

Aus dem
Department für Anatomie
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie

**Überlegenheit von Lektinkonjugatmarkern gegenüber
Adenohypophysen-Hormonantikörpern anhand von
Färbungen an konventionellen humanen Schnittpräparaten,
3D-Organoiden und an durchsichtig gemachtem Gewebe**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Nikbin, Mohammad Reza

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Bakchoul

Tag der Disputation: 08.04.2026

für m.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Hypophyse – die Steuerzentrale der Hormone.....	1
1.1.1 Makroskopische Anatomie	1
1.1.2 Mikroskopische Anatomie.....	2
1.1.3 Die Funktion der Hypophyse	4
1.1.4 Die embryonale Entwicklung	5
1.2 3D Organoide der Adenohypophyse.....	7
1.2.1 Human induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSZ).....	7
1.2.2 Differenzierung von 3D Organoiden	8
1.3 Lektinbasierte Identifikation.....	9
1.4 Gewebeklämung	11
1.5 Ziel der Arbeit.....	13
2 MATERIAL.....	15
2.1 Humane Proben	15
2.2 Zelllinien	15
2.3 Grundmedien	15
2.4 Zellmedien.....	17
2.5 Medienzusätze	18
2.6 Verbrauchsmaterialien	19
2.7 Lösungen	22
2.8 Chemikalien, Zusätze und Enzyme.....	23
2.9 Geräte	25
2.10 Primärantikörper.....	27
2.11 Sekundärantikörper.....	28
2.12 Pluripotenzfärbekit	28
2.13 Lektine.....	29

2.14	Software	29
3	METHODEN	30
3.1	Humane Proben	30
3.1.1	<i>Erlaubnis zur Entnahme von humanen Proben</i>	30
3.1.2	<i>Entnahme der Proben aus Körperspenderinnen und Körperspender</i>	30
3.1.3	<i>Fixierung und Präparation der Proben</i>	31
3.1.4	<i>Einbettung und Gefrierschnitterstellung des Gewebes</i>	31
3.1.5	<i>Paraffineinbettung</i>	32
3.1.6	<i>Immunfluoreszenz</i>	32
3.1.6.1	Immunofluoreszenzfärbung für Kryosektion	32
3.1.6.2	Immunofluoreszenzfärbung für Paraffinschnitte	34
3.1.7	<i>Histologische Färbungen</i>	34
3.1.7.1	PAS-Orange-G-Färbung	34
3.2	iPSZ Kultur	35
3.2.1	<i>Auftauen der iPSZ</i>	35
3.2.2	<i>Kultivierung der iPSZ</i>	36
3.2.3	<i>Einfrieren der iPSZ</i>	37
3.2.4	<i>Charakterisierung der iPSZ</i>	37
3.3	ADENoide	37
3.3.1	<i>Embryoid-Body Formation</i>	39
3.3.2	<i>Differenzierung der ADENoide</i>	40
3.3.3	<i>Analyse der Organoide</i>	41
3.3.3.1	Fixierung und Einbetten der ADENoide	41
3.3.3.2	Gefrierschnitterstellung	42
3.3.3.3	Immunofluoreszenzfärbung der ADENoide	42
3.4	Hypophyse Gewebeklärung	42
3.4.1	<i>Vorbereitung</i>	42
3.4.2	<i>Polymerisation der Hypophyse</i>	43
3.4.3	<i>Gewebeklärung</i>	43
3.4.4	<i>Immunofluoreszenz bei geklärtem Gewebe</i>	44
3.5	Analyse der Proben	44

4	ERGEBNISSE	45
4.1	Konventionelle histologische Färbung	45
4.2	Vergleich - Histologische und Immunofluoreszenzfärbung	48
4.3	Färbung mit Antikörpern und Lektinen	51
4.3.1	<i>Kombination der Hormone Prolaktin und GH mit Lektinen</i>	51
4.3.2	<i>Kombination der Hormone FSH und LH mit Lektinen</i>	54
4.3.3	<i>Kombination der Hormone ACTH und TSH mit Lektinen</i>	57
4.3.4	<i>Zwischenfazit zu den Lektinmarker-Hormon-Übereinstimmungen</i>	60
4.3.5	<i>Detaillierte Darstellung - ACTH-positiven und lektinpositiven Zellen</i>	60
4.3.6	<i>Übersichtaufnahme - ACTH-positiven und lektinpositiven Zellen</i>	64
4.3.7	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse der Lektinmarker</i>	67
4.4	Weitere Beobachtungen mittels Lektinen	68
4.5	Gewebeklämung am Beispiel der Hypophyse	70
4.5.1	<i>Gewebeklämung der humanen Adenohypophyse</i>	70
4.5.2	<i>Immunhistochemie der geklärten Adenohypophyse und Etablierung des Lektinmarkers UEA-1</i>	73
4.5.3	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse der Gewebeklämung</i>	75
4.6	Lektine in der Entwicklung der Adenohypophyse	75
4.6.1	<i>Protokolletablierung der ADENOide</i>	76
4.6.2	<i>Con A-positive Signale in den ADENoiden im Verlauf</i>	77
4.6.3	<i>UEA-1-positive Signale in den ADENoiden im Verlauf</i>	81
4.6.4	<i>PNA-positive Signale in den ADENoiden im Verlauf</i>	84
4.6.5	<i>Prozessoptimierung mittels Durchlichtmikroskopie</i>	87
4.6.6	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse der ADENOide</i>	88
5	DISKUSSION	90
5.1	Erfolge	90
5.1.1	<i>Glykanstrukturen statt Hormone suchen?</i>	90
5.1.2	<i>Lektinmarker – PNA</i>	90
5.1.3	<i>Lektinmarker – UEA-1</i>	91
5.1.4	<i>Lektinmarker – Con A</i>	92

5.1.5	<i>Vergleich der Lektinimmunfluoreszenz mit der PAS-Orange G Färbung</i>	93
5.1.6	<i>Weiteren Strukturen, die mittels Lektinmarkern dargestellt werden</i>	94
5.1.7	<i>Etablierung von Klärungsverfahren auf das Beispiel der Hypophyse mit Nutzung der Lektinen</i>	95
5.1.8	<i>Nutzung von Lektinen an Organoidsystem wie die der ADENOide</i>	96
5.1.9	<i>Lektinmarker in der Entwicklung der Adenohypophyse</i>	98
5.2	<i>Schlüsse</i>	99
5.2.1	<i>Con-A Lektinmarker als Surrogatmarker für ACTH positive Zellen</i>	99
5.2.2	<i>Identifikation weiterer Strukturen mittels Lektinmarker</i>	100
5.2.3	<i>3D-Anatomie der Adenohypophyse – neue Methode gelungen</i>	100
5.2.4	<i>Lektine als Entwicklungsmarker in ADENoiden</i>	100
5.3	<i>Limitationen</i>	101
5.3.1	<i>Limitationen der Lektinmarker als Diagnostika</i>	101
5.3.2	<i>Limitationen bei der Gewebeklä rung</i>	103
5.3.3	<i>Grenzen der ADENOide</i>	103
5.4	<i>Ausblick</i>	104
5.4.1	<i>Verwendung und Etablierung weiterer Lektinmarkern</i>	104
5.4.2	<i>ADENOide - Verbesserungsfahrplan</i>	107
5.4.3	<i>Gewebeklä rung</i>	108
5.4.4	<i>Einsatzmöglichkeiten der Lektine bei Hypophysenpathologien</i>	110
5.4.5	<i>Therapeutische Ansätze von Lektinen</i>	111
5.5	<i>Schlussfolge</i>	112
6	ZUSAMMENFASSUNG	114
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	115
8	DANKSAGUNG	116
9	LITERATURVERZEICHNIS	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopie Hypophyse	2
Abbildung 2: Hormonachse Hypothalamus-Hypophyse-Zielorgan.....	5
Abbildung 3: Embryologische Entwicklung der Hypophyse.....	6
Abbildung 4: Lektinbindestellen an der Glykanstruktur	11
Abbildung 5: Gewebeklärungsprozess	13
Abbildung 6: ADENoide im Prozess	38
Abbildung 7: Differenzierungsprotokoll ADENoide nach (Kasai, Suga et al. 2020) - modifiziert.....	40
Abbildung 8: Histologische Färbung der humanen Hypophyse – PAS Orange G	48
Abbildung 9: PAS-Orange-G im Vergleich zur Immunfluoreszenz	50
Abbildung 10: Färbung von Prolaktin und GH mit Lektinen.....	53
Abbildung 11: Färbung von FSH und LH mit Lektinen	56
Abbildung 12: Färbung von ACTH und TSH mit Lektinen	59
Abbildung 13: Immunhistologische Färbung der Adenohypophyse und Analyse	62
Abbildung 14: Immunhistologische Färbung der Adenohypophyse	63
Abbildung 15: Übersicht der gesamten Hypophyse	64
Abbildung 16: Übersicht der gesamten Hypophyse	65
Abbildung 17: Übersicht der gesamten Hypophyse	66
Abbildung 18: Darstellung von Gefäßen und Kolloid mit Hilfe von Lektinen	68
Abbildung 19: Klärungsverfahren der Hypophyse in einer Bilderserie	72
Abbildung 20: Immunfluoreszenzaufnahmen der geklärten Adenohypophyse	73
Abbildung 21: EB-Formation Vergleiche	76
Abbildung 22: ADENoid d61 ACTH x Con A	78
Abbildung 23: ADENoid d 72 ACTH x Con A	79
Abbildung 24: ADENoid d120 ACTH x Con A	80
Abbildung 25: ADENoid d 61 ACTH x UEA-1.....	81
Abbildung 26: ADENoid d72 ACTH x UEA-1.....	82
Abbildung 27: ADENoid d120 ACTH x UEA-1.....	83
Abbildung 28: ADENoid d61 ACTH x PNA.....	85

Abbildung 29: ADENoid d72 ACTH x PNA.....	86
Abbildung 30: ADENoid d 120 ACTH x PNA.....	87
Abbildung 31: ADENoid d120 Immunfluoreszenz vs. Durchlichtmikroskopie....	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane Proben.....	15
Tabelle 2: Zelllinien.....	15
Tabelle 3: Grundmedien	15
Tabelle 4: Zellmedien	17
Tabelle 5: Medienzusätze.....	18
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 7: Lösungen	22
Tabelle 8: Chemikalien, Zusätze und Enzyme	23
Tabelle 9: Geräte.....	25
Tabelle 10: Primärantikörper	27
Tabelle 11: Sekundärantikörper	28
Tabelle 12: Pluripotenzfärbekit.....	28
Tabelle 13: Lektine	29
Tabelle 14: Software.....	29
Tabelle 15: Kombinationsfärbung mit den Hormonen Prolactin und GH in Verbindung mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA.....	54
Tabelle 16: Kombinationsfärbung mit den Hormonen FSH und LH in Verbindung mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA	57
Tabelle 17: Kombinationsfärbung mit den Hormonen ACTH und TSH in Verbindung mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA.....	60
Tabelle 18: Erwerbliche Lektinmarkern	105

Abkürzungsverzeichnis

CO_2	carbon dioxide
%	Prozent
O_2	Sauerstoff
T_3	Thyroxin
°	Grad
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
3DISCO	3D Imaging of Solvent-Cleared Organs
A.	Arteria
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BABB	BenzylAlcohol - BenzylBenzoat (Clearing)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BMP	Bone morphogenetic protein
C	Celsius
CUBIC	Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktail (Clearing)
CLARITY	Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Immunostaining Tissue-hYdrogel
Ca^2	Calcium
Cl^-	Chlorid
ca.	circa
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Con A	Concanavalin A
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFG	DMEM F12 Glucose
DFNB	DMEM F12 N2 B27
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E-Cadherin	Epithelial cadherin
E1	episomale hiPSZ Linie – Gibco™
E6	Essential 6™ Medium

E8	Essential 8™ Medium
EB	Embryoid body
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
et al.	et alia
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FTDA	FGF2/TGFβ/Dorsomorphin/Activin A
g	Gramm
G	Gravitationsbeschleunigung ($\sim 9,81 \frac{m}{s^2}$)
gfCDM	Growth-factor free chemically defined medium
GH	Growth Hormone
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
T_3	Trijodthyronin
h	Stunde engl. hour
hiPSC	Human induced pluripotent stem cell
HMS	Hydrogel monomer solution
HSA	Humanes Serumalbumin
IGF	Insulin-like growth factor
ITS	Insulin/Transferrin/Selenit
K2	reprogrammierte Keratinozyten von K2
KOSR	KnockOut™ SR
kPa	Kilopascal
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
mTeSR™1	Zellkulturmedium
NDS	Normal donkey serum
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter

nM	Nanomolar
PACT	Passive CLARITY Technique
PAS	periodic acid schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
pH	pondus hydrogenii
PNA	Peanut
ROCK-Inhibitor	Y-27632
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAG	Smoothended-Agonist
SeeDB	See Deep Brain (Clearing)
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Shh	Sonic Hedgehog
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UEA-1	Ulex Europaeus Agglutinin
Vv.	Venae
v/v	Volumen pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ m ²	Quadratmikrometer

1 Einleitung

1.1 Die Hypophyse – die Steuerzentrale der Hormone

Die Drüse, deren Größe mit der einer Fingerkuppe vergleichbar ist, spielt eine zentrale Rolle in der Regulation und Sekretion von Hormonen. Sie fungiert als Dirigentin, „chef d’orchestre“, der Hormonregulation zwischen dem Hypothalamus und den Zielorganen des Körpers (Melmed 2022).

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Die Hypophyse, auch als Hirnanhangsdrüse bezeichnet, befindet sich in der Fossa cranii media, genauer in der Fossa hypophysialis des Os sphenoidale. Sie steht über das Infundibulum in Verbindung mit dem Hypothalamus. Anatomisch lässt sich die Hypophyse in den Lobus anterior (Adenohypophyse) und den Lobus posterior (Neurohypophyse) gliedern. Wie in der Abbildung 1 zu sehen ist, sind beide Lobi mit der Pars intermedia verbunden. Die Hypophyse wird kranial vom Chiasma opticum überlagert und durch die Dura mater geschützt. Lateral grenzt sie an den Sinus cavernosus, während sie kaudal in der Sella turcica liegt, wo sie in ihrer eigenen Grube eingebettet ist (Schünke, Schulte et al. 2022).

Die arterielle Blutversorgung des Hypophysenvorderlappens erfolgt durch Endäste der Arteria carotis interna, insbesondere durch die Arteria hypophysialis superior und die Arteria hypophysialis inferior. Die Arteria carotis interna verläuft dabei durch das Infundibulum und setzt ihren Verlauf über die Venae portales hypophysiales fort, um das Versorgungsgebiet der Adenohypophyse zu erreichen (Thomas and Keenan 1986). Dieses Pfortadersystem, bekannt als das hypothalamohypophysäre Portalsystem, nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der Hormonachse ein (Standring 2016).

Das Volumen der humanen Adenohypophyse bei Erwachsenen beträgt durchschnittlich 597,23 mm³, während ihr Gewicht etwa 600 mg beträgt (Amar and Weiss 2003, Bonczar, Wysiadecki et al. 2023). Es konnte eine Korrelation des Volumens sowohl mit dem Körpergewicht als auch mit dem biologischen Geschlecht nachgewiesen werden (Sahni, Jit et al. 2006). Die vorliegende

Untersuchung kommt zu dem Ergebnis, dass das Volumen bei beiden Geschlechtern bis zum Einsetzen der Pubertät ansteigt und dabei seinen Höhepunkt erreicht. Im weiteren Verlauf zeigt sich eine indirekte Proportionalität des Volumens in Abhängigkeit vom zunehmenden Alter (Tsunoda 1997, Pecina, Pecina et al. 2017, Bonczar, Wysiadeci et al. 2023).

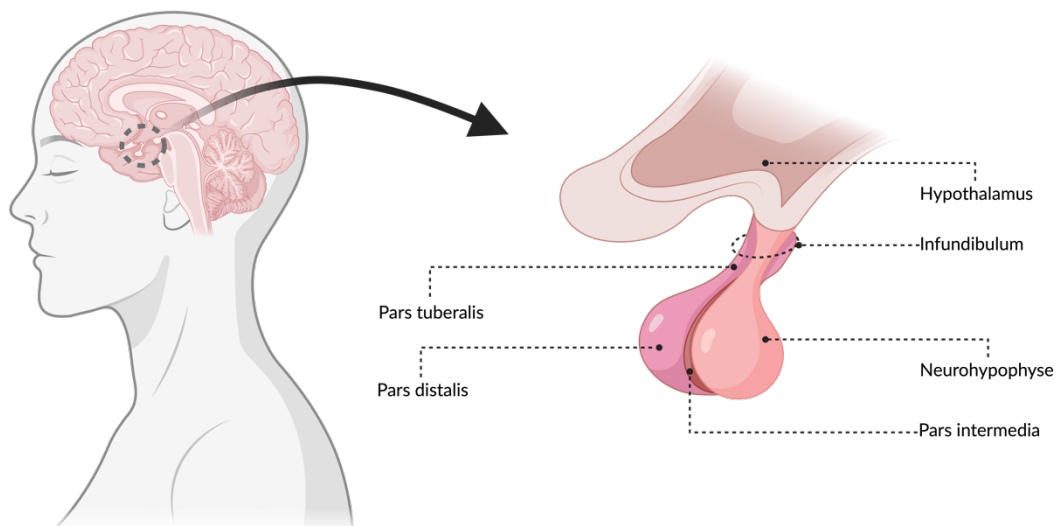


Abbildung 1: Makroskopie Hypophyse

Links ist die Position des Gehirns in Bezug auf den Schädel dargestellt. Die im Kreis dargestellte Struktur zeigt die Position der Hypophyse, welche rechts vergrößert dargestellt ist. Hier ist die Verbindung zum Hypothalamus mittels Infundibulum und die Aufgliederung in die Adeno- und Neurohypophyse zu sehen. Erstellt mit BioRender.com.

1.1.2 Mikroskopische Anatomie

Die Adenohypophyse ist verantwortlich für die Produktion, Speicherung und Sekretion verschiedener endokriner Hormone. Dieser Prozess erfolgt sowohl durch indirekte Signale aus dem Hypothalamus als auch durch direkte Signale des Fernorgans selbst. Zu den Hauptzellgruppen der Adenohypophyse zählen gonadotrope, kortikotrope, laktotrope, thyreotrope und somatotrope Zellen. Diese Zellen synthetisieren spezifische Hormone und geben sie bedarfsgerecht in das benachbarte Kapillarnetz des Blutes ab (Larkin and Ansorge 2000, Amar and Weiss 2003, Sav, Menna et al. 2025).

In der klassischen histologischen Diagnostik, beispielsweise mittels der Doppelfärbung PAS-Orange-G, können unter anderem drei große Zellpopulationen der Adenohypophyse differenziert werden (Ezrin, Swanson et al. 1959). In der vorliegenden histologischen Doppelfärbung wird der Vorteil der PAS-Reaktion genutzt. Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation der Glykolgruppen der Polysaccharide zu Aldehyden, wodurch diese als PAS-positive Strukturen sichtbar werden (Zakout, Abdellah et al. 2024). Anschließend wird im weiteren Schritt das Zytoplasma der Zellen mit Orange G gefärbt, um den Kontrast zu optimieren und eine deutliche orangefarbene Darstellung zu erzielen (Kikui and Miki 1995).

Zu den betreffenden Zelltypen zählen die basophilen Zellen, welche sich durch ihre magenta-violette Färbung auszeichnen, umfassen primär die Zellgruppen der Gonadotropen, Kortikotropen und Thyreotropen (Phifer, Spicer et al. 1973). Die azidophilen Zellen, die sich durch ihre orange Färbung hervorragen, markieren primär die laktotropen sowie somatotropen Zellpopulationen (Halimi and Duello 1976). Zudem weisen die undifferenzierten sowie inaktiven Zellen der Adenohypophyse eine geringe Affinität zur Farbstoffaufnahme auf und zählen somit zu den chromophoben Zelltypen (Peterson and Weiss 1955).

Die zuletzt genannte Gruppe rückt in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus, da diesen nicht-hormonaktiven Zellen eine Stammzellfunktion zugeschrieben wird. Diese Funktion soll sowohl für die physiologischen Größenveränderungen der Hypophyse während Schwangerschaft, Wachstum oder Stress verantwortlich sein als auch als ein Faktor für die Entstehung von Tumoren gelten (Chen, Hersmus et al. 2005, Haston, Manshaei et al. 2018, Laporte, Vennekens et al. 2020, Even-Zohar, Metin Armagan et al. 2021).

Zur Vollständigkeit sei die Neurohypophyse erwähnt, die zwar keine eigenen Hormone synthetisiert, jedoch als Freisetzungsort für die im Hypothalamus gebildeten Hormone Oxytocin und Vasopressin dient (Amar and Weiss 2003). Dementsprechend setzt sich dieser Abschnitt des Organs aus Axon-Kapillar-Netzwerken zusammen, die gemeinsam mit Stützzellen, den sogenannten Pituizyten, ein System bilden (Sav, Menna et al. 2025).

In der heutigen histologischen Diagnostik der Adenohypophyse verliert die klassische histologische Färbemethode, die Zellen in azidophile, basophile und chromophobe Typen unterteilt, zunehmend an Bedeutung. Stattdessen gewinnt die Immunfluoreszenz aufgrund ihrer höheren Genauigkeit an Relevanz. Dies zeigt sich deutlich in der aktuellen Anpassung der WHO-Tumorklassifikation von Adenohypophysentumoren, bei der der Fokus verstärkt auf spezifisch hormonproduzierende Zellen sowie auf die essenziellen Transkriptionsfaktoren gelegt wird (Lopes 2017, Silva-Ortega, García-Martinez et al. 2021). Dies ist nachvollziehbar, da die Immunhistochemie aufgrund ihrer erhöhten Sensitivität und Spezifität in der Lage ist, gezielte Strukturen, meist Proteine bzw. Antigene, mittels Antikörper direkt zu detektieren und folglich eine hohe diagnostische Aussagekraft zu gewährleisten (Magaki, Hojat et al. 2019, Micke, Botling et al. 2019).

1.1.3 Die Funktion der Hypophyse

In der Abbildung 2 ist die Hormonachse der Hypophyse dargestellt. Die Produktion von sechs verschiedenen sekretorischen Hormonen wird durch die anterioren und intermediären Lappen des Hypophysenvorderlappens reguliert. Der Hypophysenvorderlappen synthetisiert die Hormone adrenocorticotropes Hormon (ACTH), luteinisierendes Hormon (LH), follikelstimulierendes Hormon (FSH), Wachstumshormon (GH), Prolaktin (PRL) und thyrostimulierendes Hormon (TSH). Der Mittellappen zeichnet sich durch eine homogene Gewebestruktur aus und enthält melanotrophe Zellen, die für die Produktion von α -Melanotropin verantwortlich sind (Melmed 2022).

Für eine umfassende Darstellung ist es erforderlich, die vom Hypophysenhinterlappen synthetisierten Hormone Vasopressin und Oxytocin zu benennen. Im Kontext der vorliegenden Arbeit finden diese jedoch keine Berücksichtigung.

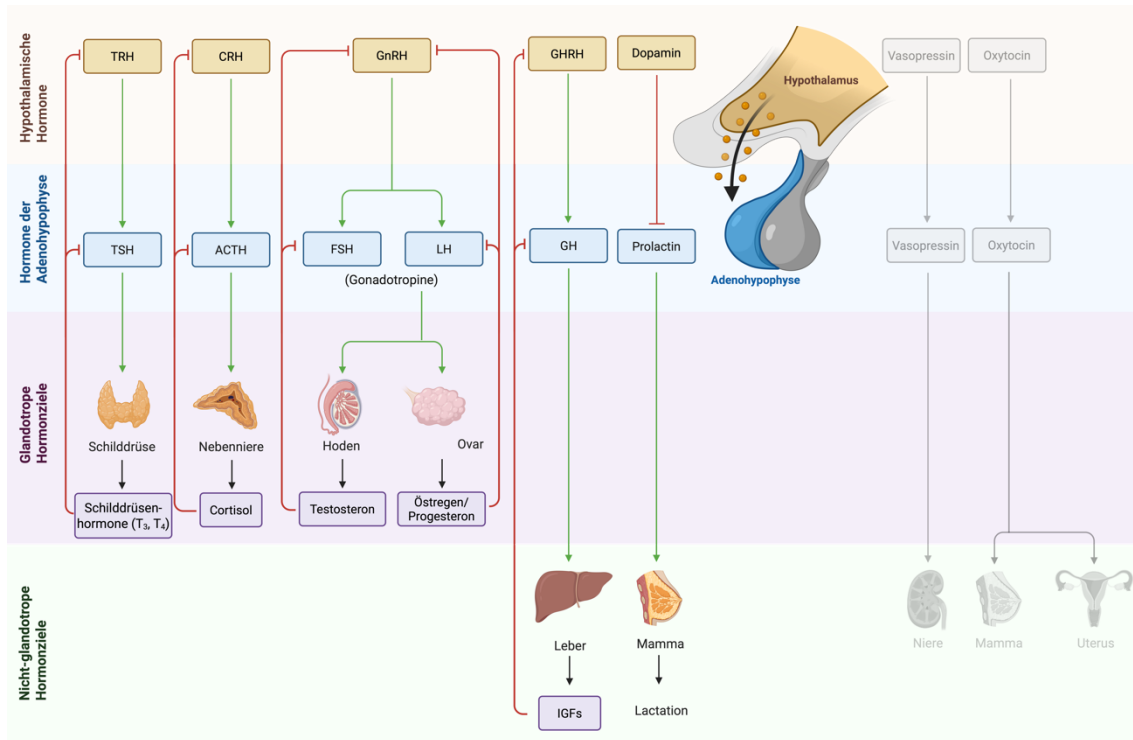


Abbildung 2: Hormonachse Hypothalamus-Hypophyse-Zielorgan

Schematische, nicht größentreue Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Hormonachse. In jeder Ebene sind die jeweiligen inhibitorischen und exzitatorischen Hormone demonstriert. Dabei stellen die grünen Pfeile eine exzitatorische Wirkung und die roten Linien eine inhibitorische Wirkung dar. Zur Vollständigkeit sind auch die Hormone der Neurohypophyse auf der rechten Seite abgeschwächt abgebildet. Erstellt mit BioRender.com.

1.1.4 Die embryonale Entwicklung

Der lateinische Name der Drüse, Glandula pituitaria, stammt von dem Begriff "pītuīta" ab, was „Schleim“ bedeutet. Dieser Name verweist auf den Ursprung der Drüse im Bereich der Nasopharynx.

Die Hypophyse entsteht aus der hypophysären Plakode, welche sich aus dem Boden des rostralen Teils der Neuralplatte sowie oralen ektodermalen Zellen zusammensetzt. In diesem Zusammenhang bildet sich eine taschenartige Invagination der ektodermalen Zellen, die in der Fachliteratur als Rathke-Tasche bezeichnet wird (Rathke 1838). Die prächordalen mesenchymalen Stromazellen, die um diese Tasche herumwachsen, fördern die Abgrenzung zur zukünftigen Mundhöhle (Standring 2016).

Die Rathke-Tasche durchläuft eine Phase passiven Wachstums, die durch den engen Kontakt zwischen dem sich ausbreitenden Neuroepithel und dem oralen Ektoderm bedingt ist – dargestellt in der Abbildung 3. Der unmittelbare Kontakt zwischen der zukünftigen Adenohypophyse und dem sich entwickelnden Diencephalon ist von zentraler Bedeutung. Eine vorzeitige Trennung dieser Strukturen kann zu einem Funktionsversagen des Organs führen (Melmed 2022).

Die Rathke-Tasche lässt sich beim Menschen bereits ab dem Ende der dritten Schwangerschaftswoche klar abgrenzen. Die Differenzierung der hormonproduzierenden Zellen des Vorderlappens erfolgt schrittweise und erstreckt sich über einen Zeitraum von sechs Wochen für die Produktion von ACTH bis hin zu 24 Wochen für die Synthese von Prolaktin (Melmed and Kleinberg 2002).

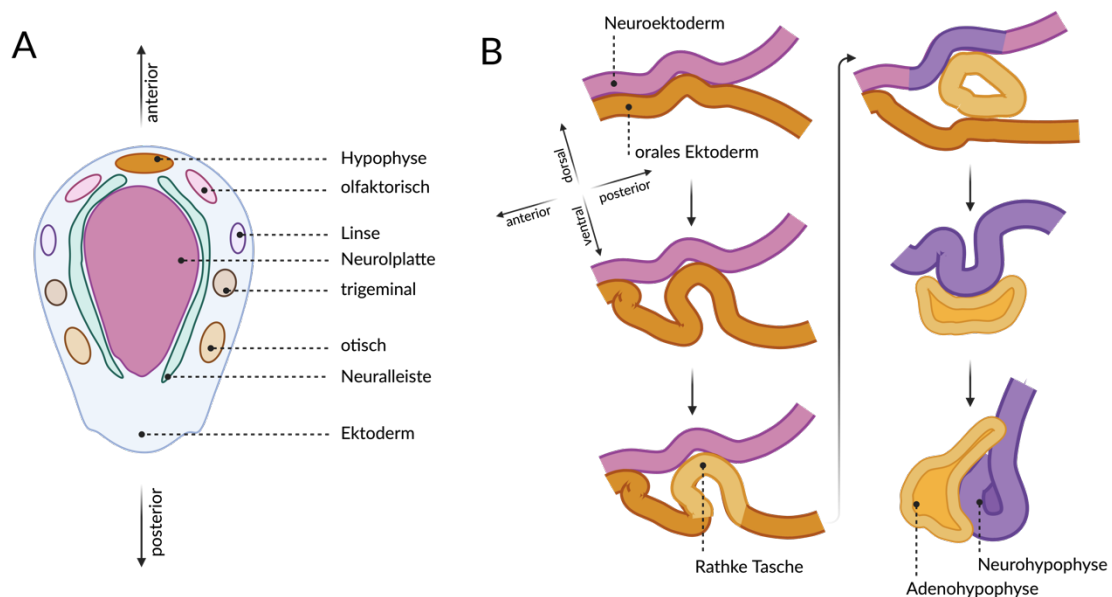


Abbildung 3: Embryologische Entwicklung der Hypophyse

A Zu sehen ist ein dorsaler Anschnitt der Neuralplatte mit den dazugehörigen Plakoden. B Im Sagittalschnitt ist die Entwicklung der Hypophyse mit der Entstehung der Rathke Tasche aus dem oralen Ektoderm dargestellt. Erstellt mit BioRender.com.

Für die frühe embryonale Entwicklung sind verschiedene Signale aus den Familien BMP, SHH und FGF von Bedeutung. Während der initialen Entwicklungsphase erfolgt die Expression von BMP4 im ventralen Diencephalon,

was maßgeblich zur Induktion der Rathke-Tasche beiträgt. Im weiteren Verlauf werden diese Signale durch FGF8 und FGF10 abgelöst, die eine zentrale Rolle in der fortschreitenden Differenzierung der ektodermalen Zellen übernehmen (Alatzoglou, Gregory et al. 2020). Sonic hedgehog (Shh) wird sowohl im ventralen Diencephalon als auch im oralen Ektoderm exprimiert, mit Ausnahme des Bereichs der Rathke-Tasche. Diese Signalmoleküle fungieren als richtungsweisende Faktoren und spielen eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung der Drüse (Zhu, Gleiberman et al. 2007, Kelberman, Rizzoti et al. 2009, Ozaki, Suga et al. 2021, Melmed 2022).

1.2 3D Organoide der Adenohypophyse

Zur Erforschung von Lektinmarkern in der Entwicklungsphase der Adenohypophyse wird in dieser Arbeit ein dreidimensionales Zellkulturmodell dieses Organs in vitro etabliert. Der Vorteil von 3D-Organoiden im Vergleich zu Tiermodellen liegt in der Reduktion ethischer Bedenken hinsichtlich der Nutzung von Versuchstieren und gleichzeitig ermöglicht die vielschichtige Selbstorganisation der Zellen die Schaffung eines realitätsnahen Organmodells, das die Komplexität des Gewebes besser widerspiegelt als beispielsweise zweidimensionale Organmodelle (Li and Belmonte 2019, Kim, Koo et al. 2020, Versteegen, Coppes et al. 2025).

Die in dieser Arbeit differenzierten 3D-Organoide werden fortan als „ADENoide“ bezeichnet, ein Wort, das sich aus den Begriffen Adenohypophyse und Organoide zusammensetzt.

Für die Generierung von Organoiden ist der Einsatz pluripotenter Stammzellen erforderlich. Die Reprogrammierung differenzierter humaner Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen stellt dabei einen entscheidenden Faktor für zahlreiche aktuelle Forschungsprojekte dar (Takahashi, Tanabe et al. 2007).

1.2.1 Human induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSZ)

Induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) sind Stammzellen mit pluripotenten Eigenschaften, die durch Reprogrammierung somatischer Zellen gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Reprogrammierung aus Keratinozyten der Haarwurzel mittels gezielter Überexpression der

Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC (Blau and Daley 2019, Karagiannis, Takahashi et al. 2019, Chen, Li et al. 2024). Diese erzeugten Zellen besitzen die Fähigkeit, sich in nahezu sämtliche Zelltypen des menschlichen Körpers zu differenzieren. Sie repräsentieren einen bedeutenden Meilenstein in der Weiterentwicklung der personalisierten Medizin, der Etablierung von Zellmodellen sowie in der Grundlagenforschung (Kiskinis and Eggen 2010, Vitale, Wolvetang et al. 2011, Aboul-Soud, Alzahrani et al. 2021). Durch den Einsatz dieser induzierten pluripotenten Stammzellen können nun Gewebemodelle in vitro erzeugt werden, die sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die individualisierte Medikamententestung Anwendung finden (Novelli, Spitalieri et al. 2022, Xu, Yang et al. 2023).

1.2.2 Differenzierung von 3D Organoiden

Durch den Einsatz von iPSZ kann zudem die Differenzierung und Reifung von 3D-Organmodellen ermöglicht werden (Vandana, Manrique et al. 2023, Xu, Yang et al. 2023). Bereits im Jahr 2011 wurde dies am Beispiel von Mäuseembryonen für die Adenohypophyse nachgewiesen (Suga, Kadoshima et al. 2011). Bereits diese ADENOide wiesen nach ihrer Reifung eine Hormonproduktion von ACTH im ausdifferenzierten Epithel des Organsystems auf. Ein bedeutender Durchbruch wurde erzielt, als fünf Jahre später ein Protokoll zur Etablierung humaner embryonaler Stammzellen entwickelt wurde (Ozone, Suga et al. 2016), welches anschließend für die Verwendung von humaninduzierten Stammzellen angepasst wurde (Kasai, Suga et al. 2020, Kano, Sasaki et al. 2022).

Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits nachgewiesen, dass Organoidsysteme nicht nur ACTH produzieren können, sondern auch alle anderen Hormone der Adenohypophyse synthetisieren. Zudem zeigen sie eine adäquate Reaktion auf verschiedene externe Stimuli, wie beispielsweise die Verabreichung von Medikamenten (Ozone, Suga et al. 2016, Chen, Leshkowitz et al. 2020).

Im Rahmen der durchgeführten Forschung konnte der Oberflächenmarker EpCAM identifiziert und charakterisiert werden. Dies ermöglicht eine gezielte Isolierung organspezifisch differenzierter Zellen, wodurch die Effizienz des

Organoidsystems für therapeutische Anwendungen signifikant gesteigert werden kann (Kodani, Kawata et al. 2022).

Abschließend konnte nachgewiesen werden, dass eine Transplantation der ADENOide in das subkutane Fettgewebe bei Mäusen mit fehlender Adenohypophyse die Funktion des Organs übernehmen kann (Sasaki, Suga et al. 2023, Taga, Suga et al. 2023).

Insgesamt ermöglichen diese Modelle die Etablierung patientenspezifischer Ansätze, die sowohl zur Untersuchung der Pathogenese von Erkrankungen der Adenohypophyse als auch zur Optimierung von Therapieansätzen für dieselben Erkrankungen von Nutzen sind (Kasai, Suga et al. 2020, Ozaki, Suga et al. 2021).

1.3 Lektinbasierte Identifikation

Die Bezeichnung „Lektin“ leitet sich aus dem lateinischen Verb „legere“ ab und bedeutet so viel wie „aussuchen“ oder „wählen“. Diese Etymologie reflektiert treffend die charakteristische Funktion dieser Proteine. Lektine sind nicht-enzymatische, reversibel zuckerbindende Proteine nicht-immunologischen Ursprungs (Goldstein, Hughes et al. 1980, Kocourek and Hořejší 1981, Barondes 1988, Peumans and Van Damme 1995, Rüdiger and Gabius 2001, Tsaneva and Van Damme 2020). Eines der wohl bekanntesten Lektine ist das Rizin, das seit Jahrtausenden in der Medizin Verwendung findet. Seine Struktur und Wirkungsweise blieben lange Zeit bis zu seiner Isolation unbekannt (Stillmark 1888, Polito, Bortolotti et al. 2019, Tsaneva and Van Damme 2020). Erst in der Mitte des vergangenen Jahrhunderts, während der Blütezeit der Lektinforschung, wurde der Nachweis erbracht, dass Lektine spezifisch Zuckermoleküle binden und auf diese Weise ihre biologische Wirkung entfalten (Watkins and Morgan 1952, Rutenber, Ready et al. 1987). Zeitgleich wurden Lektine als diagnostische Werkzeuge für die Bestimmung der ABO-Blutgruppen etabliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Erythrozyten unterschiedliche Zuckerseitenketten aufweisen, sogenannte Glykolisierungen, die mithilfe von Lektinen identifiziert werden können (Boyd and Reguera 1949, Watkins and Morgan 1952, Schertz, Boyd et al. 1960, Plato and Gershowitz 1961, Sanders, Carty et al. 1963).

Die Glykolisierung von Proteinen und Lipiden stellt einen essenziellen biochemischen Prozess dar, der nicht nur für die Funktionalität von Erythrozyten von Bedeutung ist. Vielmehr spielt sie eine zentrale Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse, darunter die Signaltransduktion, die Modulation der Immunantwort, die Regulation des Zellwachstums sowie die Sekretion von Membranproteinen. Diese vielschichtigen Funktionen verdeutlichen die fundamentale Bedeutung der Glykolisierung für die Aufrechterhaltung und Regulation zellulärer Homöostase (Ohtsubo and Marth 2006, Zhang and Ten Hagen 2011, Arey 2012, Reily, Stewart et al. 2019).

Zur Analyse der zuvor genannten Glykanstrukturen sind lektinbasierte Marker von besonderer Bedeutung. Verschiedene Lektine binden jeweils an spezifische Glykan-Bindungsstellen und sind in der Abbildung 4 schematisch dargestellt. Beispielsweise bindet Concanavalin A (Con A) selektiv an α -D-Mannose-Verbindungen und weist eine hohe Spezifität für das Vorkommen solcher Zuckerstrukturen auf (Baenziger and Fiete 1979, Bhattacharyya and Brewer 1986). Das Lektin PNA bindet spezifisch an Gal- β (1,3)-GalNAc-Verbindungen der Glykanstruktur (Pereira, Kabat et al. 1976, Banerjee, Das et al. 1996). UEA I bindet Moleküle, deren Ketten Galactose enthalten und über eine Seitenkette mit α -L-Fucose verbunden sind (Matsumoto and Osawa 1969, Kurimura, Tsuji et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit werden die zuvor erwähnten Lektine, Proteine pflanzlichen Ursprungs mit spezifischer Affinität zu Zuckerverbindungen, als mit Fluorophoren konjugierte Marker verwendet, um die Glykanstrukturen der Adenohypophysenzellen gezielt zu identifizieren.

Lektinbindestellen

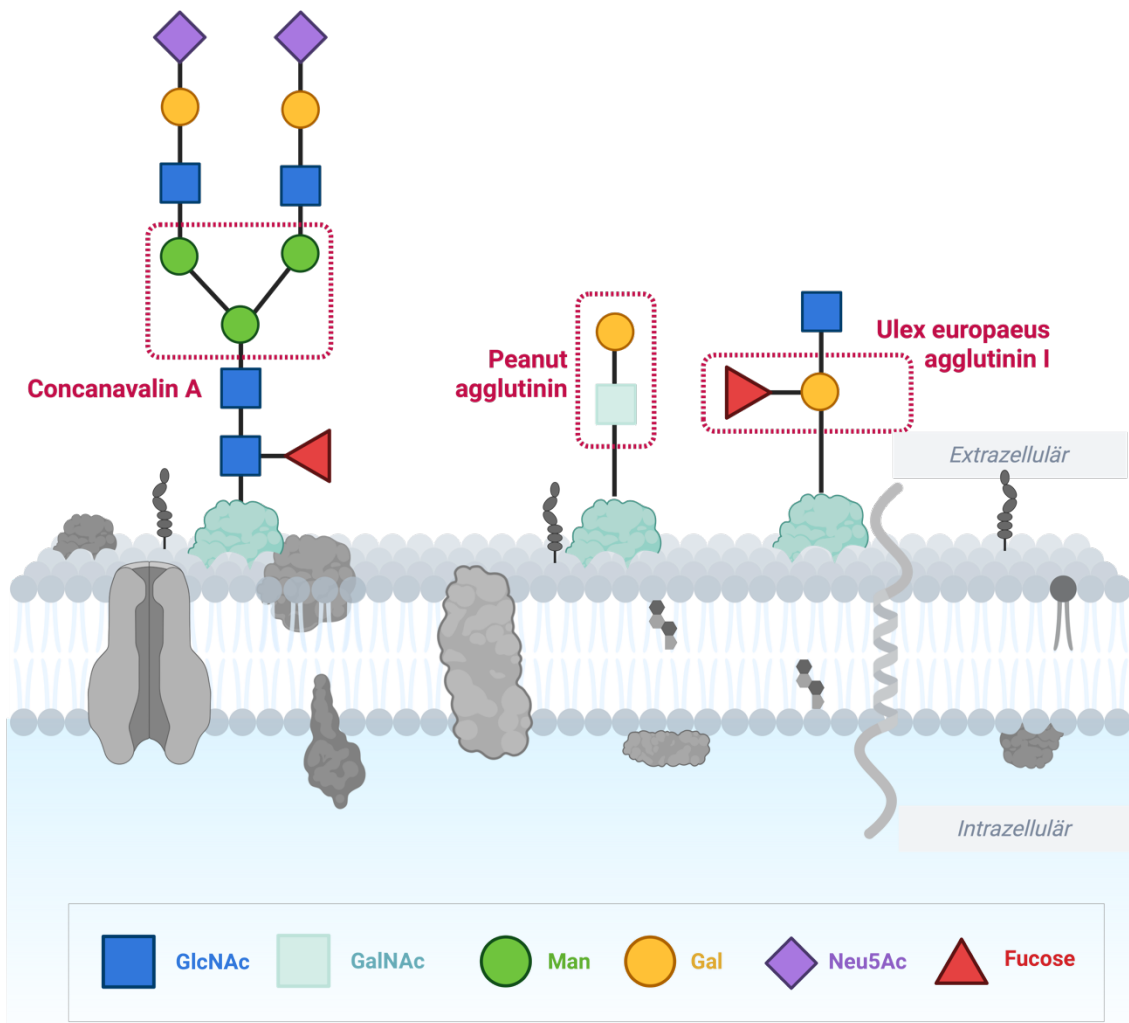


Abbildung 4: Lektinbindestellen an der Glykanstruktur

Schematische Darstellung der Zellmembran mit exemplarisch dargestellten Membranproteinen und Kanälen. Weiterhin exemplarische Darstellung der Glykoproteinstruktur und die Bindungsstellen (rot gestrichelt) für die jeweils beschriebenen Lektine Concanavalin A, Peanut agglutinin und Ulex europaeus agglutinin I. Die darunter abgebildete Legende zeigt die Monosaccharide, die in der Glykanstruktur enthalten sind, an. Erstellt mit BioRender.com.

