

1.

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Universität Schleswig-Holstein  
-Campus Lübeck-  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich

Einflüsse von Östradiol und Progesteron auf die Phorbol ester- stimulierte  
LH- Sekretion aus kultivierten Rattenhypophysenzellen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
Universität Schleswig-Holstein  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt  
von  
Björn Tilse  
aus Lübeck  
2004

1. Berichterstatter : Herr Prof. Dr. med. Olaf Ortmann

2. Berichterstatter: Herr Priv.- Doz. Dr. med. Werner Kern

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2004  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.11.04

Gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak  
- Dekan der Medizinischen Fakultät-

## Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1	Einleitung	
1.1.	Die neuroendokrine Regulation des Menstruationszyklus durch GnRH	6
1.2.	GnRH- Rezeptoren und Signaltransduktionsmechanismen	8
1.3.	Modulation der Gonadotropinsekretion durch ovarielle Steroide	9
1.3.1.	Vorstellung der Steroide	9
1.3.2.	Die Regulierung der LH- Sekretion durch die Steroide	10
1.3.3.	Die Regulierung der GnRH- Rezeptoren durch die Steroide	11
1.4.	Der Mechanismus der Gonadotropin-Sekretion	12
1.4.1.	Die Rezeptor- G Protein- Phospholipase C- Inositolphosphat- Reaktion	13
1.4.2.	Die Beteiligung des Kalziums an der Gonadotropinsekretion	13
1.4.3.	Die Proteinkinase C	14
1.4.4.	Weitere Transmitter	16
1.5.	Problemstellung	17
1.5.1.	Einflüsse der Steroide Östrogen und Progesteron auf die LH- Sekretion bei direkter Aktivierung der Proteinkinase C	18
1.5.2.	Untersuchung zur LH- Neusynthese bei direkter Stimulierung Steroid-vorbehandelter Rattenhypophysenzellen	18
1.5.3.	Abhängigkeit der Proteinkinase C- vermittelten LH- Sekretion aus Steroid- vorbehandelten Rattenhypophysenzellen von extrazellulärem Kalzium	18
2.	Material und Methode	
2.1.	Hormone	20
2.2.	Zellpräparation und Zellkultur	20
2.3.	Ablauf der Experimente	21
2.3.1.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf die TPA- oder	21

	GnRH- induzierte LH- Sekretion kultivierter Rattenhypophysenzellen	
2.3.2.	Wirkung von Steroiden und / oder Agonisten auf das Gesamt- LH	23
2.3.2.1.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf die LH- Gesamtmenge	23
2.3.2.2.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf die LH- Gesamtmenge bei Stimulation mit GnRH oder TPA	23
2.3.2.3.	Effekte der GnRH- oder TPA- Stimulation über verlängerten Zeitraum auf die LH- Gesamtmenge	23
2.3.3.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf GnRH-/ TPA- induzierte LH- Sekretion in kalziumfreiem Medium	24
2.4.	Auswertung der Experimente	24
2.4.1.	LH- Bestimmung	24
2.4.2.	Statistische Methoden	25
3.	Ergebnisse	
3.1	Effekte von Progesteron und Östrogen auf die GnRH - oder TPA- induzierte LH- Sekretion kultivierter Rattenhypophysenzellen	26
3.2.	Untersuchung zur Neusynthese von LH	27
3.2.1.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf die LH- Gesamtmenge	27
3.2.2.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf die LH- Gesamtmenge Effekte von Östrogen und Progesteron auf die LH- Gesamtmenge bei Stimulation mit GnRH oder TPA	28
3.2.3.	Effekte der GnRH- oder TPA- Stimulation über verlängerten Zeitraum auf die LH- Gesamtmenge	29
3.3.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf die GnRH- oder TPA- Stimulation in kalziumfreiem Medium	31
4.0	Diskussion	33
4.1.	Effekte von Progesteron und Östrogen auf die GnRH- oder TPA- induzierte LH- Sekretion	34

4.2.	Wirkung der Steroide und / oder Agonisten auf das Gesamt-LH	39
4.3.	Effekte von Östrogen und Progesteron auf die GnRH- oder TPA- induzierte LH- Sekretion in kalziumfreiem Medium	42
5.	Zusammenfassung	48
6.	Literaturverzeichnis	49
	Lebenslauf	73
	Danksagung	74

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
DAG	Diacylglycerol, natürlicher Aktivator der Proteinkinase C
E	17- $\beta$ - Östradiol
ER	Endoplasmatisches Retikulum, auch "estrogen receptor"
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GnRHR	Gonadotropin Releasing Hormone-Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-Protein
IP	Inositolphosphat
LH	Luteinisierendes Hormon
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
P	Progesteron
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12- Myristat-13-Azetat, ein Phorbolester
PRG	Primary Response Gene
TPA	12- O-Tetradecanoylphorbol-13- azetat, ein Phorbolester
V	Vehicle / Vehikel: Wirkstofffreie Äthanollösung
VGCC/	Voltage- gated/- sensitive- Calcium-Channel, Kalziumkanäle der
VSCC	Zellmembran

# 1. Einleitung

## 1.1. Die neuroendokrine Regulation des Menstruationszyklus durch GnRH

Beim Ablauf des Menstruationszyklus nehmen die Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) eine Hauptfunktion ein. Sie werden in den Gonadotropin- bildenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (Adenohypophyse) gebildet. Diese Zellen repräsentieren nur ca. 10 % des Hypophysengewebes, ein Teil der Zellen synthetisiert nur LH (18%), ein Teil nur FSH (22%), die übrigen 60 % bilden beide Verbindungen (Shacham et al., 2001). Diese Hormone sind in ihrer Wirkung untrennbar miteinander verbunden, in dieser Einleitung wird jedoch themenorientiert überwiegend auf das LH eingegangen werden.

LH und FSH bestehen aus je zwei glykosierten Polypeptiduntereinheiten: Die  $\alpha$ - Form ist bei beiden Hormonen identisch und findet sich auch beim TSH und  $\beta$ -HCG (92 Aminosäuren). Die  $\beta$ -Untereinheit ist spezifisch für das jeweilige Hormon (beim LH 121, beim FSH 117 Aminosäuren umfassend (Pierce et al., 1971; Gharib et al., 1990).

Die Sekretion des FSH aus der Hypophyse erfolgt -gesteuert durch GnRH- pulsatil. In der ersten Zyklushälfte bestimmt das FSH die Follikelreifung. Der dominante Follikel, der sogenannte Tertiärfollikel, sezerniert größere Mengen an Östradiol. Dadurch wird ein steiler Anstieg der LH- Konzentration bewirkt, wodurch wiederum die Ovulation ausgelöst wird. Nach Ansteigen der FSH- Konzentration kurz vor der Zyklusmitte fällt diese postovulatorisch ab.

Das Luteinisierende Hormon stimuliert in der Theka interna des Ovar die Steroidbiosynthese. Bei der Frau spielt es im Endstadium der Follikelreifung eine Rolle und bewirkt während der Zyklusmitte in der Wand des reifen Follikels die zur Ovulation führenden Veränderungen. Nach dem Eisprung stimuliert das LH die Bildung des sogenannten Corpus luteum aus den Resten des eröffneten Primärfollikels. Dadurch wird die 2. Hälfte des Zyklus, die Lutealphase eingeleitet. In dieser finden sich die Steroidhormone Östradiol und Progesteron in hoher Konzentration (zur Übersicht: Wildt und Leyendecker, 1981; Genazzani et al., 1997; Hillier, 2002).

Obwohl zwischen Hypothalamus und Adenohypophyse keinerlei Nervenverbindungen bestehen, regulieren bestimmte hypothalamische Kerngebiete Funktionen der Adenohypophyse. Die Steuerung der Gonadotropin- Sekretion und -Synthese erfolgt über das vornehmlich in den Neuronen der Eminentia mediana des Hypothalamus vorkommende Dekapeptid Gonadotropin- Releasing- Hormon (GnRH oder LH- RH). Die Synthese des GnRH erfolgt im Nucleus arcuatus des Hypothalamus (Barry,1979; Silverman et al., 1982; Wolfe et al., 2002). Zwei oder mehr Varianten des GnRH sind in den meisten Wirbeltierarten zu finden, insgesamt sind bis jetzt 14 molekulare Formen beschrieben (Sealfon et al., 1997; Millar et al., 2001). Es gelang, die GnRH- Sequenzen mehrerer Spezies zu klonen, wie die der Ratte (Eidne et al., 1992) und des Menschen (Chi et al., 1993).

Es darf als gesichert angesehen werden, dass Impulse aus höheren Zentren des Zentralnervensystems unter der Beteiligung einer Fülle von Neurotransmittern des noradrenergen, cholinergen und dopaminergen Systems sowie Peptiden mit Opiatwirkung die Abgabe von GnRH steuern. Die Details der entsprechenden Vorgänge sind aber noch nicht ausreichend geklärt (Naor,1990; zur Übersicht: Tandon und Chintala, 2001).

Den Steroiden kommt hier eine besondere Bedeutung zu, da sie direkt und indirekt die GnRH- Sekretion steuern. Nähere Informationen werden im Abschnitt 1.3.1. vorgestellt. GnRH wird pulsatil sezerniert, wobei der entsprechende Pulsgenerator im Nucleus arcuatus des mediobasalen Hypothalamus lokalisiert ist (Lincoln 1985). Entsprechend verläuft auch die Gonadotropinsekretion pulsatil. Die Effektivität der pulsatilen GnRH- Sekretion auf die Hypophyse ist konzentrationsabhängig, insofern führen Veränderungen über ein bestimmtes Maß zum Sistieren der Gonadotropin- Sekretion (Zur Übersicht: Knobil, 1990; Levine, 1997; Tandon und Chintala, 2001, Moenter et al, 2003). Dieses intermittierende Sekretionsverhalten ist essentiell für eine normale geschlechtliche Entwicklung und Gametogenese. Sowohl die Unterbrechung der GnRH- Pulse als auch die Langzeit- Anwendung von GnRH- Agonisten führen zur Suppression von Gonadotropinen, Östrogen und Progesteron (Fallest et al., 1995). Die neuronalen Impulse werden durch Transport des GnRH über das portale Gefäßsystem zur Hypophyse übermittelt (Page,1983).

## 1.2. GnRH-Rezeptoren und Signaltransduktionsmechanismen

Ende der 70er Jahre wurden erstmals spezielle Rezeptoren für GnRH im Hypophysengewebe nachgewiesen, genauer in den Membranen der gonadotropin-bildenden Zellen (Hopkins und Gregory, 1977; zur Übersicht: Conn et al., 1981; Clayton und Catt, 1981; McArdle et al., 2002). Ausser in der Hypophyse wurde die Existenz von GnRH-Rezeptoren auch in mehreren anderen Organen wie verschiedenen ZNS-Anteilen, Plazenta und den Gonaden nachgewiesen (zur Übersicht: Stojilkovic et al., 1994).

Die DNA-Sequenz-Identifizierung der GnRH-Rezeptoren gelang zuerst bei der Maus (Windle et al., 1990), dann bei weiteren Arten wie Ratte, (Eidne et al., 1992, Kaiser et al., 1992) und Mensch (Kakar et al., 1992).

GnRH-Rezeptoren gehören zur Gruppe der Rhodopsin-ähnlichen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Alle Rezeptoren dieser Gruppe bestehen aus sieben transmembranösen (teils intra-, teils extrazellulär gelegenen) Helixbereichen einer einzigen Polypeptidkette. Über die definitive dreidimensionale Struktur der GnRH-Rezeptoren besteht noch keine Klarheit (Probst et al., 1992; Sealfon et al., 1997; Shacham et al., 2001). Bisher wurden zwei Formen von GnRH-Rezeptoren erkannt: GnRHR I kommt nur bei Säugetieren vor und unterscheidet sich vom Typ II durch das Fehlen des sog. C(arboxyl)-terminalen Schwanzes und das Vorliegen einer relativ kurzen intrazellulären Sequenz ("third loop"). Diese Unterschiede werden als ursächlich für die im Gegensatz zum Typ II vorhandene Resistenz gegen die Reagibilitätsminderung ("Desensitisation") durch kontinuierliche GnRH-Einwirkung angesehen (Reviews: Kraus et al., 2001; McArdle et al., 2002; Kakar et al., 2002).

Die spezifische mRNA für GnRH-Rezeptoren in kultivierten Rattenhypophysenzellen wird durch die Steroide (s. u.), durch Kalzium (Haisenleder et al., 1997) und durch GnRH selbst zeit- und konzentrationsabhängig gesteuert (Kaiser et al., 1997; Cheon et al., 1999; Lin et al., 1999).

Das an den Rezeptor gekoppelte G-Protein moduliert durch Reaktionen mit Guanosin-Triphosphat (GTP) die GnRH-Wirkung. Die G(TP)-Proteine stellen heterotrimere Proteine dar, die aus einer  $\alpha$ -Untereinheit ( $G\alpha$ ) und einem aus  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit zusammengesetzten Dimer ( $G\beta\gamma$ ) bestehen. Bei der Aktivierung löst sich  $G\alpha$  vom Dimer

und wandelt sich zur aktiven GTP- gebundenen Form. Diese wie auch das verbliebene Dimer beeinflussen die Wirkung weiterer Effektoren (Kraus et al., 2001). Es lassen sich mehrere G-Protein-Subtypen anhand der Sensitivität ihrer  $\alpha$ -Untereinheit auf Substanzen wie Choleratoxin (CTX) oder Pertussistoxin (PTX) unterscheiden (Hawes et al., 1993). Ein weiteres G-Protein ( $G_{q/11}$ ) ist unabhängig von PTX und CTX und dürfte die bedeutendste Rolle bei der GnRH- (und TRH-) Rezeptorregulation spielen. Dieses wirkt stets über Aktivierung der Membran- assoziierten Phospholipase C, die Bedeutung dieser Verbindung wird unten dargestellt (Perrin et al., 1989; Stojilkovic et al., 1994; Kraus et al., 2001; Hsieh und Martin, 1992).

An der Signalleitung beteiligten Substanzen wie Kalzium und Diacylglycerol werden in 1.4. vorgestellt

### **1.3. Modulation der Gonadotropinsekretion durch ovarielle Steroide**

#### **1.3.1. Einleitung mit Vorstellung der Steroide**

Das zweite wichtige Kontrollorgan der Gonadotropinsekretion ist das Ovar. Über die dort produzierten Sexualsteroid Östradiol und Progesteron wird die LH/ FSH- Ausschüttung moduliert. Von den mehr als 20 verschiedenen, natürlich vorkommenden Östrogenen ist das 17- $\beta$ -Östradiol am stärksten biologisch wirksam (Emons et al., 1984). Die Östrogene werden zum größten Teil in den Granulosa- und Thekazellen des Ovars produziert. Die Östrogene sind insbesondere in der ersten Hälfte des Zyklus von essentieller Bedeutung.

Die Produktion von Progesteron erfolgt überwiegend im ovariellen Gelbkörper und in der Plazenta. Die Halbwertszeit im Plasma beträgt nur wenige Minuten. Progesteron bestimmt die Besonderheiten der zweiten Zyklusphase (Lutealphase).

Die fettlöslichen Sexualhormone können im Sinne einer passiven Diffusion die Lipidplasmamembran der Zellen frei durchqueren. Im Zellinneren binden sie an ihre spezifischen Rezeptoren. Nach weiteren Schritten erfolgt die Anlagerung an die DNA. Der Steroid-Rezeptor- Komplex wirkt hier als Transkriptionsfaktor. Über die so gebildeten spezifischen mRNAs findet nach deren Wanderung zu den Ribosomen die

Translation statt. Ziel ist die Proteinbiosynthese der jeweils benötigten Hormone.

Östrogen und Progesteron beeinflussen die Gonadotropin- Sekretion über verschiedene Wege: Auf der Hypothalamus- Ebene üben sie über Rezeptoren an den GnRH- Neuronen selbst, mehr noch über opioiderge, dopaminerge und adrenerge Neurone, einen modulatorischen Einfluß auf die GnRH- Sekretion aus (Herbison, 1998; Chappell und Levine, 2000; Richter et al., 2001).

Die zweite, für diese Arbeit wichtigere Wirkebene der Steroide hinsichtlich der LH - Sekretion sind die Gonadotropin- bildenden Hypophysenzellen.

### **1.3.2. Regulierung der LH-Sekretion und -Synthese durch die Steroide**

Die ovariellen Steroide wirken über Feed- back- Mechanismen auf der Ebene des Hypothalamus und der der Hypophyse modulierend auf die Gonadotropin- Sekretion und Synthese. Beim Rhesusaffen mit chirurgischer Unterbrechung der Hypothalamus- Hypophysenachse und intakter ovarieller Funktion konnte durch konstant stündlich applizierte GnRH- Pulse ein normaler ovulatorischer Zyklus aufrechterhalten werden (Santoro et al., 1986). Bei Patientinnen mit hypothalamischer Amenorrhoe konnte durch pulsatile GnRH-Injektionen der Zyklus wiederhergestellt werden (Knobil, 1980).

Die Steroide Östrogen und Progesteron wirken abhängig von Konzentration und Wirkdauer hemmend oder steigernd auf die LH- Sekretion. In der Konzentration von  $10^{-9}$  mol / l und einer Wirkzeit von ca. 30 Min. bis zu mehreren Stunden hemmt Östrogen die GnRH- induzierte LH- Sekretion (Kurzzeiteffekt). Nach 15 Std. beginnt der stimulierende Langzeiteffekt, nachgewiesen bis zu einer Dauer von 50 Std. Die Verwendung von unphysiologisch hohen Dosen von Östrogen bedingt einen deutlich geringeren positiven oder sogar hemmenden Effekt. Dem entgegengesetzt wirkt Progesteron- bei Vorbehandlung der Zellen mit Östrogen- bei kurzer Einwirkdauer steigernd und bei langer hemmend (Emons et al, 1986).

Östradiol entfaltet seine Wirkung in der Hypophysenzelle nach Bindung an den klassischen Östrogen- Rezeptor (ER, später als ER $\alpha$  bezeichnet). ER $\alpha$  besteht aus 5 Regionen, u.a. einer DNS- bindenden- Region (DBD= DNA-binding-domain) und einer Hormon- bindenden Region (HBD= Hormone-binding-domain). Bei den Aktivierungsvorgängen am Rezeptor spielt das sogenannte "estrogen response

element“ ERE eine Rolle (Katzenellenbogen et al., 1996). In der Hypophyse der Ratte wurden unvollständige ER-Produkte (**truncated estrogen receptor products, TERP**) entdeckt, deren Funktion noch nicht bekannt ist (Friend et al., 1997). Später wurde als ein weiterer Östrogenrezeptor ER $\beta$  identifiziert, auch in der Rattenhypophyse (Kuiper et al., 1997; Mitchner et al., 1998). Nach der Identifizierung der Östrogenrezeptoren an der Hypophysenmembran der Ratte (Bression et al., 1986) beschäftigten sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Regulierung dieser Rezeptoren. Über die Wirkung der Steroide auf die Dichte der ER und Progesteronrezeptoren besteht kein Konsens. Östrogen (E)-Behandlung erhöht die mRNA der Östrogen-Rezeptoren ("ER") um das 2-3-fache. Progesteron, zusätzlich oder alleine angewendet, bleibt ohne Auswirkung auf die mRNA der ER (Friend et al., 1997). Östradiol-Behandlung hat keine Auswirkung auf die Zahl von ER $\alpha$  und ER $\beta$ , vermehrt aber die TERP um den Faktor 5-8 (Mitchner et al., 1998). Die Progesteroneffekte sind abhängig von der Mitwirkung von Östrogen, da die Synthese der Progesteronrezeptoren von diesem induziert wird (Krey und Kamel II, 1990). Die Bildung der mRNA der Progesteronrezeptoren wird durch einen bestimmten Östrogenlevel induziert, bei einer zu hohen Konzentration jedoch sinkt der Spiegel der mRNA. Die Progesteron-Rezeptoren selbst sind ohne Östrogenvorbehandlung nicht nachweisbar (Turgeon et al., 1999). Es gelang auch der Nachweis der mRNA für die beiden Isoformen A und B der Progesteron-Rezeptoren in der Rattenhypophyse. Beide liessen sich durch die Zugabe von Östradiol vermehren (Szabo et al., 2000). Die mRNA der hypophysären Progesteronrezeptoren wird durch Progesteronapplikation reduziert, die mRNA der Östrogen-Rezeptoren jedoch weder durch Gabe von Östrogen noch Progesteron beeinflusst (Bethea et al., 1996). Östrogen scheint auch direkt auf die mRNA der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des LH zu wirken (Shupnik, 1996).

