

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE

Direktor: Professor. Dr. Dr. F. Holsboer

**Einfluß von Komponenten der extrazellulären Matrix auf
Hypophysenzellphysiologie und Hypophysentumorpathogenese**

Dissertation

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

vorgelegt von

Florian Kuchenbauer

aus

München

2002

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. G.K. Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. Heinzeller
Prof. Dr. O.-A. Müller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer.nat. M. Paez-Pereda

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 4.7.2002

Diese Arbeit ist meiner Mutter, meinem Vater, Manfred, Nonni, dem Rest meiner Familie und ganz besonders Lina, Fritz und Georg Pils gewidmet.

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	MATERIALIEN	3
2.1	Geräte und Material.....	3
2.2	Chemikalien	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	Zielsetzung der Arbeit	5
3.2	Die Adenohypophyse.....	6
3.3	Die follikulostellare Zelle und die TtT-GF Zelllinie.....	7
3.4	Kortikotrope Tumoren (zentraler Morbus Cushing) und die AtT-20 Zelllinie	8
3.5	Prolaktinome und die GH3 Zelllinie.....	9
3.6	Der Aufbau der extrazellulären Matrix	10
3.7	Integrine und deren Mechanismen der Signaltransduktion	13
3.8	Die extrazelluläre Matrix und endokrine Zellen	15
4	METHODIK	17
4.1	Zellkultur der TtT/GF, GH3 und AtT-20 Zelllinien	17
4.2	Rattenhypophysenzellkultur	17
4.3	Beschichten der Kulturplatten mit ECM Proteinen	18
4.4	Messung der Zell-Proliferation mit ³ H-Thymidin-Inkorporation, dem WST-1 Assay und der Neubauer Zählkammer	18
4.5	Die IL-6 Messung	19
4.6	Messung von ACTH und Prolaktin	20
4.7	Messung der transkriptionalen POMC Expression in AtT-20 Zellen.....	20
4.8	Die H ₂ O ₂ -Bestimmung	21
4.9	Gewebeproben von D2-KO Mäusen, humanen Hypophysen und humanen Prolaktinomen	22
4.10	Immunhistochemie.....	22
4.11	Statistik	24

5	ERGEBNISSE	25
5.1	Einfluß der extrazellulären Matrix auf follikulostellare Zellen.....	25
5.1.1	Komponenten der ECM führen zur Änderung der TtT-GF Zellform	25
5.1.2	Die ECM reguliert TtT-GF Zellproliferation	26
5.1.3	Komponenten der ECM regulieren die IL-6 Sekretion von TtT-GF Zellen.....	27
5.2	Einfluß der ECM auf die Pathophysiologie kortikotroper Zellen.....	29
5.2.1	Die ECM reguliert ACTH Sekretion von AtT-20 Zellen	29
5.2.2	Komponenten der ECM regulieren AtT-20 Zellproliferation	31
5.2.3	Die ECM führt zu Veränderungen der Zellform in AtT-20 Zellen	32
5.2.4	Reaktive Sauerstoffradikale vermitteln proliferative ECM-Signale in AtT-20 Zellen	33
5.2.5	Die Aktivierung von Rho stimuliert AtT-20 Zellproliferation	35
5.2.6	Die Rolle des β 1-Integrins.....	36
5.3	Regulation der Proliferation und Hormonsekretion von GH3 Zellen durch Laminin	38
5.3.1	Der Einfluß von Laminin auf GH3-Zellproliferation	38
5.3.2	Regulation der Prolaktinsekretion durch Laminin.....	39
5.4	Immunhistochemische Darstellung von Laminin in Hypophysen und Prolaktinomen	41
5.4.1	Immunhistochemische Darstellung von Laminin in Wildtyp-Maushypophysen, D2-KO-Maushypophysen und D2-KO-Mausprolaktinomen	41
5.4.2	Immunhistochemische Färbung von Laminin in humanen Hypophysen und humanen Prolaktinomen	43
6	DISKUSSION	45
6.1	Allgemeines	45
6.2	Hypophysenzelllinien und Proteine der extrazellulären Matrix als Modelle	45
6.3	Regulation der TtT-GF Zellfunktion durch die extrazelluläre Matrix.....	46
6.4	Effekte der ECM auf die ACTH Sekretion kortikotroper Zellen	47
6.5	Die ECM reguliert Zellmorphologie und Proliferation follikulostellarer und kortikotroper Zellen.....	48
6.6	Mögliche Mechanismen der Signaltransduktion durch Komponenten der extrazellulären Matrix in kortikotropen Zellen	48
6.7	Effekte von Laminin auf GH3 Zellen	52
6.8	Veränderung der Lamininexpression während der Prolaktinomgenese	53
7	ZUSAMMENFASSUNG	54
8	LITERATUR	56

9	DANKSAGUNG	63
10	ANHANG	63
11	LEBENSLAUF	64

1 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bp	Basenpaare
Cd	Cluster of Differentiation
CDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cpm	Zerfälle pro Minute
CRH	Kortikotropin-Freisetzung-Hormon
D2-KO	Dopamin 2-Rezeptor Knock-Out
DAB	3,3´ Diaminobenzidin
DMEM	Dulbeco´s Modified Eagle´s Serum
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	Endothelialer Wachstumsfaktor
ELISA	Enzymimmuno-Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
FS-Zelle	Follikulostellare Zelle
GDP	Guanosindiphosphat
GFAB	Glial Fibrillary Acidic Protein
GH	Wachstumshormon
GHRH	Somatotropin-Freisetzung-Hormon
GnRH	Gonadotropin-Freisetzung-Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HPrl	humanes Prolaktin
IL	Interleukin
h	Stunde
IP	Inositolphosphat
K	Kontrolle
K I	Kollagen I
Kb	Kilobasen
LH	Luteotropes Hormon
LPA	Lysophosphatidatsäure
LPS	Lipopolysaccharid
M	männlich
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
N	Probenzahl
NAC	N-Acetylcystein
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrogen
O.D.	Optische Dichte
P	Statische Wahrscheinlichkeit
PACAP	Hypophysen Adenylatzyklase aktivierendes Polypeptid
Prl	Prolaktin
RIA	Radioimmunoassay

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
rPrl	Rattenprolaktin
T ₃	L-Trijodthyronin
TRH	Thyreotropin-Freisetzung-Hormon
TSH	Thyreoidea-Stimulierendes-Hormon
VIP	Vasointestinales Peptid
w	weiblich

2 Materialien

2.1 Geräte und Material

Brutschrank	Cytoperm 8080, (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
Elisa-Lesegerät	Dynatech MR 5000, (Dynatech, Denkendorf, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Sebatech Varifuge 3.2 RS, (Heraeus, Osterode, Deutschland)
Mikroskop	Axioskop 2, (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland)
Multipipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage	1601 MP 8, (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Rundschüttler	Infors, (Bottmingen, Schweiz)
Spektrophotometer	Pharmacia, (Freiburg, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank	Laminar Flow Typ UVF 6.18 S, (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Genkingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 C, (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge	J2-21 M/E Zentrifuge, (Beckmann Instr., Fullerton, CA, USA)
Wasserbäder	Köttermann Labortechnik, (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zellkulturflaschen	Nunc, (Dänemark)
Zellkulturmaterial	Nunc, (Dänemark)
Zellkulturplatten	Falcon, (Heidelberg, Deutschland)
Zellschaber	Renner, (Dennstadt, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Falcon, (Heidelberg, Deutschland)

2.2 Chemikalien

Amphotericin B	Biochrom, (Berlin, Deutschland)
Ascorbinsäure	Sigma, (St. Louis, Mo, USA)
BSA	Paesel, (Frankfurt, Deutschland)
DMEM	Sigma (St. Louis, Mo, USA)
FCS	Gibco Europe, (Karlsruhe, Deutschland)
Insulin Actrapid HM	Novo, (Mainz, Deutschland)
Kollagenase	Cooper Biomedical, (Lakewood, N.J., USA)
MEM-Vitamine	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, (Berlin, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, (Berlin, Deutschland)
Selen	Paesel, (Frankfurt, Deutschland)
T3	Sigma, (St. Louis, Mo, USA)

Transferrin	Sigma, (St. Louis, Mo, USA)
Trypsin	Sigma, (St. Louis, Mo, USA)
Glutamin	Sigma, (St. Louis, Mo, USA)
Glyoxal	Sigma, (St. Louis, Mo, USA)
PBS	Gibco Europe, (Karlsruhe, Deutschland)
Fibronectin	Becton Dickinson Labware, (Bedford, MA, USA)
Kollagen I	Becton Dickinson Labware, (Bedford, MA, USA)
Kollagen IV	Becton Dickinson Labware, (Bedford, MA, USA)
Laminin	Becton Dickinson Labware, (Bedford, MA, USA)
Anti- β 1-Antikörper (Klon: MAR4)	BD Pharmingen, (Heidelberg, Deutschland)
LPA	Sigma, (St. Louis, Mo, USA)
WST-1	Roche Molecular Biochemicals, (Penzberg, Deutschland)

3 Einleitung

3.1 Zielsetzung der Arbeit

Während der letzten Jahren wurde die Rolle der extrazellulären Matrix (ECM) im Rahmen der Zellphysiologie und Tumorgenese immer stärker erforscht. In Hypophysenadenomen konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zu gesunden Hypophysen, ECM-Proteine in unterschiedlichem Maße und mit unterschiedlicher Lokalisation exprimiert werden. Außerdem konnten Zusammenhänge zwischen Matrix-Metalloproteinasen, Integrität der ECM und Protoonkogenexpression dargestellt werden. Die grundsätzliche Frage, welche Rolle die extrazelluläre Matrix in Hypophysenadenomen spielt, ist aber immer noch offen.

Diese Arbeit handelt von dem Zusammenhang zwischen extrazellulärer Matrix und der Regulation von Hypophysenzellfunktionen. Als *in vitro* Modelle werden die nicht hormonsezernierende follikulostellare Zelllinie TtT-GF, die Prolaktin und Somatotropin sezernierende Zelllinie GH3, sowie die kortikotrope Zelllinie AtT-20 verwendet. Zielsetzung ist die Darstellung der Regulation von Zytokinproduktion und deren mögliche physiologische Konsequenzen auf die Zellproliferation follikulostellarer Zellen. Außerdem soll der Einfluß der ECM auf Proliferation, Hormonsekretion und Signaltransduktion in einer ACTH produzierenden Hypophysentumorzelllinie untersucht werden. Abschließend werden *in vivo* Veränderungen der ECM innerhalb der Prolaktinogenese anhand von Laminin in D2-KO Mäusen und deren mögliche Konsequenz auf das Zellwachstum und die Hormonsekretion in GH3-Zellen beschrieben. Zusammenfassend soll diese Arbeit einen Überblick über die physiologische Regulation von Hypophysenzellfunktionen und mögliche pathophysiologische Konsequenzen durch die extrazelluläre Matrix geben.

Tumorzellen durch genetische Veränderungen (6;55). In neueren Arbeiten wird die Entstehung von Hypophysenadenomen einem Gendefekt zugeschrieben aus dem sich eine hormonelle Dysregulation der geschädigten Zelle ergibt, welche schließlich zur weiteren Progression des Tumorwachstums führt (19;27).

3.3 Die follikulostellare Zelle und die TtT-GF Zelllinie

Follikulostellare Zellen (FS-Zellen) sind sternförmige Zellen in der Adenohypophyse und vermutlich neuroektodermalen Ursprungs. Sie repräsentieren ca. 5-10% aller Zellen der Hypophyse und bilden ein charakteristisches Netzwerk innerhalb des gesamten Hypophysenvorderlappens (49). Die Zellen, die keine Hormone produzieren legen sich mit ihren langen Zellausläufern um endokrine Zellen. Sie sind sowohl untereinander als auch mit endokrinen Zellen durch gap-Junktions verbunden (67). Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß FS-Zellen elektrophysiologisch Signale transduzieren, was eine regulatorische Rolle für diese Zellen nahe legt (28). Follikulostellare Zellen sezernieren eine Reihe parakrin wirksamer Faktoren wie Basic Fibroblast Growth Factor (31), Vascular Endothelial Growth Factor (30) und Interleukin-6 (86). Die Funktion der FS-Zellen war bis Ende der 80er Jahre unklar, jedoch neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß FS-Zellen mehrere Funktion innerhalb der Hypophyse erfüllen. Sie haben die Fähigkeit apoptotische Zellen zu phagozitieren (1), das Ionenmilieu zu regulieren (29), die interzelluläre Kommunikation benachbarter endokriner Zellen zu modulieren (28;75) und immun-endokrine Funktionen zu vermitteln (75). Es konnte auch gezeigt werden, daß FS-Zellen sowohl die Sekretion von Hypophysenhormonen, als auch die Proliferation von Hypophysenzellen regulieren (2;3;56;75). 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 (49).

IL-6 ist verantwortlich für die Aktivierung von T-Zellen, Bildung von Akut-Phase-Proteinen und die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten (45). Jedoch wird IL-6 nicht nur von immunkompetenten Zellen, sondern auch von Zellen anderen Ursprungs gebildet. So konnte gezeigt werden, daß Zellen der Adenohypophyse IL-6 bilden (74). Die follikulostellare Zelle wurde dort als Hauptbildungsort identifiziert (74). IL-6 hemmt die Proliferation von Hypophysenzellen (2), stimuliert aber das Wachstum von Hypophysentumorzellen (4). IL-6

konnte auch als regulierender Faktor der ACTH, GH, LH, FSH und PRL Sekretion identifiziert werden (72;75). Moduliert wird die intrahypophysäre IL-6 Produktion von Faktoren wie IL-1 (87), TNF- α (54), Glukokortikoiden (16), PACAP, VIP und LPS (3;74).

3.4 Kortikotrope Tumoren (zentraler Morbus Cushing) und die AtT-20 Zelllinie

Kortikotrope Hypophysentumoren oder M. Cushing sind klinisch durch eine exzessive ACTH-Produktion charakterisiert. Pathophysiologisch bewirkt die Überproduktion von ACTH eine gesteigerte Glukokortikoidfreisetzung, durch die sich die Klinik am besten erklären läßt. Am auffälligsten ist die Trias bestehend aus Stammfettsucht, Vollmondgesicht und Büffelnacken. Eine ACTH-Überproduktion kann hypophysär (80%) oder ektop (20%), z.B. paraneoplastisch bei einem Bronchialkarzinom, bedingt sein (13). 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 (13). In der molekularen Pathogenese kortikotroper Hypophysenadenome scheint das p27 Gen involviert zu sein (60). Ein weiteres Merkmal dieser Tumore ist die Überexpression von CRH Rezeptoren (22). Diagnostiziert wird ein ACTH produzierendes Hypophysenadenom durch den CRH-Test. Therapie der Wahl ist die mikrochirurgische transsphenoidale Hypophysenoperation mit einer Erfolgsrate von 70% (13). Alternativ, bei Versagen der Operation, kommt die Bestrahlung der Hypophyse mit konventioneller Strahlentherapie, dem „gamma knife“ oder Protonen in Betracht. Postoperativ ist eine lebenslange Substitution mit Hydrokortison erforderlich (13;69). Als Model für kortikotrope Hypophysentumoren wurde die ACTH sezernierende AtT-20 Zelllinie isoliert. Sie ist eine aus kortikotropen Mäusehypophysentumoren gewonnene Zelllinie und wurden von der American Type Culture Collection zur Verfügung gestellt (33).

3.5 Prolaktinome und die GH3 Zelllinie

Prolaktinome sind überwiegend gutartige, autonom wachsende Adenome der Adenohypophyse. Ihre Klinik ist durch eine exzessive Prolaktinproduktion charakterisiert. Hyperprolaktinämie führt bei Frauen zu Zyklusstörungen, Galaktorrhoe und Libidoverlust, bei Männern ebenfalls zu Libidoverlust, Potenzstörungen und Hypogonadismus (12).

Prolaktinome stellen den größten Teil der endokrin aktiven Hypophysentumore dar (ca. 40%-50%) und treten bevorzugt in der 3.-4. Lebensdekade auf. Sie treten als Makro- (m:w = 1:1) oder Mikroadenome (m:w = 1:29) in Erscheinung und ihre geschlechtliche Verteilung liegt bei m:w = 1:3 (90;91;93). Mikroprolaktinome haben eine geringere Progressionstendenz und sprechen ähnlich wie Makroadenome sehr gut auf eine medikamentöse Therapie an. Makroprolaktinome wachsen oft invasiv und gehen mit extrem hohen Prolaktinspiegeln einher (90). Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von Prolaktinomen führen sind nach wie vor unklar. Über einen möglichen Zusammenhang zwischen Pathogenese und der Expression der Protoonkogene Pit-1, c-myc, c-jun und c-fos wird spekuliert (93). Die Therapie der Prolaktinome erfolgt primär medikamentös mit klassischen Dopaminagonisten wie Bromocriptin und Lisurid, da Dopamin der physiologische Inhibitor der Prolaktinfreisetzung ist. Die mittlerweile zum Einsatz kommenden Dopaminagonisten der 2.Generation (Quinagolid, Cabergolin) binden mit höherer Affinität an Dopamin-2-Rezeptoren und haben somit weniger Nebenwirkungen als klassische Dopaminagonisten (90;90;91). Die medikamentöse Therapie muß lebenslang erfolgen, da es sonst zu Rezidiven kommt. Operativ werden v.a. Makroprolaktinome bei Nichtansprechen der medikamentösen Therapie behandelt. Als Tiermodell zur Erzeugung von Prolaktinomen stehen seit einigen Jahren Dopamin-2-Rezeptor Knock-Out Mäuse zur Verfügung (77). Aufgrund der fehlenden Hemmung durch Dopamin kommt es in diesen Mäusen mittels der Hyperplasie-Adenom-Sequenz zur Prolaktinombildung (7;51;77). Wegen guter medikamentöser Therapiemöglichkeiten sind operativ gewonnene Prolaktinome nur eingeschränkt verfügbar. Daher hat es sich, zur weiteren Erforschung von Zellmechanismen, bewährt etablierte Zelllinien als Modelle zu verwenden. Die Zelllinie GH3 wurde aus radioaktiv induzierten Rattenhypophysentumoren gewonnen. Sie ist eine mammosomatotrope Zelllinie, die Prolaktin und Wachstumshormon sezerniert (84). Da die Regulation der Prolaktinsekretion in GH3 Zellen ähnlich wie in normalen laktotropen Zellen geregelt wird, werden GH3 Zellen als Modell hierfür verwendet. GH3 Zellen exprimieren, ebenso wie normale laktotrope

Hypophysenzellen, Rezeptoren für Hormone wie Dopamin, TRH, Somatostatin, Östradiol, EGF und VIP (32;34).

3.6 Der Aufbau der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus verschiedenen Strukturen, welche die spezielle Histoarchitektur eines jeden Organs bestimmen. Sie versorgt Zellen mit biologischer Information und bildet ein mechanisches Gerüst für Adhäsion und Migration (9). Traditionell werden die, v.a. durch Fibroblasten gebildeten, Bestandteile der ECM in Kollagene, Glykoproteine und Proteoglykane eingeteilt, wobei eine Abgrenzung der einzelnen Strukturen untereinander oft schwierig ist.

Kollagen, die häufigste ECM-Komponente, läßt sich mittlerweile in 17 Subtypen gliedern (9). Es handelt sich dabei um homo- oder heterotrimere Moleküle, welche aus verschiedenen α -Ketten bestehen. Mehr als 34 verschiedene α -Ketten sind bis dato geklont und sequenziert worden (9). Die Sequenz der verschiedenen α -Ketten beinhaltet eine variable Anzahl des klassischen Gly-X-Y Motivs, welche die sogenannten kollagenen- und nicht-kollagenen Domänen verschiedener Länge und Lage bilden. Die kollagenen Domänen dreier homo- oder heterologer α -Ketten sind zu einer dreisträngigen Helix-Struktur gefaltet, welche den Kollagenen ihre Grundstruktur gibt (9;15). Aufgrund der Eigenschaft von Kollagenen sich zu hochorganisierten Polymeren zusammenzulagern, kann man sie grob in fibrillen- (Kollagen I, II, III, V und XI) und nichtfibrillenbildende Kollagene einteilen. Hauptvertreter der fibrillenbildenden Kollagene ist Kollagen I (Abb. 2), welches aus $\alpha_1(I)$ und $\alpha_2(I)$ -Ketten aufgebaut ist und eine Tripel-Helix Struktur bildet. Kollagen I findet sich vor allem in Haut, Sehne, Knochen und Kornea und macht dort ca. 80-99 % aller Kollagenarten aus (15).

