

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Florian Holsboer

**Expression und funktionelle Bedeutung
von Aktivin A und Aktivin-Rezeptoren in der Hypophyse
und in Hypophysentumorzellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sandra Ramona Pezolt

aus Bayreuth

2011

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München (LMU)

Berichterstatter: Prof. Dr. Günter K. Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Till Roenneberg
Priv. Doz. Dr. Cornelius Schüle

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Ulrich Renner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

- 1.1 Die Hypophyse
- 1.2 Hypophysentumore
- 1.3 Zellmodelle zur Untersuchung der Hypophyse
- 1.4 Aktivin
 - 1.4.1 Aktivin Isoformen
 - 1.4.2 Aktivin Rezeptoren und Signaltransduktion
 - 1.4.3 Regulation von Aktivin
 - 1.4.4 Physiologische Funktion von Aktivin
 - 1.4.5 Rolle von Aktivin in Hypophysentumoren
- 1.5 Zielsetzung der Arbeit

2 Methodik

- 2.1 Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen
 - 2.1.1 Geräte und Materialien
 - 2.1.2 Chemikalien und Lösungen
- 2.2 Zellkultur
- 2.3 Stimulation
- 2.4 Wachstumsbestimmung mit WST Assay
- 2.5 RNA-Extraktion
- 2.6 Reverse Transkriptase- und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
- 2.7 Messung von VEGF und IL-6 mittels ELISA
- 2.8 Hormonbestimmung mittels RIA
- 2.9 Statistik

- 3 Ergebnisse
 - 3.1 mRNA-Expression von Aktivin und Aktivin-Rezeptoren in TtT/GF-, AtT20- und Maushypophysenzellen
 - 3.2 Wirkung von Aktivin A in Hypophysenzellen
 - 3.2.1 Wirkung von Aktivin A auf die Proliferation von Hypophysenzelllinien
 - 3.2.2 Wirkung von Aktivin A auf die Sekretion von VEGF und IL-6 in TtT/GF- und Hypophysenvorderlappenzellen (Maus)
 - 3.2.3 Wirkung von Aktivin A auf die Sekretion von ACTH in AtT20- Zellen
- 4 Diskussion
- 5 Zusammenfassung
- 6 Literaturverzeichnis
- 7 Danksagung
- 8 Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis:

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

LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia Inhibiting Factor
PAP	PDGF assoziiertes Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor (Platelet-Derived Growth Factor)
PI3K	Phosphatitylinositol-3-Kinase
PLC γ	Phospholipase C γ 1
POMC	Proopiomelanocortin
PRL	Prolaktin
PRH	Prolaktin-Releasing-Hormon
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular endothelial Growth Factor)
VIP	Vasointestinales Peptid
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Hypophyse

Die Hypophyse ist eine Hormondrüse, die eine übergeordnete Funktion in der Regulation des endokrinen Systems im Körper übernimmt. Sie ist zentral an der Steuerung des Stoffwechsels, der Stressantwort, des Wachstums, des Immunsystems und des Reproduktionssystem beteiligt. Die Hypophyse ist ein annähernd haselnussgroßes Organ in der Sella turcica des Os sphenoidale und liegt unmittelbar unter dem Hypothalamus, mit dem sie strukturell und funktionell eng verbunden ist. Sie besteht aus zwei Teilen mit ganz unterschiedlicher Struktur und Entwicklung. Man unterscheidet den Vorderlappen, die Adenohypophyse, die aus oropharyngealem Ektoderm, der sogenannten Rathke-Tasche entsteht und den Hinterlappen, die Neurohypophyse, die entwicklungsgeschichtlich ein Teil des Zwischenhirns ist. (Amar et al., 2003)

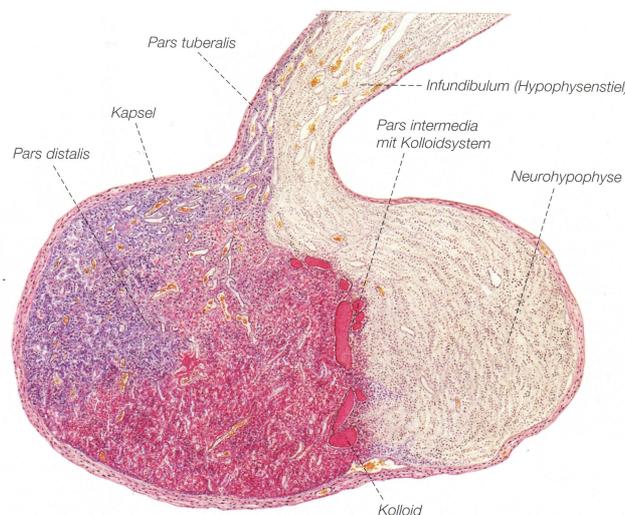


Abbildung Nr. 1: Hypophyse, Sagittalschnitt. HE Färbung aus Welsch, 2003.

Der Hypophysenzwischenlappen, der bei Nagetieren noch deutlich vorhanden ist, ist beim Menschen nur rudimentär ausgebildet. Über das Infundibulum ist die Hypophyse funktionell durch ein Pfortadersystem und magnozellige Neurone mit dem Hypothalamus verbunden. (Stalla GK et al., 2006)

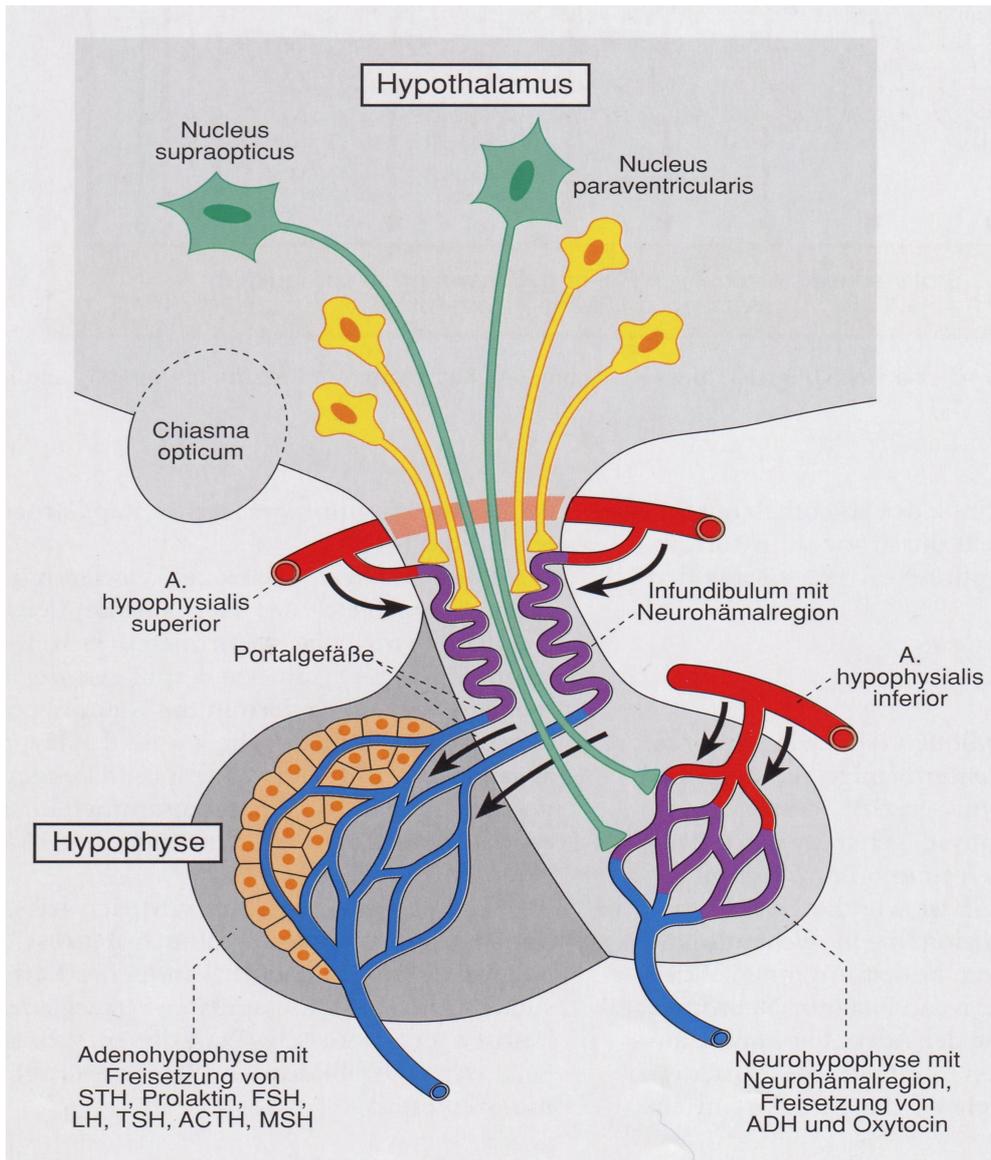


Abbildung Nr. 2: Verknüpfung von Hypothalamus und Hypophyse. (Welsch, 2003) Über ein Portalgefäßsystem ist die Hypophyse mit den Neuronen des Hypothalamus verbunden. Releasing- und Inhibiting- Hormone werden axonal transportiert, bis sie in spezielle Blutkapillaren abgegeben werden und über das Pfortadersystem in die Adenohypophyse und zu ihren Zielzellen gelangen.

Die dichtgelagerten Drüsenzellen der Adenohypophyse werden lichtmikroskopisch in drei Zellgruppen eingeteilt. Es existieren azidophile (somatotrope und laktotrope Zellen), basophile (gonadotrope, thyretrope und kortikotrope Zellen) und chromophobe Zellen.

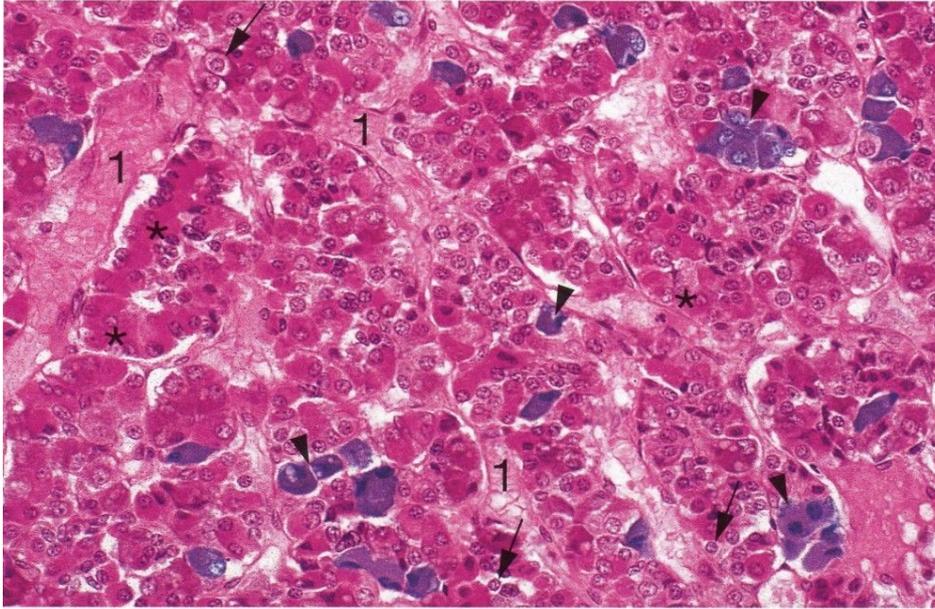


Abbildung Nr. 3: HE Färbung mit azidophilen (rot, *) und basophilen (violett-blau, ►) Zellen; einzelne chromophobe Zellen (ungefärbt, →); 1 sinusoidale Kapillaren. (Welsch, 2003)

Tabelle 1: Hormonproduktion der hypophysären Zellpopulationen

	Azidophile Zellen	Basophile Zellen	Chromophobe Zellen
Hormonsekretion	GH, Prolaktin	FSH, LH, TSH, ACTH, MSH	Keine Hormone

Die Begriffe azidophil und basophil beziehen sich hier auf Färbereigenschaften der zytoplasmatischen hormonhaltigen Sekretionsgranula. Chromophobe Zellen können mit keinem Farbstoff angefärbt werden, da ihnen die Granula fehlen. Ihnen gehören vermutlich erschöpfte, degranulierte endokrine Zellen, aber auch Stammzellen und die follikulostellaren Zellen an. Die Sekretion der Hormone der Adenohypophyse wird über verschiedene Regelkreise zwischen Hypothalamus, Hypophyse und peripherem Gewebe gesteuert. Der Hypothalamus sezerniert nach Integration verschiedener Reize höherer Zentren und nach einer zirkadianen Rhythmik Releasing- (CRH, GnRH, TRH, GHRH) oder Inhibiting-Hormone (GHIH, Dopamin) (siehe Abbildung Nr.4). Diese erreichen nach axonalem Transport in die Eminentia mediana und dortiger Abgabe in spezielle Blutkapillaren über anschließende Portalgefäße die Adenohypophyse, in der ihre Zielzellen liegen. Dort werden die Drüsenzellen zur Ausschüttung der Hypophysenhormone stimuliert oder inhibiert. Über

Feedback Mechanismen wird das ganze System reguliert (Abb. 5).

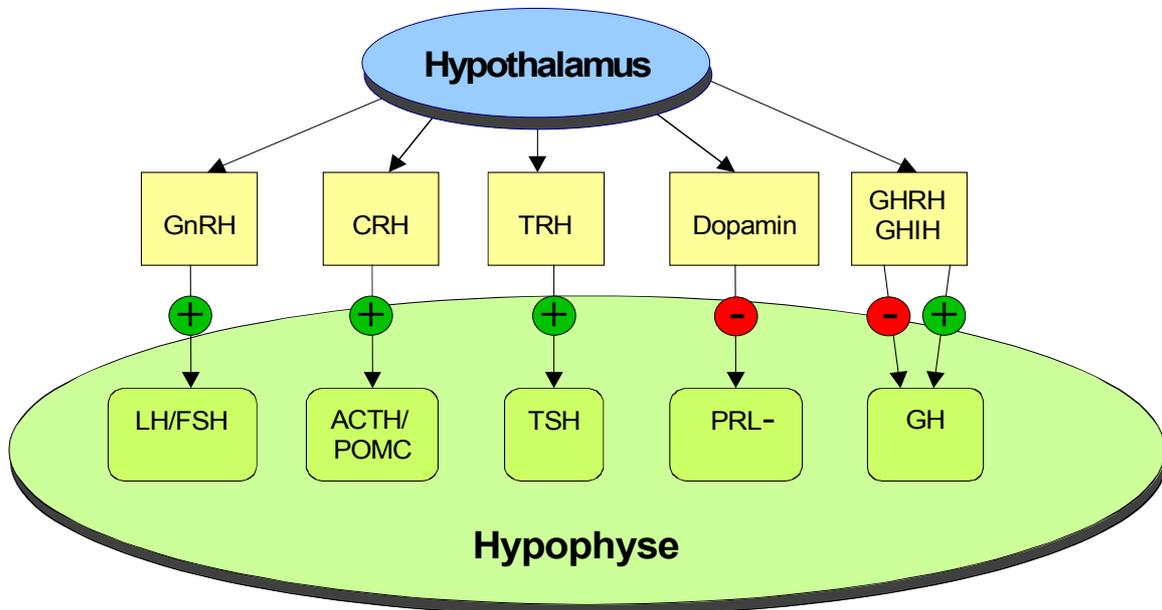


Abbildung Nr.4: Der Hypothalamus sezerniert Releasing- oder Inhibiting-Hormone, die wiederum die Hypophyse zur Ausschüttung der Hypophysenhormone LH, FSH, ACTH, TSH, PRL und GH stimulieren oder hemmen.

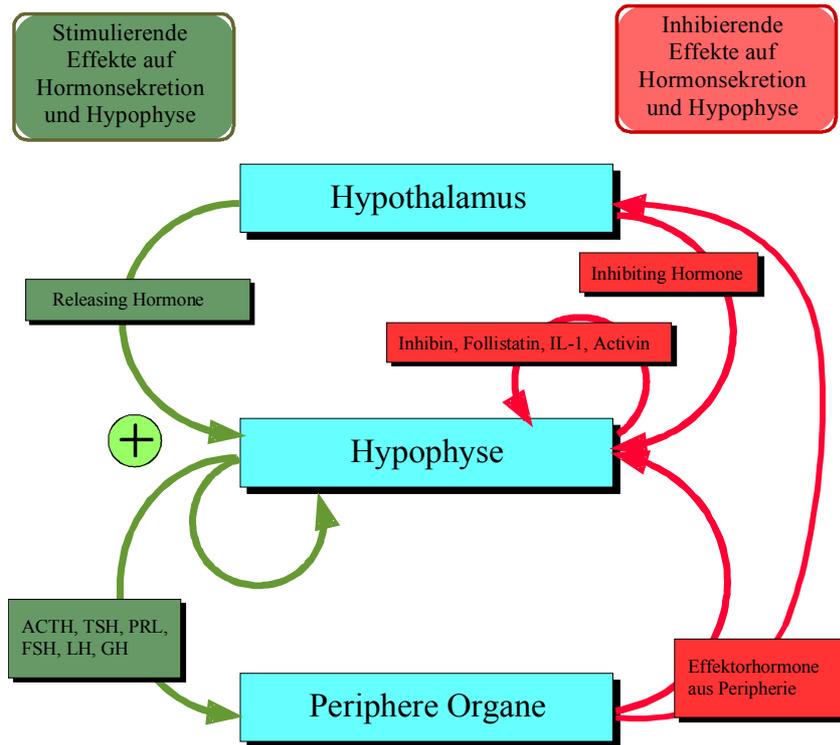


Abbildung Nr. 5: Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und der Peripherie zur Ausschüttung von Hormonen und deren Feedback-Mechanismen.

Unterschieden werden Hormone, die direkt auf ihre Zielorgane einwirken (nichtglandotrope Hormone), und solche, welche die Hormonproduktion nachgelagerter endokriner Drüsen stimulieren (glandotrope Hormone). Das Wachstumshormon (GH) und Prolaktin (PRL) wirken direkt auf ihre Zielorgane. Sie stellen somit nicht-glandotrope Hormone dar. Als glandotrope Hormone werden ACTH, TSH, LH und FSH bezeichnet.

LH und FSH werden gemeinsam von den gonadotropen Zellen produziert. ACTH, TSH, GH und PRL werden von jeweils einem spezialisierten Zelltyp gebildet und sezerniert. (Stalla et al., 2006).

Desweiteren besteht die Adenohypophyse zu ca. 5-10% aus follikulostellaren Zellen vermutlich mikroglialen Ursprungs, die mittels Zytokinen parakrin die endokrinen Zellen regulieren und somit koordinierend auf die Hormonausschüttung einwirken (siehe Kapitel 1.2) (Renner et al., 1996; Inoue, Couch et al. 1999).

Zusätzlich werden im HVL auch Neuropeptide, Zytokine, Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) und weitere Substanzen (z.B. Aktivin, Follistatin, Inhibin) gebildet. (Stalla et al., 2006)

Die Neurohypophyse entsteht aus einer nach kaudal reichenden Ausstülpung des Zwischenhirns und beinhaltet eine Vielzahl von Axonendigungen, deren Perikaryen im Hypothalamus liegen. In den Nuclei supraoptikus und paraventricularis werden die Hormone ADH und Oxytozin gebildet und in der Neurohypophyse ins Blut sezerniert (s. Abb. Nr. 2). ADH, auch Vasopressin genannt, sorgt für die Wasserrückresorption in der Niere und somit auch für eine Blutdruckregulation. Oxytozin löst die Wehentätigkeit bei der Geburt und die Milchausschüttung durch Kontraktion der myoepithelialen Zellen aus.

1.2 Hypophysentumoren

Hypophysentumoren, auch Hypophysenadenome genannt, repräsentieren ca. 10-15% aller intrakranieller Tumoren. Sie sind in der Regel gutartige Tumoren, die sich aus veränderten Zellen des Hypophysenvorderlappens entwickeln. Die Einteilung erfolgt zum Einen nach dem Durchmesser, wobei diejenigen mit einem Durchmesser kleiner 10 mm Mikroadenome und die mit einem Durchmesser größer als 10 mm Makroadenome darstellen. Ferner wird zwischen hormonaktiven und –inaktiven Tumoren unterschieden.

Die Hypophysenadenome lassen sich in Prolaktinome (50%), inaktive Tumoren (23%), GH bildende Tumore, sogenannte Somatotropinome (21%), ACTH produzierende, sogenannte Kortikotropinome (5%), TSH bildende und Gonadotropinome (1%) unterteilen (Renner et al. 2001).

Tabelle 2: Anteil der einzelnen Adenomarten an allen Hypophysentumoren.

Hypophysenadenom	Anteil an den Adenomen gesamt
Prolaktinome	50%
hormoninaktive Tumoren	23%
Somatotropinome	21%
Kortikotropinome	5%
Gonadotropinome	1%

Bezüglich der Ätiopathogenese von Hypophysentumoren wird seit langem eine Diskussion geführt, die zwei Entstehungsmodelle gegenüberstellt: Die hormonelle oder auch hypothalamische Hypothese und die intrahypophysäre Hypothese.