### **1.3.3. Regulierung der GnRH-Rezeptoren durch Steroide**

Die Details der Wirkung der Steroide auf die Gonadotropinsekretion sind noch nicht geklärt. Die Langzeiteffekte werden über den klassischen genomischen Rezeptor-mechanismus, also an RNA- und Proteinsynthese gekoppelt, vermittelt. Erste entsprechende Veränderungen sind nach 40- 60 Min. nachgewiesen worden (Katzenellenbogen et al., 1979). Bei Kurzzeitbehandlung mit Östrogen sind die geno-

mischen Mechanismen wahrscheinlich nicht beteiligt.

Die Kurzzeiteffekte wurden in Perifusionsversuchen mit GnRH- stimulierten Rattenhypophysenzellen ermittelt: Schon nach 36 Min. Östrogen- Behandlung ist eine verringerte LH- Sekretion festzustellen (Frawley und Neill, 1984; Emons et al., 1986).

Es gibt deutliche Hinweise, dass die Östrogen- Kurzzeiteffekte über eine Steuerung der GnRH- Rezeptordichte geregelt werden: Inkubation mit  $10^{-9}$  M  $E_2$  Östrogen vermindert die Rezeptorenzahl bereits nach 30 Min. Zeitgleich ist auch der negative E- Effekt nachweisbar (Emons et al., 1988). Auch die Kurzzeit- Progesteroneffekte zeigen Einflüsse auf die GnRH- Rezeptordichte: Die Progesterongabe über 4 Std. führt bei E- vorbehandelten Hypophysenzellen zu einer deutlichen Steigerung der LH- Ausschüttung bei gleichzeitigem Ansteigen der GnRH- Rezeptordichte. Unter 48-, 72- und 96- stündiger Östrogen- Vorbehandlung wurde eine steigende Zunahme der GnRH- Rezeptoren an der Hypophyse beobachtet (Menon et al., 1985). Die Progesteron- Langzeitwirkung, einhergehend mit einer Abschwächung der GnRH- induzierten LH - Antwort gegenüber der E- Vergleichsgruppe, zeigte hier keinen Einfluß auf die Rezeptordichte (Emons et al., 1992). Die mRNA der GnRH-Rezeptoren wird analog zur Veränderung der Rezeptordichte durch E und P beeinflusst: Östrogen alleine angewandt steigert mRNA und Rezeptorzahl, zusätzliches Progesteron reduziert diese Wirkung (Turzillo et al., 1998; Sakurai et al., 1997).

Aus den oben aufgeführten Ergebnissen ergibt sich eine entscheidende Bedeutung für die ovariellen Steroide bei der Regulation der Gonadotropinsekretion.

#### **1.4. Der Mechanismus der GnRH-stimulierten LH-Sekretion**

Der Ablauf der Agonist- stimulierten Gonadotropinsekretion ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. Eine große Menge unterschiedlicher Verbindungen wirkt hier antagonistisch, synergistisch oder isoliert in verschiedenen, teilweise redundanten Systemen mit. Die Abhängigkeiten voneinander zu klären, ist erst ansatzweise gelungen. Der besseren Übersicht wegen folgt zuerst eine kurze Vorstellung des derzeitigen Modells in stark vereinfachter, auf die hier relevante Thematik beschränkter Form. Aus didaktischen Gründen wird eine Aufteilung ohne Berücksichtigung der angenommenen zeitlichen Reihenfolge der entsprechenden Reaktionen gewählt und die

in dieser Arbeit besonders bedeutsame Proteinkinase C herausgelöst besprochen:

#### **1.4.1. Rezeptor- G-Protein- Phospholipase C- Inositolphosphat- Interaktionen**

Nach Bindung des GnRH an seinen Rezeptor erfolgt über Vermittlung des membranständigen  $G_q$  und/ oder  $G_{11}$ - Proteins (Perrin et al., 1989; Hsieh und Martin, 1992; Shah und Milligan, 1994) die Aktivierung der Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) innerhalb von 5- 30 Sek. Die PLC hydrolysiert dann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) (Naor et al., 1981,1986; Hsieh und Martin, 1992). Unter Einschaltung der Phospholipase D resultiert daraus die Bildung der zwei aktiven second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$ ) und „früher“ Diacylglycerol, (DAG). Diese initiieren über eine Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels und der Translokation und Aktivierung der Proteinkinase C die Gonadotropinsekretion und -Synthese. In zahlreichen weiteren Reaktionschritten werden die Inositolphosphate bis zum Inositol abgebaut. Dieses dient dann wieder als Ausgangsmaterial für die Synthese des PIP $_2$  (Nishizuka,1992; Stojilkovic et al.,1994; Stojilkovic und Catt 1995; Ortmann und Dietrich, 1999). Die in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende Beteiligung der Steroide an der Steuerung der Gonadotropinsekretion bzw. -Synthese wird in 1.3.2./3. gesondert vorgestellt.

#### **1.4.2. Beteiligung von Kalzium an der LH- Sekretion**

Schon seit längerer Zeit ist die Bedeutung des Kalziums bei der Steuerung der LH-Sekretion bekannt. Die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels mittels Ionophoren führt ohne GnRH- Stimulation zur Gonadotropin- Freisetzung (Conn et al., 1979). Später wurde eine Zunahme der zytosolischen Kalziumkonzentration in der Hypophysenzelle nach GnRH- Stimulierung nachgewiesen (Clapper und Conn, 1985). Aus der Reaktion des IP $_3$  mit seinen intrazellulären Rezeptoren resultiert eine Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels durch Mobilisierung aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Reticulum (Stojilkovic und Catt 1992; Li et al., 1997). Dieses führt zu einem in Sekunden entstehenden Gipfel der Ca $^{2+}$ -Konzentration, der sofort wieder abfällt und in eine Plateauphase übergeht. Letztere ist abhängig vom Einstrom extrazellulären Kalziums durch Ca $^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran. Es handelt sich um sogenannte VSCC („voltage sensitive Ca $^{2+}$ -channels“, synonym mit

VGCC, "voltage gated calcium channels"), bei denen man zwischen dem spannungsgesteuerten, schnell reagierendem ("transient") T -Typ und einem verzögert wirkendem, Dihydropyridin- sensitivem L-Typ unterscheidet. (Izumi et al., 1990; Stutzin et al., 1989).

Die Steuerung der VSCC wird vom zytosolischen Kalziumspiegel selbst, der Proteinkinase C und eben von der Spannung übernommen (Stojilkovic und Catt, 1992). Der Einstrom durch die Plasmamembran scheint hauptsächlich dem Auffüllen der zelleigenen Kalzium- Speicher zu dienen (Tse und Hille, 1993). Auch die Mitochondrien sind möglicherweise als Speicher von Bedeutung, insbesondere zur Aufnahme schnell einströmenden Kalziums (Hehl et al., 1996). Desweiteren gibt es Hinweise auf sogenannte Kalziosomen, Kalziumspeichernden Vesikeln. Ob diese auch durch Ionenpumpen und /oder durch  $IP_3$  kontrolliert werden, ist noch unbekannt (Kukuljan et al., 1997). Die oben aufgeführten Reaktionen nach Rezeptor-Aktivierung scheinen bei einem  $Ca^{2+}$  Spiegel zu beginnen, der einer ruhenden Zelle entspricht. Der  $Ca^{2+}$  Spiegel wird also nicht schon bei der Bindung des Agonisten an den Rezeptor erhöht, sondern durch Wirkung des neu gebildeten  $IP_3$  (Berridge, 1984; Guillemette et al., 1987; Berridge und Irvine, 1990, Stojilkovic und Catt, 1995). Die beiden Phasen der Kalzium-Spiegelveränderung verlaufen parallel zur LH- Sekretion, da auch bei dieser nach Stimulierung eine rasche höhere Freisetzung (Gipfel) und eine folgende schwächere Leistung zu beobachten ist (Tasaka et al., 1988; McArdle et al., 1996). Wenn die GnRH- Einwirkung auf die gonadotropen Hypophysenzellen zu schwach ist, kommt es nicht zur typischen 2-phasigen Erhöhung intrazellulären Kalziums. Stattdessen wird bei subphysiologischer GnRH-Dosis eine unterschwellige, vorübergehende Konzentrationssteigerung des Kalziums beobachtet. Bei physiologischer GnRH- Dosis folgen oszillierende Kalziumspiegelveränderungen niedriger Höhe (Iida et al., 1991; Ortmann et al., 1992b; Tomic et al., 1994).

### **1.4.3. Die Proteinkinase C**

Die Proteinkinase C (PKC) wurde 1977 entdeckt (Inoue et al.) und 1979 als Phospholipid- abhängig und -aktiviert erkannt (Takai et al. 1979). Sie ist in fast allen Geweben vorhanden, wobei verschiedene Isoforme drei Untergruppen bilden: Konventionelle PKC (kPKC:  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$  und  $\gamma$ ), neue PKC (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  und  $\theta$ ) und

atypische PKC (aPKC:  $\zeta$ ,  $\lambda$  und  $\iota$ ; Nishizuka 1992). Die kPKC sind bei ihrer Aktivierung von Kalzium und DAG abhängig, die nPKC wird durch DAG und Phosphatidylserin (PS) aktiviert und ist kalziumunabhängig und die aPKC benötigt weder Kalzium noch DAG und wird durch PS und Polyphosphinositide wie PIP<sub>2</sub> aktiviert. Es handelt sich um eine Polypeptidkette, Molekulargewicht 77 kD. Diese besteht aus zwei funktionell verschiedenen Anteilen, welche durch Ca<sup>2+</sup>-abhängige Thiol- Proteasen getrennt werden können: Ein hydrophober Anteil zur Bindung an die Membranen und ein hydrophiler Teil, an dem die katalytischen Reaktionen ablaufen (Nishizuka, 1984). Ihre wichtige Rolle bei der Freisetzung der Gonadotropine postulierten z.B. Hirota et al. (1985). Hierbei scheinen die PKC $\alpha$  und  $\beta$  sowie PKC $\delta$  und  $\epsilon$  beteiligt zu sein (Naor et al., 1998; Harris, 1997). Es wurde ein fördernder Einfluß der PKC auf die Zahl der GnRH- Rezeptoren in den gonadotropen Zellen vorgeschlagen (Naor et al., 1987). Eine Modulierung der GnRH- Rezeptorendichte durch die PKC schien aber daraus nicht sicher ableitbar (Braden,1991; zum Überblick: Conn et al.,1995). Ein Schritt der Einflußnahme ist möglicherweise die Mitsteuerung der GnRH-Rezeptor- Gene (White et al, 1999; Lin und Conn, 1999). Bei Verwendung von Retinal, einer Substanz, die die PKC- Aktivität aufzuheben vermag, wurde eine stark verminderte LH- Sekretion bei Stimulation mit GnRH beobachtet. In von PKC- befreiten Zellen wurden alle Effekte der stimulierenden Phorbolster auf den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und die LH- Sekretion aufgehoben. Die Wirkung von GnRH auf die Gonadotropinsekretion wurde abgeschwächt (Stojilkovic et al, 1991). Diese Ergebnisse deuten auf eine partielle Abhängigkeit der GnRH-stimulierten LH- Sekretion von PKC hin. Andererseits wurde bei Verwendung von verschiedenen GnRH- Antagonisten jedoch zumeist keine Wirkung auf die Phorbolster- induzierte LH-Sekretion festgestellt (Saito et al., 1994).

Normalerweise liegt die PKC in überwiegend gelöster Form im Zytosol vor. Bei Aktivierung findet eine Umverteilung zu einer membranständigen Form statt, wodurch das Enzym in die transmembranösen Signale und in die Regulation des Zellzyklus einbezogen wird. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung des DAG an das Enzym, wodurch ein schneller Anstieg seiner Affinität zu Ca<sup>2+</sup> und Phospholipiden beobachtet wurde (Hirota et al., 1985; Naor et al., 1985; Huckle und Conn 1987). Möglicherweise hat die Phospholipase D eine Bedeutung bei der Erhaltung der DAG- Produktion und damit Aktivierung der PKC (Nishizuka 1992; Stojilkovic und Catt, 1995). Der direkten

und sofortigen Steigerung der PKC- Aktivität nach GnRH- Stimulation folgt unmittelbar vor der LH- Sekretion eine Abnahme der Aktivität (Andrews et al., 1990).

Die mRNA der PKC in den Gonadotropin- bildenden Hypophysenzellen läßt sich in vitro durch GnRH und Phorbol ester stimulieren (Harris et al., 1997; Shraga-Levine et al., 1996). Es ergeben sich Hinweise auf eine Steigerung der LH- $\beta$ -mRNA durch die Phorbol ester PMA bzw. TPA bei kontinuierlicher Anwendung (Andrews et al., 1988; Haisenleder et al., 1995; Vasilyev et al., 2001).

#### **1.4.4. Weitere Transmitter**

Neben den obengenannten Verbindungen sind noch zahlreiche weitere Transmitter an der Gonadotropinsekretion beteiligt: Wichtig bei diesem Reaktionsablauf der LH-Sekretion ist Arachidonsäure (AA), eine aus der Inositolphosphat- Kaskade hervorgehende Fettsäure: In vitro lässt sich durch Stimulation mit AA oder ihrem Lipoxygenase- Metaboliten eine Verdoppelung der LH-Sekretion gegenüber der Basalrate erzielen. Andererseits sinkt bei Verwendung eines Lipoxygenasehemmers die GnRH-stimulierte Gonadotropin-Ausschüttung um etwa die Hälfte (Chang et al., 1986, 1987; Naor et al., 1995). Der Reaktionsweg der AA ist unabhängig von extrazellulärem Kalzium (Naor und Catt, 1981).

Desweiteren wird über die Mitwirkung der mitogen- aktivierten Proteinkinasen (MAPK) an der Gonadotropin- Sekretion und -Synthese diskutiert. Diese wird von einigen Protein G-gekoppelten Rezeptoren aktiviert und reagiert möglicherweise durch Beteiligung der Proteinkinase C (Sundaresan et al., 1996; zum Überblick: Kraus et al., 2001).

Viele weitere Verbindungen könnten bei der Steuerung der LH/ FSH-Freisetzung von Bedeutung sein: In zahlreichen Studien wurde nahezu jeder vorstellbare Transmitter als irgendwie beteiligt an der Gonadotropinsekretion ermittelt (Levine, 1997; Naor, 1990; Stojilkovic und Catt, 1992, 1995; Stojilkovic et al., 1994).

## **1.5. Problemstellung**

In dieser Arbeit sollen die Einflüsse der Steroide Östradiol und Progesteron auf die GnRH- und Proteinkinase C- stimulierte LH- Sekretion und -Synthese in kultivierten Rattenhypophysenzellen ermittelt werden, da nach den beschriebenen Studien die Mechanismen der LH-Sekretion und -Synthese in Hypophysenzellen noch nicht eindeutig aufgeklärt wurden.

Ferner wird in weiteren Experimenten die Abhängigkeit dieser Triggermechanismen von extrazellulärem Kalzium untersucht werden.

### **1.5.1. Einflüsse der Steroide Östradiol und Progesteron auf die LH-Sekretion bei direkter PKC- Stimulierung**

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass durch synthetisches DAG die PKC direkt stimuliert werden kann, ohne gleichzeitig den PIP<sub>2</sub>- Abbau einzuleiten (Kaibuchi et al., 1983). Die als Tumor- Promoter bekannten Phorbol- Ester sind aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit mit DAG ebenfalls in der Lage, die PKC direkt zu stimulieren. Dafür sind nur sehr geringe Konzentrationen erforderlich (Castagna et al., 1982). Auch in der gonadotropen Zelle sind diese Substanzen wirksam, z.B. stimuliert Tetra- Decanoyl- Phorbol- Acetat (TPA) wie GnRH sowohl die LH- Sekretion (Naor und Catt, 1981) als auch die Translokation der PKC von einer zytosolischen in eine membranständige Form (Albert et al., 1985).

Zwar können Phorbol- Ester und membranständige Diacylglycerole die Proteinkinase C aktivieren und damit eine LH- Sekretion aus Hypophysenzellen stimulieren, doch wird die Bedeutung dieses Enzyms für die GnRH- induzierte Gonadotropinfreisetzung kontrovers diskutiert (zur Übersicht: Naor, 1990). Es gibt sogar Veröffentlichungen, wonach die Anwesenheit der Proteinkinase C für eine Agonist- induzierte Gonadotropinsekretion nicht erforderlich sei (Beggs und Miller, 1989; Johnson et al., 1988; McArdle et al., 1987; Conn et al., 1995).

Die Modulation der GnRH- stimulierten LH- Sekretion ist allgemein anerkannt.

Zum Zeitpunkt des Beginns unserer Versuche lagen jedoch erst wenige Arbeiten vor, die sich mit den Effekten der Steroide auf die PKC- Reaktionswege bei der LH-

Sekretion befassten. Bei keiner dieser Arbeiten war die entsprechende Vorbehandlung mit Östradiol *und* Progesteron erfolgt.

Daher wird dieser Arbeit untersucht, inwieweit die ovariellen Steroide Östradiol und Progesteron die Proteinkinase C-vermittelte LH- Sekretion in kultivierten Rattenhypophysenzellen beeinflussen. Zur Stimulierung der Proteinkinase C wurde der Phorbolster TPA benutzt. Die verschiedenen Effekte der Steroide, die bei der Modulierung GnRH-stimulierter Kulturen von Rattenhypophysen bereits ermittelt worden sind, sind möglicherweise auch bei der direkten Stimulation der PKC wirksam. Zum Vergleich werden alle Versuche auch parallel mit GnRH als Stimulans durchgeführt.

### **1.5.2. Untersuchung der LH- Neusynthese bei direkter PKC- Stimulierung steroidvorbehandelter Hypophysenzellen**

GnRH stimuliert neben der Sekretion der Gonadotropine auch deren Synthese und Speicherung (Liu und Jackson, 1985; Andrews et al., 1988). Nicht geklärt ist, inwieweit die Proteinkinase C daran beteiligt ist. Es gibt Hinweise auf eine durch PKC induzierte Neusynthese von LH (Liu und Jackson, 1987; Stojilkovic et al., 1988a). Demnach kommt es sowohl bei Stimulation mit GnRH als auch bei direkter Aktivierung der Proteinkinase C mit Phorbolestern zu einer Steigerung des Gesamt- LH (intrazellulär verbliebenes und sezerniertes Hormon).

Daher wird in dieser Arbeit untersucht werden, ob bei direkter Stimulation der PKC mit oder ohne Steroidbehandlung der Hypophysenzellen eine Neusynthese von LH nachweisbar ist.

### **1.5.3. Abhängigkeit der Proteinkinase C- vermittelten LH- Sekretion aus steroidvorbehandelten Hypophysenzellen von extrazellulärem Kalzium**

Die Bedeutung der  $Ca^{2+}$ - Kanäle für die gonadotrope Signalübertragung wurde bei Versuchen mit  $Ca^{2+}$ - Kanal- Blockern nachgewiesen. Bei Einsatz dieser sinkt die GnRH-stimulierte LH- Sekretion beträchtlich (Marian und Conn, 1979). Es lässt sich sogar durch Stoffe, die den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel zu steigern imstande sind, eine LH-Sekretion wie bei Stimulation mit GnRH erreichen (Conn et al. 1979). Voraussetzung hierfür ist wie auch bei der physiologischen Stimulation durch GnRH das Vorliegen eines ausreichenden extrazellulären Kalzium- Spiegels. Bei kalziumfreiem Medium sinkt die

basale LH- Sekretion um ca. 50%, die GnRH- stimulierte um ca. 70 % (Conn et al., 1979). Das Ausmaß der Abhängigkeit der PKC vom extrazellulärem Kalzium- Spiegel bei der LH- Sekretion wurde ebenfalls untersucht: Bei der kalziumfreien Stimulierung der LH- Sekretion mit dem Phorbolster TPA wurde die LH- Antwort um ca. 30 % gesenkt (Stojilkovic et al., 1988b). Mit Phorbolestern gelang auch eine Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Albert et al., 1985).

