

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE

Direktor der Klinik und Chefarzt:

Prof. Dr. Dr. Martin E. Keck

**Expression und Regulation von Interleukin-8 in
Hypophysenadenomen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Luise Welzel

aus Marktredwitz

2017

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Günter K. Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Felix Beuschlein

Prof. Dr. Christine Spitzweg

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Ulrich Renner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
1.1 Die Hypophyse.....	8
1.1.1 Anatomie und Physiologie.....	8
1.1.2 Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse.....	9
1.1.3 Hypophysentumore.....	11
1.2 Interleukin-8.....	13
1.2.1 Allgemeines und Struktur.....	13
1.2.2 Physiologische Aufgaben von Interleukin-8.....	14
1.2.3 Rezeptoren und Signalwege.....	15
1.2.4 Regulation der IL-8 Expression.....	17
1.2.4.1 Stimulation der IL-8 Expression.....	17
1.2.4.2 Wirkung von Dexamethason auf die IL-8 Expression.....	19
1.2.5 Interleukin-8 in Tumoren.....	19
1.2.6 Murine Homologa von Interleukin-8.....	20
1.3 Ziel der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien und Lösungen.....	22
2.1.1 Geräte und Materialien.....	22
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	23
2.2 Methodik.....	24
2.2.1 Primärzellkultur humaner Hypophysenadenome.....	24
2.2.2 Die AtT20-Zelllinie.....	26
2.2.2.1 AtT20-Zelllinie als Modell für kortikotrope Hypophysenadenome.....	26
2.2.2.2 Anlegen der Primärkultur.....	27
2.2.2.3 Splitten der AtT20-Zellen.....	27
2.2.3 Stimulations- und Inhibitionversuche mit Zellkulturen.....	27

2.2.4	Immunologische Methoden.....	28
2.2.4.1	Interleukin-8 Messungen via ELISA	28
2.2.4.2	Radioimmunoassay	29
2.2.5	³ H-Thymidin-Inkorporationsversuch	30
2.3	Statistik.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Produktion von IL-8 in Hypophysenadenomkulturen	32
3.1.1	Basale Produktion von IL-8	32
3.1.2	Einfluss von LPS auf die IL-8 Sekretion von Hormon-inaktiven Hypophysenadenomen	34
3.1.3	Einfluss von LPS auf die IL-8 Sekretion von somatotropen Adenomen.....	38
3.1.4	Wirkung von Dexamethason auf die basale IL-8 Produktion.....	40
3.1.5	Wirkung von Dexamethason auf die LPS stimulierte IL-8 Produktion von Hormon-inaktiven Hypophysenadenomen	43
3.2	Proliferationsbestimmung von AtT20-Zellen mittels ³ H-Thymidin-Inkorporation...	46
3.2.1	Wirkung von IL-8 auf die Proliferation von AtT20-Zellen	46
3.2.2	Wirkung von KC auf die Proliferation von AtT20-Zellen.....	48
3.3	Einfluss von IL-8 auf die Hormonproduktion von AtT20-Zellen.....	49
3.3.1	Einfluss von IL-8 auf die basale ACTH-Produktion	50
3.3.2	Wirkung von IL-8 auf die CRH stimulierte ACTH-Produktion	51
3.3.3	Wirkung von IL-8 auf die ACTH-Produktion von AtT20-Zellen bei Hemmung durch Dexamethason.....	52
3.3.4	Wirkung von IL-8 auf die ACTH-Sekretion bei Inkubation mit Forskolin	53
4	Diskussion	54
4.1	Produktion von IL-8 in Hypophysentumoren	54
4.2	Regulation von IL-8 in Hypophysenadenomen	56
4.3	Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von IL-8 in Hypophysentumorzellen	58
4.4	Schlussfolgerungen	61

5 Zusammenfassung.....	63
6 Literaturverzeichnis.....	64
7 Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
AP-1	Activator-Protein-1
C/EBP	CAAT/enhancer binding protein
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD4	Cluster of differentiation 4
CNC	Carney-Complex
CRE	Glucocorticoid-responsiv element
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
DNA	Desoxyrinonukleinsäure
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELR	Aminosäuresequenz Glu-Leu-Arg
ENA	Epithelial-cell-derived Neutrophil-activating Protein
ERK 1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2
FAK	Focal Adhesion Kinase
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FS-Zellen	Follikulostellare Zellen
GCP-2	Granulocyte chemotactic protein 2
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GH	Growth Hormone
GHRH	Growth Hormone-releasing Hormone
	Guanine nucleotide binding protein alpha stimulating activity polypeptide 1
GNAS1	
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormone
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRO	Growth-regulated Oncogene
GTP	Guanosintriphosphat
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HMEC	Human Microvascular Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF-1	Insuline-like growth factor 1
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
JNK	JUN-N-terminal protein kinase
LH	Luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAS	McCune-Albright Syndrom
MEN-1	Multiple endokrine Neoplasie Typ1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAP-2	Neutrophil-activating Protein-2
NFPA	Non-functioning pituitary adenomas
NF-κB	Nuclear Factor κB
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
POMC	Pro-Opio-Melano-Cortin
RB	Retinoblastom

RIA	Radioimmunoassay
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TRH	Thyrotropin-releasing Hormone
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
α -MSH	alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon

1 Einleitung

1.1 Die Hypophyse

1.1.1 Anatomie und Physiologie

Die Hypophyse bildet zusammen mit dem Hypothalamus das zentrale Steuerorgan des endokrinen Systems und reguliert viele lebenswichtige homöostatische Vorgänge wie Wachstum, Reproduktion und Metabolismus. Dabei fungiert sie als Vermittler zwischen Hypothalamus, der wiederum Informationen aus höheren Zentren des ZNS erhält, und den peripheren Organen (Renner et al., 2001).

Die Hirnanhangsdrüse kann funktionell und anatomisch in zwei Teile gegliedert werden: Der Hypophysenvorderlappen (HVL), Teil der Adenohypophyse, nimmt die Hauptmasse ein. Der Hypophysenhinterlappen (HHL) bildet die Neurohypophyse. Über das Infundibulum besteht eine Verbindung zum Hypothalamus, ein Teil des Diencephalons. Das ca. 0,6g schwere Organ liegt vom Diaphragma sellae, einer Duraduplikation, überspannt im sogenannten Türkensattel (Sella turcica) des Keilbeins. Die Blutversorgung wird über die A.hypophysialis superior und inferior gewährleistet. Eine Besonderheit ist, dass die Arterien hier ein Pfortader-System ausbilden. Auf Höhe der Eminentia Mediana besteht ein erstes Kapillarbett mit fenestriertem Endothel, die Blut-Hirn-Schranke ist hier also aufgehoben. Über mehrere Venen wird das Blut in ein zweites Kapillarbett im HVL geleitet (Lüllmann-Rauch, 2009, Melmed, 2002). Die Funktion dieses Systems wird später erläutert.

Die Neurohypophyse kann als Fortsetzung des Hypothalamus angesehen werden. Sie wird von marklosen Axonendigungen gebildet. Die Perikaryen dieser Neurone liegen in hypothalamischen Kerngebieten, dem Nucleus supraopticus und paraventricularis. Dort werden die beiden Hormone ADH (antidiuretisches Hormon) sowie Oxytocin gebildet und per axonalem Transport zum Hinterlappen transportiert, wo sie gespeichert und sezerniert werden. Umgeben werden die Axonenden von Pituizyten, spezialisierten Gliagewebe (Lüllmann-Rauch, 2009, Rosso, Mienville, 2009).

Als Ausstülpung der Rathke-Tasche ist die Adenohypophyse ektodermalen Ursprungs. Sie besteht aus dem Pars distalis (Vorderlappen), dem Pars tuberalis (Trichterlappen), der den Hypophysenstiel von ventral umgreift und dem Pars intermedia (Mittellappen). Der Letztgenannte ist beim Menschen nur rudimentär ausgebildet. Aufgrund unterschiedlichen Färbeverhaltens lassen sich auf histologischer Ebene die zahlreicheren azidophilen von basophilen Zellen unterscheiden. Außerdem finden sich chromophobe, also kaum anfärbbare Zellen (Lüllmann-Rauch, 2009, Perez-Castro et al., 2012).

Im Vorderlappen gibt es fünf verschiedene endokrine Zelltypen, die insgesamt sechs Hormone produzieren. Die azidophilen Zellen bilden die nicht-glandotropen Hormone GH (growth hormone) und Prolaktin. Nicht-glandotrop bedeutet, dass diese Hormone ohne Zwischenschaltung in der Peripherie wirken. Im Falle von Prolaktin ist dies die laktierende Mamma. GH wirkt vor allem auf Leber, Knochen sowie Skelettmuskulatur und stimuliert dort die Freisetzung von IGF-1 (insulin-like growth faktor 1). Es spielt eine wichtige Rolle für Zellproliferation und Wachstum (Lüllmann-Rauch, 2009).

Die vier glandotropen Hormone ACTH (Adrenokortikotropes Hormon), TSH (Thyroidea-stimulierendes Hormon), FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon), die der Regulation nachgeschalteter endokriner Organe dienen, werden von den basophilen Zellen gebildet. Dementsprechend können diese Zelltypen als kortikotrope (ACTH stimuliert die Nebennierenrinde), thyrotrope (TSH stimuliert die Schilddrüse) und gonadotrope (FSH/LH wirken auf die Gonaden) Zellen bezeichnet werden. Eine Sonderstellung nehmen die kortikotropen Zellen ein: In ihnen wird das Vorläuferprotein POMC (Pro-Opio-Melano-Cortin) synthetisiert, das posttranslational in verschiedene Hormone gespalten wird. Neben ACTH sind dies zum Beispiel α -MSH oder β -Endorphine (Lamolet et al., 2001, Lüllmann-Rauch, 2009, Smith, Funder, 1988).

5-10% der Vorderlappenzellen sind follikulostellare Zellen, kurz FS-Zellen. Dieser Zelltyp wurde schon 1953 entdeckt, die komplette physiologische Funktion ist jedoch immer noch nicht bekannt (Renner, 2006, Rinehart, Farquhar, 1953). Sie beteiligen sich nicht an der Hormonsekretion, produzieren allerdings lösliche Faktoren wie VEGF und nehmen damit eine wichtige Rolle in der auto- und parakrinen Regulation der Hypophysenphysiologie ein (Allaerts, Vankelecom, 2005, Devnath, Inoue, 2008, Perez-Castro et al., 2000). Die Ontogenese dieses Zelltyps ist noch nicht geklärt. Wahrscheinlich stammen die FS-Zellen von Astrozyten oder Mikrogliazellen ab, da sie positiv für das S100-Protein und GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) sind (Inoue, 1999). Zusätzlich zeigen sie phagozytotische Eigenschaften (Aoki et al., 1996, Stokreef et al., 1986). Auch eine Abstammung von dendritischen Zellen wird diskutiert (Allaerts et al., 1997, Giometto et al., 1997, Herkenham, 2005, Sato, Inoue, 2000). Sie sind über Gap junctions untereinander und mit den endokrinen Zellen verbunden und bilden somit ein Netzwerk zur interzellulären Kommunikation (Fauquier et al., 2001, Morand et al., 1996).

1.1.2 Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Die Aktivität der Zellen der Adenohypophyse wird über hypothalamische Steuerhormone geregelt, die stimulierend (Releasing Hormone) oder inhibierend (Release-inhibiting Hormone)

wirken können. Sie werden pulsatil ausgeschüttet und erreichen über das Pfortadersystem der Hypophyse schnell und in hoher Konzentration ihr Ziel im HVL (Renner et al., 2001). Fast für jeden endokrinen Zelltyp existiert ein Releasing Hormon: GHRH (Growth Hormone-releasing Hormone), CRH (Corticotropin-releasing Hormone), TRH (Thyrotropin-releasing Hormone) und GnRH (Gonadotropin-releasing Hormone) (Lüllmann-Rauch, 2009, Morley, 1981, Perez-Castro et al., 2012, Wildt et al. 1982). Eine Sonderstellung nehmen die laktotropen Zellen ein. Da ihre Basisaktivität relativ hoch ist, stehen sie unter der inhibitorischen Kontrolle von Dopamin (Perez-Castro et al., 2012, Shaar, Clemens, 1974). Das einzig wirkliche release-inhibiting Hormon ist Somatostatin, das einen hemmenden Einfluss auf die somatotropen Zellen hat (Barinaga et al., 1985, Perez-Castro et al., 2012).

Neben diesem Regulationsprinzip spielen negative Rückkopplungsmechanismen auf hypothalamischer und hypophysärer Ebene eine wichtige Rolle. Durch die Hormone der nachgeschalteten Drüsen wird die Aktivität der glandotropen bzw. hypophysiotropen Zellen gehemmt. Somit entstehen eine sogenannte lange und kurze Rückkopplungsschleife (long and short feedback).

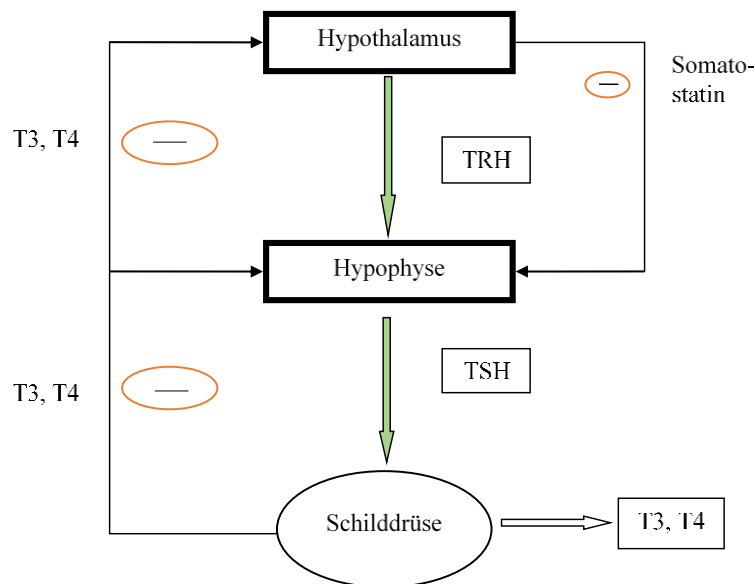


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse am Beispiel der Schilddrüse. Das hypothalamische Steuerhormon TRH (Releasing Hormon) stimuliert die TSH Freisetzung im HVL. Somatostatin als Releasing Inhibiting Hormon wirkt hemmend. Die Effektorhormone T3/T4 wirken über negative Rückkopplungsmechanismen inhibierend (long and short feedback).

Weiterhin wirken auto- und parakrine Mechanismen modulierend auf die endokrinen Regelkreise. FS-Zellen und endokrine Zellen selbst synthetisieren eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, vasoaktiven Substanzen und Neuropeptiden, die auch die Hormonsekretion beeinflussen können (Ray, Melmed, 1997, Renner et al., 2006, Renner et al.,

1996). Es muss allerdings beachtet werden, dass all diese Faktoren auch über den Blutkreislauf die Hypophyse erreichen können. Da manche Zellen, z.B. die Somatotropen, ihre eigenen Releasing und Release-inhibiting Hormone selbst produzieren können, sind ultrakurze Feedback-Mechanismen über para-/autokrine Wirkung denkbar (Perez- Castro et al., 2012, Renner et al., 2001).

Zusätzlich können verschiedene Faktoren, externe Stimuli wie Stress, psychische Belastungen oder bakterielle Infektionen die Sekretion beeinflussen. Somit ist eine Reaktion auf intrinsische und extrinsische Veränderungen des Organismus möglich (Chorousos, 1995, Besedovsky, del Ray, 1996, Renner et al., 2001).

All diese Regulationsprinzipien zeigen die extreme Variabilität der endokrinen Homöostase. Dadurch wird eine überlebenswichtige Reaktionsfähigkeit des Körpers auf physiologische oder pathophysiologische Veränderungen gewährleistet. Hypothalamus und Hypophyse dienen dabei als Schnittstelle zwischen dem Immun-, dem neuronalem sowie dem endokrinen System. (Arzt et al., 1999, Renner et al., 2001, Spangelo, Gorospe, 1995).

1.1.3 Hypophysentumore

Hypophysenadenome sind gutartige Tumore, ausgehend von den endokrinen Zellen der Adenohypophyse und machen 10-25% aller intrakraniellen Neoplasien aus (Asa, 1998, Scheithauer et al., 2006, Renner et al., 2001). In den letzten Jahren zeigten mehrere epidemiologische Studien eine steigende Inzidenz und Prävalenz von Hypophysentumoren. So berechneten Ezzat et al. durch radiologische Untersuchungen eine Prävalenz von 22,5% für Inzidentalome. Dies sind zufällig diagnostizierte, hormoninaktive Adenome (Ezzat et al., 2004). Die Prävalenz für klinisch manifeste Hypophysentumore liegt in der Normalbevölkerung bei ca. 1:1000, ist also etwa dreimal höher als bisher angenommen (Ambrosi, Faglia, 1991, Clayton, 1999, Daly et al., 2007, Fernandez et al., 2010). Hypophysenadenome sind nicht in der Lage zu metastasieren, können aber lokal invasiv wachsen. Metastasierende, maligne Hypophysenkarzinome sind extrem selten (0,1-0,2%) (Asa, Ezzat, 2009).

Die Adenome entstehen größtenteils sporadisch und sind monoklonalen Ursprungs, das heißt sie entwickeln sich aus einer transformierten Zelle (Alexander et al., 1990, Gicquel et al., 1992, Herman et al., 2009, Schulte et al., 1991). Bei der Tumorphathogenese spielen wohl zwei Mechanismen zusammen: Exzessive hormonelle Stimulation oder fehlende Inhibition erhöhen die Proliferationsrate der Zellen und somit die Wahrscheinlichkeit von Mutationen. Genauso kann nach spontaner, intrinsischer Mutation die Proliferation dieser transformierten Zelle durch

Stimulation oder fehlender Inhibition gesteigert werden (Ezzat, Asa, 2006, Renner et al., 2001). Typische Mutationen, die sich in anderen Neoplasien häufig finden, wie die des Tumorsuppressorgens p53 oder des RB-Proteins, treten in sporadischen Hypophysenadenomen sehr selten auf (Asa, Ezzat, 2002, Boggild et al., 1994, Herman et al., 1993).

Eine Ausnahme bildet eine Mutation im GNAS1 Gen, ein Onkogen, das eine konstitutive Aktivierung des cAMP-Signalweges induziert. Sie findet sich in 30-40% der sporadisch auftretenden somatotropen Hypophysenadenome, konnte aber auch in ACTH-produzierenden Tumoren und Prolaktinomen nachgewiesen werden (Dworakowska, Grossman, 2012, Lania et al., 2003, Riminucci et al., 2002, Spada et al., 1990). Etwa 5% der Hypophysentumoren sind mit familiären Erkrankungen wie MEN-1 (Multiple endokrine Neoplasie Typ1), Carney-Complex (CNC) oder dem McCune-Albright Syndrom (MAS) assoziiert (Lemos, Thakker, 2008, Stratakis et al., 2001, Vandeva et al., 2010).

Die auto-/parakrine Regulation von Hypophysenzellen durch lokal produzierte Faktoren wurde bereits beschrieben. In Adenomen wurde eine veränderte Expression dieser Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie deren Rezeptoren beobachtet. Es ist anzunehmen, dass dieser Prozess die Pathophysiologie von Adenomen und die Tumorprogression beeinflusst (Asa, Ezzat, 1998, 2002, Melmed, 2003).

Klinisch manifest können die Adenome auf drei verschiedene Weisen werden: Durch eine hypophysäre Hormoninsuffizienz, einen Hormonexzess oder durch Schäden, die durch den Masseneffekt des Tumors ausgelöst werden, wie z.B. Kopfschmerzen oder Gesichtsfeldausfälle durch Kompression des Chiasma opticum (Asa, Ezzat, 2009). Prinzipiell kann man Mikro- (< 10mm Durchmesser) von Makroadenomen (> 10mm Durchmesser) unterscheiden. Weiterhin gibt es viele verschiedene Arten der Klassifikation: funktionell, anatomisch/radiologisch, immunhistochemisch, ultrastrukturell und klinisch/pathologisch. Klinisch relevant ist vor allem die Differenzierung von hormonaktiven und -inaktiven (Asa, 1998, Asa, Ezzat, 2009). Zur ersten Gruppe gehören somatotrope, laktotrope, thyrotrope, kortikotrope und gonadotrope Hypophysenadenome. Somatotrope, also GH-produzierende Tumore stellen 10-15% der Adenome und manifestieren sich im Erwachsenenalter durch eine Akromegalie. Tritt die Erkrankung vor Schluss der Epiphysenfugen auf, liegt ein Gigantismus vor. Prolaktinome sind mit 30% die größte Gruppe. Frauen sind dreimal häufiger betroffen als Männer. Häufig werden sie erst als Inzidentalom bei Autopsien entdeckt. ACTH-produzierende Adenome induzieren durch die erhöhte Glukokortikoidsekretion ein Cushing-Syndrom. Mit weniger als 1% aller Hypophysentumore sind thyrotrope Tumore sehr selten und können sich durch eine hyper-, hypo- oder euthyreote Stoffwechsellage manifestieren. Sie sind größtenteils Makroadenome,

so dass Masseneffekte wie Gesichtsfeldausfälle häufig sind. Gonadotrope Adenome sind meist klinisch stumm, bzw. werden nicht erkannt, da sie paradoxer Weise einen Hypogonadismus auslösen (Asa, Ezzat, 2009, Prezant, Melmed, 2002).

Etwa ein Drittel der pituitären Tumore sind hormoninaktiv. Sie werden klinisch nur durch Masseneffekte auffällig. Durch Verdrängung und Schädigung von normalem Hypophysengewebe können sie zur Hypophyseninsuffizienz führen. Eine mögliche Kompression des Hypophysenstiels kann außerdem eine Hyperprolaktinämie induzieren, da dadurch der inhibitorische Einfluss von Dopamin abnimmt bzw. wegfällt (Asa, Ezzat, 2009, Cheunschon et al., 2011).

Der Goldstandard der Hypophysenadenombehandlung ist die operative Entfernung des Tumors, zu 99% über einen transsphenoidalen Zugang (Chanson, Salenave, 2004, Renner et al., 2001). Bei Inoperabilität oder unzureichendem Ergebnis kann zusätzlich eine medikamentöse Therapie erfolgen. Bei Akromegalie-Patienten zum Beispiel können Somatostatin-Analoga oder Wachstumshormon-Antagonisten die IGF-1-Konzentration senken (Melmed et al., 2009, Sabino et al., 2010). Eine Sonderstellung nimmt das Prolaktinom ein. Hier ist eine medikamentöse First-Line-Therapie mit Dopamin-Agonisten möglich. Diese führen zur Schrumpfung des Adenoms durch Abnahme des Zellvolumens (Dworakowska, Grossman, 2011, Asa, Ezzat, 2009). Eine Strahlentherapie zeigt lange Latenzzeiten und wird nur angewandt, falls Chirurgie und Medikamente nicht ausreichen. Radiochirurgie wird häufig postoperativ eingesetzt, falls eine komplette Resektion nicht möglich war oder trotz Resektion noch erhöhte Hormonspiegel vorliegen (Petersenn et al., 2006).

1.2 Interleukin-8

1.2.1 Allgemeines und Struktur

Interleukin-8, oder CXCL8, ist ein proinflammatorisches Protein aus der Gruppe der Chemokine. Chemokine sind eine Gruppe von mehr als 50 strukturell ähnlichen, 8 bis 10 kDa schweren Proteinen, die hauptsächlich an der Immunmodulation beteiligt sind. Sezerniert werden diese Proteine vor allem von Immunzellen, aber auch von vielen anderen Zelltypen wie Epithelzellen, Fibroblasten und, wie später genauer erläutert, von neoplastischen Zellen.

Anhand ihrer beiden N-terminalen Cysteinreste werden Chemokine in vier Hauptgruppen unterteilt: Die CXC-, CC-, C- und CX2C-Gruppe, wobei die CC-Gruppe die Größte darstellt. Außer IL-8 gehören unter anderen das Growth-regulated Oncogene (GRO) – α , β und γ , Neutrophil-activating Protein-2 (NAP-2) und Epithelial-cell-derived Neutrophil-activating

Protein (ENA78) zu den CXC-Chemokinen (Baggiolini et al., 1994, 1997, Brat et al., 2005, Leonard, Yoshimura, 1990).

Die Gruppe kann weiterhin in ELR (Glu-Leu-Arg) positive und negative CXC-Chemokine unterteilt werden. IL-8 gehört zu den ELR+. Diese Subklassifikation basiert auf der An- oder Abwesenheit der Tripeptid-Sequenz am N-Terminus vor dem ersten Cysteinrest. Die Untergruppen unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität (Strieter et al., 1995).