Die am häufigsten gefundene Struktur in Basalmembranen ist Kollagen IV, welches aus seinen Kollagentripelhelixmolekülen keine Fibrillen sondern ein zweidimensionales Netz bildet (15).

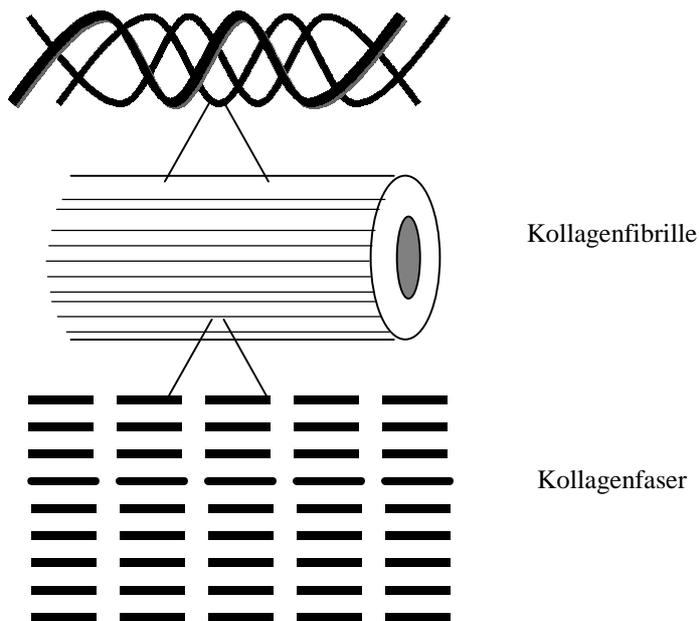


Abb.2: schematischer Aufbau von Kollagen I. Drei α -Ketten bilden eine dreisträngige Helix. Die daraus entstehenden Monomere lagern sich zu einem Kollagenpolymer, einer sog. Fibrille, zusammen. Aus den Fibrillen bilden sich schließlich Kollagenfasern.

Ein weiterer Bestandteil der ECM sind Glykoproteine. Glykoproteine formen Netzwerke und sind sowohl im Bindegewebe als auch in Basalmembranen vertreten. Sie steuern die Anordnung weiterer Komponenten der ECM sowie die Anheftung der Zellen an die Matrix und beeinflussen Bewegung und Gestalt der Zellen (9). Einer der bekanntesten Vertreter ist Fibronectin.

Fibronectin ist ein Dimer, bestehend aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten (9). In der Aminosäuresequenz von Fibronectin lassen sich drei wiederholende, aus sog. Motiven bestehende Homologien erkennen: 12 Motive der Typ I Homologie (FN I), 2 Motive der Typ II Homologie (FN II) und 15-17 Motive der Typ III Homologie (FN III) konnten bis jetzt nachgewiesen werden (9). Diese Homologien bilden im Fibronectinmolekül bis zu sechs Domänen, welche für die spezifische Bindung an Zellrezeptoren verantwortlich sind (Abb. 3) (9;47).

Durch alternatives Splicen ergeben sich mindestens 20 verschiedene Fibronectine im menschlichen Körper. Fibronectinmoleküle nehmen eine β -Faltblatt Struktur an, können diese aber bedarfsweise ändern (9). Fibronectin polymerisiert zu Fibrillen, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Diese Fibrillen können sich mit Kollagenstrukturen zusammenlagern und tragen so zur Stabilität der Matrix bei (47).

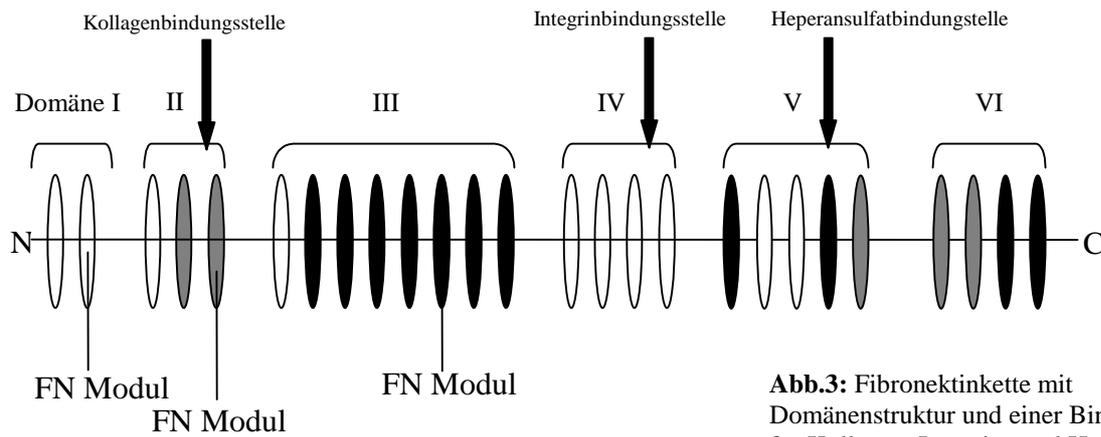


Abb.3: Fibronektinkette mit Domänenstruktur und einer Bindungsstelle für Kollagen, Integrine und Heperansulfat.

Ein weiteres, v.a. in Basalmembranen gefundenes Glykoprotein ist Laminin (10). Dieses sehr große Molekül besteht aus drei verschiedenen Polypeptiden, den sogenannten α , β und γ -Ketten. Bis jetzt konnten fünf α -, drei β - und zwei γ -Ketten geklont, sequenziert und mehr als zehn verschiedene Laminine isoliert werden (9;10). Die bekannteste Lamininisoform ist Laminin 1. In diesem Molekül sind die drei α_1 -, β_1 - und γ_1 -Ketten zu einem kreuzähnlichen Molekül mit einem langen- und drei kurzen Armen zusammengelegt (Abb. 4). Die verschiedenen Lamininisoformen beinhalten Bindungsstellen für Zellrezeptoren (z.B. Integrine), Kollagene und Proteoglykane (9).

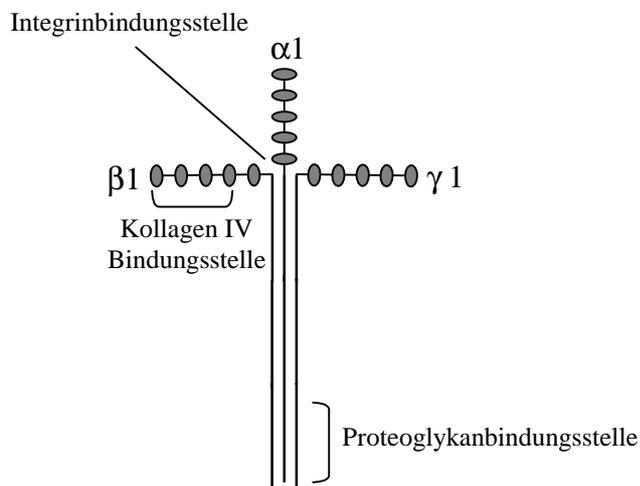


Abb. 4: Aufbau von Laminin mit der typischen Kettenstruktur und möglichen Bindungsstellen.

Ein weiterer Bestandteil der ECM sind die Glykosaminoglykane, bzw. in Verbindung mit Proteinen, sog. Proteoglykane. Typische Vertreter sind Hyaluronsäure, Fibromodulin und Agrin (9). Sie sind wichtige Bestandteile der ECM, agieren als Verbindungsstücke zwischen Kollagenen und Glykoproteinnetzwerken und tragen somit erheblich zur Regulation, Stabilisierung und Hydratation der extrazellulären Matrix bei (58).

3.7 Integrine und deren Mechanismen der Signaltransduktion

Die spezifischen Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix werden durch Transmembranproteine, hauptsächlich den Integrinen und zu einem geringen Teil von anderen Zelloberflächenproteinen vermittelt (9). Diese Interaktionen führen zu einer direkten oder indirekten Kontrolle zellulärer Funktionen wie z.B. Migration, Differenzierung, Zellform, Proliferation und Apoptose (35;37;64;88). Integrine sind Transmembranproteine, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit (Abb. 5) (48). Vierundzwanzig Integrine aus Kombinationen der 16 α - und 8 β -Untereinheiten sind im menschlichen Körper bereits identifiziert worden (36). Einige Integrine können verschiedene Komponenten der ECM binden und mehrere Integrine oft sogar dieselbe Komponente (48). Beide Untereinheiten sind Glykoproteine mit einer großen extrazellulären Domäne, einem transmembranen Segment und einem kurzen intrazellulären Schwanz bestehend aus 35-50 Aminosäuren. Lediglich die β_4 -Untereinheit mit einem intrazellulären Teil bestehend aus ca. 1000 Aminosäuren, stellt eine Ausnahme dar (48). Charakteristisch für die β -Untereinheiten ist ein zysteinreiches Segment, wogegen sich in α -Untereinheiten ein siebenfach wiederholtes homologes Segment bestimmter Aminosäuresequenzen finden läßt (48). Die extrazelluläre Bindungsstelle wird aus Teilen beider Integrinuntereinheiten gebildet (Abb.5) (48).

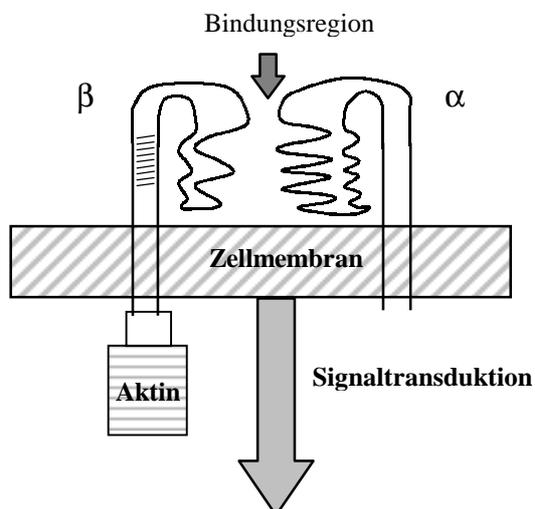


Abb.5: Integrinaufbau aus α - und β -Untereinheit. Charakteristisch für β -Untereinheiten ist eine zysteinreiche Region, wogegen α -Untereinheiten eine kationbindende Region im Kopfteil besitzen.

Der intrazelluläre Teil der Integrine interagiert direkt mit Aktin oder verschiedenen indirekten Verbindungsmolekülen des Zytoskeletts (37). Integrine sind somit in der Lage, Signale simultan mechanisch durch Modulation des Zytoskeletts, als auch chemisch durch sog. „second messenger“ Systeme zu übertragen (Abb. 6) (37). Das Binden eines Liganden an ein Integrin hat den Zusammenschluß mehrerer Integrine, eine sog. Clusterbildung, zur Folge (Abb. 6) (78). Dies führt durch Bildung fokaler Adhäsions-Komplexe zu einer Konzentration

der Integrin-Signaltransduktion (78). Zu den integrintypischen Botschafterproteinen gehören u.a. Mitglieder der Familie der Rho GTPasen (40), welche Guanosin Nukleotide binden und hydrolysieren (8). Das erlaubt ihnen entweder im aktiven GTP-gebundenen oder inaktiven GDP-gebundenen Zustand zu verweilen. Die Familie der Rho GTPasen umfasst 14 Mitglieder. Am besten charakterisiert sind Cdc42, Rac1 und RhoA (8). Sie spielen komplexe Rollen in der Regulation von Gentranskription (52), Zellzyklus (35) und Apoptose (37). Außerdem nehmen Rho GTPasen durch die Fähigkeit zur Neuorganisation des Zytoskeletts und Modulation der Zelladhäsion (78), Einfluß auf die Zellmorphologie (Abb. 6).

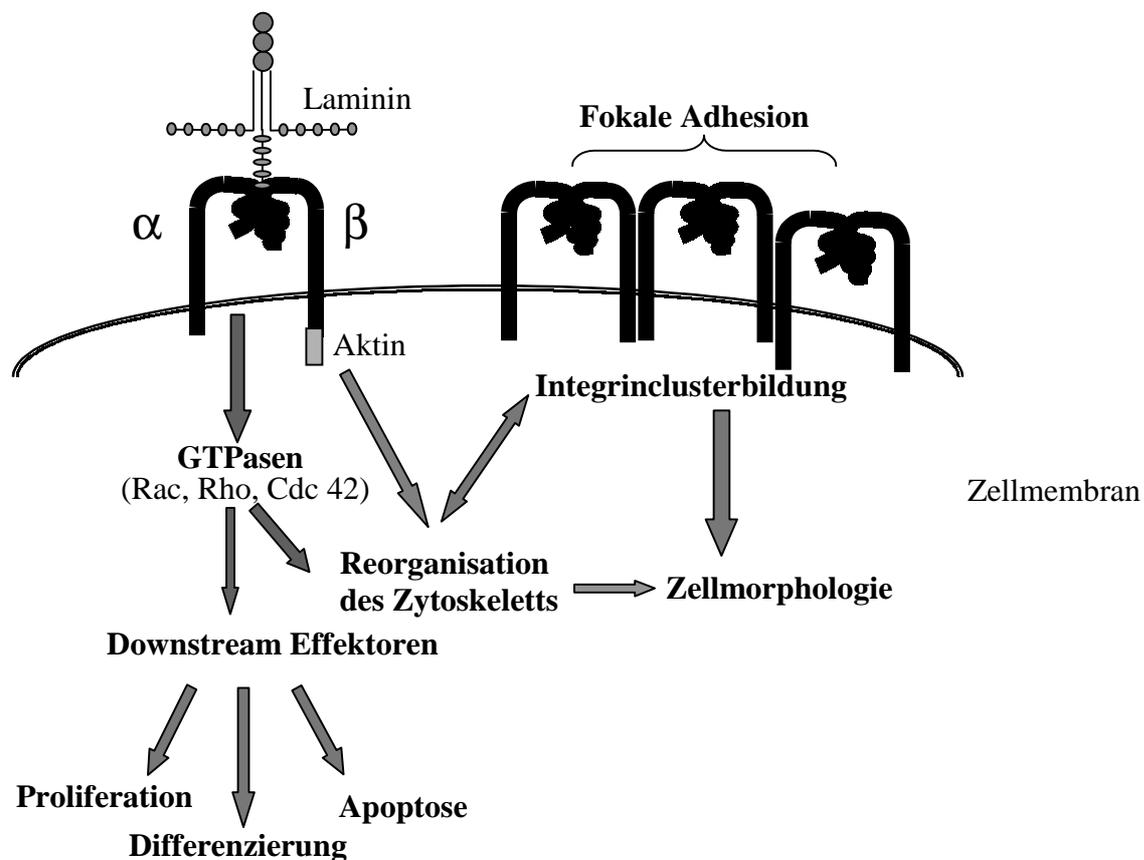


Abb. 6: Beispiel für durch Integrine vermittelte Signaltransduktion.

Die Bindung von Matrixproteinen an Integrine hat die Bildung von Integrinclustern, sog. fokalen Adhäsionen, zur Folge. Diese Clusterbildung führt zu einer Verstärkung des Signals. Integrine können GTPasen mit einer nachfolgenden Umstrukturierung des Zytoskeletts aktivieren, was Änderungen der Zellmorphologie zur Folge haben kann. Parallel dazu kommt es zur Aktivierung anderer, chemisch vermittelter Signalwege. Die extrazelluläre Matrix kann auf diesem Weg spezifische Zellfunktionen, wie Apoptose, Proliferation und Differenzierung steuern.

Vor kurzen wurde ein neuer Weg der Signaltransduktion beschrieben, der den Zusammenhang zwischen ECM induzierten Änderungen der Zellmorphologie und Gentranskription nachweist (52). Demnach regulieren Integrine und Bestandteile der extrazellulären Matrix die Rac-GTPase und bestimmen die Morphologie von Fibroblasten (52). Rac ist an den NADPH-Oxidase Komplex gebunden, welcher reaktive

Sauerstoffradikale (ROS) bildet. Diese, wiederum aktivieren den Transkriptionsfaktor NF κ B und die darauf folgende Genaktivierung (52). Ein alternativer Weg für die Integrinaktivierung durch Fibronectin beinhaltet die Aktivierung von Rho (14). Rho kann integrinunabhängig durch Lysophosphatidatsäure aktiviert werden. Es konnte u.a. gezeigt werden das die Aktivierung von Rho in CHO Zellen das Fortschreiten des Zellzyklus und deren Zellform kontrolliert (52). Als Modell für die Signaltransduktion der extrazellulären Matrix wurden meistens Fibroblasten verwendet. In Hypophysenzellen gibt es bis heute keine funktionellen Studien zu diesem komplexen Thema.

3.8 Die extrazelluläre Matrix und endokrine Zellen

Die extrazelluläre Matrix versorgt Zellen mit wichtigen Informationen für die Ausübung von zellspezifischen Funktionen (61;64). Komponenten der ECM, wie Laminin, Fibronectin und Kollagen regulieren Proliferation, Differenzierung, Morphogenese und Hormonproduktion einzelner Zellen (14;41;50;61;64;80).

So erhöhen z.B. in Granulosazellen Fibronectin, Laminin, Kollagen I und Kollagen IV die Expression von FSH-Rezeptoren sowie die Progesteronproduktion (80). Diese ECM-Komponenten regulieren ebenso in epithelialen Zellen der Mamma das Proliferationsverhalten und die Steroidhormonantwort (92). In Rattenhypophysenzellen konnte gezeigt werden, daß unter unterschiedlichen Bedingungen gelöstes Laminin sowohl einen stimulierenden, als auch inhibierenden Effekt auf die Prolaktinsekretion haben kann (21). Die ECM und Integrine sind nicht nur in der Physiologie, sondern auch in der Genese von Tumoren, involviert (88). Sie können sowohl Proliferation als auch Invasivität von Tumorzellen beeinflussen (37;79;88). Im mehrstufigen Prozeß der Tumorbildung, gewinnen Tumorzellen die Fähigkeit, ohne integrinvermittelte ECM-Zelladhäsion zu proliferieren und zu überleben. Dies ist einer der kritischen Schritte in der Tumorentwicklung (37;64).

Zudem ändert sich auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Verlauf der Tumorentwicklung. Es konnte gezeigt werden, daß bei Entstehung von Hypophysentumoren Fibronectinisoformen unterschiedlich exprimiert werden (24). Zudem korreliert die Transformation von Hypophysenzellen mit Änderungen der β_1 -Integrin Expression (26). Dagegen sind α -Integrine, mit Ausnahme der α_3 -Untereinheit, nicht in der Genese von Hypophysentumoren involviert (26). Es konnte auch gezeigt werden, daß Laminin, Fibronectin und Kollagen IV während der Entwicklung der Hypophyse aus der Rathke-

Tasche vorhanden sind (44). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen extrazellulärer Matrix, Hypophysenzellfunktion, -entwicklung, sowie der Entstehung von Hypophysentumoren vermuten. Jedoch gibt es noch keine funktionellen Studien der extrazellulären Matrix in Hypophysenzellen und Hypophysentumorzellen. Es ist daher nötig, die komplexe Regulation der Hypophyse, sowie der Hypophysentumorentstehung, durch die extrazelluläre Matrix, weiter zu erforschen, um ein tieferes Verständnis der Hypophysenphysiologie zu erlangen.

4 Methodik

4.1 Zellkultur der TtT/GF, GH3 und AtT-20 Zelllinien

Die drei verwendeten Hypophysentumorzelllinien TtT-GF (follikulostellar, Maus), GH3 (Ratte: Prolaktin-, GH sezernierend) und AtT 20 (Maus: ACTH sezernierend) wurden in Zellkulturflaschen als Monolayer im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Kulturmedium für die AtT-20 und GH3 Zelllinie wurde DMEM-Medium mit 10% FCS, für TtT/GF Zellen DMEM mit 2% FCS, 40 U/L Insulin, 5 mg/L Transferrin, 20 µg/L Na-Selenat und 30 pM T₃ verwendet. Allen Medien wurde zusätzlich 2.4 g/L Glutamin, 2.5 ng/L Amphotericin B und 10⁵ U/L Penicillin/Streptomycin zugefügt. Die Zellen wurden regelmäßig mit Trypsin/EDTA Lösung von den Zellflaschen gelöst, das Zellsuspensat bei 1200 rpm abzentrifugiert, mit Kulturmedium resuspendiert und erneut in einem Teilungsverhältnis von 1:3 eingesät. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Sowohl AtT-20, als auch GH3 Zellen wurden in Passage 15 von der American Type Culture Collection (Rockville MD, USA) erhalten. TtT/GF Zellen (Prof K. Inoue, Saitama Universität, Urawa, Japan) wurden regelmäßig immunhistochemisch auf das S-100 Protein untersucht, um mögliche Veränderung bei Kultur auszuschließen (56).

