

Aus dem Institut für Hormon- u. Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg
Prof. Dr. F. A. Leidenberger
Prof. Dr. H. M. Schulte

Regulation hormoneller trophischer Effekte in der gonadotropstämmigen α T3-1-Zelllinie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Eckhard Schomerus
aus Buxtehude

Hamburg 1997

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: *06. Mai 1958*

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg.

Sprecher: *Prof. Dr. H.-P. Reichdewitz*

Referent: *Prof. Dr. F. Reidenberger*

Korreferent: *Prof. Dr. U. Braendle*

für Adelheid

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	4
Hypophyse, gonadotrope Zellen und Gonadotropine.....	4
<i>Second messenger</i> -Systeme.....	5
Zellkulturen und α T3-1-Zellen.....	10
<i>Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide</i> (PACAP).....	13
II. Material und Methoden	17
Materialien.....	17
Kultur der α T3-1-Zellen.....	18
Herstellung steroidfreier Sera.....	19
DNA-Messungen und Zellzahlbestimmung.....	19
Messung in zelluläre Nukleinsäuren eingebauten [³ H]Thymidins.....	20
Messung der [³ H]Inositolphosphat-Bildung.....	21
Radioimmunassay für den cAMP-Nachweis.....	21
Statistische Tests.....	23
III. Ergebnisse	24
Experimente zu den Erfordernissen der Zellkultur und Parameter zur Messung der Vermehrung der α T3-1-Zellen.....	24
Einflüsse von Steroidhormonen auf das Zellwachstum.....	27
Einflüsse von GnRH auf das Wachstum der Zellen ohne und unter Zusatz von Östradiol.....	27
Einflüsse weiterer Substanzen auf die Vermehrung der α T3-1-Zellen.....	28
Messungen zur <i>Second messenger</i> -Synthese.....	30
Abbildungen.....	Seiten 34-52
IV. Diskussion	53
V. Zusammenfassung	62
VI. Literaturverzeichnis	63
VII. Danksagungen	72
Lebenslauf	73
VIII. Anhang	74

I. EINLEITUNG

Hypophyse, gonadotrope Zellen und Gonadotropine

Die Hirnanhangdrüse, Hypophyse, gliedert sich in einen vorderen Anteil, die Adenohypophyse (*Lobus anterior*), und einen hinteren Anteil, die Neurohypophyse (*L. posterior*). Während letzterer in der Ontogenese dem Zwischenhirn entstammt und vor allem aus Nervenfasern besteht - die zugehörigen Neurone liegen im Hypothalamus -, entsteht ersterer als eine Ausstülpung des Daches der embryonalen Mundhöhle, die sich von jener ganz trennt und sich der Neurohypophyse anlagert. Dieser vordere Teil des Organs besteht, zumindest überwiegend, aus endokrinen Zellen. Er wird durch Blutgefäße versorgt, die unterhalb des Hypothalamus ein feines Netzwerk bilden und in denen Nachrichten des Hypothalamus in Form hypothalamischer Hormone (Releasing- und Inhibitinghormone) an ihn herangetragen werden. Der Hypothalamus nämlich spielt die Rolle eines übergeordneten vegetativen Zentrums, er selbst steht unter dem Einfluß sowohl nervaler als auch hormonaler (Rückkopplungen) Kontrolle des Organismus, seine auf die Adenohypophyse einwirkenden Hormone werden auch als Steuerhormone bezeichnet, da sie dort die Abgabe von Hormonen fördern oder hemmen. Ohne Vermittlung der Hirnanhangdrüse auf den Organismus wirkende Hormone gibt der Hypothalamus über die Nervenendigungen im hinteren Teil der Hypophyse an den Blutkreislauf ab. Im Zusammenhang mit der hier vorgestellten Arbeit jedoch interessiert nur der aus hormonproduzierenden Zellen bestehende vordere Abschnitt des Organs. Dieser besteht aus etlichen unterschiedlichen Zelltypen, deren Funktion nicht für alle Typen bekannt ist, von denen aber einige jeweils auf die Abgabe bestimmter Hormone spezialisiert sind. Neben Wachstumshormon werden hier solche Hormone gebildet, die vor allem auf bestimmte Organe des Körpers einwirken: Die Funktion der Schilddrüse, der Nebennierenrinde und der Milchdrüsenzellen werden hier reguliert, - ebenso liegen hier die Zellen, die das Follikelstimulierende Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH) abgeben. Da die beiden Stoffe vor allem die Funktion der Keimdrüsen steuern, werden sie als gonadotrope Hormone oder Gonadotropine bezeichnet, die

sie sezernierenden Zellen als Gonadotropen. Ihre Ausschüttung wird über ein hypothalamisches Releasinghormon, das Gonadotrope Releasinghormon (GnRH), gesteuert. Manches spricht für die Annahme, daß GnRH vorrangig die Produktion des Luteinisierenden Hormons reguliere, so wurde es früher als LHRH (Luteinisierendes Hormon-Releasinghormon) bezeichnet. Ob, wie vermutet, darüber hinaus ein spezifischeres Steuerhormon für die Bildung von FSH existiert, ist jedoch bis heute nicht bekannt. Nicht geklärt ist ferner, ob eine bestimmte Gonadotrope immer nur einen Hormontyp oder aber sowohl FSH als auch LH zu bilden in der Lage ist. Das morphologische Bild dieser Zellen, die etwa 10% der Zellen der Adenohypophyse ausmachen, ist vielgestaltig, es gibt unter ihnen größere und kleinere, eher runde und eher quaderförmig gebildete, solche mit kleineren und andere mit größeren sekretorischen Granula. Zwar glauben manche Autoren, kleine Granula dem FSH, größere aber dem LH zuordnen zu können, doch reagieren manche der gonadotropen Zellen mit spezifischen Antikörpern sowohl gegen FSH als auch gegen LH, was die Anwesenheit beider Hormone in diesen Gonadotropen vermuten läßt. Wahrscheinlich stellen die zytologischen Varietäten den Ausdruck unterschiedlicher funktioneller Differenzierungen desselben Zelltyps dar [1, 2, 3]. Die beiden Gonadotropine sind Glykoproteine mit einer relativen Molekülmasse von etwa 30 000. Sie bestehen aus jeweils zwei Untereinheiten, einem α -Anteil, den sie nicht nur untereinander, sondern auch mit dem Schilddrüsenstimulierenden Hormon (TSH), einem weiteren Glykoprotein, teilen, und einem für jedes der Hormone spezifischen β -Anteil. FSH stimuliert im Ovar die Reifung des Follikels, im Hoden die Entwicklung der männlichen Keimzellen. LH hingegen unterstützt die Follikelreifung und steuert schließlich dessen Sprung, beim Mann regt es die Leydigschen Zwischenzellen des Hodengewebes zur Androgensynthese an und wird hier daher meist als *Interstitial Cell Stimulating Hormone* (ICSH) bezeichnet.

Second messenger-Systeme

Hormone sind Botenstoffe, Signale, mit deren Hilfe viele der Funktionen der Zellen eines Körpers aufeinander abgestimmt werden können. Sie dienen der Stimulation oder der Hemmung von Funktionen ihrer Zielzellen. Dabei dringen die meisten dieser Signale nie in die

jeweils angesprochene Zelle ein. Auf ihrem Weg bleiben sie in Rezeptoren hängen, für das jeweilige Hormon spezifischen Bindungsstellen, mit deren Hilfe eine Zelle ihre Umgebung überwacht. So nannte BERRIDGE selbige einmal sehr treffend die molekularen Antennen der Zellen [4]. Die Mischung von Rezeptoren für bestimmte Hormone variiert stark von Zelltyp zu Zelltyp, da ja verschiedene Zellarten in ihrem Stoffwechsel auch von ganz unterschiedlichen Hormonen reguliert werden. Die Rezeptoren setzen an der Innenseite der Zellmembran oder noch in jener selbst daraufhin Geschehnisse in Gang, mit deren Hilfe die Information innerhalb der Zellen weitergegeben wird: In der Zelle werden neue Botenstoffe gebildet, welche dann bestimmte zelluläre Tätigkeiten ankurbeln oder bremsen. Da sie erst auf den Reiz von Hormonen, die die Zelle erreichen, hin gebildet oder freigesetzt werden, werden sie als *Second messenger* bezeichnet. Ihre Diffusion im Zytoplasma ermöglicht die Nachrichtenübertragung von der Membran zu den inneren Kompartimenten der Zelle. Die Zahl dieser intrazellulären Botenstoffe scheint bemerkenswert klein: Der Vielzahl äußerer Stimuli stehen nur vier bekannte *Second messenger*-Systeme gegenüber: die Bildung zyklischen Adenosinmonophosphates (*cyclicAMP*, cAMP) und zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP), die Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat in Inositoltriphosphat und Diazylglyzerol, schließlich Veränderungen im Kalziumstoffwechsel der Zellen.

Wird ein Signal über die Bildung von cAMP weitergegeben, so muß auf der Innenseite der Zellmembran ein sogenanntes G-Protein aktiviert werden: Durch eine Veränderung der Konformation des Rezeptormoleküls wird dieses Protein empfänglich für Guanosintriphosphat (GTP) aus dem Zytoplasma. Durch die Bindung des GTP-Moleküls an das G-Protein kommt es nun zu einer Konformationsänderung des letzteren, und dieses aktiviert nun das für die Bildung von cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) notwendige Enzym, die Adenylatzyklase, - der *Second messenger* entsteht und aktiviert nun weitere Enzyme des Zellstoffwechsels, häufig unter Vermittlung von Proteinkinasen. Die Hydrolyse des GTP-Moleküls durch eine GTPase führt zum Ende der Reaktion. Neben stimulierenden G-Proteinen (G_s) gibt es inhibierende G-Proteine (G_i). Sie sind an hemmende Rezeptoren gekoppelt und führen, wiederum über die Bildung von GTP, zu einer Unterdrückung der Adenylatzyklaseaktivität.

Phosphatidylinositolbisphosphat (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP_2) besitzt, wie der

Name sagt, drei Phosphatgruppen. Eine Rezeptorstimulation an der Membranaußenseite kann zur Hydrolyse des Moleküls in gleich zwei Botenstoffe, Inositoltriphosphat (Inositol-1,4,5-triphosphat, IP_3) und Diazylglyzerol (DAG) führen. Dazu ist wiederum ein G-Protein nötig, das den Rezeptorreiz auf ein Enzym überträgt, welches das Membranlipid spaltet. Dieses Enzym ist die Phospholipase C. IP_3 verläßt die Zellmembran und scheint vor allem zu einer Freisetzung von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zellen zu führen [5,6]. DAG hingegen verbleibt in der Membran. Es aktiviert hier eine an die Membran gebundene Proteinkinase, die Proteinkinase C (PKC), welche dann wie in der beschriebenen cAMP-vermittelten Reaktion durch Phosphorylierung Proteine aktiviert. Schließlich werden, auf getrennten Wegen, IP_3 und DAG in mehreren Schritten metabolisiert und wieder zu PIP_2 vereinigt.

Der vorherrschende *Second messenger* der Zellen ist Kalzium. Nicht nur können Inositoltriphosphat und unter Umständen - möglicherweise allerdings nur in dessen Anwesenheit - zyklisches AMP zu einer Aktivierung zellulärer Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum führen, die Ca^{2+} -Konzentration des Zytoplasmas läßt sich auch unabhängig von jenen beiden zellulären Botenstoffen anheben. So können an bestimmte Oberflächenrezeptoren der Zellen bindende Hormone über eben diese Rezeptoren mit selbigen verknüpfte Kalziumkanäle der Zytoplasmamembran öffnen. Daraufhin strömen Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum, der eine weitaus höhere Ca^{2+} -Konzentration (1 mmol/l) aufweist als das Zellplasma (0,1 μ mol/l), in den Intrazellularraum. Eine ähnliche Reaktion ist an spannungsabhängigen Kalziumkanälen elektrisch erregbarer Zellen nach Depolarisation der Membran bekannt. Nicht nur die Anhebung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels, auch ein vermehrtes Zirkulieren von Kalziumionen über die Membran - der Rücktransport in den Extrazellularraum erfolgt über aktiven Transport durch ATP-abhängige Kalziumpumpen - kann über die resultierende Erhöhung lediglich der submembranösen Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung zellulärer Stoffwechselreaktionen führen [7]. In beiden Fällen, bei insgesamt oder nur submembranös angehobenem Spiegel, führen die Ca^{2+} -Ionen nämlich wiederum zu Konformationsänderungen an Proteinen, häufig Calmodulin. Calmodulin wird durch die Konformationsänderung in die Lage versetzt, an verschiedene Proteine - wiederum häufig Kinasen und Phosphatasen - zu binden und so die Aktivität selbiger zu regulieren.

Die Aktivierung der Guanylatzyklase und damit die Bildung von cGMP spielen in der vorgelegten Arbeit nur ein einziges Mal eine zudem gänzlich untergeordnete Rolle, weshalb ich auf die Unterschiede zu den für cAMP gemachten Ausführungen hier nicht näher eingehe. Es sei jedoch angemerkt, daß die Stimulation der cGMP-Synthese durch C-natriuretisches Peptid (CNP) in den α T3-1-Zellen nicht über ein G-Protein vermittelt wird (vgl. »Messungen zur *Second-messenger*-Synthese«, S. 31).

Die Erforschung der Bedeutung der einzelnen *Second messenger* für zelluläre Reaktionen wird wesentlich erleichtert durch die Kenntnis bestimmter, teilweise künstlicher, Stimuli, welche jeweils spezifisch eine Signalübertragungskette zu aktivieren vermögen. Es ist inzwischen eine beträchtliche Zahl zu diesem Zweck - oder zur gezielten Hemmung von Reaktionen im *Second messenger*-Stoffwechsel - einsetzbarer Substanzen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit spielen eine Rolle:

Forskolin: Diese organische Substanz wurde aus den Wurzeln der Buntnesselart *Coleus forskohlii* isoliert, einer in bestimmten traditionellen Zweigen der indischen Medizin seit langer Zeit vielseitig verwendeten Heilpflanze. Forskolin aktiviert spezifisch die Adenylatzyklase [4, 8, 9].

Phorbolster: Es handelt sich um polyzyklische alkoholische Derivate des Crotonöls, einer aus den Samen des südasiatischen Wolfsmilchgewächses *Croton tiglium* gewonnenen Substanz. Die karzinogenen Stoffe sind als Tumorpromotoren bekannt. Sie aktivieren Proteinkinase C und imitieren so den Einfluß von DAG. Da sie im Unterschied zu letzterem nicht abgebaut werden, hält die Stimulation des Enzyms lange an [4, 8, 10]. Für entsprechende Experimente fand im Rahmen dieser Arbeit Phorbolmyristoazetat (PMA) Verwendung.

Kalziumionophoren: Diese künstlich in die Membran eingebrachten, für Ca^{2+} spezifischen Poren, von denen die Ionophore A23187 die bekannteste ist, werden benutzt, um den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel anzuheben. Die Ionen strömen aus dem umgebenden

Medium in die Zellen hinein, da ihre elektrische Ladung durch diese Moleküle abgeschirmt wird. Die Ionophoren selbst können dank ihres hydrophoben Äußeren Lipid-Doppelmembranen durchdringen. Auf diese Weise wird die Wirkung von IP_3 auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nachgeahmt [4, 8].

Aluminiumfluorid: Das AlF_3 -Molekül hat fast dieselbe Kontur wie PO_4^{2-} und bindet dem GDP so nahe an G-Proteine, daß es eine weitere Phosphatgruppe an diesem - und damit GTP - imitiert [8].

Isobutylmethylxanthin: Durch diesen spezifischen Hemmstoff der Phosphodiesterase wird der Abbau des eigentlich kurzlebigen zyklischen Adenosinmonophosphates verhindert. So können kumulierte cAMP-Mengen bestimmt werden. Dieses gebräuchliche Verfahren erleichtert die Erfassung der Adenylatzyklasestimulation verständlicherweise erheblich.

Kalziumchelatoren: Im Gegensatz zum Einsatz der Ionophoren läßt sich die Konzentration freien Kalziums in den Zellen auf äußerst geringe Werte (höchstens noch nanomolare Konzentrationen) senken, indem Ca^{2+} -Ionen durch spezifische Chelatoren gebunden werden [8]. Am bekanntesten ist Ethylenglykoltetraazetat (EGTA).

Lithiumionen: Am Ende des sogenannten Inositolphosphatzyklusses, der Reaktionsfolge, über die Inositol zur Resynthese von PIP_2 bereitgestellt wird, steht die schrittweise Dephosphorylierung von Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat oder Inositol-1,4,5-triphosphat zu freiem Inositol. Die dabei auf Inositolmonophosphat einwirkende Phosphatase kann durch Li^+ -Ionen (mmol) selektiv gehemmt werden. Auf diese Weise wird offenbar die erneute Bereitstellung von Phosphatidylinositol behindert und so die von der PIP_2 -Spaltung abhängige Signalübertragung gebremst [4, 8].

Choleratoxin: Das Toxin des gramnegativen *Vibrio cholerae* führt zu einer Veränderung an G_s -Proteinmolekülen, die deren Vermögen, GTP zu hydrolysieren, und somit den Selbstinaktivierungsmechanismus der G_s -Proteine aufhebt, - durch die anhaltende

Aktivität der G_s-Proteine auch bei bereits nicht mehr stimuliertem Rezeptor bleibt auch die Adenylatzyklase stimuliert und der cAMP-Spiegel wird weiter angehoben [8].

Zellkulturen und α T3-1-Zellen

Unter günstigen Bedingungen ist es möglich, die meisten Arten tierischer oder auch pflanzlicher Zellen in Kulturschalen zu halten und sich auch vermehren zu lassen. Die unmittelbar aus dem Gewebe eines Organismus entnommenen Zellen werden während ihrer Anzucht in einer solchen Schale als Primärkultur bezeichnet, sie lassen sich meist subkultivieren, dann wird von Sekundärkulturen gesprochen.

In Zellkulturen läßt sich das Verhalten der Zellen unter Stimulation durch bestimmte dem Medium, in welchem die Zellen wachsen, zugesetzte Wachstumsfaktoren oder Hormone beobachten. Umgekehrt lassen sie sich in Medien halten, denen gewisse Bestandteile entzogen wurden. Auch so lassen sich an auftretenden Veränderungen in der Gestalt oder des Stoffwechsels der Zellen Rückschlüsse auf die Bedeutung der fehlenden Substanzen ziehen. Dazu lassen sich in Zellkulturen homogene Zellpopulationen untersuchen: Es lassen sich auch Einzelzellen erfolgreich vermehren, so daß alle Zellen von einer bestimmten Stammzelle abstammen und daher - von später auftretenden Veränderungen abgesehen - untereinander identisch sind. Man spricht von klonierten Zelllinien. Linien unterschiedlicher Zelltypen benötigen dabei oft ebenso unterschiedliche Zusammensetzungen ihrer Nährmedien, woraus sich wiederum Schlüsse auf für diese Zellen jeweils wesentliche Faktoren ziehen lassen.

Die meisten Wirbeltierzellen gehen nach einer begrenzten Zahl von Teilungen, häufig nur einigen Dutzend, in der Kultur zugrunde. Daneben kommt es jedoch vor, daß stabile, unbegrenzt zu kultivierende Linien entstehen. Schließlich lassen sich unbegrenzt vermehrungsfähige Kulturen auch aus Krebszellen züchten. Im Unterschied zu den meisten

anderen Zelllinien wachsen Krebszellen häufig auch von einer festen Unterlage unabhängig in Suspension und erreichen eine wesentlich höhere Zelldichte in den Kulturgefäßen, da ihr Wachstum - dem Krebs *in vivo* vergleichbar - nicht endet, wenn sie eine zusammenfließende Zellschicht gebildet haben. Natürlichen Krebszellen ähnliche Eigenschaften können erzeugt werden, indem Zellen experimentell mit Tumorstämmen infiziert werden. In jedem Fall sind gerade die sich unbegrenzt teilenden Linien von großem Nutzen für die Forschung, da sich durch sie große Zahlen einheitlicher oder eben gar klonierter Zellen erhalten lassen [11].

Mit dem Gedanken daran, daß die Etablierung einer solchen stabilen Linie gonadotroper Zellen große Erleichterungen für die Erforschung der Gonadotropine in Molekularbiologie und Zellbiochemie mit sich brächte, koppelten WINDLE und ihre Kollegen das *Simian-Virus-40-T-Antigen-Onkogen* (SV40-Tag-Onkogen) an die *Promotor/Enhancer*-Region des menschlichen Gens für die α -Untereinheit der Glykoproteine. Auf diese Weise richteten sie die Expression des SV40-Tag-Onkogens spezifisch auf die Glykoproteine sezernierenden Zellen der Adenohypophyse in Mäusen, die jenes Fusionsgen trugen. Die Tiere entwickelten Tumoren des Hypophysenvorderlappens, und deren Zellen wurden in dissoziierten Zellkulturen (als solche werden Kulturen bezeichnet, in welchen die Zellen nicht mehr im Gewebeverband, sondern frei vorliegen) angezüchtet. Wegen der großen Heterogenität der Primärkulturen wurden die endokrinen Zellen zunächst gezielt angereichert, schließlich wurden einige klonale Zelllinien etabliert. Eine dieser Linien war die Zelllinie 1 aus einem als groß und eingekapselt beschriebenen Tumor einer 49 Tage alten männlichen Maus, der die Bezeichnung α T3 gegeben worden war. So entstand der Name der α T3-1-Zelllinie. Die Tumorzellen bildeten die mRNA für die α -Untereinheit der Hormone, zeigten jedoch keine Expression eines der Gene für die spezifischen β -Untereinheiten. Da sie daraufhin auch der thyreotropen Population hätten angehören können, wurden sie auf ihre Ansprechbarkeit durch GnRH und das Thyreotropin-Releasinghormon (TRH) geprüft. Untersucht wurde auf die Synthese der mRNA für die α -Untereinheit der Glykoprotein-hormone. Die Zellen reagierten nicht auf das thyreotrope, jedoch dosisabhängig - und durch spezifische GnRH-Antagonisten zu blockieren - auf das gonadotrope Releasinghormon mit einer Anhebung der gemessenen mRNA-Konzentrationen. Dieser Befund kann als Nachweis der Vermittlung des GnRH-Effektes über den GnRH-

Rezeptor und somit - da dessen Vorhandensein als eine spezifische Funktion dieser Zellart gilt - der Abstammung der α T3-1-Zellen von Gonadotropen gewertet werden [12].

Gegenstände weiterer Experimente zur Charakterisierung der Zelllinie waren vor allem die sich nach Stimulation mit GnRH ergebenden zellulären Reaktionen.

Da ja seit einiger Zeit vermutet wird, daß die PIP_2 -Spaltung einen vorrangigen Mechanismus der Signalübertragung nach Reizung der GnRH-Rezeptoren darstellt, wurden die Konzentrationen verschiedener Metabolite des Inositolphosphat-Zyklusses nach Zugabe des Releasinghormons zum Kulturmedium untersucht. Deren Anstieg wurde gefunden, und da Phosphatidylinositol die einzige bekannte Quelle für Inositolphosphate ist [6], zeigt dies eine Aktivierung der Phospholipase C in den α T3-1-Zellen an. Da die durch dieses Enzym katalysierte Reaktion ja auch Diazylglyzerol hervorbringt, wurde darüber hinaus nach einer erhöhten Proteinkinase-C-Aktivität gesucht. Es konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung der Zellen mit GnRH zu einer Verschiebung eines Teils der Enzymmoleküle an die Zellmembran führte, eine Translokation, von der bekannt ist, daß sie als Effekt der Aktivierung des Proteins eintritt [6]. Später kam es zu einer - erwarteten - Rückverteilung des Enzyms. Während das GnRH-Analogon Nafarelin weder ohne noch unter Zuhilfenahme des Phosphodiesterasehemmers IBMX in der Lage war, zu meßbar erhöhten cAMP-Spiegeln in den Zellen zu führen, ließ sich mittels Forskolin dagegen ein etwa 200facher Anstieg der Konzentration dieses *Second messengers* und damit die Stimulierbarkeit auch dieses Signalübertragungsweges in α T3-1-Zellen zeigen.

Daß GnRH auch zu einer erhöhten Konzentration der mRNA für die α -Untereinheit der Glykoproteine führte, wurde bereits erwähnt (s. o.), ferner vergrößerte es den Kalziumstrom an spannungsabhängigen Kanälen der Zellen. Alle diese Daten stimmten gut mit den von anderen Autoren bereits an Primärkulturzellen aus tierischen Hypophysen oder *in vivo* gewonnenen Ergebnissen überein und wiesen α T3-1-Zellen bereits als ein hervorragendes Modell für Untersuchungen über die Wirkungsweise von GnRH an gonadotropen Zellen aus [13].

