Aus dem medizinischen Zentrum
für Innere Medizin
Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechselkrankheiten
Klinische Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg.
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. Thomas Mathias Gress
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

---

Etablierung eines humanen Modellsystems zur funktionellen Analyse der Somatostatinrezeptoren Typ 1, Typ 3 und Typ 4 in der humanen Karzinoid-Zell-Linie LCC-18

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Martin Feldmann

aus Frankfurt am Main

Marburg/Lahn 2007

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am: 10. Mai 2007

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch
Referent: PD Dr. rer. nat. Brigitte Lankat-Buttgereit
Korreferent: PD Dr. Alexander Dietrich
2. Korreferent: PD Dr. Holger Garn

Für Christoph

* 04.12.1960 † 12.08.2003

Inhaltsverzeichnis:

1 EINLEITUNG: 1–8

1.1 Einführung 1–8
1.2 Somatostatin - das hormonelle System 1–9
1.2.1 Allgemein 1–9
1.2.2 Verteilung somatostatinproduzierender Zellen 1–11
1.2.3 Effekte des Somatostatins 1–12
1.2.3.1 Effekte im Bereich des Zentralnervensystems 1–13
1.2.3.2 Extrazerebrale Effekte 1–13
1.2.4 Produktion und Degeneration des Somatostatins 1–14
1.2.5 Regulation der Genexpression und Sekretion 1–17
1.3 Die Somatostatinrezeptorfamilie 1–19
1.3.1 Identifikation der Somatostatinrezeptoren 1–19
1.3.2 Molekulare Klonierung der Somatostatinrezeptoren 1–21
1.3.3 Die Bindungszentren der SSTR 1–25
1.3.4 Expression der SSTR-Subtypen 1–27
1.3.4.1 SSTR im ZNS 1–28
1.3.4.2 SSTR in peripheren Geweben 1–30
1.3.5 Signaltransduktion und Koppelung an das G-Protein-System 1–32
1.3.5.1 Bildung von Homo- und Heterodimeren der SSTR 1–37
1.3.6 Die SSTR-vermittelte Hemmung der Sekretion und Zellproliferation 1–40
1.3.6.1 Sekretionshemmung 1–40
1.3.6.2 Proliferationshemmung 1–41
1.3.6.3 Apoptose 1–44
1.3.7 Regulation der SSTR 1–45
1.3.7.1 Agonist-abhängige Regulation 1–45
1.3.7.2 Regulation der SSTR-Genexpression 1–48
1.3.8 Subtypselektivität der biologischen Effekte der SSTR 1–50
1.4 Liganden an SSTR 1–53
1.5 Klinische Bedeutung 1–57
1.5.1 Diabetes mellitus 1–57
1.5.2 Hypophysäre Adenome 1–58
1.5.2.1 Akromegalie 1–58
1.5.2.2 TSH-produzierende Adenome 1–59

1.5.2.3 Andere Hypophysentumore ... 1–59
1.5.3 Neuroendokrine Tumore ... 1–60
1.5.3.1 Tumore des Gastrointestinaltraktes ... 1–61
1.5.3.2 Karzinoid Syndrom ... 1–62
1.5.3.3 Multiple Endokine Neoplasie Typ I (MEN-I) ... 1–62
1.5.4 Andere onkologische Krankheitsbilder ... 1–63
1.5.5 Gastrointestinaltrakt ... 1–63
1.5.5.1 Ösophagusvarizen ... 1–63
1.5.5.2 Sekretorische Diarrhoe ... 1–64
1.5.5.3 Pankreas ... 1–64
1.5.6 Nuklearmedizin ... 1–65
1.5.6.1 Detektion rezeptorpositiver Tumoren ... 1–65
1.5.6.2 Therapie von Malignomen über Somatostatinrezeptoren ... 1–66

2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG: ... 2–68

3 MATERIAL UND METHODEN: ... 3–69

3.1 Zelllinien ... 3–69
3.1.1 LCC-18 ... 3–69
3.1.2 INR1-G9 ... 3–70
3.1.3 BON ... 3–70
3.2 Medien: ... 3–71
3.2.1 HITES-Medium: ... 3–71
3.2.2 INR1-G9-Medium: ... 3–71
3.2.3 BON-Medium: ... 3–72
3.2.4 Material: ... 3–72
3.3 Methoden ... 3–73
3.3.1 Stabil transfizierte Zelllinien ... 3–73
3.3.2 Zellkultur ... 3–73
3.3.2.1 Routinekultur von Zellen ... 3–73
3.3.2.2 Nährmedienwechsel ... 3–73
3.3.2.3 Passagierung ... 3–74
3.3.2.4 Kryopräservation und Lagerung von Zellen ... 3–74
3.3.2.5 Auftauen kryopräservierter Zellen ... 3–75
3.3.2.6 Material und Geräte ... 3–75

3.3.3 Somatostatin-Bindungsassay 3–76
3.3.3.1 Vorbereitung der Zellen 3–76
3.3.3.2 Durchführung 3–77
3.3.4 cAMP-EIA 3–78
3.3.4.1 Vorbereitung der Zellen 3–79
3.3.4.2 Vorbereitung der Reagenzien 3–79
3.3.4.3 Durchführung 3–81
3.3.4.4 Datenverarbeitung 3–83
3.3.5 Chromogranin A-Promotor-Assay 3–84
3.3.5.1 Vorbereitung 3–84
3.3.5.2 Transiente Transfektion 3–85
3.3.5.3 Durchführung der Messung 3–86
3.3.6 Proteinbestimmung 3–86
3.3.6.1 Durchführung 3–87
3.4 Chemikalien, Enzyme, Proteine und Lösungen 3–87
3.4.1 Chemikalien: 3–87
3.4.2 Lösungen: 3–89

4 ERGEBNISSE: 4–90

4.1 Somatostatin-Rezeptor-Bindungsstudien 4–91
4.1.1 Versuche mit SST-14: 4–95
4.1.2 Versuche mit SST-28: 4–99
4.1.3 Versuche mit Poly-SST: 4–102
4.2 cAMP-Enzymimmunoassay 4–108
4.2.1 Versuche mit SST-14: 4–109
4.2.2 Versuche mit SST-28: 4–111
4.2.3 Versuche mit Poly-SST: 4–113
4.3 Chromogranin A-Promotor-Studien 4–116

5 DISKUSSION: 5–118

5.1 Ergebnisse im Vergleich zu bestehender Literatur 5–118
5.2 Hauptversuch in kritischer Betrachtung 5–119
5.2.1 Somatostatin-Bindungsassays 5–119
5.2.2 cAMP-Enzymimmunoassay 5–120

5.2.3 Chromogranin A-Promotor-Studien 5–120
5.2.4 Versuche mit Dextran-konjugiertem Somatostatin.....5–121
5.3 Ergebnisse im Kontext.....5–123

6 ZUSAMMENFASSUNG:.....6–125

7 LITERATURVERZEICHNIS:.....7–126

8 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN:.....8–153

9 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN:.....9–158

10 ANHANG:.....10–161

10.1 Erläuterung: Generierung stabil transfizierter SSTR-Subtyp-Klone.....10–161
10.1.1 Entwicklung der SSTR-Gene exprimierenden LCC-18-Klone.....10–161
10.1.2 Erstellung der Plasmide zur stabilen Transfektion.....10–164
10.1.3 Erste Identifikation positiver Klone 10–166
10.2 Lebenslauf.....10–168
10.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....10–172
10.4 Publikationen, Vorträge und Poster.....10–173
10.5 Ehrenwörtliche Erklärung.....10–174
10.6 Danksagung 10–175

1 Einleitung:

1.1 Einführung

Die Regelungsmechanismen des hormonellen Systems unseres Körpers gehören noch heute zu den wohl spektakulärsten Forschungsgebieten innerhalb der Humanmedizin und ihrer artverwandten Fachbereiche.
Nicht zuletzt durch die Einführung der Techniken der Molekularbiologie konnten in den letzten Jahren und Jahrzehnten viele, zum Teil bahnbrechende Erkenntnisse über die „Kommunikation" zwischen Zellen und Geweben über Botenstoffe sowie die Reaktion innerhalb einer Zelle nach Einwirkung eines Botenstoffes erlangt werden. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen beschäftigt sich seither intensiv mit dem weiten Feld der Botenstoffe, ob nun im Bereich des Nervengewebes in Form der so genannten Neurotransmitter oder dem übrigen Körper in Form der Hormone, um ebenfalls Antworten auf die, durch die Beantwortung bestehender Fragen entstandenen Rätsel zu finden.
Die Ergebnisse ihrer wissenschaftlichen Arbeit fanden schnell Einzug in den klinischen Bereich der Medizin, wo diese Neuerungen dankbar in die verschiedensten therapeutischen Regimes der unterschiedlichsten Erkrankungen eingegliedert wurden. Große Hoffnungen und Erwartungen richten sich daher an die Grundlagenwissenschaft, bestehende Unklarheiten nach und nach auszuräumen und so zur Verbesserung der Patientenversorgung, nicht zuletzt im Hinblick auf eine gesteigerte Effektivität und Effizienz, beizutragen.

Diese Arbeit nun fokussiert auf das Peptidhormon Somatostatin und hierbei speziell auf das mit dessen Wirkungsweise in Verbindung stehende System aus Rezeptoren sowie den letztlich auf zellulärer Ebene resultierenden Effekten einer hormonellen Stimulation.

1.2 Somatostatin - das hormonelle System

1.2.1 Allgemein

Der Aufschwung des Somatostatins (SST) zu einem der als im Organismus am weitesten verbreitet erkannten Botenstoffe begann 1968, als Krulich und Kollegen anhand von Studien am Rattenhypothalamus einen, auf ausschließlich einzelne Regionen des Organs begrenzt vorkommenden Faktor beschrieben, der die Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) inhibierte (Krulich, Dhariwal et al. 1968). Die chemische Struktur dieses Faktors, der zwischenzeitlich u. a. auch als „Growthhormone release inhibitory factor" oder „Somatotropine release inhibitory factor" (SIRF) bekannt wurde, konnte schließlich 1973 aufgeklärt werden (Brazeau, Vale et al. 1973; Hokfelt, Effendic et al. 1975). Um diesen Zeitraum herum gelang unterschiedlichsten Arbeitsgruppen, vornehmlich an Tiermodellen, der Nachweis von SST in verschiedenen Geweben, sowohl im zentralen Nervensystem als auch in vielen peripheren Organen (Hokfelt, Effendic et al. 1975; Patel and Reichlin 1978; Reichlin 1983). Man fand SST letztlich in allen Vertretern der Säugetiere und in mehr oder minder stark abgewandelten Formen bei Nicht-Säugetieren wie z. B. dem Anglerfisch sowie im Pflanzenreich (Reichlin 1983; Patel 1992), woraus geschlossen wurde, dass es sich bei SST um ein phylogenetisch sehr altes Hormonsystem handeln musste.
In allen Fällen wurden beim Säuger als aktive Botenstoffe das 14 Aminosäuren lange SST-14 bzw. das N-terminal längere SST-28 (Pradayrol, Jornvall et al. 1980), mit einer Gesamtlänge von 28 Aminosäuren, erkannt.

Einer der bemerkenswertesten Unterschiede zwischen Säugern und Nicht-Säugern war hierbei, dass Säuger ein einziges, ubiquitär vorkommendes Gen (preproSST-I), welches für das Vorläuferpeptid Preprosomatostatin kodiert, besitzen. Bei Nicht-Säugern wie den Fischen und Amphibien gelang dagegen der Nachweis zweier Gene namens preproSST-I und preproSST-II. Ersteres kodiert exakt für das bei Säugern gefundene SST-14. Auch das N-terminale Ende des preproSST-I stellt eine, zwischen Säugern und Nicht-Säugern hochgradig konservierte Sequenz da, denn man findet bei beiden als Peptid unbekannter Funktion das Preprosomatostatin$_{1\text{-}10}$. Dies unterstreicht ebenfalls die Vermutung, dass es sich bei SST um ein in der Entwicklung bereits sehr früh entstandenes Regulationsinstrument handelt.

Das Produkt des Genes preproSST-II stellt ein von Tierart zu Tierart besonders N-terminal unterschiedlich variierendes Analogon des SST-28 dar, dessen Übereinstimmung mit dem Säuger-SST-28 nur bei 40%-66% liegt (Patel 1999).

Beide preproSST-Gene werden jeweils ausschließlich alleine in einer Zelle exprimiert, wobei das SST-28-Analogon bei Fischen einzig nur in den Pankreasinseln gefunden werden kann, das SST-14 jedoch in ihrem Organismus ähnlich weit verbreitet ist wie beim Säuger (McDonald, Greiner et al. 1987), und sorgen bei diesen Tieren somit für das Vorkommen zweier spezifischer Populationen somatostatinproduzierender Zellen.

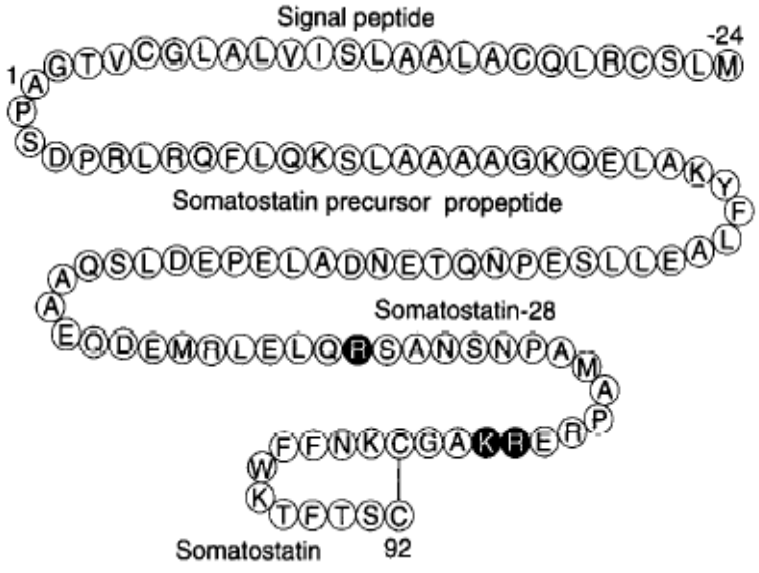

Abbildung 1: Peptidsequenz des humanen SST-Vorläufers Preprosomatostatin, aus dem nach Abspaltung der Signalsequenz der eigentliche Vorläufer Prosomatostatin wird. Dunkel markiert ist die Position der mono- bzw. dibasischen Prozessierungsstelle, die zu SST-14 bzw. SST-28 führt (Reisine and Bell 1995).

Der Grund, warum man bei Fischen zwei preproSST-Gene und bei Säugern nur ein Gen findet, erklärt man durch eine Genduplikation, die im Rahmen der Entwicklung stattgefunden haben soll.

Ein ähnlicher Zwischenfall vor ~400 Millionen Jahren soll für die Existenz des Cortistatins (CST), einem Polypeptid mit 17 bzw. 29 Aminosäuren beim Menschen und 14 bzw. 29 Aminosäuren bei der Ratte, welches dem SST sehr ähnlich ist und ab den Amphibien bis hin zum Menschen gefunden werden kann, verantwortlich sein (De Lecea, Criado et al. 1996; Tostivini, Likrmann et al. 1996; Patel 1999). Zunächst nahm man an, das CST sei in seinem Vorkommen nur auf das Zentralnervensystem begrenzt

und man erwartete aus weiterer Forschungsarbeit den Nachweis eigenständiger CST-Rezeptoren. Doch bis heute konnten diese nicht gefunden werden. Stattdessen zeigen aktuelle Untersuchungen, dass CST vielmehr ein dritter physiologischer Ligand an Somatostatinrezeptoren zu sein scheint. Hierbei ließ es sich teilweise in den selben Geweben wie SST nachweisen, teilweise aber auch an Orten, wo SST nicht produziert wurde, somit dort anstelle des SST über die SSTR zu wirken vermag (Dalm, van Hagen et al. 2004; Gottero, Prodam et al. 2004).

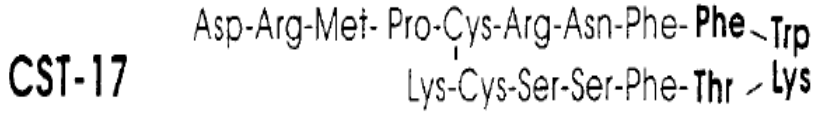

Abbildung 2: Aminosäuresequenz des beim Menschen gefundene Cortistatin-17 (Patel 1999)

1.2.2 Verteilung somatostatinproduzierender Zellen

SST-produzierende Zellen stellen sich typischer Weise als Neuron oder als sekretorisch aktive Zelle dar (Larsson, Golterman et al. 1979; Finley, Maderdrut et al. 1981; Reichlin 1983; Patel, Greenwood et al. 1995) und sind im Organismus sehr weit verbreitet. Die höchsten Dichten wurden im Bereich des zentralen (~ 25% der nachweisbaren Gesamtimmunoreaktivität auf SST in Ratten (Patel and Reichlin 1978; Patel 1999)) und peripheren Nervensystems, des endokrinen Pankreas (~ 5%) und des Darms (~ 65%) gefunden. Es gelang im weiteren Verlauf auch der Nachweis in der Schilddrüse, den Nieren und Nebennieren, der Prostata und der Plazenta (Reichlin 1983; Patel 1992). Heute weiß man, dass sich SST-produzierende Zellen in praktische jedem Gewebe finden.

Ein interessanter Aspekt im Hinblick auf die breite Verteilung SST-produzierender Zellen im zentralen Nervensystem, wo sie häufig als Subpopulation GABAerger Neurone gefunden werden (Chesselet, Soghomonian et al. 1995), ist einerseits ihre besonders große Dichte im Bereich der Strukturen des limbischen Systems, der verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus, des Striatums (...hier besteht auffälligerweise kein Zusammenhang zu GABAergen Neuronen (Chesselet, Soghomonian et al. 1995)) und primär sensorischer Bahnen, wogegen andererseits das Kleinhirn als einziges Organ

des Zentralnervensystems keinerlei SST-produzierenden Zellen zu enthalten scheint (Finley, Maderdrut et al. 1981; Johannson, Hokfelt et al. 1984).
Im Gastrointestinaltrakt finden sich SST-produzierende Zellen sowohl als endokrin aktiver Bestandteil der Mukosa oder funktionell zusammengehöriger Gewebe, als auch in Form von Neuronen der Plexus submucosus und myentericus (Hokfelt, Effendic et al. 1975; Larsson, Golterman et al. 1979). Eine besonders hohe Dichte konnte im Bereich der Pankreasinseln festgestellt werden, wo sie sich als δ-Zellen in funktioneller Nachbarschaft zu Insulin-, Glukagon- und Pankreatisches-Polypeptid-produzierenden Zellen befinden (Dubois 1975).
In der Schilddrüse konnte nachweisbares SST einer Subpopulaton von Calcitonin-produzierenden C-Zellen zugeordnet werden (Reichlin 1983). Darüber fand man eine stimulierbare SST-Produktion in Zellen der spezifischen und unspezifischen Abwehr (Aguila, Dees et al. 1991; Karalis, Mastrorakos et al. 1995; Elliot, Blum et al. 1998; Ferone, van Hagen et al. 1999)

1.2.3 Effekte des Somatostatins

Die Effekte, die den beiden Somatostatinformen im Organismus zukommen, sind, analog zur weiten Verbreitung somatostatinproduzierender Zellen, sehr unterschiedlich, bleiben jedoch letztlich immer durch den Einfluss des SST auf die Zellsekretion und/oder Zellproliferation erklärbar.
Obwohl SST grundsätzlich als der „Prototyp" des inhibitorischen Regulators gilt, konnte eine aktivierende Wirkung auf Teile der in die Migration involvierten Zentren im Gehirn nachgewiesen werden (Raynor, Lucki et al. 1993).

Man findet SST als Neurotransmitter, als parakrines/autokrines Hormon oder auch als wichtigen Bestandteil endokriner Regulationsmechanismen der zellulären Sekretion, der Neuromodulation, der Kontraktilität glatter Muskulatur, der Nährstoffabsorption sowie des Zellwachstums (Reichlin 1983; Patel 1999).
Durch seine weite Verbreitung wird SST mittlerweile eine zunehmend größere Rolle innerhalb der Entwicklung verschiedenster Erkrankungen, wie z. B. Neoplasien oder Entzündungen, Diabetes mellitus, AIDS oder verschiedenen neurologischen Krankheiten, wie der präsenilen Demenz vom Alzheimer Typ und der Depression,

beigemessen (Bissette and Myers 1992; Epelbaum, Dournaud et al. 1994; Patel and Srikant 1997).

1.2.3.1 Effekte im Bereich des Zentralnervensystems

Im Gehirn soll SST Einfluss auf die Merkfähigkeit und das Verhalten haben und in kognitive, lokomotive, sensorische sowie autonome Funktionen eingebunden sein (Reichlin 1983; Bissette and Myers 1992; Patel 1992; Raynor, Lucki et al. 1993; Epelbaum, Dournaud et al. 1994; Chesselet, Soghomonian et al. 1995). Ihm fallen inhibitorische Funktionen innerhalb der Regulation der Sekretion von Dopamin aus dem Mittelhirn sowie von Noradrenalin, TRH, CRH und endogenem SST aus dem Hypothalamus zu.
Auf der Ebene der Hypophyse unterdrückt SST sowohl die basale als auch die stimulierte GH-Freisetzung (Iranmanesh, Bowers et al. 2004) sowie die TSH-Sekretion, wogegen die Ausschüttung von LH, FSH und Prolaktin unbeeinflusst bleibt. Bemerkenswert hierbei ist allerdings, dass SST die bei Vorliegen einer Akromegalie erhöhten Prolactinspiegel zu senken vermag. Ähnliches gilt für die ACTH-Sekretion, die unten Normalbedingungen ebenfalls unbeeinflusst bleibt, jedoch im Falle eines durch ACTH-produzierende Tumoren hervorgerufenen Cushing-Syndroms durchaus durch SST supprimierbar sein kann (Patel, Greenwood et al. 1995).

1.2.3.2 Extrazerebrale Effekte

SST gilt als sehr potenter Regulator u. a. der Funktion hormonell aktiver Gewebe wie z. B. des Pankreas oder der Schilddrüse, der Zellen des Gastrointestinaltraktes und der Immunzellen.

Es wird sowohl die Sekretion aller endokriner Hormone (Insulin, Glucagon, PP, VIP...) inhibiert als auch eine generelle Reduktion der exokrinen Funktionen (Magensäure, Pepsin, Galle, Kolonsekret...) des gesamten Gastrointestinaltraktes und seiner großen Drüsen herbeigeführt (Reichlin 1983; Patel 1992; Epelbaum, Dournaud et al. 1994; Patel 1999). Zusätzlich führt SST zu einer Vasokonstriktion mit Schwerpunkt auf dem

Splanchnikusgebiet und zu einer generellen Reduktion der Magen-Darm-Motilität sowie der Kontraktilität der Gallenblase.

SST vermag in der Schilddrüse sowohl die TSH-stimulierte Ausschüttung von T_3 und T_4 als auch die Sekretion von Calcitonin und in der Nebenniererinde die durch Angiotensin II stimulierte Produktion von Aldosteron sowie die der Katecholamine im Nebennierenmark zu inhibieren. Des weiteren greift SST inhibitorisch in die Regulation der Reninausschüttung sowie in die ADH-Funktion der Niere ein, blockiert die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren (IGF1, EGF, PDGF) und Zytokine (IL6, IFN-γ) (Blum, Metwali et al. 1992; Hayry, Raisanen et al. 1993; Elliot, Blum et al. 1998) und hat steuernde Funktion auf die Proliferation von Lymphozyten und der Vorläufer von Entzündungszellen, der Darmmukosa sowie von Knorpel- und Knochenzellvorläufern (Weiss, Reddi et al. 1981; Reichlin 1983; Patel 1992; Karalis, Mastrorakos et al. 1994; Aguila, Rodriguez et al. 1996; Takeba, Suzuki et al. 1997; Patel 1999).

1.2.4 Produktion und Degeneration des Somatostatins

Beide Formen des Somatostatin werden, wie vergleichbare andere sekretorische Peptide auch, aus einem größeren Vorläuferpeptid gewonnen.

Beim Menschen findet sich das für das für beide SST-Varianten kodierende Gen auf dem langen Arm von Chromosom 3. Als Translationsprodukt der mRNA an Ribosomen findet sich nach Translokation in das endoplasmatische Retikulum zunächst das 116 AS lange Preprosomatostatin (siehe Abb. 1, S. 1-11), aus dem nach Abspaltung der Signalsequenz der direkte Vorläufer Prosomatostatin mit einer Länge von 92 AS entsteht. Die folgende Verarbeitung des Peptids betrifft bevorzugt das C-terminale Ende mit der monobasischen und der dibasischen Schnittstelle.

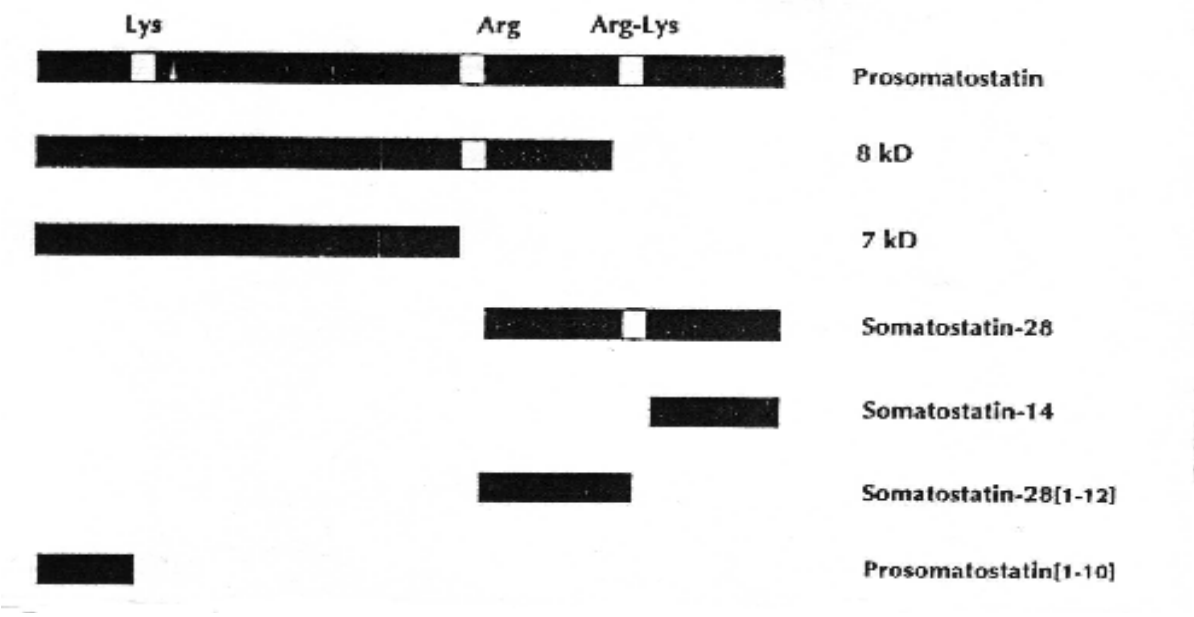

Abbildung 3: Darstellung der bekannten Produkte des Prosomatostatins, einschließlich der Positionen zur enzymatischen Spaltung (Patel and Galanopoulou 1995).

Die Lokalisation des weiteren Processings ist noch nicht vollständig geklärt, man fand jedoch Hinweise für eine effiziente Umwandlung von Prosomatostatin sowohl in SST-14 als auch SST-28 im trans-Golgi-Bereich, ggf. sogar in einem pre-Golgi-Kompartiment, die letztlich in, für beide SST-Formen jeweils spezifischen Subpopulationen von Sekretgranula mündet.
Entscheidend dafür, welches der beiden SST-Varianten gebildet wird, könnten einerseits die Ausstattung der Zelle mit speziellen Endoproteasen, andererseits ein bisher nicht identifizierter Bereich der N-terminalen Sequenz der Pro-Hormons sein (Patel and Galanopoulou 1995).

Über die anderen Produkte, die außer den beiden SST-Varianten entstehen, ist nur wenig bekannt. Grundsätzlich entstehen jeweils das SST-14 und das 8kD-Peptid bzw. das SST-28 und das 7kD-Peptid in äquimolaren Mengen.
Eine Umwandlung von SST-28 in SST-14, die durch das weitere Vorhandensein der dibasischen Schnittstelle in der Sequenz des SST-28 prinzipiell denkbar wäre, findet nicht statt (Patel and Galanopoulou 1995).
Ebenfalls konnte den übrigen Produkten der Prosomatostatinprocessings bislang keine spezifische Funktion zugemessen werden (Patel 1999).

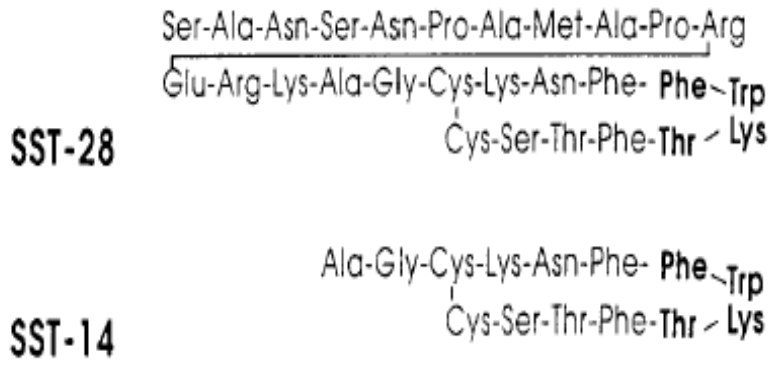

Abbildung 4: Peptidsequenz der beiden humanen SST-Varianten. Hervorgehoben ist jeweils der Teil der Sequenz, der für die biologische Aktivität entscheidend ist. Dabei gelten das Trp in Pos. 8 und das Lys in Pos. 9 als essenziell, wogegen das Phe[7] und das Thr[10] geringgradig verändert werden können (z. B. Phe in Tyr bzw. Thr in Ser oder auch Val) (Patel 1999).

Der Abbau des SST geschieht im Organismus sehr schnell, wobei der führende Abbauprozess die Spaltung durch unspezifische Proteasen darstellt (Marks and al 1975). Die Halbwertszeit des Hormons im Plasma liegt dabei lediglich bei etwa 3 – 4 Minuten.

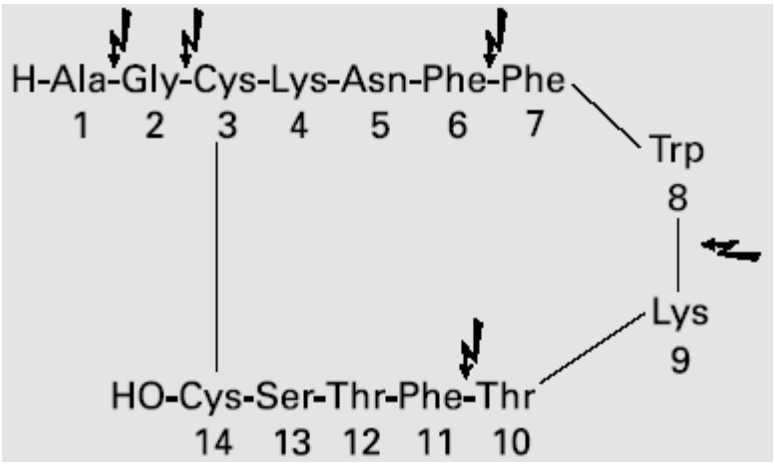

Abbildung 5: Potentielle Prozessierungsstellen der unspezifischen Proteasen beim Abbau des SST-14 (Scarpignato and Pelosini 2001).

1.2.5 Regulation der Genexpression und Sekretion

Einen weiteren Hinweis auf die zentrale Stellung des Somatostatins innerhalb des hormonellen Systems stellt die Einflussnahme eines sehr breiten Spektrums von Botenstoffen auf seine Sekretion dar. Das Spektrum dieser Agenzien reicht dabei von Ionen und Nahrungsstoffen, über Neurotransmitter und Neuropeptide sowie klassischen Hormonen und Wachstumsfaktoren, bis hin zur großen Gruppe der Zytokine (Reichlin 1983; Patel 1992; Patel 1999; Patel YC, Liu JL et al. 1999). Dabei scheinen einige dieser Substanzen ihren Effekt unspezifisch bei allen vorkommenden SST-produzierenden Zellen zu erzeugen, wogegen für andere in Bezug auf Ihre Effektorzellen eine Gewebespezifität nachweisbar ist. Eine Erklärung hierfür wäre zum einen eine gewebegebundene Expression von Rezeptoren für diese Botenstoffe oder zum anderen auch ein indirekter, über die Freisetzung anderer Peptide oder Transmitter führender Effekt. Als bei allen SST-produzierenden Zellen, unabhängig von ihrer Lokalisation oder Funktion, zur Sekretion führende Endstrecke gilt die Depolarisation der Membran.
Betrachtet man nun einzelne Agenziengruppen im Hinblick auf ihre Einflussnahme auf die Somatostatinausschüttung näher, zeigen sich dort jedoch deutliche Unterschiede für verschiedene Gewebe. Für Nährstoffe gilt zum Beispiel, dass sowohl Glukose als auch Fette und Aminosäuren die SST-Ausschüttung der pankreatischen D-Zellen deutlich stimulieren, wogegen im Falle der hypothalamischen Neurone eine Inhibierung der SST-Ausschüttung durch Glukose und sogar eine fehlende Reaktion auf Stimulierung mit Aminosäuren nachgewiesen werden konnte. Für die SST-produzierenden Zellen des Darms wurde gezeigt, dass diese ausschliesslich auf intraluminale Nährstoffe mit einer erhöhten SST-Ausschüttung reagierten – in der Zirkulation befindliche Nährstoffe waren ohne Einfluss (Patel 1992; Patel YC, Liu JL et al. 1999).

Die sehr umfangreiche Gruppe der Neurotransmitter und Neuropeptide scheint ausnahmslos einen Einfluss auf die SST-Sekretion zu haben, allerdings mit unterschiedlicher Potenz und Gewebespezifität. Innerhalb dieser Gruppe werden u. a. Glucagon, GHRH und CRH eine steigernde Wirkung, GABA und Opiaten eine generell inhibierende Wirkung zugeschrieben (Patel 1992; Epelbaum, Dournaud et al. 1994; Patel YC, Liu JL et al. 1999).

In den verschiedenen Studien zur Wirkung anderer Hormone auf das SST-System konnte belegt werden, dass sowohl GH als auch die Schilddrüsenhormone zu einer Zunahme der hypothalamischen SST-Ausschüttung führten (Patel 1992; Patel YC, Liu JL et al. 1999). Glukokortikoide zeigten sogar einen biphasischen Einfluss: Niedrige Dosen bewirkten eine Steigerung, hohe Dosen dagegen eine Inhibierung der SST-Sekretion. Auch im Falle weiterer Hormone konnte eine Gewebespezifität ihrer Wirkung auf das SST-System nachgewiesen werden. Insulin, als Beispiel, steigert die hypothalamische SST-Sekretion, unterdrückt diese jedoch in den SST-produzierenden Zellen der pankreatischen Inseln und des Darms.

Die für die Transkription des Somatostatingens entscheidende Regulationsregion wurde bislang besonders gut für die Ratte untersucht. Man findet hier eine ganze Reihe von regulatorischen Elementen, die die Einflussnahme der verschiedenen Faktoren auf die SST-Produktion ermöglichen. Neben einem, der beim Menschen gefundenen TATA-Box ähnlichen Motiv finden sich ein cAMP response element (CRE), zwei glucocorticoid response elements (GRE) und ein insulin response element. Zusätzlich konnten gewebespezifische Promotorelemente nachgewiesen werden, die in Zusammenhang mit dem CRE stehen. Eine Vielzahl anderer Stoffe sind ebenfalls dazu befähigt, die SST-Gen-Transkription zu beeinflussen.
Eine Stimulation der mRNA-Level fand sich unter anderem bei verschiedenen Mitgliedern der Wachstumsfaktor-/Zytokinfamilie (GH, IGF-I, IGF-II, IL-1, TNF-α, IL-6, IFN-γ und IL-10), den Glucokortikoiden, dem Testosteron und dem Estradiol. Eine Inhibierung beispielsweise dagegen ebenfalls im Falle der Glucokortikoide – analog zu deren bereits beschriebenen biphasischen Einflussnahme auf die SST-Ausschüttung -, dem Insulin, dem Leptin und im Falle des TGF-β (Scarborough, Lee et al. 1989; Elliot, Blum et al. 1998; Patel YC, Liu JL et al. 1999).
Zu den intrazellulären Mediatoren, die einen Einfluss auf die SST-Gen-Expression haben, gehören cAMP, Ca^{2+}, cGMP und Stickstoffmonoxid (NO) (Aguila 1994). Eine hervorragende Stellung in Bezug auf den, die SST-Funktion regulierenden Signalweg wird dabei dem cAMP zugeschrieben.
Dieses gilt als potenter Aktivator sowohl der Transkription als auch der Sekretion von SST und seine Wirkung auf Genomebene ist mittlerweile gut bekannt. Wie oben bereits angedeutet, wird die cAMP-Wirkung über das CRE vermittelt. Dieses stellt die Bindungsstelle für ein 43-kDA schweres Kernprotein namens CREB (cAMP response element binding protein) dar, dessen transkriptionelle Effizienz wiederum über Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A reguliert wird. Um die

eigentliche Transkription in Gang zu bringen, wird jedoch noch das 265-kDa schwere CBP (CREB binding protein) benötigt, da dies die Andockung des Polymerase-II-Komplexes an die Promotorregion CRE vermittelt (Kowk, Lundblad et al. 1994; Montminy, Brindle et al. 1995).

Ca^{2+} vermittelt seine Induktion des SST-Gens durch die Phosphorylierung des CREB mittels der Ca^{2+}-abhängigen Proteinkinase I und II. Der genaue Weg der Stimulierung der SST-Gen-Transkiption ist im Falle des IGF-I, des IGF-II und der Zytokine, des Estradiols, des Testosterons, des cGMP und des NO bislang noch nicht ausreichend geklärt.
Der inhibierende Effekt des TGF-β auf die SST-Transkription erscheint post-transkriptionell durch eine gesteigerte mRNA-Degeneration vermittelt zu sein. Ähnliches gilt ebenfalls für den dualen Effekt der Glucokortikoide: Die steigernde Wirkung wird direkt durch zwei in der SST-Gen-Promotorregion vorhandene GREs (Glucocorticoid response elements) vermittelt, die Reduktion der mRNA-Mengen durch höhere Dosen erfolgt wiederum durch gesteigerte Degeneration der SST-mRNA nach der Transkription (Patel, Liu et al. 1999).

1.3 Die Somatostatinrezeptorfamilie

1.3.1 Identifikation der Somatostatinrezeptoren

Die Wirkung des Somatostatins wird durch spezielle Plasmamembranrezeptoren (SST-Rezeptoren, SSTRs), die mit hoher Affinität binden, vermittelt. Sie wurden als erstes durch eine Arbeitsgruppe um Agnes Schönbrunn an der Ratten-Zelllinie GH_4C_1 mittels Bindungsstudien an ganzen Zellen nachgewiesen (Schonbrunn and Tashjian 1978). Weiterführende Studien mit anderen Techniken wie Bindungsanalysen an Membranen, in vivo- und in vitro-Autoradiographie, kovalentem Crosslinking sowie der Aufreinigung gelöster Rezeptoren zeigten, dass SSTR in unterschiedlichsten Dichten in verschiedenen Geweben des Organismus wie z.B. Hirn, endo- und exokrinem Pankreas, Nieren und Nebennieren, Schilddrüse und Immunzellen vorkommen (Patel, Murthy et al. 1990; Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel 1997; Patel and Srikant 1997; Reubi, Horisberger et al. 1998).

Auch konnten eine Reihe von Zelllinien etabliert werden, die zahlreiche SSTRs auf ihren Membranen tragen. Diese stammen zum Teil von Nagern, zum Teil von humanen Geweben oder auch Tumoren ab (Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel 1997; Patel and Srikant 1997).

Die Hypothese der Existenz mehr als eines SSTR-Subtypes kam auf, als man in Studien an Hirn und Inselgewebe unterschiedliche Rezeptorbindungsstärken und Effekte für SST-14 und SST-28 beobachten konnte (Mandarino, Stenner et al. 1981; Srikant and Patel 1981).
Weiterführende Untersuchungen unterstützten diese Hypothese und erweiterten sie zu der Erkenntnis, dass es nicht nur bestimmte SST-14 und SST-28 selektive Rezeptoren gab, sondern eine Heterologie der SST-14-Bindungsstelle bestand, die eine Einteilbarkeit in zwei Subklassen, abhängig von der Sensitivität für ein zwischenzeitlich synthetisiertes Oktapeptid-SST-Analogon (SMS201-995 oder Octreotide), denkbar machte (Tran, Beal et al. 1985). Als identische Ergebnisse für das Hexapeptid-SST-Analogon MK678 veröffentlicht wurden, führte dies zu Etablierung zweier pharmakologischer Subklassen der SSTR, der SRIF I, die eine Bindung von Oktapeptid- und Hexapeptid-Analoga zeigten, und SRIF II, bei denen diese ausblieb (Hoyer, Bell et al. 1995; Reisine and Bell 1995).
Erste Versuche, über chemisches Crosslinking rezeptorgebundener Radioliganden Erkenntnisse über das SSTR-Molekül zu erlangen, brachten zunächst weit divergierende Werte für das Molekulargewicht (21 – 228 kDa) zu Tage (Patel, Murthy et al. 1990; Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995). Die Anwendung von Photoaffinitätslabeling- und –aufreinigungsstudien, die wesentlich spezifischer waren als die vorher genutzten Methoden, ergaben Werte für verschiedene SSTR-Proteine im Bereich 32 – 85 kDa, die gewebespezifisch exprimiert wurden und einen selektiven Agonismus für SST-14 oder SST-28 zeigten. In der Ratte fanden sich beispielsweise eine 58 kDa-Form, die in den meisten Geweben gefunden werden konnte und zusätzlich ein 32 kDa- sowie ein 80 kDa-Molekül, deren Vorkommen ausschließlich auf das Gehirn beschränkt war (Srikant, Murthy et al. 1992).

1.3.2 Molekulare Klonierung der Somatostatinrezeptoren

Es brauchte genau 20 Jahre nach der Entdeckung des Somatostatins, bis die Struktur des ersten SSTR entschlüsselt werden konnte (Yamada, Post et al. 1992). Kurze Zeit darauf waren fünf eigenständige SSTR-Gene identifiziert und gaben damit den Blick auf eine weitaus umfangreichere Rezeptorfamilie, als ursprünglich aus pharmakologischen und biochemischen Kriterien erwartet worden war, frei (Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel 1997; Patel and Srikant 1997).

Die ersten zwei SSTR wurden aus RNA humaner pankreatischer Inseln geklont und mit SSTR1 und SSTR2 benannt. Gleichzeitig wurde der SSTR2 der Ratte identifiziert (Kluxen, Bruns et al. 1992). Diese Erfolge wurden schnell durch die Klonierung des SSTR1 der Ratte, des SSTR2 des Rinds und des Schweins sowie des SSTR3, des SSTR4 und des SSTR5 der Maus, der Ratte und des Menschen komplettiert (Bruno, Xu et al. 1992; Li, Forte et al. 1992; Meyerhof, Wulfsen et al. 1992; O'Carroll, Lolait et al. 1992; Yamada, Reisine et al. 1992; Yasuda, Rens-Domiano et al. 1992; Corness, Demchyshyn et al. 1993; Demchyshyn, Skrikant et al. 1993; Rohrer, Raulf et al. 1993; Panetta, Greenwood et al. 1994; Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel and Srikant 1997).
Interessanter Weise fehlen in den Genen der SSTR1, -3, -4 und -5 die klassischen Introns (Patel 1999). Dagegen fand man bei Untersuchungen am SSTR-2-Gen der Maus ein kryptisches Intron am 3'-Ende des kodierenden Bereichs, was durch Splicing zu zwei Varianten führt, einer langen (SSTR2A) und einer kurzen Form (SSTR2B) (Vanetti, Kouba et al. 1992; Patel, Greenwood et al. 1993). Aus dem betreffenden Exon des Maus-Gens folgen somit entweder eine 15 Aminosäuren lange Information nach dem Splicing oder eine über 38 Aminosäurereste verfügende ungeschnittene Kette (Patel, Greenwood et al. 1993). Beide SSTR2-Varianten unterscheiden sich ausschliesslich nur in der Länge dieses, letztendlich den zytoplasmatischen Schwanz des Rezeptors ergebenden Translates und konnten bei anderen Nagern, wie der Ratte oder dem Hamster, ebenfalls nachgewiesen werden.

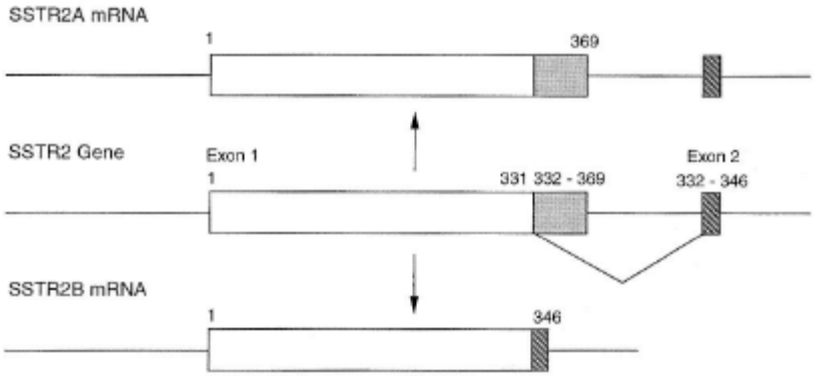

Abbildung 6: Schematische Darstellung des alternativen Varianten des Maus SSTR2 nach Splicing und die Länge der jeweiligen Aminosäuresequenz (Reisine and Bell 1995).

Somit ergeben sich für den Menschen fünf mögliche SSTR-Subtypen ähnlicher Grösse, die allesamt die für die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) typischen sieben Transmembrandomänen in α-Helix-Form aufweisen.