4.2 Rattenhypophysenzellkultur

Die Kultivierung der Rattenhypophysenzellen wurde mit Modifikationen nach der Methode von Vale et al durchgeführt (85). Die Hypophysen wurden von männlichen, mit CO₂ narkotisierten Sprague-Dawley Ratten (Lebendgewicht: 180-250 g) durch Dekapitation innerhalb von Minuten gewonnen. Hierzu wurden die Tiere mindestens 4 Tage vor Versuchsbeginn unter Standardbedingungen gehalten: 12 h Hell / Dunkel-Rhythmus, 21°C Raumtemperatur, Wasser und Standard-Zuchtfutter. Nach Freipräparieren der Hypophyse wurde der Vorderlappen von der restlichen Hypophyse abgelöst und mehrere Male in HDB+ Puffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 2 H₂O, 15 mM Hepes (PH 7,3), 10 mM Glucose, 2,5 mg/l Amphotericin B, 10⁵ U/l Penicillin/Streptomycin) gewaschen und anschließend mit einem Skalpell unter sterilen Bedingungen in einer silikonierten Petrischale zerkleinert. Die Hypophysenfragmente wurden bei 37°C enzymatisch mit jeweils 1 ml Verdauungslösung (4 g/l Kollagenase, 4 g/l BSA, 1 g/l Hyaluronidase II, 0,1 g/l

Trypsininhibitor, 20 mg/l DNase II) pro Hypophyse dispergiert. Während der zweistündigen Verdauung wurde das Hypophysengewebe mehrmals in einer silikonierten Pipette aufgezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 UpM für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in Kulturmedium erneut resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden auf Multiwell Platten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ inkubiert und konnten nach 3-4 Tagen verwendet werden. Die Zellvitalität, bestimmt durch eine Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung, betrug in der Regel > 95%.

4.3 Beschichten der Kulturplatten mit ECM Proteinen

Die 96- oder 6-well-Kulturplatten wurden mit Fibronectin, Laminin, Kollagen I oder Kollagen IV (Becton Dickinson, Bedford, USA) beschichtet. Die in PBS gelösten extrazellulären Matrix-Komponenten wurden mit einer Konzentration von 5 µg/cm² auf die Kulturplatte aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Kulturplatten mit PBS Lösung gespült und bei 4°C gelagert.

4.4 Messung der Zell-Proliferation mit ³H-Thymidin-Inkorporation, dem WST-1 Assay und der Neubauer Zählkammer

Zur Quantifizierung von Zellproliferationsraten wurden der Tritium-Thymidineinbau, der WST-1 Assay, sowie die Neubauer Zählkammer angewendet.

Die Bestimmung der Proliferationsrate mit Hilfe des ³H-Thymidininkorporation beruht auf dem Einbau von radioaktiv markierten ³H in neu synthetisierte DNA bei der Zellteilung. Dazu wurde die jeweilige Zelllinie mit einer Dichte von 5x10⁴ Zellen/well in, mit extrazellulären Matrixkomponenten beschichteten, 48-well-Kulturplatten ausgesät und nach drei Tagen 0.1 µBq/ml ³H-Thymidin zugesetzt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit 500 µl eiskalter 10% Trichloressigsäure für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Darauf folgte ein Waschen mit PBS und weitere 12 Stunden Inkubationszeit in einer Mischung aus 500 µl/well 0,1% Triton X-100 und 0,5M NaOH. Nach 10 minütigem Schütteln der zu messenden Platte konnten die Überstände in Szintillationsgefäße zusammen mit 3 ml Szintillationslösung pipettiert und die Zerfälle pro Minute im Beta-Counter gemessen werden. Die Anzahl der Zerfälle war proportional zur Proliferationsrate.

Ein anderer Test zur Erfassung der Zellzahl ist die Messung der optischen Dichte des von Zellen metabolisierten WST-1 Farbstoffs (Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Deutschland). WST-1 wird mittels der mitochondrialen Succinatdehydrogenase zu Formazan metabolisiert, dessen Lichtabsorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge zwischen 420-480 nm gemessen werden kann. Das WST-1 Reagenz wurde den Zellkulturen nach 4 Tagen Proliferationszeit in einer Verdünnung von 1:10 hinzugegeben. Nach 2 Stunden Inkubationszeit wurde der Farbumschlag im ELISA-Reader bei 440 nm gemessen.

Die direkte Zellzählung wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Sie besteht aus einer rechteckigen, dicken Spezialglasgrundplatte in deren mittleren Drittel sich vier Längsspalten, die parallel zu den kurzen Seiten laufen, befinden. Bei Auflage eines Deckglases entsteht zwischen Unterseite der Grundplatte und Deckglas ein 0.1 mm breiter Kapillarspalt in den auch die zu zählende Flüssigkeit eingefügt wird. Für die Zellzählung sind 4x4 Quadrate (Quadratfläche: 1 mm²) im Zellbereich eingezeichnet. Die in den Quadraten liegenden Zellen werden gezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

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

4.5 Die IL-6 Messung

Die Messung von IL-6 wurde mit Hilfe eines mausspezifischen ELISA-Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) durchgeführt, dessen Prinzip auf der Basis des Sandwich ELISA's beruht. Grundlage bildet eine mit einer definierten Menge eines mausspezifischen IL-6 Antikörpers beschichtete Mikrotiterplatte. Dieser wurde ein bestimmtes Volumen der zu bestimmenden Zellkulturüberstände und des Standards zugegeben. Nach 2 Stunden wurde ein weiterer mit Meerrettichperoxidase konjugierter anti-IL-6 Indikatorantikörper zugesetzt. Je höher die IL-6 Konzentration in der Test- oder Standardlösung war, desto mehr wurde der enzymmarkierte Antikörper gebunden. Als nächstes wurde mittels einer peroxidaseabhängigen Farbreaktion das im ELISA-Reader zu messende Reaktionsprodukt gebildet. Die verwendete Wellenlänge lag bei 540 nm. Die Intensität der gemessenen Farbe ist proportional zu der im initialen Schritt gebundenen Menge von IL-6. Aus der Standardkurve konnte schließlich die Menge des zu bestimmenden IL-6 abgelesen werden. Die Nachweisgrenze lag bei 3,1 pg/ml. Der Intra-Assay Koeffizient betrug 3,4% und der Inter-Assay Koeffizient 6,4%.

4.6 Messung von ACTH und Prolaktin

Um Substanzen wie z.B. Enzyme, Eiweiße und Hormone in sehr geringen Mengen nachzuweisen wird heute in vielen Fällen der Radioimmunoassay (RIA) verwendet. Ein Prinzip beruht auf einer doppelten kompetitiven Antigen-Antikörperreaktion. Der zu messenden Probe wurde eine genau definierte Menge Kaninchen-Antikörper (verdünnt in 0.05M Phosphatlösung + 1% Rinder Albumin) zugegeben. Gleichzeitig wurde eine genau definierte Menge an radioaktiv markiertem Tracer (radioaktiv markiertes Antigen, verdünnt in 0.05M Phosphatlösung + 1% Rinder Albumin) hinzugefügt. Das zu messende Antigen konkurriert mit dem Tracer um die Bindung an dem Kaninchen-Antikörper. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37°C wurde ein weiterer, gegen den Kaninchen Antikörper gerichteter, Ziegen-Antikörper (verdünnt in 0.05M Phosphatlösung +1% Rinder Albumin) der Lösung zugesetzt. Durch Zugabe von 1 ml 6% PEG und Abzentrifugieren wurde der im Gamma-Counter zu messende radioaktive Antigen-Antikörper Niederschlag gewonnen. Die Menge an gebundenen markiertem Antigen ist umgekehrt proportional der Menge an unmarkiertem Antigen (je mehr Tracer aus der Bindung verdrängt wurde, desto weniger radioaktiv ist der Antigen-Antikörper Niederschlag und desto höher die Konzentration). Parallel zu diesem Prozeß wurde eine Eichkurve erstellt, indem definierte Mengen nicht markierten Antigens mit dem Tracer um die Bindung am spezifischen Antikörper konkurrieren. Durch Ablesen an der Standardkurve konnte nun die Hormonmenge der Proben bestimmt werden. Für die Bestimmung der Hormone wurden von Stalla et al. etablierte RIAs verwendet (5). ACTH und Prolaktin wurden direkt ohne vorherige Extraktion im Kulturmedium gemessen.

4.7 Messung der transkriptionalen POMC Expression in AtT-20 Zellen

Das Prinzip der Messung der transkriptionalen Regulation des POMC-Gens beruht auf der Transfektion von AtT-20 Zellen mit einem POMC-Luc Reporterplasmid. Dieses Reporterplasmid ist durch die Koppelung des POMC-Promoters mit Luciferase-cDNA gekennzeichnet. Im Falle einer Transkription führt dies in den Zellen zur gleichzeitigen Expression von POMC-RNA und Luciferase-RNA. Die proportionale Expression der Luciferase ermöglicht die indirekte Messung der POMC Expression durch eine im Luminometer erfassbare Reaktion des Luciferaseenzym mit Luciferin.

Das POMC-Luc Reporterkonstrukt besteht aus 770bp des Ratten POMC-Luc Promoters, der alle notwendigen Sequenzen für die korrekte in vivo POMC-Expression in Maushypophysen enthält. Desweiteren findet man eine TATA box, 2.6 Kb der Luciferase cDNA und ein Polyadenylationssignal.

Zur Durchführung des Experiments wurden 2×10^6 AtT-20 Zellen in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser mit 10% FCS Kulturmedium eingesät und bei Standardbedingungen (37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2) inkubiert. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden 100 μl OptiMEM I (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) (DMEM ohne FCS und Antibiotika) mit 50 μl /well Lipofektamin (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) gemischt. Dazu wurden 5 ml OptiMEM I und 12 μg POMC-Luc Plasmid DNA hinzugefügt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur erfolgte ein Waschen der Zellen mit PBS und die Zugabe der Transfektionslösung. Die Inkubationszeit der Transfektion betrug 2,5 Stunden. Nach Absaugen des Transfektionsgemisches wurden die Zellen erneut mit 5 ml 20% FCS Kulturmedium für 12 Stunden inkubiert. Nach Ablösen folgte ein erneutes Aussäen der Zellen mit einer Dichte von 10^5 Zellen/well auf mit extrazellulären Matrixkomponenten ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten 6-well-Platten in 10% FCS Kulturmedium bei Standardbedingungen für 24 Stunden. Abschließend wurden die Zellen mit dem Cell Culture Lysis Buffer (Promega, Mannheim, Deutschland) lysiert.

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 50 μl Luc-Assaypuffer (Promega, Mannheim, Deutschland) (7.5 ml Tris-HCL 1M pH 7.8, 2.5 ml MgCl_2 1M, ad 100 ml Milli Q) mit ATP (0.1 M in Aqua dest.) gemischt und in die Messröhrchen gegeben. Anschließend wurde Luciferin (Stocklösung: 10 mg in 1 ml MeOH + 2.572 ml Luc-assaypuffer ohne ATP) in Luc-assaypuffer ohne ATP auf 1:40 verdünnt und dem Berthold Luminometer zugefügt. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 50 μl des lysierten Zellextraktes in die Messröhrchen. Jetzt konnte die Lichtemission gemessen werden, aus der sich die Luciferaseaktivität und indirekt die POMC Expression ergab.

4.8 Die H_2O_2 -Bestimmung

Zur Bestimmung von endogen gebildetem H_2O_2 wurde ein Kit (Oxis International, Inc., Portland, USA) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Oxidationsreaktion von Fe^{2+} mit H_2O_2 zu Fe^{3+} und einer weiteren Bindung des Fe^{3+} an Xylenol Orange zu einem stabilen Farbkomplex. Zum Erstellen der Standardkurve wurde H_2O_2 (30%) verwendet und von einer

Höchstkonzentration von 100 μM abwärts verdünnt. Die Absorptionsrate des Farbkomplexes wurde im ELISA Reader bei 560 nm gemessen. Der Versuchsaufbau bestand im Aussäen von 2×10^3 AtT-20 Zellen / well in, mit extrazellulären Matrixproteinen beschichteten 96-well-Platten. Die H_2O_2 Konzentration wurde mit Hilfe des Kits stündlich über einen Zeitraum von vier Stunden gemessen.

4.9 Gewebeproben von D2-KO Mäusen, humanen Hypophysen und humanen Prolaktinomen

Die Gewebeproben der D_2 -Rezeptor defizienten, sowie der genetisch identischen, aber D_2 -Rezeptor exprimierenden Mäuse wurden von Dr. Low (Vollum Institute, USA) zur Verfügung gestellt. Die D_2 -Rezeptor defizienten Mäuse stammen aus der genetisch gemischten 129/SV x B6 Mausreihe, welche mit dem B6 Mausstamm über fünf Generationen zurückgekreuzt wurde (51). Die Wildtypmaushypophysen entstammen der 129/SvEvTac Mausreihe (51). Humane Hypophysen- und Prolaktinomgewebeproben wurden von Prof. Eisenmenger (Inst. für Rechtsmedizin, LMU München), sowie von Dr. Müller und Dr. Uhl (Abt. Neurochirurgie, Klinikum Großhadern) zur Verfügung gestellt.

4.10 Immunhistochemie

Immunhistochemische Nachweisverfahren werden zur Lokalisation von Zell- und Gewebekomponenten verwendet. Die Immunreaktion basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörperreaktion mit einem oder mehreren, i.d.R. durch Enzyme oder Fluorochrome markierten, Antikörpern. Die Nachweisreaktion kann direkt als auch indirekt sein. Als Nachweismethode wurde in dieser Arbeit die Avidin-Biotin-Komplex Methode verwendet. Zum immunhistochemischen Nachweis von Prolaktin und Laminin wurden Gefrierschnitte humaner Hypophysen und Prolaktinome, sowie Wildtyp Maushypophysen und D2-KO Maushypophysen verwendet.

Zur Vorbereitung der Schnitte, wurden im ersten Schritt die 10 μm dicken Gefrierschnitte für eine Stunde getrocknet. Die Fixierung erfolgte in 4% Paraformaldehyd für 5 Minuten bei 4°C . Anschließend folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS und eine 5 minütige Inkubation in 70% Ethanol. In absteigender Alkoholreihe (80% Ethanol 5 min., 70% Ethanol 5 min., 50% Ethanol 5 min.) wurden die Schnitte rehydriert und abschließend zweimal mit PBS-

Pufferlösung gewaschen. Um endogene Peroxidasen zu blockieren wurden die Gewebeschnitte mit 3% H₂O₂ in PBS für 15 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte, zur Unterdrückung unspezifischer IgG-Bindungen, eine einstündige Präinkubation bei Raumtemperatur mit 10% Tierserum. Das Serum wurde anschließend abgesaugt. Jetzt folgte die Zugabe des in PBS und 1% Serum verdünnten Primärantikörpers mit einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 4°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Antikörper mehrmals mit PBS abgewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in PBS verdünnten, peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper für 30 Min. bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde der ABC-Komplex vorbereitet (15 µl Avidin + 15 µl Biotin + 970 µl NaPO₄ 0.05M pH 7.4, 30 Min. Inkubationszeit). Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS, die Zugabe des ABC-Komplexes und einer weiteren 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Präparate mit DAB (2 ml Diaminobenzidin Stock-Lösung + 98 ml NaPO₄ 0.05N pH 7.4 + 33 µl H₂O₂) inkubiert, welches dabei in ein braunes, mikroskopisch erfassbares Präzipitat umgewandelt wird.

Verwendete Antikörper:

1. AK	Laminin (Ziege)	Prolaktin a) Maus (Hase) b) Human (Maus)
Verdünnungen	1:1400	a) 1:1600 b) 1:400
2. AK	Ratte anti Ziege Biotin	a) Hase anti Ziege Biotin b) Maus anti Ziege Biotin
Verdünnungen	1:1000	1:300

Zur Erhöhung des Kontrastes des Präparates wurde abschließend eine Kerngegenfärbung durchgeführt. Zuerst wurde das Präparat für 5 Min. in Aqua dest. getaucht um anschließend für 4 Min. mit 1% Toluidinblau gefärbt zu werden. Darauf folgte ein kurzes zweimaliges Spülen mit Aqua dest. und ein Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (1 Min. 70% Ethanol + 100% Essigsäure, 2 Min. 96% Ethanol, 2 Min. 100% Ethanol, 5 Min. Xylol). Abschließend erfolgte das Eindecken mit Enthellan und Aushärten der Schnitte.

4.11 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt, wobei jedes Einzelexperiment mit Dreifachwerten durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet.

Zur statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit dem Scheffé-Test bestimmt. P-Werte kleiner 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluß der extrazellulären Matrix auf follikulostellare Zellen

5.1.1 Komponenten der ECM führen zur Änderung der TtT-GF Zellform

Es konnte gezeigt werden, daß Fibroblasten unterschiedliche Zellmorphologien auf einzelnen ECM-Komponenten annehmen und dies Auswirkungen auf den Zellmetabolismus hat. Um darzustellen ob Komponenten der ECM die Zellform von TtT-GF Zellen ändern, wurden TtT-GF Zellen auf Kollagen I, Laminin und Fibronectin kultiviert.

TtT-GF Zellen zeigten je nach ECM-Komponente unterschiedliche Zellformen und Anordnungen. Auf Fibronectin kultivierte TtT-GF Zellen nahmen, im Vergleich zur Kontrolle auf Plastik, ausgebreitete Form sowie eine insgesamt verteilte Anordnung ein (Abb. 7 B). Auf Laminin wachsende TtT-GF Zellen fielen besonders durch ihre zahlreichen langen, dünnen Zellausläufer und einer verteilt wachsenden Anordnung (Abb. 7 C) auf. Im Gegensatz dazu neigen auf Kollagen I kultivierte TtT-GF Zellen zur Bildung von Zellnestern (Abb. 7 D) und einer länglichen, gebogenen Form (Abb. 7 D). Die unterschiedlichen Zellmorphologien könnten durch Unterschiede in der Zelladhäsion bedingt sein, was mögliche Konsequenzen auf die Zellfunktionen haben könnte.

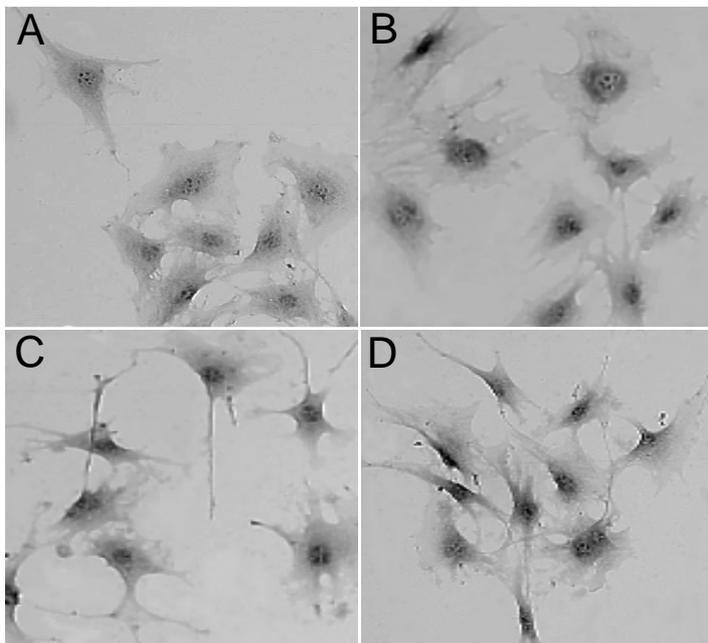


Abb. 7: TtT-GF Zellmorphologie auf verschiedenen ECM Komponenten.

TtT-GF Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen/well, für 48 h auf mit verschiedenen ECM-Substraten ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten 6-well-Platten kultiviert. **A**, TtT-GF auf Plastik; **B**, Fibronectin; **C**, Laminin; **D**, Kollagen I.

5.1.2 Die ECM reguliert TtT-GF Zellproliferation

Um den Zusammenhang zwischen Komponenten der ECM und TtT-GF Zellproliferation zu messen, wurde ^3H -Thymidininkorporation, der WST-1 Proliferationsassay sowie die Neubauer Zählkammer verwendet. Nach 4 Tagen Inkubationszeit zeigte sich unter Fibronectin und Kollagen I eine signifikante Zunahme der TtT-GF Zellproliferation (Abb. 8). Laminin führte dagegen zu keiner signifikanten Änderung der Zellproliferation (Abb. 8). ^3H -Thymidininkorporation als auch der WST-1 Proliferationsassay ergaben gleiche Resultate (nicht gezeigt). Um die Effekte unterschiedlicher Zellanhaftung auszuschließen wurden regelmäßige Kontrollen der Zellvitalität mit Akridinorange und Ethidiumbromid durchgeführt.