1.4 Gewebeklä rung

Die aktuellen anatomischen Erkenntnisse zur Charakterisierung der humanen Adenohypophyse basieren auf der Zusammenführung von Daten aus

Schnittpräparaten sowie den entsprechenden dreidimensionalen räumlichen Berechnungen der anatomischen Strukturen (Mollard, Hodson et al. 2012, Yoshitomi, Ohta et al. 2016). Zur Gewinnung einer neuen, detaillierten und realitätsnahen Kartierung der Adenohypophyse wurde in dieser Arbeit erstmals die Methode der Gewebeklärun exemplarisch am humanen Adenohypophysengewebe erfolgreich aufgezeigt.

Allgemein gilt nämlich, dass detaillierte Kenntnisse über zelluläre Grundstrukturen und Netzwerke essenziell sind für die Charakterisierung von Strukturen und den Aufbau von Modellen. Die konventionelle immunhistologische Anatomie fokussiert sich in der Regel auf dünne bis ultradünne Schnitte, um präzise Analysen zu ermöglichen. Hierbei werden häufig zahlreiche aufeinanderfolgende Schnitte untersucht, um Zusammenhänge im dreidimensionalen Raum zu interpretieren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, tiefere Gewebestrukturen mithilfe der Konfokalmikroskopie zu analysieren, die erstmals 1961 von Minsky patentiert wurde (Sands, Gerneke et al. 2005, Artigas 2011, Boamfa, Asselman et al. 2020). Zur Vereinfachung der beiden genannten aufwendigen und ressourcenintensiven Arbeiten können Gewebeklärunungsverfahren eingesetzt werden. Diese ermöglichen es, dickere und intakte Organabschnitte immunhistochemisch gefärbt darzustellen.

Bereits im 20. Jahrhundert wurden erste Experimente „[ü]ber das Durchsichtigmachen von menschlichen [...] Präparaten“ durchgeführt und veröffentlicht (Spalteholz 1914). Derzeit existieren zahlreiche etablierte Methoden zur Gewebeklärun, welche sich in drei Hauptkategorien unterteilen lassen (Azaripour, Lagerweij et al. 2016). Zur Gruppe der hydrophoben (lösungsbasierten) Methoden gehört beispielsweise BABB (Dodt, Leischner et al. 2007) oder 3DISCO (Ertürk, Becker et al. 2012) Methode. Die wässrige, auch als wasserbasierte Methode bezeichnet, wie beispielsweise SeeDB (Ke, Fujimoto et al. 2013) oder CUBIC (Susaki, Tainaka et al. 2014), zeichnet sich durch ihre spezifischen Eigenschaften und Anwendungsbereiche aus. Jedoch auch die Hydrogel-Einbettungsmethode, wie beispielsweise CLARITY (Chung, Wallace et al. 2013) oder PACT (Yang, Treweek et al. 2014). Letzteres überzeugte bei der Vorbereitung und Recherche zur Auswahl der Klärungsmethode durch die

einfache Umsetzung, den geringen Ressourcenbedarf und die relativ kurze Klärungsdauer. Abbildung 5 veranschaulicht die Prozesse dieser Methode in einer schematischen und vereinfachten Darstellung.

Gewebeklämung der humanen Hypophyse mittels PACT

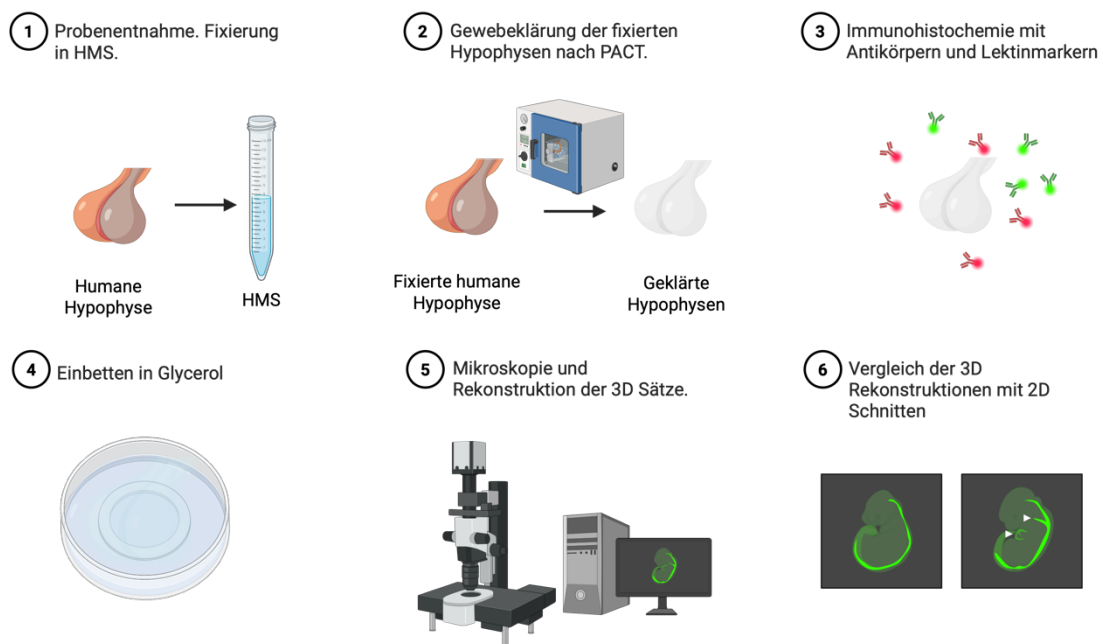


Abbildung 5: Gewebeklämungprozess

Prozess der Gewebeklämung nach der Methode PACT anhand von der humanen Hypophyse. Begonnen bei der Fixierung, Klärung, Färbung und Einbettung der Probe. Und anschließend die Aufnahme und Analyse der Mikroskopiebilder. Erstellt mit BioRender.com.

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Kolokalisation von gefärbten Regionen untersucht, die durch drei Lektin-Fluorophor-Konjugate UEA-1, Con A und PNA sowie durch die Antikörper ACTH, LH, FST, GH, TSH und Prolaktin markiert wurden. Ziel ist es, die Hypothese zu untermauern, dass die verwendeten Lektinmarker nach Literaturrecherche spezifisch für ACTH-produzierende Zellen sind und keine Färbung in anderen hormonbildenden Zellen hervorrufen. Die

Analyse der Übereinstimmung von lektinpositiven und hormonantikörperpositiven Arealen erfolgt an mehreren Paraffinschnitten der menschlichen Adenohypophyse, wobei qualitative und quantitative Methoden zum Einsatz kommen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines stabilen und spezifischen Surrogatmarkers auf Basis von Lektinen für den diagnostischen Einsatz in der Adenohypophyse. Diese Marker könnten herkömmlichen Antikörpern hinsichtlich Kosten und Diagnostikzeit überlegen sein.

Im zweiten Teil der Arbeit wird ein Protokoll zur Generierung von 3D-Organoiden der Adenohypophyse, ADENOide, unter Verwendung human induzierter pluripotenter Stammzellen entwickelt. Diese Organoiden fungieren als in vitro-Modelle für hormonproduzierende Zellen. Die Reifung der Organoiden wird in den ersten 120 Tagen mit den etablierten Lektinmarkern untersucht, um Einblicke in die Glykoproteinstruktur der Zellmembran während der Differenzierung zu gewinnen. Ziel ist es, noch nicht hormonproduzierende, aber zukünftig hormonproduzierende Zellen frühzeitig zu identifizieren, um die Selektivität und Ressourcenschonung bei der Organoidherstellung zu verbessern.

Der dritte Teil der Arbeit widmet sich der Entwicklung eines Verfahrens zur Gewebeklärung der menschlichen Adenohypophyse. Dies ermöglicht eine präzisere Charakterisierung der anatomischen Strukturen im Vergleich zu herkömmlichen Modellen, die auf Schnittpräparaten basieren. Der etablierte Surrogatmarker wird auch hier eingesetzt, um die Lektinmarkertechnologie auf geklärten Ganzorganproben anzuwenden.

Im Abschlussteil der Arbeit werden die erzielten Ergebnisse kritisch diskutiert, Limitationen identifiziert und ein Ausblick auf zukünftige Forschungsmaßnahmen gegeben, um die beschriebenen Projekte weiterzuentwickeln.

2 Material

2.1 Humane Proben

Tabelle 1: Humane Proben

Geschlecht	Alter
weiblich	68
männlich	81
weiblich	86
männlich	91
männlich	93

2.2 Zelllinien

Tabelle 2: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Firma	Bestellnummer
Gibco™ episomal hiPSC line	Aus Nabelschnurblut gewonnene CD34 + Vorläuferzellen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A18945
hiPSC	Reprogrammierte Keratinozyten von K2	-	-

2.3 Grundmedien

Tabelle 3: Grundmedien

Medium	Firma	Bestellnummer
DMEM/F12 + Gluta-MAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	31331-028
Essential 6™ Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A1516401
Essential 8™ Basal Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A15169-01

F12 Nutrient Mix + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	31765-035
hESC Embryonic Stem Cell Media	PeproTech, Hamburg, Deutschland	BM-hESC
IMDM + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	31980-022
KnockOut™ DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	10829-018
mTeSR™ 1	StemCell™ Technologies, Vancouver, Kanada	85850

2.4 Zellmedien

Tabelle 4: Zellmedien

Zellmedium	Grundmedien	Zusätze
gfCDM 5 % KOSR	IMDM + GlutaMAX™ und F12 Nutrient Mix + GlutaMAX™ (1:1)	5 % KOSR
		1 % CDL
		5 mg/mL BSA
		450 µM 1-thioglycerol
gfCDM 10 % KOSR	IMDM + GlutaMAX™ und F12 Nutrient Mix + GlutaMAX™ (1:1)	10 % KOSR
		1 % CDL
		5 mg/mL BSA
		450 µM 1-thioglycerol
gfCDM 20 % KOSR	IMDM + GlutaMAX™ und F12 Nutrient Mix + GlutaMAX™ (1:1)	20 % KOSR
		1 % CDL
		5 mg/mL BSA
		450 µM 1-thioglycerol
DFG	DMEM/F12 + Gluta- MAX™ (500 ml)	3,85 g Glucose
		1,2 g Natriumhydrogencarbonat
		5 ml Anti-anti
DFNB	485 ml DFG mit pH 7,6	10 ml B27 Zusatz
		5 ml N2 Zusatz
		5 µl CNTF (0,1 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ in 0,1 % BSA))
		1 % CDL
FTDA	DMEM/F12 + Gluta- MAX™	1 % HSA
		1% Anti-anti
		0,1 % IST Premix
		5 ng/ml Activin A
		10 ng/ml TGF-β1
		0,05 nM Dorsomorphin

2.5 Medienzusätze

Tabelle 5: Medienzusätze

Zusatz	Firma	Bestellnummer
(±) Blebbistatin	SantaCruz Biotechnology, Dal- las, USA	sc-203532B
1-Thioglycerol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	M6145-25ML
Activin A	Cell Guidance Systems, Cambridge, Vereinigtes Königreich	GFH6
Anti-Anti (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	15240-062
B-27® Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	12587-010
Bovine Serum Albu- min 25%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A10008-01
Chemically Lipid Concentrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	11905-031
CNTF	Cell Guidance Systems, Cambridge, Vereinigtes Königreich	GFH59-20
Dorsomorphin	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Ab120843
Essential 8™ Supple- ment (50x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A15171-01

HSA	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel	05-720-1B
ITS Premix	Corning, Corning, NY, USA	354350
KOSR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	10828-028
N-2 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	17502-048
Recombinant Human BMP-4	PeproTech, Hamburg, Deutschland	120-05ET
RevitaCell™ Supple- ment	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A26445-01
SB431542	Selleckchem, München, Germany	S1067
Smoothened agonist	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA	ALX-270-426-M001
TGF-β1	PeproTech, Hamburg, Deutschland	100-21
Y-27632	Selleckchem, München, Germany	S1049

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma	Bestellnummer
12-well Kulturplatte	Corning, Corning, NY, USA	351143

50 ml Spritze	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA	300869
6-well Kulturplatte	Corning, Corning, NY, USA	353046
96-well Kulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3926500
Clip Tip™ pipette-tips 1 - 10 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	94410210
Clip Tip™ pipette-tips 10 - 100 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	94410310
Clip Tip™ pipette-tips 100 - 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	94410710
Combitips® advanced 10 ml	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	0030089820
DAKO Stift	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	S2002
Einbettkassetten für Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	K116.1
Kryoeinbettform Tissue-Tek® Cryom-old®	Sakura, Tokyo, Japan	4566
Kryoröhrchen	Corning, Corning, NY, USA	430487
Mikroskopische Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland	01-2450/M
Millex® -GP 0.22 µm Filter	Merck Millipore, Cork, Irland	SLGP033RS
Peha-Soft Nitrile Untersuchungshandschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Germany	9422021
Petrischale	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	F211134Q

Pipettenspitze 10 μ l	Biozym, Hessich Oldendorf, Deutschland	720011
Pipettenspitze 1000 μ l	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	740290
Pipettenspitze 200 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.760,002
Präzisionstücher	Kimberly-Clark, Surrey, Vereinigtes Königreich	05511
SafeSeal Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.704.700
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.706.700
Schraubbecher	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	75.562.300
Schraubröhre 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	62.554.502
Schraubröhre 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	62.547.004
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1254.001
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1253.001
Serologische Pipette 50 ml	Corning, Corning, NY, USA	357550
Serologische Pipette 25 ml	Corning, Corning, NY, USA	357525
Skalpell	Aesculap AG, Tuttlingen, Germany	BA223
Skalpellklinge	Aesculap AG, Tuttlingen, Germany	BA223

SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland	03-0060
Tissue-Tek® Cryom- old® 10x10x5mm	Sakura, Tokyo, Japan	4565
Tissue-Tek® Cryom- old® 15x15x5mm	Sakura, Tokyo, Japan	4566
Vernichtungsbeutel	NeoLab, Heidelberg, Deutschland	1-7105
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz	99010
μ-Dish 35 mm	Ibidi, Gräfelfing, Deutschland	81156

2.7 Lösungen

Tabelle 7: Lösungen

Lösung	Grundmedium	Zusatz und Konzentration
PFA + 10 % Saccharose	4 % PFA in PBS -/-	10 % Saccharose
Saccharose Lösung	PBS -/-	30 % Saccharose 1 % Anti-anti
Blockierlösung	PBS -/-	10 % NDS 4 % Magermilchpulver 1,25 % BSA 0,1 % Triton X-100 4 % Acrylamide
HMS	PBS -/-	4 % PFA 0,25 % VA-044 Initiator
Citratpuffer	Aqua dest.	2,1 g Zitronensäure Monohydrat
Agarose	Aqua dest.	3 % Agarose

Gewebeklärungslösung	PBS -/-	8 % SDS
		4 % NDS
Blockierlösung		1 % BSA
Gewebeklärung	PBS -/-	0,25 % Triton™ X-100
		0,01 % Natriumazid

2.8 Chemikalien, Zusätze und Enzyme

Tabelle 8: Chemikalien, Zusätze und Enzyme

Produkt	Firma	Bestellnummer
Acrylamide	Panreac, Castellar del Vallès, Spanien	A4989,0500
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	3810.2
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland	B102409 Rev.00
DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	D9542
Dispase	Corning, Corning, NY, USA	354235
DPBS ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	14190-094
Ethanol 99 %, denaturiert	SAV-LP, Flintsbach am Inn, Deutschland	ETO-10000-99-1
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	HN06.1
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	7530.1
Hämatoxylin	Serva, Heidelberg, Deutschland	24420.01
Magermilchpulver	TSI, Zeven, Deutschland	4021155023078

Matrigel® Matrix, hESC-qualified	Corning, Corning, NY, USA	534277
Mowiol® 4-88 - Einbettmedium	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A9011,0100
Natriumazid	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland	6688
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	HN01.1
NDS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	D9663
O.C.T.™ Compound Orange G	Sakura, Tokyo, Japan Waldeck, Münster, Deutschland	SA62550 18221
Paraformaldehyde 4 % in PBS	SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	sc-281695
Perjodsäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1005240025
Phosphormolybdänsäure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	15622160
Saccharose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	S-0389
Schiffs Reagent	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	X900.1
SDS	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland	8.17034.1000
Sekundenkleber	Uhu, Bühl, Deutschland	64371
StemPro® Accutase®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A11105-01
Synth-a-Freeze®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A12542-01
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	T8787-50ML

VA-044 Initiator	Wako, Osaka, Japan	017-19362
Versene (1X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	15040-066
Wasser, demineralisiert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	3175.1
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9713.5
Zitronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	5110.1

2.9 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage BP2218-0CE	Satorius, Göttingen, Deutschland
ApoTome	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Assistant® Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Röhn, Deutschland
Autopsiesäge	VeHu, Tuttlingen, Deutschland
Axio Imager M2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Forschungsmikroskop	
Axio Scan.Z1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Cryostat Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf Multipette Stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus Pipette 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus Pipette 0,5 – 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Research® plus Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EVOS® FL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
F1-ClipTip™ one channel pipette 1 – 10 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
F1-ClipTip™ one channel pipette 10 – 100 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
F1-ClipTip™ one channel pipette 100 – 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Färbekasten nach Hellendahl mit Erweiterung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Finnpipette® F2 8 Kanäle	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Flockeneisbereiter AF-103	Scotsman, Great Blakenham, Vereinigtes Königreich
Gefrierschrank GN 4113-20K	Liebherr, Biberach, Deutschland
Heraeus Megafuge™ 16 Universalzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus™ Fresco™ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IKA® VXR basic Vibrax®	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Inkubator 37 °C, Heracell™ 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
InoLab® Labor-pH-Meter	Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland
Inversion microscope (Axioskop 2 mot plus, Primo Vert)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühl-Gefrierkombination CUN 3933- 21B	Liebherr, Biberach, Deutschland
LSM 5 Exciter	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer MR3001K	Heidolph, Schwabach, Deutschland

Mikrowelle MW13145W	Amica, Wronic, Polen
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
neoVortex® Schüttler	LeoLabLine, Heidelberg, Deutschland
Pipetus®	Hischmann, Eberstadt, Germany
Primovert inverses Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Rotatorofen	H. SAUER Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
Stereomikroskop M3	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Systemkanal Laborabzug 165/93 mm	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Thermomixer Pro	CellMedia, Zeitz, Deutschland
Ultra-Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vakuum Ofen	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vakuumpumpe, Integra Vacusafe	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Vibratom	Leica, Wetzlar, Deutschland
Vortexer	Bender+Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad, Lab Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.10 Primärantikörper

Tabelle 10: Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-ACTH	Maus	1:100	Agilent, Santa Clara, USA	M350101-2
Anti-CD31	Kaninchen	1:50	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Ab28364
Anti-FSH	Maus	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland	ab138285

Anti-GH	Kaninchen	1:100	DCS, Hamburg, Deutschland	GI100C002
Anti-LH	Maus	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland	DLN-07800
Anti- Prolaktin	Maus	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland	DLN-07575
Anti-TSH	Maus	1:100	Agilent, Santa Clara, USA	M350301-2

2.11 Sekundärantikörper

Tabelle 11: Sekundärantikörper

Antikörper	Art	Spezies	Verdü nung	Firma	Bestelln ummer
Alexa Fluor™ 488	Anti-Maus- IgG	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A32766
Alexa Fluor™ 488	Anti- Kaninchen -IgG	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A32790
Alexa Fluor™ 546	Anti-Maus- IgG	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A10036
Alexa Fluor™ 546	Anti- Kaninchen -IgG	Esel	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	A10040

2.12 Pluripotenzfärbekit

Tabelle 12: Pluripotenzfärbekit

Antikörper	Spezies	Verdü nung	Firma	Bestellnum mer
Anti-Oct-4A	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti-Sox2	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti-Nanog	Kaninchen	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti-SSEA4	Maus	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656

Anti-TRA-1-60	Maus	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656
Anti-TRA-1-81	Maus	1:200	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9656

2.13 Lektine

Tabelle 13: Lektine

Lektin	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Con A, Alexa Fluor™ 647	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	C21421
PNA, Alexa Fluor™ 647	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	L32460
UEA-1, Rhodamine	1:500	Vector Laboratories, Newark, California, USA	RL-1062-2
UEA-1, DyLight® 649	1:500	Vector Laboratories, Newark, California, USA	DL-1068

2.14 Software

Tabelle 14: Software

Programm	Firma	Gebrauch
Adobe Illustrator	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland	Abbildungen
AxioVision	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	Mikroskopie
BioRender	BioRender, Toronto, Kanada	Abbildungen
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Schreiben
EndNote	Clarivate™, Philadelphia, USA	Literatursammlung
ZEN	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	Mikroskopie, Analyse

3 Methoden

3.1 Humane Proben

Für die Durchführung der verschiedenen Versuchsreihen sind humane Proben erforderlich, deren Bereitstellung für Forschungszwecke ausschließlich nach sorgfältiger Prüfung durch eine Ethikkommission erfolgt. In diesem Abschnitt werden die einzelnen Schritte der Probenaufarbeitung detailliert dargelegt.

3.1.1 Erlaubnis zur Entnahme von humanen Proben

Die Entnahme der humanen Hypophysenproben erfolgt mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität Tübingen unter Berücksichtigung der Bestimmungen der Deklaration von Helsinki sowie des geltenden Rechts. Die Freigabe bezieht sich auf folgende Projekte: Projekt Nummer 638/2013BO1 (Nutzung hiPSZ), Projekt Nummer 205/2020BO2 (Differenzierung von Adenohypophyse-Organoiden) sowie Projekt Nummer 429/2022BO2 (Gewebeklärung an humanen Proben). Die Körperspenderinnen und Körperspender haben ihre Zustimmung zur Gewebeentnahme für Forschungszwecke bereits zu Lebzeiten erteilt.

3.1.2 Entnahme der Proben aus Körperspenderinnen und Körperspender

Zur Entnahme der Hypophyse wird zunächst ein Zugang zum Schädelknochen durch eine koronare Inzision mit einem Skalpell sowie unter Verwendung eines Periosthebers vorbereitet. Anschließend erfolgt der axiale Zugang zum Cavum cranii durch die Eröffnung des Schädels mittels einer oszillierenden Säge. Nach Abnahme des Schädeldeckels wird die Dura mater mit einer Schere eröffnet, um den direkten Zugang zum Gehirn zu ermöglichen.

Daraufhin werden die Verbindungsstrukturen des Gehirns zu den Vereinigungen der Schädelbasis mit einer Schere durchtrennt, sodass das Gehirn entnommen werden kann. Dabei wird das Infundibulum hypophysialis möglichst proximal abgesetzt. Der Zugang zur Hypophyse erfolgt im weiteren Verlauf durch die Entfernung der Dura mater in der Fossa cranii media im Bereich der Sella turcica. Die Glandula hypophysialis wird im Anschluss vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette geborgen.

Nach Abschluss der Entnahme wird die Schädeldecke wieder repositioniert und die Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

3.1.3 Fixierung und Präparation der Proben

Die entnommene Probe, deren Entnahmezeitpunkt 8 bis 12 h post mortem liegt, wird zur Fixierung in ein 50-ml-Röhrchen überführt, das eine 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung in PBS (pH 7,4) enthält. Das Behältnis wird anschließend für mindestens 24 h bei 4 °C gelagert. Nach dieser Fixierungsphase erfolgt die Überführung der Probe in PBS mit einem pH-Wert von 7,4.

Die Feinpräparation der Probe findet unter einem Stereomikroskop statt. Hierbei kommen Skalpell und Pinzette zum Einsatz. Abhängig von der jeweiligen Fragestellung wird die Hypophyse sagittal oder axial geteilt.

3.1.4 Einbettung und Gefrierschnitterstellung des Gewebes

Für die weiterführenden Untersuchungen ist es erforderlich, die Proben einzubetten und zu schneiden. In unserem Institut werden hierzu zwei gängige Methoden der Einbettung angewendet.

Bei der Kryo-Einbettung wird die Probe zunächst aus der wässrigen PBS-Lösung entnommen und in eine geeignete Form überführt. Anschließend wird diese Form mit O.C.T.[™]-Einbettmedium gefüllt, bis die Probe vollständig bedeckt ist. Die Form wird daraufhin in einer mobilen Kühlbox bei -80 °C gekühlt, um das Einbetten durch Erstarrung zu ermöglichen. Nach der Erstarrung kann die Probe in einem Ultratiefkühlschrank bei -80 °C gelagert werden.

Für das Erstellen von Schnitten wird die Probe vorsichtig aus der Form entfernt, wobei die notierte Orientierung beachtet werden muss. Mittels weniger Tropfen O.C.T.[™] wird der Block auf die vorgesehene Halterung des Kryostaten geklebt. Die Ausrichtung der Probe erfolgt so, dass die Klinge des Geräts in mehreren Dimensionen parallel zur Probenoberfläche verläuft, um orthogonale Schnitte zu gewährleisten. Nach der Justierung werden die obersten Schichten des Einbettmediums vorsichtig abgetragen und mit einem Pinsel entfernt, bis die ersten Gewebestrukturen sichtbar werden. Ab diesem Punkt werden 14 µm dicke

Schnitte auf Objektträgern gesammelt. Je nach Proben- und Schnittgröße können 2-3 Schnitte pro Objektträger platziert werden. Nach der Beschriftung der Objektträger mit Orientierungshinweisen werden diese bis zur Färbung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Für die langfristige Aufbewahrung sollten die Objektträger bei -80 °C gelagert werden.

3.1.5 Paraffineinbettung

Proben, die für die Paraffineinbettung vorgesehen sind, werden zunächst aus der PBS-Lösung entnommen und in geeignete Einbettkassetten überführt. Dabei ist sicherzustellen, dass die Höhe der Kassette der Höhe der Probe entspricht, um ein Verrutschen der Probe und den damit verbundenen Orientierungsverlust zu vermeiden. Anschließend wird die Kassette in ein weiteres Behältnis mit PBS gelegt, um ein Austrocknen der Probe zu verhindern.

Die Paraffininfiltation erfolgt über Nacht in einem Paraffin-Infiltationsautomaten des Instituts für Neuropathologie. Am darauffolgenden Tag wird die Probe in heißes Paraffin überführt und das Gewebe in Blöckchen gegossen. Diese Blöckchen werden mit dem für die Einbettkassette vorgesehenen Deckel fixiert. Nach vollständigem Erkalten ist der Paraffinblock einsatzbereit für den Schneideprozess.

3.1.6 Immunfluoreszenz

Für beide im Folgenden beschriebenen Protokolle wird eine Blockierlösung benötigt (Herstellung gemäß Tabelle 7), die vorab aus dem Gefrierschrank entnommen werden muss, damit sie Raumtemperatur erreicht.

3.1.6.1 Immunofluoreszenzfärbung für Kryosektion

Die ausgewählten Proben zur Färbung werden aus dem Kühl- oder Ultragefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgt eine Rehydrierung in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) bei Raumtemperatur (RT) für 5 min.

Im nächsten Schritt erfolgt eine Behandlung mit einer ab- und aufsteigenden Alkoholreihe in Ethanol, jeweils 30 s pro Konzentrationsstufe in folgender Reihenfolge: 70 % (v/v), 95 % (v/v), 100 % (v/v), 95 % (v/v), 70 % (v/v) – jeweils

verdünnt mit Aqua. Danach werden die Proben erneut in PBS bei RT für 5 min gelagert.

Die Probenträger werden einzeln aus dem Färbekasten entnommen, auf Papiertüchern abgeklopft und, falls erforderlich, die Bereiche um die Proben mit Präzisionstüchern getrocknet. Es folgt das Umranden der Proben mit einem hydrophoben Stift, wobei ein geeigneter Abstand zu wahren ist. Dieser Schritt sollte zügig durchgeführt werden, um ein Austrocknen der Proben zu vermeiden.

Unmittelbar danach wird eine Blockierung mit 50–120 µl der gemäß Tabelle 7 hergestellten Blockierlösung je Probenfeld für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Während der Blockierung werden die Primärantikörper-Lösungen gemäß Tabelle 10 vorbereitet. Die Antikörper werden in derselben Blockierlösung verdünnt, die auch für den Blockierungsschritt verwendet wurde. Nach der Blockierung wird die überschüssige Flüssigkeit durch seitliches Abklopfen der Objektträger entfernt, und gegebenenfalls werden feuchte Stellen entlang der hydrophoben Markierungen mit Präzisionstüchern getrocknet.

Die vorbereiteten Primärantikörper-Lösungen werden nun auf die jeweiligen Probenfelder pipettiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation der Objektträger in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht, jedoch für mindestens 12 h.

Am Folgetag werden die Objektträger dreimal mit PBS bei RT für jeweils 5 min gewaschen, um Rückstände der Blockierlösung zu entfernen. Es folgt die Inkubation der Probenfelder mit den gemäß Tabelle 11 ausgewählten Sekundärantikörpern, den Lektinen gemäß Tabelle 13 sowie DAPI (1:1000 in PBS verdünnt) für 1 h bei RT in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer.

Nach dieser Inkubation werden die Objektträger erneut dreimal mit PBS bei RT für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend erfolgt ein kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser, bevor die Proben mit Mowiol® und einem entsprechenden Deckglas eingedeckelt werden.

Die Objektträger werden abschließend für 1 h bei RT in einer lichtgeschützten Mappe getrocknet. Danach können sie entweder direkt mikroskopiert oder bei – 20 °C gelagert werden.

3.1.6.2 Immunofluoreszenzfärbung für Paraffinschnitte

Für die in Paraffin eingebetteten Proben gilt dasselbe Vorgehen wie bei den Kryosektionen ab dem Schritt der Umrandung der Proben mit einem hydrophoben Stift. Lediglich die Vorbehandlung der Proben unterscheidet sich, wie nachfolgend beschrieben.

Die auf Raumtemperatur (RT) aufgetauten Objektträger werden zunächst für 30 min bei RT in Xylol entparaffiniert. Darauf folgt eine absteigende Alkoholreihe mit Ethanol bei RT, wobei jede Stufe für 30 s durchgeführt wird: 100 % (v/v), 95 % (v/v) und 70 % (v/v). Im Anschluss erfolgt eine Waschreihe mit Aqua destillata (Aqua dest.) sowie PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) und erneut Aqua dest., jeweils für 2 min.

Danach werden die Objektträger in einen mikrowellene geeigneten Färbekasten überführt, der mit Citratpuffer (pH 6,0) gefüllt ist. Die Behandlung erfolgt für 5 min bei mittlerer Leistungsstufe (ca. 500 Watt) in der Mikrowelle. Anschließend folgt eine weitere Waschrunde mit Aqua dest. und PBS, jeweils für 2 min bei RT.

Ab diesem Punkt entspricht das Protokoll dem beschriebenen Vorgehen für Kryosektionen gemäß Abschnitt 3.1.5.1.

3.1.7 Histologische Färbungen

Sowohl zur initialen Beurteilung der Probenqualität als auch für den Vergleich zwischen einer konventionellen histologischen Färbung und einer Immunfluoreszenzfärbung sind etablierte Methoden der Zelldarstellung erforderlich. Für die Visualisierung der Hypophyse wurde in diesem Zusammenhang die PAS-Orange-G-Färbung gewählt.

3.1.7.1 PAS-Orange-G-Färbung

Für diese Färbung wurden 4–6 µm dicke Hypophysenschnitte aus Paraffin verwendet. Der Prozess beginnt mit der Entparaffinierung der Proben in Xylol bei Raumtemperatur (RT) für 30 min. Anschließend erfolgt eine Behandlung mit

Ethanol in absteigenden Konzentrationen (100 % (v/v), 95 % (v/v), 70 % (v/v)), jeweils für 2 min, gefolgt von einer Spülung in destilliertem Wasser.

Die Proben werden für 10 min bei RT in einer Perjodlösung inkubiert. Nach gründlichem Waschen unter fließendem Wasser und kurzer Spülung mit destilliertem Wasser erfolgt die Behandlung der Proben mit der Schiff'schen Reagenz für 15 min bei RT. Daraufhin werden die Proben erneut mit destilliertem Wasser gespült und anschließend gründlich unter fließendem Wasser für 10 min gewaschen.

Für die Kernfärbung werden die Proben 2 min bei RT in Hämatoxylin getaucht, gefolgt von einem gründlichen Waschen unter fließendem Wasser für 5 min. Anschließend werden die Objektträger für etwa 20 s in Orange G getaucht und so lange mit Leitungswasser gespült, bis die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle eine blasse Orangefärbung aufweisen.

Die Entwässerung erfolgt mithilfe von Ethanol in aufsteigenden Konzentrationen (70 % (v/v), 95 % (v/v), 100 % (v/v)). Abschließend werden die Proben für 5 min in Xylol getaucht und mit einem geeigneten Medium sowie einem Deckglas eingedeckt.

3.2 iPSZ Kultur

Die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) wurden unter kontrollierten Bedingungen in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer CO₂-Konzentration von 5 % sowie einem Sauerstoffanteil von 5 % kultiviert.

3.2.1 Auftauen der iPSZ

Zunächst wird eine gekühlte 6-Well-Kulturplatte mit 750 µl kühlem Matrigel® (gemäß den Herstellerangaben mit KO-DMEM hergestellt) pro Well für 1,5 h bei 37 °C beschichtet. Dabei ist zu beachten, dass Matrigel® sowohl auf Eis gelagert als auch aufgetaut werden muss.

Das Kryoröhrchen mit den Zellen wird aus dem Ultratiefkühlschrank entnommen und für 2 min bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wird die Zelllösung in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 4 ml E8-Medium

aufgefüllt. Das Röhrchen wird dann bei 1500 U/min für 2 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abpipettiert.

Der Zellpellet am Boden des Röhrchens wird mit 1,5 ml einer Lösung aus Nährmedium und RevitaCell™ (1:100) durch wiederholtes Pipettieren resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wird in ein Well einer mit Matrigel® beschichteten 6-Well-Kulturplatte überführt, wobei das überschüssige Matrigel® zuvor mittels einer Vakuumpumpe und einer Pipettenspitze entfernt wurde. Abschließend wird die Kulturplatte in den Inkubator gestellt.

3.2.2 Kultivierung der iPSZ

Täglich erfolgt ein Mediumwechsel von 1,5 ml pro Well, wobei entweder E8- oder FTDA-Medium verwendet wird. Vor dem Einsatz werden die Medien auf Raumtemperatur angewärmt. Parallel dazu wird täglich eine Sichtkontrolle unter dem Stereomikroskop durchgeführt.

Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 75 % wird die Passagierung vorbereitet. Dazu wird gemäß der oben beschriebenen Anleitung eine 6-Well-Kulturplatte mit Matrigel® beschichtet und vorbereitet. Unter aseptischen Bedingungen und mikroskopischer Kontrolle werden morphologisch differenzierte Zellen mit einer 10 µl-Pipettenspitze entfernt. Anschließend wird das Well mit 1,5 ml PBS -/- gespült, gefolgt von der Zugabe von 1 ml Versene. Die Kulturplatte wird dann für 6 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt, ohne die Zellen zu beeinträchtigen.

Es folgt eine weitere Spülung mit 1,5 ml PBS -/-, gefolgt von erneutem Absaugen. Die Zellen werden anschließend mit 1 ml E8 gelöst, indem durch schnelle Aspirations- und Pipettierzyklen gearbeitet wird. Die Zell-Suspension wird in ein 15 ml-Schraubröhrchen überführt. Verbleibende Zellen werden mit einem sterilen Zellschaber vorsichtig entfernt und zusammen mit 1 ml zusätzlichem E8 in das Schraubröhrchen gegeben.

Die Suspension wird mit weiterem E8-Medium auf ein Volumen von 1,5 ml pro Well aufgefüllt. Für eine Passagierung im Verhältnis 1:6 werden insgesamt 9 ml Suspension benötigt, um die Zellen gleichmäßig auf die neuen, beschichteten 6

Wells zu verteilen. Standardmäßig wird ein Verhältnis von 1:6 gewählt; jedoch können in Abhängigkeit von der Zelldichte auch andere Passagierungsverhältnisse erforderlich sein. Abschließend erfolgt die Inkubation unter Standardbedingungen für 24 h, gefolgt von einem ersten Mediumwechsel.

3.2.3 Einfrieren der iPSZ

Wie zuvor erläutert, werden die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) enzymatisch dissoziiert und in einer 15-ml-Schraubröhre gesammelt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) mit 1500 U/min für eine Dauer von 2 min. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet vorsichtig in 800 µl Synth-a-Freeze® resuspendiert. Die resultierende Zellmischung wird in ein Kryoröhrchen überführt, welches im Anschluss in einem Mr. Frosty®-Behälter in einen Gefrierschrank bei -80 °C gestellt wird. Mr. Frosty® gewährleistet hierbei eine kontrollierte Abkühlrate von 1 °C/min, sodass die Zieltemperatur nach ungefähr 60 min erreicht wird. Für die langfristige Lagerung eignet sich die Aufbewahrung des Kryoröhrchens in einem Tank mit flüssigem Stickstoff.

3.2.4 Charakterisierung der iPSZ

Die Charakterisierung der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) erfolgt durch den Nachweis spezifischer Pluripotenzmarker, darunter Sox2, Nanog, Oct-4A, SEAA4, TRA-1-60 und TRA-1-81. Hierbei wird die Immunofluoreszenzfärbung als zentrales analytisches Verfahren eingesetzt.

Zur Qualitätssicherung werden darüber hinaus ergänzende Analysen durchgeführt, darunter Protein- und RNA-Analysen sowie die Differenzierung in Keimblätter. Diese Testungen erfolgen zentral im Institut nach der Reprogrammierung von Keratinozyten zu iPSZ, um die Integrität und Funktionalität der Zellen sicherzustellen.

3.3 ADENoide

Das 3D-Organoid-Modell basiert auf der Überführung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSZ) in eine embryoidkörperartige (EB) Formation. Darauffolgend werden Differenzierungs- sowie Reifungsprozesse eingeleitet. Die

abschließende Auswertung erfolgt mittels Immunfluoreszenzfärbung zur Analyse spezifischer Marker. Die nachfolgend beschriebenen Schritte werden in Abbildung 6 veranschaulicht.

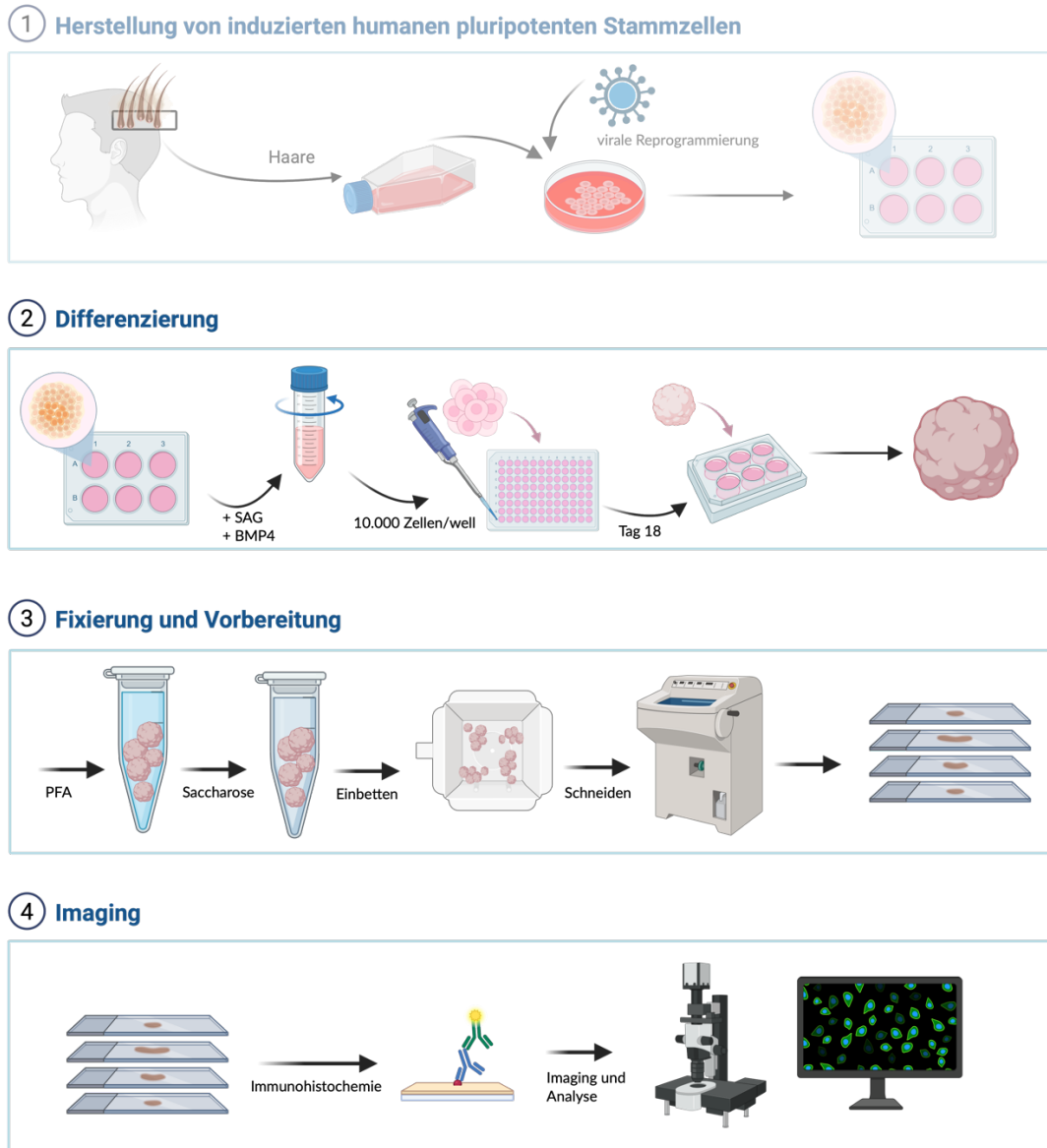


Abbildung 6: ADENoide im Prozess

1 Herstellung der hiPSC aus den Keratinozyten der Haare mittels viraler Reprogrammierung (dieser Schritt war nicht Teil dieser Arbeit und wurde der Vollständigkeit aufgeführt)
 2 Differenzierung der ADENoide aus den hiPSC mit Hilfe von den Faktoren SAG und BMP4 und Überführung aus den 96 well in die 6 well Platten am 18. Tag der Differenzierung
 3 Entnahme, Fixierung, Einbettung und Vorbereitung der ausgewählten ADENoiden zur Analyse.
 4 Färbung der geschnittenen ADENoidproben mit Hilfe der Immunfluoreszenz und anschließende Analyse. Erstellt mit BioRender.com.