In dieser Arbeit wird in einer Versuchsreihe  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Medium verwendet, um das Ausmaß der vorbeschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der PKC zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Frage, inwieweit die steroidalen Effekte durch das fehlende extrazelluläre Kalzium beeinträchtigt werden.

Als Versuchsanordnung aller Teilschritte wurden statische Zellkulturen von Hypophysen weiblicher Ratten in unterschiedlichen Zyklusstadien verwendet. In diesem System sind hypothalamische oder ovarielle Einflüsse ausgeschlossen. Die zu erwartende Varianz ist in einem Pool aus Zellen geringer als bei Verwendung individueller Hypophysen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Hormone

Östradiol (E<sub>2</sub>, Reinheit > 99,9%, Sigma/ Deisenhofen) wurde in Ethanol bei +4 °C in einer Stammlösung von 10<sup>-7</sup>M gelagert. Die Endkonzentration lag in allen Versuchen bei 10<sup>-9</sup>M. Progesteron (P, Reinheit > 99,9 % , Sigma, Deisenhofen) wurde wie E<sub>2</sub> gelagert, die Stammlösung betrug 10<sup>-4</sup>M, die Endkonzentration in allen Versuchen 10<sup>-7</sup> M. Gonadotropin- Releasing- Hormone (GnRH) und 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA, beides Sigma/ Deisenhofen) wurden in PBS (Phosphate Buffered Saline, Biochrom/ Berlin) gelöst und bei 20 °C gelagert.

### 2.2. Zellpräparation und Zellkultur

Die Hypophysen für die Präparation von primären Monolayer Zellkulturen (2x10<sup>5</sup> vitale Zellen pro Kultur) wurden von reifen weiblichen Wistar Ratten (200-220 g , Winkelmann / Borchon-Kirchborchen) gewonnen. Die Tiere befanden sich in verschiedenen Zyklusstadien. Die genaue Beschreibung der Präparation siehe bei Hyde et al.,1982, und Emons et al., 1984. Zusammengefasst ergibt sich folgender Ablauf: Nach Tötung der Ratten mittels CO<sub>2</sub> wurden die Hypophysen entnommen und in vorgewärmtes Medium A gegeben. (Präparationsmedium: Medium 199 (mit Hanks´ Salzen und L- Glutamin, ohne NaHCO<sub>3</sub>, Biochrom/ Berlin) mit 3 g/ l BSA (Bovine Serum Albumin, Bering, Marburg), 25 mM HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure), 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycinsulfat (alles Biochrom/ Berlin).

Zuerst wurden die Hypophysen in Stücke von ca. 0,5 mm Kantenlänge zerschnitten und anschliessend zweimal in Medium A gewaschen.

Nun wurden 5 g/l Trypsin (Sigma/ Deisenhofen T-8253) in Medium A hinzugegeben und bei leichtem Schütteln bei 37° C für 15 min inkubiert. Es folgte eine 1-minütige Inkubation mit zusätzlicher Desoxyribonuclease in Medium A (0,2 mg/l, Sigma/Deisenhofen D-0870). Dann wurde der Überstand dekantiert und Medium A mit 1g/l Soybean Trypsin-Inhibitor (Sigma/Deisenhofen T-9003) zugefügt. Nach weiteren 5 min Inkubation und Dekantieren wurde das Gewebe mit in PBS 1 gelösten 2 mM EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure) für 5 min, danach 1 mM EDTA-PBS1 für 15 min. inkubiert. (PBS1: PBS

ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (Biochrom/Berlin) mit BSA, Penicillin und Streptomycin (P / S) wie Medium A).

Danach wurden die Stücke dreimal mit PBS1 gewaschen und durch 5-maliges Dispergieren mit einer Pasteur- Pipette dissoziiert. Nach Filtration durch eine mit PBS1 begossene Nylongaze (Porengrösse 100  $\mu\text{m}$ ) wurden die Zellen durch Zentrifugation (250 x g) gesammelt und mit 10 ml PBS1 und 40 ml Medium B resuspendiert.

(Medium B: Inkubationsmedium: Medium 199 mit 1,4 g/l Natriumbicarbonat, 100 ml/l Pferdeserum (Biochrom/Berlin), vorbehandelt mit 20 g/l Aktivkohle (Norit A., Serva, Heidelberg) und 2 g/l Dextran T 70 (Pharmacia/ Uppsala, Schweden) sowie Penicillin und Streptomycin wie Medium A. Zur Ermittlung der Ausbeute wurden Aliquote der Zellsuspension mit einem gleichen Volumen Trypanblau (5 g/l in physiologischer Kochsalzlösung, Biochrom/ Berlin) versetzt.

Im letzten Arbeitsgang wurden die Zellen mit Medium B auf  $2 \times 10^5$  lebende Zellen pro ml Medium verdünnt, je 1 ml davon auf die Schälchen der Kulturplatten (Costar/Cambridge, USA) aufgetragen und bei  $37^\circ\text{C}$  in einer wassergesättigten Atmosphäre aus Luft und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Um das Anwachsen der Zellen zu ermöglichen, wurde mit den Versuchen frühestens 40 Std. nach Präparationsende begonnen.

## **2.3. Ablauf der Experimente**

### **2.3.1. Effekte von Östrogen und Progesteron auf die TPA- oder GnRH- induzierte LH-Sekretion kultivierter Rattenhypophysenzellen**

Wir arbeiteten mit 8 Konzentrationen GnRH und 4 des Phorbolesters TPA in jeweils vier Vorbehandlungsarten (1x Vehikel, 3x mit Steroid) mit je 3 Kulturen. Wir benötigten insgesamt also 144 Einzelergebnisse, diese gewannen wir durch Verwendung von 12 Kulturplatten mit je 12 Schälchen.

Vorbereitung:

Zuerst wurden die Steroide Östradiol (E) und Progesteron (P) in vorgewärmtem Medium B auf  $10^{-9}$  bzw.  $10^{-7}$  M verdünnt. Dabei wurde eine Lösung nur mit E, eine mit beiden Steroiden sowie eine Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol (Vehikel, V) angesetzt.

Erster Mediumwechsel, Stunde 0 :

Nach Anwachsen der Zellen wurde das bisherige Nährmedium vorsichtig abgezogen und verworfen. Nun wurden die Kulturen mit den drei möglichen Medien belegt: 3 V-Platten, 6 E- und 3 E+P- Platten.

Zweiter Mediumwechsel, Stunde 24:

Wechsel wie oben

Dritter Mediumwechsel, Stunde 44:

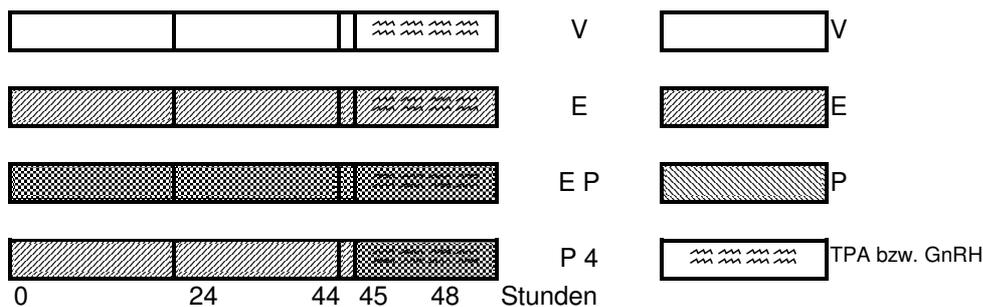
Das Medium der V- und EP- Platten wurde wie bisher gewechselt. Drei der E- Platten erhielten wiederum E. Die drei übrigen E- Platten wurden jetzt mit E+P belegt.

Vierter Mediumwechsel, Stunde 45:

Identischer Vorgang wie bei drittem Wechsel, zusätzlich erfolgte die Stimulation mit 8 Konzentrationen GnRH (es wurden  $8 \times 4 \times 3 = 96$  Schälchen benötigt) und TPA mit entsprechend 4 Konzentrationen bzw. 48 Schälchen.

Die Kulturplatten wurden für weitere 3 Std inkubiert, dann wurden die Überstände abgezogen und der weiteren Auswertung zugeführt. Es ergaben sich somit die Gruppen: V 48 Std., E 48 Std., E48 Std.+P 48 Std. E 48 Std. + P 4 Std.

Im folgenden werden diese Gruppen mit V, E, EP und P4 benannt.



Schematische Darstellung der in den meisten Experimenten benutzten Basis-Versuchsanordnung.

Mediumwechsel nach 0, 24, 44 und 45 Stunden. Zugabe von GnRH oder TPA nach 45 Std. Vorinkubation.

## **2.3.2. Wirkung von Steroiden und / oder Agonisten auf das Gesamt- LH**

### **2.3.2.1. Effekte von Östrogen und Progesteron auf die LH- Gesamtmenge.**

2 Platten wurden analog zu obigem Verfahren, 1.-3. Mediumwechsel, behandelt, es fehlt die Stimulation mit TPA / GnRH.

Nach 48 Std. wurden die abgezogenen Medien gesammelt und bei  $-20^{\circ}$  C gelagert.

Dann wird der LH- Gehalt mittels RIA bestimmt, um die Sekretionsleistung zu messen.

Zur Gewinnung des intrazellulär verbliebenen LH wurden die nun trockenen Zellen wie folgt lysiert: In jedes Schälchen wurde 1 ml straight PBS 0,3% mit 0,1% Triton gegeben und die Kulturplatten dann bei  $-70^{\circ}$  C tiefgefroren. Sie wurden wieder aufgetaut, dann nochmals eingefroren und abgetaut. Die Proben wurden nun abgezogen. In die Schälchen wurde nun je 1 ml PBS gegeben und restlichen Zellen mit einem speziellen Gummispatel vom Plattenboden entfernt. Diese Zelllösung wurde auf die entsprechenden Proben aus dem ersten Lyseschritt gegeben und die Röhrchen zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand direkt in neue Röhrchen gegeben.

Schließlich wurde der LH- Gehalt mittels RIA bestimmt (intrazellulärer Wert).

### **2.3.2.2. Effekte von Östrogen und Progesteron auf die LH- Gesamtmenge bei Stimulation mit GnRH oder TPA**

Aufbau wie 2.3.2.1., jedoch mit Stimulation durch GnRH  $10^{-9}$  und  $10^{-6}$  M sowie TPA  $10^{-9}$  M in den letzten 3 Std. Die Auswertung ist identisch mit der in 2.3.2.1.

### **2.3.2.3. Effekte der GnRH- oder TPA- Stimulation über verlängerten Zeitraum auf die LH- Gesamtmenge**

2 Platten wurden mit je GnRH  $10^{-9}$  M und  $10^{-6}$  M sowie TPA  $10^{-8}$  und  $10^{-7}$  M stimuliert. Die vier Medienwechsel wurden zu den Zeiten wie in den vorherigen Versuchen, aber ohne Steroidbehandlung durchgeführt. Neben der 3 Std.- Stimulation mit GnRH bzw. TPA wurde hier auch eine Platte 6 Std. und Eine 9 Std. lang inkubiert. Eine 4. Platte trug die Kontrollmedien der Stimulationslösung: Für GnRH 0,01 % PBS mit 0,1% BSA, für TPA 0,01 % Dimethylsulfoxid. Nach Erreichen des Stimulationsendes wurden die Medien abgezogen und und die Zellen wie oben beschrieben lysiert. Anschließend erfolgte wiederum die Bestimmung der LH- Anteile.

### **2.3.3. Effekte von Östrogen und Progesteron auf GnRH-/TPA- induzierte LH-Sekretion in kalziumfreiem Medium**

In Vorversuchen ohne steroidale Vorbehandlung wurden 4 Platten mit 8 Konzentrationen ( $0, 10^{-11}$ - $10^{-6}$ M) GnRH und 2,5 Platten mit 5 Konzentrationen ( $0, 10^{-10}$ - $10^{-7}$ M) TPA belegt. Die Inkubationabläufe entsprechen der Anleitung in 2.3.1. – ohne steroidale Vorbehandlung. Die Hälfte der Schälchen wurde hier mit kalziumfreiem Inkubationsmedium befüllt (bei 250 ml: 2,74 g spezielles Medium 199 ohne  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,35 Natriumbikarbonat, 2 g NaCl, 0,25 g/l BSA, 0,25 g P/S. Es wurde eine Osmolalitätsmessung durchgeführt).

In der eigentlichen Versuchsanordnung wurden GnRH  $10^{-9}$  und  $10^{-6}$ M und TPA  $10^{-8}$  und  $10^{-7}$ M in gleicher Weise wie bei 2.3.1. zur Stimulation steroidvorbehandelter Zellen genutzt. Bei der Hälfte der Platten wurde hier  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Medium 199 benutzt.

## **2.4. Auswertung der Experimente**

### **2.4.1. LH-Bestimmung**

Material:

Tracer: RAT- LH-I-7 (NIDDK, s. u.), markiert mit J125 (Hoechst, Marburg).

Rabbit- Serum (Gibco, Karlsruhe)

LH- Antiserum (NIDDK)

Antikörper II: Gamma-B-Precipitating Antiserum, Anti- Rabbit Serum (Donkey, Wellcome, Burgwedel)

Polyethylenglycol 6000 (PEG, Merck- Schuchardt, Hohenbrunn).

Ablauf:

Die LH- Konzentration der Proben wurde radioimmunologisch bestimmt. Dazu wurde die Standardpräparation RP-2 (AFP 56660) der National Pituitary Agency (Baltimore , MD, USA) benutzt, modifiziert nach einer Anleitung von Solano et al. (1979).

### **2.4.2. Statistische Methoden**

Die Absolutwerte für extra- bzw. intrazelluläres LH wurden jeweils in Prozent der LH-Werte aus nicht steroidal behandelten Proben („Vehikel“ = 100 %) umgerechnet. Jeder Versuch wurde mindestens zweimal reproduziert. Aus jedem Experiment ergaben sich durch die Dreifachbestimmung drei Werte, insgesamt gingen also mindestens neun Werte pro Behandlung in die Statistik ein. Nach Prüfung der Varianz- Homogenität unter Nutzung des Bartlett- Testes wurde die Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Aus diesen Relativ- Daten wurden Mittelwert und SEM berechnet. Mit dem Newman- Keuls- Test bzw. dem Nemenyi- Test wurden die drei Gruppen E48 Std., E48 Std. + P48 Std. und E48 Std. +P4 Std. gegenüber Vehikel und untereinander auf statistische Signifikanz überprüft.

Bei nicht homogenen Varianzen wurden die Daten mit dem Kruskal- Wallis- Test hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Effekte von Östrogen und Progesteron auf die GnRH- bzw. TPA-stimulierte LH- Sekretion

Mit Östradiol vorbehandelte Rattenhypophysenzellen zeigten bei Stimulation mit GnRH wie TPA eine gegenüber der Vergleichsgruppe V (ohne Steroid) gesteigerte LH - Sekretion. Hierbei besteht eine Abhängigkeit von der Konzentration des Stimulans: GnRH entfaltet seine größte Wirkung bei  $10^{-7}$  M und TPA bei  $10^{-8}$  M.

Die gleichzeitige Vorbehandlung der Zellen mit Östradiol und Progesteron führt zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während bei der nachfolgenden GnRH- Stimulation bei allen verwandten Konzentrationen eine gegenüber der Vergleichsgruppe abgeschwächte LH- Sekretion resultiert, ist dieser negative Effekt bei Verwendung von TPA als Sekretionförderer nicht zu sehen.

In den höheren Dosierungen ist sogar eine weitere Steigerung der LH- Sekretion gegenüber der Östrogen- Gruppe zu erkennen.

Die kurzzeitige Progesteron-Anwendung Östrogen- vorbehandelter Zellen bewirkte nach Stimulation mit GnRH oder TPA eine maximale Steigerung der LH- Ausschüttung gegenüber der Östrogen- Gruppe.

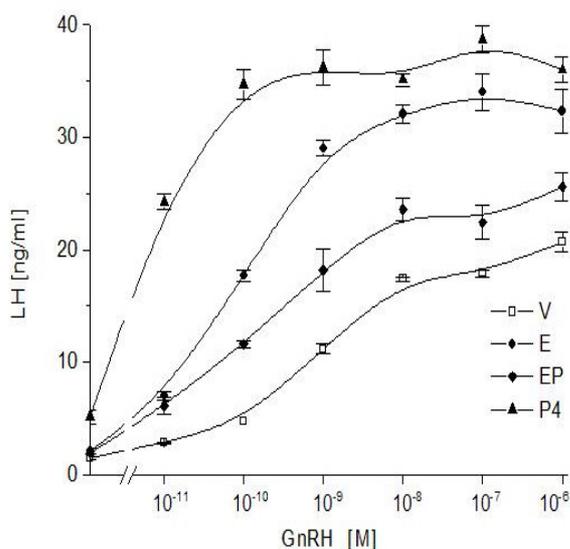


Abb.1: Effekte von Östradiol-(E) und Progesteron-(P) Behandlung auf die GnRH-Stimulation von Rattenhypophysenzellen. Die Zellkulturen wurden 48 Std. mit Vehikel (V, 0,2% Ethanol), oder 1nM Östradiol (E), oder mit 1 nM Estradiol und 100 nM Progesteron (EP) oder 48 Std. mit 1 nM Östradiol und 4 Std. mit 100 nM Progesteron (P4) vorbehandelt. Während der letzten 3 Std. der Inkubation wurden die Kulturen mit steigenden Konzentrationen von GnRH stimuliert. Es werden hier die repräsentativen Daten eines von drei Experimenten gezeigt. V gegenüber E signifikant und E gegenüber P4 signifikant. Die statistische Untersuchung erfolgte mit den Daten von drei unabhängigen Untersuchungen.

Erratum: EP zwischen V und E

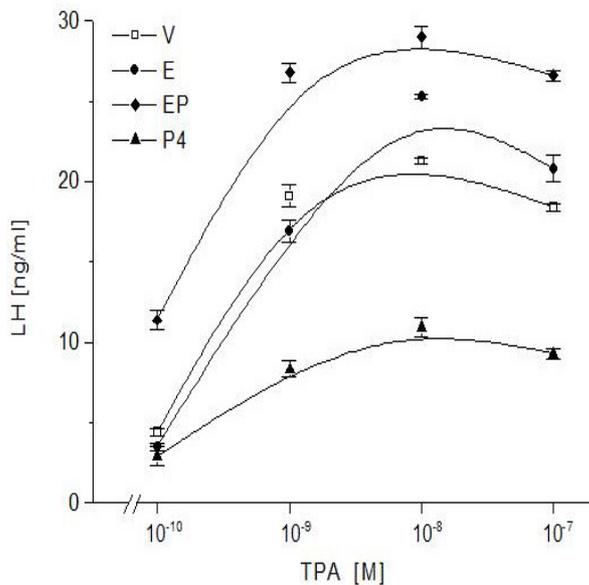


Abb.2: Effekte von Östradiol-(E) und Progesteron-(P) Behandlung auf die TPA-Stimulation von Rattenhypophysenzellen. Die Zellkulturen wurden 48 Std. mit Vehikel (V, 0,2% Ethanol), oder 1nM Östradiol (E), oder mit 1 nM Östradiol und 100 nM Progesteron (EP) oder 48 Std. mit 1 nM Östradiol und 4 Std. mit 100 nM Progesteron (P4) vorbehandelt. Während der letzten 3 Std. der Inkubation wurden die Kulturen mit steigenden Konzentrationen von TPA stimuliert. Es werden hier die repräsentativen Daten eines von drei Experimenten gezeigt. V gegenüber E signifikant und E gegenüber P4 signifikant. Die statistische Untersuchung erfolgte mit den Daten von drei unabhängigen Untersuchungen.

Erratum: Bei max. Dos. Von Unten nach oben: V,E,EP,P4

## 3.2. Untersuchungen zur Neusynthese von LH

### 3.2.1. Effekte von Östradiol und Progesteron auf die LH- Neusynthese

Die Behandlung von Rattenhypophysenzellen mit Östradiol über 48 Std. alleine oder mit zusätzlichem Progesteron über 48 Std. oder 4 Std. veränderte nicht die LH-Gesamtmenge (extrazellulär entsprechend der Sekretion und intrazellulär verbliebener Rest). Die alleinige Östrogen- Behandlung führte zu einer Sekretionssteigerung im Vergleich zur Vehikel- Gruppe. Dieses wurde durch Kurzzeit- Progesteron- Behandlung noch gesteigert. Die gleichzeitige Behandlung mit beiden Steroiden schwächte das LH-Sekretionsergebnis gegenüber alleiniger Östrogen- Anwendung ab.