Auch weitere Aspekte der Biologie der Gonadotropen dürften sich gut an ihnen studieren

lassen, wenngleich auch die Unfähigkeit dieser Zellen zur Bildung der β -Untereinheit eines Gonadotropins einen prinzipiellen Mangel darstellt.

Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP)

Dieses Hormon wurde 1989 auf Grund seiner Fähigkeit, die Adenylatzyklase von Hypophysenzellen zu stimulieren, entdeckt. AKIRA ARIMURA und seine Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter waren auf der Suche nach neuen hypophyseotropen Faktoren des Hypothalamus. Sie wählten aus Gründen der Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit die Aktivierung der Adenylatzyklase kultivierter Zellen aus Rattenhypophysen als Parameter eines Assays, mit dem sie Material aus etwa 5000 Schafhypothalami, die sie von einem Schlachthof bezogen, sichteteten. Dies geschah unter der Annahme, daß jede Substanz, die in der Lage sei, die Adenylatzyklase in den Zellen signifikant zu stimulieren, eine biologische Funktion in Hypophysenzellen ausüben sollte. So isolierten sie ein basisches Peptid, welches 38 Aminosäuren aufwies und daher auf den Namen *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide with 38 residues*, PACAP38, getauft wurde. Die unten wiedergegebene Primärstruktur weist in den 28 N-terminalen Aminosäuren eine Homologie von 68% zu derjenigen des Vasoaktiven intestinalen Polypeptids (VIP) auf, so daß das Molekül zur Sekretin/Glukagon/VIP-Familie gerechnet wird. Auf Gly-28 folgen zwei basische Aminosäuren, eine für vorgegebene Spaltungsstellen typische Sequenz. Diesem Hinweis nachgehend, synthetisierte die Arbeitsgruppe eine die 27 N-terminalen Aminosäuren umfassende, verkürzte Version des Peptids, PACAP27, die bezüglich ihrer Fähigkeit, die hypophysäre Adenylatzyklase zu stimulieren, dem längeren Molekül ebenbürtig war und schließlich auch in Fraktionen des untersuchten hypothalamischen Materials gefunden wurde [14].

Die Aminosäuresequenz der beiden Peptide wird hier so dargestellt, daß die in beiden Molekülen enthaltenen Anteile in der gewöhnlichen Druckschrift, die darüber hinaus nur in PACAP38 vorkommenden Aminosäuren in *kursiver Schrift* gesetzt sind [14]:

PACAP: His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-
Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂.

Das PACAP-kodierende Gen wurde ermittelt - in Schafen scheint es nur an einem Genort ausgebildet zu sein - und so ein 176 Aminosäuren umfassendes *Precursor*-Molekül sequenziert, innerhalb dessen PACAP38 zwischen den Positionen 132 und 169 lokalisiert ist. An einer cDNA-Bibliothek menschlicher Hodenzellen konnte festgestellt werden, daß das reife PACAP38-Molekül des Menschen mit dem des Schafes identisch ist (im Vorläuferprotein gibt es hingegen einige nicht übereinstimmende Aminosäuren) [15]. Auch PACAP38 der Ratte weist eine vollständig homologe Sequenz auf [16]. Die Primärstruktur der Peptide weicht selbst bei Frosch und Huhn in jeweils nur einer Aminosäure hiervon ab. Diese Stabilität mag darauf hindeuten, daß das Hormon für die Steuerung fundamentaler Lebensvorgänge bedeutsam ist [17]. Dabei wird PACAP in der Ontogenese bereits früh exprimiert, woraus sich der Verdacht ergibt, daß es eine Rolle auch für die Entwicklung des Zentralnervensystems spielen könnte: An Ratten gelang der Nachweis sowohl PACAPs als auch seines Rezeptors im Gestationsalter von 14 Tagen, noch bevor neuronale Zellverbindungen hergestellt sind [17].

Viele Tierarten und Gewebe wurden auf das Vorkommen von PACAP hin untersucht [18]. Dabei fanden sich an Ratten die weitaus höchsten Konzentrationen im Hypothalamus, jedoch besonders hohe Konzentrationen auch in der Neurohypophyse, der Nebenniere und den Hoden, was natürlich eine physiologische Rolle des Hormons in diesen Organen vermuten läßt. Im zentralen Nervensystem scheint PACAP, in etwas geringeren Konzentrationen, durchaus verbreitet und kommt dort unter anderem noch im Kortex und Hippokampus vor. Mit immunhistochemischen Methoden fanden sich PACAP-positive Neurone im *Nucleus paraventricularis* und *Nucleus supraopticus* [19]. Das Hormon ließ sich auch im Ovar und in diversen weiteren peripheren Geweben nachweisen, in Geweben beispielsweise des Gastrointestinaltraktes (longitudinale Muskelschicht und BRUNNERSche Drüsen: Schaf), des Pankreas (Schaf) und des Respirationstraktes (Meerschweinchen, Ratte, Schaf, Schwein u. a.). Vielfach wurde PACAP außerdem um kleine Arterien und Arteriolen des Gehirns und Abdomens herum gefunden [14].

Mindestens vier Typen von Rezeptoren wurden identifiziert: Es gibt einen hochaffinen PACAP-Rezeptor, dessen Affinität für PACAP hoch, für VIP jedoch bedeutend geringer ist. Er wird als Typ-1-Rezeptor, neuerdings auch PACAP-Rezeptor (PACAPR) bezeichnet [14, 20]. Es werden zwei Subtypen unterschieden: Die Affinität des sogenannten A-Rezeptors für PACAP38 und PACAP27 ist gleich groß (Affinität zu PACAP38=PACAP27>>VIP), die des B-Rezeptors zu der kürzeren Form geringer ausgeprägt als zu der längeren Version des Peptids (Affinität zu PACAP38>>PACAP27; [21]). Die beiden Moleküle binden zudem auch an den länger bekannten, ja offenbar verhältnismäßig unspezifischen VIP-Rezeptor (Affinität zu PACAP27(>)VIP), den Typ-2-Rezeptor, inzwischen daher richtiger auch als VIP-PACAP-Rezeptor (VIP/PACAPR) bezeichnet [20, 22]. Schließlich läßt sich auch eine Affinität des sogenannten Helodermin-VIP-Rezeptors zu PACAP nachweisen [23].

Aus den vielen so zusammengetragenen Hinweisen läßt sich eine enorme Vielfältigkeit der Aufgaben des Hormons schließen, es gilt heute als hypophyserotroper Faktor, als Neurotransmitter, Neuromodulator, neurotrophischer Faktor und eventuell auch Vasoregulator. Neue Untersuchungen von SHIODA ET AL. machen eine Regulation Vasopressin-haltiger Neurone des Hypothalamus (*N. supraopticus*) durch PACAP wahrscheinlich [20]. *In vitro*-Studien an Gonadotropen zeigten einen Synergismus mit GnRH auf die Freisetzung von LH und FSH, - jedoch keine Beeinflussung der Sekretion von adrenokortikotropem oder Wachstumshormon [24, 25]. In diesen Zusammenhang gehören auch Beobachtungen über zytoprotektive Wirkungen auf embryonale Mäuseneurone, die diese unter dem Einfluß des toxischen HIV-Hüllproteins gp120 vor dem Untergang bewahrten [14, 17].

Das Vorkommen von Typ-1-Rezeptoren im Nebennierenmark, die beobachtete Stimulation der Adenylatzyklase in PC12-Zellen (chromaffine Zellen der Ratte) und der bereits erwähnte Nachweis immunoreaktiven PACAPs im Nebennierengewebe überhaupt lassen eine Beteiligung der Peptidhormone an der Steuerung der chromaffinen Zellen, vermutlich der Synthese und Sekretion der Katecholamine, erwarten. Die gleichen Befunde bezüglich Rezeptorvorkommen und Adenylatzyklaseaktivität liegen auch für azinäre Pankreaszellen vor, und die intravenöse Infusion von PACAP steigerte die Freisetzung von Amylase in

anästhesierten Ratten [21, 26]. Inzwischen wissen wir, daß PACAP - glukoseabhängig - mit einer außergewöhnlichen Potenz eine Insulinfreisetzung hervorzurufen vermag. Der Effekt scheint als direkte Wirkung auf β -Zellen auf einer Anhebung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels *via* Aktivierung von Kalziumkanälen zu beruhen. PACAP gilt dabei heute als das mit Abstand potenteste die Insulinsekretion fördernde Peptid überhaupt [27].

Schließlich ist das bereits erwähnte Vorkommen im Hoden mit dem Nachweis von Typ-1-Rezeptoren auf Keimzellen, vor allem Spermatozoen, Hinweis auf Einflüsse des Polypeptids auf die Spermatogenese [14]. Zwar sind die Konzentrationen des Hormons im Hypothalamus höher, doch enthält das Hodengewebe insgesamt mehr PACAP als das gesamte Gehirn [18]. Es konnte nachgewiesen werden, daß PACAP innerhalb der *Tubuli seminiferi* synthetisiert wird [28]. Im Zusammenhang mit bekanntgewordenen Wirkungen auf gonadotrope Hypophysenzellen wird so inzwischen eine Schlüsselstellung im Rahmen der Fortpflanzung gemutmaßt [29, 30].

Erwähnt werden soll noch, daß intravenöse Bolusinjektionen wiederum an anästhesierten Ratten dosisabhängige hypotensive Wirkungen zeigten. Dabei war die Blutdrucksenkung durch PACAP38 der durch VIP hervorgerufenen vergleichbar und derjenigen des PACAP27-Moleküls eindeutig überlegen [31, 32]. Zusammen mit der Anwesenheit von PACAP in der Wand kleiner Blutgefäße ergab sich daraus der Verdacht, das Hormon könne an der Regulation des lokalen Blutflusses zumindest im Bereich des Darmes und des Gehirns beteiligt sein. Zur Zeit scheinen die übrigen geschilderten Einflüsse der Peptide demgegenüber jedoch im Vordergrund zu stehen.

Neben den hier zusammengetragenen sind etliche weitere Effekte der beiden Hormonvarianten bekannt und werden sicher auch künftig noch solche Wirkungen nachgewiesen werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

Materialien

Die α T3-1-Zellen waren eine Gabe von DR. MELLON vom Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, CA, USA) an DR. MCARDLE (Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung, IHF). Sie wurden in Kulturmedien der Firma Gibco-BRL (Eggenstein, D) gehalten, von welcher auch die Zusätze zu diesen Medien (s. Methoden) stammten. Die T75-Zellkulturflaschen kamen von der Firma Nunc (Wiesbaden, D). Die Mikrotiterplatten (24-, 48-, oder 96-well-plates, im folgenden als 24er-, 48er- oder 96er-Mikrotiterplatten bezeichnet) waren Produkte von Costar (Cambridge, MA, USA). Das verwendete Gonadotrope Releasinghormon (GnRH), Forskolin und Phorbolmyristoazetat (Phorbol-12-myristat-13-acetat, PMA) stammten von Calbiochem (Frankfurt am Main, D), die Steroide 17 β -Östradiol (1,3,5[10]-Estratrien-3,17 β -diol), Progesteron (Δ^4 -Pregnen-3,20-dion), Testosteron (Δ^4 -Androsten-17 β -ol-3-on) und Kortikosteron (Δ^4 -Pregnen-11 β ,21-diol-3,20-on) sowie Bacitracin (71 U/mg), Dowex-1 (*formate form*), *Phosphate buffered saline* (PBS) und Trichloressigsäure von der Firma Sigma (Deisenhofen, D). Das Keoxifen war ein Geschenk von DR. NIEDENTHAL vom Konzern Eli Lilly (Indianapolis, IND, USA) an DR. MCARDLE. Das *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide* (PACAP, mit 38 Aminosäuren bezeichnet als PACAP38, in der kürzeren, die 27 N-terminalen AS umfassenden Form als PACAP27) und das Vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) wurden von Saxon Biochemicals (Hannover, D) bezogen. Amersham Buchler (Braunschweig, D) lieferte ³H-Inositol (Myo-[2-³H]Inositol, 14-16 Ci/mmol), radioaktiv markiertes Thymidin ([Methyl-³H]Deoxythymidin-5-triphosphat, [³H]TdR, 85 Ci/mmol) die Firma New England Nuclear (Dreieich, D). Von der Firma Bissendorf (Hannover, D) stammten die humanen Endotheline (ET 1, 2 und 3), Sarafotoxin (S6b), Somatostatin, *Somatostatin-Tumor Inhibiting Analog*, Dopamin, Bromocriptin, Insulin und *Insulin-like Growth Factor I* (IGF-1). Das verwendete Isobutylmethylxanthin (IBMX) kam von Research Biochemicals International (RBI, Natick, MA, USA), die auch Bromocriptin und

Dopamin lieferten. Die Reagenzien für den radioimmunologischen Nachweis von cAMP wurden von DR. SCHUMACHER und seiner Arbeitsgruppe im IHF bereitete und stimmten mit dem im Handel befindlichen Set der Gesellschaft für Immunchemie und -biologie mbH (IBL, Hamburg, D) überein. Alle anderen Materialien stammten von branchenüblichen Versorgungsunternehmen.

Im Anhang sind die Zusammensetzungen der *Basic salt solution* (BSS) mit Zusatz von Rinderserumalbumin (BSS/BSA) und des für die Fluoreszenzmessungen verwendeten DNA-Assaypuffers, außerdem die Zusätze zu Medium 199 für den cAMP-RIA angegeben.

Kultur der α T3-1-Zellen

Die Stammkulturen der α T-3-1-Zellen wurden in T75-Flaschen über jeweils eine Woche gehalten. Als Anzuchtmedium diente DULBECCO's *Modified EAGLE's Medium* (DMEM) mit Zusätzen von Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 μ g/ml), Glutamin (20 μ mol/ml) und Serum (10%, davon je zur Hälfte Pferdeserum (*Horse serum*, HS) und fetales Kälberserum (*Fetal calf serum*, FCS). Um die Zellen in neue Kulturgefäße oder auf Mikrotiterplatten umzusetzen, wurden das Medium abgenommen und die Zellen in einer trypsinhaltigen Lösung gewaschen und so vom Boden der T75-Flaschen gelöst. Nach spätestens einer Minute wurden sie in das frische Kultur- oder Versuchsmedium überführt. Für die hier dargestellten Versuche erwies es sich nicht als vorteilhaft, die Zellen mittels eines Schabers aus den Kulturflaschen zu lösen.

Während der Experimente auf den Kulturplatten befanden sich die Zellen in DMEM mit denselben Konzentrationen von Penicillin, Streptomycin und Glutamin. Außerdem waren unterschiedliche Anteile von Serum zugesetzt (0,1%, 1,0% oder 10%, zum Teil nur FCS), für Versuche mit serumfreien Medien auch 0,3% Rinderserumalbumin (*Bovine serum albumin*, BSA). Für die meisten Versuche wurden phenolrotfreies DMEM und Zusätze steroidfreier Seren verwendet, da sowohl Steroide als auch Phenolrot einen starken trophischen Effekt auf

die α T3-1-Zellen ausüben und dieser den Einfluß schwächer auf diese Weise wirksamer Substanzen oft nicht sichtbar werden ließ.

Die Zellkulturen wurden bei 37 °C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre gehalten.

Herstellung steroidfreier Sera

Zunächst wurden 50 g Aktivkohle eine Stunde lang bei 4 °C in destilliertem Wasser gewaschen, anschließend wurden sie mit 5 g Dextran, 7 ml 1 M Trispuffer-HCL (pH 7,4) und destilliertem Wasser *ad* 500 ml aufgefüllt. Um Seren von den darin enthaltenen Steroiden zu befreien wurden Kohlesuspension und Seren (FCS oder HS) jeweils im Verhältnis 1:10 gemischt und im Wasserbad bei 55 °C eine Stunde lang geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation über 20 min mit 1200 g. Das Serum wurde mit einer Pipette abgenommen und zweimal gefiltert (Filterporendurchmesser zuletzt 0,2 μ m).

DNA-Messungen und Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in *Phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und durch Einfrieren, Auftauen und die Anwendung von Ultraschall in DNA-Assaypuffer lysiert. Der DNA-Gehalt der Lysate wurde durch den Bisbenzimid-Fluoreszenztest gegen Standardproben (DNA aus Kälberthymen) bestimmt [33, 34]. Der DNA-Gehalt diente als Maß für die Anzahl der Zellen in den Proben.

Anhand einer Verdünnungsreihe einer Zellsuspension, aus der heraus Proben für jeweils drei Fluoreszenzbestimmungen und zwei Zählungen in NEUBAUER-Kammern gewonnen wurden, ergab sich eine Zahl von ungefähr $9 \cdot 10^4$ Zellen/ μ g DNA.

Messung in zelluläre Nukleinsäuren eingebauten [³H]Thymidins

Die Entwicklung der Methode für die Messung eingebauten [³H]Thymidins in α T3-1-Zellen ging von entsprechenden Beschreibungen FRESCHNEYS aus, die jedoch durch eine Vielzahl hier nicht dargestellter methodischer Experimente verändert und an die Erfordernisse einer klonalen, fest an der Unterlage haftenden Zelllinie, wie die α T3-1-Zellen es sind, angepaßt wurden [35].

Die Zellen wurden in der Regel über vier Tage unter den entsprechenden Versuchsbedingungen auf 48er- oder 96er-Mikrotiterplatten (in 0,5 ml bzw. 0,2 ml Medium) kultiviert. Zur Vermeidung von Einflüssen einer etwaigen Verdunstung des Mediums am Plattenrand wurde die jeweils äußere Reihe von Gefäßen einer Platte nicht mit Zellen, sondern allein mit Medium bestückt. Eine Inkubationsperiode in markiertes Thymidin enthaltendem Medium beendete die Experimente: In der Regel sechs Stunden vor Ablauf des vierten Versuchstages wurden zu jeder Kultur 0,125 μ Ci [³H]Thymidin hinzugefügt (wurden die Zellen in 200 μ l Medium gehalten, so wurde diesem ein Zusatz von 50 μ l Medium mit 2,5 μ Ci/ml [³H]Thymidin hinzugefügt, was der genannten Aktivität und einer Konzentration von etwa 0,5 μ Ci/ml [³H]Deoxythymidintriphosphat ([³H]TdR) während der Inkubation entspricht). Die Zellen wurden so bis zum Ende des Versuchs (d. h. über sechs Stunden) inkubiert, anschließend zweimal fünf Minuten lang in 10%iger Trichloressigsäure (1 ml) gewaschen und das so präzipitierte Material in 250 μ l 0,1 M Natronlauge (NaOH) mindestens eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das noch am Kunststoff haftende Material wurde durch Kratzen mit einer Pipettenspitze von dort gelöst und in Szintillations-Meßgefäße überführt. Der Tritiumgehalt dieser Lösungen wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler über bis zu drei Minuten gemessen.

Im Rahmen einiger Experimente wurde dieser Verlauf abgewandelt: So wurden - um zeitliche Verläufe zu ermitteln - mitunter auch am zweiten, sechsten und achten Tag Zellen mit ³H-markiertem Thymidin inkubiert; für früh durchgeführte Versuche (u. a. mit Zellen in serumfreien Medien) gilt, daß die Phase der Inkubation mit der radioaktiv markierten Substanz 24 Stunden betrug, zudem wurden hier teilweise 0,25 μ Ci [³H]TdR eingesetzt. Diese

Variationen gehen stets aus den Bildunterschriften im Rahmen der Ergebnisdarstellung hervor.

Messung der [³H]Inositolphosphat-Bildung

Die Zellen wurden nach vier- bis fünftägiger Kultivierung auf 24er-Mikrotiterplatten zunächst gewaschen, dann in frischem Kulturmedium, dem 2,5 µCi/ml [³H]Inositol zugesetzt waren, über weitere 24 Stunden inkubiert, anschließend erneut gewaschen und 45 min lang in 0,5 ml *Basic salt solution* mit 0,3% BSA (BSS/BSA) und 5 mM LiCl sowie den im Ergebnisteil angegebenen Stimulanzen gehalten. Die Versuche endeten mit der Entfernung des Mediums und der Abtötung der Zellen durch Zugabe eines Milliliters kochenden Wassers (95 °C). Um das Zellmaterial zu lysieren, wurden die Mikrotiterplatten eingefroren und aufgetaut. Es folgte eine Ionenaustausch-Chromatographie auf Dowex-1-Chromatographiesäulen, um das [³H]Inositolphosphat ([³H]IP) von freiem [³H]Inositol zu trennen. Mittels 1 M Ammoniumformurat in 0,1 M Ameisensäure wurde das [³H]IP aus den Säulen ausgewaschen und der ³H-Gehalt der Proben wurde im Flüssigkeits-Szintillationszählgerät bestimmt.

Radioimmunassay für den cAMP-Nachweis

Für den Nachweis der cAMP-Akkumulation nach Stimulation der αT3-1-Zellen wurden selbige auf den Mikrotiterplatten, auf welchen sie - noch ohne besonderen Stimulus - angezüchtet worden waren, zweimal je zehn Minuten lang in BSS/BSA gewaschen. In dem zweiten Waschvorgang war diesem Medium Isobutylmethylxanthin (IBMX) zugesetzt (zur Dosierung siehe Abschnitt »Messungen zur *Second messenger*-Synthese«, S. 30f.). IBMX hemmt die Phosphodiesterase und verhindert so den Abbau des intrazellulär gebildeten cAMPs. Der zweite Waschschritt diente gleichzeitig als Vorinkubation mit dem Phosphodiesterasehemmer.

Die Zellen wurden dann - von Versuchen über die zeitliche Entwicklung der cAMP-Bildung als Antwort auf Stimulationen abgesehen über 60 min - in 250 µl BSS/BSA mit IBMX bei 37 °C

inkubiert. Die Zugabe von 1 ml Ethanol beendete das Experiment. So wurden in der Regel das intra- und extrazelluläre cAMP gemeinsam gemessen.

Die Mikrotiterplatten wurden mindestens 20 min lang bei -20 °C gekühlt und anschließend zentrifugiert (2 min, 120 g). Proben des Überstandes wurden in Glasröhrchen bis zur Trockenheit evaporiert und die Rückstände in Medium 199 (M 199) mit Zusätzen von 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), 2 mM Glutamin und 0,01% NaN₃ gelöst.

Zur getrennten Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Anreicherung intra- und extrazellulären cAMPs wurde die Inkubation beendet, indem das Medium von den Mikrotiterplatten abgenommen wurde. Die Zellen wurden durch Zugabe 80%igen Ethanols zerstört, dem Medium ein Milliliter reinen Ethanols zugesetzt, so daß auch hier ein Ethanolgehalt von 80% resultierte.

In einigen Experimenten wurden die Proben nun azetyliert, hierzu wurden 10 µl eines Gemisches von Triethylamin und Trichloracetat (2,5:1) hinzugefügt. Durch die Azetylierung werden auch sehr kleine cAMP-Mengen nachweisbar, der RIA erreicht auf diese Weise eine Empfindlichkeit, die zum Nachweis von etwa 10 fmol/100 µl cAMP ausreicht. Für nicht azetylierte Proben liegt die cAMP-Nachweisgrenze bei etwa 0,2 pmol/100 µl. Da die cAMP-Akkumulation nach den hier beschriebenen Stimulationen in der Regel sehr groß war, konnte auf eine Azetylierung häufig verzichtet werden. An der Vergleichbarkeit der Ergebnisse ändert sich hierdurch nichts, da der cAMP-Gehalt der Proben gegen Reihen azetylierter oder nicht azetylierter Standardlösungen gemessen wurde.

Statistische Tests

Die erhaltenen Ergebnisse wurden, wo adäquat, in einer Varianzanalyse und dem t-Test für unverbundene Stichproben nach STUDENT auf statistische Signifikanz geprüft. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ unterscheidbare Resultate wurden in diesem Sinne als signifikant angesehen, höhere Signifikanzgrade sind mitunter angegeben und entsprechen dann den üblichen Bezeichnungen (sehr signifikant für $p < 0,01$, hochsignifikant für $p < 0,001$).

III. ERGEBNISSE

Experimente zu den Erfordernissen der Zellkultur und Parameter zur Messung der Vermehrung der α T3-1-Zellen

In frühen Experimenten ging es einerseits um den Einfluß verschiedener Bestandteile der Nährmedien, in denen die Zellen kultiviert waren, andererseits darum, eine möglichst einfache Methode zu finden, mit der sich eine Steigerung des Zellwachstums nachweisen ließe. Stimuliert eine dem Kulturmedium zugesetzte Substanz das Wachstum der Zellen, so ist dies ja ein Nachweis dafür, daß diese Substanz die α T3-1-Zellen beeinflusst: Somit galt die Tatsache, daß ein bestimmter Stoff das Wachstum der Zellkulturen stimulierte, als positive Antwort auf die Frage nach einer möglichen Wirkung auf α T3-1-Zellen, was sich im Sinne eines verhältnismäßig einfach durchzuführenden Suchtests verwenden ließ.