3.3.1 Embryoid-Body Formation

Für dieses Verfahren werden drei vollständig besetzte Wells einer 6-Well-Kulturplatte mit Stammzellen ausgewählt. Analog zur Passagierung sollte hierbei eine Konfluenz von etwa 75 % erreicht werden. Morphologisch erkennbare, bereits differenzierte Stammzellen werden unter aseptischen Bedingungen mittels einer Pipettenspitze entfernt, wie zuvor beschrieben.

Die ausgewählten Wells werden anschließend mit 1 ml PBS +/- gespült und mit 750 µl Accutase® für 6 min bei 37 °C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wird 1 ml E8-Medium hinzugegeben. Die resultierende Zellsuspension wird durch mehrfaches Pipettieren homogenisiert, um die Zellen zu vereinzeln. Anschließend erfolgt der Transfer der Suspension in ein 15-ml-Schraubröhrchen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Probe von 10–20 µl der gut durchmischten Zelllösung in eine nach Herstellerangaben präparierte Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellkonzentration (Zellen/ml) wird gemäß den Herstelleranweisungen ermittelt. Basierend auf dieser Messung wird die erforderliche Gesamtzellzahl für den jeweiligen Versuch berechnet (beispielsweise entspricht eine 96-Well-Kulturplatte mit 10.000 Zellen pro Well ca. 1.000.000 Zellen).

Die Zellsuspension wird erneut gründlich homogenisiert. Das benötigte Zellvolumen verbleibt im Schraubröhrchen, überschüssige Zellsuspension wird fachgerecht entsorgt. Das Röhrchen wird bei 1500 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem Differenzierungsmedium (enthält 10 µM ROCK-Inhibitor und 10 µM (±)-Blebbistatin) resuspendiert. Diese Suspension wird weiter in ein 50-ml-Schraubröhrchen überführt.

Schließlich erfolgt die Verteilung der Zellsuspension mit 100 µl pro Well auf eine vollständige 96-Well-Kulturplatte. Die Platte wird für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und danach im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 5 % O₂ inkubiert.

3.3.2 Differenzierung der ADENoide

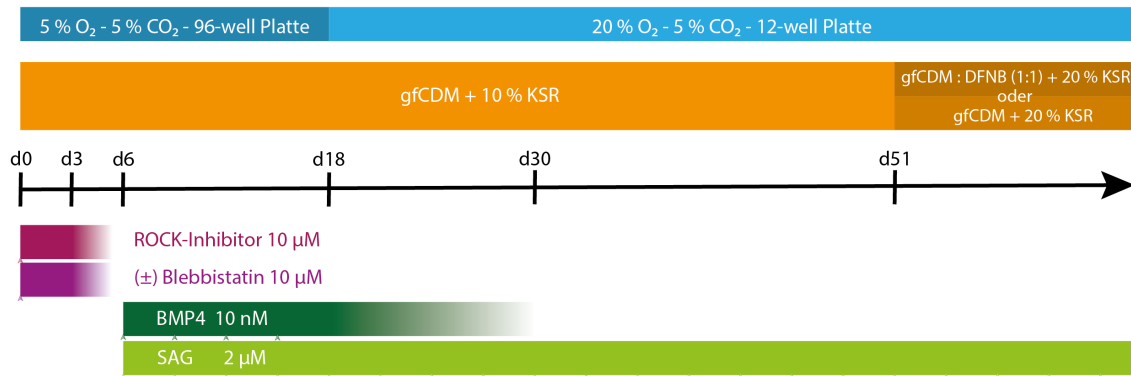


Abbildung 7: Differenzierungsprotokoll ADENoide nach (Kasai, Suga et al. 2020) - modifiziert

Am dritten Tag werden pro Well zusätzlich 100 µl gfCDM ohne Zusätze hinzugefügt. Die Kulturplatte verbleibt unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Am sechsten Tag erfolgt die Zugabe von BMP4 und SAG, wobei SAG ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich bei jedem Mediumwechsel ergänzt wird. BMP4 hingegen wird lediglich an vier aufeinanderfolgenden Wechseltagen als Induktor für die Epithelbildung eingesetzt. Ab Tag 6 wird bei jedem Mediumwechsel 100 µl Medium pro Well entfernt und durch 100 µl frisches Medium mit den entsprechenden Zusätzen ersetzt.

Am 18. Tag werden die ADENoide in eine 6-Well-Kulturplatte überführt. Hierbei werden jeweils 4–5 Organoide transferiert und das Gesamtvolumen des Nährmediums auf 1 ml pro Well erhöht. Nach diesem Wechseltag erfolgt die Kultivierung in einem anderen Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 20 % O₂. An den darauffolgenden Wechseltagen werden jeweils 500 µl Medium abpipettiert und durch 500 µl frisches Medium ersetzt.

Ab Tag 51 werden zwei parallele Ausgangsbedingungen etabliert. Zunächst wird die gesamte Flüssigkeit in den Wells abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Hälfte der Wells wird mit gfCDM und einem erhöhten Anteil von 20 % KSR kultiviert. Die andere Hälfte erhält ein Medium, das aus gfCDM und DFNB im Verhältnis 1:1 sowie 20 % KSR besteht. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt ein regelmäßiger Mediumwechsel alle drei Tage, ergänzt um 2 µM SAG. Dabei werden jeweils 500 µl des Mediums pro Well ausgetauscht. Abbildung 7 zeigt das

modifizierte Protokoll zur Differenzierung und Reifung der Adenoide in schematischer Darstellung.

3.3.3 Analyse der Organoide

Für die Analyse werden die ADENOide zu definierten Zeitpunkten fixiert, anschließend eingebettet, in Schnitte unterteilt und mittels Immunfluoreszenzfärbung detailliert charakterisiert.

3.3.3.1 Fixierung und Einbetten der ADENOide

Die unter dem Mikroskop morphologisch begutachteten Organoide (4–5 Stück) werden vorsichtig mit einer 1000- μ l-Pipettenspitze aspiriert und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wird abpipettiert, und die Organoide werden mit 500 μ l PBS -/- gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung der Organoide in 350 μ l 4 % PFA + 10 % Saccharose in PBS für 20 min bei Raumtemperatur (RT).

Nach der Fixierung wird der Überstand entfernt und fachgerecht entsorgt. Die Proben werden erneut mit 500 μ l PBS -/- gewaschen, wobei der Überstand wiederum abgezogen wird. Das Reaktionsgefäß mit den fixierten Proben wird anschließend mit 350 μ l 30 % Saccharose + 1 % Anti-Anti in PBS -/- aufgefüllt. Die Proben werden in einem geeigneten Behälter vorsichtig in den Kühlschrank gestellt. Dabei ist sicherzustellen, dass keine Organoide am Rand des Gefäßes haften oder auf der Flüssigkeitsoberfläche schwimmen. Die Übernachtlagerung im Kühlschrank ermöglicht das Absinken der fixierten Organoide zum Boden des Gefäßes.

Am Folgetag, sobald die Organoide vollständig sedimentiert sind, werden sie mit einer 200- μ l-Pipette gesammelt und in eine 10 \times 10 \times 5 mm Kryoeinbettform überführt, wobei auf eine zentrale Positionierung geachtet wird. Überschüssige Flüssigkeit wird unter Verwendung eines Stereomikroskops sorgfältig entfernt. Anschließend erfolgt das Befüllen der Form mit O.C.T.TM-Medium, beginnend an den Ecken und Rändern, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden und die Position der Organoide zu stabilisieren. Nach vollständigem Auffüllen der Vertiefung mit Medium wird die Form in eine -80 °C Kühlbox überführt. Sobald das Medium von einer klaren Flüssigkeit in einen weißen Feststoff übergegangen

ist, wird die Form entfernt und bis zur weiteren Verwendung in einem Ultratiefkühlschrank bei -80 °C gelagert.

Als Modifikation können mehrere Organoid-Chargen bzw. Organoide mit unterschiedlichen Bedingungen gleichzeitig eingebettet werden. In einer größeren Kryoeinbettform (15 × 15 × 5 mm) lassen sich bis zu vier verschiedene Probengruppen positionieren und einbetten. Dabei ist sicherzustellen, dass die unterschiedlichen Proben mit ausreichendem Abstand zueinander angeordnet werden, bevor das O.C.T.TM-Medium hinzugefügt wird. Zur präzisen Neupositionierung der fixierten Organoide kann eine feine Nadel verwendet werden. Um die Orientierung der einzelnen Gruppen zu gewährleisten, wird der Draht einer Büroklammer an einer beliebigen Ecke der Form platziert, solange das Einbettmedium noch flüssig ist. Nach dem Erstarren des Mediums kann der Draht entfernt werden, wodurch ein Loch entsteht, das in sämtlichen Kryoschnitten sichtbar bleibt und als Orientierungshilfe dient.

3.3.3.2 Gefrierschnitterstellung

Die Herstellung von Gefrierschnitten für fixierte ADENOide erfolgt analog zur Vorgehensweise bei fixiertem humanem Gewebe. Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in Abschnitt 3.1.4.

3.3.3.3 Immunofluoreszenzfärbung der ADENOide

Die Immunofluoreszenzfärbung der fixierten ADENOide erfolgt gemäß dem Protokoll für Kryoschnitte, wie in Abschnitt 3.1.5.2 detailliert beschrieben.

3.4 Hypophyse Gewebeklä rung

Im Rahmen der Gewebeklarifizierung wurde die Methode PACT angewendet (Yang, Treweek et al. 2014). Ein etabliertes Protokoll zur Gewebeklä rung von Därmen wurde in dieser Arbeit für die humane Hypophyse modifiziert (Neckel, Mattheus et al. 2016).

3.4.1 Vorbereitung

Die Entnahme der humanen Gewebeprobe erfolgt gemäß der Methode, die unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben ist: direkte Präparation unter Verwendung eines Skalpells. Anschließend wird die Probe vorsichtig in 30 ml HMS, hergestellt nach

Tabelle 7, in eine 50 ml Schraubröhre überführt. Dabei ist sicherzustellen, dass die HMS-Lösung in der Schraubröhre kontinuierlich auf Eis oder im Kühlschrank bei 4 °C gekühlt wird, um eine unerwünschte Polymerisation zu verhindern. Die Probe verbleibt für 48 h in der Lösung, um eine vollständige Diffusion in das Gewebe zu gewährleisten.

3.4.2 Polymerisation der Hypophyse

Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen wird die Probe samt der Lösung in einen Schraubbecher überführt und in einen Vakuumofen gestellt. Zunächst wird ein Unterdruck von 13,3 kPa erzeugt und für 15 min aufrechterhalten, um Luftblasen aus der Probe und der Lösung zu entfernen. Anschließend wird der Ofen auf 50 °C temperiert, wobei der Unterdruck von 13,3 kPa beibehalten wird. Diese Bedingungen werden für eine Dauer von 3 h konstant gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Schraubbecher aus dem Ofen entnommen und die Probe vorsichtig aus dem polymerisierten Gel geborgen. Verbleibende Gelreste werden sorgfältig mit einem Präzisionstuch entfernt.

3.4.3 Gewebeklärung

Die polymerisierte Hypophysenprobe wird zunächst mittels eines Fadens in einem kleinen Block fixiert, sodass die Probe zentriert schwebt. Anschließend wird sie mit 3 %iger Agarose aufgefüllt, bis die Probe vollständig bedeckt ist. Nachfolgend erfolgt eine Kühlung der Probe für 1 h bei 4 °C. Danach kann der Faden vorsichtig aus dem Agaroseblock entfernt werden.

Der Block wird mit Sekundenkleber an der Haltevorrichtung des Mikrotoms befestigt, woraufhin Proben mit einer Dicke von 500 bis 1000 µm geschnitten werden. Diese Schnitte werden zur weiteren Kontrolle auf Millimeterpapier dokumentiert und einzeln in 50-ml-Schraubröhren überführt, die mit 8 % SDS in PBS (pH 7,5) gefüllt sind.

Die Schraubröhren werden in einem Rotationsofen bei 60 °C inkubiert. Ein erster Lösungswechsel erfolgt nach 24 h, gefolgt von weiteren Wechseln alle 48 h, bis die Proben die gewünschte Klärung erreicht haben. Bei jedem Lösungswechsel werden die Proben erneut auf Millimeterpapier dokumentiert. Die Dauer des

Klärungsprozesses variiert je nach Dicke der Schnitte und kann zwischen 7 und 12 Tagen betragen.

3.4.4 Immunofluoreszenz bei geklärtem Gewebe

Nach Erreichen des gewünschten Klärungsgrads werden die Proben für 24 h in 0,1 % Triton X-100 in PBS (PBS -/-) bei 37 °C gewaschen und permeabilisiert. Nach 12 h erfolgt ein Mediumwechsel.

Anschließend folgt die Blockierung der Proben mit der gemäß Tabelle 7 hergestellten Blockierlösung für Gewebeklärun. Diese erfolgt über einen Zeitraum von 24 h bei 37 °C. Danach werden die Primärantikörper in der in Tabelle 10 angegebenen Konzentration in einer frischen Blockierlösung für Gewebeklärun gelöst. Die Proben werden hierin bei 37 °C für insgesamt 48 h inkubiert. Nach 24 h wird die gleiche Menge Primärantikörper erneut zur bestehenden Lösung hinzugefügt.

Es folgt ein Waschschrift der Proben für 24 h in 0,1 % Triton X-100 in PBS (PBS -/-) bei 37 °C. Ein Mediumwechsel erfolgt nach 12 h.

Im Anschluss daran werden die Sekundärantikörper und Lektine entsprechend den Angaben in Tabelle 11 in PBS (PBS -/-) gelöst. Die Proben werden bei 37 °C für 48 h inkubiert, wobei nach 24 h eine zusätzliche Gabe von Sekundärantikörpern und Lektinen erfolgt.

Zum abschließenden Waschen werden die Proben dreimal jeweils für 5 h in PBS (PBS -/-) bei 37 °C gelagert. Schließlich werden die Proben in eine 80 %ige Glycerol-in-H₂O-Lösung überführt, bis sie durchsichtig sind.

3.5 Analyse der Proben

Die Immunofluoreszenzfärbungen der humanen Proben sowie der ADENOide, sowohl bei Kryosektionen als auch bei Paraffinschnitten, werden mit einem Primovert Inversmikroskop und einem Axio Imager M2 Forschungsmikroskop unter Verwendung eines ApoTome aufgenommen. Für weiterführende Aufnahmen wird ein Axio Scan.Z1 eingesetzt. Die 3D-Bildgebung der geklärten Proben erfolgt in einer Glasschale mit Glasboden unter Verwendung eines LSM

5 Exciter. Zur Bildaufnahme und -bearbeitung kommen die Softwarelösungen AxioVision und Zen des Geräteherstellers zum Einsatz.

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Resultate der vorliegenden Arbeit präsentiert. Zunächst erfolgt eine Analyse der konventionellen histologischen Färbung der Hypophyse. Anschließend wird die Kolo-kalisation hormonproduzierender Zellen mit Lektin-positiven Zellen anhand immunhistochemisch gefärbter humaner Proben veranschaulicht. Besonderes Augenmerk liegt auf den Kombinationen, bei denen eine signifikante Übereinstimmung von Hormon- und Lektinbindestellen nachgewiesen wird; diese werden detailliert analysiert und in einem 3D-Organoidmodell weiter bewertet. Im abschließenden Abschnitt erfolgt die Betrachtung von Lektinmarkern an geklärtem Gewebe, wobei das neu etablierte Klärungsverfahren der Adenohypophyse erstmalig Anwendung findet.

4.1 Konventionelle histologische Färbung

Für eine präzise Beurteilung der histologischen Zellstrukturen ist die Anwendung klassischer, konventioneller Färbetechniken der Hypophyse von zentraler Bedeutung. Diese Methoden liefern einen grundlegenden Überblick über das Organ und dienen als Basis für die Planung weiterführender Untersuchungen.

Im sagittalen Schnitt, Abbildung 8A, ist eine konventionelle histologische Färbung, die PAS-Orange-G-Färbung, an der humanen Adenohypophyse dargestellt. Diese Färbung hebt die azidophilen Zellen in rötlichen bis orangefarbenen Tönen hervor. Die Zellverbände erscheinen größtenteils homogen über die Adenohypophyse verteilt, mit wenigen Ausnahmen. Zusätzlich werden Erythrozyten acidophil gefärbt, Abbildung 8C, was indirekt auf die Gefäß- und Sinussysteme hinweist. Die Abgrenzung zwischen Adeno- und Neurohypophyse ist aufgrund morphologischer Strukturveränderungen und zystischer Strukturen erkennbar, die beide Organteile voneinander trennen. Diese Unterschiede sind in Abbildung 8D in einer vergrößerten Darstellung deutlicher sichtbar.

Basophile Zellverbände, die in Blau- bis Lilatönen erscheinen, verteilen sich ebenfalls homogen im Schnittbild, mit einer auffälligen Konzentration im rostromedialen Bereich. In den Abbildungen 8B und 8D sind sowohl Kollagenfasern der Adeno- und Neurohypophyse als auch das Kolloid, das zwischen diesen Organabschnitten liegt, basophil gefärbt.

Chromophobe Zellen sind in Abbildung 8C durch eine vergrößerte Darstellung sichtbar und treten vereinzelt innerhalb der Zellverbände auf. Dabei sind Zellansammlungen mit überwiegend azidophilen, überwiegend basophilen oder gemischten Zellverhältnissen zu erkennen, die gelegentlich chromophobe Zellen einschließen. Zellverbände mit einer deutlichen Dominanz eines bestimmten Zelltyps fehlen auffallend. Diese heterogen zusammengesetzten Zellverbände in Form von Azini sind in Abbildung 8E besonders hervorgehoben.

In Abbildung 8B sind weiterhin Schrumpfungartefakte markiert, die bei histologischen Färbungen auftreten können. Dabei lösen sich die Zellen von den umgebenden Bindegewebsstrukturen und hinterlassen zum Teil leere Räume.

Die klassische, konventionelle histologische Färbung mittels PAS-Orange-G-Färbung ermöglicht es, durch den ersten Überblick Strukturen wie Azini zu identifizieren, die Lage der Adenohypophyse zu bestimmen sowie nicht hormonproduzierende Strukturen darzustellen, um diese in nachfolgenden Analysen mit spezifischeren Verfahren zu charakterisieren.

A

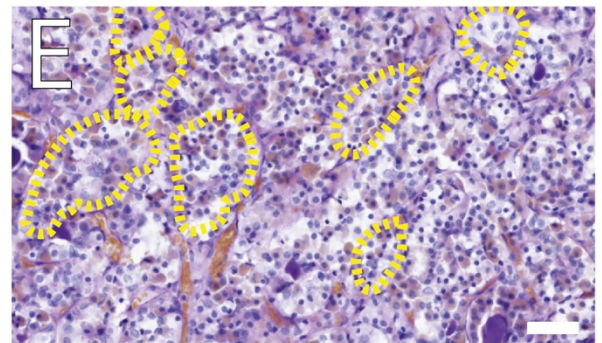
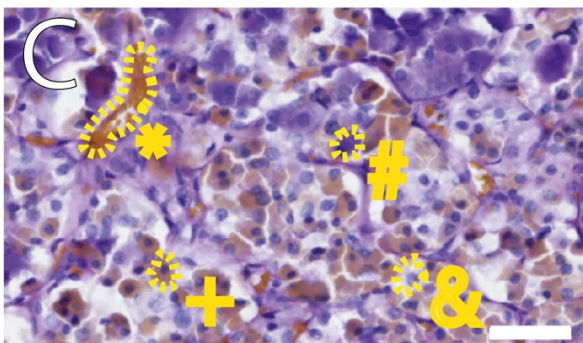
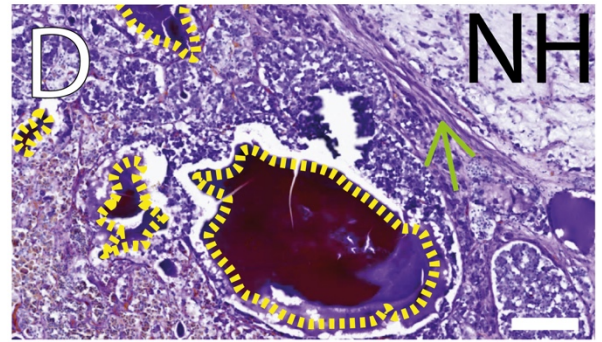
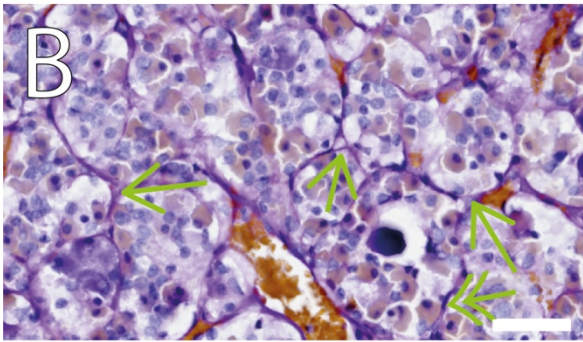
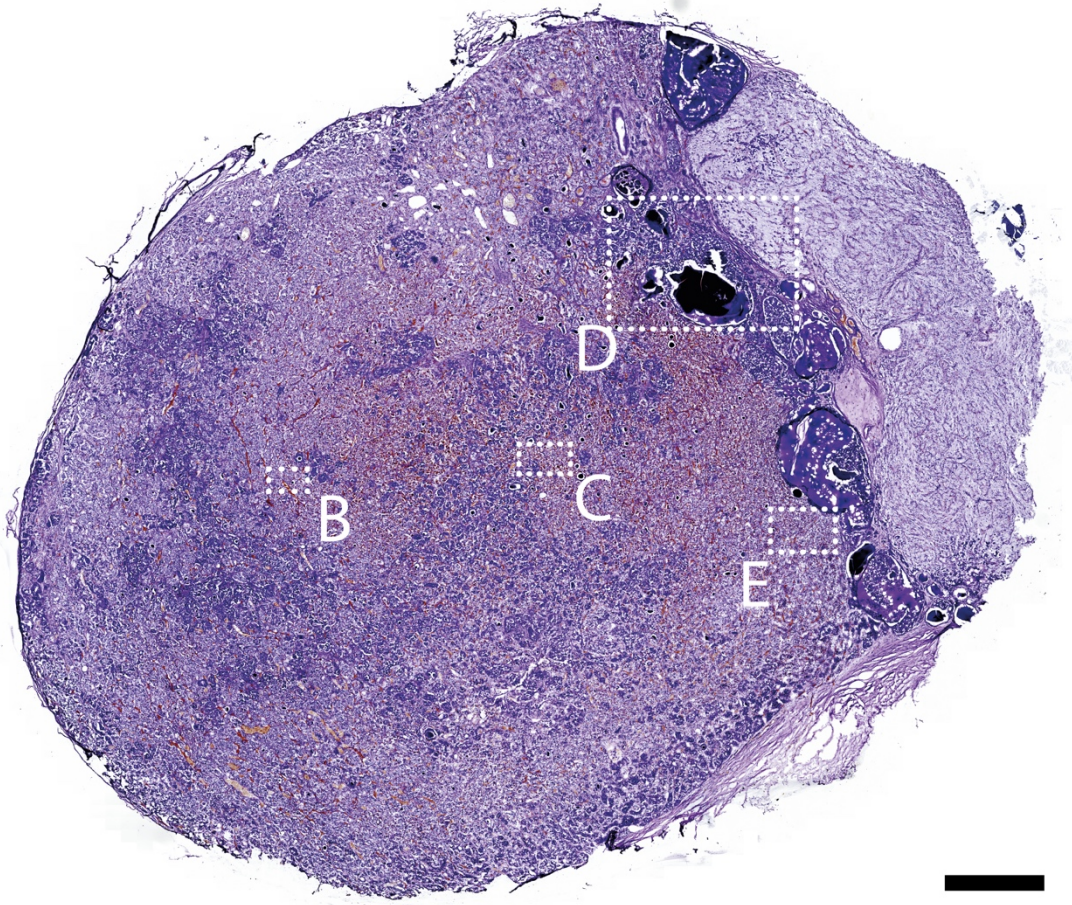


Abbildung 8: Histologische Färbung der humanen Hypophyse – PAS Orange G

A Sagittale Schnittebene. Die eingezeichneten Bereichen B-E werden unter dem Abschnitt A vergrößert dargestellt. Maßstab – Balken schwarz 1 mm. B Kollagenfasern mit einfachen Pfeilen markiert. Ein Doppelpfeil zeigt auf einen Zellkern von einer stromabildenden Zelle. Maßstab 50 μm . C Markiert sind *) Erythrozyten #) basophil angefärbte Zelle +) acidophil gefärbte Zelle &) chromophobe Zelle mit gefärbtem Zellkern. Maßstab 50 μm . D Neurohypophyse mit NH gekennzeichnet. Pfeil zeigt Bindegewebsseptum. Gestrichelte Linie markiert die Kolloideinheiten. Maßstab 200 μm . E Markiert mit gestrichelter Linie sind Azini. Maßstab 50 μm .

4.2 Vergleich - Histologische und Immunfluoreszenzfärbung

Um die in der histologischen Färbung gewonnenen Informationen detaillierter zu analysieren, ist der Einsatz spezifischerer Methoden wie der Immunhistochemie erforderlich. Die neu etablierte Methodik der Kombinationsfärbung an identischen Adenohypophysenschnitten ermöglicht dabei einen präzisen Vergleich zwischen der PAS-Orange-G-Färbung und der Immunfluoreszenzfärbung.

In Abbildung 9A ist die humane Adenohypophyse mittels PAS-Orange G-Färbung dargestellt. Sichtbar sind basophile, azidophile und chromophobe Zellen. Zudem ist ein Blutgefäß mit Erythrozyten erkennbar, exemplarisch in der oberen rechten Ecke der Abbildung.

In Abbildung 9B ist eine Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von ACTH-Antikörpern sowie den Lektinmarkern UEA-1 und Con A dargestellt. Der ausgewählte Schnittabschnitt umfasst sowohl ACTH-positive und Lektinmarker-positive Areale als auch Zellen, die für alle Marker keine Signale aufweisen und lediglich eine Kernfärbung mittels DAPI zeigen. Die in der Vergrößerung markierte Zelle, Abbildung 9B*, weist einen einzelnen Zellkern auf und zeigt deutliche Signale für beide Lektinmarker sowie den ACTH-Antikörper. Eine qualitative Beobachtung der einzelnen Signalkanäle verdeutlicht, dass alle drei Kanäle identische Areale abbilden, was auf eine Kolokalisation der Marker hinweist. In der gleichen Abbildung ist die gestrichelt markierte Zelle in den verschiedenen Immunfluoreszenzaufnahmen erkennbar. Sie zeigt auf allen Kanälen ein positives Signal. Folglich kann festgestellt werden, dass die Zelle sowohl Signale für die Lektinmarker UEA-1 und Con A als auch für den Antikörper ACTH aufweist.

In Abbildung 9A* erscheint die zuvor erwähnte, mit einer gestrichelten Linie markierte Zelle basophil. Im Vergleich dazu ist die mit einem Pfeil gekennzeichnete Zelle acidophil und zeigt in der benachbarten Immunofluoreszenzaufnahme keine Positivität für die Lektinmarker. Ein Vergleich der Übersichtsaufnahmen 9A und 9B offenbart, dass basophile Areale, die violett bis blau gefärbt erscheinen, in der Immunofluoreszenz mit UEA-1 und Con A positiv sind. Demgegenüber zeigen blassere Areale, die chromophobe Zellen sowie Areale mit acidophilen Zellen enthalten, keine Positivität für die Lektinmarker.

Durch diese neu etablierte Methode lassen sich nun Korrelationen zwischen den PAS-Orange-G-Färbungsarealen und den ACTH- sowie Lektinmarker-positiven Arealen in der Immunhistochemie herstellen. Dies ist insbesondere für die Analyse der Lektinmarkerepitope von Bedeutung. Auffällig ist, dass basophile Strukturen in der klassischen histologischen Färbung vermehrt von den Lektinmarkern angefärbt werden.

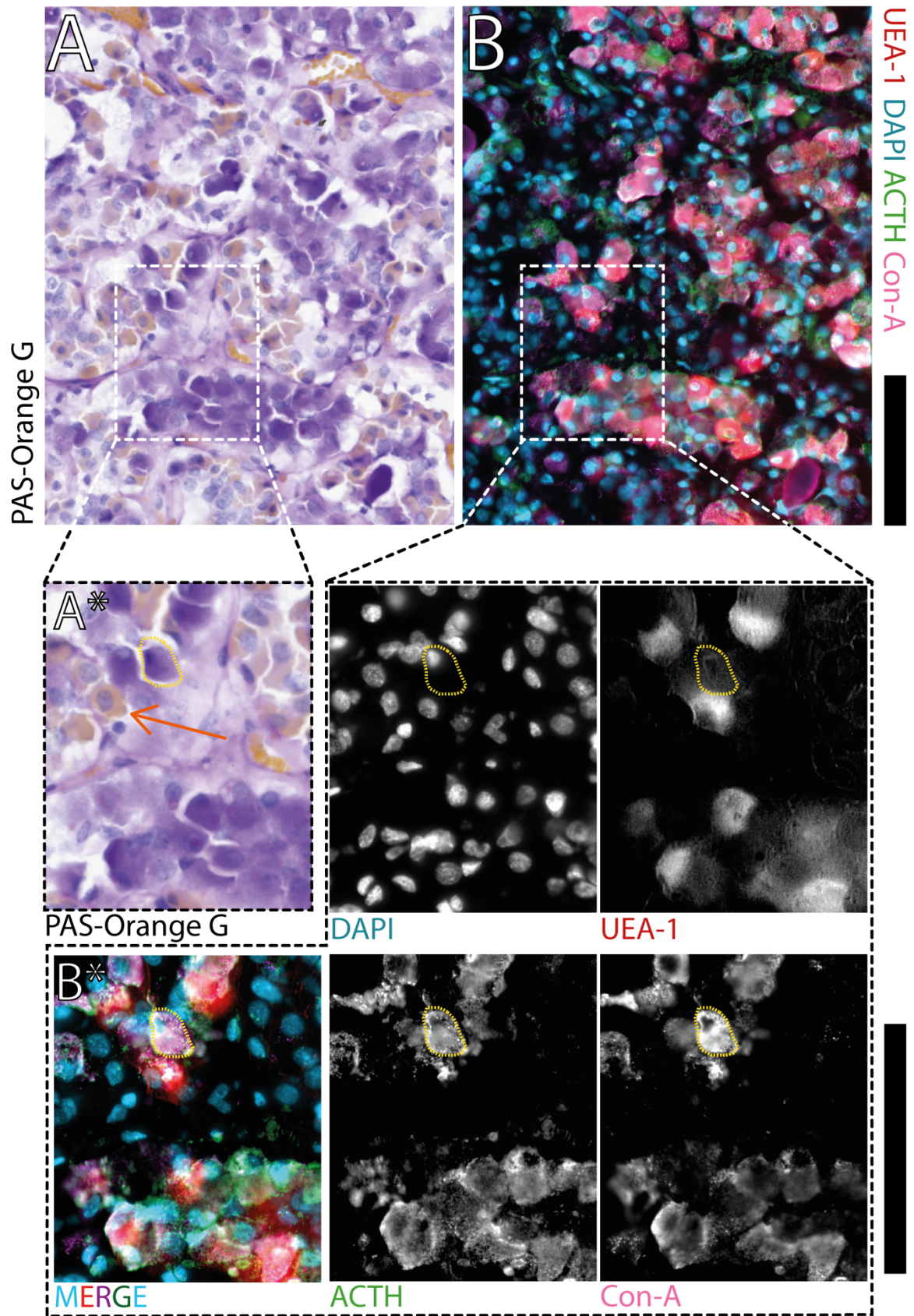


Abbildung 9: PAS-Orange-G im Vergleich zur Immunfluoreszenz

A PAS Orange G Färbung der Adenohypophyse. A Acidophile Zelle mit einem Pfeil markiert. Basophile Zelle umrandet. B Immunfluoreszenz des Abschnittes wie unter A. UEA-1 in rot, ACTH in grün, Con A in magenta und die Zellkerne mittels DAPI in blau dargestellt. Unter der Vergrößerung B* ist eine einzige Zelle umrandet dargestellt. Dieselbe Zelle ist auch bei der PAS-Orange G Färbung umrandet. Maßstab 50 µm – schwarze Balken rechts.*

4.3 Färbung mit Antikörpern und Lektinen

Um eine der Hypothesen dieser Arbeit, die Nutzung von Lektinmarkern als diagnostisches Äquivalent zu ACTH-Antikörpern, zu bestätigen, ist ein qualitativer und quantitativer Vergleich der hormonpositiven Areale der Adenohypophyse mit den lektinmarkerpositiven Arealen erforderlich. Im folgenden Abschnitt wurden verschiedene humane Hypophysenproben in einer Matrix aus Kombinationen von Hormonen und Lektinen parallel gefärbt, um potenzielle Kolokalisationsmuster zu identifizieren. Die zusammengefassten Ergebnisse aller Färbungen sind in den Tabellen 15 bis 17 dargestellt. Die gewählten Bildausschnitte verdeutlichen eine erhöhte Präsenz sowohl hormonpositiver als auch lektinpositiver Zellen.

4.3.1 Kombination der Hormone Prolaktin und GH mit Lektinen

Die immunhistologisch gefärbten Bildreihen illustrieren jeweils die Kombination eines Hormons mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA. In Abbildung 10A sind Prolaktin-positive Zellen der Adenohypophyse erkennbar. Einzelne Prolaktin-positive Areale sind sichtbar, während die DAPI-Färbung eine hohe Dichte kernhaltiger Zellen im gleichen Bereich aufzeigt.

Betrachtet man die Lektin-positiven Zellen, lassen sich positive Signale sowohl für UEA-1, Con A als auch für PNA identifizieren. Dabei variieren die Signalintensitäten, wobei UEA-1 und PNA die stärksten Signale aufweisen. Die Überlagerung der Aufnahmen (MERGE) verdeutlicht das Fehlen einer Kolokalisation zwischen Prolaktin- und Lektin-positiven Zellen, was durch markierte Zellen mit Pfeilen hervorgehoben wird.

Abbildung 10B zeigt die Kombination derselben Lektine mit dem Hormon GH. GH-positive Zellen sind homogen über den Bildausschnitt verteilt, mit

intensiveren Signalen an den apikalen Zellbereichen. Die Lektinfärbung entspricht der Darstellung in Abbildung 10A.

Die MERGE-Analyse zeigt keine eindeutige Kolo-kalisation von GH mit den Lektinen. Trotzdem weisen einige GH-positive Zellen auch Lektin-Positivität auf, hauptsächlich in Zellen mit schwacher GH-Expression. Dies deutet darauf hin, dass zwar Kolo-kalisationsmuster vorhanden sind, diese jedoch nicht hoch sind. Die entsprechenden Kolo-kalisationsmuster sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

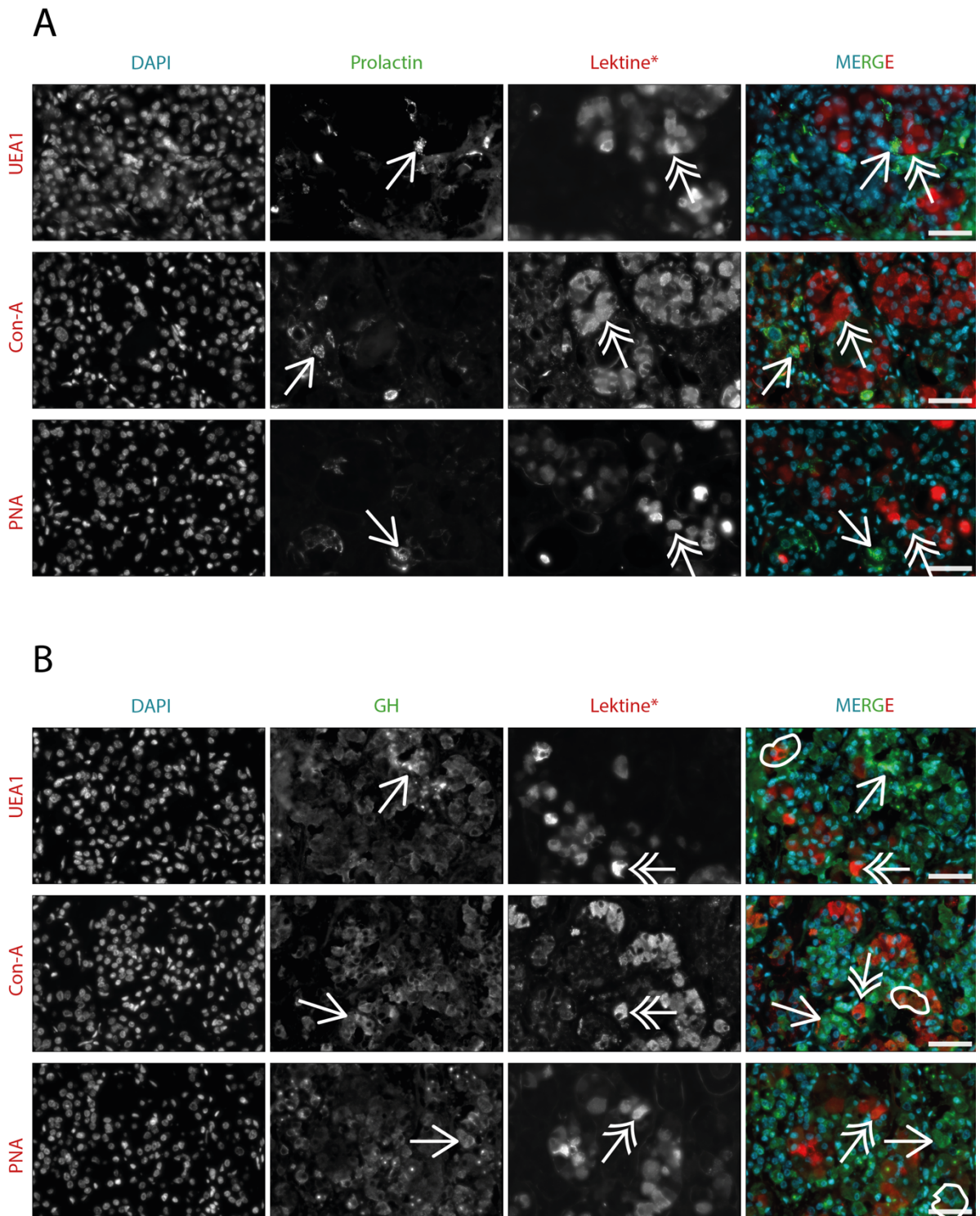


Abbildung 10: Färbung von Prolaktin und GH mit Lektinen

A) Die Immunofluoreszenz-Färbung von Prolactin wurde in Kombination mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA durchgeführt, wobei diese jeweils in Rot (von oben nach unten) dargestellt sind. Prolactin erscheint in Grün. Im MERGE-Bild sind alle drei Kanäle kombiniert sichtbar.

B) Die Immunofluoreszenz-Färbung von GH erfolgte ebenfalls in Kombination mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA, jeweils in Rot (von oben nach unten). GH ist in Grün visualisiert. Im MERGE-Bild sind alle drei Kanäle zusammengeführt. Zusätzlich sind hier die überlappenden Bereiche von Lektin und GH deutlich umrandet.

Einfache Pfeilspitzen markieren jeweils eine Zelle mit Hormonproduktion. Diese Zellen sind mit demselben Pfeil und in identischer Orientierung auch im MERGE-Bild gekennzeichnet. Pfeile mit Doppelspitzen weisen auf Lektin-positive Zellen hin, ebenfalls mit identischer Pfeilausrichtung im MERGE-Bild für den direkten Vergleich. Die Pfeile illustrieren dabei nicht überlappende Färbungen, während Kolokalisationen durch eine Umrandung der entsprechenden Areale im MERGE-Bild hervorgehoben werden.

DAPI ist in beiden Abschnitten in Blau dargestellt. Maßstab: 50 µm.

Tabelle 15: Kombinationsfärbung mit den Hormonen Prolactin und GH in Verbindung mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA

Lektin \ Hormon	UEA-1	Con A	PNA
Prolactin	-	-	-
GH	+	+	+

- = keine Kolokalisation, + = vereinzelt Kolokalisation, ++ = geringe Kolokalisation, ++++ = hohe Kolokalisation

4.3.2 Kombination der Hormone FSH und LH mit Lektinen

In Abbildung 11A wird das Hormon Follikelstimulierendes Hormon (FSH) in Kombination mit verschiedenen Lektinen dargestellt. Bei der Betrachtung der Lektine zeigt sich ein ähnliches Färbemuster der Lektinmarkersignale wie in Abbildung 10A/B.

Die Färbung der positiven Zellen mit FSH in Abbildung 11A zeigt eine verteilte Anordnung im dargestellten Ausschnitt. Auffällig ist, dass die Signale im FSH-Kanal punktförmig und nicht flächenhaft im Zytosol lokalisiert sind. Beim Vergleich der Kanäle und deren Überlappung kann keine Kolokalisation des Hormons FSH mit den verwendeten Lektinen festgestellt werden.

In Abbildung 11B wird die Kombination des Hormons Luteinisierendes Hormon (LH) mit den Lektinen untersucht. Auch LH zeigt eine verteilte Färbung im

Bildausschnitt und erscheint in den Zellen als granuläre Struktur (vgl. Abbildung 11B). Die Lektine weisen konsistente Eigenschaften auf, vergleichbar mit den Abbildungen 10A/B und 11A, mit einer homogenen Verteilung der lektinmarkerpositiven Bereiche. Die Überlagerung der Kanalsignale zeigt ebenfalls keine Kolo-kalisation von Lektinen mit LH. Es lässt sich klar erkennen, dass lektinpositive Areale keine LH-positiven Zellen enthalten. Diese Beobachtung wird durch den Vergleich der einzelnen Kanäle weiter untermauert.

Die Ergebnisse zur Kolo-kalisationsstärke der Lektinmarker mit den jeweiligen Hormonantikörpern FSH und LH sind in Tabelle 16 dokumentiert.

