20.000

Abhängig von der erlangten Zellzahl wurde die Zelllösung verdünnt, in Multiwellplatten ausplattiert und bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt für 3-4 Tage inkubiert. Die Dichte der ausgesäten Zellen betrug 100 000 Zellen pro Well. Nachdem die Zellkulturen mikroskopisch ein konfluentes Wachstum zeigten, wurden die in Kapitel 2.3.2. beschriebenen Experimente durchgeführt.

### **2.3.2 Sekretionsstudien**

Vor Stimulation der Zellen mußte das FCS-haltige Nährmedium gegen FCS-freies Medium ausgetauscht und die Zellen in diesem Medium für weitere 24 Stunden inkubiert werden. Die Zellstimulation erfolgte mit verschiedenen Substanzen, die unmittelbar vor Gebrauch in Kulturmedium frisch verdünnt worden sind, oder es wurde mit substanzfreiem Kulturmedium zur Basalsekretionbestimmung stimuliert. Aus den zur Stimulierung benutzten lyophilisierten Substanzen war jeweils eine Stammlösung in PBS oder in bidestilliertem Wasser hergestellt, in Aliquoten bei -20°C eingefroren und unmittelbar vor Stimulation mit Kulturmedium frisch verdünnt worden. Die Konzentrationen der jeweiligen Substanzen lagen alle in Bereichen, die nach dem Studium vergleichbarer Experimente ausgewählt worden waren. Es ist davon auszugehen, daß in den Zell-zu-Zell Zwischenräumen deutlich höhere Konzentrationen auftreten, als (aufgrund von Verdünnungseffekten) im Plasma zu messen ist. Unter dieser Berücksichtigung lagen die Konzentrationen der getesteten Substanzen nicht in unphysiologischen Extrembereichen. Die kultivierten Adenomzellen galt es im konfluenten Stadium zu stimulieren, cirka 3-4 Tage nach der Aussaat der Zellen. Die Inkubationsdauer wurde ab dem Zeitpunkt der Zugabe des Stimulus zur Zellkultur gerechnet und lag bei 24 Stunden. Für Dosis-Wirkungs-Versuche lag die Stimulationszeit mit den jeweiligen Substanzen ebenfalls bei 24 Stunden. Die Zeitkinetik entspricht laborinternen Standards. Diese beruhen auf Erfahrungswerten, die durch die langjährige Arbeit an Rattenhypophysen, standardisierten Hypophysenzelllinien und Hypophysenadenomen gewonnen waren. Die Überstände der stimulierten Zellen wurden nach 24-stündiger Stimulation

abgenommen und bis zur Bestimmung von IL-6 und GH in Eppendorfgefäßen bei -20°C aufbewahrt.

### **2.3.3 ELISA für die IL-6 Bestimmung**

Der „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) ist eine immunologische Methode zur Quantifizierung von Antigenkonzentrationen. Dabei besitzen ELISA eine außerordentliche Empfindlichkeit und Spezifität und sind somit Standardverfahren für die Forschung und laborklinische Anwendung. Es gibt verschiedene Formen des ELISA, wie zum Beispiel den kompetitiven ELISA oder den Sandwich-ELISA. Untersuchungen zur Bestimmung von löslichen Bestandteilen in Zellkulturüberständen von IL-6 wurden mittels selbstgefertigten ELISA und den Antikörpern der Firma R&D Systems, Minneapolis, durchgeführt. Diese Kits basieren auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Dabei wird beim jeweiligen Testsystem eine definierte Menge eines Antikörpers auf einen festen Träger (Mikrotiterplatte) adsorbiert. Eine bestimmte Menge der Zellkulturüberstände sowie der Standard wurden in die vorbeschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Nach der Inkubationsphase konnte ungebundenes Antigen ausgewaschen und eine zweite Population eines enzymmarkierten Indikatorantikörpers zur Bindung zugesetzt werden. Je mehr Antigen in der Test- oder Standardlösung vorhanden ist, desto mehr wird der enzymmarkierte zweite Antikörper gebunden. Die Farbabsorption des gebundenen Enzymkonjugats wurde im Mikroplattenlesegerät bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Die Resultate der Standardlösungen dienten dazu, eine Bindungskurve für den zweiten Antikörper als Funktion der Antigenkonzentration zu konstruieren, aus der die Menge des Antigens in der Testlösung abgeleitet werden konnte. Die untere relevante Meßgenauigkeit (Nachweisgrenze) war mit 3,1pg/ml definiert (>10% Präzision).

### **2.3.4 RIA für die Wachstumshormon (GH) Bestimmung**

Der Radioimmunoassay ist eine radioimmunologische Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen (ng-Bereich). Es können dabei zum Beispiel Enzyme, Serumeiweißkörper wie auch Hormone nachgewiesen werden. Das Prinzip des Radioimmunoassay war 1957 von Berson & Yalow (1957) entdeckt worden.

Die Methode beruht auf der Verdrängung einer definierten Menge radioaktiv markierten Antigens aus der Bindung an einen ebenfalls in definierter Menge zugesetzten spezifischen Antikörper durch die unbekannte Menge des zu bestimmenden nicht markierten Antigens. Gleichzeitig wird eine Eichkurve erstellt, indem definierte Mengen nicht markierten Antigens mit dem markierten um die Bindung am spezifischen Antikörper konkurrieren. Anhand der in der Eichkurve enthaltenen prozentualen Verdrängung kann dann auf die zu bestimmende Größe rückgeschlossen werden.

Für die Bestimmung des GH wurde ein etablierter Radioimmunoassay der Firma DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim verwendet.

Die Messung des GH erfolgte direkt, ohne vorherige Extraktion im Kulturmedium.

Zu 100 µl Probe (beziehungsweise Standard) wurden 100 µl Antikörper I und 100 µl Tracer gegeben und 24 Stunden bei 4°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Antikörper II wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend galt es die Antigen-Antikörper-Komplexe zweimal in Anwesenheit der PEG-Lösung auszufällen und durch Zentrifugieren bei 4000 Upm (10 Minuten) abzutrennen. Es blieb das Präzipitat zurück, dessen Aktivität im Gamma-Counter über 60 Sekunden gemessen wurde. Die GH-Konzentration der Proben und Kontrollen konnten anhand der Standardkurve ermittelt werden.

### **2.3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die Sekretionsmessungen wurden bei identischen Inkubationsbedingungen für mindestens drei Wells in der Zellkulturplatte bestimmt und daraus der Mittelwert ermittelt.

Bei den Sekretionsmessungen wurden die Diagramme als Prozentsatz zur Basalsekretion aufgetragen. Dafür mußten mindestens drei Wells mit substanzfreiem Medium behandelt und nach Inkubation aus diesen Werten der Mittelwert bestimmt werden. Dieser gewonnene Wert entspricht der Basalsekretion (=100%).

In den Abbildungen und den Tabellen sind jeweils die Mittelwerte der Bestimmungen und die Standardabweichung dargestellt (MW±SD).

Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der Bestimmungen einer Varianzanalyse (oneway) unterworfen. Die Signifikanz (p-Wert) wurde mit dem Scheffé-Test (ANOVA) bestimmt. Als statistisch relevant wird ein p-Wert kleiner als 0,05 herangezogen (\*\*).

Als weiteres statistisches Analyseverfahren kam die Bestimmung des Bravais-Pearson'schen Korrelationskoeffizienten zur Anwendung. Die herangezogenen Untersuchungsmerkmale waren die Basalsekretion und die jeweilige IL-6 Sekretion nach Testung. Für jede einzelne Stimulationsuntersuchung wurden diese Meßergebnisse zueinander in Verhältnis gesetzt, beziehungsweise wurde deren Maß des Zusammenhanges berechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 IL-6 Basalsekretion kultivierter Hypophysenadenomzellen

Der Mehrzahl der untersuchten Tumorzellpopulationen gemeinsam ist eine meßbare Basalsekretion von IL-6. Dieses Cytokin wird von den Zellen selbst sezerniert. Andere eventuelle IL-6 Produzenten, wie Makrophagen oder FS-Zellen, sind ausgeschlossen (vgl. 2.3.2. Sekretionsstudien).

Die basale IL-6 Sekretion ist in den folgenden Grafiken geordnet nach Tumorart und nach Konzentration dargestellt. Alle IL-6 Konzentrationen sind in pg/ml angegeben.

Die somatotropen Tumoren verzeichneten eine Basalsekretion von unter der Nachweisgrenze (vgl. 2.3.3. ELISA) bis zu mehr als 400 pg/ml IL-6. Man kann jedoch erkennen, daß der überwiegende Teil der untersuchten somatotropen Tumoren eine Basalsekretion von unter 100 pg/ml aufweist.

Tabelle 2: IL-6 Basalsekretion der somatotropen Tumoren

<b>Tumor</b>	<b>IL-6 in pg/ml</b>	
	<b>MW</b>	<b>± SD</b>
AK 4	3,129	0,078
AK 6	5,580	0,004
AK 3	8,853	0,042
AK 11	9,279	1,505
AK 0/1	12,575	1,687
AK 0/2	16,421	0,646
AK 10	49,544	14,469
AK 8	64,308	9,166
AK 9	72,806	19,329
AK 1	83,183	0,141
AK 7	127,500	10,255
AK 0/3	204,402	27,648
AK 2	386,982	7,961
AK 0/4	439,541	7,569
<b>Mittelwert</b>	<b>113,921</b>	<b>7,725</b>

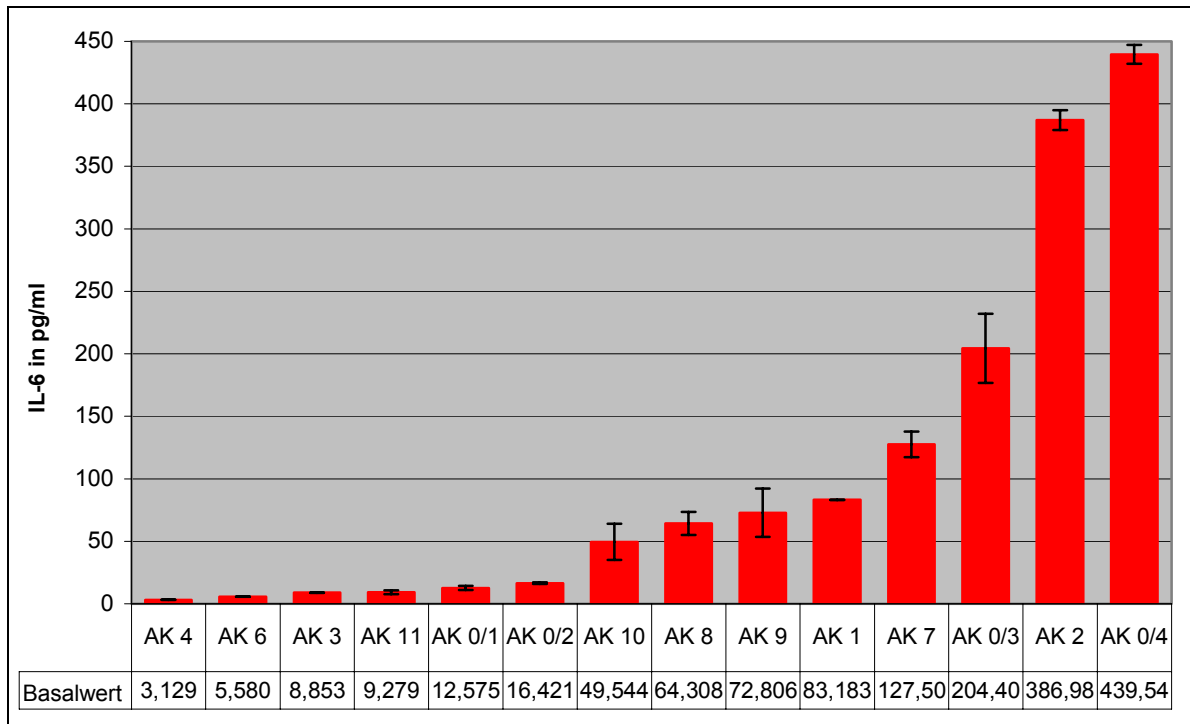


Abbildung 5: IL-6 Basalsekretion der somatotropen Tumoren

Bei den corticotropen Tumoren lag die Basalsekretion bei allen gemessenen Tumoren unter 50 pg/ml. Von den zwei vorhandenen Prolactinomen ist eine IL-6 Sekretion von 100 und die zweite von 4,5pg/ml gemessen worden.

Tabelle 3: IL-6 Basalsekretion der corticotropen Adenome und der Prolactinome

<u>Tumor</u>	<u>IL-6 in pg/ml</u>	
	<u>MW</u>	<u>± SD</u>
PR 1	4,522	2,840
PR 2	112,731	7,421
<b>Mittelwert</b>	<b>58,626</b>	<b>5,130</b>
CU 2	3,745	1,162
CU 4	5,695	1,163
CU 7	7,148	0,315
CU 1	11,385	0,332
CU 5	11,995	1,897
CU 3	17,737	3,960
CU 6	43,431	5,616
<b>Mittelwert</b>	<b>14,448</b>	<b>2,064</b>

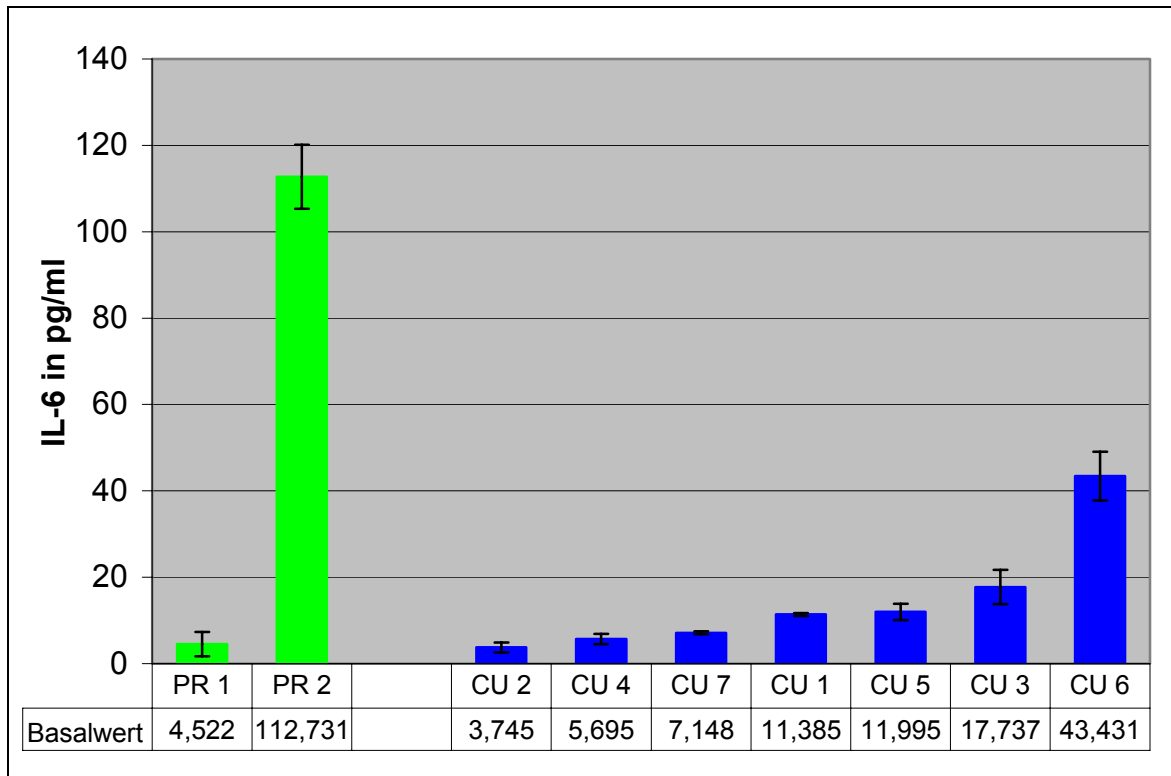


Abbildung 6: IL-6 Basalsekretion der corticotropen Adenome und der Prolactinome

Bei den hormoninaktiven Tumoren war die Basalsekretion in einem Bereich zwischen der Nachweisgrenze und 400pg/ml gelegen. Der überwiegende Teil sezernierte nicht über 100pg/ml IL-6.

Tabelle 4: IL-6 Basalsekretion der hormoninaktiven Tumoren

<u>Tumor</u>	<u>IL-6 in pg/ml</u>	
	<u>MW</u>	<u>± SD</u>
HI 7	3,546	0,302
HI 5	5,024	0,464
HI 15	12,432	0,832
HI 14	15,708	1,363
HI 4	18,791	1,871
HI 1	30,201	2,697
HI 13	40,904	3,951
HI 11	41,460	17,136
HI 0/1	70,295	0,954
HI 2	74,876	33,746
HI 9	81,458	21,646
HI 6	83,145	1,519

<u>Tumor</u>	<u>IL-6 in pg/ml</u>	
	<u>MW</u>	<u>± SD</u>
HI 8	97,922	22,469
HI 10	136,998	14,040
HI 12	214,162	0,897
HI 3	419,558	39,657
<b>Mittelwert</b>	<b>84,155</b>	<b>10,221</b>

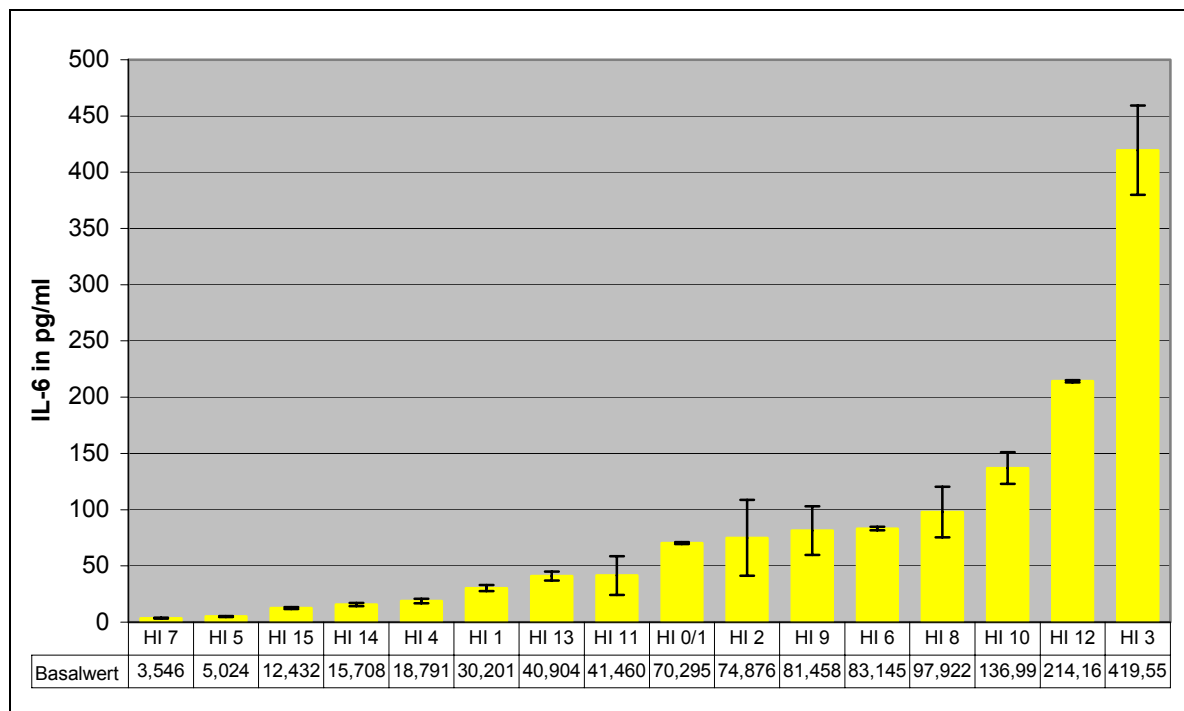


Abbildung 7: IL-6 Basalsekretion der hormoninaktiven Tumoren

### 3.2 IL-6 Sekretion kultivierter Hypophysenadenomzellen

Im zweiten Teil der Untersuchungen galt es die Ansprechbarkeit der Tumorzellen auf verschiedene Einflußfaktoren bezüglich ihrer IL-6 Sekretion zu überprüfen.