Die prinzipielle Eignung des von WINDLE, WEINER UND MELLON benutzten DMEMs vorausgesetzt, lassen sich unter den Kulturbedingungen der Zellen vor allem der Serumgehalt des Mediums und die Dauer der Wachstumsperiode sinnvoll variieren. Als geeignete Parameter zur Messung des Wachstums der Kulturen dienten die Erfassung ihres DNA-Gehaltes am Ende oder des Einbaus ^3H -markierten Thymidins in die DNA der Zellen während einer bestimmten Phase des Wachstums. Immer wurde vor der genaueren Analyse das Wachstumsverhalten der Zellen unter dem Mikroskop abgeschätzt, wodurch auch eine etwaige bakterielle Kontamination ausgeschlossen werden konnte.

Untersucht man nun das Wachstum der α T3-1-Zellen in Kulturmedien, denen unterschiedliche Mengen an Serum zugesetzt sind, so zeigt sich klar, daß diese Zellen, wenn sie in DMEM gehalten werden, auf die Zugabe von Serum angewiesen sind. Abbildung 1 zeigt das Ergebnis einer solchen Untersuchung: Dem Medium waren 0,3% Rinderserumalbumin zugefügt und die in der Abbildung angegebenen Konzentrationen fetalen Kälberserums. Am vierten Tag des

Experimentes enthielten die Kulturen ohne Serumzusatz noch in etwa die ursprünglich eingebrachte Menge an DNA, waren also nicht gewachsen. Dem entspricht, daß sich in entsprechend gehaltenen Kulturen auch kein Einbau markierten Thymidins, also keine DNA-Synthese nachweisen ließ. In den mit Zusätzen von 1 oder 10% Serum gehaltenen Kulturen hingegen waren die Zellen in der Lage, sich zu vermehren: Es waren hier sowohl die Synthese der Nukleinsäure meßbar als auch bereits der DNA-Gehalt der Kulturen vermehrt.

In Medien mit 10%igem Serumzusatz ließ sich später verständlicherweise ohne erkennbaren Nachteil auf die Zugabe weiteren Albumins verzichten.

Verfolgt man die Entwicklung einer Kultur auf Mikrotiterplatten ausgebrachter Zellen über die Zeit, so läßt sich eindrucksvoll der Zusammenhang zwischen den durch Inkubation mit markiertem Thymidin und den durch DNA-Fluoreszenzmessungen ermittelten Daten erkennen:

In der folgenden Graphik wird ein Vergleich dieser beiden meßbaren Parameter in einem Versuch dargestellt, in welchem α T3-1-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit 10^{-8} M Östradiol in phenolrotfreiem DMEM mit 10% steroidfreiem Serumanteil gehalten wurden (48er-Mikrotiterplatten, 500 μ l Medium/Kultur). Das Wachstumsverhalten der Kulturen wurde zwei, vier, sechs und acht Tage, nachdem die Zellen ausplattiert worden waren, bestimmt (Abb. 2). Dabei zeigte sich eine deutliche Stimulation der DNA-Synthese vor allem bei den am vierten Versuchstag abgetöteten Zellen. Das markierte Thymidin war ihnen 24 h zuvor zugesetzt worden. Zu diesem Zeitpunkt war auch der Gehalt an DNA in den Kulturen bereits deutlich erhöht, doch fand dieser sein Maximum erst zwei Tage nach dem Zeitpunkt des gemessenen Synthesemaximums.

Die Errechnung eines von manchen Autoren beschriebenen *Indicis*, der die Menge in die Nukleinsäure eingebauten [3 H]Thymidins auf die gegebene DNA-Menge bezieht (Abb. 2, oben), ließ im Rahmen von *Screening*-Tests zur bloßen Erkennung möglicher Stimulationen des Kulturwachstums insofern keinen wesentlichen Vorteil erkennen, als diese auch über eine alleinige [3 H]Thymidinmessung erfaßbar schienen (wenngleich im Gegensatz zur Messung von [3 H]TdR oder des DNA-Gehaltes allein erst die Ermittlung des *Indicis* eine Proliferation sicher

erkennen läßt, vgl. »Diskussion«, S. 53f.). Aus diesem Grund habe ich später in der Regel auf DNA-Messungen verzichtet.

Es zeigte sich aber, daß sowohl die DNA-Messungen als auch die Messungen zur Thymidininkorporation geeignet waren, das Wachstumsverhalten der α T3-1-Zellen zu erfassen. Es ist aus dem beschriebenen Zusammenhang heraus plausibel, daß bei letzterem Verfahren die Aktivität des tatsächlich zur DNA-Synthese verwendeten Thymidins gemessen wird, daß also mit den entsprechenden Messungen tatsächlich die Teilungsaktivität der Zellen, nicht etwa lediglich eine zytosolische Aufnahme von ^3H , bestimmt wird.

Die Ursache des starken Fallens der Kurven für das mit Östradiol stimulierte kulturelle Wachstum jenseits des vierten (^3H -Messungen) beziehungsweise des sechsten (DNA-Fluoreszenz) Tages dürfte eindeutig in einer durch die großen Zellzahlen bedingten Verschlechterung der Umgebungsverhältnisse (Medium) der Zellen liegen. In vorläufigen Versuchen, die hier nicht dargestellt werden, hatte sich jedoch bereits ergeben, daß ein Wechsel des Mediums nach dem vierten Tag keine Verbesserung dieser Situation ergab.

Der Zeitraum um den vierten Tag schien auch in etlichen weiteren Experimenten günstig für die Messungen der ^3H -Aktivität in den Kulturen. Diese Versuche hatten zum Teil vorläufigen Charakter und sollen dann hier wiederum nicht dargestellt werden, - oder aber ihr Ausgang ist aus diesem Grunde eben nur für den vierten Tag dargestellt.

Da die Erfassung der Aktivität des von den Zellen genutzten [^3H]Thymidins auf die im Abschnitt »Material und Methoden« (vgl. S. 20f.) dargestellte Weise wesentlich weniger zeitaufwendig war als die DNA-Fluoreszenzmessungen, wurde in späteren Versuchen ganz überwiegend dieser Parameter zur Bestimmung des Wachstums der Kulturen verwendet.

Einflüsse von Steroidhormonen auf das Zellwachstum

Auch Dosis-Antwort-Beziehungen der Stimulation der α T3-1-Zellen durch verschiedene Steroide wurden nach viertägiger Inkubation auf Mikrotiterplatten erfaßt (Abb. 3). Dazu wurden die Zellen ohne Stimulation oder unter Zusatz von 10^{-12} - 10^{-6} M der Steroide Östradiol, Progesteron, Testosteron und Kortikosteron gehalten. Das dem Medium zugesetzte Serum war von Steroiden befreit. Alle vier Steroide waren in der Lage, die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen zu erhöhen, die ED_{50} für diese Wirkung lag für das Östrogen bei 10^{-11} - 10^{-10} M, für die anderen Steroide mindestens tausendfach höher.

Dieser Effekt des Östradiols auf das Wachstum der α T3-1-Zellkulturen ließ sich durch den Östrogenrezeptor-Antagonisten Keoxifen blockieren (Abb. 4). Hierzu wurden die Zellen mit oder ohne Zusatz von 10^{-9} M Östradiol und Konzentrationen von 10^{-12} - 10^{-6} M Keoxifen inkubiert. Keoxifen blockierte den Einfluß der zugesetzten Konzentration von Östradiol vollständig und mit einer ED_{50} von 10^{-8} - 10^{-7} M. Es hatte auch einen hemmenden Einfluß auf die Teilungsaktivität derjenigen Kulturen, denen kein Östradiol zugesetzt worden war (vgl. »Diskussion«, S. 54).

Einflüsse von GnRH auf das Wachstum der Zellen ohne und unter Zusatz von Östradiol

Aus einer frühen Phase meiner Arbeit, in der ich auf Grund noch nicht festfügter experimenteller Strukturen Langzeitverläufe des Kulturwachstums über bis zu acht Tage maß, stammen Daten zur Stimulation des Wachstums durch GnRH. Der trophische Einfluß des Releasinghormons auf die α T3-1-Zellkulturen machte sich nämlich erst relativ spät bemerkbar, eine gesteigerte Thymidininkorporation ebenso wie eine Vermehrung der DNA wurden erst nach längerer als viertägiger Kultur offenbar. So zeigt Abbildung 5 die Ergebnisse eines solchen Experimentes anhand von DNA-Messungen, wie sie sich am fünften bis sechsten Tag ergaben. Im serumarmen Medium (1% Serum), das ja recht geringe Wachstumsmöglichkeiten zu bieten scheint (vgl. Abb. 1), zeigte sich ein deutlicher, statistisch signifikanter Anstieg des

DNA-Gehaltes, wenn 10^{-8} M GnRH zugesetzt wurden. Waren dem Medium 10% Serum zugesetzt, so war die Variabilität - möglicherweise auf Grund der langen Dauer der Zellkultur - so hoch, daß sich eine statistisch abzusichernde Stimulation nicht ergab.

Am vierten Kulturtag ließ sich auch an mit [3 H]Thymidin inkubierten Zellen kein vermehrtes Zellwachstum nachweisen, wenn sie in GnRH-haltigem Medium inkubiert wurden. Jedoch entfaltete GnRH hier bereits eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Zellen, wenn sie mit 10^{-11} M Östradiol stimuliert wurden (Abb. 6). In einer Serie von Versuchen zum Einfluß des gonadotropen Releasinghormones auf den Steroideffekt zeigte sich klar, daß letzterer partiell antagonisiert wurde, wenn den Kulturen gleichzeitig hohe Dosen von GnRH zugesetzt waren (10^{-6} M).

Einflüsse weiterer Substanzen auf die Vermehrung der α T3-1-Zellen

Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente war über die α T3-1-Zelllinie noch wenig bekannt. Auf der Suche nach weiteren auf diese Zellen einwirkenden Substanzen habe ich eine etwaige Stimulation des Wachstums der Kulturen untersucht. Für dieses *Screening* wurden Substanzen ausgewählt, für die eine Stimulation von Hypophysenzellen und in der Regel speziell Gonadotropen bekannt war.

Der statistisch gerade signifikante Einfluß der Endotheline I und II ließ sich nur in phenolrotfreiem Medium mit Zusatz steroidfreier Sera nachweisen (Abb. 7). Die Stimulation des Wachstums durch Phenolrot oder Steroide nämlich schien den gezeigten Effekt zu überlagern (vgl. »Kultur der α T3-1-Zellen«, S. 18f.). Diese Beobachtung war auch der Grund dafür, daß die weiteren Suchtests in der Regel, die hier dargestellten sämtlich, in Medien ohne diese Bestandteile ausgeführt wurden. Endothelin III und Sarafotoxin zeigten keinen trophischen Einfluß auf α T3-1-Zellen.

Einen starken trophischen Effekt hingegen zeigten Forskolin und das *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide* (PACAP; Abb. 8). Die Stimulation der Zellproliferation durch diese Substanzen und die Dosisabhängigkeit ihrer Wirkung ließen sich bereits im mikroskopischen Bild klar erkennen. Dabei war eine signifikante Anhebung ($p < 0,02$) der Menge gemessenen Tritiums in den Kulturen mit einer Konzentration von 10^{-9} M PACAP an nachweisbar, in höheren Konzentrationen war der Einfluß des PACAPs hochsignifikant ($p < 0,001$); hochsignifikant war auch die Stimulation durch 10^{-6} M Forskolin. Außerdem gilt für beide Substanzen, daß sich ihre Wirkung auch unter dem Einfluß von 10^{-9} M Östradiol noch nachweisen lies: Auch an den bereits durch das Steroid in ihrer Proliferation erheblich beschleunigten Zellen übten Forskolin und PACAP ihren trophischen Einfluß weiter aus.

Die im Rahmen derselben Versuchsserie dem Medium zugesetzten Substanzen PMA oder A23187 ließen den ^3H -Gehalt der Kulturen am Versuchsende, verglichen mit der Kontrolle, erheblich sinken (vgl. Abb. 8a).

Die natriuretischen Peptide verhielten sich in ihrem Einfluß auf die [^3H]Thymidininkorporation der Zellen nicht einheitlich, - einzig das natriuretische Peptid vom Typ C (CNP) war, in einer Dosierung von 10^{-7} M, in der Lage, das Wachstum der Kulturen signifikant zu stimulieren (Abb. 9).

Eine sehr signifikante Senkung des Tritiumgehaltes in den Kulturen - gemessen an den Kontrollen - ergab sich mit der BB-Variante des *Platelet derived growth factor* (PDGF) in Konzentrationen von 100 ng/ml (Abb. 10). Die AA-Form hingegen hatte keinen erkennbaren Einfluß auf das Kulturwachstum.

Auch bei anderen Substanzen, wie *Endothelin Growth Factor* (EGF; vgl. Abb. 10), Bromocriptin, Dopamin, Somatostatin und dem verwendeten *Tumor Inhibiting Somatostatin Analogue* ergaben sich unter den üblichen Versuchsbedingungen (phenolrotfreies DMEM, 10% steroidfreies Serum, Kulturen mit und ohne 10^{-9} M Östradiol) keine erkennbaren Effekte.

Auch IGF-1 ließ keinerlei Einfluß auf die $\alpha\text{T3-1}$ -Zellen sichtbar werden; im Gegensatz dazu

ergaben sich deutliche Hinweise darauf, daß Insulin in der Lage war, das Wachstum der Kulturen in einer Dosis von 1 µg/ml mehr als zu verdoppeln. Da die entsprechenden Experimente jedoch teils unter den oben erwähnten Versuchsbedingungen, teils in gewöhnlichem DMEM mit Zusatz normalen Serums durchgeführt wurden, sollen diese Ergebnisse hier nicht weiter berücksichtigt werden.

Messungen zur *Second messenger*-Synthese

Für die Messungen zur cAMP-Synthese galt es zunächst herauszufinden, welche Konzentrationen des Phosphodiesterasehemmers Isobutylmethylxanthin (IBMX) im Medium der stimulierten Zellen in der Lage wären, das einmal gebildete zyklische Monophosphat am besten zu bewahren. Dazu wurden Zellen in Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von IBMX und mit oder ohne 10^{-7} M PACAP38 inkubiert (Abb. 11). Alle Kulturen, die mit PACAP stimuliert worden waren, zeigten den nichtstimulierten Kulturen gegenüber hochsignifikant erhöhte cAMP-Konzentrationen. Diejenigen durch PACAP stimulierten Kulturen jedoch, denen zwischen 0,1 mM und 1,0 mM IBMX zugesetzt worden waren, enthielten nochmals sehr signifikant mehr cAMP. So wurden die nachfolgenden Versuche mit 0,25 mM IBMX ausgeführt.

In einer gleichsam entgegengesetzten Untersuchung zum Einfluß dieser Dosis von IBMX auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung der PACAP-stimulierten cAMP-Anreicherung fand sich - verglichen mit IBMX-freier Inkubationslösung - ebenfalls eine im t-Test nach STUDENT stets sehr signifikante Anhebung der gemessenen cAMP-Konzentrationen (Abb. 12). Dies war sowohl in den unstimulierten Kulturen (Kontrollen) als auch bei allen getesteten Konzentrationen von PACAP38 (10^{-12} - 10^{-6} M) der Fall. Mit und ohne IBMX waren die cAMP-Spiegel von einer Stimulation durch mindestens 10^{-9} M PACAP an signifikant erhöht (vgl. Text zu Abb. 12).

Um die günstigste Dauer der Inkubationsphase und den Zusammenhang zwischen extra- und intrazellulär meßbarem cAMP zu ermitteln, wurde der zeitliche Verlauf der cAMP-

Akkumulation in beiden Kompartimenten auf den Mikrotiterplatten getrennt erfaßt (Abb. 13, vgl. »Radioimmunassay für den cAMP-Nachweis«, S. 22). PACAP38 in einer Dosierung von 10^{-6} M führte zu einer raschen Anhebung des intrazellulären cAMP-Gehaltes, der Gehalt an extrazellulär gemessenem cAMP hingegen stieg langsamer an. Der Gesamtgehalt an cAMP hatte nach etwa einer Stunde sein Maximum erreicht. Diese Frist wurde daher als Inkubationsperiode für die meisten der nachfolgenden Experimente gewählt.

In einem Vergleich der Wirkungen, die die cAMP-Synthese maximal stimulierende Konzentrationen von PACAP38 und Forskolin (10^{-6} M PACAP und 10^{-5} M Forskolin) auf unterschiedliche Hypophysenzellsysteme hatten, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Varianzanalyse, $p < 0,05$). Während Forskolin die cAMP-Spiegel in allen Zellpräparationen signifikant anhob, war PACAP38 nur an α T3-1- und Primärkulturzellen (davon sind etwa 10% gonadotrope Zellen) aus Rattenhypophysen dazu in der Lage, es hatte keinen erkennbaren Einfluß auf das Ausmaß der cAMP-Synthese in GH₃-Zellen (Abb. 14). Im selben Experiment diente CNP als Negativkontrolle: Es stimuliert in α T3-1-Zellen die cGMP-Synthese bis zu 1000fach [36], hatte jedoch an keiner der Zellpräparationen Einfluß auf den gemessenen Spiegel an cAMP.

Betrachtet man an α T3-1-Zellen die Dosisabhängigkeiten der Wirkungen von PACAP38 und PACAP27 auf die cAMP- und IP-Bildung, und vergleicht man diese mit den Dosis-Wirkungsbeziehungen des verwandten Vasoaktiven intestinalen Polypeptides (VIP), so lassen sich Rückschlüsse auf den auf den Zellen lokalisierten Typ des PACAP-Rezeptors ziehen (vgl. »PACAP«, S. 15). In einem solchen Versuch, in welchem der Einfluß aller drei Peptide auf die cAMP- und [³H]IP-Anreicherung in Kulturen dieser Zelllinie untersucht wurde, zeigte sich, daß beide Formen von PACAP in der Lage waren, die Synthese der *Second messenger* jeweils gleichstark dosisabhängig zu stimulieren (Abb. 15). Für die Entstehung von cAMP lag die ED₅₀ dabei um 3 nM, für die [³H]IP-Akkumulation bei etwa 20 nM. VIP ließ lediglich die gebildeten cAMP-Konzentrationen in den Kulturen steigen, die ED₅₀ für diesen Effekt lag mit etwa 1000 nM jedoch um einen Faktor von 100-1000 höher als die entsprechende ED₅₀ für die PACAP-Moleküle. Ein Einfluß auf die IP-Bildung durch VIP ließ sich nicht erkennen.

Die beobachtete Stimulation der cAMP-Synthese durch PACAP und Forskolin ist - nicht prinzipiell, jedoch in ihrem Ausmaß - kalziumabhängig. In einem Experiment, mit welchem diese Frage zu untersuchen war, wurden die α T3-1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von PACAP und Forskolin jeweils mit oder ohne EGTA inkubiert. Des Weiteren wurde Aluminiumfluorid, das mitunter G-Proteine zu stimulieren vermag, zugesetzt. Während jedoch PACAP und Forskolin die Bildung von cAMP in Ca^{2+} -haltiger Inkubationslösung signifikant stimulierten, zeigte Aluminiumfluorid keinerlei Einfluß auf diesen intrazellulären Vorgang, - weder in der Anwesenheit von Kalzium noch in Ca^{2+} -freiem Medium (Abb. 16). PACAP und Forskolin stimulierten die cAMP-Synthese auch, wenn der Inkubationslösung Kalzium durch EGTA entzogen worden war.

Der Einfluß von Kalzium auf die PACAP-stimulierte cAMP-Synthese läßt sich weitergehend untersuchen, wenn man ihn in Medien mit und ohne Kalzium unter Zuhilfenahme der kalziumspezifischen Ionophore A23187 untersucht. In kalziumhaltigem Medium (1,5 mM CaCl_2) ließ sich die unter Zugabe von 10^{-7} M PACAP38 gesehene cAMP-Synthese um etwa 30% steigern, wenn der intrazelluläre Kalziumgehalt durch A23187 erhöht wurde (Abb. 17). Eine ähnliche Tendenz ließ sich auch in Abwesenheit von PACAP beobachten, sie erlangte dann jedoch keine statistische Signifikanz. Wurden die Zellen dagegen in Ca^{2+} -frei zubereitetem Medium (dem im Übrigen 2,5 mM EGTA zugesetzt waren) inkubiert, so fiel die cAMP-Synthese um 40-50% niedriger aus als in gewöhnlichem Medium, - und zwar sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von A23187.

Auch GnRH inhibiert die Stimulation der cAMP-Produktion durch PACAP. Steigerte PACAP38 allein die cAMP-Synthese mit einer ED_{50} von etwa $3 \cdot 10^{-9}$ M, so führte die Gabe von 10^{-7} M GnRH zu einer eindrucksvollen Senkung der unter PACAP-Einfluß gemessenen cAMP-Spiegel (Abb. 18). Da das Releasinghormon nach Bindung an seinen Rezeptor den intrazellulären Kalziumspiegel aber hebt, scheint dieser Effekt über einen anderen Mechanismus als die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration zustande zu kommen. GnRH aktiviert in Gonadotropen und α T3-1-Zellen auch die Proteinkinase C [12, 37-40]. Der Einfluß der Proteinkinase läßt sich testen, wenn man sie mit einem Phorbolster aktiviert und den entstandenen Effekt mit der Wirkung von GnRH vergleicht (Abb. 19). In einem solchen

Experiment inhibierten sowohl GnRH als auch Phorbolmyristoazetat (PMA) die durch Dosen von 10^{-8} - 10^{-6} M PACAP38 stimulierte cAMP-Synthese signifikant ($p < 0,05$). Dieser hemmende Einfluß erwies sich in einer weiteren experimentellen Serie, in der nun umgekehrt unterschiedliche Dosen von GnRH und PMA einer Konzentration von 10^{-8} M PACAP38 gegenübergestellt wurden, als dosisabhängig. Beide Proteinkinase C-Aktivatoren hatten für diesen hemmenden Einfluß eine ED_{50} im Bereich um 3 nM.

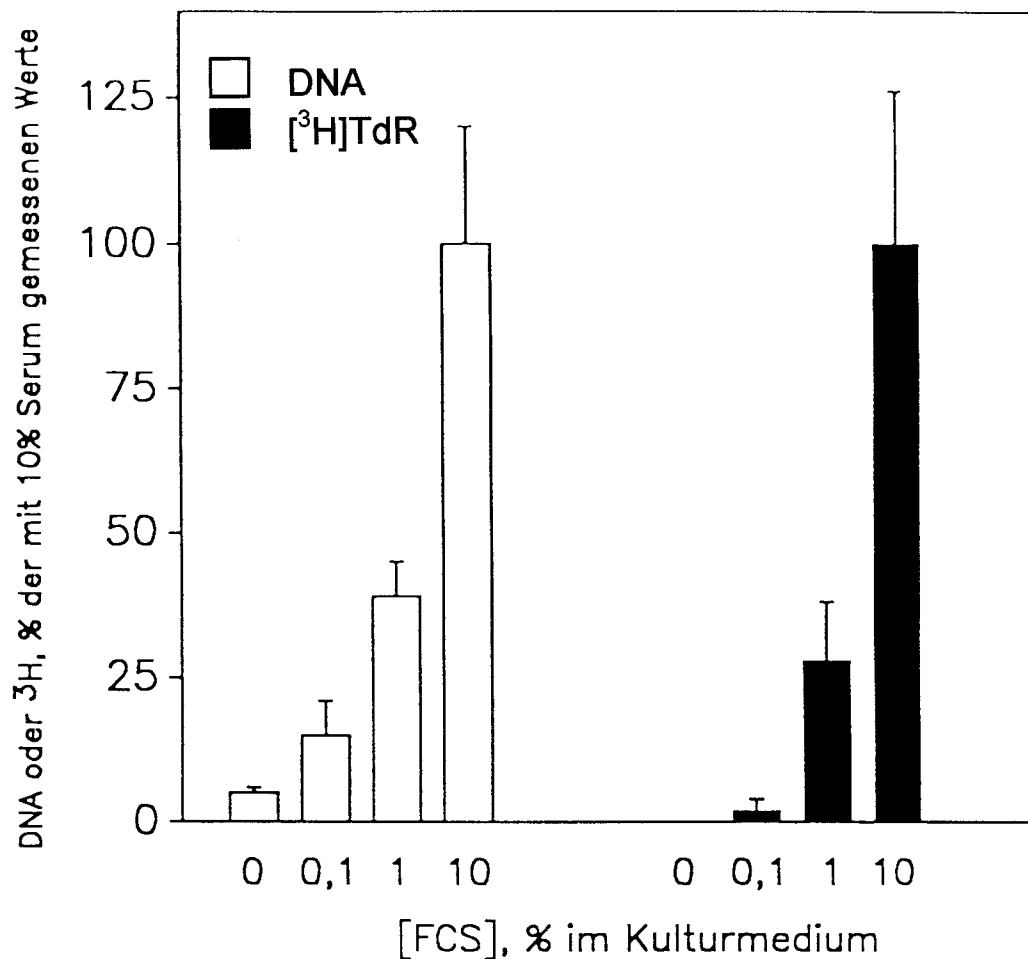


Abbildung 1: Einfluß der Konzentration zugesetzten Serums auf das Wachstumsverhalten der α T3-1-Zellen.