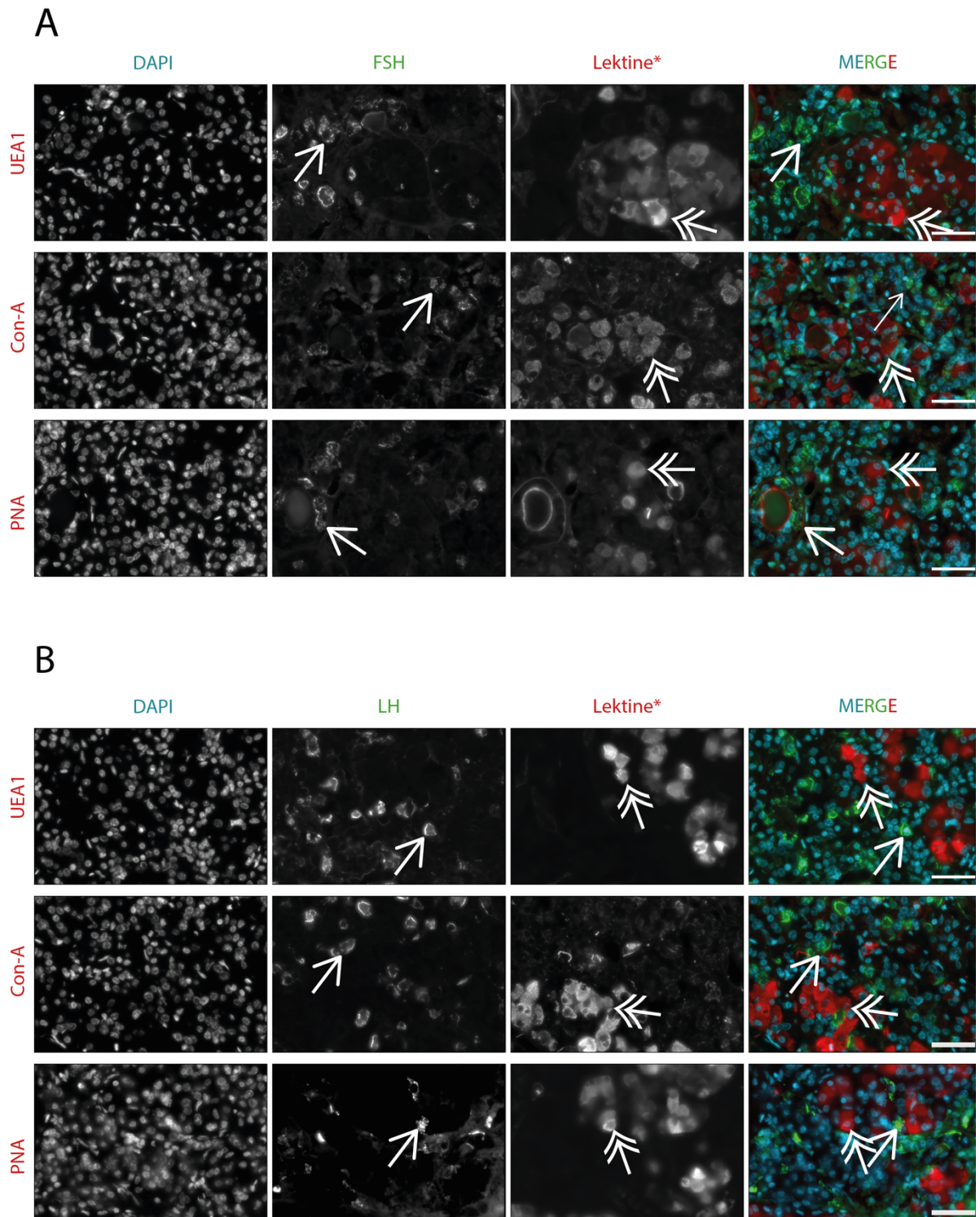


Abbildung 11: Färbung von FSH und LH mit Lektinen

A: Immunfluoreszenzfärbung von FSH in Kombination mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA, jeweils in Rot (von oben nach unten). FSH ist in Grün dargestellt. Im MERGE-Bild sind alle drei Kanäle kombiniert sichtbar.

B: Immunfluoreszenzfärbung von LH in Kombination mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA, jeweils in Rot (von oben nach unten). LH ist in Grün visualisiert. Im MERGE-Bild sind ebenfalls alle drei Kanäle zusammengeführt.

Einfache Pfeilspitzen markieren Zellen mit Hormonproduktion. Diese Zellen sind mit identischen Pfeilen in derselben Ausrichtung auch im MERGE-Bild gekennzeichnet. Doppelpfeile weisen auf Lektin-positive Zellen hin, die ebenfalls mit identischen Pfeilen im MERGE-Bild dargestellt werden, um Vergleiche zu ermöglichen. Die Pfeilmarkierungen verdeutlichen nicht überlappende Färbungen, während Kolokalisationen durch eine Umrandung der entsprechenden Areale im MERGE-Bild hervorgehoben werden.

DAPI ist in beiden Abschnitten in Blau dargestellt. Maßstab: 50 µm.

Tabelle 16: Kombinationsfärbung mit den Hormonen FSH und LH in Verbindung mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA

Hormon \ Lektin	UEA-1	Con A	PNA
FSH	-	-	-
LH	-	-	-

- = keine Kolokalisation, + = vereinzelt Kolokalisation, ++ = geringe Kolokalisation, ++++ = hohe Kolokalisation

4.3.3 Kombination der Hormone ACTH und TSH mit Lektinen

In Abbildung 12 werden die Hormone TSH und ACTH zusammen mit Lektinen dargestellt. Abbildung 12A zeigt, dass TSH-positive Zellen überwiegend in Zellkolonien vorkommen und nur selten als Einzelzellen zu finden sind. Granula-betonte Signale treten besonders an der apikalen Zellseite auf.

Die Lektinfärbungen weisen die bereits zuvor beschriebenen Eigenschaften auf. In der Überlagerung der Kanäle ist eine gewisse Kolokalisation von TSH und Con A erkennbar, jedoch nicht in Kombination mit anderen Lektinen. Es zeigt sich, dass TSH-positive Zellen teilweise auch Con A-positiv sind, während dies umgekehrt nicht zutrifft.

In der letzten Bilderreihe dieser Serie (Abbildung 12B) wird ACTH in Verbindung mit Lektinen gezeigt. Hier ist eine Verteilung der hormonpositiven Zellen in

Zellverbänden erkennbar, die sich über den gesamten Bildausschnitt erstreckt. Auffällig ist die homogene, granuläre Signalstärke der ACTH-positiven Zellen.

Bei Betrachtung der Lektinfärbungen fallen Übereinstimmungen in den Bereichen auf, die ebenfalls ACTH-positiv sind. Es kann nachgewiesen werden, dass alle drei Lektine dieselben Zellen markieren, die zuvor ACTH-positiv waren. Ein deutlicher Signalunterschied zwischen den positiven Zellen ist bei UEA-1 und PNA festzustellen, wohingegen Con A-positive Zellen ein sehr homogenes Signal aufweisen.

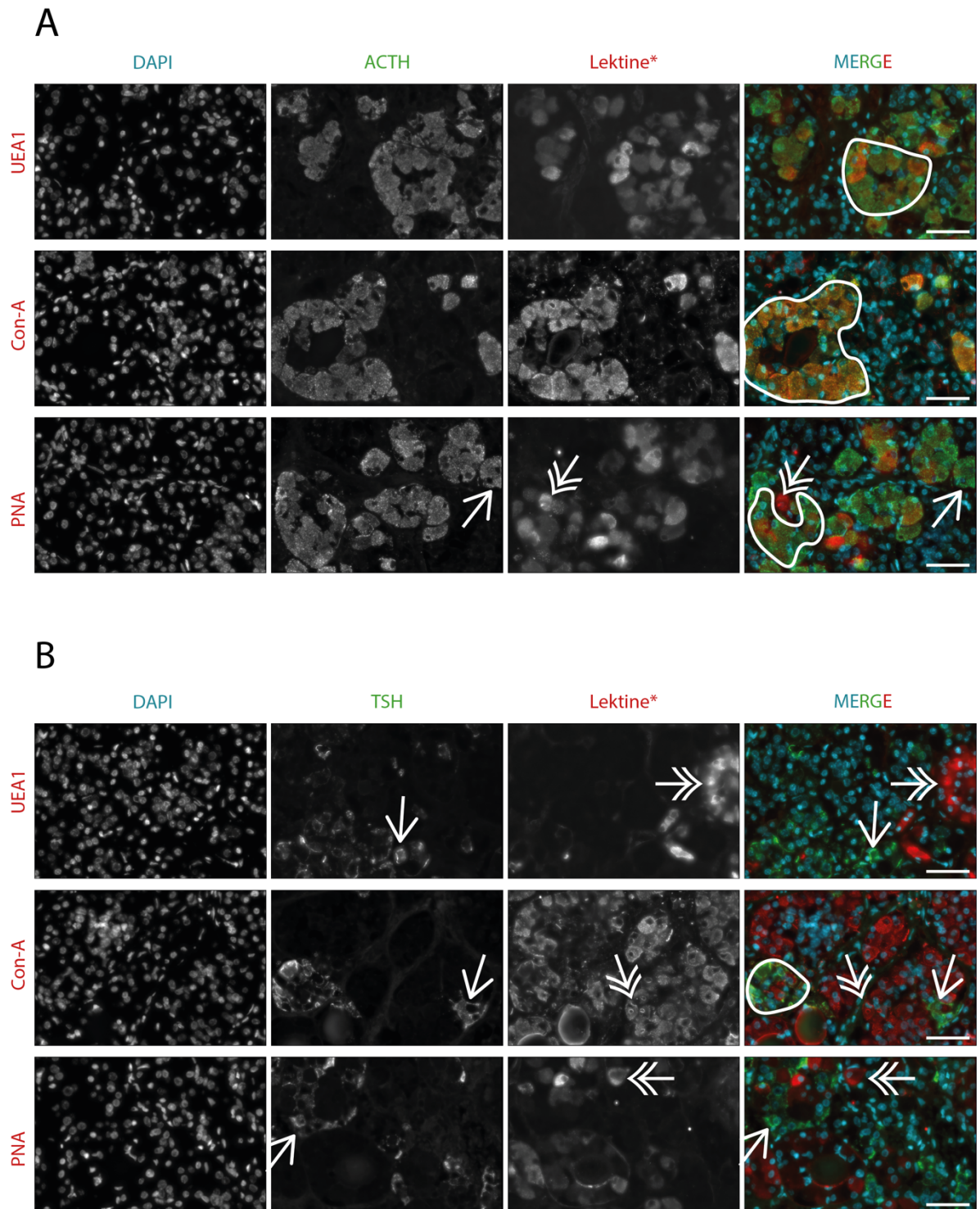


Abbildung 12: Färbung von ACTH und TSH mit Lektinen

A: Immunfluoreszenzfärbung von TSH in Kombination mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA, jeweils in Rot (von oben nach unten). TSH ist in Grün dargestellt. Im MERGE-Bild sind alle drei Kanäle zusammengeführt.

B: Immunfluoreszenzfärbung von ACTH in Kombination mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA, jeweils in Rot (von oben nach unten). ACTH erscheint in Grün. Im MERGE-Bild sind sämtliche Kanäle vereint.

Einfache Pfeilspitzen markieren Zellen mit Hormonproduktion. Diese Zellen sind mit identischen Pfeilen und derselben Orientierung auch im MERGE-Bild sichtbar. Doppelpfeilspitzen weisen auf lektinpositive Zellen hin. Auch hier findet sich der Pfeil mit derselben Ausrichtung im MERGE-Bild, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Die Pfeile dienen der Veranschaulichung nicht überlappender Färbungen, während Kolokalisationen durch Umrandung der betreffenden Areale im MERGE-Bild hervorgehoben werden.

DAPI ist in beiden Abschnitten in Blau dargestellt. Maßstabsbalken: 50 µm.

Tabelle 17: Kombinationsfärbung mit den Hormonen ACTH und TSH in Verbindung mit den Lektinen UEA-1, Con A und PNA

Hormon \ Lektin	UEA-1	Con A	PNA
ACTH	++++	++++	++
TSH	-	++	-

- = keine Kolokalisation, + = vereinzelt Kolokalisation, ++ = geringe Kolokalisation, ++++ = hohe Kolokalisation

4.3.4 Zwischenfazit zu den Lektinmarker-Hormon-Übereinstimmungen

Nach Abschluss dieses Abschnittes der Arbeit kann festgestellt werden, dass die hier verwendeten Lektinmarker eine ausgeprägte Kolokalisation mit den corticotropen, ACTH-produzierenden Zellen der Adenohypophyse aufweisen. Aufgrund dieser hohen Übereinstimmung wird im weiteren Verlauf der Arbeit die Kombination des Hormons ACTH mit den Lektinmarkern UEA, Con A und PNA fokussiert. Andere Hormone der Hypophyse werden in den folgenden Arbeitsschritten nicht weiter berücksichtigt.

4.3.5 Detaillierte Darstellung - ACTH-positiven und lektinpositiven Zellen

Nach der eindeutigen Kolokalisation von ACTH mit den Lektinmarkern UEA-1, Con A und PNA in allen sechs getesteten Hormonen wird im Folgenden diese Kombination detailliert analysiert. Abbildung 13 veranschaulicht die

Kolokalisation von ACTH mit den drei verwendeten Lektinmarkern. In Abbildung 13A* ist ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt, der eine präzisere Beschreibung der Kolokalisation ermöglicht.

Abbildung 13A zeigt die Kombinationsfärbung von ACTH, UEA-1 und Con A. In der Vergrößerung (Abbildung 13A*) ist die granuläre Verteilung der Antikörperbindungsstellen deutlich erkennbar. Die positiven Signale erscheinen homogen über die gesamte Zelle verteilt. Zusätzlich ermöglicht die positive Färbung eine indirekte Abgrenzung der Zellgrenze. Die Lektinmarker UEA-1 und Con A tragen ebenfalls zur klaren Abgrenzung der Zelle bei und zeigen positive Signale in denselben Bereichen. UEA-1 weist vermehrt granuläre Strukturen auf, während Con A eine homogenere Verteilung im Zytosol sowie vereinzelte granuläre Strukturen innerhalb der Zelle zeigt. Im Vergleich ist eine Überlappung und somit Kolokalisation von ACTH-positiven Zellen mit den UEA-1- und Con A-positiven Zellen deutlich sichtbar.

In Abbildung 14 wird ACTH erneut mittels Immunofluoreszenzfärbung dargestellt, diesmal in Kombination mit UEA-1 und PNA. Abbildung 14A zeigt, dass die Signalaufnahme im UEA-1-Kanal nicht homogen verteilt ist. Die qualitative Analyse zeigt eine variable Signalintensität, die visuell erkennbar ist. Bei der Betrachtung der PNA-Färbung wird deutlich, dass nicht alle Bereiche, die UEA-1- und ACTH-positiv sind, auch PNA-Bindung aufweisen.

Zusammenfassend demonstrieren UEA-1 und Con A eine signifikante Kolokalisation mit ACTH-positiven Zellen. Dabei sind die Signale von Con A homogener als die von UEA-1. PNA zeigt ebenfalls eine Kolokalisation mit ACTH-positiven Zellen, jedoch nicht in allen Zellen der Adenohypophyse, wie in den Detailaufnahmen ersichtlich ist.

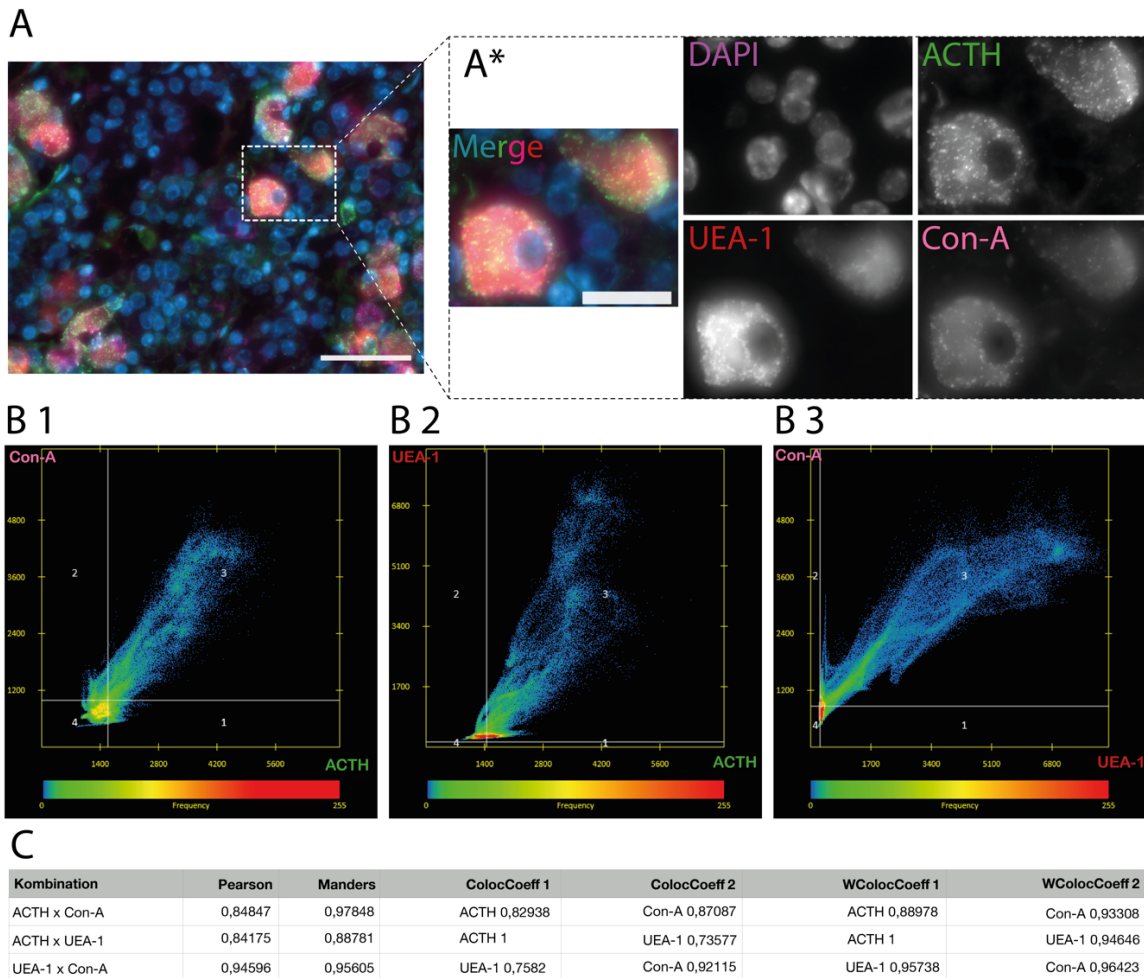


Abbildung 13: Immunhistologische Färbung der Adenohypophyse und Analyse

Abbildung A zeigt eine Färbung mit ACTH (grün) sowie den Lektinen UEA-1 (rot) und Con A (magenta). In der Übersichtsfärbung lassen sich einzelne Zellen erkennen, die dreifach positiv gefärbt sind. Die Vergrößerung in A* (rechts) stellt die jeweiligen einzelnen Kanäle dar. Dabei sind granuläre Strukturen innerhalb der Zellen in den Lektinmarker- und Antikörperkanälen eindeutig positiv sichtbar. In Abbildung B sind Kolokalisations-Streudiagramme dargestellt: B1 zeigt die Kolokalisationsanalyse zwischen ACTH (x-Achse) und Con A (y-Achse). B2 stellt die Kolokalisationsanalyse zwischen ACTH (x-Achse) und UEA-1 (y-Achse) dar. B3 illustriert die Kolokalisationsanalyse zwischen UEA-1 (x-Achse) und Con A (y-Achse). Abbildung C präsentiert die Ergebnisse der quantitativen Kolokalisationsanalyse. Dabei sind der Pearson-Korrelationskoeffizient (maximal 1) sowie der Manders-Koeffizient (zwischen 0 und 1) aufgeführt. Zusätzlich sind die Kolokalisationskoeffizienten für jeden einzelnen Kanal angegeben.

In Abbildung 13B1 ist ein Streudiagramm dargestellt, das die Kolokalisation von zwei Kanälen, in diesem Fall ACTH und Con A, visualisiert. Die Punktverteilung

im Diagramm deutet auf eine positive Diagonale hin, was auf eine Korrelation und folglich auf eine Kolo-kalisation beider Signale hinweist. Die Farbskala veranschaulicht die Häufigkeit von Pixeln mit ähnlichen Intensitäten, wobei Blau für geringe und Rot für hohe Intensität steht.

Entsprechend zeigt Abbildung 13B2 die Korrelation zwischen ACTH und UEA-1 in einem Streudiagramm. Auch hier ist eine positive Diagonale erkennbar, was erneut für eine Korrelation und somit für eine Kolo-kalisation beider Signale spricht.

Ebenso zeigt die Gegenprobe, die Korrelation zwischen den Lektinmarkern Con A und UEA-1, in Abbildung 13B3 eine positive Diagonale. Dies deutet auf eine positive Korrelation zwischen den von den Markern markierten Arealen hin.

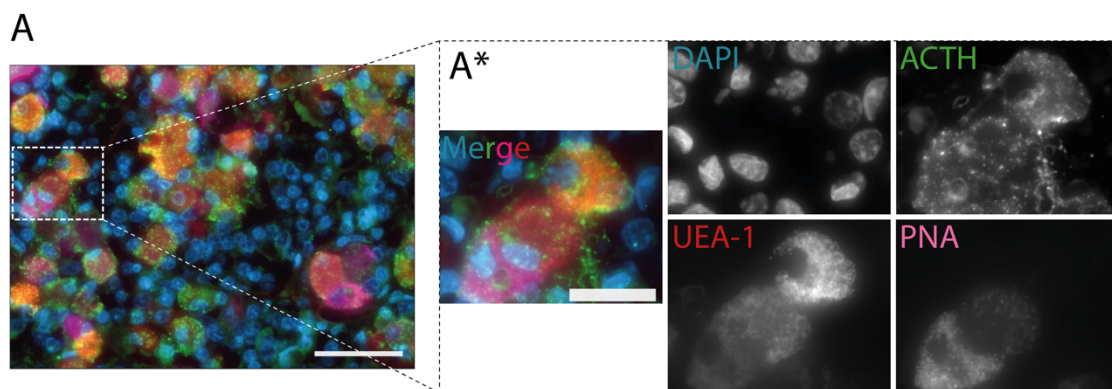


Abbildung 14: Immunhistologische Färbung der Adenohypophyse

Abbildung A zeigt eine Färbung mit ACTH (grün) sowie den Lektinen UEA-1 (rot) und PNA (magenta). In der Übersichtsfärbung lassen sich einzelne Zellen erkennen, die teilweise dreifach positiv gefärbt sind. Die Vergrößerung in A* (rechts) stellt die jeweiligen einzelnen Kanäle dar. Dabei sind granuläre Strukturen innerhalb der Zellen in den Lektinmarker- und Antikörperkanälen eindeutig positiv sichtbar. Auffällig ist jedoch, dass nicht alle ACTH positiven Areale gleichzeitig PNA positiv erscheinen. Kerngegenfärbung mit DAPI. Maßstab Übersicht 50 μm . Maßstab Vergrößerung 20 μm

4.3.6 Übersichtsaufnahme - ACTH-positiven und lektinpositiven Zellen

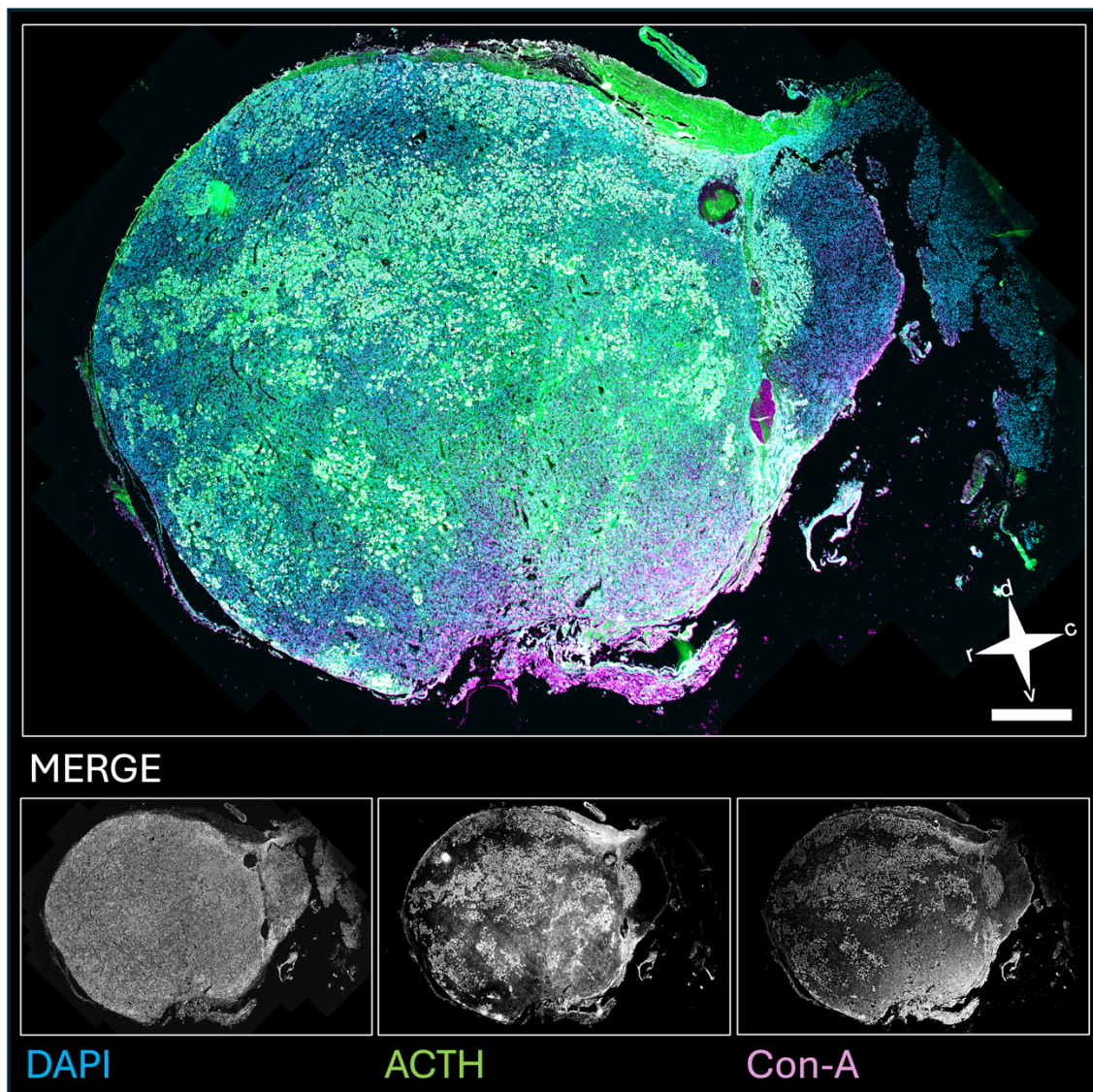


Abbildung 15: Übersicht der gesamten Hypophyse

Färbung von DAPI (blau), ACTH (grün) und Con-A (rot) – sagittaler Schnitt

Maßstab 2 mm. d=dorsal. v=ventral. r=rostral. c=caudal.

Zur Evaluierung der detaillierten qualitativen und quantitativen Aussagen der vorangegangenen Kapitel werden im Folgenden sagittale Ganzorganaufnahmen der Hypophyse qualitativ analysiert, um die zentrale These dieser Arbeit zu untermauern. In der Übersichtsdarstellung (Abbildung 15) zeigt sich eine Überlappung des verwendeten Lektinmarkers Con A mit dem Antikörper ACTH, die global über die Adenohypophyse verteilt ist. Auffällig ist, dass ACTH-positive

Areale gleichzeitig auch Con A-positive Bereiche im Zentrum des sagittalen Schnitts gruppieren. Die Randregionen des Schnitts weisen insgesamt weniger positive Areale auf.

Des Weiteren ist ein Areal ACTH-positiver Zellen innerhalb der Neurohypophyse erkennbar, ein Phänomen, das im späteren Verlauf der Arbeit näher beschrieben wird. Im Übergangsbereich von der Adenohypophyse zur Neurohypophyse sind zudem Aussparungen sichtbar, die durch Rathke-Zysten verursacht werden.

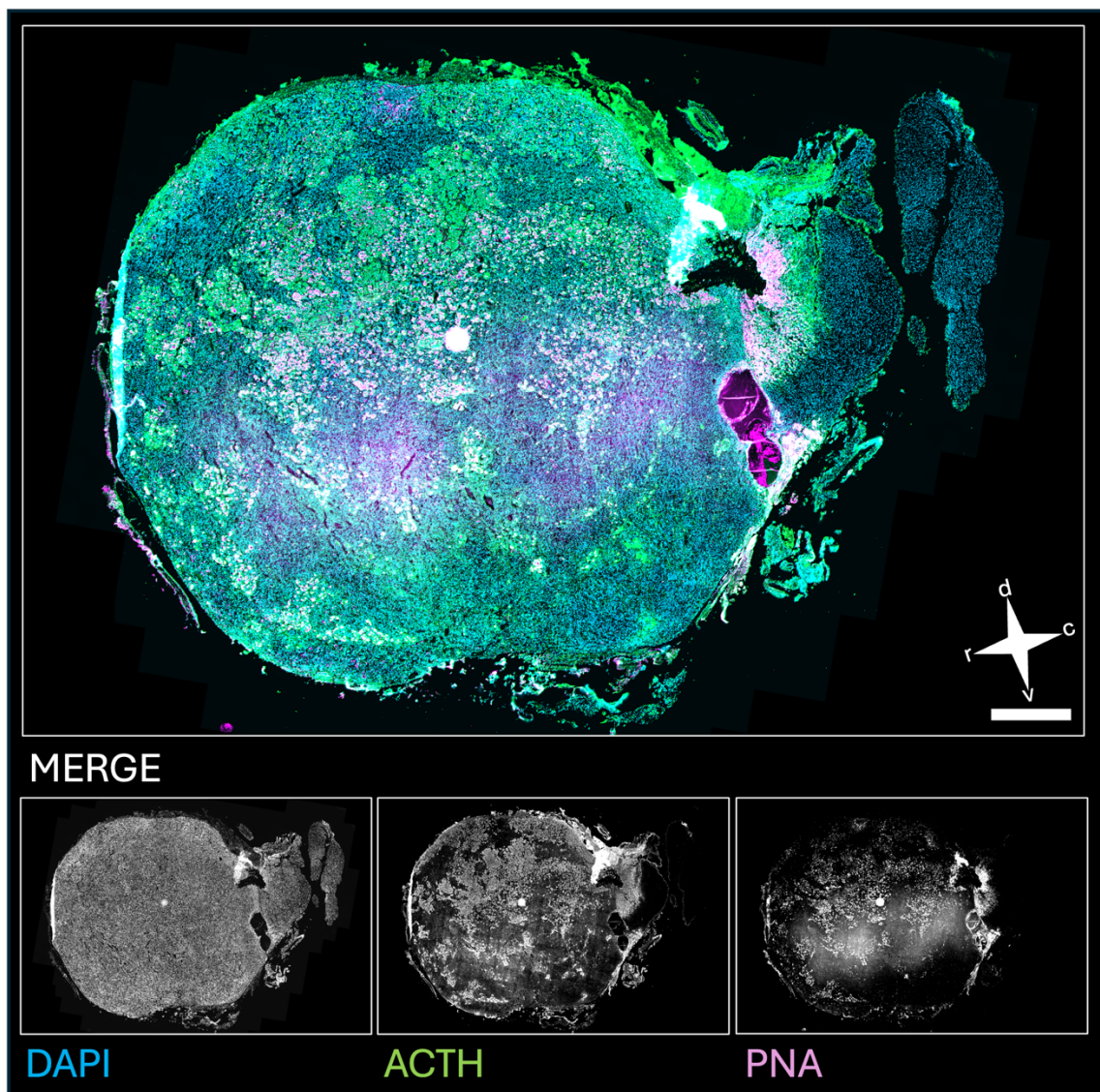


Abbildung 16: Übersicht der gesamten Hypophyse

Färbung von DAPI (blau), ACTH (grün) und PNA (rot) – sagittaler Schnitt

Maßstab 2 mm. d=dorsal. v=ventral. r=rostral. c=caudal.

In Anlehnung an Abbildung 15 zeigt auch Abbildung 16 eine Ganzorganaufnahme in sagittaler Ebene. Hierbei erfolgt jedoch ein Vergleich der ACTH-positiven Areale mit den PNA-positiven Arealen. Auffällig ist bei der qualitativen Beobachtung, dass die Verteilung der Lektinmarker in den PNA-positiven Bereichen nicht mit der Verteilung der ACTH-positiven Bereiche übereinstimmt. Es existieren Areale, die sowohl ACTH- als auch gleichzeitig PNA-positiv sind. Gleichzeitig gibt es jedoch auch Bereiche, die ausschließlich ACTH-positiv sind, ohne PNA-Positivität aufzuweisen. Das Verteilungsmuster der ACTH-positiven Areale ähnelt im Übrigen jenem in Abbildung 15. Ebenso finden sich zwischen Adeno- und Neurohypophyse nicht gefärbte Rathke-Zysten.

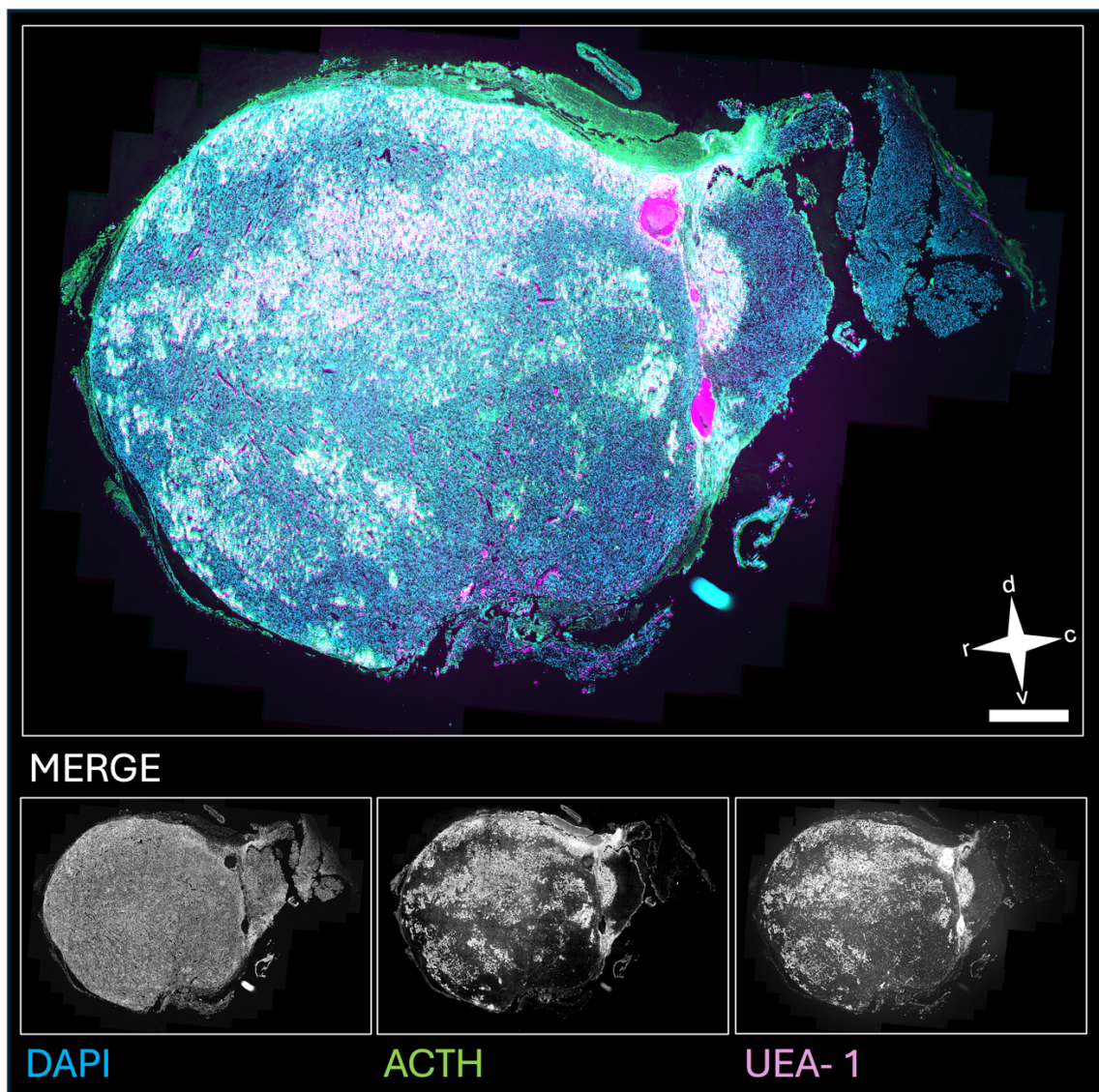


Abbildung 17: Übersicht der gesamten Hypophyse

Färbung von DAPI (blau), ACTH (grün) und UEA-1 (rot) – sagittaler Schnitt

Maßstab 2 mm. d=dorsal. v=ventral. r=rostral. c=caudal.

In Abbildung 17 wird die Kombination des Antikörpers ACTH mit dem Lektinmarker UEA-1 in positiven Bereichen dargestellt. Ähnlich den beiden vorherigen Abbildungen entspricht das Bild der ACTH-positiven Areale den anderen sagittalen Ganzorganabschnitten. Bei der qualitativen Beobachtung fällt auf, dass die Verteilung der UEA-1-positiven Areale eine hohe Übereinstimmung mit den ACTH-positiven Arealen aufweist. Dies ähnelt dem Befund in Abbildung 15, in der ACTH und Con A dargestellt sind. Auffällig ist jedoch, dass die Rathke-Zysten in dieser Abbildung ebenfalls UEA-1-positiv erscheinen. Dieses Phänomen wird im weiteren Verlauf des Textes detaillierter analysiert.

4.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Lektinmarker

1. Die Lektine UEA-1, Con A und PNA kolokalisieren mit ACTH-positiven Zellen der Adenohypophyse. Dabei liefern UEA-1 und Con A die qualitativ besten Ergebnisse in der Kolokalisation.
2. UEA-1 zeigt ein flächiges Anfärbemuster in ACTH-positiven Zellen, während Con A ein vesikuläres Bild der Zielstrukturen liefert. Dies deutet darauf hin, dass Con A bevorzugt Glykanstrukturen der ACTH-Hormonvesikel erkennt.
3. Weitere Strukturen der Adenohypophyse, wie Rathke-Taschen-Zysten und Gefäße, werden durch spezifische Lektinmarker sichtbar gemacht.
4. Die Membranen der ACTH-positiven Zellen weisen Glykanmodifizierungen auf, die Zuckerstrukturen wie α -D-Mannose, Gal- β (1,3)-GalNAc und α -L-Fucose enthalten.
5. Der Con A-Lektinmarker eignet sich am besten als Surrogatmarker für ACTH-positive Zellen, da er im Gegensatz zu UEA-1 keine weiteren anatomischen Strukturen markiert.

4.4 Weitere Beobachtungen mittels Lektinen

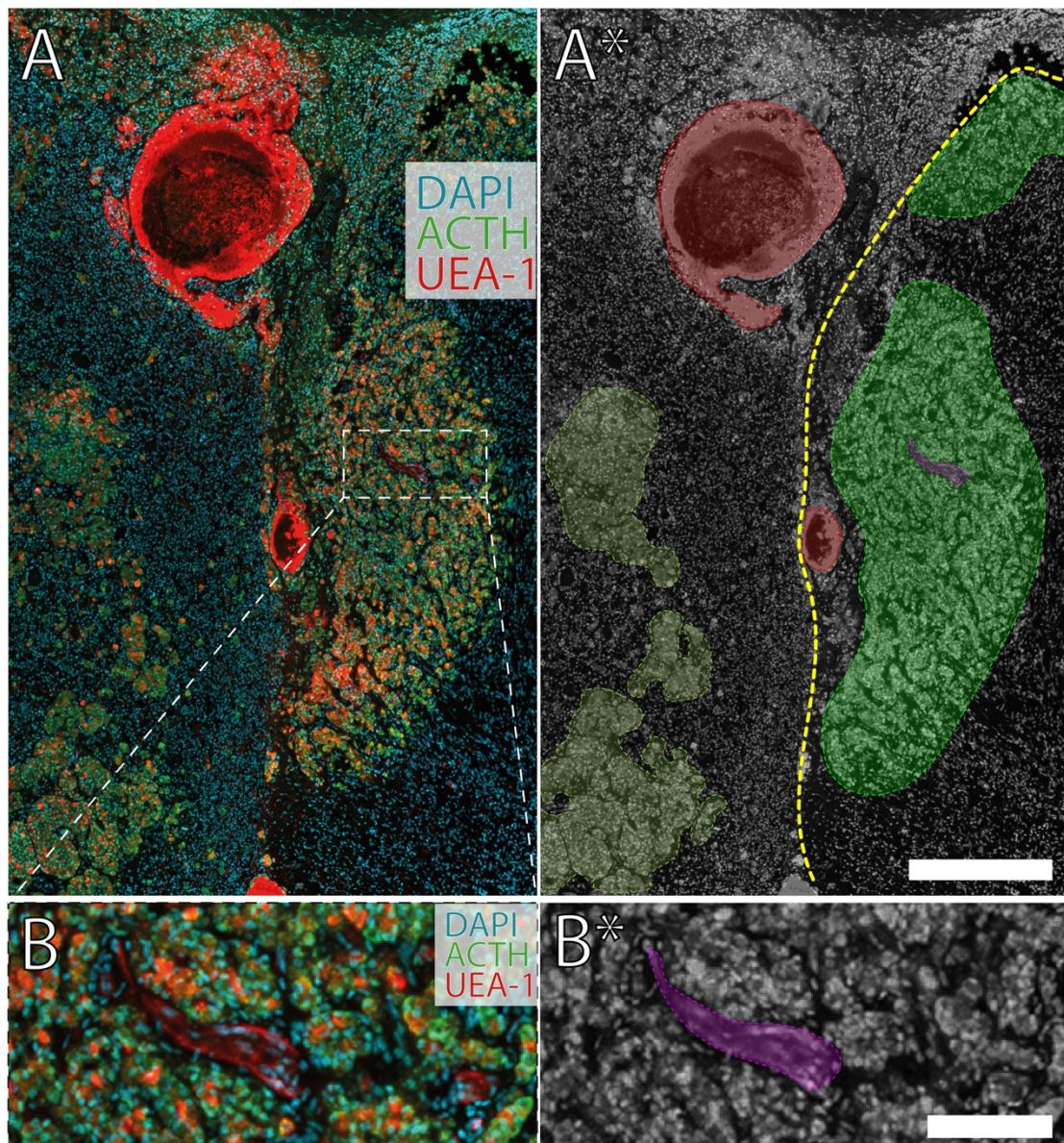


Abbildung 18: Darstellung von Gefäßen und Kolloid mit Hilfe von Lektinen

A) Die Grenze zwischen Adeno- (links) und Neurohypophyse (rechts) ist vergrößert dargestellt. Die DAPI-gefärbten Zellkerne verdeutlichen durch ihre Dichte den Verlauf der Grenze (gelb gestrichelt) zwischen beiden Hypophysenanteilen. ACTH-positive Zellen sind im Bereich der Neurohypophyse (hellgrün) sichtbar, im Vergleich dazu ACTH-positive Zellverbände in der Adenohypophyse (dunkelgrün). Zystische Strukturen im Grenzgebiet (rot) sowie ein Gefäß (lila) sind zusätzlich hervorgehoben. Maßstab: 500 µm.