Interleukin-8 wurde als eines der ersten Chemokine entdeckt und zunächst aufgrund seiner chemotaktischen Eigenschaften Neutrophil-activating Peptide-1 genannt (Baggiolini et al., 1989). Das Gen für IL-8 befindet sich auf Chromosom 4 und kodiert ein 99-Aminosäure langes Vorläufer-Protein, das durch posttranslationale Modifikation in mehrere aktive Isoformen überführt wird (Hebert, Baker, 1993). Die von Monozyten und Makrophagen sezernierte Hauptform ist schließlich 72 Aminosäuren lang, die von Nicht-Immunzellen gebildete 77 Aminosäuren. IL-8 kann als Monomer oder Dimer vorliegen, wobei die monomere Form als die biologisch aktive angesehen wird. Das basische Protein beinhaltet vier Cysteine, die zwei Disulfidbrücken bilden (Brat et al., 2005, Horcher et al., 1998, Rajarathnam et al., 1994).

1.2.2 Physiologische Aufgaben von Interleukin-8

Unter physiologischen Bedingungen spielt IL-8 bei der Immunmodulation eine entscheidende Rolle. Aktivierte Monozyten und Makrophagen setzen IL-8 in hohen Mengen bei inflammatorischen Reaktionen, Infektionen oder Autoimmunerkrankungen frei. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass eine Vielzahl von Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen oder Keratinozyten in der Lage sind, CXCL8 zu sezernieren und die entsprechenden Rezeptoren zu exprimieren.

IL-8 entfaltet drei Hauptwirkungen auf Leukozyten. Es initiiert die Rekrutierung der Zellen zum Infektionsherd, die Exozytose der in den Zellen gespeicherten Sekretgranula und einen sogenannten oxidativen Burst, die Synthese von Wasserstoffperoxid. (Baggiolini, Clark-Lewis, 1992, Takami et al., 2001, Wymann et al., 1990).

Die angiogenetische Potenz von IL-8 wurde 1992 zum ersten Mal von Koch et al. untersucht (Koch et al., 1992). Sie zeigten, dass human rekombinantes IL-8 als Mitglied der ELR-positiven CXC-Chemokine die Proliferation und Chemotaxis von HUVEC-Zellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) induziert (Xie K, 2001). Das ELR-Motif spielt eine entscheidende Rolle in der Rezeptor-Liganden-Interaktion und ist für die angiogenetische Wirkung obligat (Addison et al., 2000, Clark-Lewis et al., 1993). So weisen alle CXC Chemokine mit dieser Aminosäure-Sequenz eine angiogenetische Potenz auf (Moore et al., 1998, Strieter et al., 1995). Interleukin-

8 inhibiert außerdem die Apoptose von Endothelzellen und wirkt so zusätzlich pro-angiogenetisch (Li et al., 2003).

Um die eben beschriebenen Effekte auf Endothelzellen auslösen zu können, müssen diese entsprechende Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Auf HMEC-Zellen (Human Microvascular Endothelial Cells) konnten die IL-8 Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 nachgewiesen werden (Salcedo et al., 2000), wobei CXCR2 aufgrund seiner Interaktion mit allen ELR-positiven Chemokinen bezüglich dieser Wirkung wichtiger erscheint (Addison et al., 2000).

1.2.3 Rezeptoren und Signalwege

Die eben beschriebenen Effekte vermittelt IL-8 wie alle anderen Chemokine über G-Proteine gekoppelte Rezeptoren. Bisher sind mindestens 18 Chemokin-Rezeptoren bekannt, wobei die meisten Chemokine an mehrere Rezeptoren binden und umgekehrt die meisten Rezeptoren von mehreren Chemokinen aktiviert werden können. (Balkwill, 2004, Brat D et al., 2005)

Alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind über sieben hydrophobe Helices in der Zellmembran verankert und besitzen drei extra- sowie drei intrazelluläre Loops. Der N-Terminus befindet sich extrazellulär, das C-terminale Ende auf der cytosolischen Seite (Murphy et al., 2000, Rossi, Zlotnik, 2000, Singh S et al., 2010). Interleukin-8 interagiert mit zwei von den sieben existierenden CXC-Rezeptoren: CXCR1, auch IL-8RA genannt und CXCR2 oder IL-8RB. Die Affinität zu den beiden Rezeptoren, die strukturell eine starke Homologie vorweisen, ist gleich groß (Brat et al., 2005, Holmes et al., 1991). CXCR1 interagiert mit IL-8 und GCP-2 (Granulocyte chemotactic protein 2) (Wolf et al., 1998). CXCR2 hingegen bindet neben IL-8 alle weiteren ELR-positiven CXC-Chemokine wie GRO- α , - β , - γ , neutrophil-activating protein-2 und GCP-2 (Ahuja, Murphy, 1996, Brat et al., 2005). Ein weiterer Rezeptor für CXC-Chemokine wie IL-8, aber auch für CC-Chemokine ist DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines). Er findet sich auf Erythrozyten, Epithel- sowie Endothelzellen. Funktion und Signalweg sind bisher jedoch noch ungeklärt (Brat D et al., 2005, Horuk et al., 1993, Tournamille et al., 2010).

Die G-Proteine, an die die Rezeptoren gekoppelt sind, sind heterotrimer, d.h. aus drei Untereinheiten aufgebaut ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$). Diese Untereinheiten aktivieren weitere Effektormoleküle und lösen somit Signalkaskaden in der Zielzelle aus. Durch die ausgelösten Kaskaden vermittelt IL-8 Veränderungen in der Zelle auf den Ebenen der Translation, Transkription und Organisation des Zytoskeletts und beeinflusst somit die Zellproliferation,

das Überleben der Zellen, den Metabolismus und die Angiogenese (Thelen, 2002, Waugh, Wilson, 2008).

Eines der wichtigsten Effektormoleküle ist die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3-K), die wiederum die Akt-Kinase/PKB phosphoryliert und damit aktiviert. Dieser Weg spielt bei der Initiierung der Leukozytenmigration eine entscheidende Rolle (Knall et al., 1997). Des Weiteren wird die Phospholipase C aktiviert, die einen cytosolischen Calciumanstieg und die Aktivierung der PKC bewirkt (Richardson et al., 1998). Dadurch wird die sekretorische Funktion und der respiratorische Burst der Zellen induziert (Nasser et al., 2005) Auch MAPK-Signalkaskaden werden über CXCL8 reguliert, darunter die ERK1/2-Gruppe (Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2) (Knall et al., 1996). MAP-Kinasen sind eine Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen, die letztlich Transkriptionsfaktoren regulieren, die wiederum die Zellproliferation und das Zellüberleben beeinflussen. In Neutrophilen wurde gezeigt, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen an die PI3-Kinase gekoppelt ist, andere Studien deuten jedoch auf eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch IL-8 hin (Luppi et al., 2007, Venkatakrishnan et al., 2000, Waugh, Wilson, 2008). Es gibt noch weitere Tyrosin-Kinasen, die am Signaltransduktionsweg von IL-8 beteiligt sind, wie z.B. die FAK oder Src-Kinasen (Waugh, Wilson, 2008). Auf diese wird hier nicht genauer eingegangen.

Zusätzlich werden durch die IL-8-Rezeptoren Mitglieder der RhoGTPase-Familie aktiviert, eine Gruppe kleiner, membranboundener G-Proteine. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und beeinflussen somit die Zellmigration (Schraufstatter et al., 2001).

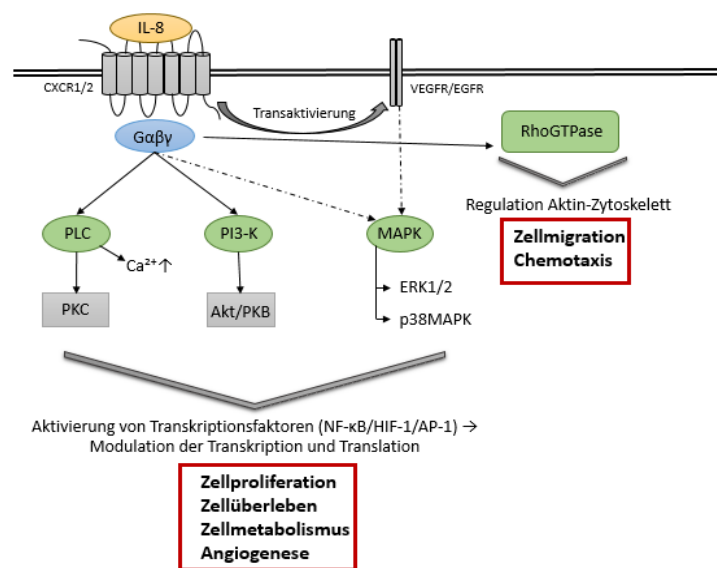


Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der IL-8 Rezeptor Signalkaskade. Das schematische Diagramm zeigt die wichtigsten Signalkaskaden, die nach einer CXCR1 und/oder CXCR2 Stimulation aktiviert werden. Über rezeptorgekoppelte, heterotrimere G-Proteine werden die wichtigsten Effektormoleküle PI3-K, PLC, MAPK-Kasakaden sowie Mitglieder der RhoGTPase-Familie aktiviert.

Wie bereits erwähnt sind häufige Ziele solcher Signalkaskaden bestimmte Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität auf diese Weise reguliert wird. Im Fall des IL-8-Signalweges seien hier NF- κ B, HIF-1, sowie das Activator Protein-1 (AP-1) und E2F zu nennen. Durch eine Inhibition oder Induktion der Transkriptionsfaktoren wird die Genexpression und Protein-Transkription beeinflusst (Waugh, Wilson, 2008).

1.2.4 Regulation der IL-8 Expression

1.2.4.1 Stimulation der IL-8 Expression

Die Expression von Interleukin-8 ist enorm variabel. Im gesunden Gewebe ist IL-8 kaum nachweisbar, kann allerdings massiv stimuliert werden. Viele Tumorzellen hingegen exprimieren IL-8 konstitutiv (Xie, 2001). Durch proinflammatorische Zytokine wie TNF oder IL-1, bakterielle Produkte wie LPS oder Stressfaktoren wie Hypoxie kann die IL-8 Konzentration um das 10- bis 100-fache ihres Ausgangswertes steigen (Brasier et al., 1998, Hoffmann E et al., 2002, Sonoda et al., 1997).

Lipopolysaccharid (LPS)/ Endotoxin ist ein Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und wird während der Zellteilung oder dem Zelltod freigesetzt. Es aktiviert Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen und gilt als eines der potentesten Stimulatoren des Immunsystems. LPS verstärkt die phagozytotischen Eigenschaften dieser Abwehrzellen, zudem werden vermehrt proinflammatorische Zytokine freigesetzt (Hoffmann et al., 2002, Ricciardolo et al., 2012, Zangh et al., 1999). Diese Effekte werden über komplexe Signalwege vermittelt, an denen unter anderen der TLR4 (Toll-like-Rezeptor 4) sowie CD4 (Cluster of Differentiation 4) beteiligt sind. Eine entscheidende Rolle für die Zytokinfreisetzung spielt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Dobrovolskaia, Vogel, 2002; Zangh et al., 1999).

Eine Stimulation der IL-8 Produktion geschieht sowohl durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, als auch posttranskriptionell über mRNA-Stabilisation. Am IL-8-Promotor befinden sich Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP). Interessanter Weise sind NF- κ B und AP-1, wie gerade erläutert, wichtige Transkriptionsfaktoren bei der Signaltransduktion von IL-8 selbst (Hoffmann et al., 2002, Waugh, Wilson, 2008).

Für eine IL-8-Genexpression ist die Aktivierung von NF- κ B essentiell, AP-1 und C/EBP wirken dagegen verstärkend und können eine maximale Transkription induzieren (Hoffmann et al.,

2002, Kunsch et al., 1994, Mukaida et al., 1994, Wu et al., 1997). NF- κ B liegt als Dimer vor, gebildet aus einer Familie von fünf Untereinheiten (Vu et al., 2013). In unstimulierten Zellen wird NF- κ B durch inhibitorische Proteine (i- κ B) im Cytosol gehalten und somit deaktiviert. Eine Phosphorylierung dieser Proteine bewirkt ihren Abbau im Proteasom durch Ubiquitinylierung, NF κ B wandert in den Zellkern und ist als Transkriptionsfaktor aktiv (Karin, Ben-Neriah, 2000).

AP-1 befindet sich als inaktive Form konstitutiv im Zellkern und wird über MAP-Kinasen aktiviert. Drei MAP-Kinase-Wege spielen bei der IL-8-Genexpression eine Rolle: der ERK-, der JUN-N-terminal protein kinase (JNK-) und der p38 MAP-Kinase-Weg (Davis, 2000, Shaulian, Karin, 2001, Whitmarsch, Davis, 1996). Auf posttranskriptioneller Ebene stabilisiert der p38-MAP-Kinase-Weg die IL-8-mRNA und erhöht somit die CXCL8-Konzentration (Hoffmann E et al., 2002, Wang et al., 2008).

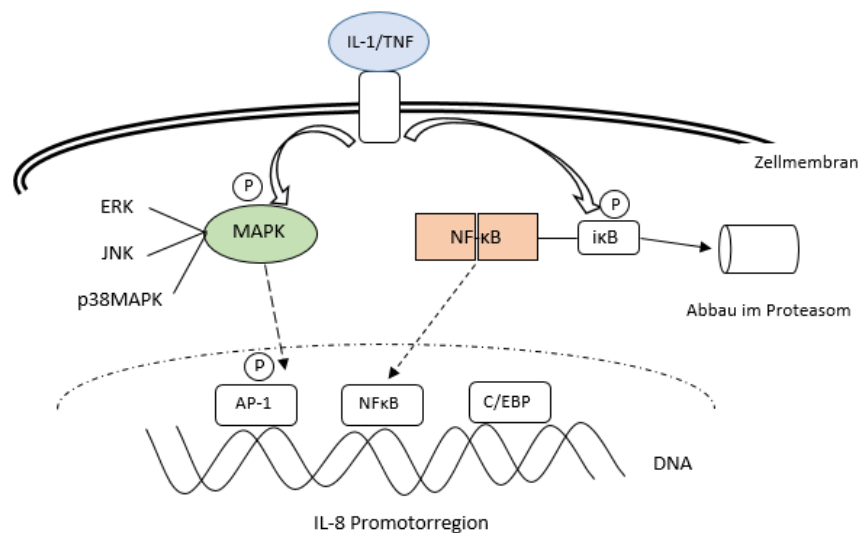


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung der wichtigsten Regulationsmechanismen der IL-8 Expression. Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 sowie C/EBP sind entscheidend für eine IL-8 Expression. Die Regulation findet sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch durch mRNA Stabilisation (über p38MAPK) statt.

Zusammenfassend ist für eine maximale IL-8-Expression die Aktivierung von NF- κ B und mindestens einem MAP-Kinase-Weg nötig (Hoffmann E et al., 2002). TNF und IL-1 gelten als potenteste Stimulatoren (Xie K, 2001).

1.2.4.2 Wirkung von Dexamethason auf die IL-8 Expression

Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid mit immunmodulierender und immunsuppressiver Wirkung. Als Steroid kann es die Zellmembran überwinden, bindet an einen cytosolischen Rezeptor und gelangt dann als Hormon-Rezeptor-Komplex in den Zellkern. Dort bindet es an sogenannte Glukokortikoid-responsive-elements (CREs) der DNA und kann so die Transkription bestimmter Zielgene stimulieren oder inhibieren. Auf diese Weise beeinflussen Glukokortikoide die Expression von vielen Zytokinen (Kwon et al., 1994). Die Interleukine-2, -3, -6, Interferon- γ oder TNF- α zum Beispiel werden supprimiert, die Rezeptordichte für Interleukin-1 und -6 steigt hingegen (Mukaida N et al., 1992). Eine Hemmung der Interleukin-8 Genexpression und Produktion durch Dexamethason konnte unter anderem in Fibroblasten, Neutrophilen, Monozyten (Kwon et al., 1994), Epithelzellen (Dauletbaev et al., 2011), Glioblastomzellen oder Lungen-Karzinomzellen (Chen et al., 2003) nachgewiesen werden.

1.2.5 Interleukin-8 in Tumoren

Neben der physiologischen, proinflammatorischen Wirkung fungiert Interleukin 8 auch als pro-oncogenetischer Faktor und beeinflusst Tumorwachstum und -Überleben, Angiogenese, Tumorzell-Motion und somit Metastasierung sowie Leukozyteninfiltration. Es ist bekannt, dass viele Tumortypen IL-8 produzieren. Eine konstitutive Expression findet sich zum Beispiel in Mamma-, Colon-, Magen- oder Pancreaskarzinomzellen (Le et al., 2000, Singh et al., 1994, Shi et al., 1999, Yuan et al., 2005). Durch Stimuli wie Hypoxie, NO oder Azidose kann diese Basalsekretion zusätzlich gesteigert werden (Andrew et al., 1995, Kunz et al., 1999, Xie et al., 2001). Auch die Expression der IL-8-Rezeptoren wurde in mehreren Tumorgeweben nachgewiesen (Brew et al., 2000, Norgauer et al., 1996, Yuan et al., 2005). CXCL8 wirkt also auf auto- und parakrine Weise und beeinflusst stark das Mikromilieu des Tumors.

An humanen Melanomzellen wurde zum ersten Mal der mitogene Effekt von endogen produzierten IL-8 nachgewiesen (Schadendorf et al., 1993). Diese Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor konnte mittlerweile für viele Tumortypen bestätigt werden (Brew et al., 2000, Galffy et al., 1999, Norgauer et al., 1996, Singh et al., 1994, Yuan A et al., 2005).

IL-8 hat außerdem einen pro-angiogenetischen Einfluss auf das Tumorgewebe. Wie bereits erwähnt besitzen Endothelzellen einen Rezeptor für IL-8 (Salcedo et al., 2000). Über diesen induziert das Chemokin die Rekrutierung und Proliferation der Endothelzellen und sorgt für

eine Neovaskularisation des Gewebes. Dadurch werden Tumorwachstum und – überleben zusätzlich unterstützt (Lattanzio et al., 2013, Xie et al., 2001, Yoshida et al., 1997).

Die chemotaktische Wirkung von IL-8 auf Leukozyten unter physiologischen Bedingungen wurde bereits beschrieben. Eine hohe IL-8-Konzentration im Tumormilieu führt ebenso zu einer Leukozyteninfiltration. Diese produzieren selbst Zytokine wie TNF- α oder Wachstumsfaktoren und verändern so das Mikroumfeld des Tumors. Dadurch werden die Effekte von IL-8 auf indirekte Weise potenziert (Xie et al., 2001, Yuan et al., 2000, 2005).

In verschiedenen Tumorzelllinien wurde gezeigt, dass IL-8 auch die Motilität der Tumorzellen selbst beeinflusst und somit die Invasivität und das Metastasierungspotential des Tumors verstärkt (Till et al., 1999, So et al., 2004, Wang et al., 1990). Auch Stromazellen, das heißt Zellen, die die Tumorzellen „einbetten“, wie Fibroblasten, Endothel- und Immunzellen, sezernieren neben anderen Wachstumsfaktoren IL-8. Sie wirken dadurch entscheidend auf das Tumormilieu ein und spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression (Chen Y et al., 2012, Tuxhorn et al., 2001, Yuan et al., 2005).

Eine Korrelation zwischen Interleukin-8 und den eben beschriebenen Effekten konnte allerdings nicht in allen bisher untersuchten Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Auch die Wirkung von IL-8 kann von Tumortyp zu Tumortyp unterschiedlich sein (Yuan A et al., 2005). Der Einfluss von IL-8 auf die Pathogenese, aber auch auf die Aggressivität und Invasivität von Tumoren legt nahe, dass IL-8 zum einen als wichtiger prognostischer Faktor oder Biomarker klinisch genutzt werden kann. Zum anderen könnten IL-8 selbst, die Rezeptoren oder Elemente der Signalkaskaden als Ziele zukünftiger Therapien dienen. Daher ist es wichtig, die Expression und Rolle von IL-8 in verschiedenen Tumortypen, wie hier in Hypophysenadenomen zu untersuchen.

1.2.6 Murine Homologa von Interleukin-8

In Mäusen findet sich kein direktes Homologon zu IL-8. Die Chemokine KC/CXCL1, MIP-2/CXCL2 und LIX/CXCL5, die strukturell eng verwandt sind und zur gleichen Gruppe der Chemokine gehören, werden allerdings als funktionelle Homologa angesehen. Sie finden sich alle auf gleichen Genclustern, für den Menschen das Gen 4q13.3, für Mäuse 5qE2. Diese Cluster codieren jeweils für eng verwandte Chemokine (Hol et al., 2010). Die Gensequenz für den murinen KC-Rezeptor korreliert stark mit denen der humanen IL-8-Rezeptoren. Für CXCR2 wurde eine Korrelation von 71,8%, für CXCR1 68,9% nachgewiesen (Bozic et al., 1994, Cerretti et al., 1993). Trotz dieser Homologie ist IL-8 nur ein relativ schwacher Agonist für den KC-Rezeptor. KC bindet ca. 10 bis 30-mal stärker als IL-8. Die EC50 (mittlere effektive

Konzentration) von IL-8 beträgt ungefähr 300nM (Bozic CR et al., 1994), dies entspricht bei einer atomaren Masseneinheit von 8452 Da für das in dieser Arbeit verwendete rekombinante IL-8 einer Konzentration von 2535,6 ng/ml.

1.3 Ziel der Arbeit

Wie eben beschrieben zeigen verschiedene Tumortypen im Vergleich zu gesundem Gewebe eine veränderte Chemokin-Sekretion. In vielen konnte eine erhöhte Interleukin-8 Konzentration nachgewiesen werden (Yuan A et al., 2005). CXCL8 besitzt pro-oncogenetische Eigenschaften und beeinflusst so die Pathogenese, Aggressivität und Invasivität von Tumoren (Xie K, 2001; Yuan A et al., 2005). Durch diese Attribute kann das Chemokin als Biomarker, Verlaufsparemeter oder potentielles Therapie-Ziel diskutiert werden. Bisher gibt es wenige Untersuchungen, ob und in welchen Mengen IL-8 auch von Hypophysenadenomzellen sezerniert wird. Die Ergebnisse sind dabei zum Teil widersprüchlich: Einige Autoren konnten mittels RT-PCR die IL-8 mRNA Synthese bzw. durch immunhistochemische Methoden die IL-8 Expression in Hypophysentumoren nachweisen (Green et al., 1996; Magagna-Poveda et al., 2013, Vindelov et al., 2011). Anhand von In-Situ-Hybridisation konnte von Suliman et al. (1999) allerdings nur in 12% (3 von 25) der untersuchten Tumoren eine IL-8 Produktion gemessen werden. Auch ist unklar, welche Funktion es in Bezug auf die Tumorentwicklung und das –Verhalten einnimmt.