Alle Kulturen wurden in DMEM mit den üblichen Zusätzen und 0,3% BSA gehalten, die jeweiligen Serumkonzentrationen betragen 0%, 0,1%, 1% oder 10%. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwerte und Standardfehler (s/\sqrt{n}) dreier Experimente, in denen nach viertägiger Kultivierung der Zellen unter diesen Bedingungen der DNA-Gehalt beziehungsweise die Aktivität des von den Kulturen zur DNA-Synthese aufgenommenen [³H]Thymidins gemessen wurden. Die ursprünglich eingesetzte Menge an Zellen entsprach einem DNA-Gehalt von ungefähr 0,6 μ g/500 μ l. Für die Messungen des Thymidineinbaus wurden jeder Einzelkultur 24 h vor Versuchsende 0,125 oder 0,25 μ Ci [³H]TdR zugesetzt (vgl. »Messung in zelluläre Nukleinsäuren eingebauten [³H]Thymidins«, S. 20f.). Die Werte für den Einbau markierten Thymidins sind statistisch signifikant positiv für 1% und 10% Serum ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$ im t-Test nach STUDENT), entsprechend ist der DNA-Gehalt der Zellkulturen gegenüber dem Ausgangsmaterial in den Kulturen signifikant vermehrt ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$).

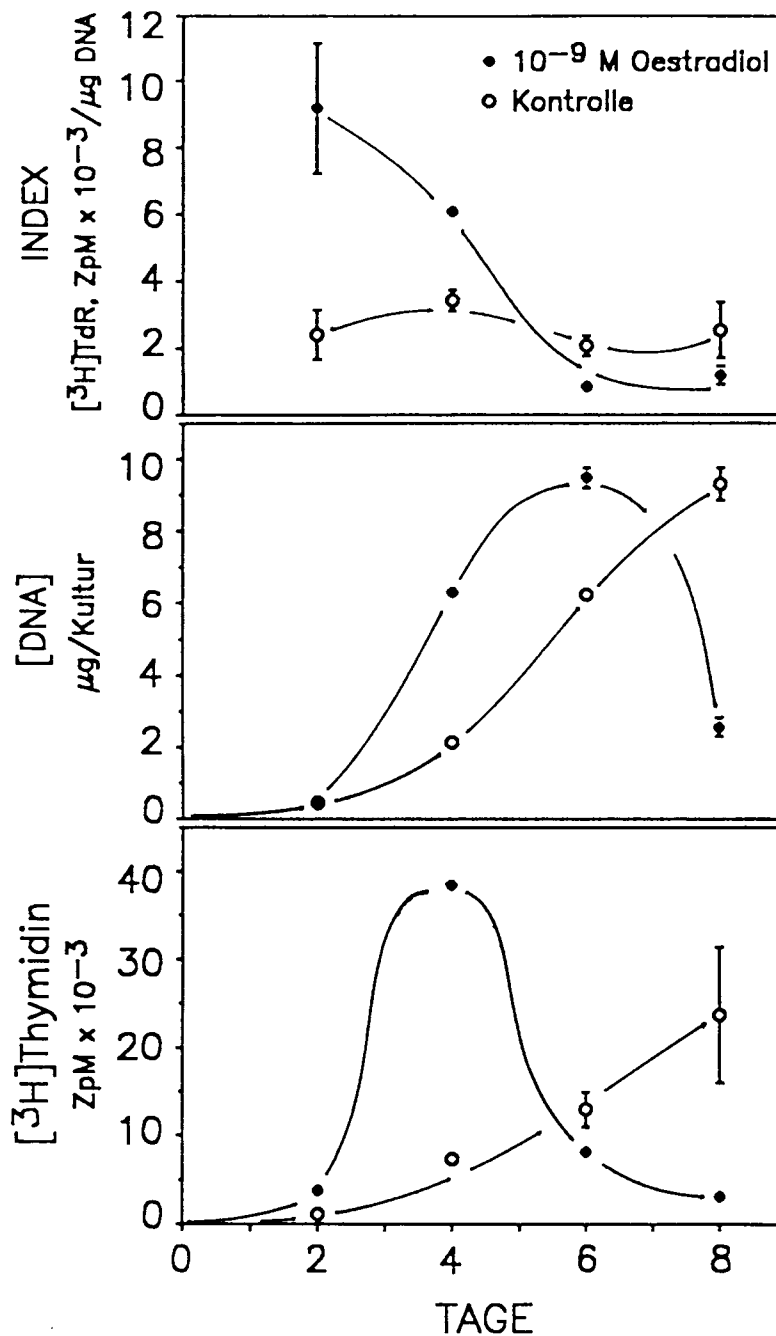


Abbildung 2: Vergleichbarkeit der durch DNA-Fluoreszenzmessungen und Inkubation mit markiertem Thymidin erhaltenen Daten zum zeitlichen Verlauf des Wachstums der $\alpha\text{T3-1}$ -Zellkulturen.

Während des Versuchs wurden die Zellen auf 48er-Mikrotiterplatten in 500 μl Medium gehalten. Pro Kultur wurden darin bei Versuchsbeginn (Tag 0) Zellen etwa entsprechend einer DNA-Menge von 0,6 μg ausgebracht. Das Medium enthielt kein oder 10^{-9} M Östradiol. Sollte der Einbau markierten Thymidins bestimmt werden, so wurde den Kulturen jeweils 24 h vor der Messung [^3H]Thymidin mit einer Aktivität von 0,25 μCi in 20 μl Medium zugesetzt. Sie wurden anschließend weiterhin inkubiert und die Inkubation zeitgleich derjenigen der für die DNA-Messungen vorgesehenen Zellen beendet. Dargestellt ist eines aus einer Serie von drei einander entsprechenden Experimenten, dessen Ergebnisse mit denjenigen der beiden weiteren Ansätze gut vergleichbar sind. In der Abbildung nicht gezeigte Standardabweichungen sind kleiner, als es der Größe der Symbole entspricht.

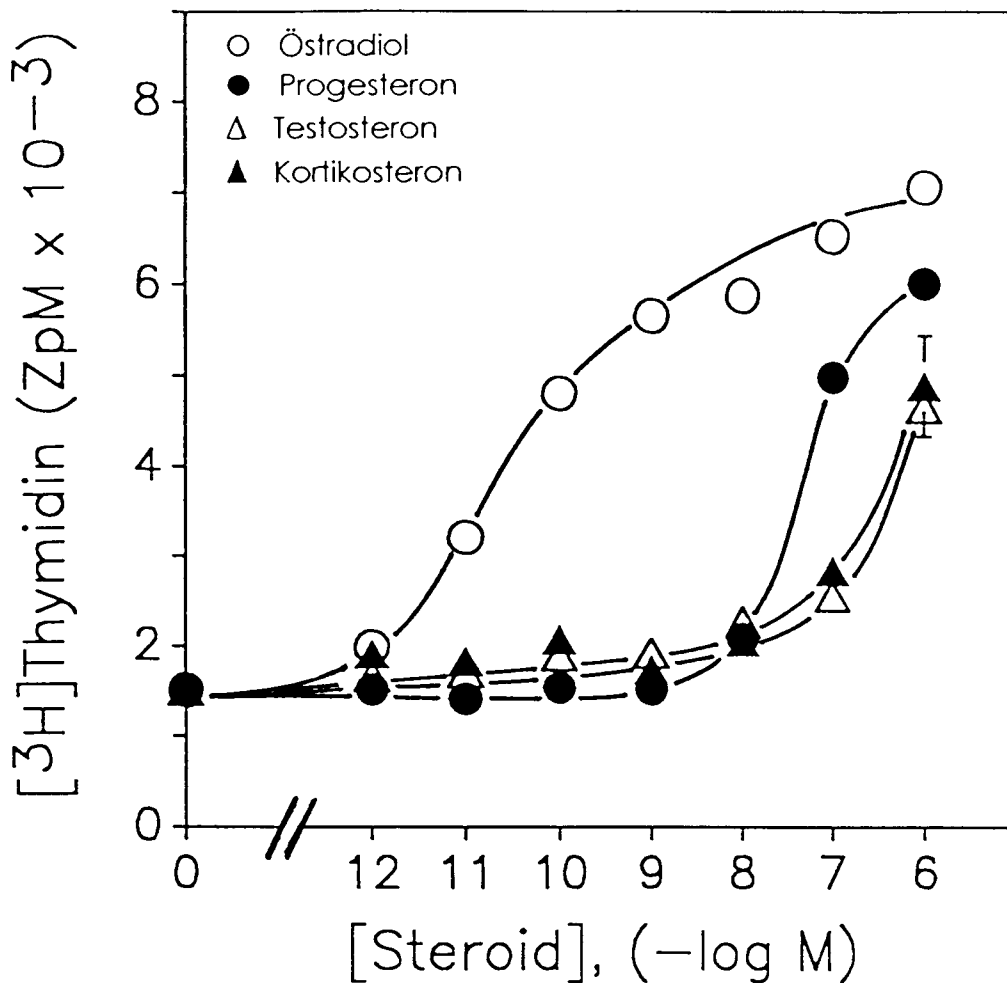


Abbildung 3: Einfluß von Steroiden auf die [³H]Thymidininkorporation durch α T3-1-Zellen.

Die Zellen wurden über vier Tage in phenolrotfreiem Medium mit Zusätzen steroidfreier Seren (5% FCS, 5% HS) und Östradiol, Progesteron, Testosteron oder Kortikosteron wie dargestellt inkubiert. Der Einbau radioaktiv markierten Thymidins in zelluläre DNA ist in Zerfällen pro Minute (ZpM) des innerhalb von 24 h pro Kultur inkorporierten Materials dargestellt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler aus je drei Beobachtungen in einem von vier Experimenten, dessen Ergebnisse auch für den Ausgang der anderen repräsentativ sind. Nicht gezeigte Abweichungen sind kleiner, als es der Größe der Symbole entspricht. Die Analyse der gemittelten Daten aller vier Experimente ergab eine Signifikanz der Östradioleffekte, wenn die Konzentration des Steroids im Medium mindestens 10^{-10} M betrug ($p < 0,05$ im t-Test, verglichen mit den Kontrollen ohne Steroidzusatz).

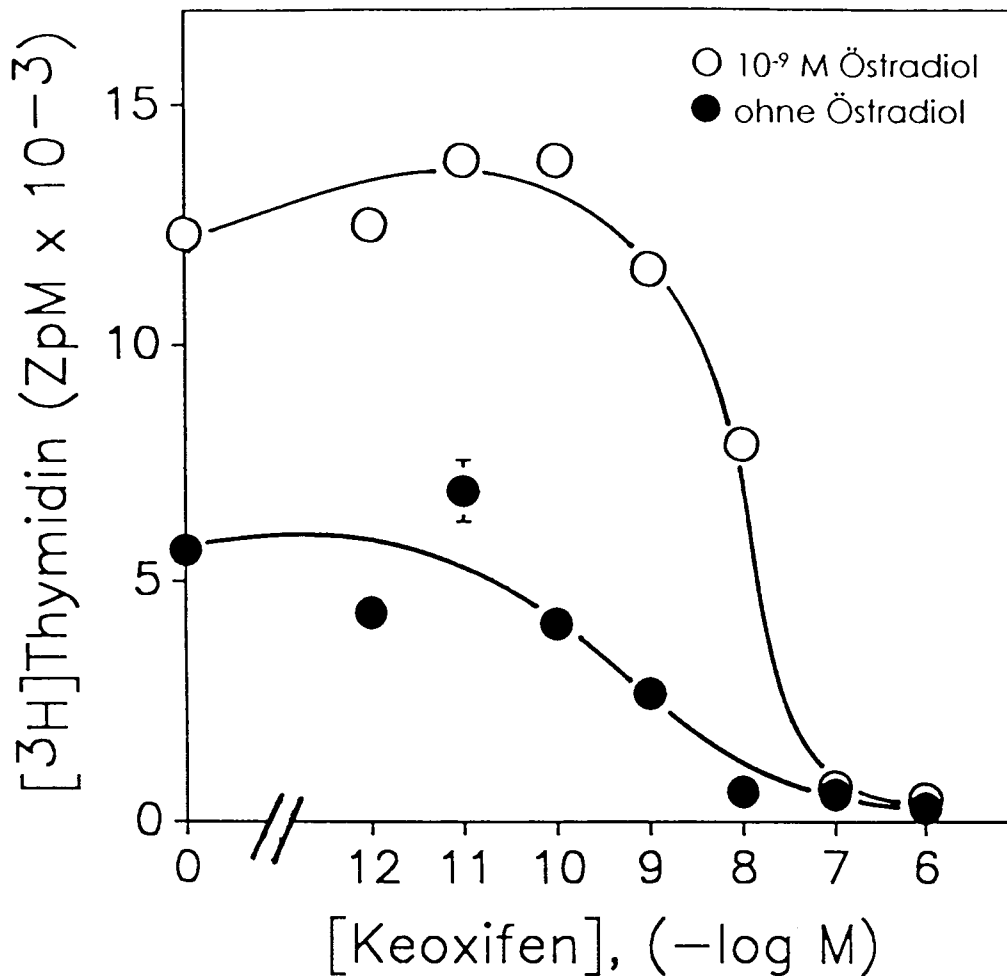


Abbildung 4: Einfluß von Keoxifen auf die Östradiol-stimulierte Inkorporation radioaktiv markierten Thymidins.

Die α T3-1-Zellen wurden über vier Tage in Medium mit den angegebenen Konzentrationen von Keoxifen und ohne oder mit 10^{-9} M Östradiol inkubiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler für die [³H]TdR-Aufnahme in die zelluläre DNA von je drei Kulturen innerhalb eines von vier Experimenten, dessen Ergebnisse auch für den Ausgang der anderen repräsentativ sind. Nicht dargestellte Abweichungen sind kleiner, als es der Größe der Symbole entspricht. Die statistische Analyse der gemittelten Daten aus allen vier Experimenten zeigte, daß die Einflüsse sowohl von Östradiol als auch von Keoxifen in Konzentrationen von mindestens 10^{-8} M signifikant waren ($p < 0,05$ im t-Test).

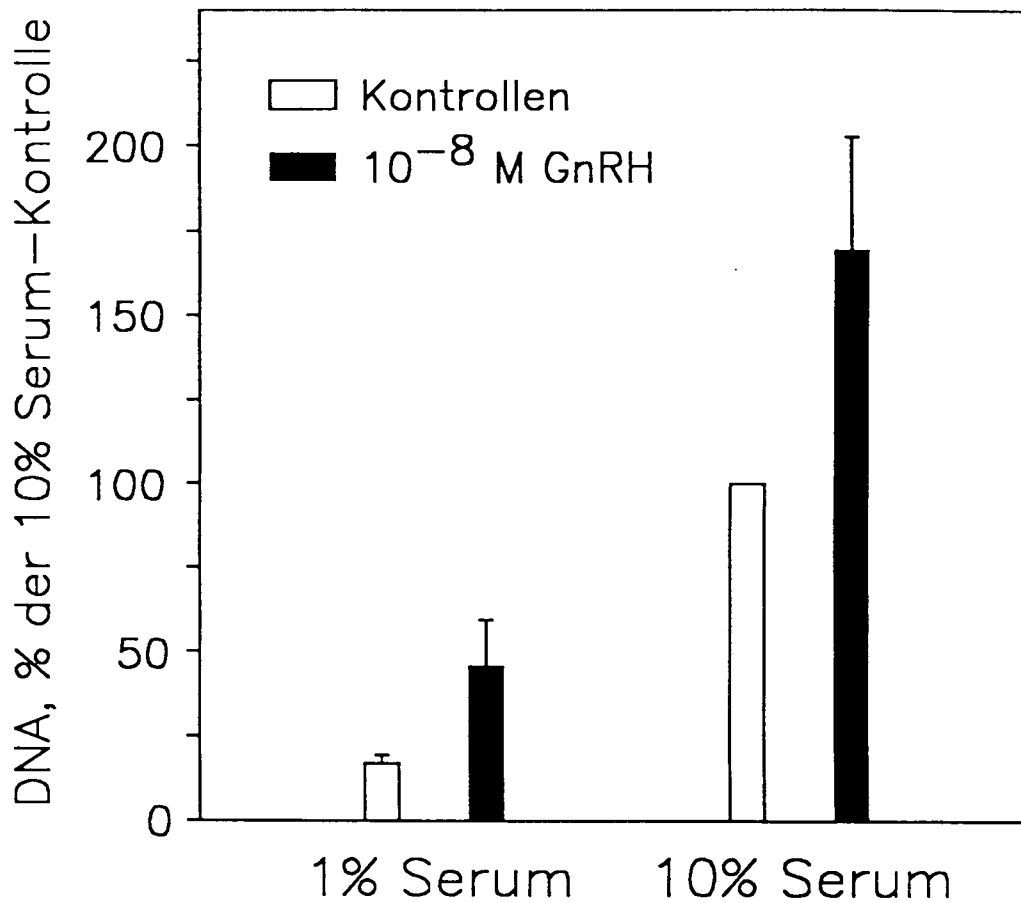


Abbildung 5: Einfluß von GnRH auf das Wachstum der α T3-1-Zellkulturen.

Ein statistisch signifikant vermehrter Gehalt der Kulturen an DNA ergab sich am fünften bis sechsten Tag in Medium, dem 1% Serum zugesetzt worden war, wenn die Zellen mit 10^{-8} M GnRH stimuliert worden waren ($p < 0,05$). Auch die Erhöhung des Serumanteils auf eine Konzentration von 10% ließ die Zellen verstärkt gedeihen ($p < 0,05$ im t-Test), doch ließ sich hier keine signifikante Stimulation durch GnRH mehr nachweisen.

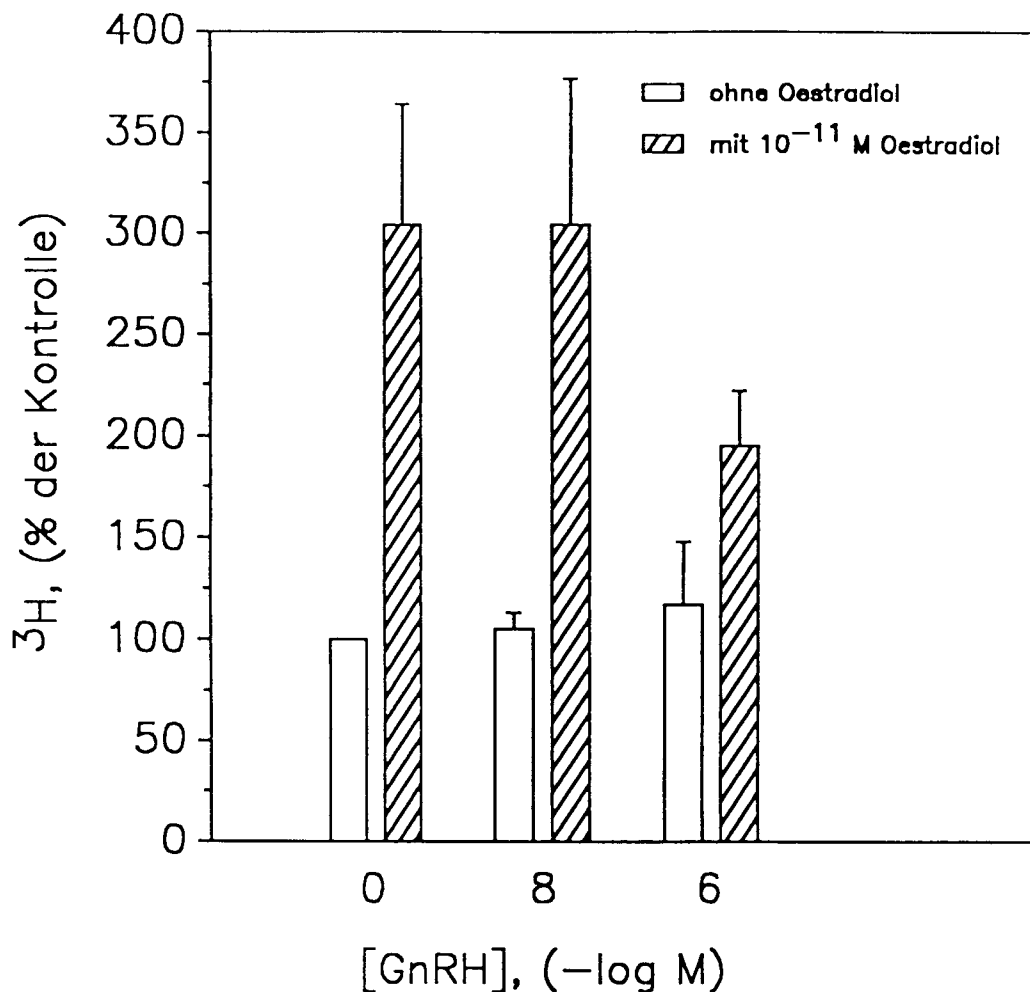


Abbildung 6: GnRH hemmt den Einfluß von Östradiol auf das Wachstum der Zellen.

Die Graphik zeigt einen Auszug aus den Ergebnissen vierer Experimente, in denen unstimulierte oder aber mit 10⁻¹¹ M Östradiol stimulierte Zellen einer Reihe von GnRH-Konzentrationen (0, 10⁻¹¹-10⁻⁶ M) ausgesetzt wurden. Die Zellen wurden am vierten Tag der Versuche jeweils sechs Stunden lang mit 0,125 µCi [³H]Thymidin inkubiert. Die gewonnenen Daten wurden auf den Wert für die Kontrollen bezogen, dessen Maß als 100%-Wert festgesetzt wurde. Während der Östrogenzusatz zu einer in allen Kulturen hochsignifikanten Wachstumsstimulation führte (p<0,001 im t-Test), konnte am vierten Versuchstag keine Steigerung des Wachstums durch GnRH nachgewiesen werden (vgl. Text zu Abb. 5). Im Gegensatz dazu hemmte GnRH in einer Konzentration von 10⁻⁶ M den Einfluß des Östrogens allein signifikant (p<0,05).

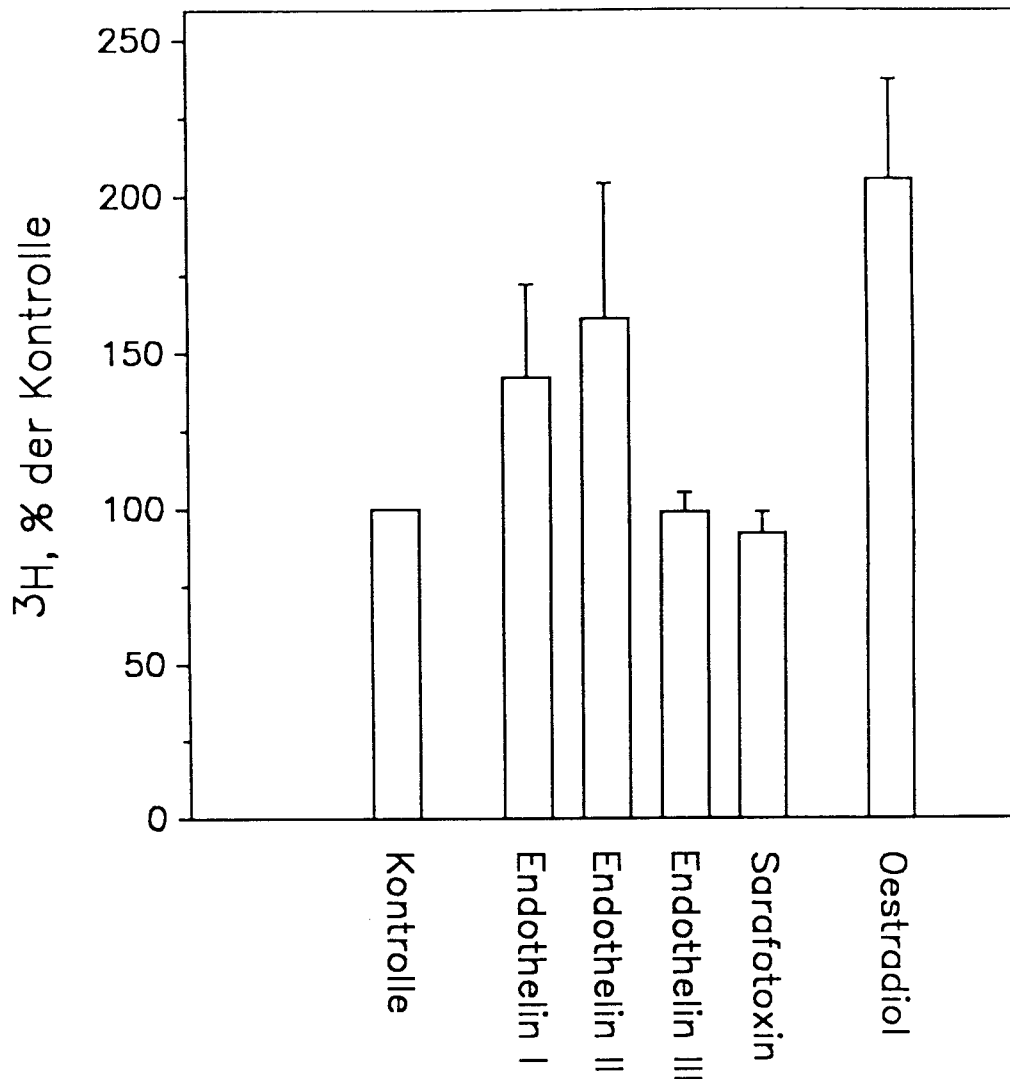


Abbildung 7: Einfluß der Endotheline I, II und III und von Sarafotoxin auf das Wachstumsverhalten der $\alpha\text{T3-1}$ -Zellkulturen.