B) Rechts ist ein Gefäß im Zellverband von ACTH-positiven Arealen dargestellt und farblich in lila markiert. Links ist ein Gefäß zu sehen, das positiv ist und Bindungssepitope für UEA-1 aufweist. Maßstab: 100 µm.

In diesem Abschnitt erfolgt eine detaillierte Analyse von vier weiteren, zuvor erwähnten Beobachtungen. Ein Vorteil spezifischer Lektinmarker besteht zudem in der gleichzeitigen Darstellung verschiedener weiterer Strukturen.

Unter Abbildung 18A sind zwei auffällige, rote Strukturen erkennbar, die an den Rändern eine intensive Bindung mit dem Lektinmarker UEA-1 aufweisen. Diese Strukturen sind in Abbildung 18A* rot hervorgehoben. Sie befinden sich zwischen der Adenohypophyse und der Neurohypophyse, deren Trennung in Abbildung 18A* durch eine gelbe, gestrichelte Linie verdeutlicht ist. Bei diesen Strukturen handelt es sich um Rathke-Zysten, die an den Rändern von einer Epithelschicht umgeben sind. Diese Schicht ist spezifisch mit dem Lektinmarker UEA-1 gefärbt, zeigt jedoch keine Bindung mit den Lektinmarkern Con A und PNA, wie in den Abbildungen 15 und 16 ersichtlich ist.

Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung ist die sogenannte basophile Invasion der Neurohypophyse, sichtbar in den Abbildungen 18A und 18A* (dunkelgrün markiert). Im Vergleich dazu sind die regulären Azini der Adenohypophyse in hellgrün hervorgehoben. Diese Zellansammlungen befinden sich innerhalb der Neurohypophyse, wobei die gelbe, gestrichelte Linie als Trennung zwischen der linksseitigen Adenohypophyse und der rechtsseitigen Neurohypophyse dient. Die Zellen der basophilen Invasion sind ACTH-positiv und zeigen ebenfalls eine positive Färbung mit dem Lektinmarker UEA-1. Somit markiert UEA-1 sowohl die basophilen Invasionszellen als auch jene, die sich später in der Neurohypophyse ansiedeln.

In Abbildung 18B* ist zudem ein Gefäß innerhalb eines Azinus hervorgehoben. Die hormonpositiven Zellen, die UEA-1-Signale aufweisen, sind durch denselben Lektinmarker markiert wie die Endothelzellen des Gefäßes. Die unterschiedliche Farbgebung ergibt sich aus der variierenden Konzentration des Lektinmarkers UEA-1, was den Kontrast zwischen den Hormonzellen und dem Gefäß in

Abbildung 18B verdeutlicht. In diesem Kontext dient UEA-1 auch als Marker für intraazinäre Gefäße.

Des Weiteren fällt in Abbildung 18B auf, dass innerhalb der Gefäße Erythrozyten gefärbt sind. Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls in Abbildung 12A unter Verwendung des Lektinmarkers UEA-1 bestätigen. UEA-1 ist als Marker für Erythrozyten bekannt und in der Literatur beschrieben (Khan, Khan et al. 2002).

4.5 Gewebeklämung am Beispiel der Hypophyse

Die Herstellung von Gewebetransparenz zur nachfolgenden Färbung stellt eine zentrale Methode dar, um präzise Aussagen über die räumlichen Beziehungen anatomischer Strukturen zeit- und ressourcenschonend zu ermöglichen. Im vorliegenden Kontext wird diese Methode zur Analyse der Hypophyse eingesetzt, um die dreidimensionale Erfassung von Hormonazini in Relation zu benachbarten Strukturen, wie Blutgefäßen oder Zysten, zu optimieren und gleichzeitig Serienschnittartefakte zu minimieren.

Dieses Kapitel befasst sich erstmalig mit der Gewebeklämung der humanen Adenohypophyse unter Einsatz der PACT-Methode. Ziel ist es, Kollokalisationsmuster zwischen ACTH-positiven Arealen und lektinpositiven Bereichen valide über das gesamte Organ hinweg darzustellen.

4.5.1 Gewebeklämung der humanen Adenohypophyse

Abbildung 19 zeigt den Verlauf der Gewebeklämung der humanen Hypophyse nach der PACT-Methode in regelmäßigen Zeitabständen. Am Tag 0 ist die sagittal dargestellte Probe nach der Fixierung in HMS, Polymerisation und als Scheibe geschnitten abgebildet. Anschließend werden die Lipide aus den verschiedenen Zellmembranen mittels SDS entfernt.

Der Klärungs- und Färbungsprozess der humanen Hypophyse über einen Zeitraum von 14 Tagen ist in Abbildung 19 dokumentiert. Unter der Abbildung 19 befindet sich eine Bilderreihe, die den Verlauf des Klärungsprozesses veranschaulicht. Die Proben sind dabei auf Millimeterpapier fotografiert, um Größe und Klärungsgrad zu beurteilen. Im zeitlichen Verlauf ist eine leichte

Größenzunahme der Probe festzustellen, mit einem maximalen Peak nach Abschluss des Klärungsverfahrens und der Überführung in Glycerol.

In Abbildung 19 ist zudem eine schnelle Klärung der Neurohypophyse im oberen Bereich der Probe bereits nach zwei Tagen erkennbar. Die fortgesetzte Klärung scheint jedoch der Neurohypophyse zu schaden, da das Gewebe rissig wird und Anzeichen des Auseinanderfallens zeigt. Für die Adenohypophyse hingegen reichen vier Tage Klärung nicht aus, um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen. Daher wurde das Protokoll bis Tag 7 fortgeführt. Erst an diesem Tag ist am Randbereich der Probe eine deutliche Durchsicht der Kästchen des Millimeterpapiers sichtbar.

Nach der Überführung in Glycerol kann das endgültige Ergebnis begutachtet werden. Hierbei ist das Muster des Millimeterpapiers klar durch die geklärte Probe erkennbar. Lediglich im Randbereich treten aufgrund optischer Brechungen Unterbrechungen im Netzmuster auf. Zusätzlich fällt eine leichte rot- bis braunfarbene Färbung im zentralen Bereich der Probe auf. In der geklärten und in Glycerol eingelagerten Probe zeigt sich zudem eine gelb- bis braunfarbene Färbung in einigen Bereichen der Adenohypophyse.

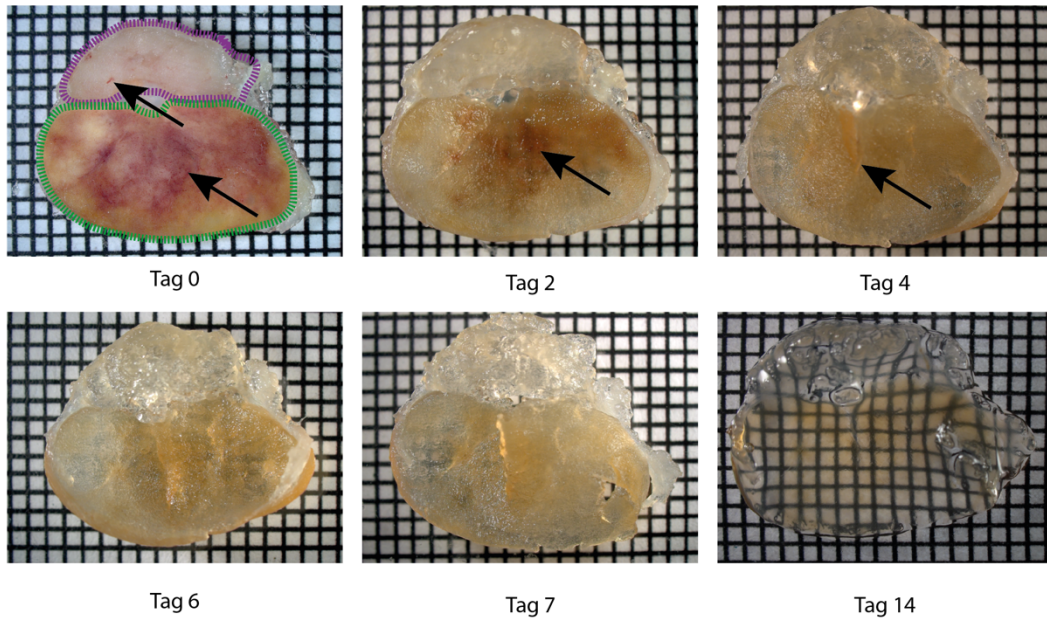


Abbildung 19: Klärungsverfahren der Hypophyse in einer Bilderserie

Neurohypophyse bei Tag 0 in lila markiert. Adenohypophyse grün umrandet. Der Maßstab der Abbildungen beträgt: Ein Kästchen des Millimeterpapiers entspricht 1 mm^2 .

4.5.2 Immunhistochemie der geklärten Adenohypophyse und Etablierung des Lektinmarkers UEA-1

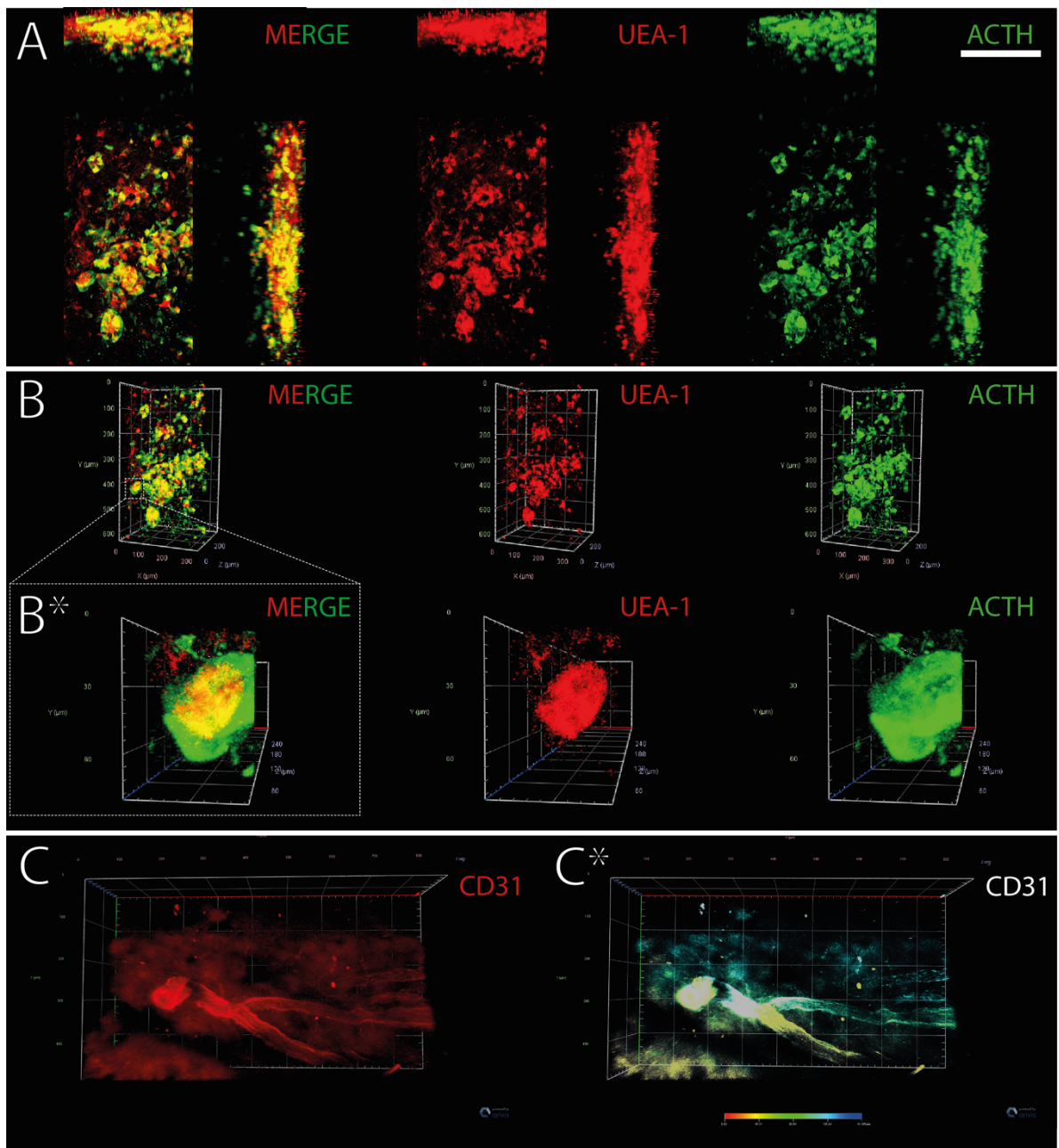


Abbildung 20: Immunfluoreszenzaufnahmen der geklärten Adenohypophyse

A: Die Abbildung zeigt die erfassten Signale des UEA-1-Markers sowie des Antikörpers gegen ACTH. Die Darstellung umfasst Aufnahmen entlang der X-Y- und Z-Achse, um die Schichtdicke der Probe zu verdeutlichen. Im MERGE-Bild ist die Überlagerung beider Signale klar erkennbar. Maßstabbalken unter A: 200 µm, Kästchen unter B/B*: 50 µm², Kästchen unter C/C*: 100 µm².

B: Diese Abbildung präsentiert eine vergrößerte sowie räumlich optimierte Darstellung der Aufnahme aus A, um die Verteilung der Signale präziser zu visualisieren. Maßstab: 200 µm.

B: Exemplarisch wird eine Detailansicht ausgewählter Zellen gezeigt, in der die nahezu vollständige Überlappung der Signale des Lektinmarkers UEA-1 mit denen von ACTH erkennbar ist. Maßstab: 50 µm.*

C: Dargestellt ist ein Gefäß innerhalb der Adenohypophyse nach erfolgter Gewebeklämung. Maßstab: 100 µm.

C: Die Detailansicht des in C gezeigten Gefäßes wird durch eine Tiefenskalierung ergänzt. Verschiedene Farben verdeutlichen die jeweilige Tiefe des Modells. Maßstab: 100 µm.*

Abbildung 20 zeigt die Immunofluoreszenz- und Lektinfärbung der geklärten humanen Adenohypophyse. In Abbildung 20A sind die Kanäle UEA-1 und ACTH in einer dreidimensionalen Darstellung visualisiert. Diese Abbildung zeigt eine etwa 400 µm dicke, geklärte Adenohypophysenscheibe, die gefärbt präsentiert wird. Deutlich erkennbar ist, dass ACTH-positive Areale gleichzeitig UEA-1-positiv sind, was auf eine Korrelation dieser Bereiche auch in der geklärten Adenohypophyse hinweist.

Abbildung 20B zeigt denselben Gewebeabschnitt in einer 3D-Darstellung. In Abbildung 20B* ist ein ausgewählter Bereich stark vergrößert dargestellt, um eine qualitative Beurteilung zu ermöglichen. Diese Abbildungen verdeutlichen, dass die UEA-1-positiven Lektinmarker-Bereiche ebenfalls ACTH-positiv erscheinen. Diese Korrelation im dreidimensionalen Raum entspricht den zuvor beschriebenen Kollokalisationsmustern in dünnen Paraffinschnitten.

Zur besseren Veranschaulichung der räumlichen Struktur und des Nutzens des geklärten Gewebes wurde in Abbildung 20C ein Gefäß innerhalb der geklärten Adenohypophyse mit dem Endothelmarker CD31 gefärbt. Die räumliche Darstellung zeigt die Verzweigung des Gefäßes in einem Volumen von 200 x 900 x 500 µm. In Abbildung 20C* verdeutlichen unterschiedliche Farbmarkierungen die Gewebetiefe: Blau- bis Grüntöne repräsentieren tieferliegende Strukturen, während Rot Farbtöne oberflächennahe Bereiche kennzeichnen.

Dieser Teilversuch zeigt erstmals, dass die modifizierte Klärungsmethode nach Neckel et al. erfolgreich auf die humane Hypophyse übertragen werden kann (Neckel, Mattheus et al. 2016).

4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Gewebeklä rung

1. Die Gewebeklä rung mittels der PACT-Methode konnte erfolgreich auf die Hypophyse angewendet werden.
2. Die dreidimensionale Anatomie der Hypophyse wurde bereits an geklä rtem humanem Gewebe unter Verwendung von Immunfluoreszenz dargestellt.
3. Der Lektinmarker UEA-1 konnte am geklä rten Gewebe der humanen Adenohypophyse etabliert werden.
4. Eine Kolokalisation von ACTH-positiven Zellen und UEA-1-positiven Zellen ist ebenfalls im geklä rten Gewebe der humanen Adenohypophyse nachweisbar.

4.6 Lektine in der Entwicklung der Adenohypophyse

Unter der Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen den Glykanstrukturen der Adenohypophyse und der Hormonexpression besteht, ist es unerlä sslich, diese Hypothese im Kontext der Drü senentwicklung zu analysieren. Dabei ist eine dynamische Betrachtung der markerpositiven Areale zu verschiedenen Zeitpunkten von zentraler Bedeutung, um potenzielle Unterschiede im Verlauf der Reifung zu identifizieren.

4.6.1 Protokolletablierung der ADENOide

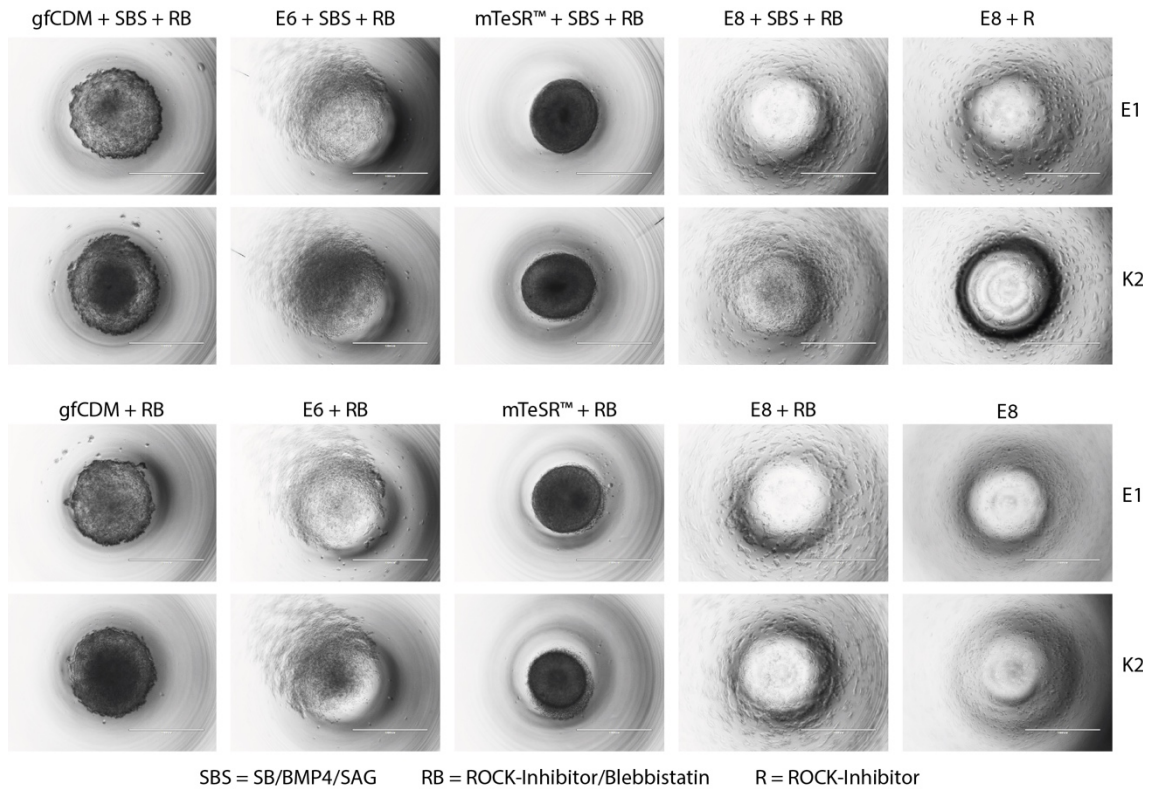


Abbildung 21: EB-Formation Vergleiche

Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der Bildung der EB-Formation. Abgebildet sind die jeweiligen Ausgangsbedingungen der hergestellten EB-Formationen unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Faktoren. Die dargestellten Reihen unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Zellstammreihen E1 und K2. Der Maßstab beträgt 1000 μm .

In diesem Experiment wurden die Bedingungen für die Bildung embryoidaler Körper (EB) optimiert und eingehend untersucht. Dabei erfolgte sowohl ein Vergleich zwischen den Zelllinien E1 und K2 als auch zwischen verschiedenen EB-Formationsmedien und deren Zusätzen. Die detaillierte Versuchsreihe ist in Abbildung 21 dargestellt.

Es zeigt sich, dass die Startbedingungen für die EB-Formation mit den Medien E6 und E8 ungeeignet sind, da die Zellen keine Aggregation bilden, sondern vereinzelt und verstreut am Boden der Vertiefung absterben. Im Gegensatz dazu ermöglichen sowohl die Medien gfCDM als auch mTeSR™ die EB-Formation, sowohl in Kombination mit SB/BMP4/SAG als auch ohne diese Faktoren, wenn lediglich ROCK-Inhibitor und Blebbistatin hinzugefügt werden.

Unter identischen Aufnahmebedingungen (gleiches Objektiv, identische Filter und Belichtungszeiten) lassen sich Unterschiede zwischen den EBs feststellen, die in den Grundmedien gfCDM und mTeSR™ kultiviert wurden. Im Vergleich dazu erscheinen die EBs, die in mTeSR™ gebildet wurden, kleiner und dunkler.

4.6.2 Con A-positive Signale in den ADENoiden im Verlauf

Eine bestimmte Anzahl von ADENoiden, die unter dem Lichtmikroskop als geeignet bewertet wurden (siehe Abbildung 31), wurde zu festgelegten Zeitpunkten entnommen und fixiert. Dies diente der späteren Färbung mit dem etablierten Hormonmarker ACTH, um hormonpositive Areale sichtbar zu machen. Es zeigte sich, dass die ADENOide ab etwa Tag 60 erste ACTH-positive Bereiche aufweisen, weshalb Proben für dieses Experiment jeweils an den Tagen 61, 72 und 120 entnommen wurden.

In den folgenden Aufnahmen wird durch die Kernfärbung mit DAPI (blau) die mehrreihige Anordnung der Zellkerne in der Epithelstruktur sowie der weniger dicht besiedelte mesenchymale Anteil der Organoide deutlich dargestellt. Die Epithelschicht repräsentiert hierbei die Zellen der Adenohypophyse und übernimmt im Organoidmodell deren Funktionen, einschließlich der Produktion des Hormons ACTH nach Spaltung und Modifizierung von POMC.

Im zeitlichen Vergleich zeigen sich ACTH-positive Bereiche, grün markiert und als Vesikelstrukturen dargestellt, vereinzelt im Epithel. In den 120 Tage alten ADENoiden (Abbildung 24) ist der Marker jedoch über den gesamten Epithelbereich positiv sichtbar. In den beiden jüngeren Organoiden (Abbildungen 22 und 23) lässt sich gut erkennen, dass die ACTH-Produktion in der frühen Entwicklung von den basalen Epithelzellen ausgeht. Im weiteren Verlauf erfolgt die Hormonproduktion auch in apikal gelegenen Epithelzellen (Abbildung 24).

Die Färbung mit dem Lektin-Konjugat Con A zeigt, ähnlich wie die ACTH-positiven Bereiche, eine Verteilung entlang der Epithelstruktur der ADENoiden. In den beiden jüngeren Proben ist dabei eine maximale Anreicherung im Bereich des apikalen Epithelareals erkennbar (Abbildungen 22 und 23).

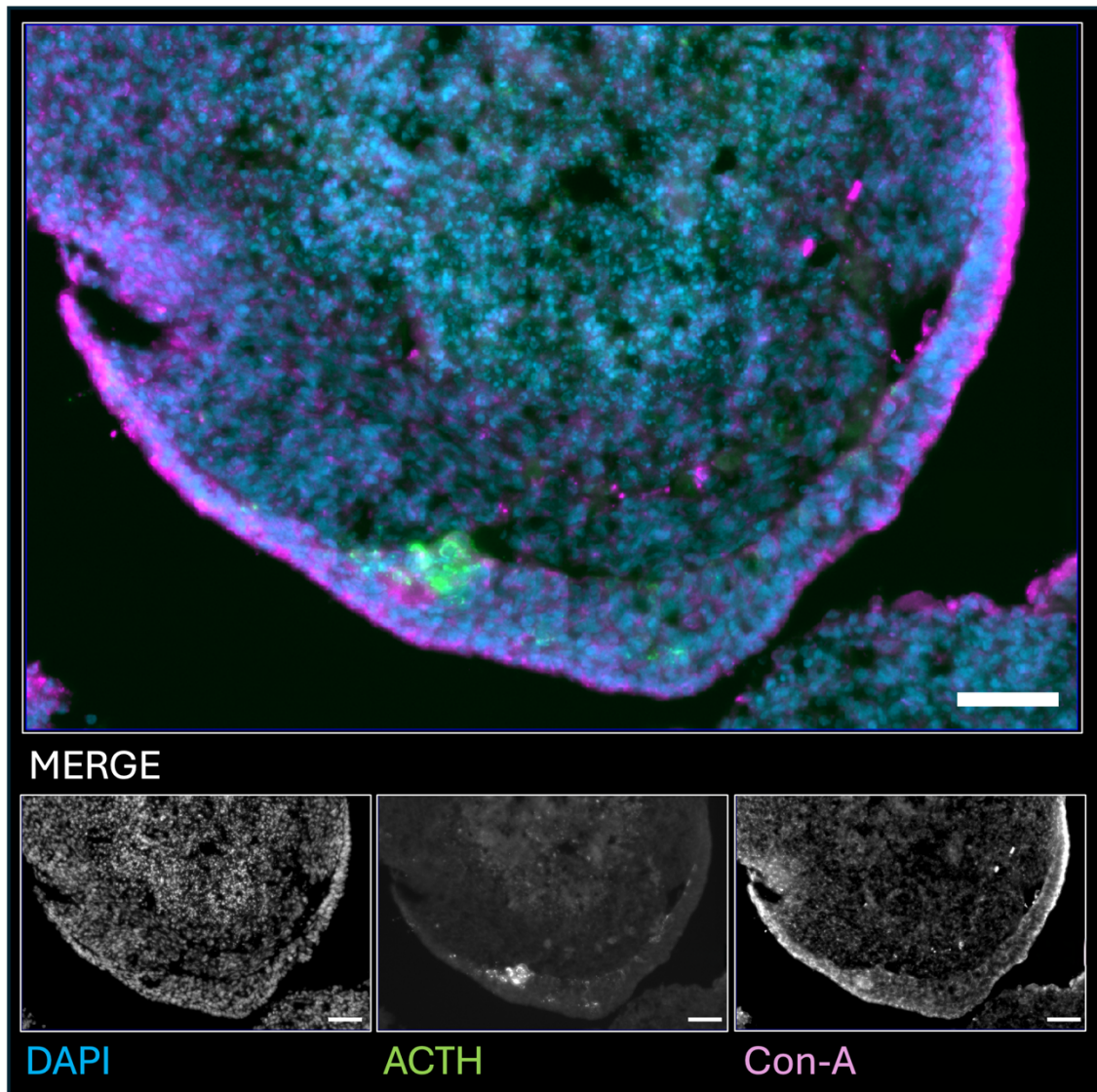


Abbildung 22: ADENoid d61 ACTH x Con A

Immunfluoreszenzfärbung der 61 Tage alten ADENoide mit ACTH Antikörper (grün) und Con A Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 μ m

In den zuvor beschriebenen Organoiden zeigt sich eine homogene Verteilung der Con-A-Konjugat-positiven Areale über den gesamten Bereich, der der Adenohypophyse entspricht. Gleichzeitig treten vereinzelte Regionen mit ACTH-positiven Zonen auf.

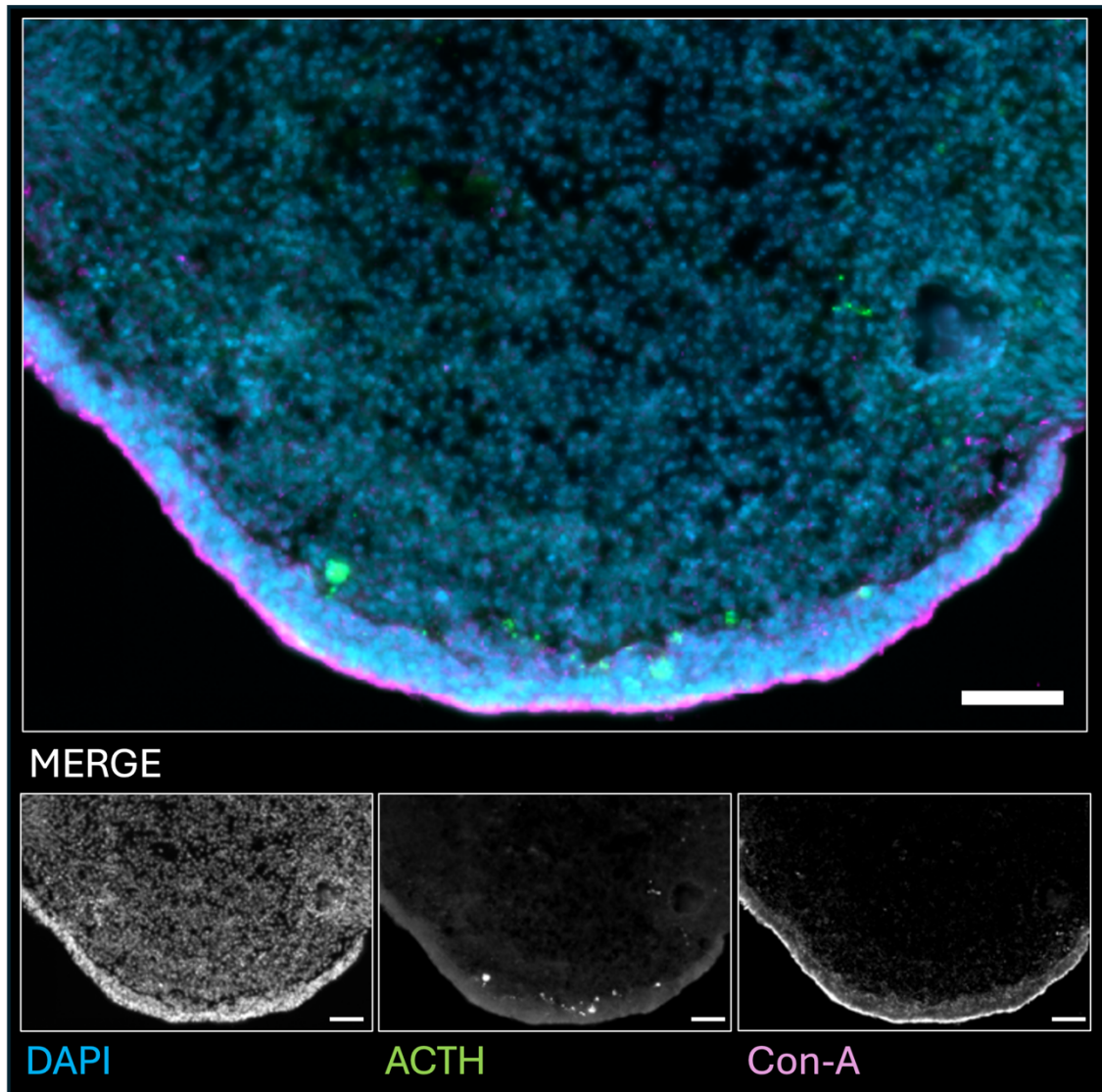


Abbildung 23: ADENoid d 72 ACTH x Con A

Immunfluoreszenzfärbung der 72 Tage alten ADENoide mit ACTH Antikörper (grün) und Con A Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 μm

In den weiter entwickelten ADENoiden mit einem Alter von 120 Tagen ist eine homogene Verteilung von ACTH-positiven Arealen im Epithelbereich erkennbar (Abbildung 24). Im Gegensatz zu den zwei jüngeren Organoiden konzentrieren sich die hormonpositiven Zonen nicht mehr ausschließlich auf den basalen Epithelbereich, sondern umfassen auch apikale Regionen. Zeitgleich zeigt sich in diesem Bereich eine homogene Färbung mit dem Con-A-Konjugat, das sowohl im apikalen als auch im basalen Epithelbereich eine deutliche Konzentration aufweist. Diese Areale lassen sich als lineare Strukturen abgrenzen. Abbildung

24 veranschaulicht deutlich die Färbung dieser beiden Bereiche durch Con A, wobei die dazwischen liegenden Abschnitte eine geringere Dichte an Bindestrukturen für dieses Lektin aufweisen.

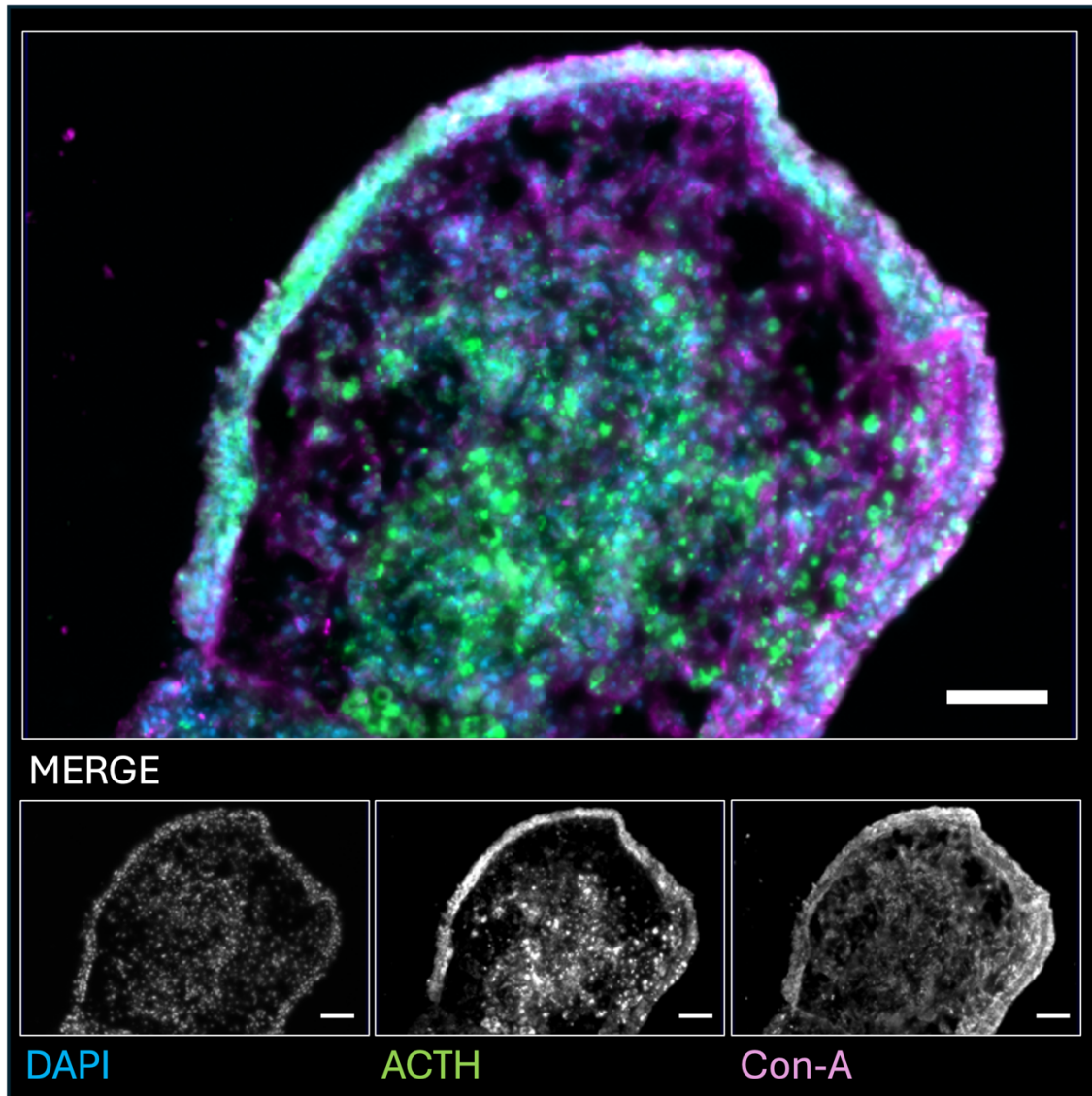


Abbildung 24: ADENoid d120 ACTH x Con A

Immunfluoreszenzfärbung der 120 Tage alten ADENoide mit ACTH Antikörper (grün) und Con A Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 µm

4.6.3 UEA-1-positive Signale in den ADENoiden im Verlauf

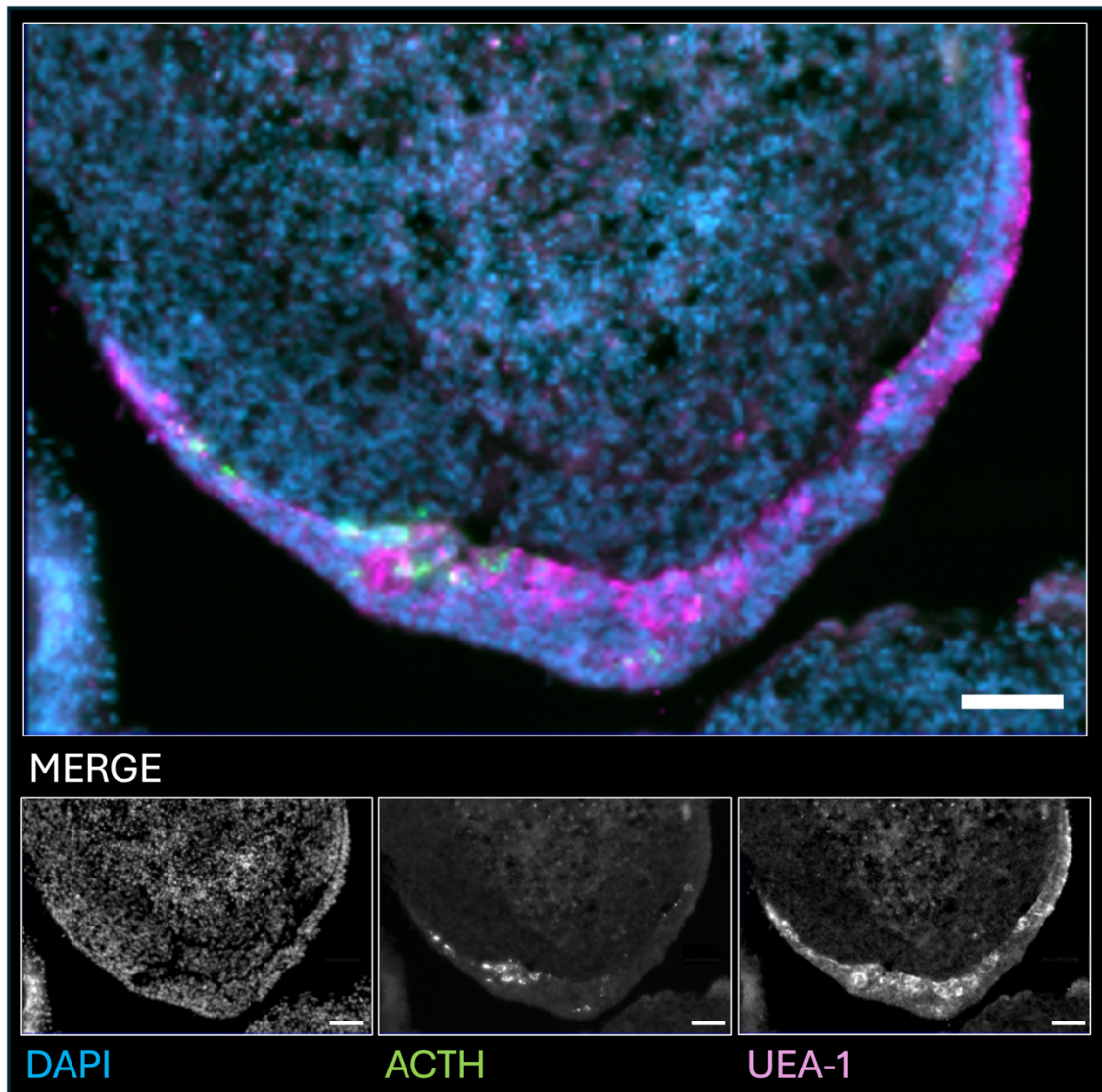


Abbildung 25: ADENoid d 61 ACTH x UEA-1

Immunfluoreszenzfärbung der 61 Tage alten ADENoide mit ACTH Antikörper (grün) und UEA-1 Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 μ m

In Anlehnung an Abschnitt 4.6.2 wurden weitere Schnitte derselben fixierten ADENoide dieses Mal mit dem Lektin-Konjugat UEA-1 gefärbt. Die Darstellung der ACTH-positiven Areale zeigt eine ähnliche Verteilung wie in den Abbildungen 22 bis 24 des vorherigen Abschnitts. Im Gegensatz zu den Con-A-positiven Bereichen weist die UEA-1-Färbung keine linienförmige Anordnung auf, sondern zeigt eine multiple, klar abgrenzbare Anreicherung über das gesamte Epithel hinweg.

Bei den beiden jüngeren ADENoiden (Abbildungen 25 und 26) sind vermehrt UEA-1-positive Areale festzustellen, während gleichzeitig weniger ACTH-positive Bereiche im Vergleich sichtbar sind. Auffällig ist zudem, dass das Umfeld der ACTH-positiven Zellen ebenfalls eine positive Färbereaktion mit dem Lektin-Konjugat UEA-1 aufweist.