Dafür wurden Wachstumsfaktoren, deren Rolle in der Tumorgenese beschrieben ist (D'Abbronzo et al. 1999), sowie einige Pharmaka aus der Hypophysenadenomtherapie ausgewählt (Melmed et al. 1998).

Die getesteten Wachstumsfaktoren waren Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1), Transforming Growth Factor alpha und beta (TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ ) sowie das in der Hypophyse relevante Peptid Pituitary Adenylate Cyclase Activating Proteine (PACAP27 [P-27] und PACAP38 [P-38]).



Von den Pharmaka wurden Bromocriptin (Bromo), Octreotid (SMS) und Dexamethason (Dex) sowie das Steroidhormon Estradiol (E2) ausgewählt.

Das Ansprechen der Tumoren auf Dexamethason wird in 3.3. beschrieben.

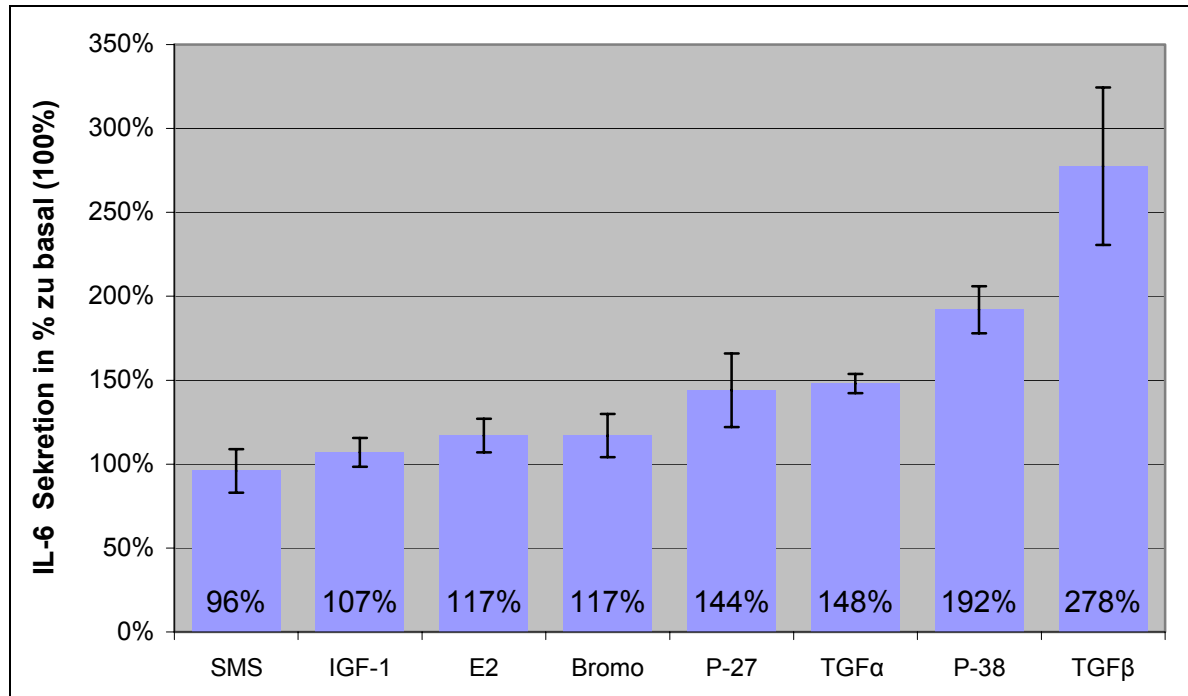


Abbildung 8: Prozentuale Mittelwerte aller IL-6 Sekretionen nach Stimulation  
 MW der IL-6 Sekretionen aller untersuchten Adenomzellkulturen 24 Stunden nach Simulation. Für jede einzelne Untersuchung wurde der jeweilige Korrelationskoeffizient aus der Basalsekretion und der IL-6 Sekretion nach Stimulation ermittelt. Für die Stimulation mit Bromocriptin ließ sich aufgrund der niedrigen Fallzahl kein Korrelationskoeffizient ermitteln.

	SMS	IGF-1	E2	Bromo	P-27	TGF $\alpha$	P-38	TGF $\beta$
Korr.koeff.	0,96	0,36	0,81		0,84	0,85	0,83	0,75

### 3.2.1 Wirkung von Octreotid (SMS)

Die Zellkulturen reagierten auf die Stimulation mit dem in der Akromegalietherapie eingesetzten Somatostatinanalogon Octreotid (Jansson et al. 1998) sehr unterschiedlich. Ihre IL-6 Sekretion schwankte zwischen einer Inhibition auf 70% und einer deutlichen Stimulation auf fast 180% ihrer Basalsekretion. Im Mittel lag die Reaktion aller untersuchten Tumoren bei 96%, so daß von keiner einheitlichen Antwort auf das Medikament auszugehen ist. Auch die Zellkulturen somatotroper Tumoren reagierten nicht in eine Richtung.

Die drei ACTH produzierenden Kulturen (blau) zeigten dagegen einheitlich eine Inhibition.

Tabelle 5: IL-6 Sekretion nach Testung mit Octreotid

TUMOR	basal		SMS 10 <sup>-7</sup> M			
	IL-6 in pg/ml		IL-6 in pg/ml		IL-6 in % zu basal (100%)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
PR 2	112,731	7,421	129,660	7,392	115%	6%
HI 4	18,791	1,871	24,137	1,599	128%	7%
HI 5	5,024	0,464	4,411	0,301	88%	7%
HI 7	3,546	0,302	3,247	0,254	92%	8%
CU 4	5,695	1,163	3,982	0,272	70%	7%
CU 5	11,995	1,897	7,515	1,939	63%	26%
CU 6	43,431	5,616	19,757	4,591	45%	23%
AK 1	83,183	0,141	102,783	6,311	124%	6%
AK 3	8,853	0,042	8,137	3,074	92%	38%
AK 6	5,580	0,004	3,948	0,353	71%	9%
AK 7	127,500	10,255	227,205	6,410	178%	3%
AK 11	9,279	1,505	7,901	1,766	85%	22%

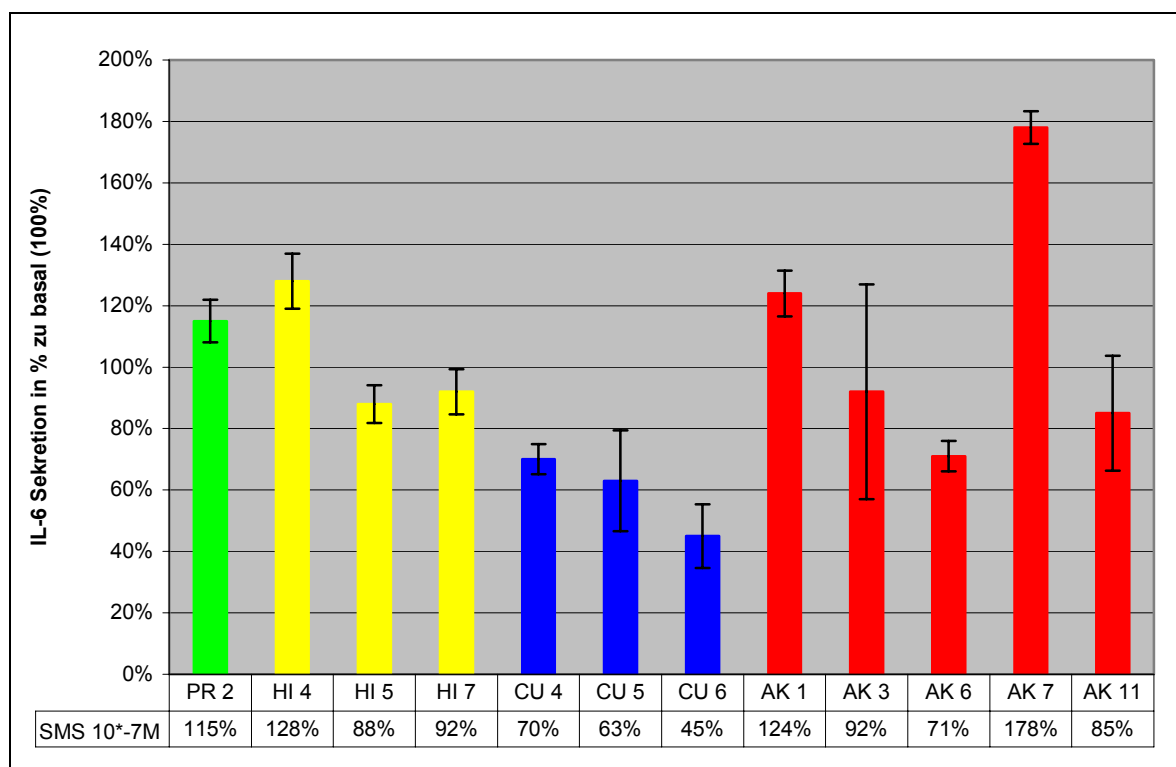


Abbildung 9: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Octreotid 10<sup>-7</sup>M

Zur besseren Veranschaulichung wurde das Stimulationsexperiment farblich nach Tumorart sortiert. Die erwähnten Cushingadenome sind blau dargestellt.

Ein Zusammenhang zwischen Geschlecht, Alter des Patienten oder behandelnder Klinik und dem Stimulationsergebnis konnte nicht gefunden werden.

Die statistische Überprüfung der Meßergebnisse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,96.

### 3.2.2 Wirkung von IGF-1

Aufgrund der unterschiedlichen Gewebegröße und damit der unterschiedlich hohen Gesamtzellzahl, die pro Tumor zur Verfügung stand, konnten nicht alle Stimulationsexperimente an allen Zellkulturen durchgeführt werden. Die IGF-1 Testung fand jedoch an dem größten Teil der Kulturen statt. Die Zellkulturen wurden jeweils 24 Stunden mit 20ng/ml IGF-1 inkubiert und die IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand (Abgabe an die Umgebung) bestimmt.

Tabelle 6: IL-6 Sekretion nach Testung mit IGF-1

<b>TUMOR</b>	<b>basal</b>		<b>IGF-1 20ng/ml</b>			
	<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in % zu basal (100%)</b>	
	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>
<b>PR 2</b>	112,731	7,421	133,380	18,303	118%	14%
<b>HI 4</b>	18,791	1,871	18,294	2,162	97%	12%
<b>HI 5</b>	5,024	0,464	4,147	0,037	83%	1%
<b>HI 6</b>	83,145	1,519	124,091	4,753	149%	4%
<b>HI 7</b>	3,546	0,302	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>HI 13</b>	40,904	3,951	71,269	2,594	174%	4%
<b>HI 14</b>	15,708	1,363	16,340	0,732	104%	4%
<b>CU 4</b>	5,695	1,163	4,486	0,046	79%	1%
<b>CU 5</b>	11,995	1,897	8,576	1,414	71%	16%
<b>CU 6</b>	43,431	5,616	39,530	4,331	91%	11%
<b>AK 1</b>	83,183	0,141	64,872	8,302	78%	13%
<b>AK 2</b>	386,982	7,961	67,197	7,624	17%	11%
<b>AK 3</b>	8,853	0,042	5,586	0,374	63%	7%
<b>AK 4</b>	3,129	0,078	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>AK 6</b>	5,580	0,004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>AK 7</b>	127,500	10,255	176,692	24,012	139%	14%
<b>AK 8</b>	64,308	9,166	189,523	24,688	295%	13%
<b>AK 10</b>	49,544	14,469	21,388	1,684	43%	8%

Eine Gliederung der Meßergebnisse nach Geschlecht und Altersgruppe der Patienten sowie nach der behandelnden Klinik ergab keine Gruppenbildung.

Wenn man die prozentuale Veränderung der IL-6 Sekretion nach der Stimulation mit IGF-1 zur Basalsekretion (=100%) aller untersuchten Tumoren aufzeichnet, ergibt sich folgendes Bild:

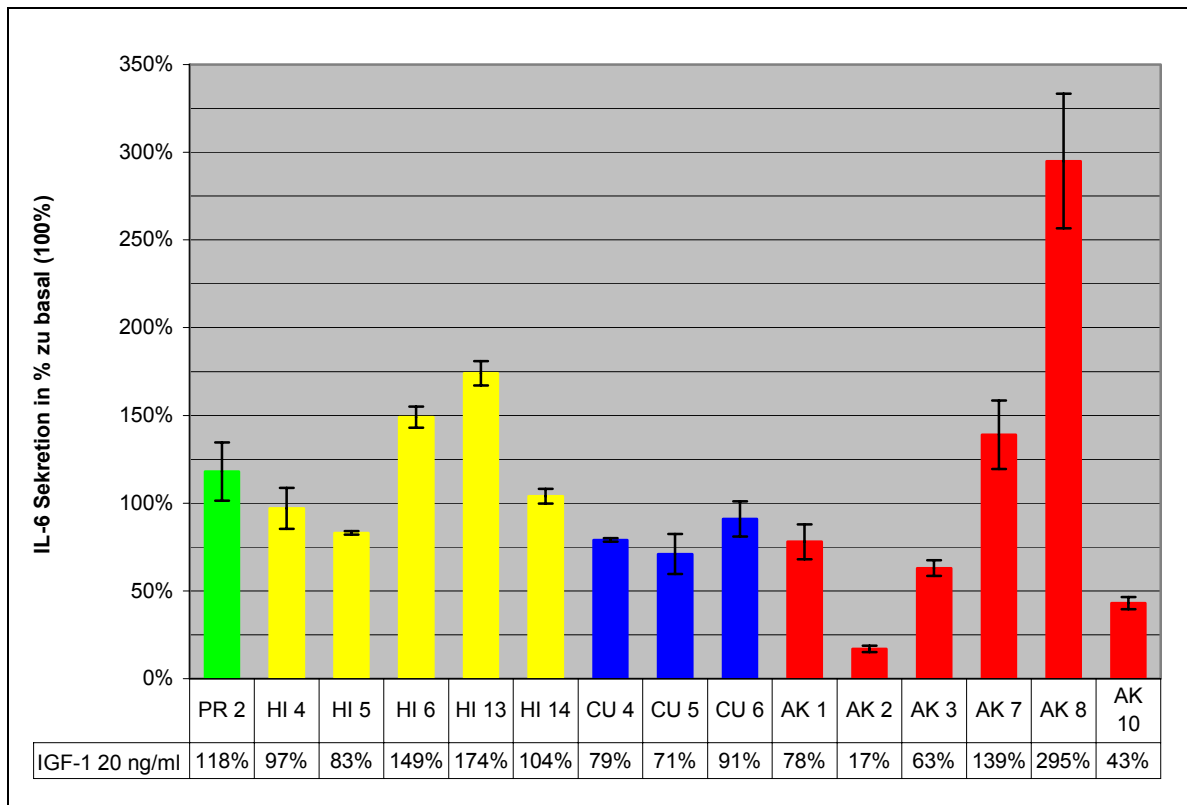


Abbildung 10: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit IGF-1 20ng/ml

Der Mittelwert der prozentualen Veränderung zum Basalwert beträgt 107%, bei einem Korrelationskoeffizienten der Datenreihen von 0,36.

Wenn man die jeweils obersten und untersten Wertepaare (AK8 und AK2) herausrechnet, erhält man einen Korrelationskoeffizienten von 0,94 und einen Mittelwert von 99%, was in der Summe auf keine tendenzielle Reaktion der Tumoren bei Stimulation mit IGF-1 hindeutet.

An insgesamt 3 Zellkulturen somatotroper Tumoren sind des weiteren Dose Response Versuche durchgeführt worden. Die Testung erfolgte mit 0,2ng/ml, 2ng/ml und 20ng/ml IGF-1. Die Darstellung der sezernierten IL-6 Konzentrationen erfolgt in pg/ml.

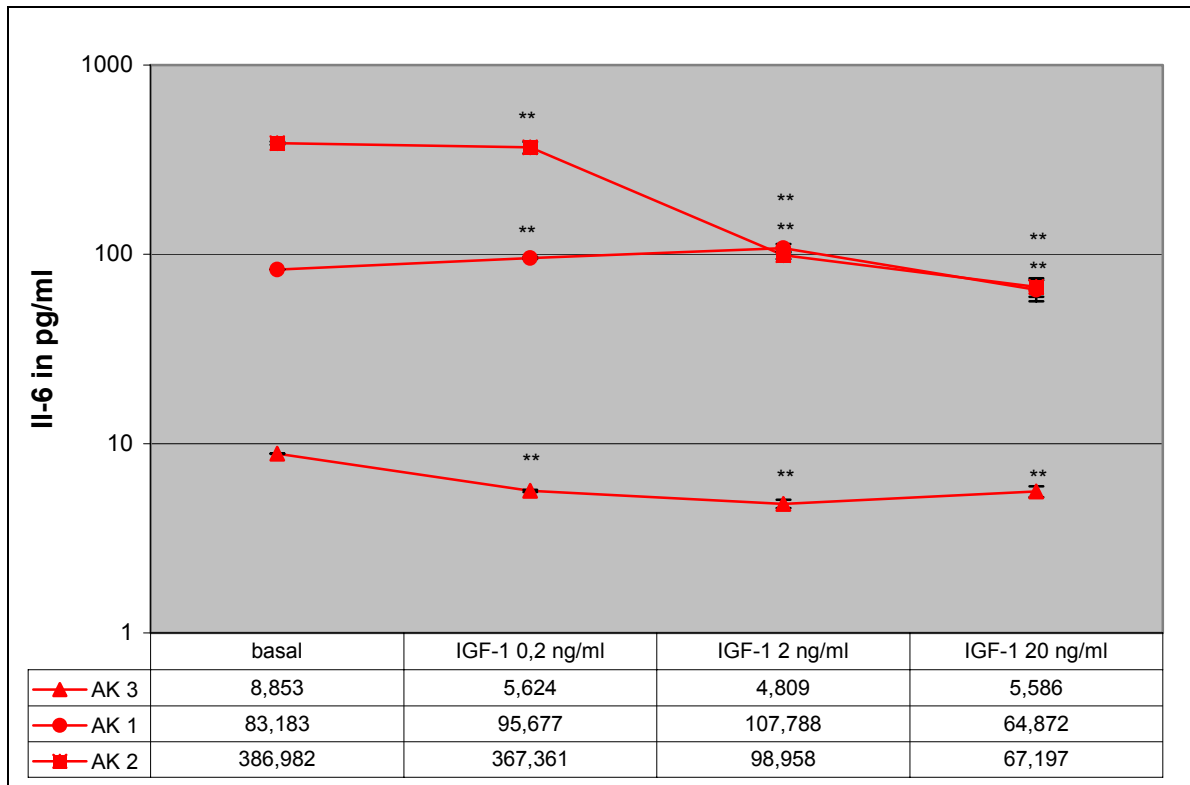


Abbildung 11: Dose Response unter IGF-1

An drei somatotropen Tumoren ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung untersucht worden. Getestet wurde die Wirkung von IGF-1 in den Konzentrationen 0,2, 2 und 20 ng/ml auf die IL-6 Sekretion der Adenomzellkulturen.