Dargestellt sind die Ergebnisse bei Zusatz von 0,25 ng/ml der genannten Stoffe, herausgegriffen aus einer Reihe von Konzentrationen, von denen diese (für ET I und II) die stärkste Stimulation ergab. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei Experimenten mit je drei Beobachtungen, zur Vereinfachung sind die Daten auf den Wert für die Kontrolle (=100%) bezogen dargestellt. ET I und II führten zu einer signifikanten Vermehrung des Tritiumgehaltes der Kulturen ($p < 0,05$ im t-Test). Die Zellen wurden in phenolrotfreiem DMEM mit Zusatz von 10% steroidfreien Serums gehalten und am vierten Tag der Kultur über einen Zeitraum von sechs Stunden mit [^3H]Thymidin (0,125 $\mu\text{Ci/Kultur}$) inkubiert. Der dargestellte Einfluß von Östradiol allein diente als Positivkontrolle.

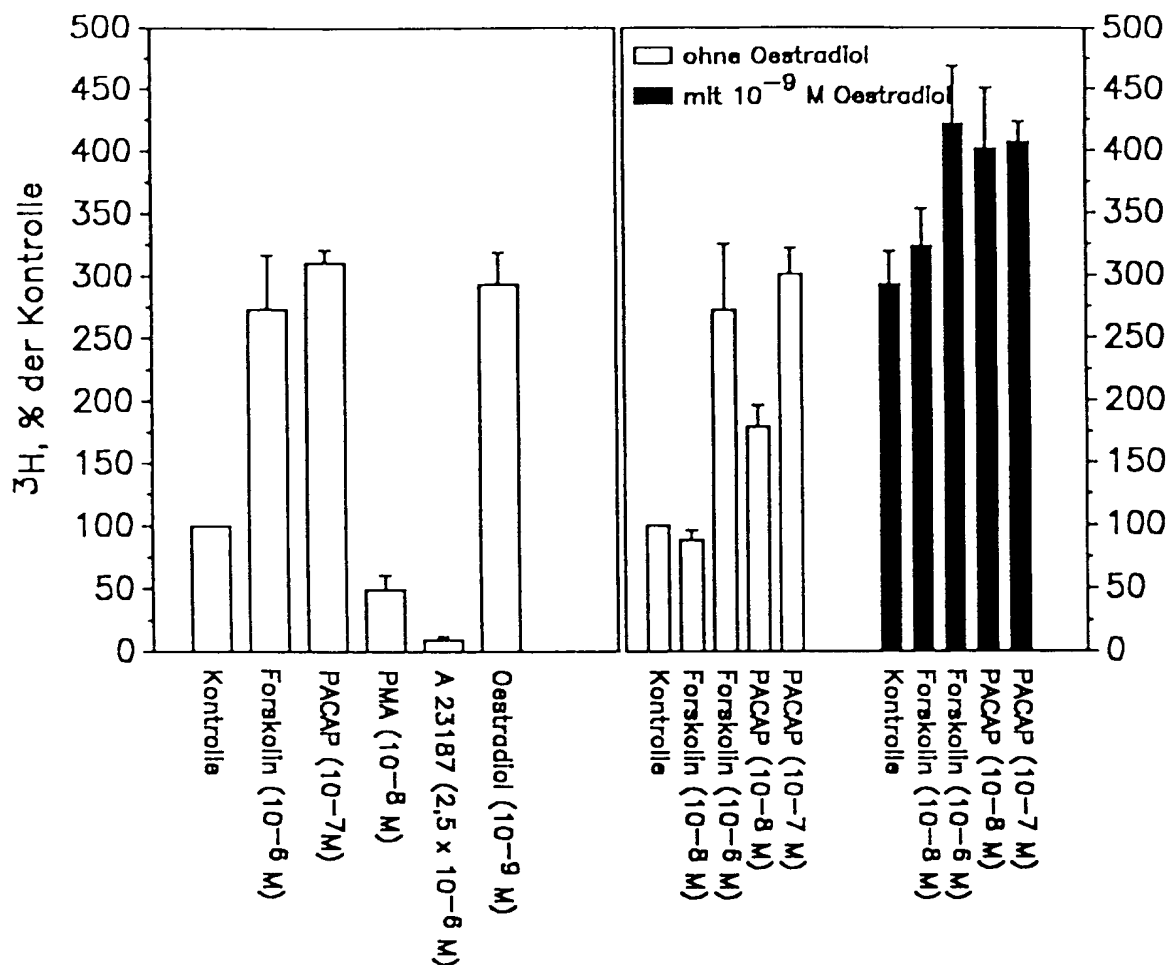


Abbildung 8: Einfluß von PACAP und Forskolin, auch von PMA und A23187 auf die Vermehrung der α T3-1-Zellen.

(a), links: Die Zellen wurden in phenolrotfreiem DMEM unter Zusatz von 10% steroidfreiem Serum gehalten, dargestellt ist der Tritiumgehalt der Kulturen als Mittelwerte dreier Experimente (mit je drei Beobachtungen), die auf den Wert der Kontrollen (=100%) bezogen worden sind. Der Gehalt an ^3H war signifikant erhöht nach Stimulation durch die dargestellten Konzentrationen von PACAP und Forskolin ($p < 0,001$ für PACAP, $p < 0,01$ für Forskolin im t-Test) und unter Östradioleinfluß (Positivkontrolle, $p < 0,001$). PMA (+ 1% Ethanol) und A23187 (+ 0,4% DMSO) senkten die gemessene Radioaktivität dosisabhängig erheblich (in den angegebenen Konzentrationen mit $p < 0,01$ für PMA und $p < 0,001$ für A23187).

(b), rechts: Die Versuche wurden mit Konzentrationsreihen der genannten Substanzen und mit und ohne Zusatz von 10^{-9} M Östradiol ausgeführt. Hier sind die für PACAP und Forskolin erhobenen Daten auszugsweise dargestellt, gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei (Forskolin) oder acht (PACAP) Experimenten in Prozenten der Kontrollwerte. Für PACAP war eine Steigerung des Zellwachstums durch eine Zugabe von mindestens 10^{-9} M an statistisch nachweisbar ($p < 0,02$, nicht abgebildet), mit 10^{-8} M PACAP war der Einfluß hochsignifikant ($p < 0,001$) ohne Östradiolzusatz, signifikant ($p < 0,05$), wenn gleichzeitig 10^{-9} M Östradiol zugesetzt wurden. Der Einfluß von 10^{-7} M PACAP war entsprechend hochsignifikant oder sehr signifikant ($p < 0,02$). Forskolin dagegen hob den ^3H -Gehalt der Kulturen erst dann signifikant an, wenn es in einer Konzentration von 10^{-6} M verwendet wurde ($p < 0,001$ ohne E_2 , $p < 0,05$ mit E_2).

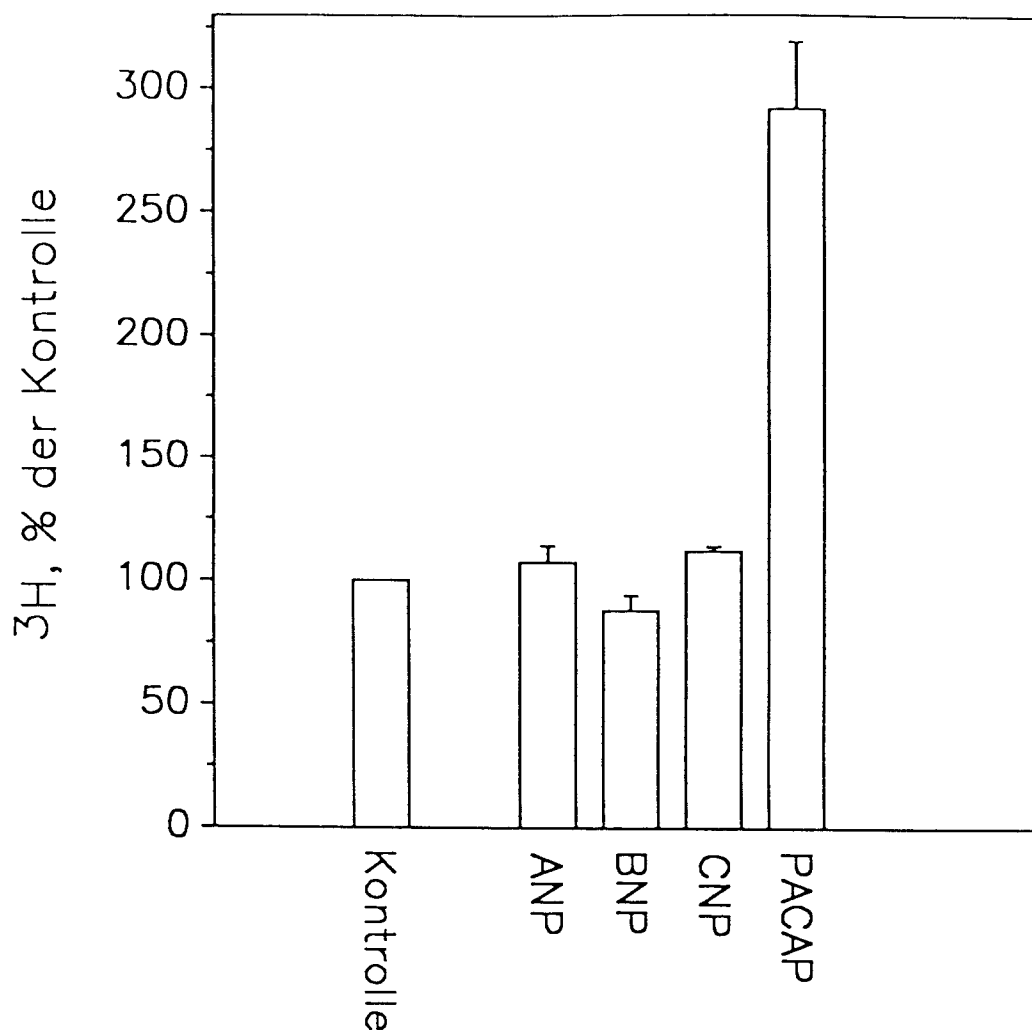


Abbildung 9: Einfluß der natriuretischen Peptide auf die Thymidininkorporation der Zellkulturen.

Die Zellen wurden in phenolrotfreiem DMEM unter Zusatz von 10% steroidfreien Serums gehalten, am vierten Tag wurde den Kulturen [^3H]TdR angeboten (0,125 μCi /Kultur). PACAP38 diente als Positivkontrolle (Stimulation mit $p < 0,001$ im t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei Experimenten (mit je drei Beobachtungen), die auf den Wert der Kontrollen (=100%) bezogen worden sind. Einzig das Natriuretische Peptid vom Typ C hob das Zellwachstum erkennbar an ($p < 0,05$).

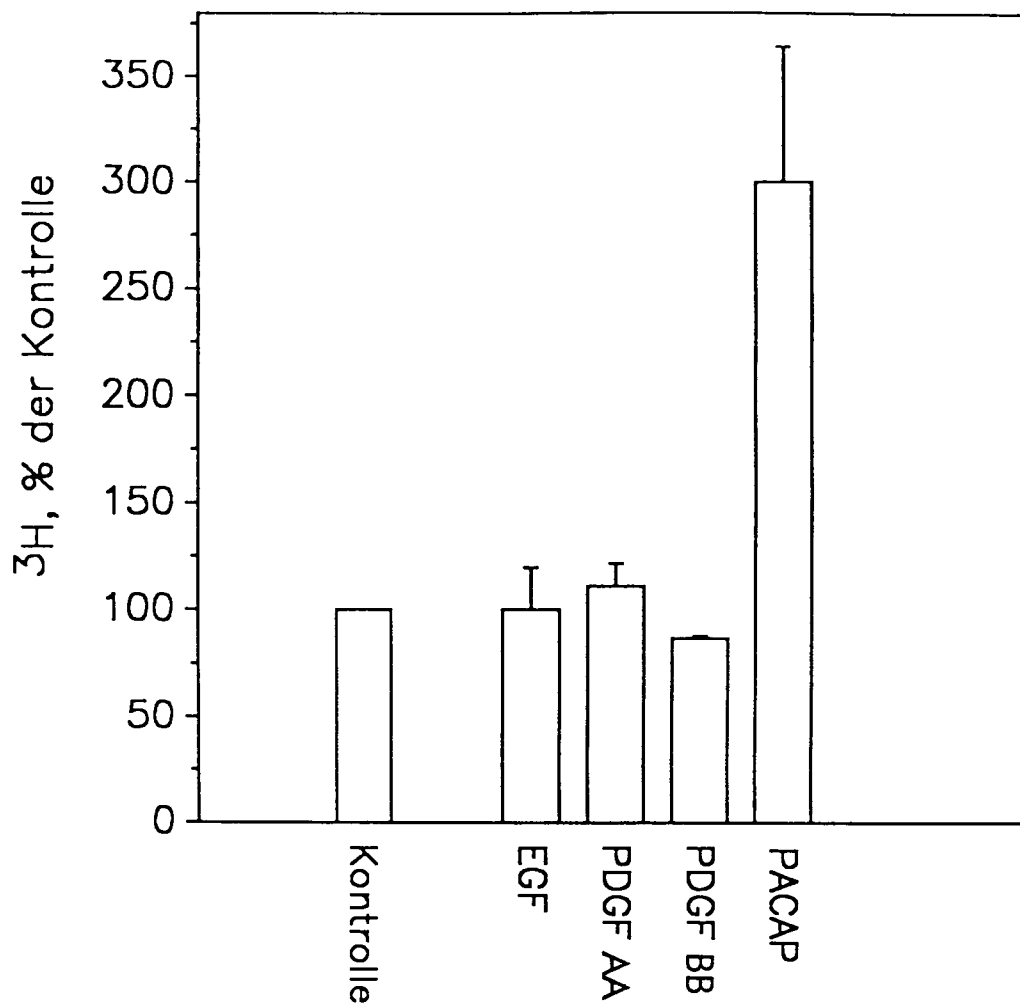


Abbildung 10: Einfluß von EGF, PDGF AA und PDGF BB auf die Thymidininkorporation der $\alpha\text{T3-1}$ -Zellkulturen.

Für Versuchsbedingungen und Darstellung gelten die unter Abbildung 9 gemachten Ausführungen. Der Effekt von 10^{-7} M PACAP ist mit $p < 0,05$ im t-Test signifikant, PDGF BB senkte den Tritiumgehalt der Kulturen ($p < 0,01$).

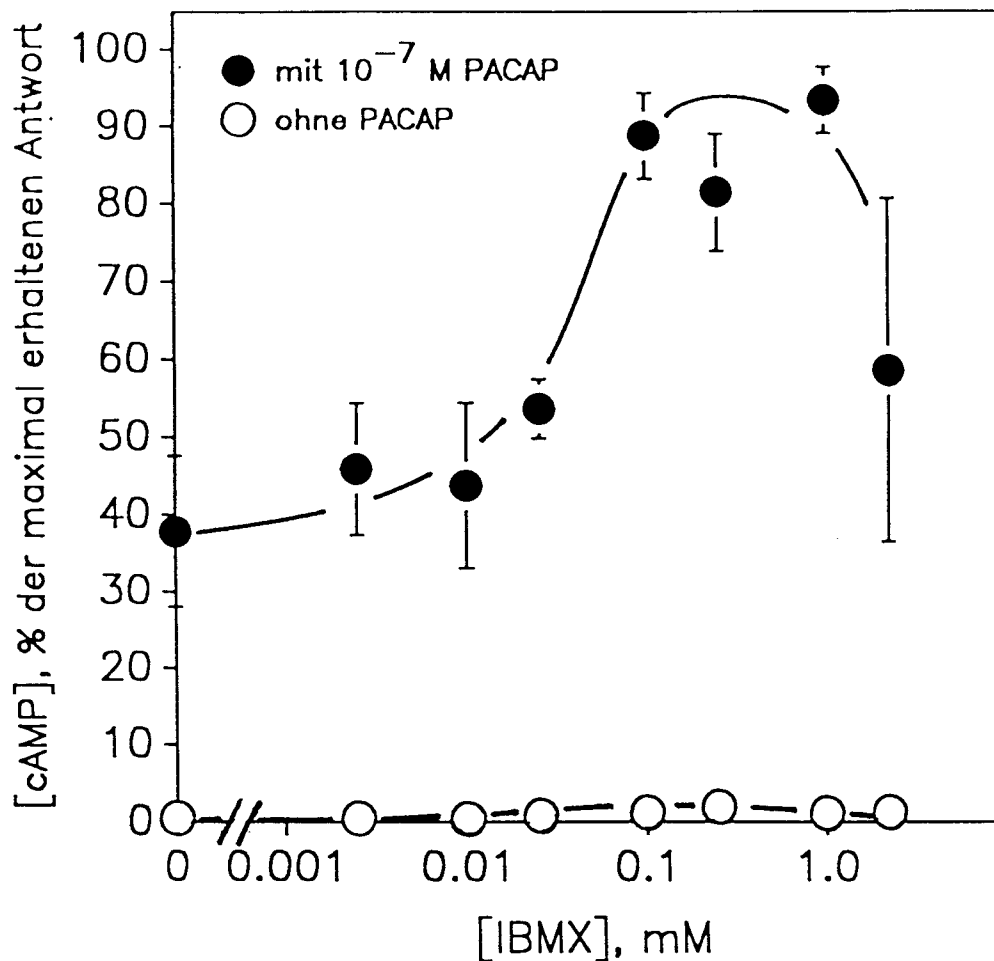


Abbildung 11: Einwirkung der IBMX-Konzentration im Inkubationsmedium auf die radioimmunologisch gemessenen cAMP-Werte.

Die Zellen wurden 90 min lang in BSS/BSA auf 24er-Mikrotiterplatten inkubiert (37 °C) und während dieser Zeit entweder mit oder ohne Stimulation durch PACAP38 den angegebenen Konzentrationen von IBMX ausgesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler aus drei Experimenten, die auf die jeweils höchste erhaltene cAMP-Konzentration eines Experimentes bezogen worden sind. Die Stimulation durch PACAP führte zu erhöhten cAMP-Spiegeln ohne und mit allen Konzentrationen von IBMX ($p < 0,001$); Dosierungen zwischen 0,1 mM und 1,0 mM IBMX ließen die Menge des kumulierten cAMPs gegenüber alleiniger Gabe von PACAP nochmals sehr signifikant ansteigen ($p < 0,01$).

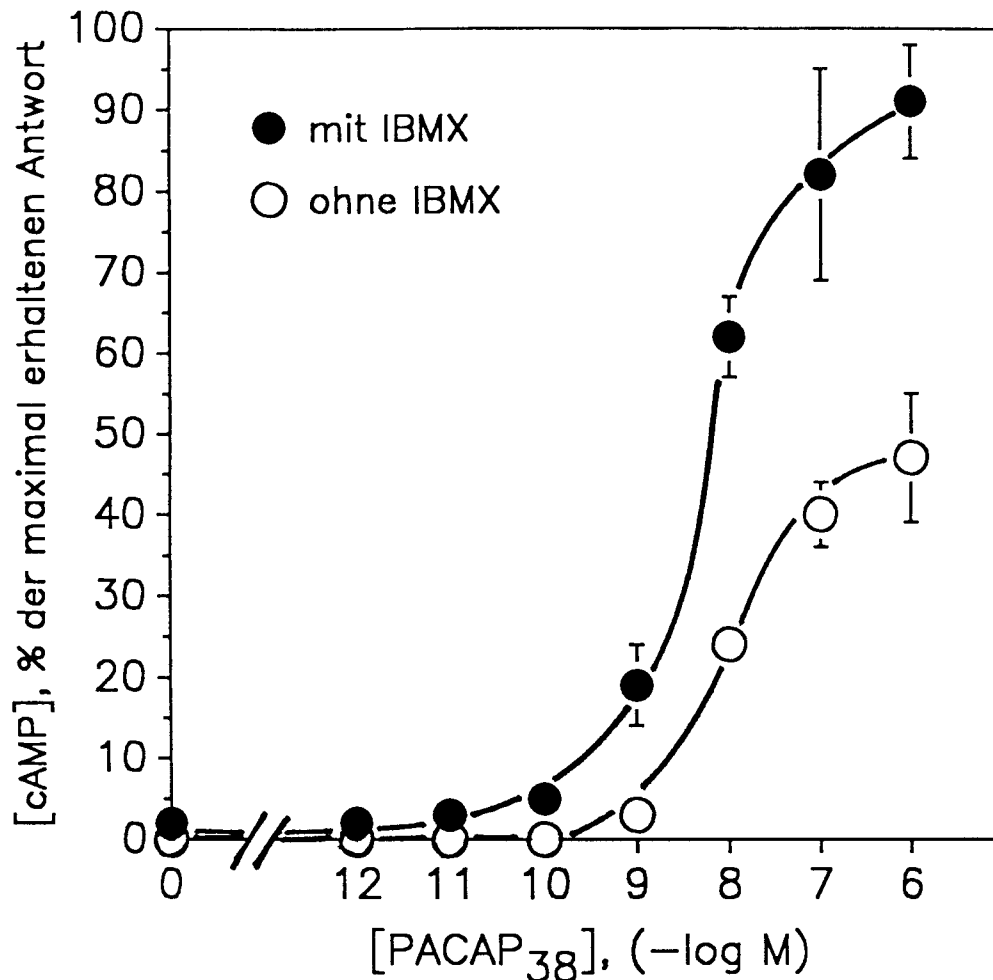


Abbildung 12: Einfluß von IBMX auf die gemessenen cAMP-Konzentrationen nach Stimulation der α T3-1-Zellen durch unterschiedliche Dosen von PACAP38.

Die Zellen wurden unter den üblichen Bedingungen in BSS/BSA mit und ohne 0,25 mM IBMX durch die angegebenen Konzentrationen von PACAP stimuliert (90 min). Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler dreier unabhängiger Experimente, die auf die jeweils höchste gemessene Konzentration von cAMP (=100%, gemessen mit 10^{-7} oder 10^{-6} M PACAP + IBMX) bezogen worden sind. Die gemessenen cAMP-Spiegel sind in allen Gruppen signifikant höher, wenn IBMX zugesetzt wurde. Verglichen mit den Kontrollen waren die cAMP-Spiegel sowohl mit als auch ohne IBMX signifikant erhöht, wenn mindestens 10^{-9} M PACAP eingesetzt wurden (mit IBMX $p < 0,05$, für 10^{-8} M PACAP $p < 0,01$; ohne IBMX $p < 0,01$, ab 10^{-8} M PACAP $p < 0,001$ im t-Test).