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression von IL-8 in Hormon-inaktiven und somatotropen Hypophysenadenomen mittels ELISA bestimmt werden. Außerdem soll untersucht werden, ob die IL-8 Sekretion durch LPS stimulierbar und durch Dexamethason hemmbar ist. Funktionelle Untersuchungen an einer Mauszellkultur (AtT20-Zelllinie) sollen Aufschlüsse bezüglich der Wirkung von IL-8 auf Zellproliferation und Hormonsekretion geben. Die Zelllinie dient dabei als Modell für einen kortikotropen Hypophysentumor.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1 Verwendete Geräte und Materialien

Brutschrank Cytoperm 8080	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner Fireboy plus Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Eismaschine ZBE-150 Ziegra	Isernhagen, Deutschland
ELISA-Lesegerät Dynatech MR 5000	Dynatech, Denkendorf, Deutschland
Gefrierschrank Öko Arctic AEG	Nürnberg, Deutschland
Gefrierschrank HFU-686 Herafreeze Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Gefriertruhe HFC-586 Herafreeze Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Kühl-Gefrierkombination Liebherr	Biberach an der Riss, Deutschland
Kühlzentrifuge Sebatech Varifuge 3.2 RS	Heraeus, Osterode, Deutschland
Mikroskop Axiskop 2	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop IMT-2 Olympus	Hamburg, Deutschland
mit UVLicht von Olympus	100W High Pressure Mercury Burner
Multipipetten Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer Paul Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipette Pipetus Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Pipetten Reference, variable Volumina Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage 1601 MP8	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttelgerät Duomax 1030 Heidolph	Schwabach, Deutschland
Sterile Arbeitsbank Laminar Flow Typ UVF 6.18 S	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland
Szintillationszähler LS 6000 IC Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Thermoblock Techne DriBlock DB2A Bibby Scientific	Staffordshire, UK
Thermocycler T3 Biometra	Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Gerät Genie 2™ Bender & Hobein	Zürich, Schweiz
Wasserbad Köttermann Labortechnik	Uetze-Hänigsen, Deutschland
Zellkulturflaschen Nunc	Dänemark
Zellkulturmaterial Nunc	Dänemark
Zellkulturplatten Falcon	Heidelberg, Deutschland
Zellschaber Renner	Dennstadt, Deutschland

Zentrifuge Biofuge Primo Thermo Scientific	Waltham, MA ,USA
Zentrifuge Centrifuge 5415R Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2 *Verwendete Chemikalien.*

Acridinorange Sigma-Aldrich	St. Louis. MO, USA
Ampicillin Roche	Mannheim, Deutschland
Ampuwa Wasser Frisenius	Deutschland
Beta-Mercaptoethanol MERCK	Darmstadt, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA) Invitrogen Corp	Paisley, UK
Chloroform Sigma	St. Louis. MO, USA
Collagenase Worthington Biochem Corp.	Lakewood, NJ, USA
Dexamethason Sigma	St. Louis. MO, USA
D-Glukose MERCK	Darmstadt, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO) Sigma	St. Louis. MO, USA
DNase II Sigma	St. Louis. MO, USA
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) Gibco	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure MERCK	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70% Medizet	München, Deutschland
Ethanol 96% Medizet	München, Deutschland
Ethanol 100% Medizet	München, Deutschland
Ethidiumbromid Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethylenediaminetetracetic Acid (EDTA) MERCK	Darmstadt, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum) Gibco Europe	Karlsruhe, Deutschland
Forskolin Sigma	St. Louis. MO, USA
³ H-Thymidin Perkin-Elmer	Boston, MA, USA
HCL MERCK	Darmstadt, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) Sigma-Aldrich	St. Louis. MO, USA
Human CKCL8/IL-8 DuoSet ELISA Development System R&D System	Minneapolis, MN, USA
Hyaluronidase Sigma	St. Louis. MO, USA
Interleukin-8, human rekombinant Biomol	Hamburg, Deutschland
Isoamylalkohol MERCK	Darmstadt, Deutschland

Isopropanol Sigma	St. Louis. MO, USA
KCL MERCK	Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Lipopolysaccharide von E.coli, Sigma	St. Louis. MO, USA
MEM-Vitamine Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Mouse CXCL1/KC R&D System	Minneapolis, MN, USA
NaCl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ MERCK	Darmstadt, Deutschland
NaOH Roth	Karlsruhe, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Partricin Biochrom AG	Berlin, Deutschland
PBS Gibco Europe	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin+Streptomycin Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Phenol Roth	Karlsruhe, Deutschland
Reagent Diluent (1% BSA in PBS, pH=7,2 - 7,4,0,2µm filtriert) R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Stop Solution (2N H ₂ SO ₄) R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Substrate Solution (1:1 Mixture of Color Reagent A (H ₂ O ₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)) R&D Systems	St. Louis. MO, USA
Trichloressigsäure Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton® X-100 Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA) Sigma-Aldrich	St. Louis. MO, USA
Trypsin Inhibitor Sigma	St. Louis. MO, USA
Tween 20 Sigma	St. Louis. MO, USA
Ultima Gold Scintillation Solution Packard Bioscience	Gromingen, Niederlande

2.2 Methodik

2.2.1 Primärzellkultur humaner Hypophysenadenome

Die Hypophysentumorpräparate wurden aus den Kliniken (Klinikum der Universität München, Standort Großhadern; Klinikum rechts der Isar der TU München; Universitätsklinikum Erlangen) postoperativ zugesandt, so dass sie maximal 48h nach Entnahme im Max-Planck-Institut eintrafen, um weiter verarbeitet zu werden.

Generell ist beim Arbeiten mit Primärzellkulturen aus Hypophysenadenomen zu erwähnen, dass die Qualität und Menge des Tumormaterials sehr unterschiedlich ist. Daher ist die

gewonnene Menge an Tumorzellen für weitere Versuche begrenzt und nicht alle Experimente konnten für alle Tumore nach den gleichen Schemata durchgeführt werden. Zudem kommen, wie bereits beschrieben, manche Tumortypen wesentlich seltener vor als andere. So konnte ich während meiner Zeit am Max-Planck-Institut deutlich weniger somatotrope Adenome als Hormon-inaktive Tumore (NFPAs, Non-functioning pituitary adenomas) bearbeiten.

Eine Übersicht über die verwendeten Tumore, Tumorart sowie Alter und Geschlecht der Patienten gibt folgende Tabelle.

Tabelle 3 Übersicht über die untersuchten Hypophysenadenome.

A: Übersicht über die Hormon-inaktiven Hypophysenadenome; N: NFPA.

Tumor-nummer	Patientenalter in Jahren	Geschlecht (m/w)
N1	55	M
N2	68	W
N3	38	M
N4	59	W
N5	69	M
N6	50	M
N7	54	M
N8	60	M
N9	45	M
N10	88	M
N11	52	M
N12	76	M

B: Übersicht über die somatotropen Hypophysenadenome; S Somatotroper Tumor

Tumor-nummer	Patientenalter in Jahren	Geschlecht (m/w)
S1	63	W
S2	76	W
S3	46	M
S4	44	M

Die Tumorpräparate wurden postoperativ in Tumormedium aufbewahrt und gekühlt ins Institut transportiert. Vor Beginn der Präparation wurden die Patientendaten dokumentiert und dem Tumor eine fortlaufende Nummer zugeteilt.

Zunächst wurde das Tumorgewebe gewaschen. Dies geschah durch mehrmaliges Spülen mit HDB+-Puffer, bis die Pufferlösung klar, also frei von Blut war. In einer mit Silikon beschichteten Petrischale wurden die Tumorstücke begutachtet, eventuell mit einem Skalpell zerkleinert und geeignete Stücke für die verschiedenen Versuchsformen ausgewählt. Teile für

Immunhistochemie oder RNA/DNA- Extraktion wurden auf Trockeneis gelegt und schock gefroren, anschließend bei -80 Grad aufbewahrt. Das übrige Gewebe diente zur Herstellung einer Zellkultur. Dazu wurden die Stücke in einer Kollagenase-Lösung inkubiert, um die Zellverbände zu lösen. Nach mindestens 60 Minuten Inkubationszeit entstand eine Einzelzellsuspension. Dieser Vorgang wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren unterstützt und kontrolliert. Die Suspension wurde anschließend zweimal 4 Minuten bei 1200U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit Medium resuspendiert. Beim zweiten Mal wurde ein spezielles Medium ohne Valin verwendet, was dafür sorgt, dass sich die Tumorzellen, nicht aber Fibroblasten oder andere eventuell enthaltene Zellen teilen können. Um die Zellmenge zu quantifizieren wurde ein Alliquot des Zellgemischs mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Diese besteht aus einer dicken, rechteckigen Grundplatte aus Spezialglas und einem dünnen, quadratischen Deckglas. Die Grundplatte besitzt im mittleren Drittel vier Längsspalten, die senkrecht zu den langen Seiten der Platte verlaufen. Beim Auflegen des Deckglases entsteht ein ca. 0,1mm breiter Spalt. In diesen wird die Zellsuspension pipettiert. Unter dem Mikroskop lassen sich auf der Grundplatte 4x4 Quadrate von einer Fläche von je 1mm² erkennen. Nun erfolgt das Auszählen der in den Quadraten befindlichen Zellen. Es werden nur lebende Zellen gezählt. Durch vorherige Färbung mit Acridinorange-Ethidiumbromid-Lösung ist unter UV-Licht eine Unterscheidung zwischen lebenden (grün) und toten (rot) Zellen möglich. Die tatsächliche Zellzahl der Suspension lässt sich schließlich nach folgender Formel berechnen:

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

Die so gewonnenen Zellen wurden in 48-Well-Multiwellplatten überführt und im Brutschrank bei 37 Grad, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Bei Bedarf musste mit PBS-Puffer gewaschen und das Tumormedium gewechselt werden.

2.2.2 Die AtT20-Zelllinie

2.2.2.1 AtT20-Zelllinie als Modell für kortikotrope Hypophysenadenome

Die AtT20-Zelllinie wurde aus einem kortikotropen Hypophysenadenom von Mäusen etabliert. Die Zellen setzen ACTH frei, sind schwach CRH responsiv und dienen daher als Modell für ACTH-produzierende Hypophysentumore in Hinblick auf Wachstumsversuche oder ihr hormonelles Verhalten (Gamby et al., 1996, Orth et al., 1973).

2.2.2.2 Anlegen der Primärkultur

Die AtT20-Zellen werden am Max-Planck-Institut bei -180 Grad in Flüssigstickstoff gelagert. Zum Schutz vor den extremen Temperaturen wurden die Zellen in ein spezielles Freezing-Medium bestehend aus DMSO, FCS und DMEM suspensiert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryo-Röhrchen zunächst in ein 37 Grad warmes Wasserbad gelegt und das Röhrchen mit 70% Ethanol gereinigt. Die Zellen wurden sofort in warmes Medium (37 Grad) übergeben. Anschließend wurde bei 1200 U/min für 4 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt, um das DMSO komplett auszuwaschen. Danach wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit 20ml Medium bei 37 Grad, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Es wurde regelmäßig mit PBS-Puffer gewaschen und das Tumormedium gewechselt. Nach ca. 2 Tagen waren die Zellen adhärent.

2.2.2.3 Splitten der AtT20-Zellen

Wenn die AtT20-Zellen ca. 80% der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche bedeckten, wurden sie gesplittet. Zum Splitten der Zellen erfolgte zunächst ein Waschschriff mit PBS-Puffer. Durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung lösten sich nach kurzer Zeit die adhärennten Zellen vom Grund der Kulturflasche. Leichtes Beklopfen der Flasche beschleunigte diesen Vorgang. Mindestens 7ml Medium wurden aufgegossen, die Reaktion durch den enthaltenen Trypsin-Inhibitor gestoppt, die Zellsuspension vorsichtig abpipettiert und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Es wurde auf 30ml Medium aufgefüllt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1200U/min wurde der Überstand verworfen und erneut 30ml Medium zugeführt. Dieser Schritt wurde wiederholt, am Ende aber nur noch 10ml Medium zugegeben. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und im gewünschten Teilungsverhältniss rekultiviert, bzw. für Stimulations-/Inhibitionsexperimente in geeigneter Menge in Multiwell-Platten ausgesät.

2.2.3 Stimulations- und Inhibitionversuche mit Zellkulturen

Für Stimulations- und Inhibitionsversuche wurden die resuspendierten Zellen wie beschrieben gezählt und mit einer Dichte von 100K pro Well auf 48-Well-Platten aufgebracht. Wenn, nach 24 bis 48 Stunden Inkubation, eine Adhäsion der Zellen festgestellt werden konnte, wurden die Zellen vor der Stimulation mit PBS gewaschen, um Zelltrümmer zu entfernen. Nun konnten die Stimulations- und Inhibitionssubstanzen in den zuvor mit Medium hergestellten

Konzentrationen aufgetragen werden. Die Zellen wurden anschließend für 24h inkubiert. Es wurden immer 3-4 Wells mit einer Konzentration stimuliert bzw. inhibiert, um entsprechende Mehrfachwerte für statistische Zwecke zu erlangen. Zudem wurden zum Erhalt eines basalen IL-8-Wertes 3-4 Wells nur mit Medium behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand in 96-Well-Platten übertragen und bis zu den verschiedenen Messungen bei -20 Grad eingefroren.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Interleukin-8 Messungen via ELISA

Als ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) bezeichnet man ein immunologisches Verfahren zum quantitativen Nachweis gelöster Moleküle mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Durch Zugabe eines weiteren, enzymgekoppelten AK (Indikator-AK), der wiederum ein Substrat umsetzen kann, ist es möglich, Konzentrationen photometrisch zu messen.

Für einen Doppel-Sandwich-ELISA benötigt man zunächst Mikrotitrierplatten, die mit dem spezifischen Antikörper (Capture-Antikörper) gegen das gesuchte Antigen beschichtet sind. Zum IL-8-Nachweis benutze ich das human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA Development Kit von R&D Systems. Da die Testplatten noch nicht beschichtet sind, werden sie über Nacht mit einer definierten Menge des Capture-Antikörpers inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wird für eine Stunde ein Block-Puffer zugefügt. Dieser soll unspezifische Bindungen an die Oberfläche der Platten und somit falsch hohe Testergebnisse verhindern. Nun, nach erneutem Waschen, werden die Proben, also die Zellkulturüberstände, und eine Standard-IL-8-Verdünnungsreihe zugegeben. Die Verdünnungsreihe dient später der Ermittlung einer Standardkurve. Während der zweistündigen Inkubationszeit binden die enthaltenen Antigene an die IL-8-spezifischen, fixierten AKs. Der Überstand wird abgekippt und es wird erneut gewaschen. Danach wird der Detektions-AK zupipettiert, ein biotinylierter AK, der ebenfalls gegen humanes IL-8 gerichtet ist. Es folgen wiederum zwei Stunden Inkubation und Waschen. Jetzt fügt man den enzymgekoppelten Indikator-AK, Streptavidin-HRP, zu. Das Streptavidin bindet an Biotin, also den Detektions-AK. HRP steht für Horseradish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase), ein Enzym, das die im nächsten Schritt, nach 20 Minuten Inkubation und einem Waschschriff, zugegebene Substratlösung umsetzen kann. Dadurch wird ein Farbstoff gebildet, der bei 450nm photometrisch gemessen werden kann.

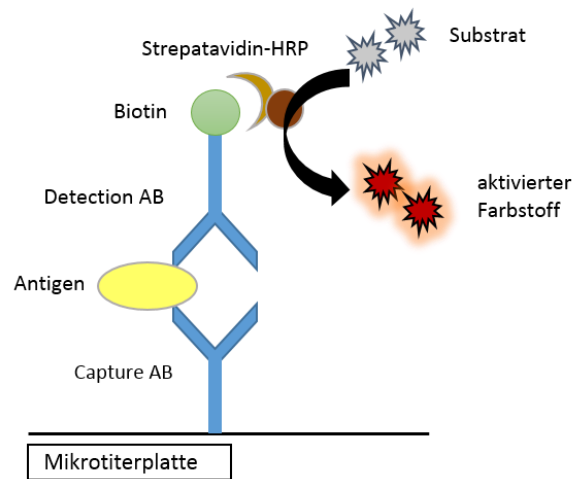


Abbildung 4 Prinzip des Doppel-Sandwich-ELISA. Über den fixierten Capture Antikörper bindet das Antigen (IL-8) an die Mikrotiterplatte. Der biotinylierte Detektions Antikörper bindet den enzymgekoppelten Indikator Antikörper (Streptavidin-HRP), welcher das zugegebene Substrat in einen Farbstoff umsetzt.

Je mehr IL-8 in den Proben enthalten ist, desto mehr Streptavidin-HRP bindet. Somit ist auch die Menge des entstandenen Farbstoffes proportional zur Konzentration. Anhand der Standardkurve können genaue Werte berechnet werden.

2.2.4.2 Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay (RIA) ist eine immunologische Methode zur Quantifizierung kleinster Substanzmengen wie Proteine, Hormone oder Enzyme. Wie bei allen Immunoassays beruht das Prinzip auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das gesuchte Antigen, das Bestandteil der jeweiligen Substanz ist. Durch gleichzeitige Zugabe eines weiteren, radioaktiv markierten Antigens findet ein Konkurrieren mit dem zu bestimmenden Antigen um die Bindungsstellen des Antikörpers statt. Die Affinität der beiden Antigene ist dabei gleich groß. Je mehr Antigene der zu quantifizierenden Substanz also vorhanden sind, desto weniger markierte Antigene binden. Nach Ablauf von 60 Minuten Inkubationszeit sowie einem Waschschrift, bei dem die nicht gebundenen Antigene entfernt werden, kann durch Bestimmung der Radioaktivität mit Hilfe eines Gammazählers die Antigenkonzentration der Probe bestimmt werden. Die Radioaktivität ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration. Zur Umrechnung ist die Erstellung einer Standardkurve nötig. Die Markierung der Antigene findet mit Iod¹²⁵ Isotopen statt. Der hochspezifische Antikörper gegen ACTH von Mäusen wurde mit der Carbodiimid-Methode hergestellt (Stalla et al., 1989).

In dieser Arbeit soll der Einfluss von Interleukin-8 auf die ACTH-Produktion von AtT20-Zellen untersucht werden. Die AtT20-Zellen dienen dabei als Modell für kortikotrope Tumore und

wurden wie oben beschrieben kultiviert, stimuliert und die Zellüberstände bis zur Messung eingefroren.

2.2.5 ³H-Thymidin-Inkorporationsversuch

In der S-Phase (Synthese-Phase) des Zellzyklus findet die Replikation der DNA statt. Durch den Einbau von Nukleotiden wird aus je einem DNA-Einzelstrang ein Doppelstrang und die Zelle kann sich teilen. Je mehr Zellteilungen stattfinden, desto mehr Nukleotide werden folglich eingebaut (Rassow et al., 2008).

Dieses Prinzip wird bei der Thymidin-Inkorporation als quantitative Methode zur Proliferationsbestimmung von Zellen genutzt. Mit radioaktivem Tritium markiertes Thymidin wird der Zellkultur zugegeben und in der Replikation in die DNA eingebaut. Mit dem β -Counter kann anschließend die Aktivität gemessen werden. Je höher diese ist, desto mehr Zellteilungen fanden statt. Absolute Zellzahlen sind dadurch nicht feststellbar, die Werte sind nur relativ.

Die AtT20-Zellen wurden auf 48-well-Platten mit 20000 Zellen/well übertragen und mit verschiedenen IL-8-Konzentrationen (0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000ng/ml), die aus 1%FCS-haltigem Medium hergestellt wurden stimuliert. Außerdem wurden die Zellen in einer zweiten Versuchsreihe mit KC stimuliert. Die Inkubationszeiten betragen 24, 48 und 120 Stunden. Für jede Kondition wurden 4-fach Werte bestimmt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte direkt anschließend.

Zunächst wurde eine Thymidin-Stammlösung hergestellt. Für eine 48-well-Platte wurden 13 μ l der ³H-Thymidin-Lösung ad 650 μ l des verwendeten Mediums zugemischt. 4 Stunden vor Ablauf der jeweiligen Stimulationsphase wurden 25 μ l dieser Lösung pro well zugegeben und die Platten für die restliche Zeit im Brutschrank inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte fanden in Radioaktivlabor statt. Auf Eis wurde der Zellkulturüberstand abpipettiert und anschließend 500 μ l kalte 10%ige Trichloressigsäure (TCA) zugegeben. Danach ruhten die Platten für 60 Minuten auf Eis im Kühlschrank bei 4 Grad. Nach dem Entfernen der TCA wurden 500 μ l Triton-NaOH Lösung (0,1% Triton, 0,5M NaOH) zugefügt und über Nacht bei 4 Grad inkubiert.

Am Folgetag konnte die Messung des eingebauten Tritiums stattfinden. Dazu wurden die Platten zuerst vorsichtig geschüttelt und der Inhalt der Wells mehrmals auf- und abpipettiert. 0,5ml des Überstands wurden in ein Szintillationsgefäß gefüllt und 4,5ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Nach kräftigem Schütteln des Röhrchens wurde die Probe in den Zähl-Rack des β -Counters gestellt und die automatische Messung gestartet.

Vor und nach dem Experiment wurden die Arbeitsbereiche durch einen Wischtest auf radioaktive Kontamination überprüft. Alle im Zusammenhang mit radioaktiven Stoffen benutzten Materialien wurden gekennzeichnet und gesondert entsorgt.

2.3 Statistik

Die Untersuchungen zur IL-8 Sekretion mittels ELISA sowie die funktionellen Untersuchungen zur Proliferation und Hormonsekretion der AtT20-Zellen wurden statistisch ausgewertet. Bei jedem Einzelexperiment wurden mindestens Dreifachwerte ermittelt. Aus diesen wurde ein Mittelwert +/- Standardabweichung berechnet.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des T-Tests berechnet. P kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet, der Signifikanzgrad auf folgende Weise gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion von IL-8 in Hypophysenadenomkulturen

Mit Hilfe des ELISA wurde die Interleukin-8-Produktion von Zellkulturen aus nicht Hormonproduzierenden Hypophysentumoren (NFPA; Non Functioning Pituitary Adenoma) und GH-produzierenden Hypophysentumoren ermittelt. Außerdem sollte der Einfluss von LPS (Lipopolysaccharide) und Dexamethason auf die IL-8-Produktion untersucht werden.

Es zeigte sich, dass beide Tumortypen IL-8 in sehr großen Mengen sezernieren, jedoch starke Konzentrationsunterschiede von Tumor zu Tumor bestehen.

3.1.1 Basale Produktion von IL-8

Um einen Basalwert der IL-8 Produktion zu erhalten, wurden die Zellen der NFPA's für 24 Stunden bei 37 Grad in 10% FCS-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen waren dabei adhärent und befanden sich mit einer Dichte von 100K/well in 48-Well-Platten. Anschließend wurde der Zellüberstand in 96-Well-Platten übertragen und bis zur Messung bei -24 Grad gelagert. Insgesamt wurden Basalwerte von 12 Tumoren ermittelt, von jedem Tumor wurden jeweils 3-4 Messungen gemacht.

Alle untersuchten Zellkulturen produzierten Interleukin-8. Schon nach den ersten Auswertungen stellte sich heraus, dass die Konzentrationen sehr hoch sind und teilweise das Konzentrationsmaximum der ELISA-Messung, das durch die Standardkurve bei 2000pg/ml liegt, überschritten wird. Daher habe ich mich entschieden, die Proben vor der Messung im Verhältnis 1:5 mit Reagent Diluent, das auch in weiteren ELISA-Arbeitsschritten verwendet wird, zu verdünnen. Die Basalsekretion ist von Tumor zu Tumor stark unterschiedlich. Abbildung 5 zeigt die extreme Varianz der basalen IL-8-Konzentrationen.

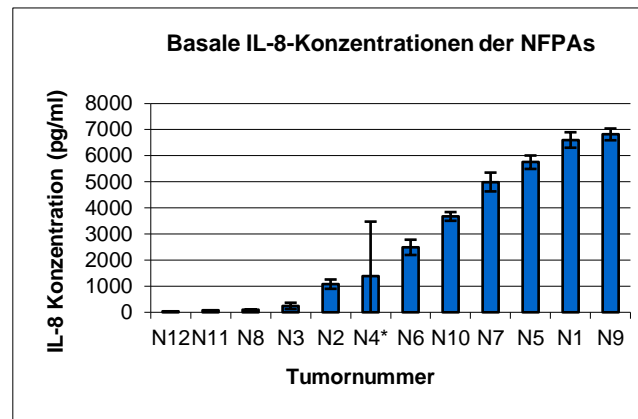


Abbildung 5 Basale IL-8 Konzentrationen der Hormon-inaktiven Hypophysenadenome. Jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt. Die Tumornummern sind nach aufsteigender Konzentration angeordnet. Die basalen Interleukin-8 Sekretionen unterscheiden sich von Tumor zu Tumor stark. * Die Einzelwerte von N4 sind stark schwankend.

Die Messungen der IL-8 Konzentration in Überständen von somatotropen Tumoren fanden unter den gleichen Bedingungen statt, die Zellkulturen wurden wie oben beschrieben behandelt. Da dieser Tumortyp, wie bereits erklärt, wesentlich seltener auftritt, konnte ich während meiner Doktorarbeitszeit nur 4 Tumore bearbeiten und messen.

Auch hier sezernierten alle Tumore Interleukin-8, erneut in sehr variablen Konzentrationen. Aufgrund der hohen Basalsekretion verwendete ich bei diesem Tumortyp eine Verdünnung von 1:10 mit Reagent Diluent. Abbildung 6 zeigt die Konzentrationsunterschiede der Basalwerte.

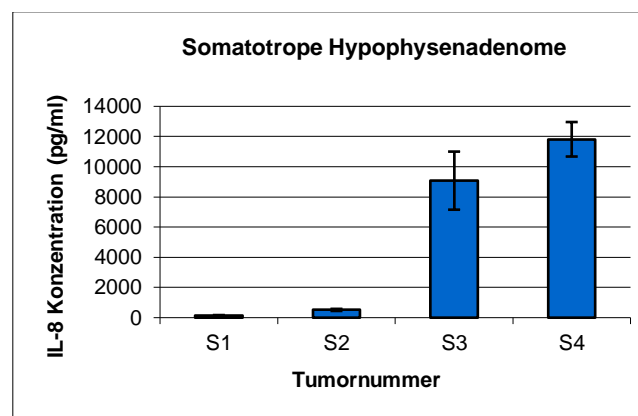


Abbildung 6 Basale IL-8 Konzentrationen der somatotropen Hypophysenadenome. Jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt. Die Tumornummern sind nach aufsteigender Konzentration angeordnet. Die Tumore zeigen sehr variable IL-8 Sekretionen.