	LHi	LHs	LH total
V	33+-5*	6+-2	40+-6
E	29+-4	11+-2	39+-7
EP	32+-3	9+-3	40+-4
P4	26+-4	15+-2**	41+-4

Tabelle 1: Effekte von Östradiol und Progesteron auf die LH-Sekretion und mögliche Neusynthese von Rattenhypophysenzellen. Diese wurden für 48 Std. mit Vehikel (V: 0,2% Ethanol), 1nM Östradiol (E), 1 nM Östradiol + 100nM Progesteron (P) oder für 48 Std. mit Östradiol und 4 Std. mit Progesteron inkubiert. Danach wurde im Kulturmedium und nach Zell-Lyse der extra- bzw. intrazelluläre LH- Anteil bestimmt.

- LH Werte sind in [ng/ml] angegeben. \*\* Zeigt P < 0,05 gegenüber E 48 .

### 3.2.2. Effekte von Östradiol und Progesteron auf die LH- Neusynthese bei Stimulierung der Zellkulturen mit GnRH oder TPA

Hier wurden steroidvorbehandelte Rattenhypophysenzellen mit GnRH bzw TPA stimuliert und die LH- Sekretionsleistung sowie das intrazellulär verbliebene LH bestimmt. Die modulierenden Effekte der Steroide auf die Stimulation entsprachen unseren obigen Ergebnissen: Östrogen- Vorbehandlung und mehr noch die zusätzliche Kurzzeit- Progesteron-Anwendung steigerten die LH-Sekretion bei GnRH- Stimulation. Die kombinierte Langzeit- Behandlung mit Östradiol und Progesteron schwächt die Sekretion jedoch gegenüber alleiniger Östrogenanwendung ab. Bei der Stimulation mit TPA ist der negative Effekt bei der Progesteron- Langzeit-Vorbehandlung nicht zu erkennen. Der gemessene intrazelluläre LH- Anteil war jedoch in allen Untersuchungen in dem Maße kleiner, wie die Sekretion zugenommen hatte. Es ergab sich somit kein Anhalt für eine LH- Neusynthese.

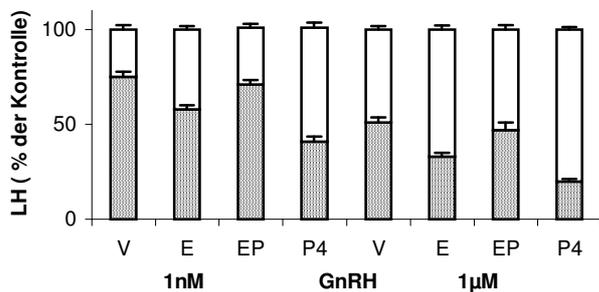


Abb.3 Effekte von Östradiol (E) und Progesteron (P) auf die Gesamt-menge (intrazellulär und sezerniertes LH) bei GnRH – stimulierten Rattenhypophysenzellen. Die Steroidbehandlung entspricht der Beschreibung der Abb.1. In den letzten 3 Std. der Behandlung wurden die Zellen mit GnRH (1nM, 1µM) stimuliert. Die Werte für Gesamt- LH (extrazellulär/ sezerniert- *weiß*-, und intrazellulär verbliebenes LH- *grau*) wurden in % ausgedrückt. Berechnungsgröße ist die Vehikel- Gruppe mit 100%. Absolute Werte für das Gesamt- LH der Vehikel- Gruppen: 35+2 für GnRH 1nM, 40+4 ng/ml für GnRH 1 µM. Die Ergebnisse wurden aus 4 unabhängigen Versuchen gewonnen.

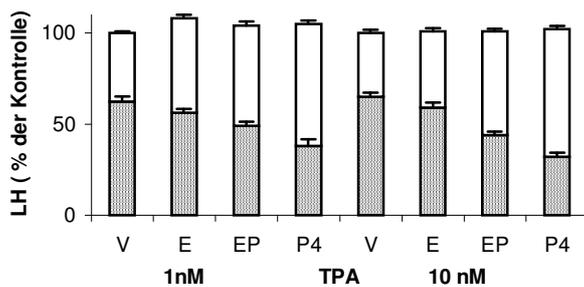


Abb.4 Effekte von Östradiol (E) und Progesteron (P) auf die Gesamtmenge (intrazellulär und sezerniertes LH) bei GnRH- bzw TPA- stimulierten Rattenhypophysenzellen. Die Steroidbehandlung entspricht der Beschreibung der Abb. 1. In den letzten 3 Std. der Behandlung wurden die Zellen mit TPA (1 nM, 10nM) stimuliert. Die Werte für Gesamt-LH (extrazellulär/ sezerniert- *weiß*-, und intrazellulär verbliebenes LH- *grau*-) wurden in % ausgedrückt. Berechnungsgröße ist die Vehikel- Gruppe mit 100%. Absolute Werte für das Gesamt- LH der Vehikel- Gruppen: 36+2 und 36+2 für TPA 1 bzw 10 nM.

### 3.2.3. Effekte von GnRH oder TPA auf die LH- Neusynthese bei Stimulation über einen verlängerten Zeitraum

Nach GnRH- bzw TPA- Stimulation über 3, 6 oder 9 Std. von Rattenhypophysenzellen (nicht Steroid- behandelt) ergab sich kein Anhalt einer Neusynthese des Hormons: Die Gesamtmenge an LH überschritt bei stimulierten Kulturen nicht die der unstimulierten Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Sekretionssteigerung des LH gegenüber der Basalrate (Vehikel). Diese nimmt bei längerer Stimulationsdauer noch zu. Im gleichen Maße sank aber der intrazelluläre Anteil des Gonadotropins.

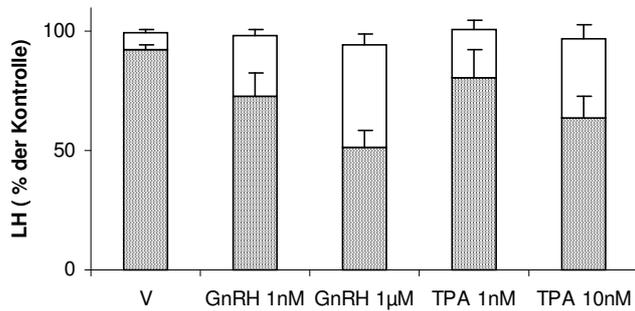


Abb. 5

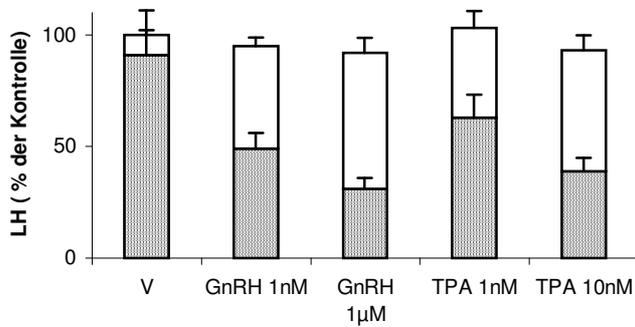


Abb. 6

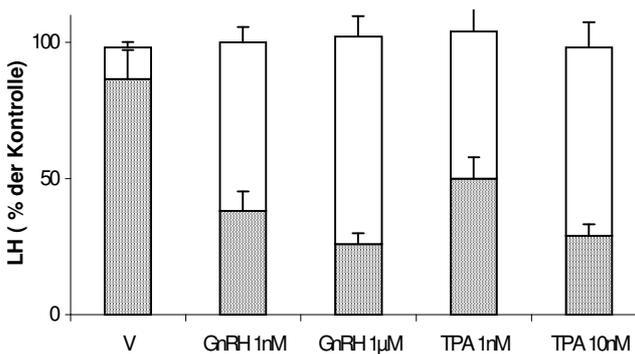


Abb. 7

Abb. 5, 6, 7 : Wirkung von GnRH- und TPA- Stimulation von Rattenhypophysenzellen ohne steroidale Vorbehandlung auf die Gesamtmenge von LH (sezernierter und intrazellulärer Anteil). Die Zellen wurden mit 1nM und 1µM GnRH sowie 1 nM und 10 nM TPA über 3, 6 und 9 Std. stimuliert. Die LH-Gesamtmenge wird in ihrem sezernierten Anteil (weiß) und im intrazellulär verbliebenen (grau) dargestellt. Letzterer wurde durch Lysierung der Zellen nach Stimulationsende bestimmt. Die Daten werden in % von der Gesamt-LH- Menge der Vehikel-Gruppe (0,2% Ethanol, kein Stimulans) dargestellt. Zwischen den Gesamt- LH- Werten der verschiedenen Behandlungen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Das Gesamt- LH in der V-Gruppe ergab für die 3, 6 und 9 Std.- Inkubation 73+-8, 70+-8 und 67+-8 ng/ml.

### 3.3. Effekte von Östradiol und Progesteron auf die LH- Sekretion GnRH- oder TPA- stimulierter Zellkulturen in kalziumfreiem Medium

Hier zeigt sich die deutliche Abhängigkeit der GnRH- Wirkung auf die LH- Sekretion vom extrazellulären Kalzium: Die Sekretionsleistungen fallen im Vergleich zur Versuchsgruppe mit herkömmlichem Medium 199 um ca. 80 % ab.

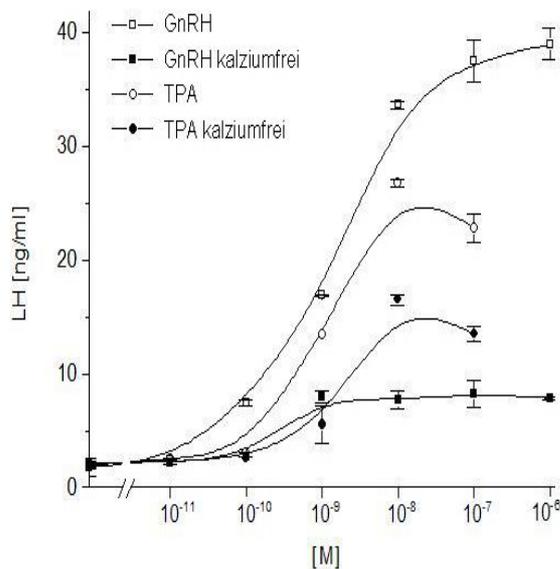


Abb.8 Abhängigkeit der GnRH-/ TPA- induzierten LH- Sekretion von extrazellulärem Kalzium: Stimulierung von kultivierten Rattenhypophysenzellen in kalziumhaltigem und kalziumfreiem Medium über 3 Std. Aus einem von zwei ähnlich ausgefallenen Experimenten wurde jeweils der Mittelwert der Dreifachbestimmung dargestellt.

Die modulierenden Wirkungen der Steroide auf die LH- Sekretion bei GnRH- Stimulation von Rattenhypophysenzellen sind auch bei Verwendung kalziumfreien Nährmediums klar erkennbar: Eine Steigerung durch Östradiol über 48 Std. (signifikant gegenüber der Vehikel- Gruppe mit 0,2 % Ethanol), eine Abschwächung gegenüber alleiniger Östradiol- Behandlung bei gleichzeitiger Progesteron- Anwendung und maximale LH-Sekretion bei Östradiol über 48 Std. und zusätzlichem Progesteron über 4 Std.

Bei den TPA- stimulierten Kulturen ist der Unterschied der LH- Sekretion zwischen kalziumhaltigem und -freiem Medium weniger gravierend: In letzterem wird bei der Vehikel- Gruppe um ca. 25- 30 % weniger LH freigesetzt. Unter steroidaler Vorbehandlung ist im Vergleich keine signifikante Abschwächung, sondern teilweise sogar eine Steigerung der LH- Sekretion zu erkennen.

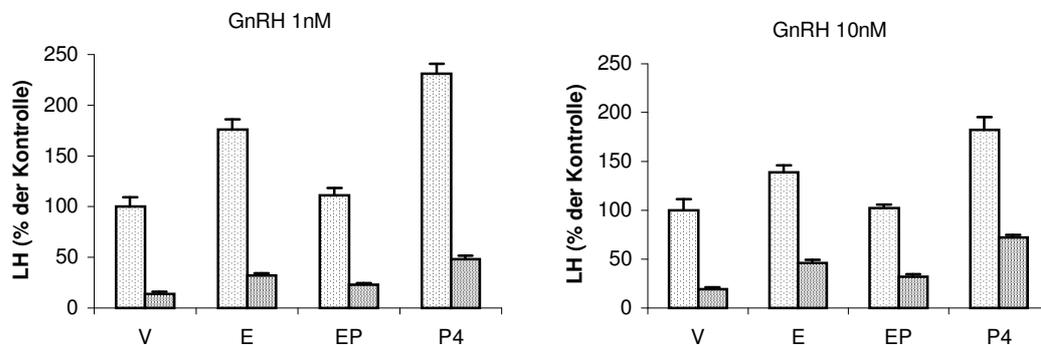


Abb.9, 10.: Effekte von Östradiol (E) und Progesteron (P) auf die LH- Sekretion GnRH- stimulierter Rattenhypophysenzellen in kalziumhaltigem und -freiem Nährmedium. Die steroidale Vorbehandlung entspricht der Beschreibung zu Abb.1. Während der letzten 3 Std. der Behandlung erfolgte die Stimulation mit 1 nM GnRH -oberes Bild- und 1  $\mu$ M GnRH- unteres Bild in regulärem (gekörnt) oder kalziumfreien (grau) Medium. Die Daten werden als % von Vehikel (V, 0,2 % Ethanol in kalziumhaltigem Medium= 100 %) dargestellt, jeweils für die beiden GnRH- Konzentrationen. Der absolute LH- Wert (ng/ml), stellvertretend für je "100%" ist 27+-4 für 1 nM GnRH und 41+-6 für 10 nM. E zeigt Signifikanz gegenüber V, P4 gegenüber E.

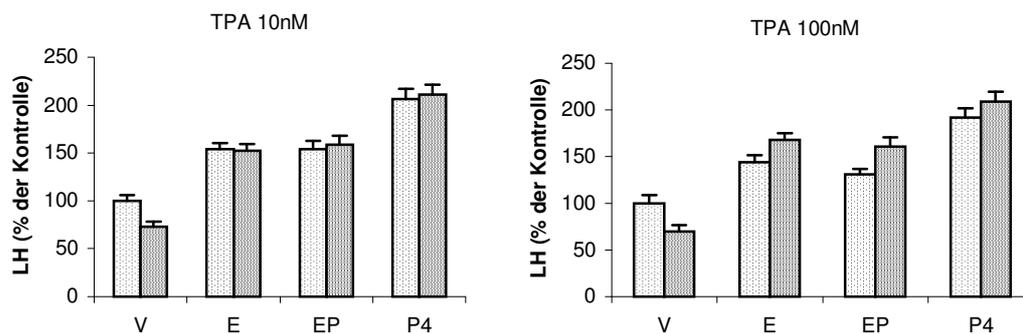


Abb.11, 12: Effekte von Östradiol (E) und Progesteron (P) auf die LH- Sekretion TPA- stimulierter Rattenhypophysenzellen in kalziumhaltigem und -freiem Nährmedium. Die steroidale Vorbehandlung entspricht der Beschreibung zu Abb.1. Während der letzten 3 Std. der Behandlung erfolgte die Stimulation mit 1 nM TPA -oberes Bild- und 10 nM TPA- unteres Bild in regulärem (gekörnt) oder kalziumfreien (grau) Medium. Die Daten werden als % von Vehikel (V, 0,2 % Ethanol in kalziumhaltigem Medium= 100 %) dargestellt, jeweils für die beiden TPA- Konzentrationen. Der absolute LH- Wert ( ng RP-2/ ml), stellvertretend für je "100%" ist 27+-4 für 1 nM GnRH und 31+-4 für 10 nM. E zeigt Signifikanz gegenüber V, P4 gegenüber E.

## 4. Diskussion

Die Details der Steuerung von Synthese und Sekretion der Gonadotropine LH und FSH sind noch nicht vollkommen verstanden. Die derzeitige Modellvorstellung sei noch einmal in Kürze vorgestellt:

Das im Hypothalamus gebildete Dekapeptid GnRH wird pulsatil sezerniert und über das portale Gefäßsystem zum Hypophysenvorderlappen transportiert (Moenter et al., 2003). GnRH wirkt auf spezielle GnRH- Rezeptoren an der Hypophyse, diese gehören zur Gruppe der G-Protein- gekoppelten, 7-fach- transmembranösen Rezeptoren (Stojilkovic et al., 1994; Stojilkovic und Catt, 1995). Diese in die Plasmamembran der Hypophysenzellen integrierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) sind in die Weiterleitung einer Fülle von Signalen aus dem extrazellulären Raum in das intrazelluläre Milieu involviert. Diese Signale wiederum werden durch die R(egulator)- G(-Protein)- S(ignaling)- Proteine beeinflusst (Neill et al., 2001).

Nach Binden des GnRH an seinen spezifischen Rezeptor wird das  $G_q$ - und/ oder  $G_{11}$ - Protein stimuliert (Shah und Milligan, 1994), dieses aktiviert die Phospholipase C, wahrscheinlich die  $\beta$ -Form (Naor 1990). Dadurch wird die Inositolphosphat-Kaskade in Gang gesetzt, in diesem Zusammenhang entstehen die aktiven second messenger Inositol-1,4,5, Triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Dieses aktiviert eine Fülle von Proteinkinase C- Formen, die in diesem Zusammenhang Wichtigsten werden als  $PKC\alpha$  und  $-\beta$ , sowie  $PKC\delta$  und  $-\epsilon$  bezeichnet (Harris et al., 1997; Naor et al., 1998). Die Proteinkinase C (PKC) ist einer der wichtigsten second messenger bei der Gonadotropinsekretion. Bei der GnRH- induzierten LH- Sekretion spielt außerdem das Ansteigen des intrazellulären Kalzium- Spiegels eine bedeutende Rolle. Es lässt sich ein vom extrazellulären Kalziumspiegel unabhängiger schneller Konzentrationsanstieg (Peak) bei Mobilisierung aus intrazellulären Speichern von einer länger dauernden Plateauphase unterscheiden. Letztere wird durch den Einstrom extrazellulären Kalziums durch die Spannungs- gesteuerten Kalzium-Kanäle aufrecht erhalten (Merelli et al., 1992; Stutzin et al., 1989, Stojilkovic and Catt, 1995). Bei den komplexen Vorgängen wirken nach aktueller Modellvorstellung weitere Effektoren mit. Genannt seien die mitogen- aktivierten Proteinkinasen (MAPK), deren einzelne Kaskaden, insbesondere die sogenannte extrazellulär-regulierte Kinase (ERK) von der PKC abhängig sein dürfte

(Shacham et al., 2001), und die Arachidonsäure (Kraus et al., 2001; McArdle et al., 2002; Kakar et al., 2002; Neill et al., 2001). Die Gesamtheit obengenannter Vorgänge, aber in unterschiedlichem Ausmaß auch die Aktivierung einzelner Anteile, führen zur Gonadotropin- Sekretion bzw. -Synthese.

Die Steroide Östradiol und Progesteron steuern auf hypothalamischer (Zanisi und Messi, 1991) wie hypophysärer Ebene die GnRH- induzierte Gonadotropinsekretion. An der Hypophyse nehmen sie Einfluß auf Synthese und Dichte des GnRH-Rezeptors (Emons et al., 1992, Turzillo et al., 1998) sowie auf dessen Sensibilität gegenüber GnRH, dem sogenannten "priming" (Waring und Turgeon, 1992). Ausserdem wirken sie über Einflussnahme auf Reaktionen *nach* Rezeptoraktivierung durch GnRH, z.B. über Modulation der PKC. Östradiol, nicht aber Progesteron scheint bei der GnRH-stimulierten LH- Sekretion einen positiven Einfluß auf die Inositolphosphatakkumulation zu haben (Ortmann et al., 1995).