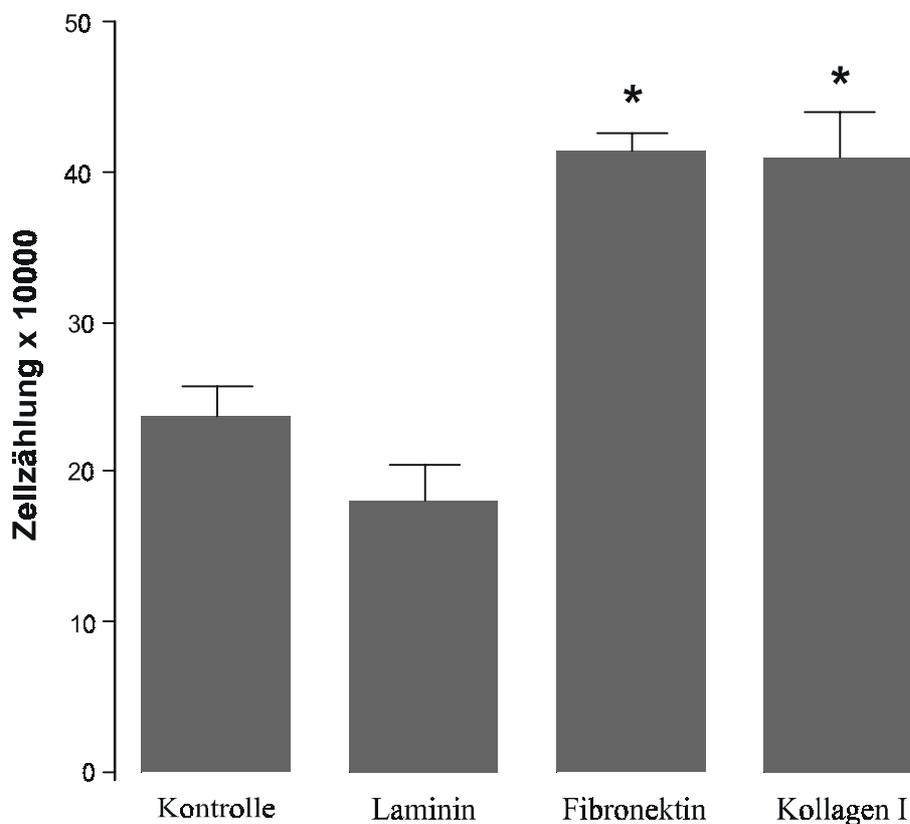


Abb. 8: ECM Komponenten regulieren die TtT-GF Zellproliferation.

TtT-GF Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen, auf mit ECM-Komponenten ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichteten Lochplatten kultiviert. Nach vier Tagen Inkubationszeit wurde das Zellwachstum durch direkte Zellzählung in der Neubauer Zählkammer bestimmt. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

5.1.3 Komponenten der ECM regulieren die IL-6 Sekretion von TtT-GF Zellen

IL-6 ist ein Zytokin, welches von TtT-GF Zellen sezerniert wird und für diese Zellen u.a. ein Wachstumsfaktor ist. Fibronectin und Kollagen I stimulierten TtT-GF Zellproliferation signifikant. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe eines RIAs den Einfluß der ECM auf eine mögliche IL-6 Freisetzung von TtT-GF Zellen untersucht. Kollagen I führte zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Freisetzung (Abb. 9). Sowohl Fibronectin als auch Laminin zeigten keine signifikante Änderung der IL-6 Sekretion (Abb. 9). Um einen Zusammenhang zwischen Proliferationssteigerung und Erhöhung der IL-6 Sekretion herauszufinden, wurde IL-6 mit Hilfe eines anti-IL-6 Antikörpers (5 mg/ml) blockiert. Die gleichzeitige Zugabe des anti-IL-6 Antikörpers kehrte die Stimulation der TtT-GF Zellproliferation durch Kollagen I um (Abb. 10). Die alleinige Antikörperzugabe zur Kontrolle hatte keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum der TtT-GF Zellen (nicht gezeigt). Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit der durch Fibronectin und Kollagen I verursachten Proliferationserhöhung. Sie deuten auf eine IL-6 vermittelte Proliferationssteigerung durch Kollagen I, aber einen anderen Mechanismus unter Fibronectin..

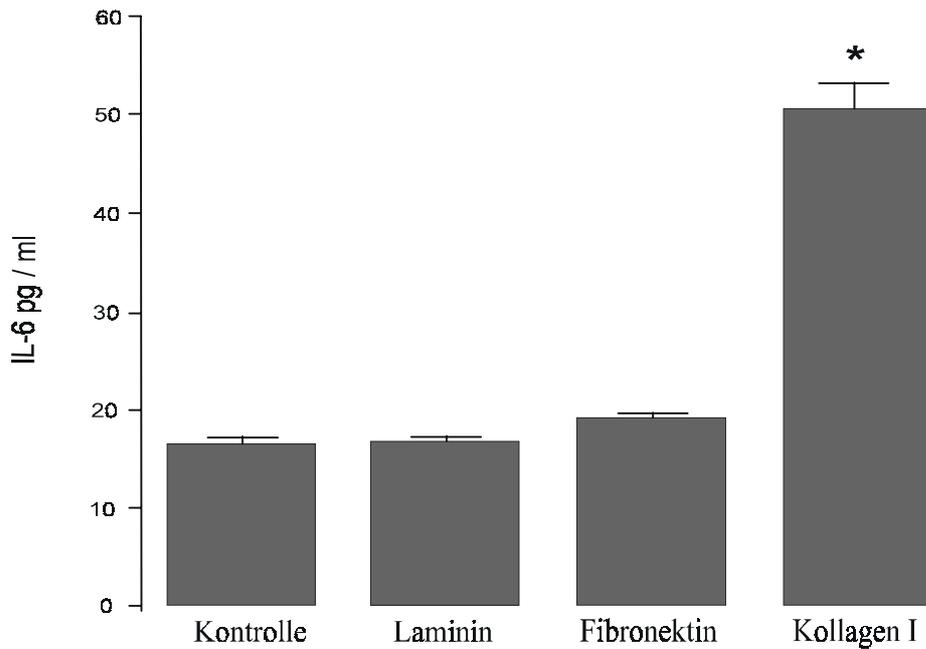


Abb. 9: Die extrazelluläre Matrix reguliert die IL-6 Sekretion von TtT-GF Zellen.

TtT-GF Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/well für 24 h auf mit verschiedenen ECM Komponenten beschichteten ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-well-Platten kultiviert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und IL-6 mittels eines RIAs gemessen. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

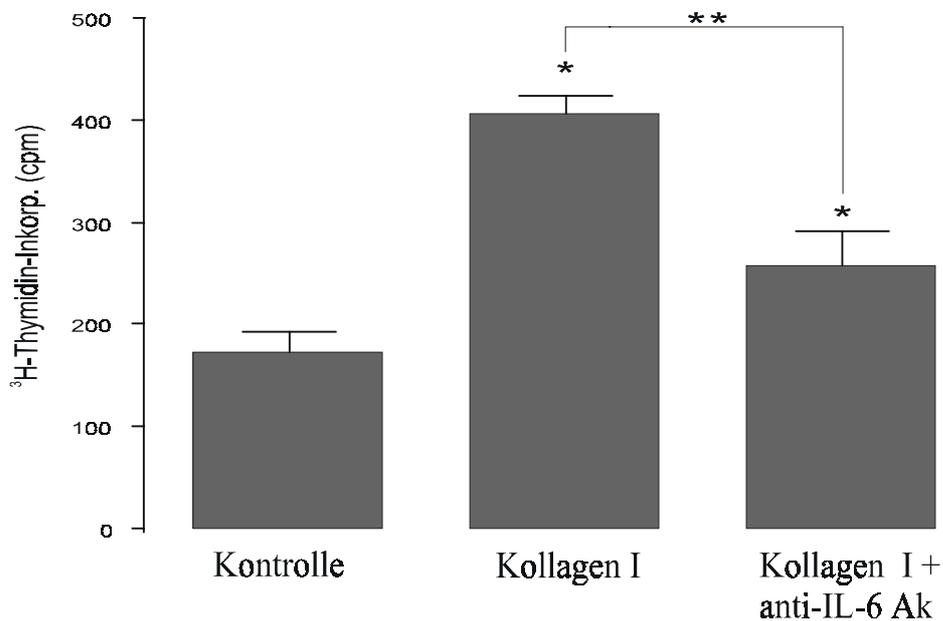


Abb. 10: Der Wachstumseffekt von Kollagen I auf TtT-GF Zellen wird durch Kollagen I induziertes IL-6 vermittelt. TtT-GF Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/well auf einer mit Kollagen I beschichteten ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-well-Platte kultiviert. Nach 24h Inkubationszeit wurde zu den auf Kollagen I kultivierten TtT-GF Zellen ein anti-IL-6 Antikörper (5 mg/ml) gegeben und das Zellwachstum mit Hilfe von ³H-Thymidin-Inkorporation nach 72 Stunden gemessen. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

5.2 Einfluß der ECM auf die Pathophysiologie kortikotroper Zellen

5.2.1 Die ECM reguliert ACTH Sekretion von AtT-20 Zellen

Um eine mögliche Regulation der ACTH Produktion in kortikotropen Zellen durch ECM Komponenten nachzuweisen, wurden AtT-20 Zellen in 10% FCS haltigen DMEM Medium, auf mit 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronectin, Laminin, Kollagen I und Kollagen IV beschichteten Gewebekulturplatten kultiviert. Nach 12 Stunden wurde das FCS haltige Medium durch serumfreies Kulturmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24h wurde im Kulturüberstand von AtT-20 Zellen bzw. Rattenhypophysenzellen die Menge des sezernierten ACTH mittels RIA bestimmt.

Fibronectin, Laminin und Kollagen I inhibierten die ACTH-Produktion in AtT-20 Zellen signifikant (Abb. 11 A). Kontrollen mit dem WST-1 Assay ergaben während der 24 stündigen Inkubationszeit keine Unterschiede in der Zellzahl und demonstrierten, daß die Resultate nicht durch Unterschiede in Zellanhaftung, Proliferation oder Zytotoxizität beeinflußt wurden (nicht gezeigt). Um zu zeigen ob diese Effekte auch auf Transkriptionsebene stattfinden, wurden AtT-20 Zellen mit einem Reporter-Konstrukt, bestehend aus einem von dem POMC-Promoter kontrollierten Luciferase-Gen, transfiziert. Mit Hilfe der Luciferaseaktivität konnte die POMC-Expression unter dem Einfluß der verschiedenen ECM-Komponenten gemessen werden. In Übereinstimmung mit den Resultaten der ACTH-Sekretion, hemmten Fibronectin, Laminin und Kollagen I (Abb. 11 B) die POMC-Luc Expression signifikant. Im Vergleich zu den AtT-20 Tumorzellen hatten die einzelnen ECM-Komponenten keinerlei Einfluß auf die ACTH-Sekretion in normalen Rattenhypophysenzellen (Abb. 11 C).

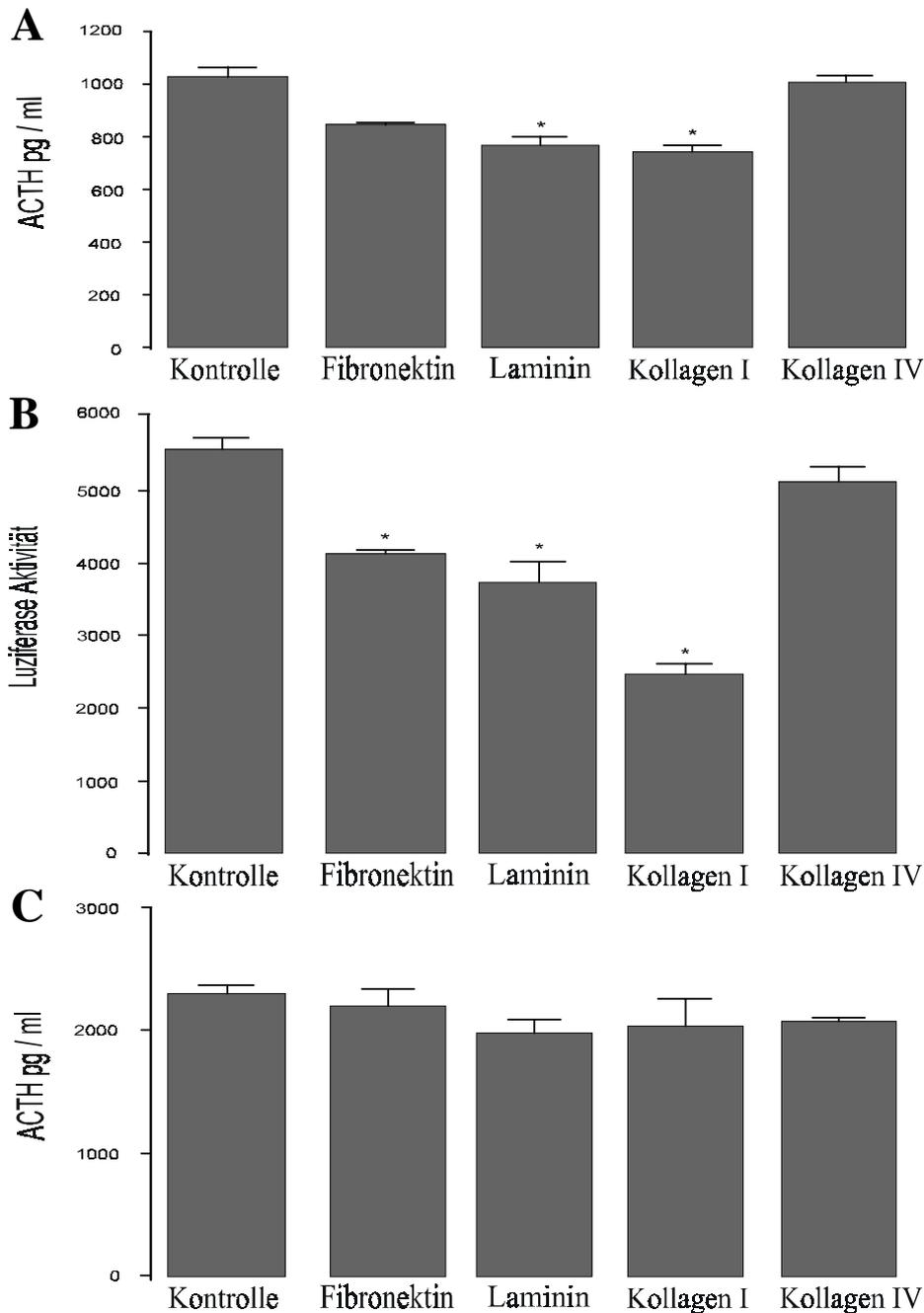


Abb. 11: Regulation der ACTH Synthese und Sekretion durch ECM-Komponenten.

AtT 20 Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/well in mit ECM-Komponenten beschichteten ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-well-Lochplatten kultiviert. **A**, ACTH Produktion in AtT-20 Zellen. Nachdem die Zellen für 12 Stunden mit 10% FCS angewachsen waren, wurden nach weiteren 24 h Inkubationszeit unter serumfreien Bedingungen die Überstände eingesammelt und ACTH mit einem RIA gemessen. **B**, Regulation der POMC-Luc Expression durch Komponenten der ECM. AtT-20 Zellen wurden mit einem POMC-Luc Plasmid transfiziert und die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden auf verschiedenen Matrixkomponenten bestimmt. **C**, ACTH Produktion in normalen Rattenhypophysenzellen. Die Rattenhypophysenzellen wurden auf mit ECM-Substraten beschichteten ($5\mu\text{g} / \text{cm}^2$) 96-well-Platten mit einer Dichte von 15×10^3 Zellen / well für 12 Stunden in 10% FCS haltigem Kulturmedium kultiviert und für weitere 24 Stunden in FCS freien Medium inkubiert. Das ACTH im Mediumüberstand wurde mittels eines RIAs gemessen. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

5.2.2 Komponenten der ECM regulieren AtT-20 Zellproliferation

Es ist bekannt, daß Komponenten der extrazellulären Matrix die Zellproliferation regulieren. Der Einfluß von Komponenten der ECM auf das Wachstum kortikotroper Tumorzellen wurde mit Hilfe von AtT-20 Zellen und ^3H -Thymidininkorporation untersucht. In den ersten 36 Stunden stellte sich ein nur sehr geringer Effekt ein, dagegen führten Fibronectin und Kollagen IV nach 4 Tagen Inkubationszeit zu einer signifikanten Zunahme der Zellproliferation (Abb. 12). Im Gegensatz dazu erniedrigten Kollagen I und Laminin das Zellwachstum (Abb. 12). Die Neubauer Zählkammer sowie der WST-1 Proliferationsassay ergaben gleiche Resultate (nicht gezeigt). Um die Effekte unterschiedlicher Zellanhaftung auszuschließen wurden regelmäßige Kontrollen der Zellviabilität mit Akridinorange und Ethdiumbromid durchgeführt.

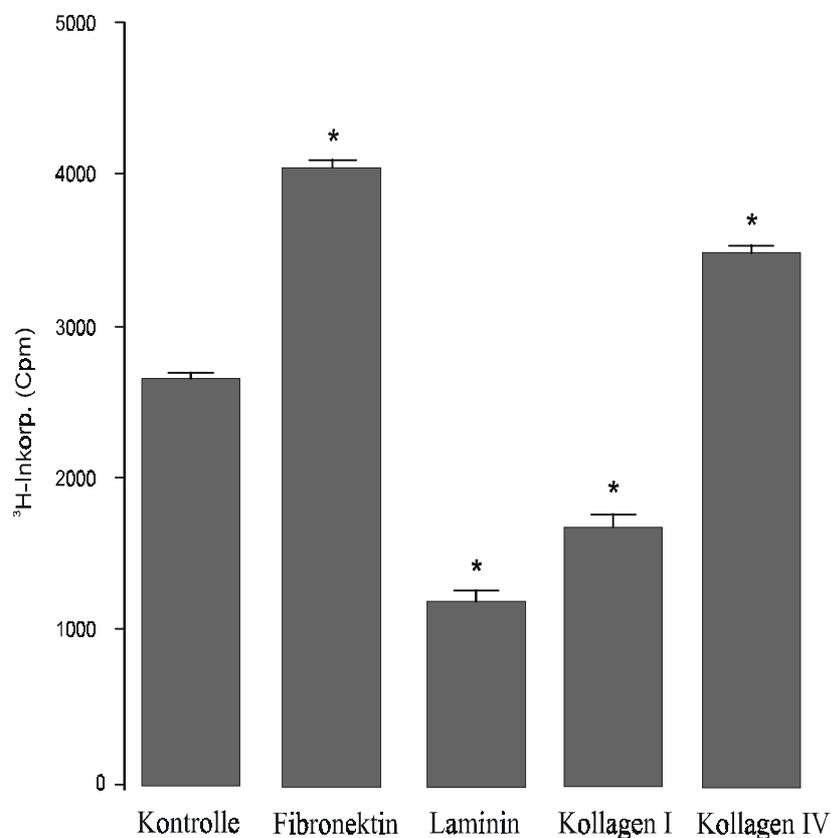


Abb.12: ECM-Komponenten regulieren die AtT-20 Zellproliferation.

AtT-20 Zellen wurden auf mit ECM-Komponenten beschichteten Gewebekulturplatten kultiviert und Zellproliferation nach vier Tagen mittels ^3H -Thymidininkorporation gemessen. Gleiche Resultate wurden durch direkte Zellzählung und dem WST-1 Assay gefunden. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

5.2.3 Die ECM führt zu Veränderungen der Zellform in AtT-20 Zellen

ECM-Proteine bewirken eine Änderung der Zellmorphologie und beeinflussen deren Stoffwechselaktivität. Ähnlich den TtT-GF Zellen nehmen auch AtT-20 Zellen je nach ECM Komponente unterschiedliche Morphologien und Anordnungen an. Auf einem Fibronektin-Substrat zeigten AtT-20 Zellen eine besonders ausgebreitete Form und eine verteilte Anordnung (Abb. 13 B). Auf Laminin oder Kollagen I bildeten AtT-20 Zellen Nester und nahmen eine runde Zellform an (Abb. 13 C+D). Auf dem Kollagen IV-Substrat lagen AtT-20 Zellen in einer Zwischenform vor (Abb. 13 E). Färbungen mit Akridinorange und Ethidiumbromid (nicht gezeigt), sowie Messungen mit dem WST-1 Assay an verschiedenen Zeitpunkten (nicht gezeigt) zeigten vitale Zellen unter allen Bedingungen.