3.1.2 Einfluss von LPS auf die IL-8 Sekretion von Hormon-inaktiven Hypophysenadenomen

Um einen möglichen Einfluss von LPS auf die Interleukin-8-Sekretion nachzuweisen, wurden die Hypophysentumorzellen mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen inkubiert und danach die IL-8-Konzentration mittels ELISA bestimmt.

Wie bereits erwähnt, ist LPS ein potenter Aktivator des Immunsystems und stimuliert physiologischer Weise die Freisetzung von IL-8 (Brasier et al., 1998, Hoffmann E et al., 2002, Sonoda et al., 1997).

Die Zelllinien wurden mit den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 und 1000ng/ml LPS für 24 Stunden inkubiert, anschließend die Zellüberstände in 96-Well-Platten umpipettiert und bis zur Messung eingefroren. Aufgrund der begrenzten Menge an Tumorgewebe, musste ich mich bei einigen Tumoren auf weniger Konzentrationsvarianten beschränken. Tabelle 4 zeigt die Stimulationsschemata der NFPAs.

Tabelle 4 LPS-Stimulationsschema der Hormon-inaktiven Hypophysenadenome. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen stimuliert. Aufgrund des begrenzten Tumormaterials konnte nicht jeder Tumor nach dem gleichen Schema stimuliert werden. LPS-Konzentration in (ng/ml).

Tumor	LPS 0,1	LPS 1	LPS 10	LPS 100	LPS 1000
N1		X	x	x	x
N2	x	X	x	x	x
N3	x	X	x	x	x
N4	x	X	x	x	x
N5			x	x	x
N6	x	X	x	x	x
N7				x	x
N8			x	x	x
N9	x	X	x	x	x
N10	x		x		x
N11	x		x		x
N12	x	X	x	x	x

LPS hatte bei allen Tumoren einen, bezogen auf den Basalwert, stimulierenden Einfluss auf die Interleukin-8 Sekretion. Abbildung 7 zeigt drei Beispiele für die Wirkung von LPS auf die Konzentration von IL-8:

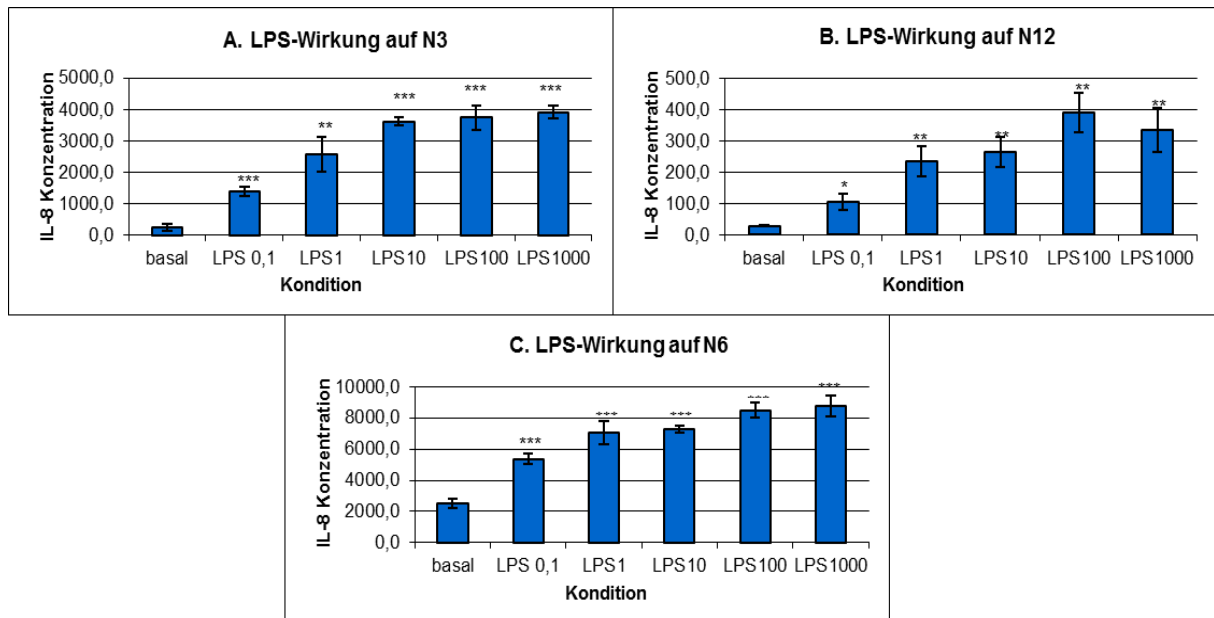


Abbildung 7 Wirkung von LPS auf die Sekretion von IL-8. Fallbeispiele A/B/C. LPS zeigt bei allen drei Fallbeispielen einen dosisabhängigen Anstieg der IL-8 Konzentrationen. LPS- Konzentrationen in ng/ml. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml). Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ vs. basal.

Schon bei der niedrigsten LPS-Konzentration von 0,1ng/ml zeigte sich bei allen Messungen ein signifikanter Anstieg der IL-8 Produktion. Zudem ist die Stimulation dosisabhängig, das heißt, mit steigender LPS-Konzentration steigt auch die IL-8 Sekretion. Bei fast allen Tumoren konnte bei maximaler Dosis von 1000ng/ml der höchste IL-8 Wert gemessen werden. Die Ausnahmen können der Tabelle entnommen werden.

Tabelle 5 Übersicht der maximal gemessenen IL-8 Konzentrationen der Hormon-inaktiven Hypophysenadenome und der zugehörigen LPS-Konzentrationen. Bei fast allen gemessenen Tumoren konnte bei einer Stimulation mit LPS 1000ng/ml die höchste Konzentration an IL-8 gemessen werden. Ausnahmen sind N1, N8, N9, N12. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml). Dargestellt ist Mittelwert (SD).

Tumor	Basale IL-8-Sekretion	Maximale IL-8-Sekretion	Kondition LPS (ng/ml)
N1	6560,0 (296,8)	7811,7 (219,2)	100
N2	1078,5 (178,8)	5087,0 (509,0)	1000
N3	244,7 (120,8)	3916,1 (188,4)	1000
N4	1380,7 (2094,7)	5375,4 (470,3)	1000
N5	5752,7 (256,5)	9275,8 (154,3)	1000
N6	2489,9 (292,9)	8768,4 (690,3)	1000
N7	4994,6 (360,5)	9500,6 (203,4)	1000
N8	107,4 (2,2)	538,3 (64,2)	100
N9	6824,2 (225,0)	10100,0 (285,4)	10
N10	3674,4 (167,0)	8233,6 (58,9)	1000
N11	70,6 (4,1)	4120,6 (163,7)	1000
N12	29,5 (2,8)	391,0 (64,3)	100

Die Tabelle zeigt zudem, dass die maximal gemessenen Konzentrationen von Interleukin-8 den Wert von 10,1ng/ml (N9) nicht übersteigen. Obwohl Konzentrationen nahe dieses Wertes schon bei Tumoren mit wesentlich niedrigerer Basalsekretion gemessen wurden, kann offensichtlich bei höheren Ausgangswerten (N1, N9) keine starke Stimulation mehr erfolgen. Es scheint bei ca. 10ng/ml ein Maximalwert vorzuliegen.

Die Tumorzelllinien reagieren, wie eben gezeigt, verschieden stark auf die Inkubation mit LPS. Es stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der basalen und der durch LPS stimulierten IL-8 Sekretion gibt. Abbildung 8 zeigt eine Gegenüberstellung der basal gemessenen Konzentrationen der Hormon-inaktiven Adenome und deren Maximalwerte. Man erkennt, dass die Sekretionssteigerung bei niedrigen Basalwerten signifikant stärker ist als bei Tumoren mit hohen basalen IL-8 Produktionen.

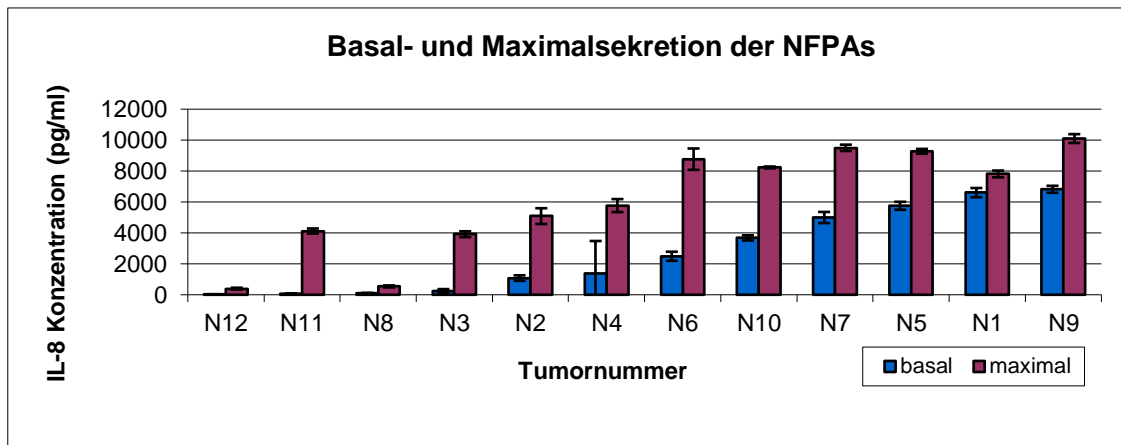


Abbildung 8 Gegenüberstellung der basalen und maximalen Konzentrationen von IL-8 bei Hormon-inaktiven Hypophysenadenomen. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. Die Tumore sind nach aufsteigender Basalsekretion angeordnet. Bei niedrigen basalen IL-8 Konzentrationen zeigt sich eine höhere Sekretionssteigerung nach Stimulation mit LPS.

Um den beobachteten Trend zu bestätigen, wurde die prozentuale Zunahme der IL-8 Konzentrationen bei der Stimulation mit LPS 1000ng/ml in Relation zum Basalwert berechnet. Das Ergebnis zeigt Abbildung 9. Die Konzentrationszunahme ist bei Tumoren mit niedriger basaler Sekretion stärker als bei Tumoren, die schon eine hohe basale IL-8 Sekretion zeigen. Tumor 11 stellt einen Extremfall dar, die prozentuale Zunahme ist hier mit Abstand am größten.

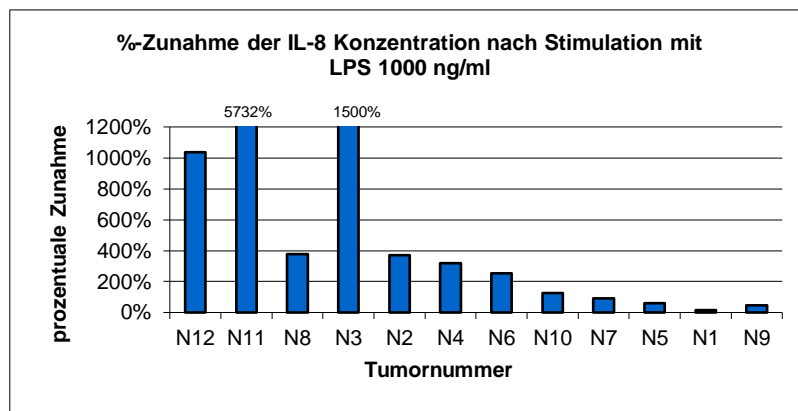


Abbildung 9 Prozentuale Zunahme der Konzentration von IL-8 nach Stimulation mit LPS 1000 ng/ml im Vergleich zur basalen Sekretion. Tumore mit niedriger basaler Sekretion von IL-8 können stärker durch LPS stimuliert werden. Die Tumornummern sind nach aufsteigender basaler Sekretion angeordnet. N11 und N3 zeigen eine wesentlich höhere Zunahme als der Rest der Tumore. Die Werte wurden aus den Mittelwerten berechnet.

Der eben beschriebene Effekt kann schon bei einer Stimulation mit der niedrigsten LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml beobachtet werden. Auch hier zeigen Tumore mit niedriger basaler Sekretion von IL-8 ein besseres Ansprechen auf eine Stimulation mit LPS. Der Sekretionsanstieg ist prozentual größer als bei Tumoren, die höhere basale IL-8 Konzentrationen vorweisen. Die Beobachtung wird noch deutlicher, wenn die relative Konzentrationszunahme gegen den Basalwert aufgetragen wird, wie Abbildung 10 zeigt.

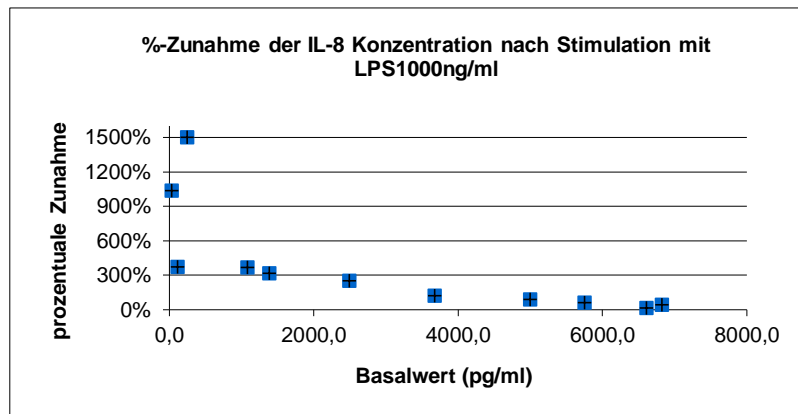


Abbildung 10 Prozentuale Zunahme der Konzentration von IL-8 nach Stimulation mit LPS 1000ng/ml. Durch das Auftragen der prozentualen Zunahme gegen den Absolutwert der basalen IL-8 Sekretion wird auf anschauliche Weise verdeutlicht, dass diejenigen Tumore, die eine niedrige Basalsekretion vorweisen, eine stärkere Sekretionssteigerung zeigen. Die Werte wurden aus den Mittelwerten berechnet.

3.1.3 Einfluss von LPS auf die IL-8 Sekretion von somatotropen Adenomen

Im Fall der GH-produzierenden Tumore stand, wie bereits erwähnt, weniger Tumormaterial zur Verfügung. Die Zellkulturen wurden mit den LPS-Konzentrationen von 0,1, 10 und 1000ng/ml inkubiert. Alle weiteren Versuchsbedingungen und Arbeitsschritte waren gleich.

Auch bei den somatotropen Tumorzelllinien hatte LPS einen signifikant stimulierenden Einfluss auf die Interleukin-8 Sekretion im Vergleich zu den basalen Werten. Wie Abbildung 11 zeigt, ist der Effekt durch LPS dosisabhängig, wenn die basalen IL-8 Konzentrationen niedrig sind. Bei S4 zeigten sich keine signifikanten Werte.

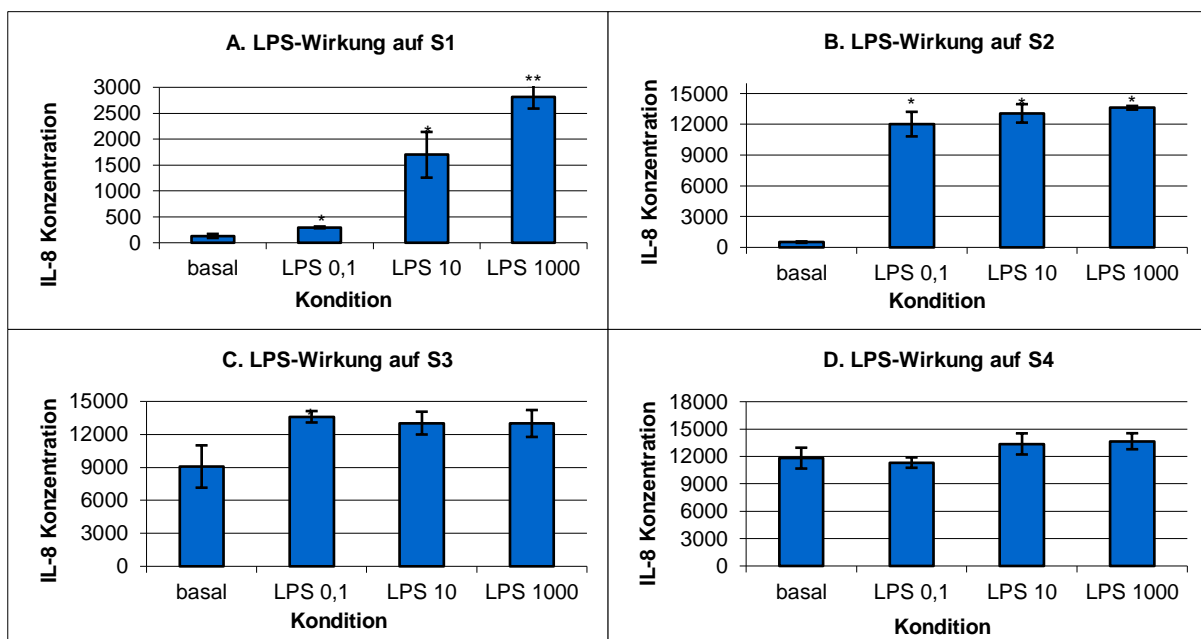


Abbildung 11 Wirkung von LPS auf die Sekretion von IL-8 der somatotropen Tumore. LPS stimuliert bei den Tumoren S1, S2 und S3 die Sekretion von IL-8. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ vs. basal.

Die maximalen IL-8 Konzentrationen wurden, mit Ausnahme von Tumornummer S3, bei der Stimulation mit LPS 1000ng/ml erreicht (siehe Tabelle 6). Dabei wird ein Maximalwert von ca. 13 ng/ml nicht überschritten, selbst wenn die basale Sekretion, wie bei Tumor S4, schon sehr hoch ist. Es ist also bei höheren Basalwerten keine extreme Stimulation mehr möglich und es existiert eine maximale Sekretionskapazität, die nicht mehr weiter gesteigert werden kann. Dies entspricht den Beobachtungen der Hormon-inaktiven Tumore.

Tabelle 6 Übersicht der maximal gemessenen IL-8 Konzentrationen der somatotropen Hypophysenadenome und der zugehörigen LPS-Konzentrationen. Bei fast allen gemessenen Tumoren konnte bei einer Stimulation mit LPS 1000ng/ml die höchste Konzentration an IL-8 gemessen werden. Ausnahm ist S3. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml). Dargestellt ist Mittelwert (SD).

Tumor	Basale IL-8-Sekretion	Maximale IL-8-Sekretion	Kondition LPS (ng/ml)
S1	131,8 (39,1)	2819,4 (230,0)	1000
S2	513,6 (68,6)	13613,2 (177,5)	1000
S3	9077,8 (1924,4)	13603,6 (518,9)	0,1
S4	11817,6 (1143,5)	13667,8 (876,1)	1000

Betrachtet man die prozentuale Zunahme der IL-8 Sekretion im Vergleich zum basalen Wert (Abbildung 12), sieht man auch hier, dass das Ansprechen auf LPS sehr variabel ist. Die Tumore S1 und S2 haben beide im Vergleich zu den restlichen GH-produzierenden Tumoren niedrige basale IL-8 Konzentrationen. Eine Stimulation mit LPS 1000ng/ml führt hier zu starken Konzentrationsanstiegen von über 2000%. Die Zelllinien mit bereits hoher Basalsekretion (S3, S4) zeigen hingegen eine nur noch geringe Zunahme von 15 bzw. 43%. Die Tendenz, dass Tumore mit niedrigen Ausgangswerten an IL-8 prozentual stärker stimulierbar sind als diese mit hohen, war schon bei den Hormon-inaktiven Tumoren festzustellen.

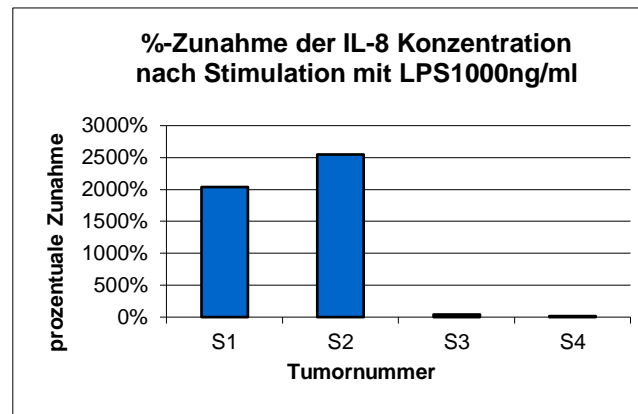


Abbildung 12 Prozentuale Zunahme der IL-8 Konzentrationen nach Stimulation der somatotropen Tumore mit LPS 1000 ng/ml im Vergleich zur basalen Sekretion. Die Tumornummern sind nach aufsteigender basaler Sekretion angeordnet. S1 und S2 zeigen eine deutlich niedrigere Basalsekretion als S3 und S4 und sprechen wesentlich stärker auf eine Stimulation mit LPS an. Die Werte wurden aus den Mittelwerten berechnet.

3.1.4 Wirkung von Dexamethason auf die basale IL-8 Produktion

Auch die Wirkung von Dexamethason auf die Interleukin-8 Produktion der Hypophysentumorzellen sollte untersucht werden. Die Zelllinien von Hormon-inaktiven Tumoren sowie die von GH-produzierenden wurden mit verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen bei 37 Grad für 24 Stunden inkubiert, danach der Zellüberstand bis zur ELISA-Messung bei -24 Grad eingefroren. Da auch hier nur begrenzt Tumormaterial zur Verfügung stand, vor allen bei den somatotropen Tumorzellen, konnten nicht alle Zellkulturen mit dem gleichen Stimulationsschema behandelt werden. Eine Übersicht über die NFPA gibt folgende Tabelle.

Tabelle 7 Dexamethason-Stimulationsschema der Hormon-inaktiven Hypophysenadenome. Aufgrund des begrenzten Tumormaterials konnten die Tumore N2, N3 und N4 nicht stimuliert werden. Dexamethason-Konzentration in (nM).

Tumor	Dex 0,1	Dex 1	Dex 10	Dex 100	Dex 1000
N1					x
N5		x	x	x	x
N6	x	x	x	x	x
N7				x	x
N8		x	x	x	x
N9	x	x	x	x	x
N10	x		x		x
N11	x		x		x
N12	x	x	x	x	x

Dexamethason bewirkte bei allen untersuchten Tumoren eine signifikante Hemmung der IL-8 Sekretion im Vergleich zum Basalwert. Abbildung 13 zeigt die gemessenen IL-8 Konzentrationen einiger Tumore nach der Inkubation mit verschiedenen Dexamethason Konzentrationen. Das Ansprechen unterscheidet sich von Tumor zu Tumor, eine Konzentrationsabhängigkeit ist nicht bei allen Tumoren zu erkennen.

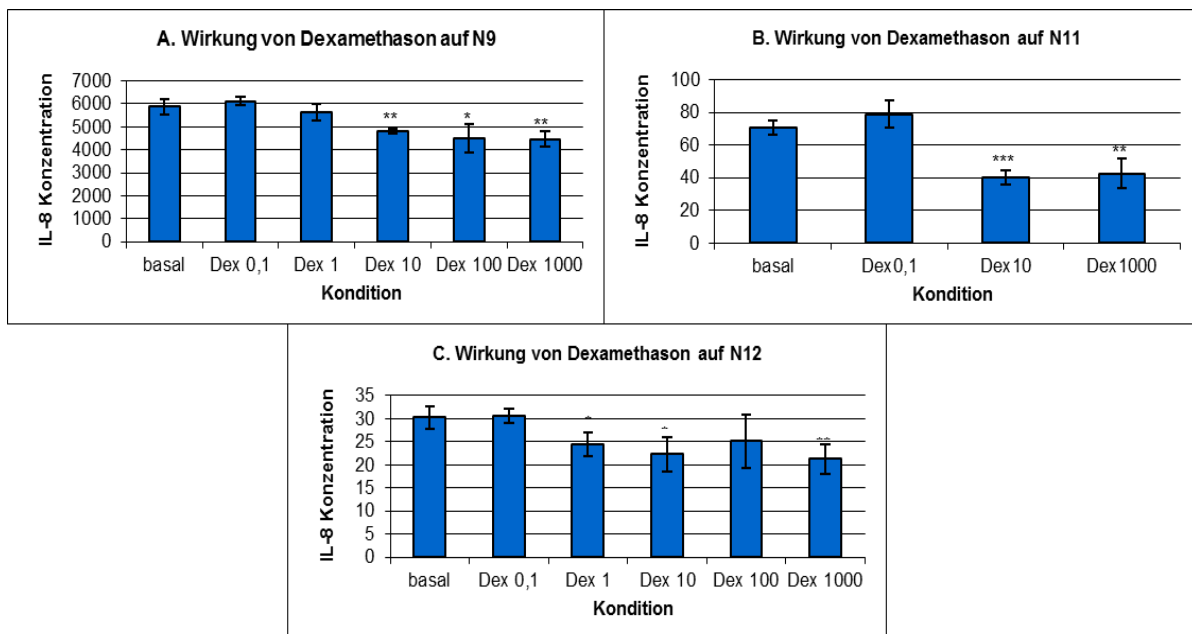


Abbildung 13 Wirkung von Dexamethason auf Hormon-inaktive Hypophysenadenome. Fallbeispiele A-C. Bei allen Tumoren zeigt Dexamethason eine hemmende Wirkung auf die IL-8 Sekretion. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ vs. basal.

Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die maximal erreichte Hemmung der IL-8 Konzentration bezogen auf die basale Sekretion und die zugehörige Kondition, bei der diese Hemmung erreicht wurde. Bei den meisten Tumoren ist der maximale Effekt bei einer Inkubation mit Dexamethason 1000nM zu sehen. Das Ansprechen der Zelllinien unterscheidet sich stark, die Konzentrationshemmung ist jedoch nie stärker als 50%. Eine komplette Inhibition der Interleukin-8 Sekretion durch Dexamethason ist mit den verwendeten Konzentrationen also nicht möglich.

Tabelle 8 Übersicht über basale und minimale Konzentrationen von IL-8, zugehöriger Kondition und prozentualer Abnahme der IL-8 Konzentration. Der maximale Hemmeffekt ist bei den meisten Tumoren bei einer Inkubation mit Dexamethason 1000nM zu sehen. Die prozentuale Abnahme übersteigt nie den Wert von 50% bezogen auf die basale Konzentration. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml), Dexamethason Konzentrationen in (nM). Dargestellt Mittelwert (SD).

Tumor	Basale IL-8 Konzentration	Minimale IL-8 Konzentration	Kondition Dex	%-Abnahme
1	6560,0 (296,8)	4016,7 (164,8)	Dex1000	39%
5	5752,7 (256,5)	4144,0 (102,1)	Dex 100	28%
6	2468,4 (333,8)	1866,9 (262,2)	Dex 100	25%
7	4994,6 (360,5)	4249,5 (465,9)	Dex 100	15%
8	107,4 (2,2)	54,0 (6,4)	Dex1000	50%
9	5874,9 (316,5)	4456,8 (335,3)	Dex1000	35%
10	3400,8 (789,3)	2287,1 (292,6)	Dex1000	38%
11	70,6 (4,1)	40,2 (4,3)	Dex10	43%
12	30,3 (2,5)	21,2 (3,1)	Dex1000	28%

Die Auswertung der Stimulationsversuche mit LPS ergab eine stärkere prozentuale Sekretionszunahme bei Tumoren mit niedrigen basalen IL-8 Konzentrationen. Bei einer Sekretionsinhibition mit Dexamethason ist ein solcher Effekt nicht erkennbar.

Aufgrund begrenzt verfügbarer Tumorzellen konnte nur in zwei GH-produzierenden Tumoren die Wirkung von Dexamethason untersucht werden. Die Bedingungen entsprachen denen der NFPA-Zellkulturen.

Tabelle 9 Stimulationsübersicht der GH-produzierenden Hypophysenadenome mit Dexamethason. Dexamethason-Konzentration in (nM).

Tumor	Dex 0,1	Dex 1	Dex 10	Dex 100	Dex 1000
S2			x	x	x
S4	x		x		x

Die Interleukin-8 Produktionen beider Tumoren werden durch die Inkubation mit Dexamethason gehemmt, Tumor S2 zeigt jedoch ein wesentlich stärkeres Ansprechen. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ist in beiden Fällen nicht zu erkennen.

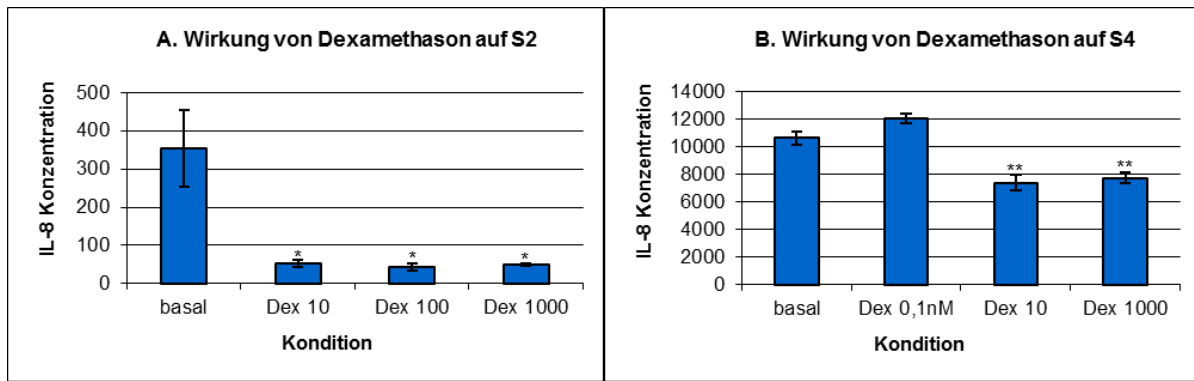


Abbildung 14 Wirkung von Dexamethason auf somatotrope Hypophysentumore. A S2, B S4. Dexamethason Konzentrationen in (nM). S2 zeigt ein sehr starkes Ansprechen auf die Inkubation mit Dexamethason. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ vs. basal.

3.1.5 Wirkung von Dexamethason auf die LPS stimulierte IL-8 Produktion von Hormon-inaktiven Hypophysenadenomen

Sowohl der inhibitorische Effekt von Dexamethason auf die Interleukin-8 Produktionen der Zelllinien der Hormon-inaktiven Hypophysentumore, als auch die stimulierende Wirkung von LPS wurden gerade geschildert. Mich interessierte nun, ob Dexamethason bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS auch eine inhibierende Wirkung bezogen auf die stimulierten Interleukin-8 Sekretionen zeigt. Kann eine Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt werden? Findet eine Hemmung der IL-8 Sekretion zurück auf den Basalwert oder sogar tiefer statt? Ist die Konzentrationsabnahme prozentual stärker oder schwächer als bei alleiniger Hemmung mit Dexamethason?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die NFPA-Zellen mit LPS 1000ng/ml und gleichzeitiger Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Dexamethason für 24 Stunden bei 37 Grad inkubiert, die Zellüberstände anschließend abpipettiert und bis zur Messung bei -24 Grad gelagert.

Tabelle 10 Stimulationsübersicht der kombinierten Inkubation mit LPS 1000ng/ml und Dexamethason. Aufgrund des begrenzten Tumormaterials konnten nicht alle Tumore auf die gleiche Weise stimuliert werden. N1, N2, N3, N4 und N10 konnten nicht kombiniert stimuliert werden. LPS-Konzentration in (ng/ml), Dexamethason-Konzentration in (nM).

Tumor	LPS 1000	+ Dex 1	+ Dex 10	+ Dex 100	+ Dex 1000
N5	x	x	x	x	x
N6	x	x	x	x	x
N7	x			x	x
N8	x		x	x	x
N9	x	x	x	x	x
N11	x		x		x
N12	x	x	x	x	x

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige, signifikante Inhibition der Interleukin-8 Sekretion bezogen auf den Ausgangswert nach Inkubation mit LPS 1000ng/ml.

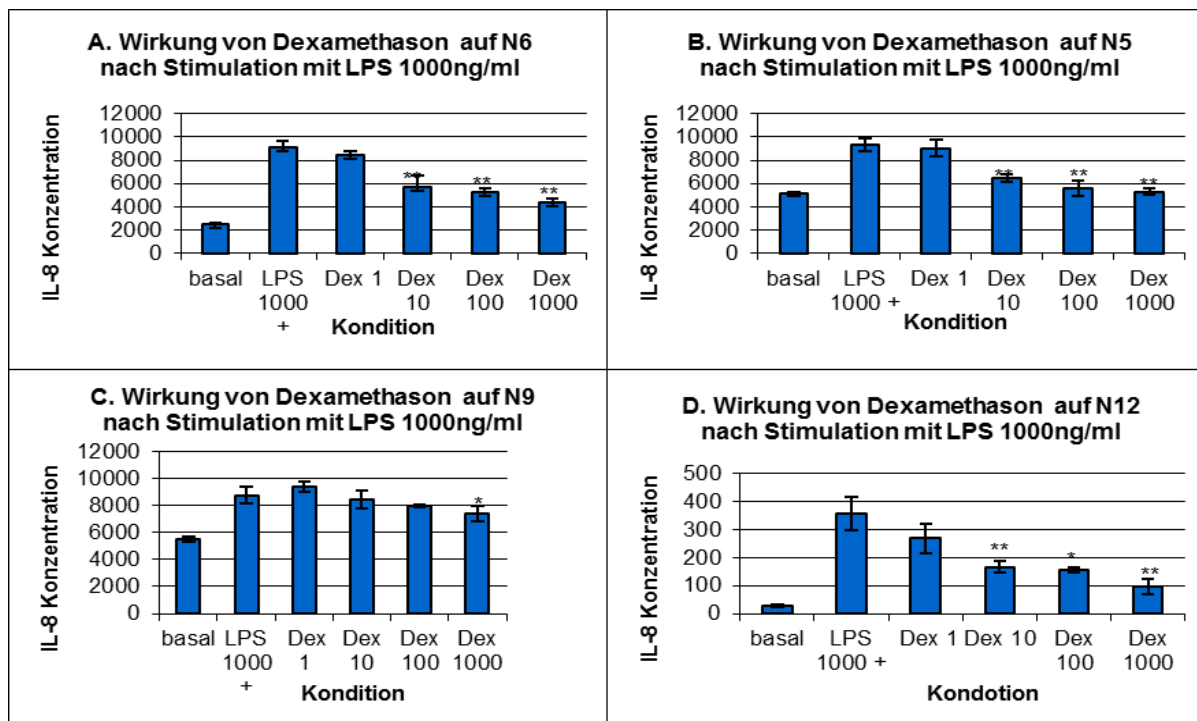


Abbildung 15 Wirkung von Dexamethason auf hormon-inaktive Hypophysenadenome nach Stimulation mit LPS 1000ng/ml. Fallbeispiele A-D. In allen Beispielen zeigt sich eine Hemmung durch Dexamethason. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001 vs. LPS1000. Dexamethason-Konzentrationen in [nM]. IL-8 Konzentrationen in (pg/ml).

Eine signifikante Konzentrationsabnahme kann bei allen Tumoren festgestellt werden. Die Werte fallen allerdings nicht bis zur basalen IL-8 Konzentration ab, sondern nähern sich dieser

nur an. Dexamethason kann also den stimulierenden Effekt von LPS nicht komplett inhibieren. Außerdem reagieren die Tumortypen sehr unterschiedlich auf die Stimulation/Inhibition.

Die Berechnung der prozentualen Abnahme nach Inkubation mit LPS 1000ng/ml und Dexamethason 1000nM in Relation zur IL-8 Konzentration nach Stimulation mit LPS 1000ng/ml macht erneut das unterschiedliche Ansprechen der Tumore deutlich. In Abbildung 16 sind die Werte nach aufsteigender Basalsekretion angeordnet und man erkennt, dass der IL-8 Konzentrationsrückgang bei Zelllinien mit niedriger basaler Sekretion stärker ist. Wie oben schon gezeigt, konnte der gleiche Effekt in Bezug auf die alleinige Stimulation mit LPS festgestellt werden.

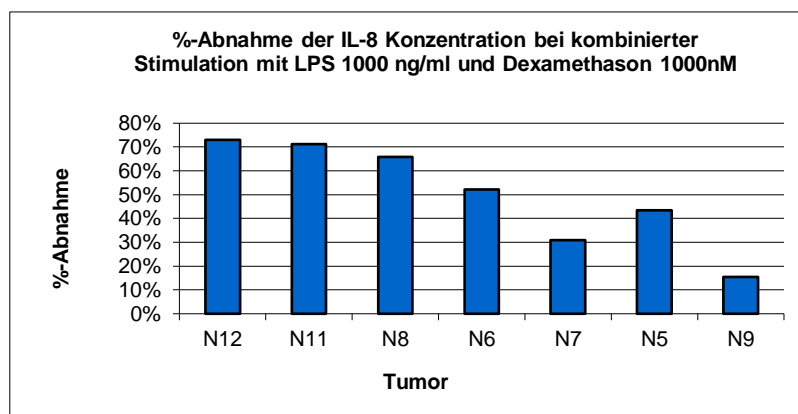


Abbildung 16 Prozentuale Abnahme der IL-8 Konzentration bei kombinierter Stimulation mit LPS 1000ng/ml und Dexamethason 1000nM in Bezug zur Konzentration nach alleiniger Stimulation mit LPS 1000ng/ml. Die Tumornummern sind nach aufsteigender basaler Sekretion angeordnet. Die Werte wurden aus den Mittelwerten ermittelt.

Abschließend interessierte mich der Vergleich zwischen der IL-8 Abnahme nach alleiniger Dexamethason-Zugabe und der kombinierten Inkubation von LPS und Dexamethason. Eine konzentrationsabhängige Hemmung durch Dexamethason kann in beiden Fällen festgestellt werden. Betrachtet man die prozentualen Abnahmen bei einer Hemmung mit Dexamethason 1000nM bezogen auf den Basalwert bzw. der Konzentration nach Stimulation mit LPS 1000ng/ml, fällt auf, dass die relative Hemmung nach Stimulation mit LPS bei allen gemessenen Tumoren höher ist. Eine Ausnahme bildet Tumor N9. Die durch LPS stimulierte IL-8 Sekretion kann also durch Dexamethason stärker gehemmt werden als die basale IL-8 Produktion.

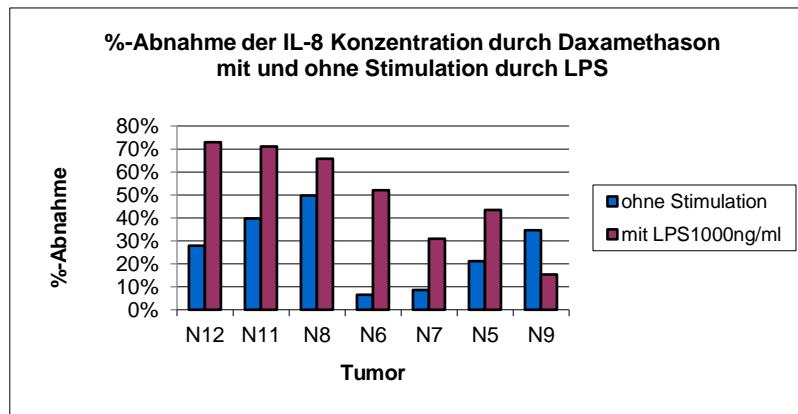


Abbildung 17 Vergleich der prozentualen Abnahme der IL-8 Konzentration nach alleiniger Dexamethason Zugabe (1000nM) und kombinierter Inkubation mit LPS 1000ng/ml und Dexamethason 1000nM. Die Tumornummern sind nach aufsteigender basaler IL-8 Sekretion angeordnet. Die prozentuale Hemmung ist nach Stimulation mit LPS stärker. Die Werte wurden aus den Mittelwerten berechnet.

3.2 Proliferationsbestimmung von AtT20-Zellen mittels ^3H -Thymidin-Inkorporation

Mit Hilfe des ^3H -Thymidin-Inkorporationsversuches sollte die Wirkung von Interleukin-8 auf die Proliferation von Hypophysentumorzellen untersucht werden. Als Zelllinie dienten AtT20-Zellen der Maus, ein Modell für einen kortikotropen Tumor (Gamby et al., 1996, Orth et al., 1973).

Die Zellen wurden wie bereits beschrieben mit verschiedenen IL-8 Konzentrationen für 24, 48 und 120 Stunden inkubiert, anschließend wurde der ^3H -Thymidin-Inkorporationsversuch durchgeführt. So konnten quantitative Vergleichswerte ermittelt werden, um die Proliferation der AtT20-Zellen unter verschiedenen Bedingungen gegenüber zu stellen. Eine absolute Zellzahl kann durch diese Methode nicht errechnet werden.

3.2.1 Wirkung von IL-8 auf die Proliferation von AtT20-Zellen

Ein Vergleich der basal gemessenen Werte, das heißt diesen Zellen wurde nur 1% -FCS-haltiges Medium zugefügt, diente der Kontrolle der Versuchsbedingungen. Die gemessenen Werte nehmen mit steigender Inkubationszeit zu (Abbildung 18). Dies beweist, dass die Methode an sich, mit den vorherrschenden Stimulationsbedingungen, sowie die Messungen, erfolgreich waren. Ein Zellwachstum fand also durch die Inkubation mit 1% -FCS-haltigem Medium statt, unabhängig von Interleukin-8.

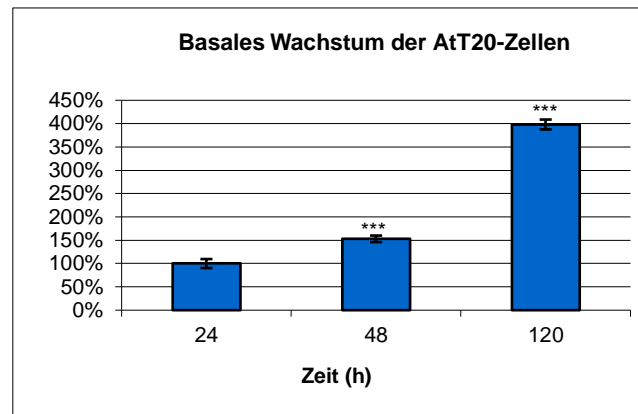


Abbildung 18 Basales Wachstum der AtT20-Zellen nach 24, 48 und 120h. Es zeigt sich nach 48 und 120h Inkubation ein signifikantes Wachstum der Zellen. Da durch die Methode keine absoluten Zellzahlen ermittelt werden, zeigt die Abbildung die prozentuale Zunahme der Zellzahl im Bezug zum basalen Wert nach 24h Inkubation (entspricht 100%). Die Werte wurden aus den gemessenen Mittelwerten errechnet. *** $p < 0,001$ vs. basal

Interleukin-8 zeigte bei keiner der drei ausgewerteten Platten einen wachstumsfördernden Effekt. Nach 24, 48 und 120 Stunden Inkubation zeigt sich kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen IL-8 Konzentrationen und den gemessenen Werten.

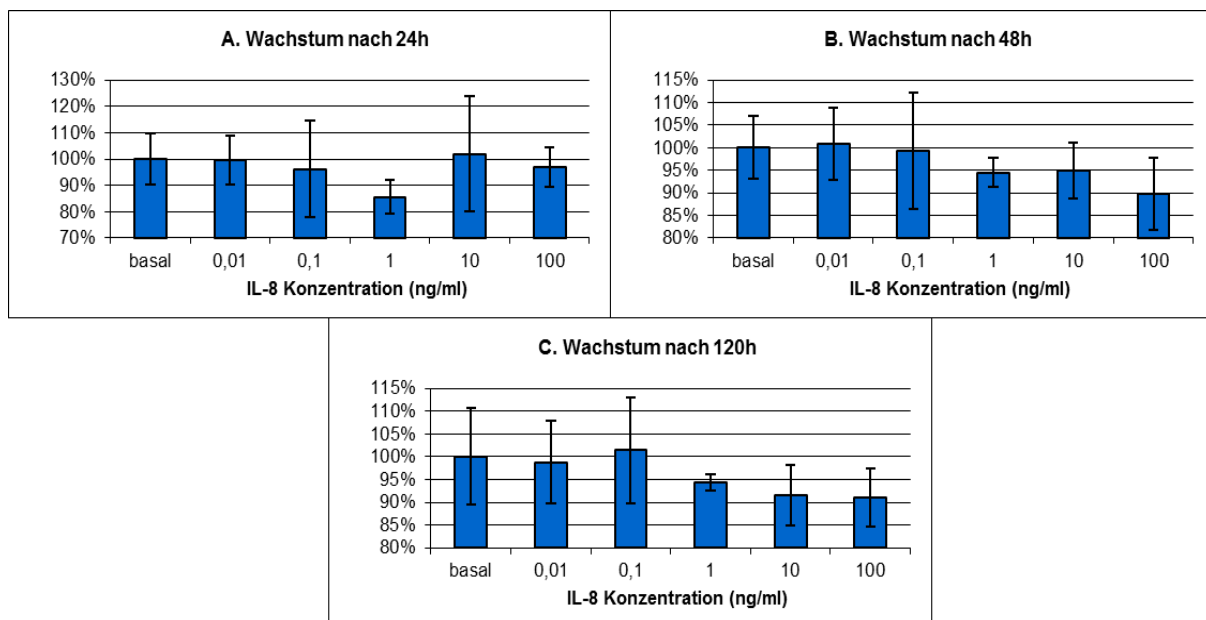


Abbildung 19 Wirkung von Interleukin-8 auf die Proliferation von AtT20-Zellen. A: nach 24h Inkubation, B: nach 48h Inkubation, C: nach 120h Inkubation. IL-8 zeigt bei keinen der verwendeten Konzentrationen einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation der Zellen. Gezeigt sind die relativen Werte \pm SD bezogen auf den basal gemessenen Wert. Die Werte wurden aus den Mittelwerten errechnet. Der p-Wert wurde anhand der Absolutwerte ermittelt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ vs. basal.

Zusammenfassend hat Interleukin-8 also keine Wirkung auf die Proliferation von AtT20-Zelllinien. In diesem Experiment wurde humanes IL-8 verwendet und nicht das murine Homologon KC. Konnten deshalb keine Effekte festgestellt werden? Der murine KC-Rezeptor

weist zwar, wie oben beschrieben, eine starke Homologie zu CXCR1 und 2 vor, IL-8 bindet aber nur mit niedriger Affinität an diesen Rezeptor. Die EC50 beträgt 300nM, was einer Konzentration von ca. 2500 ng/ml entspricht (Bozic et al., 1994, Cerretti et al., 1993). Aus technischen Gründen konnten hier nur Maximalkonzentrationen von 100ng/ml verwendet werden.

3.2.2 Wirkung von KC auf die Proliferation von AtT20-Zellen

Aufgrund der eben beschriebenen Problematik wurde die gleiche Versuchsreihe noch einmal unter der Verwendung von KC durchgeführt. Die AtT20-Zellen wurden auf die gleiche Weise behandelt wie in der vorhergehenden Versuchsreihe: Erneut wurden die Zellen gesplittet und auf drei 48-well-Platten mit einer Dichte von 20.000 Zellen/well ausgesät. Auch hier wurde 1%FCS-haltiges Medium verwendet.

Nach 24h waren die Zellen adhärent und konnten mit verschiedenen Konzentrationen von KC (1; 10; 100 ng/ml) stimuliert werden. Es wurden 4-fach Werte bestimmt und die Platten bei 37 Grad für 24, 48 und 120 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung per ³H-Thyimidin-Inkorporation.

Die Bestimmung der Basalwerte zeigte eine Proliferationssteigerung nach 48 Stunden Inkubation im Vergleich zum Wert nach 24 Stunden (Abbildung 20). Es fand also ein Zellwachstum unter den herrschenden Inkubation- und Versuchsbedingungen statt.

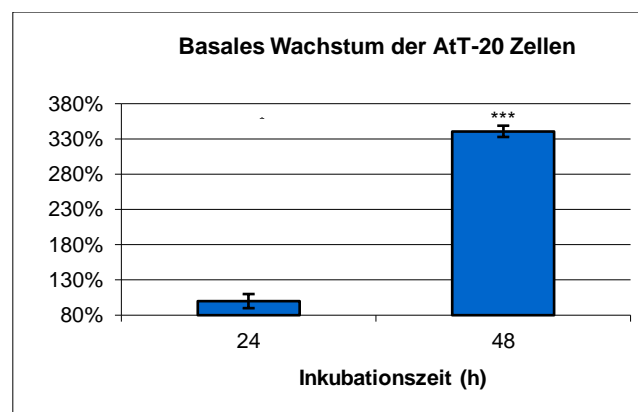


Abbildung 20 Basales Wachstum der AtT20-Zellen nach 24 und 48h. Nach 48h Inkubation steigt die Zellzahl signifikant zum Ausgangswert nach 24h. Gezeigt ist die prozentuale Zunahme +/-SD. Die Werte wurden aus den Mittelwerten errechnet. Der p-Wert wurde anhand der Absolutwerte ermittelt. ***p<0,001 vs. basal.

Weder nach 24, noch nach 48 Stunden zeigte sich ein proliferationshemmender oder – stimulierender Einfluss von KC auf die AtT20-Zellen. Im Vergleich zum Basalwert sind die

gemessenen Werte nicht signifikant verändert. Aufgrund dieser Beobachtung entschied ich mich gegen eine Auswertung nach 120 Stunden Inkubation.