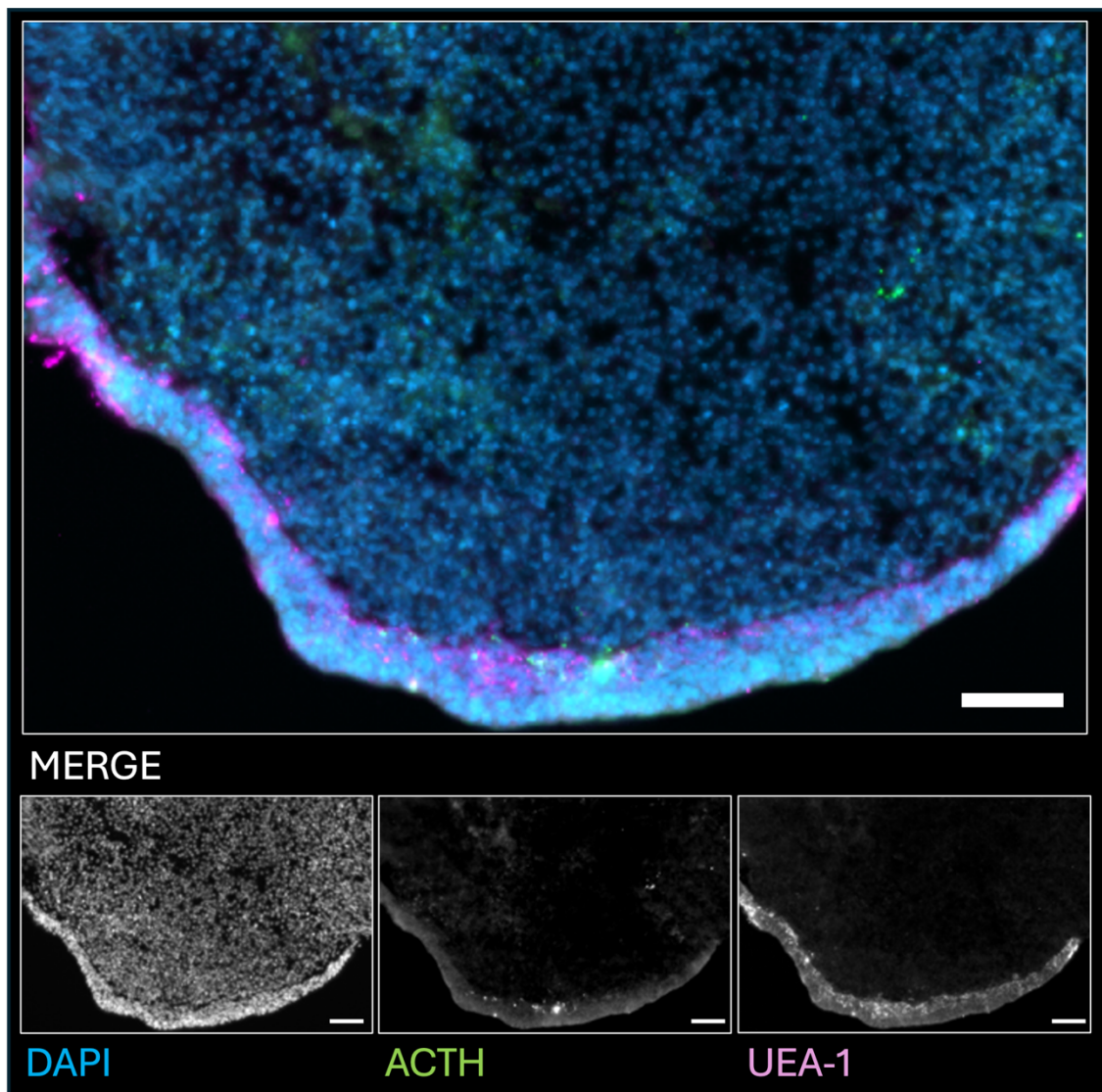


Abbildung 26: ADENoid d72 ACTH x UEA-1

Immunfluoreszenzfärbung der 72 Tage alten ADENOide mit ACTH Antikörper (grün) und UEA-1 Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 µm

In Abbildung 27, die das 120 Tage alte ADENoid zeigt, ist erkennbar, dass sich sowohl die UEA-1-positiven als auch die ACTH-positiven Bereiche gleichmäßig

über das gesamte Epithel erstrecken. Auffällig ist, dass die Verteilung dieser Bereiche teilweise exakt übereinstimmt. In der zusammengesetzten "MERGE"-Aufnahme derselben Abbildung erscheint das Epithel stellenweise weiß, was auf eine Überlagerung der Signale von ACTH und UEA-1 hinweist. Dies legt nahe, dass identische Bereiche des Epithels sowohl ACTH-positiv sind als auch Epitope für die Bindung von UEA-1 bereitstellen.

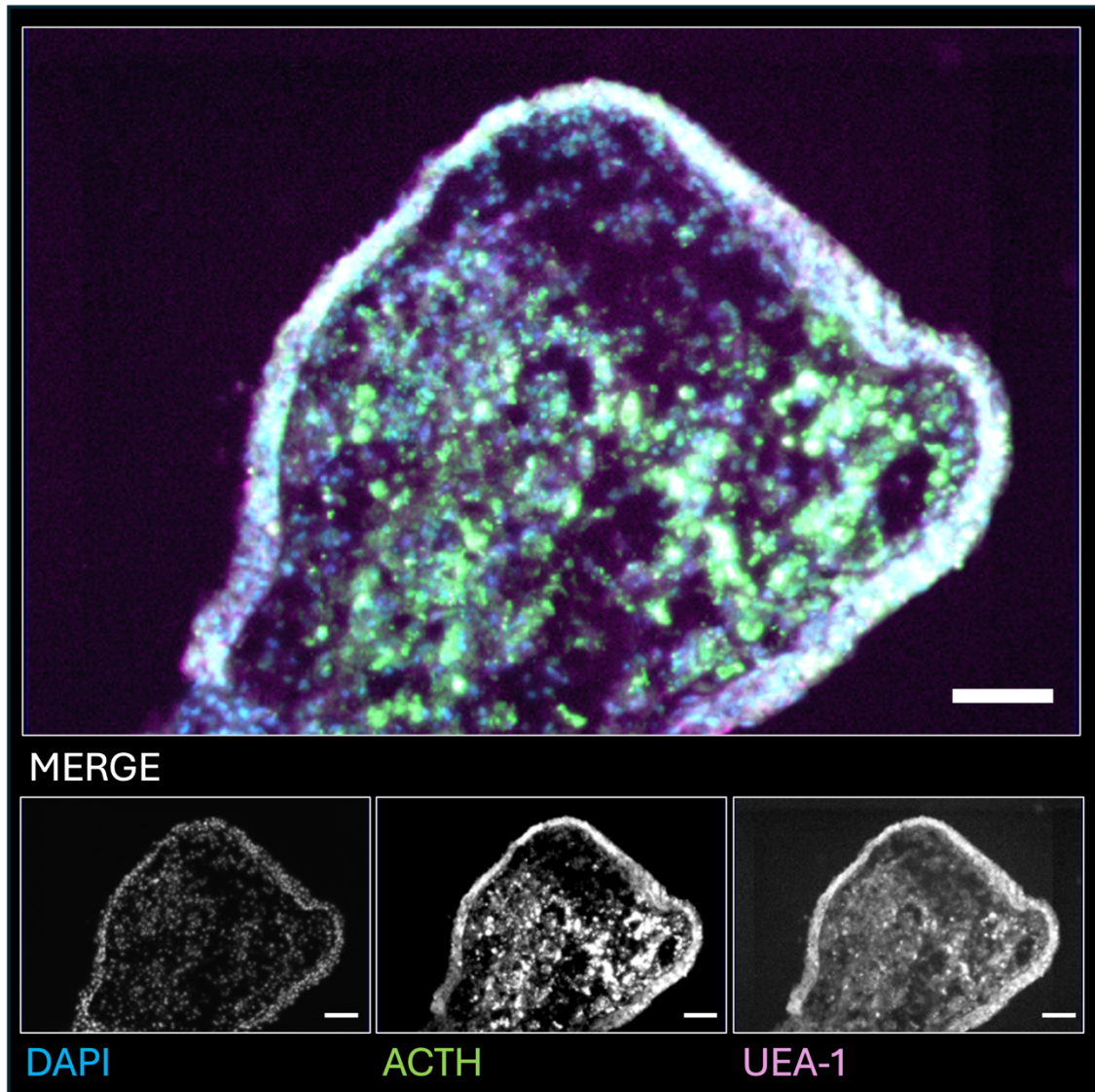


Abbildung 27: ADENoid d120 ACTH x UEA-1

Immunfluoreszenzfärbung der 120 Tage alten ADENoide mit ACTH Antikörper (grün) und UEA-1 Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 μ m

4.6.4 PNA-positive Signale in den ADENoiden im Verlauf

Ebenso wie in den vorangegangenen Abschnitten wurden auch für die folgende Analyse mit dem Lektin-Konjugat PNA unterschiedliche Schnitte desselben ADENoids verwendet. Die Verteilung der ACTH-positiven Areale in den Abbildungen 28 bis 30 zeigt Ähnlichkeiten zu den Darstellungen in den Abbildungen 22 bis 27 der vorherigen Abschnitte.

In den 61 Tage alten Organoiden (Abbildung 28) treten PNA-positive Bereiche sowohl im basalen Epithelbereich als auch vereinzelt an den apikalen Enden auf. Im Bereich der basalseitigen Epithelzellen ist ein nicht durchgängig lineares Signal des Lektin-Konjugats erkennbar. Darüber hinaus finden sich punktförmige Signalmuster im Epithel, die ebenfalls in nicht-epithelialen Arealen des Organoids sichtbar sind. Auffällig ist, dass ACTH-positive Bereiche im Epithel vorhanden sind, jedoch keine genaue Übereinstimmung mit den PNA-positiven Arealen zeigen.

Bei den 72 Tage alten ADENoiden (Abbildung 29) weisen die PNA-positiven Areale eine dichte Signalverteilung in der basalen Epithelzellschicht auf. Die punktförmigen, positiven Signale erscheinen homogen verteilt und sind im Durchmesser kleiner als die UEA-1-gefärbten Bereiche (vgl. Abbildung 26). Auch im Vergleich zu dieser Abbildung wirkt die Verteilung homogener. Eine exakte Überlappung von ACTH- und PNA-positiven Bereichen ist jedoch nicht festzustellen.

Abbildung 30 zeigt eine ähnliche Verteilung der ACTH-positiven Zellen. Für das Lektin-Konjugat PNA lassen sich positive Signale in bestimmten Unterabschnitten der basalen Epithelschicht nachweisen. Im Gegensatz zur homogen verteilten ACTH-Positivität erstrecken sich diese Signale jedoch nicht über das gesamte Epithel. Stattdessen konzentrieren sich die PNA-positiven Bereiche auf den Kern des Organoids, der den mesenchymalen Anteil repräsentiert. Eine Fokussierung auf die epithelialen Abschnitte und den adenohipophysären Anteil des ADENoids, wie sie bei den anderen Lektinbeispielen beobachtet wurde, ist hier nicht zu erkennen.

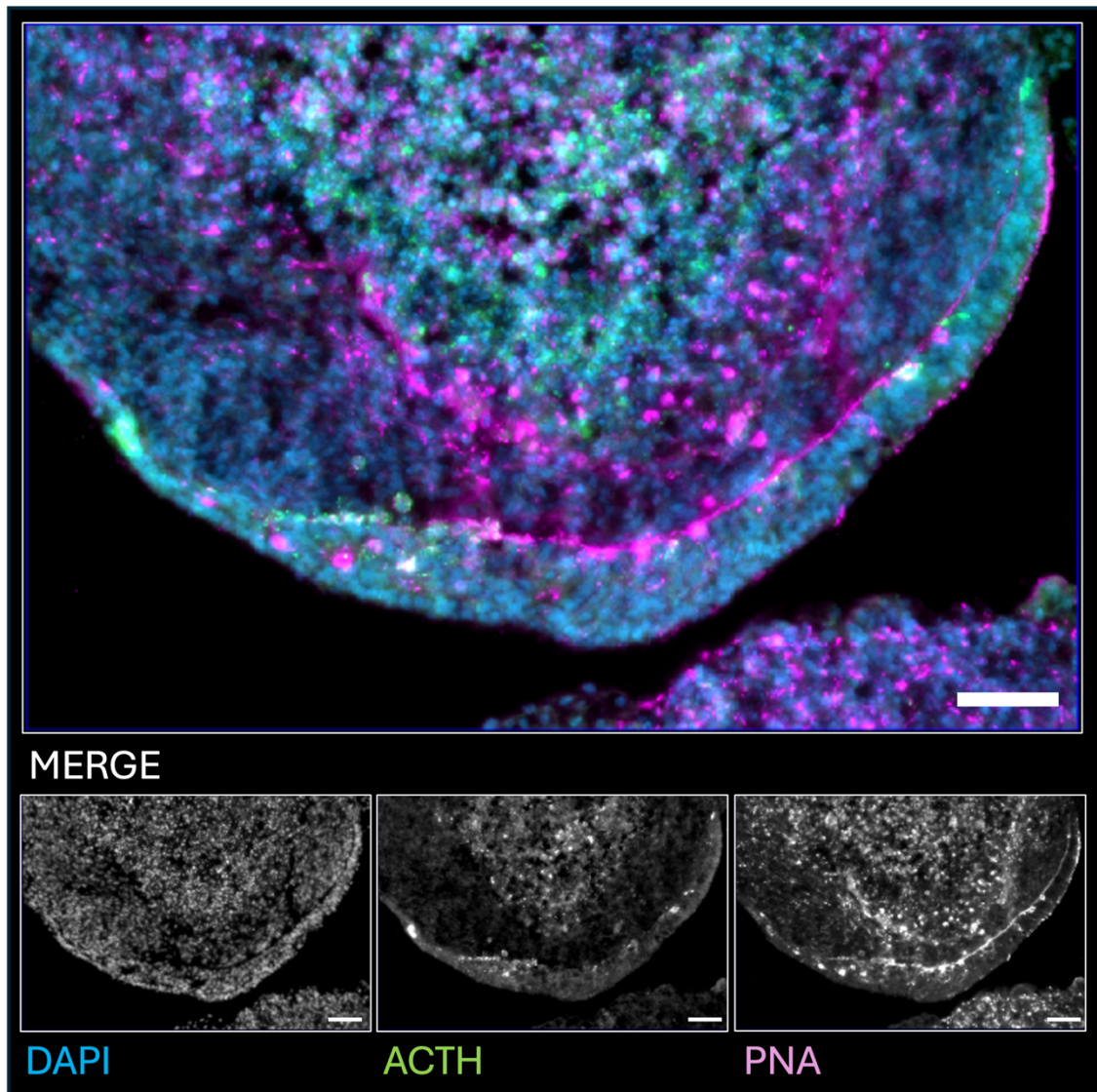


Abbildung 28: ADENoid d61 ACTH x PNA

Immunfluoreszenzfärbung der 61 Tage alten ADENOide mit ACTH Antikörper (grün) und PNA Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 μ m

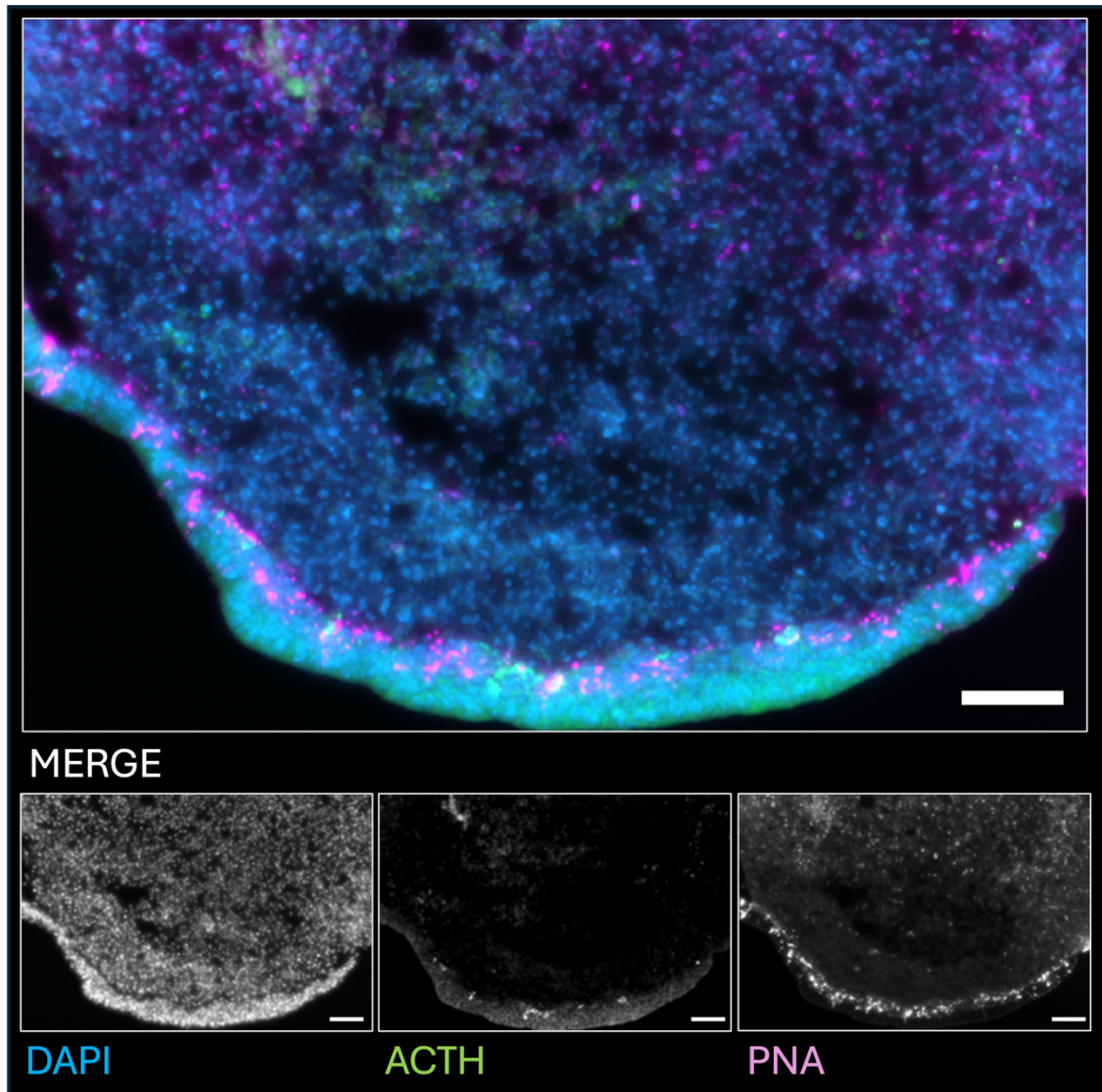


Abbildung 29: ADENoid d72 ACTH x PNA

Immunfluoreszenzfärbung der 72 Tage alten ADENOide mit ACTH Antikörper (grün) und PNA Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 μ m

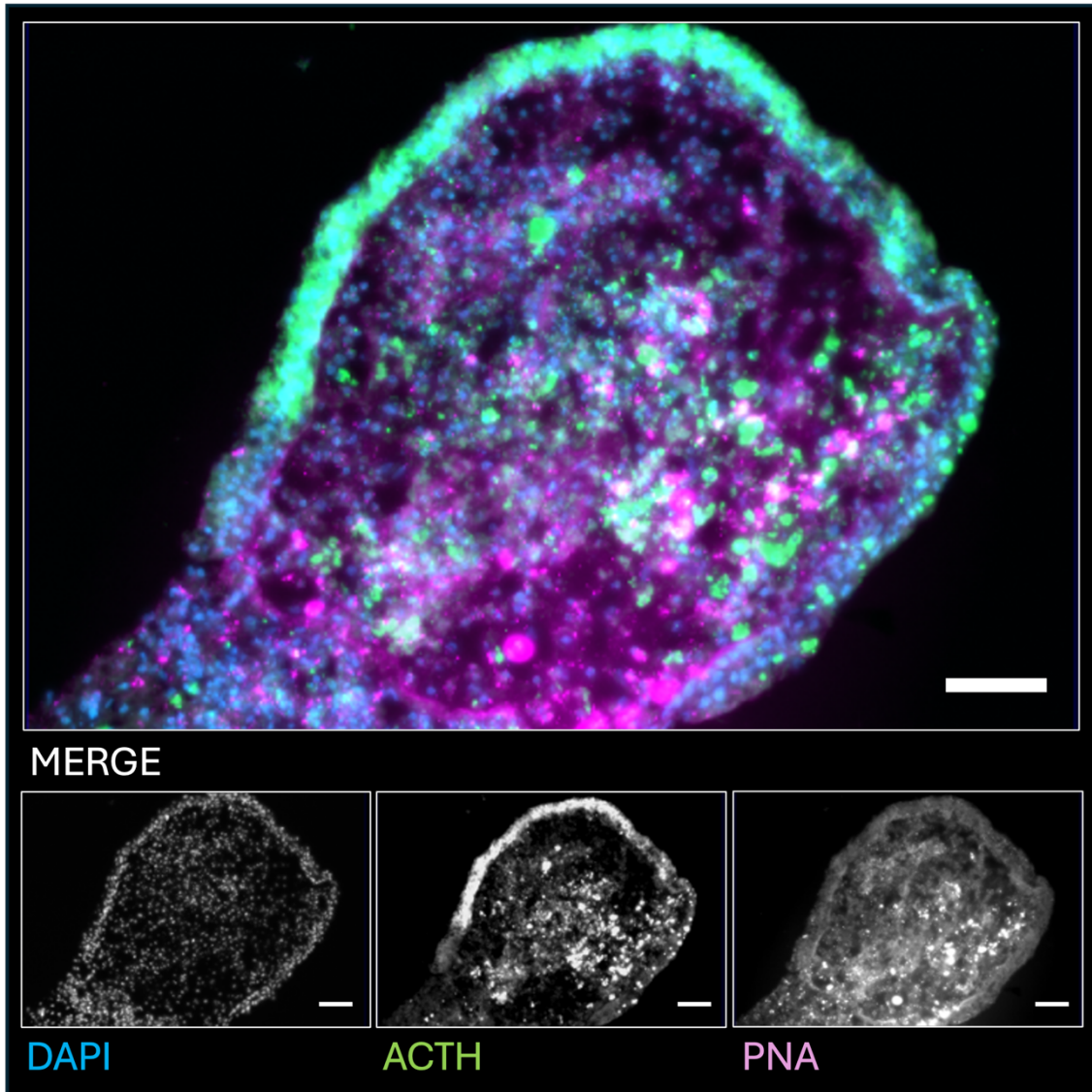


Abbildung 30: ADENoid d 120 ACTH x PNA

Immunfluoreszenzfärbung der 120 Tage alten ADENOide mit ACTH Antikörper (grün) und PNA Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab 50 μ m

4.6.5 Prozessoptimierung mittels Durchlichtmikroskopie

Vor der Fixierung der Organoidsysteme wurde jeweils eine Aufnahme mittels Lichtmikroskopie erstellt, um im Auswertungsprozess Merkmale zu etablieren, die eine Vorsortierung der ADENOide von Nicht-ADENOiden ermöglichen. Abbildung 31A zeigt eine prozessierte Immunfluoreszenzaufnahme eines Organoidschnitts, gefärbt mit dem Antikörper ACTH (grün) und dem

Lektinkonjugat Con A (pink). Die Zellkerne sind durch DAPI-Färbung in Blau sichtbar.

In Abbildung 31B ist das noch vitale Organoid im Kulturmedium unter Verwendung der Lichtmikroskopie dargestellt. Hierbei zeigt sich der weniger lichtdurchlässige Zellkern in Schwarz, umgeben von einem aufgelockerten, weniger dichten Bereich und einem klar abgrenzbaren äußeren Randareal. Letzteres, exemplarisch durch eine gestrichelte Linie markiert, repräsentiert das mehrschichtige Epithel, welches dem Modell der Adenohypophyse entspricht. Der darunterliegende, weniger dichte Bereich stellt mesenchymale Anteile des Organoids dar.

Der in Abbildung 31A durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnete Bereich korreliert mit dem markierten Areal in Abbildung 31B. Innerhalb dieses Bereichs sind das Epithel und die ACTH-positiven Regionen deutlich erkennbar.

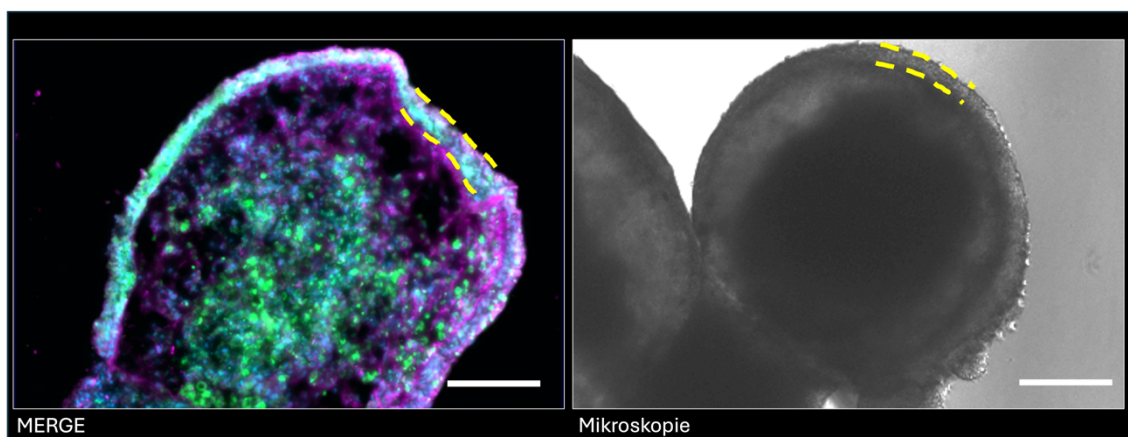


Abbildung 31: ADENoid d120 Immunfluoreszenz vs. Durchlichtmikroskopie

A Immunfluoreszenzfärbung der 120 Tage alten ADENoide mit ACTH Antikörper (grün) und Con A Konjugat (pink). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. B Durchlichtmikroskopie desselben ADednoids vor der Fixierung. In beiden Abbildungen ist das Epithel exemplarisch mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Maßstab 50 μm

4.6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der ADENoide

Zusammenfassend lassen sich für die letzten vier Abschnitte folgende prägnante Aussagen formulieren:

1. Die Konzentration der ACTH-positiven Areale nimmt mit zunehmendem Alter der Organoide zu.
2. Das Lektin-Konjugat Con A bindet an apikale Strukturen des Epithels der Organoide. In weiter entwickelten Organoiden sind zusätzlich basale Anteile des Epithels betroffen.
3. Das Lektin-Konjugat UEA-1 markiert positive Epitope im Bereich des Organoid-Epithels, die homogen verteilt sind. Die größte Übereinstimmung zeigt sich mit Arealen, die sowohl ACTH- als auch UEA-1-positiv sind. In 120 Tage gereiften ADENoiden wird diese Übereinstimmung durch das Auslöschen gegenseitiger Signale und die bildliche Darstellung in Weiß besonders deutlich.
4. Das Lektin-Konjugat PNA erhöht die Signalintensität sowohl im epithelialen als auch im nicht-epithelialen Bereich, wobei die Signalstärke im epithelialen Bereich dominiert. Mit fortschreitender Entwicklung nimmt jedoch die Spezifität für das Epithel ab.
5. Die Identifikation von ADENoiden sowie die Abgrenzung zu nicht-ADENoiden ist bei vitalen Organoiden mittels Lichtmikroskopie möglich.

5 Diskussion

5.1 Erfolge

5.1.1 *Glykanstrukturen statt Hormone suchen?*

Die hormonproduzierenden Zellen der Adenohypophyse sind, analog zu anderen Körperzellen, für andere Zellen, insbesondere Immunzellen, anhand der Glykanstruktur auf ihrer Zelloberfläche identifizierbar (Lin, Schmidt et al. 2025). In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die spezifische Glykosylierung an der Zellmembran gelegt, um zu demonstrieren, dass Subgruppen hormonproduzierender Zellen identische Glykanstrukturen aufweisen. Dies ermöglicht ihre spezifische Identifikation und den Nachweis mittels Lektinmarkern (Brooks 2023).

5.1.2 *Lektinmarker – PNA*

Ein Vergleich der konventionellen Immunfluoreszenz unter Verwendung des PNA-Lektinmarkers mit hormonpositiven Arealen offenbart interessante Übereinstimmungen mit GH- und ACTH-positiven Hormonzellen. Die Analyse von GH und PNA verdeutlicht eine moderate Übereinstimmung, die sich über verschiedene Bereiche der Adenohypophyse erstreckt, wie exemplarisch in Abbildung 10B dargestellt.

Im Gegensatz dazu zeigt sich eine signifikante Überlappung zwischen ACTH-positiven Arealen der Adenohypophyse und gleichzeitig PNA-positiven Bereichen, was in Abbildung 12A verdeutlicht wird. Eine detaillierte Betrachtung dieser Übereinstimmung, wie in Abbildung 14A* illustriert, zeigt, dass ACTH-positive Zellbereiche nicht vollständig mit den PNA-positiven Arealen übereinstimmen. Vielmehr markiert der PNA-Marker spezifische Teilareale der ACTH-Antikörper-positiven Regionen.

Diese Beobachtung wird durch Abbildung 15 weiter untermauert, die den Lektinmarker PNA und den ACTH-Antikörper in einem sagittalen Ganzorganschnitt zeigt. Hierbei fällt auf, dass ACTH-positive Areale zwar im gesamten Organ verteilt sind, jedoch nicht immer mit den PNA-positiven Bereichen übereinstimmen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Glykanstruktur innerhalb der Zelle sowie an der Zellmembran reich an Gal- β (1,3)-GalNAc-Verbindungen ist (Erber, Asbahr et al. 1992, Chacko and Appukuttan 2001). Diese Strukturen sind jedoch nicht homogen, wie ACTH selbst verteilt, sondern weisen einen Gradienten auf, der in den Detailaufnahmen sichtbar wird und eine bevorzugte Lektinmarkeraufnahme im unteren Zellbereich demonstriert.

Zusammenfassend konnte erfolgreich gezeigt werden, dass PNA-Lektinmarker eine akzeptable Alternative zur Identifikation von Teilarealen ACTH-positiver Zellen darstellen.

5.1.3 Lektinmarker – UEA-1

Bei der Analyse der Kolo-kalisation des Lektinmarkers UEA-1 mit den Hormonen der Adenohypophyse treten insbesondere die Hormonareale für GH und ACTH hervor. Abbildung 10B zeigt eine geringfügige Kolo-kalisation zwischen UEA-1-positiven und antikörperpositiven GH-Arealen, was darauf hindeutet, dass diese Zellen nur geringe Mengen an α -L-Fucose in ihrer Glykanstruktur aufweisen (Baldus, Thiele et al. 1996, Audette, Vandonselaar et al. 2000). Hervorzuheben ist die signifikante Übereinstimmung von ACTH-positiven Arealen mit UEA-1-positiven Bereichen der Adenohypophyse (Behncken 1991).

Abbildung 17 verdeutlicht, dass die positiven Bereiche sowohl für den Antikörper als auch für den Lektinmarker homogen über die Adenohypophyse verteilt sind. Auffällig ist das Vorkommen von UEA-1-positiven Regionen im Übergangsbereich von der Adenohypophyse zur Neurohypophyse, ein Aspekt, der im weiteren Verlauf der Arbeit detailliert behandelt wird (Fan, Olson et al. 2001).

Eine detailliertere Betrachtung mittels Immunfluoreszenz wird in Abbildung 12A präsentiert. Qualitativ zeigt sich, dass alle ACTH-positiven Areale ebenfalls für den Lektinmarker UEA-1 positiv sind. In der MERGE-Darstellung erscheinen bestimmte Zellen gelblich bis weißlich gefärbt, was auf eine Überlagerung zweier Kanalsignale hinweist. Zur Quantifizierung dieser Kolo-kalisation erfolgte eine quantitative Kolo-kalisationsanalyse (Abbildung 13). Die Paneele unter Abbildung 13 B liefern deutliche Hinweise auf Kolo-kalisationen zwischen UEA-1- und

ACTH-Arealen, da die Messpunkte entlang einer positiven Diagonale verlaufen. Die berechneten Werte, ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,84175 und ein Manders-Koeffizient von 0,88781, deuten auf einen hohen Grad an räumlicher Überlappung dieser Bereiche hin.

Daraus lässt sich ableiten, dass ACTH-haltige Zellbestandteile mit einer Glykanstruktur modifiziert sind, die α -L-Fucose enthält (Listinsky, Siegal et al. 1998). Dies scheint hochspezifisch für Zellareale zu sein, die ACTH produzieren oder prozessieren. Folglich stellt der Lektinmarker UEA-1 eine geeignete Alternative zur indirekten Identifikation von ACTH-positiven Zellen der Adenohypophyse dar, sowohl qualitativ als auch quantitativ mit überzeugenden Ergebnissen. Dies untermauert die eingangs formulierte Hypothese, dass ACTH-positiv Zellen mit dem Lektinmarker UEA-1 nachgewiesen werden können.

5.1.4 Lektinmarker – Con A

Beim dritten verwendeten Lektinmarker Con A zeigen sich ähnliche Überlappungen mit den ACTH-positiven Arealen wie beim Lektinmarker UEA-1. Abbildung 12B verdeutlicht jedoch, dass auch mäßig TSH-positiv Bereiche vom Lektinmarker Con A positiv markiert werden. Im qualitativen Vergleich fällt auf, dass im Vergleich zu Abbildung 12A, in der der Vergleich von ACTH mit Con A dargestellt ist, weniger TSH-positiv Bereiche ebenfalls Con A-positiv sind. Dies deutet darauf hin, dass Zellen, die das Hormon TSH produzieren, in ihrer Glykanstruktur α -D-Mannose enthalten (Orth and Nicholson 1977).

Weitaus vielversprechender erscheint die Übereinstimmung der Con A-positiven Areale mit den ACTH-positiven Bereichen, wie in der Übersichtsaufnahme in Abbildung 15 deutlich zu erkennen ist. Eine detaillierte Analyse in Abbildung 13A zeigt, dass die qualitative Übereinstimmung vergleichbar ist mit der zwischen dem Lektinmarker UEA-1 und dem Hormonantikörper ACTH. Daher erweist sich eine quantitative Kolkalisationsanalyse als zielführend. In der Kombination ACTH \times Con A ergibt sich ein Pearson-Wert von 0,84847 sowie ein Manders-Koeffizient von 0,9748. Diese Ergebnisse belegen eine eindeutige, hohe Korrelation und somit eine starke räumliche Überlappung der ACTH- und Con A-positiven Areale. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Zellbestandteile, die das

Hormon ACTH enthalten, in ihrer Glykanstruktur α -D-Mannose aufweisen (Eipper, Mains et al. 1976).

Die Ergebnisse dieses Abschnitts ermöglichen eine ebenso fundierte Schlussfolgerung hinsichtlich der Eignung des Con A Lektinmarkers zur indirekten Identifikation von ACTH-positiven Arealen der Adenohypophyse.

5.1.5 Vergleich der Lektinimmunfluoreszenz mit der PAS-Orange G

Färbung

In dieser Arbeit wurde erstmals ein Protokoll etabliert, das die kombinierte Anwendung von Immunfluoreszenz mit Lektinmarkern und Antikörpern sowie einer anschließenden PAS-Orange G Färbung am gleichen Gewebstück der Hypophyse ermöglicht. Obwohl bereits andere Ansätze zur Kombination von Immunfluoreszenz und klassischer Histologie beschrieben wurden, konnte dieses Verfahren in der vorliegenden Studie erstmals spezifisch für die Adenohypophyse demonstriert werden (Poletti, Giacon et al. 1992, Morrison, Lefever et al. 2022). Wie in Abbildung 9 ersichtlich, erfolgt ein Vergleich der Aufnahmen beider Verfahren, wobei derselbe Organabschnitt dargestellt wird. Die charakteristische basophile, acidophile und chromophobe Ausprägung der Zellen ist sowohl in der genannten Abbildung als auch in Abbildung 8C erkennbar (Fowler and McKeel 1979). Zellen, die nicht oder nur geringfügig PAS-positiv sind und folglich einen geringen Gehalt an Glykoproteinen aufweisen, erscheinen in gelblichen bis orangefarbenen Tönen (Poletti, Giacon et al. 1992). Zellen mit einem hohen Anteil an Kohlenhydraten werden in violetten bis blauen Farbtönen dargestellt (Cerri and Sasso-Cerri 2003). Durch die angewandte Methode kann bestätigt werden, dass die PAS-positiven basophilen Zellen in der klassischen Histologie auch in der Immunfluoreszenz mittels der hier eingesetzten Lektinmarker Con A und UEA-1 positive Signale aufweisen (Halmi and Duello 1976). Dies verdeutlicht, dass die ACTH-positiven Zellen glykolisiert sind und durch den Einsatz von UEA-1 sowie Con A nachgewiesen werden können.

Diese neu erfolgreich etablierte Methode an der humanen Hypophyse bietet einen verbesserten didaktischen Vorteil, da sie die gleichzeitige Darstellung der PAS-Orange-G-Färbung sowie deren Überlappungen mit Lektinmarkern und

antikörperpositiven Bereichen ermöglicht. Durch die Kombination morphologischer und molekularer Informationen wird die diagnostische Präzision in der Basisforschung bedeutsam erhöht (Lin, Chen et al. 2023).

5.1.6 Weiteren Strukturen, die mittels Lektinmarkern dargestellt werden

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, ermöglicht der Lektinmarker UEA-1 die Darstellung weiterer Strukturen der Hypophyse. Im Abschnitt B unter der Abbildung 11 ist ein Gefäßabschnitt deutlich zu erkennen, der von hormonpositiven Zellen umgeben ist. Die Visualisierung der Gefäße, genauer gesagt der L-Fucose-Glykokonjugate auf der Zelloberfläche der Endothelzellen, lässt sich mit dem Lektinmarker UEA-1 effizient realisieren (Debbage, Sölder et al. 2001, Hamid, Daly et al. 2003).

In den Abbildungen 17 und 18A lassen sich zystische Strukturen mithilfe des UEA-1-Markers darstellen. Ähnliche Strukturen sind zudem in Abbildung 16 unter Verwendung des Lektinmarkers PNA sichtbar. Diese Strukturen befinden sich zwischen der Adeno- und Neurohypophyse und entsprechen Kolloidzysten bzw. Rathkespaltzysten (Coy, Du et al. 2016, Hacıoglu, Tekiner et al. 2025). In der klassischen PAS-Orange-G-Färbung, dargestellt in Abbildung 8D, sind sie hervorgehoben und beispielhaft markiert.

Der Vergleich von Abbildung 16 und 17 zeigt, dass PNA ausschließlich die Randgebiete dieser Zysten markiert, wohingegen UEA-1 auch flächig über die Zysten hinweg bindet. Daraus lässt sich schließen, dass die Zielglykanstrukturen in den Inhalten der Rathkezysten spezifisch ausgeprägt sind und mittels der Lektinmarker identifizierbar bleiben.

In der Immunfluoreszenz, dargestellt in Abbildung 11A, fällt auf, dass der Lektinmarker lediglich am Rand der Zystenstruktur angereichert ist und nicht im zentralen Bereich. Parallel dazu sind in diesen Randgebieten auch DAPI-positive Strukturen sichtbar. Daraus lässt sich ableiten, dass UEA-1 ebenfalls die kubischen Epithelzellen färbt, die den Rand der Zyste abgrenzen (Hacıoglu, Tekiner et al. 2025).

5.1.7 Etablierung von Klärungsverfahren auf das Beispiel der Hypophyse mit Nutzung der Lektinen

In dieser Arbeit wurde erstmals die erfolgreiche Anwendung der Gewebeklä rung mittels PACT an der humanen Hypophyse demonstriert. Bei der Methodenauswahl für die Gewebeklä rung existieren verschiedene Ansätze, jedoch erwies sich die gewählte Methode als vorteilhaft (Neckel, Mattheus et al. 2016). Sie erfordert keinen komplexen Geräteaufbau zur Elektrophorese, da der Klärungsprozess vollständig passiv verläuft (Yu, Qi et al. 2017). Dies führt zwar zu einer verlängerten Verfahrensdauer, gestaltet den Prozess jedoch ressourcenschonender und reduziert potenzielle Fehlerquellen (Jensen and Berg 2017, Woo, Lee et al. 2018).

Außerhalb dieser Arbeit konnte am Beispiel des Darms gezeigt werden, dass die Gewebeklä rungszeit bei CLARITY und PACT vergleichbar ist. Zudem treten Schrumpfar tefakte im Gewebe bei der Anwendung von PACT in geringerem Maße auf, was die Wahl dieser Methode bestärkt (Neckel, Mattheus et al. 2016).

Zur Kompensation des zeitlichen Nachteils bei PACT erwies sich die Wahl der Klärungstemperatur als eine geeignete Variable. Sie ermöglicht eine effiziente und möglichst rasche Lipid-Auswaschung, wodurch der zeitliche Nachteil letztlich ausgeglichen werden kann (Chen, Leshkowitz et al. 2020).

Die in Abbildung 19 dargestellte Fotoserie illustriert die exzellente Klärung der humanen Hypophyse innerhalb eines Zeitraums von zwei Wochen. Im abschließenden Bild ist die karierte Unterlage deutlich erkennbar, was den Erfolg der Klärung des Organs eindrucksvoll belegt.

Abbildung 20 A und B präsentiert die positiven Areale des ACTH-Antikörpers sowie des Lektinmarkers UEA-1. Sowohl eine separate als auch eine kombinierte Färbung mit beiden Markern konnte am geklä rten Gewebe der humanen Adenohypophyse erfolgreich dargestellt werden. Die Detailaufnahme in Abbildung 20 B* verdeutlicht die Überlappung von UEA-1-positiven Zellen, die ebenfalls ACTH-positiv sind, und bestätigt die Kolokalisation beider Marker.

Zur Veranschaulichung einer verbesserten räumlichen Darstellung der Adenohypophyse wurde in Abbildung 20 C ein Gefäß mittels des Endothelmarkers CD31 angefärbt (Feng, Nagy et al. 2004). Das Bild zeigt ein Gefäß mit einer Bifurkation und verdeutlicht die ausgezeichnete Klärung der humanen Adenohypophyse durch den Einsatz von PACT.

5.1.8 Nutzung von Lektinen an Organoidsystem wie die der ADENOide

Für die Etablierung von Lektinmarkern als Entwicklungsmarker des Epithels der Adenohypophyse ist ein geeignetes Zellmodell erforderlich. Die Implementierung des ADENoid-Modells nach Ozaki, das zur Differenzierung und Reifung von Organoidsystemen dient und die Funktion der Adenohypophyse nachbildet, konnte in mehreren Versuchen erfolgreich bestätigt und weiter modifiziert werden (Ozaki, Suga et al. 2021). In diesem Zusammenhang traten vergleichbare positive Ergebnisse wie beim Originalprotokoll auf.