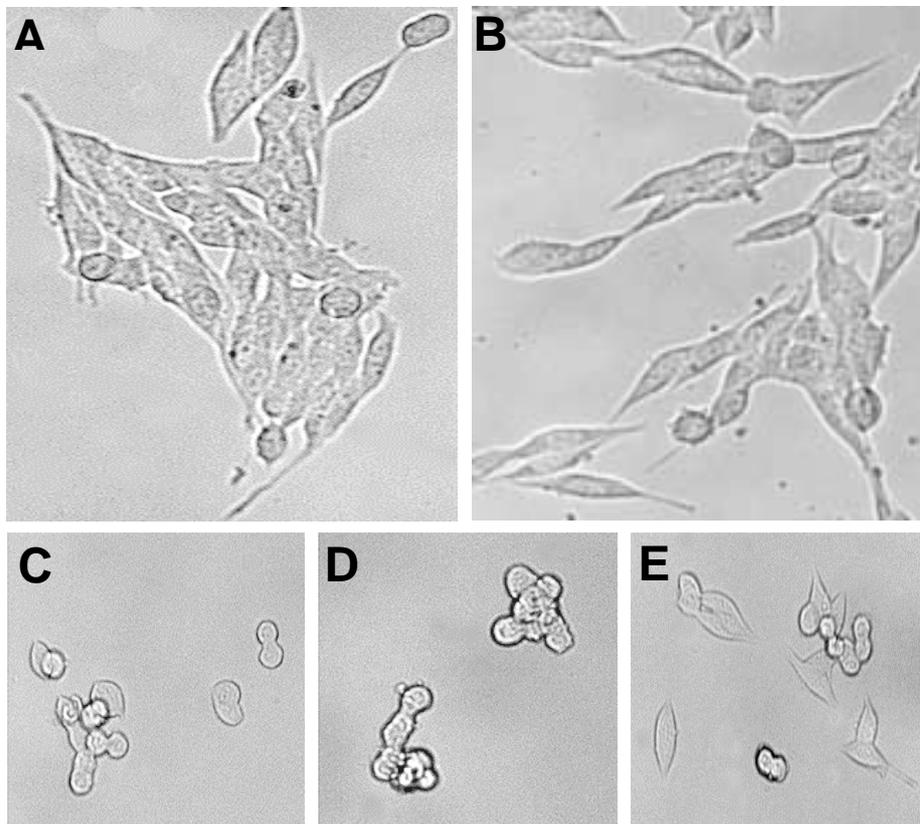


Abb. 13: AtT-20 Morphologie auf verschiedenen ECM Substraten.

Die AtT-20 Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^4 für 48 Stunden auf mit verschiedenen ECM-Komponenten beschichteten ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-well-Gewebekulturplatten kultiviert. **A**, AtT-20 Zellen auf Plastik; **B**, Fibronektin; **C**, Laminin; **D**, Kollagen I; **E**, Kollagen IV. Vergrößerung 100x.

5.2.4 Reaktive Sauerstoffradikale vermitteln proliferative ECM-Signale in AtT-20 Zellen

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß reaktive Sauerstoffradikale (ROS) Bestandteil der durch Integrine vermittelten Änderungen der Zellmorphologie in Fibroblasten sind. Um die mögliche Rolle von ROS innerhalb der Signalkette in AtT-20 Zellen zu untersuchen, wurde die zelluläre H₂O₂-Produktion unter dem Einfluß verschiedener ECM-Proteine gemessen. Laminin, Kollagen I und Kollagen IV übten einen starken Stimulus auf die H₂O₂ Produktion aus, wogegen Fibronectin keinen signifikanten Effekt produzierte (Abb. 14 A). Um herauszufinden ob die endogene Produktion von ROS für die Proliferation von AtT-20 Zellen von Bedeutung ist, wurde als Antagonist der Sauerstoffradikalfänger N-Acetylcystein (NAC) verwendet. NAC kehrte die Stimulation durch Kollagen IV und teilweise auch die durch Laminin verursachte Inhibition der Proliferation um (Abb. 14 B). Dies ist in Übereinstimmung mit den durch Laminin und Kollagen IV verursachten ROS Erhöhungen. Die Tatsache das ROS sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf AtT-20 Proliferation ausüben, könnte mit den unterschiedlichen Zellmorphologien unter Laminin- oder Kollagen IV-Einfluß zusammenhängen (Abb. 14 B+D).

Auf Kollagen I und Fibronectin führte NAC zu keinem signifikanten Effekt was in diesem Fall andere AtT-20 Zellproliferation regulierende Signalwege vermuten läßt (Abb. 14 B).

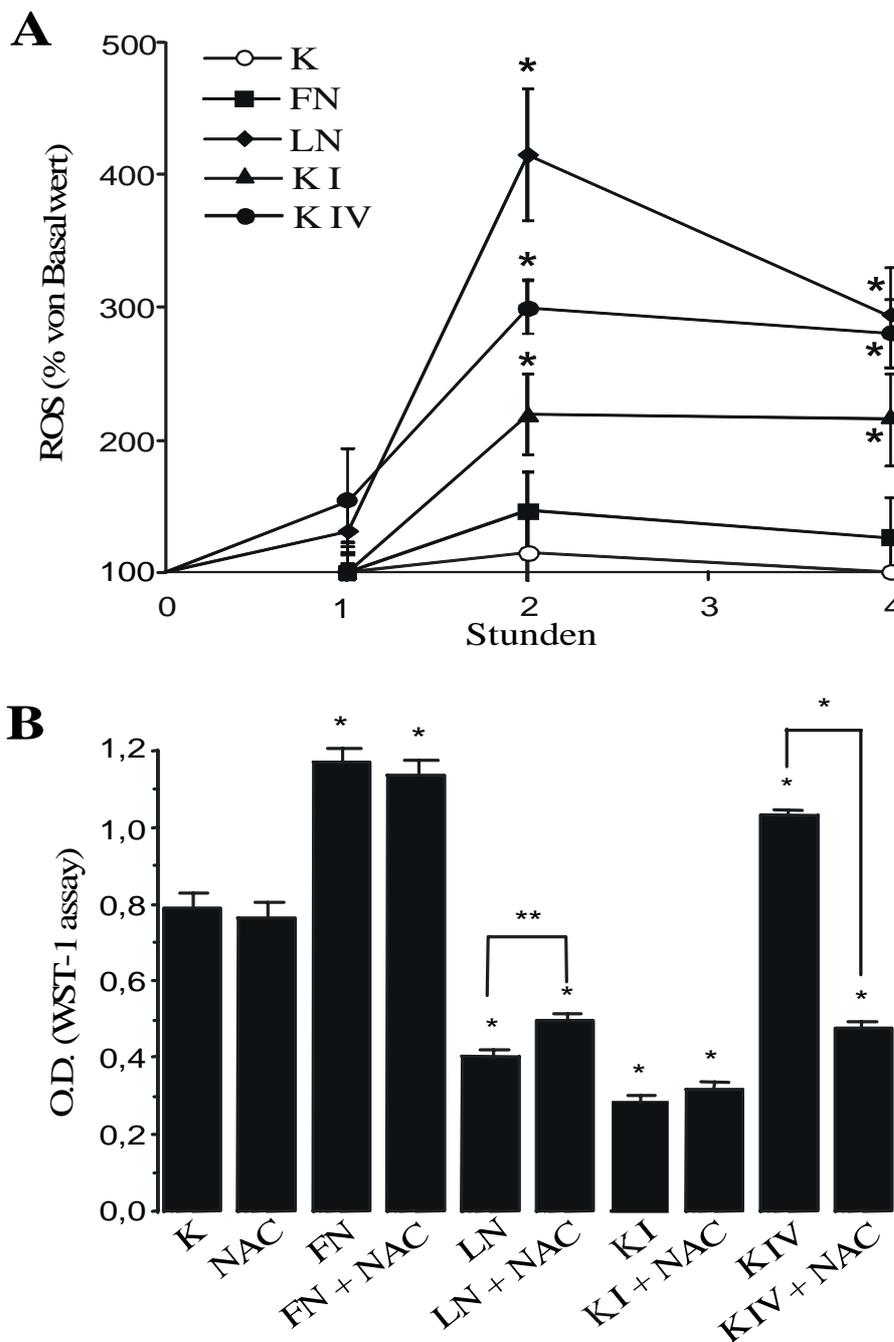


Abb. 14: ROS vermittelte proliferative Effekte der extrazellulären Matrix in AtT-20 Zellen. AtT-20 Zellen wurden auf mit ECM-Komponenten beschichteten ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 96-well-Platten ausgesät: Kontrolle (K), Fibronectin (FN), Laminin (LN), Kollagen I (K I), Kollagen IV (K IV). **A**, H_2O_2 Produktion in AtT-20 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die prozentualen Erhöhungen wurden anhand des Basalwerts von 0.2 ± 0.001 pmol $\text{H}_2\text{O}_2/200000$ Zellen (=100%) berechnet. **B**, Proliferation von AtT-20 Zellen nach Zugabe von NAC. 10^{-4} M N-Acetylcystein (NAC) wurde hinzugegeben und nach vier Tagen die AtT-20 Zellproliferation mittels WST-1 gemessen. *, $p < 0.01$ und **, $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

5.2.5 Die Aktivierung von Rho stimuliert AtT-20 Zellproliferation

Fibronectin transduziert Signale nicht nur durch Rac, sondern auch durch die Aktivierung von Rho. Der alleinige Stimulationsversuch mit Fibronectin führte zu einer signifikanten Erhöhung der AtT-20 Zellproliferation ohne eine Zunahme der ROS Produktion (Abb.15). Aus diesem Grund wurde des weiteren untersucht ob die Aktivierung von Rho, als möglicher Mechanismus in der Proliferation von AtT-20 Zellen in Frage kommt. Für diesen Zweck wurden AtT-20 Zellen mit 200 µg/ml LPA stimuliert, was zu einer integrinunabhängigen Aktivierung von Rho führt. LPA allein stimuliert die AtT-20 Zellproliferation, wobei im Gegensatz dazu die Kombination mit Fibronectin keine weitere Erhöhung der Proliferation hervorruft (Abb. 15). Demnach könnte die in AtT-20 Zellen durch Fibronectin induzierte Proliferationssteigerung Rho vermittelt sein.

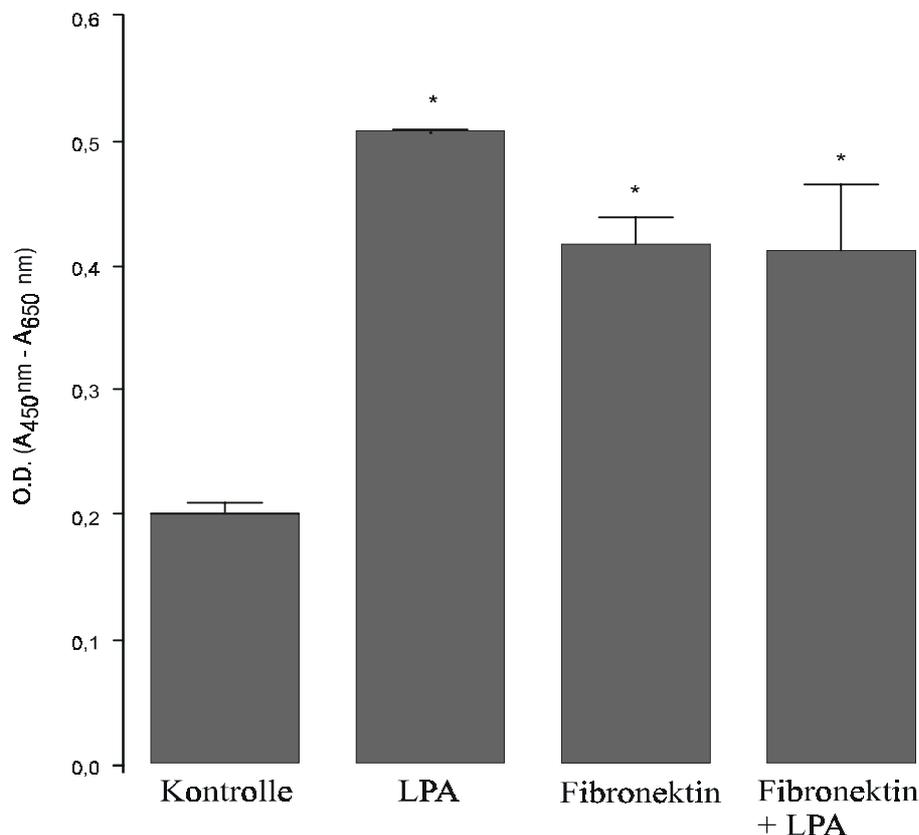


Abb. 15: Rho reguliert AtT-20 Zellproliferation.

AtT-20 Zellen wurden entweder auf Plastik (Kontrolle) oder auf mit Fibronectin beschichteten (5µg/cm²) Gewebekulturplatten kultiviert. Nach 24 h, wurden 200µg/ml Lysophosphatid säure hinzugegeben. Nach weiteren drei Tagen Inkubationszeit wurde die Zellproliferation mit dem WST-1 Assay gemessen. *, p<0.01 vs. Kontrolle.

5.2.6 Die Rolle des β 1-Integrins

Fibronectin, Laminin, sowie die Kollagene binden an unterschiedliche β 1-Integrine, welche in allen Arten von Hypophysenadenomen exprimiert werden. Mit Hilfe eines spezifischen anti- β 1-Integrin aktivierenden Antikörpers wurde die Rolle des β 1-Integrins in der Zellproliferation kortikotroper Zellen untersucht. Der anti- β 1-Integrin Antikörper stimulierte die AtT-20 Zellproliferation (Abb. 16), wogegen in Kombination mit NAC keine Umkehrung der anti- β 1-Integrin-Antikörper Stimulation beobachtet werden konnte (Abb. 16). Dies weist daraufhin, daß der Effekt des anti- β 1-Integrin Antikörpers nicht durch ROS vermittelt wird (Abb. 16). Der stimulierende Effekt des Antikörpers entspricht dem Effekt von Fibronectin, bei dem es ebenfalls zu einer Zunahme der AtT-20 Zellproliferation ohne ROS Produktion kommt. Die Kombination von Fibronectin und dem anti- β 1-Integrin-Antikörpers führte zu keiner weiteren Erhöhung der Proliferationsrate. Diese Resultate zeigen, daß die Aktivierung von β 1-Integrinen die Proliferation von AtT-20 Zellen stimulieren kann und legen nahe, daß der Effekt von Fibronectin β 1-Integrin vermittelt ist.

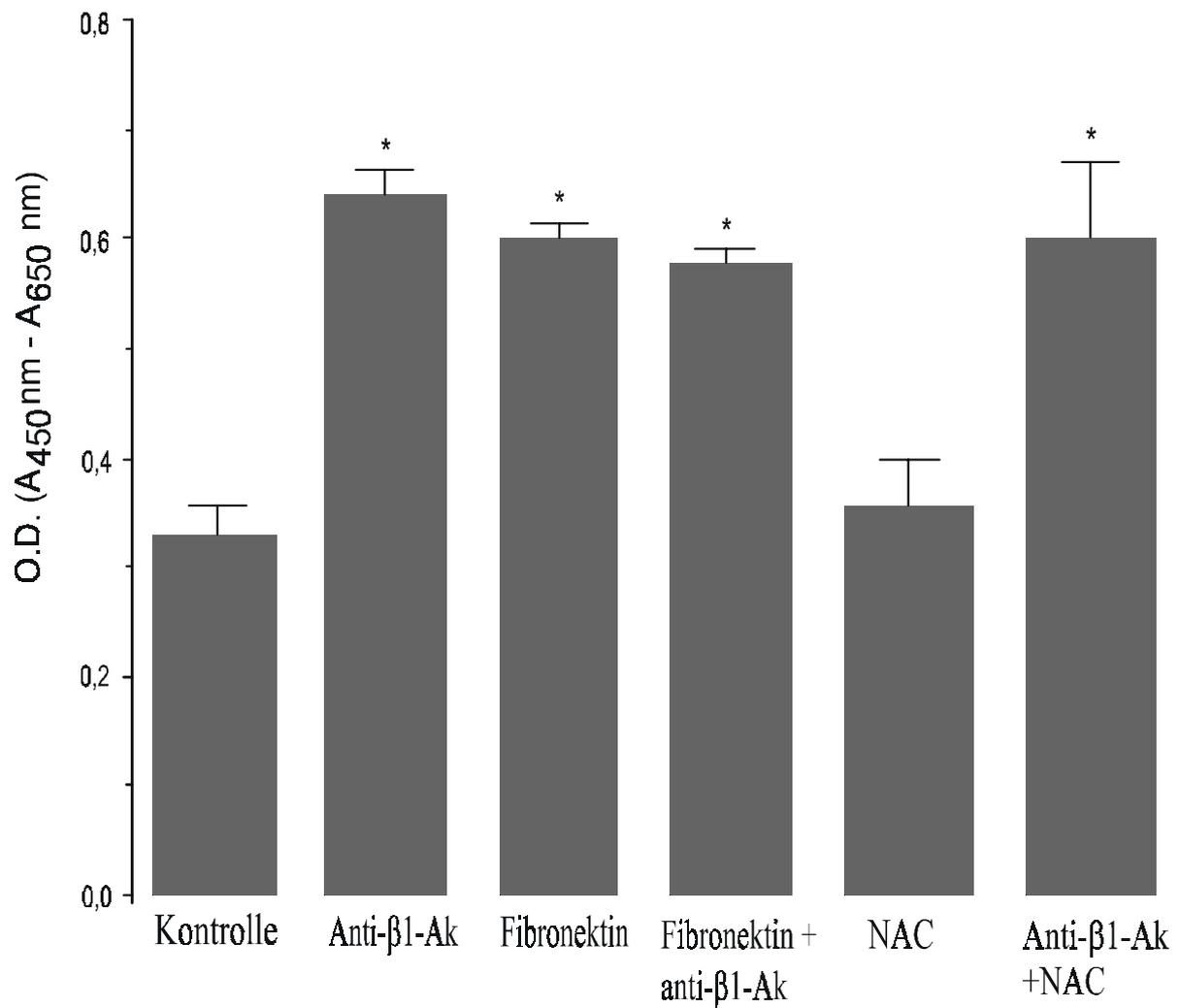


Abb. 16: Regulation der AtT-20 Zellproliferation durch β 1-Integrine.

AtT-20 Zellen wurden entweder auf Plastik (Kontrolle) oder auf mit Fibronectin beschichteten ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) Gewebekulturplatten kultiviert. Nach 24 h wurde ein anti- β 1-Integrin Antikörper ($5\text{mg}/\text{ml}$) und/oder 10^{-4}M N-Acetylcystein (NAC) hinzugegeben. Nach drei weiteren Tagen Inkubationszeit wurde die AtT-20 Zellproliferation mit dem WST-1 Assay gemessen. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

5.3 Regulation der Proliferation und Hormonsekretion von GH3 Zellen durch Laminin

5.3.1 Der Einfluß von Laminin auf GH3-Zellproliferation

Laminin spielt sowohl in der Differenzierung eine wichtige Rolle und wurde schon oft in Zusammenhang mit Tumorentstehung und Metastasenbildung gebracht. Um herauszufinden wie Laminin das Wachstum von Prolaktinomzellen reguliert, wurde mit Hilfe von ^3H -Thymidininkorporation die Proliferationsrate von GH3 Zellen unter Laminineinfluß bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Inhibition der Proliferation von GH3 Zellen (Abb.17).

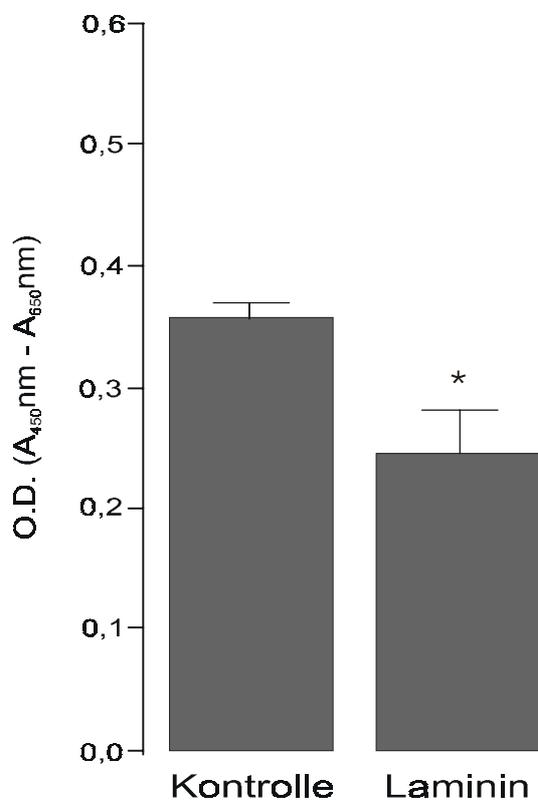


Abb. 17: Regulation der GH3 Zellproliferation durch Laminin.