### 3.2.3 Wirkung von Estradiol

In den Stimulationsversuchen wurde auch das Östrogenderivat Estradiol getestet. Leider standen für die Experimente keine Cushingadenome zur Verfügung und auch mit den besonders interessanten Prolactinomen war nur eine Testung möglich.

Tabelle 7: IL-6 Sekretion nach Testung mit Estradiol

TUMOR	basal		E2 10 <sup>-7</sup> M			
	IL-6 in pg/ml		IL-6 in pg/ml		IL-6 in % zu basal (100%)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
PR 2	112,731	7,421	266,398	9,209	236%	3%
HI 5	5,024	0,464	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HI 6	83,145	1,519	106,700	9,089	128%	9%
HI 7	3,546	0,302	3,202	0,042	90%	1%
HI 8	97,922	22,469	97,036	0,746	99%	1%
HI 9	81,458	21,646	70,934	2,263	87%	3%
HI 10	136,998	14,040	144,557	31,362	106%	22%
HI 11	41,460	17,136	44,111	9,137	106%	21%
HI 12	214,162	0,897	204,892	9,569	96%	5%
HI 14	15,708	1,363	16,726	2,202	106%	13%

TUMOR	basal		E2 10 <sup>-7</sup> M			
	IL-6 in pg/ml		IL-6 in pg/ml		IL-6 in % zu basal (100%)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
AK 4	3,129	0,078	4,554	0,042	146%	1%
AK 6	5,580	0,004	4,755	0,361	85%	8%
AK 7	127,500	10,255	80,694	0,793	63%	1%
AK 8	64,308	9,166	112,314	25,663	175%	23%

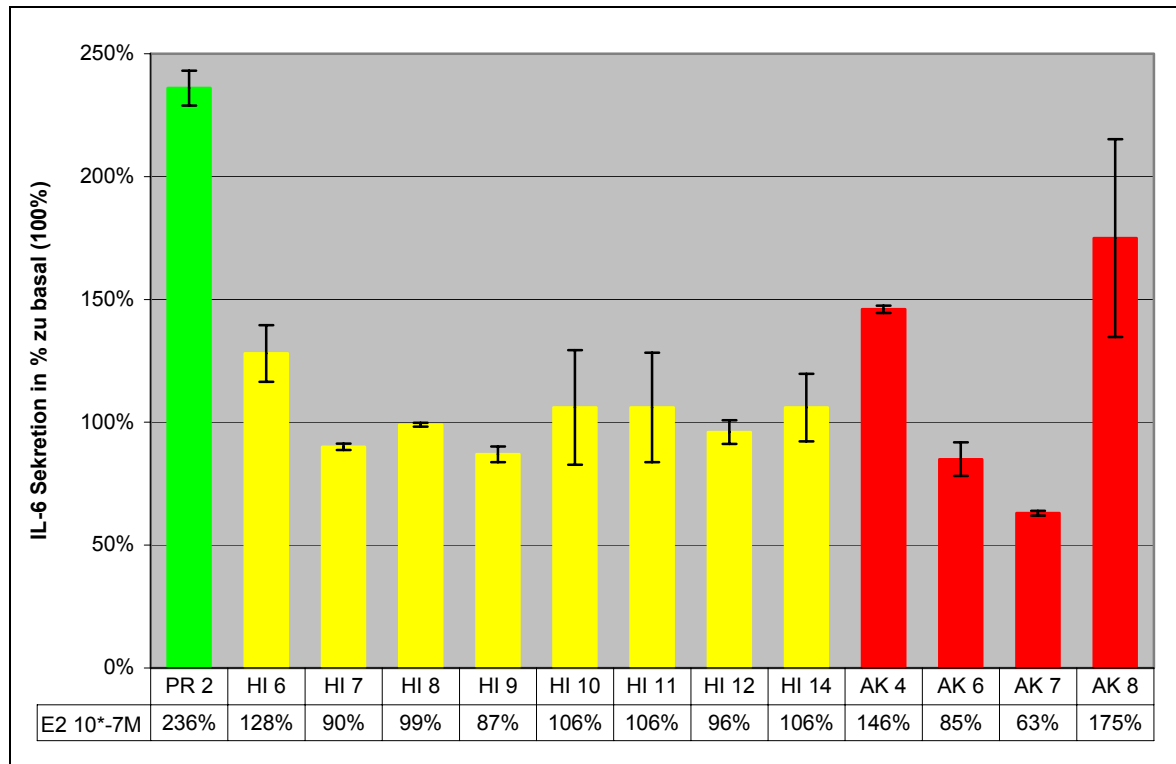


Abbildung 12: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Estradiol 10<sup>-7</sup>M

Im Mittel aller untersuchten Tumoren kam es nach einer Stimulation mit 10<sup>-7</sup>M Estradiol zu einem Anstieg der IL-6 Sekretion auf 117% gegenüber ihrer Basalsekretion. Der Korrelationskoeffizient beträgt dabei 0,81.

Wenn man wieder die oberen und unteren Extreme (PR2 und AK7) herausrechnet, kommt man auf einen Sekretionsanstieg von 111%, bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,97.

Auch hier ergab die Sortierung der Meßergebnisse nach Alter, Geschlecht der Patienten sowie der behandelnden Klinik keine Gruppenbildung.

Von zwei Tumoren konnte eine Dosisabhängigkeitsstudie durchgeführt werden. Zu beachten ist die logarithmische Konzentrationsachse. Die Konzentrationen von IL-6 sind in pg/ml angegeben und das Estradiol in mol/l (Molar).

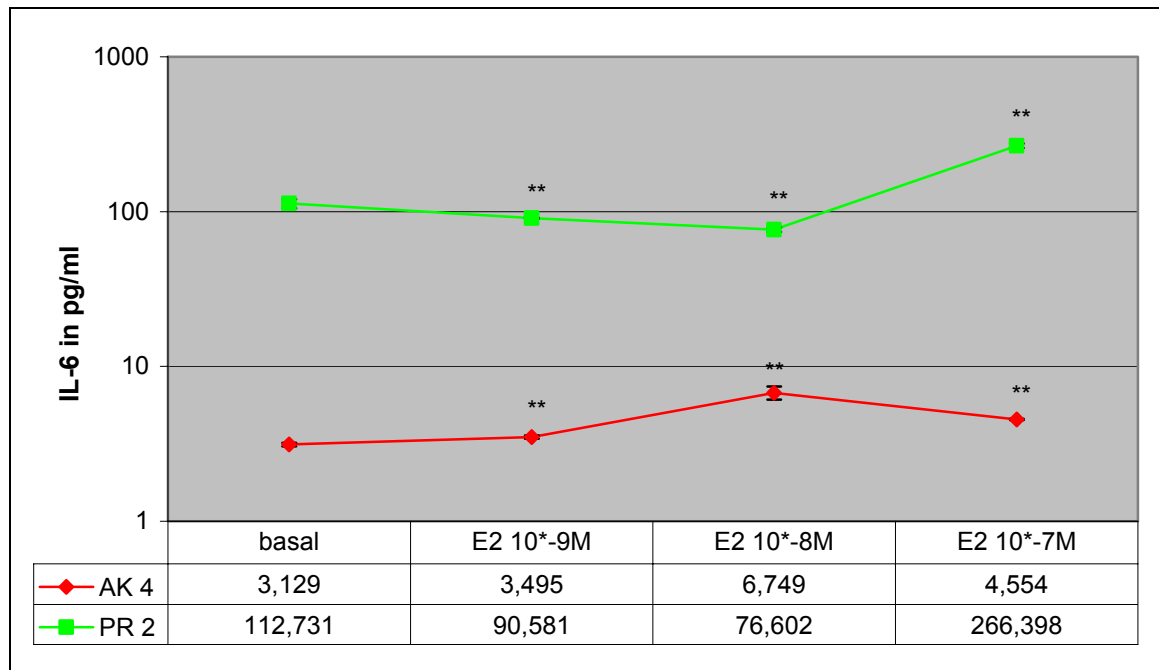


Abbildung 13: Dose Response unter Estradiol

Dosis-Wirkungs-Beziehung einer Prolactinomzellkultur und einer somatotropen Zellkultur. Estradiol wurde jeweils in den Konzentrationen 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-8</sup>M und 10<sup>-7</sup>M den Kulturen zugegeben. Nach 24-stündiger Stimulation ist der Zellüberstand abgenommen und die IL-6 Konzentration gemessen worden.

### 3.2.4 Wirkung von Bromocriptin

Der Dopaminagonist Bromocriptin wird sehr erfolgreich in der Therapie des Prolactinoms (Dopamin inhibiert die Prolactinsekretion) eingesetzt, was sich direkt auf die Studie durch die sehr niedrige Zahl an verfügbaren Tumoren ausgewirkt hat. Auch in der Therapie der Akromegalie, beziehungsweise des GH/STH induzierten Riesenwuchses hat das Medikament durch seine Wirksamkeit einen festen Platz erhalten.

Tabelle 8: IL-6 Sekretion nach Testung mit Bromocriptin  $10^{-6}$ M

<b>TUMOR</b>	<b>basal</b>		<b>Bromo <math>10^{-6}</math>M</b>			
	<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in % zu basal (100%)</b>	
	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>
<b>HI 14</b>	15,708	1,363	10,463	1,236	67%	12%
<b>CU 5</b>	11,995	1,897	13,377	0,057	112%	0%
<b>AK 8</b>	64,308	9,166	106,151	3,885	165%	4%
<b>AK 9</b>	72,806	19,329	168,761	3,823	232%	4%
<b>AK 10</b>	49,544	14,469	39,155	15,592	79%	40%
<b>AK 11</b>	9,279	1,505	4,332	0,275	47%	6%

Tabelle 9: IL-6 Sekretion nach Testung mit Bromocriptin  $10^{-7}$ M

<b>TUMOR</b>	<b>basal</b>		<b>Bromo <math>10^{-7}</math>M</b>			
	<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in % zu basal (100%)</b>	
	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>
<b>HI 8</b>	97,922	22,469	84,639	0,452	86%	1%
<b>HI 11</b>	41,460	17,136	86,174	9,539	208%	11%
<b>HI 12</b>	214,162	0,897	136,731	5,908	64%	4%
<b>HI 13</b>	40,904	3,951	81,873	1,591	200%	2%

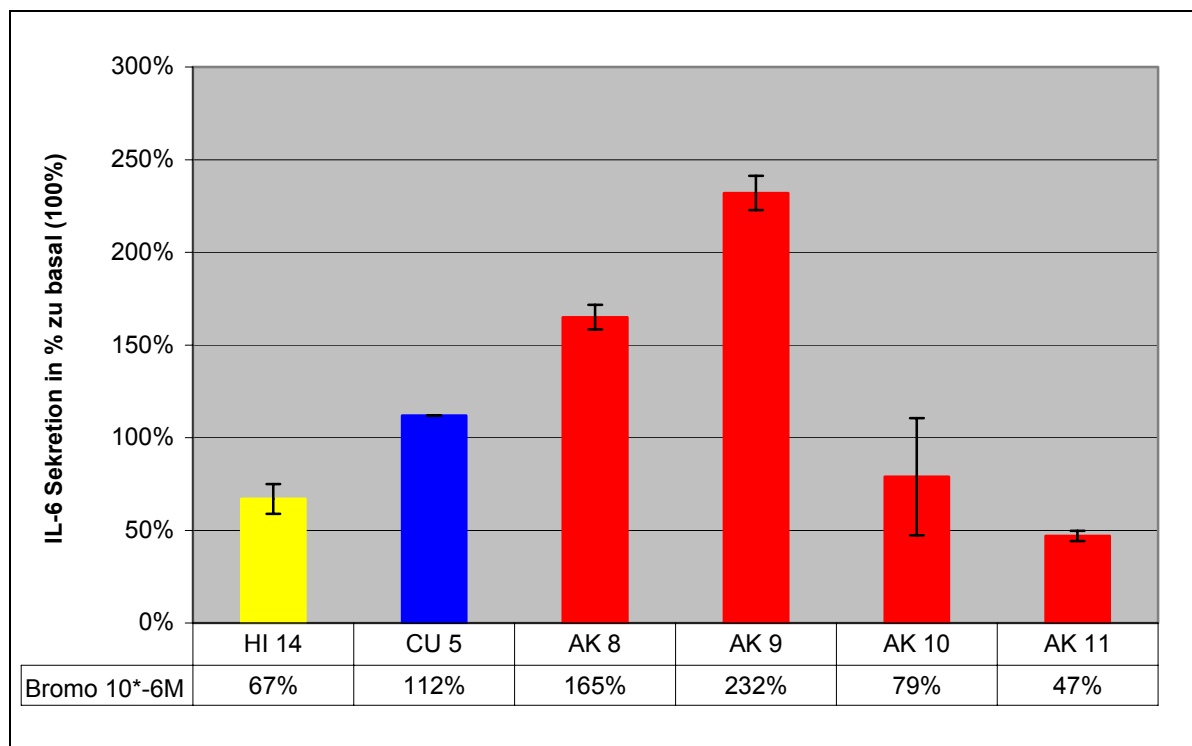


Abbildung 14: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Bromocriptin  $10^{-6}$ M



Leider sind die ermittelten Wertepaare zu uneinheitlich und in ihrer Zahl zu niedrig, um eine Tendenz zu erkennen. Auch bei einzelnen Tumorarten lässt sich kein System in ihrer Stimulationsantwort erkennen. Des weiteren standen nicht genügend Prolactinomzellen zur Verfügung, um die Reaktion auf das Medikament in seiner IL-6 Sekretion zu testen.

4 hormoninaktive Tumoren wurden auf ihre Reaktivität mit einer niedrigeren Bromocriptin Konzentration getestet.

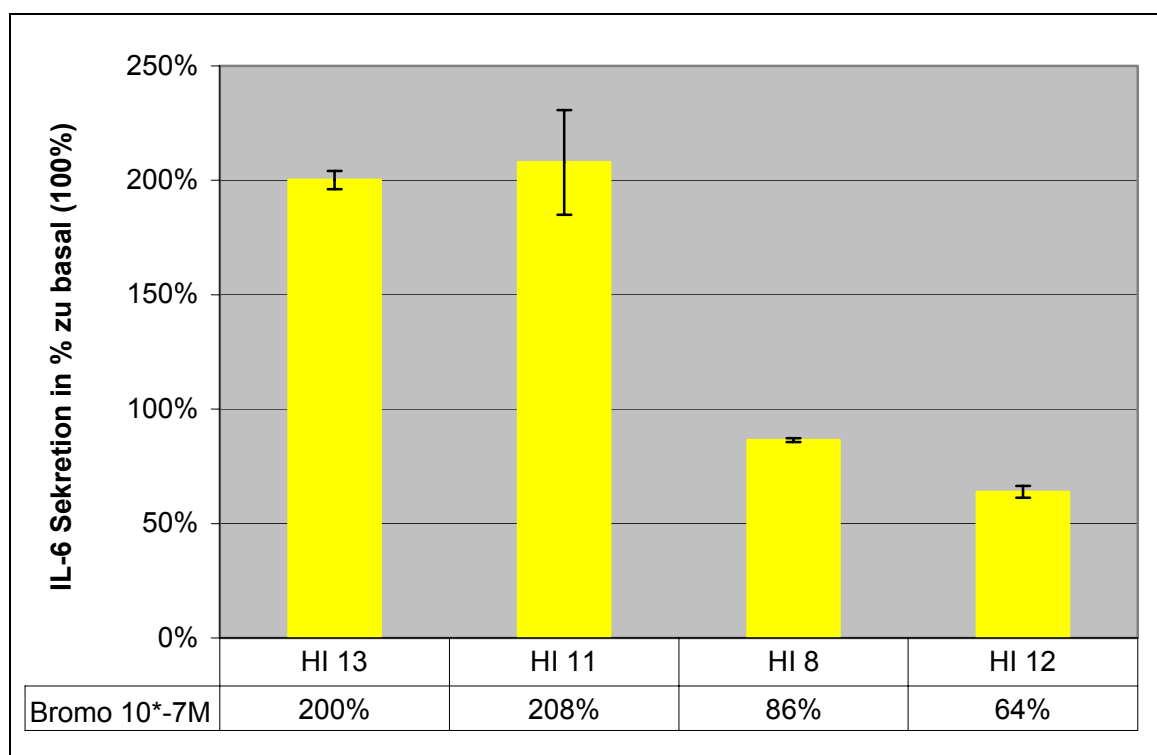


Abbildung 15: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Bromocriptin 10<sup>-7</sup>M

Auch hier ist kein Zusammenhang zwischen Patientengeschlecht und –alter, oder behandelnder Klinik zu erkennen.

### 3.2.5 Wirkung von PACAP

Das Hormon Pituitary Adenylate Cyclase Activating Proteine (PACAP) liegt in zwei wirksamen Formen vor, die sich durch ihre Aminosäurezahl unterscheiden (PACAP-27 und PACAP-38). Studien an der Hypophyse beziehungsweise an Modellzelllinien haben keine Unterschiede in ihrer biologischen Wirksamkeit ergeben

(Renner et al. 1998). Aus Kostengründen wurde, da ähnliche Ergebnisse zu erwarten waren, das mehr verbreitete und somit auch günstigere P-38 für die Stimulationsversuche benutzt und nur wenige Tumorzellkulturen mit P-27 stimuliert.

Tabelle 10: IL-6 Sekretion nach Testung mit P-27

<b>TUMOR</b>	<b>basal</b>		<b>P-27 10<sup>-7</sup>M</b>			
	<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in % zu basal (100%)</b>	
	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>
<b>PR 2</b>	112,731	7,421	196,450	17,929	174%	9%
<b>HI 11</b>	41,460	17,136	73,700	30,003	178%	41%
<b>HI 12</b>	214,162	0,897	176,372	6,756	82%	4%
<b>CU 7</b>	7,148	0,315	10,188	0,765	143%	7%
<b>AK 4</b>	3,129	0,078	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 11: IL-6 Sekretion nach Testung mit P-38

<b>TUMOR</b>	<b>basal</b>		<b>P-38 10<sup>-7</sup>M</b>			
	<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in % zu basal (100%)</b>	
	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>
<b>PR 2</b>	112,731	7,421	209,600	2,260	186%	1%
<b>HI 2</b>	74,876	33,746	197,472	8,824	264%	4%
<b>HI 3</b>	419,558	39,657	314,615	15,215	75%	5%
<b>HI 11</b>	41,460	17,136	106,552	25,464	257%	24%
<b>HI 12</b>	214,162	0,897	220,166	1,305	103%	1%
<b>HI 14</b>	15,708	1,363	66,618	0,931	424%	1%
<b>CU 4</b>	5,695	1,163	6,610	0,349	116%	5%
<b>CU 7</b>	7,148	0,315	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>AK 4</b>	3,129	0,078	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>AK 9</b>	72,806	19,329	208,085	5,758	286%	3%
<b>AK 10</b>	49,544	14,469	50,461	1,726	102%	3%
<b>AK 11</b>	9,279	1,505	9,422	2,234	102%	24%

Im Mittel reagierten die Zellkulturen auf eine Stimulation mit 10<sup>-7</sup>M PACAP mit einem Anstieg ihrer IL-6 Sekretion auf 144% der Basalsekretion (P-27), beziehungsweise 192% (P-38). Der Korrelationskoeffizient betrug dabei 0,84 (P-27) und 0,83 (P-38). Wieder wurden die Ergebnisse nach Gemeinsamkeiten überprüft und ergaben weder in Alter, Geschlecht noch Behandlungsklinik Gruppierungen.