Bei der hypothalamischen Hypothese geht man davon aus, dass eine gesteigerte Stimulation bzw. eine fehlende Inhibition, z.B. durch Hormone (Releasing-Hormone), Wachstumsfaktoren und angiogenetische Substanzen (VEGF, TGF alpha und beta, EGF usw.) zur Entstehung von Hypophysentumoren führt. Sie können Hyperplasie und Zellproliferation auslösen und somit die Wahrscheinlichkeit für einen Zelldefekt und Mutationen erhöhen. Erkenntnisse, die für diese Hypothese sprechen sind zum Einen, dass in Adenomen die hypothalamische Kontrolle teilweise intakt ist und zum Anderen in Hypophysentumoren ein Verlust von Releasing- und Inhibiting-Hormonsignalen zu verzeichnen ist (Stalla et. al., 2006).

Ein wichtiger Regulationsmechanismus der Zell zu Zell Kommunikation der Hypophysenzellen findet auf autokrinem und parakrinem Wege durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasogene Substanzen statt. Im Anfangsstadium der Tumorentwicklung nach Entstehung einer Adenom-Stamm-Zelle durch Mutation und Transformation wird diese durch solche Substanzen beeinflusst. Je nach der Art der transformierten Zelle können Zytokine, vasoaktive Substanzen und Wachstumsfaktoren das Wachstum inhibieren (bei Mikroadenomen) oder verstärken (bei Makroadenomen) (Renner, et. al. 1996).

Die intrahypophysäre Hypothese besagt, dass sich Hypophysentumoren nach einer spontanen Mutation und einer nachfolgenden Transformation einer einzigen Zelle entwickeln. Eine solche Zelltransformation mit anschließendem abnormalem Wachstum entsteht durch Störungen in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose (Stalla et al., 2006). Dies kann durch Aktivierung von Stimulatoren des Zellzyklus, sogenannte Protoonkogene oder durch Inaktivierung von Wachstumshemmern oder Apoptose einleitenden Faktoren, sogenannten Tumorsuppressorgenen, geschehen.

Für das intrahypophysäre Entstehungsmodell spricht, dass Hypophysenadenome monoklonal sind. Zudem hat man zelluläre Abnormalitäten in Hypophysenadenomen gefunden. Außerdem gibt es keine Hyperplasie von Hypophysengewebe angrenzend an das Adenom.

1.3 Zellmodelle für die Untersuchung der Hypophyse

Als zelluläres Modell der normalen Hypophyse wurden Maushypophysenzellen verwendet, die aus Maushypophysen nach Dekapitation von Mäusen gewonnen wurden. Als Modell für Hypophysenadenome werden spezielle Hypophysentumorzelllinien verwendet, die, dem Tumor entsprechend, spezifische Eigenschaften besitzen:

Tabelle 3: Häufig verwendete Zelllinien und deren Charakteristika

	TtT/GF	MtT-S	AtT20	Alpha T3-1	GH-3	PDFS
Zellart	Follikulostellare Tumorzelllinie	Somatotrope Tumorzelllinie	Kortikotrope Tumorzelllinie	Gonadotrope Tumorzelllinie, GnRH-Rezeptor positiv	Laktosomatotrope Tumorzelllinie	Follikulostellare Tumorzelllinie
Spezies	Maus	Ratte	Maus	Maus	Ratte	Mensch
Hormone	Keine	GH	ACTH	Alpha Subunit	PRL, GH	keine
Zytokine, Wachstumsfaktoren	VEGF, IL-6, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, u.a.	VEGF, Follistatin, u.a.

In dieser Arbeit wurden für die Versuche die TtT/GF und AtT20-Zelllinie verwendet, deshalb werden im Folgenden nur diese beiden genauer erläutert.

Follikulostellare Zellen und die TtT/GF-Zelllinie

Follikulostellare Zellen (FS-Zellen) repräsentieren ca. 5-10% aller Zellen der Hypophyse. Sie besitzen ein charakteristisches, sternförmiges Aussehen und formen mit ihren langen Zellausläufern ein Netzwerk um endokrine Zellen des Vorderlappens. FS-Zellen sind sowohl untereinander als auch mit endokrinen Zellen über Gap Junctions verbunden (Morand et al., 1996). Es konnte nachgewiesen werden, dass sie in der Lage sind, elektrophysiologische Signale zu transduzieren (Fauquier et al., 2001). Die Expression des S100 Proteins und des

GFAP lassen auf einen neuroektodermalen Ursprung der Zellen schließen. FS Zellen produzieren IL-6, VEGF, TGF- β , bFGF, LIF und Follistatin. Anders als hormonproduzierende Zellen sind FS Zellen multifunktional. Sie sind an der Zell zu Zell Kommunikation innerhalb der Hypophyse beteiligt, modulieren die Reaktion der endokrinen Zellen auf immunologische und neuroendokrine Stimuli, regulieren das Ionenmilieu und besitzen gliale Fähigkeiten durch protektive und unterstützende Eigenschaften. Zudem sind FS Zellen zur Phagozytose befähigt und modulieren die extrazelluläre Matrix über Enzyme (Renner et al., 1998)

Die Fähigkeit der FS Zellen angiogenetische Faktoren (VEGF, bFGF) zu produzieren, lässt vermuten, dass sie eine wichtige Rolle für die Entwicklung, Aufrechterhaltung und Funktion des Gefäßsystems in der Hypophyse spielen (Renner et al., 2001).

Um diese und andere Funktionen der FS-Zellen weiter zu analysieren wurde zu Studienzwecken aus einem thyreotropen Hypophysentumor der Maus die TtT/GF-Zelllinie etabliert. Diese Zelllinie besitzt nahezu alle Eigenschaften der FS-Zellen. Sie ist ebenfalls wie FS-Zellen für S-100 und das GFAP-Protein immunopositiv und in der Lage VEGF und IL-6 zu produzieren (Inoue et al., 1999)

Die AtT20-Zelllinie

Die AtT20-Zelllinie ist eine aus kortikotropen Mäusehypophysentumoren gewonnene Zelllinie, die als Model für kortikotrope Hypophysentumoren (zentraler Morbus Cushing) dient. Die Zellen sezernieren ACTH und sind CRH-responsiv (Gamby et al., 1996).

Kortikotrope Hypophysentumoren (M. Cushing) sind klinisch durch eine exzessiv gesteigerte ACTH-Produktion charakterisiert. Pathophysiologisch bewirkt die Überproduktion von ACTH eine erhöhte Glukokortikoidfreisetzung, die als Hyperkortisolismus bezeichnet wird. Dadurch ergeben sich zahlreiche Symptome wie Stammfettsuch, Vollmondgesicht, Stiernacken und die sogenannten Striae distensae.

Eine ACTH-Überproduktion kann hypophysär (80%) oder ektop (20%), z.B. paraneoplastisch bei einem kleinzelligen Bronchialkarzinom, bedingt sein. (Stalla et. al., 2006)

Frauen erkranken im Verhältnis 5:1 häufiger an einem zentralen M. Cushing. Die Erkrankung kann in allen Altersstufen auftreten, zeigt aber einen Gipfel zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr.

1.4 Aktivin

Die TGF β Superfamilie besteht aus mehr als 35 Mitgliedern. Sie spielt eine Rolle bei der Reproduktion, der Immunantwort, der Knochenbildung und -morphologie, der Zellmotilität, der Adhäsion, beim neuronalen Wachstum, dem Leberwachstum und der –regeneration, dem Gewebeumbau und -reparatur, der Erythropoese, der Angiogenese, der Zelldifferenzierung und dem Zellzyklus während der Embryogenese (Tsuchida et al. 2009).

Aktivin ist ein Mitglied der TGF β Superfamilie, die darüberhinaus aus Inhibin, TGF- β Isoformen, BMP, GDF (Growth and differentiation factors), MIS (Mullarian inhibiting substance), Nodal und Lefty 1 und 2 besteht (Bilezikjian L.M. et al., 2006; Chang et al., 2002). Jede Subfamilie besteht aus Isoformen, die sich in den physiologischen Funktionen ähneln, aber nicht gleichen. Diese Faktoren werden alle gewebsspezifisch gebildet und sezerniert. Sie agieren auf endokrine, parakrine und/oder autokrine Weise durch Beeinflussung lokaler zellulärer Funktionen.

Vorkommen von Aktivin

Aktivin A und B werden im Hypophysenvorderlappen exprimiert und sezerniert (Bilezikjian et al., 2004) und kommen auch noch in vielen weiteren Gewebearten vor, wie in Tabelle Nr. 4 gezeigt wird.

Tabelle 4: Vorkommen von Aktivin (Chen et al., 2002)

<u>Aktivin Expression</u>	
➤ Prostatakarzinome	➤ Hoden
➤ Mammakarzinom	➤ Ovar (Granulosazellen)
➤ Retinoblastom	➤ Endometrium
➤ Plazenta	➤ Plazenta
➤ Pigmentepithel der Retina	➤ Oozyten
➤ Darm	➤ Nebenniere
➤ Knochenmarkstroma	➤ Pankreas
➤ Adenohypophyse	➤ Knochenmarkstroma

Die erste Identifizierung von Aktivin gelang in den achtziger Jahren und zwar als negativer Feedback-Regulator der FSH Sekretion (Phillips et al., 2005).



Abbildung Nr. 6: 3D Struktur von Aktivin in der Proteinfaltung.

Später wurden weitere Funktionen von Aktivin bekannt: mesodermale Entwicklung, somatisches Wachstum, Zellproliferation und Apoptose, Erythrozytendifferenzierung und Angiogenese, Entzündungsreaktion und Reproduktion. (Bilezikjian L.M. et al., 2006; Lin et al., 2006) Eine der wichtigsten Aufgaben von Aktivin A stellt die Regulation der Zelldifferenzierung dar (Poulaki et al., 2004).

1.4.1 Aktivin Isoformen

Aktivin ist ein durch Sulfhydryl-Verbindungen verknüpfter Dimer von Aktivin β Untereinheiten. Es gibt insgesamt 5 β Untereinheiten β A, β B, β C, β D und β E. (Butler C et al., 2005) Allerdings sind momentan nur die Homo- und Heterodimere von β A und β B Untereinheiten gut charakterisiert und untersucht worden. Die β D UE wurde bisher nur in *Xenopus laevis* gefunden, wo sie als Mesoderm induzierender Faktor agiert. (Oda et al., 1995). β C und β E Untereinheiten wurden zwar in Säugerzellen identifiziert, jedoch hat man bisher noch keine Funktion zeigen können (Butler et al., 2005). Aktivin A und Aktivin B sind beides Homodimere, bestehend aus β A β A bzw β B β B Untereinheiten, Aktivin AB stellt einen Heterodimer dar, bestehend aus β A β B Untereinheiten (Abb 7).

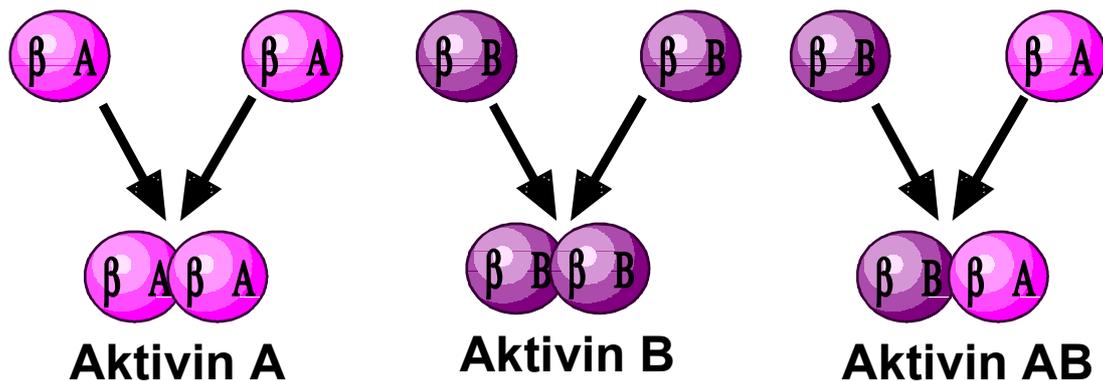


Abbildung Nr. 7: Jeweils zwei β - Untereinheiten bilden ein Aktivin-Molekül

Desweiteren können auch Aktivin C ($\beta C \beta C$), Aktivin AC ($\beta A \beta C$) und Aktivin BC ($\beta B \beta C$) entstehen. (Mellor, Cranfield et al. 2000; Vejda et al., 2002)

Aktivin β Untereinheiten können auch mit der eng verwandten Inhibin α Untereinheit dimerisieren. Dabei entsteht Inhibin A ($\alpha \beta A$) oder Inhibin B ($\alpha \beta B$). (Butler et al., 2005)

Ein Aktivin Protein entsteht durch 2 Aktivin β Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken verbunden werden (Abb. 8).

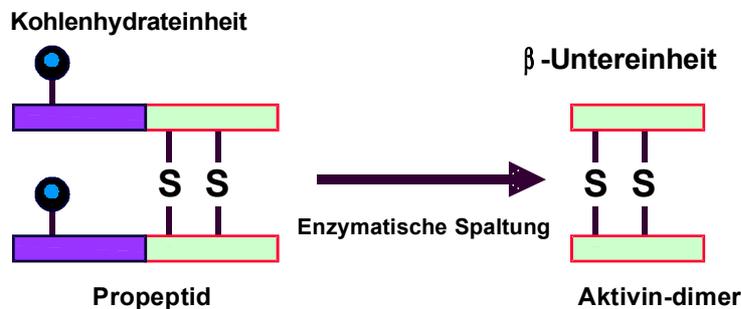


Abbildung Nr. 8: Glykosylierte Präprohormone dimerisieren. Nach anschließender Abspaltung der Kohlenhydrateinheiten entsteht ein Aktivin-Dimer.

Die Untereinheiten werden als glykosylierte Präprohormone mit einer Signalsequenz, einer Prodomäne unterschiedlicher Größe und einer C-terminalen Sequenz ausgestattet. Diese vorläufige Form dimerisiert dann mit einer anderen Untereinheit.

In Gemeinsamkeit mit anderen TGF β Mitgliedern haben die β UE von Aktivin eine konservierte Region von 7 Cysteinen. (Mc Donald NQ et al., 1993). Diese Cysteine sind für

die Proteinfaltung und die Ausbildung von Disulfidbrücken mit anderen Untereinheiten wichtig (Abb 9).

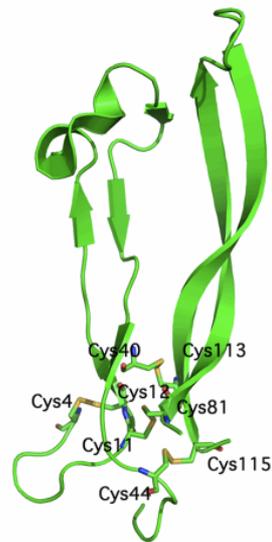


Abbildung Nr. 9: Aktivinmolekül in Proteinfaltung mit Darstellung der Cysteine und Disulfidbrücken.

Welcher Mechanismus entscheidet nun darüber, welche Untereinheiten letztendlich zusammengebaut werden? Aus Inhibin α und β A Untereinheiten können sowohl Inhibin A und Aktivin A entstehen. Man fand heraus, dass die vorhandene Menge der jeweiligen UE darüber entscheidet, welche Dimere am Ende entstehen (Butler et al., 2005) (Abb. 10).

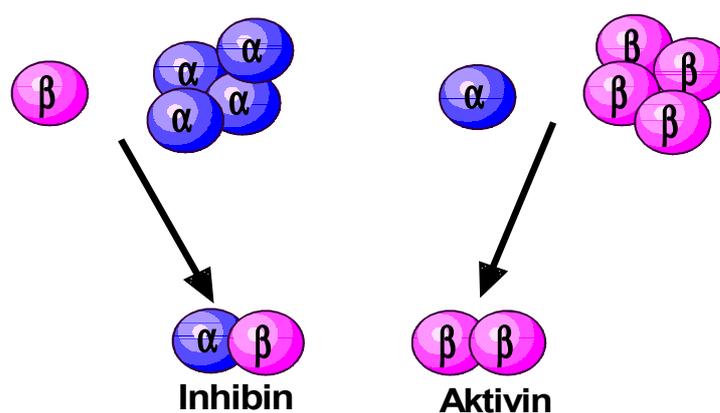


Abbildung Nr. 10: Die vorhandene Menge der entsprechenden Untereinheiten entscheidet darüber, welches Molekül entsteht. Sind viele α Untereinheiten vorhanden und im Verhältnis dazu weniger β Untereinheiten, entsteht ein Inhibin Molekül. Umgekehrt ist es analog, wenn im Verhältnis mehr β Untereinheiten vorhanden sind, entsteht ein Aktivin Molekül.

1.4.2 Aktivin Rezeptoren und Signaltransduktion

Es ist bekannt, dass Aktivin und TGF β über den selben intrazellulären Signalweg wirksam sind (Bilezikjian L.M. Et al., 2006).

Aktivin agiert über 2 Arten von Rezeptoren: Aktivin Rezeptoren Typ I und Typ II.

Es gibt insgesamt 5 Typ II Rezeptoren in der TGF β Superfamilie, wovon 2 Rezeptoren für Aktivin spezifisch sind: Aktivin Rezeptor II und Aktivin Rezeptor IIB. Typ I Rezeptoren gibt es 7 verschiedene, ALK 1-7 (Aktivin Receptor Like Kinase) (Tsuchida et al., 2009).

Sie gehören zur Familie der transmembranen Serin/Threonin Kinasen. Typ I und Typ II Rezeptoren sind Glykoproteine mit einer Größe von 55 und 70 kDa. Die extrazellulären Abschnitte der Rezeptoren enthalten um die 150 Aminosäuren mit 10 oder mehr Cysteinen, die die Faltung im extrazellulären Bereich determinieren.

Tabelle 5: Aktivin Rezeptoren Typ I und Typ II mit den zugehörigen Smad-Proteinen.

Ligand	Typ II Rezeptor	Typ I Rezeptor	R-Smad	Co-Smad	I-Smad
Aktivin A	ActRII	ALK 4 = ActRIB	Smad 2,3	Smad 4	Smad 7
Aktivin B	ActRIIB	ALK 7	Smad 2,3	Smad 4	Smad 7

Eine einzigartige Besonderheit des Typ I Rezeptors ist seine hoch konservierte, intrazelluläre Region von 30 Aminosäuren, die der Kinasedomäne unmittelbar voransteht. Diese Region wird auch GS-Domäne genannt, weil sie SGSGSG Sequenzen enthält. Die Phosphorylierung der GS-Domäne durch den ligandengebundenen Typ II Rezeptor ist notwendig, um den Signalweg zu aktivieren. (siehe unten) (Chang et. al. 2002)

Um das Aktivinsignal erfolgreich zu vermitteln, muss Aktivin zuerst an den Typ II Rezeptor binden. Nun bildet sich ein Komplex aus Aktivin und ActRII, wodurch die Affinität zum Typ I Rezeptor erhöht wird (Abb. 11). Die aktivierte Kinase-Domäne des Typ II Rezeptors phosphoryliert nun die GS Domäne des Typ I Rezeptors. Diese phosphorylierte GS Domäne phosphoryliert wiederum ihrerseits eine Anzahl von intrazellulären Mediatorproteinen, bekannt als Smad-Proteine. Smad steht für Small Mothers Against Decapentaplegic.

Es existieren acht Smad-Proteine in 3 Klassen: Rezeptor-regulierte Smad-Proteine (R-Smad), Comediator-Smad-Proteine (Co-Smad) und Inhibitor-Smad-Proteine (I-Smad) (Massague et al., 2005). Zu den R-Smads zählen Smad 1, 2, 3, 5 und 8, zu den Co-Smads zählt Smad 4 und zu den Inhibitor-Smads gehören Smad 6 und 7. Die R-Smads werden durch die Typ I Rezeptor-Kinasen direkt phosphoryliert und aktiviert, wonach sie heterometrische Komplexe mit den Co-Smads formen. Die aktivierten Smad Komplexe werden in den Zellkern transloziert, binden dort an andere nukleäre Kofaktoren und regulieren die Transkription von Zielgenen (Lin et al., 2006).

I-Smad-Proteine inhibieren Aktivin Signalwege, indem sie mit den R-Smads um den Typ I-Rezeptor oder um die Co-Smad Interaktion konkurrieren. Sie können die Signalwege auch durch Rezeptorabbau blockieren. (Lin et al., 2006)

Im Aktivin Signaltransduktionsweg spielen Smad 2,3 und 4 eine Rolle (Abb. 11). Mutationen genau dieser 3 Smad-Proteine wurden in menschlichen Tumoren gefunden. Deshalb nimmt man an, dass sie als Tumorsuppressor wirken. Das Smad 4 Protein, das auch als DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4) bezeichnet wird, ist häufig in Pankreaskarzinomen zerstört oder mutiert. (Chang et al., 2002).