GH3 Zellen wurden auf mit Laminin beschichteten ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) Gewebekulturplatten kultiviert und Zellproliferation nach vier Tagen mit dem WST-1 Assay gemessen. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

5.3.2 Regulation der Prolaktinsekretion durch Laminin

Um den Einfluß von Laminin auf die Prolaktinproduktion von GH3 Zellen zu untersuchen, wurden GH3- und Rattenhypophysenzellen auf mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin beschichteten Lochplatten kultiviert. Nach 12 Stunden wurde das FCS haltige Medium durch serumfreies Kulturmedium ersetzt. Die Prolaktinkonzentration im Überstand wurde nach weiteren 24h Inkubationszeit mittels RIA bestimmt. In GH3 Zellen führte Laminin zu einer signifikanten Inhibition der Prolaktinsekretion (Abb. 18 A), wogegen es in Rattenhypophysenzellen zu keiner signifikanten Änderung der Prolaktinsekretion kam (Abb. 18 B).

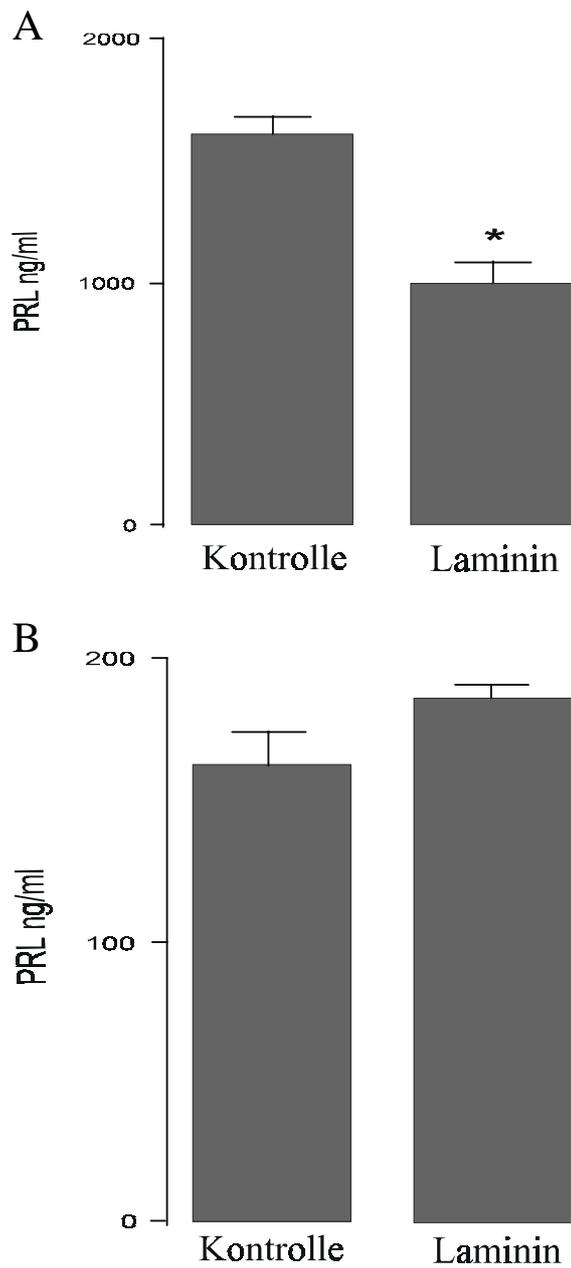


Abb. 18: Regulation der Prolaktinsekretion durch Laminin.

GH3 und Rattenhypophysenzellen wurden auf mit ECM-Substraten beschichteten ($5\mu\text{g} / \text{cm}^2$) 6-well-Platten mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/well (GH3 Zellen), bzw. 15×10^3 Zellen/well (Rattenhypophysenzellen) für 12 Stunden in 10% FCS haltigem Kulturmedium kultiviert und für weitere 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert. Prolaktin wurde im Mediumüberstand gemessen. **A**, Prolaktinsekretion in GH3 Zellen. **B**, Prolaktinproduktion in normalen Rattenhypophysenzellen. *, $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

5.4 Immunhistochemische Darstellung von Laminin in Hypophysen und Prolaktinomen

Laminin, ein oft mit Tumorgenese und Metastasierung in Zusammenhang gebrachtes Protein, ist v.a. ein grundlegender Bestandteil von Basalmembranen. Auch in Hypophysentumoren konnten qualitativ veränderte Expressionsmuster von Lamininisoformen bereits nachgewiesen werden. Die Frage, wann und wie sich die quantitative Expression von, innerhalb der Pathogenese von Prolaktinomen ändert, ist aber bislang unbeantwortet geblieben. Um mögliche Änderungen der Lamininexpression im Rahmen der mehrstufigen Prolaktinomgenese darzustellen, wurden Gefrierschnitte von Maushypophysen, humanen Hypophysen, Mausprolaktinomen und humanen Prolaktinomen immunhistochemisch untersucht.

5.4.1 Immunhistochemische Darstellung von Laminin in Wildtyp-Maushypophysen, D2-KO-Maushypophysen und D2-KO-Mausprolaktinomen

Sowohl in der Wildtyp-Maushypophyse (Abb.19 A) als auch in der normalen D2-KO Maushypophyse (2 Monate alt) (Abb.19 B) war die rotbraune Färbung von Laminin besonders im Bereich der Blutgefäße und weniger stark im Parenchym zu erkennen. Im Vergleich dazu war bereits in der D2-KO Maushypophysenhyperplasie (6 Monate alt), einer Zwischenstufe in der Prolaktinombildung, (Abb.19 C) eine Reduktion der Lamininfärbung sowohl im Bereich der Blutgefäße als auch im Parenchym zu beobachten. Im D2-KO-Mausprolaktinom (18 Monate alt) zeigte sich eine noch deutlichere Abnahme der Lamininkonzentration mit einer Konzentration um die Blutgefäße herum (Abb. 19 D). Diese Resultate lassen bereits auf eine Abnahme der Lamininkonzentration zu einem sehr frühen Zeitpunkt innerhalb der Prolaktinomgenese in D2-KO-Mäusen schließen.

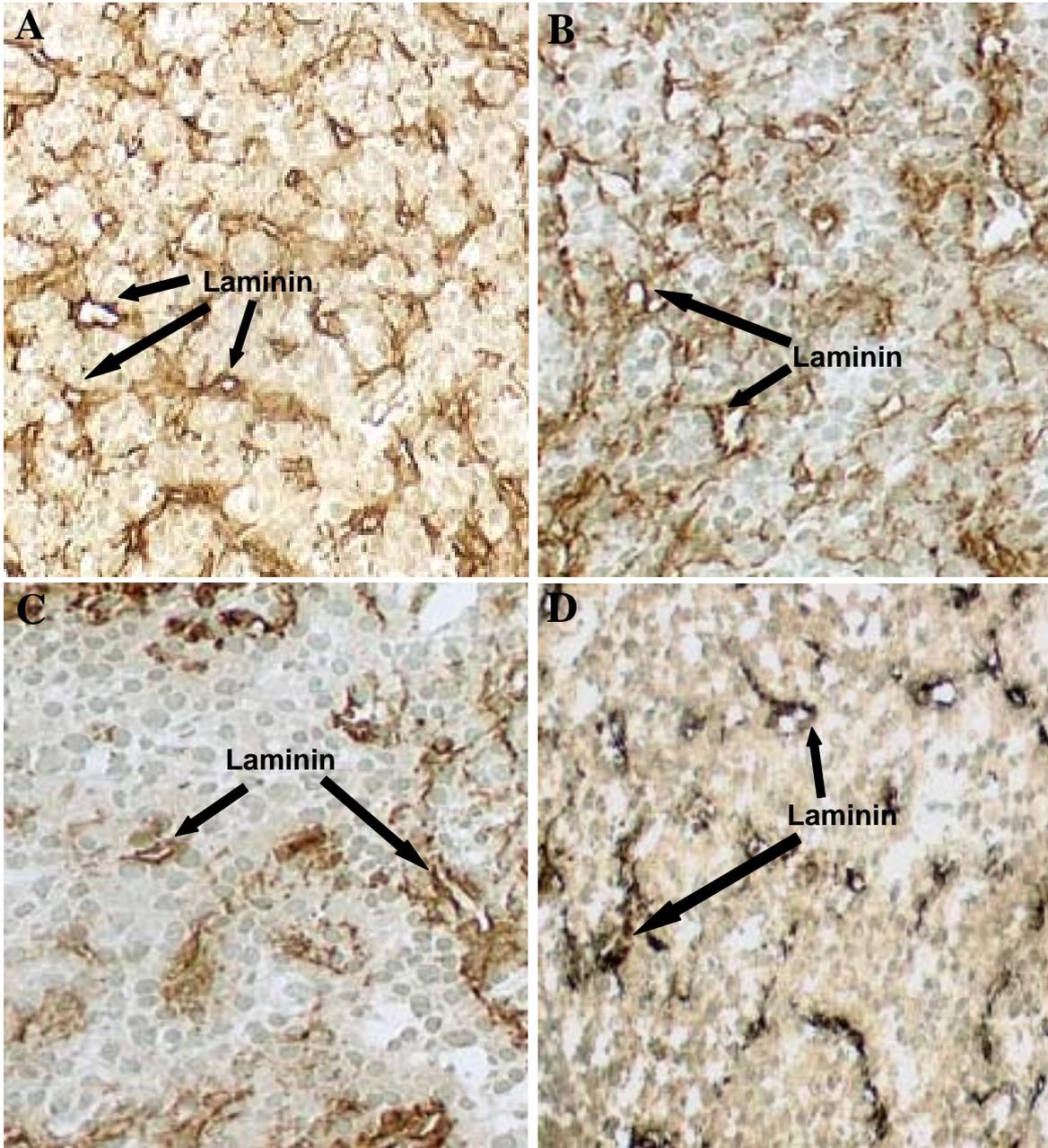


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung von Laminin in Maushypophysen.

A, Wildtyp-Maushypophyse. Das rot-braun gefärbte Laminin reichert sich besonders im Bereich der Gefäße, mit einer deutlich abgrenzbaren, dunkelbraunen Basalmembran an. **B**, D2-KO-Maushypophyse. Die Verteilung entspricht der Wildtyp-Maushypophyse. **C**, D2-KO Maushypophysenhyperplasie. Bereits im Stadium der Hyperplasie tritt eine sichtbare Reduktion der Lamininkonzentration auf. **D**, D2-KO Mausprolaktinom. Es ist eine noch deutlichere Verminderung der Lamininkonzentration mit einer Konzentration um die Blutgefäße herum zu erkennen. Vergrößerung 100x.

5.4.2 Immunhistochemische Färbung von Laminin in humanen Hypophysen und humanen Prolaktinomen

Die immunhistochemische Darstellung von Laminin in humanen Hypophysen zeigte eine, den Maushypophysen ähnliche, Anreicherung von Laminin besonders im Bereich der Gefäße und Bindegewebssepten (Abb. 20 A). In der, zufällig bei einer Autopsie gefundenen, prolaktinbildenden (Prolaktinfärbung nicht gezeigt) Hypophysenhyperplasie, einer reversiblen Vorstufe in der Prolaktinomgenese, zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Lamininfärbung (Abb. 20 B). Im Prolaktinomgewebe kam es schließlich zu einem fast vollständigem Verschwinden des Laminins mit einem Rest im Bereich der Blutgefäße (Abb. 20 B).

All dies spricht, in Übereinstimmung mit den Resultaten der Maus- und D2-KO Maushypophysen für eine Abnahme der Lamininkonzentration und -verteilung bereits in sehr frühen Stadien der Prolaktinomgenese.

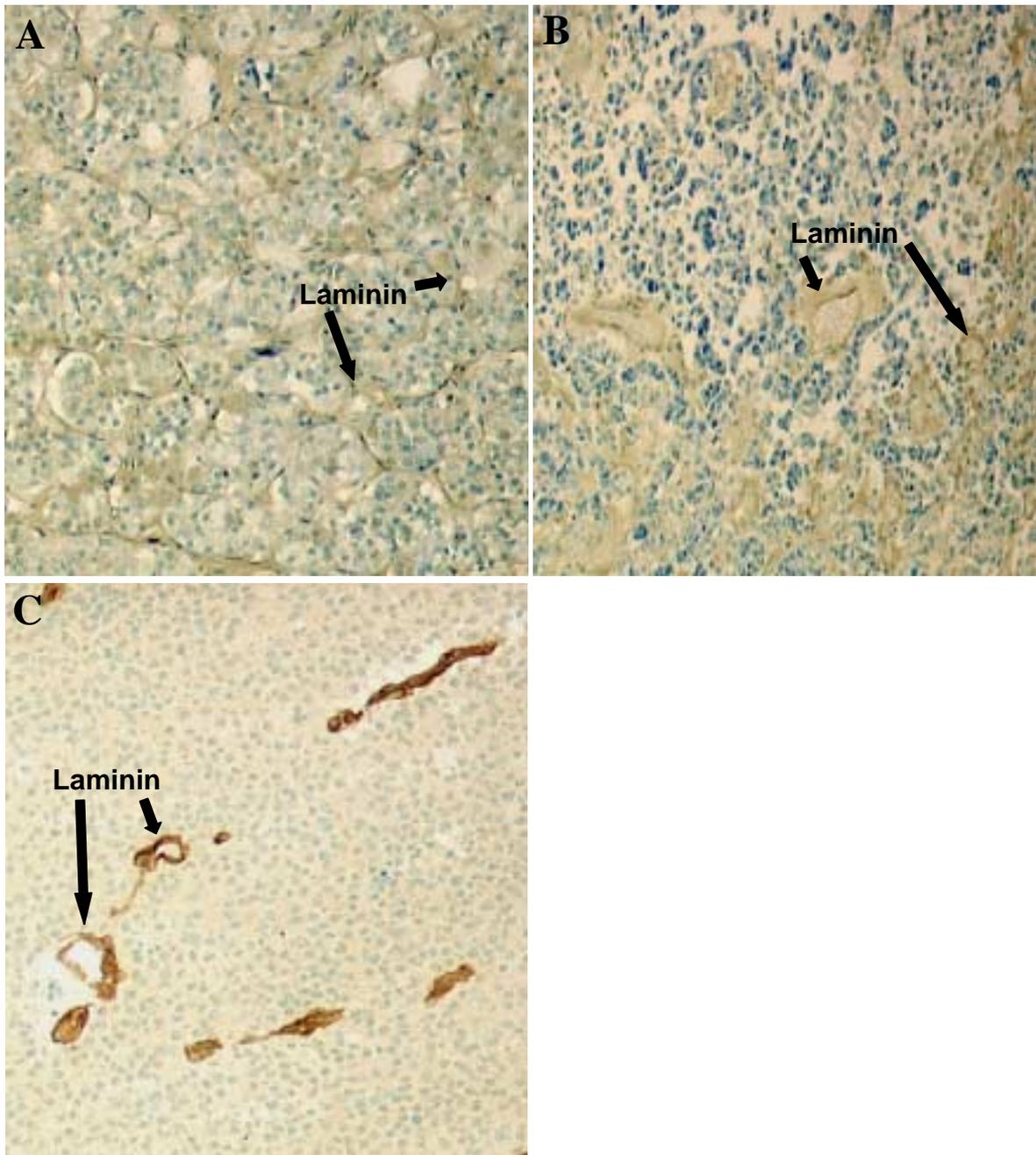


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung von Laminin in humanen Hypophysen. **A**, humane Hypophyse. Es ist eine deutliche Anreicherung des braungefärbten Laminins im Bereich der Bindegewebssepten und Gefäßen zu sehen. **B**, humane prolaktinbildende Hypophysenhyperplasie. Im oberen Bildbereich ist eine Hypophysenhyperplasie mit einer deutlichen Reduktion der Lamininkonzentration zu erkennen, wogegen der untere Bildbereich die Lamininkonzentration im normalen Hypophysengewebe aufzeigt. **C**, humanes Prolaktinom. Im Bild ist eine weitere Verringerung der Lamininkonzentration im Parenchym und einer Restkonzentration im Bereich der Gefäße zu sehen. Vergrößerung 100x.

6 Diskussion

6.1 Allgemeines

Der Einfluß der extrazellulären Matrix auf Zellfunktionen, Tumorentstehung und Mechanismen der Signaltransduktion wurde in den letzten Jahren stark erforscht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die extrazelluläre Matrix die Physiologie und Pathophysiologie von Hypophysenzellen reguliert. Es wird hier zum ersten Mal demonstriert, daß Komponenten der ECM die Zytokinproduktion follikulostellarer Zellen, Proliferation und ACTH Produktion kortikotroper Zellen, sowie Proliferation und Prolaktinproduktion mammotroper Zellen regulieren. Desweiteren wird in dieser Arbeit ein möglicher Signalweg der extrazellulären Matrix in kortikotropen Zellen und eine bereits sehr frühe Veränderung der ECM innerhalb der Prolaktinogenese demonstriert.

6.2 Hypophysenzelllinien und Proteine der extrazellulären Matrix als Modelle

Aufgrund der unregelmäßigen Verfügbarkeit und den Problemen bei der Isolation hypophysärer Zellen aus der Primärkultur, wurden verschiedene endokrine Zelllinien etabliert. Die bekanntesten Modelle für kortikotrope Zellen sind AtT-20 Zellen (33), GH3 für somatotrope und laktotrope Zellen (84) und TtT-Gf Zellen für follikulostellare Zellen (49). Diese Zelllinien wurden aus hormonproduzierenden Tumoren gewonnen und bieten die Fähigkeit zellspezifische Charakteristika, wie z.B. das S-100 Oberflächenprotein follikulostellarer Zellen, über viele Passagen zu erhalten (49). Aufgrund von Eigenschaften wie Immortalität und andauernder Hormonsekretion dienen sie v.a. als Modell für Hypophysentumorzellen. Jedoch werden intrazelluläre Vorgänge, wie Signaltransduktion, ähnlich denen normaler Hypophysenzellen bewertet und in vielen Fällen als Modell herangezogen (59).

Die ECM ist ein dreidimensionales, mit Zellen verflochtenes Gebilde, welches in permanenter Kommunikation zu angrenzenden Zellen steht (9). Sie besteht aus vielen verschiedenen Komponenten, welche miteinander verknüpft sind und im ständigen Synthesefluß stehen. Um ein so komplexes, dreidimensionales System wie die extrazelluläre Matrix zu erfassen, bieten eindimensionale Studien leider nur eingeschränkte Möglichkeiten. So sezernieren z.B. Fibroblasten Kollagene, die gleichzeitig an anderer Stelle durch Metalloproteinasen abgebaut

werden (70;83). Auf diese Weise entsteht ein dynamisches Gleichgewicht, welches im Falle einer Tumorbildung verändert wird (81-83). Während dieses Prozesses kann sich das Gleichgewicht der ECM zu Gunsten einzelner Substanzen und Rezeptoren verschieben (88). So konnte gezeigt werden, daß während der Hypophysentumorgenese Laminin- und Fibronektinisoformen unterschiedlich exprimiert werden (23;24). Dieser Dynamik würde das Arbeiten mit vorgefertigter extrazellulärer Matrix den physiologischen Vorgaben nur sehr wenig gerecht werden, die Auswirkungen einzelner ECM-Komponenten nicht erfassen und die Darstellung selektiver Signaltransduktionswege unmöglich machen. Aus diesen Gründen werden in dieser Arbeit einzelne Matrixkomponenten verwendet, um deren spezifische Auswirkungen auf den Zellmetabolismus darzustellen.

6.3 Regulation der TtT-GF Zellfunktion durch die extrazelluläre Matrix

TtT-GF Zellen machen ca. 5-10 % der Hypophysenzellen aus und bilden ein dichtes Netzwerk innerhalb der Hypophyse. Sie dienen v.a. der zellulären Kommunikation, Homöostase und Regulation von Hormonsekretion und dem Wachstum endokriner Zellen in der Hypophyse (28;49). Folglich würden Wechselwirkungen zwischen extrazellulärer Matrix und follikulostellaren Zellen nicht überraschen. So konnte bereits gezeigt werden, daß Fibronektin in follikulostellaren Zellen lokalisiert ist und eine mögliche Rolle für die Regulation von Hypophysenfunktionen durch Interaktion mit hormonsezernierenden Zellen spielt (62). Es konnte ebenso demonstriert werden, daß sich FS-Zellen ringförmig um Tumore, in denen Kollagen IV abgebaut wird formieren, was eine mögliche Rolle dieser Zellen in der Hypophysentumorgenese nahe legt (25). Doch scheinen TtT-GF Zellen nicht nur Hypophysenzellfunktionen zu regulieren. Diese Zellen haben außerdem die Fähigkeit, den Aufbau der ECM zu modulieren (65). In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, daß TtT-GF Zellen einen Typ I Metalloproteinaseinhibitor sezernieren, welcher die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix vor dem Abbau durch Kollagenasen schützt (65). Die Proliferationsstudien mit TtT-GF Zellen zeigten unter Kollagen I und Fibronektin eine Stimulation des Zellwachstums. Je nach ECM-Substrat änderte sich auch die TtT-GF Zellmorphologie, was im Punkt 6.5 diskutiert wird.