Es fiel auf, daß die Wirkung von P-27 und P-38 in zwei von fünf untersuchten Tumoren (CU7 und HI12) nicht übereinstimmten.

Zur Veranschaulichung der Stimulationsergebnisse sind die Meßergebnisse in einem Balkendiagramm als prozentuale Veränderung zu ihrem Basalwert aufgetragen.

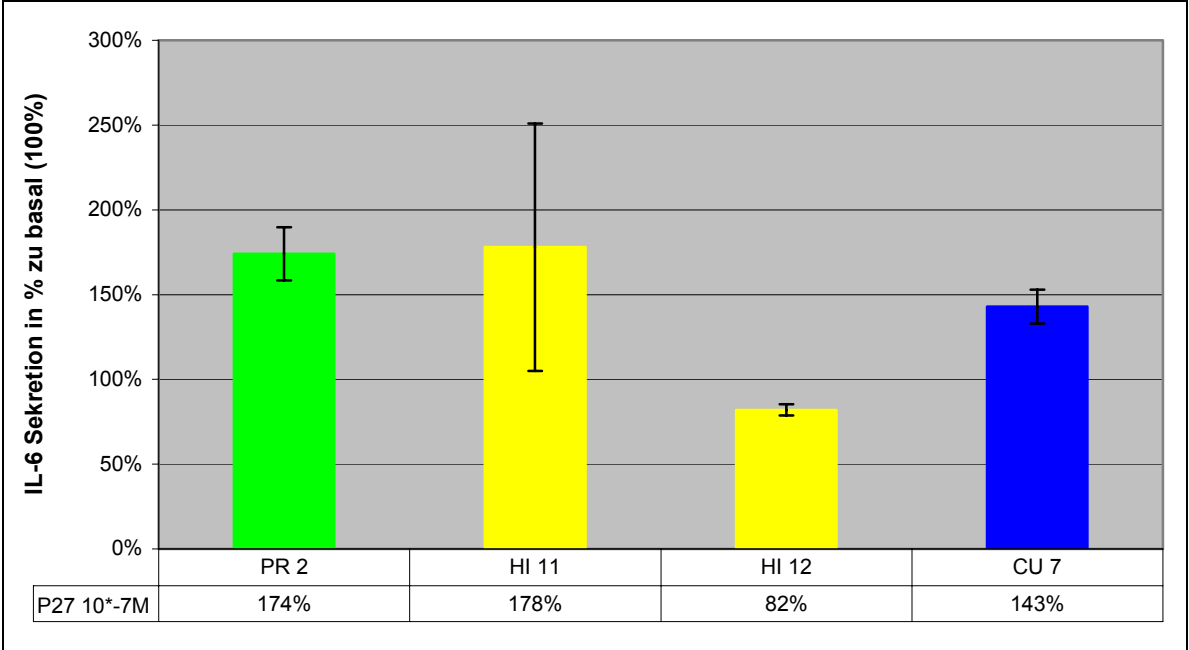


Abbildung 16: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit PACAP-27 10<sup>-7</sup>M

Es folgt das Balkendiagramm zur Stimulation mit PACAP-38, farblich nach Tumorart geordnet.

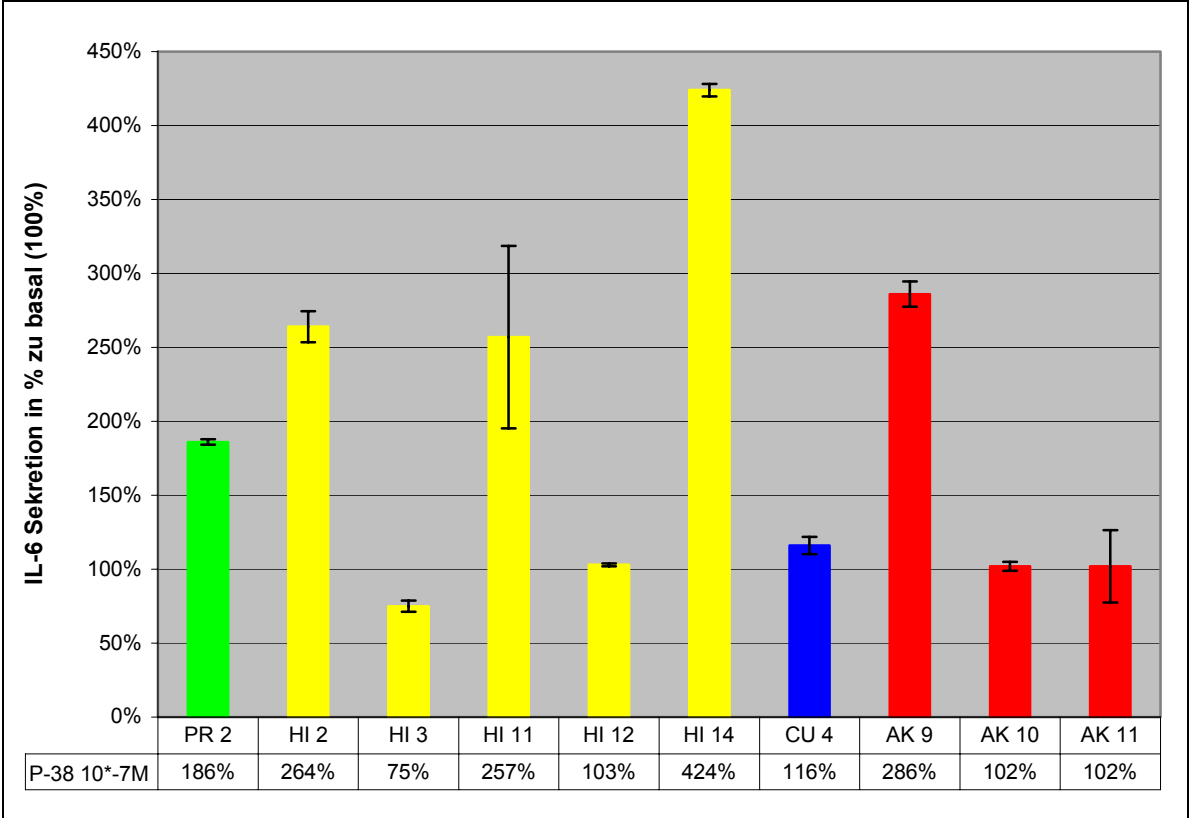


Abbildung 17: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit PACAP-38 10<sup>-7</sup>M

### 3.2.6 Wirkung von TGF $\alpha$

Der Wachstumsfaktor TGF $\alpha$  ist in gesunden Hypophysen sowie in Hypophysenadenomen gefunden worden (Ray u. Melmed 1997).

In den Stimulationsversuchen wurde die Reaktion der Tumorzellkulturen auf Zugabe von 1ng/ml TGF $\alpha$  getestet.

Tabelle 12: IL-6 Sekretion nach Testung mit TGF $\alpha$

<b>TUMOR</b>	<b>basal</b>		<b>TGF<math>\alpha</math> 1ng/ml</b>			
	<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in pg/ml</b>		<b>IL-6 in % zu basal (100%)</b>	
	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>	<b>MW</b>	<b>± SD</b>
HI 7	3,546	0,302	4,339	0,045	122%	1%
HI 8	97,922	22,469	136,124	3,431	139%	3%
HI 10	136,998	14,040	228,814	21,330	167%	9%
CU 4	5,695	1,163	4,767	0,235	84%	5%
CU 5	11,995	1,897	12,979	0,113	108%	1%
CU 6	43,431	5,616	98,258	3,525	226%	4%
AK 1	83,183	0,141	65,788	3,157	79%	5%
AK 3	8,853	0,042	14,628	1,305	165%	9%
AK 4	3,129	0,078	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AK 6	5,580	0,004	11,577	0,157	207%	1%
AK 8	64,308	9,166	202,316	17,119	315%	8%
AK 9	72,806	19,329	178,406	7,884	245%	4%
AK 10	49,544	14,469	11,633	0,000	23%	0%
AK 11	9,279	1,505	3,826	0,153	41%	4%

Im Mittel reagierten die untersuchten Adenome mit einer IL-6 Sekretionssteigerung gegenüber ihrem Basalwert auf 148%, bei einem Korrelationskoeffizienten der Datenpaare von 0,85. Dabei zeigten die drei hormoninaktiven Tumoren als einzige homogen eine durchschnittliche Sekretionssteigerung von 143%, während die anderen Tumorgruppen mit positiver sowie auch mit negativer Stimulation reagierten.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse bezüglich Geschlecht und Alter der Patienten oder der behandelnden Klinik ist keine Gruppenbildung erkennbar. Auch ein Zusammenhang zwischen Höhe der Basalsekretion und der Reaktivität auf die Stimulation konnte nicht festgestellt werden.

In der grafischen Darstellung der Meßergebnisse wurde die prozentuale IL-6 Sekretion gegenüber ihrem Basalwert in einem Balkendiagramm, nach Tumorart geordnet, aufgetragen. Die Stimulation erfolgte mit 1ng/ml TGF $\alpha$ .

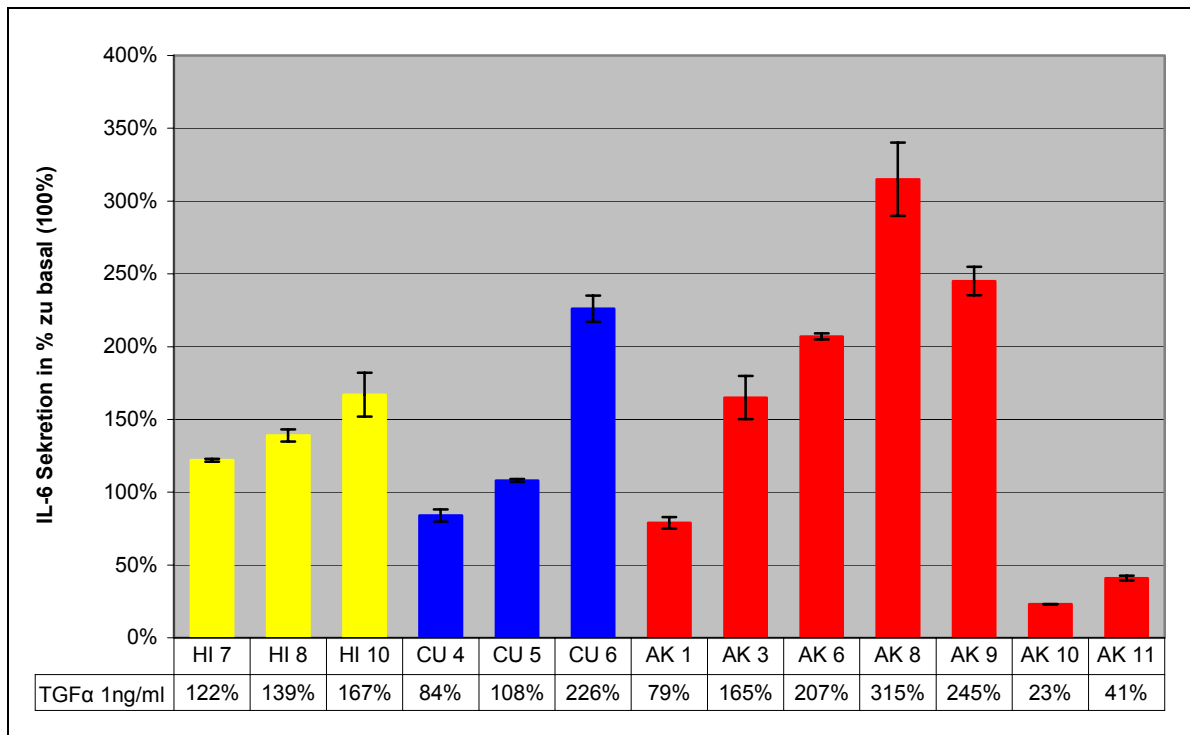


Abbildung 18: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit TGF $\alpha$  1ng/ml

An zwei somatotropen Tumoren konnte zusätzlich eine Dosis-Wirkung-Untersuchung durchgeführt werden. TGF $\alpha$  wurde zweimal um jeweils eine Potenz verdünnt. Damit kamen die Konzentrationen 1ng/ml, 0,1ng/ml und 0,01ng/ml zur Anwendung. Die IL-6 Konzentration der Überstände ist in pg/ml angegeben.

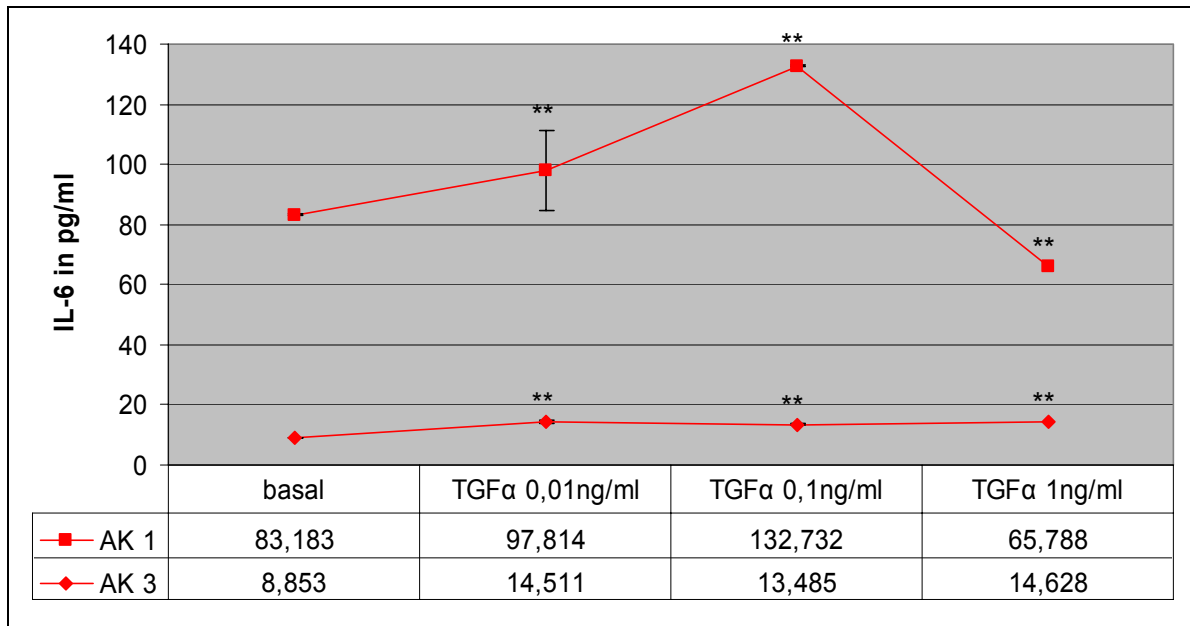


Abbildung 19: Dose Response unter TGFα

Dosis-Wirkungs-Beziehung von TGFα an zwei somatotropen Zellkulturen. Untersucht wurde die IL-6 Sekretion nach Zugabe von 0,01, 0,1 und 1ng/ml TGFα.

### 3.2.7 Wirkung von TGFβ

TGFβ, dessen Anwesenheit in Hypophysenadenomen nachgewiesen werden konnte (D'Abronzio et al. 1999), wurde ebenfalls auf seine Wirksamkeit auf die Zellkulturen hin untersucht.

Für die Stimulationsexperimente wurde der Wachstumsfaktor in einer Konzentration von 10ng/ml angewendet.

Tabelle 13: IL-6 Sekretion nach Testung mit TGFβ

TUMOR	basal		TGFβ 10ng/ml			
	IL-6 in pg/ml		IL-6 in pg/ml		IL-6 in % zu basal (100%)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
HI 10	136,998	14,040	472,130	67,673	345%	14%
HI 11	41,460	17,136	282,633	181,295	682%	64%
HI 12	214,162	0,897	287,793	12,203	134%	4%
HI 13	40,904	3,951	177,455	26,597	434%	15%
HI 14	15,708	1,363	13,821	4,174	88%	30%
CU 4	5,695	1,163	20,393	0,062	358%	0%
CU 5	11,995	1,897	17,837	0,782	149%	4%
CU 6	43,431	5,616	62,029	8,285	143%	13%
AK 8	64,308	9,166	199,207	14,500	310%	7%
AK 11	9,279	1,505	12,350	2,220	133%	18%

Bis auf den Tumor HI 14 reagierten alle untersuchten Kulturen mit einer positiven Stimulation von zum Teil einem Vielfachen ihrer IL-6 Basalsekretion.

Der Mittelwert aller untersuchten Tumoren lag bei einem Anstieg der Cytokinsekretion auf 278% ihrer unstimulierten Basalsekretion, mit einem Korrelationskoeffizient der Datenpaare von 0,75. Bei einem Versuch der Datenangleichung durch Herausrechnen der obersten (HI 11) und der untersten (HI 14) Mittelabweichung erreicht der Mittelwert immer noch eine stimulierte Sekretion von 251%, bei einem Korrelationskoeffizient von 0,80.

Bei einem Vergleich auf Alter und Geschlecht, behandelnde Klinik und Höhe der Basalsekretion kann man bei den untersuchten Tumoren keinen Trend erkennen.

In der grafischen Darstellung folgt die prozentuale Veränderung der IL-6 Sekretion als Balkendiagramm, farblich nach Tumorart geordnet.