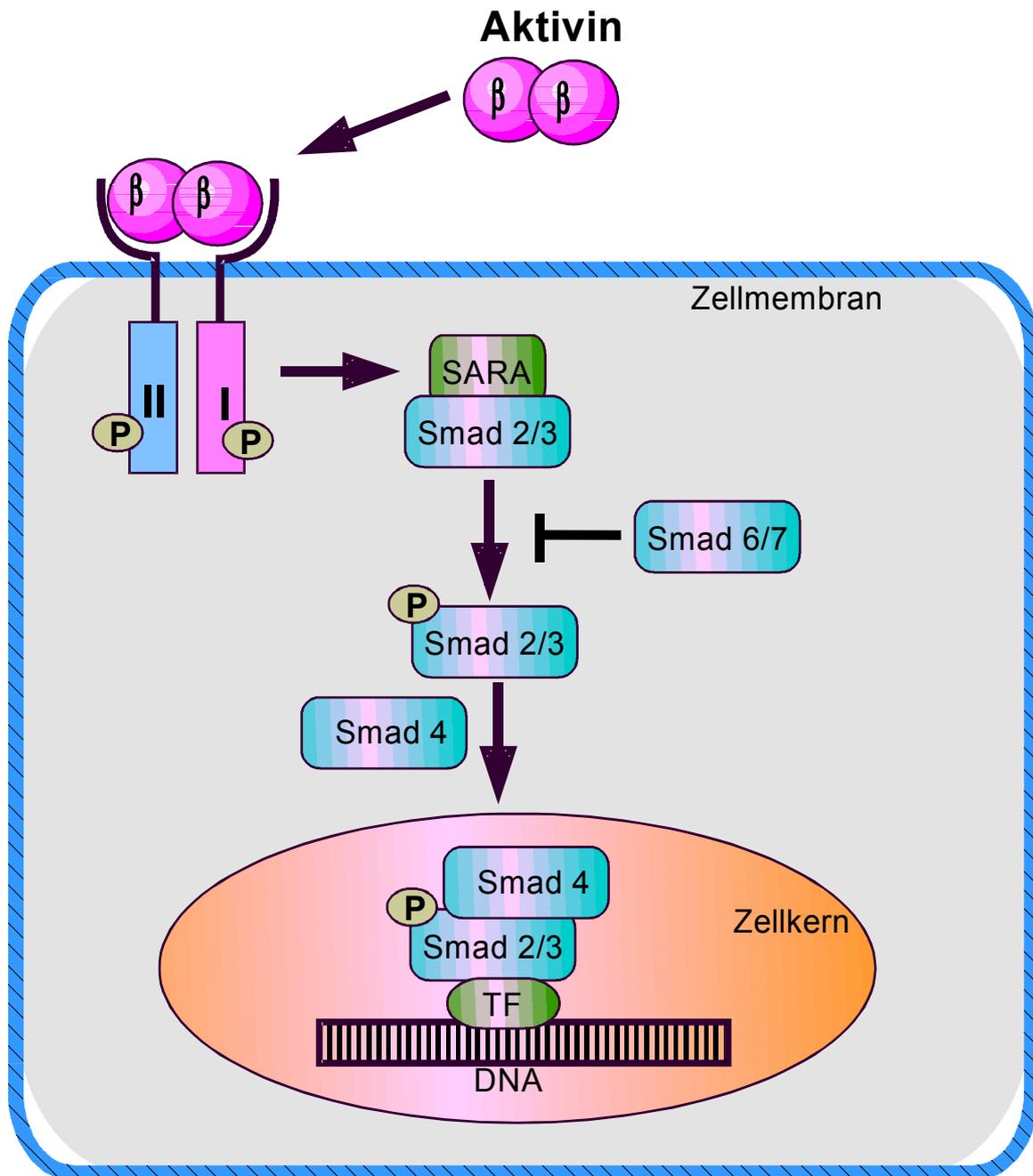


Abbildung Nr. 11: Schematische Darstellung des Aktivin Signalweges. Zuerst muss ein Aktivin Molekül an den Aktivin Rezeptor Typ II binden, daraufhin wird dieser phosphoryliert und rekrutiert den Aktivin Rezeptor Typ I. Dieser wird ebenso phosphoryliert. Danach wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, in der verschiedene Smad Proteine zum Einsatz kommen und weitere Schritte einleiten, bis es im Zellkern zur Aktivierung und Regulierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und somit auch Zielgenen kommt.

1.4.3 Physiologische Funktion von Aktivin

Aktivin wurde als parakrin, autokrin und sogar endokrin wirkendes Hormon, als Wachstums- und Differenzierungsfaktor und sogar als Zytokin beschrieben. Man könnte somit für Aktivin auch die Bezeichnung „multikrin“ einführen. (Blumenfeld und Ritter 2001). In der Hypophyse stellt Aktivin einen lokal sezernierten Faktor dar, der sowohl für die Zelldifferenzierung als auch Biosynthese und Sekretion von Glykoprotein-Hormonen zuständig ist (Danila et al., 2000).

Ursprünglich wurde Aktivin isoliert, weil es die GnRH-vermittelte FSH Produktion in der Adenohypophyse aktiviert. Weitere Funktionen von Aktivin sind GnRH-vermittelte LH Sekretion, Stimulation der Androgenproduktion in Thekazellen, Stimulation der Granulosazellproliferation und Follikelwachstum im Ovar (Chen et al., 2002). Später wurde entdeckt, dass Aktivin weitere Funktionen ausübt wie Erythrozytendifferenzierung, Nervenzellerhaltung, Knochenwachstumsförderung, Immunantwort und Wundheilung. Zudem reguliert Aktivin eine Vielzahl von zellulären Vorgängen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Wie oben beschrieben, kontrolliert Aktivin die Aktivität von Hypothalamus und Ovar, was darauf hinweist, dass Aktivin parakrine und autokrine Effekte auf das weibliche Reproduktionssystem ausübt (Peng and Mukaki 2000).

In der folgenden Tabelle sind einige Wirkungsweisen von Aktivin dargestellt. Im Gegensatz dazu die Wirkung von Inhibin, einem eng mit Aktivin verwandten Mitglied der TGF- β Superfamilie, das antagonistisch wirkt und Aktivin blockiert. (s.u.)

Tabelle 6: Wirkungsweise von Aktivin und Inhibin

• Aktivin	• Inhibin
• \uparrow basale und GnRH stimulierte FSH Sekretion	• \downarrow basale und GnRH stimulierte FSH Sekretion
• \downarrow GHRH stimulierte GH Sekretion	• \uparrow GHRH stimulierte GH Sekretion
• \downarrow Effekt von LH auf Thekazellen zur Androgensekretion	• \uparrow Effekt von LH auf Thekazellen zur Androgensekretion
• \uparrow Aromataseaktivität	• \downarrow Aromataseaktivität
• \uparrow hCG induzierte Progesteronsekretion	• \downarrow hCG induzierte Progesteronsekretion
• \uparrow Erythropoese	• \downarrow Erythropoese

Funktion von Aktivin in der Reproduktion

Das GnRH aus dem Hypothalamus bewirkt in der Hypophyse die Ausschüttung des FSH und des LH, wobei diese hypophysären Hormone die Stereoidbiosynthese im Ovar bzw. in den Follikeln stimulieren. Aktivin A, B und AB sind bekannt dafür, dass sie die FSH Synthese und Freisetzung regulieren. Dabei agieren sie sowohl als autokrine und parakrine, als auch als endokrine Faktoren. Aktivin stimuliert die FSH-Ausschüttung der Hypophyse und verstärkt die Wirkung des FSH am Ovar. Außerdem hat es einen stimulativen Effekt auf die GnRH-Rezeptoren (Chang et al., 2002). Im Ovar führt Aktivin zu einem Anstieg der FSH-Rezeptoren mit daraus folgender erhöhter Bindung von FSH und Steigerung der Aromatisierung sowie des hieraus resultierenden Anstiegs des Östradiol-17 β und der Inhibin-Produktion. Aktivin zeigt auch einen direkten Effekt an den Thekazellen und reguliert dort die Androgenbiosynthese. Das in der Hypophyse lokal produzierte Aktivin B erhöht dort ebenfalls die FSH-Sekretion, während das Aktivin A die GnRH-Rezeptorbiosynthese stimuliert, was zu einer erhöhten Ausschüttung der Gonadotropine führt. Bei Mäusen, denen der ActRIIA fehlt, findet man zu geringe Mengen an FSH in der Hypophyse und im Serum. Dies führt zu Entwicklungsdefekten der Gonaden bis hin zur Infertilität. In der Tabelle aus (Chang et al., 2002) sind weitere Entwicklungsfehler bei Mäusen dargestellt, denen entweder Aktivin Untereinheiten oder Rezeptoren fehlen:

Tabelle 7: Darstellung der Folgen für die Entwicklung von Mäusen, denen ein bestimmter Aktivin-Rezeptor fehlt.

<u>TGFβ-Superfamilie-Ligand</u>	<u>Phänotyp</u>
Knockout-Maus -Modell	
Aktivin β A Untereinheit	Perinataler Tod, kraniofaziale Defekte (zB Gaumenspalten)
Aktivin β B Untereinheit	Entwicklungsfähig, Liddefekte und Abnormalitäten in der weiblichen Reproduktion
Aktivin β C Untereinheit	Entwicklungsfähig und fruchtbar, keine ersichtlichen Abnormalitäten

Aktivin β E Untereinheit	Entwicklungsfähig und fruchtbar, keine ersichtlichen Abnormalitäten
Inhibin α Untereinheit	Tumorsuppression gestört, gonadale und adrenale Tumoren
Aktivin Rezeptor IA (ALK 2)	Embryonale Letalität, abnormales viszerales Endoderm, Defekte in der mesodermalen Entwicklung
Aktivin Rezeptor IB (ALK 4)	Embryonale Letalität
Aktivin Rezeptor IIA	25% Sterblichkeit durch kraniofaziale Defekte wie z.B. Gaumenspalten; männliche Mäuse zeigten verspätete Fertilität, weibliche Mäuse waren unfruchtbar
Aktivin Rezeptor IIB	Perinatale Letalität, rechts-links Assymetrie und anterior-posteriore Achsendefekte

Regulation der Zellproliferation durch Aktivin

Wachstumshemmung durch Aktivin

Man hat in verschiedenen Zelltypen eine Verringerung des Zellwachstums durch Aktivin nachweisen können: unter anderem in Prostatakarzinomzellen, in der Mamma, im Gefäßendothel, in glatten Gefäßmuskelzellen, in HS-72 Maus B-Zell-Hybridomen und in Plasmazytomzellen der Maus (Chen et al., 2002).

Die genauen Mechanismen sind immer noch unklar, doch es gibt einige Hinweise für ein Erklärungsmodell. In B-Zell-Hybridomen stimuliert Aktivin die Expression des cyclinabhängigen Kinase-Inhibitors p21CIP1/WAF1. Dadurch wird die Cyclin D2 Expression unterdrückt und somit kommt es nach weiteren Schritten zu einer Verhinderung der Zellzyklusprogression von der G1 zur S-Phase. (Weinberg et al., 1995) Aktivin bewirkte dort also einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase. In Adenohypophysentumoren hat Aktivin einen ähnlichen Effekt: Es erhöht auch hier die Expression von p21CIP1/WAF1 mit den selben Auswirkungen, nämlich einem Zellzyklusarrest. (Danila et al., 2000)

Apoptose

Aktivin reguliert nicht nur Zelldifferenzierung und Zellwachstum, sondern auch den programmierten Zelltod in unterschiedlichen Zellen. Es scheint, dass Aktivin Caspasen, für die Apoptose verantwortliche Proteasen, induziert. In Zellen aus Prostatakarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass Aktivin Apoptose induziert (Zhang et al., 1997) und Yamato et al. (1997) wiesen nach, dass Aktivin G1-Zellzyklusarrest mit nachfolgender Apoptose in Maus B-Zell-Hybridoma-Zellen induziert.

Aktivin und Angiogenese

Die meisten Tumoren induzieren mittels Angiogenese ein intratumorales Gefäßsystem, um Sauerstoff, Nährstoffe und Schadstoffe zu beschaffen bzw. abzutransportieren. Ferner ist die Neubildung von Gefäßen zur Blutversorgung essentiell für die Metastasierung und für weiteres Tumorwachstum.

Über die Funktion von Aktivin in der Angiogenese wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Maeshima et al. (2004) untersuchten das Verhältnis und die Wechselwirkung von VEGF und Aktivin. Sie stellten fest, dass in BAEC (Bovine aortic endothelial cells) Aktivin A produziert wird und auch die Aktivin-Rezeptoren Typ I und II exprimiert werden. Sie untersuchten die Wirkung von Aktivin in diesen Zellen und fanden heraus, dass Aktivin die Expression von VEGF und dessen Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 signifikant erhöhte. Diese VEGF Rezeptoren werden in vaskularen Endothelzellen exprimiert und sollen Angiogenese regulieren (Goto et al., 1993). Umgekehrt erhöhte auch VEGF die Produktion von Aktivin A in BAEC. Dagegen konnte gezeigt werden, dass Follistatin, ein Aktivin-Bindeprotein mit antagonistischer Wirkung (siehe unten), die Wirkung von endogenem Aktivin A blockieren kann und auch die Expression von Flt-1 und Flk-1 reduziert. Dadurch blockiert Follistatin fast vollständig die Tubulogenese der Endothelzellen in BAEC.

Poulaki et al. (2004) untersuchten die Wirkung von exogenem Aktivin auf korneale Epithelzellen und fanden heraus, dass nach Aktivin Stimulation erhöhte VEGF Konzentrationen nachzuweisen waren und die Neovaskularisation verstärkt wurde.

Andere Untersuchungen zeigen, dass Aktivin A Angiogenese inhibieren kann (Kozian et al., 1997) und als antiangiogenetischer Faktor in Krebszellen identifiziert wurde (Breit et al., 2000).

1.4.4 Regulation von Aktivin

Die Wirkung von Aktivin wird hauptsächlich durch die Interaktion mit Follistatin und dem natürlichen Antagonisten Inhibin reguliert.

Follistatin, ein monomerisches Aktivin-Bindeprotein, strukturell von Aktivin und Inhibin zu unterscheiden, wird in den follikulostellaren Zellen der Adenohypophyse von Ratten produziert. (Bilezikjian 2003). Es existieren zwei unterschiedliche Isoformen des Follistatins. FS288 ist zellmembrangebunden und lenkt nach Aktivin A Bindung dieses zu einem lysosomalen Abbau um. FS315 bindet Aktivin A, welches sich in der Zirkulation befindet (Butler et al., 2005). Follistatin bindet Aktivin mit hoher Affinität und hindert Aktivin daran, an seine Rezeptoren zu binden (de Winter et al., 1996) Follistatin ist in seiner Wirkung dem Aktivin gegenüber antagonistisch. Es existiert ein negativer Feedback-Mechanismus zwischen Aktivin und Follistatin, wobei Aktivin die Sekretion von Follistatin in Rattenhypophysenzellen erhöht. (Chen et al., 2002) Somit terminiert Aktivin selbst seine Wirkung über diesen Rückkopplungsmechanismus.

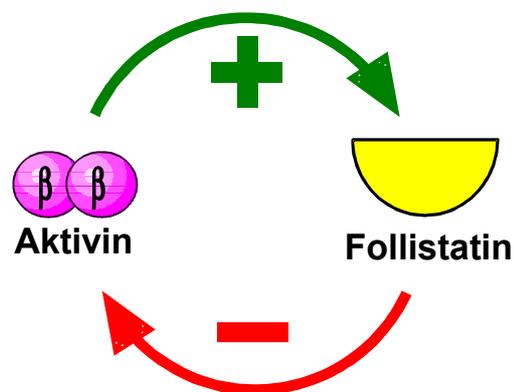


Abbildung Nr. 12: Aktivin aktiviert die Bildung von Follistatin und Follistatin wiederum hemmt Aktivin. Dadurch wird eine überschießenden Wirkung von Aktivin verhindert.

Inhibin, ein Heterodimer aus einer α - und Aktivin- β A bzw. β B Untereinheit, ist auch ein Mitglied der TGF- β Superfamilie und strukturell eng mit Aktivin verwandt. (Mason et al., 1986). Inhibin antagonisiert verschiedene Wirkungen von Aktivin, indem es an den Aktivin Rezeptor Typ II bindet und die Wirkung von Aktivin dort blockiert (Butler et al., 2005) und die Rekrutierung des Aktivin Typ I Rezeptors verhindert (Chen et al., 2002). Wahrscheinlich

binden beide mit ihren β Untereinheiten an diesen Rezeptor. (Gray et al., 2000).

Antivin, ein weiteres Mitglied der TGF β Superfamilie, wurde im Zebrafisch entdeckt. Bisherige Ergebnisse sprechen dafür, dass Antivin – ähnlich wie Inhibin – Aktivin Signale durch Konkurrenz um den selben Rezeptor inhibieren könnte (Thisse and Thisse 1999). Zusätzlich kann die Aktivinwirkung auf Ebene der Aktivinrezeptoren (Wang 1996 et al.; Chen 1997 et al.; Chen 2002 et al.) und der Smad Proteine (Chen 2002 et al.; Ulloa 1999 et al.; Biker 2000 et al.) reguliert werden.

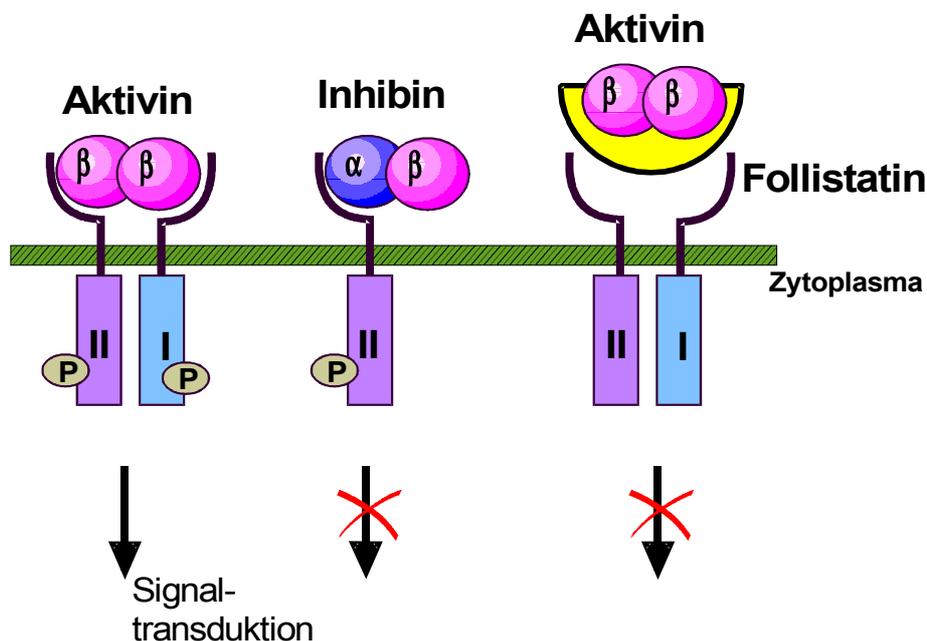


Abbildung Nr. 13: Regulation von Aktivin: Inhibin ist in der Lage, den Typ II Rezeptor zu blockieren ohne ein Signal weiterzugeben. Follistatin ist, wie oben beschrieben, ein Antagonist von Aktivin und verhindert eine Rezeptorbindung von Aktivin.

1.4.5 Die Rolle von Aktivin in Hypophysentumoren

Die genaue Rolle von Aktivin in der Pathogenese von Hypophysenadenomen beim Menschen ist immer noch unklar, aber es scheint, dass Aktivin eine Rolle bei der Entwicklung von gonadotropen Hypophysenadenomen spielt (Masaya Takeda et al., 2003).

Vorkommen der Aktivin Untereinheiten

In der Adenohypophyse hat man bereits die Aktivin-/Inhibin Untereinheiten in folgenden Zellen nachweisen können (Uccella et. al., 2000)

Tabelle 8: Darstellung der Aktivin Untereinheiten in normalen Hypophysenzellen.

	α - Untereinheit	β A-Untereinheit	β B-Untereinheit
FSH	+	+	+
LH	-	-	+
GH	-	+	-
PRL	-	+	-
ACTH	-	-	-
TSH	-	-	+

Links sind die jeweiligen hormonproduzierenden Zellen dargestellt, in denen die Aktivin Untereinheiten gefunden wurden. Nur in ACTH produzierenden Zellen wurden bislang keine Aktivin Untereinheiten nachgewiesen.

FSH produzierende gonadotrope Zellen stellen den Hauptproduktionsort für Aktivin und Inhibin in der Hypophyse dar. In diesen Zellen findet man alle Untereinheiten und alle Formen von Aktivin und Inhibin. Das Vorhandensein der α -Untereinheit des Inhibins konnte nur in gonadotropen Zellen gezeigt werden. Die Aktivin Untereinheit β A konnte sowohl in den FSH produzierenden gonadotropen Zellen, als auch in wachstumshormon- (GH) und prolaktinbildenden Zellen (PRL) nachgewiesen werden, nicht jedoch in LH runden gonadotropen Zellen. Die β B Untereinheit konnte dagegen in den gonadotropen Zellen und in TSH produzierenden Zellen gefunden werden. (Uccella 2000)

Die experimentellen Ergebnisse, die für eine Rolle von Aktivin in der Tumorentstehung sprechen, sind nicht überzeugend. Mäuse mit unzureichenden FSH und Inhibin Mengen entwickelten Ovarkarzinome, obwohl das Serumaktivin stark reduziert war (Kumar et al., 1999).

Überexpression von Aktivin- β Untereinheiten in männlichen Mäusen führte nicht zur Entstehung von Hodentumoren (Tanimoto et al., 1999).