Der Versuch, dargestellt in Abbildung 21, zeigt, dass die Verwendung von gfCDM in Kombination mit ROCK und Blebbistatin die effektivste EB-Formation einen Tag nach Beginn der Differenzierung ermöglicht. In diesem Setting bilden die Zellen eine kohärente Struktur, die jedoch nicht die dichte Aggregation aufweist, wie sie bei der Verwendung von mTeSR™ als Basismedium beobachtet wird. Gleichzeitig bleibt der Zellkontakt erhalten, ohne dass die Zellen im Medium verstreut vorliegen, wie es bei den anderen getesteten Medienkombinationen der Fall ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zusammensetzung von gfCDM eine entscheidende Rolle bei der EB-Bildung spielt (Wiles and Johansson 1999). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass gfCDM frei von exogenen Wachstumsfaktoren ist und somit eine kontrollierte sowie reproduzierbare Differenzierung in die drei Keimblätter ohne externe Differenzierungsstimuli ermöglicht (Yasuda, Ikeda et al. 2018, Li and Belmonte 2019, Sekine, Ogawa et al. 2020).

In dem vorliegenden Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die simultane Anwendung von SB, BMP4 und SAG am Tag 0 der Differenzierung mikroskopisch betrachtet keinen Einfluss auf die EB-Formation der Organoide ausübt. Folglich ist es möglich, die Differenzierung unmittelbar am selben Tag zu

initiieren, ohne einen zusätzlichen Mediumwechsel am Folgetag einzuplanen. Diese Vorgehensweise optimiert den Arbeitsablauf zu Beginn der Differenzierung und trägt zu einem effizienteren sowie ressourcenschonenderen Protokoll bei.

Des Weiteren wurde im Rahmen der Modifikation auf eine hyperoxische Kultivierung verzichtet. Die Organoide wurden in den ersten 18 Tagen unter Bedingungen von 5 % CO₂ und 5 % O₂ kultiviert, analog zu den zuvor kultivierten hiPSZ. Ab dem 18. Tag erfolgte die Überführung von jeweils vier bis sechs Organoiden in einzelne Wells einer 6-Well-Platte, wobei die Kultivierung fortan unter 20 % O₂ stattfand. Im Gegensatz dazu verwendet das ursprüngliche Protokoll 40 % O₂, was zwar eine verbesserte Sauerstoffversorgung der zentralen Zellbereiche gewährleistet, jedoch auch mit einem erhöhten oxidativen Stress verbunden ist (Farzaneh, Abbasalizadeh et al. 2020). Es ist von zentraler Bedeutung, kritisch zu untersuchen, bei welchem Sauerstoffgehalt eine optimale Zellversorgung gewährleistet werden kann, ohne dabei oxidativen Stress zu induzieren (Tse, Gardner et al. 2021, Wörsdörfer and Ergün 2021).

Im Rahmen der mikroskopischen Analyse und Selektion der ADENoide sollte besonderes Augenmerk auf die ausgebildete Epithelstruktur gelegt werden, wie in Abbildung 24 veranschaulicht (Suga, Kadoshima et al. 2011). Die Epithelstruktur manifestiert sich äußerlich in Form eines deutlich erkennbaren "Reifenmantels" und ist bereits durch einfache Lichtmikroskopie sichtbar. Es empfiehlt sich, diese ausgereiften Organoide gezielt weiter zu kultivieren, während nicht-adäquate Organoide, die keine klar definierte Reifenmantelgrenze aufweisen, ausgesondert werden sollten, um potenzielle Fehlerquellen wie Fehldifferenzierungen zu minimieren (Suga, Kadoshima et al. 2011).

Auch bei der Auswahl von ADENoiden für Fixierungs- und Färbeverfahren kann diese Methode angewendet werden. Dies gewährleistet die Entnahme von möglichst reifen und epithelisierten Zellsystemen, wodurch die Qualität der weiteren Analysen verbessert wird.

Schließlich erfolgte hier die komplexe Etablierung eines bereits beschriebenen 3D-Organoidmodells der Adenohypophyse mittels induzierter pluripotenter Stammzellen von Grund auf. Um das Protokoll in den eigenen Räumlichkeiten zu

stabilisieren, wurden Modifikationen vorgenommen, die sich als relevant erwiesen, um eine möglichst hohe Anzahl von ADENoiden für die Diagnostik mit Lektinmarkern zu gewinnen.

5.1.9 Lektinmarker in der Entwicklung der Adenohypophyse

In den Abschnitten 4.6.2–4.6.3 werden die drei Lektinmarker Con A, PNA und UEA-1 hinsichtlich ihrer Kolokalisation mit dem Hormonmarker ACTH in ADENoiden im Alter von 61, 72 und 120 Tagen qualitativ untersucht.

Die Abbildungen der jeweiligen Zeitpunkte zeigen konsistente Muster in den ACTH-positiven Arealen. In den jüngeren ADENoiden (61 und 72 Tage) treten ACTH-positive Bereiche lokal begrenzt auf, während im 120 Tage alten Organoidsystem eine verstärkte ACTH-Bildung sowohl im Epithel als auch im Zentrum des Organoids beobachtet wird.

Bei der Untersuchung von Con A in den drei Entwicklungsstadien der Organoiden (Abbildungen 22–24) zeigt sich, dass Con A-positive Areale vorwiegend das Epithel betreffen, insbesondere den apikalen Bereich. Im reifsten Organoid sind jedoch auch gelegentlich darunterliegende epitheliale Bereiche Con A-positiv. Dies deutet darauf hin, dass die Glykanstrukturen, die in der adulten humanen Adenohypophyse mit ACTH-positiven Bereichen kolokalisieren, hier hauptsächlich auf den apikalen Bereich des Epithels und vereinzelte andere Areale konzentriert sind. Auffällig ist, dass nur Epithelschichten, die ACTH-positiv sind, gleichzeitig auch Con A-positiv sind.

Für den Lektinmarker UEA-1 zeigt sich, dass bereits in den 61 und 72 Tage alten Organoiden vermehrt UEA-1-positive Areale auftreten. Es besteht eine teilweise Übereinstimmung mit ACTH-positiven Arealen, wobei nicht alle UEA-1-positiven Areale auch ACTH-positiv sind, jedoch umgekehrt alle ACTH-positiven Areale auch UEA-1-positiv erscheinen. Dies wird besonders in Abbildung 27 deutlich, wo MERGE-Aufnahmen gelb-weiße Areale im Epithelbereich zeigen, was die Überlappung der Signale von UEA-1 und ACTH und somit deren Kolokalisation belegt. Es scheint, dass UEA-1 bereits in frühen Organoidstadien Zellen markiert, die später ACTH produzieren.

Beim Lektinmarker PNA fällt auf, dass in den frühen Entwicklungsstadien PNA-positive Areale an der basalen Epithelmembran lokalisiert sind. ACTH-positive Areale sind ebenfalls PNA-positiv, jedoch nicht umgekehrt. Ähnlich wie bei UEA-1 deuten diese Befunde darauf hin, dass die markierten Epithelareale Glykanstrukturen aufweisen, die auch in der adulten Hypophyse mit ACTH-positiven Zellglykanen assoziiert sind. Im 120 Tage alten Organoid zeigt sich jedoch eine abnehmende Überlappung von ACTH- und PNA-positiven Bereichen, was mit Befunden aus der adulten humanen Adenohypophyse übereinstimmt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Glykanstrukturen der adulten humanen Adenohypophyse bereits im Verlauf der Entwicklung Modifikationen unterliegen, die sich im Verlauf der Reifung ändern. Die Lektinmarker UEA-1 und Con A erweisen sich in diesem Zusammenhang als effektive diagnostische Werkzeuge zur Markierung von ACTH-positiven Zellen beziehungsweise deren Vorstufen im Organoidsystem. Folglich können diese Lektinmarker als frühe Indikatoren der hormonellen Reifung der Adenohypophyse genutzt werden.

5.2 Schlüsse

5.2.1 Con-A Lektinmarker als Surrogatmarker für ACTH positive Zellen

Unter den drei hier untersuchten Lektinmarkern erwies sich Con-A als der am besten geeignete Marker zur Identifikation ACTH-positiver Bereiche, ohne dabei gleichzeitig nicht betroffene Strukturen anzufärben. UEA-1 zeigte ebenfalls eine ähnlich gute Kolo-kalisation, jedoch führte die Nutzung dieses Markers zu einer gleichzeitigen positiven Färbung weiterer Strukturen wie Gefäße und Kolloidzysten (Behncken 1991, Debbage, Sölder et al. 2001). Diese können zwar morphologisch von den Hormonazini unterschieden werden, jedoch ist für eine gezielte Markierung ACTH-positiver Areale der Einsatz von Con-A-Lektinmarkern besonders geeignet.

Die gleichzeitige Robustheit und Reproduzierbarkeit des Con-A-Markers trägt zudem zu einer ressourcenschonenden sowie kosteneffizienten Identifikation ACTH-positiver Zellen in humanen Organen bei (Oinam, Hayashi et al. 2022).

5.2.2 Identifikation weiterer Strukturen mittels Lektinmarker

Zugleich besteht die Option, einige Marker wie UEA-1 mit magnetischen Partikeln zu koppeln, um eine gezielte Isolierung der Endothelzellen zu ermöglichen (Conrad-Lapostolle, Bordenave et al. 1996). Es gilt zu erörtern, ob ein Marker, der sowohl ACTH-positive Zellen als auch Gefäße markiert, für die Isolierung von Zellen geeignet ist (Behncken 1991, Hamid, Daly et al. 2003). In diesem Zusammenhang könnte ein spezifischerer Lektinmarker, wie beispielsweise Con-A, eine effizientere Zellisolation ermöglichen. Dennoch weist der UEA-1 den signifikanten Vorteil auf, dass er durch den Einsatz von Lektinmarkern sowohl hormonpositive Zellen als auch die Gefäßstruktur simultan visualisieren kann. Die Differenzierung zwischen angefärbten Endothelzellen und Zellazinus erfolgt phänotypisch charakteristisch und kann ohne großen Aufwand vorgenommen werden.

Darüber hinaus ermöglicht UEA-1 durch die Anfärbung von Kolloidzysten im Bereich zwischen Adenohypophyse und Neurohypophyse präzisere Aussagen über die Glykanstruktur dieser Zellen, welche bislang nicht ausreichend untersucht werden konnten.

5.2.3 3D-Anatomie der Adenohypophyse – neue Methode gelungen

Die Gewebeklärung an der humanen Adenohypophyse erweist sich als erfolgreich. Dieser Fortschritt markiert einen bedeutenden Meilenstein in der detaillierten Charakterisierung und Darstellung der Anatomie dieses Organs, sowohl für die Grundlagenforschung als auch für potenzielle therapeutische und operative Anwendungen. Durch die erstmalige Etablierung dieser Methode an der humanen Adenohypophyse ist es möglich, präzise und zeitnahe Aussagen über die strukturellen Verhältnisse der zellulären Anatomie innerhalb des Organs zu treffen. Ergänzend dazu konnte mittels eines Lektinmarkers nachgewiesen werden, dass die in 2D-Schnitten gewonnenen Ergebnisse auch auf die geklärte und transparente Adenohypophyse übertragbar sind.

5.2.4 Lektine als Entwicklungsmarker in ADENoiden

Nach der erfolgreichen Etablierung des Protokolls zur Erstellung eines 3D-Organoidsystems der Adenohypophyse wurde die Hypothese untersucht, ob die

Glykanstruktur des Epithels der Adenohypophyse während der Entwicklung Modifikationen unterliegt.

Mithilfe des Modells konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen im Verlauf ihrer Reifung Veränderungen in der Glykanstruktur erfahren, die durch den Einsatz von Lektinmarkern visualisiert und bewertet werden können.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Lektinmarker möglicherweise ACTH-positive Areale in einem früheren Entwicklungsstadium detektieren. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit den biochemischen Veränderungen, die während der Zellreifung auftreten. In diesem Kontext erweisen sich die Lektinmarker UEA-1 und Con-A als äußerst geeignete Marker zur Identifizierung von Entwicklungsstadien in der Frühphase der Herstellung von Adenohypophysen-Organoiden.

5.3 Limitationen

5.3.1 Limitationen der Lektinmarker als Diagnostika

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt, ermöglichen Lektinmarker differenzierte Aussagen zur Kolo-kalisation von lektin- und hormonpositiven Arealen. Der Einsatz von Lektinen bietet gegenüber Antikörpern einige Vorteile, ist jedoch auch mit spezifischen Limitationen verbunden. Während bei Antikörpern eine präzise Epitoperkennung beschrieben ist, ist aktuell lediglich bekannt, an welche Zuckerstrukturen Lektinmarker binden (Manning, Romero et al. 2017). Eine exakte Lokalisation dieser Zuckerverbindungen innerhalb der Zellstruktur kann hingegen nicht eindeutig bestimmt werden.

Obwohl bereits Daten vorliegen, die den Bedarf und die Lokalisation von Glykanstrukturen beschreiben, ist eine vertiefte Erforschung dieser spezifischen Verbindungen in der Adenohypophyse erforderlich (Pavlova, Pronina et al. 1968).

Für eine präzisere Analyse ist der Einsatz der Fluoreszenz-Kolo-kalisationsmikroskopie notwendig, um einzelne Zellstrukturen und Organellen gezielt zu färben und mit den lektinpositiven Arealen zu vergleichen (Zupančič, Kreft et al. 2023). Dadurch könnten sich Rückschlüsse ziehen, an

welchen Stellen das Lektin bindet und wo die entsprechenden Zuckerstrukturen in den Glykanen lokalisiert sind (McMahon and Kilcoyne 2022).

Um eine detailliertere und hochauflösendere Darstellung der Bindungsstellen zu ermöglichen, empfiehlt sich der Einsatz der Elektronenmikroskopie (Cohen Hyams, Mam et al. 2020). Hierbei wird das Lektin mit Peroxidase oder kolloidalem Gold gekoppelt, um die exakten Bindungsstellen sichtbar zu machen. (Wong, Winbanks et al. 2010, Akimoto, Takata et al. 2016). Zukünftig sollen diese beiden Methoden auf die Adenohypophyse sowie die ausgewählten Lektine angewendet werden, um präzisere Aussagen über die exakte Bindungsstelle treffen zu können.

Angesichts der Tatsache, dass Glykanketten an unterschiedlichen Membranstrukturen verankert sind und durch Modifikationen verschiedene Signalwege beeinflussen können, ist hier von einer spezifischen Signalverarbeitung auszugehen (Ohtsubo and Marth 2006, Furukawa, Ohkawa et al. 2012, Takahashi, Kizuka et al. 2016). Die Frage, weshalb manche Zellen sowohl ACTH- als auch PNA-Lektinmarker-positive Areale aufweisen, während in anderen Regionen lediglich der PNA-Lektinmarker positiv ist, stellt eine Limitation dieser Arbeit dar. Diese Thematik erfordert weiterführende, intensive Forschung in der Zukunft.

Es ist festzustellen, dass nicht alle hormonpositiven Zellen und Zellorganellen lektinbindend sind, was darauf hindeutet, dass die Modifikation mit dieser Zuckerstruktur nur in einer bestimmten Phase des Prozesses eine Rolle spielt. Ob die α -D-Mannose-Ketten während der Synthese, Modifikation oder Lagerung von ACTH an die Glykanstruktur angefügt werden, bleibt unbeantwortet und bedarf weiterer Untersuchungen.

Nichtsdestotrotz erweisen sich Lektinmarker als geeignete Surrogatmarker zur Identifikation von ACTH-positiven Bereichen. Dies gilt auch, wenn sie nicht direkt an die ACTH-Struktur binden, sondern an die Glykanstrukturen dieser Zellen.

5.3.2 Limitationen bei der Gewebeklärung

Die Limitation bei der Gewebeklärung besteht darin, eine homogene Klärung des Gewebes möglichst effizient zu erreichen, ohne dabei Gewebsdeformationen zu verursachen. Die Gewebsdicke stellt hierbei eine wesentliche Herausforderung dar, da sie die Penetrationszeit von Antikörpern und deren gleichmäßige Verteilung im gesamten Organ maßgeblich beeinflusst (Ryu, Kim et al. 2022, White, Lam et al. 2023). Darüber hinaus wirkt sich die Dicke des Gewebes erheblich auf die Aufnahme und Analyse aus, da Laserstrahlen die gesamte Schichtdicke durchdringen müssen. Konventionelle Mikroskopieverfahren, wie die Konfokalmikroskopie, stoßen dabei an ihre analytischen Grenzen (Tian, Yang et al. 2021, Vulders, van Hoogenhuizen et al. 2021).

Dennoch konnte durch die Etablierung der Gewebeklärung mittels PACT am Beispiel der humanen Adenohypophyse demonstriert werden, dass die Methode grundsätzlich wirksam ist. Es bedarf jedoch gezielter Modifikationen, um zukünftig die Klärung und Analyse des gesamten Organs in seiner Gesamtheit zu ermöglichen.

5.3.3 Grenzen der ADENOide

Die 3D-Organoidmodelle der Adenohypophyse (ADENOide) bieten eine vielversprechende Möglichkeit, aus induzierten pluripotenten Stammzellen Modelle zu entwickeln, die die Funktionen der Adenohypophyse nachbilden. Dennoch weisen diese Modelle häufig eine geringe Stabilität auf, wodurch eine hohe Durchlaufzahl erforderlich ist, um geeignete Modelle zu identifizieren und auszusondern, die die gewünschten Eigenschaften der Adenohypophyse darstellen.

Selbst wenn die ausgewählten Organoidmodelle stabil gehalten werden können, treten weitere nachteilige Faktoren auf. Hierzu gehört insbesondere die unvollständige Gewebsstruktur, wie das Fehlen von Gefäßen (Gao, Wang et al. 2025). Diese fehlenden Gefäßstrukturen beeinträchtigen nicht nur die 3D-Anatomie, sondern führen auch zu Nekrosen in den Kernbereichen der Organoidmodelle. Dies begrenzt nicht nur die Dauer der Wachstumsphase, sondern schafft zudem hypoxische Bedingungen (Revokatova, Bikmulina et al. 2025).

Inwiefern diese von in-vivo-Bedingungen abweichenden Faktoren zu Veränderungen der Hormonproduktion und damit auch der Glykanstruktur führen, kann abschließend nicht eindeutig beurteilt werden. Daher sollten Lektinmarker in diesem instabilen Modell nur unter kontinuierlicher Evaluation eingesetzt werden, um Messfehler zu minimieren.

Darüber hinaus fehlen systematische Input- und Regulationsmechanismen, die im menschlichen Körper durch Signale aus übergeordneten sowie untergeordneten Organen und Zielzellen gesteuert werden (Wörsdörfer, I et al. 2020, Iwasawa and Takebe 2021, Yip, Wang et al. 2023). Dies wirft letztlich die Frage auf, inwieweit die gewonnenen Daten auf den klinischen Alltag, insbesondere auf den menschlichen Körper, übertragbar sind.

5.4 Ausblick

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten die Ergebnisse der Arbeit präsentiert und erörtert wurden, richtet sich der Blick nun auf zukünftige Perspektiven. Im Folgenden werden die bereits konzipierten Aufbauideen für das Projekt detailliert skizziert.

5.4.1 Verwendung und Etablierung weiterer Lektinmarkern

Die in dieser Arbeit verwendeten Lektine wurden auf Grundlage einer umfassenden Literaturrecherche ausgewählt. Ziel war es, die in der im Jahr 1991 veröffentlichten Studie beschriebenen Methoden mithilfe neuer Verfahren erneut zu evaluieren. Gleichzeitig sollten diese Methoden an neuen Modellen, wie ADENoiden und aufbereitetem Gewebe, getestet werden (Behncken 1991).

Die in dieser Arbeit verwendeten Lektine Con A, UEA-1 und PNA zählen zu den gängigen Lektinen in der Forschung und Diagnostik. Dennoch existiert eine Vielzahl weiterer Lektinmarker, die kommerziell erhältlich sind. In Tabelle 18 sind die derzeit verfügbaren Lektin-Farbstoff-Konjugate aufgeführt, die in der nächsten Forschungsphase zur Untersuchung von Lektinmarkern in der Adenohypophyse eingesetzt werden sollen.

Vor dem diagnostischen Einsatz dieser Marker bei ADENoiden, pathologischen Präparaten oder geklärtem Gewebe ist eine Etablierung an physiologischen

Adenohypophysenschnitten erforderlich. Es erscheint sinnvoll, zunächst eine umfassende Untersuchung aller verfügbaren Lektinmarker durchzuführen, um diejenigen zu identifizieren, die spezifische Bindungsstellen in der Adenohypophyse aufweisen. Im Anschluss sollten diese ausgewählten Lektinmarker mit Hormonfärbungen verglichen werden, um potenzielle Lektin-Hormon-Interaktionen zu identifizieren.

Ein weiterer Vorteil der in Tabelle 18 genannten Lektinmarker besteht in ihrer Erprobung in unterschiedlichen Forschungsbereichen. Hierbei existieren bereits etablierte Analyseverfahren wie Western Blot und Chromatographie, die für weiterführende Untersuchungen genutzt werden können (Cao, Guo et al. 2013, Pauthner, Havenar-Daughton et al. 2017). Die Verwendung von Lektinmarkern in der Flowzytometrie zur Zellsortierung sowie die Trennung von Proteinen unter Einsatz von Kombinationen aus magnetischen Beads und Lektinmarkern sind bereits dokumentiert (Stolfa, Mondal et al. 2016; Dutt, Duong et al. 2023). Die durch den Einsatz von Lektinen etablierten Methoden eröffnen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Grundlagenforschung der Adenohypophyse. Dies umfasst sowohl den Bereich der Histologie als auch die Zellkultur zur Analyse embryologischer Prozesse anhand von ADENoiden. Ein zentrales Ziel für die Zukunft besteht darin, diese Methoden an unserem Institut zu implementieren, um sie in weiteren Forschungsprojekten, insbesondere am Beispiel der Hypophyse, anzuwenden.

Tabelle 18: Erwerbliche Lektinmarkern

Eine Liste der derzeit erwerblichen Lektinmarkern mit Nennung der Namen, des Ursprungs und deren Ansatzpunkt an der Zuckerkette.

Lektin	Herkunft	Ansatzpunkt
Aleuria aurantia (AAL)	Pilz	Fuca6GlcNAc
Bauhinia pupurea (BPL, BPA)	Orchideenbaumsamen	Galβ3GalNAc
Datura stramonium (DSL)	Gemeiner Stechapfel	(GlcNAc)2-4

Dolichos biflorus agglutinin (DBA)	Pferdebohne	α -galNAc
Erythrina cristagalli (ECL, ECA)	Korallenbaum	Gal β 4GlcNAc
Galanthus nivalis (GNL)	Schneeglöckchen	α Man
Glycine max lectin (SBA)	Sojabohne	α > β GalNAc
Griffonia simplicifolia isolectin (GS-IB4, GSL-IB4)	Afrikanischer Strauchleguminose	α -Gal
Griffonia simplicifolia lectin (GSL-II)	Afrikanischer Strauchleguminose	α -Gal oder α -GalNAc
Griffonia simplicifolia lectin (GSL-II)	Afrikanischer Strauchleguminose	α oder β GalNAc
Helix pomatia lectin (HPA)	Essbare Schnecke	galNAc
Jacalin	Jackfrucht	Gal β 3GalNAc
Lens culinaris agglutinin (LCA)	Linsen	α Man, α Glc
Lotus tetragonolobus lectin (LTL)	Spargelerbse	α Fuc
Lycopersicon esculentum lectin (LEL, LEA, TL)	Tomaten	(glcNAc) ²⁻⁴
Maackia amurensis I (MAL I, MAL)	Asiatisches Gelbholz	Gal β 4GlcNAc
Maackia amurensis II (MAL II, MAH)	Asiatisches Gelbholz	Neu5Ac α 3Gal β 3GalNAc
Maclura Pomifera (MPL)	Milchorangenbaum	Gal β 3GalNAc
Narcissus pseudonarcissus (NPL, NPA, DL)	Narzissen	α Man
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)	Rote Kidney Bohnen	Gal.4GlcNAc.2Man.6 (GlcNAc.4) (GlcNAc.4Man.3) Man.4

Phaseolus vulgaris lectin (PHA-L)	Rote Kidney Bohnen	Gal β 4GlcNAc β 6(GlcNAc β 2Man α 3)Man α 3
Pisum sativum (PSA)	Erbse	α Man oder α Glc
Ricinus communis agglutinin I (RCA I, RCA 120)	Wunderbaum Samen	Gal
Sambucus nigra lectin (SNA, EBL)	Holunder	Neu5Ac α 6Gal/GalNAc
Solanum tuberosum (STL, PL)	Kartoffel	(GlcNAc) ²⁻⁴
Vicia villosa (VVL, VVA)	Zottige Wicke	GalNAc
Wheat germ agglutinin (WGA)	Weizenkeim	GlcNAc
Wisteria floribunda lectin (WFA, WFL)	Japanische Wisteria	GlcNAc

5.4.2 ADENoide - Verbesserungsfahrplan

Um ein möglichst realitätsnahes in-vitro-Modell zu entwickeln, sind spezifische Modifikationen des Organoidmodells erforderlich, die bereits gegenwärtig Anwendung finden. Zur Darstellung der Hormonachse des menschlichen Körpers können verschiedene Organoidmodelle, wie jene des Hypothalamus, der Adenohypophyse und der Nebenniere, parallel auf einem Organoidchip kultiviert werden, um die Interaktionen im Mikroumfeld zu analysieren (Picollet-D'hahan, Zuchowska et al. 2021, Wang, Zhu et al. 2025, Yang, Qu et al. 2025). Diese Methode wird bereits erfolgreich in anderen Systemen verwendet und liefert vielversprechende Ergebnisse in der praktischen Umsetzung.

Die gewonnenen Daten aus den ADENoiden sollten jedoch konsequent mit humanen Gewebeproben validiert und verifiziert werden. Ein bedeutender Vorteil ergibt sich aus der Möglichkeit, pathologische Zustände auf Organoidmodelle zu übertragen, um krankhafte Gewebefunktionen nachzubilden und gezielte Untersuchungen durchzuführen (Li and Belmonte 2019, Kim, Koo et al. 2020, Fujii and Sato 2021). Diese Untersuchungen können individuell an einzelne Personen, beispielsweise bei genetischen Erkrankungen, angepasst werden und

bieten Vorteile gegenüber bislang genutzten Tiermodellen (Weinhart, Hocke et al. 2019).

Zur Umsetzung dieser Ansätze ist die Produktion zahlreicher Organoid-Modellchargen notwendig, um die Rolle von Lektinmarkern als potenzielle Entwicklungsmarker der Adenohypophyse zu evaluieren. Hierbei muss auf eng getaktete Intervalle geachtet werden, um Veränderungen der Glykanstruktur in Abhängigkeit von der Synthesefähigkeit der Adenohypophysenhormone zu identifizieren.

Insgesamt eröffnen sich vielfältige Perspektiven, um den Einsatz von Lektinmarkern am Beispiel der ADENOide weiterzuentwickeln. Ziel ist es, effektive und kostengünstige Surrogatmarker zur Detektion von ACTH bereitzustellen.

5.4.3 Gewebeklä rung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die isolierte Gewebeklä rung der humanen Adenohypophyse unter Anwendung der PACT-Methode demonstriert. Dies eröffnete mehrere Ansatzpunkte für Optimierungen in zukünftigen Projekten.

Das langfristige Ziel besteht darin, eine vollständige Organklä rung zu etablieren, ohne die Hypophyse in Scheiben zu schneiden. Hierbei müssen verschiedene Herausforderungen berücksichtigt werden. Bei der Lagerung im HMS ist eine verlängerte Einwirkzeit notwendig, um eine effektive Penetration der Lösung in das Organinnere zu gewährleisten. Gleichzeitig sollte dieser Prozess zügig ablaufen, um Nekrosen zentraler Gewebeanteile zu vermeiden. Anschließend ist die Auswahl der optimalen Temperatur und Klä rungsdauer entscheidend, um sichtbare Lipide effizient zu entfernen.

In Bezug auf die Ganzorganklä rung ist zu prüfen, ob eine Modifikation der SDS-Konzentration sinnvoll ist. Ebenso sollten die Methodik der Immunfluoreszenz und die Inkubationszeiten für Antikörper und Lektine angepasst werden, um eine homogene Fä rbung der gesuchten Epitope sicherzustellen.

Eine zentrale Herausforderung stellt das gleichmäßige Eindringen der Antikörper in das Organzentrum und eine homogene Gewebeklä rung dar, um für die mikroskopische Analyse eine ausreichende Lichtdurchlässigkeit zu erreichen. Das aktuell verwendete Immersionsmedium (80 % Glycerol) sollte kritisch hinterfragt und gegebenenfalls optimiert werden.

Da die Konfokalmikroskopie in ihrer Eindringtiefe begrenzt ist, wäre der Einsatz der effizienteren Lichtblattmikroskopie von Vorteil. Diese Methode ermöglicht eine bessere Darstellung tieferliegender gefärbter Strukturen (Chakraborty, Driscoll et al. 2019, Glaser, Bishop et al. 2022, Rusch, Brammerloh et al. 2022, White, Lam et al. 2023).

Die Penetration der zentralen Hypophyseschichten mit HMS und das Auswaschen von Lipiden stellten Herausforderungen dar. Daher wurde das Gewebe in millimetergroße Scheiben geschnitten. Abbildung 19 zeigt eine intensivere Färbung der zentralen Bereiche im Vergleich zu den Rändern, verursacht durch Blutabbauprodukte und Reaktionsaggregate. Zur Minimierung dieser Effekte wird empfohlen, die zuführenden Blutgefäße während der in-situ-Präparation darzustellen, mit isotoner Lösung zu spülen und anschließend eine Fixierlösung zu injizieren (Huang, Brenna et al. 2019, Jing, Men et al. 2021).

Die Verwendung von HMS in der Fixierlösung erfordert eine sorgfältige Kühlung des Gewebes und der Lösungen, um eine vorzeitige Gelaktivierung zu vermeiden. Dies könnte eine homogene Verteilung von HMS intravasal und extravasal ermöglichen, sodass die Hypophyse als vollständiges Organ verwendet werden kann.

Nach erfolgreicher Gewebeklä rung und Färbung ist die Auswahl einer geeigneten Mikroskopiemethode essenziell. Während die Konfokalmikroskopie für dünne Gewebeschnitte ausreicht, erfordert die Untersuchung des gesamten Organs die Verwendung der Lichtblattmikroskopie. Diese Methode bietet Vorteile wie eine gewebeschonende Abbildung, geringere Bleachingraten, weniger Rauchartefakte sowie eine höhere Zeit- und Kosteneffizienz (Hillman, Voleti et al. 2019, Glaser, Bishop et al. 2022, Chow, Schartner et al. 2024).

Abschließend müssen die erfassten Daten mit Hochleistungsrechnern zu 3D-Aufnahmen verarbeitet und rekonstruiert werden, um eine qualitative Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

5.4.4 Einsatzmöglichkeiten der Lektine bei Hypophysenpathologien

Der Einsatz von Lektinmarkern ist vielseitig und erstreckt sich über die Immunfluoreszenz in der physiologischen Hypophyse hinaus. Analog zu Antikörpern kann die Lektin-Histochemie zur Kartierung von Glykanen in Geweben sowie in Tumorzellen verwendet werden (Hashim, Jayapalan et al. 2017). Derzeit finden unterschiedliche Mikroarrays Anwendung in der Forschung, insbesondere zur Detektion von Tumoren, Autoimmunerkrankungen sowie chronischen Erkrankungen (Yang, Lin et al. 2024). Dieser Ansatz soll auch künftig Anwendung finden, um neben physiologischen Proben zusätzlich pathologische Adenohypophysenproben zu analysieren. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Lektine Con A, PNA und UEA-1 bei den Krankheitsbildern Akromegalie und Morbus Cushing unterschiedliche, spezifische Glykanmuster aufweisen (Behncken 1991). Dieser Ansatz sowie zusätzliche Lektinmarker sollen künftig dazu verwendet werden, die Kartierung von Glykanstrukturen pathologischer Zellstrukturen der Adenohypophyse genauer zu erforschen und zu beschreiben.

Da es sich um ein Organ handelt, das operativ schwer für Biopsien zugänglich ist, stellen Serummarker zweifellos eine hervorragende, nicht invasive und kostengünstige Alternative für Therapiekontrollen dar. Bereits bei Patientinnen und Patienten mit Hypopituitarismus konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration von Mannan-bindendem Lektin (MBL) signifikant verringert ist, sich jedoch im Verlauf einer Therapie normalisiert (Matusiak, Stępnik et al. 2023). Dies verdeutlicht einen weiteren vielversprechenden Ansatzpunkt für den Einsatz von Lektinen in der Krankheitsdiagnostik, der sich potenziell auch auf andere Krankheitsmodelle der Adenohypophyse übertragen lässt. Wie im vorhergehenden Abschnitt dargelegt, existieren bereits heute Erkenntnisse über unterschiedliche Färbemuster der Lektine Con A, PNA und UEA-1 bei Erkrankungen der Adenohypophyse. Um diese Erkenntnisse diagnostisch

nutzbar zu machen, ist jedoch die Etablierung geeigneter sensitiver Methoden für die jeweiligen Erkrankungen erforderlich.

Nach erfolgreicher Stabilisierung der ADENoid-Modelle sollen diese Pathologien der Adenohypophyse im Modell abbilden. Solche Organmodelle bieten eine ideale Grundlage, um isolierte Veränderungen von Lektinmarkern zu identifizieren und deren Modifikationen präzise zu quantifizieren. Langfristig könnte dies den Bedarf an zahlreichen präklinischen Tests erheblich reduzieren und nach der Validierung eines erfolgreichen Verlaufsmarkers in humanen Probanden Anwendung finden.

5.4.5 Therapeutische Ansätze von Lektinen

Der wohl bekannteste Einsatz eines Lektins als onkologisches Therapeutikum ist die Mistelextraktherapie (*Viscum album* Agglutinin). Diese wirkt als ribosomeninaktivierendes Protein vom Typ II und soll dadurch zur Zerstörung von Tumorzellen führen (Bhutia, Panda et al. 2019). Bislang wird die Therapie lediglich als Kann-Empfehlung im Rahmen komplementärer Behandlungen bei verschiedenen Krebserkrankungen, wie etwa Brustkrebs oder Melanom, ausgesprochen. Dies liegt daran, dass eine therapeutische Überlegenheit gegenüber etablierten Medikamenten bislang nicht nachgewiesen werden konnte.

Gleichwohl existieren diverse Forschungsansätze, die den potenziellen therapeutischen Nutzen von Lektinen in der Onkologie untersuchen. Beispielsweise wird der Einsatz von Con A bei Melanomzellen erforscht, wobei in vitro eine Induktion der Apoptose in den betroffenen Zellen beobachtet werden konnte (Yau, Dan et al. 2015). Der Nutzen dieses Lektins konnte jedoch ebenfalls bei anderen Tumorentitäten, wie Kolorektalkarzinom, Lebererkrankungen und Glioblastomen, nachgewiesen werden (Miyagi, Takehara et al. 2004, Pratt, Roy et al. 2012, de Oliveira Figueiroa, Albuquerque da Cunha et al. 2017).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollen die in dieser Arbeit untersuchten Lektine sowie weitere potenziell relevante Lektine hinsichtlich ihres therapeutischen Nutzens für Tumore der Adenohypophyse evaluiert werden. Ziel

ist es, stabile Adenomodelle zu entwickeln, die das Verhalten von Tumorzellen nachbilden. Diese Modelle werden anschließend mit Lektinen behandelt, um deren Einfluss auf die Zellwachstumsrate zu analysieren. Eine potenzielle Herausforderung stellt der enzymatische Abbau der Lektine im Gastrointestinaltrakt dar. Zur Umgehung dieses Problems existieren bereits Lösungsansätze, die die Applikation von Lektinen mittels Lipid-Nanopartikeln vorsehen. Diese Methode ermöglicht nicht nur die Umgehung des Gastrointestinaltrakts, sondern trägt auch zur Reduktion möglicher Nebenwirkungen bei (Gabor, Bogner et al. 2004, Haddadzadegan, Dorkoosh et al. 2022).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist eine Methode, die seit über vier Jahrzehnten im Rahmen von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten eingesetzt wird, um Krebszellen zu schwächen und idealerweise zu eliminieren (Gairi and Le Borgne 2024). Diese Methode lässt sich ebenso analog auf Lektin-Wirkstoff-Konjugate anwenden, was bereits durch erste präklinische Daten in der Krebstherapie belegt wird (Singh, Dilnawaz et al. 2011, Shimomura, Oda et al. 2018). Dieser Ansatz erweist sich ebenfalls als vielversprechend für den Einsatz von Lektinen über diagnostische Anwendungen hinaus, insbesondere im Kontext der Behandlung von Tumoren der Adenohypophyse. Durch die gezielte Auswahl geeigneter Lektine, welche die bevorzugten hormonproduzierenden Zellen markieren, können Wirkstoff-Konjugate zur präzisen Applikation von Chemotherapeutika oder anderen therapeutisch wirksamen Substanzen direkt am Tumor sowie in dessen unmittelbarer Umgebung beitragen.

5.5 Schlussfolge

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieb Harvey Cushing den Zusammenhang zwischen Akromegalie und Hypophysentumoren (Cushing 1909, Cushing 1914). Diese Erkrankung stellt eine von vielen pathologischen Veränderungen der Hypophyse dar, deren Prävalenz und schwerwiegende Folgen bei ausbleibender Therapie eine umfassende wissenschaftliche Erforschung erforderlich machen. Fortschritte in der Therapie solcher Erkrankungen können nur durch neue Erkenntnisse aus der

Grundlagenforschung und den Einsatz moderner Methoden erzielt werden, um die Funktion des „chef d'orchestre“ besser zu verstehen.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell der ADENoide dient als exemplarisches Beispiel für die individualisierte und personalisierte Erforschung von Hypophysenerkrankungen. Dieses Modell findet bereits Anwendung bei Morbus Cushing und sollte in Zukunft weiterentwickelt werden (Mallick, Chakrabarti et al. 2023, Hashmi, Matsumoto et al. 2025). Die Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung, insbesondere durch die Untersuchung der Adenohypophyse, eröffnen neue Möglichkeiten zur Erweiterung diagnostischer Verfahren. Wie in dieser Arbeit anhand von Lektinmarkern demonstriert, existiert eine Vielzahl von Methoden für den Einsatz von Lektinen. Diese Methoden bieten sowohl Vorteile als auch Einschränkungen im Vergleich zu etablierten diagnostischen Systemen.

Ziel ist es, gezielt und differenziert auf das Spektrum bereits etablierter Diagnostika zurückzugreifen. Eine langfristige Integration von Lektinmarkern in die Diagnostik der Adenohypophyse könnte einen signifikanten Fortschritt darstellen. Ein Vergleich der Zeitersparnis und der Kosteneffizienz bei der Anwendung von Lektinmarkern zeigt deren deutliche Überlegenheit gegenüber ACTH-Antikörpern in der Diagnostik gesunder Adenohypophysen. Zudem bieten Lektinmarker eine höhere Robustheit bei der Fixierung und Gewebeaufbereitung, was einen weiteren Vorteil gegenüber Antikörpern darstellt (Manning, Romero et al. 2017, Brooks 2023).

Ein zusätzlicher Vorteil von Lektinmarkern liegt in ihrer Fähigkeit, Glykanstrukturen zu erkennen, die in der Tumorphathologie von besonderer Bedeutung sind. Sie bieten eine zuverlässigere Erkennung als Antikörper und eignen sich daher auch für Hochleistungsverfahren wie Microarrays (Gemeiner, Mislovicová et al. 2009, Dan, Liu et al. 2016).

Diese Vorteile verdeutlichen das Potenzial von Lektinmarkern sowohl für zukünftige Forschungen zur Glykanstruktur der Adenohypophyse als auch für deren Einsatz als Surrogatmarker in der Pathodiagnostik.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Überlegenheit von Lektinmarkern gegenüber dem Hormonmarker ACTH bei der Charakterisierung der Adenohypophyse sowie in der Diagnostik ihrer Erkrankungen erörtert. Verschiedene Modalitäten und Methoden werden dabei detailliert untersucht.

Im ersten Abschnitt der Arbeit erfolgt die Etablierung der Lektinmarker Con A, PNA und UEA-1 an der humanen Adenohypophyse. Dabei wird deren Übereinstimmung mit hormonpositiven Arealen beschrieben. Besonders hervorzuheben ist die ausgeprägte Kolokalisation von Con A und UEA-1 mit ACTH-positiven Arealen, was die Eignung von Lektinmarkern als alternatives Diagnostikum anstelle des Hormonantikörpers ACTH in den Fokus rückt.

Neben der konventionellen immunhistochemischen Analyse von Organschnitten werden die Lektinmarker auch in zwei weiteren Modalitäten untersucht. Zunächst wird das Modell der Gewebeklämung an der humanen Adenohypophyse nach der PACT-Methode etabliert, welches in dieser Arbeit erstmals erfolgreich beschrieben wird. Diese Methode ermöglicht es, Grundlagenforschung im dreidimensionalen Raum durchzuführen und anatomische Strukturen des Organs präziser zu charakterisieren. Auch in diesem Modell wird der Lektinmarker UEA-1 eingesetzt und die Kolokalisation eingehend analysiert.

Darüber hinaus wird das bekannte Protokoll zur 3D-Organoidherstellung der Adenohypophyse etabliert. Nach einer Modifikation des Modells und dessen erfolgreicher Umsetzung kommen Lektinmarker zum Einsatz, um die Kolokalisation zwischen ACTH-positiven Arealen und Lektinmarkern während der Entwicklung der Adenohypophyse zu untersuchen.

Im Verlauf der Arbeit kristallisieren sich die beiden Lektinmarker UEA-1 und Con A als geeignete Surrogatmarker heraus. Sie zeigen sowohl im humanen 2D-Schnittmodell, im geklärten Gewebe als auch als Entwicklungsmarker in ADENoiden signifikante Ergebnisse.

Die gewonnenen Erkenntnisse werden in der Diskussion hinsichtlich ihrer Limitationen erörtert und in einem Ausblick kritisch reflektiert.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie (INDB) unter Betreuung vom Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Stefan Liebau durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Moritz Klingenstein und Frau Dr. Stefanie Klingenstein.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Sabine Conrad von mir eigenständig durchgeführt. In Vertretungsfällen wurde die Zellkultur von Herrn Dr. Moritz Klingenstein und Frau Sabine Conrad übernommen. Das Schneiden der Paraffinschnitte wurde überwiegend von Frau Sabine Conrad durchgeführt. Die restlichen Laborarbeiten wurden vollständig durch mich durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Die Abbildungen 1-6 wurden mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Ich versichere das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die geschriebenen Texte wurden mittels einer Rechtschreib- und Grammatikkorrektur von MacOS, welche mit ChatGPT kommuniziert, korrigiert.

Für die Literaturrecherche wurden zusätzlich auch die wissenschaftsbasierten AI-Systeme OpenEvidence® und Consensus/ChatGPT angewandt und die Angaben nach kritischer Begutachtung verwendet.