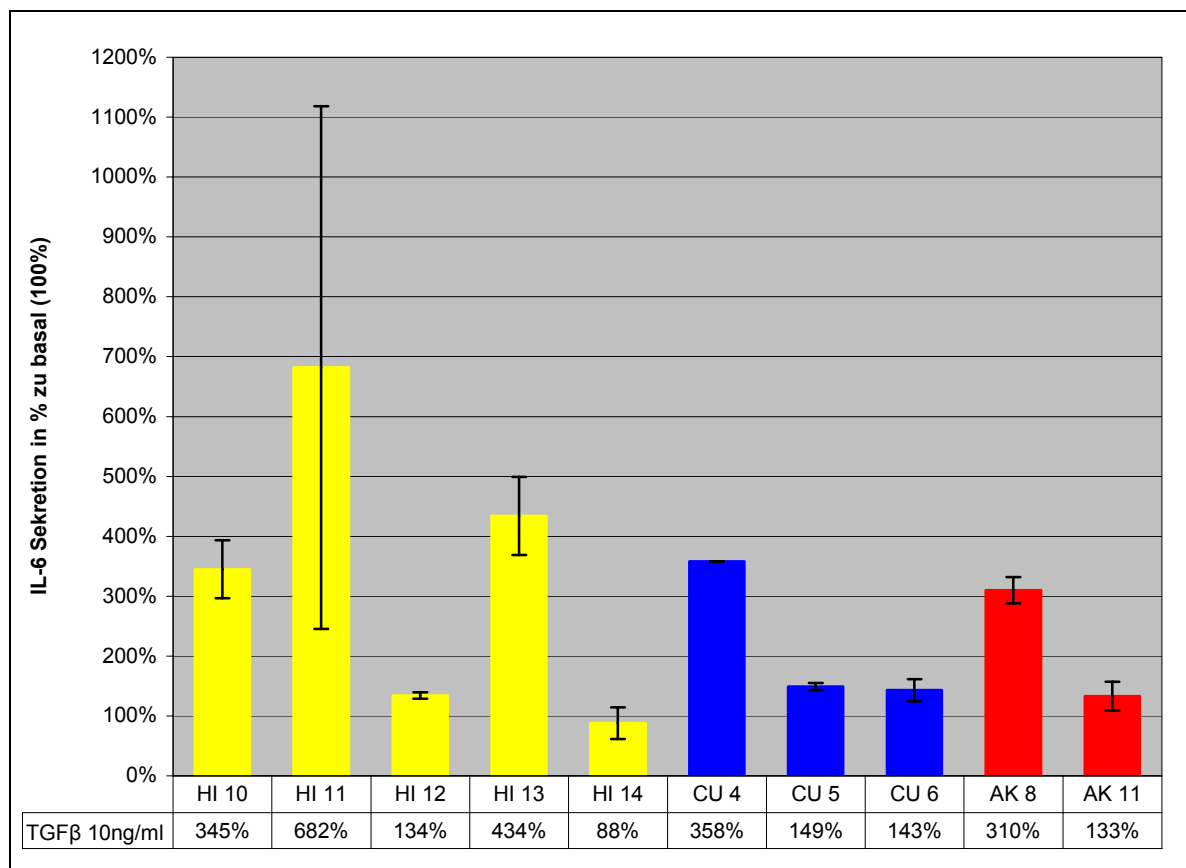


Abbildung 20: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit TGFβ 10ng/ml

### 3.3 IL-6 Sekretion kultivierter Hypophysenadenomzellen nach Behandlung mit Dexamethason

Die Reaktion der Tumorzellen in ihrer IL-6 Sekretion auf Dexamethason war absolut eindeutig. Alle untersuchten Tumoren reagierten mit einer Inhibition ihrer IL-6 Sekretion auf die Zugabe von Dexamethason, zum Teil bis unter die Nachweisgrenze. Aufgeschlüsselt auf ihre Adenomzugehörigkeit ist die Reaktion auf eine Testung mit  $10^{-6}$ M Dexamethason wie folgt:

Tabelle 14: IL-6 Sekretion nach Testung mit Dex  $10^{-6}$ M

TUMOR	basal		DEX $10^{-6}$ M			
	IL-6 in pg/ml		IL-6 in pg/ml		IL-6 in % zu basal (100%)	
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD
PR 2	112,731	7,421	36,576	1,965	32%	5%
HI 1	30,201	2,697	12,538	0,629	42%	5%
HI 2	74,876	33,746	21,651	0,000	29%	0%
HI 3	419,558	39,657	82,042	5,505	20%	7%
HI 4	18,791	1,871	7,586	0,042	40%	1%
HI 5	5,024	0,464	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HI 6	83,145	1,519	46,485	3,763	56%	8%
HI 7	3,546	0,302	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HI 8	97,922	22,469	38,872	1,809	40%	5%
HI 9	81,458	21,646	14,063	1,043	17%	7%
HI 10	136,998	14,040	53,046	5,566	39%	10%
HI 11	41,460	17,136	6,840	0,507	16%	7%
HI 12	214,162	0,897	79,541	1,729	37%	2%
HI 13	40,904	3,951	10,891	6,084	27%	56%
HI 14	15,708	1,363	7,259	0,322	46%	4%
HI 15	12,432	0,832	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CU 1	11,385	0,332	3,646	0,148	32%	4%
CU 2	3,745	1,162	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CU 3	17,737	3,960	5,335	0,048	30%	1%
CU 4	5,695	1,163	3,153	0,737	55%	23%
CU 5	11,995	1,897	6,316	0,643	53%	10%
CU 6	43,431	5,616	28,100	0,655	65%	2%
CU 7	7,148	0,315	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AK 1	83,183	0,141	43,286	0,557	52%	1%
AK 2	386,982	7,961	29,083	16,267	8%	56%
AK 3	8,853	0,042	3,575	0,289	40%	8%
AK 4	3,129	0,078	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AK 6	5,580	0,004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AK 7	127,500	10,255	7,893	1,472	6%	19%
AK 8	64,308	9,166	22,791	2,551	35%	11%
AK 9	72,806	19,329	39,416	1,947	54%	5%
AK 10	49,544	14,469	17,957	1,873	36%	10%
AK 11	9,279	1,505	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.



In der grafischen Darstellung ergibt sich folgendes Bild, wobei zu beachten ist, daß die y-Achse für eine übersichtlichere Darstellung logarithmisch skaliert ist. Wenn die IL-6 Sekretion nach Testung unter der Meßgrenze liegt, ist sie auf die Abszisse gezeichnet:

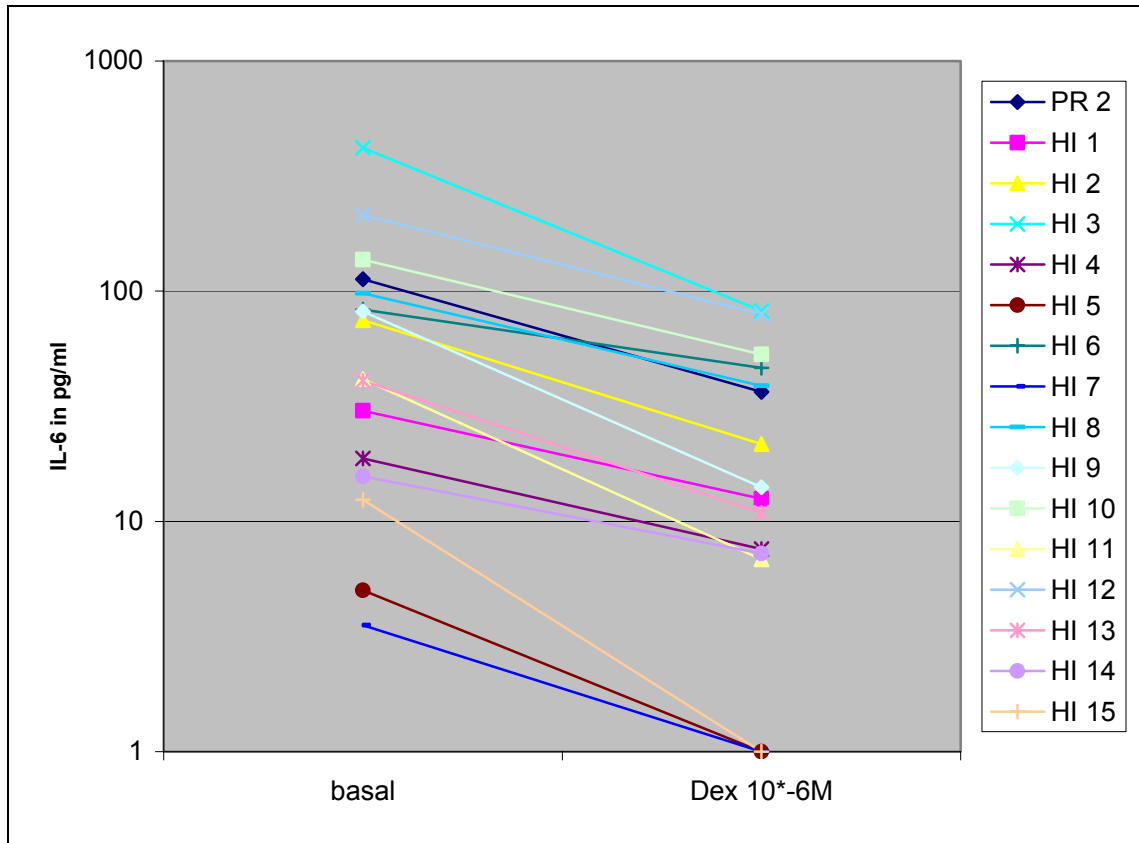


Abbildung 21: IL-6 Sekretion in pg/ml vor und nach Behandlung mit Dexamethason 10<sup>-6</sup>M  
 Die IL-6 Sekretion nach Zugabe von 10<sup>-6</sup>M Dexamethason bei einer Prolactinomzellkultur und bei hormoninaktiven Adenomzellkulturen. Wenn die IL-6 Konzentration nach Wirkstoffzugabe unterhalb der Nachweisgrenze lag, ist sie auf die Abszissenachse aufgetragen.

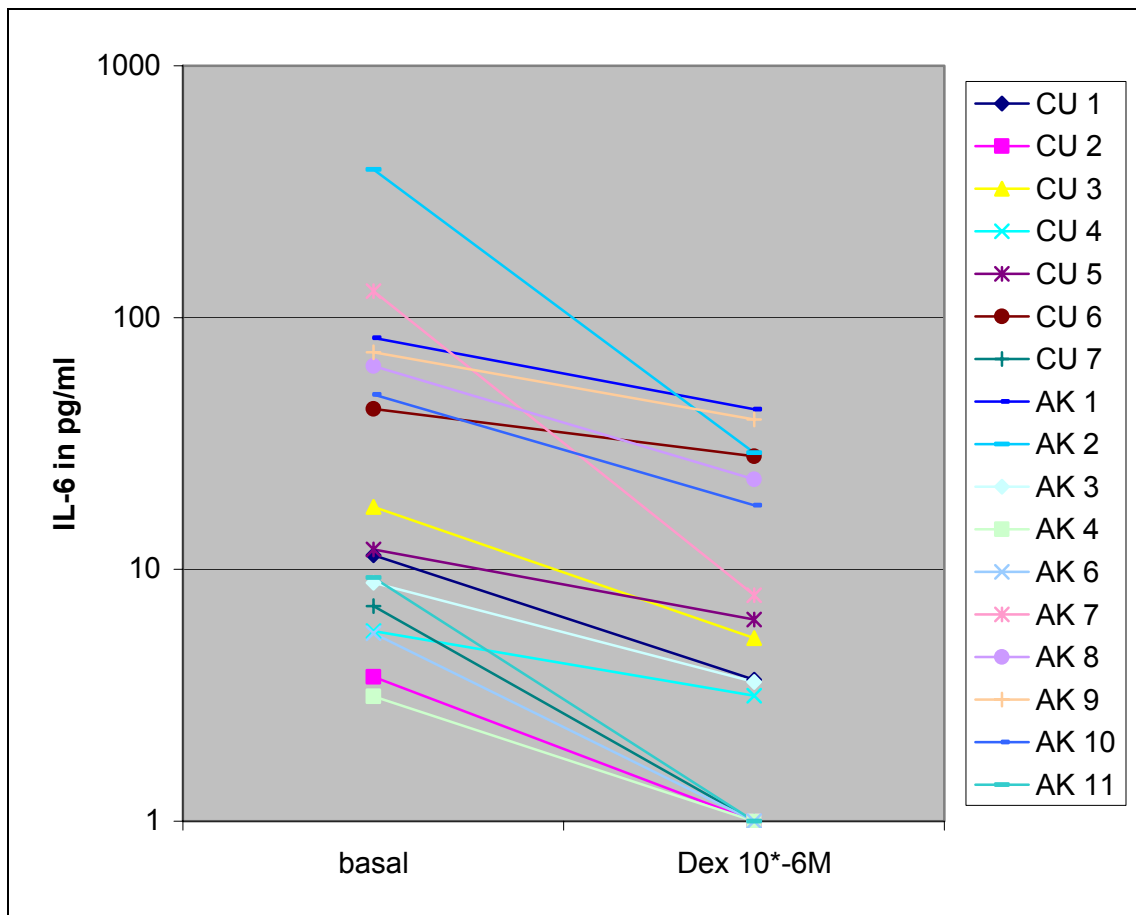


Abbildung 22: IL-6 Sekretion in pg/ml vor und nach Behandlung mit Dexamethason  $10^{-6}$ M  
 IL-6 Sekretion nach Zugabe von  $10^{-6}$ M Dexamethason bei den untersuchten corticotropen und somatotropen Tumorzellkulturen. Wenn die IL-6 Konzentration nach Wirkstoffzugabe unterhalb der Nachweisgrenze lag, ist sie auf die Abszissenachse aufgetragen.

In einer weiteren Darstellung sind Sekretionen aller untersuchten Tumoren, farblich nach Adenomtyp geordnet, in Prozent aufgetragen.

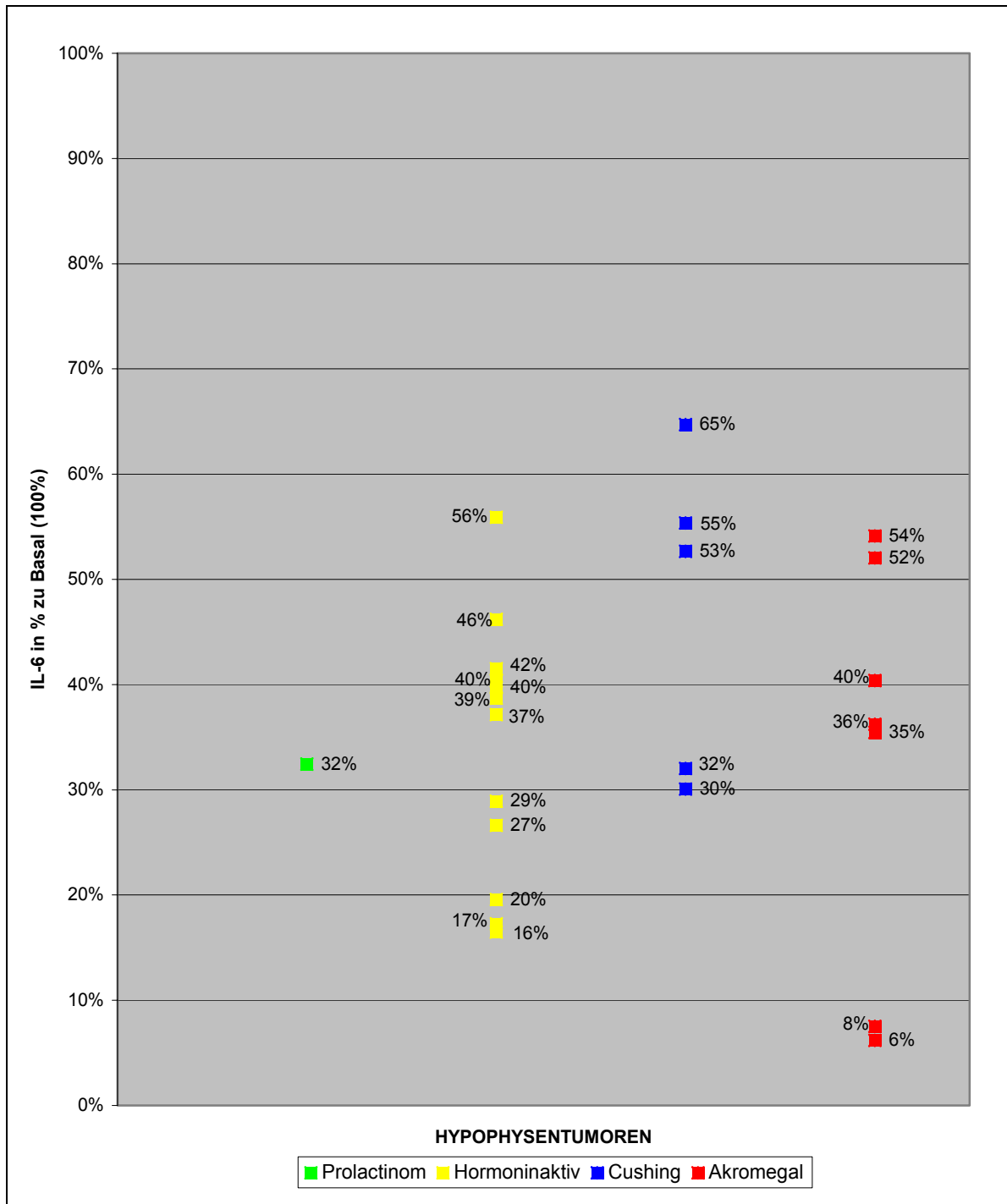


Abbildung 23: Prozentuale IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Dexamethason  $10^{-6}M$   
 In der Darstellung sind die prozentualen IL-6 Sekretionen aller untersuchten Adenomzellkulturen nach 24-stündiger Inkubation mit  $10^{-6}M$  Dexamethason aufgetragen. Die jeweilige Basalsekretion entspricht 100%.

An einigen Tumoren konnte eine Dosis-Wirkung-Untersuchung durchgeführt werden. Es ist zu sehen, daß die Konzentration von  $10^{-6}M$  an Dexamethason auch die wirksamste Konzentration ist. Nur bei niedriger Basalsekretion ist die wirksamste Konzentration an Dexamethason schon eher erreicht.

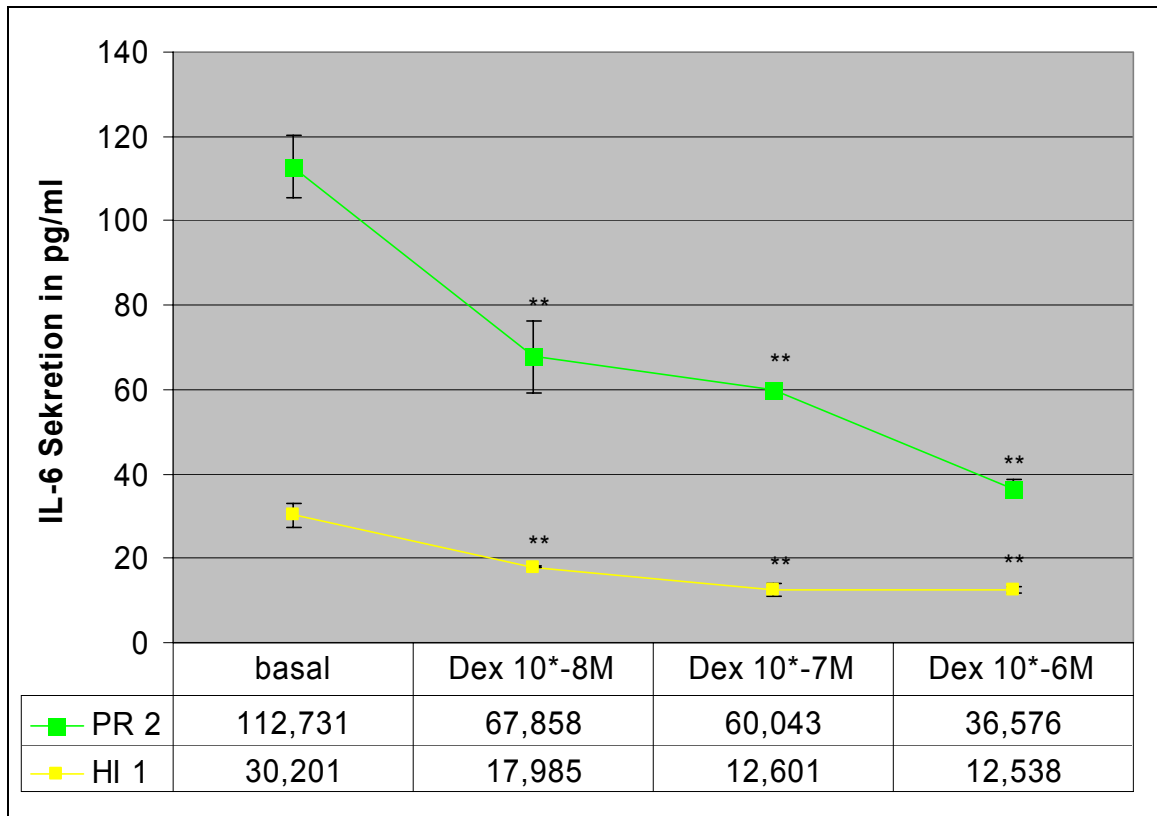


Abbildung 24: Dose Response unter Dexamethason I  
 Dosis- Wirkungs-Beziehung eines Prolactinoms und einer hormoninaktiven Zellkultur. Gemessen wurde die IL-6 Sekretion jeweils nach 24-stündiger Inkubation mit 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M und 10<sup>-6</sup>M Dexamethason.