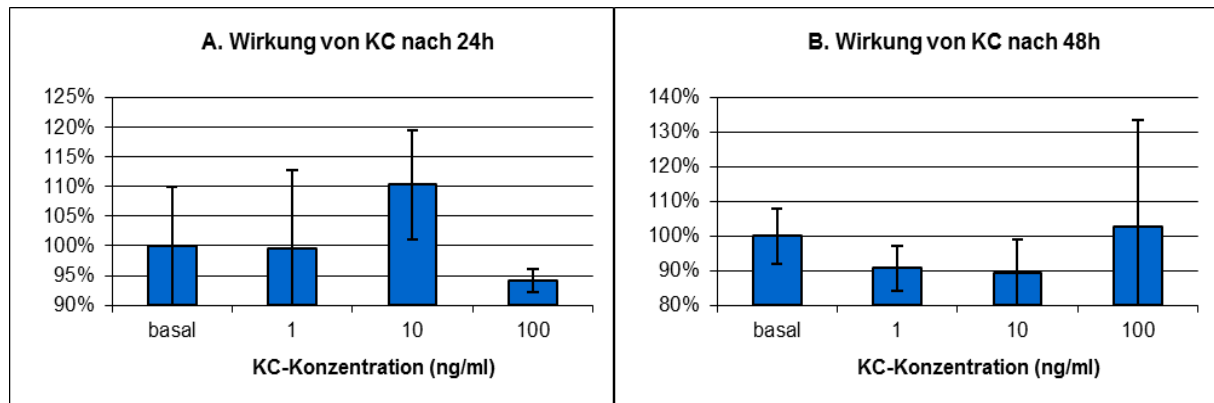


Abbildung 21 Wirkung von KC auf die Proliferation von AtT20-Zellen. A: nach 24h Inkubation, B: nach 48h Inkubation. KC hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Dargestellt sind prozentuale Angaben +/-SD bezogen auf den basal gemessenen Wert. Dazu wurden die Mittelwerte verwendet. Der p-Wert wurde anhand der Absolutwerte ermittelt.

3.3 Einfluss von IL-8 auf die Hormonproduktion von AtT20-Zellen

Um den Einfluss von Interleukin-8 auf die Hormonproduktion von Hypophysentumorzellen zu untersuchen, wurde unter Zuhilfenahme des Radioimmunassays die ACTH-Sekretion der AtT20-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen IL-8 Konzentrationen gemessen.

Dazu wurden die Zellen gesplittet, mit einer Dichte von 20.000 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Die dann adhärennten Zellen konnten nun mit den unterschiedlichen Interleukin-8 Konzentrationen (1; 10; 100 ng/ml) stimuliert werden. Es wurden jeweils 4-fach Werte bestimmt. Um zusätzlich IL-8 Wirkungen auf stimulierende/inhibierende Substanzen zu untersuchen, wurden die Zellen mit CRH, Dexamethason und Forskolin nach folgendem Schema behandelt:

Tabelle 11 Stimulationsübersicht der kombinierten Inkubation mit CRH/Dexamethason/Forskolin und verschiedenen IL-8 Konzentrationen. IL-8 Konzentrationen in (ng/ml).

	+ IL-8 1	+IL-8 10	+ IL-8 100
CRH 100nM	x	x	x
Dex 1000nM	x	x	x
Forskolin 5uM		x	x

Es wurden je 3 Platten mit identischem Stimulationsschema angelegt und für 4, 16 und 24h inkubiert. Danach wurden die Zellüberstände abpipettiert und bis zur Messung bei -24 Grad gelagert.

3.3.1 Einfluss von IL-8 auf die basale ACTH-Produktion

Vergleicht man die basale ACTH-Sekretion der AtT20-Zellen nach 4, 16 und 24h zeigt sich, wie zu erwarten, eine Zunahme der ACTH-Konzentration. Es scheint allerdings schon nach 16h ein Maximum der Sekretion erreicht zu sein, da nach 24h kein signifikanter Anstieg der ACTH-Konzentration im Vergleich zum Wert nach 16h auszumachen ist.

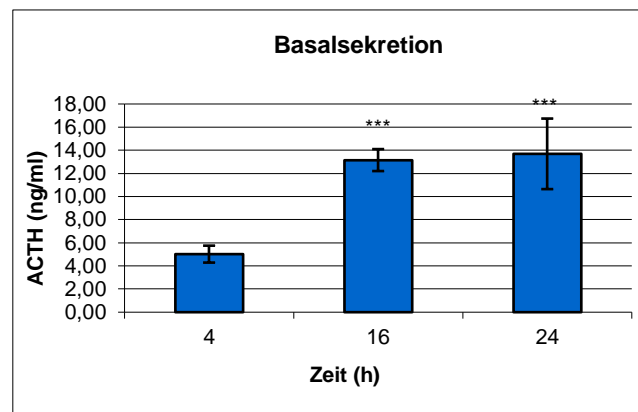


Abbildung 22 Basale ACTH-Sekretion der AtT20-Zellen nach 4, 16 und 24h. Nach 16h Inkubation steigt die ACTH-Sekretion signifikant an. Nach 24h zeigt sich kein weiterer Anstieg im Bezug zum Wert nach 16h. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. ***p<0,001 vs. basal.

Die Zellen wurden auf eine veränderte ACTH-Produktion nach IL-8 Stimulation untersucht. Nach 4 und 16h Inkubation zeigt sich keine signifikante Beeinflussung der ACTH-Konzentrationen. Nach 24h können allerdings signifikant höhere ACTH-Werte gemessen werden. Es findet sich keine Dosis-Wirkungs-Beziehung. IL-8 hat somit keinen stimulierenden Einfluss auf die Hormonproduktion der AtT20-Zellen.

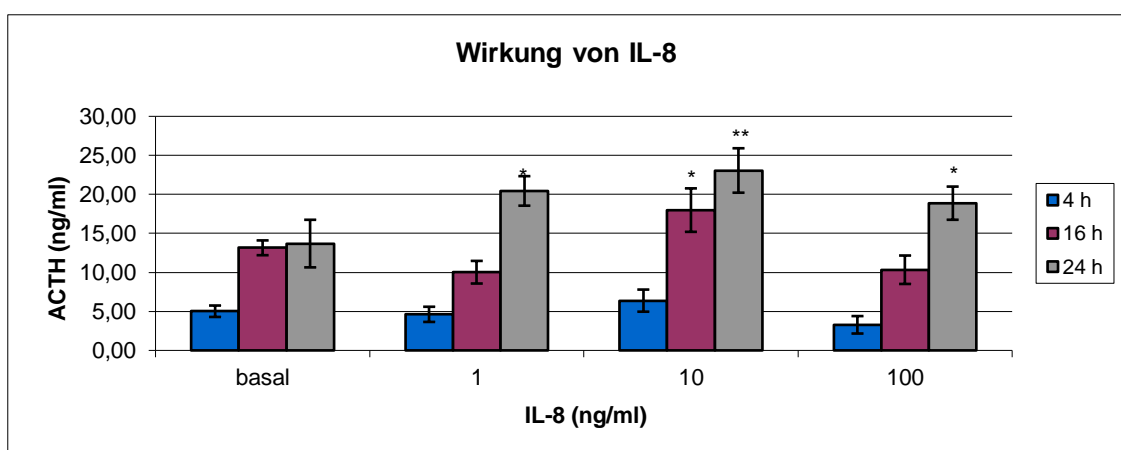


Abbildung 23 Wirkung von Interleukin-8 auf die ACTH-Sekretion von AtT20-Zellen nach 4, 16 und 24h Inkubationszeit. Nach 16h Inkubation zeigt sich bei Stimulation mit IL-8 10ng/ml, sowie nach 24h Inkubation mit allen verwendeten IL-8 Konzentrationen ein signifikanter Anstieg der ACTH-Konzentration. Da sonst keine Wirkungen von IL-8 nachgewiesen werden konnten, ist anzunehmen, dass dies zufällige Konzentrationsschwankungen sind. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. *p<0,05; **p<0,005 vs. basal.

3.3.2 Wirkung von IL-8 auf die CRH stimulierte ACTH-Produktion

CRH, physiologischer Weise vom Hypothalamus freigesetzt, ist das Releasing Hormon von ACTH und stimuliert dessen Sekretion (Renner et al., 2001). Dies konnte hier anhand des RIAs nachvollzogen werden. Wie Abbildung 24 zeigt, fand nach Inkubation mit CRH 100nM eine signifikante Erhöhung der ACTH-Konzentration im Vergleich zum Basalwert statt.

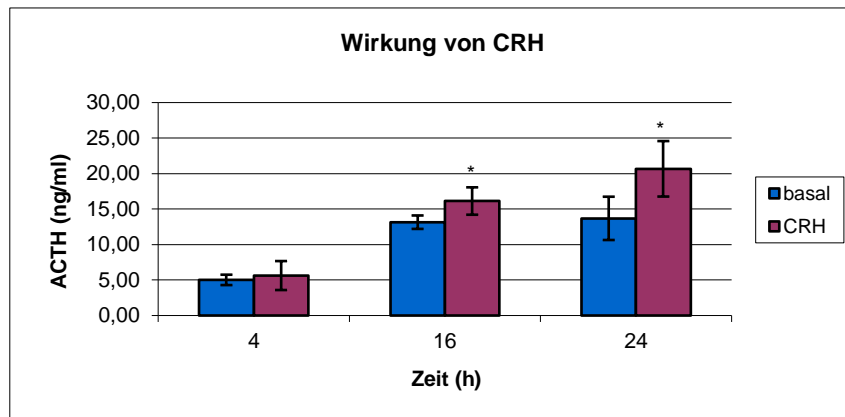


Abbildung 24 Wirkung von CRH auf die ACTH-Sekretion von AtT20-Zellen nach 4, 16 und 24 Stunden. Nach 16 und 24h Inkubation fand eine signifikante Konzentrationssteigerung im Vergleich zum basalen ACTH-Wert statt. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. * $p < 0,05$ vs. basal.

Dieser stimulierende Effekt wird von Interleukin-8 weder abgeschwächt noch verstärkt. Durch die IL-8 Zugabe zeigt sich keine signifikante Veränderung (siehe Abbildung 25).

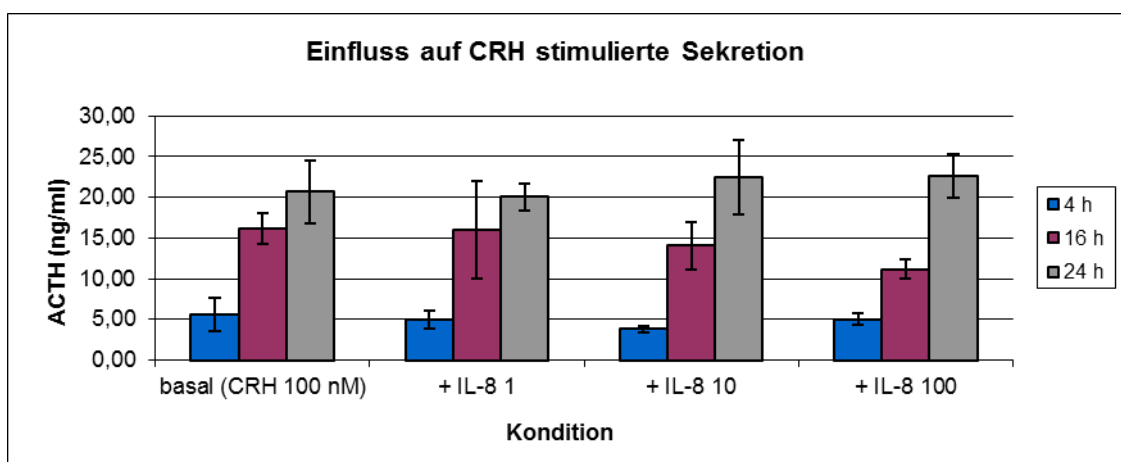


Abbildung 25 Wirkung von IL-8 auf die CRH stimulierte ACTH-Sekretion von AtT20-Zellen nach 4, 16 und 24h. Interleukin-8 bewirkt keine signifikante Änderung der ACTH-Konzentration. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt.

3.3.3 Wirkung von IL-8 auf die ACTH-Produktion von AtT20-Zellen bei Hemmung durch Dexamethason

Das synthetische Glukokortikoid Dexamethason suppremiert die Transkription von POMC, dem Vorläuferprotein von ACTH und hemmt somit die ACTH-Sekretion (Birnberg et al., 1983, Kant et. al., 1989). Diesen Effekt konnte ich bei der Inkubation der AtT20-Zellen mit Dexamethason nachweisen, wie Abbildung 26 zeigt. Dexamethason senkt die ACTH-Konzentration signifikant im Vergleich zum basalen Wert nach 4, 16 und 24 Stunden Inkubation.

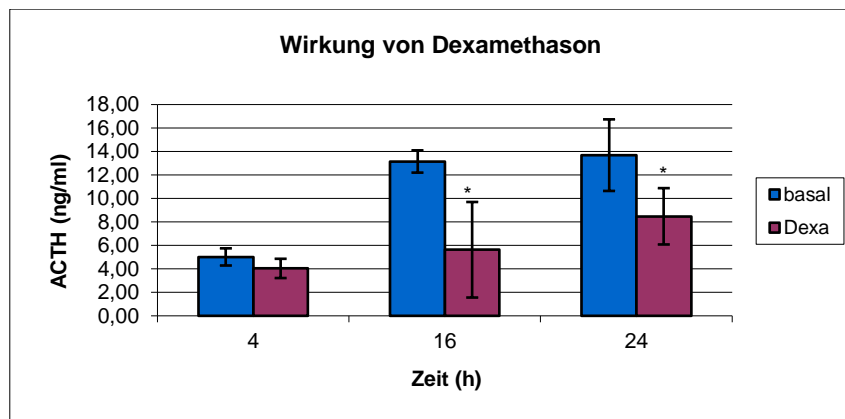


Abbildung 26 Wirkung von Dexamethason 1000nM auf die ACTH-Produktion von AtT20-Zellen nach 4, 16 und 24h. Dexamethason hemmt die ACTH-Konzentration signifikant nach 16 und 24h Inkubation. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. * $p < 0,05$ vs. basal.

Zusätzlich zu Dexamethason wurde Interleukin-8 in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. IL-8 beeinflusst die Wirkung von Dexamethason nicht signifikant.

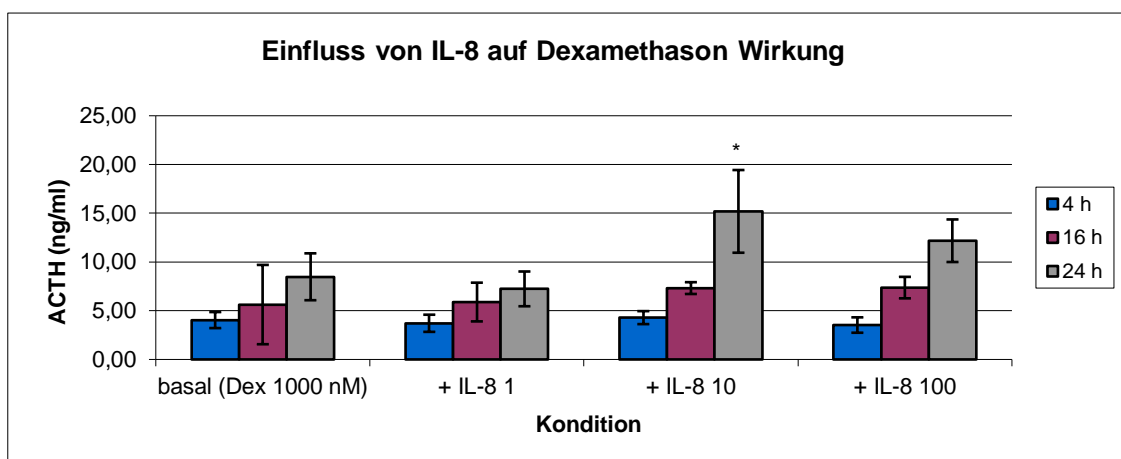


Abbildung 27 Wirkung von IL-8 auf die durch Dexamethason suppremierte ACTH-Sekretion. IL-8 hat keinen Einfluss auf die Wirkung von Dexamethason nach 4 und 6h. Nach 24h zeigt sich ein signifikanter Anstieg bei Inkubation mit IL-8 10ng/ml. Da dies der einzige signifikante Wert ist, kann er als zufällige Konzentrationsschwankung angesehen werden. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt. * $p < 0,05$ vs. basal.

3.3.4 Wirkung von IL-8 auf die ACTH-Sekretion bei Inkubation mit Forskolin

Forskolin aktiviert die Adenylatcyclase, was zur vermehrten cAMP-Synthese (cyclisches Adenosinmonophosphat) führt. Dadurch erhöht sich der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt und ACTH wird vermehrt freigesetzt (Insel, Ostrom, 2003, Luini et al., 1985). Dieser Effekt konnte mit den AtT20-Zellen nur bedingt nachgewiesen werden. Die Zellen wurden mit Forskolin $5\mu\text{M}$ inkubiert. Nach 4 und 16h zeigte sich keine signifikante Erhöhung der ACTH-Konzentration im Vergleich zum basalen Wert. Nach 24h konnte zwar ein deutlich erhöhter ACTH-Wert gemessen werden, aufgrund der großen Streuung ist dieser Anstieg jedoch nicht signifikant.

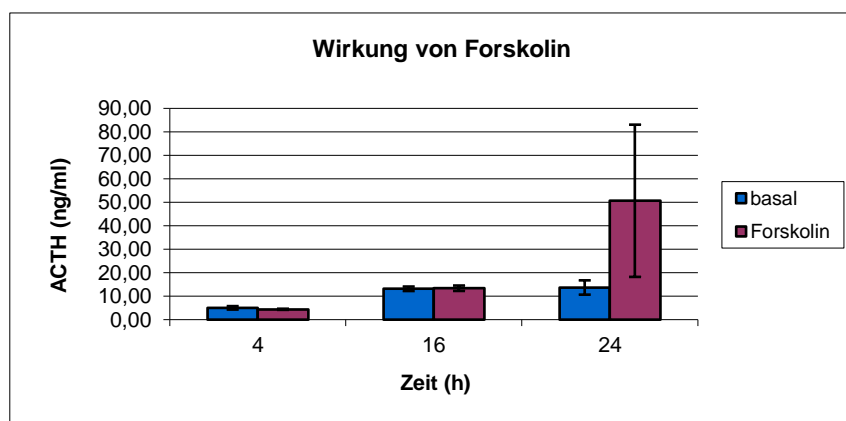


Abbildung 28 Wirkung von Forskolin auf die ACTH-Sekretion von AtT20-Zellen. Es konnte kein stimulierender Effekt von Forskolin nachgewiesen werden. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt.

Die zusätzliche Inkubation mit IL-8 10 und 100ng/ml beeinflusste die ACTH-Produktion nicht signifikant. Weder nach 4, 16 oder 24h Inkubation zeigte sich eine stimulierende Wirkung von IL-8.

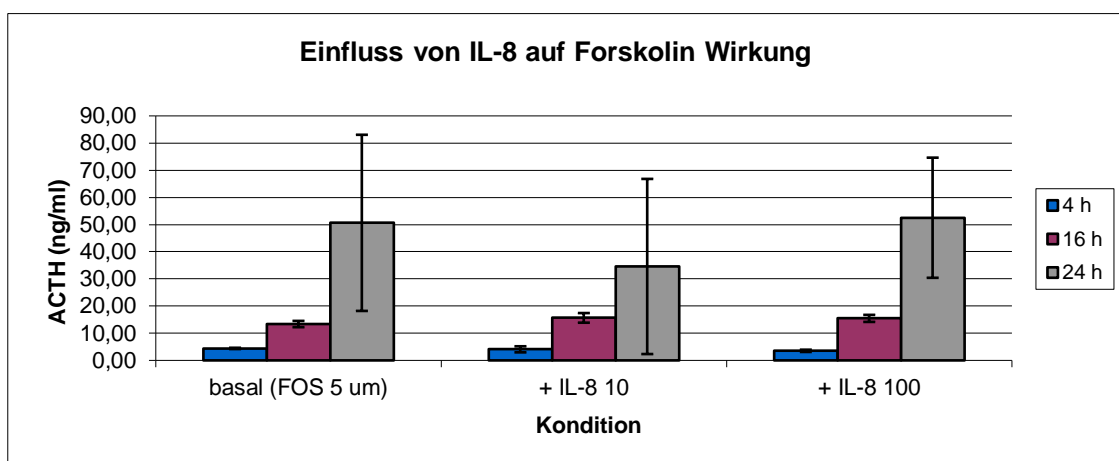


Abbildung 29 Wirkung von Interleukin-8 bei Inkubation der AtT20-Zellen mit Forskolin $5\mu\text{M}$. Es konnten keine signifikanten Werte gemessen werden. Nach 24h Inkubation zeigten die gemessenen Werte eine große Streuung. Jeweils Mittelwert +/- SD dargestellt.

4 Diskussion

Viele Tumorarten sezernieren IL-8 in hohen Konzentrationen und exprimieren entsprechende Rezeptoren (Brew et al., 2000, 1996 Le et al., 2000, Norgauer et al., 1996, Singh et al., 1994, Shi et al., 1999, Yuan et al., 2005). Dadurch kann das Zytokin auf para- und autokrine Weise als pro-oncogenetischer Faktor wirken (Xie et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion und Regulation von IL-8 in einer Reihe von humanen Hypophysenadenomen untersucht und in der kortikotropen AtT20 Hypophysentumorzelllinie überprüft, ob IL-8 für das Wachstum und die Hormonproduktion funktionell von Bedeutung ist.

4.1 Produktion von IL-8 in Hypophysentumoren

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass alle untersuchten Tumoren (12 hormoninaktive und 4 somatotrope Hypophysenadenome) in Primärzellkultur bereits unter basalen Bedingungen Interleukin-8 sezernierten. Die Produktionsraten waren dabei in beiden Tumortypen extrem variabel (Abbildungen 5 und 6) und es war offensichtlich, dass sich hormoninaktive und somatotrope Adenomzellkulturen hinsichtlich der basalen IL-8 Produktion nicht voneinander unterschieden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Befunde von Vindelov et al. (2011), die in somatotropen Hypophysenadenomzellkulturen ebenfalls eine Produktion von IL-8 beobachteten. Andere Autoren untersuchten mittels RT-PCR bzw. in situ Hybridisierung die IL-8 mRNA Synthese und mit Hilfe immunhistochemischer Methoden die IL-8 Expression in Hypophysentumoren. Mit einer Ausnahme (Sulimann et al., 1999) konnte dabei IL-8 in allen untersuchten Hypophysenadenomen nachgewiesen werden (Green et al., 1996; Magagna-Poveda et al., 2013). Insgesamt und im Vergleich zu anderen Zytokinen gibt es allerdings nur wenige Studien zur Expression und Produktion von IL-8 in Hypophysentumoren; insbesondere fehlen Untersuchungen über die IL-8 Expression in der gesunden Hypophyse, so dass unklar ist, ob die IL-8 Produktion ein adenomspezifisches Phänomen darstellt. Hier besteht noch erheblicher Forschungsbedarf.

Unklar ist auch, in welchen Zellen IL-8 in Hypophysentumoren gebildet wird. In der normalen Hypophyse wird eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und weiteren Peptiden von den endokrinen Zellen selbst sowie von FS-Zellen synthetisiert (Perez-Castro et al., 2012, Renner et al., 2001). Die letzt genannten nehmen oft bei auto-/parakrinen Regelmechanismen eine Schlüsselrolle ein, da viele der Substanzen hauptsächlich oder sogar ausschließlich von diesen produziert werden (Denef, 2008, Renner et al. 1996). Da alle intrahypophysär gebildeten immunmodulatorisch wirksamen Faktoren in FS-Zellen gefunden wurden, wird

möglicherweise auch IL-8 in FS-Zellen gebildet. Untersuchungen hierzu gibt es allerdings nicht. Und selbst wenn FS-Zellen die Quelle von IL-8 wären, bliebe unklar, ob FS-Zellen in ausreichend großer Zahl in Hypophysentumoren vorkommen. Aus einer Reihe von Studien ist bekannt, dass im Adenomgewebe keine bzw. nur sehr wenige FS-Zellen zu finden sind (Höfler et al., 1984, Renner et al., 2006, Ueta et al., 1995). Die Befunde, dass in einer Transitionszone an der Grenze zwischen normalen Hypophysengewebe und Tumor, FS-Zellen der vorherrschende Zelltyp sind, ist für meine Arbeit nicht relevant, da das für die Primärkultur verwendete Tumorgewebe aus den inneren Teilen größerer Adenome stammt. Dass FS-Zellen die Quelle für IL-8 in den hier untersuchten Adenomzellkulturen darstellen, ist daher ziemlich unwahrscheinlich.