Matzuk et al. (1996) fanden bei Ovartransplantationsversuchen heraus, dass Aktivin nicht essentiell für die Initiierung von Gonadentumoren ist. Vielmehr sprechen die Ergebnisse dafür, dass Gonadotropine (LH und FSH) erforderlich sind, damit es zur Tumorentstehung

kommt. Bei gonadotropin-sezernierenden Adenomen hat man herausgefunden, dass es zu einer Erhöhung der FSH Sekretion kommt, die LH Sekretion bleibt unbeeinflusst.. Das steht im Widerspruch zur pyhsiologisch proportionalen Sekretion von FSH und LH in der normalen Hypophyse, reguliert durch GnRH (Takeda et al., 2003).

Es gibt zwingende Beweise dafür, dass endogenes Aktivin, besonders Aktivin B, eine wichtige Rolle bei der Regulation der FSH β Genexpression spielt. Dabei hat es keinen Einfluss auf die LH Produktion (Corrigan et al., 1991). Deshalb nimmt man an, dass das Aktivin-System mit seinen Regulatoren zumindest in die Entstehung von gonadotropen Adenomen und möglicherweise auch in die Entstehung anderer Hypophysentumoren involviert ist.

In einer Studie (Uccella et al., 2000) wurden 87 Hypophysentumore auf das Vorhandensein von Aktivin/Inhibin Untereinheiten in den Tumorzellen untersucht.

Tabelle 9: Vorkommen von Aktivin Untereinheiten in Hypophysenadenomen.

	α - Untereinheit	β A- Untereinheit	β B-Untereinheit
“Nonfunctioning” Adenome	55% (22/40)	56% (22/39)	57% (20/35)
Gonadotrophe Zellen	79 % (15/19)	67% (12/18)	47% (7/15)
ACTH Zellen	0 % (0/3)	0% (0/3)	67 % (2/3)
TSH Zellen	25 % (1/4)	100% (4/4)	50% (2/4)
“Functioning” Adenome	2% (1/47)	23% (11/47)	25% (9/36)
GH Zellen	0 % (0/19)	21% (4/19)	27% (4/15)
PRL Zellen	0% (0/12)	25% (3/12)	37% (3/8)
GH + PRL Zellen	11% (1/9)	44% (4/9)	33% (2/6)
ACTH Zellen	0% (0/7)	0% (0/7)	0% (0/7)

In gonadotropen Adenomen findet man die gleichen Untereinheiten in ähnlichem Umfang wie in den normalen gondadotropen Hypophysenzellen, während bei somatotropen

Adenomen die β A Untereinheit weniger stark exprimiert wird als in somatotrophen Zellen der normalen Hypophyse. Hormoninaktive Hypophysentumore exprimieren sowohl Aktivin als auch Inhibin Untereinheiten.

Aktivin besitzt in Hypophysentumorzelllinien wie z.B AtT20-Zellen (kortikotrophe Maus-Zellen) und somatotrophen GH3 Ratten-Zellen einen antiproliferativen Effekt. (Danila et al., 2000) Obwohl Aktivin die Anzahl der FSH sezernierenden Zellen in Rattenhypophysenprimärzellkulturen erhöht, konnte keine erhöhte Zellproliferation beobachtet werden (Katayama et al., 1990). Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Follistatin Expression in menschlichen Hypophysenadenomen vermindert ist. Dabei hat man beobachtet, dass vor allem solche Tumoren, die auf Aktivin mit einer Wachstumsinhibition reagierten, keine oder kaum Follistatin-Expression zeigten (Danila et al., 2000). Man könnte annehmen, dass in Tumoren, die nicht auf Aktivin antiproliferativ reagieren, Follistatin -als ein Antagonist von Aktivin- dessen Wirkung blockiert.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Eine Dysregulation von proliferationsfördernden und -hemmenden Faktoren dürften für die Pathogenese von Tumoren von erheblicher Bedeutung sein. Dabei spielen auto- und parakrine Faktoren und deren Rezeptoren, die unter anderem Funktion und Proliferation von Tumorzellen regulieren, eine besondere Rolle. Man hat ein Ungleichgewicht verschiedener Faktoren und Rezeptoren beobachtet, das auf eine Mitwirkung bei der Entstehung und Progression von Tumoren, wie z.B. Hypophysenadenomen hindeutet (Renner U. et al., 2004). In bisherigen Studien wurden unter anderem die Aktivin Untereinheiten in Hypophysentumoren (Uccella et al., 2000), die Signaltransduktion von Aktivin (Bilezikjian L.M. et al., 2006), die Rolle von Aktivin in der Angiogenese (Maeshima et al., 2004), die Regulation von Aktivin und die Funktion von Aktivin in der Apoptose (Butler et al., 2005) und in der Entstehung von Hypophysenadenomen untersucht (Masaya Takeda, et al., 2003). Welche Rolle Aktivin genau bei der Entstehung von Hypophysenadenomen einnimmt, ist immer noch ungeklärt. Jedoch weisen einige Ergebnisse darauf hin, dass das Aktivin-Follistatin-System in die Pathogenese von Hypophysentumoren involviert ist. Andererseits sprechen andere Untersuchungen dafür, dass Aktivin einen antiproliferativen Effekt auf das

Wachstum von Hypophysenadenomen haben kann (Danila et al., 2000).

In dieser Arbeit soll das Vorhandensein von Aktivin-Rezeptoren in Hypophysenzellen und Tumorzelllinien, die Hormonproduktion nach Aktivin-Stimulation und der Einfluss von Aktivin auf das Wachstum von unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht werden. Es soll die Expression, Lokalisation und funktionelle Bedeutung von Aktivin A und Aktivin-Rezeptoren in der Hypophyse und in Hypophysentumoren untersucht werden.

2. Methodik

2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Materialien

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

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

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 11: Verwendeten Chemikalien und Lösungen

Ampicillin	Roche (Mannheim, Deutschland)
Ampuwa Wasser	Frisenius (Deutschland)
Beta-Mercaptoethanol	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Biomax MR Filme	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Bovine serum albumin (BSA)	Invitrogen Corp. (Paisley, UK)
Chloroform	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Collagenase	Worthington Biochem Corp. (Lakewood, NJ, USA)
D-Glukose	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Diethyl-pyrocbonat (DEPC)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
DNase II	Sigma (St. Louis. MO, USA)
DNTP Mix	MBI Fermentas (Vilnius, Lithouania)
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Invitrogen Corp (Paisley, UK)
Ethylenediaminetetracetic Acid (EDTA)	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Entwickler	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Ethidium bromide	Sigma (St. Louis. MO, USA)
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco Europe (Karlsruhe, Deutschland)
Filterpapier 3MM	Whatmann International Ltd. (Meidstone, GB)
Fixer Lösung	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
HCL	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Hexanucleotid Mix	Roche (Mannheim, Deutschland)
Hyaluronidase	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Isoamylalkohol	MERCK (Darmstadt, Deutschland)

Isopropanol	Sigma (St. Louis. MO, USA)
KCL	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
LY 294002	Calbiochem (La Jolla, CA, USA)
Magnesiumchlorid	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Marker 1kb Plus	Life Technologies (Paisley, USA)
MEM-Vitamine	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na-Acetat	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na-Citrat	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Nitrocellulose Membran Hybond-ELC	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
PBS	Gibco Europe (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin+Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Phenol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Polyacrylamid	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Recombinant Human/Mouse/Rat Activin A	R&D Systems, Inc.
Reverse Transkriptase (SuperScript II TM)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNasin (Rnase Inhibitor)	Promega Corp. (Madison, WI, USA)
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas
Transferrin	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Tris-Glycin 10% Gel	Anamed (Darmstadt, Deutschland)
Tris pure	ICN Pharmaceuticals (Aurora, OH, USA)
Trijodthyronin (T3)	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Trypsin	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Trypsin Inhibitor	Sigma (St. Louis. MO, USA)
Wasserstoff Peroxid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
WST-1	Roche Molecular Biochemicals (Penzberg, Deutschland)

2.2 Zelllinien und Primärzellkultur

Primärzellkulturen von Maushypophysen wurden wie folgt angelegt: 12 Wochen alte, adulte C57BL/6 Mäuse wurden unter Kohlendioxid-Narkose dekapitiert, der Schädel geöffnet, das Hirn zur Seite geklappt und die darunter liegende Hypophyse mit einer feinen Pinzette herausgenommen. Nach mehrmaligem Waschen in physiologischer Salzlösung (PBS) wurden die Maushypophysen mit einem Skalpell in kleine Stückchen zerschnitten, die dann in eine Enzymlösung gegeben wurden (4 Hypophysen pro Milliliter Lösung). Für die Herstellung der Enzymlösung wurden in PBS, das 10 mM Glucose enthielt, 2 mg/ml Collagenase, 1 mg/ml Hyaluronidase, 0.1 mg/ml Trypsin-Inhibitor, 4 mg/ml BSA und 0.1 mg/ml DNase II gelöst. Nach etwa eineinhalb-stündiger Inkubation hatten sich die Hypophysen aufgelöst und die entstandene Einzelzellsuspension wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (1200 Upm; 4 min) und Resuspendieren in Zellkulturmedium (s.u.) von Resten der Enzymlösung befreit. Ein kleines Aliquot der Zellsuspension wurde mit einem Gemisch aus Acridin-Orange und Ethidiumbromid versetzt und im UV-Licht die grün gefärbten lebenden Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Für Stimulationsexperimente wurden 100000 Zellen in 0.5 ml Zellkulturmedium pro well in 48-well Zellkulturplatten ausgesät; für die RNA Extraktion wurden 400 000 Zellen in 2 ml Medium pro well in 12-well Zellkulturplatten ausgesät. Nach 48 Stunden im Brutschrank (s.u.) waren die Hypophysenzellen angewachsen. Die Hypophysenzellkulturen wurden einmal mit Zellkulturmedium gewaschen, um Zellfragmente, tote Zellen, rote Blutkörperchen und nicht adhärent wachsende Zellen zu entfernen und konnten dann für Experimente zur Stimulation von IL-6 oder VEGF (48 well-Platten) oder zur RNA-Extraktion (12-well Platten) verwendet werden.

Die Zelllinien (TtT/GF, AtT20) und Primärzellkulturen von Maushypophysen wurden in Zellkulturflaschen als Monolayer im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für alle Zelllinien wurde als Kulturmedium DMEM-Medium verwendet, dem 10% FCS, 2mmol/l L-Glutamin, 2.5 ng/ml Amphotericin B und 105 U/ml Penicillin-Streptomycin hinzugefügt wurde.

Beim Splitten der Zellen wurden diese mit PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung vom Zellflaschenboden gelöst. Anschließend wurde das Zellsuspensat bei 1200 rpm zentrifugiert, mit dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in einem

Teilungsverhältnis von 1:2 bis 1:10 rekultiviert. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

2.3 Stimulation

Für die Stimulationsversuche wurden die resuspendierten Zellen gezählt und anschließend je nach Versuch in 24-, 48- oder 96-Well Platten ausgesät. Die verwendeten Medien entsprechen den oben beschriebenen Medien mit dem Unterschied, dass entweder kein oder 2% FCS anstatt 10% FCS hinzugefügt wurde. Vor der Stimulation wurden die angewachsenen Zellen in einem Zwischenschritt mit PBS gewaschen. Stimuliert wurden die Zellen mit Activin A in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml. Zur Bestimmung der Hormone und Wachstumsfaktoren mittels RIA und ELISA wurden die Zellen in 24-Well Platten kultiviert und der Überstand danach in neue 24-Well Platten pipettiert und anschließend bis zur Messung bei -18° C eingefroren.

2.4 Wachstumsbestimmung mit WST-Assay und der Neubauer Zählkammer

Der WST-Assay (Water Soluble Tetrazolium-Assay) ist eine indirekte Methode zur Quantifizierung der Zellproliferationsraten. Der WST-1 Assay erfasst die Zellzahl durch Messung der optischen Dichte des von Zellen metabolisierten WST-1 Farbstoffs. Dieser wird in die Zellen aufgenommen und mittels der mitochondrialen Succinatdehydrogenase zu Formazan metabolisiert. Die Lichtabsorption von Formazan kann photometrisch bei einer Wellenlänge zwischen 420-480 nm gemessen werden. Die Zellen wurden in 96-Well Platten 24,48 und 72 Stunden mit Activin A in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5ng/ml und 10 ng/ml stimuliert und das WST-1 Reagenz anschließend bei abgedunkelten Bedingungen hinzu gegeben. Nach 15, 30 und 90 Minuten Inkubationszeit wurde jeweils der Farbumschlag mittels Photometer in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die direkte Zellzählung wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Sie besteht aus einer rechteckigen, dicken Spezialglasgrundplatte in deren mittlerem Drittel sich vier Längsspalten, die parallel zu den kurzen Seiten laufen, befinden. Durch Auflage

eines Deckglases entsteht zwischen der Grundplatte und dem Deckglas ein 0,1 mm breiter Kapillarspalt in den auch die zu zählende Zellsuspension eingefügt wird. Für die Zellzählung sind 4x4 Quadrate mit einer Fläche von 1 mm² vorhanden. Die in den Quadraten liegenden Zellen werden gezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe x Verdünnung}} = \text{Zellen pro 1 } \mu\text{l}$$

2.5 RNA-Extraktion

Um die unterschiedlichen Aktivin Rezeptoren nachweisen zu können, mussten RNA-Extrakte der verschiedenen Zelllinien und einer Maushypophysenprimärzellkultur angefertigt werden (s.o.). Die Arbeitsschritte wurden stets auf Eis gekühlt durchgeführt. Für die RNA-Extraktion wurden die jeweiligen Zellen in Petrischalen mit einer Dichte von 250 000 bis 400 000 ausgesät und zwei bis drei Tage unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Die Platten wurden auf Eis gestellt, das Medium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen.

Im Anschluss wurden ca. 3ml Lösung D auf die Zellen gegeben. Diese wurden danach mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und homogenisiert. Die Lösung D inhibiert Reaktionen zwischen der RNA und der RNase, die durch die Zerstörung der Zellen vermehrt ablaufen. Es wurden jeweils 800µl des Lysats in Eppendorf Tubes pipettiert und 80µl Natriumacetat, 800µl Wasser gesättigtes Phenol und 160µl Chloroform/ Isoamylalkohol (49:1) dazugegeben. Nach jeder Zugabe der unterschiedlichen Lösungen wurden die Proben auf dem Vortex-Gerät gemischt. Die Proben wurden 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 14000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Dies führt zur Bildung zweier Phasen: die obere Phase enthält die RNA während die untere Phase DNA und Proteine enthält. Die obere Phase wurde in neue Gefäße pipettiert und 600µl -20° C kaltes Isopropanol hinzugefügt. Die Proben wurden dann zur RNA Präzipitierung über Nacht bei -20° C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Proben 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der

Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben noch einmal für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Dieses wurde danach in 60-80µl bei 60° C in DEPC-Wasser resuspendiert und bei -20° C gelagert.

Um die RNA-Konzentration der Proben zu bestimmen, wurde eine Verdünnung von 1µl RNA + 59µl DEPC-Wasser hergestellt. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei $\lambda_1 = 260\text{nm}$ und $\lambda_2 = 280\text{nm}$ gemessen. Der Quotient aus λ_1 / λ_2 sollte dabei zwischen 1,5 und 2 liegen. Für die Ermittlung der RNA -Konzentration wurde folgende Formel angewandt:

$$\lambda_1 \times 40 \times 60 / 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l RNA.}$$

Alle RNA Proben wurden auf ihre Reinheit überprüft. Dafür wurden PCRs (siehe unten) mit den Primern GAPDH und β -Actin durchgeführt. Diese beiden Moleküle kommen nahezu in allen Gewebearten vor und sind Indikatoren für das Vorhandensein von DNA. Nach erfolgter Elektrophorese dürfen somit im Gel keine Banden zu sehen sein. Somit hat man sichergestellt, dass keine DNA Replikation durch die PCR stattgefunden hat und die Proben nicht durch DNA kontaminiert waren. Zur Überprüfung der Reversen Transkription wurden ebenfalls PCRs mit diesen Primern durchgeführt, mit dem Unterschied, dass hier das Vorhandensein der Banden erwünscht war, denn diese zeigen eine erfolgreiche Umschreibung von RNA in cDNA.

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

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

Tabelle 12: Reaktionsansatz für Reverse Transkription

Menge	Reagenz
1 µl	RNA
1 µl	dNTP Mix 2mM
2 µl	Hexanukleotide (Zufallsprimer)
2 µl	Dithiothreitol (DTT) 10mM

1 µl	Reverse Transkriptase (200 U)
4 µl	Puffer
9 µl	DEPC Wasser

Für die PCR wurde für die jeweiligen Primer folgender Reaktionsansatz hergestellt:

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die PCR

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

Die PCR läuft in drei Grundsritten ab: Denaturierung, Anheften der Primer und Extension (siehe Abb. Nummer). Sie basiert auf der Verwendung thermostabiler DNA-Polymerase, die aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* gewonnen wird und deswegen auch Taq-Polymerase genannt wird. Sie machte es möglich, viele PCR-Zyklen in Sequenz laufen zu lassen, da sie den Schritt der Denaturierung bei über 90 °C unbeschadet übersteht, so dass nicht nach jedem Zyklus erneut Polymerase hinzugegeben werden muss. Die einzelnen Reaktionszyklen dauern jeweils 60 Sekunden und werden automatisiert durch den Thermocycler durchgeführt. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94 °C aufgeschmolzen, so dass nur noch Einzelstränge vorliegen (Denaturierung). Nach Abkühlen auf 55 bis 65 °C je nach Rezeptortyp können nun die Primer an DNA-Einzelstränge spezifisch binden (Annealing). Bei den Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die der Taq-Polymerase als Startsequenz dienen. Im dritten Schritt wird die Sequenz an den Primern beginnend bei 72 °C unter Verwendung der dNTP- Bausteine durch die Taq-Polymerase verlängert (Extension). Es werden 35 Zyklen durchgeführt. Zum Ausschluss von Kontaminationen diente als Kontrolle ein Ansatz ohne cDNA-Probe.

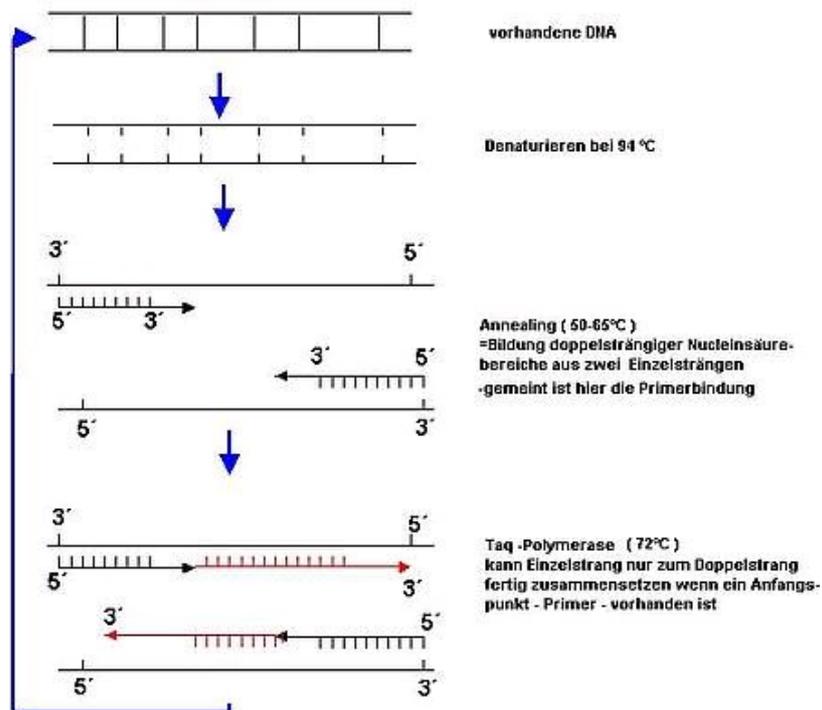


Abbildung Nr. 14: Prinzip der PCR

Die vervielfältigten DNA-Fragmente (16 µl) wurden im Anschluss mit einem Loading Buffer (4 µl) in ein 1,5% Agarosegel geladen und mittels Elektrophorese für 40min bei 80 Volt nach Größe aufgeteilt. Ein 1kb DNA Ladder Marker diente zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente und wurde bei der Elektrophorese mitgeladen. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid in das Gel können die DNA Fragmente im Gel mittels Banden unter UV-sichtbar gemacht und abfotografiert werden.

Um die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer zu finden, wurde für jeden Primer eine Gradienten PCR bei einer Temperatur von jeweils 55°C, 60°C und 65°C durchgeführt. Als DNA Probe diente dabei die c-DNA der Maushypophysenprimärzellkultur. Die Temperatur bei der die Banden am besten sichtbar waren, wurde bei der PCR verwendet.

Tabelle 14: Darstellung der Primer-Sequenzen und Temperatur für die PCR.