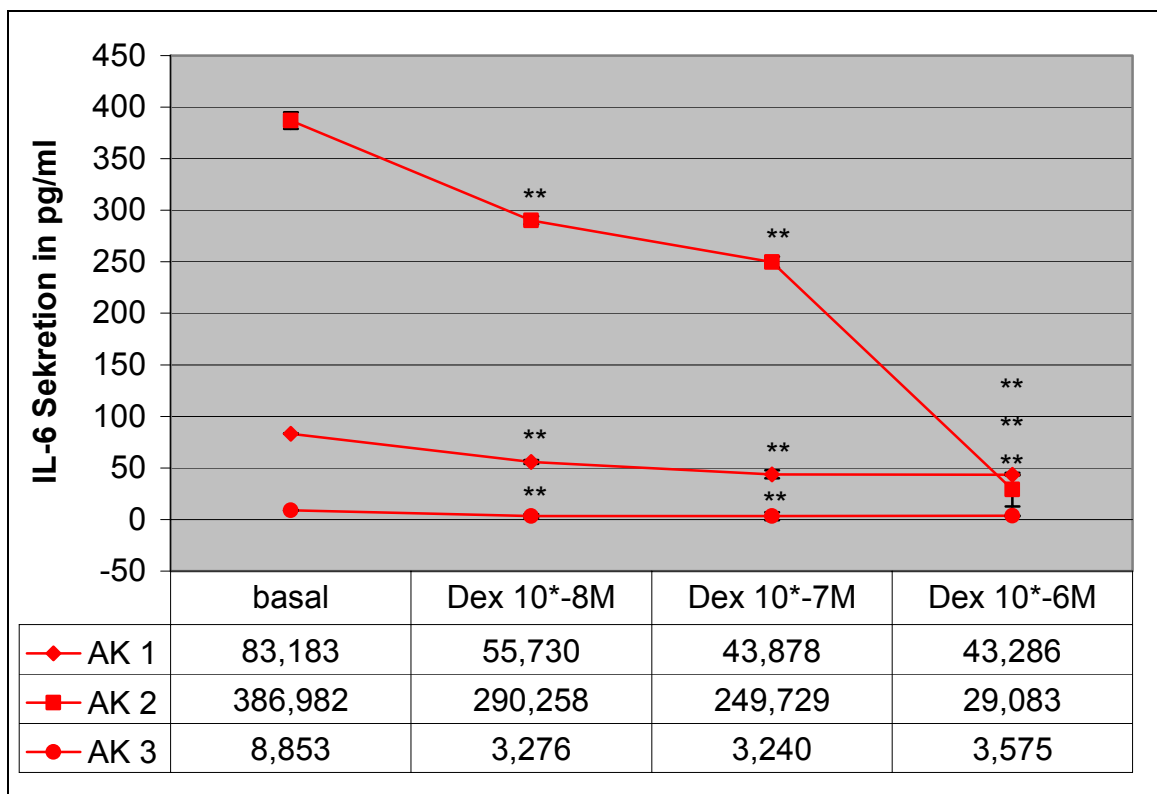


Abbildung 25: Dose Response unter Dexamethason II  
 Dosis- Wirkungs-Beziehung von drei somatotropen Adenomzellkulturen. Gemessen wurde die IL-6 Sekretion jeweils nach 24-stündiger Inkubation mit 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M und 10<sup>-6</sup>M Dexamethason.

### 3.4 GH Sekretion kultivierter somatotroper Hypophysenadenomzellen nach Behandlung mit IL-6

Da die Wirkung von IL-6 auf die endokrine Funktion des gesunden Hypophysenvorderlappens bekannt ist (Renner et al. 1996, Arzt u. Stalla 1996, Arzt et al. 1999), war das Verhalten der somatotropen Tumoren in ihrer Hormonsekretion bei Stimulation mit IL-6 zu untersuchen.

Es wurde die GH-Sekretion der Zellkulturen basal und nach Stimulation mit 10ng/ml IL-6 mittels Radio Immunoassay (RIA) gemessen.

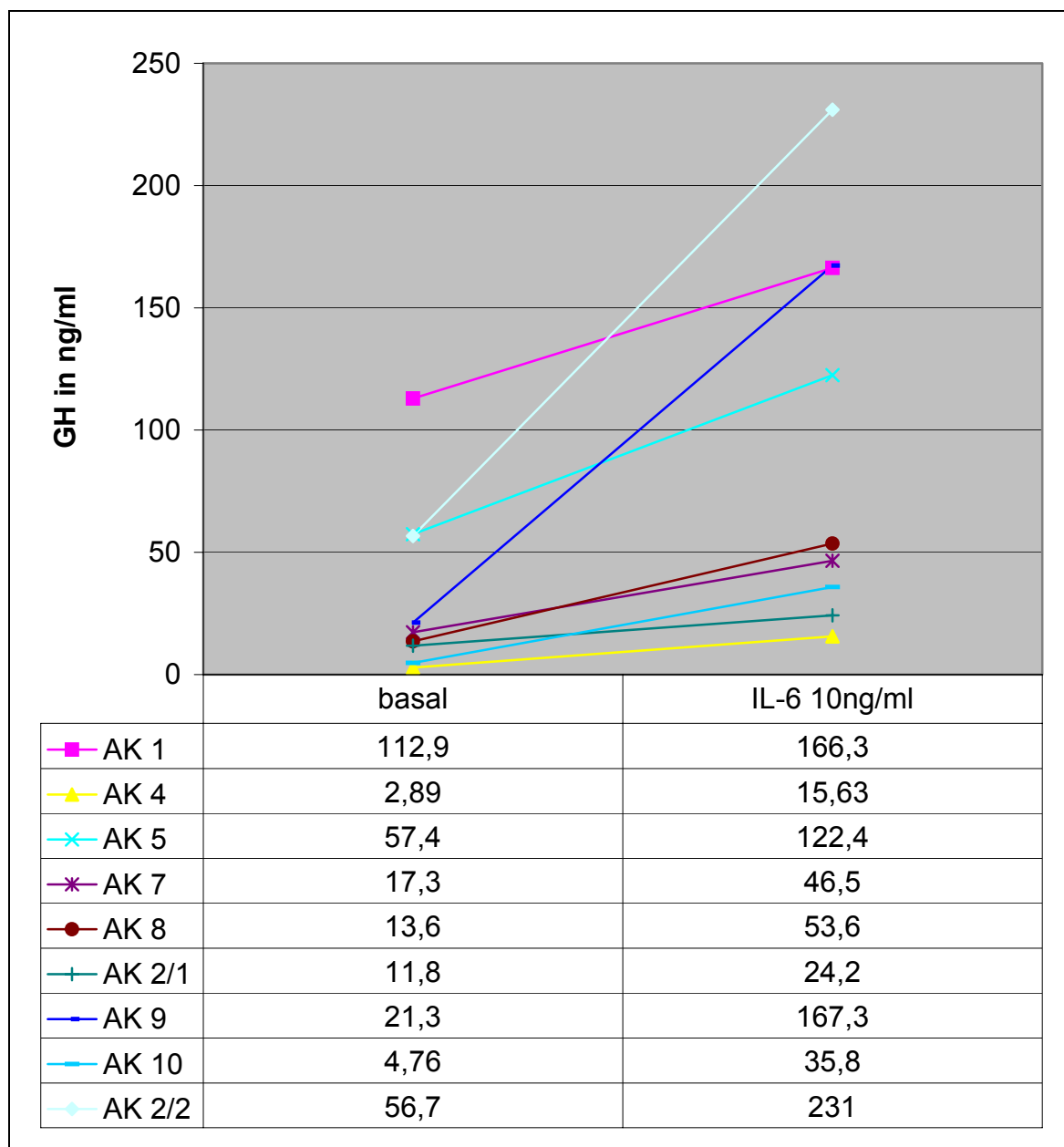


Abbildung 26: GH Sekretion somatotroper Tumoren unter Stimulation mit IL-6 10ng/ml

Da alle untersuchten Tumoren mit einem Anstieg ihrer GH-Sekretion reagierten, wurde an einem weiteren Tumor mit einer ausreichend großen Zellzahl ein Dose Response Experiment durchgeführt und die GH-Sekretion mit der auf das spezifische Releasinghormon des Hypothalamus GHRH (rot) verglichen.

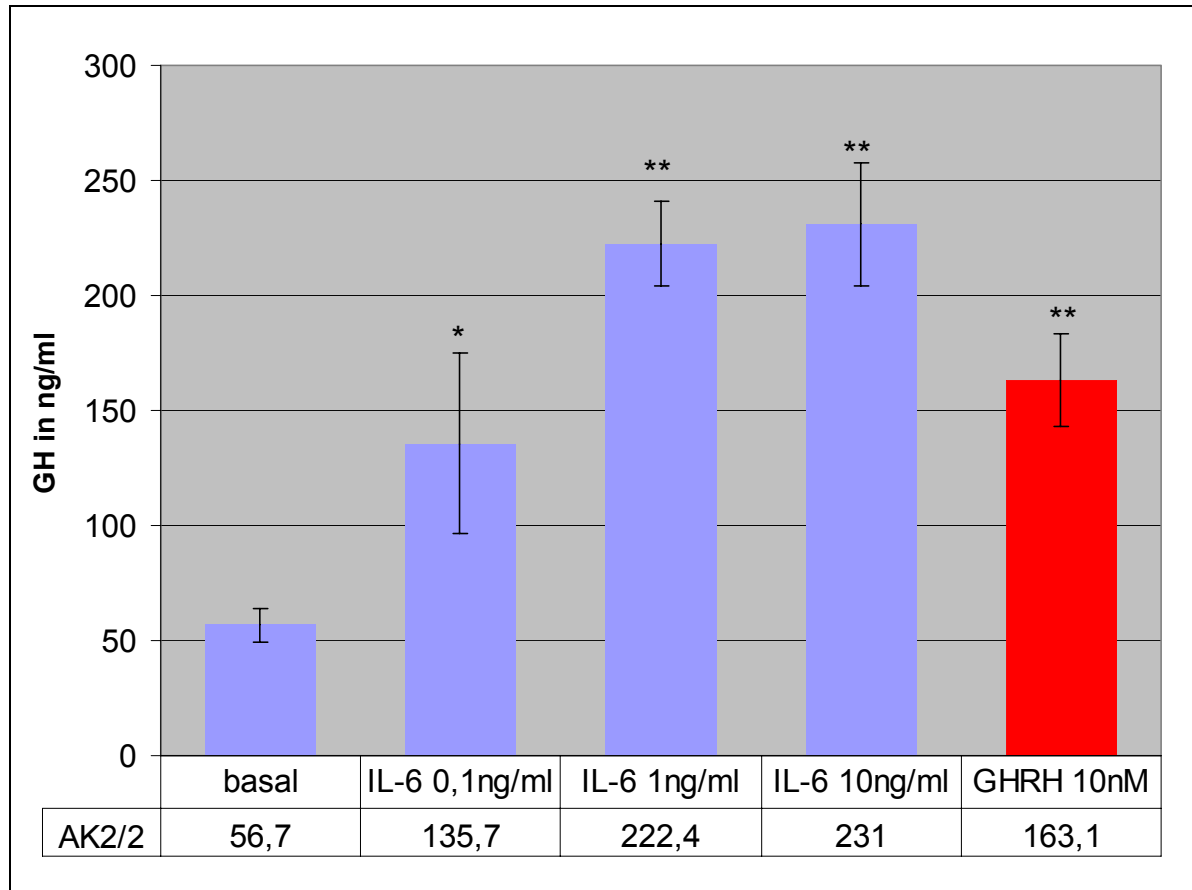


Abbildung 27: Tumor AK2/2 Dose Response unter IL-6  
 Dosis-Wirkungs-Beziehung der IL-6 stimulierten GH Sekretion in einer humanen, somatotropen Hypophysenadenomzellkultur. Zum Vergleich ist die Wirkung von 10nM GHRH (rot) dargestellt.

## 4 Diskussion

Interleukin-6 ist ein pleiotroper Faktor. Er ist nicht nur für die Zellen des Immunsystems von herausragender Bedeutung, sondern auch für eine Vielzahl anderer Zelltypen ein Regulator, der Funktion und Proliferation beeinflusst.

Im Falle intrakranieller Tumoren wird IL-6 als inhibierend wirksamer Wachstumsfaktor bei Meningeomen diskutiert (Schrell et al. 1998). Bei Glioblastomen fördert IL-6 die Angiogenese, wobei hier IL-6 nicht selbst die Proliferation von Endothelzellen beeinflusst, sondern indirekt über die Stimulation von VEGF die Neovaskularisation fördert (Rohhion et al. 2001).

Im Zusammenhang mit Tumoren der Adenohypophyse wird vermutet, daß IL-6 einen Progressionsfaktor der Adenomentwicklung darstellt, indem es die Proliferation von Tumorzellen direkt stimuliert (Arzt et al. 1999, Borg et al. 2003).

Die in den vorliegenden Untersuchungen dargestellten Ergebnisse zeigen, daß IL-6 auch für die exzessive Hormonproduktion bei somatotropen Hypophysenvorderlappenadenomen von Bedeutung ist.

Im Bereich des Hypophysenadenoms wirksames IL-6 kann entweder aus gewebeständigen Makrophagen und follikulostellaren Zellen (FS-Zellen) stammen oder von der Tumorzelle selbst gebildet werden.

FS-Zellen als Quelle für IL-6 sind nur in geringem Umfang oder überhaupt nicht in den Hypophysenadenomen vorhanden. Allerdings ist gezeigt worden, daß an der Grenze zwischen Tumor und normalen Hypophysengewebe, in der Transitionszone, FS-Zellen gehäuft vorliegen (Farnoud et al. 1994). Wie es dort zur Akkumulation der FS-Zellen kommt, ist nicht bekannt, jedoch hat Gloddek et al. beobachtet, daß IL-6 einen positiven Wachstumsfaktor für FS-Zellen darstellt (Gloddek et al. 1998). Dieses deutet darauf hin, daß das von den Tumorzellen gebildete IL-6 zusammen mit dem von den FS-Zellen selbst produzierten IL-6 lokal im Bereich der Tumorperipherie zu letztlich erhöhten IL-6 Konzentrationen führt, was lokal eine verstärkte auto-/parakrine Wachstumsstimulation für FS-Zellen bedingt.

Makrophagen finden sich als potentielle IL-6 Quelle nur sporadisch im normalen HVL. Im Tumorgewebe sind in der Regel mehr Makrophagen zu finden. In vivo könnte somit IL-6, das von Makrophagen gebildet wird, zum Wachstum der Tumoren beitragen. Für die durchgeführten Experimente ist jedoch hervorzuheben, daß routinemäßige Untersuchungen der Adenom-Zellkulturen mit markierten Antikörpern, die gegen Makrophagenmarker (CD14) gerichtet waren, keinen Makrophagen-nachweis erbrachten. Somit ist davon auszugehen, daß die hier vorliegenden in vitro Untersuchungen tatsächlich tumorzellspezifische Effekte aufzeigen.

Im Gegensatz zur normalen Hypophyse, in der die endokrinen Zellen kein IL-6 synthetisieren, sind in bis zu 80% aller endokrin aktiven oder inaktiven Hypophysenadenome die transformierten Tumorzellen selbst in der Lage, IL-6 zu produzieren und zu sezernieren.

Das bedeutet, daß eine autokrine Proliferationsstimulation der Tumorzellen mittels IL-6 erfolgen könnte.

In der vorliegenden Arbeit sind 40 Hypophysenadenome kultiviert und ihre Basalsekretion von IL-6 nach 24-stündiger Inkubation mit plasmafreiem Medium gemessen worden. In den Überständen fast aller untersuchten Adenomzellkulturen (39) wurde IL-6 nachgewiesen.

Während die IL-6 Produktion durch Tumorzellen schon in der Literatur diskutiert wurde (Jones et al. 1991, Rezai et al. 1994, Velkeniers et al. 1994), sind in der vorliegenden Arbeit erstmals Untersuchungen zur Regulation der intratumoralen IL-6 Sekretion durchgeführt worden. Es sollte überprüft werden, ob andere Wachstumsfaktoren, Neuropeptide oder Hormone, die im Verdacht stehen, die Tumorprogression positiv oder negativ zu beeinflussen, eventuell nicht nur direkt, sondern auch indirekt, über Stimulation beziehungsweise Inhibition von IL-6 wirksam sind.

Bei der Auswahl der untersuchten, potentiellen Regulatoren sind mit PACAP und einem Corticosteroid (Dexamethason) auch Substanzen berücksichtigt worden, die als Effektoren der IL-6 Sekretion von FS-Zellen bekannt sind (Nagashima et al. 2003). Als Stimulatoren der IL-6 Sekretion in den Adenomzellkulturen erwiesen sich neben PACAP  $TGF\alpha$  und  $TGF\beta$ . Die gefundene Wirkung der untersuchten



Substanzen auf die intratumorale IL-6 Produktion weist darauf hin, daß diese Faktoren zum Teil indirekt zur Tumorprogression über die Beeinflussung der IL-6 Sekretion beitragen können, neben ihrer direkten Wirkung auf die Tumorentwicklung.

Der bekannte Einfluß des PACAP als positiver Stimulator der IL-6 Sekretion in FS-Zellen erwies sich als allgemeine Tendenz an den untersuchten Adenomzellkulturen, allerdings nicht durchgehend bei allen Versuchen. Entgegen der Erwartung war die registrierte Reaktion auf die beiden Formen von PACAP-27 und PACAP-38 in ihrer Ausprägung nicht deckungsgleich. Zwar zeigte das untersuchte Prolactinom eine fast identische IL-6 Sekretion nach Stimulation, andere Adenome reagierten dagegen sehr unterschiedlich oder sogar entgegengesetzt (Tabellen 10 und 11).

Die Rezeptoren der Transforming Growth Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  sind in der gesunden Hypophyse sowie in Hypophysenadenomen nachgewiesen worden (Ray u. Melmed 1997, D'Abronzio et al. 1999). Weiterhin konnte TGF $\beta$  (TGF $\beta_1$  und TGF $\beta_3$ ) selbst in gonadotropen, in laktotropen und in FS-Zellen der Hypophyse gefunden werden (Renner et al. 2002). Die Wirkung von TGF $\alpha$  beruht auf einem Hyperplasie induzierenden Effekt und auf Tumorinduktion der Hypophyse. Gerade in Prolactinomen scheint das TGF $\alpha$  eine kritische, tumorproliferierende Rolle zu spielen (Renner et al. 1996, Ray u. Melmed 1997). Im Gegensatz dazu zeigt TGF $\beta$  mindestens teilweise eine Gegenspielerfunktion. Dem Faktor ist ein inhibierender Effekt auf die PRL Synthese und Sekretion nachgewiesen worden. Ebenso inhibiert er die TGF $\alpha$  Synthese (Ray u. Melmed 1997). Seiner hemmenden Wirkung auf die Tumorzellproliferation steht im Gegensatz dazu eine VEGF-, und damit Angiogenese-induzierende Wirkung gegenüber (Renner et al. 2002). Diese Fähigkeiten machen ihn zu einem interessanten Wachstumsfaktor in der Tumorforschung, der in weiteren Studien ausführlich untersucht werden muß. In den vorliegenden Experimenten stimulierten beide Wachstumsfaktoren die Tumorzellen in ihrer IL-6 Sekretion. Das auf gesunde Zellen eigentlich inhibierende TGF $\beta$  wirkte sogar noch potenter als das TGF $\alpha$ .