Es ist bekannt, daß FS-Zellen Interleukin-6 sezernieren und dies ein autokriner Wachstumsfaktor für follikulostellare Zellen ist (73). Nur unter Kollagen I zeigte sich ein Anstieg von IL-6, wogegen Fibronektin zu keinerlei Änderung der IL-6 Konzentration führte. Die Kombination von Kollagen I und eines anti-IL-6-Antikörpers führte zu einer signifikanten

Inhibition der TtT-GF Zellproliferation. Dies läßt darauf schließen, daß Kollagen I die TtT-GF Zellproliferation durch autokrine IL-6 Sekretion regulieren kann, wogegen dem Wachstumsanstieg unter Fibronectin ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt. Zusammengefaßt konnte hier erstmalig gezeigt werden, daß Komponenten der extrazellulären Matrix die Physiologie follikulostellarer Zellen regulieren. Zieht man die vielfältigen Aufgaben von FS-Zellen und Interleukin-6, wie Regulation der ACTH, GH, PRL, LH und FSH Ausschüttung oder die mögliche Stimulation des Wachstums von Hypophysentumorzellen (2) in Betracht, ergäben sich spekulativ sehr viele Möglichkeiten wie die ECM sowohl Hypophysenphysiologie als auch die eventuelle Tumorgenese durch FS-Zellen beeinflussen kann (56).

6.4 Effekte der ECM auf die ACTH Sekretion kortikotroper Zellen

Verglichen mit der normalen Adenohypophyse sind Fibronectin und Laminin in Hypophysenadenomen unterschiedlich lokalisiert und exprimiert (23;24). Die daraus entstehenden funktionellen Konsequenzen sind jedoch nicht klar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß Fibronectin, Laminin und Kollagen I die ACTH Biosynthese in der kortikotropen Tumorzelllinie AtT-20 inhibieren. Die Effekte auf die POMC-Gentranskription nach 24 Stunden Inkubationszeit deuten auf einen progressiven Effekt der ECM im Rahmen der ACTH Biosynthese hin. Im Gegensatz dazu wurden in normalen Rattenhypophysenzellen keine signifikanten Veränderungen beobachtet. Diese Unterschiede in der ACTH Produktion könnten durch Veränderungen in der Expression von ECM-Proteinen und Integrinen zwischen normalen- und Tumorzellen bedingt sein. Ein Teil kortikotroper Hypophysenadenome exprimiert weniger Laminin verglichen mit normalem Hypophysengewebe (23). Dies könnte bedeuten, daß eine verminderte Lamininexpression ein weiterer Grund für die exzessive ACTH Produktion kortikotroper Adenome wäre.

6.5 Die ECM reguliert Zellmorphologie und Proliferation folliculostellarer und kortikotroper Zellen

Der Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und Zellfunktion ist in den letzten Jahren immer mehr Gegenstand kontemporärer Forschung geworden (76;94). In Endothelzellen konnte mit Hilfe von Microbeads gezeigt werden, daß je nach Zellform Endothelzellen entweder proliferieren oder apoptotisch werden (17). Es konnte gezeigt werden, daß auf einem Fibronectin Substrat AtT-20 Zellen eine ausgebreitete Form und verteilte Anordnung annehmen, dagegen auf Laminin, Kollagen I und Kollagen IV AtT-20 Zellen eine runde Zellform beibehalten und in Clustern wachsen. Mögliche Apoptose in den runden Zellen wurde experimentell ausgeschlossen. Auch TtT-GF Zellen nehmen auf Fibronectin eine ausgebreitete Form an und wachsen verteilt. Dagegen bilden TtT-GF Zellen auf Kollagen I Zellcluster und haben eine längliche Form. Auf Laminin bilden TtT-GF Zellen lange, charakteristische Zellausläufer und haben eine verteilte Anordnung. In beiden Fällen läßt dies auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen ECM induzierter Zellmorphologie und Zellfunktion, ähnlich dem in Endothelzellen, schließen (17). Besonders eine ausgebreitete Form, wie unter Fibronectin beobachtet, führte zu einer erhöhten Zellwachstumsrate. AtT-20 und TtT-GF Zellen nehmen auf Fibronectin eine ausgebreitete Form, sowie eine verteilt wachsende Anordnung an und zeigen in beiden Fällen eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate. Ein runde Zellform wie sie AtT-20 und TtT-GF Zellen auf Laminin annehmen, führte zu einer Abnahme der Proliferationsrate, bzw. Apoptose. Als möglicher Grund wird eine für den Zellmetabolismus geometrisch günstige Zellform diskutiert (19;78). Dies läßt vermuten, daß auch in Hypophysenzellen die Zellmorphologie von der ECM reguliert wird und Einfluß auf die Zellproliferation hat.

6.6 Mögliche Mechanismen der Signaltransduktion durch Komponenten der extrazellulären Matrix in kortikotropen Zellen

Die extrazelluläre Matrix transduziert Signale mit Hilfe von Integrinen, welche im weiteren Verlauf Transkriptionsfaktoren aktivieren. Diese führen mittels Regulation der Genexpression zu Änderungen der Zellform und Zellaktivität (64). So konnte erst kürzlich demonstriert werden, daß Laminin durch die Produktion von ROS in Kombination mit einer runden Zellform, Gentranskription in Fibroblasten reguliert. In diesen Zellen tritt eine runde Zellform

parallel mit einer Aktivierung von Rac auf, was zu einem Anstieg der ROS Produktion durch die NADPH Oxidase führt (52). Desweiteren wurde gezeigt, dass es in Endothelzellen mittels Aktivierung von Rac zu einer Hemmung des Zellwachstums kommt (39;66). Interessanterweise zeigen auch Granulosazellen in Gegenwart verschiedener ECM Komponenten Änderungen ihres Verteilungsmusters und ihrer Zellmorphologie (80). Laminin führt in Granulosazellen, ähnlich wie bei AtT-20 Zellen, zur Bildung von Zellclustern aus runden Zellen. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, daß Komponenten der ECM die Progesteronproduktion und FSH Rezeptorexpression regulieren (80). In AtT-20 Zellen konnte demonstriert werden, daß Laminin eine stark erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (ROS), sowie eine rundliche Zellmorphologie und eine durch N-Acetylcystein (NAC), einem freien Radikalfänger, umkehrbare Inhibition der Proliferationsrate zur Folge hat. Dies deutet am ehesten auf eine Rac vermittelte Inhibition der AtT-20 Zellproliferation durch Laminin hin (39). Interessanterweise produzierten AtT-20 Zellen auch unter Kollagen I und IV, geringere, aber erhöhte Mengen an ROS. Kollagen I übte einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation von AtT-20 Zellen aus. Jedoch ergab die Kombination von NAC keine Umkehrung der Kollagen I vermittelten Inhibition, was auf einen alternativen Signaltransduktionsweg, wie z.B durch Cdc42 hinweisen könnte (37;42). Kollagen IV produzierte im Gegensatz zu Laminin eine Steigerung der AtT-20 Proliferation, die sich mit NAC umkehren ließ. Hierbei könnte es sich um eine Rac vermittelte Steigerung der Proliferationsrate handeln, was nur bedingt zu der Mischung aus ausgebreiteter sowie abgerundeter Zellform passen würde. Eine alternative Möglichkeit wäre die Steigerung der Proliferation durch gleichzeitiges Aktivieren von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren durch Kollagen IV (37).

Fibronectin hat, im Gegensatz zu Laminin, Kollagen I und Kollagen IV keine signifikante Änderung der ROS Produktion in AtT-20 Zellen zur Folge. Diese Tatsache zusammen mit der ausbreiteten, gedehnten Zellform deutet auf einen weiteren, alternativen Signalweg für die Vermittlung der Effekte von Fibronectin hin (18;46). Dieser Signalweg könnte, wie in anderen Zelllinien z.B. Fibroblasten bereits demonstriert, die Aktivierung von Rho anstelle von Rac und der NADPH Oxidase beinhalten (14;18;46). Denn erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß Fibronectin, eine durch Rho vermittelte Proliferationssteigerung von Endothelzellen verursacht (14;66). Mit LPA behandelte AtT-20 Zellen zeigen einen signifikanten Anstieg der Proliferation, was beweist, daß die Aktivierung der Rho GTPase auch AtT-20 Zellproliferation stimulieren kann. Die Tatsache, daß LPA in Kombination mit Fibronectin keinen weiteren Effekt auf die AtT-20 Zellproliferation hat, könnte bedeuten, daß

AtT-20 Zellen auf Fibronectin bereits maximal stimuliert werden. Andererseits könnte Fibronectin auch durch andere Mechanismen, wie die Phosphorylierung des EGF Rezeptors den Eintritt in den Zellzyklus erleichtern (68). Die Resultate dieser Arbeit zeigen, daß Fibronectin und Kollagen IV AtT-20 Zellproliferation signifikant stimulieren, was eine Rolle dieser ECM Komponenten in der Progression von Hypophysenadenomen nahe legt.

Der aktivierende anti- β 1-Integrin Antikörper stimuliert AtT-20 Zellproliferation in gleicher Weise wie Fibronectin. Jedoch führt der Antikörper in Gegenwart von Fibronectin zu keiner weiteren Stimulation. Dies könnte bedeuten, daß Fibronectin bereits eine maximale Stimulation von β 1-Integrinen zur Folge hat, welche nicht linear dosisbezogen verläuft (57). Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß in den meisten Hypophysentumoren hauptsächlich β 1-Integrine exprimiert werden (26). Alternativ konnte in anderen Studien gezeigt werden, daß parakrine und autokrine Faktoren wie Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), ein Zytokin von dem vermutet wird, daß es in der Hypophysenadenomgenese involviert ist (6), die Expression individueller Integrin Untereinheiten regulieren kann (43). Dieser Mechanismus könnte zu einer Veränderung der Integrinexpression und einem konsequenten Wechsel der Proliferation in Hypophysenzellen führen. Eine weitere Rho vermittelte Signaltransduktion würde z.B. die Aktivierung von Phosphoinositolphosphat-5-kinase (PIP5k) beinhalten (14).

Zusammengefasst würde sich die in Abb. 21 vorgeschlagene Signaltransduktionskette für die extrazelluläre Matrix in kortikotropen Zellen ergeben.

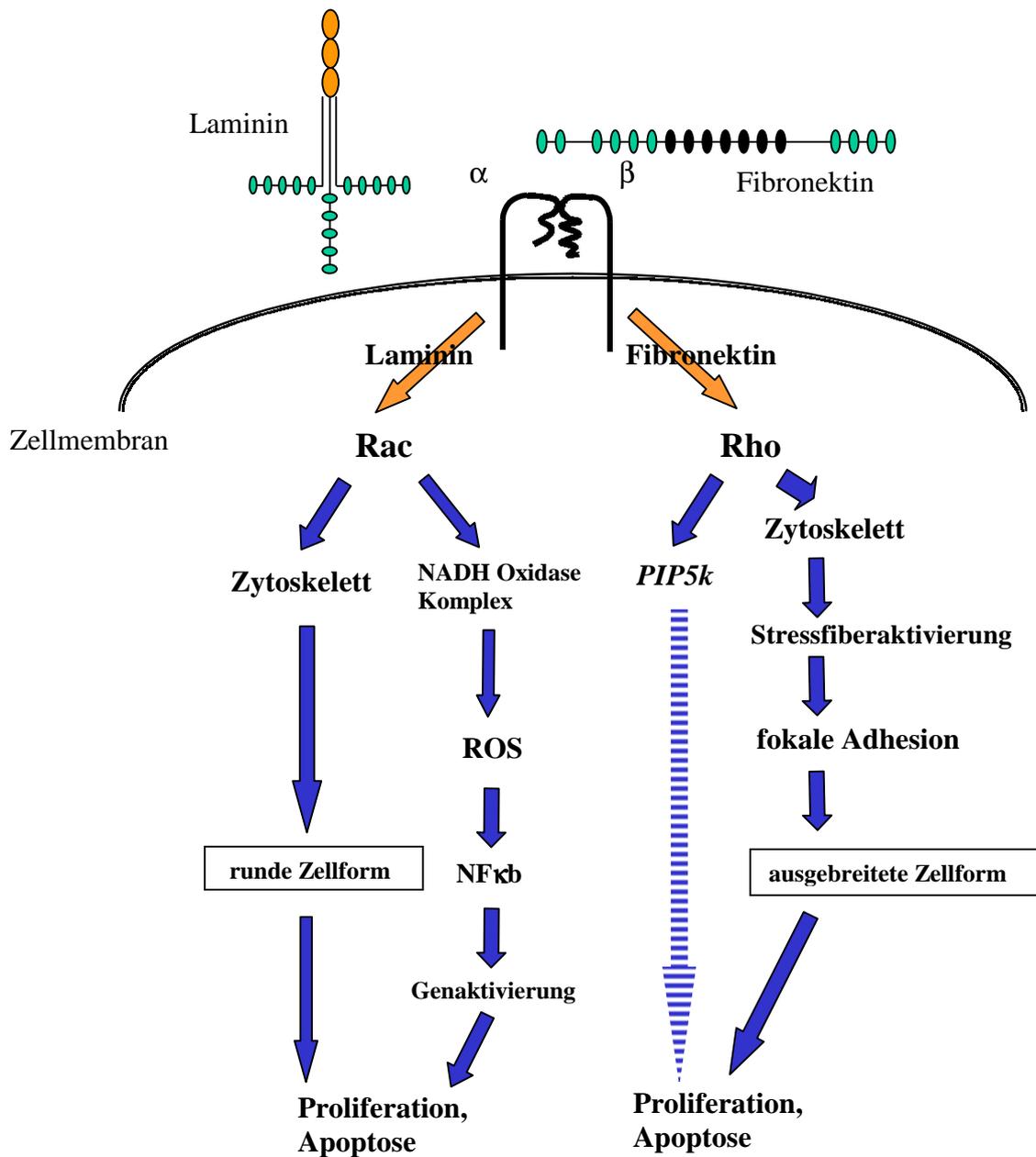


Abb. 21: Modell der Signaltransduktion durch Laminin und Fibronektin in AtT-20 Zellen. Die Aktivierung eines Integrins führt je nach ECM Komponente entweder zur Aktivierung der kleinen GTPase RHO oder Rac. Im Falle von Rac hätte dies parallel die Umstrukturierung des Zytoskeletts, sowie die Aktivierung des NADH-Komplexes mit der nachfolgenden Bildung von ROS, NFκB und einer entsprechenden Genaktivierung zur Folge. Die Aktivierung von Rho würde in gleicher Weise zu einer parallelen mechanischen Signaltransduktion über das Zytoskelett, sowie chemisch mittels „second messenger“ Systeme, wie z.B. Phosphoinositolphosphat-5-kinase (PIP5k), zu Änderungen der Proliferations- oder Apoptoserate führen.

6.7 Effekte von Laminin auf GH3 Zellen

Laminin wurde, neben der Regulation physiologischer Funktionen, schon oft in Zusammenhang mit Tumorentstehung und Metastasenbildung gebracht (38;53). So konnte gezeigt werden, daß die Synthese von Laminin in adrenokortikalen Zellen durch ACTH reguliert wird und einen homöostaseregulierenden Faktor in der Nebennierenrinde darstellt (71). Auch in der Zelldifferenzierung scheint Laminin eine wichtige Rolle zu spielen, denn es konnte in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, daß Laminin erheblich am Erhalt des Basalmembrannetzwerks und Differenzierung dieser Zellen beteiligt ist (20;63). Desweiteren wurde in Endothelzellen gezeigt, daß Laminin eine Hemmung der Cyclin D1 Translation zur Folge hat, woraus ein Proliferationsstopp dieser Zellen resultierte (66). Ähnlich verhielt es sich in GH3 Zellen wo eine signifikante Inhibition der GH3 Proliferationsrate unter Laminineinfluß nachgewiesen wurde, was einem ähnlichen Mechanismus zugrunde liegen könnte. Als Konsequenz könnten sich Änderungen der Lamininexpression im Hypophysengewebe proliferationshemmend, bzw. -fördernd, ähnlich wie in AtT-20 Zellen (57), auf Prolaktin produzierende Zellen auswirken. Laminin könnte somit einen physiologischen Regulator der Proliferation von mammotropen Hypophysenzellen darstellen. Das klinische Bild von Prolaktinomen wird vor allem durch die exzessive Sekretion von Prolaktin hervorgerufen. Ursache ist eine Vermehrung von mammotropen Hypophysenzellen, sowie eine Dysregulation der Prolaktinsekretion. In kortikotropen AtT-20 Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Laminin die POMC Expression und somit die ACTH Sekretion reguliert (57). Folglich würde es nicht überraschen wenn Laminin auch in mammotropen Zellen ein Einfluß auf die Prolaktinsekretion haben könnte. De facto führte Laminin in GH3 Zellen innerhalb von 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Prolaktinsekretion. Im Gegensatz dazu konnte in Rattenprolaktinzellen keinerlei Veränderung der Prolaktinsekretion unter Laminineinfluß gemessen werden. Dies könnte sowohl durch Unterschiede in der Zusammensetzung der ECM, als auch durch unterschiedliche Integrinexpressionsmuster, wie sie in Hypophysentumoren vorkommen, bedingt sein (23;26).

6.8 Veränderung der Lamininexpression während der Prolaktinogenese

Die Regulation der Proliferation und Prolaktinsekretion von GH3 Zellen, die Synthese von Laminin in Hypophysenzellen (89) und die unterschiedlichen Expressionsmuster von Laminin in Hypophysenadenomen verglichen mit normalem Hypophysengewebe, deuten auf eine regulatorische Funktion von Laminin in der Hypophyse und der Entstehung von Hypophysenadenomen hin (23). Aus diesem Grund wurden zur Darstellung von Laminin D2-Knock-Out-Mäuse benutzt, welche durch eine fehlende Expression des Dopamin-2 Rezeptors ein in vivo Modell für Prolaktinome und deren Entstehung sind (51). Die Prolaktinogenese in D2-KO Mäusen ist ein mehrstufiger Prozeß, bei dem sich über eine hyperplastische Zwischenstufe das eigentliche Adenom entwickelt (7).

Die immunhistochemische Färbung Laminins in normalen D2-KO Mäusen und D2-KO Prolaktinomen zeigte eine deutliche Reduktion der Lamininkonzentration. Die benutzten Lamininantikörper waren gegen die Lamininisoformen 1-3 gerichtet und deckten somit den größten Teil der in Geweben vorkommenden Lamininisoformen ab (23). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Lamininfärbungen humaner Hypophysen und Prolaktinome, in denen sich in ähnlicher Weise eine signifikante Konzentrationsminderung des Laminins darstellen ließ (23). Die humane Hypophysenhyperplasie wurde zufällig bei einer Autopsie entdeckt und färbte sich positiv für Prolaktin. Reversible Hypophysenhyperplasien werden oft bei Schwangeren gefunden, sind aber generell mit erhöhten Proliferationsraten und einem gesteigerten Mutationsrisiko verbunden (55). Die Feststellung, daß Prolaktinome weniger Laminin als normales Hypophysengewebe beinhalten, könnte bedeuten, daß das z.T. verstärkte Zellwachstum und die hohe Prolaktinproduktion in mammotropen Hypophysenadenomen auch auf eine Reduktion der Laminininhibition zurückzuführen ist. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß es bereits auf der sehr frühen Stufe der Hypophysenzellhyperplasie zu Änderungen in der Expression extrazellulärer Matrixproteine kommt und dies Konsequenzen für Hormonsekretion und Wachstum von Prolaktinomen hat.