Hypophysenadenome sind monoklonalen Ursprungs. Nach einer somatischen Mutation einer einzelnen Zelle kommt es zur klonalen Expansion (Alexander et al., 1990, Gicquel et al., 1992, Herman et al., 2009, Schulte et al., 1991). Voraussetzung für die Tumorprogression ist die Fähigkeit der Zelle, den inhibitorischen Wirkungen von wachstumshemmenden Faktoren zu entkommen bzw. autokrine Mechanismen zu entwickeln, um ein autonomes Wachstum zu ermöglichen. Somit ist eine tumoreigene Produktion von wachstumsfördernden Substanzen essentiell für die Tumorgenese und es wurde gezeigt, dass Faktoren wie IL-6 oder VEGF-A, die in normalen Hypophysen in FS Zellen gebildet wurden, in Hypophysenadenomen von den Tumorzellen selbst sezerniert wurden (Renner et al., 1996). Vermutlich gilt dies auch für IL-8. Denkbar wäre ebenso, dass vereinzelt in Hypophysenadenomen vorkommende, nicht neoplastische Zellen wie Fibroblasten oder Immunzellen IL-8 produzieren. In früheren Studien konnte man allerdings keine Immunzellen in Adenomprimärzellkulturen nachweisen (Arzt et al., 1993). Unmittelbar nach dem Anwachsen der Adenomzellkultur, wenn die IL-8 Experimente durchgeführt werden, finden sich nur ganz vereinzelt spindelförmige Fibroblasten. Im Vergleich zu Adenomzellen ist deren Anzahl so gering, dass es unwahrscheinlich scheint, dass sie für die Produktion der enormen Mengen an IL-8 verantwortlich sein könnten. Auch wenn aktuell noch nicht endgültig geklärt ist, aus welchem Zelltyp das gemessene Interleukin-8 stammt, ist eine Sekretion durch die Tumorzellen selbst am wahrscheinlichsten.

Unklar bleibt auch, warum die untersuchten Adenome IL-8 unter basalen Bedingungen in unterschiedlichen Mengen produzieren. Hier müsste im Zuge künftiger Untersuchungen überprüft werden, ob zum Beispiel die extrem hohe IL-8 Produktion auf konstitutiv aktivierte regulatorische Faktoren der IL-8 Synthese (z.B. NF-kappaB) zurückzuführen ist und welche Ursache dieser Aktivierung zugrunde liegt.

4.2 Regulation von IL-8 in Hypophysenadenomen

Es ist bekannt, dass in Hypophysenadenomen produzierte Zytokine ähnlich wie in Immunzellen reguliert werden. So wird zum Beispiel IL-6 in Hypophysenadenomen durch bakterielle Pathogene (z.B. LPS) stimuliert, während anti-inflammatorisch wirksame Glukokortikoide bzw. das synthetische Glukokortikoid Dexamethason die IL-6 Produktion stark inhibieren. Die hier durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von LPS auf die IL-8 Sekretion in Adenomzellkulturen zeigten, dass auch die IL-8 Produktion durch LPS konzentrationsabhängig stimuliert werden konnte. Dies bestätigt die Beobachtungen in anderen Tumorzelllinien, wie z.B. Kolonkarzinomzellen, wo LPS ebenfalls die IL-8 Sekretion erhöhte (Grandel et al., 2009, Klaffenbach et al., 2005, Tang, Zhu, 2012). Wie bereits beschrieben stimuliert LPS, als Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, unter physiologischen Bedingungen das Immunsystem und bewirkt auf diese Weise eine Freisetzung von IL-8 (Brasier et al., 1998, Hoffmann E et al., 2002, Sonoda et al., 1997). Da, wie hier gezeigt, auch die Tumorzellen auf LPS reagieren, ist anzunehmen, dass in den Zellen der gleiche Signalweg vorliegt. Eine entscheidende Rolle spielt dabei der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Dobrovolskaia, Vogel, 2002; Zangh et al., 1999). Zudem müssen die Zellen den Rezeptor für LPS, den TLR4, exprimieren. Die Hypophysenadenome zeigen also nicht nur eine basale IL-8 Sekretion, sondern können diese auch noch steigern. Es ist davon auszugehen, dass eine solche Stimulation nicht nur durch LPS, sondern auch durch andere pro-inflammatorische Botenstoffe wie TNF- α oder IL-1 bewirkt werden kann. Für andere Tumorarten konnte dies bereits nachgewiesen werden (Wang et al., 2012, Wigmore et al., 2001, Xie et al., 2001). In Hypophysenadenomen sind jedoch zukünftige Untersuchungen nötig.

Die Stimulationsexperimente zeigten, dass IL-8 nicht unbegrenzt stimuliert werden konnte. Bei 24-stündiger Stimulation mit maximaler LPS-Konzentration wurde ein Grenzwert erreicht, der für die nicht Hormon-produzierenden Hypophysentumore bei ca. 10ng/ml (Tabelle 3), für die somatotropen Adenome bei ca. 13ng/ml (Tabelle 4) lag. Die Zellkulturen besitzen hier offensichtlich eine maximale Sekretionskapazität. Einer der Gründe hierfür dürfte die Dichte der TLR4 Rezeptoren auf der Zelloberfläche sein. Wenn alle TLR4 Rezeptoren mit LPS besetzt sind, wäre auch bei höheren LPS Konzentrationen keine weitere Stimulation der IL-8 Sekretion möglich. Zudem ist auch der intrazelluläre IL-8 Produktionsapparat nicht unbegrenzt stimulierbar und dementsprechend die IL-8 Ausschüttung limitiert.

Ein anderer wichtiger Punkt, den ich durch meine Messungen feststellen konnte, ist das unterschiedliche Ansprechen der Zellkulturen auf die Stimulation mit LPS. Wie die Abbildungen 9 und 12 verdeutlichen, ist die prozentuale Konzentrationszunahme bei den

Kulturen, die niedrige basale IL-8 Konzentrationen aufweisen wesentlich stärker als bei Tumoren mit höherer basaler Sekretion. Es ist möglich, dass sich die TLR4 Rezeptordichte der unterschiedlichen Tumortypen unterscheidet und somit Zellen mit einer höheren Rezeptorausstattung stärker auf LPS reagieren. Diese wären also tatsächlich sensibler gegenüber LPS und besser stimulierbar. Auf der anderen Seite ist es auch vorstellbar, dass diejenigen Zelllinien mit hohen basalen IL-8 Konzentrationen schon initial annähernd maximal IL-8 sezernieren und daher nicht weiter stimuliert werden können. Die mit niedriger Basalsekretion haben also die gleiche Kapazität, sind allerdings noch nicht stimuliert. Diese Annahme wirft allerdings, wie schon im vorhergehenden Kapitel erwähnt, die Frage auf, wie die basale IL-8 Sekretion der Hypophysentumore reguliert wird und aus welchen Gründen manchen Tumortypen überhaupt eine stärkere basale Produktion aufweisen.

In meiner Arbeit habe ich auch den Einfluss von Dexamethason auf die IL-8 Sekretion in Hypophysenadenomzellkulturen untersucht, da dieses synthetische Glukokortikoid immunsuppressiv wirkt und die Expression vieler proinflammatorischer Zytokine, unter ihnen IL-8, inhibiert. Unter physiologischen Bedingungen hemmt es die IL-8 Sekretion in verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Neutrophilen oder Fibroblasten (Kwon et al., 1994), aber auch in IL-8 produzierenden Tumorzellen wie Glioblastomzellen oder Lungen-Karzinomzellen konnte eine Hemmung der IL-8 Sekretion nachgewiesen werden (Chen et al., 2003). Diese Beobachtungen bestätigten sich in meiner Arbeit. Dexamethason zeigt einen signifikant hemmenden Einfluss auf alle untersuchten Hypophysentumore (9 NFPA's und 2 GH-produzierende Tumore, Abbildung 13 und 14). Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte allerdings nicht bei allen Zelllinien nachgewiesen werden. Das Ansprechen der Zellkulturen unterschied sich stark, es war mit der verwendeten Höchstdosis von 1000 nM Dexamethason jedoch nicht möglich, die IL-8 Sekretion komplett zu inhibieren. Eine Suppression stärker als 50% im Bezug zum basal gemessenen Wert wurde nicht erreicht, wie Tabelle 8 zeigt. Die Gründe hierfür sind ähnlich den oben aufgeführten Überlegungen zur Wirkung von LPS. Dexamethason bindet allerdings nicht an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche, sondern diffundiert als synthetisches Steroid in die Zelle, wo sich ein cytosolischer Rezeptor (Glukokortikoid-Rezeptor, GR) befindet. Der Hormon-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und bindet dort an CREs der DNA (Kwon et al., 1994). Auch hier ist die Menge an GR und anderen Elementen der beschriebenen Signalkaskade begrenzt. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Inkubationszeit von Dexamethason nur 24 Stunden betrug. Dexamethason wirkt über die CREs auf transkriptioneller Ebene, hemmt also die mRNA Synthese bestimmter Zielgene, darunter IL-8. Die Auswirkung auf die Translation von IL-8

mRNA in IL-8 Protein erfolgt mit einer gewissen Zeitverzögerung und bereits synthetisiertes, in den Adenomzellen gespeichertes Interleukin-8 kann zunächst noch weiterhin sezerniert werden. Daher wäre in zukünftigen Projekten zu untersuchen, ob und wie viel IL-8 die Tumorzellen speichern können, ob Dexamethason die IL-8 Produktion komplett inhibieren kann und wie lange dieser Prozess dauert.

Da sowohl der stimulierende Effekt von LPS, als auch die inhibierende Wirkung von Dexamethason nachgewiesen werden konnten, wurden abschließend kombinierte Versuche durchgeführt. In allen untersuchten Adenomzellkulturen inhibierte Dexamethason dosisabhängig und signifikant die LPS-stimulierte IL-8 Sekretion, wobei der Ausgangswert allerdings in keinem Stimulationsexperiment erreicht wurde. Dies deutet darauf hin, dass der stimulierende Einfluss von LPS stärker ist als der inhibierende Effekt von Dexamethason. Hier könnte aber erneut die Inkubationszeit wichtig sein. Dexamethason zeigt, wie oben beschrieben, eine verzögerte Wirkung, LPS wirkt jedoch direkt. Es ist also möglich, dass bei längerer Inkubationszeit die IL-8 Konzentrationen auf den Ausgangswerte von nicht mit LPS behandelten Adenomzellkulturen sinken würden. Zudem stellte sich heraus, dass die relative Hemmung durch Dexamethason nach Stimulation mit LPS stärker ist, als die Hemmung der basalen IL-8 Sekretion. Ein Unterschied zeigt sich allerdings vor allem bei Tumoren, die stark auf LPS ansprechen, deren Kapazität zur Sekretionssteigerung also groß ist. Dies sind Tumore mit niedrigen basalen IL-8 Konzentrationen, wie oben bereits diskutiert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass alle untersuchten Hypophysentumoren Interleukin-8 in hohen Mengen sezernieren. Das Ansprechen auf stimulierende oder inhibierende Einflüsse variiert jedoch stark.

4.3 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von IL-8 in Hypophysentumorzellen

Viele Tumortypen sezernieren sowohl konstitutiv als auch stimuliert IL-8 in hohen Konzentrationen (Andrew et al., 1995, Kunz et al., 1999, Le et al., 2000, Singh et al., 1994, Shi et al., 1999, Yuan et al., 2005). In verschiedenen Tumoren wie Mamma-, Magen oder Pankreaskarzinomen wurden auch entsprechende IL-8 Rezeptoren nachgewiesen (Blogowski et al., 2014, Li et al., 2014, Singh et al., 2013), so dass anzunehmen ist, dass IL-8 auto- und parakrin in den entsprechenden Tumorgewebe wirksam ist. Es konnte gezeigt werden, dass IL-8 ein kritischer Faktor für die Proliferation, Vaskularisierung und Metastasierung von verschiedenen Tumortypen ist (Bizzarri et al., 2006, Strieter et al., 2004, Chen et al., 2012, Mestas et al., 2005).

Zur Expression des IL-8 Rezeptors CXCR2 in normalen menschlichen Hypophysen und einer sehr kleinen Anzahl von Hypophysentumoren wurde bisher eine einzige immunhistochemische Studie publiziert, in der gezeigt wurde, dass der CXCR2 im normalen Hypophysenvorderlappen in allen hormonproduzierenden Zelltypen vorkommt, und dass er in allen untersuchten Hypophysenadenomen exprimiert wird (Tecimer et al., 2000). Es ist daher anzunehmen, dass das von Hypophysenadenomzellen gebildete IL-8 in auto-/parakriner Weise auf Hypophysentumorzellen einwirken kann. Welche Wirkung es tatsächlich hat, ist jedoch unbekannt. Daher habe ich in meiner Arbeit untersucht, ob IL-8 das Wachstum von Hypophysentumorzellen beeinflussen kann und habe exemplarisch am Beispiel von ACTH die Wirkung von IL-8 auf die Hormonsekretion von Hypophysentumorzellen überprüft.

Für Wachstumsuntersuchungen sind Primärzellkulturen von Hypophysenadenomen ungeeignet, da sich die Zellen in Kultur nicht oder fast nicht messbar vermehren. Da ich aus den untersuchten somatotropen Hypophysenadenomen nur begrenzte Mengen an Zellen für die Primärkultur gewinnen konnte, standen auch nicht genügend Zellen zur Untersuchung des Effektes von IL-8 auf die Sekretion von GH in humanen somatotropen Adenomen zur Verfügung. Daher untersuchte ich den Einfluss von Interleukin-8 auf die Zellproliferation und Hormonsekretion in der AtT20-Zelllinie. Die Zellen wurden aus kortikotropen Hypophysenadenomen der Maus gewonnen und dienen als Modell für einen ACTH-produzierenden Tumor (Gamby et al., 1996, Orth et al., 1973).

IL-8 zeigt in keinem der Stimulationsexperimente einen wachstumsfördernden Effekt auf die AtT20-Zellen. Dies steht im Widerspruch zu vielen Studien, die eine mitogene Wirkungsweise von IL-8 auf verschiedene Tumortypen nachweisen konnten (Brew et al., 2000, Galffy et al., 1999, Norgauer et al., 1996, Singh et al., 1994, Yuan A et al., 2005). Es ist nun zu diskutieren, ob dies auf besondere Gegebenheiten hinsichtlich der IL-8/IL-8-Rezeptor-Expression in Mäusen zurückzuführen ist oder ob IL-8 tatsächlich keine Proliferationssteigerung in Hypophysenadenomen hervorruft. Mausähnliche Säugetiere (Maus, Ratte, also „klassische“ Versuchstiere in der biomedizinischen Forschung) können kein IL-8 bilden, in diesen Tieren übernimmt das IL-8 Homologon KC die Funktion von IL-8 und ist über einen entsprechenden KC-Rezeptor wirksam. Aufgrund der starken Rezeptorhomologie des murinen KC-Rezeptors zu den humanen CXCR1/2-Rezeptoren habe ich mich entschieden, in meiner Versuchsreihe humanes IL-8 zur Stimulation von AtT20 Zellen zu verwenden. Aus anderen Arbeiten kann allerdings entnommen werden, dass die EC50 für die Bindung von humanem IL-8 an den KC-Rezeptor ca. 300nM beträgt (entspricht 2500ng/ml), die Affinität ist also gering (Bozic et al., 1994, Cerretti et al., 1993). Es stellt sich die Frage, ob die Zellen generell nicht responsiv auf

IL-8 sind, oder ob zu geringe Konzentrationen verwendet wurden. Aus diesem Grund wurde der gleiche Versuch noch einmal unter der Verwendung des murinen Homologons KC durchgeführt. Doch auch hier zeigte sich keine stimulierende Wirkung auf die Proliferation der AtT20-Zellen. Es ist also in weiteren Arbeiten zu untersuchen, ob die AtT20-Zellen überhaupt einen KC-Rezeptor besitzen. Zudem ist es wichtig, nochmals darauf hinzuweisen, dass hier nur mit einer Mauszelllinie gearbeitet wurde, die als Modell eines Hypophysentumors dienen soll. Es wäre also fraglich, in wie weit die gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

Des Weiteren habe ich in AtT20 Zellen überprüft, ob IL-8 die Sekretion von ACTH beeinflusst und habe die Wirkung von IL-8 auch vergleichend oder in Kombination mit anderen Faktoren, die die ACTH Sekretion beeinflussen (CRH, Forskolin, Dexamethason) untersucht. Das hypothalamische Corticotropin-releasing Hormon (CRH) ist physiologischerweise verantwortlich für die Stimulation der Produktion und Freisetzung von ACTH (Renner et al., 2001). Auch im Modellversuch konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 24). Ebenso die Wirkung von Dexamethason. Das Steroid hemmt die Transkription von POMC, dem Vorläufermolekül von ACTH (Birnberg et al., 1983, Kant et. al., 1989). Nach Inkubation mit Dexamethason sank die ACTH Konzentration der AtT20-Zellen (Abbildung 26). Diese Ergebnisse zeigen, dass die AtT20-Zellen durchaus als Modell für einen kortikotropen Hypophysenadenom geeignet sind: Die Zellen sezernieren ACTH, sind CRH responsiv und können durch Dexamethason gehemmt werden.

Forskolin gilt als Stimulator der ACTH Sekretion. Über einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg führt es zur Freisetzung des Hormons (Insel, Ostrom, 2003, Luini et al., 1985). Die Messungen an AtT20-Zellen bestätigten diese Wirkungsweise jedoch nicht. Forskolin zeigt keine signifikanten Effekte. Es ist möglich, dass die maximal verwendete Konzentration von $5\mu\text{m}$ zu niedrig war. Andererseits könnte ein anderer Sekretionsmechanismus zu Grunde liegen und folglich ein Ca^{2+} -Anstieg in den murinen Zellen keine ACTH Freisetzung bewirken.

Interleukin-8 zeigte in keiner Versuchsreihe einen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss auf die Hormonsekretion der AtT20-Zellen. Weder die basale ACTH-Sekretion, noch die simultane Inkubation mit CRH, Dexamethason und Forskolin konnte durch IL-8 signifikant verändert werden. Für die Stimulation wurde, wie schon bei der Thymidin-Inkorporation, humanes IL-8 verwendet. Aufgrund der hohen Rezeptor-Homologie der humanen CXCR1/2-Rezeptoren mit dem murinen KC-Rezeptor, sollte untersucht werden, ob IL-8 Effekte in Bezug auf die Hormonproduktion der Zellen erzeugen kann. Wie jedoch Bozic et al. gezeigt haben, ist

die EC50 der murinen Rezeptoren für humanes IL-8 sehr hoch und für unsere Versuche wären technisch nicht realisierbare Konzentrationen nötig (Bozic et al., 1994, Cerretti et al., 1993). Es bleibt in zukünftigen Untersuchungen zu klären, welche Ursachen das Nicht-Anprechen der AtT20-Zellen auf IL-8 hat. Liegt es rein an der Verwendung des humanen IL-8 oder exprimiert diese Zelllinie gar keinen Rezeptor für KC? Leider stammen auch alle anderen in der Hypophysentumorforschung eingesetzten Zelllinien von Mäusen oder Ratten ab. Die einzige humane, endokrin inaktive Zelllinie HP75 ist genetisch instabil und ihr Stellenwert als Modellzelllinie für humane Hypophysentumoren in der Fachwelt umstritten (Jin et al., 1998). Denkbar wäre, für zukünftige in vitro Studien Expressionsplasmide, die das Gen für den humanen IL-8 Rezeptor tragen, in Maus-Hypophysentumorzellen einzuschleusen um auf diese Weise Zellklone zu erzeugen, die humane IL-8 Rezeptoren enthalten. Vorausgesetzt die Rezeptoren wären funktionell aktiv, könnte man die Klone dann für Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von IL-8 einsetzen.

4.4 Schlussfolgerungen

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-8 wird intratumoral von einer Vielzahl von Tumortypen produziert, wo es über ebenfalls in den Tumoren exprimierte IL-8 Rezeptoren die Proliferation, Neovaskularisation und Metastasebildung stimuliert. IL-8 ist in diesen Tumoren ein wichtiger tumorigener Faktor und oft im Serum der betroffenen Patienten erhöht. In vielen Tumorarten konnte eine positive Korrelation der IL-8-Werte mit verschiedenen prognostischen Kriterien wie Tumorgrading, klinischem Stadium, Überlebensraten oder rezidivfreie Intervalle nachgewiesen werden (Ahmed et al., 2006, Bizzarri et al., 2006, Chen et al., 2012, Cheng et al., 2014, Mateo et al., 2012). Auch konnte bereits gezeigt werden, dass neutralisierende Antikörper gegen IL-8, Inhibitoren der IL-8 Produktion oder IL-8-Rezeptor-Antagonisten in verschiedenen Tumortypen sowohl in vitro als auch in vivo anti-tumorigen wirksam sind (Xie, 2001; Wells et al., 1996; Olbina et al., 1996; Hoffmann et al., 2002; Waugh, Wilson, 2008; Le et al., 2000; Moore et al., 1999; Strieter et al., 2004; Mestas et al., 2005; Huang et al., 2002).

Ich konnte feststellen, dass Hypophysentumore variable und überwiegend große Mengen an IL-8 produzieren, wobei die Produktion durch LPS weiter gesteigert und durch das synthetische Glukokortikoid Dexamethason stark gehemmt werden kann. Während aber IL-8 in den meisten Tumoren einen Marker für die Aggressivität darstellt, bleibt die Bedeutung der hohen intratumoralen IL-8 Produktion in Hypophysenadenomen unklar, weil diese überwiegend benignen Neoplasien einen niedrigen Proliferationsindex (<0,1%), einen sehr geringen Vaskularisationsgrad, kaum invasives Wachstum und keine Metastasenbildung aufweisen (Asa,

1998, Renner et al., 2001). Ob IL-8 in Hypophysenadenomen funktionell von Bedeutung ist und warum IL-8 in diesen Tumoren im Gegensatz zu vielen Karzinomen nicht tumorigen wirksam ist, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Interleukin-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin aus der Gruppe der CXC-Chemokine, das physiologisch nicht nur von Immunzellen, sondern vielen weiteren Zelltypen wie Epithelzellen oder Fibroblasten sezerniert wird. Neben seiner immunmodulierenden Wirkung besitzt IL-8 als Mitglied der ELR-positiven Chemokine eine proangiogenetische Potenz. In vielen Tumortypen konnte eine Expression von IL-8 und den entsprechenden Rezeptoren nachgewiesen werden. Dadurch kann das Zytokin auf auto- und parakrine Weise Tumorentstehung, Wachstum, Neovaskularisation und Metastasierung beeinflussen und als pro-onkogenetischer Faktor fungieren. Die Expression, Regulation und pathophysiologische Bedeutung von IL-8 in Hypophysentumoren ist weitgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression von IL-8 in humanen Hypophysenadenomen sowie einige funktionelle Aspekte untersucht. Mittels ELISA konnte IL-8 in allen untersuchten Hypophysentumoren in hohen Mengen nachgewiesen werden. Von Tumor zu Tumor zeigten sich starke Konzentrationsunterschiede. Zudem ist die Expression von IL-8 in humanen Hypophysenadenomkulturen durch LPS dosisabhängig stimulierbar und durch Dexamethason hemmbar. Funktionelle Untersuchungen zur Wirkung von Interleukin-8 wurden an AtT20-Zellen durchgeführt, einer Mauszelllinie, die als Modell für kortikotrope Hypophysentumoren dient. Wachstum und ACTH-Sekretion wurden durch IL-8 nicht beeinflusst. Mit Hilfe der ³H-Thymidin-Inkorporation konnte kein proliferationsfördernder Effekt nachgewiesen werden. Als Ursache dafür ist die Verwendung von humanem IL-8 statt dem murinen Homologen KC in Betracht zu ziehen. Die gleiche Versuchsreihe unter Einsatz von KC erbrachte jedoch ebenso keine mitogenen Effekte. Der Einfluss auf die Hormonproduktion der AtT20-Zellen wurde mittels RIA untersucht. Humanes IL-8 zeigt keine stimulierende oder inhibierende Wirkung auf die ACTH-Sekretion der Adenomzellen. Es bleibt zu eruieren, ob diese Ergebnisse allein durch den Gebrauch von humanem IL-8 zu erklären sind, oder ob diese Zelllinie keine Rezeptoren für IL-8 exprimiert. Meine Arbeit verdeutlicht die Komplexität der hypophysären Regulationsmechanismen bzw. die Schwierigkeiten, die sich daraus für Untersuchungen in vitro sowie die Übertragung von Modelldarstellungen auf den Menschen ergeben.