Die Beteiligung der Proteinkinase C an der Gonadotropinsekretion wurde in zahlreichen Arbeiten belegt. Die näheren Umstände sind jedoch noch nicht voll verstanden.

In dieser Arbeit wurden die Einflüsse der Steroide auf die LH-Freisetzung und -Synthese aus kultivierten Rattenhypophysenzellen nach Stimulation der PKC mittels TPA untersucht. Vergleichend wurde jeweils eine Zellkulturreihe mit GnRH stimuliert.

#### **4.1. Effekte von Östradiol und Progesteron auf die GnRH- oder TPA-stimulierte LH-Sekretion**

Wir untersuchten in dieser Arbeit die mögliche Modulation der Proteinkinase C-vermittelten LH- Sekretion durch die Steroide Progesteron und Östradiol.

Bei der GnRH-stimulierten Vergleichsgruppe ergaben sich positive Effekte auf die LH-Sekretion bei Östradiol- Behandlung über 48 Std. Abhängig von der GnRH-Konzentration wurde die LH- Sekretion im Verhältnis zur V-Gruppe um 95- 291 % gesteigert. Bei der Gruppe mit zusätzlichem Progesteron für die letzten 4 Std. wurde eine noch höhere Ausbeute an LH gemessen: 167- 657 % mehr LH als bei der Vehikel-Behandlung. Bei gleichzeitiger Anwendung von E und P über 48 Std. zeigte sich eine Abschwächung der LH- Sekretion gegenüber der Behandlung mit E alleine (mit V verglichen: 21-174 % ).

Wir bestätigten damit die bei früheren Untersuchungen beobachteten Ergebnisse des positiven und negativen Östrogeneffektes (Lagace et al., 1980; Drouin und Labrie 1981; Emons et al., 1984; Frawley und Neill, 1984; Turgeon und Waring, 1990; Ortmann et al., 1989a, b, 1990; Krey und Kamel III, 1990).

Bei der Phorbol-ester-induzierten LH-Sekretion mit der effektivsten Dosierung (TPA  $10^{-8}$ M) ermittelten wir bei der Vehikel-Gruppe LH-Ausschüttungen in Höhe von 60.9 % gegenüber der Vergleichsgruppe mit der entsprechend höchsten sekretorischen Leistung (GnRH  $10^{-7}$ M). Nach 48 Std.-E-Vorbehandlung TPA-stimulierter Zellen wurde in unseren Versuchen analog zur GnRH-Vergleichsgruppe ein deutlicher Anstieg der LH-Freisetzung gemessen: je nach TPA-Konzentration steigerte sich die LH-Antwort gegenüber der TPA-V-Gruppe um 61-192 %. Bei gleichzeitiger Langzeitbehandlung mit Östradiol und Progesteron über 48 Std. (EP 48) war in unseren Versuchen bei den TPA-stimulierten Zellen kein negativer Effekt auf die LH-Sekretion nachweisbar. Wir ermittelten LH-Werte etwa in Höhe der E-Langzeitbehandlung. Die Differenz zwischen den LH-Sekretionen ist bei den 4 Konzentrationen mit TPA nicht einheitlich, insgesamt besteht eine Tendenz der Steigerung (Dieses steht im Gegensatz zum Ergebnis bei der GnRH-Gruppe). Bei Kombination von E-Langzeit- und P-Kurzzeitbehandlung traten wie bei der GnRH-Reihe ein positiver Östrogen- und ein positiver Progesteron-Effekt auf. Das Ergebnis war eine maximale LH-Ausschüttung von bis zu 318 % (TPA  $10^{-10}$  M) gegenüber der Vehikel-Gruppe derselben TPA-Konzentration bzw. von 174,7 % gegenüber GnRH  $10^{-7}$ M-Vehikel.

Andere Arbeitsgruppen veröffentlichten zum Teil abweichende Ergebnisse:

Zur TPA-Stimulierung ohne Steroidvorbehandlung liegen uns 2 Arbeiten vor: Stojilkovic et al. beschrieben (1988a) für TPA im Mittel 70% der LH-Sekretion der GnRH-Vergleichsgruppe. 0,1 nM TPA stimulierte 50 % der LH-Menge der Vergleichsgruppe mit dem GnRH-Superagonisten GnRH $\alpha$  (Izumi et al., 1991). Bei Verwendung der PKC-Aktivatoren OAG (1-Oleoyl-2-Acetyl-Glycerol) und PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) ergaben sich gegenüber der GnRH (1nM)-stimulierten LH-Sekretion nur bei PMA ( $10^{-7}$ M) mit etwa 60% positive Ergebnisse. Die anderen LH-Sekretionen entsprachen der Basalrate (Liu und Jackson, 1987).

Dieselben Autoren ermittelten bei Stimulierung E-vorbehandelter Zellen (25 Std) mit dem Proteinkinase C-Aktivator C8 (L-alpha-1,2-Dioctanoyl-Glycerol, 200  $\mu$ M) eine LH-

Sekretionsteigerung von 108% gegenüber der Kontrolle (Liu und Jackson,1987). Eine deutlich stärkere Sekretionssteigerung von ca. 1200 % wurde bei E-vorbehandelten und mittels PDBu (Phorbol-12.13-Dibutytrat) stimulierten Hypophysenzellen (OVX, in vivo-Östradiol- Behandlung über 4 Tage) ermittelt. Bei der Verwendung des PKC- Aktivators DOG (1,2- Dictanoyl-sn-Glycerol) wurden jedoch nur 15 % erzielt (Thomson et al., 1993). Bei 1-stündiger TPA- Stimulation von Rattenhypophysenzellen mit 72-stündiger E-Vorbehandlung ergab sich eine ca. 80 -%-Sekretionssteigerung von LH (Drouva et al., 1990).

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen klar die Fähigkeit der Proteinkinase C, ohne Mitwirkung des GnRH die LH- Sekretion zu stimulieren. Es ist noch nicht bekannt, auf welchem Wege diese Wirkung erzielt wird. Bei Phorbol-ester-Stimulierung wurde eine Steigerung der PKC- Aktivität und Translokation des Enzyms vom Zytosol zur Zellmembran beobachtet (Johnson et al., 1996).

Hier sollen vordergründig die Einflüsse der Steroide auf die PKC diskutiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie korrelieren mit den durch Östrogen und Progesteron verursachten Veränderungen der GnRH- Rezeptorzahl in den Hypophysengonadotropinzellen. Langzeit- Östrogen- Inkubation allein oder mit zusätzlicher Progesteronkurzzeitbehandlung vermehrt die Rezeptoranzahl. Darreichung von P über längere Zeit bleibt ohne Auswirkung auf die Rezeptordichte. Parallel dazu steigt bzw sinkt die GnRH- induzierte LH- Sekretion (Emons et al.,1988; Emons et al.,1992). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, daß die positiven Effekte von E- Langzeit und zusätzlicher P-Behandlung über Steuerung der GnRH- Rezeptoren wirken könnten. Da die steroidalen Effekte auf die Phorbol-ester- induzierte LH-Sekretion in unseren Versuchen jedoch ohne Aktivierung des GnRH- Rezeptors, sondern durch angenommene direkte Stimulation der Proteinkinase C erfolgten, sind offenbar weitere Reaktionswege vorhanden.

Drouva et al. (1990) untersuchten die Einflüsse von Östrogen auf die Proteinkinase C- Aktivität in Rattenhypophysenzellen bei 72-Std.- Behandlung. Sie ermittelten eine Steigerung gegenüber der Basalaktivität um den Faktor 6,5. Bei der PKC- Stimulierung durch DOG (1,2-Dioctanoyl-sn-Glycerol) und PDBu (12,13- Dibutytrat) mit und ohne Östradiol- Vorbehandlung ergab sich bei letzterer eine deutliche PKC- Aktivitätssteigerung und eine gesteigerte PKC- Synthese (Thomson et al., 1993). Audy

et al. wiesen nach, daß die GnRH- stimulierte LH-Sekretion bei Proteinkinase C-geleerten Hypophysenzellen ovariectomierter Ratten nur dann signifikant absinkt, wenn diese mit Östrogen vorbehandelt worden waren (1990). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Proteinkinase C-abhängige Reaktionsweg der GnRH-Signalübertragung durch Östrogen moduliert wird. Drouva et al. (1990) führten in vivo Versuche mit ovariectomierten Ratten durch, bei denen in einer Gruppe alle ZNS-Verbindungen zur Hypophyse unterbrochen worden waren. Die Autoren beschreiben eine direkte Konzentrationssteigerung der Proteinkinase C durch Östrogenbehandlung, dabei werden die zytosolische und die membranständige Form gleichermaßen betroffen. Die Aktivität der Proteinkinase C läßt sich in der Behandlungsdauer von frühestens 15 Std. bis maximal 120 Std. durch E beeinflussen. Auch in den Versuchen von Maeda und Lloyd (1993) wurde durch Östradiolbehandlung von Rattenhypophysenzellen eine Steigerung der PKC- Aktivität und eine mRNA- Zunahme für verschiedene PKC- Isoenzyme nachgewiesen.

Als möglicher Bestandteil der Steroidreaktionswege zwischen Rezeptor und Zellkern werden die sogenannten *Estrogen-Response-Elements* (ERE) diskutiert. Es wurde eine Mitwirkung der PKC vermutet (Demay et al., 2001 ; Nett et. al, 2002).

Nur eine Arbeit bietet Hinweise auf ein mögliches Zusammenspiel zwischen Progesteron und der PKC- Aktivität: mit dem Ansatz, Angiotensin II in seiner Eigenschaft als mitwirkendes Agens beim Inositol- Reaktionsweg näher zu untersuchen, wurde die Modulationsfähigkeit von Östradiol und Progesteron auf Angiotensin II und PKC erfasst. Östradiol, Progesteron und die Vergleichssubstanz wurden 5 Tage vor Hypophysengewinnung *in vivo* appliziert. Der Angiotensin II- Effekt wurde dann *in vitro* untersucht. Es ergab sich eine deutliche Steigerung der IP<sub>3</sub>- Konzentration unter der Angiotensin-II-Behandlung in der Östradiol- Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe. Die Langzeitprogesterongabe erbrachte hingegen keine Steigerung der IP<sub>3</sub>- Aktivität. Die Aktivitätsbestimmung der Proteinkinase C zeigte die höchste Wirkung bei der Kombination von Östradiolvorbehandlung und Angiotensin II- Gabe (ca. 75% Steigerung). Die maximale Aktivitätsminderung wurde durch alleinige Progesteron-Gabe hervorgerufen (Lachowicz et al., 2000). Die Verwendung des Progesteronrezeptor- Antagonisten RU 486 wie auch des PKC- Antagonisten Staurosporin führte bei Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA) stimulierten Hypophysenzellen zu einer

deutlich abgeschwächten LH-Sekretion bei Ratten mit intakten Ovarien gegenüber den Ergebnissen bei ovariectomierten Tieren (Aguilar et al, 2003). Die Autoren vermuten als Ursache eine Interaktion von PKC mit Östradiol-abhängigen Progesteronrezeptoren.

Krey und Kamel berichteten über Progesteron- Auswaschversuche. Bei E- und P-vorbehandelten Zellen wurde das Progesteron 4 Std. vor der Stimulation mit PMA entfernt. Es trat eine Suppression der LH- Sekretion gegenüber der E-Vergleichsgruppe auf, diese wiederum zeigte geringere Ergebnisse als die EP- Gruppe (Krey und Karmel III,1990). Die Autoren folgern, dass dieses durch eine spezifische Beeinflussung der Gonadotropin- Sekretion durch Progesteron- Einflüsse unter Umgehung der GnRH-Rezeptoren bedingt sein könnte.

Obwohl Kurzzeitprogesteronbehandlung die GnRH- bzw. TPA- induzierte LH- Sekretion E-vorbehandelter gonadotroper Zellen in der gleichen Art moduliert, verringert entsprechende Langzeitprogesteronbehandlung zwar die GnRH- stimulierte LH- Ausschüttung, verändert aber nicht die LH- Antwort auf TPA.

Dieser Unterschied der akuten und chronischen Wirkungen des Progesterons zwischen GnRH- und (direkt) -PKC- vermittelter Gonadotropinfreisetzung deutet an, dass die zwei Komponenten der biphasischen Progesteronwirkung verschieden geregelt sein könnten. Ähnliche unterschiedliche Wirkungen ovarieller Steroide wurden bei der Arachidonsäure- induzierten LH- Sekretion beobachtet:

Bei der indirekten Stimulierung der Arachidonsäure mittels Mellitin (dieses aktiviert die Phospholipase A<sub>2</sub>, welche ihrerseits die Bildung der Arachidonsäure aus Membranphospholipiden bewirkt) führte die Langzeit- Östrogen- Behandlung mit oder ohne Progesteron über längere Zeit zu keinem Effekt, während eine Inkubation der Zellen mit E oder mit E + P über kurze Zeit eine LH- Sekretion wie bei der GnRH-Vergleichsgruppe erbrachte (Ortmann et al., 1992a).

Ein stimulierender Effekt der Arachidonsäure auf die  $\beta$ -mRNA der PKC von Hypophysenzellen wurde bei gleichzeitiger GnRH- Anwendung beobachtet (Shraga-Levine et al., 1996). Die Blockade des AA- Metabolismus hob die LH- Antwort aller untersuchten Sekretionförderer- auch TPA- auf (Kamel und Kubajek,1988). Eine neuere Arbeit beschäftigt sich mit der Modulationsfähigkeit der Steroide auf die GnRH-induzierte AA- Freisetzung. Östradiol beeinflusst Diese nicht, während zusätzliches Progesteron bei Kurzzeitanwendung die AA- Reaktion erhöht. Langzeit-Progesteron-

Anwendung hingegen schwächt die AA- Antwort ab (Ortmann et al., 1996). Hinweise gegen ein mögliches Zusammenspiel zwischen PKC und der Arachidonsäure veröffentlichten Chang et al (1987): Bei TPA- Stimulation mit und ohne gleichzeitiger Hemmung der Arachidonsäure mittels eines Inhibitors der Diacylglycerol-Lipase ergab sich keine Änderung der LH-Sekretion, wobei die Arachidonsäure- Blockade bei GnRH- Stimulation die LH- Antwort aufhob.

## **4.2 Wirkung der Steroide auf das Gesamt-LH**

GnRH- Aktivierung seines Rezeptors an der Hypophysenmembran führt neben der LH- Sekretion über eine Steigerung der spezifischen LH $\beta$ - mRNA (und der unspezifischen LH $\alpha$ -mRNA) zur Biosynthese des Hormons. Die LH $\beta$ - Untereinheit liegt in einer geringeren Konzentration vor als die  $\alpha$ -Untereinheit und stellt somit den limitierenden Faktor bei der LH- Synthese dar (Gharib et al., 1986). Die Proteinkinase C und Kalzium scheinen an den Reaktionen einen bedeutenden Anteil zu haben (Andrews et. al., 1988). Die Steroide Östradiol, Progesteron und auch Testosteron modulieren auf verschiedenen Wegen auf hypophysärer Ebene die GnRH- induzierte Gonadotropinsynthese (zum Überblick: Shupnik, 1996). Zum Zeitpunkt unserer Versuche bestand kein Konsens hinsichtlich der Bedeutung von GnRH und PKC sowie der steroidalen Modulation auf die Gonadotropinsynthese (Gharib et al., 1986; Zmeili et al., 1986).

In dieser Arbeit untersuchten wir in weiteren Experimenten, ob durch die Stimulation steroidvorbehandelter oder nicht- vorbehandelter Hypophysenzellen mit GnRH oder TPA die LH- Gesamtsumme vergrößert werde. Die Gesamtsumme setzt sich aus sezerniertem und intrazellulär verbliebenem Anteil zusammen. Eine solche Vermehrung würde für eine Neusynthese sprechen.

Bei der Behandlung mit den Steroiden allein ergab sich in unseren Versuchen eine geringe Sekretionssteigerung von LH gegenüber der Basalrate, wobei die Gesamtsumme unverändert blieb.

Die Stimulation steroidvorbehandelter Zellen mit GnRH oder TPA führte zu einer dosis- und zeitabhängigen LH- Sekretion, dabei entsprachen die steroidalen Effekte den in der ersten Versuchsgruppe ermittelten. Im gleichen Maße wie die Menge sezernierten LHs

gegenüber der Vergleichsgröße zunahm, sank der in den Zellen verbliebene Anteil.

Auch Langzeitstimulation bis zu 9 Std. nur mit GnRH oder TPA führten zu keiner Vermehrung des Gesamt- LH. Wir konnten also weder bei der GnRH- noch der TPA-Stimulierung mit und ohne steroidale Vorbehandlung Anzeichen für die LH-Neusynthese feststellen.

Die Ergebnisse anderer Autoren zeigen ein kontroverses Bild:

Krey und Kamel stimulierten progesteronvorbehandelte Zellen (< 6 Std und > 12 Std. ) mit GnRH. Es ergab sich keinerlei Anhalt für eine LH- Neusynthese (Krey et Kamel 1990, I). Bei weiteren Versuchen mit den gleichen Bedingungen und zusätzlicher E-Vorbehandlung ermittelten sie ebenfalls keine signifikante Veränderung der Gesamthormonmenge (Krey und Karmel, 1990, III). Lagace et al. (1980) führten ebensolche Versuche durch, auch sie stellten keine Neusynthese fest. Hsueh et al. (1979) testeten die Effekte der Steroide (einzeln oder zusammen), auch mit GnRH-Stimulation, auf die LH- Gesamtmenge. Sie konnten keine signifikante Veränderung feststellen. Dagegen ermittelten Stojilkovic et al. eine dosis- und zeitabhängige Neusynthese im Verhältnis 1:2 zur Sekretion bei Stimulation mit GnRH oder TPA ohne steroidale Beteiligung (Stojilkovic et al., 1988b). In anderen Arbeiten zweier Forschergruppen (Ramey et al., 1987; Liu und Jackson, 1987) wird ebenfalls von einer eindeutigen LH- Neusynthese berichtet. Die erste Autorengruppe stimulierte mit GnRH, die andere mit einem Phorbolster. Beide behandelten die Zellen mit Östrogen vor und maßen die LH- Neusynthese über die Zunahme der Inkorporation radioaktiv markierter Bestandteile des LH.

Insbesondere in der jüngeren Zeit wurden bei entsprechender Fragestellung nach Syntheseleistung die LH- *Untereinheiten* bestimmt. Eine Synthesesteigerung beider LH-Untereinheiten wurde bei 24- stündiger kontinuierlicher Stimulation mit dem Phorbolster PMA beobachtet (Haisenleder et al., 1995). Bei der Bestimmung der LH- $\beta$ -mRNA- Konzentration nach GnRH- (0,1nM) oder PM- Stimulation (2-20 nM) über 24 Std. ermittelten die Autoren eine 6,8- bzw 2-5-fache Steigerung der  $\beta$ -RNA. Die PKC sei notwendig für die GnRH- stimulierte LH- $\beta$ - mRNA- Produktion (Andrews et al., 1988). Eine jüngere Publikation beschreibt ebenfalls die Einbindung der PKC durch GnRH bei der akuten Induktion der LH $\beta$ - Gene (unabhängig von Kalzium und MAPK). GnRH sei bei der Herunterregulierung der LH $\beta$ - Gene aber von der PKC unabhängig (Vasilyev et

al., 2001). In einer anderen Arbeit wurde die Transkriptionszunahme der  $\alpha$ -Untereinheit gemessen: 10 nM GnRH steigerte 20,7-fach, 100 nM TPA 8,7-fach (Holdstock et al., 1996). GnRH steigerte die  $\alpha$ -Gene 157-fach, PMA 62-fach (Colin und Jameson, 1998)

Eine gleichzeitige Steigerung der mRNA  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten um ca. das 2-fache durch GnRH bzw. TPA beschrieben Ben-Menahem und Naor (1994). Sie beobachteten einen biphasischen Effekt des GnRH: ein erster Gipfel der mRNA-Zunahme wurde nach 30-60 Min. der Behandlung festgestellt, ein zweiter während 12-24 Std. Salton et al. (1988) demonstrierten hingegen, dass bei GnRH-stimulierter LH-Freisetzung keine vermehrte LH- $\beta$ -Transkription stattfindet.