Tübingen, April 2026

Nikbin, Mohammad Reza

8 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Stefan Liebau für die Anregung, die Promotion an seinem Institut zu absolvieren, sowie für die zahlreichen anregenden Gespräche bei Kaffee, gemeinsamen Mahlzeiten oder im Präpariersaal.

Ebenso bedanke ich mich bei meiner Betreuerin und meinem Betreuer, Stefanie und Moritz Klingenstein, für ihre engagierte und geduldige Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Ihre freundlichen Gespräche und motivierenden Worte waren stets eine wertvolle Hilfe, insbesondere in herausfordernden Phasen.

Mein Dank gilt auch meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Bakchoul, dessen Expertise und Rückmeldungen meine Arbeit bereichert haben.

Alfio Milazzo danke ich für die fundierte Einführung in die Histologie sowie für die inspirierenden wissenschaftlichen Diskussionen im Zusammenhang mit meiner Promotion.

Ein besonderer Dank geht an Peter Neckel für seine kontinuierliche tatkräftige Unterstützung und seine stets konstruktiv-kritischen Anregungen, die meinen wissenschaftlichen Ansatz nachhaltig geprägt haben.

Melanie Scharr danke ich für die aufbauenden Gespräche bei Kaffee und ihre motivierenden Worte, die insbesondere in schwierigen Phasen der Versuchsdurchführung sehr wertvoll waren.

Den Postdocs Kevin Achberger und Natalia Pashkovskaia danke ich für ihre Unterstützung und die bereichernden, ideenreichen Gespräche.

Sabine Conrad und Ulrich Mattheus danke ich für ihre gründliche Einarbeitung sowie für ihre umfassende Unterstützung bei Laborarbeiten.

Mein Dank gilt auch Andreas Ogleiser, Kirsten Wermter und Peter Künstle für ihre organisatorische Unterstützung im Institut.

Der Hans-Böckler-Stiftung danke ich herzlich für die finanzielle Förderung meines Stipendiums, durch das ich die Möglichkeit hatte, ein Jahr meines Studiums auszusetzen und mich Vollzeit der Forschung zu widmen.

Ich danke den Kooperationspartnern, insbesondere der Abteilung für Neuropathologie sowie dem Institut für Klinische Anatomie, für die wertvolle Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Freund:innen und Kommiliton:innen, die mir in guten, wie in schlechten Zeiten zur Seite standen.

Definitiv spreche ich meiner Mutter meinen tief empfundenen Dank aus, da sie maßgeblich dazu beigetragen hat, dass mir all dies ermöglicht wurde. Ohne ihren Mut wäre es nicht möglich gewesen, diesen Weg erfolgreich zu beschreiten.

Abschließend möchte ich meiner Partnerin, Carolin Aicher, meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Sie hat mich nicht nur durch ihre wertvollen Anregungen und inhaltlichen Ideen unterstützt, sondern auch durch ihre beständige Motivation und konstruktiven Diskussionen maßgeblich zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

9 Literaturverzeichnis

1. Aboul-Soud, M. A. M., A. J. Alzahrani and A. Mahmoud (2021). "Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening." Cells **10**(9).
2. Akimoto, Y., K. Takata and H. Kawakami (2016). "Pre-embedding Method of Electron Microscopy for Glycan Localization in Mammalian Tissues and Cells Using Lectin Probes." Methods Mol Biol **1474**: 259-267.
3. Alatzoglou, K. S., L. C. Gregory and M. T. Dattani (2020). "Development of the Pituitary Gland." Compr Physiol **10**(2): 389-413.
4. Amar, A. P. and M. H. Weiss (2003). "Pituitary anatomy and physiology." Neurosurg Clin N Am **14**(1): 11-23, v.
5. Arey, B. (2012). The Role of Glycosylation in Receptor Signaling. Glycosylation. S. Petrescu. Rijeka, IntechOpen.
6. Artigas, R. (2011). Imaging Confocal Microscopy. Optical Measurement of Surface Topography. R. Leach. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 237-286.
7. Audette, G. F., M. Vandonselaar and L. T. Delbaere (2000). "The 2.2 Å resolution structure of the O(H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*." J Mol Biol **304**(3): 423-433.
8. Azaripour, A., T. Lagerweij, C. Scharfbillig, A. E. Jadczyk, B. Willershausen and C. J. Van Noorden (2016). "A survey of clearing techniques for 3D imaging of tissues with special reference to connective tissue." Prog Histochem Cytochem **51**(2): 9-23.
9. Baenziger, J. U. and D. Fiete (1979). "Structural determinants of concanavalin A specificity for oligosaccharides." Journal of Biological Chemistry **254**(7): 2400-2407.
10. Baldus, S. E., J. Thiele, Y. O. Park, F. G. Hanisch, J. Bara and R. Fischer (1996). "Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) in comparison to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I)." Glycoconj J **13**(4): 585-590.
11. Banerjee, R., K. Das, R. Ravishankar, K. Suguna, A. Surolia and M. Vijayan (1996). "Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex." Journal of Molecular Biology **259**(2): 281-296.
12. Barondes, S. H. (1988). "Bifunctional properties of lectins: lectins redefined." Trends in Biochemical Sciences **13**(12): 480-482.
13. Behncken, A. (1991). "Lectin-Bindings in Pituitary Adenomas and Normal Pituitaries."
14. Bhattacharyya, L. and C. F. Brewer (1986). "Precipitation of Concanavalin A by a high mannose type glycopeptide." Biochemical and Biophysical Research Communications **137**(2): 670-674.
15. Bhutia, S. K., P. K. Panda, N. Sinha, P. P. Praharaj, C. S. Bhol, D. P. Panigrahi, K. K. Mahapatra, S. Saha, S. Patra, S. R. Mishra, B. P. Behera, S. Patil and T. K. Maiti (2019). "Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death." Pharmacological Research **144**: 8-18.
16. Blau, H. M. and G. Q. Daley (2019). "Stem Cells in the Treatment of Disease." New England Journal of Medicine **380**(18): 1748-1760.

17. Boamfa, M., M. J. Asselman, R. C. Vulders, E. Verhoef, M. van Royen and P. van der Zaag (2020). "Combined transmission, dark field and fluorescence microscopy for intact, 3D tissue analysis of biopsies." Journal of Biomedical Optics **25**(11): 116503.
18. Bonczar, M., G. Wysiadecki, P. Ostrowski, M. Michalczyk, D. Plutecki, J. Wilk, W. Michalik, J. Walocha, K. Balawender, T. Iskra, D. Lusina, M. Koziej, M. Radek and A. Żytkowski (2023). "The Morphology of the Pituitary Gland: A Meta-Analysis with Implications for Diagnostic Imaging." Brain Sciences **13**(1): 89.
19. Boyd, W. C. and R. M. Reguera (1949). "Hemagglutinating substances for human cells in various plants." J Immunol **62**(3): 333-339.
20. Brooks, S. A. (2023). "Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and Future Directions." Methods Mol Biol **2566**: 65-84.
21. Cao, J., S. Guo, K. Arai, E. H. Lo and M. Ning (2013). "Studying extracellular signaling utilizing a glycoproteomic approach: lectin blot surveys, a first and important step." Methods Mol Biol **1013**: 227-233.
22. Cerri, P. S. and E. Sasso-Cerri (2003). "Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections." Micron **34**(8): 365-372.
23. Chacko, B. K. and P. S. Appukuttan (2001). "Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes alpha-linked galactose, but not N-acetyl lactosamine in N-linked oligosaccharide terminals." Int J Biol Macromol **28**(5): 365-371.
24. Chakraborty, T., M. K. Driscoll, E. Jeffery, M. M. Murphy, P. Roudot, B. J. Chang, S. Vora, W. M. Wong, C. D. Nielson, H. Zhang, V. Zhemkov, C. Hiremath, E. D. De La Cruz, Y. Yi, I. Bezprozvanny, H. Zhao, R. Tomer, R. Heintzmann, J. P. Meeks, D. K. Marciano, S. J. Morrison, G. Danuser, K. M. Dean and R. Fiolka (2019). "Light-sheet microscopy of cleared tissues with isotropic, subcellular resolution." Nat Methods **16**(11): 1109-1113.
25. Chen, J., N. Hersmus, V. Van Duppen, P. Caesens, C. Deneef and H. Vankelecom (2005). "The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics." Endocrinology **146**(9): 3985-3998.
26. Chen, Q., D. Leshkowitz, J. Blechman and G. Levkowitz (2020). "Single-Cell Molecular and Cellular Architecture of the Mouse Neurohypophysis." eNeuro **7**(1).
27. Chen, Y., M. Li and Y. Wu (2024). "The occurrence and development of induced pluripotent stem cells." Front Genet **15**: 1389558.
28. Chow, D. J. X., E. P. Schartner, S. Corsetti, A. Upadhya, J. Morizet, F. J. Gunn-Moore, K. R. Dunning and K. Dholakia (2024). "Quantifying DNA damage following light sheet and confocal imaging of the mammalian embryo." Sci Rep **14**(1): 20760.
29. Chung, K., J. Wallace, S.-Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A. S. Andalman, T. J. Davidson, J. J. Mirzabekov, K. A. Zalocusky, J. Mattis, A. K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grosenick, V. Gradinaru and K. Deisseroth (2013). "Structural and molecular interrogation of intact biological systems." Nature **497**(7449): 332-337.
30. Cohen Hyams, T., K. Mam and M. C. Killingsworth (2020). "Scanning electron microscopy as a new tool for diagnostic pathology and cell biology." Micron **130**: 102797.

31. Conrad-Lapostolle, V., L. Bordenave and C. Baquey (1996). "Optimization of use of UEA-1 magnetic beads for endothelial cell isolation." Cell Biol Toxicol **12**(4-6): 189-197.
32. Coy, S., Z. Du, S. H. Sheu, T. Woo, F. J. Rodriguez, M. W. Kieran and S. Santagata (2016). "Distinct patterns of primary and motile cilia in Rathke's cleft cysts and craniopharyngioma subtypes." Mod Pathol **29**(12): 1446-1459.
33. Cushing, H. (1909). "III. Partial Hypophysectomy for Acromegaly: With Remarks on the Function of the Hypophysis." Ann Surg **50**(6): 1002-1017.
34. Cushing, H. W. (1914). "THE WEIR MITCHELL LECTURE: SURGICAL EXPERIENCES WITH PITUITARY DISORDERS." JAMA: 1515-1525.
35. Dan, X., W. Liu and T. B. Ng (2016). "Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research." Med Res Rev **36**(2): 221-247.
36. de Oliveira Figueiroa, E., C. R. Albuquerque da Cunha, P. B. S. Albuquerque, R. A. de Paula, M. A. Aranda-Souza, M. S. Alves, A. Zagmignan, M. G. Carneiro-da-Cunha, L. C. Nascimento da Silva and M. T. Dos Santos Correia (2017). "Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents." Curr Med Chem **24**(34): 3667-3680.
37. Debbage, P. L., E. Sölder, S. Seidl, P. Hutzler, B. Hugl, D. Ofner and A. Kreczy (2001). "Intravital lectin perfusion analysis of vascular permeability in human micro- and macro- blood vessels." Histochem Cell Biol **116**(4): 349-359.
38. Dodt, H.-U., U. Leischner, A. Schierloh, N. Jährling, C. P. Mauch, K. Deininger, J. M. Deussing, M. Eder, W. Zieglgänsberger and K. Becker (2007). "Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain." Nature Methods **4**(4): 331-336.
39. Eipper, B. A., R. E. Mains and D. Guenzi (1976). "High molecular weight forms of adrenocorticotrophic hormone are glycoproteins." J Biol Chem **251**(13): 4121-4126.
40. Erber, W. N., H. Asbahr, B. Meyer, R. P. Herrmann and J. M. Davies (1992). "Peanut agglutinin (lectin from *Arachis hypogaea*) binding to hemopoietic cells: an immunophenotypic study using a biotin streptavidin technique." Pathology **24**(3): 173-176.
41. Ertürk, A., K. Becker, N. Jährling, C. P. Mauch, C. D. Hojer, J. G. Egen, F. Hellal, F. Bradke, M. Sheng and H.-U. Dodt (2012). "Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO." Nature Protocols **7**(11): 1983-1995.
42. Even-Zohar, N., D. Metin Armagan and S. Melmed (2021). "Pituitary stem cells." Vitam Horm **116**: 1-19.
43. Ezrin, C., H. Swanson, J. Humphrey, J. Dawson and F. Hill (1959). "Beta and delta cells of the human adenohypophysis: their response to adrenocortical disorders." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **19** **6**: 621-631.
44. Fan, X., S. J. Olson and M. D. Johnson (2001). "Immunohistochemical Localization and Comparison of Carboxypeptidases D, E, and Z, α -MSH, ACTH, and MIB-1 Between Human Anterior and Corticotroph Cell "Basophil Invasion" of the Posterior Pituitary." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **49**(6): 783-790.
45. Farzaneh, Z., S. Abbasalizadeh, M. H. Asghari-Vostikolaee, M. Alikhani, J. M. S. Cabral and H. Baharvand (2020). "Dissolved oxygen concentration

- regulates human hepatic organoid formation from pluripotent stem cells in a fully controlled bioreactor." Biotechnol Bioeng **117**(12): 3739-3756.
46. Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak and A. M. Dvorak (2004). "Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium." J Histochem Cytochem **52**(1): 87-101.
 47. Fowler, M. R. and D. W. McKeel, Jr. (1979). "Human adenohypophyseal quantitative histochemical cell classification. I. Morphologic criteria and cell type distribution." Arch Pathol Lab Med **103**(12): 613-620.
 48. Fujii, M. and T. Sato (2021). "Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases." Nat Mater **20**(2): 156-169.
 49. Furukawa, K., Y. Ohkawa, Y. Yamauchi, K. Hamamura, Y. Ohmi and K. Furukawa (2012). "Fine tuning of cell signals by glycosylation." J Biochem **151**(6): 573-578.
 50. Gabor, F., E. Bogner, A. Weissenboeck and M. Wirth (2004). "The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **56**(4): 459-480.
 51. Gao, Q., J. Wang, H. Zhang, J. Wang, Y. Jing and J. Su (2025). "Organoid Vascularization: Strategies and Applications." Adv Healthc Mater **14**(20): e2500301.
 52. Gemeiner, P., D. Mislovicová, J. Tkáč, J. Svitel, V. Pätoprstý, E. Hrabárová, G. Kogan and T. Kozár (2009). "Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics." Biotechnol Adv **27**(1): 1-15.
 53. Glaser, A. K., K. W. Bishop, L. A. Barner, E. A. Susaki, S. I. Kubota, G. Gao, R. B. Serafin, P. Balaram, E. Turschak, P. R. Nicovich, H. Lai, L. A. G. Lucas, Y. Yi, E. K. Nichols, H. Huang, N. P. Reder, J. J. Wilson, R. Sivakumar, E. Shamskhov, C. R. Stoltzfus, X. Wei, A. K. Hempton, M. Pende, P. Murawala, H. U. Dodt, T. Imaizumi, J. Shendure, B. J. Beliveau, M. Y. Gerner, L. Xin, H. Zhao, L. D. True, R. C. Reid, J. Chandrashekar, H. R. Ueda, K. Svoboda and J. T. C. Liu (2022). "A hybrid open-top light-sheet microscope for versatile multi-scale imaging of cleared tissues." Nat Methods **19**(5): 613-619.
 54. Goldstein, I. J., R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa and N. Sharon (1980). "What should be called a lectin?" Nature **285**(5760): 66-66.
 55. Grairi, M. and M. Le Borgne (2024). "Antibody-drug conjugates: prospects for the next generation." Drug Discov Today **29**(12): 104241.
 56. Hacıoglu, A., H. Tekiner, M. A. Altinoz, G. Ekinci, J. F. Bonneville, K. Yaltirik, A. Sav, U. Ture and F. Kelestimur (2025). "Rathke's cleft cyst: From history to molecular genetics." Rev Endocr Metab Disord **26**(2): 229-260.
 57. Haddadzadegan, S., F. Dorkoosh and A. Bernkop-Schnürch (2022). "Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers." Adv Drug Deliv Rev **182**: 114097.
 58. Halmi, N. S. and T. Duello (1976). "'Acidophilic' pituitary tumors: a reappraisal with differential staining and immunocytochemical techniques." Arch Pathol Lab Med **100**(7): 346-351.
 59. Hamid, S. A., C. Daly and S. Campbell (2003). "Visualization of live endothelial cells ex vivo and in vitro." Microvasc Res **66**(2): 159-163.
 60. Hashim, O. H., J. J. Jayapalan and C. S. Lee (2017). "Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers." PeerJ **5**: e3784.

61. Hashmi, H., R. Matsumoto, D. Corcoran, Y. Kawakami and T. Araki (2025). "Genetic models of Cushing's disease : From cells, in vivo transgenic models to human pituitary organoids." Pituitary **28**(2): 47.
62. Haston, S., S. Manshaei and J. P. Martinez-Barbera (2018). "Stem/progenitor cells in pituitary organ homeostasis and tumourigenesis." J Endocrinol **236**(1): R1-r13.
63. Hillman, E. M. C., V. Voleti, W. Li and H. Yu (2019). "Light-Sheet Microscopy in Neuroscience." Annu Rev Neurosci **42**: 295-313.
64. Huang, J., C. Brenna, A. U. M. Khan, C. Daniele, R. Rudolf, V. Heuveline and N. Gretz (2019). "A cationic near infrared fluorescent agent and ethylcinnamate tissue clearing protocol for vascular staining and imaging." Sci Rep **9**(1): 521.
65. Iwasawa, K. and T. Takebe (2021). "Organogenesis in vitro." Curr Opin Cell Biol **73**: 84-91.
66. Jensen, K. H. R. and R. W. Berg (2017). "Advances and perspectives in tissue clearing using CLARITY." Journal of Chemical Neuroanatomy **86**: 19-34.
67. Jing, D., Y. Men and H. Zhao (2021). "Tissue Clearing and 3-D Visualization of Vasculature with the PEGASOS Method." Methods Mol Biol **2319**: 1-13.
68. Kano, M., H. Sasaki, T. Miwata and H. Suga (2022). "Recipe for pituitary organoids." Front Endocrinol (Lausanne) **13**: 1025825.
69. Karagiannis, P., K. Takahashi, M. Saito, Y. Yoshida, K. Okita, A. Watanabe, H. Inoue, J. K. Yamashita, M. Todani, M. Nakagawa, M. Osawa, Y. Yashiro, S. Yamanaka and K. Osafune (2019). "Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development." Physiol Rev **99**(1): 79-114.
70. Kasai, T., H. Suga, M. Sakakibara, C. Ozone, R. Matsumoto, M. Kano, K. Mitsumoto, K. Ogawa, Y. Kodani, H. Nagasaki, N. Inoshita, M. Sugiyama, T. Onoue, T. Tsunekawa, Y. Ito, H. Takagi, D. Hagiwara, S. Iwama, M. Goto, R. Banno, J. Takahashi and H. Arima (2020). "Hypothalamic Contribution to Pituitary Functions Is Recapitulated In Vitro Using 3D-Cultured Human iPSCs." Cell Rep **30**(1): 18-24 e15.
71. Ke, M.-T., S. Fujimoto and T. Imai (2013). "SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction." Nature Neuroscience **16**(8): 1154-1161.
72. Kelberman, D., K. Rizzoti, R. Lovell-Badge, I. C. A. F. Robinson and M. T. Dattani (2009). "Genetic Regulation of Pituitary Gland Development in Human and Mouse." Endocrine Reviews **30**(7): 790-829.
73. Khan, F., R. Khan, A. Sherwani, S. Mohmood and M. Azfer (2002). "Lectins as markers for blood grouping." Medical Science Monitor **8**(12): RA 293-300.
74. Kikui, Y. and A. Miki (1995). "A differential staining method for adenohypophyseal cells." Arch Histol Cytol **58**(3): 375-378.
75. Kim, J., B. K. Koo and J. A. Knoblich (2020). "Human organoids: model systems for human biology and medicine." Nat Rev Mol Cell Biol **21**(10): 571-584.
76. Kiskinis, E. and K. Eggan (2010). "Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells." J Clin Invest **120**(1): 51-59.
77. Kocourek, J. and V. Hořejší (1981). "Defining a lectin." Nature **290**(5803): 188-188.

78. Kodani, Y., M. Kawata, H. Suga, T. Kasai, C. Ozone, M. Sakakibara, A. Kuwahara, S. Taga, H. Arima, T. Kameyama, K. Saito, A. Nakashima and H. Nagasaki (2022). "EpCAM Is a Surface Marker for Enriching Anterior Pituitary Cells From Human Hypothalamic-Pituitary Organoids." Front Endocrinol (Lausanne) **13**: 941166.
79. Kurimura, Y., Y. Tsuji, K. Yamamoto, H. Kumagai and T. Tochikura (1995). "Efficient production and purification of extracellular 1,2-alpha-L-fucosidase of *Bacillus* sp. K40T." Biosci Biotechnol Biochem **59**(4): 589-594.
80. Laporte, E., A. Vennekens and H. Vankelecom (2020). "Pituitary Remodeling Throughout Life: Are Resident Stem Cells Involved?" Front Endocrinol (Lausanne) **11**: 604519.
81. Larkin, S. and O. Ansorge (2000). Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland. Endotext. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc.
82. Li, M. and J. C. I. Belmonte (2019). "Organoids — Preclinical Models of Human Disease." New England Journal of Medicine **380**(6): 569-579.
83. Lin, J. R., Y. A. Chen, D. Campton, J. Cooper, S. Coy, C. Yapp, J. B. Tefft, E. McCarty, K. L. Ligon, S. J. Rodig, S. Reese, T. George, S. Santagata and P. K. Sorger (2023). "High-plex immunofluorescence imaging and traditional histology of the same tissue section for discovering image-based biomarkers." Nat Cancer **4**(7): 1036-1052.
84. Lin, S. Y., E. N. Schmidt, K. Takahashi-Yamashiro and M. S. Macauley (2025). "Roles for Siglec-glycan interactions in regulating immune cells." Semin Immunol **77**: 101925.
85. Listinsky, J., G. Siegal and C. Listinsky (1998). "Alpha-L-fucose: a potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia." American journal of clinical pathology **110** **4**: 425-440.
86. Lopes, M. B. S. (2017). "The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary." Acta Neuropathologica **134**(4): 521-535.
87. Magaki, S., S. A. Hojat, B. Wei, A. So and W. H. Yong (2019). "An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry." Methods Mol Biol **1897**: 289-298.
88. Mallick, S., J. Chakrabarti, J. Eschbacher, A. G. Moraitis, A. E. Greenstein, J. Churko, K. W. Pond, A. Livolsi, C. A. Thorne, A. S. Little, K. C. J. Yuen and Y. Zavros (2023). "Genetically engineered human pituitary corticotroph tumor organoids exhibit divergent responses to glucocorticoid receptor modulators." Transl Res **256**: 56-72.
89. Manning, J. C., A. Romero, F. A. Habermann, G. García Caballero, H. Kaltner and H. J. Gabius (2017). "Lectins: a primer for histochemists and cell biologists." Histochem Cell Biol **147**(2): 199-222.
90. Matsumoto, I. and T. Osawa (1969). "Purification and characterization of an anti-H(O) phytohemagglutinin of *Ulex europaeus*." Biochim Biophys Acta **194**(1): 180-189.
91. Matusiak, A. E., J. Stępniaak, A. Lewiński and M. Karbownik-Lewińska (2023). "Decreased mannan-binding lectin level in adults with hypopituitarism; dependence on appropriate hormone replacement therapies." Front Immunol **14**: 1107334.

92. McMahon, S. S. and M. Kilcoyne (2022). "Lectin Histochemistry for Tissues and Cells, and Dual Lectin and Antibody Co-localization." Methods Mol Biol **2370**: 281-299.
93. Melmed, S. (2022). The Pituitary. Chantilly, UNITED STATES, Elsevier Science & Technology.
94. Melmed, S. and D. Kleinberg (2002). Chapter 8 - Anterior Pituitary. Williams Textbook of Endocrinology (Tenth Edition). S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen and H. M. Kronenberg. Philadelphia, Elsevier: 177-279.
95. Micke, P., J. Botling, J. S. M. Mattsson, M. Planck, L. Tran, H. Vidarsdottir, B. Nodin, K. Jirström and H. Brunnström (2019). "Mucin staining is of limited value in addition to basic immunohistochemical analyses in the diagnostics of non-small cell lung cancer." Sci Rep **9**(1): 1319.
96. Miyagi, T., T. Takehara, T. Tatsumi, T. Suzuki, M. Jinushi, Y. Kanazawa, N. Hiramatsu, T. Kanto, S. Tsuji, M. Hori and N. Hayashi (2004). "Concanavalin a injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver." Hepatology **40**(5): 1190-1196.
97. Mollard, P., D. J. Hodson, C. Lafont, K. Rizzoti and J. Drouin (2012). "A tridimensional view of pituitary development and function." Trends Endocrinol Metab **23**(6): 261-269.
98. Morrison, L. E., M. R. Lefever, H. N. Lewis, M. J. Kapadia and D. R. Bauer (2022). "Conventional histological and cytological staining with simultaneous immunohistochemistry enabled by invisible chromogens." Lab Invest **102**(5): 545-553.
99. Neckel, P. H., U. Mattheus, B. Hirt, L. Just and A. F. Mack (2016). "Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure." Sci Rep **6**: 34331.
100. Novelli, G., P. Spitalieri, M. Murdocca, E. Centanini and F. Sangiuolo (2022). "Organoid factory: The recent role of the human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in precision medicine." Front Cell Dev Biol **10**: 1059579.
101. Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006). "Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease." Cell **126**(5): 855-867.
102. Oinam, L., R. Hayashi, K. Hiemori, K. Kiyoi, K. Sage-Ono, K. Miura, M. Ono and H. Tateno (2022). "Quantitative evaluation of glycan-binding specificity of recombinant concanavalin A produced in lettuce (*Lactuca sativa*)." Biotechnol Bioeng **119**(7): 1781-1791.
103. Orth, D. N. and W. E. Nicholson (1977). "High molecular weight forms of human ACTH are glycoproteins." J Clin Endocrinol Metab **44**(1): 214-217.
104. Ozaki, H., H. Suga and H. Arima (2021). "Hypothalamic-pituitary organoid generation through the recapitulation of organogenesis." Development, Growth & Differentiation **63**(2): 154-165.
105. Ozone, C., H. Suga, M. Eiraku, T. Kadoshima, S. Yonemura, N. Takata, Y. Oiso, T. Tsuji and Y. Sasai (2016). "Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells." Nat Commun **7**: 10351.
106. Pauthner, M., C. Havenar-Daughton, D. Sok, J. P. Nkolola, R. Bastidas, A. V. Boopathy, D. G. Carnathan, A. Chandrashekar, K. M. Cirelli, C. A. Cottrell, A. M. Eroshkin, J. Guenaga, K. Kaushik, D. W. Kulp, J. Liu, L. E. McCoy, A. L. Oom, G. Ozorowski, K. W. Post, S. K. Sharma, J. M. Steichen, S. W. de Taeye,

- T. Tokatlian, A. Torrents de la Peña, S. T. Butera, C. C. LaBranche, D. C. Montefiori, G. Silvestri, I. A. Wilson, D. J. Irvine, R. W. Sanders, W. R. Schief, A. B. Ward, R. T. Wyatt, D. H. Barouch, S. Crotty and D. R. Burton (2017). "Elicitation of Robust Tier 2 Neutralizing Antibody Responses in Nonhuman Primates by HIV Envelope Trimer Immunization Using Optimized Approaches." Immunity **46**(6): 1073-1088.e1076.
107. Pavlova, E., T. Pronina and Y. Skebelskaya (1968). "Histostructure of adenohipophysis of human fetuses and contents of somatotropic and adrenocorticotropic hormones." General and comparative endocrinology **10** **2**: 269-276.
108. Pecina, H. I., T. C. Pecina, V. Vyroubal, I. Kruljac and M. Slaus (2017). "Age and sex related differences in normal pituitary gland and fossa volumes." Front Biosci (Elite Ed) **9**(2): 204-213.
109. Pereira, M. E. A., E. A. Kabat, R. Lotan and N. Sharon (1976). "Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) Agglutinin." Carbohydrate Research **51**(1): 107-118.
110. Peterson, R. R. and J. Weiss (1955). "STAINING OF THE ADENOHYPHYSIS WITH ACID AND BASIC DYES1." Endocrinology **57**(1): 96-108.
111. Peumans, W. J. and E. J. Van Damme (1995). "Lectins as plant defense proteins." Plant Physiol **109**(2): 347-352.
112. Phifer, R. F., S. S. Spicer and G. R. Hennigar (1973). "Histochemical reactivity and staining properties of functionally defined cell types in the human adenohipophysis." Am J Pathol **73**(3): 569-587.
113. Picollet-D'hahan, N., A. Zuchowska, I. Lemeunier and S. Le Gac (2021). "Multiorgan-on-a-Chip: A Systemic Approach To Model and Decipher Inter-Organ Communication." Trends Biotechnol **39**(8): 788-810.
114. Plato, C. C. and H. Gershowitz (1961). "Specific Differences in the Inhibition Titers of the Anti-H Lectins from *Cytisus sessilifolius* and *Ulex europaeus*." Vox Sanguinis **6**(3): 336-347.
115. Poletti, A., C. Giacomoni and N. Pennelli (1992). "Simultaneous visualization of immunodetected antigens and tissue components revealed by non-enzymatic histochemical stains." J Histochem Cytochem **40**(12): 1965-1970.
116. Polito, L., M. Bortolotti, M. G. Battelli, G. Calafato and A. Bolognesi (2019). "Ricin: An Ancient Story for a Timeless Plant Toxin." Toxins (Basel) **11**(6).
117. Pratt, J., R. Roy and B. Annabi (2012). "Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells." Glycobiology **22**(9): 1245-1255.
118. Rathke, M. (1838). "Über die Entstehung der Glandula pituitaria." Archiv für Anatomie, Physiol Wiss Med **4**: 482-485.
119. Reily, C., T. J. Stewart, M. B. Renfrow and J. Novak (2019). "Glycosylation in health and disease." Nat Rev Nephrol **15**(6): 346-366.
120. Revokatova, D., P. Bikmulina, Z. Heydari, A. Solovieva, M. Vosough, A. Shpichka and P. Timashev (2025). "Getting Blood out of a Stone: Vascularization via Spheroids and Organoids in 3D Bioprinting." Cells **14**(9).
121. Rüdiger, H. and H.-J. Gabius (2001). "Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications." Glycoconjugate Journal **18**(8): 589-613.

122. Rusch, H., M. Brammerloh, J. Stieler, M. Sonntag, S. Mohammadi, N. Weiskopf, T. Arendt, E. Kirilina and M. Morawski (2022). "Finding the best clearing approach - Towards 3D wide-scale multimodal imaging of aged human brain tissue." Neuroimage **247**: 118832.
123. Rutenber, E., M. Ready and J. D. Robertus (1987). "Structure and evolution of ricin B chain." Nature **326**(6113): 624-626.
124. Ryu, Y., Y. Kim, H. R. Lim, H. J. Kim, B. S. Park, J. G. Kim, S. J. Park and C. M. Ha (2022). "Single-Step Fast Tissue Clearing of Thick Mouse Brain Tissue for Multi-Dimensional High-Resolution Imaging." Int J Mol Sci **23**(12).
125. Sahni, D., I. Jit, Harjeet, Neelam and A. Bhansali (2006). "Weight and dimensions of the pituitary in northwestern Indians." Pituitary **9**(1): 19-26.
126. Sanders, B. G., J. Carty and A. Rothbart (1963). "IMMUNOCHEMICAL ANALYSES OF HEMAGGLUTINATING SUBSTANCES IN LEGUMINOSEAE SEEDS." Proceedings of the Pennsylvania Academy of Science **37**: 96-103.
127. Sands, G. B., D. A. Gerneke, D. A. Hooks, C. R. Green, B. H. Smaill and I. J. Legrice (2005). "Automated imaging of extended tissue volumes using confocal microscopy." Microscopy Research and Technique **67**(5): 227-239.
128. Sasaki, H., H. Suga, K. Takeuchi, Y. Nagata, H. Harada, T. Kondo, E. Ito, S. Maeda, M. Sakakibara, M. Soen, T. Miwata, T. Asano, H. Ozaki, S. Taga, A. Kuwahara, T. Nakano, H. Arima and R. Saito (2023). "Subcutaneous transplantation of human embryonic stem cells-derived pituitary organoids." Frontiers in Endocrinology **Volume 14 - 2023**.
129. Sav, A., G. Menna, C. Serra, E. Söztutar and U. Türe (2025). "Anatomy of the pituitary gland." Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism **39**(3): 102013.
130. Schertz, K. F., W. C. Boyd, W. Jurgelsky and E. Cabanillas (1960). "Seed extracts with agglutinating activity for human blood." Economic Botany **14**(3): 232-240.
131. Schünke, M., E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll and K. H. Wesker (2022). PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie.
132. Sekine, K., S. Ogawa, S. Tsuzuki, T. Kobayashi, K. Ikeda, N. Nakanishi, K. Takeuchi, E. Kanai, Y. Otake, S. Okamoto, T. Kobayashi, T. Takebe and H. Taniguchi (2020). "Generation of human induced pluripotent stem cell-derived liver buds with chemically defined and animal origin-free media." Sci Rep **10**(1): 17937.
133. Shimomura, O., T. Oda, H. Tateno, Y. Ozawa, S. Kimura, S. Sakashita, M. Noguchi, J. Hirabayashi, M. Asashima and N. Ohkohchi (2018). "A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC)." Mol Cancer Ther **17**(1): 183-195.
134. Silva-Ortega, S., A. García-Martínez, M. Niveiro de Jaime, M. E. Torregrosa, J. Abarca, I. Monjas, A. Picó Alfonso and I. Aranda López (2021). "Proposal of a clinically relevant working classification of pituitary neuroendocrine tumors based on pituitary transcription factors." Human Pathology **110**: 20-30.
135. Singh, A., F. Dilnawaz and S. K. Sahoo (2011). "Long circulating lectin conjugated paclitaxel loaded magnetic nanoparticles: a new theranostic avenue for leukemia therapy." PLoS One **6**(11): e26803.

136. Spalteholz, W. (1914). Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung - Monografie, S. Hirzel.
137. Standring, S. (2016). Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice. [Philadelphia], Elsevier Limited.
138. Stillmark, H. (1888). Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen.
139. Suga, H., T. Kadoshima, M. Minaguchi, M. Ohgushi, M. Soen, T. Nakano, N. Takata, T. Wataya, K. Muguruma, H. Miyoshi, S. Yonemura, Y. Oiso and Y. Sasai (2011). "Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture." Nature **480**(7375): 57-62.
140. Susaki, Etsuo A., K. Tainaka, D. Perrin, F. Kishino, T. Tawara, Tomonobu M. Watanabe, C. Yokoyama, H. Onoe, M. Eguchi, S. Yamaguchi, T. Abe, H. Kiyonari, Y. Shimizu, A. Miyawaki, H. Yokota and Hiroki R. Ueda (2014). "Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis." Cell **157**(3): 726-739.
141. Taga, S., H. Suga, T. Nakano, A. Kuwahara, N. Inoshita, Y. Kodani, H. Nagasaki, Y. Sato, Y. Tsumura, M. Sakakibara, M. Soen, T. Miwata, H. Ozaki, M. Kano, K. Watari, A. Ikeda, M. Yamanaka, Y. Takahashi, S. Kitamoto, Y. Kawaguchi, T. Miyata, T. Kobayashi, M. Sugiyama, T. Onoue, Y. Yasuda, D. Hagiwara, S. Iwama, Y. Tomigahara, T. Kimura and H. Arima (2023). "Generation and purification of ACTH-secreting hPSC-derived pituitary cells for effective transplantation." Stem Cell Reports **18**(8): 1657-1671.
142. Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." Cell **131**(5): 861-872.
143. Takahashi, M., Y. Kizuka, K. Ohtsubo, J. Gu and N. Taniguchi (2016). "Disease-associated glycans on cell surface proteins." Mol Aspects Med **51**: 56-70.
144. Thomas, J. A. and E. J. Keenan (1986). Pharmacology of Adenohypophyseal Hormones. Principles of Endocrine Pharmacology. J. A. Thomas and E. J. Keenan. Boston, MA, Springer US: 15-42.
145. Tian, T., Z. Yang and X. Li (2021). "Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications." J Anat **238**(2): 489-507.
146. Tsaneva, M. and E. J. M. Van Damme (2020). "130 years of Plant Lectin Research." Glycoconjugate Journal **37**(5): 533-551.
147. Tse, H. M., G. Gardner, J. Dominguez-Bendala and C. A. Fraker (2021). "The Importance of Proper Oxygenation in 3D Culture." Front Bioeng Biotechnol **9**: 634403.
148. Tsunoda, A. (1997). "MR height of the pituitary gland as a function of age and sex: Especially physiological hypertrophy in adolescence and in climacterium." AJNR Am J Neuroradiol **18**(3): 551-554.
149. Vandana, J. J., C. Manrique, L. A. Lacko and S. Chen (2023). "Human pluripotent-stem-cell-derived organoids for drug discovery and evaluation." Cell Stem Cell **30**(5): 571-591.
150. Verstegen, M. M. A., R. P. Coppes, A. Beghin, P. De Coppi, M. F. M. Gerli, N. de Graeff, Q. Pan, Y. Saito, S. Shi, A. A. Zadpoor and L. J. W. van der Laan (2025). "Clinical applications of human organoids." Nat Med **31**(2): 409-421.

151. Vitale, A. M., E. Wolvetang and A. Mackay-Sim (2011). "Induced pluripotent stem cells: a new technology to study human diseases." Int J Biochem Cell Biol **43**(6): 843-846.
152. Vulders, R. C. M., R. C. van Hoogenhuizen, E. van der Giessen and P. J. van der Zaag (2021). "Clearing-induced tissue shrinkage: A novel observation of a thickness size effect." PLoS One **16**(12): e0261417.
153. Wang, H., W. Zhu, C. Xu, W. Su and Z. Li (2025). "Engineering organoids-on-chips for drug testing and evaluation." Metabolism **162**: 156065.
154. Watkins, W. M. and W. T. J. Morgan (1952). "Neutralization of the Anti-H Agglutinin in Eel Serum by Simple Sugars." Nature **169**(4307): 825-826.
155. Weinhart, M., A. Hocke, S. Hippenstiel, J. Kurreck and S. Hedtrich (2019). "3D organ models-Revolution in pharmacological research?" Pharmacol Res **139**: 446-451.
156. White, S. L., A. T. Lam and H. D. Buck (2023). "3D Imaging for Cleared Tissues and Thicker Samples on Confocal and Light-Sheet Microscopes." Methods Mol Biol **2593**: 143-161.
157. Wiles, M. V. and B. M. Johansson (1999). "Embryonic stem cell development in a chemically defined medium." Exp Cell Res **247**(1): 241-248.
158. Wong, S. E., C. E. Winbanks, C. S. Samuel and T. D. Hewitson (2010). Lectin Histochemistry for Light and Electron Microscopy. Histology Protocols. T. D. Hewitson and I. A. Darby. Totowa, NJ, Humana Press: 103-114.
159. Woo, J., E. Y. Lee, H. S. Park, J. Y. Park and Y. E. Cho (2018). "Novel Passive Clearing Methods for the Rapid Production of Optical Transparency in Whole CNS Tissue." J Vis Exp(135).
160. Wörsdörfer, P. and S. Ergün (2021). "The Impact of Oxygen Availability and Multilineage Communication on Organoid Maturation." Antioxid Redox Signal **35**(3): 217-233.
161. Wörsdörfer, P., T. I. I. Asahina, Y. Sumita and S. Ergün (2020). "Do not keep it simple: recent advances in the generation of complex organoids." J Neural Transm (Vienna) **127**(11): 1569-1577.
162. Xu, Z., J. Yang, X. Xin, C. Liu, L. Li, X. Mei and M. Li (2023). "Merits and challenges of iPSC-derived organoids for clinical applications." Front Cell Dev Biol **11**: 1188905.
163. Yang, B., Jennifer B. Treweek, Rajan P. Kulkarni, Benjamin E. Deverman, C.-K. Chen, E. Lubeck, S. Shah, L. Cai and V. Gradinaru (2014). "Single-Cell Phenotyping within Transparent Intact Tissue through Whole-Body Clearing." Cell **158**(4): 945-958.
164. Yang, H., Z. Lin, B. Wu, J. Xu, S. C. Tao and S. Zhou (2024). "Deciphering disease through glycan codes: leveraging lectin microarrays for clinical insights." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **56**(8): 1145-1155.
165. Yang, Y., Y. Qu, J. Wang, Y. Wang, J. Zhao, M. Wang, W. Hu, J. Zhao, B. Lin, X. Zhang and Y. Luo (2025). "Exploring microfluidics-based organoid interactions through analysis of albumin secretion." Lab Chip **25**(4): 487-499.
166. Yasuda, S. Y., T. Ikeda, H. Shamsavarani, N. Yoshida, B. Nayer, M. Hino, N. Vartak-Sharma, H. Suemori and K. Hasegawa (2018). "Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells." Nat Biomed Eng **2**(3): 173-182.

167. Yau, T., X. Dan, C. C. W. Ng and T. B. Ng (2015). "Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy." Molecules **20**(3): 3791-3810.
168. Yip, S., N. Wang and R. Sugimura (2023). "Give Them Vasculature and Immune Cells: How to Fill the Gap of Organoids." Cells Tissues Organs **212**(5): 369-382.
169. Yoshitomi, M., K. Ohta, T. Kanazawa, A. Togo, S. Hirashima, K. I. Uemura, S. Okayama, M. Morioka and K. I. Nakamura (2016). "Three-dimensional ultrastructural analyses of anterior pituitary gland expose spatial relationships between endocrine cell secretory granule localization and capillary distribution." Sci Rep **6**: 36019.
170. Yu, T., Y. Qi, J. Zhu, J. Xu, H. Gong, Q. Luo and D. Zhu (2017). "Elevated-temperature-induced acceleration of PACT clearing process of mouse brain tissue." Sci Rep **7**: 38848.
171. Zakout, Y. M., M. A. Abdellah, M. A. Abdallah and S. A. Batran (2024). "Optimization of PAS stain and similar Schiff's based methods for glycogen demonstration in liver tissue." Histochem Cell Biol **161**(4): 359-364.
172. Zhang, L. and Kelly G. Ten Hagen (2011). "The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation." Biochemical Society Transactions **39**(1): 378-382.
173. Zhu, X., A. S. Gleiberman and M. G. Rosenfeld (2007). "Molecular Physiology of Pituitary Development: Signaling and Transcriptional Networks." Physiological Reviews **87**(3): 933-963.
174. Zupančič, D., M. E. Kreft and R. Romih (2023). "Combined Lectin- and Immuno-histochemistry (CLIH) for Fluorescence Microscopy." Methods Mol Biol **2566**: 99-110.