TGF $\alpha$  könnte also seine tumorprogressionsfördernde Wirkung neben einem direkten Effekt auch über seine IL-6 Sekretionsstimulation vermitteln. Dagegen verliert TGF $\beta$  durch seine deutliche IL-6 Sekretionssteigerung einen Teil seiner inhibierenden Potenz und wirkt in Tumoren dadurch oft stimulierend.

Leider konnte auf Grund der geringen Zellausbeute keine Untersuchung an einem Prolactinom vorgenommen werden. Weitere Arbeiten in dieser Richtung sind empfehlenswert, um Aussagen über IL-6 Sekretion und PRL im Zusammenhang mit den Wachstumsfaktoren machen zu können.

Estradiol beeinflusst die Produktion von IL-6 sehr unterschiedlich. In einer jüngeren Studie konnte eine inhibierende Wirkung von Estradiol auf die PACAP abhängige IL-6 Sekretion in FS-Zellen gezeigt werden (Nagashima et al. 2003).

In der vorgelegten Arbeit konnte ein deutlich stimulierender Effekt von Estradiol auf das IL-6 Sekretionsverhalten der untersuchten Prolactinomzellkultur festgestellt werden. Dieser Befund führte zu einer weitergehenden Studie, in der entsprechende Untersuchungen an einer größeren Anzahl lactotroper und lactosomatotroper Adenome durchgeführt wurde und das Ergebnis bestätigte (Onofri et al. 2004).

Im Gegensatz dazu war bei den Zellkulturen der anderen untersuchten Adenome festzustellen, daß sich alle Sekretionswerte nach E2 Stimulation nahe um ihre jeweiligen Basalwerte bewegten (Abb.12). Dieser Befund spricht für einen eindeutig spezifischen Effekt von Estradiol auf Prolactinome. Das Steroidhormon stimuliert in Prolactinomzellkulturen die IL-6 Produktion und Sekretion.

Andere Faktoren wie IGF-1, Octreotid oder der Dopamin-Agonist Bromocriptin beeinflussen die IL-6 Sekretion sehr inhomogen und nur in therapeutisch unphysiologisch hohen Konzentrationen. Hier muß man eher von keinem Effekt auf die Tumorprogression über den Weg der IL-6 Sekretion ausgehen.

IGF-1 ist der Mediator des GH in der Peripherie und wird überwiegend in der Leber produziert. Der Wachstumsfaktor erreicht die Hypophyse nicht nur über den Blutweg, sondern wird dort auch selbst sezerniert (Renner et al. 1996). Untersuchungen ergaben den direkten Einfluß von GH auf die IGF-1 Synthese in der Hypophyse sowie umgekehrt ebenso eine Feedback-Regulation auf die GH-Sekretion (Ray u. Melmed 1997). Der wachstumsstimulierende Effekt war jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht mit einem Anstieg der IL-6 Sekretion verbunden. Auch bei den Kulturen somatotroper Zellen gab es keine einheitliche Tendenz in ihrer Reaktion. Jedoch war zu beobachten, daß bei den Zellkulturen mit sehr niedriger IL-6 Sekretion eine

Reaktion im Grunde ausblieb. Dagegen trat bei den Tumoren mit hoher nachgewiesener IL-6 Basalsekretion eine dosisabhängige Reaktion auf (Abb.10).

Mit Octreotid steht ein Medikament zur Behandlung der Akromegalie zu Verfügung, welches erfolgreich die Plasmakonzentration von GH und IGF-1 auf Normalwerte zu senken vermag. Es konnten dem Medikament jedoch keine positiven Effekte auf die Tumorgröße nachgewiesen werden (Newman et al. 1998, Melmed et al. 1998). In den Stimulationsexperimenten ist kein einheitlicher Effekt auf die somatotropen Zellkulturen nachgewiesen worden. Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten Cushingzellkulturen eine eindeutige Inhibition der IL-6 Sekretion nach Zugabe des Somatostatinanalogons (Abb.9). Für eine weitere Interpretation waren die Sekretionsergebnisse nach Stimulation zu inhomogen.

Das gilt ebenfalls für die Ergebnisse bei der Stimulation mit Bromocriptin, wobei dabei auch die niedrige Fallzahl, aufgrund mangelnden Tumorgewebes eine Rolle spielt.

Eindeutig erkennbar war die inhibierende Wirkung des Corticosteroid Dexamethason auf die IL-6 Sekretion und damit auf die Tumorprogression. Es ist bekannt gewesen, daß Dexamethason die peritumorale IL-6 Sekretion (über die Hemmung der FS-Zellen) inhibiert (Renner et al. 1998). Dieser und der hier gezeigte Effekt wären eine Erklärung, warum corticotrope Adenome langsam wachsen und sich in den meisten Fällen nur zu Mikroadenomen entwickeln, die in 80% der Fälle mit Verfahren der klassischen Bildgebung nicht nachweisbar sind. Der Hypercortizismus unterdrückt in Patienten mit Morbus Cushing über die Suppression von IL-6 dessen stimulierende Effekte auf Wachstum, Neovaskularisation und Invasivität von corticotropen Hypophysenadenomen (Páez Pereda et al. 2000). Dies wäre so auch eine Erklärung für die vergleichsweise niedrige IL-6 Basalsekretion (MW 14,45pg/ml) der untersuchten corticotropen Adenomen (Tab.3).

Im Gegensatz zur normalen Hypophyse, bei der die stimulierende Wirkung des Cytokins auf die ACTH- und GH-Sekretion bekannt war (Renner et al. 1996, Renner et al. 1997), gab bis zur vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zur Wirkung von IL-6 auf die tumorale Hormonproduktion.

Mit der vorliegenden Studie wurde erstmals gezeigt, daß IL-6 die GH-Sekretion in somatotropen Hypophysenadenomen stark stimuliert. Das Cytokin erwies sich gegenüber dem direkten Releasinghormon aus dem Hypothalamus als potenterer Stimulator (Thiele et al. 2003).

Parallel wurden in einer anderen Studie ähnliche Effekte bei der ACTH Produktion in den corticotropen Hypophysenadenomen nachgewiesen. IL-6 wirkt dabei sowohl auf die Hormonsekretion als auch auf die Hormonsynthese (Páez Pereda et al. 2000). Denkbar ist, daß peritumorales, von FS-Zellen gebildetes IL-6, zusammen mit intratumoralem IL-6 auto-/parakrin die Funktion von Hypophysenadenomzellen stimuliert und somit zur exzessiven Hormonsekretion endokrin aktiver Tumoren beitragen kann. Diese Resultate führen zwangsläufig zu einer Suche nach Möglichkeiten eine hohe IL-6 Konzentration in den Tumorgeweben zu verhindern oder wenigstens zu senken, wie in der vorliegenden Arbeit mit der Behandlung mit Dexamethason erreicht wurde. Ein anderer Ansatz wäre eine Unterdrückung der Signalwirkung von IL-6 durch Blockierung des initialen Signaltransduktors gp130, wie von Perez Castro et al. gezeigt (Perez Castro et al. 2003).

Bei der Interpretation der Meßergebnisse gelingt es nur sehr begrenzt eine homogene Gruppe von einheitlichen Reaktionen auf die Stimulation auch innerhalb der Adenomtypen zu finden. Eine Erklärung für dieses Bild ist in einer Tumorindividualität zu suchen, die klinisch bekannt ist und im unterschiedlichen Ansprechen der medikamentösen Therapie beobachtet wird. Die Heterogenität der Tumoren drückt sich auch durch eine unterschiedliche Rezeptorendichte aus. So muß man ein unterschiedliches Dose Response Verhalten der Tumoren feststellen, was sich nicht nur zwischen den unterschiedlichen Adenomtypen zeigt, sondern ebenfalls in der jeweiligen Tumorgruppe zu beobachten ist.

Durch dieses individuelle Ansprechen der Tumoren ist eine tiefere Interpretation der Ergebnisse nur sehr begrenzt möglich und beschränkt sich auf sich abzeichnende Tendenzen.

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 42 Hypophysenvorderlappentumoren unterschiedlicher Gewebsgröße aus insgesamt 4 neurochirurgischen Kliniken zur Verfügung. Eine größere Fallzahl war leider nicht zu erreichen, da zum einen die Gewebsgewinnung mit einem deutlichen Mehraufwand gegenüber der

herkömmlichen Operationsmethode verbunden war und zum anderen die konservative Therapie, die medikamentöse Inhibition oder Radiotherapie, nach Möglichkeit der invasiven vorgezogen wird. Gerade auch die niedrige Zellzahl, die nach der Tumoraufbereitung für die Stimulationsexperimente zur Verfügung stand, verhinderte ausführlichere Studien und damit die Ausweitung auf mehr Faktoren oder mehr Konzentrationsabhängigkeitsstudien.

Beim Betrachten gegebenenfalls unerwarteter Meßergebnisse, die die Befunde beeinflußt haben können, muß die Gesamtheit der einzelnen Arbeitsschritte und deren Streubreite berücksichtigt werden. Das betrifft die Technik der Zellkultivierung, die Methodik mittels Enzym-Immunoassay sowie eine Vielzahl weiterer überschaubarer oder unerkannter Einflußfaktoren.

Da bei den Hypophysenadenomen die Diagnose eventuell erst zu einem späten Entwicklungszeitpunkt gestellt wird, könnte des weiteren ein höheres Alter des Tumors gegenüber jüngeren zu einer Inhomogenität der Meßergebnisse führen. Das Tumoralter und damit eine unterschiedlich starke IL-6 Sekretion der Tumorzellen wären so eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die, im Vergleich zu den anderen Tumoren, relativ niedrige Basalsekretion der Cushing Adenome (Tab.2, 3 und 4). Da der Hypercortizismus eine Klinik verursacht, der früher zu einer Diagnose führt als bei den anderen Hypophysenadenomen, handelt es sich somit um eventuell jüngere Tumorzellen. Um darüber jedoch eine Aussage zu machen, wären weitere Untersuchungen unter ausführlicher Berücksichtigung der Patientendaten nötig.

Nach der Aussaat wurde den Zellen eine durchschnittliche Zeit von 3 Tagen gegeben um sich zu regenerieren und anzuwachsen. Erst wenn mikroskopisch das Bild einer konfluent gewachsenen Kultur zu sehen war, wurde mit den Stimulationsexperimenten begonnen. Für die Arbeit mit den Zellkulturen blieb insgesamt ein nur recht kleines Zeitfenster von cirka 8 Tagen, da dann die Zahl der unvermeidlich mitausgesäten Fibroblasten stark anstieg und so den Tumorzellen der Raum und die notwendigen Nährstoffe genommen wurden. Nach 10 Tagen war die Zellkultur mit Fibroblasten überwuchert und ein aussagefähiges Experiment somit nicht mehr möglich. 24 Stunden nach Stimulationsbeginn wurde der Überstand abgenommen, in Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

In den untersuchten Hypophysenadenomen sezernierten die Tumorzellen schon unter basalen Bedingungen zum überwiegenden Teil relativ große Mengen an IL-6. Wenn man das Volumen der Zellüberstände mit 0,5ml auch noch als Verdünnungsfaktor einbezieht liegt die IL-6 Konzentration an den Zellgrenzen noch deutlich höher. Es ist anzunehmen, daß die IL-6 Produktion in vielen Hypophysentumoren ein autonomer Prozeß ist, wenngleich sie zum Beispiel durch Glucocorticoide stark inhibiert und durch PACAP sowie TGF $\alpha$  und TGF $\beta$  stimuliert werden kann. IL-6 bewirkt an sezernierenden HVL-Adenomen einen Hormonsekretionsanstieg. Zusammengefaßt sprechen die Befunde dafür, daß in Hypophysentumoren produziertes IL-6 über auto-/parakrine Mechanismen sowohl die Pathophysiologie als auch die Progression von Hypophysentumoren stimuliert. Es ist durchaus denkbar, daß auf Grundlage dieser und ähnlicher gemachter experimenteller Befunde therapeutische Konzepte für die Behandlung von Hypophysenadenomen entwickelt werden können, die auf eine Senkung der intratumoralen IL-6 Produktion zielen oder die Signaltransduktion des Cytokins unterbinden.

## 5 Zusammenfassung

Aus 42 eingeschickten HVL-Adenomen wurden nach standardisiertem Schema Zellkulturen angelegt und diese Kulturen auf ihre IL-6 Basalsekretion (40) sowie 33 Kulturen auf ihr Ansprechen auf verschiedene Faktoren in ihrer Cytokinsekretion hin untersucht. 9 somatotrope Zellkulturen wurden auf ihre Wachstumshormonsekretion sowie deren IL-6 Abhängigkeit hin untersucht

In fast allen untersuchten Tumorzellkulturüberständen (39 von 40) war IL-6 in nachweisbaren Konzentrationen zu messen. Die Versuchsbedingungen schlossen andere IL-6 Quellen als die Tumorzellen selbst aus.

Auf unterschiedliche Faktoren, die den Zellkulturen zugegeben wurden, reagierten die Tumorzellen in ihrer Cytokinsekretion zum Teil nicht oder sehr inhomogen, sodaß daraus keine Effekte postuliert werden konnten. Auf die Zugabe des Wachstumsfaktors PACAP kam es zu einem teilweisen (P-27) beziehungsweise einem deutlichen (P-38) Überwiegen einer IL-6 Sekretionserhöhung gegenüber der Basalsekretion. Hier kann man von einem positiv stimulierenden Trend des Faktors auf das Sekretionsverhalten der untersuchten Adenomzellkulturen sprechen.

Auf die Zugabe von TGF $\alpha$  sprachen alle untersuchten hormoninaktiven Tumoren mit einer IL-6 Sekretionssteigerung an. Auch bei den weiteren untersuchten Adenomen überwog ein Sekretionsanstieg, sodaß man von einem stimulierenden Trend im Sekretionsverhalten der untersuchten Tumoren auf die Testung mit TGF $\alpha$  sprechen kann.

Von 10 untersuchten Tumoren reagierten 9 mit einem IL-6 Sekretionsanstieg auf die Stimulation mit TGF $\beta$ . Die gemessene IL-6 Konzentration lag im Mittel bei 278% gegenüber ihrer Basalsekretion und verzeichnete damit den deutlichsten Sekretionsanstieg aller untersuchten Faktoren.

Dexamethason bewirkte bei allen untersuchten Tumorzellkulturen eine Inhibition ihrer IL-6 Sekretion. Die negative Stimulation lag im Mittel aller 33 untersuchten Adenome bei 39% ihrer unbehandelten Basalsekretion.

Das IL-6 verursachte bei den untersuchten GH sezernierenden Adenomen einen Anstieg ihrer Hormonsekretion. Dieser Effekt wäre eine mögliche Erklärung für die zum Teil immensen Plasmahormonkonzentrationen an Akromegalie erkrankter Patienten. Die Wirkung des IL-6 auf die GH Sekretion deckt sich mit dem Ergebnis von ACTH produzierenden Adenomen, die parallel gemacht wurden.



## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Bromo	Bromocriptin
BSA	Bovines Serum-Albumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNTF	ciliary nerve neurotrophic factor
CRH	Corticotropin-releasing-Hormon
CSF	Colony Stimulating Factor
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuklease I
DNase II	Desoxyribonuklease II
E2	Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötales Kälberserum
FGF-2 Gen	Fibroblast Growth Factor-2 Gen
FGF-4 Gen	Fibroblast Growth Factor-4 Gen
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FS-Zellen	follikulostellare Zellen
GH	Wachstumshormon
GHRH	growth hormone releasing hormone
gp	Glykoprotein
Gy	Gray
HDB-Puffer	bicarbonate hemodialysis Puffer
HEPES	2-hydroxyethyl piperazinyl ethanesulfonic acid
HHL	Hypophysenhinterlappen
HIV	human immunodeficiency virus
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
hu IL-6	humanes Interleukin-6
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL-1	Interleukin-1
IL-11	Interleukin-11
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
JAK	Janus Kinase
kDa	kilo-Dalton
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LOH Gen	loss of heterozygosity Gen
LPS	Lipopolysaccharid
LPS/LBP Komplex	Lipopolysaccharid/LPS Binding Protein Komplex

M	Molar
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mCD14	membranständiger cluster of differentiation 14
MEN-1 Gen	multiple endokrine Neoplasie-1 Gen
MW	Mittelwert
n.d.	Unter der Nachweisgrenze
P-27	PACAP-27
P-38	PACAP-38
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Proteine
PBS	Phosphat Buffered Saline
PEG-Lösung	Polyethylenglykol-Lösung
PRL	Prolactin
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sIL-6R	solubler Interleukin-6 Rezeptor
SMS	Octreotid
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
STH	Somatotropin
T3	Triiodthyronin
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor $\alpha$
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreoideastimulierendes Hormon
T-Zellen	thymusabhängige Lymphozyten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultra-Violettes Licht
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die zwei Hauptaktivierungswege von IL-6 .....	7
Abbildung 2: Strukturmodell des IL-6 Rezeptorkomplexes .....	8
Abbildung 3: Regulation der IL-6 Produktion in der FS-Zelle der Hypophyse.....	12
Abbildung 4: Tumorgenese-Modell der Hypophyse.....	15
Abbildung 5: IL-6 Basalsekretion der somatotropen Tumoren.....	30
Abbildung 6: IL-6 Basalsekretion der corticotropen Adenome und der Prolactinome	31
Abbildung 7: IL-6 Basalsekretion der hormoninaktiven Tumoren .....	32
Abbildung 8: Prozentuale Mittelwerte aller IL-6 Sekretionen nach Stimulation .....	33
Abbildung 9: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Octreotid $10^{-7}M$ .....	34
Abbildung 10: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit IGF-1 20ng/ml .....	36
Abbildung 11: Dose Response unter IGF-1 .....	37
Abbildung 12: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Estradiol $10^{-7}M$ .....	38
Abbildung 13: Dose Response unter Estradiol .....	39
Abbildung 14: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Bromocriptin $10^{-6}M$ .....	40
Abbildung 15: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Bromocriptin $10^{-7}M$ .....	41
Abbildung 16: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit PACAP-27 $10^{-7}M$ .....	43
Abbildung 17: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit PACAP-38 $10^{-7}M$ .....	43
Abbildung 18: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit TGF $\alpha$ 1ng/ml.....	45
Abbildung 19: Dose Response unter TGF $\alpha$ .....	46
Abbildung 20: IL-6 Sekretion nach Behandlung mit TGF $\beta$ 10ng/ml.....	47
Abbildung 21: IL-6 Sekretion in pg/ml vor und nach Behandlung mit Dexamethason $10^{-6}M$ .....	49
Abbildung 22: IL-6 Sekretion in pg/ml vor und nach Behandlung mit Dexamethason $10^{-6}M$ .....	50
Abbildung 23: Prozentuale IL-6 Sekretion nach Behandlung mit Dexamethason $10^{-6}M$ .....	51
Abbildung 24: Dose Response unter Dexamethason I .....	52
Abbildung 25: Dose Response unter Dexamethason II .....	52
Abbildung 26: GH Sekretion somatotroper Tumoren unter Stimulation mit IL-6 10ng/ml.....	53
Abbildung 27: Tumor AK2/2 Dose Response unter IL-6.....	54

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Untersuchung verwendete Tumoren.....	17
Tabelle 2: IL-6 Basalsekretion der somatotropen Tumoren .....	29
Tabelle 3: IL-6 Basalsekretion der corticotropen Adenome und der Prolactinome ...	30
Tabelle 4: IL-6 Basalsekretion der hormoninaktiven Tumoren.....	31
Tabelle 5: IL-6 Sekretion nach Testung mit Octreotid.....	34
Tabelle 6: IL-6 Sekretion nach Testung mit IGF-1 .....	35
Tabelle 7: IL-6 Sekretion nach Testung mit Estradiol .....	37
Tabelle 8: IL-6 Sekretion nach Testung mit Bromocriptin $10^{-6}$ M .....	40
Tabelle 9: IL-6 Sekretion nach Testung mit Bromocriptin $10^{-7}$ M .....	40
Tabelle 10: IL-6 Sekretion nach Testung mit P-27.....	42
Tabelle 11: IL-6 Sekretion nach Testung mit P-38.....	42
Tabelle 12: IL-6 Sekretion nach Testung mit TGF $\alpha$ .....	44
Tabelle 13: IL-6 Sekretion nach Testung mit TGF $\beta$ .....	46
Tabelle 14: IL-6 Sekretion nach Testung mit Dex $10^{-6}$ M.....	48

## Literaturverzeichnis

- Allaerts, W., Jeucken, P. H. M., Debets, R., Hoefakker, S., Claassen, E., Drexhage, H. A., Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function, *Journal of Neuroendocrinology*, 9, 43-53 (1997).
- Arzt, E., Buric, R., Stelzer, G., Stalla, J., Sauer, J., Renner, U., Stalla, G. K., Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6, *Endocrinology*, 132, 459-467 (1993).
- Arzt, E., Stalla, G. K., Cytokines: Autocrine and paracrine roles in the anterior pituitary, *Neuroimmunomodulation*, 3, 28-34 (1996).
- Arzt, E., Páez Pereda, M., Perez Castro, C., Pagotto, U., Renner, U., Stalla, G. K., Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland, *Frontiers Neuroendocrinology*, 20, 71-95 (1999).
- Arzt, E., gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways, *The Journal of Clinical Investigation*, 108, 1729-1733 (2001).
- Asa, S. L., Ezat, S., The Cytogenesis and Pathogenesis of Pituitary Adenomas, *Endocrine Reviews*, 19(6), S. 798–827 (1998).
- Asa, S. L., Somers, K., Ezzat, S., The MEN-1 Gene Is Rarely Down-Regulated in Pituitary Adenomas, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, S. 3210-3212 (1998).
- Asa, S. L., Ramyar, L., Murphy, P. R., Li, A. W., Ezzat, S., The Endogenous Fibroblast Growth Factor-2 Antisense Gene Product Regulates Pituitary Cell Growth and Hormone Production, *Molecular Endocrinology*, 15 (4), S. 589-599 (2001).
- Asa, S. L., Ezzat, S., The Pathogenesis of Pituitary Tumors, *Nature Reviews Cancer*, 2, S. 836 -849 (2002).