Eine Stimulation mit PMA über 6 Std. steigerte die Aktivität beider LH-Untereinheiten, stärker jedoch die  $\beta$ -Form. Die Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration sei hauptverantwortlich für die Produktion der  $\alpha$ -Untereinheit, (Saunders et al., 1998). In einer weiteren Versuchsgruppe hingegen liessen sich mit PMA/ MAPK nur die Gene der  $\alpha$ -Untereinheit stimulieren, die von LH $\beta$  nur bei funktionierendem Kalzium-Einstrom (Weck et al., 1998). Die Autoren postulieren eine getrennte Transkriptionsregulation der LH-Untereinheiten durch unterschiedliche Signalwege des identischen GnRH-Rezeptors.

Andere Autoren berichten von einer Suppression der mRNA der  $\alpha$ -Untereinheit durch kombinierte Östradiol/ Progesteronwirkung über 32 Std. und 48 Std., sowie einer entsprechenden Wirkung auf die LH- $\beta$ -RNA nach 29 Std. Es wird vorgeschlagen, dass die Progesteroneinflüsse auf LH sich hauptsächlich auf die eigentliche Sekretion, weniger auf die Synthese konzentriert (Attardi et al., 1997). Kerrigan et al. stellten keine Erhöhung von LH- $\beta$ -mRNA nach pulsativer GnRH-Stimulation mit und ohne Östradiol und/oder Progesteron-Vorbehandlung fest (Kerrigan et al., 1993). Ramey et al. (1987) zeigten, dass Östrogen die für die Biosynthese des Hormons notwendige GnRH-Konzentration senke.

In den hier vorgestellten Experimenten zeigte sich *kein* Synergismus zwischen Östradiol, Progesteron und GnRH bzw. TPA hinsichtlich der Synthesesteigerung des LH.

Abweichungen bei den Ergebnissen verschiedener Versuche mit ähnlicher Fragestellung können u.a. in folgenden Ursachen begründet sein: Die Ergebnisse der

Publikationen sind aufgrund der Vielfalt der Variablen (Geschlecht und Art der Versuchstiere, ggf. Zustand nach Ovariectomie, Zellen aus gemischten Kulturen oder geklonte  $\alpha$ T-3- Linien- hier werden nur  $\alpha$ -Untereinheiten produziert- Anwendungsdauer der Steroide, Konzentrationen etc.) nicht exakt vergleichbar. Ausserdem können Unterschiede bei der Herkunft der Versuchstiere und der LH- Antisera, der endokrinen Situation, der die Hypophysen ausgesetzt sind, oder der Kultur- und Inkubationsbedingungen und Inkubationszeiten eine Rolle spielen.

Aus den genannten Studien ergibt sich die Hypothese, dass verschiedene Signalwege nach Stimulation des GnRH- Rezeptors einen Mechanismus zur spezifischen Transkription von LH $\alpha$ - oder LH $\beta$ - Genen bereitstellen könnten. Welche dieser Gene speziell durch PKC, Kalzium oder weitere Transmitter reguliert werden und wie die GnRH- Pulse bevorzugt individuelle Signalwege der *second messenger* in der Hypophysenzelle aktivieren können, muß weiteren Studien vorbehalten bleiben (Gajewska und Kochmann, 2001).

#### **4.3. Stimulation steroidvorbehandelter Zellen mit GnRH/ TPA in Ca<sup>2+</sup>-freiem/ und -haltigem Medium**

In früheren Arbeiten wurde die Abhängigkeit sowohl der GnRH- als auch der Phorbolster- stimulierten LH- Sekretion von extrazellulärem Kalzium postuliert (Conn et al., 1979).

In unserer Studie untersuchten wir die Einflüsse von Östrogen und Progesteron auf die von extrazellulärem Kalzium- abhängigen und -unabhängigen Komponenten der GnRH- und TPA- stimulierten Reaktionswege. Dazu wurde eine Hälfte der Versuche mit kalziumfreiem Medium durchgeführt.

Die GnRH- stimulierte LH- Sekretion ohne Steroidvorbehandlung war in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium mit 14% gegenüber der Vergleichsgruppe in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Milieu mit 100% (Orientierungsgröße) drastisch verringert. Ähnliche Ergebnisse hatten auch unsere Vorversuche gezeigt. Auch die Steroid- behandelten Zellen sezernierten im kalziumfreien Medium nur einen Bruchteil der bei der Vergleichsgruppe gemessenen Menge LH. Die steroidale Modulation war jedoch in beiden Medien im Verhältnis zur

sezernierten LH- Menge vergleichbar. Bei der Langzeit Östradiol- Behandlung ergaben sich (GnRH  $10^{-9}$  M) 176 bzw. 32 % für kalziumhaltiges/ - freies Medium.

Die kombinierte Anwendung beider Steroide über 48 Std. erbrachte entsprechend 111 und 23 %. Der maximalen LH- Sekretion bei der P-Kurzzeit- Inkubation E- vorbehandelter Zellen von 231 % stehen 48 % im kalziumfreien Medium gegenüber.

Diese Daten zeigen, dass sowohl die von extrazellulärem  $Ca^{2+}$ -abhängigen als auch unabhängigen Reaktionswege der GnRH- Signaltransduktion durch Östrogen und Progesteron beeinflusst werden.

Eine andere Situation ergab sich bei den TPA- stimulierten Zellen:

In der Kontrollgruppe ohne Steroide war die LH- Sekretion in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium nur 27 (bei  $10^{-8}$ M) bzw. 30% (bei  $10^{-7}$ M) geringer als im  $Ca^{2+}$ -haltigem Medium. Die E- behandelten Zellen zeigten jedoch im  $Ca^{2+}$ -freien Milieu fast die gleiche -154/ 152 %- bei  $10^{-8}$ M TPA oder sogar eine gesteigerte Sekretion mit 168% (ohne Kalzium) gegenüber 144 % mit Kalzium (bei  $10^{-7}$ M TPA) gegenüber dem herkömmlichen Medium.

Auch bei kombinierter steroidaler Langzeitbehandlung waren die Ergebnisse annähernd identisch (154/159 bei  $10^{-8}$ M TPA) oder es lag eine vermehrte LH- Sekretion in kalziumfreien Medium vor (161: kalziumfrei, 131: mit Kalzium bei  $10^{-7}$ M TPA). Fast gleiche Sekretionsleistungen fanden wir bei der Progesteron- Kurzzeitwirkung E- vorbehandelter Zellen: Bei Stimulation mit TPA  $10^{-8}$ M lag das Ergebnis der LH- Sekretion aus der kalziumfreien Inkubation mit 211% gering über dem aus kalziumhaltiger Behandlung (206%), bei  $10^{-7}$ M TPA entsprechend bei 209 (kalziumfrei) und 192 % (kalziumhaltig).

Zusammengefasst zeigte sich somit in unseren Versuchen eine vollständige Unabhängigkeit der PKC- stimulierten Gonadotropinsekretion steroidvorbehandelter Zellen vom extrazellulärem Kalzium.

Bei vergleichbaren Versuchen anderer Arbeitsgruppen mit  $Ca^{2+}$ -freiem Medium ergaben sich uneinheitliche Resultate: die TPA- stimulierte LH- Sekretion wurde dosisabhängig um ca. 10 -25% der Basalrate gesenkt, der stimulatorische Effekt des GnRH auf die Gonadotropin- Freisetzung aber vollständig zum Erliegen gebracht (Naor und Eli, 1985). Weniger drastisch war der Unterschied zwischen der durch GnRH/ TPA stimulierten LH- Freisetzung bei Verwendung von kalziumhaltigem zu -freiem Medium in den Versuchen von Stojilcovic et al.: Für GnRH ergab sich ein LH-Sekretionsergebnis von ca. 5,2:1 und

2:1 bei  $10^{-9}$  und  $10^{-7}$ M. Bei  $10^{-9}$ M TPA sank die in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium stimulierte LH Menge um ca. 30 % im Vergleich zum Vergleichsmedium, bei  $10^{-7}$ M TPA um ca. 36 % (Stojilkovic et al., 1988a). Desweiteren sei noch eine Veröffentlichung mit gegensätzlicher Aussage genannt: mit PMA über 4 Std. stimulierte Rattenhypophysenzellen (drei Tage vor der Entnahme waren die Tiere ovariectomiert worden) sezernierten 0 ng LH (GnRH- Kontrolle: 753), die Kombination aus PMA und dem Kalzium- Kanal- Aktivator Ionomycin hingegen 976 ng. Die Autoren vermuteten, dass extrazelluläres Kalzium für die Phorbol-ester- stimulierte LH- Sekretion erforderlich sei (Das et al., 1994).

Unsere Ergebnisse der GnRH- Gruppe entsprechen der Annahme der Abhängigkeit der GnRH- Wirkung auf die Gonadotropinsekretion von extrazellulärem Kalzium, wie sie in zahlreichen Arbeiten dargestellt wurde (Tasaka et al., 1988; Naor 1990; Stojilkovic et al., 1995; Zorec, 1997). Die GnRH- Stimulierung in effektiver Dosierung führt nach Konsens genannter Arbeitsgruppen zur biphasischen Antwort des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels mit primärem Peak und folgender Plateauphase. Auch die Gonadotropinsekretion verläuft biphasisch.

Bei Verwendung kalziumfreien Mediums wird die Peakphase nur geringfügig verkleinert, die Plateauphase hingegen aufgehoben (Merelli et al., 1994). Die durch die GnRH- Stimulierung aktivierte Inositolkaskade bedingt auch bei  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Stimulationsmedium das Mobilisieren von intrazellulär gespeichertem Kalzium (aus dem Endoplasmatischen Retikulum), entsprechend einem kurzzeitigen nachweisbaren Gipfel. Eine rasche Mobilisierung von LH ist die Folge. Die Aufrechterhaltung eines wirksamen Kalziumspiegels (Plateauphase) ist mangels Zustrom durch die VGCC jedoch nicht möglich. Daraus resultiert ein Sistieren der Gonadotropinfreisetzung.

In früheren Arbeiten wurde die Fähigkeit der Phorbol-ester erkannt, bei Stimulierung von Rattenhypophysenzellen deren intrazellulären Kalziumspiegel zu heben. Dieses geschehe über die VGCC (L-Typ) und sei von extrazellulärem Kalzium abhängig (Izumi et al., 1990; Stojilkovic et al., 1991).

Die Proteinkinase C scheint nach unseren Ergebnissen bei Fehlen extrazellulären Kalziums jedoch weitgehend auch ohne Zustrom extrazellulären Kalziums stimuliert werden zu können und auch ihrerseits zu wirken.

Eine mögliche Erklärung für diese weitere Funktion könnte in einer durch die PKC induzierten Minderung der für die LH- Sekretion nötigen intrazellulären

Kalziumkonzentration liegen: Bei Vorbehandlung von kultivierten Hypophysenzellen mit Phorbolestern wurde eine Sensitivierungssteigerung der GnRH- stimulierten LH- Sekretion gegenüber dem intrazellulären Kalziumspiegel beobachtet. Die Autoren folgern, dass die PKC wichtig für die kalziumabhängige Agonist- stimulierte LH- Sekretion sei (Jobin et al., 1995). Es wurde eine gesteigerte Sensitivität der Proteinkinase C gegenüber Kalzium als Ursache für die Beobachtung angesehen, dass die PKC eine Exozytose bedingt, ohne dass der intrazelluläre Kalziumspiegel wesentlich gestiegen wäre (Zhu et al., 2002).

Bei Stimulierung der PKC mit dem Phorbolster PMA und gleichzeitiger Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei (männlichen) Rattenhypophysenzellen in kalziumhaltigem Medium konnten im Gegensatz zur GnRH- Vergleichsgruppe keine Steigerungen des Kalziumspiegels beobachtet werden (Tse et al., 1995; Billiard et al., 1997). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Arbeiten von Izumi et al. (1990) und Stojilkovic et al. (1991). In diesem Zusammenhang sei zum einen auf die unterschiedlichen Isoformen der PKC hingewiesen -abhängig und unabhängig von extrazellulärem Kalzium -(Harris et al., 1997; MacEwan et al. (1999), zum anderen auf das unterschiedliche Geschlecht der Versuchstiere.

Eine Arbeitsgruppe untersuchte die Zusammenhänge zwischen PKC und VGCC auf die Phospholipase (C, A<sub>2</sub> und D) -Aktivität. Die Verwendung von TPA führte zur isolierten Phospholipase D- Aktivierung ohne Abhängigkeit von Kalzium (Poulin et al., 1996). Die Bedeutung der Phospholipase D bei der Gonadotropin- Sekretion liegt in der Bildung der späten Form des Diacylglycerols. Es wird angenommen, dass Dieses ein Kalzium- unabhängiges Isoform der PKC ("novel PKC" / nPKC) aktiviert (Shacham et al., 2002; zur Übersicht der PLD: Stojilkovic und Catt, 1995).

Die bereits erwähnte mitogen- aktivierte Proteinkinase (MAPK) ist in ihren PKC- assoziierten Reaktionen eher bei den Kalzium- abhängigen Signaltransduktionen von Bedeutung: Die an der Gonadotropin- Sekretion beteiligte ERK- Kaskade- der MAPK ist absolut vom Einstrom extrazellulären Kalziums durch VGC-Kanäle abhängig (Mulvaney und Robertson, 2000). Nach Auffassung der Autoren ist die PKC für den entsprechenden Kalzium- Einstrom durch die VGCC verantwortlich. Eine Mitwirkung intrazellulär gespeicherten Kalziums wurde nicht beobachtet.

Wir konnten zeigen, dass die Östradiolbehandlung bei Phorbol- induzierter PKC- Stimulation in  $Ca^{2+}$ - freiem Medium zu einer Steigerung der LH- Sekretion gegenüber der Vehikelgruppe führt. Abhängig von der Konzentration des eingesetzten TPAs wurde teilweise sogar die E- Gruppe mit regulärem Medium übertroffen.

Dieses ließe den Schluß zu, dass sich durch Steroid- Einfluß die Abhängigkeit der PKC von extrazellulärem Kalzium relativieren bzw. ausschliessen ließe.

Es wurde gezeigt, dass Progesteron bei dieser Phase der von extrazellulärem Kalzium unabhängigen LH- Freisetzung modulierend wirkt (Ortmann et al., 1994). Die o.g. biphasische LH- Sekretion nach GnRH- Stimulation wurde in früheren Versuchen durch die Steroide gleichmäßig moduliert. Die Effekte entsprachen denen unserer Arbeit in 4.1. Bei Durchführung der Versuche in kalziumfreien Medium war die Plateauphase nicht mehr nachweisbar. Die Modulation der Spikephase durch die Steroide war nicht beeinträchtigt (Ortmann et al., 1995).

Bei Versuchen mit ähnlicher steroidaler Vorbehandlung und Agoniststimulierung wurden die Effekte auf die Kalzium- Aktivität gemessen: GnRH allein führte je nach Konzentration entweder zur unter-schweligen, oszillierenden oder biphasischen (Peak und Plateau) Kalzium- Antwort. Bei 48 Std.- Östrogen- Vorbehandlung ergab sich kein prinzipieller Unterschied. Eine zusätzliche Progesteron- Kurzzeit (3 Std.)- Behandlung verschob die Kalzium-Reaktion auf die verschiedenen GnRH- Dosierungen von "unterschwellig" zu "oszillierend" und Letztere zu "biphasisch". Die kombinierte Langzeitanwendung beider Steroide hatte den gegenteiligen Effekt. Die Einflüsse alleiniger Östrogenvorbehandlung auf PMA- induzierte Kalziumkonzentrationssteigerung (beider Phasen) waren gering, bei zusätzlicher langzeitiger Progesterongabe nicht signifikant höher, bei Kurzzeit- Progesteron- Mitinkubation jedoch deutlich gesteigert. Es wird geschlossen, dass die Modulierung Phorbol- induzierter Kalzium- Signale durch Östrogen unwahrscheinlich sei. Progesteron scheint wie bei der GnRH- Stimulation auch hier einen Einfluß auf den Kalziumspiegel zu haben (Ortmann et al., 1992b, 1994). Die genannten Beobachtungen erklären nicht die gesicherte Modulierung GnRH/ Phorbol- stimulierter LH- Sekretion durch Östradiol. Auch die oben genannten Ergebnisse bei Verwendung kalziumfreien Mediums liessen auf weitere Reaktionswege schliessen. Eine andere Arbeitsgruppe veröffentlichte zu dieser Fragestellung abweichende Ergebnisse: Östradiol erhöhte in einer Anwendungsdauer

von 2-24 Std. die zytosolische Kalzium-Konzentration in kultivierten (Schaf-) Hypophysenzellen auf bis zu 200 %, reduzierte diese aber bei weiterer Behandlung bis 36 Std. auf weniger als den Ausgangswert. Es wurde postuliert, dass Östradiol über Beeinflussung der Kalziumkanäle und damit des intrazellulären Kalzium-Spiegels seine unterschiedlichen Wirkungen auf die Gonadotropin-Sekretion steuert (Heyward und Clarke, 1999). In den bereits zitierten Versuchen von Maeda und Lloyd (1993) steigerte die Vorbehandlung mit Östradiol auch die Aktivität und mRNA von Kalzium-unabhängigen PKC-Isoenzymen ( $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$ ).

Die schon in 4.1. in die Diskussion eingebrachte Arachidonsäure könnte auch in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen: Möglicherweise werden die Progesteron-Einflüsse auf die Kalziumkonzentrationsveränderungen durch Mitwirkung der Arachidonsäure vermittelt (Ortmann et al., 1996). Eine aktuellere Arbeit beschäftigt sich mit der direkten Wirkung- ohne Steroideffekte- der AA auf die Translokation der PKC in die aktive Form. Wichtig in diesem Zusammenhang erscheint die beobachtete Unabhängigkeit vom intrazellulären Kalziumspiegel (O'Flaherty et al., 2002).

## 5. Zusammenfassung

Die stimulierenden und inhibierenden Effekte der Steroide Östradiol und Progesteron auf die GnRH- induzierte LH- Sekretion sind allgemein anerkannt. Zahlreiche Versuche erbrachten deutliche Hinweise, dass die Proteinkinase C eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Gonadotropinsekretion spiele.

In dieser Studie untersuchten wir, ob Progesteron und Östradiol auch die Proteinkinase C- vermittelte LH- Sekretion zu modulieren vermögen. Die PKC stimulierten wir direkt mit dem Phorbolster TPA. Langzeit- Behandlung (48 Std.) von Rattenhypophysenzellen mit 1 nM Östradiol steigerte die GnRH- und Phorbolster (TPA)- stimulierte LH- Sekretion. Dieser positive Effekt wurde durch Zugabe von Progesteron über 4 Std. (100 nM) gefördert. Eine kombinierte Langzeit Östradiol- und Progesteron- Behandlung, die einen inhibitorischen Effekt bei der GnRH- Stimulation gegenüber alleiniger Langzeit- Östradiol- Anwendung hat, führte bei der TPA- Stimulation zu keiner erniedrigten LH- Freisetzung. Diese Steroid- Wirkungen traten ohne Veränderung des Gesamt- LH auf (intrazelluläres und sezerniertes LH). Ebenso wenig wurde die Gesamt- LH- Menge durch die Steroide oder die Stimulatoren allein (bei 3- bis 9-stündiger Anwendung) verändert.

Da die GnRH- und TPA- induzierte LH- Sekretion vom  $Ca^{2+}$ - Einstrom in die Hypophysenzelle abhängt, untersuchten wir mögliche Unterschiede auch im Vergleich  $Ca^{2+}$ -freies/ physiologisches Stimulationsmedium. Die Menge sezernierten LHs nahm in der GnRH- Gruppe bei  $Ca^{2+}$ - freiem Medium stärker ab als bei den TPA- stimulierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Steroide in beiden Medien die GnRH und TPA- induzierte LH- Sekretion zu beeinflussen vermögen. Wenn TPA in  $Ca^{2+}$ - freiem Medium als Stimulus verwandt wurde, waren die durch E und P bedingten Modulationen im Verhältnis zur Gesamtsekretion ausgeprägter, woraus abgeleitet werden kann, dass die  $Ca^{2+}$ - unabhängige Komponente der PKC vermittelten LH- Sekretion für die Regulierung der Steroid- Effekte wichtiger sein könnte.