7 Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix umgibt Zellen, stabilisiert Gewebe und reguliert Zellfunktionen. Bestandteile der ECM transduzieren Signale durch Zellmembranrezeptoren, sog. Integrine. Integrine vermitteln Änderungen der Zellmorphologie, Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Zellen. Die Frage ob die ECM eine wichtige Rolle in der Physiologie und Tumorgenese der Hypophyse spielt, ist immer noch offen. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die regulatorischen Möglichkeiten der ECM in der Hypophyse dargestellt. Es wurde der Einfluß der extrazellulären Matrix auf das Wachstum und die Zytokinsekretion von follikulostellaren Zellen, sowie Hormonsekretion, Proliferation und Signaltransduktion in kortikotropen Zellen untersucht. Desweiteren werden in dieser Arbeit Änderungen der Expression von Laminin, als auch deren mögliche funktionale Konsequenzen innerhalb der Prolaktinomgenese demonstriert.

In der follikulostellaren Zelllinie TtT-GF konnte gezeigt werden, daß Fibronectin und Kollagen I die Zellproliferation stimulieren. Simultan führte nur Kollagen I zu einer Erhöhung der Interleukin-6 Sekretion, welches ein bekannter Wachstumsfaktor für follikulostellare Zellen ist. Die signifikante Hemmung der Proliferation von FS-Zellen bei Kombination von Kollagen I mit einem anti-IL6-Antikörper läßt darauf schließen, daß Kollagen I die Proliferation und Zytokinsekretion von follikulostellaren Zellen reguliert. Die Fibronectin vermittelte Proliferationsteigerung scheint dagegen einem anderen Mechanismus zugrunde zu liegen.

In der kortikotropen Tumorzelllinie AtT-20 konnte nachgewiesen werden, daß die ACTH Sekretion durch Fibronectin, Laminin und Kollagen I inhibiert wird. Ein Reporterkonstrukt bestehend aus dem POMC Promoter und Luciferasegen zeigte ähnliche Ergebnisse, was auf eine Hemmung der ACTH Sekretion bereits auf Ebene der POMC-Transkription schließen läßt. Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Veränderung der ACTH Sekretion in normalen Hypophysenzellen festgestellt werden.

AtT-20 Zellproliferation wurde durch Kollagen IV und Fibronectin stimuliert, wogegen Kollagen I und Laminin zu einer Inhibition führten. Parallel dazu fand eine Veränderung der Zellform statt. Ein möglicher integrinvermittelter Signalweg umfasst die Aktivierung von Rac, einer kleinen GTPase, mit der konsekutiven Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und einer runden Zellform. Es konnte gezeigt werden, daß eine Inhibition der AtT-20 Proliferation durch Laminin mit einer signifikanten Erhöhung der

reaktiven Sauerstoffradikalen und einer runden Zellform einhergeht. Dieser Effekt war mit N-Acetylcystein (NAC), einem ROS-Antagonisten, umkehrbar und am ehesten Rac vermittelt. Unter Kollagen IV fand ebenfalls eine Inhibition des Zellwachstums statt. AtT-20 Zellen nahmen auch hier eine runde Zellform an und produzierten, wenn auch weniger stark als Laminin und Kollagen I, ROS. Dieser Effekt war jedoch nicht durch NAC umkehrbar. Kollagen I führte dagegen zu einer Steigerung der Proliferation und ROS-Produktion, sowie zu ausgebreiteten als auch runden Zellen. Diese z.T. gegensätzlichen durch Kollagen I+IV vermittelten Effekte könnten durch simultane Aktivierung alternativer Mechanismen, wie z.B. eine integrinbedingte Aktivierung als auch Hemmung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, verursacht sein.

Ein weiterer, oft mit Fibronectin assoziierter Signalweg, beinhaltet die integrinvermittelte Aktivierung von Rho, einer weiteren kleinen GTPase. Die fehlende ROS Erhöhung, der Einsatz eines β 1-integrin stimulierenden Antikörpers, sowie die integrinunabhängige Stimulation von Rho durch Lysophosphatidsäure läßt auf eine Rho assoziierte Proliferationserhöhung in AtT-20 Zellen durch Fibronectin schließen.

In GH3 Zellen führte Laminin zu einer Abnahme der Prolaktinsekretion und zur Inhibition der Proliferation. Im Gegensatz dazu konnten keine Veränderungen der Prolaktinsekretion in normalen Rattenhypophysenzellen beobachtet werden. Übereinstimmend zeigte sich im Dopamin₂ Rezeptor defizienten Mausprolaktinom, einem Knock-Out in vivo Modell für spontane Prolaktinomentwicklung, und humanen Prolaktinom eine bereits sehr frühe Abnahme der Lamininexpression. Diese Hemmung der Lamininexpression während der Prolaktinomentwicklung könnte einen weiteren Faktor für erhöhte Hormonproduktion und Zellproliferation in Prolaktinomen darstellen.

Die hier erstmalig beschriebenen Auswirkungen der extrazellulären Matrix auf Hypophysenzellproliferation und -hormonsekretion verdeutlichen die wichtige, aber wenig erforschte Rolle der ECM in der Hypophyse. Diese Resultate sind nicht nur neue Ansatzpunkte der Hypophysenphysiologie und -pathophysiologie, sondern lassen auch die Weitläufigkeit der unterschiedlichen regulativen Systeme innerhalb der Hypophyse erkennen.

8 Literatur

1. Aoki A, de Gaisan EO, Pasolli HA, Torres AI. Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 1996;104:256-62.
2. Arzt E, Buric R, Stelzer G et al. Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* 1993;132:459-67.
3. Arzt E, Pereda MP, Castro CP, Pagotto U, Renner U, Stalla GK. Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:71-95.
4. Arzt E, Stalla GK. Cytokines: autocrine and paracrine roles in the anterior pituitary. *Neuroimmunomodulation.* 1996;3:28-34.
5. Arzt E, Stelzer G, Renner U, Lange M, Muller OA, Stalla GK. Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J.Clin.Invest* 1992;90:1944-51.
6. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr.Rev.* 1998;19:798-827.
7. Asa SL, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ. Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology* 1999;140:5348-55.
8. Aspenstrom P. Effectors for the Rho GTPases. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1999;11:95-102.
9. Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J.Mol.Med.* 1998;76:253-65.
10. Aumailley M, Krieg T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J.Invest Dermatol.* 1996;106:209-14.
11. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr.Rev.* 1996;17:64-102.
12. Biller BM. Hyperprolactinemia. *Int.J.Fertil.Womens Med.* 1999;44:74-7.
13. Bornstein SR, Scherbaum WA. Hyperkortisolismus. In: Scherbaum W, ed. *Thiemes Innere Medizin.* Stuttgart: 1999:195-200.
14. Bourdoulous S, Orend G, MacKenna DA, Pasqualini R, Ruoslahti E. Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression. *J.Cell Biol.* 1998;143:267-76.
15. Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin.Orthop.* 1992;250-72.
16. Carmeliet P, Vankelecom H, Van Damme J, Billiau A, Denef C. Release of interleukin-6 from anterior pituitary cell aggregates: developmental pattern and modulation by glucocorticoids and forskolin. *Neuroendocrinology* 1991;53:29-34.

17. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997;276:1425-8.
18. Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J.Cell Biol.* 1998;142:573-86.
19. Dahia PL, Grossman AB. The molecular pathogenesis of corticotroph tumors. *Endocr.Rev.* 1999;20:136-55.
20. De Arcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefebvre O, Kedingler M, Simon-Assmann P. Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J.Cell Biol.* 1996;133:417-30.
21. Denduchis B, Rettori V, McCann SM. Role of laminin on prolactin and gonadotrophin release from anterior pituitaries of male rats. *Life Sci.* 1994;55:1757-65.
22. Dieterich KD, Lehnert H. Decreased expression of corticotropin-releasing factor-binding protein mRNA in ACTH-secreting pituitary adenomas. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 2000;108:59-62.
23. Farnoud MR, Derome P, Peillon F, Li JY. Immunohistochemical localization of different laminin isoforms in human normal and adenomatous anterior pituitary. *Lab Invest* 1994;70:399-406.
24. Farnoud MR, Farhadian F, Samuel JL, Derome P, Peillon F, Li JY. Fibronectin isoforms are differentially expressed in normal and adenomatous human anterior pituitaries. *Int.J.Cancer* 1995;61:27-34.
25. Farnoud MR, Kujas M, Derome P, Racadot J, Peillon F, Li JY. Interactions between normal and tumoral tissues at the boundary of human anterior pituitary adenomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 1994;424:75-82.
26. Farnoud MR, Veirana N, Derome P, Peillon F, Li JY. Adenomatous transformation of the human anterior pituitary is associated with alterations in integrin expression. *Int.J.Cancer* 1996;67:45-53.
27. Farrell WE, Clayton RN. Molecular pathogenesis of pituitary tumors. *Front Neuroendocrinol.* 2000;21:174-98.
28. Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P. Folliculostellate cell network: A route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:8891-6.
29. Ferrara N, Fujii DK, Goldsmith PC, Widdicombe JH, Weiner RI. Transport epithelial characteristics of cultured bovine pituitary follicular cells. *Am.J.Physiol* 1987;252:E304-E312.
30. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1989;161:851-8.

31. Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R, Gospodarowicz D. Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84:5773-7.
32. Frawley LS, Boockfor FR. Mammosomatotropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr.Rev.* 1991;12:337-55.
33. Gamby C, Waage MC, Allen RG, Baizer L. Growth-associated protein-43 (GAP-43) facilitates peptide hormone secretion in mouse anterior pituitary AtT-20 cells. *J.Biol.Chem.* 1996;271:10023-8.
34. Ganong WF. What regulates the production and secretion of angiotensinogen in the brain? *Front Neuroendocrinol.* 1994;15:78-81.
35. Giancotti FG. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1997;9:691-700.
36. Giancotti FG. Complexity and specificity of integrin signalling [news]. *Nat.Cell Biol.* 2000;2:E13-E14.
37. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-32.
38. Giannelli G, Antonaci S. Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. *Clin.Exp.Metastasis* 2000;18:439-43.
39. Gu J, Sumida Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin- dependent Rho and Rac activation via p130(Cas)-CrkII-DOCK180 pathway. *J.Biol.Chem.* 2001;276:27090-7.
40. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-14.
41. Hay ED. Extracellular matrix alters epithelial differentiation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1993;5:1029-35.
42. Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol.* 2000;19:319-23.
43. Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J.Biol.Chem.* 1989;264:380-8.
44. Horacek MJ, Thompson JC, Dada MO, Terracio L. The extracellular matrix components laminin, fibronectin, and collagen IV are present among the epithelial cells forming Rathke's pouch. *Acta Anat.(Basel)* 1993;147:69-74.
45. Horn F, Henze C, Heidrich K. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiology* 2000;202:151-67.
46. Hotchin NA, Kidd AG, Altroff H, Mardon HJ. Differential activation of focal adhesion kinase, Rho and Rac by the ninth and tenth FIII domains of fibronectin. *J.Cell Sci.* 1999;112:2937-46.
47. Hynes RO. *Fibronectins*. Berlin; Heidelberg; New York: Springer 1990.

48. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
49. Inoue, K. The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch.Histol.Cytol.* 1999;62:205-218..
50. Jiang FX, Cram DS, DeAizpurua HJ, Harrison LC. Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1999;48:722-30.
51. Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL et al. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 1997;19:103-13.
52. Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 1998;280:898-902.
53. Kitayama J, Nagawa H, Tsuno N et al. Laminin mediates tethering and spreading of colon cancer cells in physiological shear flow. *Br.J.Cancer* 1999;80:1927-34.
54. Kobayashi H, Fukata J, Murakami N et al. Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells. *Brain Res.* 1997;758:45-50.
55. Koralı Z, Müller A, Schopohl J, Schaaf GK, Stalla GK. Hypophysentumoren und Kraniopharyngeome. In: Reulen HJ, Kreth FW, eds. *Manual Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks.* Tumorzentrum München 2001:89-108.
56. Koyama, C. Pituitary folliculo-stellate-like cells stimulate somatotrophic tumor growth in nude mice. *Endocr.Pathology* 1995;6: 67-75.
57. Kuchenbauer F, Hopfner U, Stalla J, Arzt E, Stalla GK, Paez-Pereda M. Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 2001;175:141-8.
58. Lander AD, Selleck SB. The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas. *J.Cell Biol.* 2000;148:227-32.
59. Li QL, Yano H, Ren SG, Li X, Friedman TC, Melmed S. Leukemia inhibitory factor (LIF) modulates pro-opiomelanocortin (POMC) gene regulation in stably transfected AtT-20 cells overexpressing LIF. *Endocrine.* 1997;7:325-30.
60. Lidhar K, Korbonits M, Jordan S et al. Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1999;84:3823-30.
61. Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 1993;7:737-43.
62. Liu YC, Tanaka S, Inoue K, Kurosumi K. Localization of fibronectin in the folliculo-stellate cells of the rat anterior pituitary by the double bridge peroxidase-antiperoxidase method. *Histochemistry* 1989;92:43-5.

63. Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J.Cell Biol.* 1997;139:1553-65.
64. Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 1998;8:437-41.
65. Matsumoto H, Ishibashi Y, Ohtaki T, Hasegawa Y, Koyama C, Inoue K. Newly established murine pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) secretes potent pituitary glandular cell survival factors, one of which corresponds to metalloproteinase inhibitor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1993;194:909-15.
66. Mettouchi A, Klein S, Guo W et al. Integrin-Specific Activation of Rac Controls Progression through the G(1) Phase of the Cell Cycle. *Mol.Cell* 2001;8:115-27.
67. Morand I, Fonlupt P, Guerrier A et al. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* 1996;137:3356-67.
68. Moro L, Venturino M, Bozzo C et al. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 1998;17:6622-32.
69. Orth DN. Cushing's syndrome. *N.Engl.J.Med.* 1995;332:791-803.
70. Paez PM, Ledda MF, Goldberg V et al. High levels of matrix metalloproteinases regulate proliferation and hormone secretion in pituitary cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2000;85:263-9.
71. Pellerin S, Keramidas M, Chambaz EM, Feige JJ. Expression of laminin and its possible role in adrenal cortex homeostasis. *Endocrinology* 1997;138:1321-7.
72. Ray D, Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr.Rev.* 1997;18:206-28.
73. Renner U, Gloddek J, Arzt E, Inoue K, Stalla GK. Interleukin-6 is an autocrine growth factor for folliculostellate-like TtT/GF mouse pituitary tumor cells. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 1997;105:345-52.
74. Renner U, Gloddek J, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK. Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells. *Domest.Anim Endocrinol.* 1998;15:353-62.
75. Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK. Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *Eur.J.Endocrinol.* 1996;135:515-32.
76. Ruoslahti E. Stretching is good for a cell. *Science* 1997;276:1345-6.
77. Saiardi A, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* 1997;19:115-26.

78. Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1999;11:274-86.
79. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat.Med.* 1999;5:662-8.
80. Sites CK, Kessel B, LaBarbera AR. Adhesion proteins increase cellular attachment, follicle-stimulating hormone receptors, and progesterone production in cultured porcine granulosa cells. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1996;212:78-83.
81. Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999;98:137-46.
82. Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am.J.Pathol.* 1996;148:1345-50.
83. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1999;11:634-40.
84. Tashjian AH, Jr., Bancroft FC, Levine L. Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J.Cell Biol.* 1970;47:61-70.
85. Vale W, Grant G, Amoss M, Blackwell R, Guillemin R. Culture of enzymatically dispersed pituitary cells: functional validation of a method. *Endocrinology* 1972;91:562-72.
86. Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Denef C. Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 1989;49:102-6.
87. Vankelecom H, Matthys P, Van Damme J, Heremans H, Billiau A, Denef C. Immunocytochemical evidence that S-100-positive cells of the mouse anterior pituitary contain interleukin-6 immunoreactivity. *J.Histochem.Cytochem.* 1993;41:151-6.
88. Varner JA, Cheresch DA. Integrins and cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1996;8:724-30.
89. Vila-Porcile E, Picart R, Tixier-Vidal A, Tougard C. Cellular and subcellular distribution of laminin in adult rat anterior pituitary. *J.Histochem.Cytochem.* 1987;35:287-99.
90. Webster J. Clinical management of prolactinomas. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* 1999;13:395-408.
91. Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I, Scanlon MF. A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline Comparative Study Group. *N.Engl.J.Med.* 1994;331:904-9.
92. Xie J, Haslam SZ. Extracellular matrix regulates ovarian hormone-dependent proliferation of mouse mammary epithelial cells. *Endocrinology* 1997;138:2466-73.

93. Xu RK, Wu XM, Di AK, Xu JN, Pang CS, Pang SF. Pituitary prolactin-secreting tumor formation: recent developments. *Biol.Signals Recept.* 2000;9:1-20.
94. Zhu X, Assoian RK. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol.Biol.Cell* 1995;6:273-82.

9 Danksagung

Diese Arbeit wurde alleinig von Prof. Dr. Stalla ermöglicht. Vielen Dank für die Ideen, das Bereitstellen der Mittel und das Unterstützen der Forschungsaufenthalte. DANKE !

Betreut wurde diese Arbeit von Dr. Marcelo Paez Pereda. Vielen Dank für die guten Ideen, Unterstützung, Kritik und, am wichtigsten, die allumfassende Betreuung. Endlich ist es geschafft !

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken ohne die diese Arbeit ebenfalls nie zustande gekommen wäre.

- Ursula Hopfner: Für die technische Unterstützung, sehr viel Geduld und den Communicator. Noch viele weitere Kilometer zusammen !
- Yvonne Grübler: Ebenfalls für die technische Unterstützung, Integration in die Gruppe und ständige Hilfsbereitschaft.
- Dr. Ulrich Renner: Für viel Kritik, Anregungen und Offenheit für neue Ideen.
- Dr. Uberto Pagotto: Schwierig in Worte zu fassen. Danke für den ständigen Gesang und die konstruktive Kritik an meiner Ausbildung.
- Johanna Stalla: Für das Beibringen und der geduldigen Durchführung der RIAs.
- Dr. Marily Theodopolou: Für lebhaftes Diskussionen und Hilfe bei Erstellung von Grafiken.

10 Anhang

Veröffentlichungen aus Teilen dieser Arbeit:

Kuchenbauer F, Hopfner U, Stalla J, Arzt E, Stalla GK, Paez-Pereda M. Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells. Mol.Cell Endocrinol. 2001;175:141-8.

Kuchenbauer F, Hopfner U, Stalla J, Renner U, Stalla GK, Paez-Pereda M. Decreased expression of laminin during prolactinoma development regulates proliferation and hormone secretion. Manuskript in Vorbereitung.

11 Lebenslauf

Florian Kuchenbauer
Trivastr. 15a
80637 München

PERSÖNLICHE ANGABEN:

1. Geburtsdatum: 15.03.1974
2. Geburtsort: München
3. Staatsangehörigkeit: Deutsch
4. Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1980 – 1984	Grundschule an der Ostpreußenstraße, München
1984 – 1993	Nymphenburger Gymnasium, München, Abitur

HOCHSCHULBILDUNG

November 1993	Chemiestudium an der München TU
November 1994	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
September 1996	Physikum
September 1997	1. Staatsexamen
März 2000	2. Staatsexamen
April 2001	3. Staatsexamen
Mai 2001	USMLE Step II

PRAKTISCHES JAHR

April - August 2000	Neurologie <ul style="list-style-type: none">▪ Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA▪ Krankenhaus München-Harlaching, München
August - Dez. 2000	Innere Medizin <ul style="list-style-type: none">▪ Universitätsklinikum Innenstadt Ziemssenstraße, München
Dez. - April 2001	Chirurgie <ul style="list-style-type: none">▪ Universitätsklinikum Innenstadt Nußbaumstraße, München

seit Juli 2002 AiP an der III. Medizinischen Klinik (Hämatologie/Onkologie), Klinikum Großhadern

DISSERTATION

Prof. Dr. Stalla, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Neuroendokrinologie

"Einfluß von Komponenten der extrazellulären Matrix auf Hypophysenzellphysiologie und Hypophysentumorpathogenese"

FORSCHUNGSaufenthalte

Sept. – Nov. 1998 Forschungsstipendium aus dem Fond „Hochschule International“ an der Universidad de Buenos Aires, Argentinien

Juni – Juli 1999 Forschungsaufenthalt an der medizinischen Fakultät der Universität Brescia, Italien

VERÖFFENTLICHUNGEN

Kuchenbauer F, Hopfner U, Stalla J, Arzt E, Stalla GK, Paez-Pereda M. Extracellular matrix components regulate ACTH production and proliferation in corticotroph tumor cells. Mol.Cell Endocrinol. 2001;175:141-8.

Kuchenbauer F, Biberthaler P, Stöger H, Mutschler W. Morbus Teutschländer eine seltene benigne Differentialdiagnose proliferativer Raumforderungen im Weichteilgewebe. Unfallchirurg, Herbst 2002

Kuchenbauer F, Hopfner U, Stalla J, Renner U, Stalla GK, Paez-Pereda M. Decreased expression of laminin during prolactinoma development regulates proliferation and hormone secretion. Manuskript in Vorbereitung.