Hypophysenadenome zeigen, wie hier nachgewiesen, eine zum Teil exzessive IL-8 Produktion, die durch LPS gesteigert und durch Dexamethason inhibiert werden kann. Welche pathophysiologische Bedeutung die intratumorale IL-8 Produktion für die Progression, Angiogenese oder Invasivität von Hypophysenadenomen hat, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

Addison CL, Daniel TO, Burdick MD (2000). The CXC Chemokine Receptor 2, CXCR2, Is the Putative Receptor for ELR+ CXC Chemokine-Induced Angiogenic Activity. *The J of Immunol* 2000; 165:5269-5277.

Ahmed OI, Adel AM, Diab DR et al. (2006). Prognostic value of serum level of interleukin-6 and interleukin-8 in metastatic breast cancer patients. *Egypt J Immunol* 13(2):61-68.

Ahuja SK, Murphy PM (1996). The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem* 271:20545-20550.

Alexander JM, Biller BMK, Bikkal H et al. (1990). Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* 86:336-40.

Allaerts W, Jeucken PHM, Debets R et al. (1997). Heterogeneity of pituitary folliculostellate cells: Implications for IL-6 production and accessory function in vitro. *J neuroendocrinol* 9:43-53.

Allaerts W, Vankelecom H (2005). History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur Endocrinol* 153(1):1-12.

Ambrosi B, Faglia G (1991). Epidemiology of pituitary tumors. In: Faglia G, Beck-Peccoz P, Ambrosi B (eds.). *Pituitary adenomas: new trends in basic and clinical research*. Amsterdam: Elsevier, S.159-168.

Andrew PJ, Harant H, Lindley IJ (1995). Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 214:949-956.

Aoki A, de Gaisan EO, Pasolli HA et al. (1996). Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104: 256-262.

Arzt E, Buric R, Stelzer G et al. (1993). Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* 132(1):459-467.

Arzt E, Pereda MP, Castro CP (1999). Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front neuroendocrinol* 20(1): 71-95.

Asa SL (1998). Tumors of the pituitary gland. In: *Atlas of Tumor Pathology* 3(22). Washington, D.C.: Armed Forces Inst. Pathol.

Asa SL, Ezzat S (1998). The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 19: 798-827.

Asa SL, Ezzat S (2002). The pathogenesis of pituitary tumors. *Nature Rev Cancer* 2(11): 836-849.

Asa SL, Ezzat S (2009). The Pathogenesis of Pituitary Tumors. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 4:97-126.

Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992). Interleukin-8, a Chemotactic and Inflammatory Cytokine. *FEBS Letters* 307(1):97-101.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-179.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997). Human chemokines: An update. *Annu Rev Immunol* 15:675-705.

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84(4):1045-1049.

Balkwill F (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4:540-550.

- Barinaga M, Bilezikjian LM, Weston AP et al.** (1985). Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314:279-281.
- Besedovsky HO, del Ray A** (1996). Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17:64-102.
- Birnberg NC, Lissitzky JC, Hinman M et al.** (1983). Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the level of transcription and secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6982-6986.
- Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R et al.** (2006). ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacology & Therapeutics* 112:139–149.
- Błogowski W, Deskur A, Budkowska M et al.** (2014). Selected cytokines in patients with pancreatic cancer: a preliminary report. *Plos One* 9(5):e97613.
- Boggild MD, Jenkinson S, Pistorello M et al.** (1994). Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 78:387-92.
- Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C et al.** (1992). The Murine Interleukin 8 Type B Receptor Homologue and Its Ligands. *The Journal of Biological Chemistry* 269(47):29355-20358.
- Brasier AR, Jamaluddin M, Casola A et al.** (1998). A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of RelA, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem* 273:3551-3561.
- Brat D, Bellail AC, Van Meir EG** (2005). The Role of Interleukin-8 and its Receptors in Gliomagenesis and tumoral Angiogenesis. *Neuro-Oncology* 7(2):122-133.

Brew R, Erikson JS, West DC et al. (2000). Interleukin-8 as an autokrin growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 12:78-85.

Ceretti DP, Nelson N, Kozlosky CJ (1993). The Murine Homologue of the Human Interleukin-8 Receptor Type B maps near the Ity-Lsh-Bcg Disease Resistance Locus. *Genomics* 18:410-413.

Chanson P, Salenave S (2004). Diagnosis and treatment of pituitary adenomas. *Minerva Endocrinol* 29(4): 241-75.

Chen JJW, Yao P-L, Yuan A et al. (2003). Up-Regulation of Tumor Interleukin-8 Expression by Infiltrating Macrophages: Its correlation with Tumor Angiogenesis and Patient Survival Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 9:729-737.

Chen Y, Shi M, Yu GZ et al. (2012). Interleukin-8, a promising predictor for prognosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 18(10): 1123-1129.

Cheng D, Kong H, Li Y (2014). Prognostic value of interleukin-8 and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271(3):503-9.

Cheunschon P, Zhou Y, Zhang X et al. (2001). Silencing of the imprinted DLK1-MEK3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *The American J of Pathol* 179(4):2120-2130.

Chrousos GP (1995). The hypothalamic-pituitary adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332: 1351-1362.

Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T et al. (1993). Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3574-3577.

Clayton RN (1999). Sporadic pituitary adenomas: from epidemiology to use of databases. *Baillière's Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 13(3): 451-460.

Daly AF, Burlacu MC, Livaduriu E et al. (2007). The epidemiology and management of pituitary incidentalomas. *Horm Res* 68(5): 195-8.

Dauletbaev N, Eklove D, Mawji N et al. (2011). Down-regulation of Cytokine-induced Interleukin-8 requires Inhibition of p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) via MAPK Phosphatase 1-dependent and -independent Mechanisms. *J Biol Chem* 286:15998-16007.

Davis RJ (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP Kinases. *Cell* 103:239-252.

Denef C (2008). Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 20(1):1-70.

Devnath S, Inoue K (2008). An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol* 20:687-691.

Dobrovolskaia MA, Vogel SN (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection* 4:903-914.

Elias KA, Weiner RI (1984). Direct arterial vaskularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. *Proc Natl acad Sci USA* 81:4549-4553.

Ezzat S, Asa SL (2006). Mechanisms of disease: The pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:220-230.

Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT et al. (2004). The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 101(3): 613-619.

Farnoud MR, Kujas M, Derome P et al. (1994). Interaction between normal and tumoral tissues at the boundary of human anterior pituitary adenomas: An immunohistochemical study. *Virchows Arch* 424:75-82.

Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA et al. (2001). Folliculostellate cell network: a route for longdistance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8891-8896.

Fernandez A, Karavitaki N, Wass JA (2010). Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf)* 72(3):377-382.

Galfy G, Mohammed KA, Dowling PA et al. (1999). Interleukin-8: an autocrine growth factor for malignant mesothelioma. *Cancer Res* 59:367-371.

Gamby C, Waage MC, Allen RG et al. (1996). Growth-associated Protein-43 (GAP-43) facilitates Peptide Hormon Secretion in Mouse Anterior Pituitary AtT-20 Cells. *J Biol Chem* 271:10023-10028.

Gicquel C, LeBouc Y, Luton JP et al. (1992). Monoclonality of corticotroph macroadenomas in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metabol* 75:472-475.

Giometto B, Miotto D, Botteri M et al. (1997). Folliculo-stellate cells of human pituitary adenomas: immunohistochemical study of the monocyte/macrophage phenotype expression. *Neuroendocrinol* 65:47-52.

Grandel U, Heygster D, Sibelius U et al. (2009). Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil cocultures. *Mol Cancer Res* 7(10):1729-1735

Green VL, Atkin SL, Speirs V et al. (1996). Cytokine expression in human anterior pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 45(2):179-185.

Hebert CA, Baker JB (1993). Interleukin-8: A review. *Cancer Invest* 11:743-750.

Herkenham M (2005). Folliculo-stellate (FS) cells of the anterior pituitary mediate interactions between the endocrine and immune systems. *Endocrinol* 146:33-34.

Herman V, Drazin NZ, Gonsky R et al. (1993). Molecular screening of pituitary adenomas for gene mutations and rearrangements. *J Clin Endocrinol Metab* 77:50-55.

Herman V, Fagin J, Gonsky R et al. (1990). Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1427-1433.

Hertzer KM, Donald GW, Hines OJ (2013). CXCR2: a target for pancreatic cancer treatment? *Expert Opin Ther Targets* 17(6):667–680.

Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O., Holtmann H, et al. (2002). Multiple Control of Interleukin-8 Gene Expression. *J of Leukocyte Biol* 72:847-855.

Höfler H, Walter GF, Denk H (1984). Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and in pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* 65:35-40.

Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G (2010). The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of Leukocyte Biology* 85:501-508.

Holmes WE, Lee J, Kuang WJ et al. (1991). Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253:1278-1280.

Horcher M, Rot A, Aschauer H et al. (1998). IL-8 derivatives with a reduced potential to form homodimers are fully active in vitro and in vivo. *Cytokine* 10:1-12.

Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC et al. (1993). A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: The erythrocyte chemokine receptor. *Science* 261:1182-1184.

Huang S, Mills L, Mian B et al. (2002). Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 161(1):125–134.

Inoue K, Couch EF, Takano K et al. (1999). The structure and function of folliculo-stellate cell in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol* 62:205-218.

Insel PA, Ostrom RS (2003). Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol* 23(3):305-314.

Jin L, Kulig E, Qian X et al. (1998). A human pituitary adenoma cell line proliferates and maintains some differentiated functions following expression of SV40 large T-Antigen. *Endocrine Pathology* 9(2): 169-184.

Kant GJ, Mougey EH, Brown AJ et. al. (1989). Dexamethasone suppresses ACTH release without attenuating pituitary cyclic AMP response to stress in vivo. *Life Sci* 42(2): 125-131.

Karin M, Ben-Neriah Y (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.

Klauffenbach D, Rascher W, Röllinghoff M et al. (2005). Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell lines. *Am J Reprod Immunol* 53(2):77-84.

Knall C, Worthen GS, Johnson GL (1997). Interleukin-8 stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3052-3057.

Knall C, Young S, Nick JA et al. (1996). Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem* 271(5):2832-2838.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL (1992). Interleukin-8 as a macrophage derived mediator of angiogenesis. *Science* 258:1798-1801.

Kunsch C, Lang RK, Rosen CA et al. (1994). Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF κ B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 153(1):153-163.

Kunz M, Hartmann A, Flory E et al. (1999). Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness. *Am J Pathol* 155:753-763.

Kwon OJ, Au BT, Collins PD et al. (1994). Inhibition of Interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultures airway epithelial cells. *Immunol* 81:389-394.

Lamolet B, Pulichino AM, Lanonerie T et al. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-59

Lania A, Mantovani G, Spada A (2003). Genetics of pituitary tumors: focus on G-protein mutations. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:1004-1017.

Lattanzio L, Tinissi F, Torta I et al. (2013). Role of IL-8 induced angiogenesis in uveal melanoma. *Invest New Drugs* 31:1107-1114.

Le X, Shi Q, Wang B et al. (2000). Molecular regulation of constitutive expression of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma. *J Interferon Cytokine Res* 20:1532-1540.

Lemos M, Thakker RV (2008). Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Human mutation* 29:22-32.

Leonard EJ, Yoshimura T (1990). Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol* 2:479-486.

Li A, Dubey S, Varney ML et al. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170:3369-3376.

Li Z, Wang Y, Dong S et al. (2014). Association of CXCR1 and 2 expressions with gastric cancer metastasis in ex vivo and tumor cell invasion in vitro. *Cytokine* 69(1):6-13.

Luini A, Lewis D, Guild S et al. (1985). Hormone secretagogues increase cytosolic calcium by increasing cAMP in corticotropin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8034-8038.

Lüllmann-Rauch R (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, 3.Auflage.

Luppi F, Longo AM, de Boer WI et al. (2007). Interleukin-8 stimulates cell proliferation in small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung cancer* 56:25-33.

Magagna-Poveda A, Leske H, Schmid C et al. (2013). Expression of somatostatin receptors, angiogenesis and proliferation markers in pituitary adenomas: an immunohistochemical study with diagnostic and therapeutic implications. *Swiss Med Wkly* 143:w13895.

Mateo J, Heymach JV, Zurita AJ (2012). Circulating Biomarkers of Response to Sunitinib in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Current Data and Clinical Outlook. *Mol Diagn Ther* 16(3):1-17.

Melmed S (2002). The Pituitary. 2nd edition, Malden, MA: *Blackwell Science*.

Melmed S (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: The plastic pituitary. *J Clin Invest* 112: 1603-1618

Melmed S, Colao A, Barkan A et al. (2009). Guidelines for acromegaly management: an update. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1509-17.

Mestas J, Burdick MD, Reckam PK et al. (2005). The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J Immunol* 175(8):5351–5357.

Mete O, Ezzat S, Asa SL (2012). Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *Journal of Molecular Endocrinology* 49:R69–R78

Moore BB, Arenberg DA, Addison CL et al. (1998). Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. *J Lab Clin Med* 132:97-103.

Moore BB, Arenberg DA, Stoy K et al. (1999). Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol* 154(5):1503–1512.

Morand I, Fonlupt P, Guerrier A et al. (1998). Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: Evidence for gap junctions-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinol* 137:3356-3367.

Morley JE (1981). Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocr Rev* 2:396-436.

Mukaida N, Gussella GL, Kasahara T et al. (1992). Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line. *Immunol* 75:674-679.

Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y et al. (1993). Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 56:554-558.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-176.

Nasser MW, Marjoram RJ, Brown SL et al. (2005). Cross-desensitization among CXCR1, CXCR2, and CCR5: role of protein kinase C- ϵ . *J Immunol* 174:6927-6933.

Norgauer J, Metzner B, Schraufstatter I (1996). Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells. *J Immunol* 156(3):1132-1137.

Olbina G, Cieslak D, Ruzdijic S et al. (1996). Reversible inhibition of IL-8 receptor B mRNA expression and proliferation in non-small cell lung cancer by antisense oligonucleotides. *Anticancer Res* 16:3525-3530.

Orth DN, Nicholson WE, Allen RG et al. (1973). ACTH and MSH Production by a Single Cloned Mouse Pituitary Tumor Cell Line. *Endocrinol* 92(2):385-393.

Perez-Castro C, Nagashima AC, Pereda MC et al. (2000). The gp130 cytokines interleukin-11 and ciliary neurotropic factor regulate through specific receptors the function

and growth of lacto-somatotropic and folliculostellate pituitary cell lines. *Endocrinol* 141:1746-1753.

Perez-Castro C, Renner U, Haedo MR, et al. (2012). Cellular and Molecular Specificity of Pituitary Gland Physiology. *Physiol Rev* 92:1-38.

Petersenn S, Lüdecke DK, Fahlbusch R et al. (2006). Therapie von Hypophysentumoren. *Dtsch Ärzteblatt* 103(8): A-474/B-407/C-389.

Prezant T, Melmed S (2002). Molecular pathogenesis of pituitary disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 9:61-78.

Rajarithnam K, Sykes BD, Kay CM et al. (1994). Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264:90-92.

Raman D, Baugher PJ, Thu YM et al. (2007). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Letters* 256:137–165.

Rassow J, Hauser K, Netzker R et al. (2008). *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag, 2.Auflage.

Ray D, Melmed S (1997). Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 18: 206-228.

Renner U, Arzt E, Stalla GK (2006). Molekulare und pathologische Aspekte der para- und autokrinen Hypophysenregulation durch Zytokine und Wachstumsfaktoren. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*, ed. D. Ganten and K. Ruckpaul. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 239-260.

Renner U, Pagotto U, Arzt E et al. (1996). Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasoactive substances in normal and tumorous pituitary function and growth: A review. *Eur J Endocrinol* 135: 515-532

- Renner U, Schaaf L, Stalla GK** (2001). Hypothalamische und hypophysäre Erkrankungen. *Endokrinopathien, ed. D. Ganten and K. Ruckpaul*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 11-44.
- Ricciardolo FLM, Sorbello V, Benedetto S et al.** (2012). Bradykinin-and lipopolysaccharide-induced bradykinin B2 receptor expression, interleukin-8 release and "nitrosative stress" in bronchial epithelial cells BEAS-2B: Role for neutrophils. *Eur J Pharmacol* 694:30-38.
- Richardson RM, Ali H, Pridgeon BC et al.** (1998). Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 273:10690-10695.
- Riminucci M, Collins MT, Lala R et al.** (2002). An R201H activating mutation of the GNAS1 (G α) gene in a corticotroph pituitary adenoma. *Mol Pathol* 55:58-60.
- Rossi D, Zlotnik A** (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-242.
- Rosso L, Mienville JM** (2009). Pituicyte modulation of neurohormone output. *Glia* 57:235-243.
- Sabino SM, Miranda PAC, Ribeiro-Oliveira A** (2010). Growth hormone-secreting pituitary adenomas. From molecular basis to treatment options in acromegaly. *Cancer biology & therapy* 9: 483-492.
- Salcedo R, Resau JH, Halverson D et al.** (2000). Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 14:2055-2064.
- Sato T, Inoue K** (2000). Dendritic cells in the rat pituitary gland evaluated by the use of monoclonal antibodies and electron microscopy. *Arch Histol Cytol* 63:291-303.

Schadendorf D, Moller A, Algermissen B et al. (1993). IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 151:2667-2675.

Schechter J, Goldsmith P, Wilson C et al. (1988). Morphological evidence for the presence of arteries in human prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 67:713-719.

Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV et al. (2006). Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery* 59: 341-53

Schraufstatter IU, Chung J, Burger M (2001). IL-8 activates endothelial CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:1094-1103.

Schulte HM, Oldfield EH, Allolio B et al. (1991). Clonal composition of pituitary adenomas in patients with Cushing's disease: determination by X-chromosome inactivation analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1302-8

Shaar CJ, Clemens JA (1974). The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin in vitro. *Endocrinol* 95: 1202-1212.

Shaulian E, Karin M (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20(19):2390-2400.

Shi Q, Abbruzzese J, Huang S et al. (1999). Constitutive and inducible interleukin-8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res* 5:3711-3721.

Singh JK, Simões BM, Howell SJ et al. (2013). Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Research* 15:210.

Singh RK, Gutman M, Radinsky R (1994). Expression of interleukin-8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* 54:3242-3247.

Singh S, Singh AP, Sharma B, et al. (2010). CXCL8 and its Cognate Receptors in Melanoma Progression and Metastasis. *Future Oncology* 6(1):111.

Smith AI, Funder JW (1988). Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* 9:159-179.

So J, Navari J, Wang FQ et al. (2004). Lysophosphatidic acid enhances epithelial ovarian carcinoma invasion through the increased expression of interleukin-8. *Gynecol Oncol* 95:314-322.

Sonoda Y, Kasahara T, Yamaguchi T et al. (1997). Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vandate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 272:15366-15372.

Spada A, Arosio M, Bochicchio D et al. (1990). Clinical, biochemical, and morphological correlates in patients bearing growth hormone-secreting pituitary tumors with or without constitutively active adenylyl cyclase. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1421-1426.

Spangelo BL, Gorospe WC (1995). Role of cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front Neuroendocrinol* 16: 1-22.

Stalla GK, Stalla J, von Werner K et al. (1989). Nitroimidazole Derivatives inhibit Anterior Pituitary Cell Function apparently by a direct Effect on the catalytic Subunit of the Adenylate Cyclase Holoenzyme. *Endocrinol* 125(2):699-706.

Stokreef JC, Reifel CW, Shin SH (1986). A possible phagocytic role for folliculo-stellate cells of anterior pituitary following estrogen withdrawal from primed male rats. *Cell Tissue Res* 243:255-261.

Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA (2001). Clinical and molecular features of the carney Complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *The J of Clin Endocrinol and Metab* 86:4041-4046.

Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ et al. (2004). CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol* 14(3):195–200.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL et al. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270:27348-27357.

Suliman MER, Royda JA, Baxter L et al. (1999). IL-8 mRNA expression by in situ hybridisation in human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 140:155-158.

Takami M, Herrera R, Petruzzelli L (2001). Mac-1-dependent tyrosin phosphorylation during neutrophil adhesion. *Am J of Physiol-Cell Physiol* 280:1045-1056.

Tang X, Zhu Y (2012). TLR4 signaling promotes immune escape of human colon cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Oncol Res* 20(1):15-24.

Tecimer T, Dlott J, Chuntharrapai A et al. (2000). Expression of the chemokine receptor CXCR2 in normal and neoplastic neuroendocrine cells. *Arch Pathol Lab Med* 124(4):520-525.

Thelen M (2002). Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2:123-128.

Till KJ, Zuzel M, Cawley JC (1999). The role of hyaluronan and interleukin-8 in the migration of chronic lymphoreticular tissues. *Cancer Res* 59:4419-4426.

Tournamille C, Blancher A, Le Van Kim C et al. (2004). Sequence, evolution and ligand binding properties of mammalian Duffy antigen/receptor for chemokines. *Immunogenetics* 55:682-694.

Turner HE, Nagy Z, Gatter KC et al. (2000). Angiogenesis in pituitary adenomas and in the normal pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1159-1162.

Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. *The J Urology* 166:2472-2483.

Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS et al. (1995). S-100 antigen-positive folliculostellate cells are not the source of IL-6 gene expression in human pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol* 7(6):467-474.

Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Letters* 267:226–244.

Vandeva S, Jaffrain-Rea M-L, Daly AF et al. (2010). The genetics of pituitary adenomas. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24:461-476.

Venkatakrishnan G, Salgia R, Groopman JE (2000). Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 275:6868-6875.

Vindeløv SD, Hartoft-Nielsen ML, Rasmussen ÅK et al. (2011). Interleukin-8 production from human somatotroph adenoma cells is stimulated by interleukin-1 β and inhibited by growth hormone releasing hormone and somatostatin. *Growth Horm IGF Res* 21(3):134-139.

Vu D, Huang DB, Vemu A et al. (2013). A structural basis for selective dimerization by NF- κ B RelB. *J Mol Biol* 425(11):1934-1945.

Wang JM, Taraboletti G, Matsushima K et al. (1990). Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8. *Biochem Biophys Res Commun* 169:165-170.

Wang S, Zhang J, Zhang Y (2008). Nitric oxide-p38 MAPK signaling stabilizes mRNA through AU-rich element-dependent and -independent mechanisms. *J Leukoc Biol* 83:982-990.

Wang Y, Wang W, Wang L et al. (2012). Regulatory mechanisms of interleukin-8 production induced by tumour necrosis factor- α in human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Mol Med* 16(3):496-506.

Waugh DJJ, Wilson C (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* 14(21):6735-6741.

Wells TN, Power CA, Lutsi-Narasimhan M et al. (1996). Selectivity and antagonism of chemokine receptors. *J Leukocyte Biol* 59:53-60.

Whitmarsch AJ, Davis RJ (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* 74:589-607.

Wigmore S, Maingay JP, Fearon KC et al. (2001). Endogenous production of IL-8 by human colorectal cancer cells and its regulation by cytokines. *Int J Oncol* 18(3):467-73.

Wildt L, Hausler A, Marshall G et al. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinol* 109: 376-385.

Wolf M, Delgado MB, Jones SA (1998). Granulocyte chemotactic protein-2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur J Immunol* 28:164-170.

Wu GD, Lai EJ, Huang N et al. (1997). Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* 272:2396-2403.

Wymann MP, Kernen P, Bengtsson T et al. (1990). Corresponding oscillations in neutrophil shape and filamentous actin content. *J Biol Chem* 265:619-622.

Xie K (2001). Interleukin-8 and human Cancer Biology. *Cytokine and Growth Faktor Reviews* 12:375-391.

Yoshida S, Ono M, Shono T et al. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 17:4015-4023.

Yuan A, Chen JJW, Yao P-L et al. (2005). The Role of Interleukin-8 in Cancer Cells and Microenvironment Interaction. *Frontiers in Bioscience* 10:853-865

Yuan A, Yang PC, Yu J et al. (2000). Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1957-1963.

Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S et al. (2011). Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *Neurosurgery* 114:336–44.

Zangh FX, Kirschning CJ, Mancinelli R et al. (1999). Bacterial Lipopolysaccharide activates Nuclear Factor- κ B through Interleukin-1 Signaling Mediators in cultured Human Dermal Endothelial Cells and Mononuclear Phagocytes. *J Biol Chem* 274:7611-7614.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Stalla für die Möglichkeit, eine experimentelle Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, sowie die Bereitstellung eines geeigneten Themas bedanken.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Ulrich Renner, danke ich für seine hervorragende Unterstützung in allen Bereichen der Arbeit sowie seine stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft.

Vielen Dank auch allen anderen Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank geht an Johanna Stalla für die vielfältige Hilfe im Umgang mit Zelllinien und wissenschaftlichen Techniken, an Kristin Lucia und Yonghe Wu für die stete vielseitige Hilfsbereitschaft.

Eidesstattliche Versicherung

Welzel, Julia Luise

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Expression und Regulation von Interleukin-8 in Hypophysenadenomen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin