

---

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE

Geschäftsführender Direktor:  
Professor Dr. Dr. Dr. h.c. F. Holsboer

**Vorkommen und Funktion des *toll-like* Rezeptor 2 in  
follikulostellaren Hypophysenzellen**

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

vorgelegt von  
**Arne Konnerth**  
aus München  
2012

---

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München (LMU)

Berichterstatter: Prof. Dr. Günter K. Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Kreth  
Priv. Doz. Dr. Ulrich Schüller  
Priv. Doz. Dr. Harald J. Schneider

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Ulrich Renner

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2012

---

## INHALTSVERZEICHNIS

1	Vorwort.....	5
2	Einleitung.....	6
2.1	Die Hypophyse.....	6
2.1.1	Anatomie und Physiologie.....	6
2.1.2	Hypophysenadenome.....	8
2.1.3	Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse.....	8
2.1.4	Einfluss immunologischer Faktoren auf die Hypophyse.....	10
2.2	Das Immunsystem und <i>toll-like</i> Rezeptoren.....	11
2.2.1	Die Gruppe der <i>toll-like</i> Rezeptoren.....	12
2.2.2	<i>Toll-like</i> Rezeptoren in der Hypophyse.....	12
2.2.3	Toll-like-Rezeptoren und Tumorwachstum.....	13
2.2.4	Der <i>toll-like</i> Rezeptor 2.....	14
2.3	Fragestellung.....	15
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Chemikalien, Materialien und Lösungen.....	17
3.1.1	Chemikalien.....	17
3.1.2	Materialien und Geräte.....	19
3.1.3	Lösungen.....	20
3.2	Zelllinien.....	20
3.2.1	Die TtT-GF-Zelllinie.....	20
3.2.2	Die AtT-20-Zelllinie.....	21
3.2.3	Die GH3-Zelllinie.....	21
3.2.4	Die MtT-S-Zelllinie.....	22
3.3	Methoden.....	22
3.3.1	Kultivieren der Zelllinien.....	22
3.3.2	Stimulationsexperimente.....	22
3.3.3	Verwendung des TLR2-Antikörpers T2.5.....	23

---

3.3.4	Wachstumsbestimmung mit dem WST-Assay.....	24
3.3.5	IL-6-Messung mittels <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	24
3.3.6	Reverse Transkription/Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	25
3.4	Statistik.....	31
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Expression des <i>toll-like</i> Rezeptor 2 in Hypophysentumorzelllinien.....	31
4.2	Peptidoglycan stimuliert das Zellwachstum in verschiedenen Hypophysentumorzelllinien.....	32
4.3	Unterschiedliche Auswirkungen einer Stimulation mit Lipoteichonsäure auf die verschiedenen Zelllinien.....	36
4.4	Der <i>toll-like</i> Rezeptor 2-Antikörper hat keinen Einfluss auf die Peptidoglycan-vermittelte Wachstumsstimulation von TtT-GF-Zellen.....	40
4.5	Peptidoglycan bewirkt eine verstärkte IL-6-Sekretion von TtT-GF-Zellen.....	42
4.6	Pam3CysSK4 führt zu einer Proliferationssteigerung der TtT-GF-Zellen.....	43
4.7	Abschwächung der Pam3CysSK4-vermittelten Wachstumsstimulation durch einen TLR2-Antikörper.....	44
4.8	Pam3CysSK4 bewirkt eine dosisabhängige Erhöhung der IL-6-Sekretion der TtT-GF-Zellen.....	45
4.9	Hemmung der Pam3CysSK4-vermittelten IL-6 -Sekretionssteigerung durch T2.5.....	46
5	Diskussion.....	47
6	Zusammenfassung.....	55
7	Literaturverzeichnis.....	57
8	Danksagung.....	67

## 1 VORWORT

In dieser Arbeit wird das Vorkommen und die Funktion des *toll-like* Rezeptors 2 (TLR2) in der Hypophyse untersucht. *Toll-like* Rezeptoren vermitteln die angeborene Immunabwehr und sind bedeutsam für die Erkennung und Abwehr von Mikroorganismen, indem sie bestimmte Bestandteile von diesen binden. Die rezeptortragenden Zellen reagieren u.a. mit der Sekretion von Zytokinen, wodurch eine Immunreaktion eingeleitet wird. Der TLR2 ist bisher auf Makrophagen und Monozyten, aber auch auf verschiedenen Arten von Epithelzellen nachgewiesen worden. Er bindet unter anderem Peptidoglycan (PGN) und Lipoteichonsäure (LTA) von grampositiven Bakterien und führt über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Zytokinsekretion.

Zu Beginn meiner Doktorarbeit war in der Hypophyse nur der TLR4 nachgewiesen und näher untersucht worden. Die Stimulation dieses Rezeptors durch das bakterielle Pathogen Lipopolysaccharid wirkt sich auf das Wachstum von Tumorzellen und auf die Sekretion von Zytokinen aus. Diese wiederum nehmen Einfluss auf die ACTH-Ausschüttung und greifen somit in die Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der TLR2 in verschiedenen Hypophysentumorzelllinien vorhanden ist. Hierbei diente die TtT-GF-Zelllinie als Modell für follikulostellare Hypophysenzellen, während die Zelllinien AtT-20, GH3, und MtT-S Modelle für verschiedene hormonproduzierende Hypophysentumore darstellen. Desweiteren wurde getestet, ob sich die Stimulation mit Pathogenen, welche an den TLR2 binden, auf das Wachstum verschiedener Arten von Hypophysenzellen sowie auf die IL-6-Produktion auswirkt. Könnten solche Wirkungen gezeigt werden, so würde dies für einen Zusammenhang zwischen systemischen bakteriellen Infektionen und dem Tumorwachstum sowie der Immunregulation von Hypophysenzellen sprechen.

---

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 Die Hypophyse**

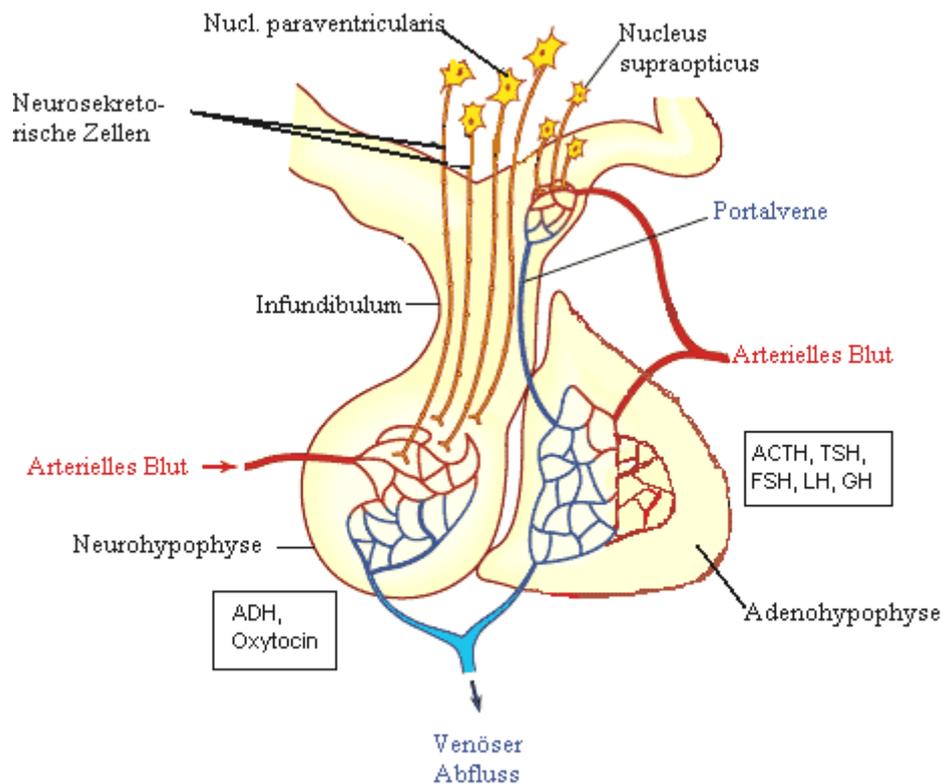
#### **2.1.1 Anatomie und Physiologie**

Die Hypophyse reguliert als zentrales Organ des Hormonsystems durch die Steuerung der nachgeschalteten Hormondrüsen zahlreiche wichtige Funktionen des Organismus wie Stoffwechsel, Wachstum und Reproduktion. Sie ist als Hirnanhangsdrüse in der Sella turcica des Keilbeins lokalisiert und setzt sich aus der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) und der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) zusammen.

In der Neurohypophyse enden die marklosen Axone neurosekretorischer Zellen des Hypothalamus. Der Nucleus supraopticus ist für die Produktion des Antidiuretischen Hormons (ADH), der Nucleus paraventricularis für die Produktion von Oxytocin verantwortlich. Die Sekretion beider Hormone erfolgt über Potenziale, die die Exozytose und damit Abgabe ins Blut auslösen (Renner et al., 2001).

Die Adenohypophyse ist embryologisch aus der Rathke-Tasche hervorgegangen und nimmt 3/4 der Hypophyse ein. Sie ist eine typische Hormondrüse aus retikulärem Bindegewebe, zahlreichen Sinusoiden, die an ein Pfortadersystem angeschlossen sind, und verzweigten Strängen von Drüsenzellen.

Die Adenohypophyse produziert jedes ihrer vier glandotropen (ACTH, TSH, FSH, LH) und ihre zwei nichtglandotropen Hormone (GH, Prolaktin) durch unterschiedliche Zelltypen.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Hypophyse: Die Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) bildet die Hormone ADH und Oxytocin. Die Freisetzung von Hormonen aus der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) wird durch im Hypothalamus gebildete *releasing* Hormone reguliert, welche über das Portalvenensystem in die Adenohypophyse gelangen. Die Adenohypophyse sezerniert u.a. glandotrope Hormone, die in den peripheren Hormondrüsen wie Schilddrüse und Nebenniere die Ausschüttung der jeweiligen Effektorhormone bewirken.

Histologisch ist eine Einteilung in chromophobe (ca. 50 %), chromophile (azidophile [Prolaktin, GH], ca. 40 %), basophile ([ACTH, TSH, FSH, LH], ca. 10 %), Endothelzellen, Fibroblasten und follikulostellare Zellen möglich (Lippert, 2000).

Follikulostellare Zellen (FS-Zellen) sind sternförmige Zellen in der Adenohypophyse, welche vermutlich neuroektodermalen Ursprungs sind. Sie repräsentieren ca. 5-10 % aller Zellen der Hypophyse und produzieren selbst keine Hormone. Mit ihren langen Zellausläufern legen sie sich um endokrine Zellen und bilden ein charakteristisches Netzwerk innerhalb des gesamten Hypophysenvorderlappens (Inoue, 1999). Sowohl untereinander als auch mit endokrinen Zellen sind sie durch *gap-junctions* verbunden (Morand et al., 1996). Follikulostellare Zellen sezernieren eine Reihe parakrin wirksamer Faktoren wie *Basic Fibroblast Growth Factor* (Ferrara et al., 1987a), *Vascular Endothelial Growth Factor* (Ferrara und Henzel, 1989) und

---

Interleukin-6 (Vankelecom et al., 1989). Die Funktion der FS-Zellen war lange unklar, inzwischen haben jedoch neuere Untersuchungen gezeigt, dass FS-Zellen mehrere Funktionen innerhalb der Hypophyse erfüllen. Sie haben die Fähigkeit, apoptotische Zellen zu phagozytieren (Aoki et al., 1996), das Ionenmilieu zu regulieren (Ferrara et al., 1987b), die interzelluläre Kommunikation benachbarter endokriner Zellen zu modulieren (Fauquier et al., 2001; Renner et al., 1996) und, insbesondere durch Zytokine vermittelt, immun-endokrine Funktionen zu vermitteln (Renner et al., 1996). Es konnte auch gezeigt werden, dass FS-Zellen sowohl die Sekretion von Hypophysenhormonen, als auch die Proliferation von Hypophysenzellen regulieren (Arzt et al., 1993; Koyama, 1995).

### **2.1.2 Hypophysenadenome**

Hypophysenadenome machen ca. 10-15% aller intrakranieller Tumore aus. Es wird zwischen Mikro- (<10 mm Durchmesser) und Makroadenomen (>10 mm Durchmesser) und zwischen hormonaktiven und -inaktiven Tumoren unterschieden. Sie lassen sich in Prolaktinome (50%), hormon-inaktive Tumoren (22%), GH-bildende Tumoren (22%), ACTH-produzierende (5%) und Tumoren, die LH, FSH oder TSH bilden (1%), unterteilen (Renner et al., 2001).

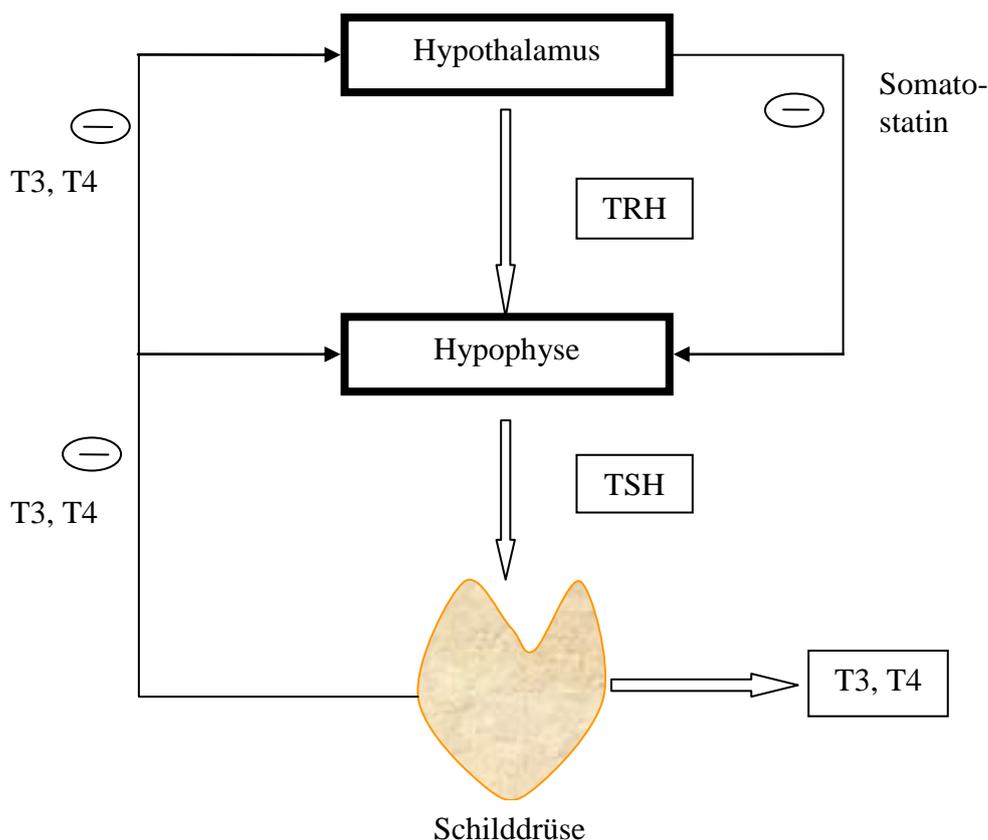
Die Monoklonalität von Hypophysenadenomen weist darauf hin, dass zu Beginn der Tumorentstehung eine Zellmutation innerhalb der Hypophyse steht (Alexander et al., 1990; Clayton et al., 2000; Heaney, 2006). Hierzu können eine vermehrte Expression von Onkogenen und verminderte Expression von Tumorsuppressorgenen, eine hypophysäre und hypophysäre hormonelle Dysregulation, Wachstums- und angiogenetische Faktoren sowie Umwelt- und iatrogene Faktoren wie Bestrahlung und therapeutische Hormongabe beitragen (Ezzat, 2001).

### **2.1.3 Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse**

Die Sekretion der Hormone wird durch unterschiedliche Regelkreise zwischen Hypothalamus, Hypophyse und peripherem Zielgewebe gesteuert. Nach Integration verschiedener Reize höherer Zentren (Cortex, limbisches System, Thalamus, ARAS und Rückenmark) sowie unter Einfluss der biologischen Uhr setzt der Hypothalamus hypophysiotrope Hormone (CRH,

TRH, GnRH, GHRH, Somatostatin, PRH, Dopamin) frei, die über das hypophysäre Portalvenennetz zur Hypophyse gelangen. Die hypothalamischen *releasing*-Hormone führen im Hypophysenvorderlappen zur Freisetzung der glandotropen Hormone (ACTH, GH, LH, FSH, TSH), die in den endokrinen Zielorganen die Freisetzung der peripheren Hormone bzw. IGF-1 bewirken. Die Regulation der Hormonausschüttung des Hypothalamus und der Hypophyse erfolgt durch *feedback* im Sinne einer negativen Rückkopplung, einerseits durch die vom peripheren Zielgewebe ausgeschütteten Hormone, Gewebemetaboliten und Stoffwechselfsubstrate, andererseits durch die ausgeschütteten Polypeptidhormone der Hypophyse, durch die der Hypothalamus in der Sekretion der *releasing* Hormone gehemmt wird. So wird eine endokrine Homöostase erreicht, die allerdings variabel ist. Eine Ausnahme stellt die laktotrophe Achse dar: die Prolaktinsekretion steht vorwiegend unter tonisch-inhibitorischer Kontrolle durch Dopamin.

Die Abbildung 2 stellt den Mechanismus der *feedback*-Inhibition schematisch dar.



**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse am Beispiel der Schilddrüse: Die Ausschüttung von TRH durch den Hypothalamus und von TSH durch die Hypophyse wird durch einen *Feedback*-Mechanismus reguliert, indem die Freisetzung von TRH und TSH durch die sezernierten Schilddrüsenhormone gehemmt wird. TSH steht zudem unter inhibierendem Einfluss von Somatostatin aus dem Hypothalamus.

### 2.1.4 Einfluss immunologischer Faktoren auf die Hypophyse

Der Hypothalamus und die Hypophyse stehen als zentrale endokrine Organe mit dem Immunsystem in Wechselwirkung (Arzt et al., 1999; Spangelo und Gorospe, 1995; Besedovsky und del Rey, 1996). Im Jahr 1985 zeigten Blalock et al., dass die Zytokine IL-1 und IL-6 die ACTH-Sekretion der hypophysären kortikotropen Tumorzelllinie AtT-20 stimulieren (Blalock et al., 1985). Ein Jahr später konnten Besedovsky et al. nachweisen, dass die systemische Gabe von IL-1 die Plasmaspiegel von ACTH und Glukokortikoiden bei Mäusen erhöht und dass die Neutralisation von IL-1 bei Ratten die Glukokortikoidreaktion auf experimentelle virale Infektionen verhindert (Besedovsky et al., 1986). Im Folgenden wurde gezeigt, dass die ACTH-freisetzende Wirkung von IL-1 von dem hypothalamischen Peptid CRH abhängt und dass somit die Wirkung von IL-1 auf die HPA-Achse wahrscheinlich im Hypothalamus stattfindet (Berkenbosch et al., 1987; Sapolsky et al., 1987). Seitdem sind vermehrt Hinweise auf die IL-1-vermittelte Regulation von ZNS-Reaktionen auf periphere Veränderungen der Immunaktivität erbracht worden (Berkenbosch et al., 1989; McCann et al., 1994; Rivest und Rivier, 1995).

Die Funktion der Wechselwirkung zwischen Hypophyse und Immunsystem besteht unter anderem darin, die Hormonsekretion der Hypophyse während Infektionen oder Entzündungen so zu verändern, dass überschießende Immunreaktionen bis hin zum septischen Schock vermieden werden. Dies geschieht durch eine erhöhte ACTH- und konsekutive Glukokortikoidfreisetzung. Allerdings haben bakterielle Endotoxine wie LPS keinen direkten Einfluss auf die ACTH-Produktion der Hypophyse (Spangelo und Gorospe, 1995; Gloddek et al., 2001). Durch das LPS kommt es zu einem Anstieg der zirkulierenden Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, welche ihrerseits die Hormonfreisetzung in der Adenohypophyse modulieren (Arzt et al., 1999; Chrousos, 1995). Es ist jedoch gezeigt worden, dass LPS auch durch die intrahypophysäre Erhöhung von IL-6 die ACTH-Sekretion erhöht. Dabei sind innerhalb der Adenohypophyse hauptsächlich follikulostellare Zellen für die Bildung von IL-6 verantwortlich (Renner et al., 1998). Die parakrine Wirkung von Zytokinen könnte so dazu beitragen, immun-endokrine Interaktionen während Infektionen bzw. Entzündungen zu regulieren und zu optimieren.

Auch für das Wachstum von Hypophysenzellen ist die auto- und parakrine Sekretion von Zytokinen ein wichtiger Regulationsmechanismus. Das Wachstum von Hypophysentumoren

---

könnte somit ebenfalls durch immunologische Reaktionen im Rahmen von Infektionen, beispielsweise durch eine Erhöhung von IL-6, beeinflusst werden.

## 2.2 Das Immunsystem und *toll-like* Rezeptoren

Die Verteidigung gegen mikrobielle Pathogene ist eine der Hauptaufgaben des Immunsystems, welches aus zwei Komponenten, der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunantwort, besteht (Takeda und Akira, 2005). Beide Komponenten der Immunantwort erkennen eindringende Pathogene als fremd, d.h. nicht zum Organismus gehörend, wodurch das Immunsystem angeregt wird, diese zu eliminieren. Bisher sind beide Komponenten unabhängig voneinander untersucht worden, wobei sich die Aufmerksamkeit vor allem auf die adaptive Immunantwort gerichtet hat. Bei der erworbenen Immunantwort benutzen B- und T-Lymphozyten Antigenrezeptoren wie Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren zur Erkennung von körperfremden Antigenen. Die Mechanismen des Fremderkennens durch diese Antigenrezeptoren sind intensiv analysiert worden, und die Hauptmechanismen, wie Diversität, Klonalität und Gedächtnisfunktion wurden gut charakterisiert. Diese Rezeptoren existieren jedoch ausschließlich in Wirbeltieren. Der Mechanismus für die Fremderkennung von Pathogenen durch evolutionär tieferstehende Organismen und durch die angeborene Immunantwort von Säugetieren ist dagegen lange Zeit weitgehend unbekannt geblieben. Obwohl bekannt ist, dass Zellen der angeborenen Immunität wie Makrophagen und dendritische Zellen von mikrobiellen Bestandteilen wie dem LPS gramnegativer Bakterien aktiviert werden, blieb der für diese Erkennung verantwortliche Rezeptor lange Zeit unbekannt.

Am Ende des 20. Jahrhunderts gelang die Entdeckung, dass das *toll*-Protein, ursprünglich bekannt als ein die dorsoventrale Zelldifferenzierung steuerndes Protein, ein essentieller Rezeptor für die Verteidigung von *Drosophila* gegen Pilzinfektionen ist, wobei *Drosophila* ausschließlich über die angeborene Immunabwehr verfügt (Lemaitre et al., 1996). Kurze Zeit darauf wurde ein entsprechender Rezeptor bei Säugetieren gefunden, der heute *toll-like* (Toll-ähnlich, im weiteren wird die englische Schreibweise verwendet) Rezeptor 4 (TLR4) genannt wird und der die Expression von Genen induziert, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Medzhitov et al., 1997).

### 2.2.1 Die Gruppe der *toll-like* Rezeptoren

Bisher wurden zehn menschliche *toll-like* Rezeptoren identifiziert (Rock et al., 1998). Der Zytoplasma-Anteil der TLRs weist eine hohe Ähnlichkeit zu dem der IL-1-Rezeptor-Familie auf, und wird als eine *toll*/IL-1-Rezeptor- (TIR-) Domäne bezeichnet. Trotz dieser Ähnlichkeit sind die extrazellulären Anteile beider Rezeptortypen strukturell nicht verwandt. Die IL-1-Rezeptoren besitzen eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, während TLRs in der extrazellulären Domäne leuzinreiche Wiederholungen aufweisen.

Die verschiedenen TLRs erkennen spezifische mikrobielle Komponenten von Pathogenen wie Bakterien, Pilzen, Protozoen und Viren. Sie kommen nicht nur auf typischen Immunzellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen vor, sondern sind ebenso auf zahlreichen Arten von Epithelien nachgewiesen worden, vor allem auf solchen, die eine Grenze zwischen dem Organismus und der Umwelt darstellen. Das Verteilungsmuster der einzelnen TLRs hängt von dem jeweiligen Gewebe ab, z.B. besitzen die TLRs 2,3,4 und 5 spezifische Rollen bei der Immunabwehr von Bronchial- und gastrointestinalem Epithel, während bei Mäusen der TLR11 zur urogenitalen Immunität beizutragen scheint (Zhang et al., 2004). Auch bei anderen Geweben, wie der Blut-Hirn-Schranke und Endothelien wurden unterschiedliche TLR-Expressionsmuster gefunden. Während TLR3 eine wichtige Rolle bei der Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke durch das West-Nil-Virus zu spielen scheint, führt die Expression der TLR 2 und 4 zur Sensitivität gegenüber bakteriellen Liganden und steuert die Bewegung von Leukozyten innerhalb der Mikrozirkulation und die darauffolgende Migration in entzündete Gewebe, wie z.B. in der Lunge (Wang et al., 2004; Fan et al., 2003; Andonegui et al., 2002; Andonegui et al., 2003).

### 2.2.2 *Toll-like* Rezeptoren in der Hypophyse

Da Hypophysenzellen epithelialen Ursprungs sind, kann vermutet werden, dass auch die Hypophyse *toll-like* Rezeptoren aufweist. Hierbei ist bisher lediglich das Vorkommen des TLR4 untersucht worden. Dieser ist sowohl in FS-Zellen (Lohrer et al., 2000) als auch in einigen Hypophysentumoren, verschiedenen Tumorzelllinien (AtT-20, HP75) sowie in normalen menschlichen Hypophysen nachgewiesen worden (Tichomirowa et al., 2005). In anderen Zelllinien wie GH3 und aT3-1 war TLR4 jedoch nicht nachzuweisen.

In Versuchen zum Proliferationsverhalten führte LPS (Lipopolysaccharid, ein Endotoxin aus der Zellwand gramnegativer Bakterien) bei der TLR4-positiven Zelllinie AtT-20 zu einer Wachstumshemmung, auf das Wachstum der TLR4-negativen Zelllinie GH3 wirkte sich LPS nicht aus. Bei der Hormonsekretion von AtT20-Zellen zeigte sich nach Stimulation mit LPS keine Änderung der ACTH-Freisetzung (Tichomirowa et al., 2005). Es wurde allerdings inzwischen gezeigt, dass LPS bei diesen Zellen eine Stimulation der Propiomelanocortin-(POMC)-Gen-Expression bewirkt (Iwasaki et al., 2008). Untersucht wurde auch die Zytokin-Sekretion TLR4-positiver primärer Adenomzellkulturen. Auf eine Stimulation mit Lipopolysaccharid reagierten diese mit einer Erhöhung von IL-6, welches bekanntermaßen Zellwachstum und Hormonproduktion in Hypophysentumoren induziert (Arzt et al., 1993; Pereda et al., 1996; Pereda et al., 2000; Thiele et al., 2003). Bei TLR4-negativen Adenomen wurde keine vermehrte IL-6-Sekretion festgestellt.

### **2.2.3 Toll-like-Rezeptoren und Tumorwachstum**

Die Bindung entsprechender Liganden an TLRs führt über eine Signaltransduktionskaskade, welche die Aktivierung von Molekülen wie TIRAP, MyD88, IRAK und TRAF einschließt, zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern, wodurch die Bildung von Zytokinen, wie z.B. IL-6, ausgelöst wird. IL-6 und andere Zytokine können durch ihre zellwachstumsfördernde Wirkung eine Rolle bei abnormem Wachstum und Malignität spielen.

Im Jahr 2006 zeigten Jego et al., dass humane Myelom-Zelllinien (HMCL) bestimmte TLRs, u.a. TLR 1, 7 und 9, exprimieren und empfindlich gegenüber den entsprechenden PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) sind (Jego et al., 2006). Die Kultivierung von HMCLs mit Liganden für TLR7 und 9 förderte das Zellwachstum, vermittelt durch eine autokrine Sekretion von IL-6 (die Neutralisation von IL-6 verhinderte ein Wachstum und Überleben von HMCLs). Die Autoren schlossen, dass rekurrierende Infektionen das Tumorwachstum von multiplen Myelomen unterstützen und die Wirksamkeit von Standardtherapien abschwächen könnten.

Ein weiterer möglicher Zusammenhang zwischen TLRs und Tumorwachstum wurde für die Nebenniere postuliert. Es ist gezeigt worden, dass IL-8 in Nebennierenkarzinom-Zellen vorkommt und dass es zum Wachstum dieser Zellen beiträgt. Kanczkowski et al. untersuchten die Rolle verschiedener TLR-Liganden bei der IL-8-Produktion durch NCI-H295R-Zellen

(Kanczkowski et al., 2007). Sie stellten fest, dass die gemeinsame Stimulation durch TLR1/6- und TLR2-Liganden die Induktion von IL-8-Peptid und –mRNA bewirkt. Somit könnten von grampositiven Bakterien abstammende TLR1/2/6-Liganden über eine IL-8-Produktion zur Tumorgenese in der Nebenniere beitragen.

## 2.2.4 Der *toll-like* Rezeptor 2

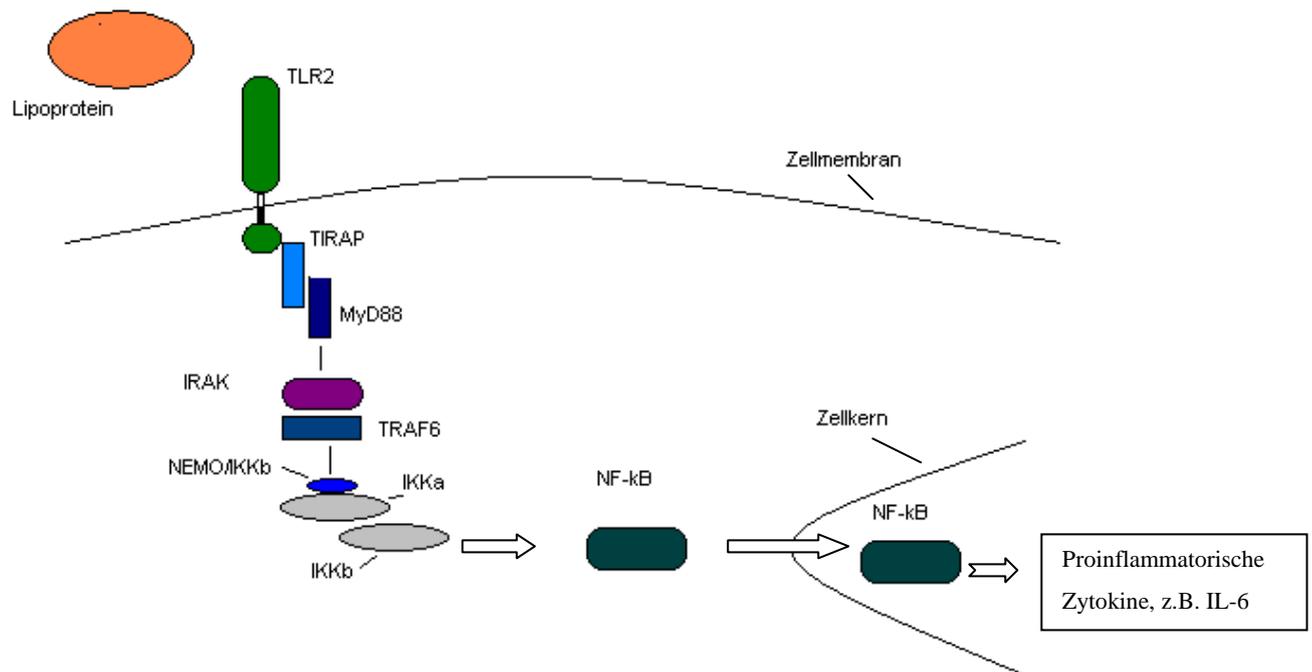
### 2.2.4.1 Liganden

TLR2 erkennt eine Vielzahl mikrobieller Komponenten, darunter Lipoproteine bzw. Lipopeptide von verschiedenen Pathogenen. Zu den Liganden zählen außerdem Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien, Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Glykosylphosphatidylinositolanker von *Trypanosoma cruzi*, ein phenollösliches Modulin von *Staphylococcus epidermidis*, Zymosan von Pilzen und Glykolipide von *Treponema maltophilum*. (Takeuchi et al., 1999; Takeda et al., 2003).

### 2.2.4.2 Subzelluläre Lokalisation und Signalweg

Die *toll-like* Rezeptoren 1, 2 und 4 befinden sich, wie durch spezifische Antikörpermarkierung gezeigt werden konnte, an der Zelloberfläche.

Die Bindung von Liganden wie Lipoproteinen an den TLR2 führt zur Aktivierung eines vom Adaptorprotein MyD88 abhängigen Signalweges, der analog zum Signalweg des IL-1-Rezeptors verläuft (Takeda und Akira, 2005). Bei der von den TLRs 2 und 4 ausgehenden Signalweiterleitung spielt neben MyD88 das TIRAP- (*TIR domain-containing adaptor protein*-) Molekül eine essentielle Rolle (Hornig et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). MyD88 führt nach TLR-Stimulation zur Rekrutierung von IRAK-4 und unterstützt die IRAK-4-vermittelte Phosphorylierung von IRAK-1. Aktiviertes IRAK-1 verbindet sich anschließend mit TRAF6, was zur Aktivierung des TAK1/TAB-Komplexes führt. Hierdurch wird die Aktivität des I $\kappa$ B Kinase- (IKK-) Komplexes erhöht. Der somit aktivierte IKK-Komplex bewirkt die Phosphorylierung und den nachfolgenden Abbau von I $\kappa$ B, was zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern führt. Hierdurch erfolgt eine vermehrte Transkription von IL-6.



**Abbildung 3** TLR2-vermittelte Signaltransduktion: Die Bindung entsprechender Liganden, z.B. bakterielles Lipoprotein, an den *toll-like* Rezeptor 2 führt über eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, welche die Proteine TIRAP, MyD88, IRAK, TRAF6 und IKK umfasst, zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern. Dies bewirkt eine Induktion und Sekretion von Zytokinen wie IL-6.

## 2.3 Fragestellung

*Toll-like* Rezeptoren wurden bisher auf Immunzellen wie Monozyten und auch auf verschiedenen Epithelzellen nachgewiesen. Sie nehmen dabei Funktionen der angeborenen Immunabwehr wahr. In der Hypophyse, welche als endokrines Organ aus Epithelzellen aufgebaut ist und unter anderem immunologische Funktionen hat (z.B. die Sekretion von IL-6), wurde bisher lediglich der TLR4 nachgewiesen. Zu den Funktionen von TLR in der Hypophyse ist wenig bekannt, Untersuchungen mit TLR4-Liganden ergaben Hinweise für Zusammenhänge mit dem Wachstum und der Zytokinsekretion von Hypophysenzellen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, das Vorkommen und die Funktion des *toll-like* Rezeptors 2 (TLR2) in der Hypophyse zu untersuchen. Hierzu werden zunächst verschiedene Zelllinien, welche als Modell für follikulostellare Zellen (TtT-GF) bzw. für hormonproduzierende

---

Hypophysentumore (AtT-20, GH3 und MtT-S) verwendet werden, mittels RT-PCR auf das Vorkommen von *toll-like* Rezeptor 2-mRNA untersucht.

Außerdem soll durch Zellwachstumsversuche festgestellt werden, ob sich die bakteriellen Zellwandbestandteile Peptidoglycan und Lipoteichonsäure sowie das Lipoprotein Pam3CysSk4, ein spezifischer Ligand des TLR2, auf die Proliferation der Zellen auswirken. Desweiteren wird mittels ELISA die Auswirkung dieser Substanzen auf die Zytokinsekretion von TtT-GF-Zellen untersucht.

Anhand der Ergebnisse könnten Erkenntnisse über Wechselwirkungen zwischen dem Wachstum von Hypophysentumoren und systemischen bakteriellen Infektionen gewonnen werden. Außerdem könnten Auswirkungen von Peptidoglycan und Pam3CysK4 auf die Zytokinsekretion follikulostellarer Zellen Zusammenhänge zwischen immunologischen Prozessen und endokriner Regulation aufzeigen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Chemikalien, Materialien und Lösungen

##### 3.1.1 Chemikalien

In der folgenden Tabelle werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Hersteller aufgelistet.

Amphotericin B	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Ampicillin	Roche (Mannheim, Deutschland)
Beta-Mercaptoethanol	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Biomax MR Filme	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Bovine serum albumin (BSA)	Invitrogen Corp. (Paisley, UK)
Chloroform	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Diethyl-pyrocarbonat (DEPC)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
dNTP Mix	MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania)
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Invitrogen Corp (Paisley, UK)
Ethylenediaminetetracetic Acid (EDTA)	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Ethidium bromide	Sigma (St. Louis, MO, USA)
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco Europe (Karlsruhe, Deutschland)
Hexanucleotid Mix	Roche (Mannheim, Deutschland)
Isoamylalkohol	MERCK (Darmstadt, Deutschland)

Isopropanol	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Lipoteichonsäure von Staphylococcus aureus	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Marker 1kb Plus	Life Technologies (Paisley, UK)
Na-Acetat	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pam3CysSK4	EMC Microcollections (Tübingen, Deutschland)
PBS	Gibco Europe (Karlsruhe, Deutschland)
Peptidoglycan (Staphylococcus aureus)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Penicillin+Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Phenol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Reverse Transkriptase (SuperScript II™)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Taq DNA polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
TLR2-Antikörper T2.5	NatuTec (Frankfurt am Main, Deutschland)
Trypsin	Sigma (St. Louis, Mo, USA)
WST-1	Roche Molecular Biochemicals, (Penzberg, Deutschland)
ELISA-Kit (IL-6)	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

**Tabelle 1** *Verwendete Chemikalien*

### 3.1.2 Materialien und Geräte

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte sowie deren Hersteller dargestellt.

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

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

**Tabelle 2** *Verwendete Materialien und Geräte*

### 3.1.3 Lösungen

In der folgenden Tabelle werden die verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung genannt.

DEPC Wasser	200µl DEPC/l Deionisiertes Wasser
Lösung D	4M Guanidiumthiocyanat 250g/ 337ml, 0,75M Natrium-citrat pH= 7,0; 17,6ml/ 337ml, 10% Sarkosyl: 26,4ml/ 337ml, gelöst in 293 ml DEPC 180µl Beta-Mecaptoethanol/ 25ml kurz vor Gebrauch
Na-Acetat	2M Na-Acetat: 27,2g/ 100ml, DEPC: 20µl, pH= 4,0
Tris-based Puffer (TBS)	1x Tris: 2,42 g/l, NaCl: 8 g/l, pH= 7,6
Tris Puffer	Tris: 12,114g/l, pH= 7,6

**Tabelle 3** *Verwendete Lösungen*

## 3.2 Zelllinien

### 3.2.1 Die TtT-GF-Zelllinie

Die TtT-GF-Zelllinie wird als Modell für folliculostellare Zellen (FS-Zellen) verwendet. Sie wurde aus einem isologen, transplantablen thyreotropen Hypophysentumor der Maus

gewonnen, welcher durch Radiothyreoidektomie induziert worden war. Die TtT-GF-Zellen weisen viele Eigenschaften auf, welche denjenigen von FS-Zellen entsprechen: Vorkommen zahlreicher Lysosomen und Intermediärfilamente im Zytoplasma, phagozytische Aktivität, follikuläre Formation sowie Nachweis von GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und gliazellspezifischem S-100 (Inoue et al., 1992). Auch zeigen die TtT-GF-Zellen das typische sternförmig-verzweigte Wachstum von Follikulostellarzellen. Außerdem sind sie in der Lage, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Gloddek et al., 1999), IL-6 (Matsumoto et al., 1983) und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor-beta*) zu exprimieren. Weiter besitzen sie Rezeptoren für TGF- $\beta$  (Renner et al., 2002) und für die Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  (Kobayashi et al., 1997) und IL-11 (Perez Castro et al., 2000). Zudem exprimieren sie Adenosinrezeptoren A(1) und A(2), über die Adenosin und Adenosinrezeptor-Agonisten die intrazelluläre cAMP Konzentration beeinflussen können (Rees et al., 2002).

### 3.2.2 Die AtT-20-Zelllinie

AtT-20 Zellen entstammen einem (adeno-) hypophysärem ACTH-produzierendem Adenokarzinom der LAF1-Mauslinie. AtT-20 Zellen sind morphologisch klein und rund gestaltet. Sie wachsen in Kulturmedium einschichtig adhärierend auf Petrischalen, wobei hormonell aktive Zellen in Aggregaten im Medium flotieren (Orth et al., 1973).

AtT-20-Zellen spiegeln das hormonelle Antwortverhalten von kortikotrophen Zellen der Hypophyse wider und wurden in dieser Hinsicht intensiv untersucht (Van Wijk et al., 1995; Devi, 1992; Gamby et al., 1996). Die Zellen packen das Hormon ACTH in elektronendichte sekretorische Vesikel (Mains und Eipper, 1976). Neben ACTH sezernieren AtT-20 Zellen Proteine wie Laminin (Burgess et al., 1985).

### 3.2.3 Die GH3-Zelllinie

Die GH3-Zelllinie dient als Modell für Prolaktinome. Sie wurde aus radioaktiv induzierten Rattenhypophysentumoren gewonnen und ist eine mammosomatotrope Zelllinie, die Prolaktin und Wachstumshormon sezerniert (Tashjian et al., 1970). Da die Prolaktinsekretion ähnlich wie in normalen laktotropen Zellen reguliert wird, werden GH3-Zellen auch als Modell für die Prolaktinsekretion dieser Zellen verwendet. GH3-Zellen exprimieren, ebenso wie normale

---

laktotrope Hypophysenzellen, Rezeptoren für Hormone wie Dopamin, TRH, Somatostatin, Östradiol, EGF und VIP.

### **3.2.4 Die MtT-S-Zelllinie**

Diese Zelllinie entstammt einem östrogeninduzierten mammotropen Hypophysentumor der Ratte (Inoue et al., 1990). Die nur schwach an Kulturplatten anhaftenden MtT-S-Zellen sezernieren GH, sprechen auf eine Stimulation mit GHRH an und sind östrogensensitiv. Elektronenmikroskopisch zeigen sie eine große Ähnlichkeit zu normalen somatotropen Hypophysenzellen.

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 Kultivieren der Zelllinien**

Die adhärennten Zellen der verschiedenen Linien wurden bei 37°C in einem Brutschrank bei feuchter Atmosphäre (5 % CO<sub>2</sub>-Anteil, 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Als Kulturmedium wurde für alle Zelllinien DMEM-Medium verwendet, dem 10% FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 2,5 ng/ml Amphotericin B und 10<sup>5</sup> U/ml Penicillin-Streptomycin hinzugefügt wurde. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1200 rpm für 4 Minuten wurde der Überstand abpipettiert, und die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis von 1:2 bis 1:18 in neue Zellkulturflaschen gegeben und unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

### **3.3.2 Stimulationsexperimente**

Für die Stimationsversuche wurden die jeweiligen Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung aus der Zellkulturflasche gelöst. Nach dem Zentrifugieren und der

Resuspension in neuem Medium wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer gezählt und in einer Dichte von 5.000-10.000 Zellen pro well auf 96-well-Platten für Wachstumsversuche bzw. 25.000-50.000 Zellen pro well auf 48-well-Platten für ELISA-Versuche ausgesät. Für 24 Stunden wurden die Zellen in 10% FCS-haltigem Medium belassen, anschließend wurden sie mit PBS gewaschen, und es wurde für weitere 24 Stunden serumfreies Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Stimulationssubstanzen in den unten beschriebenen Konzentrationen, verdünnt mit 1% FCS enthaltendem Medium, zu den Zellen gegeben und für 24, 48 bzw. 72 Stunden inkubiert. Als Kontrolle (Basalwert) diente die Zugabe von Medium ohne Stimulationssubstanzen. Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und Pam3CysSK4 wurden in PBS gelöst und auf die benötigten Konzentrationen in Medium verdünnt. Die Überstände der in 48-well-Platten angezüchteten Zellen für die ELISA-Messungen zur Bestimmung von IL-6 wurden nach 48 Stunden abpipettiert und bis zur Durchführung des ELISA bei -18°C eingefroren. Für die Zellwachstumsversuche wurden jeweils 6-fach-Werte bestimmt und die Versuche je dreimal durchgeführt, wobei im Ergebnisteil jeweils ein repräsentatives Versuchsergebnis zur Darstellung kommt. Für die ELISA-Messungen wurden 4-fach-Bestimmungen durchgeführt.

### **3.3.3 Verwendung des TLR2-Antikörpers T2.5**

Mit Hilfe des TLR2-Antikörpers wurde untersucht, ob eine Blockade des TLR2 die Wirkung von PGN bzw. Pam3CysSK4 auf TtT-GF-Zellen beeinflusst. Die Versuchsvorbereitungen mit Aussäen der Zellen und Serumdeprivation wurden wie oben beschrieben durchgeführt, wobei auf 96-well-Platten eine Dichte von 5000 TtT-GF-Zellen/well gewählt wurde. Die Zellen wurden mit 0, 10 und 100 µg/ml PGN bzw. 0, 1 und 12 µg/ml Pam3CysSK4 stimuliert. Eine Stunde vor Stimulationsbeginn wurde die Hälfte der wells mit jeweils 20 µg/ml des TLR2-Antikörpers T2.5 vorbehandelt, so dass nach der Stimulation mit PGN bzw. Pam3CysSK4 eine Stunde später jede der einzelnen Probenreihen sowohl ohne Antikörper als auch mit Antikörper behandelt vorlag, während alle anderen Einflussfaktoren identisch waren. Nach 48 Stunden Stimulationsdauer wurde ein WST-Assay durchgeführt.

Zur IL-6-Bestimmung mittels des ELISA wurden 50.000 TtT-GF-Zellen/well auf einer 48-well-Platte ausgesät. Auch hier wurde der Hälfte der wells eine Stunde vor der Stimulation mit Pam3CysSK4 jeweils 20 µg/ml TLR2-Antikörper zugegeben.

### 3.3.4 Wachstumsbestimmung mit dem WST-Assay

Beim WST- (*water soluble tetrazolium*) Assay handelt es sich um eine indirekte Methode zur Messung der Zellproliferation. Hierbei wird zu den Zellen das WST-Reagenz gegeben, welches mit Hilfe der mitochondrialen Succinatdehydrogenase der zu untersuchenden Zellen zu Formazan metabolisiert wird. Im ELISA-Reader kann die Lichtabsorption von Formazan, dessen Konzentration in Abhängigkeit von der Zellproliferation zunimmt, bei einer Wellenlänge von 420-480 nm gemessen werden. Die gemessene Absorption korreliert mit der Proliferationsrate der Zellen.

Zu den wie oben beschrieben auf 96-well-Platten angewachsenen Zellen wurden nach einer Stimulationsdauer von 24 bzw. 48 Stunden 10 µl WST-1-Reaganz pro well gegeben, wobei Lichteinstrahlung vermieden wurde. Nach 20 bis 60 Minuten Einwirkzeit im Brutschrank wurde die optische Dichte im ELISA-Reader bei 440 nm gemessen.

### 3.3.5 IL-6-Messung mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Die Messung von IL-6 wurde mit Hilfe eines mausspezifischen ELISA- (*enzyme-linked immunosorbent assay*) Kits durchgeführt. Das Prinzip des ELISA beruht auf einer quantitativen Sandwich-Immunoassay-Technik. Hierzu wird eine Mikrotitrierplatte, welche mit einer definierten Menge eines mausspezifischen IL-6-Antikörpers beschichtet ist, benötigt. Auf diese wird ein bestimmtes Volumen der zu untersuchenden Zellkulturüberstände und des Standards gegeben. Nach zwei Stunden, während derer die zu untersuchenden Proben und Standardkonzentrationen an diese fixierten Antikörper binden, und nach wiederholtem Waschen, wird ein weiterer mit Meerrettichperoxidase konjugierter anti-IL-6-Indikatorantikörper zugesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung zugegeben, die durch das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym umgesetzt wird. Je höher die IL-6-Konzentration in der Test- oder Standardlösung war, desto mehr wurde der enzymmarkierte Antikörper gebunden. In einer peroxidaseabhängigen Reaktion wird ein Produkt gebildet, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden kann. Die Intensität der gemessenen Farbe ist proportional zu der im ersten Schritt gebundenen Menge an IL-6. Die IL-6-Konzentrationen lassen sich aus einer Standardkurve errechnen.

### 3.3.6 Reverse Transkription/Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription/Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine molekularbiologische Methode, mit der geringe Mengen an mRNA in Zellen und Geweben nachgewiesen werden können.

Um mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion das genetische Material zu vervielfältigen und zu untersuchen, muss zunächst die RNA aus dem Gewebe gewonnen werden (RNA-Extraktion). Anschließend wird mittels der reversen Transkription die RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben und dann mit Hilfe der PCR amplifiziert.

Die Neusynthese von DNA-Sequenzen, die von zwei synthetischen Oligonukleotiden (sog. Primer) ausgeht, erfolgt mittels DNA-Polymerasen. Die Primer für die PCR werden so ausgewählt, dass sie an den Bereich der DNA angrenzen, der vervielfältigt werden soll. Durch die exponentielle Anreicherung, ausgehend von geringen Mengen an DNA ( $10^{-9}$  bis  $10^{-15}$  g), können nach mehrmaliger Wiederholung des Vorgangs (30 bis 60 Zyklen) die DNA-Abschnitte nachweisbar gemacht werden. Diese entsprechen der in der Probe vorhandenen mRNA.

#### 3.3.6.1 RNA-Extraktion

Um eine PCR durchführen zu können, muss in einem ersten Schritt die RNA aus den Zellen freigesetzt und isoliert werden. Hierfür wurden zunächst die verschiedenen Zelllinien für 48 Stunden auf 6-well-Platten angezüchtet. Dabei wurden pro well 300.000-400.000 Zellen in 1ml Wachstumsmedium gelöst.

Zur Extraktion der RNA wurden die Platten im Folgenden auf Eis gestellt. Das Medium wurde zunächst abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde zu den Zellen 1ml Lösung D gegeben, bevor sie mit einem Zellschaber aus den wells gelöst und homogenisiert wurden. Die Lösung verhinderte dabei Reaktionen zwischen RNA und der RNase, die durch Zellzerstörung vermehrt ablaufen. Anschließend wurden jeweils 800 µl des Lysats in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und 80 µl Natriumacetat, 800 µl wassergesättigtes Phenol und 160 µl Chlorophorm/Isomylalkohol (49:1) zugegeben. Zwischen den Schritten wurden die Proben jeweils auf dem Vortex-Gerät gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben 15 Minuten lang bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt führt zur Bildung von zwei Phasen: die obere Phase enthält die

RNA, während die untere Phase DNA und Proteine enthält. Die obere Phase wurde in neue Gefäße überführt und 800 µl -20°C kaltes Isopropanol hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend zur RNA-Präzipitierung über Nacht bei -20°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 14.000 rpm der Überstand vorsichtig dekantiert, und das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen. Die Proben wurden erneut für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend das Pellet bei 60°C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 40 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Mit der so gewonnenen RNA-Lösung wurde eine PCR (s.u.) mit dem Primer für GAPDH durchgeführt, um die RNA auf eine eventuelle Kontamination mit DNA zu untersuchen. Wenn DNA gefunden wurde, wurde die RNA-Extraktion wiederholt und die Probe erneut auf DNA-Kontamination hin untersucht. Die RNA-Suspension wurde bei -20°C gelagert.

Zur RNA-Extraktion aus der Mausmilz wurden zunächst auf Eis 800 µl Lösung D jeweils in ein 2 ml-Eppendorfgefäß gegeben. Das Gewebe wurde hinzugegeben und anschließend mit einem Ultra-Turax-Gerät homogenisiert, wobei mehrmals mit Ethanol bzw. DEPC-Wasser gewaschen wurde. Zu der so gewonnenen Gewebesuspension wurden 80 µl Natriumacetat, 800 µl Phenol und 160 µl Chloroform-Isomylalkohol gegeben. Zwischen diesen Einzelschritten wurde jeweils durch Vortexen gemischt. Im Folgenden wurde die RNA-Extraktion, wie oben für die Zelllinien beschrieben, durchgeführt.

### **Bestimmung der RNA-Konzentration**

Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der jeweiligen RNA-Probe mit 59 µl DEPC-Wasser versetzt. Mit Hilfe eines Photometers wurde der Extinktionskoeffizient  $\lambda 1$  bestimmt. Durch die Formel  $(\lambda 1 * 40 * 60) / 1000$ , wobei 60 dem Verdünnungsfaktor entspricht, erhält man die RNA-Konzentration in µg/ml. Zuletzt wurde von der RNA-Lösung das einem µg RNA entsprechende Volumen mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt, so dass man eine Lösung von 1 µg RNA in 10 µl Volumen erhielt.

### **3.3.6.2 Reverse Transkription**

Als nächstes wurde die so gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben, um im Folgenden die PCR durchführen zu können. Die Reaktion von RNA zu DNA wird durch das Enzym Reverse

Transkriptase katalysiert. Es wurde folgender Reaktionsansatz zusammengestellt und gut gemischt.

Menge	Reagenz
4 µl	Puffer "first strand"
10 µl	RNA-DEPC-Lösung (enthält 1µg RNA)
2 µl	dNTP Mix 2mM
2 µl	Hexanukleotide (Zufallsprimer)
2 µl	Dithiothreitol (DTT) 10 mM
1 µl	Reverse Transkriptase (200 U)

**Tabelle 4** Reaktionsansatz für Reverse Transkriptase-Reaktion

Dieser Ansatz wurde zur Durchführung der Reaktion für 60 Minuten bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde er für fünf Minuten in ein bei 95°C siedendes Wasserbad gegeben, um die Reaktion zu beenden. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

### 3.3.6.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung der für das TLR2-Gen von Maus bzw. Ratte kodierenden Nukleinsäuren aus der in der reversen Transkription gewonnenen cDNA wurden Oligonukleotidprimer, die mit Hilfe des Programms NCBI Blast identifiziert und von der Firma MWG Biotech hergestellt wurden, verwendet.

Die Primersequenzen für GAPDH und TLR2 sind in Tabelle x aufgeführt.

Zur Durchführung der PCR wurde für die Primer für GAPDH bzw. TLR2 folgender Reaktionsansatz gewählt:

10x PCR Buffer	1,5 µl
dNTP mix (2mM)	1,5 µl

MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,9 µl
Primer A Sense 10 pmol/l	0,5 µl
Primer B Antisense 10 pmol/l	0,5 µl
Taq DNA Polymerase	0,15 µl
Destilliertes Wasser	8,95 µl
cDNA	1µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	15 µl

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der jeweiligen Primer dargestellt:

<b><i>GADPH s</i></b>	5' > ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G < 3'	s = sense
<b><i>GADPH as</i></b>	5' > GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC < 3'	as = antisense
<b><i>TLR2 s</i></b>	5' > GAT GGC CGC TCC AGG TCT TTC < 3'	
<b><i>TLR2 as</i></b>	5' > CCA GCA GGA AAG CAG ACT CGC < 3'	

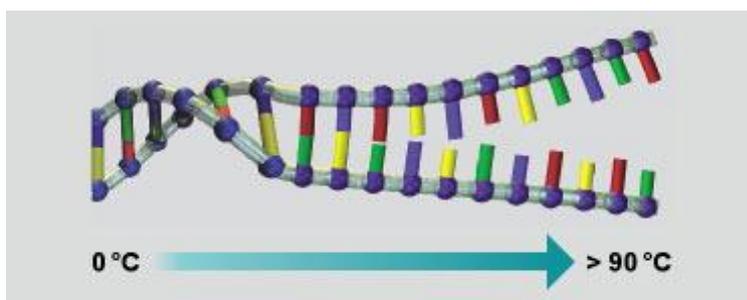
**Tabelle 5** Primersequenzen

Es wurden 35 Zyklen der PCR durchgeführt. Jeder Zyklus setzt sich aus folgenden drei Einzelschritten zusammen:

### 1. Denaturierung:

*1 Minute bei 94°C: Spaltung der Doppelstränge*

Es bilden sich Einzelstränge, die zu Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase werden.

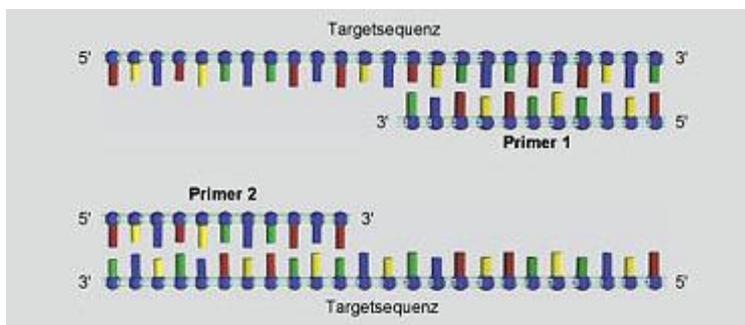


**Abbildung 4** Denaturierung: Der DNA-Doppelstrang trennt sich bei Temperaturen von rund 94°C in seine Einzelstränge auf (nach: [www.roche.de/diagnostics](http://www.roche.de/diagnostics)).

## 2. Annealing:

*1 Minute bei 65°C: Anlagerung der Primer*

Die Primer binden an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle. Die annealing-Temperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität einer PCR. Um die für die TLR2-Primer optimale *annealing*-Temperatur herauszufinden, wurde an der RNA einer Maushypophyse eine Gradienten-(RT-)PCR bei den Temperaturen 55°C, 59°C und 65°C durchgeführt. Die deutlichste Bande war bei 55°C sichtbar, deshalb wurde diese Temperatur bei den folgenden PCRs als *annealing*-Temperatur gewählt.

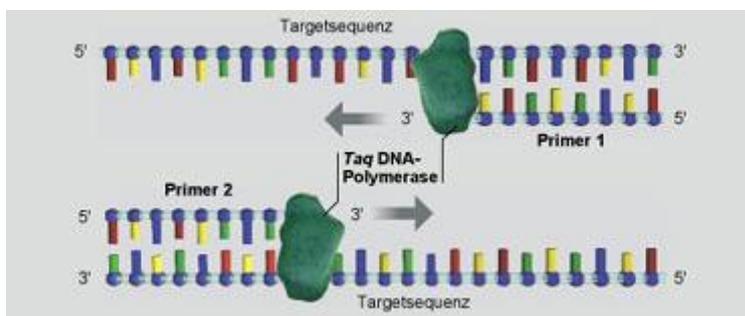


**Abbildung 5** *Annealing*: Primer binden an jeden der beiden Einzelstränge und zwar an genau den Stellen, an denen die Kopie der DNA beginnen soll.

## 3. DNA-Synthese:

*1 Minute bei 72°C: Elongation der Fragmente*

Die hitzestabile Taq-Polymerase ermöglicht die DNA-Synthese aus den im Reaktionsansatz enthaltenen Nukleotiden.



**Abbildung 6** *DNA-Synthese*: Taq-Polymerasen verlängern den Primer mit den ebenfalls zugesetzten DNA-Einzelbausteinen. So wird die einzelsträngige DNA wieder zum Doppelstrang komplettiert.

### 3.3.6.4 Gel-Elektrophorese

Um das Reaktionsprodukt der PCR in Abhängigkeit von seiner jeweiligen Länge an Basenpaaren sichtbar zu machen, wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1,2 g Agarosepulver unter Aufkochen in 100 ml 1xTBE-Puffer gelöst, und es wurden 60 µl Ethidiumbromid hinzugegeben.

Zu den durch die PCR gewonnenen 15 µl-Proben wurden je 4 µl eines Ladepuffers gegeben. 1 µl Marker wurde mit 14 µl destilliertem Wasser und ebenfalls 4 µl Ladepuffer versetzt. Je 10 µl jeder Probe wurden in die Vertiefungen des Gels pipettiert, anschließend wurde für 40 Minuten eine elektrische Spannung von 80 mV angelegt. Die Geschwindigkeit, mit der die Nukleinsäurefragmente im elektrischen Feld wandern, ist einerseits abhängig von der Länge der Fragmente (gemessen in Basenpaaren, bp) und damit ihrer Ladung; andererseits beeinflusst die Dichte des Gels (also der Gehalt an Agarose) die Wanderungsgeschwindigkeit. Zur Quantifizierung der Anzahl an Basenpaaren lässt man einen Marker mitlaufen, der Moleküle mit definierten bp-Werten enthält. So kann man die Länge der amplifizierten Fragmente ablesen, die für das GAPDH-Gen 495bp und für das TLR2-Gen 535 bp beträgt. Nach der Elektrophorese wurde unter UV-Licht eine Photographie des Gels angefertigt.

## 3.4 Statistik

Jedes Einzelexperiment wurde mit Vier- bis Sechsfachwerten durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung berechnet. Die Signifikanz des jeweiligen Unterschiedes zum Kontrollwert (bzw. Basalwert/Medium) wurde mit dem t-Test bestimmt. P kleiner als 0,05 werden als signifikant betrachtet. Der Signifikanzgrad wurde wie folgt gekennzeichnet: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Expression des *toll-like* Rezeptor 2 in Hypophysentumorzelllinien

Die Hypophysentumorzelllinien TtT-GF, GH3, AtT-20 und MtT-S wurden auf die Expression des *toll-like* Rezeptor 2 untersucht. Hierzu wurde nach der Extraktion von RNA aus den einzelnen Hypophysentumorzelllinien jeweils die RNA mittels der Reverse-Transkriptase-Reaktion in DNA umgeschrieben und anschließend eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Primer für den *toll-like* Rezeptor 2 durchgeführt. Das universell und konstant exprimierte *Housekeeping*-Gen GAPDH diente zur Kontrolle für das Vorhandensein von mRNA in den einzelnen Proben. Als Positivkontrolle, d.h. Gewebe in welchem der TLR2 vorhanden ist, diente das Milzpräparat einer Maus.

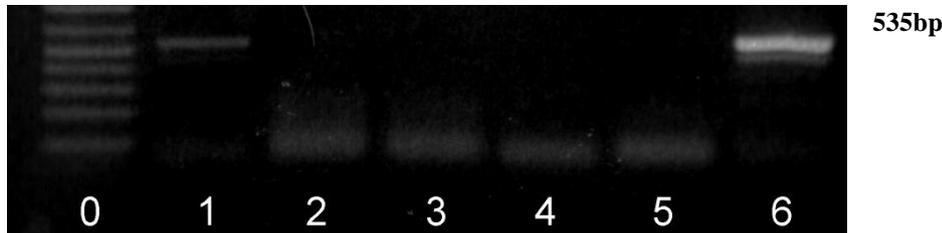
Nach Durchführung einer Gelelektrophorese mit der aus der PCR gewonnenen DNA war für TtT-GF-Zellen eine Bande im Bereich der Basenpaarlänge des zur TLR2-mRNA gehörenden Amplifikationsproduktes (535 bp) sichtbar (Abbildung 7). In den GH3-, AtT-20 und MtT-S-Zellen hingegen konnte keine TLR2-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Somit scheint der TLR2 in den follikulostellaren Hypophysenzellen vorhanden zu sein, während die hormonproduzierenden Hypophysentumorzellen diesen Rezeptor nicht besitzen (Tabelle 6).

	TtT-GF	GH3	AtT-20	MtT-S	Maus-Milz
<b>TLR2</b>	+	-	-	-	+
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+	+

**Tabelle 6** Vorkommen von TLR2-mRNA in verschiedenen Hypophysentumorzelllinien Dargestellt ist das Ergebnis einer Gelelektrophorese nach RT-PCR. Ein positiver Nachweis der TLR2- bzw. GAPDH-mRNA ist mit „+“ gekennzeichnet, ein fehlender Nachweis mit „-“.

Um zu untersuchen, ob die Transkription von TLR2-RNA durch Stimulation mit Peptidoglycan als TLR2-Ligand in GH3-Zellen induziert werden kann, wurden GH3-Zellen auf 6-well-Platten angezüchtet und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Peptidoglycan für 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurden eine RNA-Extraktion und eine RT-PCR durchgeführt. In der folgenden Gelelektrophorese zeigte sich keine Ausbildung einer Bande in

dem für das Amplifikationsprodukt des TLR2-Gens erwarteten Basenpaarbereich (Abbildung 7). Der TLR2 scheint somit auch durch die Stimulation mit entsprechenden Liganden nicht induzierbar zu sein.



**Abbildung 7** Photographie unter UV-Licht einer Gelelektrophorese nach PCR, Untersuchung auf TLR2: 0 = Marker, 1 = TtT-GF-Zellen, 2 = GH3-Zellen+Medium, 3= GH3-Zellen+1µg/ml PGN, 4 = GH3-Zellen+10µg/ml PGN, 5 = GH3-Zellen+100µg/ml PGN, 6 = Maus-Milz (Positivkontrolle).

## 4.2 Peptidoglycan stimuliert das Zellwachstum in verschiedenen Hypophysentumorzelllinien

Es wurde der Einfluss des bakteriellen Zellwandbestandteils Peptidoglycan, welcher als TLR2-Ligand bekannt ist, auf die Zellproliferation von Hypophysentumorzellen untersucht.

Hierzu wurden TtT-GF-, GH3-, AtT20- und MtT-S-Zellen für 24 und 48 (z.T. auch 72) Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Peptidoglycan (0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe des WST-Assays die Lichtabsorption bestimmt, welche proportional zur Zellzahl der einzelnen Proben ist.

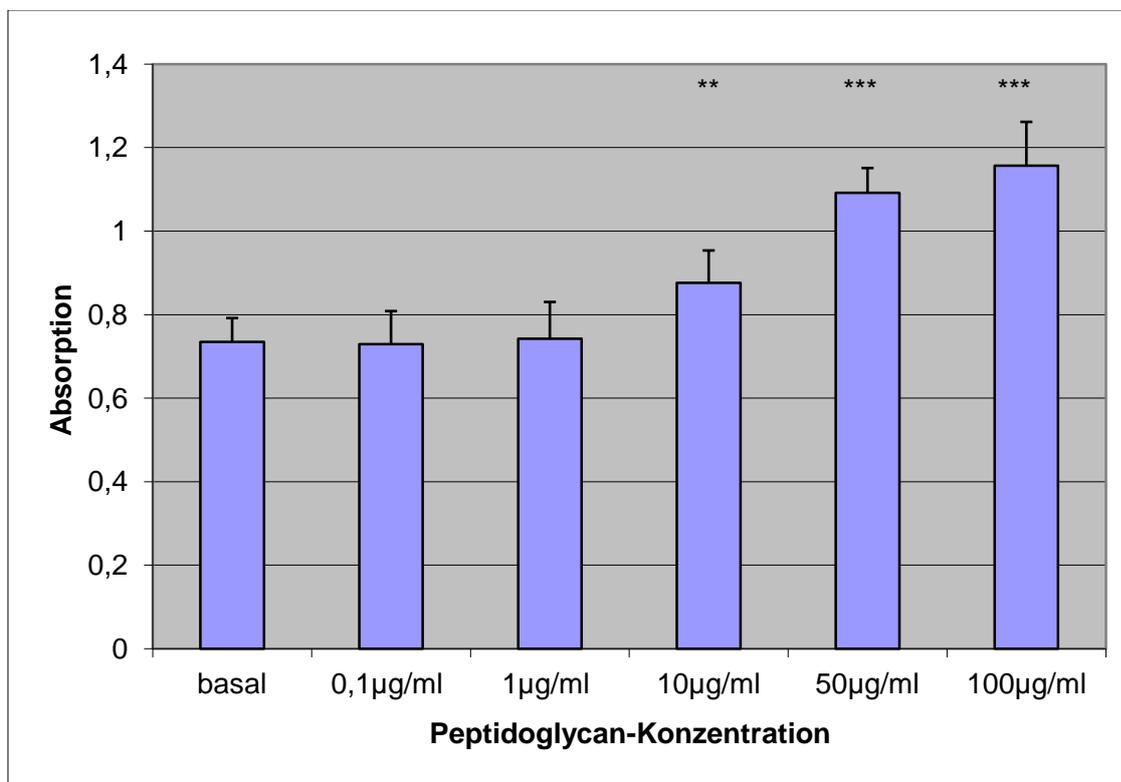
Im Folgenden wird für eine Stimulationsdauer von 48 Stunden dargestellt, wie sich die Gabe von Peptidoglycan in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten der verschiedenen untersuchten Zelllinien auswirkte. Im zeitlichen Vergleich (24-48-72 Stunden) zeigte sich jeweils eine Zunahme der Zellproliferation im zeitlichen Verlauf.

### 4.2.1 Peptidoglycan führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Zellproliferation von TtT-GF-Zellen

Die TtT-GF-Zellen wurden auf 96-well-Platten angezüchtet, indem pro well 8.000 Zellen ausgesät wurden, welche anschließend je 24 Stunden in 10% FCS-haltigem Medium und in

serumfreiem Medium wachsen konnten. Es folgte die Stimulation mit Peptidoglycan, welches in verschiedenen Konzentrationen in 1% FCS-haltigem Medium suspendiert wurde. Als Negativkontrolle wurde 1% FCS-haltiges Medium ohne Peptidoglycan verwendet.

Nach 48stündiger Behandlung von TtT-GF-Zellen mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen (0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml) zeigte sich ein konzentrationsabhängiges verstärktes Wachstum der Zellen. Insbesondere ab einer Konzentration von 10 µg/ml Peptidoglycan kam es zu einem deutlichen Anstieg des Zellwachstums bzw. der im WST-Assay gemessenen Zunahme der Absorption (Abbildung 8).



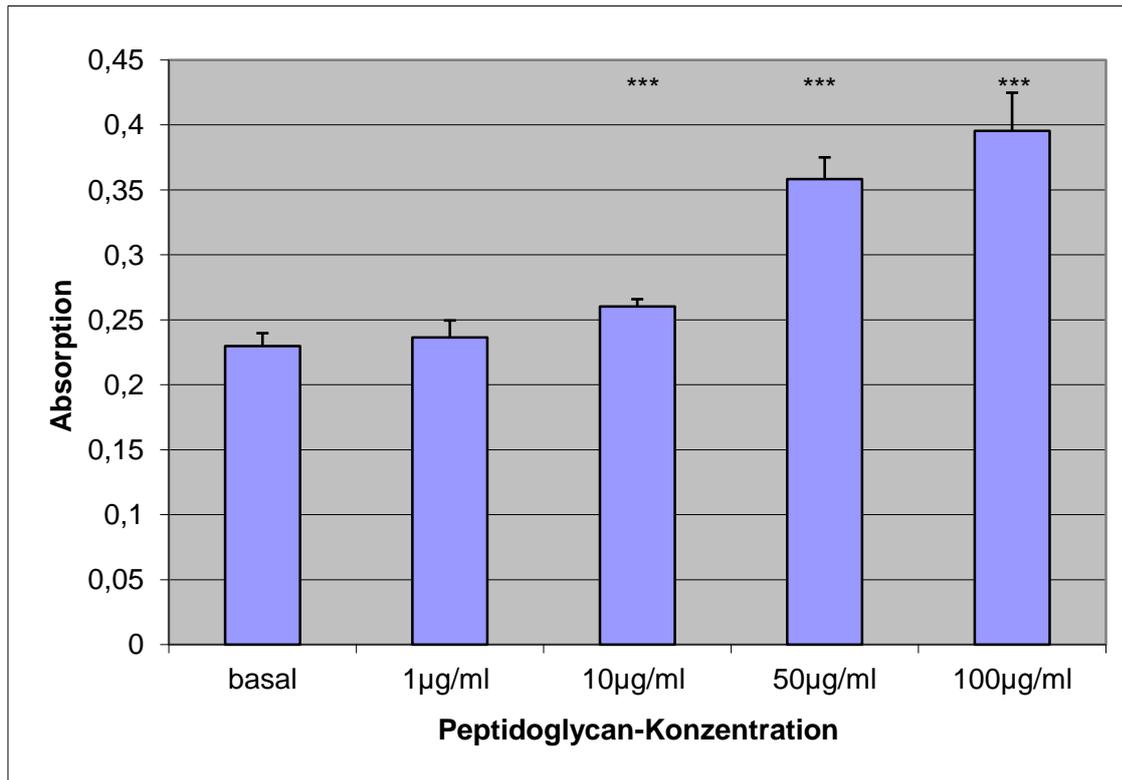
**Abbildung 8** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen: Von der Peptidoglycan-Konzentration abhängige Zunahme der Absorption als Maß der Zellproliferation.

#### 4.2.2 Peptidoglycan führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Zellproliferation von GH3-Zellen

Zur Beurteilung der Auswirkung einer Stimulation mit Peptidoglycan auf die hormonproduzierenden GH3-Zellen wurden diese nach Aussäen in einer Dichte von 6.000

Zellen/well für je 24 Stunden in 10% FCS-haltigem Medium und in serumfreiem Medium angezüchtet. Anschließend folgte eine 48-stündige Stimulation mit Peptidoglycan in unterschiedlichen Konzentrationen.

Hierbei zeigte sich ein konzentrationsabhängiges verstärktes Wachstum der Hypophysentumorzellen. Insbesondere ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  PGN kam es zu einem deutlichen Anstieg der Zellproliferation (Abbildung 9).

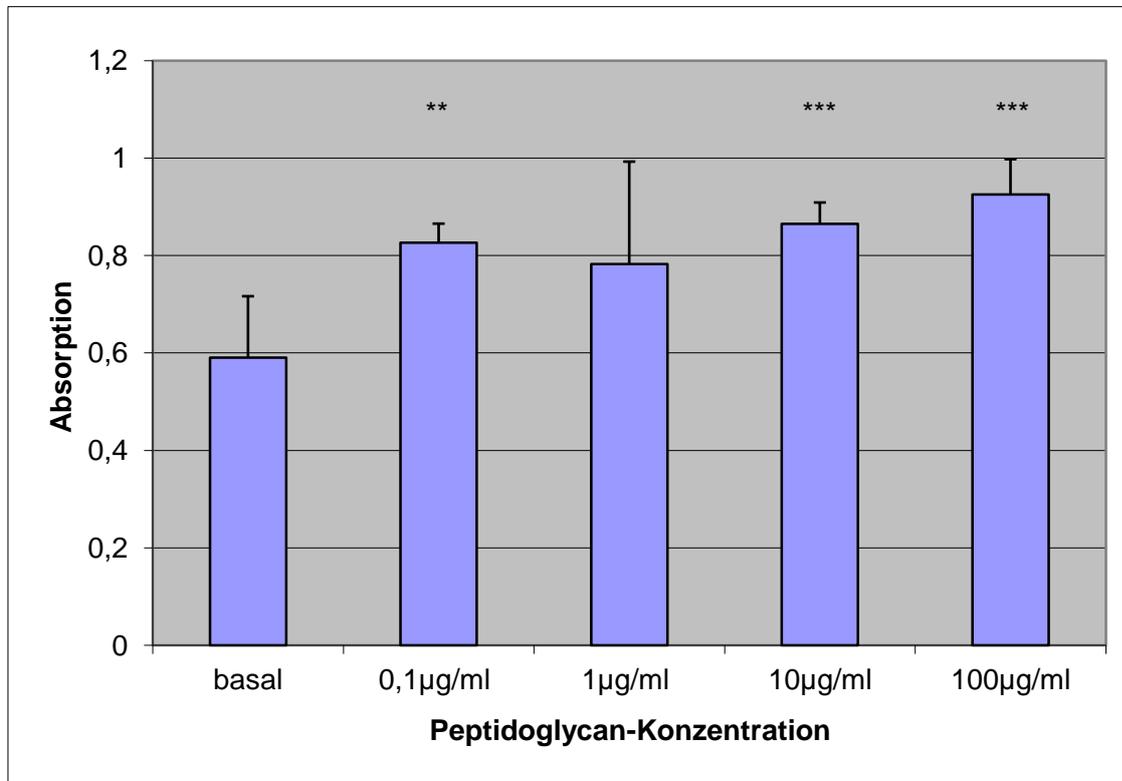


**Abbildung 9** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der GH3-Zellen mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen (1,0 – 100  $\mu\text{g/ml}$ ): Es zeigte sich eine von der Peptidoglycan-Konzentration abhängige Zunahme der Lichtabsorption als Maß der Zellproliferation.

#### 4.2.3 Peptidoglycan führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Zellproliferation von AtT-20-Zellen

Um den Einfluss einer Stimulation mit Peptidoglycan auf die AtT-20-Zellen zu untersuchen, wurde eine Zelldichte von 10.000 Zellen pro well auf 96-well-Platten verwendet und im Übrigen verfahren wie für TtT-GF- und GH3-Zellen beschrieben. Nach 48-stündiger Stimulationsdauer zeigte sich ein konzentrationsabhängiges verstärktes Wachstum der

Hypophysentumorzellen. Hierbei trat ein deutlicher Anstieg des Zellwachstums bereits bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Peptidoglycan auf (Abbildung 10).

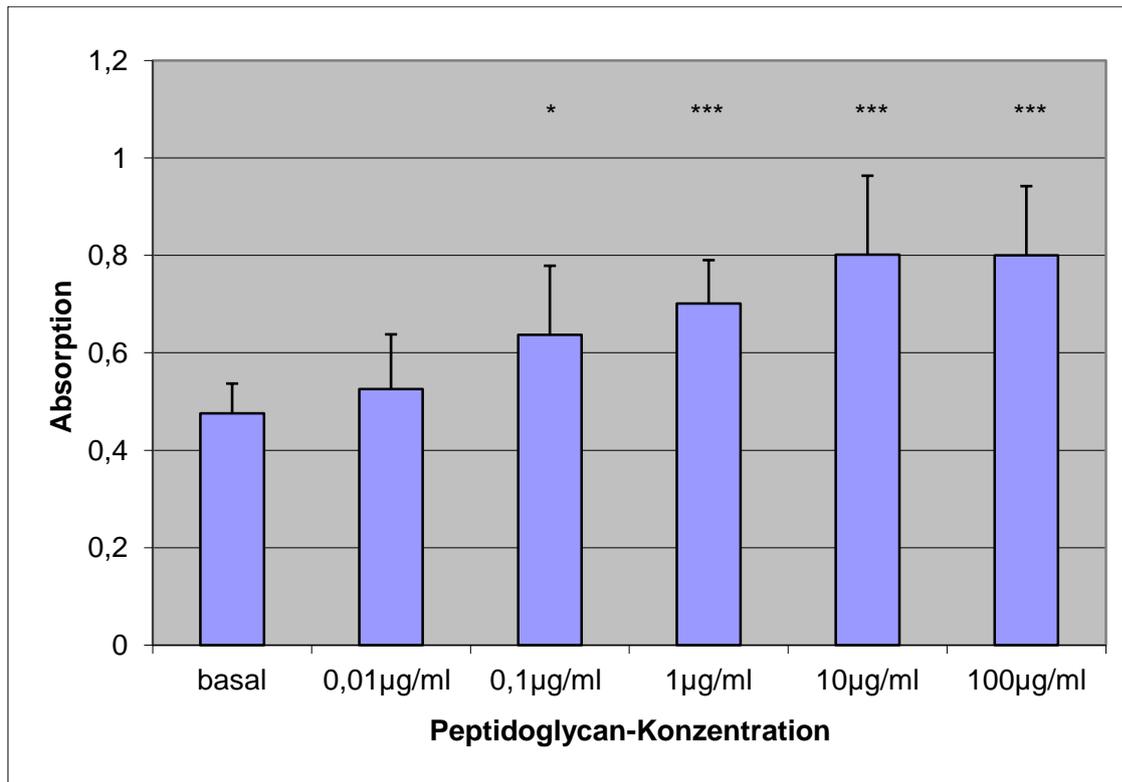


**Abbildung 10** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der AtT-20-Zellen mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen: Peptidoglycan-konzentrationsabhängige Zunahme der Extinktion als Maß der Zellproliferation.

#### 4.2.4 Peptidoglycan führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Zellproliferation von MtT-S-Zellen

Auch bei MtT-S-Zellen wurden die Auswirkungen einer Stimulation mit Peptidoglycan auf das Zellwachstum untersucht. Hierzu wurden die Hypophysentumorzellen in einer Dichte von 5.000 Zellen pro well auf 96-well-Platten ausgesät und mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ ; 50  $\mu\text{g/ml}$ ; 100  $\mu\text{g/ml}$ ) für 48 Stunden stimuliert.

Im anschließend durchgeführten WST-Assay zeigte sich eine Zunahme der gemessenen optischen Dichte als Ausdruck einer von der Peptidoglycan-Konzentration abhängigen Wachstumszunahme der MtT-S-Zellen (Abbildung 11).



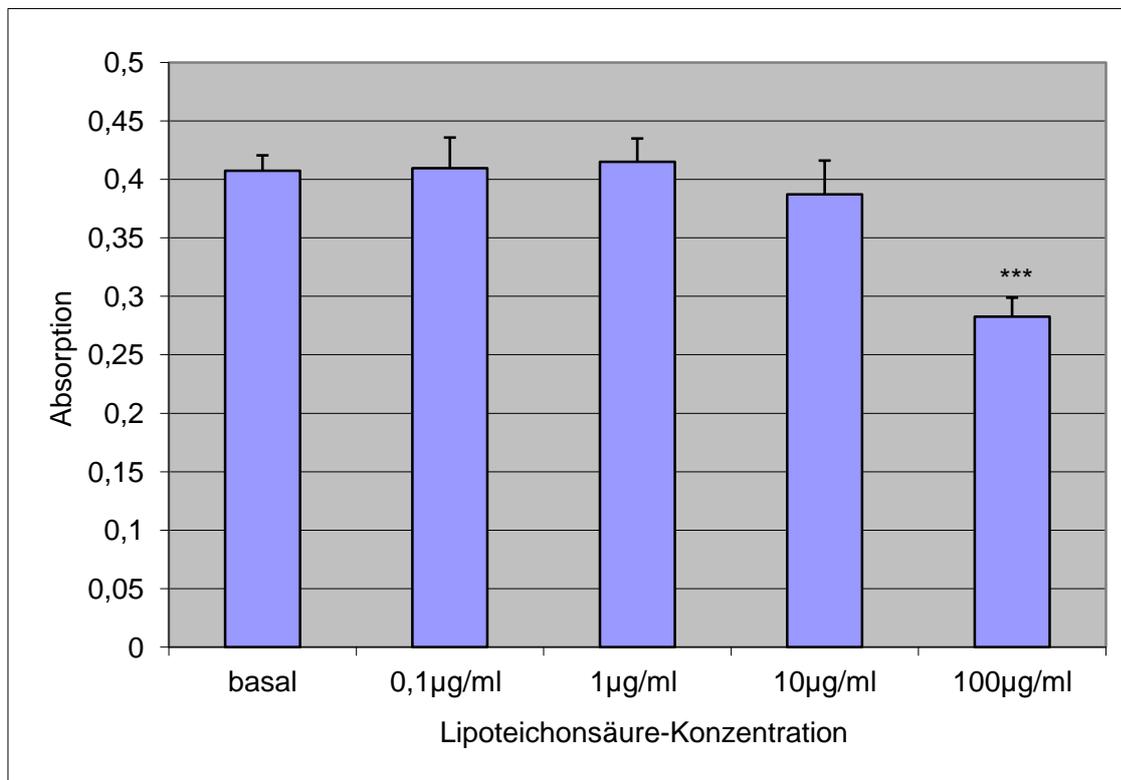
**Abbildung 11** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der MtT-S-Zellen mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen: Von der Peptidoglycankonzentration abhängige Zunahme der Extinktion als Maß der Zellproliferation.

### 4.3 Unterschiedliche Auswirkungen einer Stimulation mit Lipoteichonsäure auf die verschiedenen Zelllinien

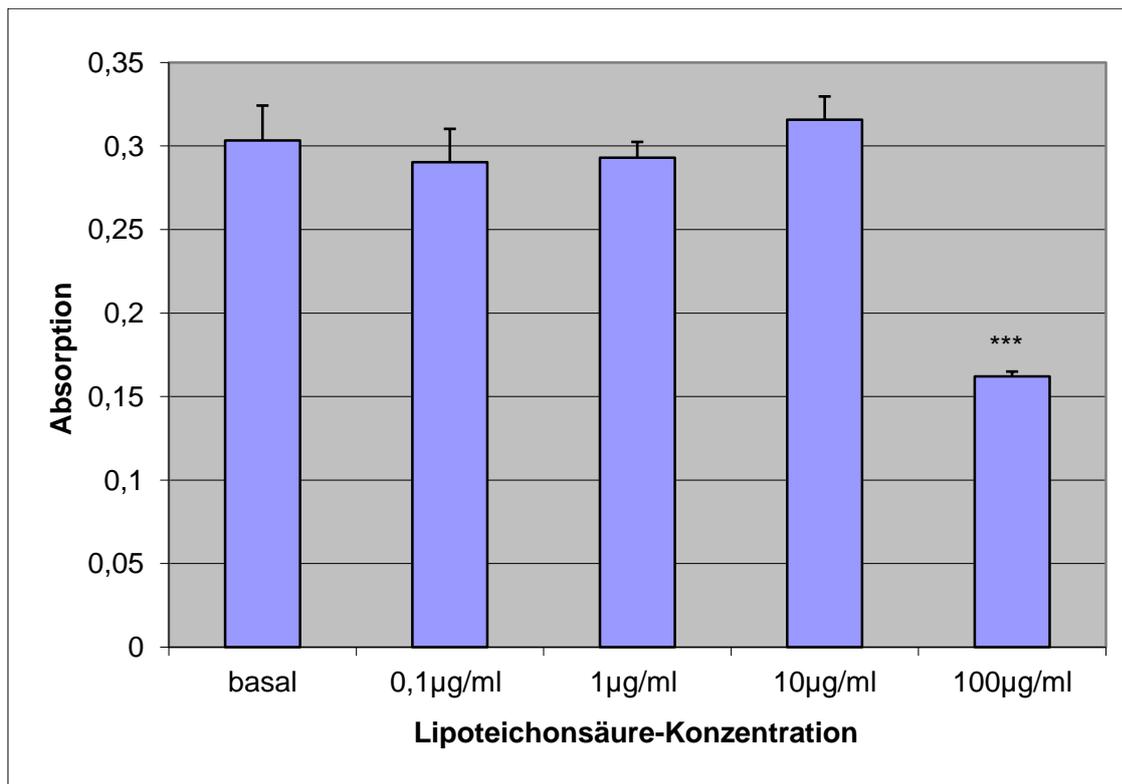
Lipoteichonsäure (LTA) gilt, wie Peptidoglycan, als Ligand des TLR2. Zur Überprüfung der Wirkung dieses bakteriellen Zellwandbestandteils auf die Proliferation von Hypophysenzellen wurden Stimulationsexperimente an TtT-GF-, GH3-, AtT-20- und MtT-S-Zellen durchgeführt. Diese entsprachen in der Vorgehensweise den Versuchen zur Proliferationsbestimmung unter Peptidoglycan-Stimulation.

### 4.3.1 Lipoteichonsäure bewirkt in höherer Dosierung einen Rückgang der TtT-GF- und GH3-Zellzahl

Zur Vorbereitung der Stimulatiosexperimente mit Lipoteichonsäure wurden 7.000 TtT-GF-Zellen bzw. 5.000 GH3-Zellen pro well in 10% FCS-haltigem Medium auf 96-well-Platten angezüchtet. Nach weiteren 24 Stunden in serumfreiem Medium erfolgte die Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) von Lipoteichonsäure. Die Stimulationsdauer betrug jeweils 24 und 48 Stunden. Anschließend wurde mit Hilfe des WST-Assays die Zellproliferation bestimmt. In den Abbildungen 12 und 13 sind die Ergebnisse nach 48-stündiger Behandlung der TtT-GF- bzw. GH3-Zellen mit Lipoteichonsäure dargestellt, die Ergebnisse bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden fielen analog aus (nicht dargestellt). Bei einer Lipoteichonsäure-Konzentration von 0,1-10  $\mu\text{g/ml}$  zeigte sich keine Änderung der Zellproliferation, bei 100  $\mu\text{g/ml}$  Lipoteichonsäure nahm die im WST-Assay gemessene Lichtabsorption deutlich ab, entsprechend einem signifikanten Rückgang der jeweiligen Zellzahl.



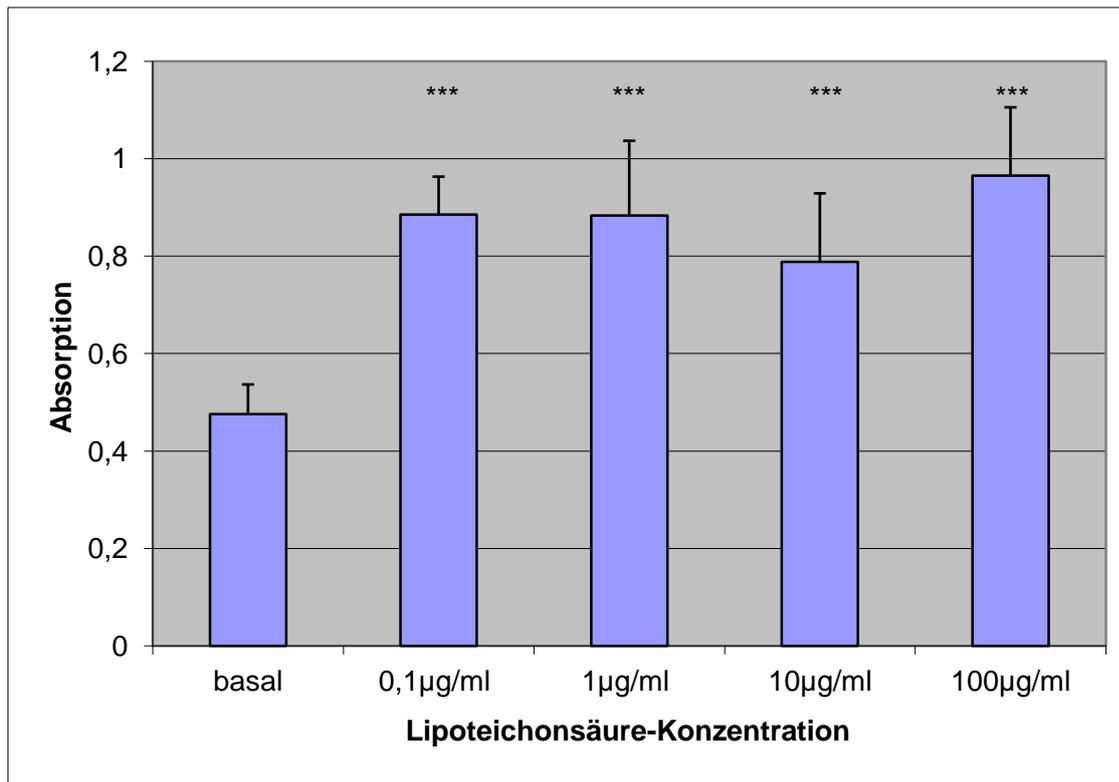
**Abbildung 12** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Lipoteichonsäure in verschiedenen Konzentrationen: Bei einer Lipoteichonsäure-Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  deutliche Abnahme der Absorption als Maß der Zellproliferation.



**Abbildung 13** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der GH3-Zellen mit Lipoteichonsäure in verschiedenen Konzentrationen: Bei einer Lipoteichonsäure-Konzentration von 100 µg/ml deutliche Abnahme der Absorption als Maß der Zellproliferation.

#### 4.3.2 Bei MtT-S-Zellen bewirkt die Stimulation mit Lipoteichonsäure eine Zunahme der Zellproliferation

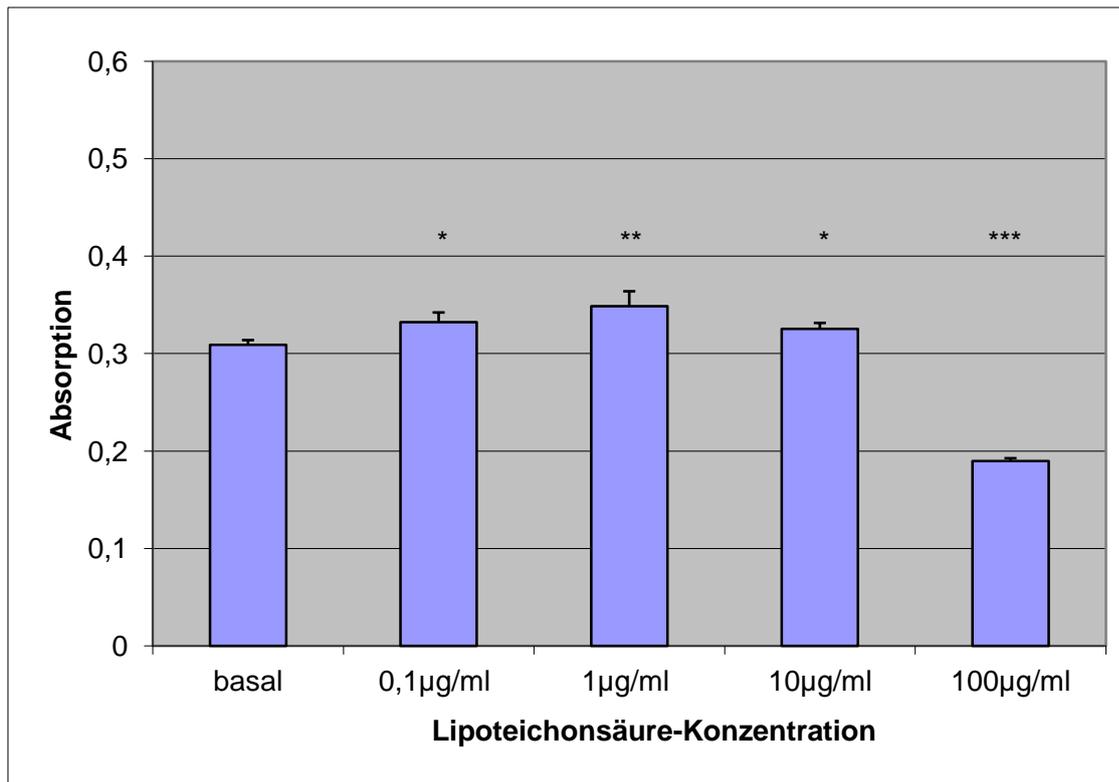
Bei 48stündiger Stimulation von MtT-S-Zellen, welche in einer Anfangsdichte von 5.000 Zellen pro well ausgesät worden waren, mit unterschiedlichen Konzentrationen von Lipoteichonsäure zeigte sich eine Zunahme der im WST-1-Assay untersuchten Zellproliferation. Diese Wachstumszunahme unterschied sich kaum bei den unterschiedlichen eingesetzten Lipoteichonsäure-Konzentrationen (0,1; 1,0; 10; 100 µg/ml) (Abbildung 14).



**Abbildung 14** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der MtT-S-Zellen mit Lipoteichonsäure in verschiedenen Konzentrationen: Zunahme der Absorption als Maß der Zellproliferation bei Stimulation mit Lipoteichonsäure in Konzentrationen von 0,1 bis 100 µg/ml.

#### **4.3.3 Die Stimulation von AtT-20-Zellen mit Lipoteichonsäure bewirkt konzentrationsabhängig eine Steigerung bzw. Abnahme der Zellproliferation**

Auch bei der AtT-20-Zelllinie wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit Lipoteichonsäure auf das Zellwachstum untersucht. Die anfängliche Zellzahl betrug 8.000 Zellen pro well. Nach je 24stündiger Inkubationszeit in Medium, welches 10% bzw. 0% FCS enthielt, wurde eine Stimulation mit Lipoteichonsäure in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt (0,1; 1; 10; 100 µg/ml). Bei der Untersuchung der Zellproliferation im WST-1-Assay ließ sich eine Zellwachstumszunahme insbesondere bei niedrigeren Lipoteichonsäure-Konzentrationen feststellen. Diese war bei Zugabe von 1 µg/ml LTA am stärksten ausgeprägt, weniger bei 10 µg/ml. Bei einer LTA-Konzentration von 100 µg/ml kam es dagegen zu einer deutlichen Abnahme der im WST-1-Assay bestimmten AtT-20-Zellzahl (Abbildung 15).



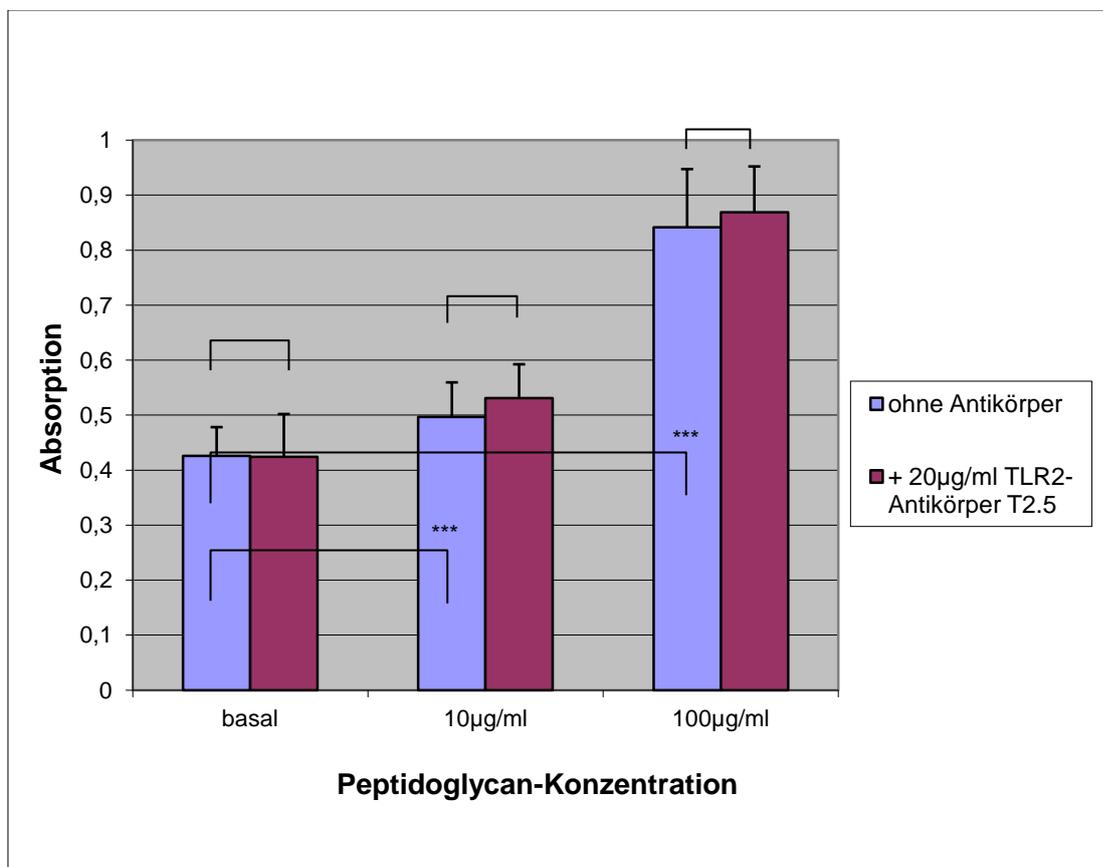
**Abbildung 15** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der AtT-20-Zellen mit Lipoteichonsäure in verschiedenen Konzentrationen: Zunahme der Zellproliferation bei Stimulation mit Lipoteichonsäure in Konzentrationen von 0,1 bis 10 µg/ml, deutliche Abnahme der Lichtabsorption und damit der Zellzahl bei 100 µg/ml LTA.

#### 4.4 Der *toll-like* Rezeptor 2-Antikörper hat keinen Einfluss auf die Peptidoglycan-vermittelte Wachstumsstimulation von TtT-GF-Zellen

Mit Hilfe der PCR konnte bei den TtT-GF-Zellen der *toll-like* Rezeptor 2 nachgewiesen werden. Nachdem eine Stimulation mit Peptidoglycan als einem bekannten unspezifischen TLR-2-Liganden zu einer Zellproliferationszunahme von TtT-GF-Zellen in Abhängigkeit von der Peptidoglycan-Konzentration geführt hatte, wurde nun überprüft, ob die Steigerung der Zellwachstums über den TLR2 vermittelt wird. Hierzu wurden die Zellen erneut mit Peptidoglycan stimuliert, wobei zur Blockierung des TLR2 der TLR2-Antikörpers (T2.5) hinzugegeben wurde.

Nach Aussäen der Zellen in einer Dichte von 5000 TtT-GF-Zellen/well wurden diese 24 Stunden in 10% FCS-haltigem und weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium angezüchtet. Anschließend wurde die Hälfte der wells mit jeweils 20 µg/ml des TLR2-Antikörpers

vorbehandelt und inkubiert. Nach einer Stunde wurden die wells mit 0, 10 bzw. 100  $\mu\text{g/ml}$  Peptidoglycan stimuliert und 48 Stunden inkubiert, bevor der WST-Assay zur Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt wurde. Es zeigte sich wiederum eine Zunahme der Zellproliferation in Abhängigkeit von der Peptidoglycan-Konzentration. Die Zugabe des gegen *toll-like* Rezeptor 2 gerichteten Antikörpers wirkte sich nicht auf die Peptidoglycan-vermittelte Wachstumssteigerung aus. Somit wird die durch Zugabe von Peptidoglycan ausgelöste Steigerung der Proliferation der Hypophysentumorzellen nicht durch den TLR2 vermittelt (Abbildung 16).

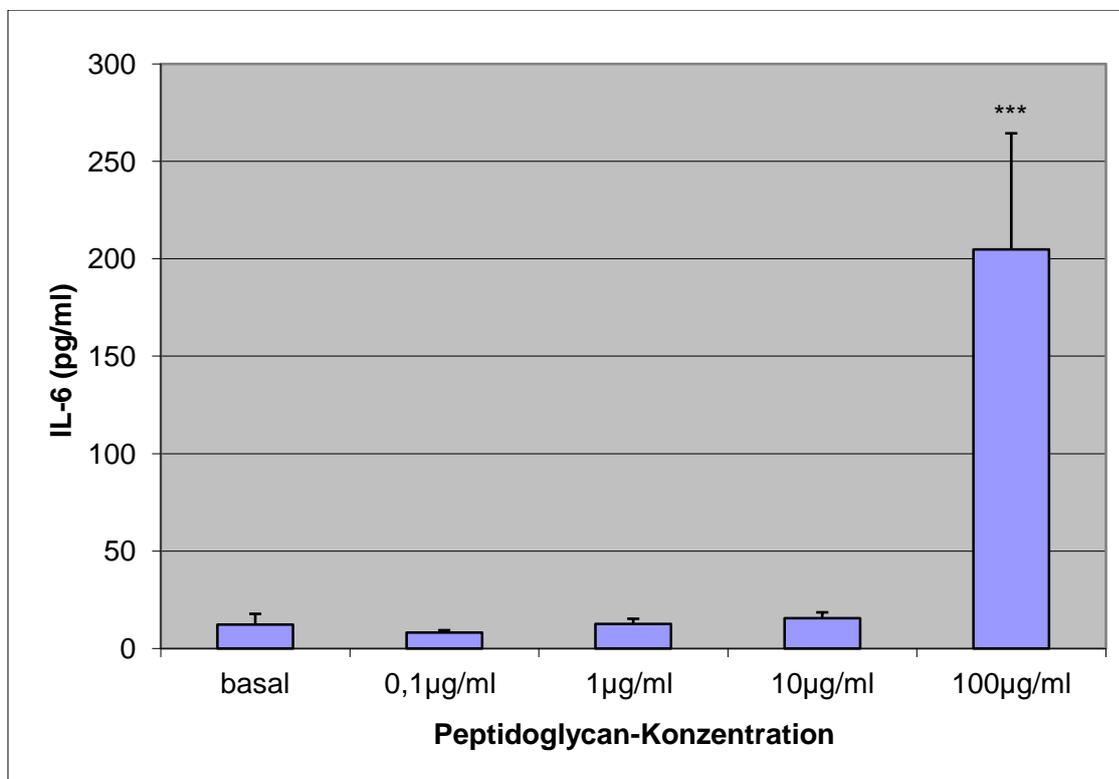


**Abbildung 16** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen jeweils ohne bzw. mit Zugabe des TLR2-Antikörpers T2.5: Peptidoglycan-konzentrationsabhängige Zunahme der Absorption (blaue Balken), keine Verminderung der Absorption durch zusätzliche Gabe des TLR2-Antikörpers (rote Balken).

#### 4.5 Peptidoglycan bewirkt eine verstärkte IL-6-Sekretion von TtT-GF-Zellen

Um zu untersuchen, ob sich die Stimulation durch Peptidoglycan neben dem Effekt auf das Zellwachstum auch auf die Funktionalität der TtT-GF-Zellen auswirkt, wurde die IL-6-Sekretion in Abhängigkeit von der Stimulationsdosis im Vergleich zur basalen Sekretion der Hypophysenzellen untersucht. Hierzu wurden 50.000 TtT-GF-Zellen pro well ausgesät und anschließend 24 Stunden in 10% FCS-haltigem und weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium angezchtet. Im Anschluss daran wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 µg/ml, 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml) von Peptidoglycan stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Überstände abpipettiert. Mittels ELISA erfolgte die Bestimmung der IL-6-Konzentration im Medium, das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt.

Die Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Peptidoglycan führte erst bei einer Konzentration von 100 µg/ml zu einer dann deutlichen Zunahme der IL-6-Sekretion. Bei Stimulation mit geringeren Konzentrationen von Peptidoglycan zeigte sich keine signifikante Änderung der IL-6-Sekretion im Vergleich zur basalen IL-6-Produktion der Hypophysenzellen.

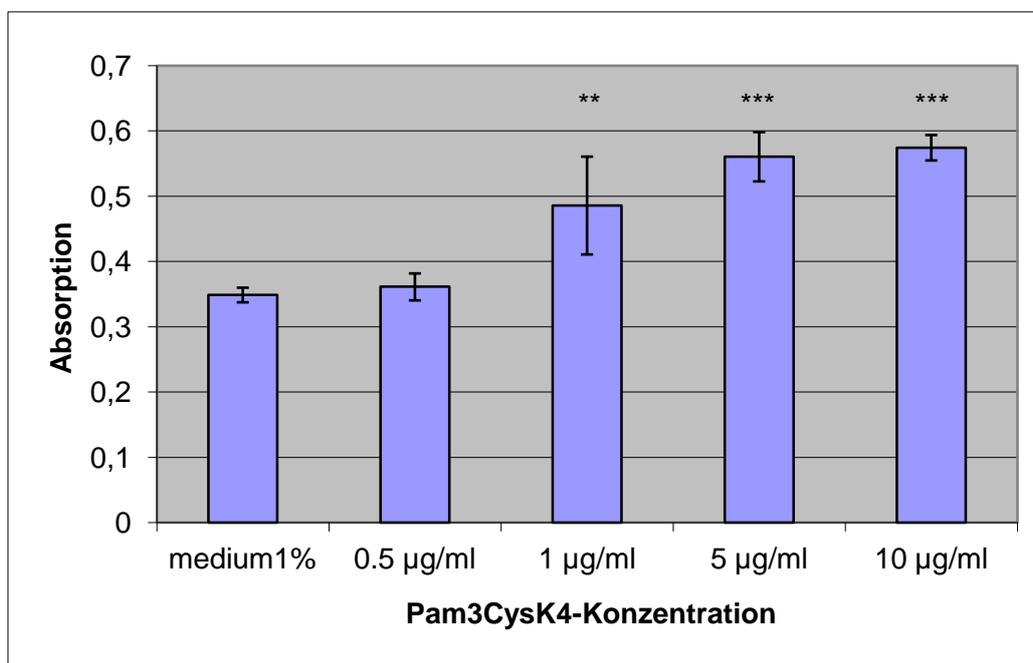


**Abbildung 17** IL-6-Bestimmung mittels ELISA nach 48-stündiger Stimulation von TtT-GF-Zellen mit Peptidoglycan in verschiedenen Konzentrationen: Signifikante Steigerung der IL-6-Sekretion gegenüber der basalen IL-6-Produktion bei einer Peptidoglycan-Konzentration von 100 µg/ml.

## 4.6 Pam3CysSK4 führt zu einer Proliferationssteigerung der TtT-GF-Zellen

Nachdem Wachstumsversuche unter Gabe eines TLR2-Antikörpers gezeigt hatten, dass die Peptidoglycan-abhängige Proliferationssteigerung der TtT-GF-Zellen nicht über den *toll-like* Rezeptor 2 vermittelt wird, wurde nun überprüft, wie sich die Stimulation der TtT-GF-Zellen mit einem hochspezifischen TLR2-Liganden, dem bakteriellen Lipoprotein Pam3CysK4, auf die Zellproliferation auswirkt.

Hierzu wurden 5000 TtT-GF-Zellen pro well ausgesät und anschließend 24 Stunden in 10% FCS-haltigem und weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium angezchtet. Zur Stimulation der TtT-GF-Zellen wurde für 48 Stunden 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml Pam3CysK4 bzw. als Kontrolle Medium hinzugegeben. Anschließend wurde ein WST-Assay durchgeführt, in welchem die Absorption als Maß für die Zellproliferation gemessen wurde. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängig verstärktes Wachstum der TtT-GF-Zellen, insbesondere verstärkt bei einer Konzentration von 5 bzw. 10 µg/ml Pam3CysK4 ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 18).



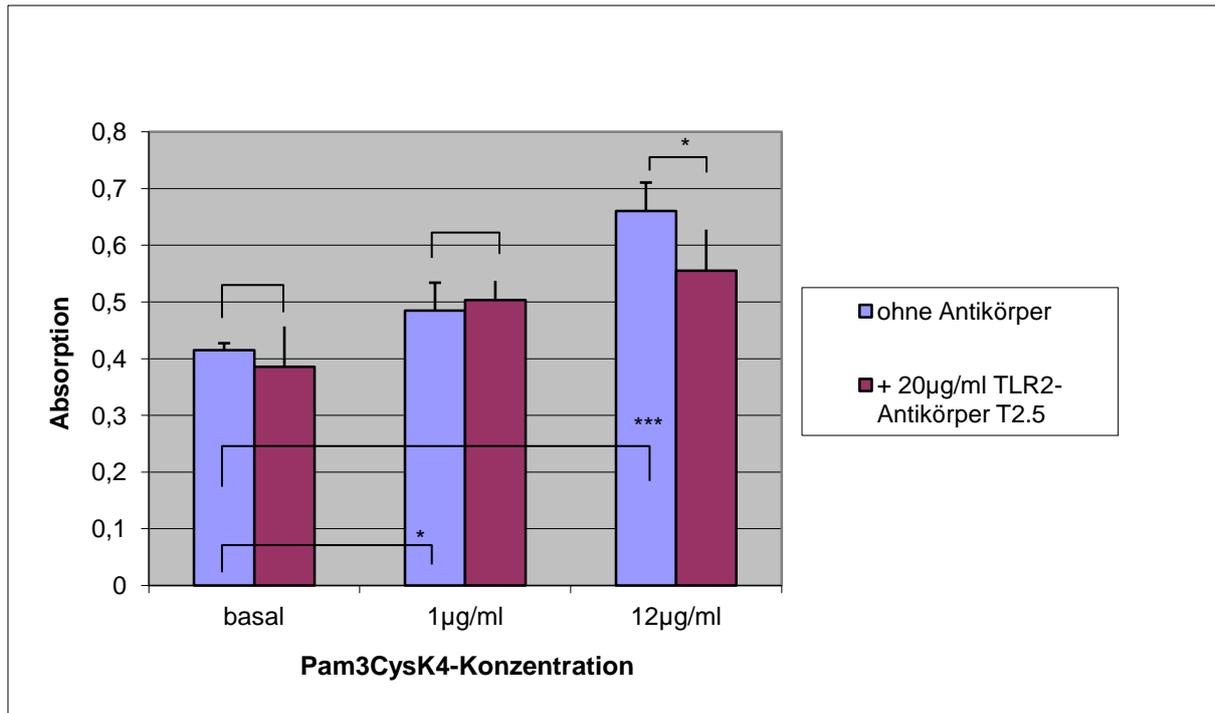
**Abbildung 18** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium (basal) bzw. Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Pam3CysK4 in verschiedenen Konzentrationen: Pam3CysSK4-Konzentrationsabhängige Zunahme der photometrisch gemessenen Absorption.

#### **4.7 Abschwächung der Pam3CysSK4-vermittelten Wachstumsstimulation durch einen TLR2-Antikörper**

Um zu überprüfen, welche Rolle der TLR2 bei der durch Pam3CysK4 ausgelösten Wachstumssteigerung der TtT-GF-Zellen spielt, wurde der TLR2 vor der Zugabe von Pam3CysK4 durch den spezifischen Antikörper T2.5 blockiert.

Hierzu wurden nach Aussäen der Zellen in einer Dichte von 5000 TtT-GF-Zellen/well diese je 24 Stunden in 10% FCS-haltigem und in serumfreiem Medium angezchtet. Im Anschluss daran wurde die Hälfte der wells mit jeweils 20 µg/ml des TLR2-Antikörpers vorbehandelt, der anderen Hälfte der wells wurde parallel dazu Medium hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurden die wells mit 0,1 bzw. 12 µg/ml Pam3CysSK4 stimuliert und 48 Stunden inkubiert, bevor der WST-Assay zur Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt wurde.

Es zeigte sich wiederum eine Zunahme der Zellproliferation in Abhängigkeit von der Pam3CysSK4 -Konzentration. Die durch Pam3CysSK4 induzierte Wachstumssteigerung wurde bei einer Konzentration von 12µg/ml Pam3CysSK4 durch den Antikörper abgeschwächt. Bei Stimulation der TtT-GF-Zellen mit 1µg/ml Pam3CysSK4 beeinflusste der Antikörper die Steigerung der Proliferation der Hypophysenzellen hingegen nicht (Abbildung 19).



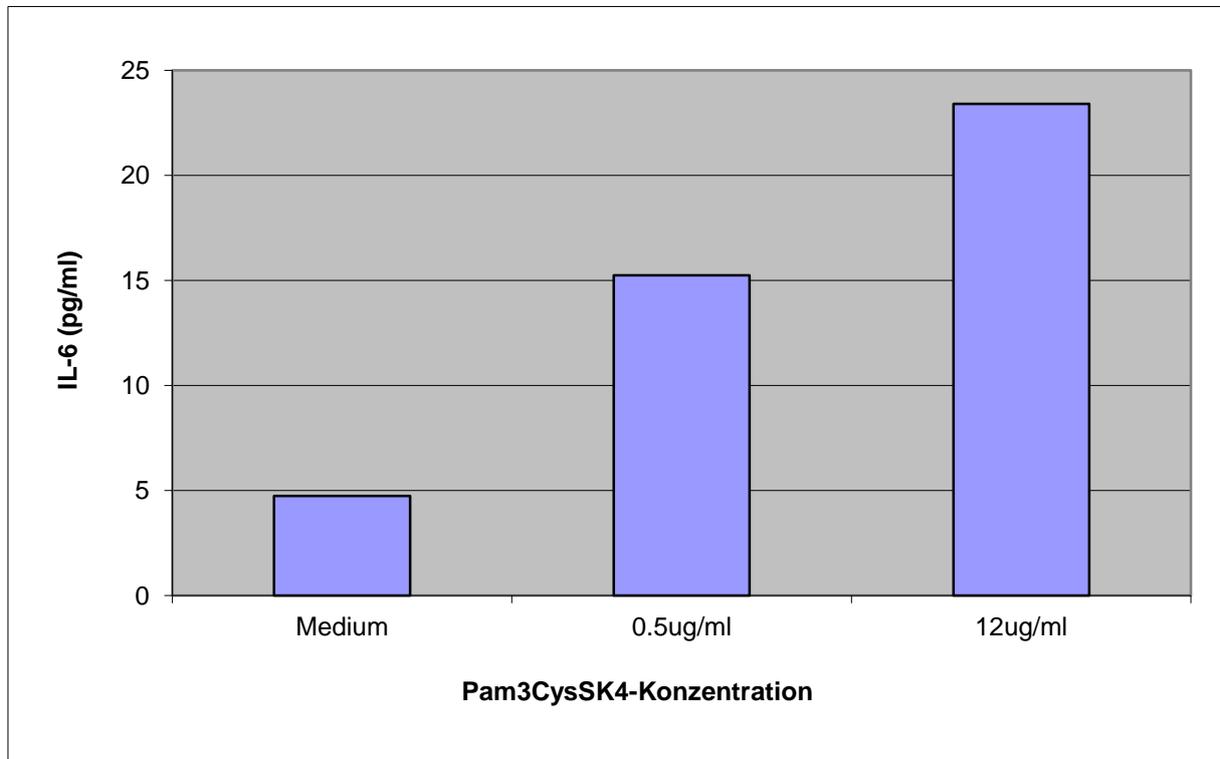
**Abbildung 19** Zellproliferationsbestimmung im WST-Assay nach 48-stündiger Inkubation mit Medium bzw. Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Pam3CysSK4 in verschiedenen Konzentrationen ohne bzw. mit Zugabe des TLR2-Antikörpers T2.5: Pam3CysSK4-konzentrationsabhängige Zunahme der Absorption (blaue Balken). Abschwächung der Proliferationssteigerung durch Zugabe des TLR2-Antikörpers bei Stimulation mit 12 µg/ml Pam3CysK4 (rote Balken).

#### 4.8 Pam3CysSK4 bewirkt eine dosisabhängige Erhöhung der IL-6-Sekretion der TtT-GF-Zellen

Zur Überprüfung, ob sich die Stimulation durch Pam3CysSK4 neben dem Effekt auf das Zellwachstum auch auf die Funktionalität von TtT-GF-Zellen auswirkt, wurde die IL-6-Sekretion in Abhängigkeit von der Stimulationsdosis im Vergleich zur basalen Sekretion untersucht.

Hierzu wurden auf einer 48-well-Platte 50.000 TtT-GF-Zellen pro well ausgesät und anschließend für 24 Stunden in 10% FCS-haltigem und für weitere 24 Stunden in einem serumfreiem Medium angezchtet. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 12 µg/ml) von Pam3CysSK4 stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abpipettiert. Mittels ELISA erfolgte die Bestimmung der IL-6-Konzentration im Medium. Hierbei zeigte sich ein von der

Pam3CysSK4-Dosis abhängiger Anstieg der IL-6-Sekretion durch die Hypophysenzellen (Abbildung 20).



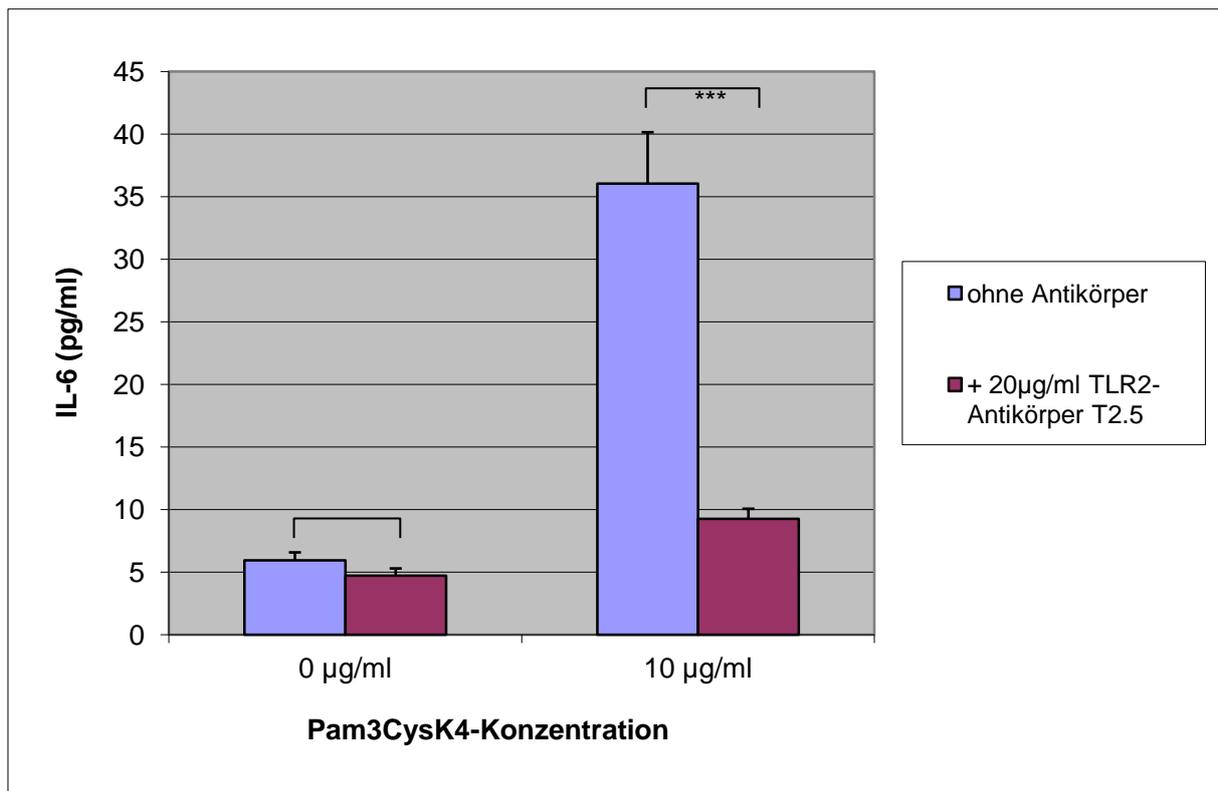
**Abbildung 20** IL-6-Bestimmung mittels ELISA nach 24-stündiger Inkubation mit Medium(basal) bzw. Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Pam3CysSK4 in verschiedenen Konzentrationen: Von der Pam3CysSK4-Dosis abhängiger Anstieg der IL-6-Sekretion.

#### 4.9 Hemmung der Pam3CysSK4-vermittelten IL-6 Sekretionssteigerung durch T2.5

Nachdem die Exposition der TtT-GF-Zellen gegenüber Pam3CysSK4 zu einer Steigerung der IL-6-Sekretion geführt hatte, wurde nun untersucht, ob sich die Erhöhung der Zytokinfreisetzung durch die Gabe des TLR2-Antikörpers T2.5 inhibieren lässt. Hierzu wurden nach Aussäen der TtT-GF-Zellen auf einer 96-well-Platte in einer Dichte von 5000 Zellen/well diese je 24 Stunden in 10% FCS-haltigem und in serumfreiem Medium angezchtet. Anschließend wurde die Hälfte der wells mit jeweils 20 µg/ml des TLR2-Antikörpers vorbehandelt und inkubiert. Nach einer Stunde wurden die wells mit 10 µg/ml Pam3CysK4 stimuliert bzw. zur Kontrolle mit Medium versetzt und 24 Stunden inkubiert,

bevor der ELISA zur Bestimmung der IL-6-Sekretion durchgeführt wurde.

Die Zugabe des TLR2-Antikörpers wirkte sich auf die basale IL-6-Sekretion der TtT-GF-Zellen nicht signifikant aus. Die Erhöhung der IL-6-Konzentration nach Stimulation mit 10 µg/ml Pam3CysK4 wurde hingegen durch den TLR2-Antikörper erheblich abgeschwächt und fiel nur noch vergleichsweise gering aus (siehe Abbildung 21). Die Stimulation der IL-6-Sekretion der Hypophysenzellen durch Pam3Cysk4 wird somit weitgehend durch den TLR2 vermittelt.



**Abbildung 21** Bestimmung der IL-6-Sekretion im ELISA nach 24-stündiger Inkubation mit Medium bzw. Stimulation der TtT-GF-Zellen mit Pam3CysSK4, jeweils mit bzw. ohne Zugabe des TLR2-Antikörpers T2.5: Abschwächung der Pam3CysSK4-abhängigen IL-6-Sekretionssteigerung der TtT-GF-Zellen durch TLR2-Blockade.

## 5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte der *toll-like* Rezeptor 2 in einer als Modell für hypophysäre FS-Zellen dienenden Zelllinie, den TtT-GF-Zellen, nachgewiesen werden. In den untersuchten hormonproduzierenden Hypophysentumorzellen war der TLR2 nicht nachweisbar. Nach Stimulation der FS-ähnlichen TtT-GF-Zellen mit einem spezifischen TLR2-Liganden, dem bakteriellen Lipoprotein Pam3CysSK4, kam es zu einer von der Pam3CysSK4-Konzentration abhängigen Steigerung von Zellwachstum und IL-6-Sekretion der Zellen. Durch einen TLR2-Antikörper wurde die Wirkung des Lipoproteins deutlich abgeschwächt. Bakteriell Peptidoglycan führte sowohl bei der TLR2-exprimierenden TtT-GF-Zelllinie als auch bei denjenigen Hypophysentumorzelllinien, welche den TLR2 nicht exprimieren, zu einem vermehrten Zellwachstum.

### TLR2 in der Hypophyse

*Toll-like* Rezeptor 2-mRNA wurde in der Zelllinie TtT-GF, welche als Modell für follikulostellare (FS-) Hypophysenzellen diente, nachgewiesen, nicht hingegen in hormonproduzierenden GH3-, AtT-20- und MtT-S-Hypophysentumorzellen. Die Expression des TLR2 konnte hier, wie bei GH3-Zellen gezeigt wurde, auch durch Stimulation der Zellen mit Peptidoglycan nicht induziert werden.

Von den FS-Zellen wird aufgrund ihrer Proteinexpression und der Fähigkeit zur Phagozytose angenommen, dass sie Ähnlichkeiten zu dendritischen Zellen aufweisen und eng mit Mikrogliazellen verwandt sind (Allaerts et al., 1996). Mikrogliazellen wiederum stehen für die Hauptform der aktiven Immunabwehr im Zentralnervensystem, ihre Aufgabe besteht in der Erkennung und Beseitigung potenziell pathogen wirkender Substanzen. Die in dieser Arbeit gezeigte Expression des TLR2 könnte ein Hinweis dafür sein, dass die follikulostellaren Zellen in der Hypophyse immunologische Funktionen wahrnehmen.

Nach Stimulation der FS-ähnlichen TtT-GF-Zellen mit einem bakteriellen Lipoprotein (Pam3CysSK4) kam es zu einer Steigerung von Zellwachstum und IL-6-Sekretion der Zellen. Mit Hilfe eines TLR2-Antikörpers, welcher diese Wirkungen des Lipoproteins deutlich abschwächte, konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der Zellproliferation teilweise und die vermehrte Zytokinsekretion hauptsächlich durch den *toll-like* Rezeptor 2 vermittelt werden.

### **Funktion und Auswirkungen des TLR2 in der Hypophyse**

Die durch den TLR2 vermittelte IL-6-Ausschüttung von FS-Zellen dient möglicherweise der Regulierung der Immunantwort im Rahmen von bakteriellen Infektionen. Für eine immunologische Funktion der FS-Zellen spricht auch, dass diese in Reaktion auf eine Stimulation mit LPS ebenfalls IL-6 sezernieren (Lohrer et al., 2000). Von IL-6 ist bekannt, dass es die Hormonfreisetzung von Hypophysenzellen auf parakrine Weise steigern kann (Pereda et al., 2000). Nach Erkennung von Pathogenen könnten follikulostellare Zellen durch eine IL-6-vermittelte ACTH-Ausschüttung in der Hypophyse eine Erhöhung des Kortisolspiegels (durch die Wirkung des ACTH in der Nebenniere) bewirken. Das auf diese Weise ausgeschüttete Kortisol wirkt antiinflammatorisch und könnte somit dabei helfen, überschießende Immunreaktionen im Rahmen systemischer bakterieller Infektionen im Sinne einer Gegenregulation zu verhindern.

Neben dieser modulierenden Rolle des TLR2 in Bezug auf immun-endokrine Interaktionen sind andere Funktionen dieses Rezeptors denkbar, welche auf dem sog. "*Danger-Modell*" nach Matzinger (Matzinger, 2002) beruhen. Der TLR2 erkennt nämlich nicht nur exogene bakterielle Pathogene und Bestandteile von Pilzen, sondern reagiert auch auf endogene, von Zellen ausgehende Signale wie Komponenten der extrazellulären Matrix sowie Proteine, die mit Stress, Apoptose oder Nekrose assoziiert sind (Erridge, 2010; Tsan und Gao, 2004). Das *Danger-Modell* geht davon aus, dass das Immunsystem nicht nur zwischen eigenen und fremden Zellen unterscheidet. Es wird auch in Reaktion auf Alarmsignale aktiviert, d.h. Antigene, welche nach Pathogen- oder Toxinexposition von beschädigten Zellen freigesetzt werden. Auch transformierte Tumorzellen produzieren in fortgeschritteneren Stadien Alarmsignale. Im Anfangsstadium werden Tumorzellen oftmals vom Immunsystem nicht erkannt, weil sie zunächst wie gesunde Zellen wachsen, ohne Änderungen der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) oder der Hitzeschockprotein- (*hsp*-) Produktion, die beide Alarmsignale darstellen können (Kaisho und Akira, 2002), aufzuweisen. Mit zunehmender Größe des Tumors treten Störungen der extrazellulären Matrix auf. Darüber hinaus werden Zellen in weniger vaskularisierten Gebieten innerhalb des Tumors unzureichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, was zu einer vermehrten *hsp*-Produktion führt. Somit könnten ECM-Fragmente und Hitzeschockproteine wachsender Tumore Immunzellen über den TLR2 aktivieren (Asea et al., 2002; Vabulas et al., 2002; Tsan

---

und Gao, 2004) und eine Reaktion der Immunzellen auf die wachsenden Tumorzellen hervorrufen.

Neben Tumorzellen können auch Bestandteile apoptotischer körpereigener Zellen Antigene für den TLR2 von FS-Zellen darstellen. Im Bereich der Hypophyse ist bekannt, dass die im Rahmen der Schwangerschaft auftretende Vermehrung der laktotrophen Zellen in der postpartalen- oder der Postlaktationsphase durch Apoptose wieder reduziert wird. Nach einem zunächst autolytisch verlaufenden Prozess werden die Zellüberreste der apoptotischen Zellen von Phagozyten entfernt (Aoki et al., 1996). Dabei könnte die Bindung von ECM-Bestandteilen an den TLR2 von FS-Zellen die Phagozytose einleiten.

Desweiteren könnte der auf FS-Zellen befindliche TLR2 eine Rolle bei der Pathophysiologie der Hypophysitis spielen. Hierbei führt die Anwesenheit mikrobieller Pathogene zu einer ausgeprägten Immuneinfiltration in die Hypophyse. Es kommt zu lokalen Entzündungsprozessen, welche hormonproduzierende Hypophysenzellen beschädigen oder zerstören. Eine Überreaktion von FS-Zellen auf intrahypophysäre Pathogene könnte ein Auslöser für solche Entzündungsreaktionen sein.

Schließlich könnte der TLR2 von FS-Zellen an der Ansammlung von FS-Zellen beteiligt sein, welche im Grenzgebiet von Hypophysentumoren beobachtet wird. Tumoröse Faktoren wie veränderte Bestandteile der extrazellulären Matrix könnten über den TLR2 eine Migration oder Proliferation von FS-Zellen in der Umgebung des Tumors induzieren.

Die Bedeutung der Ansammlung von FS-Zellen an der Tumorgrenze ist noch nicht geklärt. Anscheinend sind FS-Zellen nicht in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen einzudämmen. Es besteht sogar die Möglichkeit, dass durch eine von FS-Zellen ausgehende, TLR2-vermittelte IL-6-Sekretion in der Nähe eines Tumors das Tumorstadium verstärkt wird. Dafür spricht, dass IL-6 bei Hypophysenadenomen einen Wachstumsfaktor darstellt (Arzt, 1993; Pereda, 1996).

---

## **Wirkung von bakteriellem Peptidoglycan und Lipoteichonsäure auf Hypophysentumorzellen**

Zusammenhänge zwischen der Anwesenheit bakterieller Antigene und dem Wachstum von Hypophysentumorzellen ergaben sich in der vorliegenden Arbeit auch aus den Ergebnissen bei Stimulation verschiedener Hypophysentumorzelllinien durch die Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien Peptidoglycan und Lipoteichonsäure.

Die Zugabe von Lipoteichonsäure bewirkte bei GH3- und AtT-20-Zellen eine Zunahme der Zellproliferation, bei TtT-GF-, GH3- und AtT-20-Zellen kam es bei einer LTA-Konzentration von 100 µg/ml zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl gegenüber den Ausgangswerten, so dass es hier wohl zu einem Absterben der Zellen gekommen ist. Unterschiedliche, konzentrationsabhängige Effekte von Lipoteichonsäure wurden bisher in verschiedenen Studien nachgewiesen. Die jeweils untersuchten Zellkulturen (menschliche Herzzellen, Mikrogliazellen bzw. Atemwegsepithelzellen) reagierten auf Stimulation mit LTA in eher niedrigen Dosen mit einer vermehrten Zellproliferation, während höhere Dosen (ca. 10-1000 µg/ml) zu Zelltod bzw. Apoptose führten (Simpson et al., 1982; Jiang-Shieh et al., 2005; Nell und Grote, 2003). Für die zytotoxischen Wirkungen der Lipoteichonsäure sind wohl am ehesten Glukoseanteile verantwortlich (Nell und Grote, 2003). Wodurch die unterschiedlichen Wirkungen (Wachstumsstimulation bzw. Abtötung) von LTA auf die verschiedenen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien entstehen, ist unklar. Da nur TtT-GF-Zellen über den TLR2 verfügen, müssen die durch LTA ausgelösten Wirkungen, insbesondere die Proliferationssteigerung der MtT-S- und AtT-20-Zellen, über *toll-like* Rezeptor-unabhängige Wege vermittelt werden. Da MtT-S-Zellen eine besonders ausgeprägte Steigerung des Zellwachstums unter LTA zeigten und als einzige resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung der Lipoteichonsäure waren und auch die Exposition gegenüber 100 µg/ml LTA überlebten, müssen diese Zellen Eigenschaften aufweisen, welche einerseits den Zelltod verhindern, andererseits zu einer besonders starken Wachstumssteigerung unter LTA-Stimulation führen.

Auf die Zugabe von Peptidoglycan reagierten die FS-ähnlichen TtT-GF-Zellen mit einer vermehrten IL-6-Sekretion. Außerdem führte Peptidoglycan sowohl bei den TtT-GF-Zellen als auch bei Zelllinien hormonproduzierender Hypophysentumore (AtT-20, MtT-S und GH3) zu einer von der Peptidoglycan-Konzentration abhängigen Steigerung der Zellproliferation. Da letztere Zellarten nicht den TLR2 besitzen und da auch bei den TLR2-positiven TtT-GF-Zellen die Reaktion auf PGN durch einen TLR2-Antikörper nicht inhibierbar war, müssen

diese Proliferationseffekte im Gegensatz zur Reaktion auf Lipoprotein über andere Wege als den TLR2 erfolgen. Somit existieren sowohl TLR2-abhängige als auch TLR2-unabhängige Signalwege, welche die Wirkungen der verschiedenen bakteriellen Pathogene auf die untersuchten Zellen vermitteln.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich chronische (bakterielle) Infektionen auf die Pathophysiologie von Hypophysentumoren auswirken könnten. Dies könnte einerseits durch die parakrin wirksame IL-6-Sekretion von FS-Zellen, welche indirekt proliferationssteigernd wirkt, andererseits durch eine direkte wachstumsfördernde Wirkung von bakteriellen Pathogenen auf Hypophysentumorzellen geschehen.

Hinweise für einen Zusammenhang von bakteriellen Infektionen und Tumorpathophysiologie hatten sich auch in einer Studie zum TLR4 in Hypophysenadenomen gezeigt (Tichomirowa et al., 2005). Hier bewirkte das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid bei TLR4-positiven Hypophysenzellen, welche allerdings nur einen kleinen Anteil der Tumorzellen in Hypophysenadenomen ausmachen, eine Wachstumshemmung. Untersuchungen an einer humanen Myelom-Zelllinie und an Nebennierenkarzinomzellen zeigten als Reaktion auf die Bindung bakterieller Pathogene an *toll-like* Rezeptoren ein gesteigertes Zellwachstum, welches durch vermehrt ausgeschüttete, autokrin wirkende Zytokine (IL-6, IL-8) bedingt war (Jego et al., 2006; Kanczkowski et al., 2007). Bei der Zytokininduktion scheint die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über *toll-like* Rezeptoren eine Rolle zu spielen (Inoue et al., 2007).

Zur Erklärung für die bei Behandlung der Zellen mit Peptidoglycan in dieser Arbeit beobachteten Effekte, welche nachweislich nicht ausschließlich auf den TLR2 zurückzuführen waren, kommen TLR-unabhängige Systeme, über welche die Erkennung von Peptidoglycan und anderen Pathogenen erfolgt, in Frage. Neben den *toll-like* Rezeptoren gibt es weitere Antigen-erkennende sog. "Mustererkennungsrezeptoren" (*pattern recognition receptors*, PRRs). Diese sind im gesamten Tierreich vorkommende Rezeptoren, welche in vielen verschiedenen Mikroorganismen vorkommende Muster und Strukturen von Pathogenen erkennen. Diese Strukturen stellen für das mit einer begrenzten Anzahl von Rezeptoren ausgestattete angeborene Immunsystem Hauptziele für die Erkennung von Infektionen dar. Sie werden auch als *PAMPs* (*pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet, und umfassen unter anderem die Bakterien-Zellwandbestandteile Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und Lipoproteine. Von den Mustererkennungsrezeptoren sind neben den *toll-like* Rezeptoren die NOD- (*nucleotide-binding oligomerization domain-*) Proteine (Philpott und Girardin, 2004) bisher am besten untersucht. Wie *toll-like* Rezeptoren sind sie

an der Erkennung von Pathogenen und an der Einleitung einer Entzündungsreaktion zur Infektionsabwehr beteiligt. Die Proteine NOD1 und NOD2 erkennen beide intrazelluläres bakterielles Peptidoglycan, wobei NOD2 als essentielle Struktur das Muramyl-dipeptid (MurNAc-L-Ala-Diisoglutamin) (MDP) erkennt, welches auch im Peptidoglycan von grampositiven Bakterien enthalten ist (Girardin et al., 2003). Somit könnten die beobachteten Reaktionen der verschiedenen untersuchten Zelllinien auf Peptidoglycan, d.h. Zellwachstum und erhöhte IL-6-Sekretion, über NOD2 vermittelt stattgefunden haben. In Bezug auf die Hypophyse ist bisher gezeigt worden, dass NOD1 und NOD2 in TtT-GF-Zellen exprimiert werden, und dass die Reaktion dieser Zellen auf LPS (NF- $\kappa$ B-Aktivierung und IL-6-Sekretion) neben dem TLR4 von NOD2 abhängig ist (Correa-de-Santana et al., 2009). Neben NOD1 und NOD2 existieren weitere sog. *NOD-like receptors* (NLRs). Diesen ist gemeinsam, dass ihre Liganden das Cytosol erreichen müssen, indem entweder die Bakterien die Zellmembran durchdringen oder die Bakterien in der Lage sind, Proteine durch diese Membran zu befördern (Barton, 2008). Daneben sind weitere Peptidoglycan-erkennende Proteine nachgewiesen worden, wie CD14 (Dziarski und Gupta, 2005), LCa, LCx (Chang und Deisenhofer, 2007) und die sogenannten PGRPs (*peptidoglycan recognition proteins*) (Dziarski, 2004).

Ein weiterer Aspekt zur Erklärung der durch Peptidoglycan ausgelösten, nicht durch TLR2 vermittelten Effekte ist, dass die Identifizierung von Peptidoglycan als Ligand des TLR2 (Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999) nicht unumstritten geblieben ist. Im Jahr 2004 beschrieben Travassos et al., dass hochgereinigtes Peptidoglycan nicht von TLR2 erkannt wird und dass die Wirkungen auf Verunreinigungen mit Lipoproteinen oder Lipoteichonsäure zurückzuführen seien (Travassos et al., 2004). Auch hier gingen die Autoren davon aus, dass Peptidoglycan durch NOD-Proteine erkannt wird. Durch welche Rezeptoren, neben dem TLR2, die in dieser Arbeit beobachteten Wirkungen von Peptidoglycan tatsächlich zustande kommen, bleibt unklar. Hier sind weitere Untersuchungen zu Mustererkennungsrezeptoren in Hypophysentumorzellen notwendig, z.B. zum Vorkommen von NOD-Proteinen.

### **Klinische Relevanz**

In dieser Arbeit wurden wachstumssteigernde Effekte von Peptidoglycan und Lipoteichonsäure auf hormonproduzierende Hypophysentumorzellen gezeigt. Des Weiteren

---

konnte eine vermehrte IL-6-Sekretion von TtT-GF-Zellen bei Exposition gegenüber PGN bzw. Lipoprotein nachgewiesen werden, welche ebenfalls zu einer Wachstumssteigerung von Hypophysentumorzellen führt. Übertragen auf die klinische Situation weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass bei Patienten mit Hypophysentumoren auf eine konsequente Behandlung komorbider bakterieller Infektionen geachtet werden sollte, da diese Auswirkungen auf die Tumorpathophysiologie haben können. Zur genaueren Beurteilung der klinischen Relevanz sowie zur weiteren Klärung der Mechanismen der Wechselwirkung zwischen mikrobiellen Pathogenen und dem Wachstum von Tumoren sind jedoch weitere Studien notwendig.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden das Vorkommen und die Funktion des *toll-like* Rezeptors 2 (TLR2) in der Hypophyse untersucht. *Toll-like* Rezeptoren vermitteln die angeborene Immunabwehr und sind bedeutsam für die Erkennung und Abwehr von Mikroorganismen, indem sie bestimmte Bestandteile von diesen binden. Die rezeptortragenden Zellen reagieren u.a. mit der Sekretion von Zytokinen, wodurch eine Immunreaktion eingeleitet wird. Der TLR2 ist bisher auf Makrophagen und Monozyten, aber auch auf verschiedenen Arten von Epithelzellen nachgewiesen worden. Er bindet u.a. Peptidoglycan (PGN), Lipoteichonsäure (LTA) und Lipoproteine von grampositiven Bakterien und führt über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Zytokinsekretion.

Der TLR2 konnte in einer als Modell für hypophysäre FS-Zellen dienenden Zelllinie, den TtT-GF-Zellen, nachgewiesen werden, nicht dagegen in hormonproduzierenden GH3-, AtT-20- und MtT-S-Hypophysentumorzellen. Die Expression des TLR2 konnte hier, wie bei GH3-Zellen gezeigt wurde, auch durch Stimulation der Zellen mit Peptidoglycan nicht induziert werden.

Nach Stimulation der FS-ähnlichen TtT-GF-Zellen mit einem spezifischen TLR2-Liganden, dem bakteriellen Lipoprotein Pam3CysSK4, kam es zu einer Steigerung von Zellwachstum und IL-6-Sekretion der Zellen. Mit Hilfe eines TLR2-Antikörpers, welcher die Wirkung des Lipoproteins deutlich abschwächte, konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der Zellproliferation teilweise und die vermehrte Zytokinsekretion hauptsächlich durch den *toll-like* Rezeptor 2 vermittelt wird.

Die IL-6-Ausschüttung von FS-Zellen über den TLR2 dient möglicherweise der Regulierung der Immunantwort im Rahmen von bakteriellen Infektionen. Nach Erkennung von Pathogenen könnten follikulostellare Zellen durch die IL-6-vermittelte ACTH-Ausschüttung in der Hypophyse eine Erhöhung von Kortisol bewirken, welches durch seine antiinflammatorische Wirkung dabei helfen könnte, überschießende Immunreaktionen im Rahmen systemischer bakterieller Infektionen zu verhindern. Des weiteren könnten hypophysäre *toll-like* Rezeptoren eine Rolle bei der immunologischen Reaktion auf veränderte körpereigene Zellen spielen, indem sie beispielsweise dazu beitragen, dass Tumorzellen angegriffen oder apoptotische Zellen phagozytiert werden.

Die Zugabe von Lipoteichonsäure bewirkte bei GH3- und AtT-20-Zellen eine Zunahme der Zellproliferation, bei TtT-GF-, GH3- und AtT-20-Zellen kam es bei höheren LTA-

---

Konzentrationen zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl gegenüber den Ausgangswerten, so dass es hier wohl zu einem Absterben der Zellen gekommen ist.

Bakterielles Peptidoglycan führte sowohl bei der TLR2-exprimierenden TtT-GF-Zelllinie als auch bei denjenigen Hypophysentumorzelllinien, welche den TLR2 nicht exprimieren, zu einem vermehrten Zellwachstum. Bei den FS-ähnlichen Zellen bewirkte die Zugabe von Peptidoglycan außerdem eine Steigerung der IL-6-Sekretion. Da diese Effekte, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, nicht ausschließlich über den TLR2 vermittelt werden, müssen TLR2-unabhängige Signalwege in Hypophysenzellen existieren, welche die Peptidoglycan-vermittelte Steigerung von Zellproliferation und Zytokinsekretion bewirken.

Die Beeinflussung des Zellwachstums von Hypophysentumorzellen und der Zytokinsekretion von follikulostellaren Zellen durch Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und Lipoproteine weist darauf hin, dass sich chronische (bakterielle) Infektionen auf die Pathophysiologie von Hypophysentumoren auswirken könnten. Dies könnte einerseits durch die parakrin wirksame IL-6-Sekretion von FS-Zellen, andererseits durch eine direkte wachstumsfördernde Wirkung von bakteriellen Pathogenen auf Hypophysentumorzellen geschehen. Hinweise für einen Zusammenhang von bakteriellen Infektionen und der Tumorpathophysiologie insbesondere von epithelialen Tumoren haben sich bisher in verschiedenen Studien gezeigt. Um Schlussfolgerungen in Hinsicht auf mögliche klinische und therapeutische Konsequenzen ziehen zu können, sind weitere Arbeiten zur Klärung der Mechanismen der Wechselwirkung zwischen mikrobiellen Pathogenen und dem Wachstum von Tumoren erforderlich.

---

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Alexander JM, Biller BMK, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A.** Clinically nonfunctional pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest.* 1990, Vol. 86, pp. 336–340.

**Allaerts W, Fluitsma DM, Hoefsmit ECM, Jeucken PHM, Morreau H, Bosman FT & Drexhage HA.** Immunohistochemical, morphological and ultrastructural resemblance between dendritic cells and folliculo-stellate cells in normal human and rat anterior pituitaries. *Journal of Neuroendocrinology.* 1996, Vol. 8, pp. 17–29.

**Andonegui G, Bonder CS, Green F et al.** Endothelium-derived toll-like receptor 4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration in the lungs. *J Clin Invest.* 2003, Vol. 111, pp. 1011–1020.

**Andonegui G, Goyert SM, Kubes P.** Lipopolysaccharide-induced leukocyte–endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels. *J Immunol.* 2002, Vol. 169, pp. 2111–2119.

**Aoki A, de Gaisan EO, Pasolli HA, Torres AI.** Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes.* 1996, Vol. 104, pp. 256-262.

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

**Arzt E, Pereda MP, Castro CP, Pagotto U, Renner U, Stalla GK.** Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol.* 1999, Vol. 20, pp. 71-95.

**Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK.** Novel signal transduction pathway utilized by extracellular hsp70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 2002, Vol. 277, pp. 15028–15034.

---

**Barton, GM.** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 2008, Vol. 118(2), pp. 413–420.

**Berkenbosch F, Degoeij DEC, del Rey A, Besedovsky HO.** Neuroendocrine, sympathetic and metabolic responses induced by interleukin-1. *Neuroendocrinology.* 1989, Vol. 50, pp. 570-576.

**Berkenbosch F, Van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H.** Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science.* 1987, Vol. 238, pp. 524–526.

**Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA.** Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science.* 1986, Vol. 233, pp. 652–654.

**Besedovsky HO, del Rey A.** Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996, Vol. 17, pp. 64-102.

**Blalock JE, Harbur-McMenamin D, Smith EM.** Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *J. Immunol. Suppl.* 1985, Vol. 135, pp. 858s–861s.

**Burgess TL, Craik CS, Kelly RB.** The exocrine protein trypsinogen is targeted into the secretory granules of an endocrine cell line: studies by gene transfer. *J Cell Biol.* 1985, Vol. 105, pp. 639-645.

**Chang CI, Deisenhofer J.** The peptidoglycan recognition proteins LCa and LCx. *Cell Mol Life Sci.* 2007, Vol. 64(11), pp. 1395-1402.

**Chrousos, GP.** The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New Engl J Med.* 1995, Vol. 332, pp. 1351-1362.

**Clayton RN, Pfeifer M, Atkinson AB, Belchetz P, Wass JA, Kyrodimou E, Vanderpump M, Simpson D, Bicknell J, Farrell WE.** Different patterns of allelic loss (loss of heterozygosity) in recurrent pituitary tumors provide evidence of multiple clonal origins. *Clin Cancer Res.* 2000, Vol. 6, pp. 3973–3982.

---

**Correa-de-Santana E, Fröhlich B, Labeur M, Páez-Pereda M, Theodoropoulou M, Monteserin JL, Renner U, Stalla GK.** NOD2 receptors in adenopituitary folliculostellate cells: expression and function. *J Endocrinol.* 2009, Vol. 203(1), pp. 111-122.

**Devi, L.** Secretion and regulation of a neuropeptide-processing enzyme by AtT-20 cells. *Endocrinology.* 1992, Vol. 131, pp. 1930-1935.

**Dziarski R, Gupta D.** Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2005, Vol. 11(5), pp. 304-310.

**Dziarski, R.** Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol.* 2004, Vol. 40(12), pp. 877-886.

**Erridge, C.** Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *Journal of Leukocyte Biology.* 2010, Vol. 87.

**Ezzat, S.** The role of hormones, growth factors and their receptors in pituitary tumorigenesis. *Brain Pathol.* 2001, Vol. 11, pp. 356–370.

**Fan J, Frey RS, Malik AB.** TLR4 signalling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest.* 2003, Vol. 112, pp. 1234–1243.

**Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P.** Folliculostellate cell network: A route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001, Vol. 98, pp. 8891-8896.

**Ferrara N, Fujii DK, Goldsmith PC, Widdicombe JH, Weiner RI.** Transport epithelial characteristics of cultured bovine pituitary follicular cells. *Am.J.Physiol.* 1987, Vol. 252, pp. E304-312.

**Ferrara N, Henzel WJ.** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1989, Vol. 161, pp. 851-858.

---

**Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R, Gospodarowicz D.** Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987, Vol. 84, pp. 5773-77.

**Gamby C, Waage MC, Allen RG, Baizer L.** Growth-associated protein-43 (GAP-43) facilitates peptide hormone secretion in mouse anterior pituitary AtT-20 cells. *J.Biol.Chem.* 1996, Vol. 271, pp. 10023-10028.

**Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ.** Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003, Vol. 278, p. 8869.

**Gloddek J, Lohrer P, Stalla J, Arzt E, Stalla GK, Renner U.** The intrapituitary stimulatory effect of lipopolysaccharid on ACTH secretion is mediated by paracrine-acting IL-6. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001, Vol. 109, pp. 410-415.

**Gloddek J, Pagotto U, Paez Pereda M, Arzt E, Stalla GK, Renner U.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol.* 1999, Vol. 160(3), pp. 483-490.

**Heaney, AP.** Pituitary tumour pathogenesis. *British Medical Bulletin.* 2006, Vols. 75, 76, pp. 81-97.

**Hornig T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R.** The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* 2002. pp. 420-429.

**Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K.** NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci.* 2007, Vol. 98(3), pp. 268-274.

**Inoue K, Hattori M-A, Sakai T, Inukai S, Fujimoto N, Ito A.** Establishment of a series of pituitary clonal cell lines differing in morphology, hormone secretion, and response to estrogen. *Endocrinology.* 1990, Vol. 126, pp. 2313-2320.

---

**Inoue K, Matsumoto H, Koyama C, Shibata K, Nakazato Y, Ito A.** Establishment of a Folliculo-Stellate-Like Cell Line from a Murine Thyrotropic Tumor. *Endocrinology*. 1992, Vol. 131, pp. 3110-3116.

**Inoue, K.** The structure and function of follicule-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch.Histol.Cytol*. 1999, Vol. 62, pp. 205-218.

**Iwasaki, Y et al.** Lipopolysaccharide Stimulates Proopiomelanocortin Gene Expression in AtT20 Corticotroph Cells. *Endocrine Journal*. 2008, Vol. 55/2, pp. 285-290.

**Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps, Pellat-Deceunynck C.** Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 2006, Vol. 20(6), pp. 1130-1137.

**Jiang-Shieh YF, Yeh KY, Wei IH, Chang CY, Chien HF, Tsai RY, Chang ML, Lee AW, Pai MH, Wu CH.** Responses of microglia in vitro to the gram-positive bacterial component, lipoteichoic acid. *J Neurosci Res*. 2005, Vol. 82(4), pp. 515-524.

**Kaisho T, Akira S.** Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002, Vol. 1589, pp. 1-13.

**Kanczkowski W, Morawietz H, Ziegler CG, Funk RH, Schmitz G, Zacharowski K, Mohn CE, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR.** Pam3CSK4 and LTA- TLR ligands associated with microdomains induce IL8 production in human adrenocortical cancer cells. *Horm Metab Res*. 2007, Vol. 39(6), pp. 457-460.

**Kobayashi H, Fukata J, Murakami N, Usui T, Ebisui O, Muro S, Hanaoka I, Inoue K, Imura H, Nakao K.** Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells. *Brain Res*. 1997, Vol. 758, pp. 45-50.

**Koyama, C.** Pituitary folliculo-stellate-like cells stimulate somatotrophic tumor growth in nude mice. *Endocr.Pathology*. 1995, Vol. 6, pp. 67-75.

---

**Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA.** The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996, Vol. 86, p. 973.

**Lippert, H.** *Lehrbuch Anatomie*. 5.Auflage. s.l. : Urban & Fischer Verlag, 2000. pp. 491-494.

**Lohrer P, Gloddek J, Nagashima AC, Korali Z, Hopfner U, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK, Renner U.** Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38alpha mitogen-activated protein kinase/nuclear factor  $\kappa$ B pathway. *Endocrinology*. 2000, Vol. 141, pp. 4457-4465.

**Mains RE, Eipper BA.** Biosynthesis of ACTH by mouse pituitary tumor cells. *J Biol Chem*. 1976, Vol. 251, pp. 4115-4120.

**Matsumoto H, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K.** Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotrophic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3',5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology*. 1983, Vol. 133, pp. 2150-2155.

**Matzinger, P.** The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002, Vol. 296, pp. 301-305.

**McCann SM, Karanth S, Kamat A, Dees WL, Lyson K, Gimeno M, Rettori V.** Induction by cytokines of the pattern of pituitary hormone secretion in infection. *Neuroimmunomodulation*. 1994, Vol. 1, pp. 2-13.

**Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997, pp. 388-394.

**Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y.** Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-

---

mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology*. 1996, Vol. 137, pp. 3356-3367.

**Nell MJ, Grote JJ.** Effects of bacterial toxins on air-exposed cultured human respiratory sinus epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003, Vol. 112(5), pp. 461-468.

**Orth DN, Nicholson WE, Mitchell WM, Island DP, Shapiro M, Byny RL.** ACTH and MSH production by a single cloned mouse pituitary tumor cell line. *Endocrinology*. 1973, Vol. 92, pp. 385–393.

**Pereda MP, Lohrer P, Kovalovsky D, Perez Castro C, Goldberg V, Losa M, Chervín A, Berner S, Molina H, Stalla GK, Arzt E.** Interleukin-6 is inhibited by glucocorticoids and stimulates ACTH secretion and POMC expression in human corticotroph pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000, Vol. 108, pp. 202-207.

**Pereda MP, Goldberg V, Chervin A, Carrizo G, Molina A, Andrada J, Sauer J, Renner U, Stalla GK, Arzt E.** Interleukin-2 (IL-2) and IL-6 regulate c-fos protooncogene expression in human pituitary adenoma explants. *Mol Cell Endocrinol*. 1996, Vol. 124, pp. 33–42.

**Perez Castro C, Nagashima AC, Pereda MP, Goldberg V, Chervin A, Largen P, Renner U, Stalla GK, Arzt E.** The gp130 cytokines interleukin-11 and ciliary neurotropic factor regulate through specific receptors the function and growth of lactosomatotropic and folliculostellate pituitary cell lines. *Endocrinology*. 2000, Vol. 141(5), pp. 1746-1753.

**Philpott DJ, Girardin SE.** The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol*. 2004, Vol. 41(11), pp. 1099-1108.

**Rees DA, Lewis MD, Lewis BM, Smith PJ, Scanlon MF, Ham J.** Adenosine-regulated cell proliferation in pituitary folliculostellate and endocrine cells: differential roles for the A(1) and A(2B) adenosine receptors. *Endocrinology*. 2002, Vol. 143(6), pp. 2427-2436.

**Renner U, Gloddek J, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK.** Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells. *Domest. Anim Endocrinol*. 1998, Vol. 15, pp. 353-362.

---

**Renner U, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, Arzt E, Stalla GK.** Transforming Growth Factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. *Endocrinology*. 2002, Vol. 143(10), pp. 3759-3765.

**Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK.** Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *Eur.J.Endocrinol.* 1996, Vol. 135, pp. 515-32.

**Renner U, Schaaf L, Stalla GK.** *Hypothalamische und hypophysäre Erkrankungen: Endokrinopathien.* s.l. : Springer Verlag, 2001. pp. 11-40.

**Rivest S, Rivier C.** The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocr. Rev.* 1995, Vol. 16, pp. 177–199.

**Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF.** A family of human receptors structurally related to Drosophila Tol. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998, Vol. 95, p. 588.

**Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W.** Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science.* 1987, Vol. 238, pp. 522–524.

**Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.** Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 1999, Vol. 274, p. 17406.

**Simpson WA, Dale JB, Beachey EH.** Cytotoxicity of the glycolipid region of streptococcal lipoteichoic acid for cultures of human heart cells. *J Lab Clin Med.* 1982, Vol. 99(1), pp. 118-126.

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

---

**Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 2005, Vol. 17, pp. 1–14.

**Takeda K, Kaisho T, Akira S.** Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2003, Vol. 21, p. 335.

**Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S.** Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999, Vol. 11, p. 443.

**Tashjian AH, Jr., Bancroft FC, Levine L.** Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J. Cell Biol.* 1970, Vol. 47, pp. 61-70.

**Thiele J-O, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Stummer W, Losa M, Lange M, Tichomirowa M, Arzt E, Stalla GK, Renner U.** Functional in vitro studies on the role and regulation of interleukin-6 in human somatotroph pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2003, Vol. 149, pp. 455-461.

**Tichomirowa M, Theodoropoulou M, Lohrer P, Schaaf L, Losa M, Uhl E, Lange M, Arzt E, Stalla GK, Renner U.** Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) stimulates interleukin-6 production and inhibits growth of pituitary tumour cells expressing the toll-like receptor 4. *J Neuroendocrinol.* 2005, Vol. 17, pp. 152–160.

**Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG.** Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 2004, Vol. 5.

**Tsan MF, Gao B.** Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2004, Vol. 76, pp. 514–519.

**Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, Da Costa C, Rammensee HG, Wagner H, Schild H.** The endoplasmic reticulum-

---

resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* 2002, Vol. 277, pp. 20847–20853.

**Van Wijk PA, Neck JW van, Rijnberk A, Croughs RJM, Mol JA.** Proliferation of the murine corticotropic tumour cell line AtT20 is affected by hypophysiotrophic hormones, growth factors and glucocorticoids. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1995, Vol. 111/1, pp. 13-19.

**Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Deneef C.** Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology.* 1989, Vol. 49, pp. 102-106.

**Wang T, Town T, Alexopoulou L et al.** Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004, Vol. 10, pp. 1366–1373.

**Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S.** Essential role of TIRAP/Mal for activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002, Vol. 420, p. 324.

**Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S.** A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* 2004, Vol. 303, p. 1522.

---

## 8 DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Professor Stalla für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, die experimentelle Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, danken.

Meinem Betreuer, Dr. Ulrich Renner, danke ich sehr herzlich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die kontinuierliche Unterstützung und Gesprächsbereitschaft.

Besonders danken möchte ich auch Dr. Chiara Onofri für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung beim Erlernen und Durchführen der unterschiedlichen Versuchstechniken und Tania Colaco für ihre engagierte Unterstützung.

Gedankt sei für vielfältige Hilfe im Umgang mit Zelllinien und für wertvolle Tipps und Hinweise Johanna Stalla, Jose Luis Monteserin Garcia und Eliane Correa de Santana.

Vielen Dank auch den anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern und technischen Assistentinnen für die gute Zusammenarbeit.