Zusammenfassend muss vermutet werden, daß Östradiol und Progesteron ihre modulatorischen Effekte auf die GnRH- stimulierte LH-Sekretion über den Einfluß auf die Proteinkinase C bewirken. Dieser Effekt tritt unabhängig von LH- Neusynthese und  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zellen auf

## 6. Literaturverzeichnis

Aguilar R, Bellido C und Sanchez- Criado JE: The role of estrogen-dependent progesterone receptor in protein kinase C- mediated LH secretion and GnRH selfpriming in rat anterior pituitary glands. J Endocrinol Invest 26 (6), 527-32 (2003)

Andrews WV, Maurer RA und Conn PM: Stimulation of Rat LH- $\beta$ - Messenger RNA Levels by Gonadotropin Releasing Hormone. J Biol Chem 263, 27, 13755- 13761 (1988)

Andrews WV, Hansen JR, Janovick JA und Conn M: Gonadotropin-Releasing Hormone Modulation of Protein Kinase-C Activity in Perfused Anterior Pituitary Cell Cultures. Endocrinology 127, 5, 2393-99 (1990)

Attardi B, Klatt B, Hoffman GE und Smith MS: Facilitation or Inhibition of the Estradiol- Induced Gonadotropin Surge in the Immature Rat by Progesterone: Regulation of GnRH and LH Messenger RNAs and Activation of GnRH Neurons. J Neuroendocrinol 9, 8, 589-599 (1997)

Audy MC, Boucher Y und Bonnin M: Estrogen Modulated Gonadotropin Release in Relation to Gonadotropin- Releasing Hormone (GnRH) and Phorbol ester (PMA) Actions in Superfused Rat Pituitary Cells. Endocrinology 126, 2, 1396-1402 (1990)

Barry J: Immunohistochemistry of luteinizing hormone- releasing hormone- producing neurons of the vertebrates. Int Rev Cytol 60, 179-221 (1979)

Beggs MJ und Miller WL: GnRH- stimulated LH- release from ovine

gonadotrophs in culture is separate from phorbol ester-stimulated release. *Endocrinology* 124, 667- 674 (1989)

Ben-Menahem D und Naor Z: Regulation of Gonadotropin mRNA Levels in Cultured Rat Pituitary Cells by Gonadotropin- Releasing Hormone (GnRH): Role for Ca<sup>2+</sup> and Protein Kinase C. *Biochemistry*, 33, 12, 3698-704 (1994)

Berridge MJ und Irvine RF: Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 241, 197- 205 (1990)

Berridge MJ: Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 220, 345 –360 (1984)

Bethea CL, Brown NA und Kohama SG: Steroid Regulation of Estrogen and Progesterone Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Monkey Hypothalamus and Pituitary. *Endocrinology*, 137,10, 4372-83 (1996)

Billiard J, Koh DS, Babcock DF und Hille B: Protein kinase C as a signal for exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12192-12197 (1997)

Braden TD, Bervig T und Conn M: Protein Kinase-C Activation Stimulates Synthesis of Gonadotropin- releasing Hormone (GnRH) Receptors, but does not Mediate GnRH-Stimulated Receptor Synthesis. *Endocrinology* 129, 5, 2486-2490 (1991)

Bression D, Michard M, Le Dafniet M, Pagesy P und Peillon F: Evidence for a Specific Estradiol Binding Site on Rat Pituitary Membranes. *Endocrinology* 119, 3, 1048 –1051 (1986)

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U und Nishizuka Y:

Direct activation of  $ca^{++}$ -activated, phospholipid-dependent protein kinase C by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257, 7847 – 7851 (1982)

Chang JP, Graeter J und Catt KJ: Dynamic Actions of Arachidonic Acid and Protein Kinase C in Pituitary Stimulation by GnRH. *Endocrinology* 120, 5, 1837- 1845 (1987)

Chang JP, Graeter J und Catt KJ: Coordinate action of arachidonic acid and protein kinase C in gonadotropin-releasing hormone-stimulated secretion of luteinizing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 134, 1, 134-139 (1986)

Chappell PE und Levine JE: Stimulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Surges by Estrogen. I. Role of Hypothalamic Progesterone Receptors. *Endocrinology* 141, 4, 1477-85 (2000)

Cheon M, Park D, Kim K, Park SD und Ryu K: Homologous upregulation of GnRH receptor mRNA by continuous GnRH in cultured rat pituitary cells. *Endocrine* 11, 1, 49-55 (1999)

Chi L, Zhou W and Prikhozhan A: Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol Cell Endocrinol (Netherlands)* 91, 1-2, pR1-6 (1993)

Clapper DL und Conn PM: Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation of Pituitary Gonadotrope Cells Produces an Increase in Intracellular Calcium. *Biol Reprod* 32, 269 – 278 (1985)

Clayton RN und Catt KJ: Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors: Characterization, Physiological Regulation, and

Relationship to Reproductive function. *Endocr Rev* 2, 2, 186- 209 (1981)

Colin IM und Jameson JL: estradiol sensitization of rat pituitary cells to gonadotropin-releasing hormone: involvement of protein kinase C- and calcium- dependent signaling pathways. *Endocrinology* 139, 9, 3796-3802 (1998)

Conn PM, Rogers DC und Sandhu FS: Alteration of the Intracellular Calcium Level Stimulates Gonadotropin Release from Cultured Rat Pituitary Cells. *Endocrinology* 105, 1122-1128 (1979)

Conn PM, Rogers DC, und Sheffield T: Inhibition of GnRH- stimulated LH release by pimozide: Evidence for a site of action after  $ca^{++}$  - mobilisation. *Endocrinology* 109, 1122- 1126 (1981)

Conn PM, Janovick JA, Stanislaus D, Kuphal D und Jennes L: Molecular and Cellular Bases of Gonadotropin- Releasing Hormone Action in the Pituitary and Central Nervous System. *Vitam Horm*, 50, 151- 214 (1995).

Das S, Fahmy NW und Bourne GA: Calcium mobilization is a prerequisite for the expression of phorbol ester- stimulated luteinizing hormone secretion from pituitaries of male and acutely ovariectomized rats. *Eur J Endocrinol*, 130, 151-58, (1994)

Demay F, de Monti M, Tiffoche C, Vaillant C und Thieulant ML: Steroid- Independent Activation of ER by GnRH in Gonadotrope Pituitary Cells. *Endocrinology* 142, 8, 3340- 3347 (2001)

Drouin J und Labrie F: Interactions between  $17\beta$ - estradiol and proge-

sterone in the control of luteinizing and follicle- stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 108, 52-57 (1981)

Drouva SV, Gorenne I, Laplante E, Rerat E, Enjalbert A und Kordon C: Estradiol Modulates Protein Kinase C Activity in the Rat Pituitary *in Vivo* and *in Vitro*. *Endocrinology* 126, 1, 536-544 (1990)

Eidne KA, Sellar RE, Couper G, Anderson L und Taylor PL: Molecular cloning and characterisation of the rat pituitary gonadotropin- releasing hormone (GnRH) receptor. *Mol Cell Endocrinol* 90, 1, R 5-9 (1992)

Emons G, Hoffmann HG, Brack C, Ortmann O, Sturm R, Ball P und Knuppen R: Modulation of GnRH-receptor concentration in cultured female rat pituitary cells by estradiol treatment. *J Steroid Biochem* 31, 751-756 (1988)

Emons G, Knuppen R, Ball P und Catt KJ: Biphasic modulation of pituitary sensitivity to GnRH by Östrogens: the effect of A- and D-ring substitution on LH release in cultured pituitary cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 107, 317-327 (1984)

Emons G, Nill J, Sturm R und Ortmann O: Effects of progesterone on GnRH- receptor density in cultured rat pituitary cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 42831 – 839 (1992)

Emons G, Ortmann O, Fingscheidt U, Ball P und Knuppen R: Short-term effects of oestradiol and 4- hydroxyoestradiol on gonadotrophin-releasing hormone induced luteinizing hormone secretion by rat pituitary cells in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* 111, 3, 312-20 (1986)

Fallest PC, Trader GL, Darrow JM und Shupnik M: Regulation of Rat Luteinizing Hormone  $\beta$  Gene Expression in Transgenic Mice by Steroids and a Gonadotropin- Releasing Hormone Antagonist. Biol Reprod 53, 1, 103-109 (1995)

Frawley LS und Neill JD: Biphasic effects of Östrogen on GnRH-induced LH-release in monolayer cultures of rat and monkey pituitary cells. Endocrinology 114, 659-663 (1984)

Friend KE, Resnick EM, Ang LW und Shupnik MA: Specific modulation of Östrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary throughout the estrous cycle and in response to steroid hormones. Mol Cell Endocrinol, 131, 2, 147-55 (1997)

Gajewska A und Kochman K: GnRH Pulsality and the Differential Activation of the Rat Luteinizing Hormone Subunit Genes in the Anterior Pituitary Gland. Neuroendocrinol Letters 22, 435- 440 (2001)

Genazzani A R, Petraglia F, Gamba O, Sgarbi L, Greco MM und Genazzani A D: Neuroendocrinology of the Menstrual Cycle. Ann N. Y. Acad Sci, 143- 151 (1997)

Gharib SD, Bowers SM, Need LR und Chin WW: Regulation of Rat Luteinizing Hormone Subunit Messenger RNAs by Gonadal Steroid Hormones. J Clin Invest 77 (2), 582-589 (1986)

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA und Chin WW: Molecular biology of the pituitary gonadotropins. Endocr Rev 11,1, 177-199 (1990)

Haisenleder DJ, Yasin M und Marshall JC: Regulation of Gonadotropin, Thyrotropin Subunit, and Prolactin Messenger

Ribonucleic Acid Expression by Pulsatile or Continuous Protein Kinase-C Stimulation. *Endocrinology* 136,1, 13-19 (1995)

Haisenleder DJ, Yasin M und Marshall JC: Gonadotropin Subunit and Gonadotropin- Releasing Hormone Receptor Gene Expression are Regulated by Alteration in the Frequency of Calcium Pulsatile Signals. *Endocrinology* 138, 12, 5227-30 (1997)

Harris D, Reiss N und Naor Z: Differential Activation of Protein Kinase C  $\delta$  and  $\epsilon$  Gen Expression by Gonadotropin- releasing Hormone in  $\alpha$ T3-1 Cells. Autoregulation by Protein Kinase C. *J Biol Chem* 272, 21, 13534- 40 (1997)

Hawes BE, Barnes S und Conn PM: Cholera Toxin and Pertussis Toxin Provoke Differential Effects on Luteinizing Hormone release, Inositol Phosphate Production, and Gonadotropin- Releasing Hormone (GnRH) Receptor Binding in the Gonadotrope: Evidence for Multiple Guanyl Nucleotide Binding Proteins in GnRH Action. *Endocrinology* 132, 5, 2124-2130 (1993)

Hehl S, Golard A und Hille B: Involvement of mitochondria in intracellular calcium sequestration by rat gonadotropes. *Cell Calcium*, 20, 6, 515-24 (1996)

Heyward PM und Clarke IJ: A Transient Effect of Estrogen on Calcium Currents and Electrophysiological Responses to Gonadotropin- Releasing Hormone in Ovine Gonadotropes. *Neuroendocrinology* 62, 543- 552 (1995)

Herbison AE: Multimodal Influence of Estrogen upon Gonadotropin- Releasing Hormone Neurons. *Endocr Rev* 19 (3), 302-330 (1998)

Hillier SG: Rôle de la LH sur la folliculogenese dans le cycle menstruel. J Gynecol Obstet Biol Reprod 31, 1, S12-1S14 (2002)

Hirota K, Hirota T, Aguilera G und Catt KJ: Hormon-induced Redistribution of Calcium- activated Phospholipid-dependent Protein Kinase in Pituitary Gonadotrophs. J Biol Chem 260, 3243- 3246 (1985)

Holdstock JG, Aylwin SJ und Burrin JM: Calcium and glycoprotein hormone Alpha- subunit gene expression and secretion in alpha T3-1 gonadotropes. Mol Endocrinol 10, 11, 1308-17 (1996)

Hsieh KP und Martin TFJ: Thyreotropin- Releasing Hormone and Gonadotropin- Releasing Hormone Receptors Activate Phospholipase C by Coupling to the Guanosine Triphosphate- Binding Proteins  $G_q$  and  $G_{11}$ . Mol Endocrinology 6, 1673-1681 (1992)

Hsueh AJW, Erickson GF und Yen SSC: The Sensitizing Effect of Östrogens and Catechol Östrogen on Cultured Pituitary Cells to Luteinizing Hormone- Releasing Hormone: Its Antagonism by Progestins. Endocrinology 104, 3, 803- 813 (1979)

Huckle WR und Conn PM: The relationship between gonadotropin-releasing- hormone release and inositol phosphate production: studies with calcium antagonists and protein kinase C activators. Endocrinology 120, 160- 169 (1987)

Iida T, Stojilkovic SS, Izumi S-I und Catt KJ: Spontaneous and agonist-induced calcium oscillations in pituitary gonadotrophs. Mol Endocrinol 5, 949-958 (1991)

Inoue M, Kishimoto A, Takai Y und Nishizuka Y: Studies on a cyclic

nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* 252, 21, 7610-16 (1977)

Izumi S-I, Stojilkovic SS, Iida T, Krsmanovic LZ, Omeljaniuk RJ und Catt KJ: Role of voltage-sensitive calcium channels  $[Ca^{++}]_i$  and secretory responses to activators of protein kinase C in pituitary gonadotrophs. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 359-36 (1990)

Izumi S, Iwashita M, Makino T, Saito S, Sakamoto S, Takeda Y und Nozawa S: Phorbol ester-induced LH release in pituitary gonadotrophs: effects of antagonists of calmodulin and GnRH. *Endocrinol Jpn* 38, 2, 195-204 (1991)

Jobin RM, Tomic M, Zheng L, Stojilkovic SS und Catt KJ: Gonadotropin-Releasing Hormone-Induced Sensitization of Calcium-Dependent Exocytosis in Pituitary Gonadotrophs. *Endocrinology* 136, 8, 3398-3405 (1995)

Johnson MS, Mitchell R und Fink G: The role of protein kinase C in LHRH self-priming in rat anterior pituitary glands *in vitro*. *J Endocrinol* 116, 231-239 (1988)

Johnson MS, Simpson J und Mitchell R: Effect of phorbol 12,13-dibutyrate on ligand binding, enzyme activity and translocation of protein kinase C isoforms in the alpha T $\delta$ -1 gonadotrope derived cell line. *Mol Cell Biochem* 6, 165 (1), 65-75 (1996)

Kaibuchi K, Takai Y, Sawamura M, Hoshijima M, Fujikura T und Nishizuka Y: Synergistic functions of protein phosphorylation and

calcium mobilization in platelet activation. *J Biol Chem* 258, 11, 6701-4 (1983)

Kaiser UB, Zhao D, Cardona Grund Chin WW: Isolation and characterisation of cDNAs encoding the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189,3, 1645-1652 (1992)

Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A und Chin WW: Differential Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Pulse Frequency on Gonadotropin Subunit and GnRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels *in vitro*. *Endocrinology* 138, 3, 1224-31 (1997)

Kakar SS, Mosgrove LC, Devor DC, Sellers JC und Neill JD: Cloning, Sequencing, and Expression of Human Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 189, 1, 289-295 (1992)

Kakar SS, Malik MT und Winters SJ: Gonadotropin releasing hormone receptor: cloning, expression and transcriptional regulation. *Prog Brain Res* 141, 129- 147 ( 2002)

Kamel F und Kubajak CL: Gonadal steroid effects on LH response to arachidonic acid and protein kinase C. *Am J Physiol* 255, 3Pt1, E3 14-21 ( 1988)

Katzenellenbogen BS, Tsai TS, Tatee T und Katzenellenbogen JA: Östrogen and antiÖstrogen action: studies in reproductive target tissues and tumors. *Adv Exper Med Biol* 117, 111-32 (1979)

Katzenellenbogen BS: Estrogen Receptors: Bioactivities and Interactions with Cell Signaling Pathways. *Biol Reprod* 54, 287-293

(1996)

Kerrigan JR, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Yasin M und Marshall JC: Failure of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Pulses to Increase Luteinizing Hormone  $\beta$  Messenger Ribonucleic Acid in GnRH-Deficient Female Rats. *Endocrinology* 133, 5, 2071-2079 (1993)

Knobil E: The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36, 53-88 (1980)

Knobil E: The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 163, 5, Part 2, 1721-1727 (1990)

Kraus S, Naor Z und Seger R: Intracellular Signaling Pathways Mediated by the Gonadotropin- Releasing Hormone ( GnRH) Receptor. *Arch Med Res* 32, 499-509 ( 2001)

Krey LC und Kamel F: Progesterone modulation of gonadotropin secretion by dispersed rat pituitary cells in culture. I: Basal and gonadotropin- releasing hormone- stimulated LH release. *Mol Cell Endocrinol* 68, 85- 94 (1990)

Krey LC, Kamel F und MacLusky NJ: Progesterone modulation of gonadotropin secretion by dispersed rat pituitary cells in culture. II: Intracellular metabolism and progestin receptors. *Mol Cell Endocrinol* 68, 95- 103 (1990)

Krey LC und Kamel F: Progesteron modulation of gonadotrophin secretion by dispersed rat pituitary cells in culture. III: A 23187, cAMP, phorbol ester and DiC8- stimulated luteinizing hormone release. *Mol Cell Endocrinol* 70, 21-23 (1990)

Kuiper GGJM, Carlson B, Grandien K, Haggblad J, Nilsson S und Gustafsson J-A: Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 138: 863-870 (1997)

Kukuljan M, Vergara L und Stojilkovic SS: Modulation of inositol-1,4,5-triphosphate-induced ( $\text{Ca}^{++}$ ); oscillations by calcium entry in pituitary gonadotrophs. *Biophys J* 72, 2Pt 1, 698-707 (1997)

Lachowicz A; Ocedalski T; Pawlikowski M und Rebas E: Effect of 17- $\beta$ -Estradiol and Progesterone on Angiotensin II- Induced Changes in Inositol-1,4,5-Triphosphate Content and Protein Kinase C Activity in Anterior Pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 1, 7-10 (2000)

Lagace L, Massicotte J und Labrie F: Acute Stimulatory of Progesterone on Luteinizing Hormone and Follicle- Stimulating Hormone Release in Rat Anterior Pituitary Cells in Culture. *Endocrinology* 106, 684- 689 (1980)

Levine JE: New Concepts of the Neuroendocrine Regulation of Gonadotropin Surges in Rats. *Biol Reprod* 56, 293-302 (1997)

Li YX, Stojilkovic SS, Keizer J und Rinzel J: Sensing and refilling calcium stores in an excitable cell. *Biophys J* 72, 3, 1080-91 (1997)

Lin X und Conn PM: Transcriptional activation of GnRH receptor gene by GnRH: involvement of multiple signal transduction pathways. *Endocrinology* 140, 1, 358-64 (1999)

Lincoln DW, Fraser HM, Lincoln GA, Martin GB und McNeilly AS:

Hypothalamic Pulse Generators. *Rec Prog Horm Res* 41, 369- 416 (1985)

Liu TC und Jackson GL: Synthesis and release of luteinizing hormone in vitro: manipulations of  $Ca^{++}$ - environment. *Am J Physiol* 249, E 165- E174 (1985)

Liu T-C und Jackson G L: Stimulation by Phorbol Ester and Diacylglycerol of Luteinizing Hormone Glycosylation and Release by Rat Anterior Pituitary Cells. *Endocrinology* 121, 1589-1595 (1987)

Maeda T und Lloyd RV: Protein kinase C activity and messenger RNA modulations by estrogen in normal and neoplastic rat pituitary tissue. *Lab Invest* 68 (4), 472-480 ( 1993)

Marian J und Conn PM: Gonadotropin releasing hormone stimulation of cultured pituitary cells requires calcium. *Mol Pharmacol* 16, 1, 196- 201 (1979)

McArdle CA, Huckle WR und Conn PM: Phorbol Esters Reduce Gonadotrope Responsiveness to Protein Kinase C but not to  $Ca^{++}$ - mobilizing Secretagogues. *J Biol Chem* 262, 5028- 5035 (1987)

McArdle CA, Forrest- Owen W, Davidson JS, Fowkes R, Bunting R, Mason WT, Poch A und Kratzmeier M:  $Ca^{++}$ - entry in gonadotrophs and alphaT3-1 cells: does store-dependent  $Ca^{++}$  influx mediate gonadotrophin- releasing hormone action ? *J Endocrinol* 149, 155- 169 (1996)

McArdle CA, Franklin J, Green L und Hislop JN: Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin- releasing hormone receptors.