Primer	Sequenz (5'-3')	Temperatur
AktRII	CAC TGT CAG ACT TTC TTA AGG (sense) ATC TTT TAA GCC AGG TAT ATC (antisense)	60°C
AktRII B	GGC CTG AAG CCA CTA CAG CTG (sense) TCA CTC TGC CAC GAC TGC TTG (antisense)	60°C
AktRIB	CCC ACT TCT TTC CAA CAC ATC (sense) GGG GAA GGG AAA GCC ATC ATC (antisense)	60°C
Akt BB	CGG GTC CGC CTG TAC TTC TTC (sense) TGA CCC GTA CCT TCC TCC TGC (antisense)	60°C
Akt BA	TGG CTC AGG ACA TCA CCC AGG (sense) TCT CAA AGA GGA GGG CTG GGG (antisense)	65°C
ALK 7	GAC CTT GCG GCA GGA CTG AAG (sense) AGG GAC ACG CAC GAT TTG CTC (antisense)	60°C

2.7 Messung von VEGF und IL-6 mittels ELISA

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

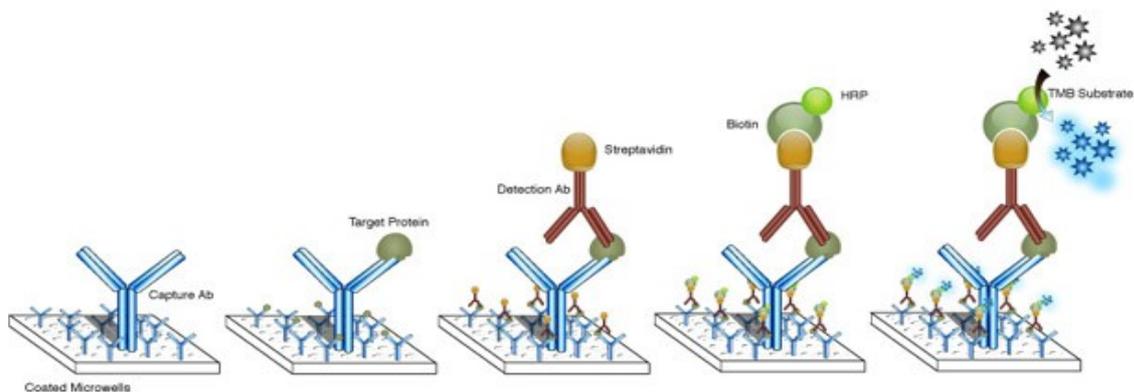


Abbildung Nr. 15: Prinzip des ELISA: Eine mit AK beschichtete Platte wird mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Die zu untersuchende Substanz kann an den AK binden. Danach wird ein 2. AK hinzugegeben, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieser 2. AK bindet an den mit Substanz gebundenen 1. AK. Danach wird ein Substrat hinzugegeben, das vom Enzym umgesetzt wird und einen Farbumschlag bewirkt.

In dieser Arbeit wurden ELISA Tests für VEGF und IL-6 eingesetzt (rVEGF Ratte, m IL-6 Maus). Für die Messung von VEGF wurden die Zelllinie TtT/GF in 48-Well Platten kultiviert (25000 Zellen/Well) und mit Aktivin A stimuliert (siehe oben). Der Überstand wurde nach 12h Stimulation abgenommen und anschließend sofort bei -20 °C eingefroren. Die Konzentration von VEGF in diesen Überständen wurden jeweils als Dreifach- oder Vierfachwerte mit dem DuoSet ELISA Kit für VEGF (R&D Systems) gemessen.

Für die Messung von IL-6 wurden die Zelllinien in 48-Well Platten kultiviert (25000 Zellen/Well) und genau wie für den Versuch mit VEGF mit Aktivin A stimuliert. Der Überstand wurde nach 12h Stimulation abgenommen und anschließen sofort bei -20 °C eingefroren. Die Konzentration von IL-6 in diesen Überständen wurden jeweils als Dreifach- oder Vierfachwerte mit dem DuoSet ELISA Kit für IL-6 (R&D Systems) gemessen.

2.8 Hormonbestimmung mittels RIA

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

detektiert. Im ersten Schritt muss ein hochspezifischer Antikörper hergestellt werden. Ein N-terminaler spezifischer Antikörper gegen ACTH von Ratten wurde in zwei Schritten mit der Carbodiimid Methode (Stalla et al., 1989) in Kaninchen hergestellt. Die Standards wurden von Bachem (Bubendorf, Schweiz) hergestellt. Zu einer bestimmten Menge von Antikörpern wurde eine bestimmte Menge von Proben (Zellüberstand) und radioaktiv markiertes Standardantigen hinzugefügt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit binden die Antikörper die Antigene (Hormone), wobei nur soviel Antikörper vorhanden sind, dass nicht alle Antigene binden können und somit die markierten mit den unmarkierten, zu untersuchende Antigenen (Hormonen) um die Bindungsplätze konkurrieren. Nachdem sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, wird die Menge an gebundenen, markierten Antigen (Hormon) mit Hilfe eines Gammazählers gemessen. Die Radioaktivität ist dabei umgekehrt proportional zur Menge der zu untersuchenden Hormone. Die Konzentration der zu untersuchenden Hormone kann durch den Vergleich der Radioaktivität mit einer Standardkurve berechnet werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Aktivin A einen Einfluss auf die Hormonsekretion von Hypophysenzellen hat. Dazu wurden AtT20-Zellen in 48 Well-Platten kultiviert, in der oben beschriebenen Form mit Aktivin A stimuliert und der Überstand für die Hormonmessung eingefroren.

2.9 Statistik

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

Zur statistischen Auswertung wurde die Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktorvariablen Zeit/Medium und darin der Dunnet Test vorgenommen, um die Gruppenunterschiede zu testen. P kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 mRNA Expression von Aktivin A/B und Aktivin-Rezeptoren in AtT20-Zellen, TtT/GF-Zellen und im Vorderlappen der Maushypophyse

Unter Verwendung der PCR wurden die Zelllinien AtT20, TtT/GF und Vorderlappenzellen der Maushypophyse auf das Vorhandensein von Aktivin β A-, Aktivin β B- und Aktivin-Rezeptor-mRNA untersucht. Folgende Aktivin-Rezeptoren wurden untersucht: ALK 7, Aktivin-Rezeptor IB (= ALK 4), Aktivin-Rezeptor IIB und Aktivin-Rezeptor II. Es konnte gezeigt werden, dass in den oben genannten Zellen mRNA aller untersuchter Aktivin-Rezeptoren, sowie von Aktivin B vorhanden ist. Aktivin A mRNA konnte in TtT/GF und in den Maushypophysenzellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in AtT20- Zellen.

Tabelle 15: Vorkommen von Aktivin Rezeptoren in den untersuchten Zelllinien und Primärzellkultur.

	Akt β A	Akt β B	ALK 7	Akt R IB (=ALK4)	Akt R IIB	Akt R II
AtT20-Zellen	-	+	(+)	+	+	+
TtT/GF-Zellen	+	+	(+)	+	+	+
Maushypophysenzellen	+	+	+	+	+	+

- negativer Rezeptornachweis, + positives Ergebnis, (+) schwach positives Ergebnis.

Aktivin β A- und β B-mRNA

TtT/GF-Zellen könnten ebenso wie normale Hypophysenzellen Aktivin A, AB und B produzieren, AtT20-Zellen nur Aktivin B.

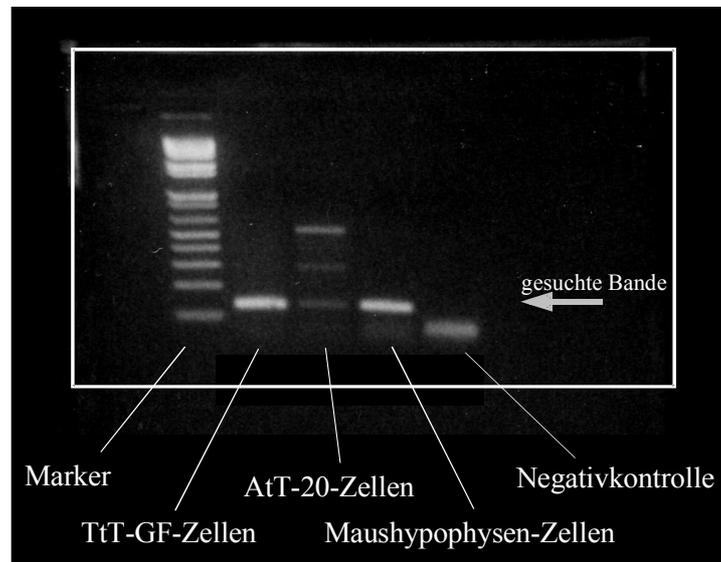


Abbildung Nr. 16: Darstellung des Nachweises von **Aktivin β B** mRNA in TtT/GF-Zellen, AtT20-Zellen, Maushypophysenzellen.

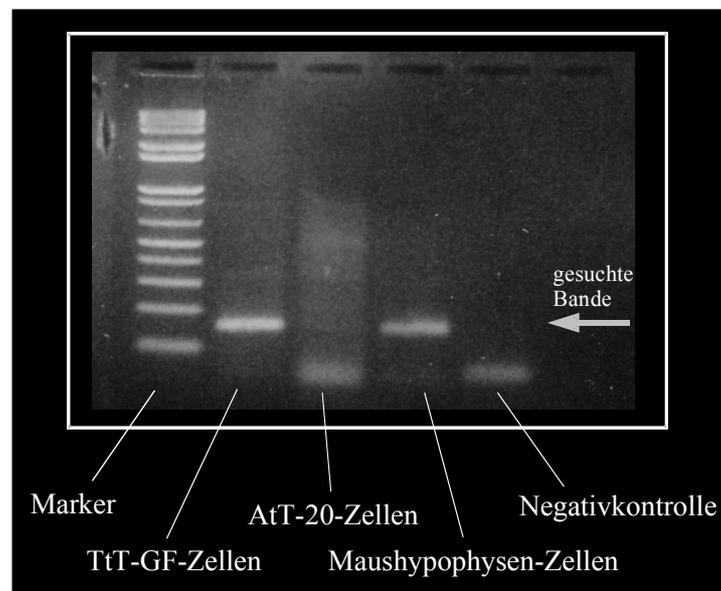


Abbildung Nr. 17: Darstellung von **Aktivin β A** mRNA in TtT/GF-Zellen, in Maushypophysenzellen. Kein Nachweis in AtT20-Zellen.

Aktivin-Rezeptoren

Alle Aktivin Rezeptoren (Akt R IB, ALK-7, Akt R II, Akt R IIB) konnten in TtT/GF-, AtT20- und in Maushypophysenzellen nachgewiesen werden.

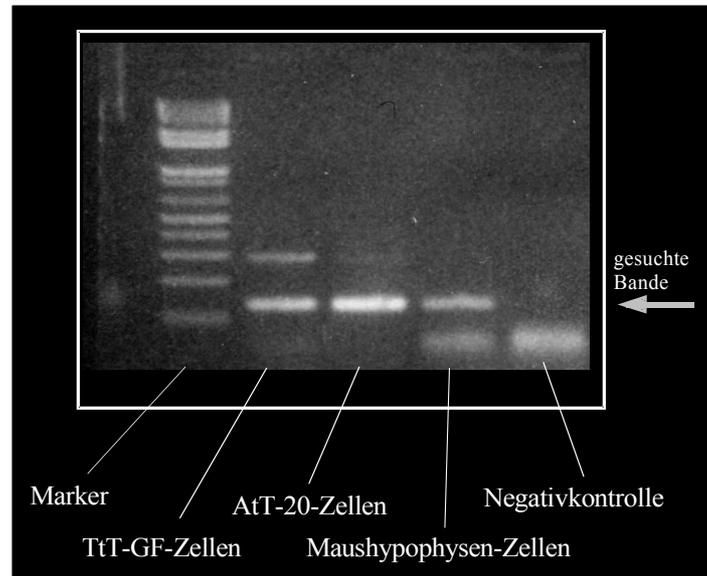


Abbildung Nr. 18: Nachweis der Rezeptor mRNA von **Akt R IIB** in TtT/GF-Zellen, AtT20-Zellen, Maushypophysenzellen..

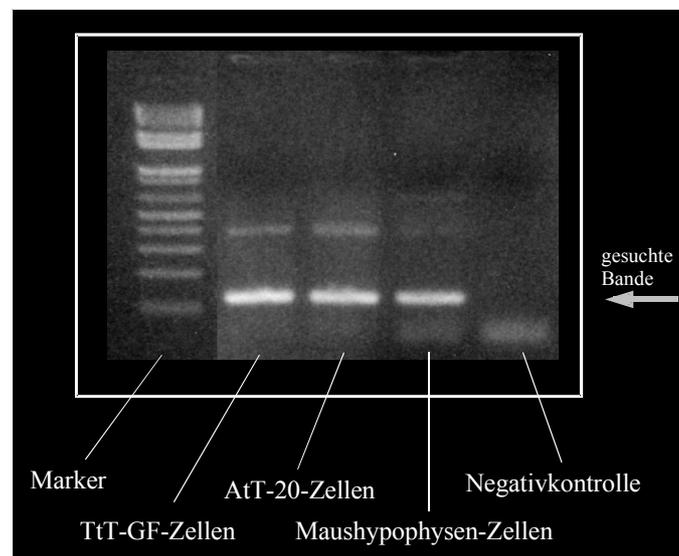


Abbildung Nr. 19: Nachweis der Rezeptor mRNA von **Akt R IB** in TtT/GF-Zellen, AtT20-Zellen, Maushypophysenzellen.



Abbildung Nr. 20: Nachweis der Rezeptor mRNA von **ALK7** in TtT/GF-Zellen (schwach positiv), AtT20-Zellen (schwach positiv), Maushypophysenzellen.

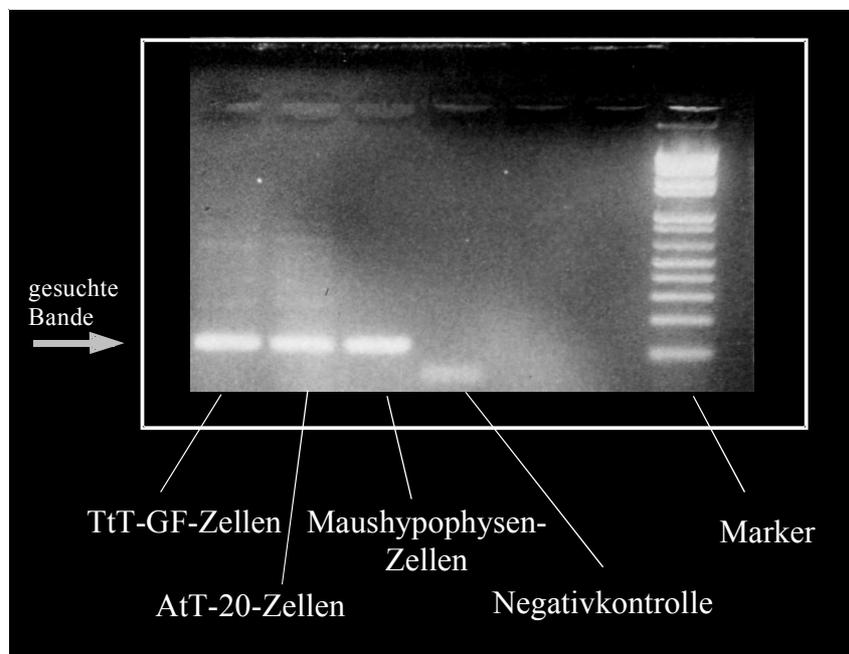


Abbildung Nr. 21: Nachweis der Rezeptor mRNA von **Akt RII** in TtT/GF-Zellen, AtT20-Zellen, Maushypophysenzellen.

3.2 Wirkung von Aktivin A in Hypophysenzellen

3.2.1 Wirkung von Aktivin A auf die Proliferation von Hypophysenzelllinien

Da die TtT/GF und die AtT20-Zelllinie wie oben beschrieben alle untersuchten Aktivin-Rezeptoren ausbilden, wurde ein Stimulationsversuch mit einer TtT/GF und einer AtT20-Zelllinie gestartet. Sie wurden nach Behandlung mit Aktivin A mittels WST1-Assay auf das Zellwachstum unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht.

Die TtT/GF-Zellen wurden zum Einen unterschiedlich lange mit Aktivin A stimuliert (24h, 48h und 72h), zum Anderen wurden verschiedene Medien verwendet (0% und 2% FCS). Unter serumfreien Bedingungen (0% FCS) wird der isolierte Effekt von Aktivin A bestimmt, in Gegenwart von 2% FCS wird der Effekt unter Bedingungen untersucht, bei denen Aktivin A mit anderen, im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren/Cytokinen (die selbst die Proliferation der Zellen beeinflussen) interagiert. Zuletzt wurde der durch die Zellen verursachte Farbumschlag photospektrometrisch als Veränderung der Absorption nach verschiedenen Einwirkzeiten mit dem WST1-Assay gemessen (15min, 30min, 90min Einwirkzeit).

Die Zellen wurden 48 Stunden mit Aktivin A verschiedener Konzentration (siehe oben) in je 0% und 2% FCS- Anteil im Medium stimuliert. Die Versuchsauswertung erfolgte getrennt nach 0% und 2% Medium. In der 0% Gruppe konnte für alle Konzentrationen von Aktivin A verglichen mit dem Basalwert eine signifikante Wachstumszunahme der Zellen gezeigt werden.

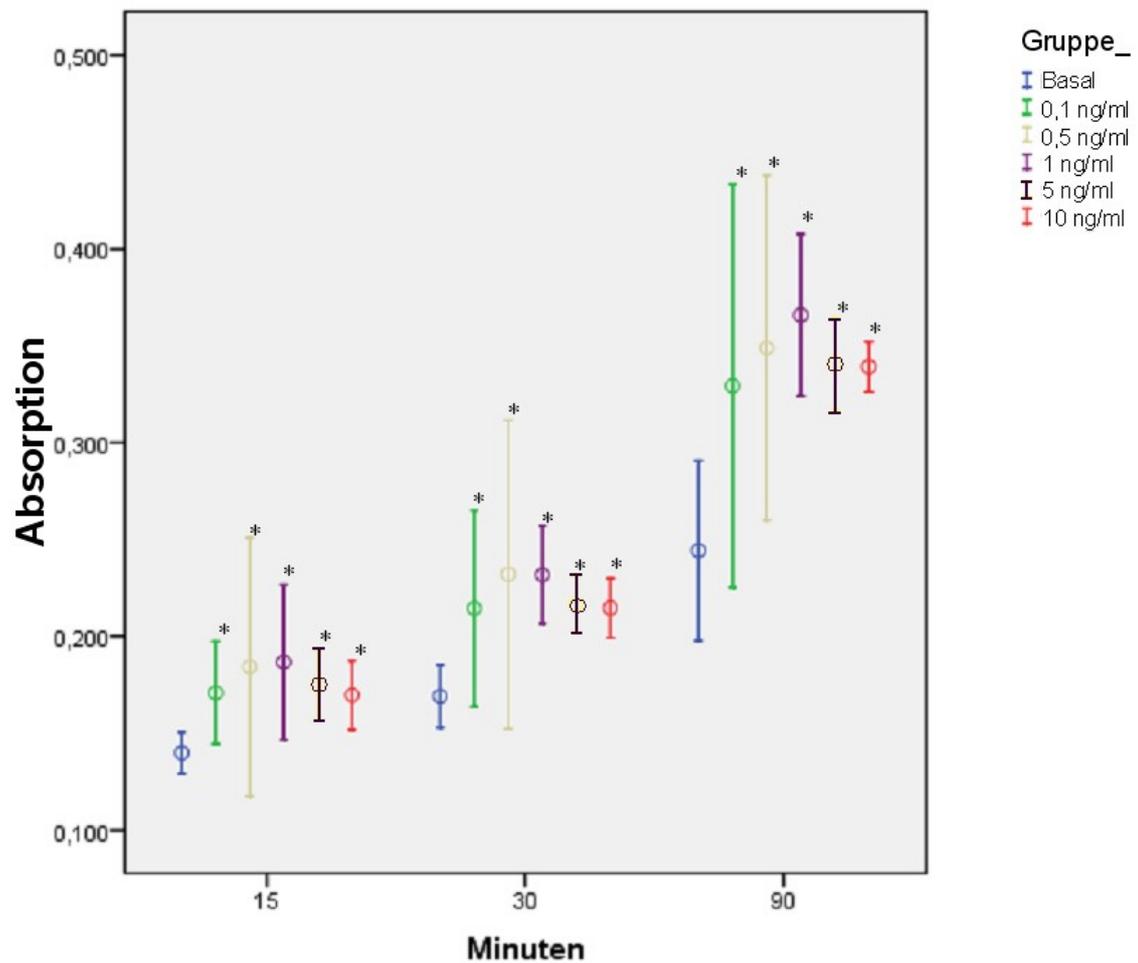


Abbildung Nr. 22: Wirkung von Aktivin A auf die Proliferation von folliculostellaren TtT/GF-Zellen in serumfreiem Kulturmedium. TtT/GF-Zellen wurden 48h mit verschiedenen Aktivin A Konzentrationen behandelt und anschließend im WST-Proliferationsassay der Farbumschlag nach 15, 30 und 90 Minuten spektrophotometrisch bestimmt. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Basalwert) stimulierte Aktivin A dosisabhängig die Proliferation von TtT/GF-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von Dreifachbestimmungen. * $p < 0,001$

In der 2. Versuchsgruppe mit verwendetem 2% FCS Medium konnte dagegen eine Wachstumshemmung der Zellen ab einer Aktivin A Konzentration von 5 ng/ml gezeigt werden.

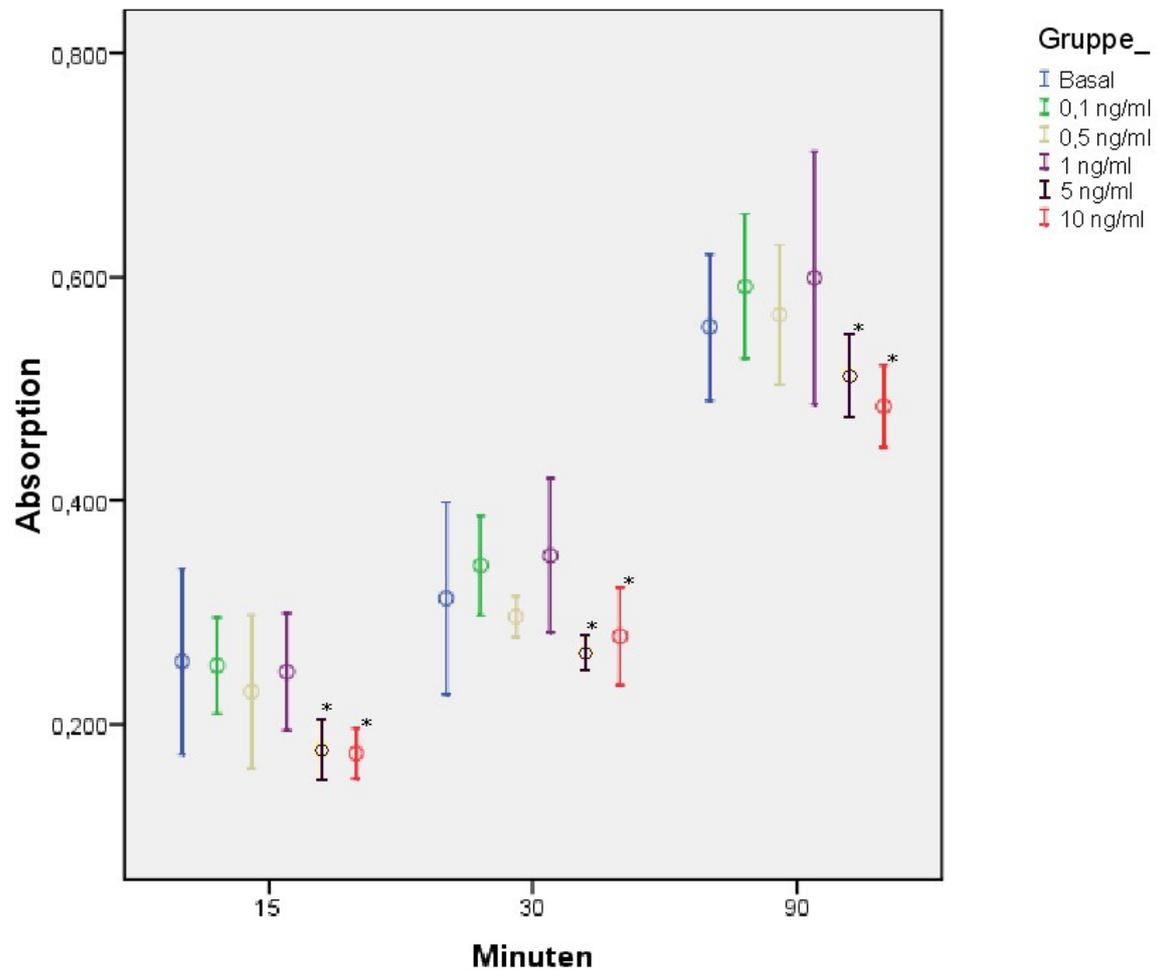


Abbildung Nr. 23: Wirkung von Aktivin A auf die Proliferation von folliculostellaren TtT/GF-Zellen in serumhaltigem Kulturmedium. TtT/GF-Zellen wurden 48h mit verschiedenen Aktivin A Konzentrationen behandelt und anschließend im WST-Proliferationsassay der Farbumschlag nach 15, 30 und 90 Minuten spektrophotometrisch bestimmt. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Basalwert) stimulierte Aktivin A dosisabhängig die Proliferation von TtT/GF-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von Dreifachbestimmungen. * $p < 0,001$

Die AtT20-Zellen wurden jeweils 24h und 48h mit Aktivin A stimuliert, dabei wurde mit unterschiedlichen Zellzahlen pro well gearbeitet (2500 und 5000 Zellen/well). Genau wie im Versuch mit den TtT/GF-Zellen wurde das Ergebnis nach 15, 30 und 90 min Einwirkzeit des

WST1-Assay Substrates abgelesen. Es wurden auch für diese Zellkultur unterschiedliche Medien gewählt (0% und 2% FCS).

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Zellwachstum innerhalb einer Gruppe zwischen den unterschiedlichen Aktivin A Konzentrationen nach der Stimulation gezeigt werden, jedoch ergab sich ein signifikanter Unterschied nach 90 Minuten Einwirkzeit des WST 1-Assay Substrates im Vergleich zu den Werten nach 15 und 30 Minuten Einwirkzeit.

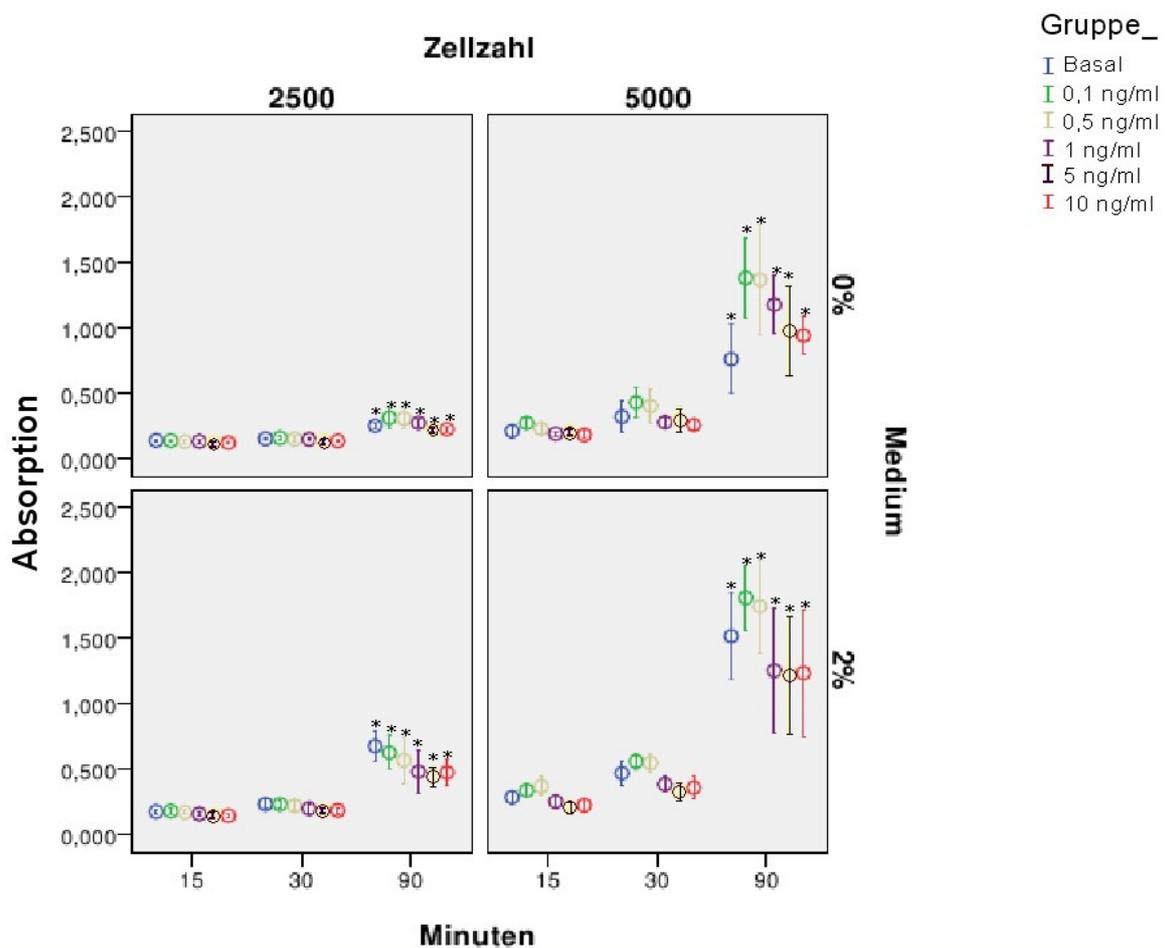


Abbildung Nr. 24: Wirkung von Aktivin A auf die Proliferation von AtT20-Zellen in serumfreiem sowie serumhaltigem Kulturmedium. AtT20-Zellen wurden jeweils 24 und 48h mit verschiedenen Aktivin A Konzentrationen behandelt und anschließend im WST-Proliferationsassay der Farbumschlag nach 15, 30 und 90 Minuten spektrophotometrisch bestimmt. Innerhalb einer Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Wachstum. Jedoch sieht man deutlich, dass sich im Versuch nach 90 Minuten Einwirkzeit des WST Assay Substrates eine signifikante Erhöhung des Wachstums aller Zellen, unabhängig der Aktivin A Konzentration und des Mediums ergibt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von Dreifachbestimmungen. * $p < 0,001$

3.2.2 Wirkung von Aktivin A auf die VEGF und IL-6 Sekretion in TtT/GF-Zellen und Maushypophysenvorderlappenzellen

Im ersten Versuch wurde die Wirkung von Aktivin A auf die Interleukin-6 Sekretion untersucht. Im Vergleich zum Basalwert, nämlich die IL-6 Sekretion der Zellen ohne Aktivin Stimulation, konnte im Versuch mit den Maushypophysenvorderlappenzellen eine signifikante Sekretionserhöhung von IL-6 bei allen Aktivin Konzentrationen im Vergleich zum Basalwert gezeigt werden. Jedoch gelang dies im Versuch mit den TtT/GF-Zellen nicht. Hier konnte kein signifikanter Unterschied der Interleukin 6 Sekretion nach Stimulation mit Aktivin A gezeigt werden. Es fällt jedoch auf, dass bei den Tumorzellen eine gesteigerte Interleukin 6 Sekretion im Vergleich zu den Maushypophysenzellen zu finden ist.

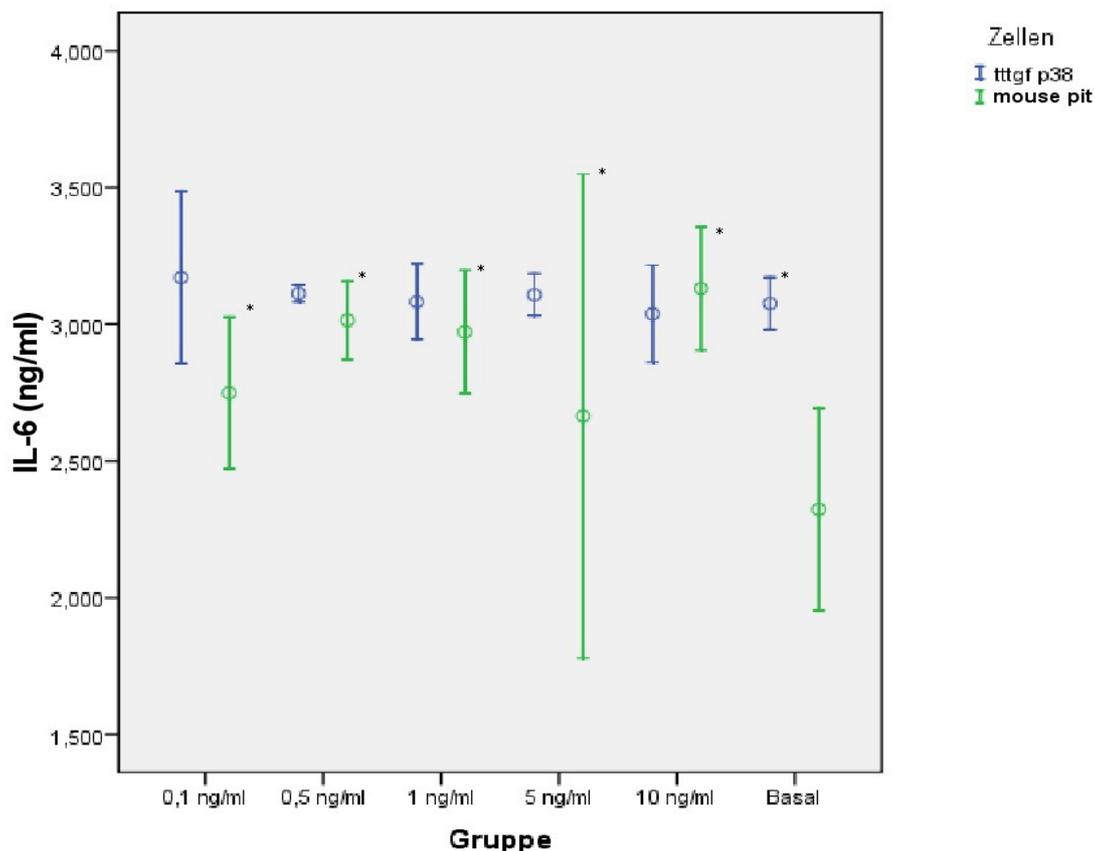


Abbildung Nr. 25: Wirkung von Aktivin A auf die IL-6 Sekretion von follikulostellaren TtT/GF-Zellen und Maushypophysenzellen. TtT/GF-Zellen und Maushypophysenzellen wurden 24h mit verschiedenen Aktivin A Konzentrationen behandelt und anschließend mittels ELISA die IL-6 Sekretion untersucht. Die Maushypophysenvorderlappenzellen zeigen eine signifikant (* $p < 0.05$) gesteigerte Sekretion von IL-6, jedoch die Tumorzellen TtT/GF aus der Passage 38 zeigen diese Sekretionserhöhung nicht. Allerdings sezernieren die unbehandelten Tumorzellen signifikant (* $p < 0.05$) mehr IL-6 als die unbehandelten Maushypophysenzellen.

Im nächsten Versuch wurde der Einfluss von Aktivin A auf die VEGF Sekretion bei Maushypophysenzellen und der TtT/GF-Zelllinie untersucht. Das Ergebnis ist sehr eindeutig. Es konnte eine signifikant verminderte Sekretion von VEGF bei den TtT/GF-Zellen nach Aktivin A Stimulation beobachtet werden. Dieser Effekt zeigte sich bei allen Konzentrationen von Aktivin A im Vergleich zum Basalwert. Im Gegensatz dazu blieb bei den Maushypophysenvorderlappenzellen die VEGF Sekretion auch nach Stimulation mit Aktivin A auf einem konstant niedrigen Niveau.

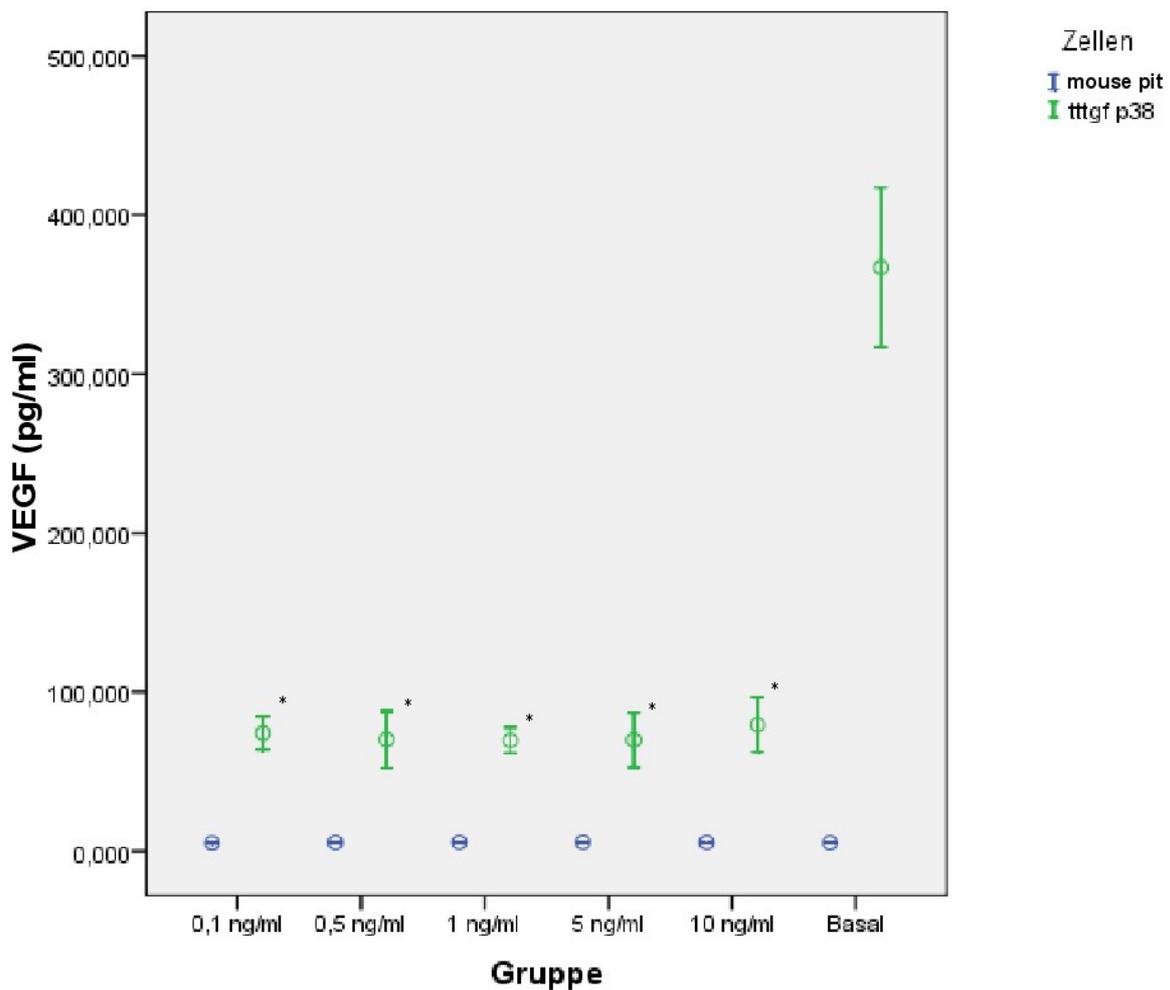


Abbildung Nr. 26: Wirkung von Aktivin A auf die VEGF-Sekretion von follikulostellaren TtT/GF-Zellen und Maushypophysenzellen. TtT/GF-Zellen und Maushypophysenzellen wurden 24h mit verschiedenen Aktivin A Konzentrationen behandelt und anschließend mittels ELISA die VEGF-Sekretion untersucht. Die Maushypophysenvorderlappenzellen zeigen sowohl nach als auch ohne Behandlung mit Aktivin A keine bzw eine sehr geringe VEGF Sekretion, wobei die TtT/GF-Zellen nach Stimulation mit Aktivin A eine signifikante Hemmung der VEGF Sekretion zeigen. * $p < 0,001$ für alle Konzentrationen von Aktivin A.

3.2.3 Wirkung von Aktivin A auf die ACTH Sekretion in AtT20-Zellen

Unter Zuhilfenahme des Radioimmunoassay wurden AtT20-Zellen nach Stimulation mit AktivinA auf eine veränderte ACTH Sekretion untersucht. Es konnte keine signifikant veränderte Hormonproduktion gezeigt werden.

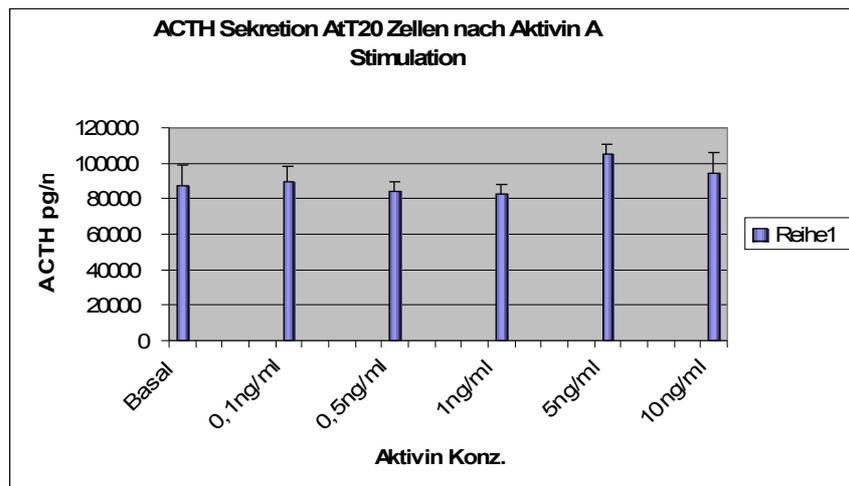


Abbildung Nr.27: Wirkung von Aktivin A auf die ACTH Sekretion in AtT 20 Zellen. AtT20-Zellen wurden mit verschiedenen Aktivin A Konzentrationen über 24h behandelt und anschließend die ACTH Sekretion mittels RIA gemessen. Nach Aktivin A Stimulation wurde die ACTH Produktion nicht signifikant verändert.

4. Diskussion

In meiner Doktorarbeit habe ich in Zellen des Hypophysenvorderlappens der Maus sowie in zwei aus Maushypophysentumoren etablierten Tumorzelllinien, den endokrin aktiven, ACTH-produzierenden AtT20-Zellen und den nicht Hormon-produzierenden, follikulostellaren TtT/GF-Zellen, die Expression des Aktivin/Aktivinrezeptorsystems untersucht, sowie einige funktionelle Aspekte dieses Systems. Die mRNA der Aktivin β B Untereinheit und der beiden Aktivin B Rezeptoren (AktRIIB, ALK7) konnte ich in allen untersuchten Zellen nachweisen. Die mRNA der Aktivin β A Untereinheit fehlte in AtT20-Zellen, ansonsten waren die mRNAs von Aktivin β A und die der beiden Aktivin A Rezeptoren (AktRII, ALK4(=AktRIB)) in allen untersuchten Zellen vorhanden. Funktionelle Untersuchungen, in denen unterschiedliche, unten ausführlich diskutierte Effekte auf Wachstum, VEGF-, IL-6- und ACTH-Sekretion beobachtet wurden, habe ich wegen des begrenzten Zeitrahmens der Doktorarbeit auf Aktivin A beschränkt.

Die Hormonproduktion und das Wachstum der verschiedenen endokrinen Zelltypen des Hypophysenvorderlappens wird nicht nur durch hypothalamische, hypophysiotrope Faktoren (Releasing und Inhibiting Factors) reguliert, sondern auch durch zahlreiche Wachstumsfaktoren (TGF- α , TGF- β , VEGF, EGF, BMP-4, IL6, u.a.) beeinflusst. Letztere erreichen die Hypophyse über die Blutzirkulation oder werden von Hypophysenzellen selbst gebildet und wirken über autokrine und parakrine Mechanismen modulierend auf die Homöostase der Hypophyse ein (Renner et al., 1996; Renner et al., 2004). Neben diesen zum Teil noch wenig verstandenen physiologischen Effekten weisen Veränderungen in der Expression dieser Faktoren oder ihrer Rezeptoren in Hypophysenadenomen darauf hin, dass sie auch an der Entwicklung, Progression und Pathophysiologie dieser Tumoren beteiligt sind (Renner et al., 1996; Renner et al., 2004).

Die Familie der TGF- β -Wachstumsfaktoren, zu der u.a. die Isoformen von TGF- β und BMP (Bone Morphogenetic Proteins) aber auch Aktivin und Inhibin zählen, spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung der Hypophyse und Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktion von Hypophysenzellen (Lin et al., 2006). Auch bei der

Pathogenese, Pathophysiologie und Progression von Hypophysentumoren sind Faktoren der TGF- β -Familie beteiligt. Die Östradiol-induzierte Verschiebung des TGF- β 1/- β 3 Verhältnisses zugunsten des stimulierend wirkenden TGF- β 3 spielt zumindest im Tiermodell eine wichtige Rolle bei der Östradiol-induzierten Prolaktinomentwicklung (Sarkar, 2006). Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Klinische Neuroendokrinologie hatten gezeigt, dass TGF- β -Isoformen die Produktion des angiogenetischen Faktors VEGF stimulierten und damit die Neovaskularisation von Hypophysentumoren fördern dürften (Renner et al., 2002). Andere Untersuchungen der Arbeitsgruppe kamen zum Ergebnis, dass BMP-4 ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von Hypophysentumoren ist, wobei BMP-4 die Pathogenese von Prolaktinomen fördert (Paez-Pereda et al., 2003), während es in kortikotropen Hypophysenadenomen die Progression und Pathophysiologie dieser Tumoren inhibiert (Giacomini et al., 2006). Der Grund für diese gegensätzliche Wirkung lag in der Interaktion der BMP-4-induzierten Smad-Signalproteine mit verschiedenen Signalwegen in den jeweiligen Tumortypen. In Prolaktinomen verstärkte BMP-4 durch die Interaktion des Smad1/Smad4 Komplexes mit dem Östrogenrezeptor dessen stimulierende Aktivität auf die Prolaktinproduktion und das Tumorwachstum (Paez-Pereda et al., 2003; Labeur et al., 2010). In kortikotropen Adenomen stimulierte BMP-4 die Retinsäure- und Somatostatin-Signalwege, die beide inhibierend auf ACTH-Produktion und Tumorzellproliferation einwirken (Giacomini et al., 2006; Labeur et al., 2010).

Da Untersuchungen zur Bedeutung von Mitgliedern der TGF- β Proteinfamilie für die Pathogenese und Pathophysiologie von Hypophysentumoren einen Forschungsschwerpunkt in der Arbeitsgruppe Klinische Neuroendokrinologie bilden, war es naheliegend, sich auch mit der Expression und Bedeutung von Aktivin und seiner Rezeptoren in Hypophysentumorzellen zu beschäftigen. Während die Bedeutung von Aktivin als wichtiger physiologischer Regulator der gonadotropen Achse intensiv untersucht wurde (Gregory & Kaiser, 2004; Bilezikjian et al., 2006; Winters & Moore, 2007; Xia & Schneider, 2009), gibt es deutlich weniger Untersuchungen zur Bedeutung von Aktivin als pathophysiologisch wirksamem Faktor in Hypophysentumoren (Lebrun, 2009). In verschiedenen Arbeiten konnten die Aktivin-/Inhibin Untereinheiten sowohl in normalen Hypophysenzellen als auch in Hypophysenadenomen nachgewiesen werden (Demura et al., 1995; Demura et al., 1996; Suzuki et al., 1996; Uccella

et al., 2000). In der PRL und GH sezernierenden laktosomatotropen GH3-Rattenhypophysentumor-Zelllinie konnte ebenfalls die Expression und Freisetzung von Aktivin A nachgewiesen werden (Ying et al., 1996). Auch die humane, follikulostellare PDFS-Hypophysentumorzelle produziert Aktivin A (Sanno et al., 1998; Danila et al., 2000), was mit meinen Befunden aus den hier untersuchten follikulostellaren TtT/GF Maushypophysentumorzellen übereinstimmt, in denen ich erstmals in diesem Zelltyp die mRNA Synthese von Aktivin β A nachweisen konnte, und damit die Voraussetzung für die Produktion des aus zwei β A-Untereinheiten bestehenden homodimeren Aktivin A. TtT/GF-Zellen exprimieren außerdem auch noch die β B Untereinheit von Aktivin, so dass die Zellen außer Aktivin A (β A/ β A) auch noch Aktivin B (β B/ β B) und Aktivin AB (β A/ β B) produzieren könnten. Interessanterweise produzieren follikulostellare Zellen nicht nur Aktivin, sondern, wie in früheren Arbeiten gezeigt, auch Follistatin, das als Bindungsprotein für Aktivin wirkt und dadurch die Interaktion von Aktivin mit seinen Rezeptoren unterbindet (Winters & Moore, 2007). Wie unter 1.4.4 bereits dargestellt, existiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen Aktivin und Follistatin wobei durch die Produktion der beiden Faktoren durch ein und dieselbe Zelle Aktivin autokrin die Produktion von Follistatin in follikulostellaren Zellen stimuliert und seine Aktivität dadurch selbst blockiert. Die physiologische Bedeutung dieser intrahypophysär durch FS Zellen vermittelten Suppression der Aktivinwirkung ist wenig verstanden und dürfte vor allem FSH-produzierende Zellen vor überschießenden Effekten von Aktivin schützen.

Ich konnte hier erstmals zeigen, dass im Gegensatz zu normalen kortikotropen Zellen, die weder Aktivin β A noch β B produzieren (siehe Tab. 5), ACTH-produzierende AtT20 Maus-Hypophysentumorzellen zumindest die mRNA für die β B Untereinheit exprimieren und damit Aktivin B Protein (β B/ β B Homodimer) produzieren könnten. Aktivin B, das ähnlich wirksam ist wie Aktivin A, könnte demnach autoparakrin auf Wachstum und Funktion von AtT20-Zellen einwirken. Ob Aktivin B auch in humanen kortikotropen Hypophysenadenomen (und anderen Hypophysentumoren) exprimiert wird und funktionell aktiv ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

Sowohl TtT/GF als auch AtT20-Zellen exprimieren die mRNA für die beiden kooperierenden Rezeptoren für Aktivin A (ActRII und ActRIIB (=ALK4)) und für Aktivin B (ActRIIB und ALK7). Da davon ausgegangen werden kann, dass auch die entsprechenden Rezeptorproteine

gebildet werden, ist die Voraussetzung gegeben, dass die Aktivine A, B und AB in den Zellen wirksam sind, zum Teil über autoparakrine Mechanismen. Diese Erstbefunde bestätigen frühere Untersuchungen, in denen Aktivinrezeptoren (vor allem Rezeptoren für Aktivin A) in anderen Hypophysentumor-Zelllinien (GH3, PDFS, HP75) und in humanen Hypophysenadenomen nachgewiesen worden waren (Demura et al., 1995; Moustakas et al., 1995; Ying et al., 1996; Alexander et al., 1996; Danila et al., 2000; Risbridger et al., 2001). Interessanterweise wurde in HP75 Zellen und in einer Reihe von Hypophysenadenomen eine trunkierte Form von ALK4 gefunden, die zusammen mit AktRII Aktivin A zwar binden kann, die aber nicht in der Lage ist, die intrazelluläre Aktivin A Signalkaskade zu induzieren (Alexander et al., 1996). In Hypophysentumoren mit trunkiertem ALK4 ist Aktivin A daher funktionell nicht aktiv und kann zum Beispiel das Wachstum von entsprechenden Hypophysenadenomzellen oder HP75 Zellen nicht inhibieren (Zhou et al., 2000; Danila et al., 2002). Erst nach experimenteller Überexpression des normalen ALK4 Rezeptors wirkt Aktivin A wieder inhibierend auf das Wachstum von HP75 Zellen (Danila et al., 2002). Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR-Methode zum Nachweis von ALK4 mRNA war es nicht möglich, die Expression eines intakten oder trunkierten ALK4 Rezeptorproteins in TtT/GF und AtT20-Zellen zu bestimmen, so dass anhand der im Folgenden diskutierten funktionellen Daten über die Expression intakter oder defekter ALK4 Rezeptoren lediglich spekuliert werden kann.

Aktivin A wird in einer Reihe von Tumoren exprimiert und wirkt über autoparakrine Mechanismen in der Regel inhibierend auf die Proliferation der Tumorzellen (Risbridger et al., 2001), indem es die Expression des cyclinabhängigen Kinase-Inhibitors p21/CIP1/WAF31 stimuliert (Chen et al., 2002). Dadurch wird die Expression von Cyclin D2 unterdrückt und die Zellzyklusprogression von der G1 zur S-Phase verhindert (Weinberg et al., 1995). Dieser durch Aktivin A induzierte Mechanismus und die damit verbundene Arretierung des Zellzyklus wurde auch in hormoninaktiven Hypophysentumoren nachgewiesen (Danila et al., 2000), mit Ausnahme der Hypophysenadenome, die den oben erwähnten, trunkierten und damit inaktiven Aktivin A Rezeptor exprimierten. Ich konnte in meinen Untersuchungen keinen Effekt von Aktivin A auf die Proliferation von AtT20-Zellen feststellen, was angesichts der Tatsache, dass diese Zellen die mRNA für ALK4 exprimieren, die Schlussfolgerung nahe legt, dass aus der ALK4 mRNA durch alternativen Spleißens nur ein trunkiertes ALK4 Protein

und somit ein inaktiver Aktivin A Rezeptor gebildet werden kann. Dies müsste in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

In TtT/GF-Zellen hingegen beeinflusste Aktivin A das Zellwachstum, was auf die Expression eines funktionell aktiven, normalen Aktivin A Rezeptors hinweist. Interessanterweise wirkte Aktivin A unterschiedlich auf die TtT/GF Proliferation: Unter serumfreien Bedingungen stimulierte Aktivin A das Wachstum von TtT/GF-Zellen während es in Gegenwart von fötalem Kälberserum (FCS) schwach, aber signifikant antiproliferativ auf die Zellen wirkte. Über die Ursache dieser gegensätzlichen Wirkung von Aktivin A kann derzeit nur spekuliert werden. Denkbar ist, dass unter serumfreien Bedingungen, unter denen die Zellen mangels Wachstumsfaktoren nur sehr langsam wachsen, die Aktivin A induzierte Smad-Signalkaskade intrazelluläre Mechanismen induziert, die in einer Wachstumsstimulation münden. Dieser isolierte, proliferative Effekt von Aktivin A könnte sich in Gegenwart von FCS ins Gegenteil umkehren, weil über verschiedenste, im FCS enthaltene Wachstumsfaktoren die Proliferation von TtT/GF-Zellen per se stark stimuliert wird, und Aktivin A-induzierte Smads nun über Interaktionen mit anderen proliferativ wirksamen Signalkaskaden deren wachstumsstimulierende Wirkung supprimieren. Um dies nachzuweisen müssten in zukünftigen Arbeiten komplexe Untersuchungen der intrazellulären Signalwege von Aktivin A und deren Interaktion mit anderen Cytokin-Signalwegen durchgeführt werden. Da in vivo Hypophysentumoren ebenfalls unter dem Einfluss einer Vielzahl intratumoraler und externer Wachstumsfaktoren stehen, würden meine Befunde nahe legen, dass Aktivin A als inhibitorischer Faktor wirksam ist, aber auch dies muss experimentell noch geklärt werden.

Untersuchungen in Hypophysentumoren haben gezeigt, dass diese intratumoral eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren produzieren, die das Wachstum der Tumoren autoparakrin fördern (Renner et al., 2004). Die Wachstumsfaktoren beeinflussen sich gegenseitig, so dass denkbar ist, dass Aktivin A nicht nur direkt auf die Proliferation von Hypophysentumorzellen einwirkt, sondern auch indirekt über eine Stimulation oder Inhibition intratumoraler Cytokine, die wiederum das Wachstum von Hypophysenadenomzellen stimulieren. Daher habe ich in der IL-6 produzierenden TtT/GF-Zelllinie den Einfluss von Aktivin A auf die Sekretion dieses Cytokins untersucht. IL-6 wird nicht nur von TtT/GF-Zellen sondern generell von humanen Hypophysenadenomzellen gebildet und wirkt autoparakrin stimulierend auf deren Proliferation (Renner et al., 2009). Es zeigte sich, dass Aktivin A die Freisetzung von IL-6 in

TtT/GF-Zellen nicht beeinflusste; ob dies auch in humanen Hypophysenadenomen der Fall ist, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. In Zellkulturen normaler Maushypophysen, in denen follikulostellare Zellen die einzige Quelle für IL-6 darstellen, konnte ich zeigen, dass Aktivin A stimulierend auf die IL-6 Sekretion wirkte. In der normalen Hypophyse ist lokal produziertes IL-6 nicht als Wachstumsfaktor aktiv sondern an immun-endokrinen Interaktionen während entzündlicher oder infektiöser Prozesse beteiligt (Renner et al., 2009), so dass Aktivin A möglicherweise über die Stimulation von IL-6 immunmodulatorisch in der normalen Hypophyse wirksam ist, was aber in zukünftigen Studien noch zu beweisen wäre.

Aktivin A könnte die Entwicklung und Progression von Hypophysentumoren nicht nur über Veränderungen der Proliferation der Tumorzellen beeinflussen, sondern auch durch die Modifikation der angiogenetischer Prozesse im Zuge der Tumorneovaskularisation. Aktivin A hat sich in den wenigen, bisher durchgeführten Studien meist als ein Stimulator des potentesten angiogenetischen Faktors VEGF sowie dessen Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 erwiesen (Maeshima et al., 2004; Poulaki et al., 2004; Endo et al., 2004) und wirkt demnach fördernd auf die Tumorneovaskularisation. In Hypophysentumorzellen fehlen diesbezügliche Untersuchungen, so dass hier in VEGF sezernierenden TtT/GF Hypophysentumorzellen erstmals gezeigt wurde, dass schon geringe Konzentrationen an Aktivin A die VEGF Sekretion stark supprimieren, was im Gegensatz zu den Befunden der o.g. Studien steht. Aktivin A wirkt damit auch gegensätzlich zu anderen Mitgliedern der TGF- β Familie, nämlich TGF β 1 und TGF- β 3, die beide in TtT/GF-Zellen stimulierend auf die VEGF Sekretion wirken (Renner et al., 2002). Dies ist umso überraschender, weil Aktivin A und TGF- β Isoformen über die gleichen Smad-Signalproteine (Smad2/3/4) wirksam sind, so dass wohl verschiedene transkriptionelle Mechanismen für die unterschiedliche Wirkung auf die VEGF Produktion verantwortlich sind. Ob Aktivin A und TGF- β Isoformen auch in humanen Hypophysentumoren die VEGF Produktion wie in TtT/GF-Zellen unterschiedlich regulieren, ist Gegenstand laufender Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Klinische Neuroendokrinologie.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist Aktivin A ein wichtiger Regulator des hypophysären Gonadotropins FSH, während die LH Produktion kaum beeinflusst wird. Dieser stimulierende Effekt von Aktivin A auf die FSH-Sekretion scheint auch in den seltenen FSH-produzierenden Gonadotropinomen erhalten zu bleiben, so dass Aktivin A vermutlich zur exzessiven Produktion dieses Hormons und damit zur Pathophysiologie FSH-produzierender Gonadotropinome beiträgt (Wessels et al., 2001).

Zur Bedeutung von Aktivin A für die Produktion anderer Hypophysenhormone in normalen und tumoralen Hypophysenzellen gibt es nur wenige Untersuchungen. Aktivin A inhibierte die GH Produktion in normalen somatotropen Hypophysenzellen (Kitaoka et al., 1988) und in humanen somatotropen Hypophysenadenomzellen (Kitaoka et al., 1991), während es in GH3 Zellen die GH mRNA Synthese und die Freisetzung von GH stimulierte (Tamura et al., 2000). Die Prolaktinsekretion wurde durch Aktivin A sowohl in normalen laktotropen Hypophysenzellen als auch in GH3 Zellen inhibiert, in letzteren wurde auch die PRL mRNA Synthese supprimiert (Kitaoka et al., 1988; Tamura et al., 2000). Die Effekte auf die GH und PRL Produktion traten schon bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen von Aktivin A auf. Da in GH3 Zellen Aktivin A die mRNA Synthese der beiden Hormone beeinflusste und Effekte auf die Sekretion frühestens nach 12stündiger Behandlung mit Aktivin A beobachtet wurden, scheint Aktivin A über die Hormonsynthese modulierend auf die PRL- und GH-Sekretion zu wirken und nicht über die Einwirkung auf vesikuläre Hormonausschüttungsprozesse, da in diesem Fall schnelle Effekte auf die Hormonfreisetzung innerhalb von Minuten bzw. wenigen Stunden zu erwarten wären.

Bei Untersuchungen zur Wirkung von Aktivin A auf die ACTH Sekretion konnte in Primärzellkulturen von Rattenhypophysen kein Effekt beobachtet werden (Kitaoka et al., 1988). Bei in vivo Untersuchungen in Ratten kam es nach intraventrikulärer Applikation von Aktivin A zu einem Anstieg von ACTH, wobei jedoch vermutlich der durch Aktivin A ebenfalls induzierte Anstieg von CRH verantwortlich gewesen sein dürfte (Plotsky et al., 1991). Bei meinen mehrfach wiederholten Experimenten zur Wirkung von Aktivin A auf die ACTH Produktion von AtT20-Zellen konnte ich weder nach kurzzeitiger Stimulation (4h) noch nach Langzeitstimulation (12h, 24h, 48h) einen signifikanten Effekt auf die ACTH Sekretion feststellen. Dieser Befund steht in Widerspruch zu einer älteren Untersuchung, in der Aktivin A sowohl die POMC mRNA Synthese als auch die ACTH Sekretion in AtT20-Zellen inhibierte, wobei dieser Effekt jedoch frühestens nach 96stündiger Behandlung mit

Aktivin A auftrat (Bilezikjian et al., 1991). Die Ursache für diese diskrepanten Befunde könnte demnach in der unterschiedlich langen Behandlungszeit mit Aktivin zu finden sein. Da aber AtT20-Zellen schnell wachsende Tumorzellen sind, die bei höherer Dichte dazu neigen, sich spontan von der Zellkulturgefäßoberfläche abzulösen und dann absterben, bergen Langzeitbehandlungen von AtT20-Zellen immer die Gefahr unspezifischer Effekte auf die Hormonproduktion in sich. Trotzdem bleibt angesichts der widersprüchlichen Befunde abzuklären, ob Aktivin A unter bestimmten Kultur- und Behandlungsbedingungen nicht doch Effekte auf die ACTH Produktion hat.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass AtT20-Zellen nur die Aktivin β B Untereinheit und TtT/GF-Zellen sowohl die β A als auch β B Untereinheit bilden. AtT20-Zellen könnten damit nur Aktivin B (β B/ β B Homodimer) bilden, während TtTGF Zellen zusätzlich noch Aktivin A (β A/ β A Homodimer) und Aktivin AB (β A/ β B Heterodimer) produzieren könnten. In verschiedenen anderen Zelltypen ist ebenfalls gezeigt worden, dass sie über die Expression unterschiedlicher beta-Untereinheiten verschiedene Aktivin Isoformen herstellen können (Risbridger et al., 2001). Über die unterschiedliche Expression von Typ I und Typ II Rezeptoren für die verschiedenen Aktivine können Zellen nur durch bestimmte Aktivin Isoformen beeinflusst werden. In TtT/GF und AtT20-Zellen wurden sowohl die Rezeptoren für Aktivin A als auch für Aktivin B exprimiert, so dass hypothetisch alle 3 Aktivin Isoformen wirksam sein könnten. Es gibt kaum Untersuchungen zur Bedeutung der verschiedenen Isoformen für Wachstum und Funktion von Hypophysenzellen, weil fast alle Studien ausschließlich mit Aktivin A durchgeführt wurden. Im Zusammenhang mit der Regulation der Gonadotropinsekretion sind unterschiedliche Wirkungen von Aktivin B auf die FSH Sekretion beschrieben worden, zum einen, dass Aktivin B deutlich schwächer als Aktivin A die FSH stimuliert (Nakamura et al., 1992), zum anderen dass Aktivin B ein sehr starker Stimulator der FSH Sekretion ist (Corrigan et al., 1991). Da auch ich nur Teilaspekte zur Wirkung von Aktivin A auf Wachstum und Funktion von TtT/GF und AtT20-Zellen untersucht habe, besteht ein erheblicher Forschungsbedarf hinsichtlich der Aufklärung der Bedeutung von Aktivin B und Aktivin AB für normale und tumorale Hypophysenzellen.