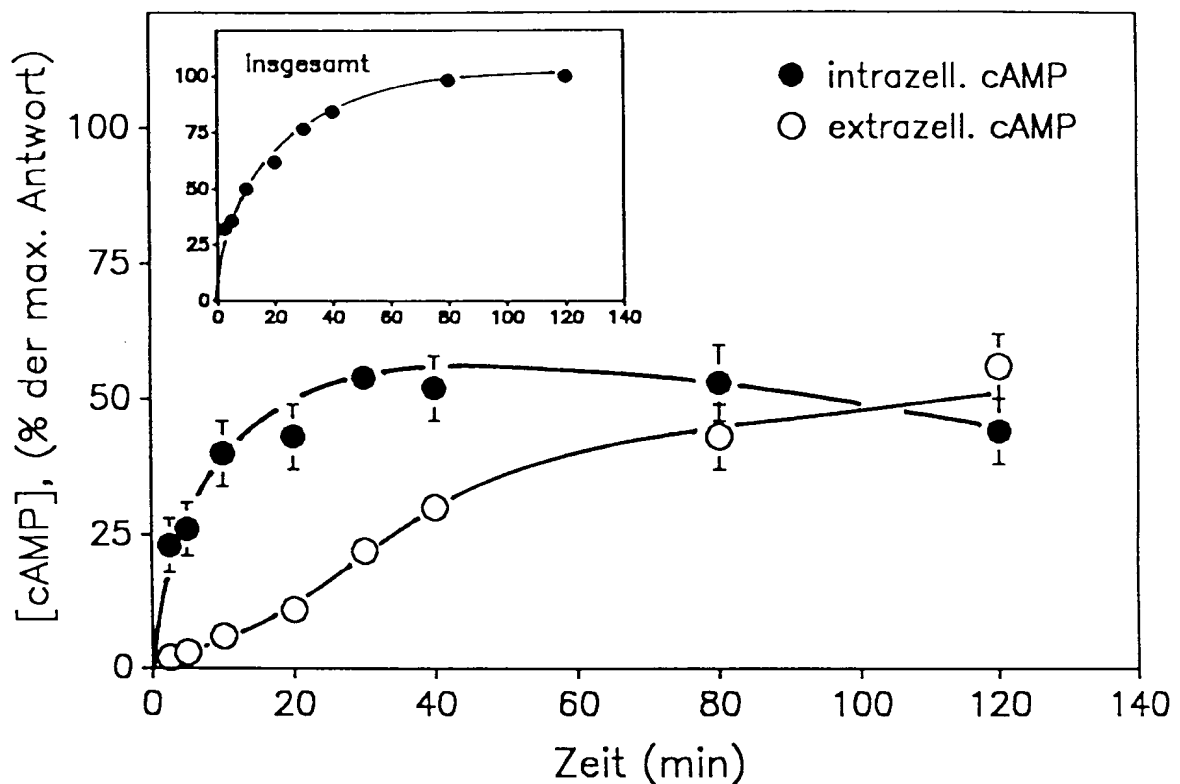


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der cAMP-Anreicherung nach Stimulation mit 10^{-6} M PACAP.

Zur Erfassung des intra- und extrazellulären cAMP-Gehaltes wurden die Zellen behandelt, wie in »Material und Methoden« beschrieben; die Dauer der Inkubationsperioden ist angezeigt. Der Gesamtgehalt an cAMP wurde durch Addition errechnet. Die Graphik zeigt Mittelwerte und Standardfehler aus drei Experimenten, die Daten sind auf den maximal gemessenen cAMP-Gesamtgehalt (=100%) bezogen. Dieser betrug 55-1100 pmol cAMP/Kultur.

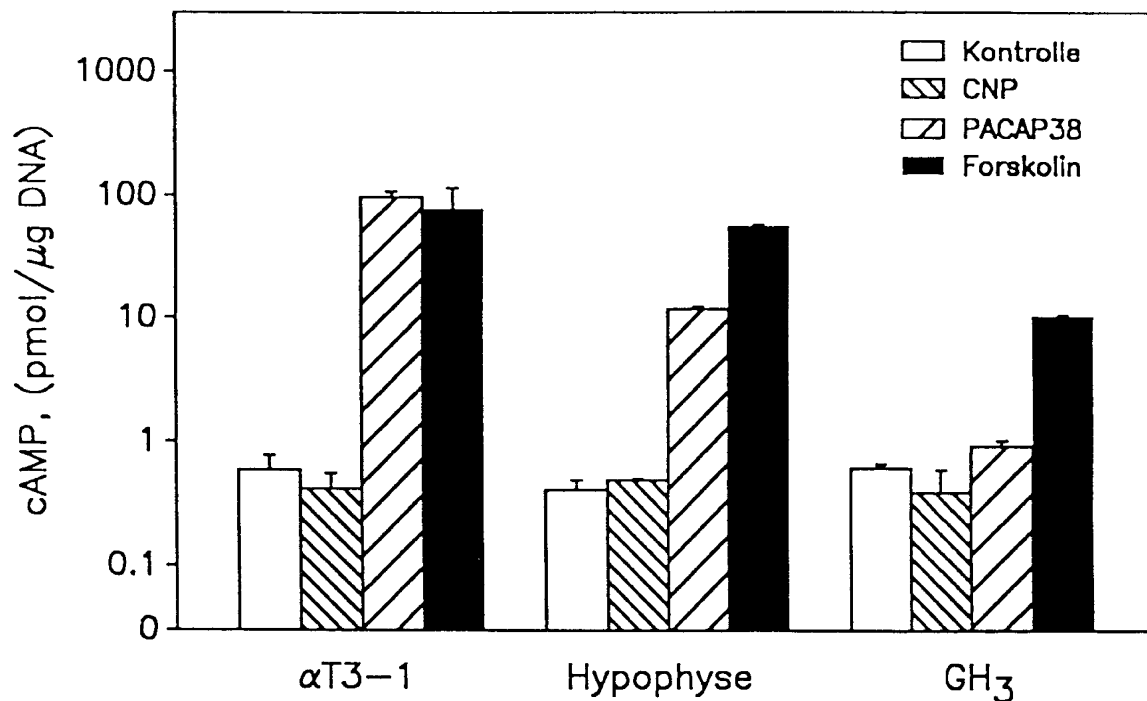


Abbildung 14: Einfluß von PACAP38 und Forskolin auf die cAMP-Anreicherung in unterschiedlichen *in vitro*-Systemen von Hypophysenzellen.

Die α T3-1-Zellen, die Primärkulturzellen aus Rattenhypophysen sowie die GH₃-Zellen wurden auf 24er-Mikrotiterplatten gehalten und über 45 min in BSS/BSA (mit 0,25 mM IBMX) mit 10^{-7} M PACAP38, 10^{-5} M Forskolin oder 10^{-6} M CNP stimuliert, die Kontrollen blieben ohne Zusatz. Die Graphik zeigt Mittelwerte und Standardfehler (n=3) eines einzelnen, repräsentativen Experimentes. Der cAMP-Gehalt ist auf den DNA-Gehalt in den Kulturen bezogen, die Skala der Ordinate logarithmisch.

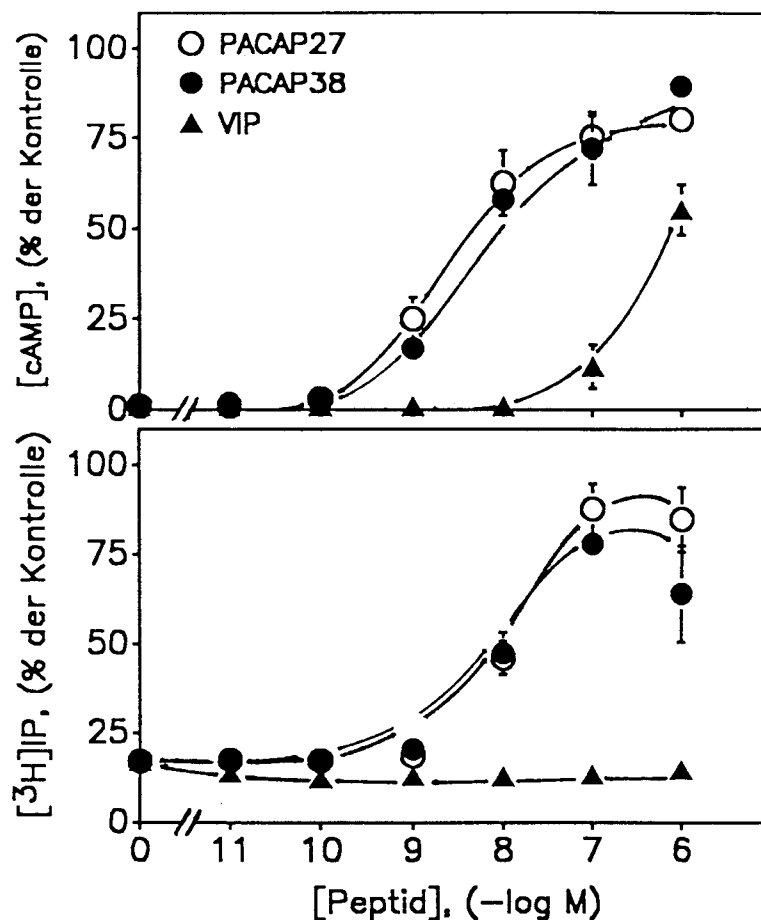


Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Beziehung für den Einfluß von PACAP27, PACAP38 und VIP auf die Bildung von cAMP und [³H]IP in α T3-1-Zellen.

Die Zellen wurden wie unter »Material und Methoden« (s. S. 21f.) beschrieben behandelt und mit den angegebenen Konzentrationen der Peptide 45 min lang stimuliert. Diese kürzere als aus Abbildung 13 abzuleitende Inkubationszeit wurde gewählt, um die Dauer der cAMP-Akkumulation mit derjenigen für die Anreicherung von [³H]IP in Einklang zu bringen. Für die cAMP-Messungen waren dem Medium 0,25 mM IBMX, für die [³H]IP-Bestimmung 5 mM LiCl hinzugefügt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse aus drei (IP) bis sechs (cAMP) Experimenten, die auf die jeweils höchste gemessene Konzentration der *Second messenger* (=100%) bezogen sind (diese ergaben sich mit 10^{-7} - 10^{-6} M PACAP und lagen zwischen 640-1640 pmol cAMP/Kultur oder 11370-16490 counts per minute (cpm)/Kultur für die [³H]IP-Messungen). Die cAMP-Akkumulation war durch beide PACAP-Varianten in Konzentrationen von mindestens 10^{-9} M an signifikant stimuliert, durch VIP in einer Dosierung von wenigstens 10^{-7} M ($p < 0,05$ im t-Test).

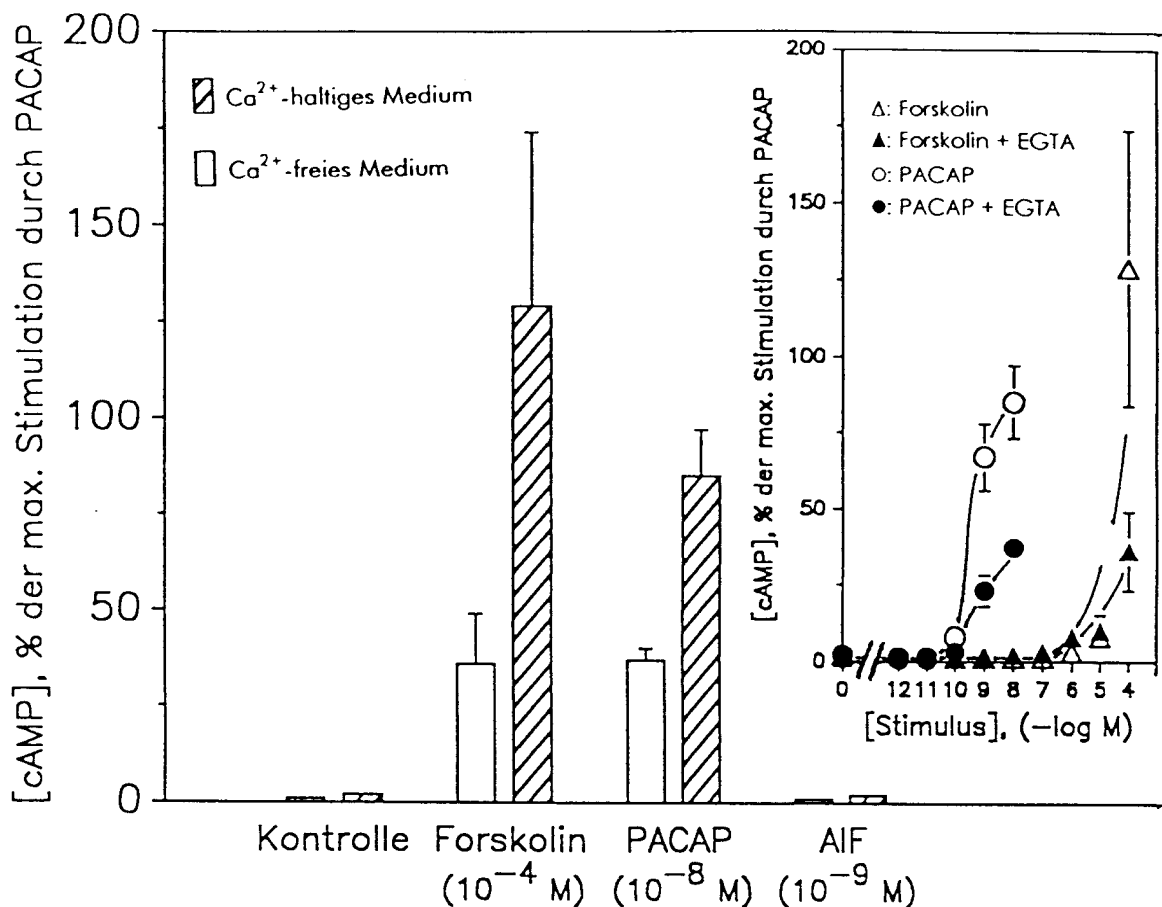


Abbildung 16: Einfluß von Kalzium auf die Synthese von cAMP an stimulierten α T3-1-Zellen.

Die Zellen wurden in BSS/BSA (0,25 mM IBMX) 60 min lang mit den angegebenen Konzentrationen von PACAP, Forskolin und Aluminiumfluorid (AlF_3) stimuliert, der Salzlösung war für die Inkubation ohne Ca^{2+} EGTA zugesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. In kalziumhaltigem Inkubationsmedium stimulierten Forskolin und PACAP die cAMP-Synthese signifikant (für 10^{-9} M PACAP $p < 0,01$, für 10^{-8} M PACAP $p < 0,001$, für 10^{-4} M Forskolin $p < 0,05$ im t-Test), in Anwesenheit von EGTA war die Stimulation durch PACAP immer noch von 10^{-9} M an signifikant ($p < 0,05$), für Forskolin war sie es im t-Test wegen der größeren Abweichung vom Mittelwert nicht mehr (bei aber auch hier signifikanter Differenz der Mittelwerte in der Varianzanalyse). In der rechts oben eingefügten Graphik ist die in diesem Experiment untersuchte Dosis-Wirkungskurve für PACAP38 und Forskolin zu sehen. Aluminiumfluorid stimuliert unter den gegebenen Versuchsbedingungen die cAMP-Synthese nicht.

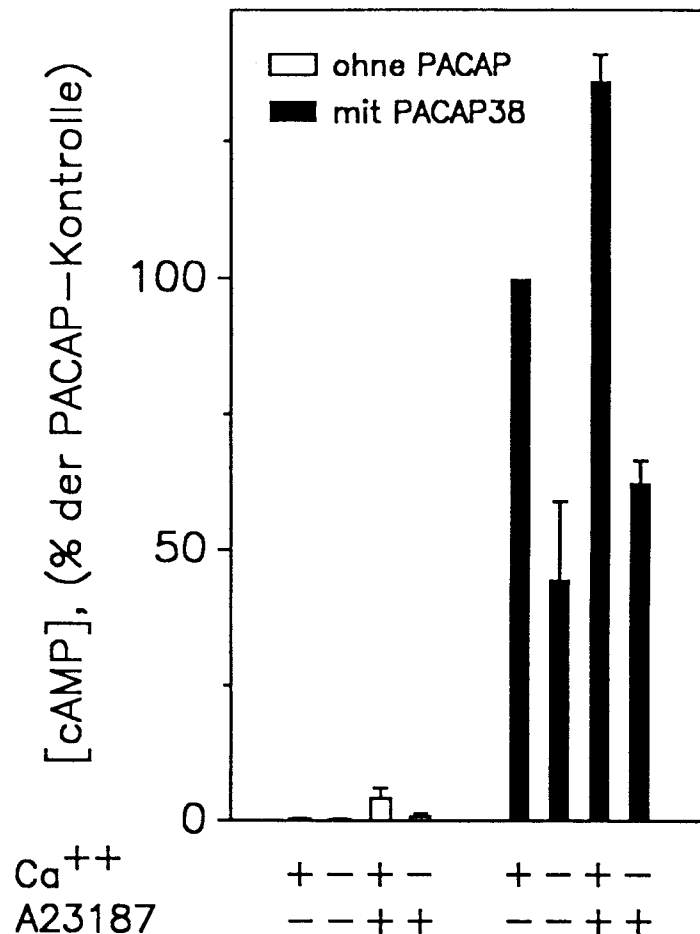


Abbildung 17: Kalziumabhängigkeit der PACAP38-stimulierten cAMP-Anreicherung.

Die α T3-1-Zellen wurden 60 min in BSS/BSA (mit 1,5 mM CaCl_2 darin) oder in Ca^{2+} -freier BSS/BSA (der 2,5 mM EGTA zugesetzt waren), jeweils sowohl mit als auch ohne $2,5 \cdot 10^{-6}$ M A23187, inkubiert. Währenddessen blieben sie ohne weiteren Stimulus (Kontrollen), oder es wurden ihnen 10^{-7} M PACAP hinzugefügt. Wurden Ca^{2+} -freies Medium oder die Kalziumionophore benutzt, so galt dies auch während der Vorinkubation (10 min). Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler dreier Experimente, die auf die Inkubation mit PACAP38 in gewöhnlichem Medium (=100%) als interne Kontrolle bezogen sind (hier wurden 435-590 pmol cAMP/Kultur gemessen). Die Verstärkung der cAMP-Anreicherung unter Einfluß der Ionophore und die verminderte Bildung von cAMP in kalziumfreiem Medium (mit und ohne A23187) waren im t-Test mit $p < 0,05$ signifikant.

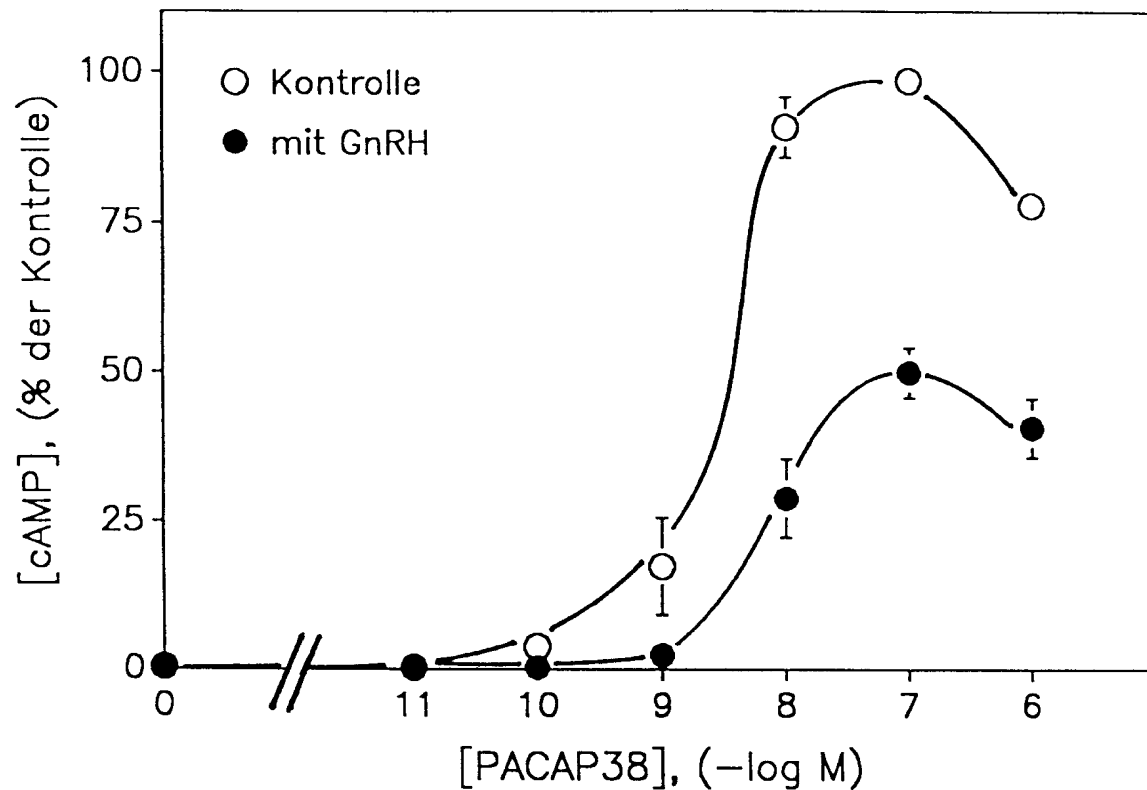


Abbildung 18: GnRH senkt die unter PACAP-Stimulation erzielte cAMP-Synthese.

Die α T3-1-Zellen wurden wie üblich 60 min in BSS/BSA (mit 0,25 mM IBMX) durch die angegebenen PACAP-Konzentrationen stimuliert; dies geschah jeweils ohne oder mit 10^{-7} M GnRH. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardfehler aus vier Experimenten (mit je drei Beobachtungen), die Daten sind auf die jeweils höchste gemessene cAMP-Konzentration (=100%) bezogen (gemessen mit 10^{-8} - 10^{-6} M PACAP ohne GnRH-Zusatz, cAMP-Gehalt 375-635 pmol/Kultur). Der hemmende Einfluß des Releasinghormones war bei allen PACAP-Dosen von mindestens 10^{-10} M an statistisch signifikant ($p < 0,05$ im t-Test).

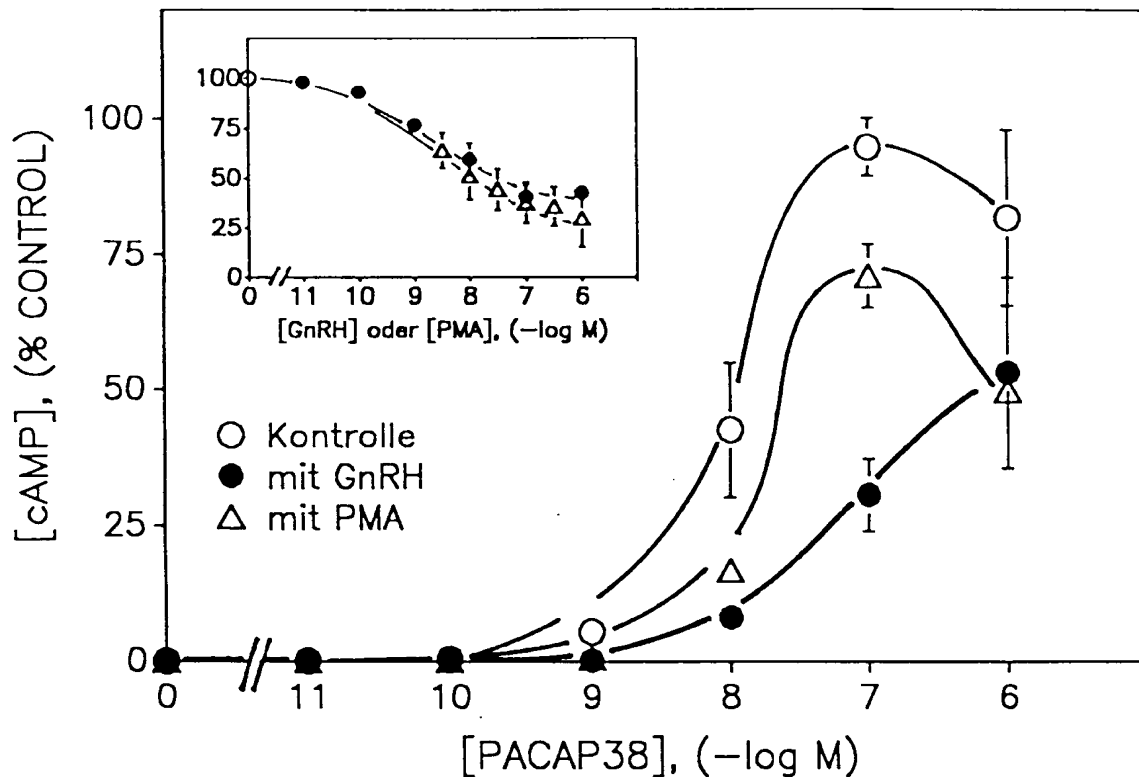


Abbildung 19: GnRH und PMA senken die unter PACAP-Stimulation erzielte cAMP-Synthese.

Die α T3-1-Zellen wurden wie unter Abbildung 18 beschrieben behandelt, neben dem Einfluß von GnRH aber wurde nun auch derjenige von PMA untersucht. In der kleinen Graphik oben links sind die Ergebnisse einer Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von GnRH oder PMA und 10^{-8} M PACAP38 wiedergegeben. Der hemmende Einfluß beider Proteinkinase C-Aktivatoren war hier in Konzentrationen oberhalb von 10^{-9} M statistisch signifikant ($p < 0,05$ im t-Test). Beide Graphiken zeigen Mittelwerte und Standardfehler aus jeweils drei Experimenten, die auf den je größten erhaltenen cAMP-Spiegel (=100%) bezogen sind.