J Endocrinol 173, 1- 11 (2002)

MacEwan DJ, Johnson MS und Mitchell R: Protein kinase C isoforms in pituitary cells displaying differential sensitivity to phorbol ester. Mol Cell Biochem 202, 85- 90 (1999)

Menon M, Peegel H und Katta V: 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, 534- 540 (1985)

Merelli F, Stojilkovic SS, Iida T, Krsmanovic LZ, Zheng L, Mellon P und Catt KJ: Gonadotropin-Releasing Hormone- Induced Calcium Signaling in Clonal Pituitary Gonadotrophs. Endocrinology 131, 2, 925- 932 (1992)

Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E und Katz A: a novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. Proc Natl Acad Sci USA 98,17, 9636- 9641 (2001)

Mitchner NA, Garlick C und Ben-Jonathan N: Cellular Distribution and Gene Regulation of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the Rat Pituitary Gland. Endocrinology 139, 9, 3976- 3983 (1998)

Moenter SM, DeFazio RA, Pitts GR und Nunemaker CS: Mechanisms underlying episodic gonadotropin- releasing hormone secretion. Front Neuroendocrinol 24, 79- 93 (2003)

Mulvaney JM und Roberson MS: Divergent Signaling Pathways Requiring discrete Calcium Signals Mediate Concurrent Activation of

Two Mitogen-activated Protein Kinases by Gonadotropin- releasing Hormone. J Biol Chem 275, 14182- 14189 (2000)

Naor Z und Catt KJ: mechanism of Action of Gonadotropin- Releasing Hormone. J Biol Chem 256, 5, 2226- 2229 (1981)

Naor Z und Eli Y: Synergistic stimulation of LH release by protein kinase C activators and  $Ca^{++}$  -ionophore. Biochem Biophys Res Commun 130, 848- 853 (1985)

Naor Z, Zer J, Zakut H und Hermon J.: Characterisation of pituitary calcium- activated, phospholipid -dependent protein kinase: Redistribution by gonadotropin- releasing- hormone. Proc Natl Acad Sci USA 82, 8203- 8207 (1985)

Naor Z, Schwartz I, Hazum E, Azrad A und Herman J: Effekt of phorbol ester on stimulus- secretion coupling mechanisms in gonadotropin releasing hormone- stimulated pituitary gonadotrophs. Biochem Biophys Res Commun 148, 1312 – 1322 (1987)

Naor Z: Signal Transduction Mechanisms of  $Ca^{++}$  Mobilizing Hormones: The Case of Gonadotropin- Releasing Hormone. Endocr Rev 11, 326- 353 (1990)

Naor Z, Harris D und Shacham S: Mechanism of GnRH Receptor Signaling: Combinatorial Cross- Talk of  $Ca^{2+}$  and Protein Kinase C. Front Neuroendocrinol 19, 1-19 (1998)

Neill JD, Duck LW, Sellers JC, Musgrove LC und Kehrl JH: A regulator of G Proteinsignaling, RGS3, inhibits gonadotropin- releasing hormone (GnRH)- stimulated luteinizing hormone (LH) secretion. BMC Cell

Biology 2, 21- 36 (2001)

Nett TM, Turzillo AM, Baratta M und Rispoli LA: Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle- stimulating hormone and luteinizing hormone. *Dom Anim Endocrinol* 23 , 33- 42 (2002)

Nishizuka Y: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308, 694- 698 (1984)

Nishizuka Y: Intracellular Signaling by Hydrolysis of Phospholipids and Activation of Protein Kinase C. *Science* 258, 607- 614 (1992)

O'Flaherty JT, Chadwell BA, Kearns MW, Sergeant S und Daniel LW: Protein Kinases C Translocation Responses to Low Concentrations of Arachidonic Acid. *J Biol Chem* 276 (27), 24743- 24750 (2001)

Ortmann O, Emons G, Knuppen R und Catt KJ: Inhibitory effects of the antiprogestin, RU 486, on progesterone actions and luteinizing hormone secretion in pituitary gonadotrophs. *J Steroid Biochem* 32, 291- 297 (1989a)

Ortmann O, Wiese H, Knuppen R und Emons G: Acute facilitory action of progesterone on gonadotrophin secretion of perfused rat pituitary cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 12, 426- 434 (1989b)

Ortmann O., Johannsen K., Knuppen R. und Emons G.: Acute effects of oestradiol and progesterone on mellitin- and gonadotrophin-releasing hormon- induced LH- secretion. *J Endocrinol* 132, 251- 259 (1992a)

Ortmann O, Stojilcovic SS, Cesnjaj M, Emons G und Catt KJ: Modulation of cytoplasmic calcium signaling in rat pituitary

gonadotrophs by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131, 1565–1569 (1992b)

Ortmann O, Merelli F, Stojilkovic SS, Schulz KD, Emons G und Catt KJ: Modulation of Calcium Signaling and LH Secretion by Progesterone in Pituitary Gonadotrophs and clonal pituitary cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48, 1, 47- 54 (1994)

Ortmann O, Bakhit M., Bloh P, Schulz K-D und Emons G: Ovarian Steroids Modulate Gonadotropin- releasing Hormone- induced Biphasic Luteinizing Hormone Secretory Responses and Inositol Phosphate Accumulation in Rat Anterior Pituitary Cells and  $\alpha$ T3-1 Gonadotrophs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54, 3/4, 101-109 (1995)

Ortmann O, Ansari-Pirsarai B, Bloh P, Schulz KD und Emons G: Modulatory actions of progesterone on gonadotropin- releasing hormone- induced arachidonic acid liberation from perfused rat pituitary cells. *Eur J Endocrinol* 135, 626- 30 (1996)

Ortmann O und Diedrich K: Pituitary and extrapituitary actions of gonadotrophin- releasing hormone and its analogues. *Human Reprod* 14, 194- 206 (1999)

Page RB: Directional Pituitary Blood Flow: A Microcinematographic Study. *Endocrinology* 112, 1,157- 165 (1983)

Perrin MH, Haas Y, Porter J, Rivier J und Vale W: The Gonadotropin-Releasing Hormone Pituitary Receptor Interacts with a Guanosine Tri-Phosphate- Binding-Protein: Differential Effects of Guanyl Nucleotides On Agonist and Antagonist Binding. *Endocrinology* 124, 2, 798- 804 (1989)

Pierce JG, Liao T, Howard SM, Shome B und Cornell JS: Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone.

Recent Prog Horm Res 27, 165- 212 (1971)

Poulin B, Rich N, Mitev Y, Gautron JP, Kordon C, Enjalbert A und Drouva SV: Differential involvement of calcium channels and protein kinase- C activity in GnRH- induced phospholipase- C, -a2 and D- activation in a gonadotrope cell Line (alpha T3-1). Mol Cell Endocrinol 122, 1, 33-50, (1996)

Probst WC, Snyder LA, Schuster DL, Brosius J und Sealfon S: Sequence Alignment of the G-Protein Coupled Receptor Superfamily. DNA Cell Biol 11, 1, 1-20 (1992)

Ramey JW, Highsmith RF, Wilfinger WW und Baldwin DM: The Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone and Estradiol on Luteinizing Hormone Biosynthesis in Cultured Rat Anterior Pituitary Cells. Endocrinology 120, 4, 1503- 1513 (1987)

Richter TA, Robinson JE und Evans NP: Progesterone Treatment That either Blocks or Augments the Estradiol- Induced Gonadotropin- Releasing Hormone Surge Is Associated with Different Patterns of Hypothalamic Neural Activation. Neuroendocrinology 73, 378- 386 (2001)

Saito S, Izumi S, Umeuchi M, Makino T, Tsujimoto G und Nozawa S: Effect of GnRH Antagonists on Phorbol- Induced LH Release from Rat Pituitary Gonadotrophs. Endocrinol J 41, 4, 415-9 (1994)

Sakurai H, Adams BM und Adams TE: Concentration of GnRH receptor and GnRH receptor mRNA in pituitary tissue of orchidectomized sheep: effect of estradiol, progesterone, and

progesterone withdrawal. *J Endocrinol* 152,1,91-98 (1997)

Salton SR, Blum M, Jonassen JA, Clayton RN und Roberts JL: Stimulation of pituitary luteinizing hormone secretion by gonadotropin-releasing hormone is not coupled to beta-luteinizing hormone gene transcription. *Mol Endocrinol* 2, 1033- 1042 (1988)

Santoro N, Filicori M und Crowley JRWF: Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile GnRH. *Endocr Rev* 7, 12-23 (1986)

Saunders BD, Sabbach E, Chin WW und Kaiser UB: Differential Use of Signal Transduction Pathways in the Gonadotropin- Releasing Hormone- Mediated Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Expression. *Endocrinology* 139, 4,1835- 1843 (1998)

Sealfon SC, Weinstein H und Millar RP: Molecular Mechanisms of Ligand Interaction with the Gonadotropin- Releasing Hormone Receptor. *Endocr Rev* 18, 2,180-205 (1997)

Silverman AJ, Antunes JL, Abrams GM und Nilaver RT: The Luteinizing Hormone Releasing Hormone pathways in Rhesus (*Macaca mulatta*) and Pigtailed (*Macaca nemestrina*) Monkeys: New Observations on Thick, Unembedded Sections. *J Comp Neurology* 211, 309-317 (1982)

Shacham S, Harris D, Ben- Shlomo B, Cohen I, Bonfil D, Przeddecki F, Lewy H, Ashkenazi IE, Seger R und Naor Z: Mechanism of GnRH Receptor Signaling on Gonadotropin Release and Gene Expression in Pituitary Gonadotrophs. *Vitam Horm* 63, 63- 90 (2001)

Shah BH und Milligan G: The Gonadotrophin- Releasing Hormone

Receptor of  $\alpha$ T3-1 Pituitary Cells Regulates Cellular Levels of both of the Phosphoinositidase C-Linked G-Proteins,  $G_{q\alpha}$  and  $G_{11\alpha}$ , Equally. *Mol Pharmacol* 46, 1- 7 (1994)

Shraga-Levine Z, Ben-Menahem D und Naor Z: Arachidonic acid and lipoxygenase products stimulate protein kinase C beta mRNA levels in pituitary alpha T3-1 cell line: role in gonadotropin- releasing hormone action. *Biochem J* 316 (Pt 2): 667- 670 (1996)

Shupnik MA: Gonadotropin Gene Modulation by Steroids and Gonadotropin- Releasing Hormone. *Biol Reprod* 54, 279-286 (1996)

Solano AR, Dufau ML und Catt KJ: Bioassay and Radioimmunoassay of Serum Luteinizing Hormone in the Male Rat. *Endocrinology* 105,372-381 (1979)

Stojilkovic SS, Chang JP, Izumi S, Tasaka K und Catt KJ: Mechanisms of Secretory Responses to Gonadotropin- Releasing Hormone and Phorbol esters in Cultured Pituitary Cells. *J Biol Chem* 263, 17301- 17306 (1988a)

Stojilkovic SS, Chang JP, Ngo D und Catt KJ: Evidence for a Role of Protein Kinase C in Luteinizing Hormone Synthesis and Secretion. *J Biol Chem* 263, 17307- 17313 (1988b)

Stojilkovic SS, Iida T, Merelli F, Torsello A, Krsmanovic LZ und Catt KJ: Interactions between Calcium and Protein Kinase C in the Control of Signaling and Secretion in Pituitary Gonadotrophs. *J Biol Chem* 266, 10377- 10384 (1991)

Stojilkovic SS und Catt KJ: Calcium Oscillations in Anterior Pituitary Cells. *Endocr Rev* 13, 2, 256- 280 (1992)

Stojilkovic SS und Catt K: Novel Aspects of GnRH- Induced Intracellular Signaling and Secretion in Pituitary Gonadotrophs. *J Neuroendocrinol* 7, 739- 757 (1995)

Stojilkovic SS, Reinhart J und Catt KJ: Gonadotropin- Releasing Hormone Receptors: Structure and Signal Transduction Pathways. *Endocr Rev* 15, 4, 462- 498 (1994)

Stutzin A, Stojilkovic S, Catt KJ und Rojas E. Characteristics of two types of Calcium channels in rat pituitary gonadotrophs. *Am J Physiol* 257 (Cell Physiol 26) C865- C874 (1989)

Sundaresan S, Colin IM, Pestell RG und Jameson JL: Stimulation of Mitogen-Activated Protein Kinase by Gonadotropin-Releasing Hormone: Evidence for the Involvement of Protein Kinase C. *Endocrinology* 137, 1, 304- 311 (1996)

Szabo M, Kilen SM, Nho SJ und Schwartz NB: Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by Östrogen. *Biol Reprod* 62, 95- 102 (2000)

Tandon OP und Rajesh Chintala S: Hypothalamo- Pituitary- gonadal Axis in Control of Female Reproductive Cycle. *Indian J Physiol Pharmacol* 45 (4), 395- 407 (2001)

Tasaka K, Stojilkovic SS, Izumi S-I und Catt KJ: Biphasic Activation of cytosolic free Calcium and LH Responses by Gonadotropin-Releasing Hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 154, 1, 398- 403 (1988)

Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T und Nishizuka Y: Calcium- dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. J Biol Chem 254, 10, 3692-5 (1979)

Thomson FJ, Johnson MS, MacEvan DJ und Mitchell R: Oestradiol-17 $\beta$  modulates the actions of pharmacologically distinct forms of protein kinase C in rat anterior pituitary cells. J Endocrinol 136, 105-107 (1993)

Tomic M, Cesnaj M, Catt KJ und Stojilkovic SS: Developmental and Physiological Aspects of Ca<sup>2+</sup> -Signaling in Agonist- Stimulated Pituitary Gonadotrophs. Endocrinology 135, 1762-1771 (1994)

Tse A und Hille B: Role of Voltage- Gated Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> Channels in Gonadotropin- Releasing Hormone- Induced Membrane Potential Changes Identified Rat Gonadotropes. Endocrinology 132, 4, 1475-81 (1993)

Tse A, Tse F und Hille B: Modulation of Ca<sup>++</sup> oscillation and apamin-sensitive, Ca<sup>++</sup>- activated K<sup>+</sup> current in rat gonadotropes. Pflügers Arch- Eur J Physiol 430: 645-652 (1995)

Turgeon J und Waring DW: Rapid Augmentation by Progesterone of Agonist- Stimulated Luteinizing Hormone Secretion by Cultured Pituitary Cells. Endocrinology 127, 2, 773- 780 (1990)

Turgeon JL, Van Patten SM, Shyamala G und Waring DW: Steroid Regulation of Progesterone Receptor Expression in Cultured Rat Gonadotropes. Endocrinology 140, 5, 2318-2325 (1999)

Turzillo AM, Clapper JA, Moss GE und Nett TM: Regulation of ovine GnRH receptor gene expression by progesterone and oestradiol.

J Reprod Fertil 113, 2, 251- 256 (1998)

Vasilyev VV, Lawson MA, Dipaolo D, Webster NJG und Mellon P: Different Signaling Pathways Control Acute Induction versus Long-Term Repression of LH $\beta$  Transcription by GnRH. Endocrinology 143,

9, 3414- 3426 (2002)

Waring DW und Turgeon JL: A Pathway for Luteinizing Hormone Releasing- Hormone Self- Potentiation: Cross- Talk with the Progesterone Receptor. Endocrinology 130, 6, 3275- 3282 (1992)

Weck J, Fallest PC, Pitt LK und Shupnik MA: Differential Gonadotropin- Releasing Hormone Stimulation of Rat Luteinizing Hormone Subunit Gene Transcription by Calcium Influx and Mitogen-Activated Protein Kinase- Signaling Pathways. Mol Endocrinol 12, 3, 451- 457 (1998)

White BR, Duval DL, Mulvaney JM Roberson MS und Clay CM: Homologous Regulation of the Gonadotropin- Releasing Hormone Receptor Gene is Partially Mediated by Protein Kinase C Activation of an Activator Protein- 1-Element. Mol Endocrinol 13, 4566- 4577 (1999)

Wildt L und Leyendecker G: Die endokrine Kontrolle des menstruellen Zyklus. Gynäkologe 14, 64- 83 (1981)

Wolfe A, Kim HH und Radovick: The GnRH neuron: molecular aspects of migration, gene expression and regulation. Prog Brain Res 141, 243- 257 (2002)

Zanisi M und Messi E : Sex Steroids and the Control of LHRH Secretion. J Steroid Biochem Mol Biol 40, 1- 3, 155- 163 (1991)

Zhu H, Hille B und Xu T: Sensitization of regulated exocytosis by protein kinase C. Proc Natl Acad Sci USA 24; 99 (26), 17055- 17059 (2002)

Zmeili SM, Papavasiliou SS, Thorner MO, Evans WS, Marshall JC und Landefeld TD: Alpha and Luteinizing Hormone Beta Subunit Messenger Ribonucleic Acids During The Rat Estrous Cycle. Endocrinology 119, 4,1867- 1869 (1986)

Zorec R: Calcium Signaling und Secretion in Pituitary Cells. Trends Endocrinol Metab 7, 10, 384- 388 (1996)

## Lebenslauf

- 15.08.1961** geboren in Lübeck als 2. von 3 Söhnen von Sigrid Tilse, geb. Hoge und Dr. med. Harro Tilse, Internist
- 1968-72** Grundschule
- 1972-82** Gymnasium, Abitur
- 1983-84** Grundwehrdienst bei der Bundesmarine
- 10/1984** Beginn des Studiums der Humanmedizin in Lübeck,
- 1989-90** Durchführung des experimentellen Teils der Dissertation
- 5/1992** Approbation
- 6/1992-** Arzt im Praktikum an der Klinik für Innere Medizin  
**11/1993** (Prof. Fehm) der Medizinischen Universität zu Lübeck
- 7/1994** Eintritt in die Bundeswehr als Soldat auf Zeit, Verwendung als Geschwaderarzt in der Flotte, Truppenarzt, Taucherarzt und im Stab der Marinetechnikschule sowie am Schiffahrtmedizinischen Institut der Marine
- Klinische Tätigkeit: 6 Monate Chirurgie, 6 Monate Neurologie, 18 Monate Psychiatrie im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg sowie 6 Monate Mitarbeit in Hausärztlicher Praxis
- 03.01.04** Dienstzeitende bei der Bundeswehr  
Zum 01.02.04 zugelassen als Allgemeinarzt in Lübeck.  
Seit 1988 mit Dr. med. Andrea Tilse, geb. Reimann, Allgemeinärztin, verheiratet. 4 gemeinsame Kinder im Alter von 7-15 Jahren.  
Freizeitinteressen: wechselnde Themen aus den Bereichen Archäologie, Geschichte, Kunstgeschichte

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden im J. Steroid Biochem. Molec. Biol. veröffentlicht::

Modulatory Actions of Estradiol and Progesterone on Phorbol Ester-Stimulated LH Secretion from Cultured Rat Pituitary Cells. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. Vol. 43, No. 7, pp 619-627, 1992

## Danksagung

Dem inzwischen emeritierten Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Universität zu Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. Oberheuser, danke ich für die Nutzung von Arbeitsplatz und Material. Herrn Prof. Dr. med. O. Ortmann, zwischenzeitlich an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Philippsuniversität in Marburg, jetzt Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Regensburg, danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung während des experimentellen Teils und bei der Abfassung der Promotionsschrift. Insbesondere für die nach mehrjähriger Arbeitsunterbrechung meinerseits wieder aufgenommene Betreuung schulde ich besonders herzlichen Dank. Meiner damaligen Kommilitonin Frau Kirsten Johannsen, damals ebenfalls Doktorandin im Hormonlabor, jetzt ärztlich in den USA tätig, danke ich für die kamerdschaftliche Zusammenarbeit.

Frau R. Sturm danke ich besonders für Ihre Einarbeitung in die Labortätigkeit und weitere Unterstützung beim experimentellen Teil der Arbeit.

Zu meiner grössten Betroffenheit erfuhr ich, dass sie jüngst an einer Krankheit verstarb. Ihre herzliche und hilfsbereite Art wird in meiner Erinnerung bleiben.