Zusammengefasst konnte ich in 2 hypophysären Tumorzelllinien (kortikotrope AtT20 und follikulostellare TtT/GF-Zellen) erstmals die Expression von Aktivin Isoformen und ihrer Rezeptoren nachweisen. Zumindest in TtT/GF-Zellen (und damit möglicherweise auch in den seltenen humanen follikulostellaren Hypophysenadenomen) beeinflusste Aktivin A die Zellproliferation und suppressierte die Produktion des angiogenetischen Faktors VEGF. In AtT20-Zellen beeinflusste das hier untersuchte Aktivin A weder Wachstum noch ACTH Produktion der Zellen. Ob dies auch für humane kortikotrope Hypophysenadenome gilt und auch für andere, hier nicht untersuchte Aktivin Isoformen sind nur einige von vielen Aspekten, die in zukünftigen Untersuchungen noch geklärt werden müssen.

5. Zusammenfassung

Der Wachstumsfaktor Aktivin (Isoformen Aktivin A, B und AB) wird gewebsspezifisch gebildet und sezerniert, u.a. in der Adenohypophyse und ihren Tumoren. Aktivin wirkt endokrin, parakrin und autokrin auf Funktionen und Wachstum verschiedenster Zelltypen und ist in der Hypophyse ein wichtiger Regulator der Gonadotropinsekretion.

Die Bedeutung von Aktivin und Aktivin-Rezeptoren in der Hypophyse und für die Pathogenese und Pathophysiologie von Hypophysentumoren ist noch weitgehend unklar. In dieser Arbeit wurde erstmals in kortikotropen AtT20 und follikulostellaren TtT/GF Hypophysentumorzellen (beides Zelllinien aus der Maus) die Expression von Aktivin und Aktivin Rezeptoren sowie einige funktionelle Aspekte von Aktivin A untersucht.

Mittels RT-PCR wurde in beiden Zelllinien die mRNA für die β B Aktivin Untereinheit und nur in TtT/GF-Zellen auch die β A mRNA nachgewiesen, so dass AtT20-Zellen nur Aktivin B (β B/ β B Homodimer) Protein, TtT/GF-Zellen dagegen auch noch Aktivin A (β A/ β A Homodimer) und Aktivin AB (β A/ β B Heterodimer) bilden können. Die mRNA für die beiden Aktivin A Rezeptoren (AktRII und ALK4) und die beiden Aktivin B Rezeptoren (AktRIIB und ALK7) konnten in beiden Zelllinien nachgewiesen werden, so dass über die Rezeptorproteindimere prinzipiell alle drei Aktivin Isoformen in den beiden Zelltypen wirksam sein können.

Funktionelle Untersuchungen zur Wirkung von Aktivin A (die beiden anderen Isoformen wurden nicht untersucht) ergaben in AtT20-Zellen, dass Wachstum und ACTH Sekretion durch Aktivin nicht beeinflusst wurden. Als Ursache wird eine aus anderen Untersuchungen bekannte posttranskriptionelle Störung vermutet, die zur Ausbildung eines trunkierten und inaktiven ALK4 Rezeptorproteins führen. Das Wachstum von TtT/GF-Zellen wurde unter serumfreien Bedingungen durch Aktivin A stimuliert, in Gegenwart von fötalem Kälberserum dagegen inhibiert. Die Sekretion des angiogenetischen Faktors VEGF wurde in TtT/GF-Zellen supprimiert, während die Produktion von IL-6, einem Wachstumsfaktor für Hypophysentumoren, nicht beeinflusst wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass Aktivin in manchen, aber nicht allen Hypophysentumortypen ein inhibitorisch wirksamer Faktor ist. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob dies für die Behandlung bestimmter Hypophysenadenomtypen von klinischer Relevanz sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Amar S, et. al. (2003). Pituitary anatomy and physiology. Neurosurgical Clinical Note of America 14: 11-23.
- Alexander JM, Bikkal HA, Zervas NT, et al. (1996) Tumor-specific expression and alternative splicing of messenger ribonucleic acid encoding activin/transforming growth factor-beta receptors in human pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab 81:783-790.
- Bilezikjian LM, Blount AL, Campen CA, et al. (1991) Activin-A inhibits proopiomelanocortin messenger RNA accumulation and adrenocorticotropin secretion of AtT20 cells. Mol Endocrinol 5:1389-1395.
- Bilezikjian LM, Blount AL, Donaldson CJ, et al. (2006) Pituitary actions of ligands of the TGF- β family: activins and inhibins. Reproduction 132:207-215.
- Bilezikjian LM, Leal AM, Blount AL, et. al. (2003). Rat anterior pituitary folliculostellate cells are targets of interleukin-1 β and a major source of intrapituitary follistatin. Endocrinology 144(2): 732-40.
- Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, et. al. (2004). Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. Mol Cell Endocrinol 225(1-2): 29-36.
- Bitzer, M., von Gersdorff G, et al. (2000). A mechanism of suppression of TGF- β /SMAD signaling by NF- κ B/RelA. Genes Dev 14: 187-197.
- Blumenfeld Z, Ritter M (2001). Inhibin, Activin and Follistatin in Human Fetal Pituitary and Gonadal Physiology. Annals NY Academy of Sciences 943: 34-48.
- Breit S, Ashman K, Wilting J, et. al. (2000). The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. Cancer Res 60(16): 4596-601.
- Brosh N, Sternberg D, Honigwachs-Sha'anani J, et. al. (1995). The plasmacytoma growth inhibitor restrictin-P is an antagonist of interleukin 6 and interleukin 11. Identification as a stroma-derived activin A. J Biol Chem 270(49): 29594-600.
- Butler CM, Gold EJ, Risbridger GP, et. al. (2005). Should activin β C more than a fading snapshot in the activin/TGF β family album? Cytokine & Growth Factor Reviews 16: 377-385.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM, et al. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. Endocr Rev 23(6): 787-823.

- Chen Y, Liu HM, Lin SL, et al. (1997). Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. EMBO J 16: 3866-3876.
- Chen YG, Liu F, Massagué J (2002). Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. Exp Biol Med (Maywood) 227(2): 75-87.
- Corrigan AZ, LM Bilezikjian, Carrol RS, et al. (1991). Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. Endocrinology 128(3): 1682-4.
- Danila DC, Inder WJ, Zhang X, et al. (2000). Activin effects on neoplastic proliferation of human pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab 85(3): 1009-15.
- Danila DC, Zhang X, Zhou Y, et al. (2000) A human pituitary tumor-derived folliculostellate cell line. J Clin Endocrinol Metab 85:1180-1187.
- Danila DC, Zhang X, Zhou Y, et al. (2002) Overexpression of wild-type activin receptor Alk4-1 restores activin antiproliferative effects in human pituitary tumor cells. J Clin Endocrinol Metab 87:4741-4740.
- Demura R, Tajima S, Suzuki T, et al. (1995) Expression of inhibin alpha, and beta A subunit and activin type II receptor mRNAs in various human pituitary adenomas. Endocr J 42:95-100.
- Demura R, Kubo O, Suzuki T, et al. (1996) Demonstration of activin in normal pituitary and in various human pituitary adenomas by immunohistochemistry. Endocr J 43:429-432.
- de Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJM, et al. (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. Mol Cell Endocrinol 116(1): 105-14.
- Endo D, Kogure K, Hasegawa Y, et al. (2004) Activin A augments vascular endothelial growth factor activity in promoting branching tubulogenesis in hepatic sinusoidal endothelial cells. J Hepatol 40:399-404.
- Fauquier T, Guerineau NC, McKinney, RA et al. (2001). Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8891-6.
- Gamby C, Waage MC, Allen RG, et al. (1996). Growth-associated protein-43 (GAP-43) facilitates peptide hormone secretion in mouse anterior pituitary AtT20 cells. J Biol Chem 271(17): 10023-8.
- Giacomini D, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, et al. (2006) Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action. Endocrinology 147:247-256.

- Goto F, Goto K, Weindel K, et al. (1993). Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. Lab Invest 69(5): 508-17.
- Gray PC, Greenwald J, Blount AL, et al. (2000). Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin. J Biol Chem 275(5): 3206-12.
- Gregory SJ, Kaiser UB (2004) Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. Semin Reprod Med 22:253-267.
- Gribi R, Tanaka T, Harper-Summers R, et al. (2001). Expression of activin A in inflammatory arthropathies. Mol Cell Endocrinol 180(1-2): 163-7.
- Hübner G, Brauchle M, Gregor M, et al. (1997). Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? Lab Invest 77(4): 311-8.
- Inoue K, Couch EF, Takano K, et al. (1999). The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. Arch Histol Cytol 62(3): 205-18.
- Jones KL, Brauman JN, Groome NP, et al. (2000). Activin A release into the circulation is an early event in systemic inflammation and precedes the release of follistatin. Endocrinology 141(5): 1905-8.
- Jones KL, Brauman JN, Groome NP, et al. (2004). Activin A and follistatin in systemic inflammation. Mol Cell Endocrinol 225(1-2): 119-25.
- Katayama T, Shiota K, Takahashi M (1990). Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. Mol Cell Endocrinol 69(2-3): 179-85.
- Kitaoga M, Kojima I, Ogata E (1988) Activin-A: a modulator of multiple types of anterior pituitary cells. Biochem Biophys Res Commun 30:48-54.
- Kitaoga M, Takano K, Tanaka Y, et al. (1991) Inhibition of growth hormone secretion by activin A in human growth hormone-secreting tumour cells. Acta Endocrinol 124:666-671.
- Kozian DH, Ziche M, Augustin HG (1997). The activin-binding protein follistatin regulates autocrine endothelial cell activity and induces angiogenesis. Lab Invest 76(2): 267-76.
- Kumar TR, Palapattu G, Wang P, et al. (1999). Transgenic models to study gonadotropin function: the role of follicle-stimulating hormone in gonadal growth and tumorigenesis. Mol Endocrinol 13: 851-865.
- Labeur M, Paez-Pereda M, Haedo M, Arzt E, Stalla GK (2010) Pituitary tumors: cell type-specific roles for BMP-4. Mol Cell Endocrinol (in press).

- Lebrun JJ (2009) Activin, TGF-beta and menin in pituitary tumorigenesis. Adv Exp Med Biol 668:69-78.
- Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, et al. (2006). The structural basis of TGF β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. Reproduction 132: 179-190.
- Maeshima K, Maeshima A, Hayashi Y, et al. (2004). Crucial Role of Activin A in Tubulogenesis of Endothelial Cells Induced by Vascular Endothelial Growth Factor. Endocrinology 145(8): 3739-3745.
- Mason AJ, Niall HD, Seeburg PH (1986). Structure of two human ovarian inhibins. Biochem Biophys Res Commun 135(3): 957-64.
- Massague J, Seoane J, Wotton D (2005). Smad transcription factors. Genes and Development 19: 2783-2810.
- Matzuk MM, Kumar TR, Shou W, et al. (1996). Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. Recent Prog Horm Res 51: 123-154.
- McDonald NQ, Hendrickson WA (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cysteine knot motif. Cell 73: 421-4.
- Mellor SL, Ball EM, O'Connor AE, et al. (2000). Localization of activin beta(A)-, beta(B)-, and beta(C)-subunits in human prostate and evidence for formation of new activin heterodimers of beta(C)-subunit. J Clin Endocrinol Metab 85(12): 4851-8.
- Michel U, Ebert S, Phillips D, et al. (2003). Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicemia. Eur J Endocrinol 148(5): 559-64.
- Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, et al. (1996). Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. Endocrinology 137(8): 3356-67.
- Moustakas A, Takumi T, Lin HY, et al. (1995) GH3 pituitary tumor cells contain heteromeric type I and type II receptor complexes for transforming growth factor beta and activin-A. J Biol Chem 270:765-769.
- Nakamura T, Asashima M, Eto Y, et al. (1992) Isolation and characterization of native activin B. J Biol Chem 267:16385-16389.
- Nusing RM, Barsig J (1999). Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. Br J Pharmacol 127(4): 919-26.
- Oda S, Nishimatsu S, Murakami K, et al. (1995). Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. Biochem

- Biophys Res Commun 210(2): 581-8.
- Ohguchi M, Yamato K, Ishihara Y, et al. (1998). Activin A regulates the production of mature interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist in human monocytic cells. J Interferon Cytokine Res 18(7): 491-8.
- Paez-Pereda M, Giacomini D, Refojo D, et al. (2003) Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. Proc Natl Acad Sci USA 100:1034-1039.
- Peng C, Mukai ST (2000). Activins and their receptors in female reproduction. Biochem Cell Biol 78: 261-279.
- Phillips DJ, Jones KL, Clarke IJ, et al. (2005). Activin A: From sometime reproductive factor to genuine cytokine. Veterinary Immunology and Immunopathology 108: 23-27.
- Plotsky PM, Kjaer A, Sutton SW, et al. (1991) Central activin administration modulates corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin secretion. Endocrinology 128:2520-2525.
- Poulaki V, Mitsiades N, Kruse FE, et al. (2004). Activin A in the Regulation of Corneal Neovascularization and Vascular Endothelial Growth Factor Expression. American Journal of Pathology 164 No. 4: 1293-1302.
- Renner U, Pagotto U, Arzt E, et al. (1996). Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. Eur J Endocrinol 135(5): 515-532.
- Renner U, Gloddek J, Paez-Pereda M, et al. (1998). Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells. Domest Anim Endocrinol 15(5): 353-62.
- Renner U, Schaaf L, Stalla GK (2001). Endokrinopathien/ Hypothalamische und hypophysäre Erkrankungen. Endokrinopathien, ed. D. Ganten and K. Ruckpaul. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Renner U, Lohrer P, Schaaf L, et al. (2002) Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. Endocrinology 143:3759-3765.
- Renner U, Paez-Pereda M, Arzt E, et al., (2004). Growth factors and cytokines: function and molecular regulation in pituitary adenomas. Molecular Pathology of the Pituitary(32): 96-109.
- Renner U, de Santana EC, Gerez J, et al. (2009) Intrapituitary expression and regulation of the gp130 cytokine interleukin-6 and its implication in pituitary physiology and pathophysiology. Ann N Y Acad Sci 1153:89-97.

- Risbridger GP, Schmitt JF, Robertson DM (2001) Activins and inhibins in endocrine and other tumors. Endocr Rev 22:836-858.
- Russell CE, Hedger MP, Brauman JN, et al. (1999). Activin A regulates growth and acute phase proteins in the human liver cell line, HepG2. Mol Cell Endocrinol 148(1-2): 129-36.
- Saiki I (1997). Cell adhesion molecules and cancer metastasis. Jap J Pharmacol 75: 215-242.
- Sanno N, Teramoto A, Sugiyama M, et al. (1998) Expression of Pit-1 mRNA and activin/inhibin subunits in clinically nonfunctioning adenomas. In situ hybridization and immunohistochemical analysis. Horm Res 50:11-17.
- Sarkar DK (2006) Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. Front Horm Res 35:32-49.
- Stalla GK, Stalla J, von Werder K, et al. (1989). Nitroimidazole derivatives inhibit anterior pituitary cell function apparently by a direct effect on the catalytic subunit of the adenylate cyclase holoenzyme. Endocrinology 125(2): 699-706.
- Stalla GK, et al.,(2006). Biochemie, Regulation und Physiologie der Hypophysenhormone. Therapieleitfaden Hypophysenerkrankungen. UNI-MED-Verlag AG. 16-25
- Suzuki T, Demura R, Tajima S, et al. (1996) Inhibin alpha and beta A subunit messenger ribonucleic acids expression in human pituitary adenomas: studies by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Endocr J 43:353-356.
- Takeda M, Otsuka F, Suzuki J, et al. (2003) Involvement of activin/BMP system in development of human pituitary gonadotropinomas and nonfunctioning adenomas. Biochem Biophys Res Commun 306:812-818.
- Tamura N, Irahara M, Kuwahara A, et al. (2000) Effect of activin on production and secretion of prolactin and growth hormone in cultured rat GH3 cells. Eur J Endocrinol 142:506-511.
- Tanimoto Y, Tanimoto K, Sugiyama F, et al. (1999). Male sterility in transgenic mice expressing activin β A subunit gene in testis. Biochem Biophys Res Commun 259: 699-705.
- Thisse C, Thisse B, Halpern ME, et al., (1999). Antivin, a novel and divergent member of the TGF β superfamily, negatively regulates mesoderm induction. Development 126: 229-240.
- Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A, et al. (2009). Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. Cell Communications and Signaling 2009, 7:15

- Uccella, S, La Rosa S, Genasetti A, et. al (2000). Localization of inhibin/activin subunits in normal pituitary and in pituitary adenomas. Pituitary 3(3): 131-9.
- Ulloa L, Doody J, and Massague J (1999). Inhibition of transforming growth factor- β /Smad signalling by the interferon- γ /STAT pathway. Nature 397: 710-713.
- Vejda S, Cranfield M, Peter B, et al. (2002). Expression and dimerization of the rat activin subunits betaC and betaE: evidence for the oramation of novel activin dimers. J Mol Endocrinol 28(2): 137-48.
- Wang T, Li BY, Danielson PD, et al. (1996). The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF β family Type I receptors. . Cell 86: 435-444.
- Weinberg RA (1995). The retinoblastoma protein and cell control. Cell 81: 323-330.
- Welsch U (2003). Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer Verlag München Jena (1. Auflage).
- Wessels HT, Hofland LJ, van der Wal R, et al. (2001) In vitro secretion of FSH by cultured clinically nonfunctioning and gonadotroph pituitary adenomas is directly correlated with locally produced levels of activin A. Clin Endocrinol 54:485-492.
- Winters SJ, Moore JP (2007) Paracrine control of gonadotrophs. Semin Reprod Med 25:379-387.
- Xia Y, Schneyer AL (2009) The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. J Endocrinol 202:1-12.
- Yamato K, Koseki T, Ohguchi M, et al.,(1997). Activin A induction of cell-cycle arrest involves modulation of cyclin D2 and p21CIP1/WAF1 in plasmatic cells. Mol Endocrinol 11: 1044-1052.
- Ying C, Zhang Z, Huang G, et al. (1996) Expression and localization of inhibin/activin and activin receptors in GH3 cells, a rat pituitary adenocarcinoma cell line. J Endocrinol Invest 19:6-11.
- Yndestad A, Landro L, Ueland T, et al. (2004). Elevated levels of activin A in heart failure: potential role in myocardial remodeling. Circulation 109(11): 1379-85.
- Zhang Z, Zheng J, Zhao Y, et al. (1997). "Overexpression of activin A inhibits growth, induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in an androgen-sensitive human prostate cancer cell line." Int. J Oncol 11: 727-736.
- Zhou Y, Sun H, Danila DC, et al. (2000) Truncated activin type I receptor Alk4 isoforms are dominant negative receptors inhibiting activin signaling. Mol Endocrinol 14:2066-2075.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Professor Dr. Günter K. Stalla, der es mir ermöglichte, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe in einem gut überschaubaren Zeitraum durchzuführen.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Ulrich Renner möchte ich für die Unterstützung bei der Umsetzung der Experimente, sowie für die wertvollen Gespräche, seine Offenheit und Anregungen danken.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Chiara Onofri, die mich in die Labortechniken eingearbeitet und mir bei der Durchführung meiner Experimente und allem, was dafür notwendig war, sehr geholfen hat.

Zudem bedanke ich mich bei Frau Stalla für die Durchführung der RIA Tests und für die Einarbeitung in die Zellkultur.

Besonders danken möchte ich meiner langjährigen Freundin Barbara Wölfel, die mir die Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Professor Stalla vermittelt und mich zu jeder Zeit im Labor mit Rat und Tat unterstützt hat.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund, dafür, dass sie immer hinter mir stehen und mir den Rücken stärken. Ohne sie wäre mein Medizinstudium gar nicht möglich gewesen.