- Ben-Shlomo, A., Miklovsy, I., Ren, S-G., Yong, W. H., Heaney, A. P., Culler, M. D., Melmed, S., Leukemia Inhibitory Factor Regulates Prolactin Secretion in Prolactinoma and Lactotroph Cells, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(2), S. 858-863, (2003).
- Bethin, K. E., Vogt, S. K., Muglia, L. J., Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation, *PNAS*, 97, S. 9317-9322, (2000).
- Borg, S. A., Kerry, K. E., Baxter, L., Royds, J. A., Jones, T. H., Expression of Interleukin-6 and its effects on growth of HP75 human pituitary tumor cells, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(10), 4938-4944 (2003).
- Chesnokova, V., Melmed, S., Minireview: Neuro-Immuno-Endocrine Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis by gp130 Signaling Molecules, *Endocrinology*, 143, S. 1571 – 1574 (2002).
- D'Abronzio, F. H., Swearingen, B., Klibanski, A., Alexander, J. M., Mutational analysis of activin/transforming growth factor- $\beta$  type I and type II receptor kinases in human pituitary tumors, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 1716-1721 (1999).
- Farnoud, M.R., Kujas, M., Derome, P., Racadot, J., Peillon, F., Li, J. Y., Interactions between normal and tumoral tissues at the boundary of human anterior pituitary adenomas, *Virchows Arch*, 424, 75-82 (1994)
- Gloddek, J., Paez Pereda, M., Pagotto, U., Stalla, G.K., Renner, U., Endocrine and auto-/paracrine regulation of the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) from pituitary folliculostellate cells by PACAP, IL-6 and glucocorticoids, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 106, S.49 (1998).
- Gloddek, J., Untersuchungen zur Physiologie der folliculostellaren Zelle der Hypophyse: Regulation und Bedeutung von IL-6 und VEGF, Dissertation der Fakultät für Biologie der LMU München, (1999).
- Gloddek, J., Lohrer, P., Stalla, J., Arzt, E., Stalla, G. K., Renner, U., The intrapituitary stimulatory effect of lipopolysaccharide on ACTH secretion is mediated by

- paracrine-acting IL-6, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 109, S. 410-415, (2001).
- Graciarena, M., Carba-Nagashima, A., Perez-Castro, C., Giacomini, D., Páez-Pereda, M., Renner, U., Stalla, G. K., Arzt, E., Pituitary gp130 cytokine networks, *Pituitary and Periphery: Communication In and Out*, S. 197-208, (2003).
- Hanisch, A., Dieterich, K. D., Dietzmann, K., Lüdecke, K., Buchfelder, M., Fahlbusch, R., Lehnert, H., Expression of members of the Interleukin-6 family of cytokines and their receptors in human pituitary and pituitary adenomas, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 4411-4414 (2000).
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., Schaper, F., Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem J.*, 374, 1-20 (2003).
- Holub, M. Cs., Szalai, Cs., Polgár, A., Tóth, S., Falus, A., Generation of "truncated" interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA by alternative splicing; a possible source of soluble IL-6R, *Immunology Letters*, 68, 121-124 (1999).
- Igaz, P., Horváth, A., Horváth, B., Szalai, Cs., Pállinger, È., Rajnavölgyi, È., Tóth, S., Rose-John, S., Falus, A., Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) makes IL-6R negative T cell line respond to IL-6; it inhibits TNF production, *Immunology Letters*, 71, 143-148 (2000).
- Inoue, K., Couch, E. F., Takano, K., Ogawa, S., The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland, *Arch Histol Cytol.* Aug; 62(3):205-218. (1999)
- Jansson, J.-O., Svensson, J., Bengtsson, B.-Å., Frohman, L. A., Ahlman, H., Wängberg, B., Nilsson, O., Nilsson, M., Acromegaly and Cushing's syndrome due to ectopic production of GHRH and ACTH by a thymic carcinoid tumor: *in vitro* responses to GHRH and GHRP-6, *Clinical Endocrinology*, 48, 243-250 (1998).

- Jones, T. H., Justice, A., Price, A., Chapman, K., Interleukin-6 secreting human pituitary adenomas, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **73**, 207-209 (1991).
- Jones, T. H., Kennedy, R. L., Justice S. K., Price, A., Interleukin-1 stimulates the release of interleukin-6 from cultured human pituitary adenoma cells, *Acta Endocrinologica*, **128**, 405-410 (1993).
- Jones, S. A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., Fuller, G. M., The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease, *The FASEB Journal*, **15**, S. 43-58 (2001).
- Lohrer, P., Gloddek, J., Carbia Nagashima, A., Korali, Z., Hopfner, U., Paez Pereda, M., Arzt, E., Stalla, G. K., Renner, U., Lipopolysaccharide Directly Stimulates the Intrapituitary Interleukin-6 Produktion by Folliclostellate Cells via Specific Receptors and the p38 $\alpha$  Mitogen-Activated Protein Kinase/Nuclear Factor  $\kappa$ B Pathway, *Endocrinology*, **141** (12), S. 4457- 4465 (2000).
- März, P., Gadiant, R. A., Otten, U., Expression of interleukin-6 receptor (IL-6R) and gp130 mRNA in PC12 cells and sympathetic neurons: modulation by tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), *Brain Research*, **706**, 71-79 (1996).
- März, P., Herget, T., Lang, E., Otten, U., Rose-John, S., Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation, *European Journal of Neuroscience*, **10**, 2765-2773 (1998).
- März, P., Otten, U., Rose-John, S., Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors, *European Journal of Neuroscience*, **11**, 2995-3004 (1999).
- Matsumoto, H., Koyama, C., Sawada, T., Koike, K., Hirota, K., Miyake, A., Arimura, A., Inoue, K., Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3',5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation, *Endocrinology*, **133**, S. 2150-2155 (1993).



- Melmed, S., Jackson, I., Kleinberg, D., Klibanski, A., Current treatment guidelines for acromegaly, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 2646-2652 (1998).
- Melmed, S., The Pituitary, Blackwell Science Inc., Chapt.3, Chapt.10, Chapt.12, Chapt.16, Gebundene Ausgabe (2002).
- Melmed, S., Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary, *Journal Clin. Invest.*, 112, S. 1603-1618 (2003).
- Nagashima, A. C., Giacomini, D., Perez Castro, C., Páez Pereda, M., Renner, U., Stalla, G. K., Arzt, E., Transcriptional regulation of interleukin-6 in pituitary folliculostellate TtT/GF cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201, 47-56 (2003).
- Newman, C. B., Melmed, S., George, A., Torigian, D., Duhaney, M., Snyder, P., Young, W., Klibanski, A., Molitch, M. E., Gagel, R., Sheeler, L., Cook, D., Malarkey, W., Jackson, I., Vance, M. L., Barkan, A., Frohman, L., Kleinberg, D. L., Octreotide as primary therapy for acromegaly, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 3034-3040 (1998).
- Onofri, C., Carbia Nagashima, A., Schaaf, L., Feirer, M., Lohrer, P., Stummer, W., Berner, S., Chervin, A., Goldberg, V., Stalla, G. K., Renner, U., Arzt, E., Estradiol Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-6 in Human Lactotroph and Lactosomatotroph Pituitary Adenomas, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 112, S. 18-23, (2004).
- Päth, G., Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, E., Scherbaum, W. A., Interleukin-6 and the Interleukin-6 Receptor in the Human Adrenal Gland: Expression and Effects on Steroidogenesis, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, S. 2343-2349, (1997).
- Páez Pereda, M., Lohrer, P., Kovalovsky, D., Perez Castro, C., Goldberg, V., Losa, M., Chervín, A., Berner, S., Molina, H., Stalla, G. K., Renner, U., Arzt, E., Interleukin-6 is inhibited by glucocorticoids and stimulates ACTH secretion and POMC expression in human corticotroph pituitary adenomas, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 108, 202-207 (2000).

- Perez Castro, C., Giacomini, D., Nagashima, A. C., Onofri, C., Graciarena, M., Kobayashi, K., Páez-Pereda, M., Renner, U., Stalla, G. K., Arzt, E., Reduced expression of the cytokine transducer gp130 inhibits hormone secretion, cell growth, and tumor development of pituitary lactosomatotrophic GH3 cells, *Endocrinology*, 144(2), 693-700 (2003).
- Ray, D., Melmed, S., Pituitary Cytokine and Growth Factor Expression and Action, *Endocrine Reviews*, 18(2), S. 206-228, (1997).
- Renner, U., Brockmeier, S., Strasburger, C. J., Lange, M., Schopohl, J., Müller, O. A., Werder, K. V., Stalla, G. K., Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulation of GH release from human somatotroph adenoma cells: interaction with GH-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and octreotide, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 78, 1090-1096 (1994).
- Renner, U., Pagotto, U., Arzt, E., Stalla, G. K., Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review, *European Journal of Endocrinology*, 135, 515-532 (1996).
- Renner, U., Gloddek, J., Arzt, E., Inoue, K., Stalla, G. K., Interleukin-6 is an autocrine growth factor for folliculostellate-like TtT/GF mouse pituitary tumor cells, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 105, 345-352 (1997).
- Renner, U., Gloddek, J., Páez Pereda, M., Arzt, E., Stalla, G. K., Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells, *Domestic Animal Endocrinology*, 15(5), 353-362 (1998).
- Renner, U., Lohrer, P., Schaaf, L., Feirer, M., Schmitt, K., Onofri, C., Arzt, E., Stalla, G. K., Transforming Growth Factor- $\beta$  Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor Production by Folliculostellate Pituitary Cells, *Endocrinology*, 143(10), S. 3759-3765, (2002).
- Rezai, A. R., Rezai, A., Martínez-Maza, O., Vander-Meyden, M., Weiss, M. H., Interleukin-6 and interleukin-6 receptor gene expression in pituitary tumors, *Journal of Neuro-Oncology*, 19, 131-135 (1994).

- Rolhion, C., Penault-Llorca, F., Kemeny, J.L., Lemaire, J.J., Jullien, C., Labit-Bouvier, C., Finat-Duclos, F., Verrelle, P., Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas, *J Neurosurg*, 94(1), S. 97-101, (2001).
- Rose-John, S., Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors, *Acta Biochimica Polonica*, 50(3), S. 603-611, (2003).
- Schrell, U.M., Koch, H.U., Marschalek, R., Schrauzer, T., Anders, M., Adams, E., Fahlbusch, R., Formation of autocrine loops in human cerebral meningioma tissue by leukemia inhibitor factor, interleukin-6 and oncostatin M: inhibition of meningioma cell growth in vitro by recombinant oncostatin M. *J Pathol*, 183, S. 460-468, (1997).
- Schuster, B., Meinert, W., Rose-John, S., Kallen, K.-J., The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane, *FEBS Letters*, 538, S. 113-116, (2003).
- Shimon, I., Yan, X., Ray, D. W., Melmed, S., Cytokine-dependent gp130 receptor subunit regulates human fetal pituitary adrenocorticotropin hormone and growth hormone secretion, *J. Clin. Invest.*, 100, 357-363 (1997).
- Spangelo, B. L., MacLeod, R. M., Isakson, P. C., Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro, *Endocrinology*, 126, 582-586 (1990).
- Tadamitsu, K., Shizuo, A., Masashi, N., Tetsuya, T., Interleukin-6 Family of Cytokines and gp130, *BLOOD*, 86, S. 1243-1254 (1995).
- Thiele, J.-O., Lohrer, P., Schaaf, L., Feirer, M., Stummer, W., Losa, M., Lange, M., Tichomirowa, M., Arzt, E., Stalla, G. K., Renner, U., Functional in vitro studies on the role and regulation of Interleukin-6 in human somatotroph pituitary adenomas, *European Journal of Endocrinology*, 149, S.455-461, (2003).
- Turnbull, A. V., Rivier, C. L., Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanism of Action, *Physiological Reviews*, 79(1), S. 1-71, (1999).
- Varghese, J. N., Moritz, R. L., Lou, M.-Z., Donkelaar, A. V., Ji, H., Ivancic, N., Branson, K. M., Hall, N. E., Simpson, R. J., Structure of the extracellular

domains of the human interleukin-6 receptor  $\alpha$ -chain, *PNAS*, 99(25), S. 15959-15964, (2002).

Velkeniers, B., Vergani, P., Trouillas, J., D'Haens, J., Hooghe, R. J., Hooghe-Peters, E. L., Expression of IL-6 mRNA in normal rat and human pituitaries and in human pituitary adenomas, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 42, 67-76 (1994).

Venihaki, M., Dikkes, P., Carrigan, A., Karalis, K. P., Corticotropin-releasing hormone regulates IL-6 expression during inflammation, *Journal of Clinical Investigation*, 108, S. 1159-1166, (2001).

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Thiele, J.-O., Lohrer, P.J., Gloddek, J., Losa, M., Uhl, E., Müller, A., Lange, M., Stalla, G.K., Renner, U., Regulation of IL-6 in pituitary adenomas, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108 (Suppl. 1), S. 4, 2000 (Vortrag)

Thiele, J.-O., Lohrer, P.J., Schmitt, K., Losa, M., Uhl, E., Arzt, E., Stalla, G.K., Renner, U., Intratumoral interleukin-6 probably contributes to the excessive growth hormone production in somatotroph pituitary adenomas, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108, A. 27, 2000 (Poster)

Thiele, J.-O., Paez Pereda, M., Lohrer, P.J., Losa, M., Uhl, E., Müller, A., Lange, M., Stalla, G.K., Renner, U., Regulation and role of interleukin-6 in pituitary adenomas, *Pituitary* 3, P. 50, 2000 (Poster)

Thiele, J.-O., Paez Pereda, M., Lohrer, P.J., Gloddek, J., Losa, M., Uhl, E., Müller, A., Lange, M., Arzt, E., Stalla, G.K., Renner, U., Regulation and role of interleukin-6 in pituitary adenomas, *Max-Planck-Institut, Institutssymposium*, 2000 (Poster)

Thiele, J.-O., Lohrer, P.J., Schaaf, L., Feirer, M., Stummer, W., Losa, M., Lange, M., Tichomirowa, M., Arzt, E., Stalla, G. K., Renner, U., Functional in vitro studies on the role and regulation of Interleukin-6 in human somatotroph pituitary adenomas, *European Journal of Endocrinology*, 149, S.455-461, 2003 (Artikel)

Sowie in Vorbereitung:

Thiele, J.-O., Lohrer, P.J., Schaaf, L., Feirer, M., Stummer, W., Losa, M., Lange, M., Tichomirowa, M., Arzt, E., Stalla, G. K., Renner, U., Functional in vitro studies on the regulation of Interleukin-6 in human pituitary adenomas. 2005 (Artikel)

## **Mein Dank gilt**

Herrn Prof. Dr. G.K. Stalla für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. U. Renner für seine wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung, erst seine Hilfestellungen und seine Fachkompetenz haben diese Arbeit zustande kommen lassen.

Den MitarbeiterInnen und KollegInnen der AG Stalla für ausführliche und stets geduldige Anleitung, Hilfe und Erklärung. Die Zusammenarbeit war eine große Bereicherung und Freude für mich.

Meiner Frau, meinen Eltern sowie meinem Bruder, ohne deren Geduld, Toleranz und hilfreichen Diskussionen eine Fertigstellung nicht möglich gewesen wäre.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Angaben

Name: Jan-Oliver Thiele  
Anschrift: Andreas-Sammer-Straße 9, D-82061 Neuried  
Tel.: 089/69380904  
Email: GPJOT@web.de  
Geburtsdatum/-ort: 25.05.1971 in Crivitz  
Eltern: Sibylle Thiele, geb. Pabst, Fachärztin für Allgemeinmedizin und Prof. Dr. Dr. Hans-Jürgen Thiele, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Diplomchemiker  
Familienstand: verheiratet mit Andrea Thiele, geb. Bogdan, Diplomphilologe

### Ausbildung

1978 - 1988 Polytechnische Oberschule, Dresden  
1988 - 1990 Erweiterte Oberschule, Dresden  
1993 - 2003 Ludwig-Maximilians-Universität, München  
August 1996 Physikum  
August 1999 1. Staatsexamen  
April 2002 2. Staatsexamen  
November 2003 3. Staatsexamen  
2000 - 2004 Promotionsarbeit im MPI für Psychiatrie, München

### Beruf

1990 - 1993 Pflegehelfer im Krankenhaus München Harlaching  
1993 - 1995 Sitzwachentätigkeit im Krankenhaus München Harlaching  
1995 - 1998 Freiberufliche Tätigkeit, Medienanalyse  
1998 - 2003 Angestelltenverhältnis bei Public Media Information, Medienanalyse  
2003 - jetzt ärztliche Aushilfe in der chirurgischen Notaufnahme des KKH Starnberg

### Praktikum

1995 Halbjähriger Studienaufenthalt in London, England,  
2002 - 2003 das Praktische Jahr im Krankenhaus München Harlaching (Chirurgie) sowie im KKH Starnberg (Innere Medizin und Anästhesie)