IV. DISKUSSION

Alle Forschungen auf dem Gebiet der biochemischen Vorgänge in der Hypophyse stehen vor der Schwierigkeit, daß unselektierte Zellpräparationen aus den Hypophysen von Versuchstieren stets ein Gemisch der vielen unterschiedlichen in der Hypophyse vorkommenden Zelltypen sind. Diese Tatsache macht es unmöglich, beobachtete Effekte etwa nach einer hormonellen Stimulation der Kulturen auf direkte Wirkungen auf den reagierender Zelltyp zurückzuführen, da alle Einflüsse erst im Sinne einer parakrinen Regulation unter Vermittlung anderer Zelltypen entstanden sein könnten. Diese Sichtweise gewinnt noch an Bedeutung dadurch, daß ja bisher nicht für alle morphologisch in der Hypophyse beobachteten Zellarten Funktionen bekannt sind und diese somit gerade im Bereich einer entsprechenden Steuerung liegen könnten. Abgesehen von den bedeutungsvollen Vorteilen, die klonierte Zelllinien in Bezug auf die mögliche erhebliche Verminderung der Anzahl von Versuchstieren ergeben, eröffnen sie die Möglichkeit, mit direkten Einflüssen auf eine bestimmte Zellart, auf homogene Zellpopulationen, zu experimentieren. Später allerdings werden die so ermittelten Ergebnisse wohl an komplexeren Modellen - und gegebenenfalls *in vivo* - auf ihre physiologische Relevanz eben im Zusammenspiel der Zellen mit ihrer natürlichen Umgebung, geprüft werden müssen. Die α T3-1-Zellen scheinen als Modellsystem zur Erforschung der Biochemie gonadotroper Zellen in diesem Sinne gut geeignet.

Vergleicht man die in der Abbildung 2 dargestellten Daten zur DNA-Synthese beziehungsweise [3 H]Thymidininkorporation in den α T3-1-Zellkulturen, so ist zu beachten, daß es sich bei der im [3 H]TdR/DNA-Index dargestellten Stimulation durch Östradiol leicht verständlich um eine echte Proliferation handeln wird, während sich dies anhand der einfachen [3 H]TdR- oder DNA-Bestimmungen nicht sicher sagen ließe: Hier werden die Ergebnisse durchaus von Faktoren wie einer Verbesserung der Haftfähigkeit der Zellen an den Kulturgefäßen oder einer Senkung der Zellmortalität beeinflußt, Substanzen, die durch solche Wirkungen den Zellverlust verringern, können auch ohne Steigerung der Proliferation zu im Vergleich mit den Kontrollen erhöhten

Werten führen und hierdurch eine solche vortäuschen. Deshalb ist in dieser Arbeit lediglich von vermehrter [³H]TdR-Inkorporation oder DNA die Rede, wenn eine wirkliche Proliferation nicht nachgewiesen wurde, - jedoch nicht nur dann. Der Anteil abgestorbener Zellen wurde nicht erfaßt. Wie bereits unter »Experimente zu den Erfordernissen der Zellkultur...« (S. 24) erwähnt, wurden jedoch alle Kulturen vor Beendigung der Versuche mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich in allen Fällen einer beschriebenen deutlichen Stimulation auf [³H]TdR-Inkorporation oder DNA-Vermehrung eine offensichtliche Proliferation.

Nachdem feststand, daß sowohl DNA-Messungen als auch ³H-Thymidinbestimmungen geeignet waren, ein erhöhte Aktivität der α T3-1-Zellkulturen - in der Regel am vierten Kulturtag - nachzuweisen, konnten Dosis-Wirkungsstudien zum Einfluß von Steroiden auf die Vermehrung der Zellen durchgeführt werden. Daß Steroidhormone einen Einfluß auf Hypophysenzellen haben und unter anderem die Gonadotropinsynthese erhöhen, ist seit langem bekannt [41-49]. Bisher jedoch war keine Klärung der Frage möglich, ob diese Wirkungen direkt auf gonadotrope Zellen ausgeübt werden können. So dienten die Versuche zum Einfluß von Östradiol, Progesteron, Testosteron und Kortikosteroiden auf das Wachstum von α T3-1-Zellkulturen dem Nachweis einer direkten Einwirkung der Steroide auf gonadotropstämmige Zellen. Zu einer vermehrten [³H]Thymidininkorporation kam es durch alle vier erwähnten Substanzen, jedoch zeigte sich Östradiol hierin als bei weitem am wirkungsvollsten. Die mit etwa 10^{-11} M niedrig liegende ED₅₀ einer Wachstumsstimulation durch das Östrogen und die Blockade des Effektes durch Keoxifen (als spezifischem Östrogenrezeptor-Antagonisten) lassen - auch in Verbindung mit einem erst nach Tagen maximalen hemmenden Einfluß des Steroids auf GnRH-Rezeptoren [50] - vermuten, daß dieser Einfluß über nukleäre Östradiolrezeptoren vermittelt wird. Keoxifen zeigte auch dann einen hemmenden Einfluß auf die Thymidininkorporation der Zellen, wenn dem mittels Adsorption an Aktivkohle im Steroidgehalt reduzierten Serum kein Östradiol hinzugesetzt wurde. Hier lag die ED₅₀ mit etwa 10^{-9} M sogar niedriger als unter Steroidzusatz (ED₅₀ 10^{-8} M). Vermutlich enthalten auch die mit der beschriebenen Methode behandelten und landläufig als »steroidfrei« bezeichneten Sera noch geringe Konzentrationen von Steroiden - auch Östradiol. Der Östradiolgehalt liegt jedoch nachweislich unter 10^{-11} M (MCARDLE, mündlich). Somit wäre aber vorstellbar, daß die Wirkungen dieser geringen Menge des Steroids durch niedrige Konzentrationen von Keoxifen

effektiv inhibiert würden. Dem entspräche natürlich, daß die hier dargestellten Östradiolwirkungen noch gar nicht die volle Größe dessen Einflusses auf die Zellen offenbarten. Neben der bereits erwähnten Senkung der Zahl von GnRH-Rezeptoren unter Östradioleinfluß konnten MCARDLE UND POCH gleichzeitig eine durch Östradiol erhöhte ED₅₀ für die Wirkungen des Releasinghormons auf die [³H]IP-Akkumulation in α T3-1-Zellen nachweisen [50]. 1996 zeigten COLIN ET AL. an Primärzellkulturen aus Rattenhypophysen, daß ein anhaltender Östrogeneinfluß die Basisaktivität des *Promotors* für die α -Untereinheit der Gonadotropine herabsetzt, während er deren Ansprechbarkeit auf GnRH stark erhöht [51]. Die von ihnen beobachteten Effekte lassen zeitlich auf Östrogenrezeptor-gesteuerte Veränderungen der Genexpression schließen, denkbar wäre etwa eine durch Östradiol induzierte Synthese eines Enzyms, welches dann die Reagibilität der Zelle für GnRH verändert. Mutmaßen ließe sich, daß hier auch eine mögliche Schnittstelle zur beschriebenen Inhibition der Proliferation der Zellen durch GnRH liegen könne.

Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß für die Erforschung der Wirkungen von GnRH oft eine Pulsatilität der Stimulation von Bedeutung ist, ein Umstand, dem unter Versuchsbedingungen wie den hier beschriebenen nicht Rechnung getragen wird.

Eine Stimulation des Kulturwachstums ließ sich auch durch einen Zusatz von GnRH zum Medium nachweisen. Diese war jedoch - bezogen auf diejenige unter Östradioleinfluß - vergleichsweise geringfügig und nicht mehr nachweisbar, wenn die Wachstumsbedingungen bereits durch den Zusatz von 10% Serum verbessert worden waren. Darüber hinaus ließ sich dieser Einfluß erst nach einer längeren Kulturdauer von fünf bis sechs Tagen nachweisen.

Bereits am vierten Versuchstag jedoch zeigte sich die beschriebene GnRH-induzierte Reduktion des Östrogeneffektes auf das Wachstum der α T3-1-Zellkulturen. Es gibt eine Reihe von Studien, in denen nachgewiesen wurde, daß bei Behandlung mit GnRH oder GnRH-Analoga die Zahl von Östrogenrezeptoren auf untersuchtem Zellmaterial steigt [52]. So wäre vielleicht eher eine Steigerung der trophischen Steroidwirkung zu erwarten gewesen. Es gibt jedoch seit Jahren auch Hinweise auf direkte antitumoröse Wirkungen von GnRH-Agonisten auf Mammakarzinomzellen [53], und vermutlich sind solche direkten Einflüsse auch an den

partiellen Erfolgen von GnRH-Analoga in der Krebstherapie beteiligt. NERI ET AL. beschrieben den - bereits bekannten - direkten antiöstrogenen Effekt eines agonistischen GnRH-Analogons ([D-Trp⁶]GnRH) auf die Proliferation Östrogenrezeptor-positiver Mammakarzinomzellen (MCF-7-Zellen) näher, sie konnten nachweisen, daß die wachstumshemmende Wirkung des GnRH-Agonisten sich von der Wirkungsweise des klassischen Antiöstrogens Tamoxifen auf den intrazellulären Stoffwechsel unterscheidet [54]. Offen bleibt aber bisher die Frage, wie der GnRH-Effekt vermittelt wird, durch welchen intrazellulären Mechanismus also der Einfluß des Steroidhormons inhibiert wird.

Tamoxifen erwies sich in jenen Untersuchungen als deutlich potenter. NERI ET AL. fanden eine komplette Blockade der Wachstumsstimulation durch Östradiol an MCF-7-Zellen bei einem Verhältnis der Konzentrationen von E₂:Tamoxifen von 1:100. Dasselbe Verhältnis der Stoffkonzentrationen genügte auch für den maximalen inhibitorischen Effekt des benutzten GnRH-Agonisten, jedoch kam es so nur zu einer Abnahme des Zellwachstums [55]. Der dem Östradiol gegenüber bestehende Antagonismus von GnRH zeigte sich am Wachstum der α T3-1-Zellen dagegen erst bei einem Konzentrationsverhältnis der beiden Stoffe von 1:10⁴ (bei gleicher E₂-Konzentration, 10⁻¹¹ M). Dies mag an einer unterschiedlichen Sensibilität der beiden Zelllinien für die genannten Stoffe liegen, an Strukturunterschieden zwischen GnRH und seinem von NERI ET AL. benutzten Agonisten, schließlich möglicherweise auch an der Tatsache, daß sie die Zellen einen Tag länger inkubiert haben. So brauchte ja beispielsweise die in Abb. 5 beschriebene Wachstumsstimulation der α T3-1-Zellkulturen durch GnRH auch 5-6 Tage, um sich zu entwickeln.

Erst kürzlich veröffentlichten KAKAR ET AL. Experimente, in denen sie ebenfalls an α T3-1-Zellen unter GnRH eine Inhibition des Wachstums der Kulturen beobachtet hatten [56]. Der von ihnen beschriebene Effekt entspricht teilweise den hier gezeigten Ergebnissen: Unter Einfluß von 10⁻⁶ M GnRH maßen auch sie durch [³H]Thymidininkorporation - bei einer kürzeren Versuchsdauer von maximal drei Tagen - eine Reduktion des Wachstums um 30%. Zellzählungen mittels Hämozytometer ließen nach Ausschluß einer erhöhten Zellmortalität auf eine Senkung der Proliferationsrate schließen. Die Kulturbedingungen waren ähnlich, während KAKAR ET AL. dem Medium normales Serum zusetzten, wurden die von mir

beschriebenen Versuche mit steroidfreien Sera und kontrollierter Zugabe von Östradiol durchgeführt. Der Effekt war zeit- und dosisabhängig, wobei ein geringer Einfluß bereits nach Inkubation der Zellen mit 10^{-9} M (D-Lys⁶)GnRH über acht Stunden zu messen war (davon vier Stunden [³H]Thymidin-inkubiert, Inhibition 16,2%). Mit der verminderten Proliferationsrate ging eine *Down*-Regulation der GnRH-Rezeptor-mRNA einher, so daß die bereits bekannte Abnahme der GnRH-Rezeptorenzahl unter Einwirkung von GnRH-Agonisten zumindest teilweise auf eine Verringerung der Transkription zurückzuführen zu sein scheint (alternativ käme eine verringerte Stabilität der mRNA in Betracht).

Für Substanzen, die im Rahmen der durchgeführten Suchtests nicht zu erkennbaren trophischen Effekten geführt haben, obwohl aus anderen Arbeiten eine direkte Wirkung auf gonadotrope Zellen abzuleiten ist, ist naturgemäß nicht ausgeschlossen, daß sie in anderer Weise auf gonadotrope Zellen wirken - oder an Gonadotropen etwa in Primärzellkulturen auch zu einem vermehrten Wachstum führen würden. Auf Grund der gezielten Tumorgenese in der Entstehung der α T3-1-Zellen mit Hilfe des SV40-T-Antigens, der Tatsache also, daß es sich um Tumorzellen mit verändertem Proliferationsverhalten handelt, lassen sich über entsprechende Effekte dieser Substanzen etwa auf ruhende Gonadotropen keinerlei Aussagen machen (vgl. außerdem S. 53f.).

Was den stark inhibitorischen Einfluß des Phorbolesters PMA und der Kalziumionophore A23187 auf die [³H]Thymidininkorporation der Zellen betrifft, so läßt sich aus den durchgeführten Konzentrations-Wirkungs-Studien nicht ableiten, ob es sich um einen physiologischen Effekt oder um eine toxische Wirkung handelte. Aufschluß hierüber hätte vielleicht der Versuch einer kombinierten Stimulation mit beiden Stoffen geben können, denn auf diese Weise läßt sich mitunter die DNA-Synthese initiieren [4]. Ein toxischer Einfluß der Begleitsubstanzen EtOH und DMSO ist ausgeschlossen, da es für die maximal in den Kulturen auftretenden Konzentrationen dieser beiden Stoffe Kontrollen gab, deren Werte mit den übrigen Kontrollkulturen übereinstimmten. Erheblich gesteigert war der Einbau markierten Thymidins in zelluläres Material nach Stimulation mit *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide* und Forskolin. Dabei ist das zuerst genannte Molekül weitaus potenter, bereits 10^{-9} M PACAP steigerten das Zellwachstum signifikant, die Forskolinwirkung ließ sich erst in

um den Faktor 1000 höheren Konzentrationen nachweisen (Ergebnisse nicht dargestellt). Ein Vergleich der ED₅₀-Werte läßt sich aus den in den geschilderten Experimenten gewonnenen Daten jedoch nicht anstellen, da zumindest mit Forskolin vermutlich keine Maximierung des Effektes erreicht wurde. Neben der sich im Verlauf von Tagen entwickelnden Wirkung der beiden Stoffe auf die Menge des inkorporierten [³H]Thymidins in den Kulturen, übten sie auch deutliche Einflüsse auf die *Second-messenger*-Synthese der α T3-1-Zellen aus. Forskolin führte zu signifikant erhöhten cAMP-Konzentrationen in allen untersuchten Zellkultursystemen, mit PACAP ließ sich in den hierzu durchgeführten Versuchen kein Einfluß auf den cAMP-Gehalt von GH₃-Zellen nachweisen, obwohl PROPATO-MUSSAFIRI ET AL. eine gesteigerte Exozytoseaktivität dieser Zellen unter PACAP-Einfluß beschrieben haben, sie also durchaus PACAP-empfindlich sind [57]. Doch wird die Exozytose von Gonadotropinen ja offenbar von der Aktivität der Adenylatzyklase unabhängig über eine Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels der gonadotropen Zellen nach Bindung von GnRH an seine Rezeptoren vermittelt [39, 58-63].

Die cAMP-Synthesetätigkeit nach Stimulation mit dem Peptid fällt in α T3-1-Zellkulturen etwa dreifach höher aus als - maximal - in Primärzellkulturen von Rattenhypophysen. Diese Tatsache kann ihren Grund darin haben, daß die Gonadotropen in den Hypophysenpräparationen ja nur etwa 10% der Zellen ausmachen. Der Anstieg der cAMP-Konzentration nach Stimulation durch PACAP wird auch ohne, vor allem aber in Anwesenheit von IBMX beobachtet. Daher kann wohl angenommen werden, daß er auf eine Stimulation der Adenylatzyklase, nicht auf eine Phosphodiesterasehemmung, zurückgeht. Wenngleich die durch GnRH hervorgerufene Ausschüttung von Gonadotropinen offenbar durch den intrazellulären Ca²⁺-Stoffwechsel gesteuert wird (s. o.), so hat doch eine Vielzahl von Arbeitsgruppen beschrieben, daß auch zyklisches Adenosinmonophosphat Stoffwechselforgänge in gonadotropen Zellen modifiziert: So ist bekannt, daß es die Menge der auszuschüttenden Gonadotropine im intrazellulären Pool verändert [64], die Ansprechbarkeit der Exozytoseaktivität der Zellen auf Veränderungen der Ca²⁺-Konzentration modifiziert [65] sowie die Gonadotropinsynthese und Gentranskription in den Zellen reguliert [66-69]. Unter den Stoffen, die zu einer vermehrten Bildung von cAMP in Gonadotropen führen, mag auch GnRH sein, von dem seit langem bekannt ist, daß es *in vitro* die cAMP-Synthese in Hypophysenzellen erhöht [70, 71], doch kann dies an α T3-1-Zellen

nicht beobachtet werden [13]. So mag PACAP, daß an den Zellen dieser von Gonadotropen abstammenden Linie einen ausgeprägten Einfluß auf die cAMP-Synthese hat, ein wichtigerer Stimulus für selbige sein. Es spricht ja eine Vielzahl von Beobachtungen dafür, daß PACAP eine hypophyseotrope Rolle spielt [14, 31, 72] und die Gonadotropen zu den Zielzellen des Hormons gehören [73, 74]. Der Nachweis, daß PACAP die cAMP-Akkumulation in α T3-1-Zellen stimuliert, war wohl die erste Beobachtung einer direkten Wirkung des Peptids auf gonadotropstämmige Zellen. Auch der beschriebene trophische Einfluß des Hormons, die vermehrte Inkorporation von [3 H]Thymidin nach Stimulation der Kulturen mit PACAP, könnte über den Adenylatzyklaseweg vermittelt werden: Er wurde ja durch Forskolin imitiert, jedoch nicht durch GnRH oder PMA, die beide auch als Proteinkinase-C-Aktivatoren bekannt sind. In diesem Zusammenhang muß aber noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die α T3-1-Zelllinie durch gezielte Transgenese erzeugt wurde und in Verbindung mit dem Promotor für die Transkription der α -Untereinheit der Gonadotropine das SV40-T-Antigen enthält [12]. Aktivierung des Promotors durch PACAP könnte gleichzeitig zu einer erhöhten Expression des SV40-T-Antigens führen, - und PACAP natürlich ebenfalls über diesen Mechanismus zu einer Vermehrung der Zellen. Diese Frage ließe sich vielleicht am einfachsten klären, indem man die trophischen Einflüsse des Hormons auf Gonadotrope in Primärkulturen untersuchte. Neben der Aktivierung der Adenylatzyklase folgt auf die Stimulation der α T3-1-Zellen mit PACAP jedoch auch eine vermehrte Akkumulation von [3 H]Inositolphosphat, kommt es also zur erhöhten Aktivität der Phospholipase C. Wie für die cAMP-Synthese ($EC_{50} \approx 3$ nM) sind PACAP27 und PACAP38 auch für diesen Effekt gleichermaßen potent ($EC_{50} \approx 20$ nM), doch eindeutig potenter als VIP, es liegt also der Gedanke nahe, daß beide *Second messenger*-Wege über

Typ-I-PACAP-Rezeptoren aktiviert werden. Darüber hinaus ist ja bekannt, daß der in der Hypophyse vorherrschende Rezeptortyp für PACAP der Typ-I-Rezeptor ist (vgl. »Einleitung«, S. 15), und MCARDLE konnte inzwischen nachweisen, daß die Bindung jodierten PACAP27s an α T3-1-Zellen durch die drei Peptide in der gleichen Rangfolge inhibiert wird [75]. Die Scatchardanalyse der [125 I]PACAP27-Bindung in Experimenten mit Ligandensättigung ließ uns ebenfalls vermuten, daß α T3-1-Zellen einen einzigen Rezeptortyp besitzen; dessen K_d liegt bei ungefähr 3 nM, - ein Wert, der mit dem für andere Systeme beschriebenen K_d -Wert von Typ-I-Rezeptoren für PACAP in etwa übereinstimmt [72, 75]. An den oben angeführten Unterschied

in den EC_{50} -Werten für die Aktivierung der Adenylatzyklase und der Phospholipase C durch PACAP anknüpfend läßt sich noch vermuten, daß dieser PACAP-Rezeptor effektiver an das Adenylatzyklasesystem gekoppelt ist. Eine unterschiedlich enge Kopplung an die beiden Signalübertragungswege ist bereits an mehreren verschiedenen Rezeptoren beobachtet worden [76-78].

GnRH hemmt den Einfluß von PACAP auf die cAMP-Synthese. Da bekannt ist, daß das Releasinghormon in $\alpha T3-1$ -Zellen die zytosolische Kalziumkonzentration steigert [58, 79, 80], hätte die Vermutung nahegelegen, daß diese Hemmung auf einer Ca^{2+} -Calmodulin-vermittelten Aktivierung der Phosphodiesterase beruhe. Für dieses Enzym ist eine Regulation über Calmodulin ja seit langem bekannt. Gegen diesen Verdacht spricht jedoch die Tatsache, daß der hemmende Einfluß von GnRH nicht durch A23187 zu imitieren war, ja umgekehrt eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch die Kalziumionophore zu einer Steigerung der cAMP-Synthese führte. Zudem führte die Inkubation in kalziumfreiem Medium mit EGTA-Zusatz zu einer verminderten Synthese des *Second messengers*. Letzteres gilt auch für Forskolin, während GnRH die durch diesen Stoff hervorgerufene cAMP-Synthese nicht beeinträchtigte [81]. Auch hier wäre ja für eine Phosphodiesteraseaktivierung zu erwarten gewesen, daß sie vom jeweiligen Stimulus unabhängig sei. Schließlich hätte der Phosphodiesterasehemmer IBMX in der Lage sein sollen, den GnRH-Einfluß aufzuheben, wenn diesem eine Aktivierung des Enzyms zugrunde gelegen hätte, doch schwächte IBMX die beobachtete Hemmung nicht [81].

Eine zweite Möglichkeit, die unter GnRH-Einfluß niedrigeren cAMP-Spiegel nach PACAP-Stimulation zu erklären, ist eine Aktivierung der Proteinkinase C. Es ist beschrieben worden, daß dieses Enzym in $\alpha T3-1$ -Zellen durch gonadotropes Releasinghormon aktiviert wird [13], und seine Isoenzyme spielen in vielen Systemen eine Rolle im Zusammenspiel zwischen Aktivatoren der Adenylatzyklase und der Phospholipase C [82]. Dieser Ansatz einer Erklärung nun wird gestützt durch den dem GnRH-Effekt entsprechenden Einfluß des Phorbolesters PMA auf die cAMP-Synthese nach Stimulation mit PACAP. Offen bleibt dabei, warum GnRH die cAMP-Produktion effektiver hemmt als PMA. Möglich wäre, daß noch weitere Mechanismen an dem GnRH-Effekt beteiligt sind. Wie für GnRH (s.o.), so gilt auch für PMA, daß es die

Forskolin-induzierte cAMP-Synthese nicht beeinträchtigt, und gleiches gilt für die beiden Stoffe in Bezug auf eine Akkumulation von cAMP unter Einwirkung von Cholera-toxin [81]. Forskolin wirkt direkt auf katalytische Untereinheiten der Adenylatzyklase (s. a. »Einleitung«, S. 8), Cholera-toxin führt zu einer Ribosylierung von G_s-Untereinheiten und dadurch einer Aktivierung der Adenylatzyklase [83]. Aus diesen Zusammenhängen läßt sich ableiten, daß weder das Releasinghormon noch der Phorbol-ester direkt auf die Adenylatzyklase selbst oder deren Aktivierung durch ein G-Protein einwirken, sondern daß sie bereits an einem früheren Punkt der Signalübertragung, also offenbar auf der Ebene des PACAP-Rezeptors, in diese eingreifen. Da keine der beiden Substanzen einen meßbaren Einfluß auf die Kinetik der Bindung ¹²⁵I-markierten PACAP27s an seinen Rezeptor auf α T3-1-Zellen hatte, scheint zur verminderten cAMP-Synthese eine verminderte Aktivierung der G-Proteine zu führen [81]. Aus vergleichbaren Studien unter anderem an adrenergen β -Rezeptoren ist bekannt, daß eine Regulation der Kopplung zwischen Rezeptoren und G-Proteinen durch Rezeptorphosphorylierung möglich ist [84], und so könnte dieser Mechanismus einer Entkopplung des G-Proteins vom PACAP-Rezeptor auch hier den hemmenden Einfluß von Phorbolmyristoazetat und gonadotropem Releasinghormon erklären. Es bleibt aufzuklären, inwieweit die beschriebenen Wechselwirkungen auch in nichtklonierten Gonadotropen vorkommen und welche physiologische Rolle sie spielen. Ein Ansatz für die Antwort auf letztere Frage könnte allerdings die Tatsache sein, daß die Stimulation der cAMP-Synthese nach Bindung von PACAP an seinen Rezeptor äußerst lange, nämlich über Stunden, andauert und das pulsatile ausgeschüttete GnRH *in vitro* in der Lage ist, diese Wirkung in bedeutend kürzeren Zeiträumen zu antagonisieren [81].

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Weg zur Erforschung der Biologie der aus vielen unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzten Hypophyse ist die Arbeit mit klonierten Linien nach Isolation der Ausgangszelle. Die aus einem künstlich erzeugten Tumor hervorgegangene α T3-1-Zelllinie ist dafür ein Beispiel, und es konnte gezeigt werden, daß sie sich hervorragend eignet, um an ihr Aspekte der Biologie gonadotroper Zellen - von einer solchen stammt sie - zu studieren. Anhand von Wachstumsassays mit Bestimmung des DNA-Gehaltes oder der Thymidininkorporation von Kulturen habe ich nach Stoffen gesucht, die auf die serumabhängigen α T3-1-Zellen eine Wirkung ausüben. Nicht unerwartet stimulierten Steroide, allen voran Östradiol, deren Wachstum. Der Einfluß des Östrogens war durch den Rezeptorantagonisten Keoxifen hemmbar. Zwar führte auch Gonadotropes Releasinghormon allein zu einer - geringer ausgeprägten - Steigerung des Kulturwachstums, doch war es in einer Konzentration von 10^{-6} M auch in der Lage, den Östradioleinfluß (10^{-11} M) statistisch signifikant zu inhibieren. Möglicherweise läßt sich an α T3-1-Zellen daher der bekannte antitumoröse Effekt des Hormons weiter erforschen. Eine besonders ausgeprägte - dem Östradiol in etwa vergleichbare - wachstumsstimulierende Wirkung entfaltete auch das erst 1989 entdeckte *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*, von dem zwei verschieden lange Varianten, PACAP27 und PACAP38, benannt nach der Anzahl ihrer Aminosäuren, bekannt sind. Sein Einfluß war Anlaß, hier die Mechanismen der intrazellulären Signalübertragung näher zu untersuchen. Schon ohne Zugabe eines Phosphodiesterasehemmers war der cAMP-Spiegel signifikant erhöht, wenn mindestens 10^{-9} M PACAP zugesetzt wurden. PACAP27 und PACAP38 stimulierten die cAMP-Synthese gleichstark und mit statistischer Signifikanz von einer Konzentration von 10^{-9} M an, verglichen mit einer Steigerung der Bildung dieses *Second messengers* durch VIP erst ab 10^{-7} M. Die Aktivierung der Adenylatzyklase durch PACAP erwies sich in weiteren Experimenten als kalziumabhängig. Zwar bestand der Effekt auch in kalziumfreiem Medium, jedoch war der gemessene cAMP-Gehalt in den Kulturen dann deutlich geringer. Umgekehrt war die Kalziumionophore A23187 in der Lage, die Bildung des Signalüberträgers - verglichen mit PACAP allein - noch zu steigern. GnRH setzte in einer Konzentration von 10^{-7} M die PACAP-induzierte cAMP-Produktion der α T3-1-Zellen herab, und zwar bei allen untersuchten Konzentrationen (bis 10^{-6} M) von PACAP38. Zwar galt für Phorbolmyristoazetat als weiteren Proteinkinase-C-Aktivator Entsprechendes, doch war die durch PMA hervorgerufene Hemmung geringer ausgeprägt und es ergab sich aus weiterführenden Untersuchungen, daß der beobachtete Effekt vermutlich bereits auf der Ebene der G-Proteine vermittelt wird.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. **SCHIEBLER, TH:** Histologie, Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen; nach der amerikanischen Ausgabe von LC JUNQUEIRA UND J CARNEIRO/übersetzt, überarbeitet und ergänzt von TH SCHIEBLER, U PEIPER UND F SCHNEIDER. - 2., korrigierte Auflage. Springer; Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo (1986)
2. **FAWCETT, DW:** A textbook of histology; revidierte Ausgabe von: W BLOOM, DW FAWCETT: Textbook of histology, 10. Auflage 1975. - 11. Auflage. Saunders; Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hong Kong (1986)
3. **FARQUHAR, MG, EH SKUTELSKY, CR HOPKINS:** Structure and function of pituitary cells; in: A. TIXIER-VIDAL, M. G. FARQUHAR (Hrsg.), The anterior pituitary, Academic Press, New York (1975), 83-135
4. **BERRIDGE, MJ:** The molecular basis of communication within the cell; in: Molecules of life; Scient Am (1985): 142-152
5. **BERRIDGE, MJ, RF IRVINE:** Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature 312 (1984): 315-321
6. **BERRIDGE, MJ, RF IRVINE:** Inositol phosphates and cell signalling. Nature 341 (1989): 197-205
7. **RASMUSSEN, H:** The cycling of calcium as an intracellular messenger. Scient Am (1989): 44-51
8. **STRYER, L:** Biochemistry. - 3. Auflage. Freeman, New York (1988)
9. **Lexikon der Biologie.** - 1. Auflage. Herder, Freiburg, Basel, Wien (1983-1987)
10. **HUCKLE, WR, PM CONN:** The relationship of gonadotropin releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release and inositol phosphate production: studies with calcium antagonists and protein kinase C activators. Endocrinology 120 (1987): 160-169

11. **ALBERTS, B, D BRAY, J LEWIS, M RAFF, K ROBERTS, JD WATSON:** Molekularbiologie der Zelle. Übersetzung von L JAENICKE. - 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 1986. VCH, Weinheim, Deerfield Beach (1987)
12. **WINDLE, JJ, RI WEINER, PL MELLON:** Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4 (1990): 597-603
13. **HORN, F, LM BILEZIKJIAN, MH PERRIN, MM BOSMA, JJ WINDLE, KS HUBER, AL BLOUNT, B HILLE, W VALE, PL MELLON:** Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol Endocrinol* 5 (1991): 347-355
14. **ARIMURA, A:** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research. *Regulatory Peptides* 37 (1992): 287-303
15. **KIMURA, C, S OHKUBO, K OGI, M HOSOYA, Y ITOH, H ONDA, A MIYATA, L JIAN, RR DAHL, HH STIBBS, A ARIMURA, M FUJINO:** A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 166 (1990): 81-89
16. **OGI, K, C KIMURA, H ONDA, A ARIMURA, M FUJINO:** Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem Biophys Res Commun* 173 (1990): 1271-1279
17. **ARIMURA, A, A SOMOGYVARI-VIGH, C WEILL, RC FIORE, I TATSUNO, V BAY, DE BRENNEMAN:** PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann N Y Acad Sci* 739 (1994): 228-243
18. **ARIMURA, A, A SOMOGYVARI-VIGH, A MIYATA, K MIZUNO, DH COY, C KITADA:** Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129 (1991): 2787-2789
19. **KOVES, K, A ARIMURA, A SOMOGYVARI-VIGH, S VIGH, J MILLER:** Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 127 (1990): 264-271
20. **SHIODA, S, T. YADA, S. NAKAJO, K. NAKAYA, Y. NAKAI, A. ARIMURA:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): a novel regulator of vasopressin-containing neurons. *Brain Res* 765 (1997): 81-90

-
21. **ROBBERECHT, P, MC WOUSSEN-COLLE, P DE NEEF, P BOURLET, L BUSCAIL, A VANDERMEERS, MC VANDERMEERS-PIRET, J CHRISTOPHE:** The two forms of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP1-27) and (PACAP1-38) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR4-2J cell membranes. *FEBS Lett* 286 (1991):133-136
 22. **SHIVERS, BD, TJ GORES, PE GOTTSCHALL, A ARIMURA:** Two high-affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology* 128 (1991): 3055-3065
 23. **GOURLET, P, P DE NEEF, MC WOUSSEN-COLLE, A VANDERMEERS, MC VANDERMEERS-PIRET, P ROBBERECHT, J CHRISTOPHE:** The activation of adenylate cyclase by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) via helodermin-preferring VIP receptors in human SUP-T1 lymphoblastic membranes. *Biochem Biophys Acta* 1066 (1991): 245-251
 24. **CULLER, MD, CS PASCHALL:** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) potentiates the gonadotropin-releasing activity of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 129 (1991): 2260-2262
 25. **TSUJI, T, K ISHIZAKA, SJ WINTERS:** Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on gonadotropin secretion and subunit mRNAs in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* 135 (1994): 826-833
 26. **MUNGAN, Z, A ERTAN, RA HAMMER, A ARIMURA:** Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on rat pancreatic exocrine secretion. *Peptides* 12 (1990): 559-562
 27. **YADA, T, M SAKURADA, K IHIDA, M NAKATA, F MURATA, A ARIMURA, M KIKUCHI:** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is an extraordinarily potent intra-pancreatic regulator of insulin secretion from islet β -cells. *J Biol Chem* 269 (1994): 1290-1293
 28. **SHIODA, S, G LEGRADI, WC LEUNG, S NAKAJO, K NAKAYA, A ARIMURA:** Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its mRNA in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Endocrinology* 135 (1994): 818-825
 29. **MCARDLE, CA:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: A key player in reproduction? Editorial. *Endocrinology* 135 (1994): 815-817

30. **Arimura, A, S Shioda:** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol* 16 (1995): 53-88
31. **Miyata, A, A Arimura, RR Dahl, N Minamino, A Uehara, L Jiang, MD Culler, Coy, AH:** Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164 (1989): 567-574
32. **Nandna, KA, MA Benito-Orfila, DM Smith, MA Ghatei, SR Bloom:** Action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on the rat vascular system: effects on blood pressure and receptor binding. *J Endocrinol* 129 (1991): 69-73
33. **Labarca, C, K Paigen:** A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102 (1980): 344-352
34. **Holtorf, AP, K Furuya, R Ivell, CA Mcardle:** Oxytocin production and oxytocin messenger ribonucleic acid levels in bovine granulosa cells are regulated by insulin and insulin-like growth factor-I: dependence on developmental status of the ovarian follicle. *Endocrinology* 125 (1989): 2612-2620
35. **Freshney, RI:** Culture of animal cells. - 2. Auflage. Alan R. Liss, Inc.; New York (1987)
36. **McArdle, CA, A Poch, K K  ppler:** Cyclic guanosine monophosphate production in the pituitary: stimulation by C-type natriuretic peptide and inhibition by gonadotropin-releasing hormone in α T3-1 cells. *Endocrinology* 132 (1993): 2065-2072
37. **Conn, PM, WR Huckle, WV Andrews, CA McArdle:** The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. *Recent Prog Horm Res* 43 (1987): 29-68
38. **Huckle, WR, PM Conn:** Molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action, II: The effector system. *Endocr Rev* 9 (1988): 387-395
39. **Catt, KJ, SS Stojilkovic:** Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 1 (1989): 15-20
40. **Naor, Z:** Signal transduction mechanisms of Ca^{2+} mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 11 (1990): 326-353

41. **AUDY, MC, Y. BOUCHER, M. BONNIN:** Estrogen modulated gonadotropin release in relation to gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) and phorbol ester (PMA) actions in superfused rat pituitary cells. *Endocrinology* 126 (1990): 1396-1402
42. **DROUVA, SV, I GORENNE, E LAPLANTE, E RÉRAT, A ENJALBERT, C KORDON:** Estradiol modulates protein kinase C activity in the rat pituitary *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 126 (1990): 536-544
43. **HSUEH, AJW, GF ERICKSON, SSC YEN:** The sensitizing effect of estrogens and catechol estrogen on cultured pituitary cells to luteinizing hormone-releasing hormone: its antagonism by progestins. *Endocrinology* 104 (1979): 807-813
44. **KAMEL, F, LC KREY:** Gonadal steroid modulation of LH secretion stimulated by LHRH, Ca^{2+} and cAMP. *Mol Cell Endocrinol* 32 (1983): 285-300
45. **LIU, TC, GL JACKSON:** Actions of 17β -estradiol on gonadotropin release induced by drugs that activate intracellular signal transduction mechanisms in rat anterior pituitary cells. *Biol Reprod* 39 (1988): 787-796
46. **EMONS, G, JG HOFFMANN, C BRACK, O ORTMANN, R STURM, P BALL, R KNUPPEN:** Modulation of gonadotropin-releasing hormone receptor concentration in cultured female rat pituitary cells by estradiol treatment. *J Steroid Biochem* 31 (1988): 751-756
47. **FINK, G:** Neuroendocrine control of gonadotropin secretion. *Br Med Bull* 35 (1979): 155-160
48. **MENON, M, H PEEGEL, V KATTA:** Estradiol potentiation of gonadotropin-releasing hormone responsiveness in the anterior pituitary is mediated by an increase in gonadotropin-releasing hormone receptors. *Am J Obstet Gynec* 151 (1985): 534-540
49. **ORTMANN, O, G EMONS, R KNUPPEN, KJ CATT:** Inhibitory actions of keoxifene on luteinizing hormone secretion in pituitary gonadotrope. *Endocrinology* 123 (1988): 962-968
50. **MCARDLE, CA, E SCHOMERUS, I GRÖNER, A POCH:** Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone receptor number, growth and inositol phosphate production in α T3-1-cells. *Mol Cell Endocrinol* 87 (1992): 95-103
51. **COLIN, IM, AC BAUER-DANTOIN, S SUNDARESAN, P KOPP, JL JAMESON:** Sexually dimorphic transcriptional responses to gonadotropin-releasing hormone require chronic *in vivo* exposure to estradiol. *Endocrinology* 137 (1996): 2300-2307
52. **FERNANDEZ-MONTOLI, ME, O DIEZ-GIBERT, JM SAMANIEGO, L BALAGUERO, MA**

- NAVARRO:** Total and unbound cytosolic estrogen and progesterone receptors in myometrium and fibroid after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Fertil Steril* 63 (1995): 522-527
53. **Miller, WR, WN Scott, R Morris, HM Fraser, RM Sharpe:** Growth of human breast cancer cells is inhibited by a luteinising hormone-releasing hormone agonist. *Nature* 313 (1985): 231-233
54. **NERI, C, E COLOMB, M ROUX-DOSSETO, PM MARTIN:** Distinct effects of gonadotropin-releasing hormone analogs and 4-hydroxytamoxifen on pS2 mRNA expression with respect to cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res* 11 (1991): 411-415
55. **NERI, C, Y BERTHOIS, B SCHATZ, K DRIEU, PM MARTIN:** Compared effects of GnRH analogs and 4-hydroxytamoxifen on growth and steroid receptors in antiestrogen sensitive and resistant MCF-7 breast cancer cell sublines. *Breast Cancer Res Treat* 15 (1990): 85-93
56. **KAKAR, SS, S NATH, J BUNN, L JENNES:** The inhibition of growth and down-regulation of gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor in α T3-1 cells by GnRH agonist. *Anti-Cancer Drugs* 8 (1997): 369-375
57. **PROPATO-MUSSAFIRI, R, SM KANSE, MA GHATEI, SR BLOOM:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide releases 7B2, adrenocortikotrophin, growth hormone and prolactin from the mouse and rat clonal pituitary cell lines AtT-20 and GH₃. *J Endocrinol* 132 (1992): 107-113
58. **MCARDLE, CA, R BUNTING, WT MASON:** Dynamic video imaging of cytosolic Ca²⁺ in the α T3-1, gonadotrope derived, cell line. *Mol Cell Neurosci* 3 (1992): 124-132
59. **CONN, PM, DV MORELL, ML DUFAU, KJ CATT:** Gonadotropin-releasing hormone action in cultured piticytes: indepence of luteinizing hormone release and adenosine 3',5'-monophosphate production. *Endocrinology* 104 (1979): 448-453
60. **HANSEN, JR, CA MCARDLE, PM CONN:** Relative roles of calcium derived from intra- and extracellular sources in dynamic LH release from perfused pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1 (1987): 808-815

61. **NAOR, Z, AM CAPPONI, MF ROSSIER, D AYALON, R LIMOR:** Gonadotropin-releasing hormone-induced rise in cytosolic free Ca^{2+} levels: mobilization of cellular and extracellular Ca^{2+} Pools and relationship to gonadotropin secretion. *Mol Endocrinol* 2 (1988): 512-520
62. **DAVIDSON, JM, IK WAKEFIELD, JA KING, GP MULLIGAN, RP MILLAR:** Dual pathways of calcium entry in spike and plateau phases of luteinizing hormone release from chicken pituitary cells: sequential activation of receptor-operated and voltage-sensitive calcium channels by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 2 (1988): 382-390
63. **MCARDLE, CA, A POCH:** Dependence of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release upon intracellular Ca^{2+} pools is revealed by desensitization and thapsigargin blockade. *Endocrinology* 130 (1992): 3567-3574
64. **JANOVICK, JA, PM CONN:** A cholera toxin-sensitive guanyl nucleotide binding protein mediates the movement of pituitary luteinizing hormone into a releasable pool: loss of this event is associated with the onset of homologous desensitization to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 132 (1993): 2131-2135
65. **MACRAE, BM, JS DAVIDSON, RP MILLAR, PA VAN DER MERWE:** Cyclic AMP stimulates luteinizing-hormone (lutropin) exocytosis in permeabilized sheep anterior pituitary cells. Synergism with protein kinase C and calcium. *Biochem J* 271 (1990):635-639
66. **COUNIS, R, M JUTISZ:** Regulation of pituitary gonadotropin gene expression. Outline of intracellular signalling pathways. *Trends Endocrinol Metab* 2 (1991): 181-187
67. **STARZEC, A, M MOUMNI, G D'ANGELO-BERNARD, Y LERRANT, M JUTISZ, R COUNIS:** Cyclic AMP enhances gene expression synthesis and release of newly synthesized alpha and luteinizing hormone beta subunits in cultured rat anterior pituitary cells. *Neurochem Int* 15 (1989): 259-264
68. **GHARIB, SD, ME WIERMAN, MA SHUPNIK, WW CHIN:** Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11 (1990): 177-199
69. **SCHODERBEK, WE, MS ROBERSON, RA MAURER:** Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene. *J Biol Chem* 268 (1993): 3903-3910

-
70. **BORGEAT, P, A CHAVANY, A DUPONT, F LABRIE, A ARIMURA, AV SCHALLY:** Stimulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland *in vitro* by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone. Proc Natl Acad Sci USA 69 (1972): 2677-2681
 71. **BORGEAT, P, F LABRIE, J DROUIN:** Inhibition of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in anterior pituitary gland *in vitro* by growth hormone-release inhibiting hormone. Biochem Biophys Res Commun 56 (1974): 1052-59
 72. **ARIMURA, A:** Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Comparison with vasoactive intestinal peptide receptors. Trends Endocrinol Metab 3 (1992): 288-294
 73. **VIGH, S, A ARIMURA, PE GOTTSCHALL, C KITADA, A SOMOGYVARI-VIGH, GW CHILDS:** Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) using biotinylated ligands. Peptides 14 (1991): 59-65
 74. **CANNY, BJ, SR RAWLINGS, DA LEONG:** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide specifically increases cytosolic calcium concentration in rat gonadotropes and somatotropes. Endocrinology 130 (1992): 211-215
 75. **SCHOMERUS, E, A POCH, R BUNTING, WT MASON, CA MCARDLE:** Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the pituitary: activation of two signal transduction pathways in the gonadotrope-derived α T3-1 cell line. Endocrinology 134 (1994) 315-323
 76. **GUDERMANN, T, M BIRNBAUMER, L BIRNBAUMER:** Evidence for dual coupling of murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization. J Biol Chem 267 (1992): 4479-4488
 77. **HUNG, DT, YH WONG, T-KH VU, SR COUGHLIN:** The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylate cyclase. J Biol Chem 267 (1992): 20831-20834
 78. **KOSUGI, S, F OKAJIMA, T BAN, A HIDAKA, A SHENKER, LD KOHN:** Mutation of alanine 623 in the third cytoplasmic loop of the rat thyrotropin (TSH) receptor results in a loss in the phosphoinositide but not cAMP signal induced by TSH and receptor antibodies. J Biol Chem 267 (1992): 24153-24156

79. **MERELLI, F, SS STOJILKOVIC, T IIDA, LZ MRSMANOVIC, L ZHENG, PL MELLON, KJ CATT:** Gonadotropin releasing hormone-induced calcium signaling in clonal pituitary gonadotrops. *Endocrinology* 131 (1992): 925-932
80. **ANDERSON, L, J HOYLAND, WT MASON, KA EIDNE:** Characterization of the gonadotropin-releasing hormone calcium response in single α T3-1 pituitary gonadotrop cells. *Mol Cell Endocrinol* 86 (1992): 167-175
81. **MCARDLE, CA, A POCH, E SCHOMERUS, M KRATZMEIER:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide effect in pituitary cells: modulation by gonadotropin-releasing hormone in α T3-1 cells. *Endocrinology* 134 (1994): 2599-2605
82. **HOUSLEY, MD:** Crosstalk: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur J Biochem* 195 (1990): 9-27
83. **KAHN, RA, AG GILMAN:** ADP-ribosylation of G_s promotes the dissociation of its α and β subunits. *J Biol Chem* 259 (1984): 6235-6240
84. **SIBLEY, DR, JL BENOVIC, MG CARON, RJ LEFKOWITZ:** Phosphorylation of cell surface receptors: a mechanism for regulated signal transduction pathways. *Endocr Rev* 9 (1988): 38-56

VII.

DANKSAGUNGEN

Ich danke meinem Doktorvater, PROFESSOR DR. LEIDENBERGER, für die Möglichkeit, in dem von ihm geleiteten Haus die vorliegende Arbeit anzufertigen. DR. MCARDLE, dessen Arbeitsgruppe ich zugeordnet war, danke ich für die hervorragende Betreuung während der langen experimentellen Phase. Über das immer freundliche Entgegenkommen des Leiters der Abteilung, DR. MUKHOPADHYAY, habe ich mich oft gefreut, darüber hinaus bin ich ihm ebenso wie DR. OLCESE dankbar auch für manchen fachlichen Rat. Dies gilt auch für viele weitere Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes, in praktischen Fragen der Laborarbeit ganz besonders für die MTA der Arbeitsgruppe, FRAU POCH.

LEBENS LAUF

Name: Eckhard Schomerus

Geburtsdatum und -ort: 6. November 1967, Buxtehude

Eltern: Christhart Schomerus, Pastor
Renate Schomerus, geb. Hammerstein

Konfession: evangelisch-lutherisch
1968 getauft, 1982 konfirmiert

Schulbildung: 4 Jahre Grundschule Buxtehude-Altkloster, 1974-1978
9 Jahre Gymnasium Neu Wulmstorf,
Abitur 1987

Studium: Studium der Humanmedizin an der
Universität Hamburg, Beginn im Wintersemester 1987
Drittes Staatsexamen am 6. Juni 1996

Famulaturen:

- Krankenhaus Bethesda, Bergedorf (Innere Medizin)
- Allgemeines Krankenhaus Altona, Hamburg (Pathologie)
- Lorettokrankenhaus, Freiburg i. Br. (Chirurgie, Ambulanz)
- »Elective« an der Universitätsklinik Lund,
Schweden (pädiatrische Onkologie)

Praktisches Jahr (Hamburg):

- Kinderheilkunde, AK Heidberg (PD Dr. Veelken)
- Innere Medizin, Krankenhaus Mariahilf (Prof. Dr. Planz)
- Chirurgie, AK Heidberg (Dr. Nabavi, Prof. Dr. Lüdtke)

Sprachen: Englisch, Schwedisch

Hamburg 1996

VII. ANHANG

Basic salt solution:

NaCl	135,0	mM
CaCl ₂	1,5	mM
KCl	1,0	mM
MgCl ₂	0,5	mM
KH ₂ PO ₄	1,0	mM
Glukose	5,6	mM
HEPES	10,0	mM

Einstellung des pH-Wertes auf 7,4.

Basic salt solution/Bovine serum albumin:

Zugabe von 0,1% Rinderserumalbumin

DNA-Assaypuffer:

NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	7,5	g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	17,9	g/l
NaCl	8,0	g/l
EDTA	2,0	mM
Phosphat	50,0	mM

Zusätze zu M 199 für den cAMP-RIA:

M 199	100,0	ml
HEPES (1 M)	20	ml

Auffüllen mit Aqua bidestillata auf 1000 ml,
Einstellung mit NaOH auf pH 7,4.