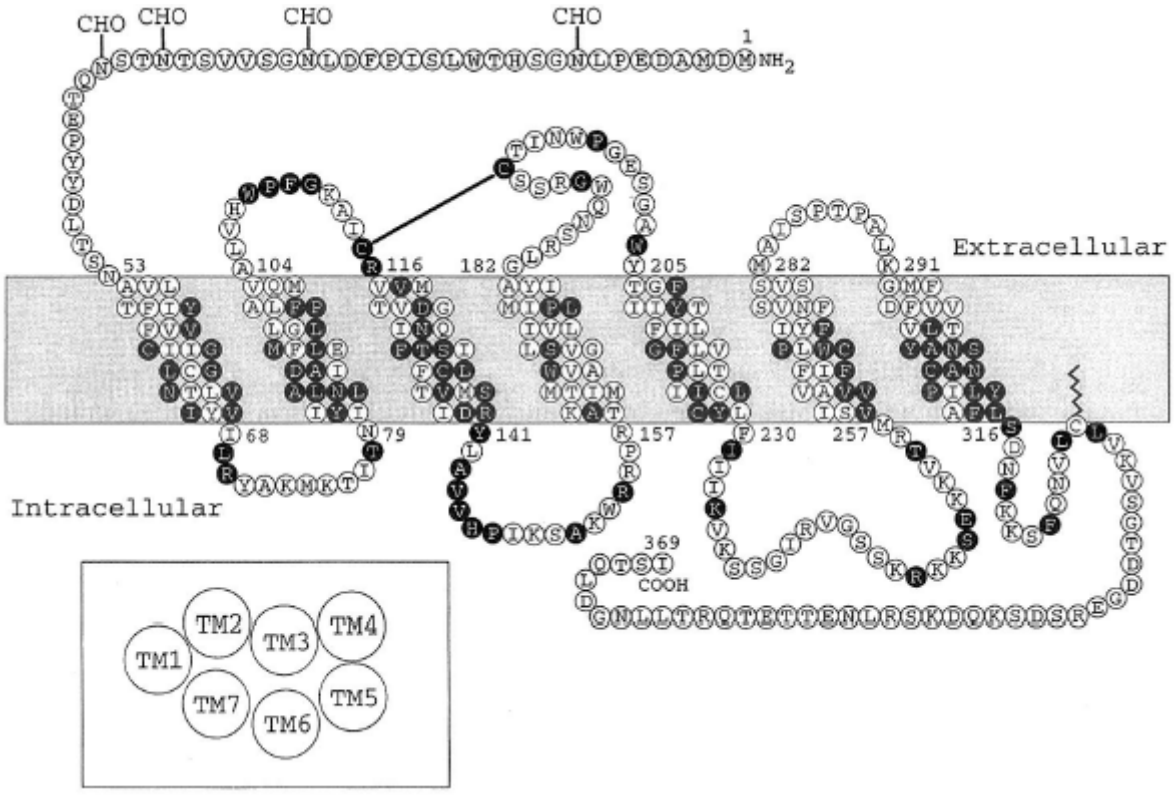

Abbildung 7: Modell zur Darstellung der Struktur der Aminosäuresequenz in der Plasmamembran am Beispiel des humanen SSTR2 (Reisine and Bell 1995)

Die jeweilige Geninformation der fünf SSTR befindet auf unterschiedlichen Chromosomen. Die durch sie verschlüsselte Information kodiert für Rezeptorproteine mit einer Länge zwischen 364 und 418 Aminosäureresten, wobei man im Vergleich der Sequenzen die größten Übereinstimmungen im Bereich der Transmembrandomänen (55 – 70% der Sequenz) und die größten Unterschiede dagegen an der amino- bzw. carboxy-terminalen Anteilen findet (Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel and Srikant 1997).

Subtype	Size (amino acids)		Chromosomal Location (human)
	Human	Rat	
SSTR1	391	391	14q13
SSTR2A	369	369	17q24
SSTR2B		346	
SSTR3	418	428	22q13.1
SSTR4	388	384	20p11.2
SSTR5	364	363	16p13.3

Abbildung 8: Chromosomlokalisation und Länge der Aminosäuresequenz der humanen SSTR (Reisine and Bell 1995)

Alles in allem liegt die Sequenzidentität aller SSTR untereinander zwischen 39 und 57%. Nicht nur alle bislang geklonten menschlichen SSTR-Isoformen, sondern auch die anderer Spezies zeigen ein hoch konserviertes Sequenzmotiv (YANSCANPI/VLY) in der siebten Transmembrandomäne, dem somit der Status einer Erkennungssequenz zugerechnet wird.

Die fünf humanen SSTR zeigen zwischen einer und vier, für N-gekoppelte Glykosylation geeignete Stellen im Bereich des amino-terminalen Endes sowie der zweiten extrazellulären Schleife und zwischen drei und acht mögliche Erkennungsmotive für eine Proteinphosphorylisation durch die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und die Calmodulinkinase II. Diese Erkennungsmotive befinden sich im Bereich der zytoplasmatischen c-terminalen Sequenz und der zweiten sowie dritten intrazellulären Schleife. Die humanen SSTR1, -2, -4 und -5 verfügen allesamt über ein Cysteinrest 12 Aminosäuren c-terminal-wärts der siebten Transmembrandomäne, von dem angenommen wird, dass es sich hierbei um die mögliche Position eines Palmitoyl-Membran-Ankers handeln könnte, wie man ihn von einer Reihe anderer Vertreter der GPCR-Familie kennt. Bei diesen bildet eine in dieser Position kovalent gebundene Palminsäure eine vierte zytoplasmatische Schleife. Interessanterweise, findet sich beim SSTR3 des Menschen, dem diese Möglichkeit zur Bildung eines Membranankers in

genannter Weise fehlt, ein, im Vergleich zu den anderen vier Vertretern, wesentlich längerer c-terminaler Schwanz.

Die fünf SSTR-Subtypen zeigen eine bemerkenswerte Strukturübereinstimmung in Vergleich unterschiedlicher Spezies (Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995). Dabei ergaben sich eine Sequenzübereinstimmung von 94 – 99% für die SSTR1-Isoform des Menschen, der Ratte und der Maus, sowie 93 – 96% im Falle der SSTR2-Isoform des Menschen, der Ratte, der Maus, des Schweins und des Rinds. Im Vergleich zu der Identität von 88% der Sequenz des SSTR4 zwischen Mensch und Ratte, stellt sich die Sequenz des SSTR3 und -5 mit einer Übereinstimmung von 82 – 83% zwischen humanen und Nagerformen geringer konserviert dar.
Die größte Verwandtschaft zwischen den SSTR und den anderen Vertretern der GPCR findet sich bislang bei den Opioidrezeptoren, dessen σ-Rezeptor über eine Sequenzgleichheit von 37% mit dem SSTR1 der Maus verfügt (Evans, Keith et al. 1992). Hinweise auf eine variante Form des SSTR5 (Patel, Panetta et al. 1994) konnten sich bis heute nicht bestätigen.
Für Cortistatin mit seiner nachweislichen Interaktionsfähigkeit mit der fünf bekannten SSTR-Subtypen konnte bis heute kein eigener CST-Rezeptortyp nachgewiesen werden, so dass seine Wirkung bis dato nur über die SSTR-Familie erklärbar ist (Dalm, van Hagen et al. 2004). Allerdings verfügt es interessanter Weise über die Fähigkeit der Neurodepression und Schlafmodulation, die man vom SST nicht kennt (De Lecea; Patel 1997), so dass hier noch weitere Forschungsarbeit von Nöten zu sein scheint.

Eine Reihe von neuen Genen mit Sequenzähnlichkeiten zur SSTR-Familie wurden in der Zwischenzeit beschrieben, wobei zwei dieser Gene (SLC-1/GPR-24 und GPR-25) eine Sequenzhomologie von 34 – 40% mit der Transmembrandomänen der SSTR aufweisen. Allerdings fehlt ihnen sowohl das zuvor beschriebene typische Erkennungsmotiv (YANSCANPI/VLY) (Jung, Nguyen et al. 1997; Patel 1997) und der Rezeptor, für den sie kodieren, bindet weder SST noch einen anderen, bislang bekannten Liganden, so dass hier noch Aufklärungsbedarf besteht, ob es sich ggf. um eine verwandte Rezeptorfamilie handelt.

1.3.3 Die Bindungszentren der SSTR

Obwohl es bislang schon bei einigen Vertretern der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gelungen ist, die Struktur des, für die Ligandenbindung verantwortlich zeichnenden Bereiches aufzuklären, finden sich bis dato für die SSTR wenige, zum Teil uneinheitliche Daten. Forschungsergebnisse an SSTR sowie auch aus anderen GPCR-Systemen nähren die Hypothese, dass das aktive Zentrum eine, aus einigen nichtkontinuierlichen Aminosäuren innerhalb der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors gebildete Tasche darstellen könnte (Baldwin 1994; Strader, Fong et al. 1995; Greenwood, Hukovic et al. 1997). Eine alternative Hypothese geht jedoch davon aus, das keine Bindungstasche gebildet wird, sondern die Liganden statt dessen direkt mit bestimmten Bereichen der extrazellulären Schleifen und/oder der Transmembrandomänen in Verbindung treten, um so spontane Konformationsänderungen innerhalb der Rezeptorstruktur zu stabilisieren (Schwartz and Rosenkilde 1996).

Im Fall der sehr großen Proteinliganden, wie man sie beispielsweise unter den Glykoproteinhormonen findet, scheinen sich die interagierenden Aminosäurereste des Rezeptors ausschließlich im Bereich des amino-terminalen Segmentes zu befinden, wogegen biogen-aktive Amine nur mit den Transmembrandomänen reagieren sollen. Dagegen befinden sich die aktiven Zentren für mit dem SST vergleichbare Peptidliganden entweder im Bereich der extrazellulären Schleifen oder umfassen diese und die Transmembrandomänen (Gether, Johansen et al. 1993; Hjorth, Schambye et al. 1994; Schwartz and Rosenkilde 1996)
Aus dem Wissen um die Bindungsselektivität der Oktapeptidanaloga wie dem Octreotide für den humanen SSTR2 im Gegensatz zum SSTR1 heraus, versuchte eine Arbeitsgruppe um Kaupmann durch systematische Mutation aus einem humanen SSTR1 einen SSTR2 zu erzeugen (Kaupmann, Bruns et al. 1995). Sie identifizierten als für die Ligandenbindung entscheidende Aminosäurereste des humanen SSTR1 das Gln^{291} und das Ser^{305} in der sechsten bzw. siebten Transmembrandomäne. Ersetzte man diese durch die korrespondierenden Aminosäurereste Asn^{276} und Phe^{294} des SSTR2, so erhöhte sich die Affinität der SSTR1 zu Octreotide und anderen Oktapeptidanaloga um das 1000fache. Durch molekulares Modelling und die Kenntnis der Struktur des Octreotide postulierten Kaupmann et al. das Vorhandensein einer Bindungstasche als aktivem Zentrum mit hydrophoben und geladenen

Aminosäureresten ausschließlich aus den Transmembrandomänen III-VII. Ihrer Vorstellung nach sollte der entscheidende Sequenzbereich des Octreotide, bestehend aus den Aminosäuren Phr^{7}-Trp^{8}-Lys^{9}-Thr^{10}, mit den Aminosäureresten Asn^{276} und Phe^{294}, die sich an den äußeren Enden der sechsten bzw. siebten Transmembrandomäne des SSTR2 befinden und dort für eine hydrophobe Umgebung sorgen, interagieren. Diese hydrophobe Umgebung ermöglicht eine lipophile Bindung zum Phe^{7}, dem Trp^{8} und dem Thr^{10}, die eine zusätzliche Verankerung, z. B durch elektrostatische Interaktion zwischen dem Asp^{137} der dritten Transmembrandomäne und dem Lys^{9}, und damit eine Sicherung erfährt. Allerdings ist bislang noch nicht klar, welche genaue Funktion dem Asp^{137} zukommt. Einerseits gibt es Annahmen, nach denen es eine direkte Interaktion vermitteln, andererseits aber auch eine allosterische Veränderung der Rezeptorstruktur hervorrufen könnte. Mutationsstudien zeigten zumindest, dass ein Fehlen des dem Asp^{137} der dritten Transmembrandomäne des SSTR2 korrespondierenden Aminosäurerestes die Bindung aller Liganden unmöglich macht (Nehring, Meyerhof et al. 1995).

Der Grund für die schlechte Bindungsfähigkeit des Octreotide an den humanen SSTR1 liegt in der Anwesenheit der Aminosäurereste Gln^{291} und Ser^{305} in der Nähe des extrazellulären Randes der Transmembrandomänen VI und VII. Folgt man der Theorie der Bindungstasche, so wird durch diese beiden Aminosäurereste verhindert, dass das Peptid weit genug in die Bindungstasche des Rezeptors hineinreicht. Die korrespondierenden Aminosäurereste Asn^{276} und Phe^{294} des humanen SSTR2 sorgen dagegen für eine stabile Interaktion mit der Disulfidbrücke des Octreotide. Den natürlichen Liganden SST-14 und -28 ist es im Unterschied zu den Analoga durch ihre größere Länge und Flexibilität möglich, ihre Konformation derart anzupassen, dass sie die Bindungszentren aller Rezeptoren erreichen können.

Allerdings muss an dieser Stelle einschränkend angemerkt werden, dass derzeit noch der Beweis fehlt, dass die, für die Octreotide-Bindung als entscheidend wichtig angesehenen Aminosäurereste auch wirklich essentiell für die Bindung der natürlichen Liganden sind. Ebenfalls könnte sich die Annahme, dass das Modell der Bindungstasche des humanen SSTR2 auf die übrigen Subtypen übertragbar sei, als falsch erweisen, da von eng verwandten GPCR's eine unterschiedliche Anordnung der Epitope zur Bindung eines gemeinsamen Liganden bekannt ist.

So ergaben die Ergebnisse der Forschungsarbeiten einer Arbeitsgruppe um Greenwood zur Frage der Involvierung der extrazellulären Schleifen in der SST-Bindung, dass möglicherweise die zweite extrazelluläre Schleife an der Interaktion mit sowohl SST-14 und -28 als auch mit Octreotide beteiligt sein könnte. Das Modell, das sich aus diesen Studien ableitet, verfügt somit über ein aktives Zentrum, das aus den Transmembrandomänen III bis VII mit einer möglichen Beteiligung der zweiten extrazellulären Schleife besteht, und stimmt damit mit einer Reihe anderer, bereits bekannter Peptid-bindenden GPCR's wie dem Neurokinin I, dem Angiotensin II und den GnRH-Rezeptoren überein, bei denen sich die, für die Bindung entscheidenden Aminosäurereste ebenfalls sowohl auf die extrazellulären Schleifen als auch auf die Transmembrandomänen verteilen (Gether, Johansen et al. 1993; Hjorth, Schambye et al. 1994; Schwartz and Rosenkilde 1996).

1.3.4 Expression der SSTR-Subtypen

Eine Reihe von Techniken wie die mRNA-Analyse per Northern Blot, die RT-PCR, der Ribonuclease-Protection-Assay und die in situ-Hybridisierung dienten der Erforschung der zellulären Expression der SSTR-Subtypen in Geweben des Nagers und des Menschen sowie in verschiedenen Tumoren und Tumorzelllinien (Breder, Yamada et al. 1992; Bruno, Xu et al. 1993; Kong, DePaoli et al. 1994; Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Thoss, Perez et al. 1995; Thoss, Perez et al. 1996). Zusätzlich führte die Etablierung der Subtyp-spezifischen SSTR-Antikörper zur Möglichkeit der direkten Lokalisation der Rezeptorproteine per Immunohistochemie.
Diese Studien ergaben ein sehr fein abgestimmtes Bild der SSTR-Expression im Bereich des zentralen Nervensystems und der Peripherie, das sich als selektiv für SSTR-Subtypen und spezifisch im Hinblick auf die verschiedenen Gewebe bzw. die Spezies erwies (Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel 1997; Blake, Badway et al. 2004; Corleto, Nasoni et al. 2004).

1.3.4.1 SSTR im ZNS

Im Falle der Ratte konnte die mRNA der SSTR1-5 im Bereich des zerebralen Kortex, des Striatum, des Hippocampus, der Amygdala, des Riechhirns und der Area praeoptica lokalisiert werden (Bruno, Xu et al. 1993). Im Vergleich fiel dabei auf, dass die mRNA-Mengen des SSTR1 im Hirnstamm und Rückenmark besonders hohe Werte zeigten, wogegen für den SSTR2 die Relation der mRNA-Menge des Kortex zu der der subkortikalen Strukturen deutlich zugunsten der des Kortex verschoben waren (Breder, Yamada et al. 1992; Kong, DePaoli et al. 1994). Zusätzlich zeigte sich, dass die mRNA des SSTR5 in deutlich geringeren Mengen in Rattenhirn zu finden war (Thoss, Perez et al. 1995), sich die mRNA der SSTR3 ausschließlich nur auf das Kleinhirn beschränkte (Meyerhof, Wulfsen et al. 1992; Kong, DePaoli et al. 1994) und der SSTR4 im Vergleich zu den anderen Subtypen die geringsten mRNA-Mengen aufwies (Thoss, Perez et al. 1995; Fehlmann, Langenegger et al. 2000).

Per Immunohistochemie konnten die SSTR1, -2 und –3 im Gehirn der Ratte lokalisiert werden. Dabei fand sich eine besonders hohe Dichte des SSTR1 in den histologischen Schichten 2, 3, 5 und 6 des zerebralen Kortex, im Hypothalamus, in bestimmten Bereichen des Hippocampus, im Mittelhirn und der Granularzellschicht des zerebellären Kortex (Hervieu and Emson 1998). Der SSTR2 konnte im Rattenhirn besonders in den Bereichen des olfaktorischen Tuberkulums, des Kortex des Gyrus piriformis, den Schichten 2, 3, 5 und 6 der Großhirnrinde, der Basalganglien, der Area CA1-2 des Hippocampus, der Amygdala, des Pons und der Medulla oblongata nachgewiesen werden (Dournaud, Gu et al. 1996). Des Weiteren besteht die Vermutung, dass eine bestimmte Subpopulation des SSTR-2 als Autorezeptor auf SST-immunoreaktiven Neuronen dienen könnte (Dournaud, Boudin et al. 1998). Die Verteilung des SSTR3 zeigt eine auffällige Dominanz mit Beschränkung auf die Schichten 5 und 6 des zerebralen Kortex und insbesondere die Granularzellschicht der Kleinhirnrinde (Kumar, Patel et al. 1996).
Interessant ist ebenfalls die Verteilung der fünf SSTR-Subtypen im Bereich des Hypothalamus, die an der Ratte ausgiebig untersucht wurden (Helboe, Stidsen et al. 1998; Kumar, Sasi et al. 1999). Hierbei stellt der SSTR1 den in Relation insgesamt am stärksten vertretenden Subtyp, gefolgt von den SSTR2, -3 sowie -4 und dem SSTR5 als dem am wenigsten exprimierten Vertreter, dar (Kumar, Ong et al. 1999). Dabei trifft man auf eine starke Präsenz des SSTR1 in allen größeren hypothalamischen

Kerngebieten, in den Nervenfasern der Zona externa der Eminentia mediana und im Ependym des dritten Ventrikels (Helboe, Stidsen et al. 1998; Hervieu and Emson 1998; Kumar, Ong et al. 1999). Der SSTR2 wird in denselben Bereichen exprimiert, jedoch in verhältnismäßig geringeren Raten. Diese beiden SSTR sind die bevorzugten Subtypen des rostralen Hypothalamus. Die SSTR-Subtypen 3 und 4 finden sich hauptsächlich in Bereich des Nucleus arcuartus ventromedialis und der Eminentia medialis (Kumar, Ong et al. 1999). Der SSTR5 letztlich als der am geringsten exprimierte Subtyp findet sich lediglich im Nucleus arcuatus und der medialen Eminenz. In den para- und periventrikulären Kerngebieten fand sich eine Koexpression des SSTR1 mit SST, so dass dies zu der Annahme führte, dass diesem hier, ähnlich dem SSTR2 im Großhirnrindenbereich, die Rolle eines Autorezeptors zukommen könnte (Helboe, Stidsen et al. 1998).
Die am Rattenhirn gewonnen Erkenntnisse über die Rezeptorverteilung können jedoch aus heutiger Sicht nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen werden. Dies zeigt ein Vergleich am Beispiel der Hypophyse stellvertretend für das gesamte ZNS: Im Gewebe der Hypophyse der Ratte finden sich die Genprodukte aller fünf Subtypen, wogegen in der menschlichen Hypophyse ausschließlich die Subtypen 1, 2, 3 und 5 exprimiert werden (Bruno, Xu et al. 1993; Panetta and Patel 1994; Day, Dong et al. 1995; O'Carrol and Krempel 1995). Der humane SSTR4 findet sich ausschließlich transient während der Entwicklung und fehlt im adulten Zustand (Panetta and Patel 1994; Goodyer, Grigorakis et al. 2004).

Bei der Ratte fand sich bei mRNA-Studien an Hypophysengewebe im Hinblick auf die Co-Lokalisation von SSTR, dass in jedem Zelltyp mindestens ein SSTR-Subtyp zu finden war, also auch in den Kortikotropin- und Gonadotropin-produzierenden Populationen, die man bis dahin für SSTR-negativ gehalten hatte (Day, Dong et al. 1995; O'Carrol and Krempel 1995). Man fand heraus, dass der SSTR5 vor dem SSTR2 den am häufigsten in der Hypophyse vorkommende Subtyp darstellt (Day, Dong et al. 1995; Kumar, Laird et al. 1997; Kimura, Tomizawa et al. 1998). Immunohistochemische Untersuchungen bestätigten dies (Kumar, Laird et al. 1997; Mezey, Hunyady et al. 1998) und zeigten, dass der SSTR5 auf 86% und der SSTR2 auf 42% aller Somatotropin-produziernden Zellen vorkommen. Die SSTR3 und -4 waren dagegen nur mäßig exprimiert und für den SSTR1 fand sich lediglich eine Rate von 5% von GH-positiven Zellen, auf deren Oberfläche er nachweisbar war (Kumar, Laird et al. 1997). Gleichzeitig fanden sich Zellen, die SSTR2 und -5 gleichzeitig exprimierten, was die

Möglichkeit der Existenz mehr als eines SSTR-Subtypes auf der Oberfläche einer individuellen Zelle bewies (Mezey, Hunyady et al. 1998).
Die eben beschriebene, auffällige Vormachtstellung des SSTR5, dem einzigen Rezeptorsubtypen, der eine bevorzugte Bindungsfähigkeit von SST-28 gegenüber SST-14 zeigt, korreliert mit der beschriebenen höheren Potenz des SST-28 gegenüber der des SST-14, die Wachstumshormonausschüttung in der Ratte zu inhibieren (Srikant and Patel 1981).
Die Daten zur Verteilung der SSTR-Subtypen im Gewebe der menschlichen Hypophyse sind leider nicht so detailliert wie die der Untersuchungen der Hypophyse der Ratte, jedoch stellen auch hier die SSTR2 und -5 die bevorzugten Rezeptoren zur Regulation der GH-Ausschüttung dar (Schindler, Humphrey et al. 1996; Shimon, Taylor et al. 1997).

1.3.4.2 SSTR in peripheren Geweben

Frühere Studien mittels Autoradiographie zeigten SST-14-selektive Bindungsstellen auf α-Zellen der Pankreasinseln der Ratte und ebensolche für SST-28 auf den β-Zellen, was eine selektive Suppression der Glucagon-Ausschütung per SST-14 und der Insulin-Ausschüttung über SST-28 bei dieser Spezies vermuten ließ (Amherdt, Patel et al. 1987), wobei spätere Untersuchungen zeigten, dass in den Zellen der pankreatischen Inseln der Ratte alle fünf SSTR-mRNAs zur Expression kommen (Patel, Greenwood et al. 1995).
Bei den Pankreasinseln des Menschen fanden sich immunhistochemisch eine Co-Lokalisation der SSTR1-5 auf den Insulin-, Glucagon- und den SST-produzierenden Zellen, wobei hier die Rezeptorsubtypen 1, 2 und 5 eine vorherrschende Rolle zu spielen scheinen. Dabei tragen die β-Zellen bevorzugt SSTR1 und -5, die α-Zellen SSTR2 und die δ-Zelle SSTR5 (Kumar, Sasi et al. 1999). Dieser vermeintlichen Selektivität schrieb man damals die Möglichkeit zu, die Insulin-Ausschüttung mittels SSTR1-selektiver Agonisten bzw. die des Glucagons über SSTR2-spezifische Liganden bevorzugt beeinflussen zu können.

Über in-situ-Hybridisierung konnte die mRNA aller fünf SSTR im gesamten Magen-Darm-Trakt der Ratte nachgewiesen werden (Krempels, Hunyady et al. 1997). In allen diesen Geweben fanden sich die SSTR1-5 in den epithelialen Schichten, der äußeren

Muskulatur und dem submukösen Plexus, wogegen der enterische Plexus lediglich die SSTR1-3 zu besitzen schien. Diese Ergebnisse deckten sich im weitesten Sinne mit den Untersuchungen am Gewebe der humanen Gastrointestinaltraktes (Le Romancer, Cherifi et al. 1996).

Die Nebennieren sind ein bekanntes Ziel der SST-Wirkung. Man fand hier hohe Konzentrationen von SSTR2 bei mäßigen Mengen von SSTR1 und -3 (Bruno, Xu et al. 1993; Patel, Greenwood et al. 1995).

Eine ganze Anzahl peripherer Organe zeigte zum Teil überraschend hohe Werte für die Expression von SSTR-Subtypen. So fanden sich zum Beispiel der SSTR3 in Leber und Milz, der SSTR4 in Lunge, Herz sowie Plazenta und die Rezeptoren 1, 2 und 3 in Spermatozyten und den Sertolizellen des Hodens (Bruno, Xu et al. 1993; Rohrer, Raulf et al. 1993; Patel, Greenwood et al. 1995; Caron, Buscail et al. 1997; Zhu, Krempels et al. 1998; Badway, West et al. 2004). Auch in den, dem Immunsystem zugeordneten Geweben und Zellen konnten SSTR-Subtypen nachgewiesen werden. So fand man beispielsweise die mRNA der Subtypen 1, 2 und 3 im menschlichen Thymus (Ferone, van Hagen et al. 1999) und den SSTR2 auf aktivierten Immunzellen wie den Makrophagen, T- und B-Lymphozyten (Elliot, Metwali et al. 1994; Elliot, Blum et al. 1998; Lichtenauer-Kaligis, Dalm et al. 2004).

Zusätzlich zu den normalen Geweben sind mittlerweile eine Vielzahl von Tumoren bekannt und wurden Tumorzelllinien etabliert, die positiv für SSTR-mRNA sind bzw. SSTR-Subtypen an ihrer Oberfläche tragen (Patel, Panetta et al. 1994; Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel 1997). Dabei konnten für die Mehrheit der humanen Tumorzelllinien Positivität für mRNA mehr als eines SSTR nachgewiesen werden (Patel 1997). Unter den bekannten Tumoren bzw. Zelllinien befinden sich sekretorisch aktive und inaktive Hypophysentumore, Karzinoide, Insulinome, Glucagonome, Pheochromozytome, Mammakarzinome, Nierenkarzinome, Leberkarzinome, Prostatakarzinome, Meningiome, Neurinomen sowie Gliome (Hofland and Lamberts 2001; Mundschenk, Unger et al. 2003; Bläker, Schmitz et al. 2004; Frühwald, Rickert et al. 2004; Orlando, Raggi et al. 2004; Smitha, Maggi et al. 2004; Stafford, Condon et al. 2004). Dabei scheint der SSTR2 der mit der höchsten Frequenz vorkommende Rezeptorsubtyp in allen Tumoren zu sein, entsprechend ihrer Häufigkeit gefolgt vom SSTR1, dem SSTR3 und letztlich dem SSTR4. Der SSTR5 nimmt hier eine gewisse Sonderstellung ein, da seine Expression möglicherweise tumorspezifisch zu

sein scheint. Seine mRNA konnte beispielsweise in Brusttumoren nachgewiesen werden, fehlte jedoch gänzlich zum Beispiel in Insulinomen (Patel 1997).

1.3.5 Signaltransduktion und Koppelung an das G-Protein-System

Somatostatinrezeptoren vermitteln ihre zelluläre Antwort über eine G-Protein-gekoppelte Modulation verschiedener Second-Messenger-Systeme. Hierzu gehören die Adenylatzyklase, Ca^{2+}- und K^+-Ionenkanäle, der Na^+/H^+-Antiporter, die Guanylatzyklase, die Phospholipase C, die Phospholipase A2, die MAP-Kinase (MAPK) sowie die Serin-Threonin- und die Phosphotyrosylproteinphosphatase [PTP] (Barber, McGuire et al. 1989; Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Patel 1997; Reardon, Dent et al. 1997; Barnett 2003; Lahlou, Guillermet et al. 2004).
SSTRs gelten als potente Inhibitoren der Adenylatzyklase und damit der cAMP-Entstehung. Über Versuche an AtT-20- und GH_4C_1-Zellen, bei denen es mittels G_i-Antiseren bzw. G_i-Antisenseplasmiden gelang, die Inhibierung der Adenylatzyklase zu blocken, fand man heraus, dass hierbei alle drei $G\alpha_i$-Subtypen [$G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$] beteiligt waren (Tallent and Reisine 1992; Liu, Jacobs et al. 1994; Senogles 1994; Gu and Schonbrunn 1997). Ebenfalls fand man eine Koppelung an verschiedene Subklassen von K^+-Kanälen (De Weille, Schmid-Antomarchi et al. 1989; Wang, Bogen et al. 1989; Sims, Lussier et al. 1991; White, Schonbrunn et al. 1991), wobei der Mechanismus ihrer Modulation über das G-Protein-System ist noch nicht hinreichend bekannt ist. Die Aktivierung von K^+-Kanälen durch die SSTR hat in aller erster Linie eine Hyperpolarisation der Zellmembran zur Folge, wodurch diese für spontane Aktionspotentiale refraktär wird. Eine sekundäre Folge ist dabei die Reduktion des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels, da wegen der Hyperpolarisation der reguläre, über spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle ablaufende Ca^{2+}-Influx gestört ist (Koch and Schonbrunn 1988; Patel, Murthy et al. 1990; Sims, Lussier et al. 1991).
Zusätzlich zu dieser indirekten Wirkung fand sich auch eine direkte Modulierbarkeit spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle über das $G\alpha_{o2}$-Protein (Inkeda and Schofield 1989; Kleuss, Heschefeler et al. 1991).
Eine andere Möglichkeit, eine Aktivierung sowohl von K^+- als auch Ca^{2+}-Kanälen hervorzurufen, stellt die Dephosphorylation vor Kanalproteinen nach SSTR-vermittelter Aktivierung einer Serin-Threonin-Phosphatase dar (White, Schonbrunn et al. 1991).

Eine weitere Modulation von Ca^{2+}-Kanälen durch SSTRs wäre ebenfalls über die Induktion von cGMP möglich, welches durch die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase zu einer Inhibierung der Kanalproteine führen würde (Meriney, Gray et al. 1994).
Nicht zuletzt, so zeigten eine ganze Zahl Untersuchungen, aktivieren SSTRs eine Reihe von Phosphatasen, wie die bereits erwähnte PTP oder die Serin-Threonin-Phosphatase aber auch die Ca^{2+}-abhängige Phosphatase Calcineurin (White, Schonbrunn et al. 1991; Buscail, Delesque et al. 1994; Florio, Rim et al. 1994; Buscail, Esteve et al. 1995; Florio, Scarziello et al. 1996; Reardon, Wood et al. 1996; Renstrom, Ding et al. 1996; Srikant and Shen 1996; Reardon, Dent et al. 1997; Florio, Yao et al. 1999; Sharma, Patel et al. 1999).

Alle genannten Wirkungen sind abhängig von Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteinen, jedoch fand man als Besonderheit bei SSTRs in Kolonkarzinomen eine Koppelung an Na^+/H^+-Ionentauscher über Pertussis-Toxin-insensitive Mechanismen (Barber, McGuire et al. 1989).

Als andere, allerdings weniger wichtige Signalwege der endogenen SSTRs wurden die Phopholipase A2-abhängige Stimulation der Arachidonsäureproduktion am Beispiel der Neurone des Hippocampus und die Phospholipase C-vermittelte Steigerung der IP_3 (Inositoltriphosphat) -Bildung in den Bereichen des Endhirnkortex und der glatten Muskulatur des Darmes beschrieben (Schweitzer, Madamba et al. 1990; Marin, Delumeau et al. 1991; Murthy, Coy et al. 1996; Martinez-Ferrer, Boyano-Adanez et al. 2000).

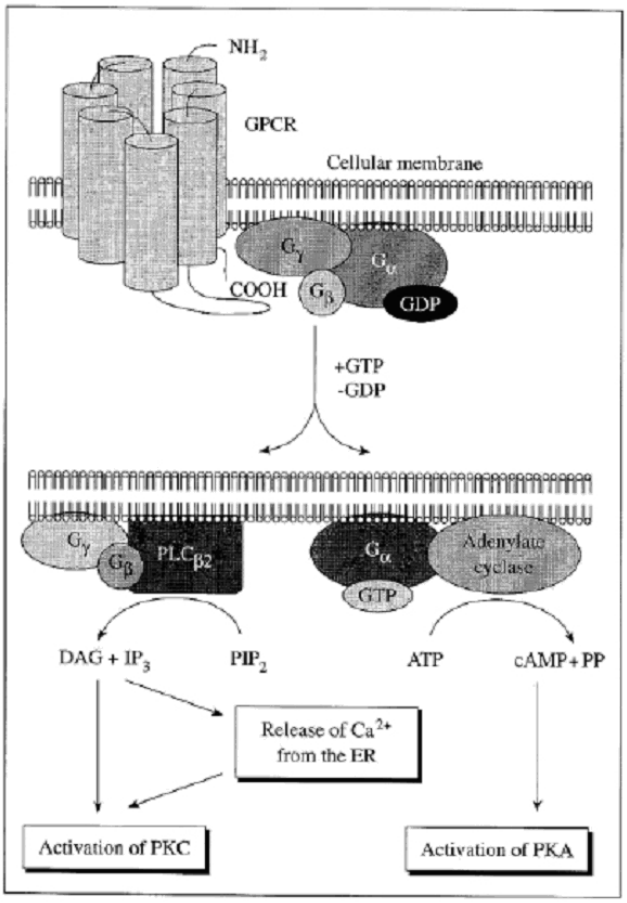

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Koppelung eines typischen GPCR an die intrazelluläre Signaltransduktion (Behr, Kann et al. 2003).

Eine Kernfrage in Bezug auf die Signalspezifität der Mitglieder einer Rezeptorfamilie wie den SSTR ist immer die, ob ein gegebener Subtyp ausschließlich einen oder gar verschiedene G-Protein-gekoppelte Effektorwege aktivieren kann.
Diese Frage wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen aufgenommen, die einer Beantwortung durch individuelle Expression eines SSTR-Subtypen in verschiedenen Zellsystemen näher kommen wollten.
Aus der Aminosäuresequenz der SSTR2-5 konnte man eine mögliche Position zur Koppelung an ein G-Protein im Bereich der dritten zytoplasmatischen Schleife ausmachen. Interessanterweise scheint diese Andockmöglichkeit in der Sequenz des SSTR1 zu fehlen. Dennoch zeigten weitere Untersuchungen, dass der SSTR1 über das $G\alpha_{i3}$ an die Adenylatzyklase gekoppelt ist (Kubota, Yamada et al. 1994). Für den aus GH_4C_1-Zellen gewonnene und in CHO-Zellen exprimierten SSTR2A konnten mögliche Assoziationen zu $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_{o2}$ gefunden werden (Luthin, Eppler et al. 1993; Gu and Schonbrunn 1997) und der SSTR3, so die Ergebnisse einer anderen Untersuchung, interagiert mit $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i4}$ und $G\alpha_{i6}$ (Komatsuzaki, Murayama et al.

1997). Für die anderen SSTR-Subtypen konnten die assoziierten G-Proteine noch nicht mit ausreichender Sicherheit ermittelt werden (Komatsuzaki, Terashita et al. 2001). Mittlerweile besteht in Fachkreisen Konsens darüber, dass alle fünf SSTRs, insbesondere die humanen Isoformen, funktionell an die Hemmung Adenylatzyklase über Pertussis-Toxin-sensitive G-Proteine gekoppelt sind (Hoyer, Lubbert et al. 1994; Patel, Greenwood et al. 1994; Patel 1997).

Auch bei den humanen Isoformen der SSTR fand man eine Stimulation der PTP, wiederum über durch Pertussis-Toxin-sensitive G-Proteine vermittelte Signalwege (Pan, Florio et al. 1992; Buscail, Delesque et al. 1994; Florio, Rim et al. 1994; Zeggari, Esteve et al. 1994; Buscail, Esteve et al. 1995; Florio, Scarziello et al. 1996; Reardon, Wood et al. 1996; Reardon, Dent et al. 1997; Florio, Yao et al. 1999; Sharma, Patel et al. 1999; Florio, Thellung et al. 2000), wobei allerdings bislang noch unklar ist, ob die G-Proteine den Rezeptor direkt an die PTP koppeln oder das Signal indirekt vermittelt wird.

	SSTR1	**SSTR2**	**SSTR3**	**SSTR4**	**SSTR5**
Chromosomlokalisation	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
Molekulargewicht	53 – 72	71 – 95	65 – 85	45	52 – 66
Aminosäuren	391	369	418	388	363
Selektiver Ligand	L-797591	L-054522 L-779976	L-796778 BN-81644 BN-81674	L-803087 NNC-269100	BIM-23268
G-Protein-Kopplung	+	+	+	+	+
Signaltransduktion und Effekte:					
Adenylylcyclase	↓	↓	↓	↓	↓
Tyrosinphosphatase	↑	↑	↑	↑	↑
MAP-Kinase	↑	↓	↑↓	↑	↓
K^+-Kanäle	↓	↑	↑	↑	↑
Ca^{2+}-Kanäle	↓	↑↓			↓
Na^+/H^+-Antiporter	↑	↑↓		↑	
AMPA/Kainat-Glutamat-Kanäle	↑	↓			
Phospholipase C/IP_3	↑	↑	↑	↑	↑↓
Phospholipase A_2				↑	

Tabelle 1: Charakteristische Eigenschaften der fünf humanen SSTR-Subtypen (Patel 1999; Krantic, Goddard et al. 2004)

Einschränkend muss zu den gerade angeführten Ergebnissen gesagt werden, dass es möglicherweise Spezies-spezifische Unterschiede in Bezug auf die möglichen Signalwege geben könnte. Beispielsweise ist für den SSTR5 der Ratte bekannt, dass dieser gerade nicht die PTP reguliert (Cordelier, Esteve et al. 1997; Sharma, Patel et al. 1999).
Für drei Rezeptoren konnte eine Hemmung der MAPK-Signalweges gefunden werden: Der SSTR2 in bestimmten Neuroblastomzellen, der SSTR3 in NIH3T3- und Mausinsulinomzellen sowie der SSTR5 in transfizierten CHO-K1-Zellen (Cattaneo, Amoroso et al. 1996; Cordelier, Esteve et al. 1997; Yoshitomi, Fujii et al. 1997; Ludvigsen, Stridsberg et al. 2004). Im Gegenteil dazu fand man für den SSTR1 und den SSTR4 eine Stimulation der MAPK in transfizierten CHO-K1-Zellen (Bito, Mori et al. 1994; Florio, Yao et al. 1999; Ludvigsen, Stridsberg et al. 2004).
In Ratteninsulinomzellen fand sich eine Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle durch endogene SSTR1 und -2, wobei die Wirkung des SSTR1 stärker war (Fujii, Gonoi et al. 1994; Roosterman, Glassmeier et al. 1998). Ähnliche Wirkungen des SSTR2 fanden sich in den Neuronen der Amygdala der Ratte (Viana and Hille 1996).
Die bereits oben beschriebene Fähigkeit der Aktivierung eines Na^+/H^+-Antiporters durch den SSTR1 konnte ebenfalls für den SSTR4 nachgewiesen werden. Im Falle des SSTR2 gibt es hierzu widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen und für die übrigen Subtypen 3 und 5 steht diese Untersuchung noch aus.
Untersuchungen an transfizierten CHO-K1-Zellen zeigten eine Aktivierbarkeit der PLA-2-abhängigen Arachidonsäureproduktion über ein Pertussis-Toxin-senstives G-Protein für den SSTR4 (Bito, Mori et al. 1994).

Die beschriebenen Ergebnisse lassen ganz klar vermuten, dass individuelle SSTR-Subtypen mehr als ein G-Protein bzw. mehr als eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade aktivieren können.

Da nun aber alle fünf SSTR SST-14 und -28 als natürliche Liganden mit nanomolarer Affinität zu binden vermögen, die Rezeptoren gemeinsame Signalwege zu nutzen und einzelne Zellen mehr als nur einen SSTR-Subtyp zu exprimieren schienen, stellte sich in der Folge die Frage, ob sich verschiedene SSTR auf der Oberfläche einer Zelle zueinander redundant verhalten oder funktionell mit einander interagieren, um so eine größere Signalvielfalt zu ermöglichen. Zusätzlich gabt es Hinweise dafür, dass bei den SSTR eine Bildung von Homo- und Heterodimeren auf der Zelloberfläche stattfinden könnte. Dadurch solle, so die Hypothese, eine Alterierung der funktionellen

Möglichkeiten des Rezeptors, wie der Affinität zu Liganden, des erzeugten Signals oder eine Agonisten-induzierte Regulation möglich sein (Rocheville, Hukovic et al. 1998).

1.3.5.1 Bildung von Homo- und Heterodimeren der SSTR

Eine direkte Proteininteraktion zwischen den Mitgliedern der SSTR-Subfamilien und sogar zwischen den SSTR und verwandten Rezeptorfamilien konnte sich in den letzten Jahren durch intensive Forschungsbemühungen anhand von heterologen Zell-Expressionssystemen mit epithelialen und fibroblasischen Zellen nachweisen lassen (Prinster, Hague et al. 2005). Auf diese Weise konnten Erkenntnisse über die Homodimerisation der SSTR2-, SSTR3- und SSTR5-Subtypen erlangt werden (Rocheville, Lange et al. 2000; Rocheville, Lange et al. 2000; Pfeiffer, Koch et al. 2001; Patel, Kumar et al. 2002; Moller, Stidsen et al. 2003), aus denen speziell für den SSTR5 hervorging, dass die Homodimerisation selbst Somatostatin-induziert war. Für die SSTR-Subtypen 1 und 4 fand sich bis dato kein Hinweis für Homodimerisation (Patel, Lange et al. 2002).
Ebenfalls konnte eine Heterodimerisation zwischen SSTR2 und –3 (Pfeiffer, Koch et al. 2001) sowie zwischen SSTR1 und –5 (Rocheville, Lange et al. 2000; Patel, Kumar et al. 2002; Grant, Patel et al. 2004) nachgewiesen werden.
Über die Heterodimerisation zwischen Mitgliedern der SSTR-Familie hinaus konnten zwischenzeitlich einige sehr interessante Forschungsergebnisse zur familienübergreifenden Heterodimerisation von SSTR mit anderen GPCR publiziert werden. Im Vordergrund stehen hierbei Ergebnisse zu den SSTR2 und –5 mit μ-Opioid- und Dopamin D2-Rezeptoren (Rocheville, Lange et al. 2000; Pfeiffer, Koch et al. 2002)

Diese verschiedenen Arten der Oligomerisation führen zu Bildung von sog. „Poly-Rezeptoren", die damit neue Charakteristiken in Bezug auf die Affinitäten zu Liganden sowie die Leistungsfähigkeit und Effizienz der nachgeschalteten intrazellulären Signaltransduktion zeigen. Beispielsweise konnte für den SSTR2/SSTR3-Rezeptorkomplex gezeigt werden, dass hier die Affinität für den SSTR3-selektiven Liganden stark vermindert wird, die des SSTR2-selektiven Agonisten dagegen unverändert bleibt. Für das SSTR5/D2-Heterodimer konnte sogar eine deutliche Steigerung der Affinität für den SSTR5-selektiven Liganden nachgewiesen werden.

Die durch die Rezeptorkomplexbildung hervorgerufene Wirkung auf die intrazelluläre Signaltransduktion wie cAMP-Spiegel und MAPK-Aktivität erweist sich als unterschiedlich und stark von den Typen der Rezeptoren abhängig. Zum Beispiel zeigte sich für den SSTR2/SSTR3-Rezeptorkomplex eine praktisch vollständige Attenuierung des SSTR3-vermittelten Signals (Pfeiffer, Koch et al. 2001). Für das SSTR2/μ-Opioidrezeptor-Heterodimer wurde dagegen eine gesteigerte Aktivierung der MAPK durch SSTR2-selektive Agonisten, trotz einer, im Vergleich zum SSTR2-Monomer verringerten Affinität des Liganden, beschrieben (Pfeiffer, Koch et al. 2002).
Die Oligomerbildung beeinflusst allerdings ebenfalls noch die Dynamik der Rezeptorinternalisation. So scheint die durch den SSTR5-selektiven Liganden induzierte Internalisation des SSTR5 reduziert zu sein, wenn er mit dem SSTR1 einen Komplex formt (Rocheville, Lange et al. 2000). Ebenso bleibt die Internalisation des SSTR3 durch die Wirkung seines selektiven Liganden aus, wenn er den Teil eines SSTR2/SSTR3-Heterodimers darstellt (Pfeiffer, Koch et al. 2001).

Es liegt nahe, dass diese neuen Charakteristika heterodimerisierter SSTR-Subtypen wertvollen pharmakologischen Nutzen bringen könnten. So zeigte sich beispielsweise für den synthetischen, bi-spezifischen Liganden BIM-23244 (Spezifität für SSTR2 und -5) an GH-produzierenden Adenomzellen eine Inhibierung der GH-Ausschüttung mit einer, im Vergleich zum Octreotide höheren Affinität. Darüber hinaus ist dieser Ligand sogar bei Octreotide-resistenten Adenomen wirksam. Gründe hierfür könnten eine Verlängerung der Wirkung der SSTR2-selektiven Komponente durch den SSTR5-Anteil des Dimers durch langsamere Internalisation oder auch beschleunigte Re-Sensibilisierung im Vergleich zur Kinetik des SSTR2-Monomers sein (Saveanu, Gunz et al. 2001).
Ähnliches zeigte sich für das Somatostatin-Dopamin-Chimer BIM-23A387: Durch seine scheinbare Wirkung über ein SSTR2/D2-Heterodimer erwies es sich in der Reduktion der GH- und Prolaktin-Sekretion der Zellen humaner Hypophysenadenome dem Octreotide als überlegen (Saveanu, Lavaque et al. 2002).

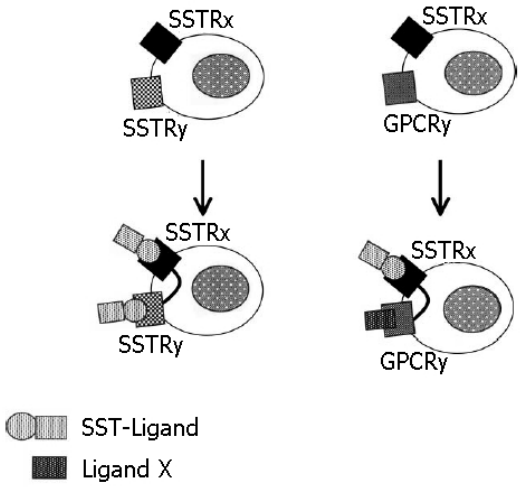

Abbildung 10: Beispiele für Rezeptoroligomerisation – links die Homodimerisation zweier Somatostatinrezeptoren sowie rechts die Heterodimerisation eines Somatostatinrezeptors und eines anderen Vertreters der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Krantic, Goddard et al. 2004).

Die kombinierte Aktivierung verschiedener Rezeptorsubtypen durch Somatostatin selbst oder Liganden in der Form von Molekülchimeren trägt zur Steigerung der Vielfältigkeit der Rezeptorausstattung der Zelle sowie der der molekularen Basis der biologischen Wirkungen des Somatostatins bei. Allerdings konnten die o. a. wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Bildung von Homo- und Heterodimeren bei SSTR-Subtypen bislang ausschließlich nur Zellmodellen entnommen werden. Der Nachweis an „natürlichen" Zellen steht derzeit noch aus, auch wenn es Hinweise für das Vorhandensein beispielsweise von SSTR2-D2-Rezeptorkomplexen auf der Oberfläche von menschlichen Astrozyten gibt (Baragli, Kumar et al. 2003).

Nach wie vor bleiben eine Vielzahl von Lücken in unserem Wissen über die SSTR-Subtyp-Selektivität der Kopplung an K^+- und Ca^{2+}-Kanäle sowie über die molekularen Signale des Rezeptors, die für die Aktivierung der verschiedenen Phosphatasen und des MAPK-Signalweges verantwortlich sind. Viel des bestehenden Wissens zu diesen Fragen basiert auf Ergebnissen von Studien mit transfizierten Zellen in Form von heterologen Systemen. Wegen der gegebenen Einschränkungen solcher Systeme sollten diese mit gewisser Vorsicht betrachtet werden. Nicht zuletzt die Einführung hoch-selektiver, Subtyp-spezifischer Agonisten aber auch die von Antagonisten mit den selben Vorraussetzungen könnten hier ebenso wie die Etablierung homologer Systeme die Möglichkeiten zur Untersuchung der Subtyp-selektiven Effektorkopplung endogener SSTR in normalen Zellen immens erweitern.

1.3.6 Die SSTR-vermittelte Hemmung der Sekretion und Zellproliferation

1.3.6.1 Sekretionshemmung

Die Fähigkeit des SST, die sog. regulierte Sekretion von Zellen zu blockieren, beruht auf der SSTR-induzierten Hemmung zweier Schlüsselmediatoren der intrazellulären Signaltransduktion, des cAMP und des Ca^{2+} (Scherubl, Hescheler et al. 1993). Allerdings fand man ebenfalls heraus, dass SST die zelluläre Sekretion unabhängig vom cAMP-Spiegel oder der Ca^{2+}-Konzentration zu hemmen vermag (Luini and de Matteis 1990; Patel, Murthy et al. 1990; Wollheim, Winiger et al. 1990; Patel 1992; Patel, Greenwood et al. 1995; Renstrom, Ding et al. 1996; Patel and Srikant 1997). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass SST, unabhängig von cAMP, Ca^{2+} oder wahrscheinlich irgendeines anderen Second Messengers, dazu fähig ist, die zelluläre Sekretion zu hemmen. Der hierbei entscheidende Punkt scheint die G-Protein-vermittelte Aktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin zu sein (Renstrom, Ding et al. 1996), wobei ähnliche distale Effekte bereits für andere inhibitorische Rezeptoren, wie den α-Adrenorezeptor oder der Galaninrezeptor gezeigt werden konnten. Dies wiederum lässt die Vermutung zu, dass eher die Phosphorylierung/Dephosphorylierung an Stelle des Ca^{2+}-Signals eine entscheidende Rolle in der zur Exozytose führenden Endstrecke der Signaltransduktion spielen könnte.

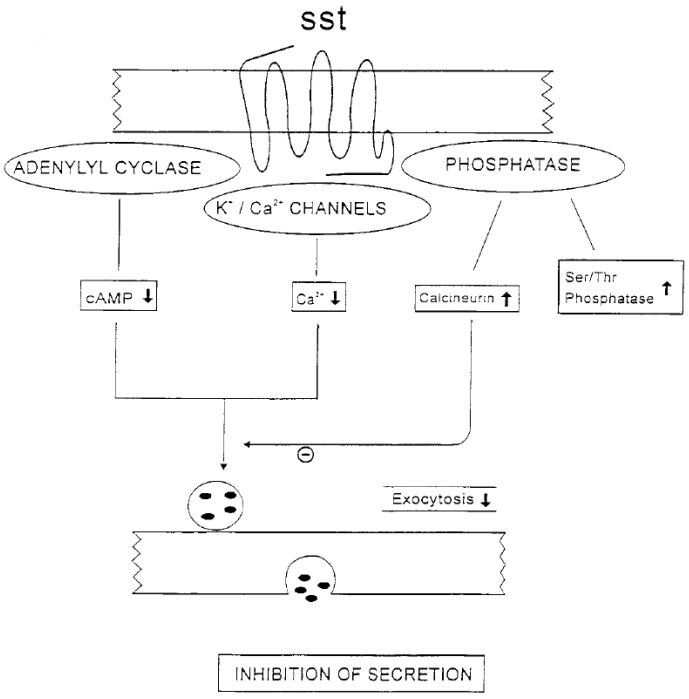

Abbildung 11: Schematische Darstellung der SSTR-vermittelten Inhibition der zellulären Sekretion (Patel 1999).

Allerdings stehen genauere Untersuchungen der Kopplung der SSTR-Subtypen an den Exozytosevorgang sowie der zur Aktivierung des Calcineurins führenden Signalmechanismen noch aus.
Auch die genaueren Umstände der SST-vermittelten Hemmung der konstitutiven Sekretion von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen müssen noch geklärt werden.

1.3.6.2 Proliferationshemmung

Im Gegensatz zu den anti-sekretorischen Fähigkeiten des SSTs wurde die anti-proliferative Wirkung erst in den frühen 80er Jahren nach Einführung der lang wirkenden SST-Analoga wie dem Octreotide bekannt (Weiss, Reddi et al. 1981; Sharma, Patel et al. 1996). Im Rahmen der therapeutischen Nutzung zur Hemmung der hormonellen Hypersekretion von Pankreas-, Dünndarm und Hypophysentumoren konnte neben dem bekannten anti-sekretorischen Effekt auch eine variable Schrumpfung der Tumormassen beobachtet werden (Lamberts, Krenning et al. 1991; Weckbecker, Raulf et al. 1993; Weckbecker, Tolcsvai et al. 1994; Lamberts, Van Der Lely et al. 1996; Bousquet, Puente et al. 2001; Lamberts, de Herder et al. 2002). Seit dem konnte diese anti-proliferative Wirkung ebenfalls in sich normal teilenden Zellen, wie z. B. Schleimhautzellen des Dünndarms (Reichlin 1983), aktivierten Lymphozyten (Aguila, Rodriguez et al. 1996) und Entzündungszellen (Karalis, Mastrorakos et al. 1994; Karalis, Mastrorakos et al. 1995; Takeba, Suzuki et al. 1997), sowie auch in vivo bei soliden Tumoren und in vitro bei aus endokrinen und epithelialen Tumoren stammenden Zellen in Kultur (Hypophyse, Schilddrüse, Mamma, Prostata, Kolon, Pankreas, Lunge und Gehirn) nachgewiesen werden (Weckbecker, Raulf et al. 1993; Weckbecker, Tolcsvai et al. 1994).
Die anti-proliferative Wirkung beruht sowohl auf zytostatischen als auch zytotoxischen Effekten. Sie wird einerseits durch direkt auf den Tumorzellen befindlichen SSTR und andererseits indirekt durch SSTR auf Nicht-Tumorzellen vermittelt. Die Wirkung des SST auf diese Zellen besteht darin, die Sekretion von Hormonen und Wachstumsfaktoren die das Tumorwachstum beeinflussen sowie die Angiogenese zu hemmen, eine Vasokonstriktion zu erzeugen und die Funktion von Immunzellen zu modulieren (Pagliacci, Tognellini et al. 1991; Patel, Barrie et al. 1994; Candi, Melino et al. 1995; Cheung and Boyages 1995; Srikant 1995; Sharma, Patel et al. 1996; Sharma and Srikant 1998; Sharma and Srikant 1998).

Verschiedene SSTR-Subtypen und intrazelluläre Signalwege könnten hierbei von Bedeutung sein, wobei jedes der drei großen, durch SSTR modulierten Second-Messenger-Systeme (cAMP, Ca^{2+}, PTP) eine Rolle spielen könnte (Weckbecker, Raulf et al. 1993; Patel 1997; Lahlou, Saint-Laurent et al. 2003; Bousquet, Guillermet et al. 2004).
Das größte Interesse bezieht sich momentan auf Proteinphosphatasen, die eine Dephosphorylierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen erzeugen oder die über eine Modulierung der MAPK-Signalkaskade zu einer Unterdrückung der mitogenen Signaltransduktion führen.

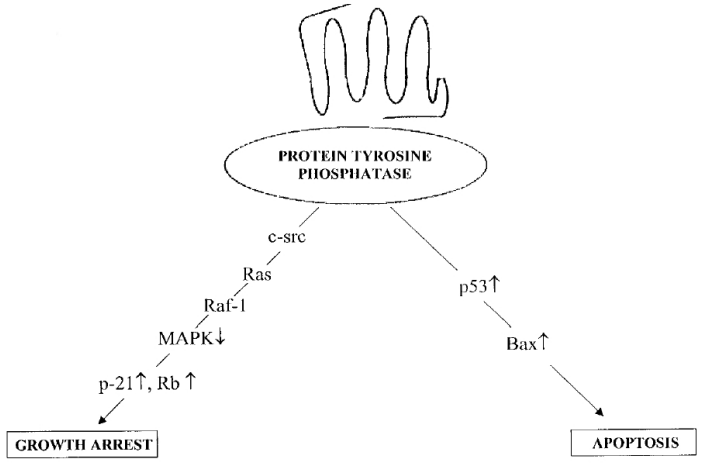

Abbildung 12: Schematische Darstellung der zu Proliferationsstop bzw. Apoptose führenden SSTR-Wirkung, ausgehend von der PTP (Patel 1999; Lahlou, Saint-Laurent et al. 2003).

Die Bedeutung der PTP für die Regulation der Zellproliferation ist bereits von anderen GPCR wie u. a. dem Dopamin-II-Rezeptor bekannt. Bereits im Jahr 1985 wurde eine SST-sensitive PTP beschrieben (Hierowski, Liebow et al. 1985), die die EGF-Rezeptorkinase in einer bestimmten Pankreaskarzinomzelllinie dephosphorylieren und somit inaktivieren konnte sowie zu einer Antagonisierung zusätzlicher Tyrosinkinasen wie der Insulin- oder IGF-I-Rezeptortyrosinkinase fähig war (Liebow, Reilly et al. 1989; Tsuzaki and Moses 1990; Grant, Wargovich et al. 1994; Bousquet, Delesque et al. 1998). Mittlerweile konnte die Induzierbarkeit der PTP durch SST in einer Vielzahl normaler Zelllinien sowie auch Tumorzelllinien bestätigt werden (Liebow, Reilly et al. 1989; Viguerie, Tahiri-Jouti et al. 1989; Tsuzaki and Moses 1990; Brevini, Bianchi et al. 1993; Grant, Wargovich et al. 1994; Srikant and Shen 1996) und Untersuchungen an transfizierten Zellen zeigten eine Stimulierbarkeit der PTP durch jeden der fünf SSTR-Subtypen (Buscail, Delesque et al. 1994; Florio, Rim et al. 1994; Buscail, Esteve et al.

1995; Florio, Scarziello et al. 1996; Reardon, Wood et al. 1996; Sharma, Patel et al. 1996; Cordelier, Esteve et al. 1997; Florio, Yao et al. 1999; Sharma, Patel et al. 1999). Über die Signaltransduktion vom SSTR bis zur PTP ist bislang allerdings nur sehr wenig bekannt. In CHO-K1-Zellen konnte durch spezifische Immunopräzipitation der Hinweis erbracht werden, dass das G-Protein $G_{i\alpha 3}$ an der Formierung eines Komplexes aus SSTR2 und dem PTP-Subtyp SHP-1 beteiligt sein könnte (Lopez, Esteve et al. 1997).

Wie im Falle der PTP, so sind auch alle fünf SSTR-Subtypen zur Beeinflussung der MAPK-Aktivität fähig (Bito, Mori et al. 1994; Cattaneo, Amoroso et al. 1996; Reardon, Wood et al. 1996; Cordelier, Esteve et al. 1997; Yoshitomi, Fujii et al. 1997; Florio, Yao et al. 1999). An SY-5Y Neuroblastomzellen konnte man beispielsweise zeigen, dass SST über den SSTR2 zu einer Hemmung der MAPK und damit der durch Rezeptor-Tyrosinkinasen induzierten Zellproliferation führt (Cattaneo, Amoroso et al. 1996). Vermutlich handelt es sich dabei um eine dephosphorylationsabhängige Inaktivierung der MAPK durch die SST-aktivierte PTP. Für den SSTR3 gibt es ebenfalls Hinweise, dass SST über ihn eine ähnliche, PTP-vermittelte Hemmung der MAPK verursacht (Reardon, Wood et al. 1996), allerdings sind Ergebnisse aus Untersuchungen an einer Maus Insulinom-Zelllinie bekannt, bei denen es über den SSTR3 zu einem dualen Effekt - ein vorübergehender Anstieg gefolgt von einem Abfall - in Bezug auf die MAPK-Aktivität gekommen war (Yoshitomi, Fujii et al. 1997).
Der SSTR5 führt zu einer Senkung der MAPK-Aktivität über die Hemmung der Guanylatzyklase und damit der intrazellulären cGMP-Konzentration (Cordelier, Esteve et al. 1997).
Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen für die Rezeptoren 2, 3 und 5, zeigte sich an CHO-K1-Zellen eine Aktivierung der MAPK-Aktivität durch die SSTR1 und -4 (Bito, Mori et al. 1994; Florio, Yao et al. 1999). Allerdings kam es auch in diesen Zellen zu einer SSTR1-vermittelten Proliferationshemmung, da hier die Aktivitätssteigerung der MAPK zu einer Erhöhung der Expression eines bestimmten Proteinkinaseinhibitors führte (Florio, Yao et al. 1999). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es durch jeden der SSTR-Subtypen zu einer PTP-abhängigen Modulation des MAPK-Signalweges kommt, die typabhängig positiv oder auch negativ sein kann und zu einer Inhibierung des Zellwachstums führt. Dabei sind die exakten Schritte, die die Verbindung zwischen dem aktivierten Rezeptorprotein und der Stimulation der PTP darstellen, noch nicht beschrieben.

1.3.6.3 Apoptose

Neben dem zytostatischen Effekt konnte gezeigt werden, dass SST auch die Apoptose, d.h. den sog. programmierten Zelltod, induzieren kann. Dieser Nachweis gelang als erstes an, mit Octreotide behandelten AtT-20- und MCF7-Zellen in Kultur (Pagliacci, Tognellini et al. 1991; Srikant 1995; Sharma and Srikant 1998). Hierbei erschien die Apoptose ein konzentrationsabhängiger Effekt im Bereich 10^{-10} bis 10^{-5} M bei allen Zellen im aktiven Zellzyklus zu sein, wogegen Zellen mit blockiertem Zellzyklus unaffektiert blieben (Srikant 1995). Weitere Untersuchungen an diesen Zellen leiteten zu der Vermutung, die PTP könnte als notwendiger Zwischenschritt in der SSTR-Vermittlung der Apoptose beteiligt sein (Sharma and Srikant 1998), jedoch gelang es aufgrund der Expressionsmuster der SSTR auf diesen Zellen nicht, den zur Apoptoseeinleitung entscheidenden SSTR-Subtyp festzustellen.
Untersuchungen an CHO-K1-Zellen, die alle fünf humanen rekombinanten SSTR individuell exprimierten, zeigten, dass die Apoptose einzig und allein über den humanen SSTR3 vermittelt wurde (Sharma, Patel et al. 1996). Hierbei gelang einerseits auch die Blockierung der Apoptoseinduktion durch Vorbehandlung der Zellen mittels Pertussis-Toxin bzw. Orthovandat, was für eine direkte Beteiligung eines Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteins und der PTP bei der intrazellulären Signaltransduktion spricht, und andererseits der Nachweis der Assoziation der über hSSTR3 eingeleiteten Apoptose mit der Aktivierung des Wild-Typ-Tumorsuppressorproteins p53 (wt-p53) und dem pro-apopoischen Proteins Bax (Sharma, Patel et al. 1996). In dieser Beziehung entwickelte sich die Induktion des p53 schnell in einer zeit-abhängigen Weise und ging dabei der Aktivierung des Bax und dem Zeitpunkt des Apoptosebeginns voraus.
Der momentan gültigen Vorstellung nach soll das wt-p53 in phosphorylierter, inaktiver Form bereits intrazellulär vorliegen, so dass eine Aktivierung durch Dephosphorylierung von Serin-Resten sehr schnell erreicht werden kann. Dies konnte ebenfalls an dem Modell der hSSTR3-exprimierenden CHO-K1-Zellen nachgewiesen werden, wo sich p53 in der Immunfluoreszenz in einer perinukleären Lokalisation darstellte (Sharma, Patel et al. 1996). Eine Behandlung dieser Zellen mit SST-Agonisten erzeugte eine intranukleäre Translokation des p53 begleitet von einer Schrumpfung des Nukleus, eines charakteristischen Merkmals für in der Apoptose befindliche Zellen (Sharma, Patel et al. 1996). Der durch die Aktivierung des hSSTR3 vermittelte Anstieg des p53 ist in allen Phasen des Zellzyklus nachweisbar, ist also unabhängig von einem Zellzyklusstillstand, was die fehlende Nachweisbarkeit des Zyklus-abhängigen Kinaseinhibitors p21, der charakteristisch für Zellen im Zyklusarrest ist, vermuten ließ.

Zwischenzeitlich konnte schließlich gezeigt werden, dass durch die hSSTR3 induzierte Apoptosesignalkette eine Kationen-insensitive saure Endonuklease bei gleichzeitigem Abfall des pH-Wertes im nukleärem Milieu aktiviert wird (Sharma and Srikant 1998).

Im Gegensatz zu der hSSTR3 vermittelten Apoptose, führte die Aktivierung der übrigen Subtypen zu einem Zellzyklusarrest in den untersuchten CHO-K1-Zellen, der mit einer nachweisbaren Induktion von Rb (Retinoblastom-Tumor-Suppressor-Protein) und p21 einherging. Hierbei erreichte der hSSTR5 den maximalen Effekt, gefolgt von hSSTR2, -4 und letztlich -1 (Sharma, Patel et al. 1999).

1.3.7 Regulation der SSTR

1.3.7.1 Agonist-abhängige Regulation

In verschiedenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass, nach einer initial starken Antwort auf SST-Agonisten, die Reaktion bei dauerhafter Exposition immer geringer wird (Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Lamberts, Van Der Lely et al. 1996; Patel 1997). Die Fähigkeit, bei dauerhafter Exposition ihre eigene Sensitivität gegenüber dem Agonisten variieren zu können, ist bereits als gemeinsames Merkmal einer Vielzahl anderer Mitglieder der Gruppe der GPCR bekannt. Diese Agonisten-spezifische Regulation umfasst typischerweise eine Rezeptordesensitivierung infolge Entkoppelung von G-Proteinen oder auch der Rezeptorinternalisation und -degradation (Dohlman, Thorner et al. 1991; Strader, Fong et al. 1995; Hofland and Lamberts 2003). Die Phosphorylierung des c-terminalen Bereiches und der intrazellulären Schleifen durch Second-Messenger-aktivierte oder G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen spielt bei der Desensitivierung und Internalisation eine entscheidende Rolle. Die Agonist-abhängige Entkopplung der SSTR von G-Proteinen konnte bei den AtT-20-Zellen nachgewiesen werden (Reisine and Axelrod 1983). Eine Agonist-abhängige Internalisation fand sich dagegen bei Zellen des Hypophysenvorderlappens und der pankreatischen Inseln der Ratte, ebenfalls in AtT-20-Zellen sowie in Tumorzellen der humanen Hypophyse und der pankreatischen Inseln (Morel, Leroux et al. 1985; Amherdt, Patel et al. 1989; Hofland, Van Koetsveld et al. 1995; Hofland, Breeman et al. 1999). Ganz im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen an GH_4C_1- und Rin-m5f-Zellen, dass hier eine Exposition mit einem SST-Agonisten über 24-48 h zu

einer SSTR-Steigerung führte (Presky and Schonbrunn 1988; Sullivan and Schonbrunn 1988).

Da z. B. normale Hypophysen- oder Inselzellen bzw. die von ihnen entstammenden Tumorzelllinien immer eine Kombination verschiedener SSTR-Subtypen exprimieren, ist es sinnvoller Weise notwendig, Untersuchungen an mit jeweils einem SSTR-Subtyp stabil transfizierten Zelllinien durchzuführen, um klare Aussagen bezüglich der Reaktion der SSTR treffen und genaue Charakterisierungen der SSTR-Isoformen vornehmen zu können.

Dabei zeigten die Rezeptoren SSTR1, -2, -3 und -5 eine akute Desensitivierung der Bindung an die Adenylatzyklase (Hukovic, Panetta et al. 1996; Hipkin, Friedman et al. 1997; Roth, Kreienkamp et al. 1997; Hukovic, Panetta et al. 1998).

Die humanen SSTR2, -3, -4 und -5 durchliefen in CHO-K1-Zellen eine schnelle Internalisation, die zeit- und temperaturabhängig über einen Zeitraum von 60 min nach Aktivierung durch den Agonisten verlief (Hukovic, Panetta et al. 1996). Die maximale Internalisation konnte mit 78% für den SSTR3 beobachtet werden, gefolgt vom SSTR5 (66%), dem SSTR4 (29%) und dem SSTR2 (20%). Im Gegensatz dazu wurde hierbei der hSSTR1 nicht internalisiert.

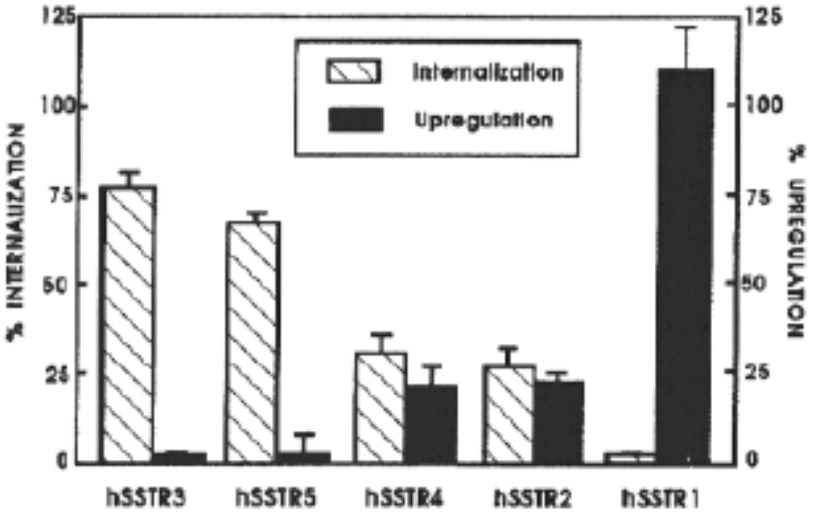

Abbildung 13: Vergleich der Rezeptor-typischen Profile für die Internalisation nach Kurzzeitexposition mit einem Agonisten und Hochregulation bei chronischer Exposition (Hukovic, Panetta et al. 1996).

Ähnliche Ergebnisse wurden für den Fall des hSSTR1 und den Maus-SSTR2 in transfizierten COS7-Zellen und den Ratten-SSTR2 in GH_4C_1-Zellen erbracht (Hipkin, Friedman et al. 1997; Nouel, Gaudriault et al. 1997).

Ein anderes Bild der Internalisation zeigte sich bei Untersuchungen der fünf Ratten-SSTR-Subtypen in transfizierten humanen Embryo-Nierenzellen, wo die SSTR1-3 in Anwesenheit von SST-14 und SST-28 schnell internalisiert, der SSTR5 dagegen lediglich nur nach Exposition mit SST-28 nach intrazellulär verlagert und der SSTR4 überhaupt nicht internalisiert wurde (Roth, Kreienkamp et al. 1997).
Der Grund für diese Unterschiede verbleibt im Moment noch unklar, dennoch könnte es beispielsweise an strukturellen Unterschieden zwischen den humanen und Nager-SSTR-Isoformen oder auch zwischen den für die Transfektion genutzten Zelllinien liegen.
Mutationsanalysen im c-terminalen Bereich des Rezeptorproteins und Studien mittels direkter Phosphorylierung haben gezeigt, dass die Phosphorylierung zytoplasmatischer Reste, besonders am C-Terminus, eine wichtige Rolle im Rahmen der Agonist-induzierten Desensitivierung und Internalisation der Subtypen SSTR2A, SSTR3 und SSTR5 spielt (Hipkin, Friedman et al. 1997; Roth, Kreienkamp et al. 1997; Hukovic, Panetta et al. 1998).
Die oben bereits angesprochene Hochregulation der SSTR bei prolongierter Exposition zu einem Agonisten wurde auch für die humanen SSTR-Subtypen durch andere Arbeitsgruppen untersucht. Hierbei zeigte ich nach einer Expositionsdauer von 22 h im Falle des hSSTR1 eine um 110% gesteigerte Exprimierung und für den hSSTR2 und hSSTR4 immerhin noch 26% bzw. 22%. Die Rezeptoren hSSTR3 und hSSTR5 zeigten hier dagegen keinen Anstieg (Hukovic, Rocheville et al. 1999).

Der Effekt der Hochregulierung der SSTR durch eine Langzeitbehandlung mit einem Agonisten wurde bereits vor über fünfzehn Jahren anhand von Hypophysen- und Inselzelltumorzellen beschrieben (Presky and Schonbrunn 1988; Sullivan and Schonbrunn 1988) und war auch bei einer Reihe anderer GPCR, wie dem ß3-Adrenorezeptor, dem 5HT2A-Subtyp des Serotoninrezeptors und der langen Form des Dopamin-2-Rezeptors nachgewiesen worden (Loumaye and Catt 1983; Thomas, Holt et al. 1992; Ng, Varghese et al. 1997). Da diese Reaktion jedoch nur unter kontinuierlicher Exposition des Rezeptors mit dem Agonisten entsteht, einer Situation deren Eintreten unter normalen physiologischen Bedingungen als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist, erscheint diese Art der Reaktion in erster Linie pharmakologisch und nur während Langzeittherapien und krankhaften Zuständen beobachtbar zu sein.
Im Gegensatz zur Rezeptor-Downregulation sind die molekularen Mechanismen, die der Hochregulation unterliegen, bislang kaum verstanden. Die Hochregulierung des

hSSTR1 scheint ein temperaturabhängiger, aktiver Prozess zu sein, bei dem durch Ligandenaktivierung eine Rezeptorrekrutierung aus einem bereits vorbestehenden zytoplasmatischen Pool stattfindet. Dabei ist keine Proteinsynthese oder Signaltransduktion nötig, allerdings besteht eine unbedingte Abhängigkeit von molekularen Signalen im Bereich des C-Terminus des Rezeptorproteins (Hukovic, Rocheville et al. 1999).

1.3.7.2 Regulation der SSTR-Genexpression

Die Evolution ließ für die SSTR-Gene einen zeit- und gewebespezifischen Regulationsmechanismus entstehen, der durch eine Vielzahl von Hormonen und krankhaften Zuständen beeinflusst werden kann. Beispielsweise führen die Veränderungen als Reaktion auf Hungern oder den Insulinmangel im Rahmen eines Diabetes mellitus zur Reduktion der mRNA-Level der Rezeptoren SSTR1-3 in der Hypophyse und des SSTR5 im Hypothalamus (Bruno, Xu et al. 1994). Jedoch sind die hier zugrunde liegenden Mechanismen bislang noch nicht bekannt.
Andere Untersuchungen zeigten, dass cAMP, Gastrin, EGF und SST selbst zu einer Steigerung der „Steady-State-SSTR-mRNA-Level" führen (Patel, Greenwood et al. 1993; Bruno, Xu et al. 1994; Vidal, Rauly et al. 1994). Östrogen erzeugte in Ratten-Prolaktinomzellen in Kultur eine Hochregulierung der SSTR2 und -3 (Visser-Wisselaar, Van Uffelen et al. 1997) und zeigte in Ratten-Hypophysenzellen in Kultur neben der Steigerung der mRNA-Level für SSTR2 und -3 eine Inhibierung der Raten der SSTR-1-mRNA (Djordjijevic, Zhang et al. 1998). Die beschriebene Steigerung der mRNA-Level des SSTR2 und -3 durch Östrogen konnte im Rahmen von in-vivo-Experimenten an Gewebe der Ratten-Hypophyse bestätigt werden (Kimura, Tomizawa et al. 1998). Dagegen kam es hierbei allerdings zu einer Hochregulierung der SSTR1-mRNA-Level bei gleichzeitiger Reduktion des mRNA-Gehalts des SSTR5 (Kimura, Tomizawa et al. 1998).
Mittlerweile gilt es als allgemein anerkannt, dass Östrogene einen positiven Effekt auf die Expression der Rezeptoren SSTR2 und -3 haben, wogegen der Einfluss auf die anderen drei Subtypen minimal oder variabel zu sein scheint.
Glukokortikoide regulieren die SSTR-Gentranskription biphasisch in Abhängigkeit von der Zeit, der Dosis sowie des untersuchten Gewebetypes (Xu, Berelowitz et al. 1995; Park, Kamegai et al. 2003). Eine kurzdauernde Exposition induziert beispielsweise die

mRNA des SSTR1 und -2, wogegen eine längere Behandlung die Transkription beider Gene inhibiert.
Untersuchungen an einer Schilddrüsen-Tumorzelllinie der Maus zeigten, dass durch Schilddrüsenhormone die mRNA-Level der Rezeptoren SSTR1 und -5 induziert wurden (James, Sarapura et al. 1997).

	Effect on mRNA					
Class of agent	SST	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Intracellular mediators						
cAMP	↑		↑			↑
Ca^{2+}	↑					
cGMP	↑					
NO	↑					
Thyroid/steroid hormones						
Glucocorticoids	↑↓	↑↓	↑↓			
Testosterone	↑					
Estrogens	↑		↑	↑		↓
Thyroid hormone		↑				↑
Insulin	↓					
Growth factors/cytokines						
GH	↑					
IGF-I	↑					
IGF-II	↑					
IL-1	↑					
TNF-α	↑					
IL-6	↑					
IFN-γ	↑					
IL-10	↑					
TGF-β	↓					
leptin	↓					
NMDA receptor agonists	↑					

Abbildung 14: Effekte verschiedener Mediatoren auf die intrazelluläre mRNA-Konzentration des SST und seiner Rezeptoren (Patel 1999)

Mittlerweile arbeitet eine Vielzahl von Forschungsgruppen an der Analyse der SSTR-Genpromotorsequenzen, um das Verständnis für die extrazellulären und gewebespezifischen Faktoren, die die SSTR-Gene regulieren, zu erweitern. Hierbei wurden für verschiedene der Ratten-, Maus- und Human-SSTR-Isoformen Sequenzen typischer gewebespezifischer Promotoren, deren Struktur mit „TATA-less G+C-rich" beschrieben wurden, gefunden (Greenwood, Panetta et al. 1994; Hauser, Meyerhof et al. 1994; Greenwood, Robertson et al. 1995; Xu, Berelowitz et al. 1995; Baumeister, Kreuzer et al. 1998; Xu, Berelowitz et al. 1998; Xu, Berelowitz et al. 1998; Baumeister and Meyerhof 2000; Petersenn, Rasch et al. 2002).
Im Falle des hSSTR2 wurde ein neues Initiatorelement (SSTR2 inr) beschrieben, das sich nahe des mRNA-Initiationspunktes befindet und so eine Genexpression in Abwesenheit einer TATA-Box durch die Bindung des Helix-Loop-Helix-

Transkriptionsfaktors SEF-2 ermöglicht, der seinerseits mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert (Pscherer, Dorflinger et al. 1996). Zusätzlich fand sich hier eine Östrogen-responsive Sequenz (Xu, Berelowitz et al. 1998).
Im hSSTR5-Promotor fanden sich neben einer Sequenz, die die Induzierbarkeit über cAMP ermöglicht, zusätzlich verschiedene Polymorphismen, welche das Expressionsbild in verschiedenen Individuen beeinflussen könnten (Greenwood, Panetta et al. 1994; Sasi, Puebla et al. 1998).

1.3.8 Subtypselektivität der biologischen Effekte der SSTR

Da SST die Vielzahl seiner biologischen Effekte über fünf Rezeptoren vermittelt, ist eine sehr wichtige Frage die, ob eine bestimmte Antwort selektiv für einen einzelnen Subtyp ist oder die Einbindung mehrerer Subtypen umfasst. Die Erkenntnis der überlappenden Nutzung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionsketten durch die verschiedenen Subtypen und der Tatsache, dass die typische Zielzelle multiple SSTR-Subtypen, häufig sogar alle fünf gleichzeitig, exprimiert, stützt besonders die Vermutung einer konzertierten Wirkungsweise der Rezeptoren im Gegensatz zu einer reinen Indiviualwirkung. Nichtsdestotrotz gibt es Hinweise für eine „relative Rezeptorenselektivität" einiger SSTR-Effekte. Im Hinblick auf die Einflüsse des SST auf die Zellproliferation wirkt ausschließlich der SSTR3 zytotoxisch, wogegen die übrigen vier Subtypen einen Arrest des Zellwachstums vermitteln (Sharma, Patel et al. 1996; Florio, Yao et al. 1999; Sharma, Patel et al. 1999).
Im Gegensatz zur Zellproliferation ist für den Bereich der Zellsekretion überraschend wenig über Subtyp-selektive Wirkungen bekannt.
Immunzellen, Entzündungszellen und neoplastische Zellen wurden zwischenzeitlich als sehr wichtige „neue" Ziele der SST-Wirkung erkannt (Lamberts, Krenning et al. 1991; Blum, Metwali et al. 1992; Elliot, Metwali et al. 1994; Karalis, Mastrorakos et al. 1994; Karalis, Mastrorakos et al. 1995; Aguila, Rodriguez et al. 1996; Rauly, Saint-Laurent et al. 1996; Patel 1997; Takeba, Suzuki et al. 1997; Elliot, Blum et al. 1998; Ferone, van Hagen et al. 1999; Ferone, van Hagen et al. 2000).

Im Gegensatz zu den „klassischen" SST-produzierenden neuroendokrinen Zellen, wie denen im Hypothalamus oder den pankreatischen Inseln, die große Mengen Peptid schlagartig aus Vorratspools freisetzen können, werden SST und SSTRs in

Entzündungszellen wie Makrophagen und Lymphozyten mit den zur Antigenpräsentierung und -erkennung notwendigen Membranproteinen co-induziert. Hier dienen sie der parakrinen sowie autokrinen (man spricht wegen der räumlichen Nähe der SSTR zu den Orten der Antigenpräsentierung bzw. -erkennung auch von „juxtakrinen Effekten" (Krantic, Goddard et al. 2004)) Modulation der proliferativen und hormonellen Antworten im Rahmen entzündlicher oder immunologischer Prozesse. Eine solche duale Aktivierung konnte bei Makrophagen während granulomatöser Reaktionen, bei T-Lymphozyten, bei Splenozyten und bei synovialen Fibroblasten im Rahmen einer Rheumatoiden Arthritis sowie in entzündlich verändertem Fettgewebe septischer Patienten nachgewiesen werden (Takeba, Suzuki et al. 1997; Cardoso, El Ghamrawy et al. 1998; Elliot, Blum et al. 1998; Levite 1998; Weinstock and Elliott 1998; El Ghamrawy, Rabourdin-Combe et al. 1999; Ferone, van Hagen et al. 1999; Giannetti, Horvat et al. 1999; Paran and Paran 2003; Seboek, Linscheid et al. 2004). Der SSTR2 ist der Hauptsubtyp der exprimierten SSTR in Lymphozyten und Entzündungszellen und scheint dort funktionell verantwortlich für die Modulation der sekretorischen und proliferativen Reaktionen dieser Zellen zu sein (Takeba, Suzuki et al. 1997; Elliot, Blum et al. 1998). Gleichermaßen finden sich eine Vielzahl von Tumoren, bei denen eine Co-Expression von SST und SSTR nachweisbar ist (Reubi, Waser et al. 1993).

Die Transfektion von NIH3T3-Zellen mit dem SSTR2-Rezeptor erwies sich als induzierend auf die SST-Genexpression, was vermuten lässt, dass im Falle der Immun- und Entzündungszellen, die Gegenwart einer hohen Dichte von SSTR und SST möglicherweise der Versuch des Tumors widerspiegelt, das endogene SST-System zur autokrinen/parakrinen Modulation der Reaktion auf das Neoplasma zu aktivieren (Rauly, Saint-Laurent et al. 1996).

Studien mit selektiven non-Peptid-Agonisten zeigten, dass die GH-Ausschüttung aus Somatotropin-produzierenden Zellen der Ratten-Hypophyse vorzugsweise durch SSTR2- und SSTR5-selektiven Verbindungen blockiert werden konnte (Rohrer, Birzin et al. 1998; Rohrer and Schaeffer 2000). Diese Ergebnisse korrelieren mit der bevorzugten Expression von SSTR2 und -5 auf der Oberfläche Somatotropin-produzierender Zellen der Ratte und weist darauf hin, dass diese beiden Subtypen eine zentrale Rolle bei der Mediation der GH-Ausschüttung der Hypophyse spielen könnten (Kumar, Laird et al. 1997). Obwohl der zelluläre Verteilungsmodus der SSTR-Subtypexpression der humanen Hypophyse noch nicht hinreichend geklärt ist, bestärkten Untersuchungen mit Subtyp-selektiven Peptidagonisten die Annahme, dass

auch in der humanen Hypophyse die Regulation der GH- und TSH-Ausschüttung durch SSTR2 und -5 führend beeinflusst wird (Shimon, Taylor et al. 1997).

Im Falle der Inselzellhormone, scheint die Insulinausschüttung der Maus spezifisch durch den SSTR5 modifiziert zu werden (Rohrer, Birzin et al. 1998; Rohrer and Schaeffer 2000). Im Unterschied dazu, zeigen die humanen ß-Zellen nicht nur eine reiche Expression von SSTR5 sondern auch von SSTR1, was vermuten lässt, dass die Insulinregulation beim Menschen im Unterschied zur Maus durch mindestens zwei SSTR-Subtypen reguliert wird (Kumar, Sasi et al. 1999). Allerdings ist nicht von der Hand zu weisen, dass immunhistochemisch auf der Oberfläche der humanen ß-Zellen auch der Subtyp 2 in mäßigen, der Subtyp 3 in geringen Mengen und Spuren des SSTR4 nachweisbar waren (Kumar, Sasi et al. 1999) und andere Untersuchungen eine Inhibition der Insulinsekretion beim Menschen durch alleinige Stimulation des SSTR2 erreichen konnten (Brunicardi, Atiya et al. 2003).

Es herrscht allgemeine Einigkeit darüber, dass sowohl beim Nager wie auch beim Menschen der SSTR2 die zentrale Rolle in der Mediation der Glucagonsekretion der α-Inselzellen spielt, da dieser Subtyp zum einen bevorzugt auf α-Zellen exprimiert wird zum anderen eine Selektivität der Gucagonsuppression durch SSTR2-selektive non-peptid Agonisten nachgewiesen werden konnte (Hunyady, Hipkin et al. 1997; Rohrer, Birzin et al. 1998; Kumar, Sasi et al. 1999; Rohrer and Schaeffer 2000)

	Immunohistochemistry	
	β cells	α cells
SSTR1	++++	+
SSTR2	+++	++++
SSTR3	++	+
SSTR4	+	−
SSTR5	++++	++

Abbildung 15: Darstellung der immunhistochemischen Verteilung der SSTR-Subtypen auf humanen Inselzellen (Kumar, Sasi et al. 1999)

Im Hinblick auf die zuvor bereits angesprochene hypophysäre GH-Regulation sehr interessante Ergebnisse konnten an einem SSTR2-defizienten Maus-Modell erlangt werden (Zheng, Bailey et al. 1997; Martinez, Curi et al. 1998). Die Tiere blieben

gesund bis zu einem Alter von 15 Monaten, was eine zentrale Rolle des SSTR2 innerhalb der Embryogenese und der weiteren Entwicklung der Maus ausschließt. Zudem zeigten, entgegen aller pharmakologischen fundierten Hinweise auf eine zentrale Stellung der SSTR2 an der Regulation der hypophysären GH-Sekretion, die Tiere als einzige identifizierte neuroendokrine Abnormität im Rahmen der GH-Kontrolle ein Fehlen der GH-induzierten Feedback-Suppression der GH-Ausschüttung aufgrund eines Verlustes von SSTR2-Rezeptoren auf GHRH-Neuronen des Nucleus arcuatus (Zheng, Bailey et al. 1997). Das Wachstum der Tiere war sowohl prä- als auch postnatal normal, was auf eine erhaltene allgemeine GH-Sekretion hinweist.
Die Mäuse zeigten zusätzlich hohe basale Raten der Magensäuresekretion bei gleichzeitig normalen Gastrinspiegeln. Dies unterstützt die Annahme, dass der SSTR2 der verantwortliche Subtyp für die SST-vermittelte Suppression der endogenen Magensäureproduktion zu sein scheint (Lloyd, Amirmoazzami et al. 1997; Martinez, Curi et al. 1998). Weitere Ergebnisse, wie die Beeinflussung der Regulation der Glucagonausschütung oder der inflammatorischen Antwort durch SSTR2, aus der Arbeit mit diesem Modell stehen derzeit noch aus.

1.4 Liganden an SSTR

Die fünf humanen SSTR-Subtypen binden SST-14 und SST-28 mit nanomolaren Affinitäten, wobei die Rezeptortypen 1 bis 4 höhere Affinitätswerte zugunsten des SST-14 zeigen, der SSTR5 dagegen eine 10 bis 15fach größere Selektivität für SST-28 im Vergleich zu SST-14 aufweist (Patel and Srikant 1994; Patel, Greenwood et al. 1995; Patel 1997; Farooqi, Bevan et al. 1999). Das beim Menschen gefundene CST-17 zeigt ebenfalls eine nanomolare Affinität zu allen fünf SSTR und kann als dritter physiologischer Ligand angesehen werden, da es in manchen Geweben sowohl in Gesellschaft zum SST produziert wird, in anderen jedoch allein gefunden werden kann und bis heute keine eigene Rezeptorfamilie nachgewiesen werden konnte. (Dalm, van Hagen et al. 2004; Gottero, Prodam et al. 2004).
Die Spezifität des endogenen SST basiert zum einen darauf, dass es hauptsächlich an den Orten produziert wird, an denen es auch zur Wirkung kommen soll, und zum anderen direkt nach seiner Ausschüttung durch Peptidasen in Gewebe und Blut inaktiviert wird, was ungewollte systemische Nebenwirkungen minimiert.

Eine systemische Gabe eines synthetischen SST-Analogons dagegen hat deutlich weitläufigere Effekte, da es zu einer gleichzeitigen Aktivierung einer Vielzahl von SST-sensitiven Zielgeweben kommt. Diese Tatsache macht es neben der nur sehr kurzen Halbwertszeit des SST im Organismus notwendig, dass für den pharmakotherapeutischen Einsatz Analoga designed werden, die einen selektiveren Einsatz und eine größere metabolische Stabilität als die natürlich vorkommenden Peptide aufweisen.

Strukturanalysen in Bezug auf die biologische Aktivität des SST-14 haben gezeigt, dass die Sequenz der Aminosäurereste Phe^7, Trp^8, Lys^9 und Thr^{10}, die strukturell einen β-Turn formieren, eine zentrale Stellung einnimmt. Dabei sind Trp^8 und Lys^9 essentiell, wogegen im Falle Phe^7 und Thr^{10} eine gewisse Austauschbarkeit gegen vergleichbare Aminosäuren (Phe → Tyr bzw. Thr → Ser oder Val) möglich erscheint. Entsprechend war zu Beginn der Suche nach neuen Agonisten an SSTR die allgemeine Strategie zur Erstellung von SST-Analoga die Verknüpfung der zentralen Sequenz Phe^7-Trp^8-Lys^9-Thr^{10} mit Substituten, die entweder durch die Bildung einer Disulfidbrücke oder einer Aminoverbindung zu einer Stabilisierung des β-Turn führten (Bauer, Briner et al. 1982; Veber, Saperstein et al. 1984; Taylor and Coy 1997; Janecka, Zubrzycka et al. 2001). Auf diese Weise konnten eine ganze Reihe kurzkettiger, zyklischer Peptide synthetisiert werden, von denen einige in der Tat eine größere metabolische Stabilität und SSTR-Selektivität als SST-14 aufweisen.
Aus diesem Fortschritt ging als erstes das Oktapeptidanalogon SMS201-995 (Octreotide) als klinisch nutzbarer Stoff hervor (Bauer, Briner et al. 1982), der 1983 Eingang in den klinischen Alltag zur Therapie hormonproduzierender Hypophysen-, Pankreas- und Darmtumore fand und seit dem die wichtigste therapeutische Schiene bei der Behandlung mit SST-Analoga darstellt (Bauer, Briner et al. 1982; Lamberts, Krenning et al. 1991; Lamberts, Van Der Lely et al. 1996; Lamberts, de Herder et al. 2002).
Octreotide, BIM23014 (Lanreotide), RC160 (Vapreotide) und das Hexapeptid MK678 (Steglitide) binden ausschließlich nur an einen Teil der fünf SSTR. Octreotide zum Beispiel zeigt eine dem SST-14 vergleichbare Affinität zu den SSTR2 und –5 gegenüber einer moderaten Affinität zum SSTR3 (Patel and Srikant 1994; Patel, Greenwood et al. 1995; Reisine and Bell 1995; Bruns, Raulf et al. 1996; Patel 1997) und eine auffallend geringe Bindungsfähigkeit zu den Rezeptoren 1 und 4. Im Vergleich dazu zeigen Lanreotide und Vapreotide dagegen eine größere Affinität zum SSTR4. Die Erkenntnis über das Affinitätsverhalten des Octreotide führte zu der bereits oben erwähnten

Subklassifikation der SSTR in SIRF I, welche SSTR2, -3 und –5 umfasst, und SIRF II (Hoyer, Bell et al. 1995).

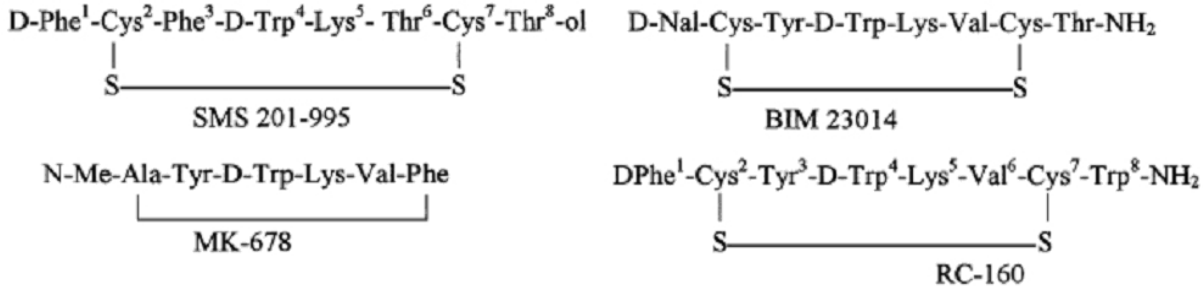

Abbildung 16: Typische Peptidanaloga des Somatostatins. Octreotide (SMS 201-995), Lanreotide (BIM 23014), Vapreotide (RC-160) und Steglitide (MK-678) mit Darstellung des für die Stabilisierung des ß-Turns nötigen Verbindung (Janecka, Zubrzycka et al. 2001).

Im direkten Vergleich zu SST-14 und SST-28 ist sogar seit einiger Zeit ein Nonapeptid-Analogon namens KE108 verfügbar, das eine Affinität zu allen fünf SSTR zeigt und dabei in Bezug auf die biologische Stabilität deutliche Vorteile auf sich vereinen könnte (Reubi, Eisenwiener et al. 2002). Ähnlich vielversprechend scheint das dem Somatostatin sehr ähnliche Analogon SOM230 zu sein, das sich durch eine hohe Affinität zu den SSTR-Subtypen 1, -2, -3 und -5 auszeichnet, dabei jedoch nicht an den SSTR4 binden soll (Weckbecker, Briner et al. 2002; Lewis, Bauer et al. 2003; Murray, Kim et al. 2004).

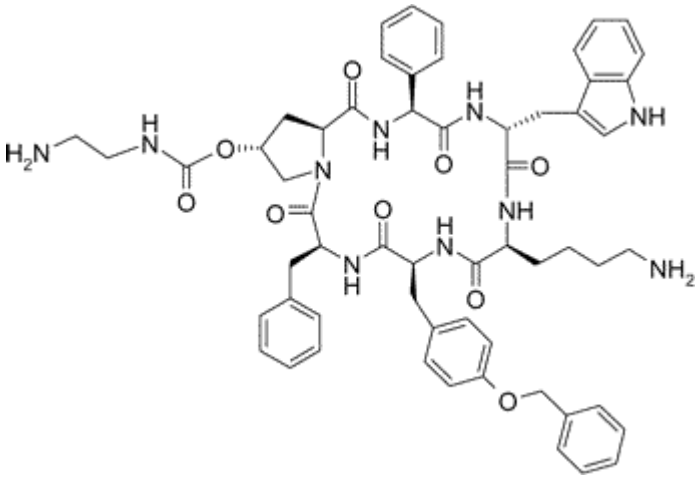

Abbildung 17: Struktur des neuen Somatostatinanalogon SOM230 (Lewis, Bauer et al. 2003)

Einen in dieser Beziehung ebenfalls besonders interessanten Aspekt brachte die Veröffentlichung über die Identifikation einer Reihe von SSTR-Subtyp-selektiven nicht-Peptid-Agonisten mit besonders hoher Affinität, die die Möglichkeit der direkten Untersuchung physiologischer Funktionen und die Entwicklung oral verfügbarer, Subtyp-selektiver Therapeutika in greifbare Nähe zu rücken scheinen (Rohrer, Birzin et al. 1998; Yang, Berk et al. 1998; Rohrer and Schaeffer 2000; Grace, Durrer et al. 2005; Rivier, Kirby et al. 2005; van der Hoek, Hofland et al. 2005). Nicht zuletzt, da sie den physiologischen Agonisten wie auch den im klinischen Alltag typischerweise zum Einsatz kommenden Peptid-Analoga wie dem Octreotide im Hinblick auf die biologische Stabilität deutlich überlegen sind (Janecka, Zubrzycka et al. 2001).

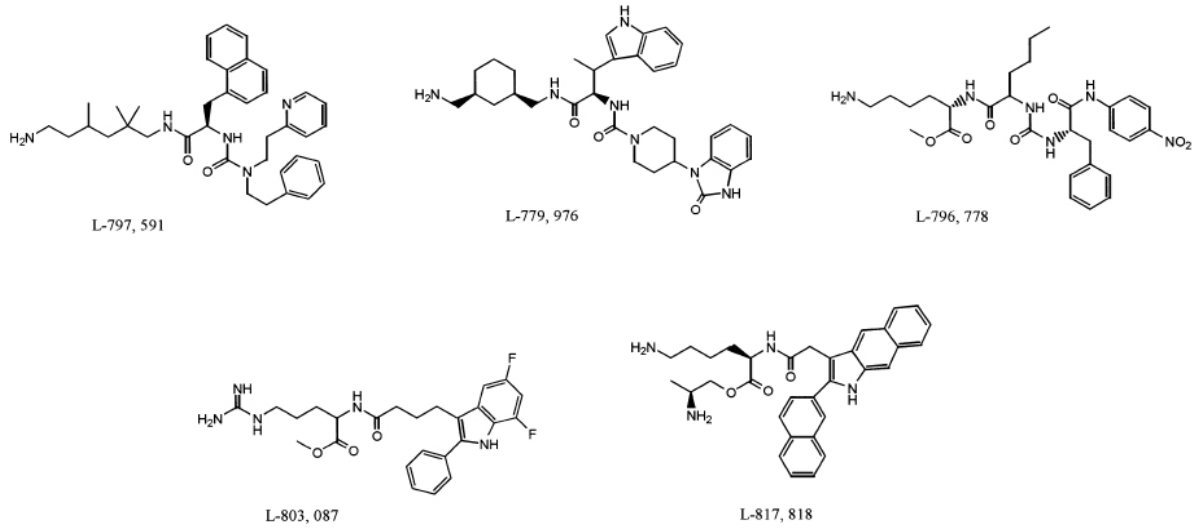

Abbildung 18: Struktur der rezeptorselektiven nicht-Peptid-Agonisten der Somatostatinrezeptoren. Von links oben nach rechts unten entspricht die Selektivität des Moleküls dem jeweiligen Rezeptorsubtyp SSTR1, -2, -3, -4 bzw. -5 (Janecka, Zubrzycka et al. 2001).

In den Hauptversuchen dieser Arbeit kommt schließlich ein weiteres synthetisches SST-Analogon zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ein Polydextransomatostatin mit dem Namen Somatostatin-Dextran-70 („Poly-SST“) und einem Molekulargewicht von 70 kDa und einer Halbwertzeit im Blut von 27 Stunden, welches durch eine Arbeitsgruppe um Anders Holmberg, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden, synthetisiert wurde (Behe, Du et al. 2001; Wulbrand, Feldman et al. 2002).

In der Zwischenzeit wurden auch erste SST-Antagonisten beschrieben, die eine nanomolare Affinität in Verbindung mit einer Rezeptorselektivität aufweisen, jedoch dabei die Koppelung des Rezeptors an die Adenylatzyklase antagonisieren, veröffentlicht (Bass, Buckwalter et al. 1996; Wilkinson, Feniuk et al. 1997; Janecka, Zubrzycka et al. 2001).

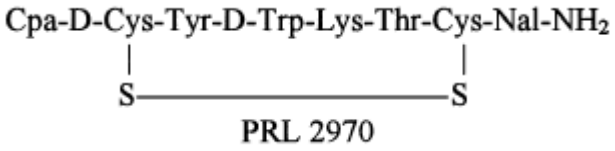

Abbildung 19: Der rezeptorselektive Antagonist PRL 2970 bindet an den SSTR2. Er stellt den bis dato potentesten Antagonisten dar, der bisher synthetisiert werden konnte (Janecka, Zubrzycka et al. 2001).

1.5 Klinische Bedeutung

1.5.1 Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus herrscht als zentrales Problem typischer Weise ein absoluter oder relativer Insulinmangel vor, wodurch es zur Unterscheidung des juvenilen Typ 1-Diabetes, vom Typ 2-Diabetes (auch Altersdiabetes) kam, wobei noch Sonderformen wie der MODY (Maturity onset diabetes of the young – eine Art Typ 2-Diabetes, die bereits in jungen Jahren auftritt!) Einzug in die moderne Nomenklatur erhielten.
Häufig findet man bei Patienten mit Diabetes mellitus erhöhte Glucagon- und GH-Werte im Serum, so dass, da die Sekretion dieser Hormone durch Somatostatin kontrolliert werden kann, dessen therapeutischer Nutzen sowohl bei der Insulin-pflichtigen (IDDM – Insulin-dependent diabetes mellitus) als auch bei der nicht-Insulin-pflichtigen (Non-insulin-dependent diabetes mellitus) Form dieses Krankheitsbildes postuliert wurde.
In der Tat konnten Studien nachweisen, dass bei diesen Patienten Octreotide in einer Dosis von 3 x 200 mg pro Tag die postprandiale Hyperglykämie deutlich reduzierte (Mosdell and Visconti 1994). Damit sanken die durchschnittlichen Blutglucosewerte im Tagesverlauf und der entsprechende Insulinbedarf.
Ebenfalls gibt es vielversprechende Ansätze in der Behandlung der sogenannten diabetischen Spätkomplikationen mit Somatostatinanaloga, speziell dem Octreotide. Diese betreffen insbesondere die Therapie der Diabetes-assoziierten Probleme am

Auge, wie die Verbesserung der Sehschärfe oder auch die Reduktion der Revaskularisation im Bereich der Retina sowie des Glaskörpers durch die Somatostatin-vermittelte Reduktion der GH- und IGF 1-Werte (van Hagen, Baarsma et al. 2000; Boehm 2003), aber auch die Behandlung der diabetischen Nephropathie (Landau, Segev et al. 2001).

1.5.2 Hypophysäre Adenome

1.5.2.1 Akromegalie

Die Wachstumshormon-sezernierenden Adenome gehören zu den ganz klassischen therapeutischen Feldern der SST-Analoga, da sie, als einem typischen Somatostatin-Zielgewebe entstammend, häufig eine hohe Dichte an Somatostatinrezeptoren aufweisen (Shimon 2003). Daher konnte schon früh der positive, wenn auch von der SST-Rezeptorzahl abhängige, therapeutische Effekt z. B. des Octreotide auf die Serumspiegel des GH und des IGF-1 gezeigt werden (Reubi and Landolt 1989). Entsprechend umfangreiche Erfahrungen liegen mittlerweile für Patienten mit Akromegalie vor, bei denen entweder der Unwillen zur Operation vorliegt, eine Operation aufgrund der Adenomgröße zu gefährlich wäre oder auch eine operative Versorgung ungenügende Ergebnisse zeigte, vor. Diese Ergebnisse beziehen sich sowohl auf den Einsatz eines konventionellen Therapieregimes mit täglichen Mehrfachgaben des SST-Analogons als auch auf die Behandlung mit Langzeitpräparaten auf Basis des Octreotide, des Lanreotide oder auch des Vapreotide (Lamberts, Uitterlinden et al. 1985; Lamberts 1988; Lamberts, Uitterlinden et al. 1988; Ezzat, Snyder et al. 1992; Heron, Thomas et al. 1993; Melmed 1993; Johnson, Chowdrey et al. 1994; Lamberts, van der Lely et al. 1996; Caron, Morange-Ramos et al. 1997; Flogstad, Halse et al. 1997; Gillis, Noble et al. 1997; Pawlikowski and Melen-Mucha 2003). Insgesamt konnten dabei nicht nur eine deutliche Verbesserung der Wachstumshormonspiegel im Serum der Patienten, bis hin zur vollständigen Suppression der Hormonausschüttung, aber auch eine Reduktion der Tumorgröße (Lamberts, Uitterlinden et al. 1985; Ezzat, Snyder et al. 1992) und eine Erleichterung der Kopfschmerzen, die häufig mit Akromegalie assoziiert sind (Lamberts 1988), der typischen Gelenkschmerzen, des Schwitzens sowie der Schlafapnoe gezeigt werden. In vielen Fällen überstieg die subjektive Besserung des Zustandes der Patienten die, die anhand der reinen Laborwerte zu erwarten gewesen wäre.

1.5.2.2 TSH-produzierende Adenome

Somatostatin reduziert in seiner physiologischen Funktion die Sekretion des TSH an den entsprechenden Zellen der Adenohypophyse.
Seine Effektivität in der Behandlung zur Suppression der TSH-Ausschüttung durch TSH-bildende Adenome konnte gezeigt werden (Reschini, Giustina et al. 1976). Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Besserung der klinischen Zeichen der Überproduktion von Schilddrüsenhormon und die Reduktion der TSH bzw. T_3-/T_4-Serumspiegel bei Patienten mit TSH-produzierenden Adenomen ergaben sich ebenfalls für verschiedene Formen der SST-Analoga (Chanson, Timsit et al. 1993; Gancel, Vuillermet et al. 1994; Hofland and Lamberts 2004).

1.5.2.3 Andere Hypophysentumore

Klinisch Hormon-inaktive Tumore fallen häufig erst im späteren Verlauf der Erkrankung durch die Folgen des lokal verdrängenden bzw. destruierenden Wachstums auf. In dieser Beziehung konnte beispielsweise eine Verbesserung der Gesichtsfeldausfälle durch Kompression des Chiasma opticum bei Patienten mit Hormon-inaktiven Tumoren der Adenohypophyse durch eine Therapie mit Octreotide gezeigt werden (Lamberts, de Herder et al. 1994). Inwieweit allerdings dabei ein Teil-Einfluss der SSTR der Retina oder des N. opticus vorlag, konnte damals nicht geklärt werden. Aktuelle Untersuchungen zu den sogenannten nicht-funktionierenden Hypophysenandenomen vermuten jedoch eine Therapie dieser Tumoren über den SSTR1 als besten Ansatz (Pawlikowski, Pisarek et al. 2003; Zatelli, Piccin et al. 2004).
Auf für den sogenannten Morbus Cushing verantwortlichen ACTH-produzierenden Adenomen konnten bis dato keine SSTR nachgewiesen werden (Lamberts 1988), so dass diese für die Therapie mit SST-Analoga nicht zugänglich zu sein scheinen (Hofland and Lamberts 2004). Für die durch CRH-produzierende Adenome erzeugte Form des Morbus Cushing scheint sich neuesten Untersuchungen zur Folge eine effektive Behandlungsmöglichkeit über den SSTR5 und das neue SST-Analogon SOM230 zu öffnen (van der Hoek, Waaijers et al. 2005). Allerdings im Fall der von einem Cushing Syndrom betroffenen Patienten, bei denen eine paraneoplastischen Sekretion von ACTH durch Tumoren typischerweise neuroendokrinen Ursprungs, wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie auch den Tumoren des Thymus oder des

Pankreas, vorliegt, konnte durch das Vorhandensein von SSTR durch SST-Analoga eine Reduktion der Hormonaktivität erzeugt werden. So zeigte sich beispielsweise, dass Octreotide einen direkten Einfluss auf die Ausschüttung von ACTH aus solchen Tumoren im Sinne eines inhibitorischen Effektes zu haben scheint, der mit der Reduktion der Level des Cortisols im Blut und Urin und einer deutlichen Besserung der klinischen Symptomatik einherging (Lamberts, de Herder et al. 1994; Doi, Imai et al. 2003).

1.5.3 Neuroendokrine Tumore

Ähnlich wie die Adenohypophyse stellen die verschiedenen Gewebe des Gastrointestinaltraktes typische physiologische Wirkorte des Somatostatins dar, wo es autokrin, parakrin oder auch als Neurotransmitter der Regulation der Vielzahl von, an der Verdauung und Nährstoffaufnahme im weitesten Sinn beteiligten hormonellen Zellsystemen dient. Es wundert daher nicht, dass Somatostatin Analoga mit großem Erfolg innerhalb der Therapieregimes solcher neuroendokriner Tumoren etabliert wurde.

Tumour	Symptoms/syndrome	Main hormone/ peptide	Percent malignant	Main sites (%)
Insulinoma	Neuroglucopenia Whipple's trias	Insulin	5–10	Pancreas
Gastrinoma	Zollinger-Ellison syndrome Peptic ulcer Diarrhoea Epigastric pain	Gastrin	60–90	Pancreas (30–60) Duodenum (30–40) Others (10–20)
VIPoma	Verner-Morrison syndrome Pancreatic cholera syndrome Watery diarrhoea	VIP	80–90	Pancreas (90)
Glucagonoma	Glucagonoma syndrome Necrolytic migratory erythema Diabetes mellitus Sore red tongue	Glucagon	60	Pancreas (>90)
Somatostatinoma	Gallstones Diabetes mellitus Upper abdominal pain or functionally inactive	Somatostatin	60	Pancreas (60) Duodenum (30)
GRFoma	Acromegaly	GRF	50	Pancreas (30) Lung (50) Small intestine (10) Others (10)
Carcinoid tumour	Carcinoid syndrome or functionally inactive	Serotonin Tachykinins	90	Small intestine (70) Bronchial system (10) Pancreas (5) Others (15)

Abbildung 20: Hauptcharakteristiken und führende Symptome neuroendokriner Tumoren (Arnold, Simon et al. 2000)

1.5.3.1 Tumore des Gastrointestinaltraktes

Mehr als 80 Prozent der neuroendokrinen Tumoren der panreaktischen Inseln, des Duodenums und des übrigen Gastrointestinaltraktes exprimieren SSTRs (Reubi, Kvols et al. 1990; de Herder, Hofland et al. 2003; Fjallskog, Ludvigsen et al. 2003). Die meisten dieser Veränderungen wachsen langsam und haben häufig bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnostik metastasiert. Die führende klinische Symptomatik der Patienten ist dabei typischerweise nicht durch das Wachstumsmuster des Primarius oder ggf. seiner Metastasen bedingt, sondern begründet sich auf die hormonelle Hypersekretion des Tumors und die damit verbundene Aushebelung physiologischer Regelmechanismen.
Für Octreotide konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es die Symptome bei Patienten mit einem VIPom, einer Tumorart, die das vasointestinal-aktive Peptid produziert, gut zu kontrollieren vermag. Diese Patienten leiden an einem typischen Bild aus wässriger Diarrhoe mit folgender Hypokaliämie, Achlorhydrie und Dehydratation. Ähnliche Erfolge in der Behandlung der Symptomatik zeigte sich ebenfalls bei Patienten mit Gastrinomen, Insulinomen und Glucagonomen (Kvols, Buck et al. 1987; Farooqi, Bevan et al. 1999; Arnold, Wied et al. 2002; Oberg, Kvols et al. 2004; Reubi 2004), wobei die Insulinome, obwohl auch bei ihnen die SSTR2 und –5 als typische Rezeptoren gelten (Bertherat, Tenenbaum et al. 2003), in etwa 50 Prozent der Fälle einer Behandlung mit Octreotide nicht zugänglich sind, da sie dann ausschließlich nicht Octreotide-bindende SSTR-Subtypen exprimieren (Lamberts, Krenning et al. 1991; Bertherat, Tenenbaum et al. 2003). Allerdings könnte in Zukunft für sie ein therapeutischer Ansatz mit neuen, polyspezifischen Liganden wie beispielsweise dem SOM230 geschaffen werden (Reubi, Eisenwiener et al. 2002; Murray, Kim et al. 2004). Trotz der vielfach gesehenen guten Wirksamkeit in der Symptomkontrolle der Patienten, findet sich ebenfalls sehr häufig eine Abnahme der therapeutischen Wirkung der SST-Analoga, wie dem Octreotide, im Laufe der Behandlungsdauer, der zunächst mit einer Steigerung der Dosis des Medikament begegnet werden kann. So wurde bereits frühzeitig berichtet, dass dies in praktisch allen Fälle letztlich in einem Verlust der klinischen Wirksamkeit der Behandlung mündet (Wyndick, Anderson et al. 1989). Zurückzuführen soll dieser Wirkverlust auf die Entwicklung und das Wachstum von Tumorzellklonen sein, die sich durch ein Fehlen durch die eingesetzten Analoga erreichbarer SSTR auszeichnen (Farooqi, Bevan et al. 1999).

1.5.3.2 Karzinoid Syndrom

Ähnlich wie im Falle der Aromegalie-verursachenden GH-produzierenden Adenome der Hypophyse stellt auch im Behandlungsansatz der Karzinoide die Anzahl der exprimierten SSTR den terminierenden Faktor für die zu erwartende Wirksamkeit der Therapie mit SSTR-Agonisten dar (Reubi, Kvols et al. 1990; Reubi, Schaer et al. 1997). Mit Octreotide konnten sehr gute Erfolge bei der Kontrolle von Patienten mit metastasierten Karzinoiden und durch die Hypersekretion von Serotonin und Tachykinin bedingter Diarrhoe und Flush-Symptomatik gezeigt werden (Kvols, Moertel et al. 1986; Pawlikowski and Melen-Mucha 2003), die sich auch diagnostisch an der Reduktion der Konzentration der 5-Hydroxyindolessigsäure im Urin nachweisen ließ. Da sowohl hypertensive als auch hypotensive Karzinoidkrisen sehr gut auf SST-Agonisten ansprechen, haben diese mittlerweile eine zentrale Stellung in der Prophylaxe und Notfallbehandlung von Karzinoidpatienten vor und während der operativen Behandlung.

1.5.3.3 Multiple Endokine Neoplasie Typ I (MEN-I)

Hierbei handelt es sich um ein genetisch determiniertes, autosomal dominant mit variabler Penetranz vererbtes Krankheitsbild. Die betroffenen Patienten zeichnen sich durch das Auftreten von Neoplasien im Bereich der Adenohypophyse, den Nebenschilddrüsen und dem endokrinen Pankreas sowie, weniger regelhaft, der Nebennierenrinde und der Schilddrüse aus (Calender 2000; Bordi 2004).
Etwa 80 % aller Betroffenen entwickeln Tumore des endokrinen Pankreas jedweder Art. Umgekehrt findet sich beispielsweise bei 30 % aller Gastrinome das Vorliegen eines MEN-1. Auffällig ist hierbei, dass sich Gastrinome der MEN-1-Patienten häufiger im Bereich des Duodenums als dem Pankreas selbst lokalisiert sind. Nicht selten findet man aber auch die Entwicklung eines Gastrinoms sowohl in Duodenum und Pankreas sowie das Auftreten von Karzinoiden im Bereich der Lunge, des Duodenums oder des Magens bei diesen Patienten (Oberg 2001).
Entsprechend der Ursprungsgewebe der einzelnen, bei diesem komplexen Krankheitsbild auftretenden Tumoren, hat sich der Einsatz von SST-Analoga als sehr wertvoll erwiesen.

1.5.4 Andere onkologische Krankheitsbilder

In vielen Behandlungsschemata und Chemotherapieprotokollen finden sich SSTR-Analoga als festen Bestandteil. Zu den typischen Malignomen, die einem therapeutischen Ansatz mit Somatostatin bzw. seinen Analoga zugänglich sind, gehören, neben den bereits erwähnten neuroendokrinen Tumoren, die Adenokarzinome der Brust, der Niere, des Kolons und des Ovars sowie die Meningiome (Reubi, Kvols et al. 1990; Lamberts, Krenning et al. 1991; Reubi, Schaer et al. 1997; Lamberts, de Herder et al. 2002).
Man versucht sich dabei natürlich einerseits die direkte SSTR-vermittelte Wirkung auf die Tumorzellproliferation, andererseits aber auch indirekte Effekte, wie beispielsweise die Reduktion auf das Malignom wirkender Wachstumsfaktoren oder die Angiogenese des wachsenden Tumors, zu Nutze zu machen (Lamberts, van der Lely et al. 1996; Kumar, Liu et al. 2004).

1.5.5 Gastrointestinaltrakt

Neben den gerade besprochenen neuroendokrinen Tumoren, die sich ebenfalls in den meisten Fällen im Gastrointestinaltrakt finden, gibt es aber noch eine ganze Zahl anderer Einsatzmöglichkeiten für SSTR-Agonisten.

1.5.5.1 Ösophagusvarizen

Die, der Behandlung der Ösophagusvarizen mit SST-Analoga zugrunde liegende Wirkung der Somatostatins stellt die Reduktion des Blutflusses im Splanchnikusgebiet dar. Hierbei zeigte sich eine effektive Einsatzmöglichkeit z. B. für Octreotide bei der Akutbehandlung der Varizenblutung (Valenzuela, Schubert et al. 1989; Burroughs, McCormick et al. 1990; Pawlikowski and Melen-Mucha 2003) aber auch bei Fortbestehen oder Wiederauftreten der Blutung nach einer Sklerosierungsbehandlung (Sung, Chung et al. 1993).

Ein weiterer, sehr wichtiger Ansatz für SSTR-Agonisten liegt heute in der Kontrolle des Blutdruckes in der Portalvenenstrombahn im Rahmen der Transplantationschirurgie der Leber.

1.5.5.2 Sekretorische Diarrhoe

Der Hintergrund für den klinischen Einsatz von SST-Analoga in der Behandlung der therapierefraktären Diarrhoe, der Störungen der intestinalen Motilität sowie der intestinalen Fisteln begründet sich in der SSTR-vermittelten Wirkung auf die intestinale Absorption sowie die Inhibierung der Sekretionsraten des Magens, des Darms und des Pankreas.
Für Octreotide konnte eine Reduktion der Flüssigkeitsvolumina bei Ileostoma-Diarrhoe, enterokutanen Fisteln und dem Kurzdarmsyndrom gezeigt werden (Mosdell and Visconti 1994; Pawlikowski and Melen-Mucha 2003). Zusätzlich zeigte sich eine Verbesserung der, durch neuroendokrine Tumore bedingten sekretorischen Diarrhoe, der mit AIDS assoziierten Diarrhoe sowie der intestinalen Graft-versus-host-Reaktion (Farthing 1994).

1.5.5.3 Pankreas

SST-Analoga haben ihre Bedeutung in der Behandlung sowohl der akuten als auch der chronischen Pankreatitis als auch der Pankreatitis als Komplikation nach endoskopisch retrograder Cholangiopankreatographie (ERCP) erlangt (Mosdell and Visconti 1994). Weitere Ansätze bieten die Pseudozysten des Pankreas, die Pankreaschirurgie sowie die Transplantation des Pankreas.

1.5.6 Nuklearmedizin

1.5.6.1 Detektion rezeptorpositiver Tumoren

Die Somatostatinrezeptor-Szintigraphie unter Nutzung mit Gamma-Strahlern markierter SST-Analoga wie dem [^{111}In-DTPA^{0}-D-Phe^{1}]-Octreotide, dem ^{111}In-Pentreotide („Octreoscan") oder dem ^{111}In-DOTA-Lanreotide („^{111}In-MAURITIUS") ist heute das wichtigste diagnostische Werkzeug zur Untersuchung von Patienten mit vermuteten neuroendokrinen Tumoren (Krenning, Kwekkeboom et al. 1993; Meko, Doherty et al. 1996; Warner and O'dorisio 2002; Cimitan, Buonadonna et al. 2003) und in ihrer Sensitivität sowie Spezifität allen anderen gängigen Verfahren, wie dem MRT, dem CT oder der Sonographie, aber auch dem Nachweis von Tumormarkern wie dem Chromogranin A deutlich überlegen. Dabei stellt ein positiver Nachweis eines Tumors im SSTR-Szintigramm gleichzeitig eine Vorhersage über die Effektivität einer weiteren Therapie mit entsprechenden SST-Analoga dar. Aber auch für andere Tumorarten, wie z. B. das Osteosarkom, könnte die SSTR-Szintigraphie von Nutzen sein (Ferrari, Dondi et al. 2003).

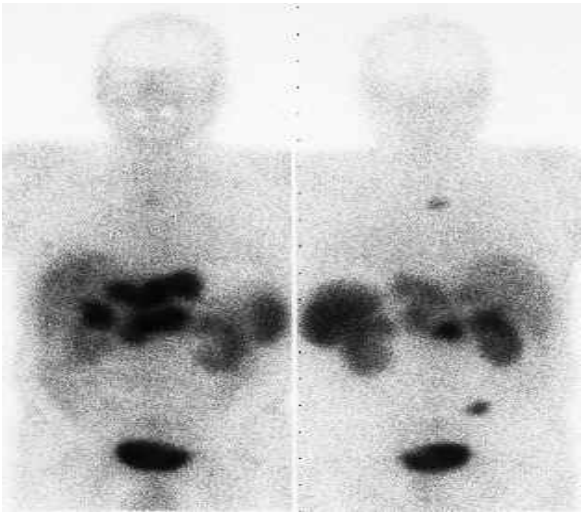

Abbildung 21: Beispiel eines Somatostatinrezeptor-Szintigrams eines Patienten mit einem metastasierten neuroendokrinen Pankreastumor. Die linke Bildhälft zeigt dabei die a.p.-, die rechte die p.a.-Aufnahme.

Mit der dynamischen Szintigraphie ließen sich 90 % aller Patienten mit Karzinoiden, besonders mit Leber-, regionalen Lymphknoten- und Kochenmetastasen nachweisen. In vielen Fällen gelang sogar die Detektion des Primarius, der trotz Bestehen von Tochtergeschwülsten typischerweise noch so klein ist, dass er sich mit anderen

bildgebenden Verfahren wie dem MRT, der Sonographie oder gar dem CT nur in seltenen Fällen darstellen lässt. Dennoch stellen Läsionen mit einem Durchmesser unter 1 cm, wie man sie häufig bei Patienten mit MEN-1 findet, nach wie vor ein diagnostisches Problem dar (Oberg 2001).
Ein weiteres Problem, dem sich derzeit intensive Forschungsbemühungen widmen, ist die Rezeptorselektivität der typischerweise genutzten radioaktiven Markermoleküle, die auf den klassischen SST-Analoga, wie beispielsweise dem Octreotide, aufbauen. Das es sich bei Octreotide um eine Analogon mit selektivem Bindungsverhalten zu den SSTR2 und -5 handelt, lassen sich entsprechend auch nur Tumoren, die diese Rezeptoren in ausreichendem Maße exprimieren, in verlässlicher Weise darstellen.
Eine Lösung dieses Problems könnte, neben der Nutzung sogenannter poly-selektiver Radioliganden wie zum Beispiel dem radioaktiv markierten SOM230, die Ausweitung der Untersuchungsmethode auf zwei oder gar mehrere Zielrezeptoren darstellen. Diese Idee basiert auf der Erkenntnis, dass insbesondere neuroendokrine Tumoren typischerweise weitere spezifische Rezeptoren, wie VIP-, Cholezystokinin- und Bombesinrezeptoren, in verschiedenen Subtypen auf ihrer Oberfläche besitzen und entsprechend eine Kombination von Radioliganden eine noch bessere Darstellbarkeit zur Folge haben könnte (Reubi and Waser 2003).

1.5.6.2 Therapie von Malignomen über Somatostatinrezeptoren

Basierend auf dem Prinzip der Markierung der Malignomzelle mit radioaktiven Liganden in der Szintigraphie beschäftigt sich derzeit viel Forschungsarbeit mit der rezeptorvermittelten Einschleusung von α- und β-Strahlern in die Zellen eines Tumors. Dabei soll erreicht werden, dass auf nur möglichst kurze Distanz schädliche Radioliganden durch Internalisation in die Nähe des Zellkerns und des Genoms der entsprechenden Zielzelle geraten. Die derzeit gängigen Radioliganden wurden aus den etablierten SST-Analoga wie dem Octreotide oder auch dem Lanreotide entwickelt und wurden mit ^{111}In, ^{90}Y oder auch dem ^{117}Lu markiert (Krenning, de Jong et al. 1999; Smith, Liu et al. 2000; De Jong, Valkema et al. 2002; Oberg 2004; Kwekkeboom, Mueller-Brand et al. 2005).
In enger Gemeinsamkeit zu der Entwicklung neuer Liganden zur rezeptorvermittelten Radiotherapie steht die Synthese mit zytotoxischen Substanzen markierter Liganden,

die in analoger Weise in die Zielzelle eingeschleust, durch ihre Schädigung neue therapeutische Wege öffnen könnten (Szepeshazi, Schally et al. 2003).
Von entscheidender Bedeutung hierbei ist jedoch in Bezug auf die Durchführbarkeit eines solchen Therapieansatzes, dass die Zellen die Zielrezeptoren im Verhältnis zu „normalen" Zellen deutlich überexprimieren, um, bei ausreichender Wirksamkeit auf die Zellen des Malignoms, einen bestmöglichen Schutz der übrigen Körpergewebe gewährleisten zu können (Oberg 2001).

Auch hier könnte der bereits angesprochene Ansatz der Therapie über selektive Liganden unterschiedlicher Rezeptorfamilien (z. B. Somatostatin, Gastrin, Bombesin oder auch Cholezystokinin) gleichzeitig zu einer weiteren Verbesserung bereits erreichter Ergebnisse beitragen (Reubi and Waser 2003).

Ein ganz neuer und für die Zukunft sicherlich mit großem Interesse zu beobachtender Ansatz wird die an Rezeptoren ansetzende Gentherapie zur Behandlung von Malignomzellen sein (Buchsbaum, Chaudhuri et al. 2005).

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung:

Somatostatin als entwicklungsgeschichtlich sehr altes Hormonsystem spielt sowohl in der medizinischen Wissenschaft als auch in der klinischen Praxis eine wichtige Rolle. Nicht zuletzt, da es den Ansatz einer Vielzahl von therapeutischen Interventionsmöglichkeiten einer Reihe Krankheitsbilder u. a. in der Endokrinologie, der Onkologie, der Nuklearmedizin oder auch verwandten Disziplinen wie der endokrinen Chirurgie und endokrinen Ophthalmologie bietet.
Therapeutisch vielversprechende Ansatzpunkte, wie z. B. die Auslösung des programmierten Zelltodes, scheinen dabei lediglich durch bestimmte Rezeptorsubtypen vermittelt zu sein, so dass hier intensive Forschung betrieben wird. Dennoch sind gerade im Bereich der Grundlagenforschung an Somatostatin und seinen Rezeptorsubtypen viele Fragen ungeklärt. So blieben bislang beispielsweise entscheidende Fragen zur intrazellulären Signaltransduktion nach Stimulation eines Somatostatinrezeptors ohne befriedigende Antwort.

Diese Arbeit soll nun einen Betrag dazu leisten, ein einfaches, verlässliches und dabei rein humanes Modellsystem einführen zu können, welches Grundlagenforschung abseits der bislang etablierten heterologen Zell-Rezeptor-Systeme ermöglicht und in Folge auf direkterem Wege zu validen Antworten in Bezug auf das Hormonsystem „Somatostatin" des Menschen führt.

Nach der stabilen Transfektion aktivierbarer DNA-Konstrukte humaner Somatostatinrezeptor-Subtypen in die vorher Somatostatinrezeptor-negative humane neuroendokrine Kolonkarzinom-Zelllinie LCC-18 in Zusammenarbeit mit Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe soll nun gezeigt werden, dass es möglich ist, diese als ein einfach handhabbares, rein humanes Zellsystem zur weiterführenden Erforschung der durch Somatostatin hervorgerufenen intrazellulären Reaktionen unter praktischen Gesichtspunkten zu nutzen.
Im weiteren wird die korrekte Funktion der stabil transfizierten Subtyp-spezifischen DNA-Konstrukte mittels Bindungsstudien und der Anschluss der Rezeptoren an die intrazelluläre Signalkette durch den Nachweis des zu erwartenden Einfluss des Somatostatins auf den intrazellulären Spiegel des Second-messengers cAMP verifiziert. Gleichzeitig folgt der Beweis, dass die Promotoraktivität des Chromogranin A, eines typischen sekretorischen Proteins neuroendokriner Tumoren, in den erzeugten Somatostatinrezeptor-tragenden Zellklonen gesenkt werden kann.

3 Material und Methoden:

3.1 Zelllinien

3.1.1 LCC-18

Die Etablierung und Einführung der LCC-18-Zellen wurde durch die Arbeitsgruppe um Lundqvist 1991 durchgeführt (Lundqvist, Mark et al. 1991). Sie gewannen und lysierten unbehandeltes Tumormaterial eines, an einem neuroendokrinen Kolontumor leidenden australischen Patienten und züchteten es im Kulturmedium HITES an. Im späteren Verlauf wurden gefrorene Kulturzellen zur weiteren Charakterisierung an das Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Schweden, geschickt, wo zum einen immunhistochemische sowie zytogenetische Untersuchungen und zum anderen in vivo Untersuchungen, in Form von in ein Rnu/rnu-Nacktrattenmodell subkutan injizierten Kulturzellen, vorgenommen wurden.

Sowohl die kultivierten als auch die im Nacktrattenmodell transplantierten Zellen zeigten die bereits beim Primärtumor gefundene Immunhistopathologie. Als positive neuroendokrine Marker fanden sich VIP (Kulturmedium ca. 30pmol/l, Zell-Pellets ca. 100 pmol/l), Substanz P, Glucagon (Kulturmedium ca. 30 pmol/l, Zell-Pellets ca. 260 pmol/l) und Chromogranin A. Der Nachweis von Somatostatin und seinen Rezeptoren war negativ.
Das c-myc-Gen erschien im Vergleich zum normalen, peripheren Makrophagen um das drei- bis vierfache amplifiziert.
Im Nacktrattenmodell zeigte sich nach einer subkutanen Injektion von 1 Millionen Zellen eine palpable Tumorgrösse nach 8 Wochen Wachstumszeit, wobei keine Metastasen beobachtet werden konnten.

Diese Zelllinie wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. K. Öberg, Ludwig Instute for Cancer Research, Uppsala, Schweden, zur Verfügung gestellt.

3.1.2 INR1-G9

Diese, in unseren Arbeitsgruppen fest etablierte Zelllinie entstammt den Klonierungsversuchen einer japanischen Arbeitsgruppe um Takaki an Glucagonomzellen des Hamsters (Takaki, Ono et al. 1986) und diente auf Grund ihres sehr hohen Exprimierungsgrades für den SSTR-2 in einem Teil unserer Untersuchungen als Positiv-Kontrolle.

3.1.3 BON

Diese Zelllinie wurde 1994 als erste humane pankreatische Karzinoidzelllinie etabliert (Parekh, Ishizuka et al. 1994). Sie exprimiert natürlicher Weise die Rezeptoren SSTR1, -2 und -5 in guten Raten und diente als Positivkontrolle während der Chromogranin A-Promotor-Studien. Der Grund hierfür liegt darin, dass sich die ansonsten als Positivkontrolle genutzte Zelllinie INR1-G9, wie sich während der Voruntersuchungen zeigte, nur eingeschränkt zur transienten Transfektion eignete. Daher wurde auf diese Zelllinie zurückgegriffen, deren transiente Transfektion unproblematisch zu erreichen war.

3.2 Medien:

3.2.1 HITES-Medium:

Hierbei handelt es sich um das Standartmedium der LCC-18-Zelllinie.
„HITES" stellt dabei die Abkürzung für „Hydrokortisol, Insulin, Transferrin, Estradiol, Selen" dar.

500 ml	RPMI – Medium 1640 mit 11 mmol Glucose
5 Vol. %	fötales Kälberserum (FCS)
3,6 ng/ml	Hydrokortisol
0,67 mg/500 ml	Insulin
20 mg/500 ml	Transferrin
0,55 µg/500 ml	17-β-Estradiol
1,93 µg/500 ml	Natrium-Selenium
100 U/ml	Penicillin
100 mg/ml	Streptomycin

Diesem Medium wurde als „Selektionsdruckmittel" zur Versorgung der stabil transfizierten Klone G418 in einer Konzentration von 400 µg/ml sowie Hygromycin B in einer Konzentration von 200 µg/ml beigemischt.

3.2.2 INR1-G9-Medium:

500 ml	RPMI – Medium 1640 mit 11 mmol Glucose
10 Vol. %	fötales Kälberserum (FCS)
100 U/ml	Penicillin
100 mg/ml	Streptomycin

3.2.3 BON-Medium:

Zur Herstellung des Bon-Medium wurde lediglich eine Mischung aus gleichen Teilen Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) und F12 Medium hergestellt. Zugesetzt wurde zusätzlich Penicillin (100 U/ml) sowie Streptomycin (100 mg/ml).

3.2.4 Material:

17-β-Estradiol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
D-MEM	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
F 12-Medium	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
FCS	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Geneticin (G418)	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Hydrokortisol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Insulin	Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland
Hygromycin B	Clontech, Palo Alto, USA
Natrium-Selenit	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RPMI 1640	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Penicillin	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Streptomycin	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.3 Methoden

3.3.1 Stabil transfizierte Zelllinien

Die stabil transfizierten LCC-Klone wurden in der Arbeitsgruppe erzeugt, wobei hierbei Herr Dr. Wulbrand den herausragenden Teil der Klonierung leistete. Die Methodik der Generierung stabil transfizierter Zellklone wird im Anhang unter Punkt 10.1 erläutert.

3.3.2 Zellkultur

3.3.2.1 Routinekultur von Zellen

Zur Routinekultur der Zellen wurden Zellkulturflaschen (200 ml, Cellstar, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) verwandt. Ihr Wachstum fand bei gleich bleibendem Klima (Temperatur 37°C) und feuchtigkeitsgesättigter Luft (Luftfeuchtigkeit 90%) unter Begasung mit 5% CO_2 in einem Brutschrank (Heraeus Instruments BB 6220) statt. Die Begasung mit 5% CO_2 war zur Stabilisierung des pH-Wertes des, in den Kulturmedien vorhandenen Hydrogencarbonat-Puffer notwendig. Entsprechend durften die im Schrank gelagerten Zellkulturflaschen niemals fest verschlossen sein, da sonst kein regelhafter Gasaustausch hätte stattfinden können.

3.3.2.2 Nährmedienwechsel

Abhängig von der vorliegenden Zelldichte sowie der Farbindikation des Mediums wurde etwa alle zwei bis drei Tage das Medium in allen Zellkulturflaschen gewechselt. Hierzu wurde unter den Bedingungen einer Sterilbank für Zellkulturarbeit (Modell Lamin Air HB 2448, Heraeus, Hanau, Deutschland) das alte Medium vorsichtig am Rand des Zellrasens restlos abgesaugt und ebenfalls unter entsprechender Vorsicht durch zimmertemperiertes, frisches Medium ersetzt.

3.3.2.3 Passagierung

Etwa zweimal pro Woche musste eine Passagierung der in Kultur befindlichen Zellen durchgeführt werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst, nach sorgfältigem Absaugen des Mediums am Rande des Zellrasens, vorsichtig mit 37°C warmer 1xPBS-Lösung gespült. Zur Ablösung der in der Flasche verbliebenen adhärenten Zellen dienten 2 - 2,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung, so dass diese, nach einer Einwirkzeit von etwa 3 - 5 min, problemlos unter Zuhilfenahme von etwa 3 - 5 ml raumtemperierten Mediums mit einem weichen Pipettenstrahl abgespült werden konnten. Je nach vorbestehender Konfluenz des Zellrasens, wurden die resuspendierten Zellen auf 3 oder 4 neue Kulturflaschen verteilt und die Passagezahl um 1 erhöhlt.

Zur Beschickung der für Versuche genutzten 6-, 24- oder 96-Well-Platten wurde keine trypsinhaltige Lösung eingesetzt. Nach vorsichtigen Entfernen des Mediums und dem oben bereits beschriebenen Waschschritt mit 1xPBS-Lösung wurden statt dessen 5 ml 1xPBS-EDTA-Lösung zugegeben, so dass die Zellen nach kurzer Einwirkzeit mit weichem Pipettenstrahl abgespült und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt werden konnten. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet im entsprechenden raumtemperierten Medium resuspendiert und auf die Well-Platten überführt.
Zielgrößen hierbei waren ca. 1.000.000 Zellen in 2 ml Medium pro Well einer 6-Well-Platte, ca. 100.000 Zellen in 0,5 ml Medium pro Well einer 24-Well-Platte sowie ca. 10.000 Zellen in 0,1 ml Medium pro Well einer 96-Well-Platte. Diese Mengen wurden stichprobenartig vor Aussaat mittels einer Neubauerzählkammer kontrolliert.

3.3.2.4 Kryopräservation und Lagerung von Zellen

Der adhärent wachsende Zellrasen einer 75 cm^2-Kulturflasche wurde zur Gewinnung zweier Einfrierampullen (Kryoröhrchen) mit je 1 ml Zellsuspension mittels PBS-EDTA abgelöst, in Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 800 rpm abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 1,8 ml Medium sowie die gleichmäßige Verteilung auf wie Kryoröhrchen. Zuletzt folgte die langsame Zugabe von 100 µl DMSO pro Probe (Endkonzentration 10%).

Zum stufenweisen Herunterfrieren der Proben wurden diese zunächst in einem geeigneten Styroporbehälter in einen Gefrierschrank bei -20°C überführt und dort für mindestens 24 Stunden gelagert. Es folgte ein zweiter Schritt für mindestens 24 Stunden bei -80°C und schließlich die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff.

3.3.2.5 Auftauen kryopräservierter Zellen

Im Gegensatz zum relativ langwierigen Vorgehen beim Einfrieren von Zellen, geht das Auftauen sehr schnell. Vor Entnahme der Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank wurden entsprechende Zellkulturflaschen mit 25 ml 37°C-warmen Medium beschickt und so für die Aufnahme der aufgetauten Zellen vorbereitet.

Das aus dem Stickstofftank entnommene Kryoröhrchen wurde zum Antauen direkt für wenige Sekunden in einen mit lauwarmem Wasser gefüllten Becher gelegt, um dann sofort in die vorbereiteten Zellkulturflaschen entleert zu werden. Die Kulturflaschen wurden umgehend zur Regeneration des Zellstoffwechsels in den Brutschrank überführt. Nach 24 Stunden Bebrütungszeit folgte ein obligater Zellmedienwechsel.

3.3.2.6 Material und Geräte

6-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Aqua ad injectabila	Braun, Melsungen, Deutschland
Brutschrank BB 6220	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
EDTA 0,02%	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Geneticin (G418)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Gewebekulturflaschen Cellstar	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Glutamin 200mM	Seromed, Wertheim, Deutschland
Hygromycin B	Clontech, Palo Alto, USA
Insulin	Hoechst, Frankfurt, Deutschland

Neubauerzählkammer	Braun, Melsungen, Deutschland
Quadriperm-Schalen	Heraeus, Hanau, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Selenit	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Sterilfilter	Millipore, Molsheim, Deutschland
Sterilbank Lamin Air HB 2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.3.3 Somatostatin-Bindungsassay

Die Methodik des sogenannten Bindungsassays beruht auf dem Prinzip der konzentrationsabhängigen Verdrängung eines radioaktiv markierten (= heißen) Liganden durch einen unmarkierten (= kalten) aus einer Rezeptorbindung.
Hierzu wurde einem jeden Versuchsansatz dieselbe, definierte Menge an heißem Liganden zugegeben und jeweils in Doppelbestimmung eine definierte Menge kalten. Neben einer Doppelbestimmung ohne kalten Liganden wurde seine Konzentration von Doppelbestimmung zu Doppelbestimmung reduziert. Im Hauptversuch üblich war eine Konzentrationsreihe von 10^{-6}M, 10^{-7}M, 10^{-8}M, 10^{-9}M, 10^{-10}M, 10^{-11}M sowie 10^{-12}M, wogegen im Rahmen der Vorversuche die untersuchten Konzentrationen auf 10^{-6}M und 10^{-8}M eingeschränkt wurde.
Entsprechend konnte nach sorgfältiger Entfernung der Reaktionslösung auf Ligandenverdrängung zurückzuführende Radioaktivitätsdifferenzen mittels γ-Counter gemessen werden.

3.3.3.1 Vorbereitung der Zellen

Die für den Versuch vorgesehenen Zellenklone der stabil transfizierten Zellen, der untransfizierten LCC- sowie der G9-Zellen wurden in großen Zellkulturflaschen bis zu einer 80%igen Konfluenz bebrütet.
Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden alle Zellen mit 10 ml PBS-EDTA abgelöst, zentrifugiert (800rpm für 3 min) und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden gleichmäßig (2 ml/Well) auf die 6-Well-Platten

verteilt und bis zum Versuchsbeginn bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die 6-Well-Platten dienten im weiteren Verlauf ebenfalls als Versuchsgefäß, so dass hier eine optimale Akklimatisierung möglich war.
Gleichzeitig wurde dem Medium aller stabil transfizierten Zellklonen Doxycyclin (2 µg/ml) zugegeben, um während der Inkubationszeit von 48 Stunden eine Expression der SSTR zu induzieren.

3.3.3.2 Durchführung

Zu Versuchsbeginn wurde das Medium aller Wells abgesaugt, die Zellen zweimal vorsichtig mit jeweils 2 ml 37°C temperierten PBS-Puffer gewaschen und dieser schließlich wieder am Rand des Zellrasens sorgfältig abgesaugt.
Es folgte die vorsichtige Zugabe von 2 ml Inkubationslösung je Well am Rand des Zellrasens. Die jeweiligen Inkubationslösungen waren direkt von Versuchsbeginn vorbereitet worden und bestanden aus 37°C vorgewärmtem KRB-Puffer mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA), 1mmol des Proteinasen-Inhibitors Pefa-Bloc SC und der jeweiligen, für eine Doppelbestimmung benötigten Konzentration von nicht-radioaktiv markiertem Liganden (SST-14, SST-28, Poly-SST). Sofort nach Zugabe der Inkubationslösung wurden jedem Well 50 µl des in KRB-Puffer gelöstem ^{123}I-Tyr-SST-14 (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK; spezifische Aktivität 2000 Cu/mmol), entsprechend etwa 25000 cpm Aktivität, zupipettiert und die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert.
Nach der Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung sorgfältig entfernt, die Zellen zweimal vorsichtig mit je 2 ml 37°C vortemperierten PBS-Puffer gewaschen und schließlich mit 1 ml ebenfalls 37°C vortemperierter 1M NaOH lysiert.
Zur Messung im γ-Counter wurden 0,75 ml des Zelllysates in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Messzeit betrug 180 sec.
Im sofortigen Anschluss an die Aktivitätsmessung im Counter wurde zur Normierung der Messwerte eine quantitative Proteinbestimmung aus 10 µl des Zelllysates der Eppendorf-Gefäße durchgeführt.

3.3.4 cAMP-EIA

Ein weiterer Untersuchungsaspekt dieser Arbeit war, neben den Versuchen zum Nachweis der Funktion des Expressionskonstruktes und der auf Stimulation hin exprimierten Rezeptoren, die Frage nach dem „intrazellulären Anschluss" der auf der Membran befindlichen Rezeptoren.
Die erste zu untersuchende Stufe der Signaltransduktion eines G-Protein-assoziierten Rezeptors, wie im Falle eines Somatostatinrezeptors, sollte entsprechend die intrazelluläre cAMP-Konzentration betreffen, da ja bekannt ist, dass die Wirkung des Somatostatins über seinen Rezeptor mit einer Erniedrigung des intrazellulären cAMP-Spiegels einhergeht. Um den Einfluss der rezeptorvermittelten Wirkung des Somatostatin auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration zeigen zu können, ist es sehr wirkungsvoll, den cAMP-Spiegel zuvor jedoch künstlich anzuheben.
Hierzu bietet sich der Wirkstoff Forskolin bzw. das kommerziell erhältliche synthetische Analogon an, deren Wirkung sich auf eine Aktivierung der Adenylatcyclase zurückführen lässt.

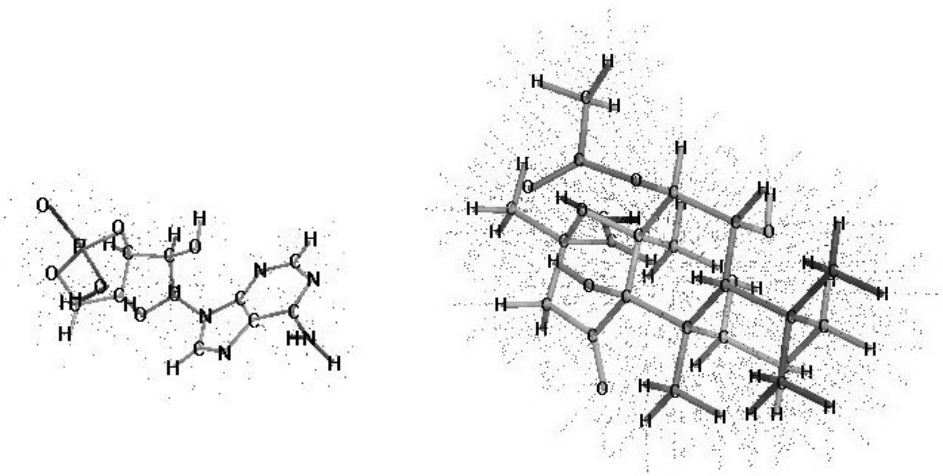

Abbildung 22: 3D-Strukturformel des cAMP (links) und des Forskolin (rechts). Datenquelle: www.chemfinder.cambridgesoft.com

3.3.4.1 Vorbereitung der Zellen

Die in Kulturflaschen herangezogenen Zellen wurden, sofern mit dem Expressionskonstrukt transfiziert, 48 Stunden vor Versuch mit Doxycyclin (2 µg/ml Medium) behandelt. Am Versuchsvortag folgte die Verteilung der Zellen auf 96-Well-Platten durch Ablösung mittels PBS-EDTA, Zentrifugation und Resuspension in frischem, raumtemperierten Medium. Dieses war für alle stabil transfizierten LCC-Klone wiederum mit Doxycyclin (2 µg/ml Medium) versetzt. Somit wurde auch hier eine Inkubationszeit des Doxycyclins zu Induktion der Rezeptoren von 48 Stunden eingehalten. Nach der Überführung der Zellen in die 96-Well-Platten wurden diese bis zum Versuchsbeginn am folgenden Tage unter Zellkulturstandartbedingungen im Brutschrank inkubiert.

3.3.4.2 Vorbereitung der Reagenzien

Kurz vor Beginn des eigentlichen Versuches mussten die im benutzten Kit „Biotrak Enzymeimmunoassay RPN225" (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) enthaltenen Reagenzien frisch angesetzt werden. Der Ansatz der Reagenzien wurde streng der Vorschrift des Herstellers entsprechend vorgenommen und alle nach Ansatz im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

<u>Ansatz der Standards:</u>

Im Kit enthalten ist ein Fläschchen mit pulverisiertem Basisstandard, der, nach Lösung in 2 ml Assay-Puffer eine cAMP-Konzentration von 32 pmol/ml besitzt.
Die übrigen Standards wurden in Form einer Verdünnungsreihe aus dem Basisstandard gewonnen.
Hierzu wurden 8 Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 2 ml Volumen zunächst mit 12,5 fmol, 25 fmol, 50 fmol, 100 fmol, 200 fmol, 400 fmol, 800 fmol und 1600 fmol beschriftet und mit jeweils 500 µl Assay-Puffer befüllt.
Nun wurden 500 µl des Basisstandards in das „1600 fmol"-Gefäß pepittiert, über die Pipette gut gemischt, schließlich davon 500 µl in das „800 fmol" Gefäß überführt und dort erneut sorgfältig durchmischt. Dieses Vorgehen wurde entsprechend bis zur Erlangung aller o. a. cAMP-Konzentrationen wiederholt.

Vorbereitung der Mess-Well-Platte:

Entsprechend der Vorgaben der Herstellerinstruktionen wurde während der Inkubationszeit der Reaktionsplatte die Analyseplatte des Kits mit den Standards belegt.
Hierbei blieb die Backgroundprobe „B" leer. Die Wells der für die Messung der unspezifischen Bindung „NSB" wurden mit 200 µl Lyse-Puffer befüllt. In die Wells dieser beiden Doppelbestimmungen wurde im weiteren Verlauf nichts mehr hinzugegeben!
In die Standardwells wurden je 100 µl der entsprechenden vorbereiteten Konzentrationen gegeben und die Wells des „Null-Standards" („0") mit 100 µl Lyse-Puffer befüllt.
Nach Vorbereitung wurde die Assayplatte bei 4°C im Kühlschrank bis zu ihrer Verwendung gelagert.

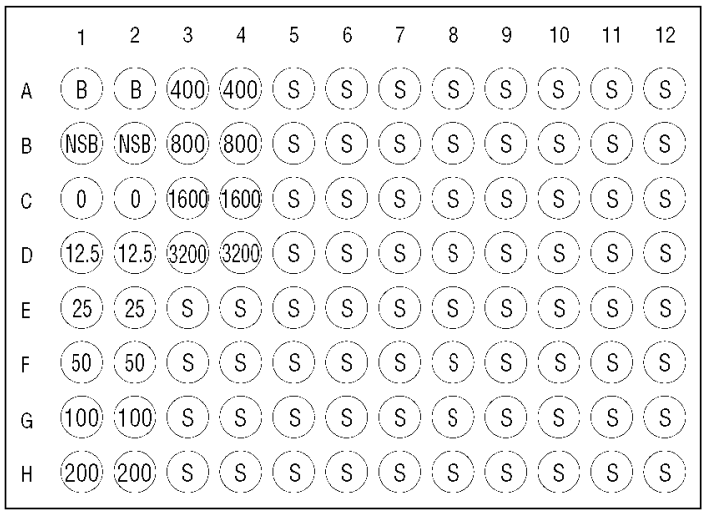

Abbildung 23: Standardbelegung der 96-Well-Platte des Biotrak Enzymeimmunoassay RPN225 für die Analyse des intracellulären cAMP-Spiegels. "B"=Background, "NSB"=Non-specific-binding, "0 - 3200"=entsprechende Wells für die Standardkonzentrationen, "S"=Sample. Aus den Herstellerinstruktionen (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003)

3.3.4.3 Durchführung

Zunächst wurde am Versuchstag das Zellmedium sorgfältig abgesaugt und durch 100 µl/Well der vorbereiteten Versuchslösung ersetzt. Diese basierte auf dem Zellmedium RPMI 1640 ohne Zusätze wie FCS oder Penicillin/Streptomycin und zeichnete sich durch die Beimischung definierter Mengen des Ligands sowie von Forskolin aus. Grundsätzlich wurden die Wells in Doppelbestimmungen belegt. Als Liganden wurden SST-14, SST-28 und Poly-SST an verschiedenen Versuchstagen benutzt. Als Kontrollen wurden neben einer „unstimulierten" Doppelbestimmung, die, da ihr weder Forskolin noch ein Ligand zugegeben worden war, den basalen intrazellulären cAMP-Spiegel zeigen sollte und eine ausschließlich mit 10^{-5} M Forskolin stimulierte Probe untersucht, die als entsprechender Maximalwert für die intrazelluläre cAMP-Konzentration diente. Zur Untersuchung der eigentlichen Ligandenwirkung dienten drei Doppelbestimmungen, denen, jeweils mit 10^{-5} M Forskolin belegt, der Ligand in den Konzentrationen 10^{-6} M, 10^{-8} M bzw. 10^{-10} M zugemischt wurde. Nach Zugabe der Versuchslösungen folgte eine 10 minütige Inkubation bei 37°C.

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurde, wie oben beschrieben, der Biotrak Enzymeimmunoassay RPN225 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) benutzt. Das Vorgehen zur Bestimmung verlief analog der Vorschrift für die intrazelluläre cAMP-Bestimmung ohne Acetylierung.

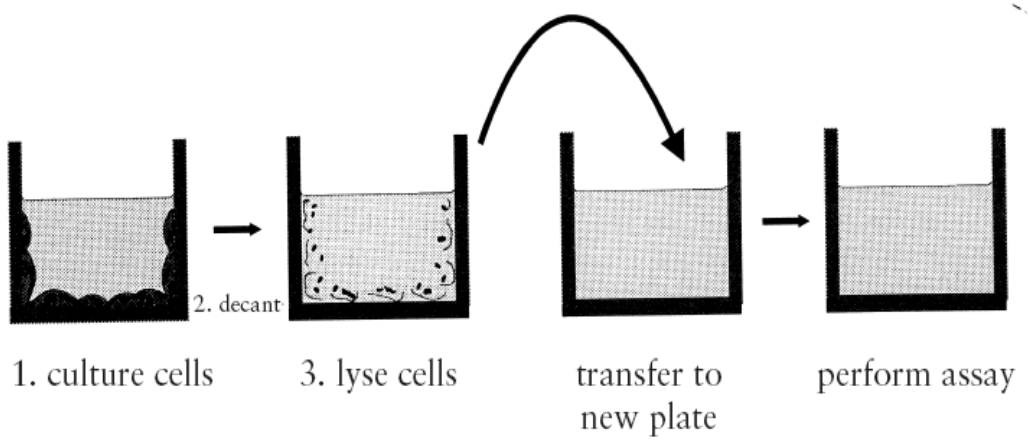

Abbildung 24: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs (Herstellerinformationen auf www.amersham.com, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003)

Nach der 10 minütigen Inkubationszeit wurde das Reaktionsmedium vorsichtig aus den Well entfernt und die Zellen aller Wells mittels des kiteigenen Lysereagenzes zerstört. Im Folgenden wurden je 100 µl der Ansätze mit Zelllysat in die entsprechenden „S"-Wells der Assayplatte überführt. Dann wurden je 100 µl des Antiserums in alle Wells mit Ausnahme der „B"- und der „NSB"-Wells pepittiert und die Platte nach kurzem vorsichtigem Schwenken für 2 Stunden im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Der nächste Schritt umfasste die Zugabe von je 50 Ml cAMP-Peroxidase-Konjugat in alle Wells außer den mit „B" bezeichneten. Anschließend wurde die Platte wiederum vorsichtig geschwenkt und es folgte eine erneute Inkubationsphase bei 4°C im Kühlschrank für eine Stunde.
Nun wurde der Inhalt der Wells sorgfältig, ohne den Boden des Wells in Mitleidenschaft zu ziehen, abgesaugt und alle Wells viermal mit je 400 µl Waschpuffer gespült, der Waschpuffer nach dem letzten Durchgang wiederum sorgfältig abgesaugt. Im sofortigen Anschluss folgten die Belegung aller Wells mit 150 µl Enzymsubstrat und eine letzte Inkubation auf einem Schüttler für eine Stunde bei Raumtemperatur. Innerhalb der letzten Inkubatonsphase stellte sich durch die Enzymreaktion eine Blaufärbung ein. Diese Reaktion wurde mit 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte der Flüssigkeit in den Wells der Platte bei 450 nm im Elisa-Reader gemessen.
Zur Normierung der erhaltenen Werte wurde parallel zur Messung eine Proteinbestimmung aus jedem „S"-Wells mittels 10 µl des vorhandenen Restinhaltes durchgeführt.

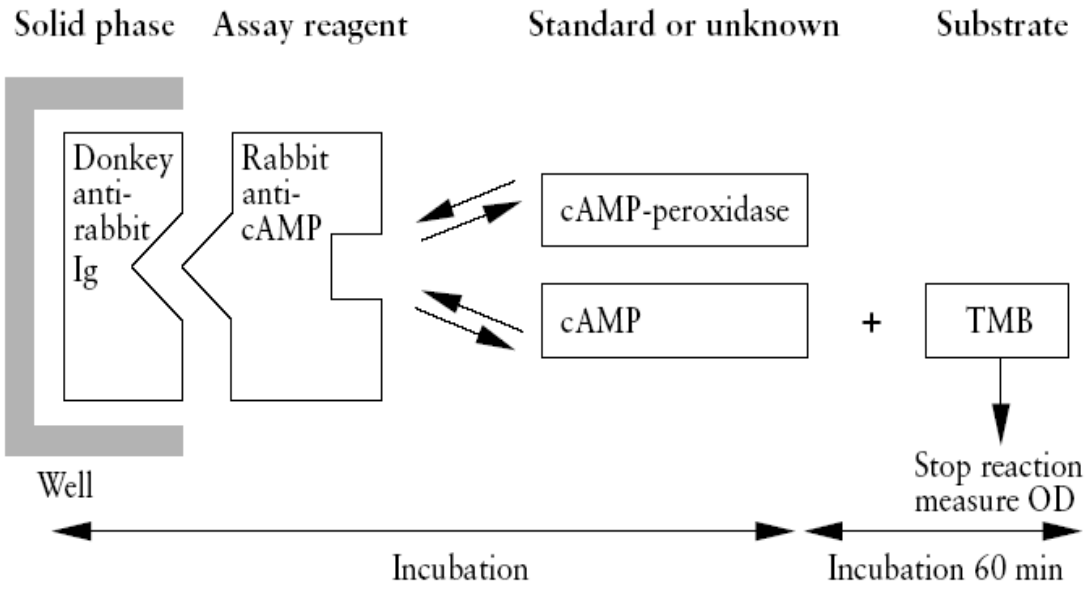

Abbildung 25: Funktionsprinzip des verwendeten cAMP-EIA- Kit nach den Herstellerinstruktionen (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003)

3.3.4.4 Datenverarbeitung

Da die erhaltenen Messwerte nach Durchführung des Assay alle in Form von optischen Dichten (OD) vorlagen, musste eine Umrechnung der OD in cAMP-Konzentrationen erfolgen. Hierzu wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen verwandt.
Nach den Vorgaben des Herstellers wurde mittels des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL® (Microsoft, USA) zunächst aus den Messwerten der Standards eine halblogarithmische Darstellung erstellt.
Dabei dienten die durch die Standards vorgegebenen cAMP-Konzentrationen als Werte der x-Achse. Die Werte $\%B/B_0$ der y-Achse errechneten sich nach folgender Formel:

$$\%B/B_0 = \frac{(\text{standard or sample OD-NSB OD})}{(\text{zero standard OD-NSB OD})} \times 100$$

Hierbei sind die „NSB OD" der Mittelwert der optischen Dichte des Messpunkt „Non-specific-binding" und die „zero standard OD" die optische Dichte des „Null-Standards".

Über die so gewonnene graphische Darstellung ließ sich nun eine Regressionsfunktion ermitteln, so dass alle OD-Meßwerte in cAMP-Konzenrationen umgerechnet werden konnten.

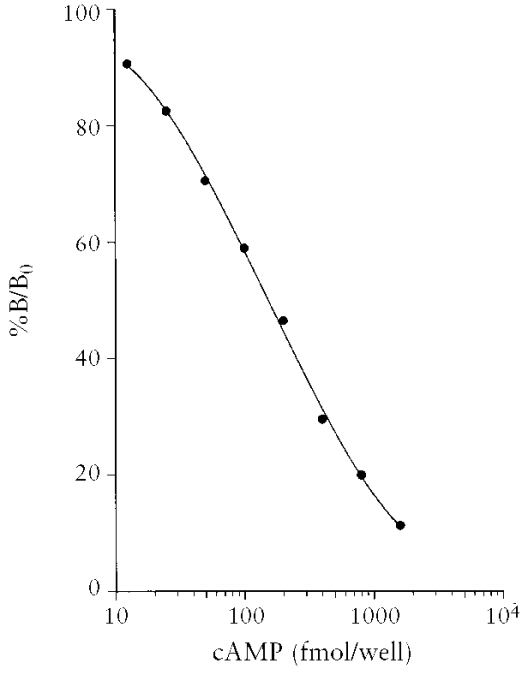

Abbildung 26: Empfohlene graphische Darstellung der Standards gemäß der Herstelleranweisung. (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003)

Um eine Normierung im Sinne des Ausgleichs ggf. zu Versuchsbeginn vorgelegener Zellzahlunterschiede zu erreichen, wurden die jeweiligen Ergebnisse auf den Gesamtprotein des zugehörigen Wells umgerechnet.

3.3.5 Chromogranin A-Promotor-Assay

3.3.5.1 Vorbereitung

Chromogranin A (CgA) ist ein typisches sekretorisches Protein und ein bekannter Marker neuroendokriner Gewebe. Sein Promotor zeichnet sich durch ein sogenanntes cAMP-responsibles Element (CRE) aus, welches die Aktivität des Promotors in Abhängigkeit der herrschenden cAMP-Konzentration stellt. Eine hohe Konzentration hat eine hohe Aktivität zur Folge. Wird dieser Promotor mit dem Gen eines bekannten Proteins kombiniert, so lässt sich die Aktivität des Promotors indirekt durch den Nachweis des Proteins führen. Durch die Einfachheit ihres Nachweises wurde die Kombination des CgA-Promotors mit dem Gen der Luciferase gewählt und die Klonierung in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Der Chromogranin A-Promotor wurde in den pGL2-Basic Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) kloniert und in kompetenten E. coli DH5α amplifiziert. Klonierung, Amplifikation sowie folgende Plasmidpräparation wurden nach den bereits beschriebenen Regeln durchgeführt.

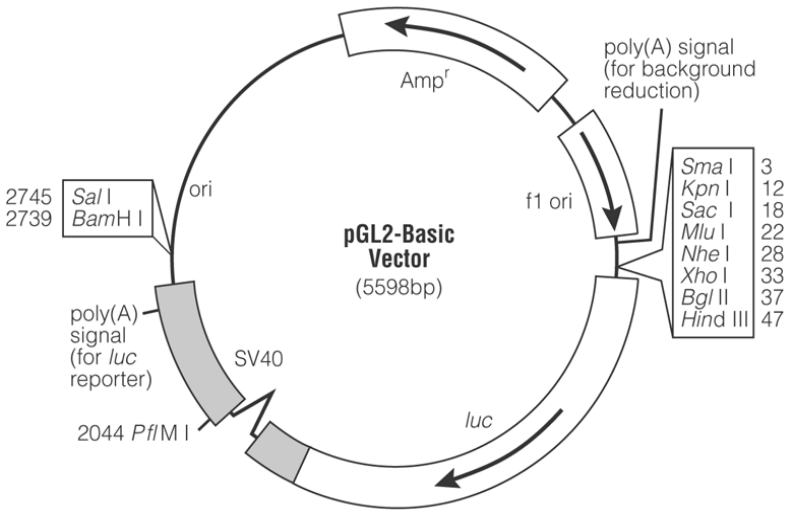

Abbildung 27: Darstellung des zur transienten Transfektion benutzte pGL2 Vektor. Oben erkennt man die Ampicillinresistenz, unten das Luciferasegen und rechtsseitig der Insertionsbereich mit den zugehörigen Restriktionsendonukleasen. Darstellung gemäß Herstellerinformationen (Promega, Mannheim, Deutschland)

Die zu transfizierenden Zellen wurden zwei Tage vor Versuch nach üblicher Methode mittels PBS-EDTA aus den Kulturflaschen auf 24-Well-Platten in Standardmedium ausgebracht.

3.3.5.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion fand nach dem Prinzip der Lipofektion statt. Dieses Prinzip basiert auf der Einschleusung in Mizellen verpacken DNA-Materials durch Vereinigung der Mizellen mit der Zellmembran. Die Reaktion fand in reinem RMPI 1640 Medium statt, da Zusätze wie insbesondere das fetale Kälberserum zu Störung der Mizellenbildung hätten führen können.

Pro Transfektionsansatz wurden zunächst in einem Gefäß je 2 µg des zu transfizierenden Plasmids in je 100 µl Medium gemischt und in einem zweiten je 20 µl Lipofectaminreagenz (Gibco BRL Life Science, Eggenstein, Deutschland) mit je 100 µl Medium. Der Inhalt beider Gefäße wurde nun vereint, vorsichtig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Folgend wurde das Plasmid-Lipofectamin-Gemisch mit je 800 µl Medium auf eine Summe von etwa 1 ml je Ansatz verdünnt.
Das auf den Zellen der 24-Well-Platten befindliche Standardmedium wurde sorgfältig abgesaugt. Zwei Waschschritten mit reinem Medium diente zur Befreiung der Zellen von etwaigen Rückständen, bevor je 1 ml des vorbereiteten Plasmidansatzes auf die Zellen eines jeden Wells gegeben wurde. Es folgte eine Inkubationsphase für 5 Stunden im Brutschrank unter Standardbedingungen.
Danach wurde der Plasmidansatz entfernt, die Zellen mit Standardmedium sowie Doxycyclin (2 µg/ml) belegt und für weitere 24 Stunden unter Normalbedingungen im Brutschrank inkubiert.
Zwei Stunden vor Messung wurde dem Medium der Zellen das jeweilige Agens bzw. Agensgemisch zugegeben. Alle Messpunkte wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Untersucht wurde, neben einer unstimulierten (kein SSTR-Ligand, kein Forskolin) und einer ausschließlich mit 10^{-5}M Forskolin stimulierten Doppelbestimmung, eine Messreihe mit 10^{-5} M Forskolin-Stimulation und Zugabe von Ligand (SST-14, SST-28 sowie Poly-SST) in 10^{-6} M bzw. 10^{-8}M.

3.3.5.3 Durchführung der Messung

Die Messung fand mittels des Luciferase-Assay-System (Promega, Madison, USA) nach den Herstelleranweisungen statt.

Zunächst wurde das Inkubationsmedium sorgfältig entfernt und die Zellen in drei Schritten mit je 200 µl PBS-Puffer gespült. Danach folgte die Lysierung der Zellen durch Zugabe von 200 µl Reporter-Lysis-Puffer je Well. Hierzu wurden die Zellen für 15 min unter Raumtemperatur und stetigem Schwenken inkubiert. Der gesamte Inhalt der Wells wurde sorgfältig durch mehrfaches auf- und abpipettieren vom Boden abgelöst und in Eppendorf Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 1,5 ml überführt. Dabei konnte die Zelllyse im Anschluss durch kurzes Durchfrieren auf Trockeneis nochmals verbessert werden. Die Proben wurden danach mittels Vortex durchmischt und abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. 20 µl dieses Überstandes dienten als Volumen für die Messung und wurden auf den Boden eines Luminometermeßröhrchens pipettiert. Als Messgerät wurde das Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) benutzt. Prinzip der Untersuchung ist die Messung einer Lichtreaktion durch die Umsetzung des Substrates Luciferin durch das nachzuweisende Enzym Luciferase. Das Ergebnis der standardisiert 180 sec dauernden Messung wurde vom Messgerät in RLU (relative light units) geliefert. Eine Normierung der Ergebnisse auf den Proteingehalt wurde mit 10 µl des nicht für die Messung benötigten Überstandes durchgeführt.

3.3.6 Proteinbestimmung

Vor dem Hintergrund, dass sowohl die absoluten Messergebnisse der Bindungsstudien, als auch die der cAMP-Assays und natürlich ebenfalls die der Chromogranin-Promotor-Untersuchungen mittels Luciferasenachweis in ihrer Vergleichbarkeit in mehr oder minder großem Maße von einer Vergleichbarkeit der Ausgangszellzahl je Messwert abhängen, wurde stets eine Normierung der Rohmesswerte einer Probe in Bezug auf ihren Proteingehalt durchgeführt, da eine Proportionalität des Proteingehaltes einer Probe zu ihrer vorbestehenden Zellzahl angenommen werden kann und eine Normierung der Zellzahl beispielsweise mittels Neubauerzählkammer nicht praktikabel wäre.

3.3.6.1 Durchführung

Zur Proteinbestimmung wurde das BCA-Protein-Assay System (Pierce, Rockford, USA) mit einem linearen Messbereich von 20 µg/ml – 2000 µg/ml benutzt. Die Bestimmungen selbst wurden stets in Doppelbestimmungen auf einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die BCA-Protein-Assay Lösung wurde gemäß des Herstellers aus einer Mischung der Reagenzien A und B im Verhältnis 50 : 1 hergestellt.
Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1600 µg/ml) bovinem Serumalbumins (BSA) im jeweiligen Versuchspuffer mitgeführt.
In jedes Well wurden zunächst 10 µl der Probe bzw. des Standards pipettiert. Im Anschluss daran wurden jedem Well 200 µl der vorbereiteten BCA-Protein-Assay Lösung zugegeben und die Platte bei 37°C für 30 min inkubiert.
Nach der Inkubation wurde die Platte umgehend in einem Spektrum-Photometer-Reader bei 562 nm gemessen.
Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel ® (Microsoft, USA) konnte anhand der Standards und ihrer graphischen Darstellung eine Regressionsfunktion errechnet und, über diese, die gemessenen Werte der optischen Dichte in Form von prozentualen Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

3.4 Chemikalien, Enzyme, Proteine und Lösungen

3.4.1 Chemikalien:

10fach TBE-Puffer	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid/Bisacryl Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München, Deutschland
Borsäure/Borat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau-Xylen-Cyanol Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure (99,8%)	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmsstadt, Deutschland
Formamid	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
^{125}I-Tyr-Somatostatin-14	Amersham, Little Chalfont, UK
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Luciferase-Assay-System Reporter	Promega, Madison, USA
Lysis Puffer	
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mineralöl für PCR	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumacetat wasserfrei	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxyd-Plätzchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pefa-Block	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phenylmethylsulfonyfluorid (PMSF)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
RNA-Clean	AGS, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure konzentriert	Merck, Darmstadt, Deutschland
Somatostatin-14	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Somatostatin-28	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TRIS-Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TRIS-PufferAN	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.4.2 Lösungen:

1fach PBS-Puffer

2,7 mM	Kalium-Chlorid
1,47 mM	Kalium-Dihydrogenphosphat
137 mM	Natrium-Chlorid
6,45 mM	Di-Natrium-Hydrogenphosphat

→ pH 7,4 (Korrektur mit Natronlauge oder Salzsäure)

Zur Herstellung von PBS-EDTA-Puffer wurden der oben beschriebenen Rezeptur 0,54 mM Na_2-EDTA zugegeben und der pH-Wert gleichermaßen auf 7,4 eingestellt.

Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB)

118 mM	Natriumchlorid
42 mM	Kalium-Dihydrogenphosphat
4,7 mM	Kaliumchlorid
2,5 mM	Calciumchlorid
1,4 mM	Magnesiumsulfat
325 mM	Natriumhydrogencarbonat
5,6 mM	Glucose

→ pH 7,4 (Korrektur mit Natronlauge oder Salzsäure)

LB-Medium

10 g/l	Bacto-Trypton
5 g/l	Yeast Extrakt
10 g/l	Natriumchlorid

4 Ergebnisse:

Als Gegenstand dieser Arbeit anzusehen ist die technische Untersuchung von Zellklonen, die durch stabile Transfektion der genetischen Information jeweils eines humanen SSTR-Subtyp in Form eines sehr einfach aktivierbaren Expressionskonstruktes in eine humane Zelllinie, die nachweislich in ihrer ursprünglichen Form keine SSTR an ihrer Oberfläche besitzt, entstanden waren. Das dabei die im Vorfeld zu dieser Arbeit durchgeführte stabile Transfektion als solche erfolgreich war, lässt sich eindeutig daran fest machen, dass dem, durch das spezielle Medium erzeugten künstlichen Selektionsdruck nur Zellen standhalten konnten, die in den jeweiligen Transfektionsschritten die entsprechenden Plasmid-gebundenen Resistenzen erhalten hatten.

Doch was ist mit der Funktion des Konstruktes selbst? Hierbei galt es, den grundsätzlichen Nachweis der Funktionalität auf verschiedenen Ebenen im Sinne eines Wirkungskreises Gen – Zelloberfläche – Gen zu führen:

1.) Wird nach Doxicyclin-Stimulation des eingefügten Konstruktes aus der mRNA das Protein erzeugt und dieses als Rezeptor auf der Zellmembran präsentiert? Rezeptoren müssten sich über Verdrängungsanalysen radioaktiver Liganden zeigen.

2.) Wenn der Rezeptor exprimiert wird, ist er auch erwartungsgemäß an die intrazelluläre Signaltransduktion gekoppelt? Die Assoziation von Somatostatinrezeptoren zu Vertretern der Gruppe der inhibitorischen G-Proteine und ihre Wirkung auf den cAMP-Spiegel müsste sich durch cAMP-Assays überprüfen lassen.

3.) Wenn es zu Veränderungen des cAMP-Spiegels kommt, wirken sich diese auch auf einen typischen Vertreter der cAMP-konzentrationsabhängigen Promotoren wie den Chromogranin A-Promotor mit seinem cAMP-responsiblen Element aus?

4.1 Somatostatin-Rezeptor-Bindungsstudien

Basis des Bindungsassays ist die Verdrängung eines radioaktiv markierten Liganden in fester Dosierung durch nicht-markierten Liganden in unterschiedlicher, fallender Konzentration. Die durch die Verdrängung entstehenden Aktivitätsunterschiede wurden in einem γ-Counter in der Maßeinheit „counts per minute" [cpm] gemessen und durch Proteinbestimmung auf die zellbedingten Gesamtmenge Protein [mg] normiert. Aus diesen normierten Werten erfolgt dann die Errechnung der Verdrängungsrate (Rate of Displacement – ROD) [%].
Zellklone, deren Expressionskonstrukt in seiner Funktion durch RT-PCR und Restriktionsanalyse in der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte, wurden zunächst einem Screening auf Vorhandensein von SSTR unterzogen.
Dieses Screening umfasste eine einfache Ligandenverdrängungsanalyse mit nur drei Messpunkten in Doppelbestimmung. Dabei wurden im Vorfeld als Kriterien für eine, im Sinne des Hauptteils dieses Abschnitts ausreichende ROD eine Höhe von >= 25% für rezeptortragende Zellklone und eine maximale Verdrängung von < 10% für pTRE-Zellen, da dies in etwa dem Bereich der unspezifischen Bindung, gemessen während Vorversuchen an nicht-rezeptortragenden, natürlichen LCC-Zellen, entsprach, festgelegt. Gleichzeitig wurden vom Wert negative RODs (Damit gemeint: Eine per γ-Counter gemessene und auf den Proteingehalt bezogene Aktivität einer mit heißem UND kaltem Liganden behandelten Probe liegt höher als die der nur mit heißem Liganden versetzten. Somit errechnet sich eine negative Verdrängungsrate!), wie sie sehr häufig bei der Untersuchung der pTRE-Zellklone sowie auch bei nicht-transfizierten LCC-Zellen auftraten, als durch unspezifische Bindung bedingt definiert.
Als Ligand wurde im Screening lediglich SST-14 sowohl in radioaktiv markierter wie auch unmarkierter Form benutzt. Die untersuchten Messpunkte umfassten neben dem Leerwert, dem kein unmarkierter Ligand zugegeben worden war, diesen in Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-8} M.
Das Screening diente dazu, die rezeptortragenden Klone zu finden, die insgesamt das beste Verdrängungsverhalten zeigten. Gleichzeitig wurden Klone mit guten Verdrängungswerten auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht. Dabei fiel auf, dass die Rezeptorexpression der Zellen, trotz fortwährender Reproduzierbarkeit, in gewisser Weise Fluktuationen unterworfen war. Das bedeutet, wurde ein Zellklon an zwei unterschiedlichen Terminen untersucht, so konnte es sein, dass er in einem Versuch eine exzellente Verdrängung und an einem anderen Termin eine im Vergleich

dazu eher mäßige zeigte. Die möglichen Gründe dafür werden in der Diskussion erörtert.

Daher rührte jedoch die Überlegung, Zellen der jeweils fünf der besten Zellklone eines Rezeptorsubtypen zu einem Mischklon zu poolen, um einen gewissen Ausgleich dieser Varianz der Verdrängungsraten und damit eine Art Konstanz zu erreichen. Für diese Mischklone wurden der Einfachheit halber die Namen SSTR1, SSTR3, SSTR4 und pTRE gewählt.

Insgesamt durchliefen 153 Zellklone der verschiedenen Subtypen das Screening (SSTR1 – Σ 37; SSTR3 – Σ 58; SSTR4 – Σ 21; pTRE – Σ 37).

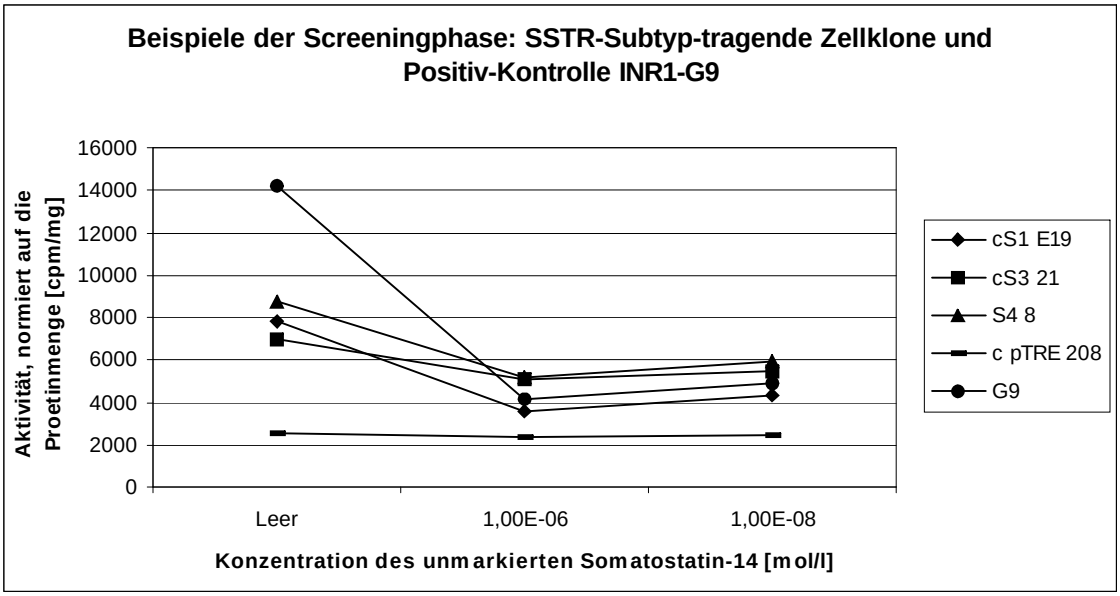

Abbildung 28: Beispielklone und INR1-G9-Kontrolle der Screeningphase. Im Falle der rezeptortragenden Klone [hierbei gilt: cS1 E19 = SSTR1-tragend, cS3 21 = SSTR3-tragend, S4 8 = SSTR4-tragend] sieht man ein gutes Verdrängungsverhalten (ca. 30-50% maximal), im Gegensatz zur nicht-rezeptortragenden Negativ-Kontrolle pTRE (<10% maximal). Die natürliche Positiv-Kontrolle G9 weist hier eine exzellente Verdrängung von ca. 70% maximal auf. Alle hier aufgeführten stabil transfizierten Zellklone gingen in die Mischklone des jeweiligen Rezeptors mit ein.

Die folgende Abbildung soll nun beispielhaft die angesprochene „Fluktuation" im Bindungs- bzw. Verdrängungsverhalten über mehrere Versuchstage hinweg darstellen. Die zu Beginn dieses Abschnittes aufgestellten Kriterien werden zu jedem Versuchstag erfüllt, auch wenn die Größenordnungen schwanken.

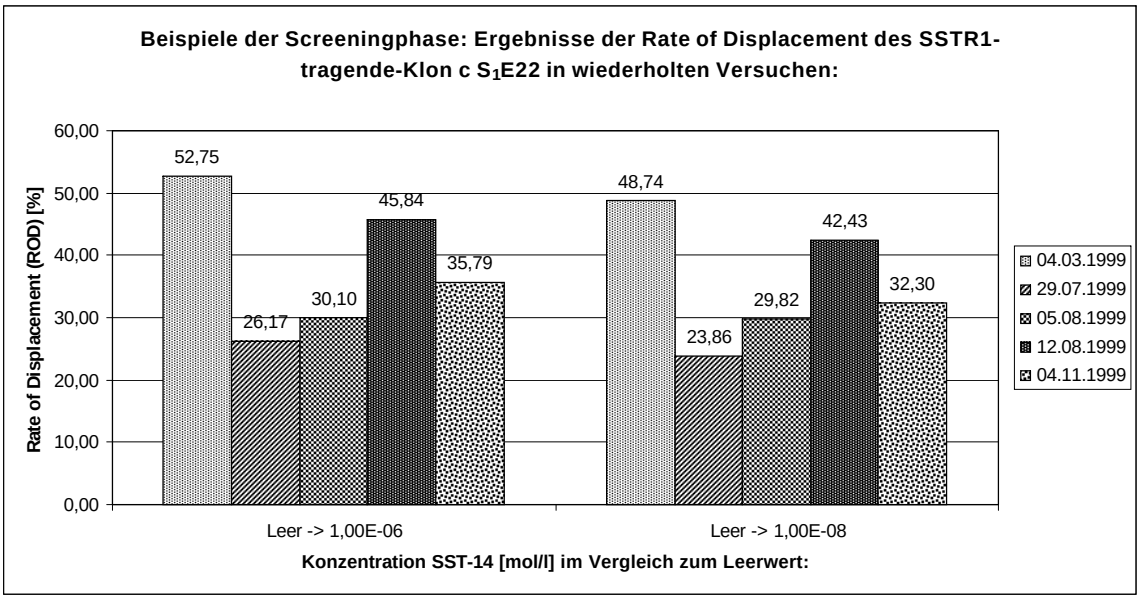

Abbildung 29: Vergleich der Ergebnisse der Rate of Displacement (ROD) mehrerer Versuchstage für den SSTR1-tragenden Zellklone c S1E22. Aufgezeigt sind die Verdrängungswerte in %, die sich aus der Reduktion der gemessenen Aktivität an den entsprechenden Meßpunkten im Vergleich zum Leerwert errechnet. Dieser Zellklon ging als Bestandteil des SSTR1-Mischklones in die Untersuchungen des Hauptversuches ein.

Aus den Vorversuchen gingen folgende Klone als Beste bzw. Teil der Mischklone in die Hauptversuche ein:

- Subtyp 1:

  Bester: c S_1 4
  Mischklon SSTR1: c S_1 4, c S_1 5, c S_1 E19, c S_1 E22, c S_1 E33

- Subtyp 3:

  Bester: c S_3 22
  Mischklon SSTR3: c S_3 E10, c S_3 E14, c S_3 E17, c S_3 22, c S_3 128

- Subtyp 4:

  Bester: c S_4 19
  Mischklon SSTR4: c S_4 3, c S_4 12, c S_4 14, c S_4 15, c S_4 19

- Leervektor-transfizierte Klone:

  Mischklon pTRE: c pTRE 5, c pTRE 8, c pTRE 11, c pTRE 193, c pTRE 200

Für die Hauptversuche dieses Abschnitts wurde zum einen die Konzentrationsreihe des verwendeten, nicht-radioaktiv markierten Liganden erweitert. Die, neben dem Leerwert, nun untersuchten Konzentrationen umfassten 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M sowie 10^{-12} M. Somit sollte eine regelrechte Verdrängungskurve graphisch darstellbar sein. Zum anderen wurde das Spektrum der untersuchten, nicht radioaktiv markierten Liganden vergrößert. Zusätzlich zum bereits während der Screeningphase eingesetzten SST-14 wurden nun zusätzlich noch als zweites das physiologisch vorkommende Analogon SST-28 und als Neuentwicklung ein Somatostatin-Dextran-Konjugat (Wulbrand, Feldman et al. 2002) untersucht. Als radioaktiv-markierter Ligand wurde in allen Fällen das ^{125}Iod-SST-14 beibehalten. Alle Versuche wurden wie bereits beschrieben am besten Einzelklon des jeweiligen Rezeptorsubtyps sowie am entsprechenden gepoolten Mischklon durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente der aus den Vorversuchen erzeugte pTRE-Mischklon. Als Positiv-Kontrolle wurden immer INR1-G9-Zellen mitgeführt, die physiologischerweise den SSTR2 an ihrer Oberfläche tragen und, wie sich in den Vorversuchen zeigte, im Verdrängungsverhalten aufgrund der exprimierten Rezeptorzahl den häufig in Labors etablierten SSTR-tragenden Zelltypen BON und AR42J deutlich überlegen sind. Daneben wurde grundsätzlich immer eine pTRE-Negativkontrolle in den Versuch einbezogen, um Unterschiede zwischen der spezifischen Bindung durch rezeptortragenden Zellen und der unspezifischen Bindung durch einfaches Anhaften von Liganden an der Zelloberfläche nicht-rezeptortragender Zellen aufzeigen zu können.

Im weiteren Verlauf folgt nun die exemplarische Darstellung typischer Versuche der Hauptversuchsreihe für die jeweiligen SSTR-Subtyp-tragenden Klone (bester Einzelklon bzw. Mischklon) in Abhängigkeit von den eingesetzten Liganden sowie die graphische Darstellung der Gesamtergebnisse für jeden Rezeptorsubtyp in Abhängigkeit vom verwendeten Liganden und dessen Konzentration als mittlere Verdrängungsrate.

4.1.1 Versuche mit SST-14:

Die Abbildungen zeigen typische Verdrängungskurven für die rezeptortragenden Klone und die INR1-G9-Positivkontrolle, die einen Beleg dafür darstellen, dass sich auf den stabil transfizierten Zellen Rezeptoren finden, an denen sich radioaktiv markiertes SST-14 mit nicht-markiertem SST-14 verdrängen lässt.
Der Kurvenverlauf der pTRE-Negativkontrollen ist charakteristisch für eine fehlende Bindungsreaktion durch Nicht-Vorhandensein von bindungsfähigen Rezeptoren.

Die folgende Darstellung eines Versuches der Hauptversuchsreihe zeigt eine maximale Verdrängungsrate („rate of displacement" – ROD) durch den nicht-radioaktiven Liganden für den besten SSTR1-Einzelklon c S1 4 von 59,29 % und für den SSTR1-Mischklon von 61,34 %, bei einer ROD für die G9-Kontrolle von 42,14 %. Die damit einhergehenden IC_{50} betragen für den cS1 4-Klon 6,17 E-9 mol/l und den SSTR1-Mischklon 7,41 E-9 mol/l.

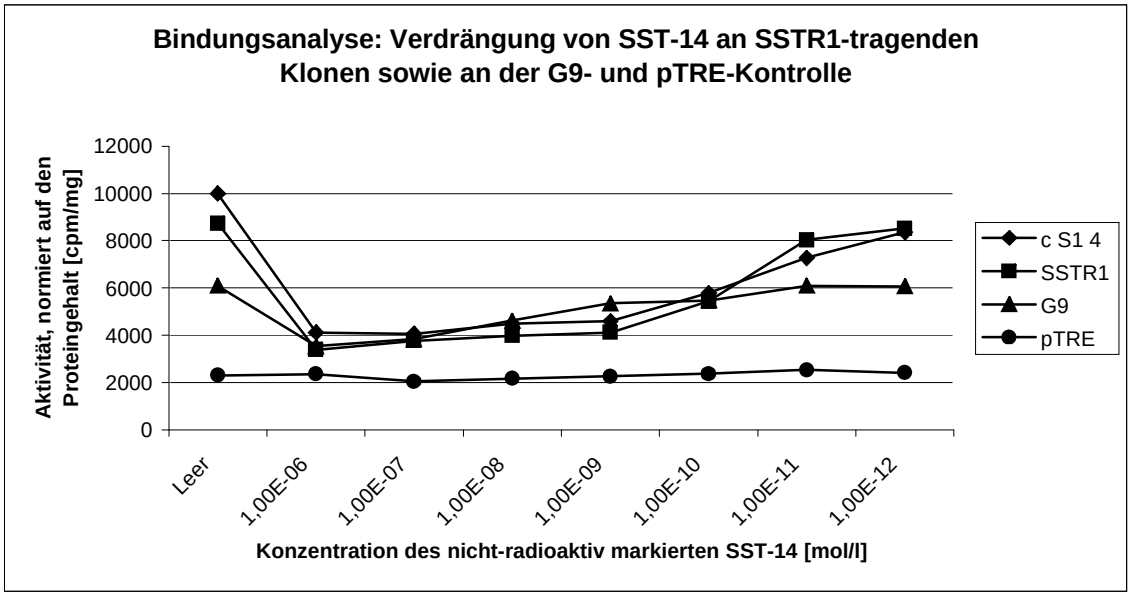

Abbildung 30: SST-14-Bindungsanalyse an SSTR1-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.

In der Gesamtdarstellung der Verdrängungsraten für SST-14 an SSTR1-tragenden Klonen zeigen sich gute RODs im Vergleich zur ebenfalls dargestellten Positivkontrolle G9. Im Gegensatz dazu fehlt das Bild der Verdrängung im Falle der pTRE-Kontrolle.

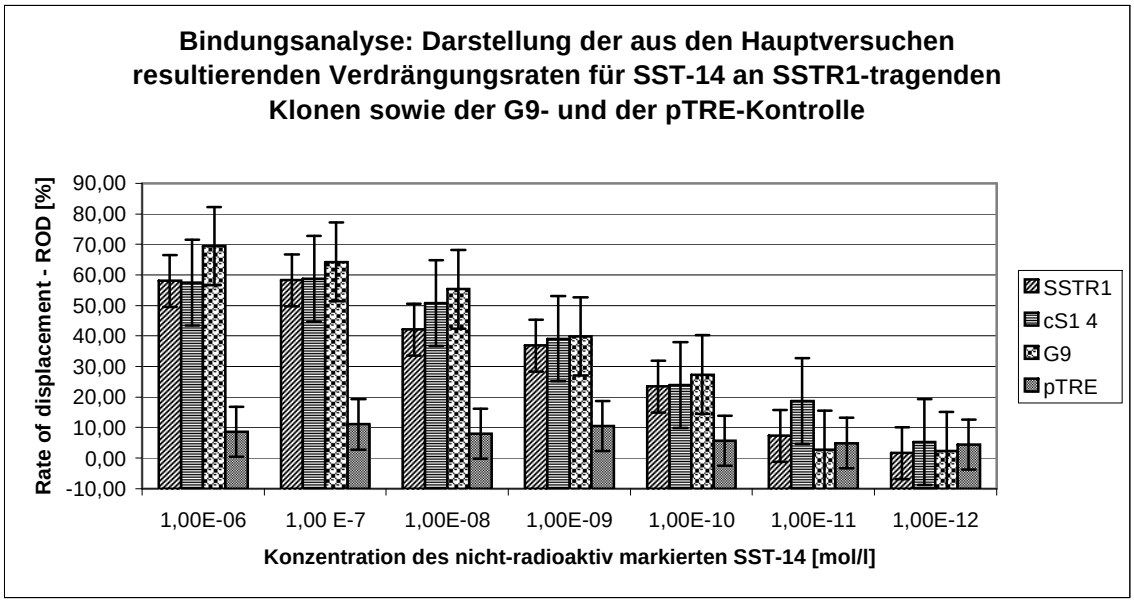

Abbildung 31: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-14 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR1 [Mischklon] und c S1 4 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen. Gut sichtbar dabei die Unterschiede zwischen den rezeptortragenden Zellen und der rezeptorlosen pTRE-Kontrolle.

In der folgenden bespielhaften Darstellung der Verdrängungsanalyse von SST-14 an Klonen mit dem SSTR3-Subtyp beträgt die ROD für den c S3 22-Klon 52,09 %. Die damit verbundene IC_{50} liegt bei 6,38 E-7 mol/l. Für SSTR3-Mischklon kann hier nur eine ROD von 46,48 % angegeben werden, da eine Berechnung der IC_{50} bei einer maximalen Verdrängung von unter 50 % nicht möglich ist.
Die Darstellung der mittleren RODs für SST-14 an SSTR3-tragenden Zellklonen zeigt jedoch ein gutes Verdrängungsverhalten für beide untersuchten Zelllinien.

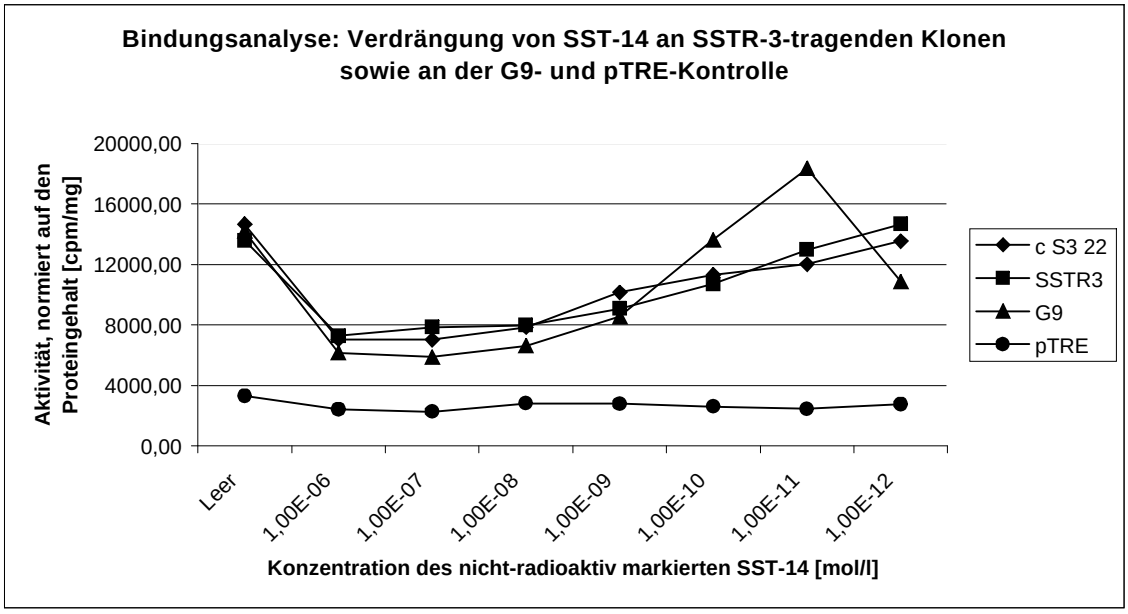

Abbildung 32: SST-14-Bindungsanalyse an SSTR3-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.
Die graphische Auswertung der Ergebnisse der Hauptversuche für die Verdrängungsraten für SST-14 an den SSTR3-tragenden Klonen zeigt das typische Bild mit guten RODs.

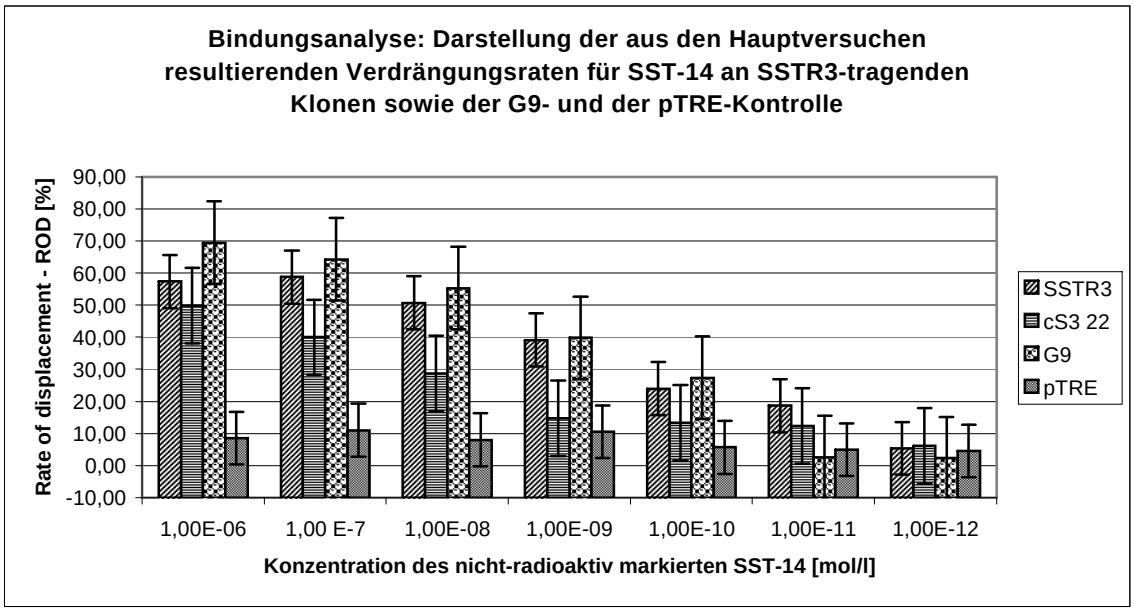

Abbildung 33: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-14 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR3-tragenden Klonen SSTR3 [Mischklon] und c S3 22 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen.

Die SSTR4-tragenden Zellklone zeigten in den mit Abstand meisten Versuchen außergewöhnlich gute Verdrängungsraten, die häufig weit über der der G9-Positivkontrolle lagen.

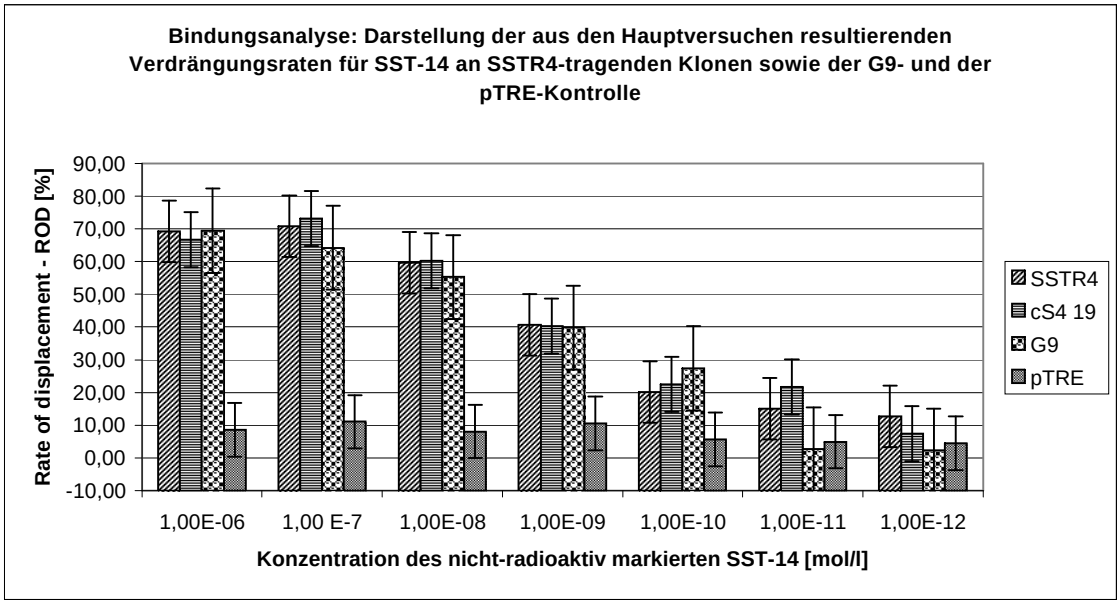

Abbildung 34: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-14 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR4-tragenden Klonen SSTR4 [Mischklon] und c S4 19 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen. Gut sichtbar sind die hohen ROD-Werte im Vergleich zu denen der Positiv-Kontrolle G9. Die SSTR4-tragenden Klone des Hauptversuches zeigen im Vergleich zu den SSTR1- und den SSTR3-tragenden Zellen die höchsten Verdrängungsraten.

Die maximalen Verdrängungsraten im folgend gezeigten Versuch lagen für den cS4 19-Klon bzw. den SSTR4-Mischklon bei 76,09 % bzw. 78,58 %, während die ROD der G9-Kontrolle bei 73,50 % betrug. Die daraus resultierenden IC_{50}-Werte betragen für den cS4 19-Klon 5,11 E-9 mol/l und den SSTR4-Mischklon 4,73 E-9 mol/l.

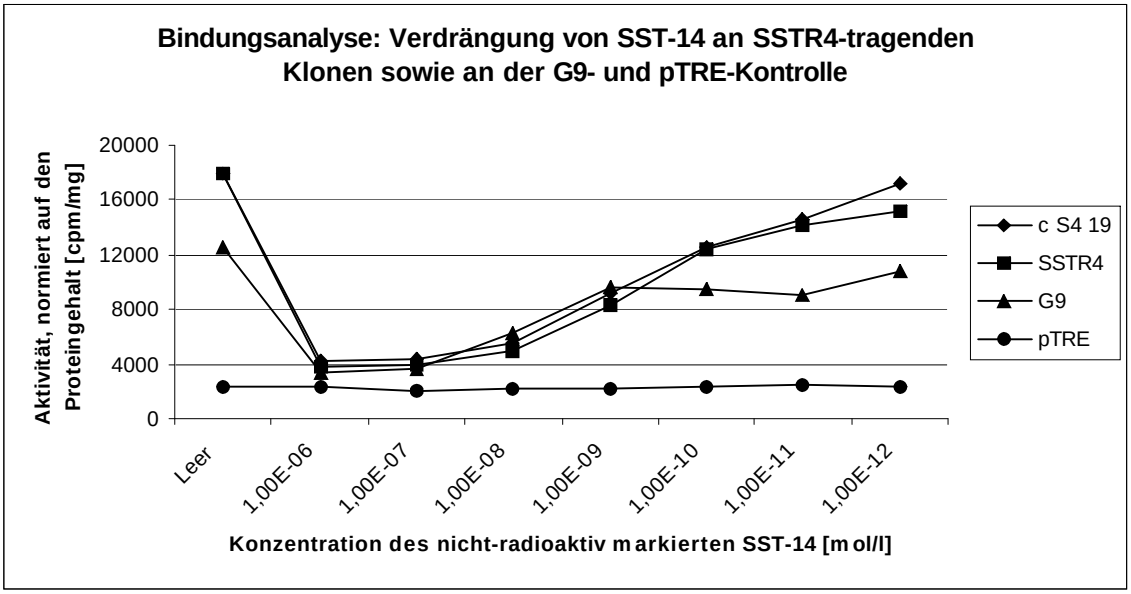

Abbildung 35: SST-14-Bindungsanalyse an SSTR4-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.

4.1.2 Versuche mit SST-28:

Auch hier zeigen alle Abbildungen typische Verdrängungskurven, die aus der konzentrationsabhängigen Konkurrenz des radioaktiv markierten und des nicht-markierten Liganden um die Rezeptorbindungsstelle resultieren. Die jeweils mitgeführte pTRE-Negativkontrolle zeigt das Bild, das durch gänzliches Fehlen von Bindungsstellen hervorgerufen wird.

Das Verdrängungsverhalten für SST-28 an SSTR1-tragenden Zellen liegt in einer, mit dem für SST-14 vergleichbaren Größenordnung.

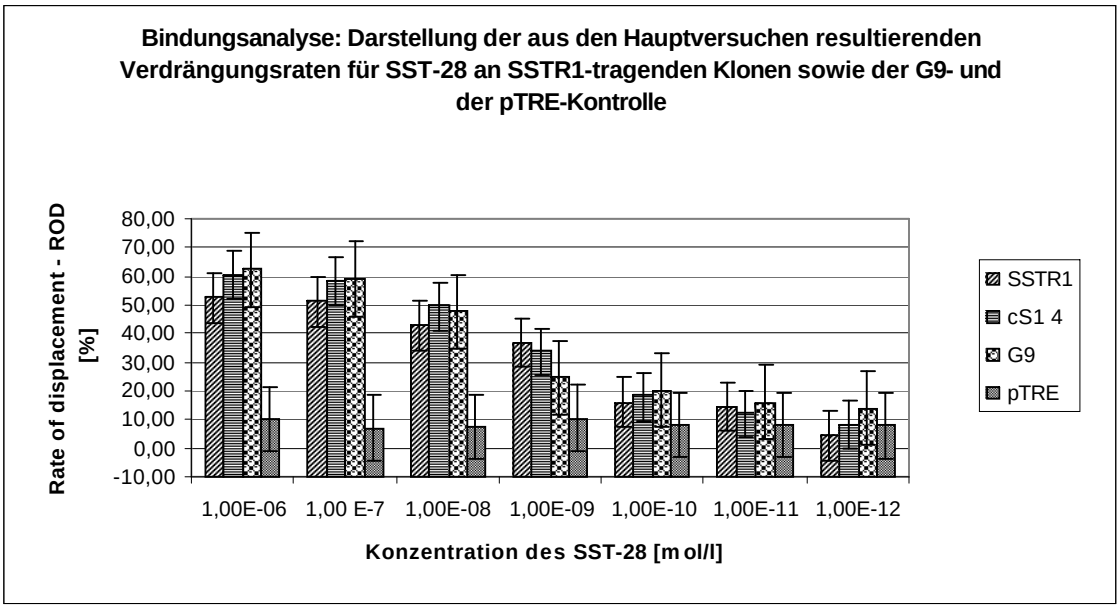

Abbildung 36: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-28 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR1 [Mischklon] und c S1 4 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen.

Die ROD der SSTR1-tragenden-Zellen beläuft sich in der folgend dargestellten Abbildung eines Versuches der Hauptversuchsreihe auf 66,00 % für den c S1 4-Klon und 64,75 % für den SSTR1-Mischklon. Für die G9-Positivkontrolle beträgt sie 74,05 %. Die somit errechneten IC_{50}-Werte liegen bei 4,90 E-9 mol/l für den c S1 4-Klon und 5,45 E-9 mol/l für den SSTR1-Mischklon.

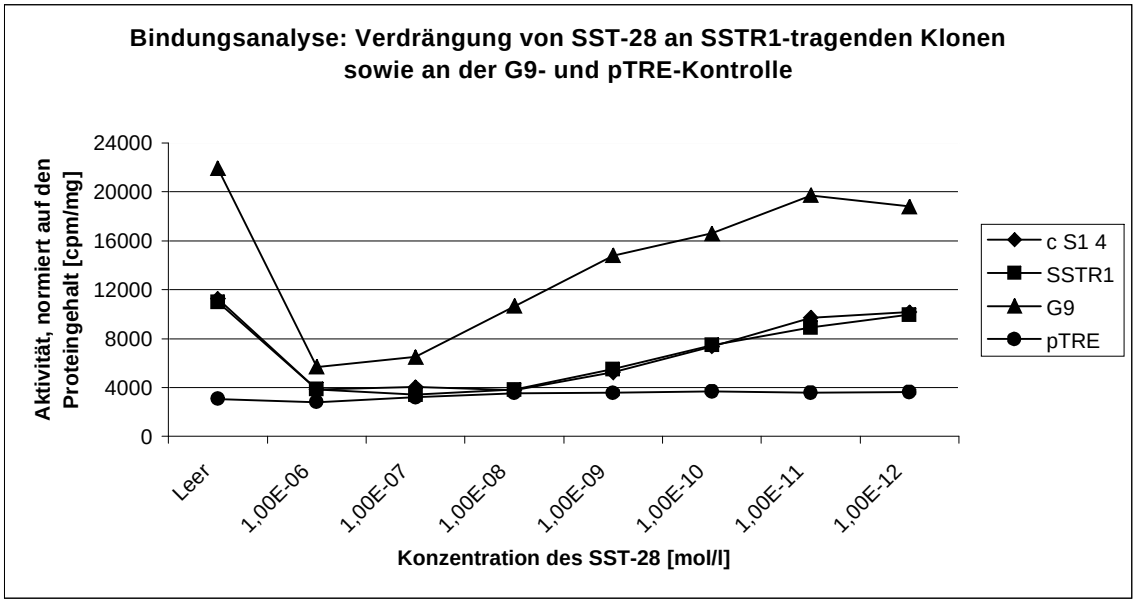

Abbildung 37: SST-28-Bindungsanalyse an SSTR1-tragenden Zellen, der G9-Positiv - und der pTRE-Negativkontrolle.

Im Verhältnis zu den stabil transfizierten Klonen anderer SSTR-Subtypen zeigen die SSTR-3-tragenden Klone mit SST-28 in verschiedenen Versuchen nur vergleichsweise geringe Verdrängungsraten.

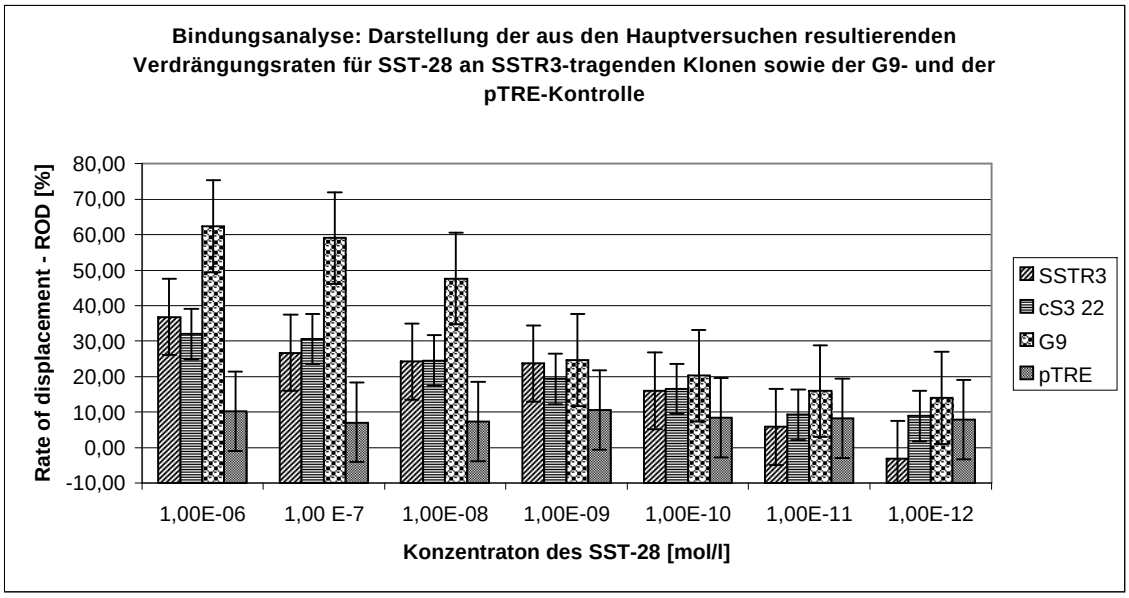

Abbildung 38: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-28 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR3 [Mischklon] und c S3 22 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen.

Die maximale Verdrängung liegt im folgend beispielhaft dargestellten Fall kaum über 30 % (c S3 22: 35,12 %; SSTR3: 31,91 %), so dass keine IC_{50}-Berechnung erfolgen kann.

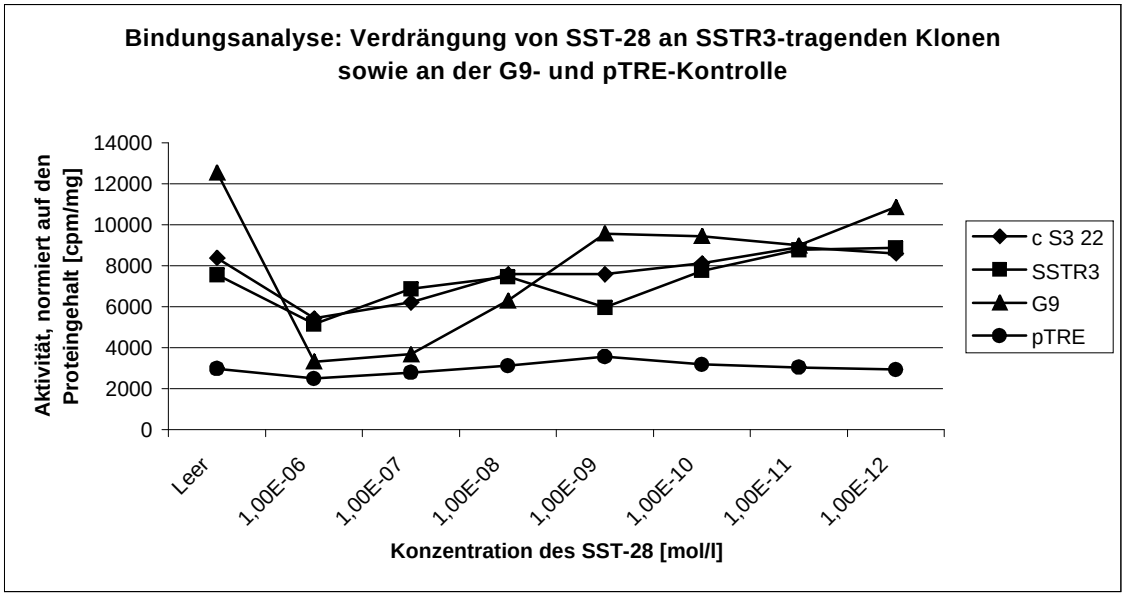

Abbildung 39: SST-28-Bindungsanalyse an SSTR3-tragenden Klonen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.

Auch im Falle des SST-28 als verwendeten nicht-markierten Liganden zeigen die SSTR4-tragenden Klone in den Versuchen häufig exzellente Bindungswerte.

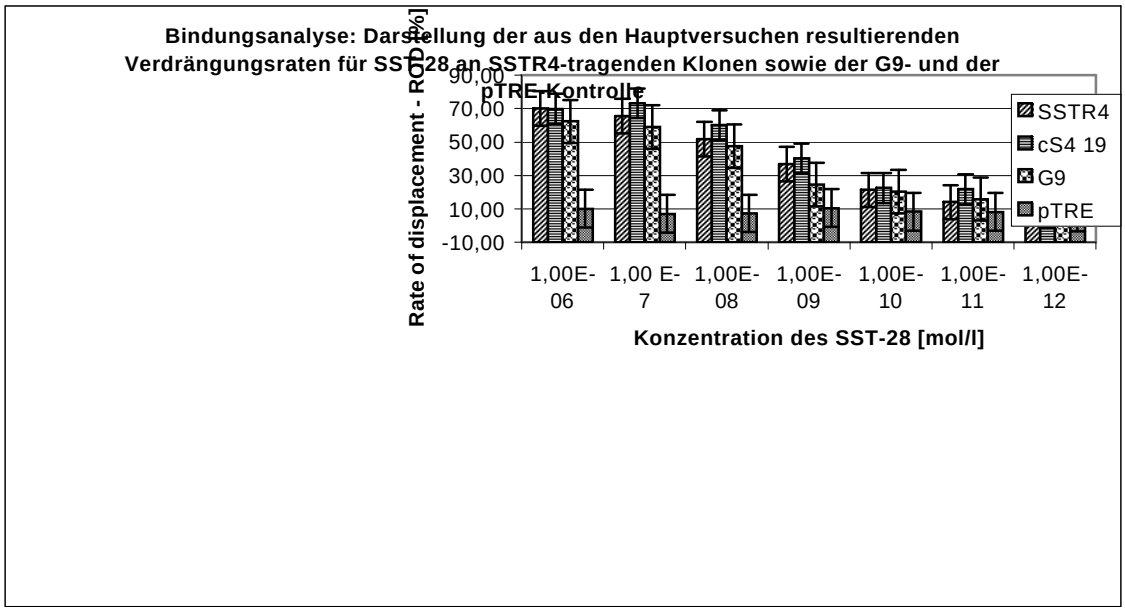

Abbildung 40: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-28 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR4-tragenden Klonen SSTR4 [Mischklon] und c S4 19 [Einzelklon].

Die ROD liegt in der unten folgenden exemplarischen Darstellung für den c S4 19 bei 79,29 % und im Falle des SSTR4-Mischklons bei 79,82 %. Die G9-Positivkontrolle zeigt eine ROD von 74,05 % und die pTRE-Negativkontrolle lediglich 8,74 %, was einem Fehlen von Rezeptoren gleichkommt.
Die errechneten IC_{50}-Werte liegen für den c S4 19-Klon bei 5,10 E-9 mol/l und für den SSTR4-Mischklon bei 3,25 E-9 mol/l.

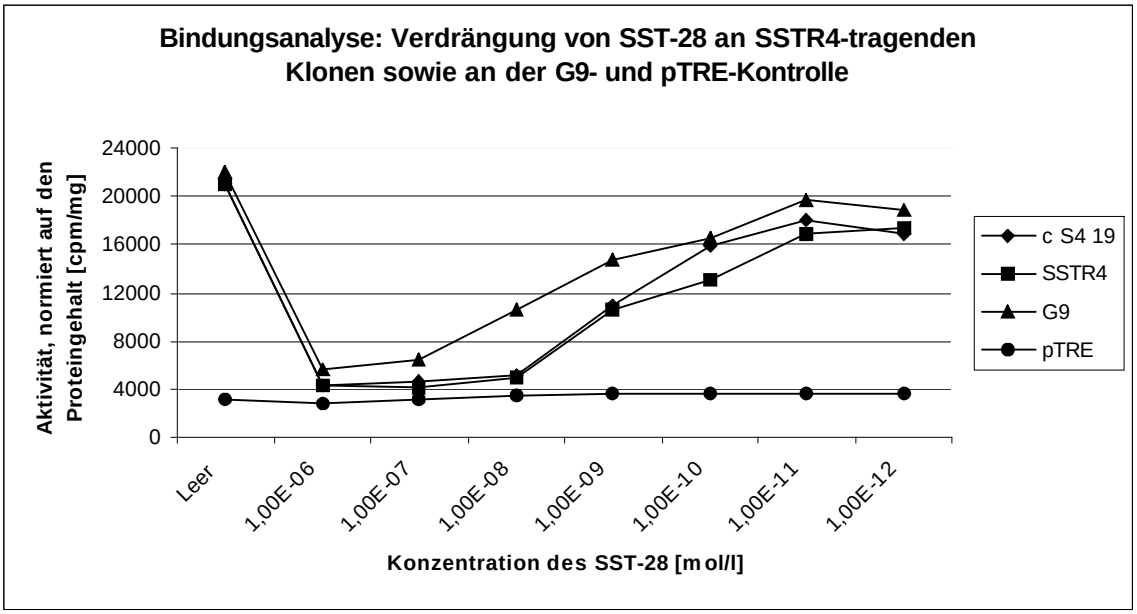

Abbildung 41: SST-28-Bindungsanalyse an SSTR4-tragenden Klonen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.

4.1.3 Versuche mit Poly-SST:

Ein relativ großmolekulares Somatostatin-Dextran-Konjugat (Dextran-70-Somatostatin, Poly-SST), welches deutliche Vorteile im Bereich der Halbwertzeit und damit im Sinne der Pharmakokinetik hat, stellt für einen Bindungsassay jedoch ein gewisses Problem dar. Kann man doch leicht nachvollziehen, dass es das „kleine" SST-14 viel leichter hat, an das aktive Zentrum eines Rezeptors zu gelangen, als sein „vernetztes" Pendant. Somit verwundert es nicht, dass die in den Versuchen maximal erreichbaren Verdrängungsraten auch bei der G9-Positivkontrolle teilweise deutlich unter denen der physiologischen Analoga lagen.

Die folgende Darstellung eines Einzelversuches der Hauptversuchsreihe zeigt typische Verdrängungskurven für Bindungsassays mit Dextran-konjugiertem Somatostatin. Im Gegensatz zu den, für die physiologischen Analoga typischerweise gesehenen, breiten konzentrationsabhängigen Verdrängungsbereich, sieht man hier nur einen sehr engen, im Bereich einer Konzentration des Poly-SST von 10^{-6} mol/l liegenden Abfall der Aktivität. Erreichbar waren in diesem Fall maximale Verdrängungsraten von 58,46 % für den c S1 4-Klon, von 62,32 % für den SSTR1-Mischklon und 63,61 % für die G9-Positivkontrolle.
Entsprechend höher im Vergleich zu den bereits gezeigten Versuchen mit SST-14 sowie SST-28 liegt die errechnete IC_{50}. Ihr Wert beträgt in dargestellten Fall 7,94 E-7 mol/l für den c S1 4-Klon und 7,40 E-7 mol/l für den SSTR1-Mischklon.

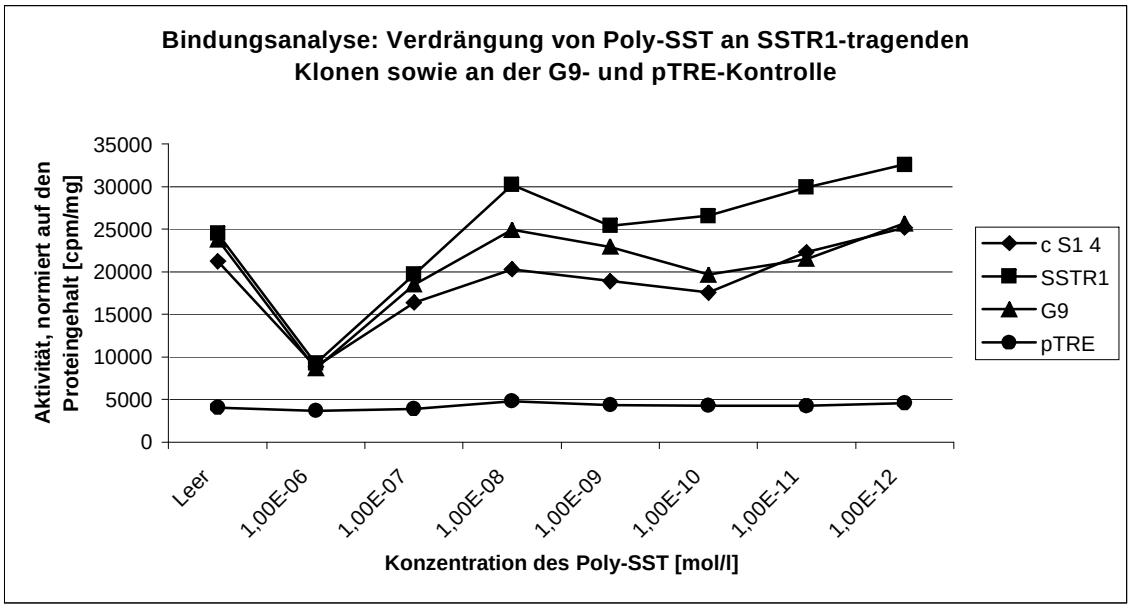

Abbildung 42: Poly-SST-Bindungsanalyse an SSTR1-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.

Das in der Darstellung des Einzelversuches gezeigte Bild deckt sich ebenfalls mit dem, der durchschnittlichen RODs als Gesamtergebnis.

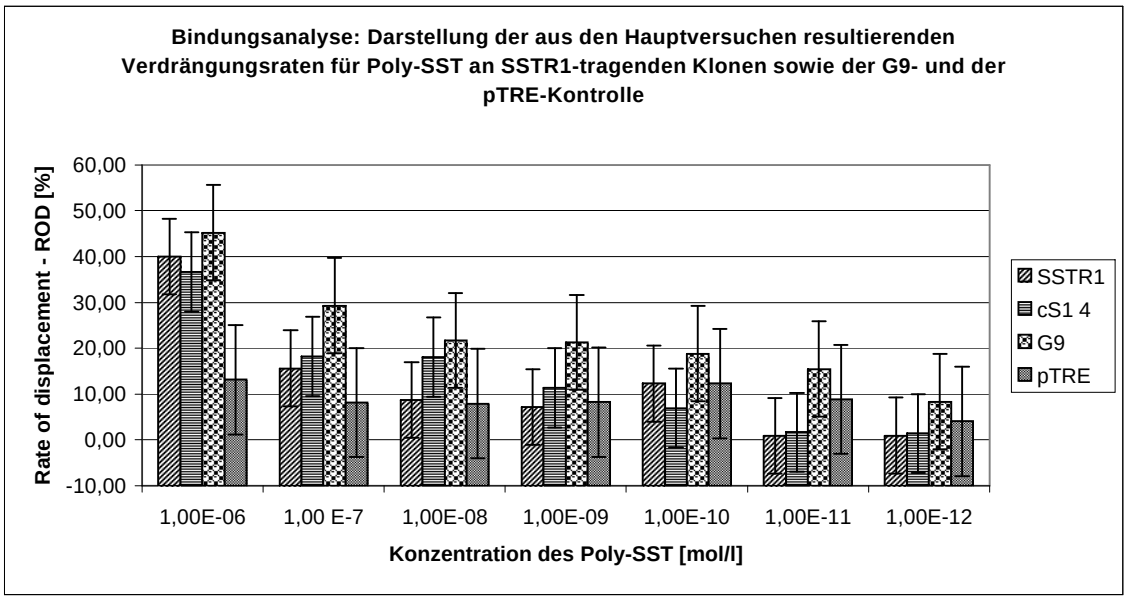

Abbildung 43: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für Poly-SST an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR1 [Mischklon] und c S1 4 [Einzelklon]. Es ist ein deutlicher Unterschied zu den entsprechenden Darstellungen der Ergebnisse mit den physiologischen Liganden zu erkennen. Unterhalb einer Poly-SST-Konzentration von 1,00E-06 mol/l kann nicht mehr von einer verläßlichen Verdrängung ausgegangen werden. Auch die mittleren RODs der Positivkontrolle G9 erscheinen im Verhältnis zu den Werten mit physiologischen Liganden auffallend reduziert.

Im Vergleich zum beispielhaft dargestellten Bindungsassay an den SSTR-1-tragenden Zellen, liegt die maximale Verdrängung an den SSTR3-tragenden Zellen niedriger. Im hier dargestellten Fall sieht man das typische Bild mit einer ROD für den c S3 22-Klon von 31,36 % und für den SSTR3-Mischklon von 34,26 %. Die G9-Positivkontrolle zeigt eine ROD von 42,24 %. Die pTRE-Negativkontrolle zeigt das erwartete Bild bei Fehlen der bindungsfähigen Rezeptoren.

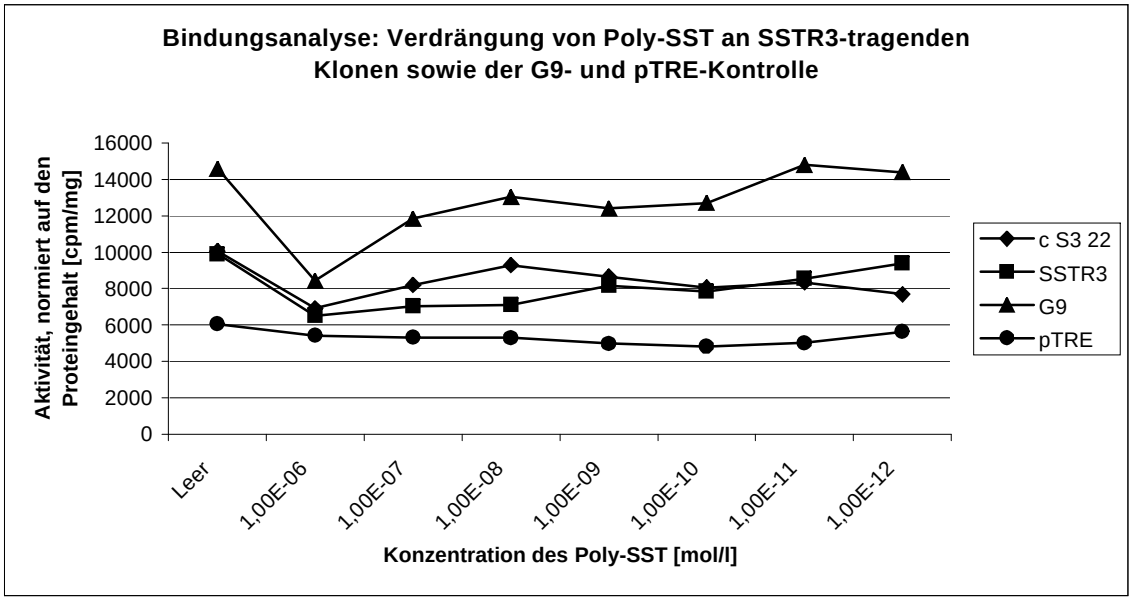

Abbildung 44: Poly-SST-Bindungsanalyse an SSTR3-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.

Auch in der Darstellung der Gesamtergebnisse zeigt sich für die SSTR3-tragenden Zellen eine im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellen eine niedrigere mittlere ROD, die ein erschwertes Rezeptor-Ligand-Bindungsverhalten vermuten lassen.

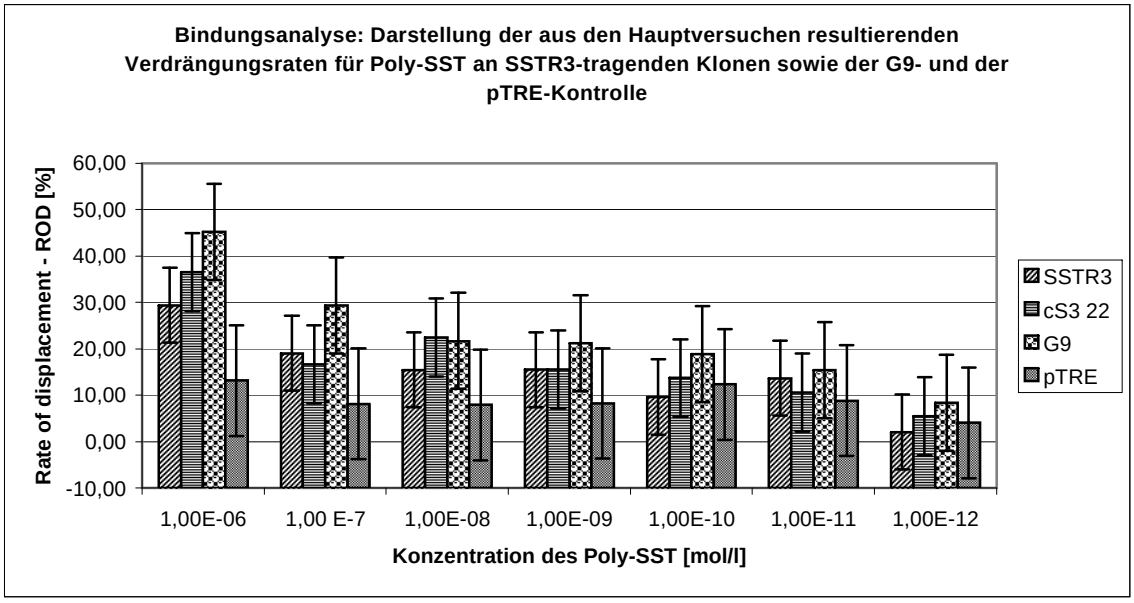

Abbildung 45: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für Poly-SST an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR3-tragenden Klonen SSTR3 [Mischklon] und c S3 22 [Einzelklon]. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zu den entsprechenden Darstellungen der Ergebnisse mit den physiologischen Liganden zu erkennen.

Im Vergleich zu den gezeigten Versuchen mit den physiologischen Agonisten können auch im Falle der SSTR4-tragenden Klone mit Poly-SST häufig nur deutlich geringere maximale Verdrängungsraten erzielt werden. Die ROD beträgt im folgend dargestellten Diagramm eines Versuches der Hauptversuchsrehe für den c S4 19-Klon 36,61 %, für den SSTR4-Mischklon 31,48 % und die G9-Positivkontrolle 47,80 %.

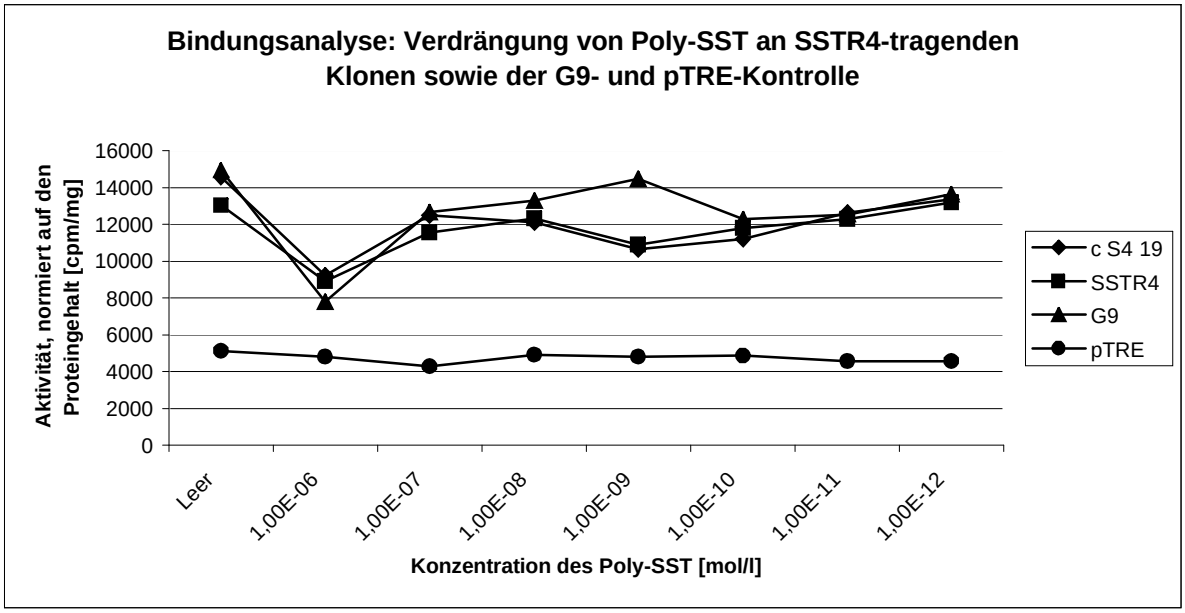

Abbildung 46: Poly-SST-Bindungsanalyse an SSTR-4-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle.

In der Darstellung der mittleren RODs als Ergebnis dieses Teiles des Hauptversuches zeigt sich der deutliche Unterschied im Verdrängungsverhalten gegenüber dem der physiologischen Liganden. Gleichermaßen wie die übrigen untersuchten SSTR-tragenden Klone zeigen die SSTR4-Subtyp-tragenden Zellen eine nachweisbares, wenn auch im Vergleich zu den Versuchen mit den physiologischen Liganden geringeres Verdrängungsverhalten.

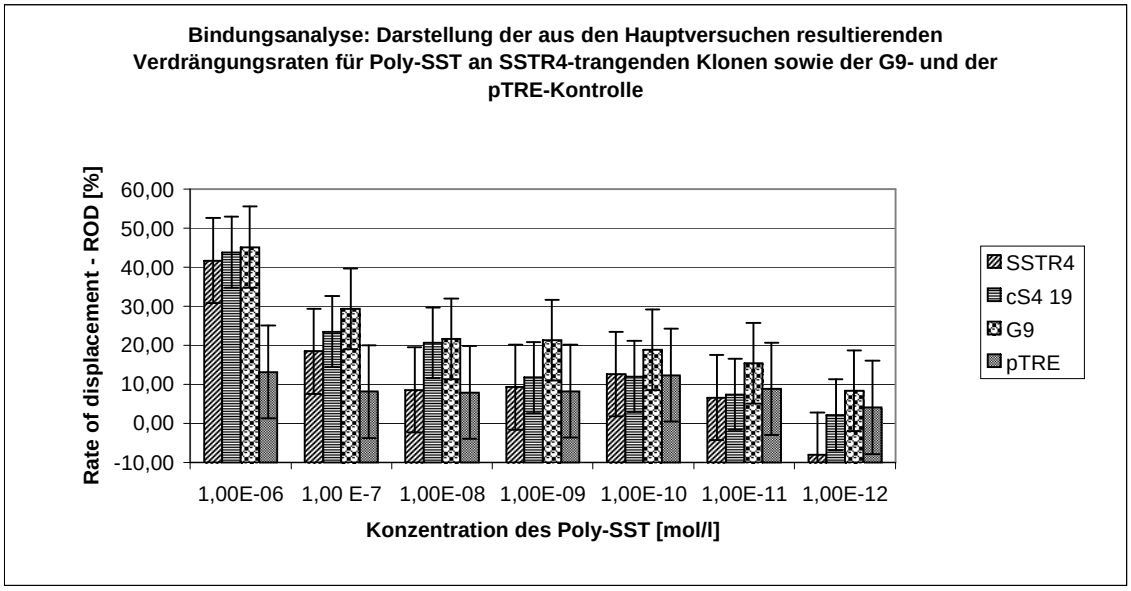

Abbildung 47: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für Poly-SST an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR4-tragenden Klonen SSTR4 [Mischklon] und c S4 19 [Einzelklon]. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zu den entsprechenden Darstellungen der Ergebnisse mit den physiologischen Liganden zu erkennen.

4.2 cAMP-Enzymimmunoassay

Durch die Untersuchung der SST-abhängigen Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration soll der „generelle Anschluss" des Rezeptors an die intrazelluläre Signaltransduktion dargestellt werden.
Dabei wurde zunächst immer ein jeweiliger Basalwert („Leer") durch die Untersuchung von vollkommen unstimulierten Zellen erhoben. Alle übrigen Ansätze enthielten als Basisstimulation Forskolin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l sowie den entsprechenden Liganden (SST-14, SST-28 bzw. Poly-SST) in jeweilig fallender Konzentration (10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M sowie 10^{-12} M).

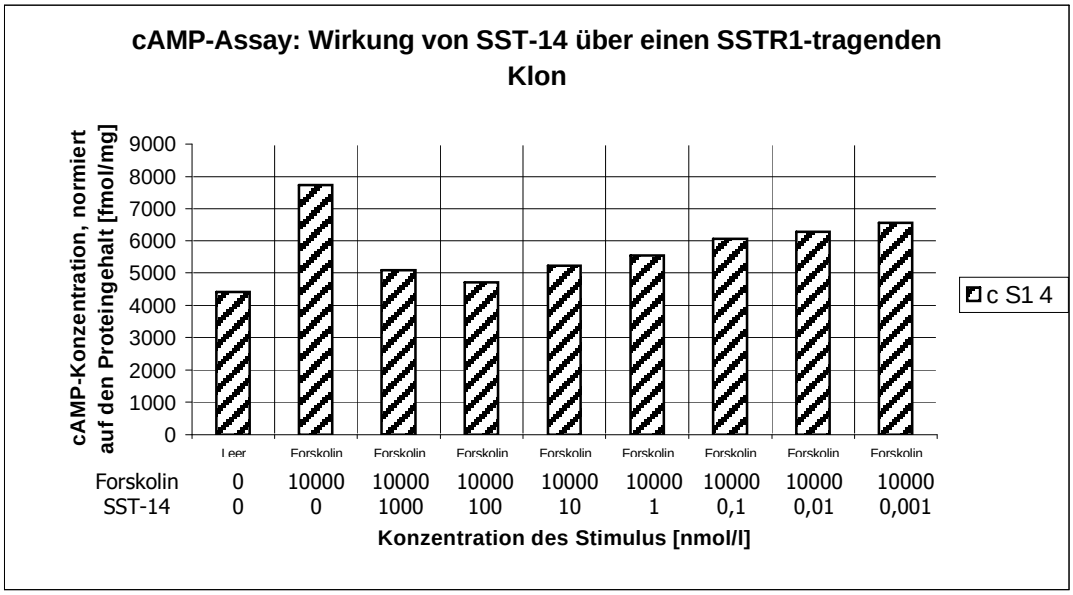

Abbildung 48: Darstellung der Ergebnisse eines cAMP-EIA am SSTR1-tragenden Einzelklon c S1 4. Gut zu sehen ist die konzentrationssteigernde Wirkung des Forskolin gegenüber dem Basalwert „0" sowie die konzentrationsabhängige Reduktion der cAMP-Spiegel durch SST-14.

Der Hintergrund für das Setting dieser Versuche beruht auf der Vorstellung, das Somatostatin zwar sicherlich auch die cAMP-Basalwerte reduzieren würde, dies jedoch nur sehr schwer mittels kommerziell erhältlicher cAMP-EIA-Kits darstellbar sein dürfte. Daher sollte, durch Zuhilfenahme des Forskolin als Aktivator der Adenylatcyclase, die somatostatinbedingte Reduktion der cAMP-Spiegel von einem erhöhten Niveau der praktikablere Weg der Durchführung sein. Entsprechend stellt der rein mit Forskolin

stimulierte Ansatz im Vergleich mit dem unstimulierten Ansatz „Leer" gleichzeitig die Positivkontrolle der Validität der Methode dar.

Auch hier folgt die Darstellung typischer Versuchsergebnisse für die jeweiligen SSTR-Subtyp-tragenden Klone in Abhängigkeit vom eingesetzten Liganden. Bei der Darstellung wurde sich der Übersicht wegen auf die Aufführung der Ligandenkonzentrationen von 10^{-6} M, 10^{-8} M und 10^{-10} M beschränkt. Die cAMP-Konzentration wird entsprechend der während des Versuches vorgenommenen Normierung auf den Proteingehalt in der Einheit fmol/mg dargestellt.

4.2.1 Versuche mit SST-14:

Die folgende Darstellung zeigt einen typischen Konzentrationsverlauf für den SSTR1-tragenden Klon c S1 4, den SSTR1-Mischklon und die G9-Kontrolle. Für letztere war sehr häufig ein Minimum der cAMP-Konzentration bei einem SST-14-Gehalt von 10^{-8} mol/l zu sehen.
Die maximale, durch die SST-Wirkung hervorgerufene Konzentrationsreduktion lag in diesem Versuch für den c S1 4-Klon bei 34,20 %, für den SSTR1-Mischklon bei 54,29 % und für die G9-Kontrolle bei 48,82 %.

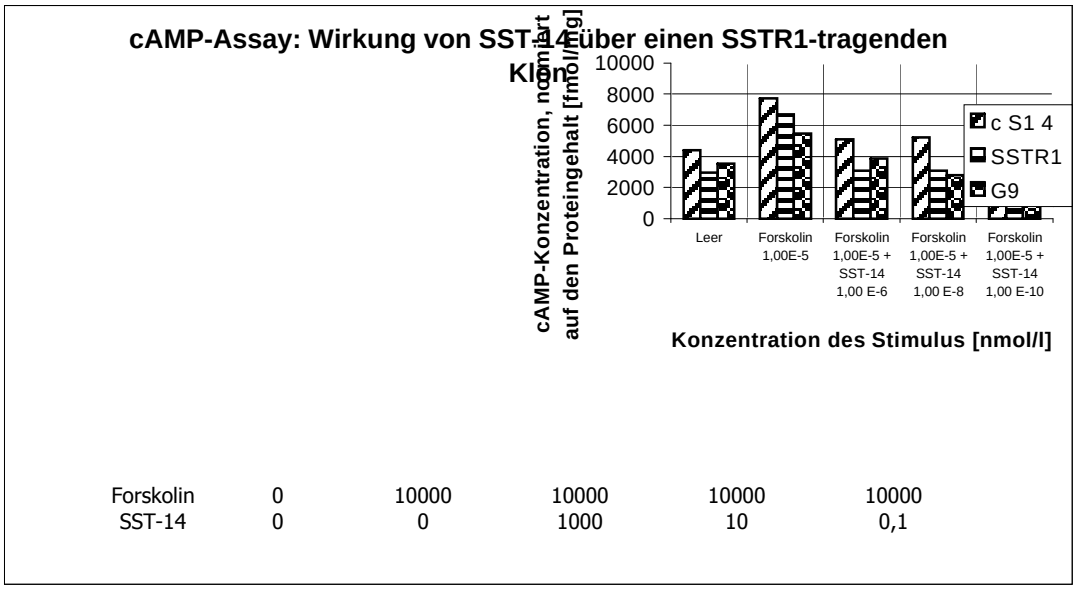

Abbildung 49: cAMP-EIA mit SST-14 an SSTR1-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

Ein ähnliches Bild findet man im folgenden Diagramm eines Versuches mit SSTR3-tragenden Zellen und der G9-Kontrolle. Die maximale Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels lag hier für den c S3 22-Klon bei 44,02 %, für den SSTR3-Mischklon bei 54,74 % und für die G9-Kontrolle bei 49,16 %.

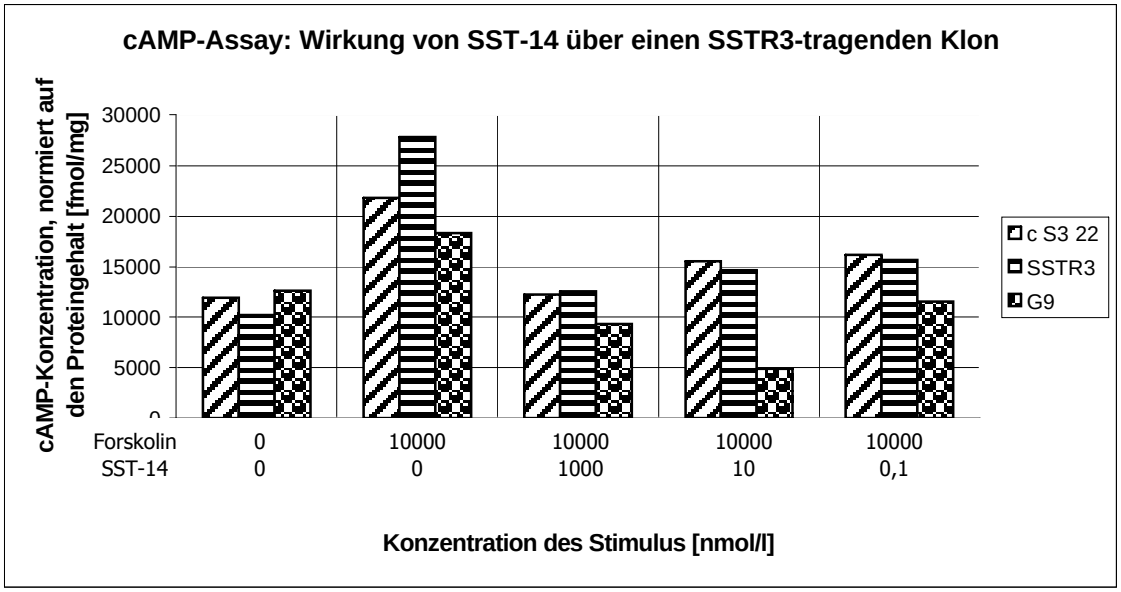

Abbildung 50: cAMP-EIA mit SST-14 an SSTR3-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

Ebenfalls gute Reduktionswerte durch SST-14 ließen sich mit den SSTR4-tragenden Klonen zeigen. In dem in der folgenden Abbildung dargestellten Versuch konnte mit dem c S4 19-Einzelklon eine maximale Reduktion des cAMP-Spiegels von 38,63 % erreicht werden. Für den SSTR4-Mischklon betrug sie 51,28 % und für die G9-Kontrolle 48,65 %.

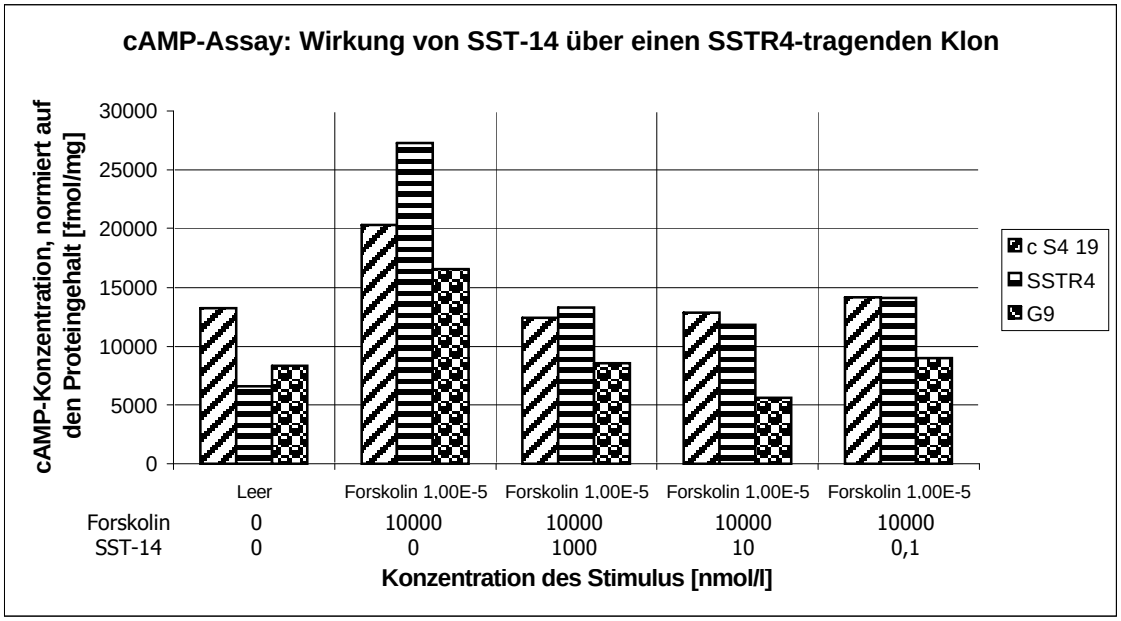

Abbildung 51: cAMP-EIA mit SST-14 an SSTR4-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

4.2.2 Versuche mit SST-28:

Auch bei den Untersuchungen mit dem zweiten physiologischen SSTR-Agonisten zeigt sich an den SSTR1-tragenden Klonen ein typisches Bild für die cAMP-Reduktion in Abhängigkeit von der Konzentration des SST-28. Die maximal erreichte Erniedrigung des cAMP-Spiegels liegt im dargestellten Versuch für den c S1 4-Einzelklon bei 75,40 % für eine Ligandenkonzentration von 10^{-6} mol/l. Die hier in der Abbildung zu sehende stärkere Reduktion des cAMP-Spiegels für 10^{-8} molares SST-28 konnte in den anderen Versuchen so nicht gesehen werden. Die Verläufe für den SSTR1-Mischklon und die G9-Kontrolle waren typisch. So liegt die hier dargestellte maximale Reduktion des cAMP-Gehaltes im Falle des SSTR1-Mischklones bei 81,96 % und der G9-Kontrolle bei 56,00 %.

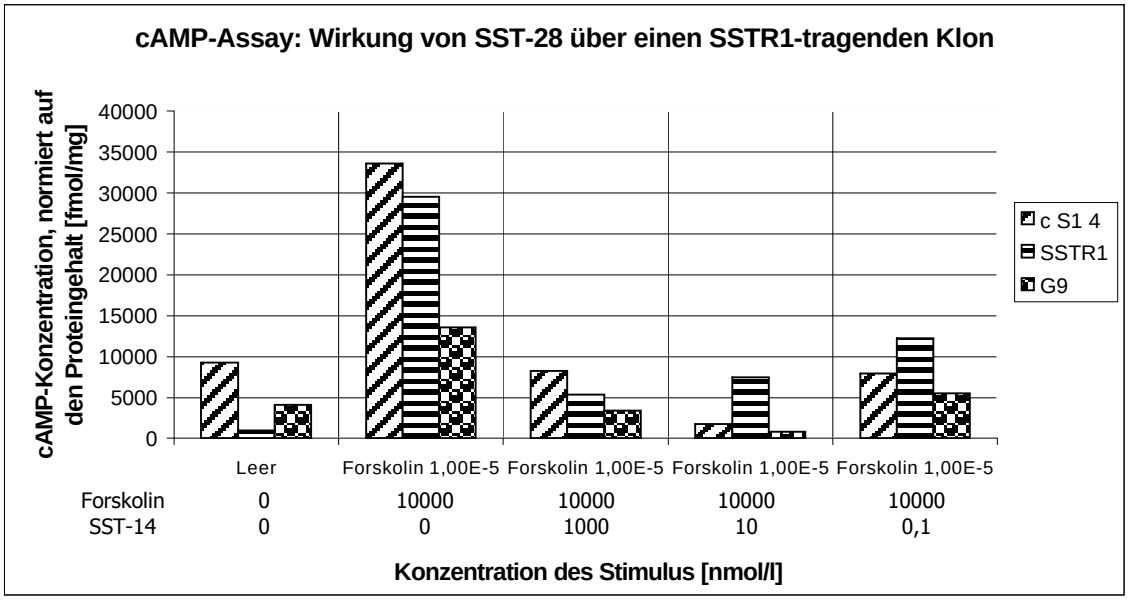

Abbildung 52: cAMP-EIA mit SST-28 an SSTR1-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

Ebenfalls an den SSTR3-tragenden Zellen konnten gute Reduktionen des cAMP-Spiegels durch SST-28 gezeigt werden. Im hier folgend dargestellten Versuch lagen die maximalen cAMP-Reduktionen für den c S3 22-Klon bei 75,82 %, für den SSTR3-Mischklon bei 71, 61 % und für die G9-Kontrolle bei 56,00 %.

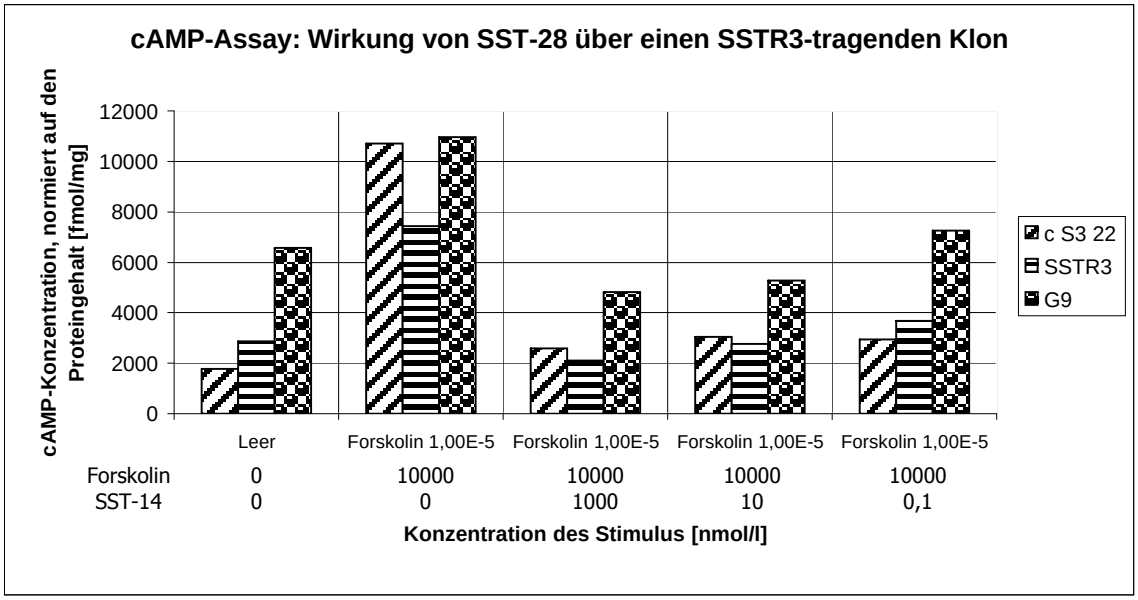

Abbildung 53: cAMP-EIA mit SST-28 an SSTR3-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

Auch im Falle der SSTR4-tragenden Zellen konnten gute Ergebnisse gezeigt werden. Im hier dargestellten Versuch liegt die maximale Reduktion des cAMP-Spiegels für den c S4 19-Einzelklon bei 56,13 %, für den SSTR4-Mischklon bei 72,50 % und für die G9-Kontrolle bei 74,86 %.

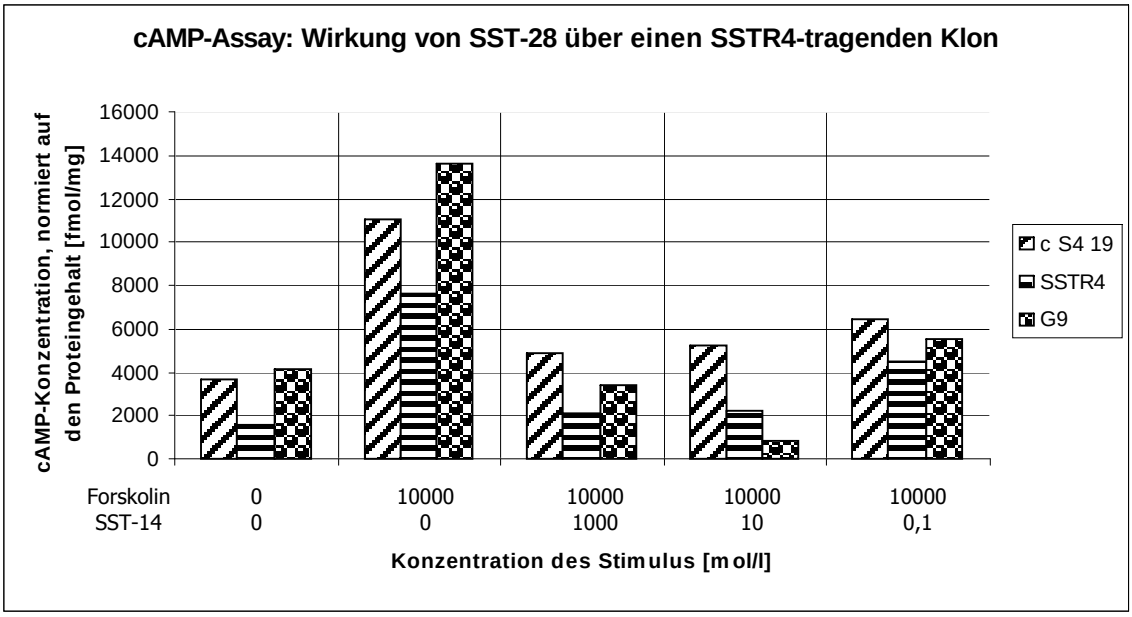

Abbildung 54: cAMP-EIA mit SST-28 an SSTR4-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

4.2.3 Versuche mit Poly-SST:

In den folgenden drei Abbildungen sind Versuche mit dem SST-Dextran-Konjugat dargestellt. In allen drei Fällen ließ sich die erwartete Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels zeigen. Auffällig war jedoch hierbei, dass im Falle der INR1-G9-Zellen das, bei der Verwendung der physiologischen Agonisten sonst bei einer Ligandenkonzentration von 10^{-8} mol/l liegende Minimum der cAMP-Konzentration, in wiederholten Versuchen erst bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l lag.

Im aufgeführten Versuch an den SSTR1-tragenden Zellen lag die maximale Reduktion des cAMP-Spiegels bei 59,94 % für den c S1 4-Einzelklon, bei 54,10 % für den SSTR1-Mischklon und bei 69,29 % für die G9-Positivkontrolle.

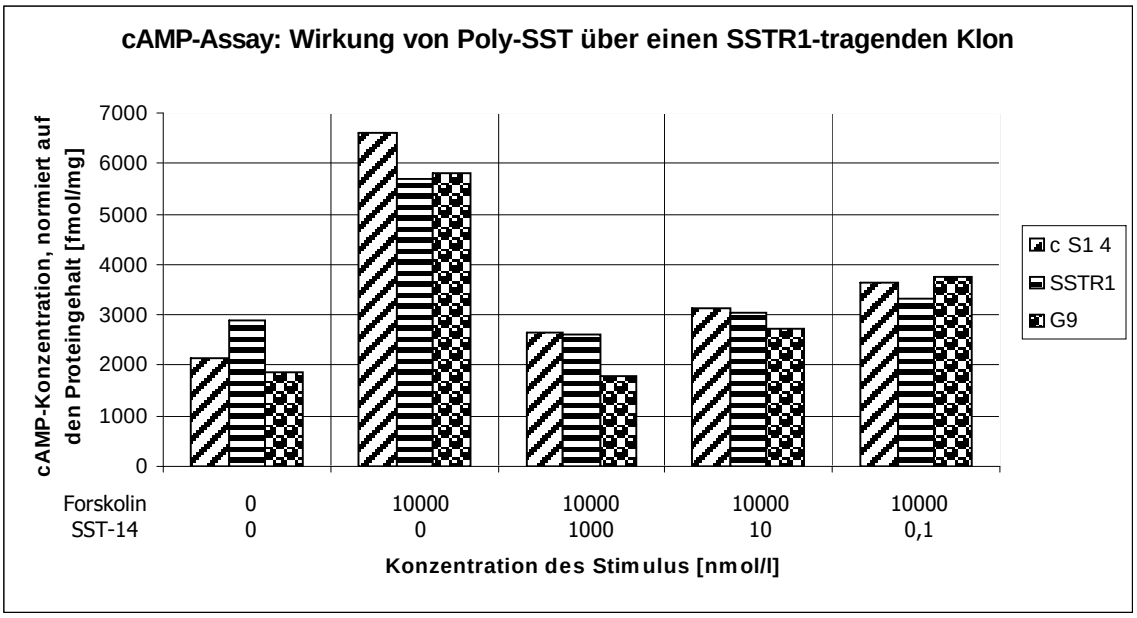

Abbildung 55: cAMP-EIA mit Poly-SST an SSTR1-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

Ebenfalls gute Werte zeigten sich an den SSTR3-tragenden Zellen. In der folgenden Darstellung liegt die maximale cAMP-Reduktion bei 62,84 % für den c S3 22-Klon, bei 62,53 % für den SSTR3-Mischklon und bei 49,34 % für die G9-Kontrolle.

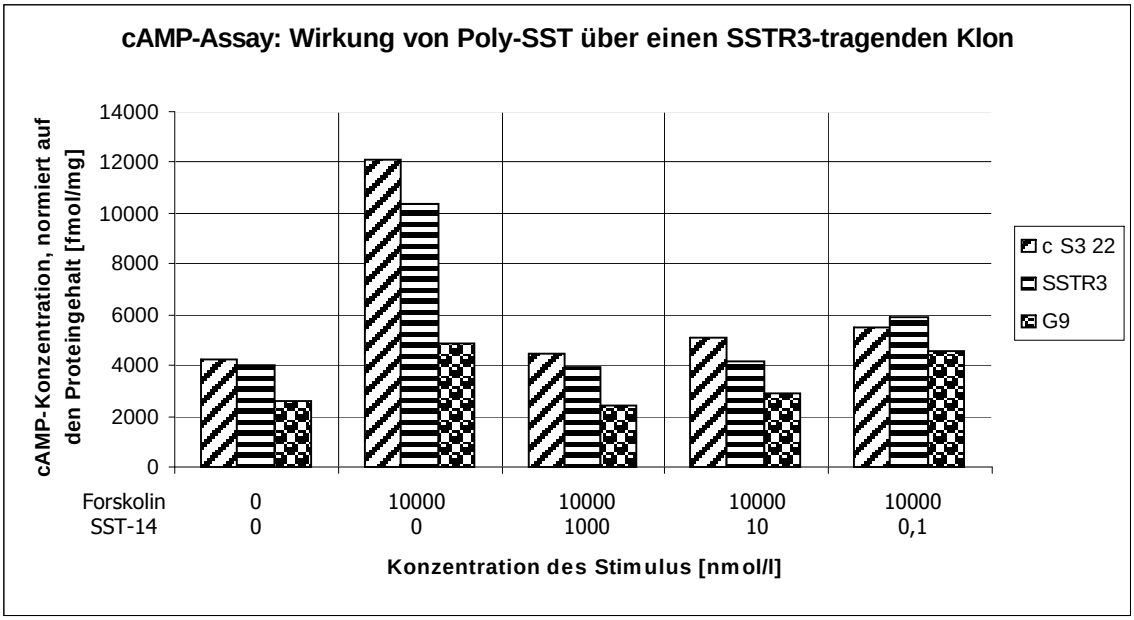

Abbildung 56: cAMP-EIA mit Poly-SST an SSTR3-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

Die letzte Abbildung dieses Abschnittes zeigt einen Versuch mit Poly-SST an SSTR4-tragenden Zellen mit Darstellung der typischen, konzentrationsabhängigen Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel. Die maximale Reduktion der cAMP-Konzentration liegt hierbei für den c S4 19-Einzelklon bei 44,21 %, für den SSTR4-Mischklon bei 53,34 % und für die G9-Kontrolle bei 49,34 %.

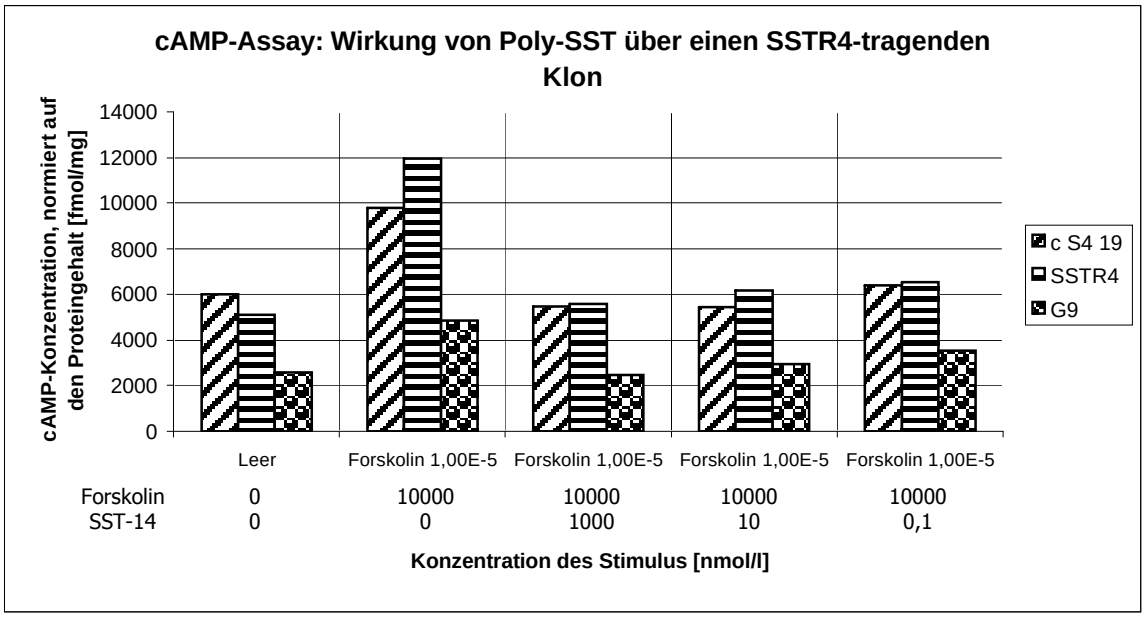

Abbildung 57: cAMP-EIA mit Poly-SST an SSTR4-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.

4.3 Chromogranin A-Promotor-Studien

Dieser letzte durchgeführte Untersuchungsteil bezieht sich direkt auf die über die exprimierten SSTR auf Genebene hervorgerufenen Effekte. Der Nachweis einer durch Somatostatin hervorgerufenen, konzentrationsabhängigen Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels konnte im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden. Um jedoch zu darzustellen, dass ein Somatostatineffekt auf Genebene nachweisbar ist, benötigt man in gewisser Weise eine Art „Sonde".

Als eine solche Sonde lässt sich der, in seiner Aktivität in proportionalem Maß vom intrazellulären cAMP-Spiegel abhängende Chromogranin A-Promotor nutzen, wenn er mit einem Gen kombiniert wird, dessen Protein leicht einer Messung zugänglich ist. Als eine der idealen Kombinationen hierfür erweist sich der in einen Luciferasereporter-Vektor klonierte Chromogranin A-Promotor, da eine mit diesem Konstrukt transfizierte Zelle in Abhängigkeit von ihrer intrazellulären cAMP-Konzentration das Enzym Luciferase produziert. Diese lässt sich in ihrer, in Abhängigkeit von der Menge der Luciferase liegenden enzymatischen Aktivität durch eine einfache Untersuchung nachweisen. Durch den Umsatz seines Substrates kommt es durch die Luciferase zur Entstehung von Licht, welches mittels eines Luminometers gemessen werden kann. Dabei ist die Menge des in relative light units (RLU) gemessenen Lichts abhängig von der Aktivität des Enzyms, die wiederum, genauso wie die Aktivität des Chromogranin A-Promotors, in direktem Zusammenhang zur Menge der Luciferase steht. Dies erlaubt den direkten Schluss von der gemessenen Lichtmenge auf die Promotor-Aktivität.

Die folgende Abbildung zeigt ein typisches Versuchsergebnis für die SSTR-Subtyptragenden Mischklone, die pTRE-Negativ- und die BON-Positivkontrolle. Standardmäßige Messpunkte waren immer ein Basalwert („Zellen, kein Vektor"), ein Wert für transient transfizierte und mit Forskolin 10^{-5} M stimulierte Zellen (der gleichzeitig die Positivkontrolle darstellte) sowie je ein Messpunkt mit solchen Zellen und SST-14 in 10^{-6} molarer bzw. 10^{-8} molarer Konzentration. Zu sehen ist die Reduktion der durch die Forskolinwirkung gesteigerten Promotor-Aktivität durch SST-14, in Abhängigkeit von seiner Konzentration.

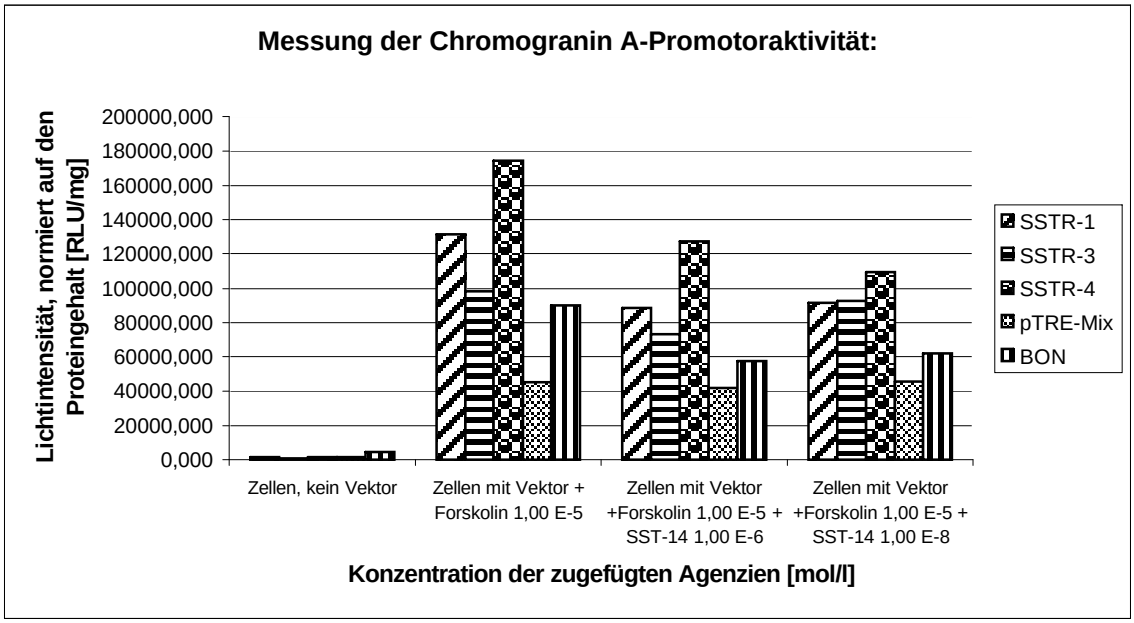

Abbildung 58: Chromogranin A-Promotor-Studie mit Untersuchung der SSTR-Subtyp-tragenden Mischklone, der pTRE-Negativ- und der BON-Positivkontrolle.

Grund für den Einsatz der BON-Zellen als Positivkontrolle waren im Vorfeld deutlich gewordene Probleme bei der transienten Transfektion der sonst üblicherweise als Positivkontrolle genutzten INR1-G9-Zellen. Die humanen BON-Zellen ließen sich, im Gegensatz zu den vom Hamster stammenden INR1-G9-Zellen, problemlos nach der selben Lipofectamin-Methode und mit dem selben Lipid wie die ebenfalls humanen LCC-Zellen, die die Basis für die SSTR-Subtyp-tragenden Klone darstellten, transfizieren.

Diese, im Vorfeld der Untersuchung hin sehr aufwendige Methode wurde nur in relativ geringer Stückzahl und nur an den dargestellten Mischklonen durchgeführt. Die sonst mit untersuchten besten Einzelklone wurden hier nicht mit in die Versuche einbezogen. Auch die Ausweitung auf den Einsatz von SST-28 oder gar Poly-SST konnte nicht stattfinden.

5 Diskussion:

5.1 Ergebnisse im Vergleich zu bestehender Literatur

Sicherlich ist es von herausragender Bedeutung, die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche mit den Erkenntnissen bereits publizierter Arbeiten speziell den etablierten heterologen Systemen zu vergleichen.
Hierbei kann festgestellt werden, dass die Bindungseigenschaften der hier untersuchten Zellsysteme sehr stark den Eigenschaften der etablierten Zellsysteme ähneln. Die Affinitäten für SST-14 und -28 liegen für alle drei untersuchten Rezeptorsubtypen wie im Falle der bekannten heterologen Systeme im nanomolaren Bereich. Somit kann das homolog humane System, wie es hier untersucht wurde, als gleichwertig angesehen werden.
Die intrazelluläre Signaltransduktion wurde im Hinblick auf die SST-bedingten Effekte auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration grundlegend untersucht und zeigte auch hier für alle drei Rezeptorsubtypen nach Forskolin-Vorstimmulation gut verwertbare Ergebnisse, deren Richtung in die der etablierten Literatur weisen.
Sicherlich müssen sich dieser Untersuchung im weiteren Verlauf weitere Ansätze zur Überprüfung weiterer Signaltransduktionswege folgen, die den Rahmen dieser Arbeit ansonsten gesprengt hätten. Das Fazit zeigt jedoch, dass erfolgreich mit den SSTR-Subtypen 1, 3 und 4 stabil transfizierte Klone identifiziert und in Bindungsstudien der Nachweis der Rezeptoren geführt werden konnte. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wurde nach Forskolin-Stimulation durch SSTR-vermittelte Wirkung aller drei untersuchten Liganden signifikant gesenkt und die durch den Chromogranin A-Promotor initiierte Genexpression konnte durch SST-14 ebenfalls reduziert werden, so dass das homolog-humane System der SSTR-Subtypen 1, 3 und 4 dem Vergleich mit den bekannten heterologen Systemen ohne Abstriche standhalten kann.

5.2 Hauptversuch in kritischer Betrachtung

5.2.1 Somatostatin-Bindungsassays

Die während der wiederholten Untersuchungen sichtbare Varianz der Ergebnisse identischer Klone, kann, wie bereits angesprochen, auf einen unterschiedlichen Zustand der Zellen von Versuch zu Versuch zurückzuführen sein, der ggf. weder makroskopisch noch mittels einfacher Mikroskopie erkennbar gewesen sein könnte. Hiervon war allerdings lediglich das Ausmaß der Gesamtbindung der zugefügten Aktivität betroffen. Die Verhältnisse der Verdrängungsraten der einzelnen Messpunkte blieben unbeeinflusst.
Dem Problem unterschiedlich großer Zellzahlen in den Ansätzen der jeweiligen Messpunkte wurde durch Normierung auf den Proteingehalt begegnet. Wie bereits beschrieben wurden die Zellen vor Messung der Aktivität mittels NaOH lysiert, so dass auch die Gefahr ungleichmäßiger Zahlen zur Messung in den Wells der 6-Well-Platten zurückbleibender Zellen minimiert werden konnte. Dabei konnte in Voruntersuchungen zu dieser Methode gezeigt werden, dass der Kollagen-belegte Boden der Wells nicht durch die NaOH aufgelöst wurde und somit eine Proteinbestimmung als Normierungsverfahren möglich war.
Eine weitere Fehlerquelle eines solchen Versuchsansatzes ist die Qualität des radioaktiv markierten Liganden zum Zeitpunkt des Versuches. Grundsätzlich wurde das mit ^{125}Jod markierte SST-14 direkt nach Erhalt der Lieferung aufgelöst, in kleinen Proben mit praktikabler Aktivität (sog. „Aliquots") bei –20 °C gelagert und entsprechend der benötigten Menge am Versuchstag frisch aufgetaut.
Es ist dennoch nicht auszuschliessen, dass es aufgrund teilweise längerer Lagerungszeiten zur Radiolyse des markierten Somatostatins gekommen sein könnte. Dies hätte jedoch lediglich Auswirkung auf die gebundene Gesamtaktivität, nicht aber auf die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Verdrängungsraten der entsprechenden Konzentrationen unmarkierten Ligands. Im übrigen wurde mit den unmarkierten Agonisten in gleicher Weise verfahren wie mit dem radioaktiv markierten SST-14: Auch sie wurden nach Lieferung umgehend aliquotiert und bei –20 °C gelagert, so dass zu jedem Versuch frisch aufgetauter unmarkierter Agonist vorlag.

5.2.2 cAMP-Enzymimmunoassay

Der kommerziell erhältliche cAMP-EIA-Kit, wie er hier verwandt wurde, stellt ein relativ einfach zu handhabendes und, bei genauer Beachtung der Versuchsvorschrift, mit wenig Fehlerquellen behaftetes Untersuchungsinstrument dar.
Von entscheidender Bedeutung für die Ergebnisse dieser Untersuchung dürfe auch hier, wie in den vorhergehenden Abschnitten bereits beschrieben, der Zustand der Zellen bei Untersuchungsbeginn sein.
In Voruntersuchungen zu dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Messung der Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation der Adenylatcyclase durch Forskolin der Messung nach Hemmung des cAMP-Abbaus durch das Methylxantin IBMX überlegen war. Die Messung ausgehend von den Basalwerten ohne künstliche Anhebung der intrazellulären cAMP-Konzentration war zwar möglich und zeigte auch erwartete Messwerte, erschien allerdings wegen der sehr geringen messbaren cAMP-Mengen wenig praktikabel und in ihrer Verlässlichkeit bzw. ihrer Aussagekraft der Methode mit Forskolinstimulation unterlegen. Daher wurden in den Hauptversuchen konform zu den meisten Veröffentlichungen in der Literatur Bestimmungen nach Forskolinstimulation durchgeführt.

Da der Einfluss ungleichmäßiger Ausgangszellzahlen bei relativ geringen Zellzahlen pro Ansatz von hoher Bedeutung ist, wurde auch hier die Normierung auf den Gesamtproteingehalt des jeweiligen Ansatzes durchgeführt.

5.2.3 Chromogranin A-Promotor-Studien

Dies ist sicherlich eine Untersuchung, die nicht zuletzt wegen ihres Umfangs und des zu betreibenden Aufwandes eine Vielzahl von Fehlerquellen besitzt.

Wird von einem ggf. schon im Vorfeld bestehendem niedrigen DNA-Gehalt der Probe oder gar einer stärkeren Verunreinigung der für die transiente Transfektion vorgesehenen DNA mit RNA abgesehen, stellt der Vorgang der transienten Transfektion als solches einen sehr empfindlichen Arbeitsschritt dar. Entscheidend für den Erfolg ist ein ideales Verhältnis zwischen Transfektionslipid und Plasmid-DNA, welches durch genaue photometrische Bestimmung der DNA-Menge gegeben sein

muss. Mit dem Perfect Lipid pFX-3 Transfection Kit (Invitrogen, San Diego, USA) konnten zwar immer wieder gute Ergebnisse erzielt werden, dennoch handelt es sich bei der transienten Transfektion um einen von vielen Faktoren abhängigen Vorgang. So sind beispielsweise die Mizellenbildung und die Membrangängigkeit des Lipids stark temperaturabhängig.

Ein weiteres Problem an dieser Untersuchungsform ist die geringe Stabilität der Luciferase, die ebenfalls, wie sich in den Vorversuchen zu dieser Methode zeigte, eine deutliche Temperaturabhängigkeit aufwies. Schlussendlich wurden die Proben zur optimalen Schonung des Enzyms auf Eis verarbeitet, was allerdings zur Folge hatte, dass geringe Schwankungen der effektiven Temperatur einer Probe in Abhängigkeit vom Reaktionsgefäß (Eppendorf-Gefäß oder 6-Well-Platte – je nach Arbeitsschritt) kaum zu vermeiden waren.

5.2.4 Versuche mit Dextran-konjugiertem Somatostatin

Nachdem durch eine Veröffentlichung aus unsere Arbeitsgruppe bekannt wurde, dass zeitgleich an einer Etablierung rein humaner Modellsysteme zur weiteren Untersuchung aller fünf humanen Somatostatinrezeptoren gearbeitet wurde, trat die Arbeitsgruppe um Anders Holmberg, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden, an uns mit der Bitte heran, an unseren Zellsystemen mit einem neu synthetisierten Liganden Bindungsstudien und cAMP-Assays durchzuführen.
Bei dem neuen Liganden handelte es sich um ein Polydextransomatostatin mit dem Namen Somatostatin-Dextran-70 (von uns kurz Poly-SST genannt) und einem Molekulargewicht von 70 kDa. Der dabei entscheidende Vorteil gegenüber den physiologischen Agonisten liegt in einer Halbwertzeit von 27 Stunden, die durch die Größe und damit verbundene Stabilität gegenüber Peptidasen begründet ist. Der Nachteil der Substanz liegt allerdings genauso auf der Hand. Bedingt durch seine Größe wird das Molekül natürlich wesentlich langsamer und in geringerem Umfang in Gewebe aufgenommen.

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass es mit nanomolarer, wenn auch im Vergleich zu den physiologischen Agonisten SST-14 und SST-28 etwas geringerer

Affinität an alle fünf SSTR-Subtypen zu binden vermag. Auch eine Reduktion intrazellulärer cAMP-Spiegel nach Inkubation mit Poly-SST konnte gezeigt werden.

Zwischenzeitlich ist sowohl die wissenschaftliche als auch die klinische Etablierung des Somatostatin-Dextran-70 deutlich vorangeschritten, so dass erste Ergebnisse klinischer Phase-1-Studien veröffentlicht werden konnten (Joensuu, Nilsson et al. 2004). Somit hatte unsere Arbeitsgruppe die erstklassige Möglichkeit, die neu etablierten Zellsysteme abseits der physiologischen Agonisten mit einem bis zu diesem Zeitpunkt für uns unbekannten Peptid testen zu können, so dass in dieser Arbeit nicht nur Ergebnisse aus der Grundlagenforschung mit den physiologischen Agonisten SST-14 und SST-28 sondern auch direkt aus der, zu diesem Zeitpunkt noch experimentellen Anwendung gezeigt werden können.

5.3 Ergebnisse im Kontext

Wie kaum ein anderes regulatorisches Peptid nimmt das Somatostatin nach wie vor eine Schlüsselstellung im Organismus eines jeden Lebewesens ein. Und dabei werden noch heute neue Erkenntnisse in Bezug auf die organ- und gewebeabhängige Funktionsweise dieses Systems und die Interaktionen mit anderen Hormonen bzw. Transmittern in der Wissenschaft etabliert. Auch wenn sich derzeit sehr viel Forschungsbemühen auf die Entwicklung rezeptorselektiver Liganden insbesondere aus dem Bereich der Agonisten aber auch der Antagonisten bezieht, herrscht ebenfalls noch reichlich Forschungsbedarf im Bereich der Kenntnisse über die Details der intrazellulären Signaltransduktion sowie der Interaktionen verschiedener Rezeptoren. Dabei gilt dies sowohl für die Interaktionen verschiedener SSTR-Subtypen miteinander, als auch für die Interaktionen von einzelnen SSTR-Subtypen mit Rezeptoren anderer GPCR-Klassen wie z. B. der Opiatrezeptoren.

Entsprechend breit ist die Einsatzmöglichkeit der hier vorgestellten Modellsysteme:

Zum einen könnten sie zur detaillierteren Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion herangezogen werden und so die bislang gebräuchlichen heterogenen Zellsysteme ablösen, da durch ein homogenes humanes Zellsystem allgemein gültige Aussagen zu den Abläufen der Signaltransduktion, zu einzelnen Pfaden und nicht zuletzt zu den kumulativen Effekten verschiedener gleichzeitig ablaufender Signalkaskaden möglich wären.

Einen möglicherweise anderen Einsatzort könnte die Forschung an selektiven Agonisten oder auch Antagonisten liefern, um hier am rein humanen System z. B. Affinitäten zu erforschen, die zur Optimierung des Moleküldesigns herangezogen werden könnten.

Ein sicherlich zukunftsweisendes Gebiet stellt die Etablierung von Subtyp-spezifischen in-vivo-Modellen z. B. in der Nacktmaus dar. Diese könnten dazu verwandt werden, um neu synthetisierte Somatostatinanaloga auf ihre Eignung zur Diagnostik oder Therapie in der Nuklearmedizin zu evaluieren. Ein solcher Ansatz mit allen SSTR-Subtyp-Klonen befindet sich derzeit in Planung.

Als ebenfalls zukunftsweisend wäre der Einsatz zur weiteren Erforschung von Rezeptorinteraktionen denkbar. Beispielsweise könnte auf der Basis der hier vorgestellten Systeme eine zweite stabile Transfektion mit einem weiteren humanen Rezeptor, wie z. B. einem Opioidrezeptor, nach ähnlichem, wie dem hier durchgeführten Vorgehen, angestrebt werden. Somit wäre es möglich, detaillierte Informationen über die Interaktion zwischen einem bestimmten Somatostatinrezeptor und einem GPCR einer anderen Familie zu erforschen.

6 Zusammenfassung:

Etablierung eines humanen Modellsystems zur funktionellen Analyse der Somatostatinrezeptoren Typ 1, Typ 3 und Typ 4 in der humanen Karzinoid-Zell-Linie LCC-18

Einführung: Somatostatin (SST) und seine Rezeptoren stellen bis heute einen der interessantesten Regelungsmechanismen zur Steuerung von Hormon- und Neurotransmitter-vermittelten Effekten im Körper dar. Hierbei moduliert SST über seine Rezeptoren (SSTR) inhibitorisch die sekretorische Aktivität von Zellen und vermittelt direkt zytostatische oder zytotoxische Effekte auf eine Zielzelle. Viel Forschungsleistung konzentriert sich derzeit auf diesem Gebiet. Dabei wurden zur Aufklärung der bis heute noch unbekannten Details der intrazellulären Signaltransduktion der SSTR-Subtypen immer wieder heterologe Zellsysteme etabliert. Den Resultaten solcher Systeme kann jedoch aus unserer Sicht nur in begrenzten Maße allgemeingültige Aussagekraft beigemessen werden. **Zielsetzung:** Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Überprüfung eines neuen, homolog-humanen Zellsystems zur weiteren Untersuchung des Somatostatins und seiner Rezeptorsubtypen, das durch die stabile Transfektion der klonierten humanen SSTR-Subtypen in Zellen der zuvor SSTR-freien humanen neuroendokrinen Kolonkarzinom-Zelllinie LCC-18 entwickelt wurde. **Methoden:** An, durch eine doppelt stabile Transfektion mit der genetischen Information der jeweiligen humanen SSTR-Subtypen versehenen Zellen erfolgten Bindungsstudien mit SST-14, SST-28 sowie einem neuen SST-Polydextran-Liganden in Konkurrenz zu ^{125}I-Tyr-SST-14. Die SSTR-vermittelten Wirkungen auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration der o. a. Liganden und auf die Genexpression wurden analysiert. **Ergebnisse:** Erfolgreich mit den SSTR-Subtypen 1, 3 und 4 stabil transfizierte Klone konnten identifiziert und in Bindungsstudien der Nachweis der Rezeptoren geführt werden. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wurde nach Forskolin-Stimulation durch SSTR-vermittelte Wirkung aller drei untersuchten Liganden signifikant gesenkt und die durch den Chromogranin A-Promotor initiierte Genexpression konnte durch SST-14 ebenfalls reduziert werden. **Schlussfolgerung:** Es konnte ein homolog-humanes Zellsystem etabliert werden, dessen Möglichkeiten in der weiteren Erforschung der Rezeptorsubtyp-spezifischen intrazellulären Signaltransduktion, neuer SSTR-Agonisten und –Antagonisten, der Interaktion membranständiger Rezeptoren sowie in der Etablierung neuer Tumormodelle vielfältig sind.

7 Literaturverzeichnis:

Aguila, M. (1994). "Growth hormone releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase." Proc Natl Acad Sci USA **91**: 782 - 786.

Aguila, M., W. Dees, et al. (1991). "Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci USA **88**: 11485 - 11489.

Aguila, M., A. Rodriguez, et al. (1996). "Somatostatin antisense oligodesoxynucleotide-mediated stimulation of lymphocyte proliferation in culture." Endocrinology **137**: 1585 - 1590.

Amherdt, M., Y. Patel, et al. (1987). "Selective binding of somatostatin-14 and somatostatin-28 to islet cells revealed by quantitative electron microscopic autoradiography." J Clin Invest **80**: 1455 - 1458.

Amherdt, M., Y. Patel, et al. (1989). "Binding and internalization of somatostatin, insulin, and glucagon by cultured rat islet cells." J Clin Invest **84**: 412 - 417.

Arnold, R., B. Simon, et al. (2000). "Treatment of neuroendokrine GEP tumors with somatostatin analogues." Digestion **62 (Suppl. 1)**: 84 - 91.

Arnold, R., M. Wied, et al. (2002). "Somatostatin analogues in the treatment of endocrine tumors of the gastrointestinal tract." Expert Opin Pharmacother **3**(6): 643 - 656.

Badway, A., F. West, et al. (2004). "Somatostatin regulates intracellular signaling in human carotid endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **319**(4): 1222 - 1227.

Baldwin, J. (1994). "Structure and function of receptors coupled to G proteins." Curr Opin Cell Biol **6**: 180 - 190.

Baragli, A., U. Kumar, et al. (2003). "Hetero-oligomerization of dopamine (D2R) and somatostatin receptors (sstr2) in CHO-K1 cells and cortical cultured neurons." Proceeding of endocrine society, Philadelphia **469**: (Abstract).

Barber, D., M. McGuire, et al. (1989). "Beta-adrenergic and somatostatin receptors regulate Na-H exchange indipendent of cAMP." J Biol Chem **264**: 21038 - 21042.

Barnett, P. (2003). "Somatostatin and somatostatin receptor physiology." Endocrine **20**(3): 255 - 264.

Bass, R., B. Buckwalter, et al. (1996). "Identification and characterization of novel somatostatin antagonists." Mol Pharmacol **50**: 709 - 715.

Bauer, W., U. Briner, et al. (1982). "SMS 201-995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action." Life Sci **31**: 1133 - 1140.

Baumeister, H., O. Kreuzer, et al. (1998). "Cloning, expression, pharmacology and tissue distribution of the mouse somatostatin receptor subtype 5." J Neuroendocrinol **10**: 283 - 290.

Baumeister, H. and W. Meyerhof (2000). "Gene regulation of somatostatin receptors in rats." J Physiol Paris **94**(3 - 4): 167 - 177.

Behe, M., J. Du, et al. (2001). "Biodistribution, blood half-life, and receptor binding of a somatostatin-dextran conjugate." Med Oncol **18**(1): 59 - 64.

Behr, T., P. Kann, et al. (2003). "Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltraktes einschließlich des Karzinoides." Der Nuklearmediziner **2**: 121 - 133.

Bertherat, J., F. Tenenbaum, et al. (2003). "Somatostatin receptors 2 and 5 are the major somatostatin receptors in insulinomas: an in vivo and in vitro study." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5353 - 5360.

Bissette, G. and B. Myers (1992). "Somatostatin in Alzheimers disease and depression." Life Sci **51**: 1389 - 1410.

Bito, H., M. Mori, et al. (1994). "Functional coupling of SSTR4, a major hippocampal somatostatin receptor, to adenylate cyclase inhibition, arachidonate release and activation of the mitogen-activated protein kinase cascade." J Biol Chem **269**: 12722 - 12730.

Blake, A., A. Badway, et al. (2004). "Delineating somatostatin's neuronal actions." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **3**(2): 153 - 160.

Bläker, M., M. Schmitz, et al. (2004). "Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas." J Hepatol **41**(1): 112 - 118.

Blum, A., A. Metwali, et al. (1992). "Granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors and respond to somatostatin with decreased IFN-gamma secretion." J Immunol **149**: 3621 - 3626.

Boehm, B. (2003). "The therapeutic potential of somatostatin receptor ligands in the treatment of obesity and diabetes." Expert Opin Investig Drugs **12**(9): 1501 - 1509.

Bordi, C. (2004). "Multiple endocrine neoplasia (MEN)-associated tumours." Dig Liver Dis **36 (Suppl. 1)**: S31 - S34.

Bousquet, C., N. Delesque, et al. (1998). "SST2 somatostatin receptor mediates negative regulation of insulin receptor signaling through the tyrosine phosphatase SHP-1." J Biol Chem **273**: 7099 - 7106.

Bousquet, C., J. Guillermet, et al. (2004). "Somatostatin receptors and regulation of cell proliferation." Dig Liver Dis **36 (Suppl. 1)**: S2 - S7.

Bousquet, C., E. Puente, et al. (2001). "Antiproliferative Effect of Somatostin and Analogs." Chemotherapy **47 (Suppl. 2)**: 30 - 39.

Brazeau, P., W. Vale, et al. (1973). "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone." Science **179**(68): 77 - 79.

Breder, C., Y. Yamada, et al. (1992). "Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain." J Neurosci **12**: 3920 - 3934.

Brevini, T., R. Bianchi, et al. (1993). "Direct inhibitory effect of somatostatin on the growth of the human prostatic cancer cell line LNCaP: Possible mechanism of action." J Clin Endocrinol Metab **77**: 626 - 631.

Brunicardi, F., A. Atiya, et al. (2003). "Activation of somatostatin receptor subtype 2 inhibits insulin secretion in the isolated perfused human pancreas." Pancreas **27**(4): e84 - e89.

Bruno, J., Y. Xu, et al. (1994). "Somatostatin regulates somatostatin receptor subtype mRNA expression in GH_3 cells." Biochem Biophys Res Commun **202**: 1738 - 1743.

Bruno, J., Y. Xu, et al. (1992). "Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 11151 - 11155.

Bruno, J., Y. Xu, et al. (1993). "Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat." Endocrinology **133**: 2561 - 2567.

Bruno, J., Y. Xu, et al. (1994). "Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribunuleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat." Endocrinology **135**: 1787 - 1792.

Bruns, C., F. Raulf, et al. (1996). "Binding properties of somatostatin receptor subtypes." Metabolism **45 (Suppl. 1)**: 17 - 20.

Buchsbaum, D., T. Chaudhuri, et al. (2005). "Radiotargeted gene therapy." J Nucl Med **46 (Suppl. 1)**: 179S - 186S.

Burroughs, A., P. McCormick, et al. (1990). "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of somatostatin for variceal bleeding: Emergency control and prevention of early variceal re-bleeding." Gastroenterology **99**: 1388 - 1395.

Buscail, L., N. Delesque, et al. (1994). "Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: Mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2." Proc Natl Acad Sci USA **91**: 2315 - 2319.

Buscail, L., J.-P. Esteve, et al. (1995). "Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms." Proc Natl Acad Sci USA **92**: 1580 - 1584.

Calender, A. (2000). "Molecular genetics of neuroendocrine tumors." Digestion **62 (Suppl. 1)**: 3 - 18.

Candi, E., G. Melino, et al. (1995). "Tamoxifen and somatostatin affect tumours by inducing apoptosis." Cancer Lett **96**(1): 141 - 145.

Cardoso, A., C. El Ghamrawy, et al. (1998). "Somatostatin increases mitogen-induced IL-2 secretion and proliferation of human Jurkat T-cells via sst3 receptor isotype." J Cell Biochem **68**: 62 - 73.

Caron, P., L. Buscail, et al. (1997). "Expression of somatostatin receptor SST4 in human placenta and absence of octreotide effect on human placental growth hormone concentrations during pregnancy." J Clin Endocrinol Metab **82**: 3771 - 3776.

Caron, P., I. Morange-Ramos, et al. (1997). "Three year follow-up of acromegalic patients treated with intramuscular slow-release landreotide." J Clin Endocrinol Metab **82**: 18 - 22.

Cattaneo, M., D. Amoroso, et al. (1996). "A somatostatin analogue inhibits MAP kinase activation and cell proliferation in human neoplasma and in human small cell lung carcinoma cell lines." FEBS Lett **397**: 164 - 168.

Chanson, P., J. Timsit, et al. (1993). "Clinical pharmacokinetics of octreotide. Therapeutic applications in patients with pituitary tumors." Clin pharmacokinetics **25**: 375 - 391.

Chesselet, M.-F., J.-J. Soghomonian, et al. (1995). "Anatomical localization and regulation of somatostatin gene expression in the basal ganglia and its clinical implications." In: Somatostatin and its receptors, Ciba Foundation Symposium 190, West Sussex, UK: Wiley: 51 - 64.

Cheung, N. and S. Boyages (1995). "Somatostatin-14 and its analog octreotide exert a cytostatic effect on GH3 rat pituitary tumor cell proliferation via a transient G0/G1 cell cycle block." Endocrinology **136**(10): 4174 - 4181.

Cimitan, M., A. Buonadonna, et al. (2003). "Somatostatin receptor scintigraphy versus chromogranin A assay in the management of patients with neuroendocrine tumors of different types: clinical role." Ann Oncol **14**(7): 1135 - 1141.

Cordelier, P., J. Esteve, et al. (1997). "Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5." Proc Natl Acad Sci USA **94**(17): 9343 - 9348.

Corleto, V., S. Nasoni, et al. (2004). "Somatostatin receptor subtypes: basic pharmacology and tissue distribution." Dig Liver Dis **36 (Suppl. 1)**: S8 - S16.

Corness, J., L. Demchyshyn, et al. (1993). "A human somatostatin receptor (SSTR-3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides." FEBS Lett **321**: 279 - 284.

Dalm, V., P. van Hagen, et al. (2004). "Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripheral tissues." Clin Endocrinol (Oxf) **60**(5): 625 - 629.

Day, R., W. Dong, et al. (1995). "Expression of mRNA for somatostatin receptor (sstr) types 2 and 5 in inividual rat pituitary cells. A double labeling in situ hybridization analysis." Endocinology **136**: 5232 - 5235.

de Herder, W., L. Hofland, et al. (2003). "Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours." Endocr Relat Cancer **10**(4): 451 - 458.

De Jong, M., R. Valkema, et al. (2002). "Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings." Semin Nucl Med **32**(2): 133 - 140.

De Lecea, L., J. Criado, et al. (1996). "A cortical neuropeptid with neuronal depressant and sleep-modulating properties." Nature **381**: 242 - 245.

De Weille, J., H. Schmid-Antomarchi, et al. (1989). "Regulation of ATP-sensitive K^+ channels in insulinoma cells: Activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP." Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2971 - 2975.

Demchyshyn, L., C. Skrikant, et al. (1993). "Cloning and expression of a human somatostatin-14 selective receptor variant (SSTR4) located on chromosome 20." Mol Pharmacol **43**: 894 - 901.

Djordjijevic, D., J. Zhang, et al. (1998). "Effect of 17 beta-estradiol on somatostatin receptor expression and inhibitory effects on growth hormone and prolactin release in rat pituitary cell cultures." Endocrinology **139**: 2272 - 2277.

Dohlman, H., J. Thorner, et al. (1991). "Model systems for the study of seven transmembrane segmant receptors." J Biol Chem **268**: 337 - 341.

Doi, M., T. Imai, et al. (2003). "Octreotide-sensitive ectopic ACTH production by islet cell carcinoma with multiple liver metastases." Endocr J **50**(2): 135 - 143.

Dournaud, P., H. Boudin, et al. (1998). "Interrelationsships between somatostatin SST2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain. Evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin." J Neurosci **18**: 1056 - 1071.

Dournaud, P., Y. Gu, et al. (1996). "Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific antipeptide antibody." Neuroscience **16**: 4468 - 4478.

Dubois, M. (1975). "Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas." Proc Natl Acad Sci USA **72**: 1340 - 1343.

El Ghamrawy, C., C. Rabourdin-Combe, et al. (1999). "sst5 somatostatin receptor mRNA induction by mitogenic activation of human T-lymphocytes." Peptides **20**: 305 - 311.

Elliot, D., A. Blum, et al. (1998). "Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines." J Immunol **160**: 3997 - 4003.

Elliot, D., A. Metwali, et al. (1994). "T-lymphocytes isolated from the hepatic granulomas of schistosome-infected mice express somatostatin receptor subtyp II (SSTR2) messenger RNA." J Immunol **153**: 1180 - 1186.

Epelbaum, J., P. Dournaud, et al. (1994). "The neurobiology of somatostatin." Crit Rev Neurobiol **8**: 25 - 44.

Evans, C., D. J. Keith, et al. (1992). "Cloning of a delta opioid receptor by functional expression." Science **158**: 1952 - 1955.

Ezzat, S., P. Snyder, et al. (1992). "Octreotide treatment of acromegaly: A randomized, multicenter study." Ann Intern Med **117**: 711 - 718.

Farooqi, S., J. Bevan, et al. (1999). "The therapeutic value of somatostatin and ist analogues." Pituitary **2**: 79 - 88.

Farthing, M. (1994). "Octreotide in the treatment of refractory diarrhoea and intestinal fistulae." Gut **35**: 5 - 10.

Fehlmann, D., D. Langenegger, et al. (2000). "Distribution and characterisation of somatostatin receptor mRNA and binding sites in the brain and periphery." J Physiol Paris **94**(3 - 4): 265 - 281.

Ferone, D., P. van Hagen, et al. (2000). "Physiological and pathophysiological role of somatostatin receptors in the human thymus." Eur J Endocrinol **143 (Suppl. 1)**: S27 - S34.

Ferone, D., P. van Hagen, et al. (1999). "In vitro characterization of somatostatin receptors in the human thymus and effects of somatostatin and octreotide on cultured thymic epithelial cells." Endocrinology **140**(1): 373 - 380.

Ferrari, S., M. Dondi, et al. (2003). "Somatostatin receptor (SSTR) scintigraphy in patients with osteosarcoma." Cancer Biother Radiopharm **18**(5): 847 - 851.

Finley, J., J. Maderdrut, et al. (1981). "The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system." Neuroscience **6**: 2173 - 2192.

Fjallskog, M., E. Ludvigsen, et al. (2003). "Expression of somatostatin receptor subtypes 1 to 5 in tumor tissue and intratumoral vessels in malignant endocrine pancreatic tumors." Med Oncol **20**(1): 59 - 67.

Flogstad, A., J. Halse, et al. (1997). "Sandostatin LAR in acromegalic patients: Longterm treatment." J Clin Endocrinol Metab **82**: 23 - 28.

Florio, T., C. Rim, et al. (1994). "The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells." Mol Endocrinol **8**: 1289 - 1297.

Florio, T., A. Scarziello, et al. (1996). "Somatostatin inhibits PC C13 thyroid cell proliferation through the modulation of phosphotyrosine phosphatase activity-impairmant of the somatostatinergic effects by stable expression of EIA viral oncogene." J Biol Chem **271**: 6129 - 6136.

Florio, T., S. Thellung, et al. (2000). "Somatostatin receptor 1 (SSTR1)-mediated inhibition of cell proliferation correlates with the activation of the MAP kinase cascade: role of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2." J Physiol Paris **94**(3 - 4): 239 - 250.

Florio, T., H. Yao, et al. (1999). "Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1)." Mol Endocrinol **13**: 24 - 37.

Frühwald, M., C. Rickert, et al. (2004). "Somatostatin receptor subtype 2 is expressed by supratentorial primitive neuroectodermal tumors of childhood and can be targeted for somatostatin receptor imaging." Clin Cancer Res **10**(9): 2997 - 3006.

Fujii, Y., T. Gonoi, et al. (1994). "Somatostatin receptor subtype SSTR2 mediates the inhibition of high voltage activated calcium channels by somatostatin and its analogue SMS201-995." FEBS Lett **355**: 117 - 120.

Gancel, A., P. Vuillermet, et al. (1994). "Effects of a slow-release formulation of the new somatostatin analogue landreotide in TSH-secreting pituitary adenomas." Clin Endocrinol **40**: 421 - 428.

Gether, U., T. Johansen, et al. (1993). "Binding epitopes for peptide and nonpeptide ligands on the NK1 (substance P) receptor." Regul Pep **46**: 49 - 58.

Giannetti, N., B. Horvat, et al. (1999). "Somatostatin-dependent adenylyl cyclase activity in non-activated and mitogen-activated human T-cells: evidence for uncoupling of sst3 receptor from adenylyl cyclase." J Cell Biochem **72**: 221 - 231.

Gillis, J., S. Noble, et al. (1997). "Octreotide long-acting release (LAR). A review of its pharmacological properties & therapeutic use in the management of acromegaly." Drugs **53**: 681 - 699.

Goodyer, C., S. Grigorakis, et al. (2004). "Developmental changes in the expression of somatostatin receptors (1-5) in the brain, hypothalamus, pituitary and spinal cord of the human fetus." Neuroscience **125**(2): 441 - 448.

Gottero, C., F. Prodam, et al. (2004). "Cortistatin-17 and -14 exert the same endocrine activities as somatostatin in humans." Growth Horm IGF Res **14**(5): 382 - 387.

Grace, C., L. Durrer, et al. (2005). "Somatostatin receptor 1 selective analogues: 4. Three-dimensional consensus structure by NMR." J Med Chem **48**(2): 523 - 533.

Grant, M., R. Patel, et al. (2004). "The role of subtype-specific ligand binding and the C-tail domain in dimer formation of human somatostatin receptors." J Biol Chem **279**(37): 38636 - 38643.

Grant, M., T. Wargovich, et al. (1994). "Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis." Circulation **89**: 1511 - 1517.

Greenwood, M., N. Hukovic, et al. (1997). "Ligand binding pocket of the human somatostatin receptor 5 (hSSTR5): Mutational analysis of the extracellular domains." Mol Pharmacol **52**: 807 - 814.

Greenwood, M., R. Panetta, et al. (1994). "Sequence analysis of the 5'-flanking promotor region of the human somatostatin receptor 5." Biochem Biophys Res Commun **205**: 1885 - 1890.

Greenwood, M., L. Robertson, et al. (1995). "Cloning of the gene encoding the human somatostatin receptor 2: sequence analysis of the 5' flanking promotor region." Gene **159**: 291 - 292.

Gu, Y. and A. Schonbrunn (1997). "Coupling specificity between somatostatin receptor sst2A and G proteins: Isolation of the receptor-G protein complex with a receptor antibody." Mol Endocrinol **11 (Suppl. 5)**: 527-537.

Hauser, F., W. Meyerhof, et al. (1994). "Sequence analysis of the promotor region of the rat somatostatin receptor subtype 1 gene." FEBS Lett **345**: 225 - 228.

Hayry, P., A. Raisanen, et al. (1993). "Somatostin analog Lanreotide inhibits myocyte replication and several growth factors in allograft arteriosclerosis." FASEB J **7**: 1055 - 1060.

Helboe, L., C. Stidsen, et al. (1998). "Immunohistochemical and cytochemical localization of the somatostatin receptor subtype sst1 in the somatostatinergic parvocellular neuronal system of the rat hypothalamus." J Neurosci **18**: 4938 - 4945.

Heron, I., F. Thomas, et al. (1993). "Pharmacokinetics and efficacy of a long acting formulation of the new somatostatin analog BIM 23014 in patients with acromegaly." J Clin Endocrinol Metab **76**: 721 - 727.

Hervieu, G. and P. Emson (1998). "The localization of somatostatin receptor 1 (sst1) immunoreactivity in the rat brain using an N-terminal specific antibody." Neuroscience **85**: 1263 - 1284.

Hierowski, M., C. Liebow, et al. (1985). "Stimulation by somatostatin of dephosphorylation of membrane proteins in pancreatic cancer Mia PaCA-2 cell line." FEBS Lett **179**: 252 - 256.

Hipkin, R., J. Friedman, et al. (1997). "Agonist-induced desensitization, internalization and phosphorylation of the sst_{2A} somatostatin receptor." J Biol Chem **27**: 13869 - 13876.

Hjorth, S., H. Schambye, et al. (1994). "Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT1 receptor." J Biol Chem **269**: 30953 - 30959.

Hofland, L., W. Breeman, et al. (1999). "Internalization of [DOTA^{o}, ^{125}I-Tyr^{3}] octreotide by somatostatin receptor-positive cells in vitro and in vivo: Implications for somatostatin receptor-targeted radioguided surgery." Proc Assoc Amer Phys **111**: 63 - 69.

Hofland, L. and S. Lamberts (2001). "Somatostatin receptor subtype expression in human tumors." Ann Oncol **12 (Suppl. 2)**: S31 - S36.

Hofland, L. and S. Lamberts (2003). "The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance." Endocr Rev **24**(1): 28 - 47.

Hofland, L. and S. Lamberts (2004). "Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy." Front Horm Res **32**: 235 - 252.

Hofland, L., P. Van Koetsveld, et al. (1995). "Internalization of the radioiodinated somatostatin analog [^{125}I-Tyr^{3}] octreotide by mouse and human pituitary tumor cells: Increase by unlabelled octreotide." Endocinology **136**: 3698 - 3706.

Hokfelt, Effendic, et al. (1975). "Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1 cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus." Acta Endocrinol **80 (Suppl. 200)**: 5 - 41.

Hoyer, D., G. Bell, et al. (1995). "Classification and nomenclature of somatostatin receptors." Trends Pharmacol Sci **16**: 86 - 88.

Hoyer, D., H. Lubbert, et al. (1994). "Molecular pharmacology of somatostatin receptors." Arch Pharmacol **350**: 441 - 453.

Hukovic, N., R. Panetta, et al. (1996). "Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation." Endocrinology **137**(9): 4046 - 4049.

Hukovic, N., R. Panetta, et al. (1998). "The cytoplasmatic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase, and in mediating desensitization and internalization." J Biol Chem **273**: 21416 - 21422.

Hukovic, N., M. Rocheville, et al. (1999). "Agonist-dependent up-regulation of human somatostatin receptor type 1 requires molecular signals in the cytoplasmic C-tail." J Biol Chem **274**(35): 24550 - 24558.

Hunyady, B., R. Hipkin, et al. (1997). "Immunhistochemical localization of somatostain receptor SSTR2A in the rat pancreas." Endocrinology **138**: 2632 - 2635.

Inkeda, S. and G. Schofield (1989). "Somatostatin blocks a calcium current in rat sympathetic ganglion neurons." J Physiol **409**: 221 - 240.

Iranmanesh, A., C. Bowers, et al. (2004). "Activation of somatostatin-receptor subtype-2/-5 suppresses the mass, frequency, and irregularity of growth hormone (GH)-releasing peptide-2-stimulated GH secretion in men." J Clin Endocrinol Metab **89**(9): 4581 - 4587.

James, R., V. Sarapura, et al. (1997). "Thyroid hormone induced expression of specific somatostatin receptor subtypes correlates with involution of the TtT-97 murine thyreotrope tumor." Endocrinology **138**(2): 719 - 724.

Janecka, A., M. Zubrzycka, et al. (2001). "Somatostatin analogs." J Peptide Res **58**: 91 - 107.

Joensuu, T., S. Nilsson, et al. (2004). "Phase I trial on sms-D70 somatostatin analogue in advanced prostate and renal cell cancer." Ann NY Acad Sci. **1028**: 361 - 374.

Johannson, O., T. Hokfelt, et al. (1984). "Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat." Neuroscience **13**: 265 - 339.

Johnson, M., H. Chowdrey, et al. (1994). "Pharmacokinetics and efficacy of the long acting somatostatin analogue somatuline in acromegaly." Eur J Endocrinol **130**: 229 - 234.

Jung, B., T. Nguyen, et al. (1997). "Discovery of a novel human G protein coupled receptor gene (GPR25) located on chromosome 1." Biochem Biophys Res Commun **230**: 69 - 72.

Karalis, K., G. Mastrorakos, et al. (1994). "Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo." J Clin Invest **93**: 2000 - 2006.

Karalis, K., G. Mastrorakos, et al. (1995). "Somatostatin may participate in the antiinflammatory actions of glucocorticoids." Endocrinology **136**: 4133 - 4138.

Kaupmann, K., C. Bruns, et al. (1995). "Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor." Embo J **14**: 727 - 735.

Kimura, N., S. Tomizawa, et al. (1998). "Chronic treatment with estrogen up-regulates expression of sst2 messenger ribonucleic acid (mRNA) but down-regulates expression of sst5 mRNA in rat pituitaries." Endocrinology **139**: 1573 - 1580.

Kleuss, C., J. Heschefeler, et al. (1991). "Assignment of G protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents." Nature **353**(3): 43 - 48.

Kluxen, F., C. Bruns, et al. (1992). "Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 4618 - 4622.

Koch, B. and A. Schonbrunn (1988). "Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells." J Biol Chem **263**: 226 - 234.

Komatsuzaki, K., Y. Murayama, et al. (1997). "A novel system that reports the G-proteins linked to a given receptor: A study of type 3 somatostatin receptor." FEBS Lett **406**: 165 - 170.

Komatsuzaki, K., K. Terashita, et al. (2001). "Somatostatin type V receptor activates c-Jun N-terminal kinases via Galpha(12) family G proteins." Biochem Biophys Res Commun **289**(5): 1211 - 1217.

Kong, H., A. DePaoli, et al. (1994). "Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2, and SSTR3 in adult rat brain: Analysis by RNA blotting and in situ hybridization histochemistry." Neuroscience **59 (Suppl. 1)**: 175 - 184.

Kowk, R., J. Lundblad, et al. (1994). "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB." Nature **370**: 223 - 226.

Krantic, S., I. Goddard, et al. (2004). "Novel modalities of somatostatin actions." Eur J Endocrinol **151**: 643 - 655.

Krempels, K., B. Hunyady, et al. (1997). "Distribution of somatostatin receptor messenger RNAs in the rat gastrointstinal tract." Gastroenterology **112**: 1948 - 1960.

Krenning, E., M. de Jong, et al. (1999). "Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy." Ann Oncol **10 (Suppl. 2)**: 23 - 29.

Krenning, E., D. Kwekkeboom, et al. (1993). "Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients." Eur J Nucl Med **20**(8): 716 - 731.

Krulich, L., A. Dhariwal, et al. (1968). "Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro." Endocrinology **83**(4): 783 - 790.

Kubota, A., Y. Yamada, et al. (1994). "Multiple effector coupling of somatostatin receptor subtype SSTR1." Biochem Biophys Res Commun **204**(1): 176 - 186.

Kumar, M., Z. Liu, et al. (2004). "Anti-angiogenic effects of somatostatin receptor subtype 2 on human pancreatic cancer xenografts." Carcinogenesis **25**(11): 2075 - 2081.

Kumar, U., D. Laird, et al. (1997). "Expression of the five somatostatin receptor (SSTR1-5) subtypes in rat pituitary somatotrophes: Quantitative analysis by double-label immunofluorence confocal microscopy." Endocrinology **138**: 4473 - 4476.

Kumar, U., X.-Y. Ong, et al. (1999). "Cellular expression of the five somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in rat hypothalamus: A comparative immunohistochemical analysis." Program Annual Meeting US Endocrine Society, San Diego, CA June 12-15(Submitted for publication.).

Kumar, U., S. Patel, et al. (1996). "Immunohistochemical distribution of the five somatostatin receptor (SSTR) subtype in the rat cerebral cortex." Program Annual Meeting Society For Neuroscience, November 16-21.

Kumar, U., R. Sasi, et al. (1999). "Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis." Diabetes **48**(1): 77 - 85.

Kvols, L., M. Buck, et al. (1987). "Treatment of metastatic islet cell carcinoma with a somatostatin analogue (SMS 201-995)." Ann Intern Med **107**: 162 - 168.

Kvols, L., C. Moertel, et al. (1986). "Treatment of the malignant carcinoid syndrome: Evaluation of a long-acting somatostatin analogue." N Engl J Med **315**: 663 - 666.

Kwekkeboom, D., J. Mueller-Brand, et al. (2005). "Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs." J Nucl Med **46 (Suppl. 1)**: 62S - 66S.

Lahlou, H., J. Guillermet, et al. (2004). "Molecular signaling of somatostatin receptors." Ann N Y Acad Sci **1014**: 121 - 131.

Lahlou, H., N. Saint-Laurent, et al. (2003). "sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation." J Biol Chem **278**(41): 39356 - 39371.

Lamberts, S. (1988). "The role of somatostatin in the regulation of anterior pituitary hormone secretion and the use of its analogs in the treatment of human pituitary tumors." Endocr Rev **9**: 417 - 436.

Lamberts, S., W. de Herder, et al. (2002). "Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer." Trends Endocrinol Metab **13**(10): 451 - 457.

Lamberts, S., W. de Herder, et al. (1994). "Editorial: A role of (labelled) somatostatin analogs in the differential diagnosis and treatment of Cushing's syndrome." J Clin Endocrinol Metab **78**: 17 - 19.

Lamberts, S., E. Krenning, et al. (1991). "The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors." Endocr Rev **12**: 450 - 482.

Lamberts, S., P. Uitterlinden, et al. (1988). "Therapy of acromegaly with sandostatin: The predictive value of an acute test, the value of serum somatostatin-C measurements in dose adjustment and the definition of a biochemical "cure"." Clin Endocrinol (Oxf) **29**: 411 - 420.

Lamberts, S., P. Uitterlinden, et al. (1985). "Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995." N Engl J Med **313**: 1576 - 1580.

Lamberts, S., A. van der Lely, et al. (1996). "Octreotide." N Engl J Med **334**: 246 - 254.

Lamberts, S., A. van der Lely, et al. (1996). "Somatostatin analogs: Future directions." Metabolism **45**: 104 - 106.

Lamberts, S., A.-J. Van Der Lely, et al. (1996). "Drug therapy: Octreotide." N Engl J Med **334**: 246 - 254.

Landau, D., Y. Segev, et al. (2001). "A novel somatostatin analogue prevents early renal complications in the nonobese diabetic mouse." Kidney International **60**: 505 - 512.

Larsson, L., N. Golterman, et al. (1979). "Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion." Science **205**: 1393 - 1395.

Le Romancer, M., Y. Cherifi, et al. (1996). "Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes in human and rat gastric mucosae." Life Sci **58**: 1091 - 1098.

Levite, M. (1998). "Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype." PNAS **95**: 12544 - 12549.

Lewis, I., W. Bauer, et al. (2003). "A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential." J Med Chem **46**(12): 2334 - 2344.

Li, X., M. Forte, et al. (1992). "Cloning and expression of a rat somatostatin receptor enriched in brain." J Biol Chem **267**: 21307 - 21312.

Lichtenauer-Kaligis, E., V. Dalm, et al. (2004). "Differential expression of somatostatin receptor subtypes in human peripheral blood mononuclear cell subsets." Eur J Endocrinol **150**(4): 565 - 577.

Liebow, C., C. Reilly, et al. (1989). "Somatostatin analogues inhibit growth of pancreatic cancer by stimulating tyrosine phosphstase." Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2003 - 2007.

Liu, Y., K. Jacobs, et al. (1994). "G protein specificity in receptor-effector coupling: Analysis of the roles of Go and Gi in GH4C1 pituitary cells." J Biol Chem **269**: 13880 - 13886.

Lloyd, K., S. Amirmoazzami, et al. (1997). "Somatostatin inhibits gastrin release and acid secretion by activating sst2 in dogs." Am J Physiol **272**: G1481 - G1488.

Lopez, F., J.-P. Esteve, et al. (1997). "The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signalling." J Biol Chem **272**: 24448 - 24454.

Loumaye, E. and K. Catt (1983). "Agonist-induced regulation of pituitary receptors for gonadotropin releasing hormone." J Biol Chem **258**: 12002 - 12009.

Ludvigsen, E., M. Stridsberg, et al. (2004). "Subtype selective interactions of somatostatin and somatostatin analogs with sst1, sst2, and sst5 in BON-1 cells." Med Oncol **21**(3): 285 - 295.

Luini, A. and M. de Matteis (1990). "Evidence that receptor-linked G protein inhibits exocytosis by a post-second messenger mechanism in AtT-20 cells." J Neurochem **54**: 30 - 38.

Lundqvist, M., J. Mark, et al. (1991). "Characterisation of a cell line (LCC-18) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma." Eur J Cancer **27**(12): 1663 - 1668.

Luthin, D., C. Eppler, et al. (1993). "Identification and quantification of Gi-type GTP-binding proteins that copurify with a pituitary somatostatin receptor." J Biol Chem **268**: 5990 - 5996.

Mandarino, L., D. Stenner, et al. (1981). "Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion." Nature **291**: 76 - 77.

Marin, P., J. Delumeau, et al. (1991). "Somatostatin potentiates the α_1-adrenergic activation of phospholipase C in striatal astrocytes through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate." Proc Natl Acad Sci USA **88**: 9016 - 9020.

Marks, N. and e. al (1975). "Inactivation of somatostatin (GH-RIH) and ist analogs by crude and partially purified rat brain extracts." FEBS Lett **55 (Suppl. 1)**: 220 - 224.

Martinez, V., A. Curi, et al. (1998). "High basal gastric acid secretion in somatostatin receptor subtyp 2 knockout mice." Gastroenterology **114**: 1125 - 1132.

Martinez-Ferrer, A., M. Boyano-Adanez, et al. (2000). "Diazepam attenuation of somatostatin binding and effect of somatostatin on accumulation of inositol 1,4,5-trisphosphate in the rat frontoparietal cortex." Neuropsychopharmacology **23**(2): 178 - 187.

McDonald, J., F. Greiner, et al. (1987). "Seperate cell types that express different forms of anglerfish islets can be immunohistochemically differentiated." J Histochem Cytochem **35**: 155 - 162.

Meko, J., G. Doherty, et al. (1996). "Evaluation of somatostatin-receptor scintigraphy for detecting neuroendocrine tumors." Surgery **120**(6): 975 - 983.

Melmed, S. (1993). "Medical management of acromegaly - What and when?" Acta Endocrinol **129**: 13 - 17.

Meriney, S., D. Gray, et al. (1994). "Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca^{2+} current modulated by cGMP-dependent protein kinase." Nature **369**: 336 - 339.

Meyerhof, W., I. Wulfsen, et al. (1992). "Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of a somatostatin-14 receptor in rat brain." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 10267 - 10271.

Mezey, E., B. Hunyady, et al. (1998). "Cell specific expression of the SSTR2A and SSTR5 somatostatin receptors in the rat anterior pituitary." Endocrinology **139**: 414 - 419.

Moller, L., C. Stidsen, et al. (2003). "Somatostatin receptors." Biochim Biophys Acta **1616**(1): 1 - 84.

Montminy, M., P. Brindle, et al. (1995). "Regulation of somatostatin gene transcription by cAMP." In: Somatostatin and its receptors, Ciba Foundation Symposium 190, West Sussex, UK: Wiley: 7 - 20.

Morel, G., P. Leroux, et al. (1985). "Ultrastructural autoradiographic localization of somatostatin-28 in the rat pituitary gland." Endocinology **116**: 1615 - 1620.

Mosdell, K. and J. Visconti (1994). "Emerging indications for Octreotide therapy, Part II." Am J Hosp Pharm **51**: 1317 - 1330.

Mosdell, K. and J. Visconti (1994). "Emerging indications for octreotide therapy." Am J Hosp Pharm **51**: 1184 - 1192.

Mundschenk, J., N. Unger, et al. (2003). "Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5150 - 5157.

Murray, R., K. Kim, et al. (2004). "The novel somatostatin ligand (SOM230) regulates human and rat anterior pituitary hormone secretion." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 3027 - 3032.

Murthy, K., D. Coy, et al. (1996). "Somatostatin receptor-mediated signalling in smooth muscle." J Biol Chem **271**: 23458 - 23463.

Nehring, R., W. Meyerhof, et al. (1995). "Aspartic acid residue 124 in the third transmembrane domain of the somatostatin receptor subtype 3 is essential for somatostatin-14 binding." DNA Cell Biol **14**: 939 - 944.

Ng, G., G. Varghese, et al. (1997). "Resistance of the dopamine D_{2L} receptor to desensitization accompanies the upregulation of receptors onto the surface of Sf9 cells." Endocrinology **138**: 4199 - 4206.

Nouel, D., G. Gaudriault, et al. (1997). "Differential internalization of somatostatin in COS-7 cells transfected with SST1 and SST2 receptor subtypes: A confocal microscopic study using novel fluorescent somatostatin derivates." Endocrinology **138**: 296 - 306.

Oberg, K. (2001). "Established clinical use of octreotide and landreotide in oncology." Chemotherapy **47**(2): 40 - 53.

Oberg, K. (2004). "Future Aspects of Somatostatin- Receptor-Mediated Therapy." Neuroendocrinology **80 (Suppl. 1)**: 57 - 61.

Oberg, K., L. Kvols, et al. (2004). "Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system." Ann Oncol **15**(6): 966 - 973.

O'Carrol, A. and K. Krempel (1995). "Widespread dirstribution of somatostatin receptor messenger ribunucleic acid in rat pituitary." Endocinology **136**: 5224 - 5227.

O'Carroll, A., S. Lolait, et al. (1992). "Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with perferential affinity for somatostatin-28." Mol Pharmacol **42**: 939 - 946.

Orlando, C., C. Raggi, et al. (2004). "Measurement of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in breast cancer and corresponding normal tissue." Endocr Relat Cancer **11**(2): 323 - 332.

Pagliacci, M., R. Tognellini, et al. (1991). "Inhibition of human breast cancer cell (MCF-7) growth in vitro by the somatostatin analog SMS201-995: Effects on cell cycle parameters and apoptoic cell death." Endocrinology **129**: 2555 - 2562.

Pan, M., T. Florio, et al. (1992). "G protein activation of a hormone-stimulated phosphtase in human tumor cells." Science **256**: 1215 - 1217.

Panetta, R., M. Greenwood, et al. (1994). "Molecular cloning, functional characterization and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28." Mol Pharmacol **45**: 417 - 427.

Panetta, R. and Y. Patel (1994). "Expression of mRNA for all 5 human somatostatin receptor (hSSTR1-5) in pituitary tumors." Life Sci **56**: 333 - 342.

Paran, D. and H. Paran (2003). "Somatostatin analogs in rheumatoid arthritis and other inflammatory and immune-mediated conditions." Curr Opin Investig Drugs **4**(5): 578 - 582.

Parekh, D., J. Ishizuka, et al. (1994). "Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion." Pancreas **9**(1): 83 - 90.

Park, S., J. Kamegai, et al. (2003). "Role of glucocorticoids in the regulation of pituitary somatostatin receptor subtype (sst1-sst5) mRNA levels: evidence for direct and somatostatin-mediated effects." Neuroendocrinology **78 (Suppl. 3)**: 163 - 175.

Patel, P., R. Barrie, et al. (1994). "Post receptor signal transduction mechanisms involved in octreotide induced inhibition of angiogenesis." Surgery **116**: 1148 - 1152.

Patel, R., U. Kumar, et al. (2002). "Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells." PNAS **99**: 3294 - 3299.

Patel, R., D. Lange, et al. (2002). "Photobleaching fluorescence resonance energy transfer reveals ligand-induced oligomer formation of human somatostatin receptor subtypes." Methods **27**: 340 - 348.

Patel, Y. (1992). "General aspects of the biology and function of somatostatin." Basic and Clinical Aspects of Neuroscience (Weil C, Muller EE, Thorner MO, Eds.), Berlin: Springer Verlag **4**: 1 - 16.

Patel, Y. (1997). "Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes." J Endocrinol Invest **20**: 348 - 367.

Patel, Y. (1999). "Somatostatin and its receptor family." Front Neuroendocrinol **20**(3): 157 - 198.

Patel, Y. and A. Galanopoulou (1995). "Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoproteases (in "Somatostatin and its receptors")." In: Somatostatin and its receptors, Ciba Foundation Symposium 190, West Sussex, UK: Wiley: 26 - 40.

Patel, Y., M. Greenwood, et al. (1993). "Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: Tissue selective distribution and cAMP regulation." Biochem Biophys Res Commun **198**: 605 - 612.

Patel, Y., M. Greenwood, et al. (1995). "The somatostatin receptor family." Life Sci **57**(13): 1249 - 1265.

Patel, Y., M. Greenwood, et al. (1995). "The somatostatin receptor family: A mini review." Life Sci **57**: 1249 - 1265.

Patel, Y., M. Greenwood, et al. (1994). "All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase." Biochem Biophys Res Commun **198**(2): 605 - 612.

Patel, Y., J. Liu, et al. (1999). "Production, action and degradation of somatostatin." In: Jefferson LS, Cherrington DN, Eds. "The Handbook of Physiology, The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism", New York: Oxford Univ. Press.

Patel, Y., K. Murthy, et al. (1990). "Mechanism of action of somatostatin: An overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins." Metabolism **39 (Suppl. 2)**: 63 - 69.

Patel, Y., R. Panetta, et al. (1994). "Expression of multiple somatostatin receptor genes in AtT-20 cells: Evidence for a novel somatostatin-28 selective receptor subtype." J Biol Chem **269**: 1506 - 1509.

Patel, Y. and S. Reichlin (1978). "Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain and peripheral tissues of the rat." Endocrinology **102**: 523 - 530.

Patel, Y. and C. Srikant (1994). "Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5)." Endocrinology **135**(6): 2814 - 2817.

Patel, Y. and C. Srikant (1997). "Somatostatin receptors." Trends Endocrinol Metab **8**: 398 - 405.

Patel YC, Liu JL, et al. (1999). "Production, action and degradation of somatostatin." In: Jefferson LS, Cherrington DN, Eds. "The Handbook of Physiology, The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism", New York: Oxford Univ. Press.

Pawlikowski, M. and G. Melen-Mucha (2003). "Perspectives of new potential therapeutic applications of somatostatin analogs." Neuro Endocrinol Lett **24**(1-2): 21 - 27.

Pawlikowski, M., H. Pisarek, et al. (2003). "Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes in "clinically nonfunctioning" pituitary adenomas." Endocr Pathol **14**(3): 231 - 238.

Petersenn, S., A. Rasch, et al. (2002). "Characterization of the human somatostatin receptor type 4 promoter." Mol Cell Endocrinol **188**(1 - 2): 75 - 83.

Pfeiffer, M., T. Koch, et al. (2001). "Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst3 receptor function by heterodimerization with sst2A." J Biol Chem **276**: 14027 - 14036.

Pfeiffer, M., T. Koch, et al. (2002). "Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization and desensitization." J Biol Chem **277**: 19762 - 19772.

Pradayrol, L., H. Jornvall, et al. (1980). "N-terminally extended somatostatin: The primary structure of Somatostatin 28." FEBS Lett **109**: 55 - 58.

Presky, D. and A. Schonbrunn (1988). "Somatostatin pertreatment increases the number of somatostatin receptors in GH4C1 pituitary cells and does not reduce cellular responsiveness to somatostatin." J Biol Chem **263**: 714 - 721.

Prinster, S., C. Hague, et al. (2005). "Heterodimerization of G Protein-Coupled Receptors: Specificity and Functional Significance." Pharmacol Rev **57**: 289 - 298.

Pscherer, A., U. Dorflinger, et al. (1996). "The helix-loop-helix transcription factor SEF2 regulates the activity of a novel initiator element in the promotor of the human somatostatin receptor II gene." Embo J **15**: 6680 - 6690.

Rauly, I., N. Saint-Laurent, et al. (1996). "Induction of a negative autocrine loop by expresion of Sst2 somatostatin receptor in NIH 3T3 cells." J Clin Invest **97**: 1874 - 1883.

Raynor, K., I. Lucki, et al. (1993). "Somatostatin 1 receptors in the nucleus accumbens selectively mediate the stimulatory effects of somatostatin on locomotor activity in rats." J Pharm Exp Ther **265**: 67 - 73.

Reardon, D., P. Dent, et al. (1997). "Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness." Mol Endocrinol **11**(8): 1062 - 1069.

Reardon, D., S. Wood, et al. (1996). "Activation of a protein tyrosine phosphatase and inactivation of Raf-1 by somatostatin." Biochem J **31**: 401 - 404.

Reichlin (1983). "Somatostatin." N Engl J Med **309**: 1495 - 1501, 1556 - 1563.

Reisine, T. and J. Axelrod (1983). "Prolonged somatostatin treatment desensitizes somatostatin's inhibition of receptor-mediated release of adrenocorticotropin hormone and sensitizes adenylate cyclase." Endocinology **113**: 811 - 813.

Reisine, T. and G. Bell (1995). "Molecular biology of somatostatin receptors." Endocr Rev **16**(4): 427 - 442.

Renstrom, E., W. Ding, et al. (1996). "Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting β cells by activation of calcineurin." Neuron **17**: 513 - 522.

Reschini, E., G. Giustina, et al. (1976). "Hyperthyroidism with elevated plasma TSH levels and pituitary tumor: Study with somatostatin." J Clin Endocrinol Metab **46**: 924 - 927.

Reubi, J. (2004). "Somatostatin and Other Peptide Receptors as Tools for Tumor Diagnosis and Treatment." Neuroendocrinology **80 (Suppl. 1)**: 51 - 56.

Reubi, J., K. Eisenwiener, et al. (2002). "A new peptidic somatostatin agonist with high affinity to all five somatostatin receptors." Eur J Pharmacol **456**(1 - 3): 45 - 49.

Reubi, J., U. Horisberger, et al. (1998). "Localization of receptors for vasoactive intestinal peptide, somatostatin and substance p in distinct compartments of human lymphoid organs." Blood **92**: 191 - 197.

Reubi, J., L. Kvols, et al. (1990). "Distribution of somatostatin receptors in nomal and tumor tissue." Metabolism **39**: 78 - 81.

Reubi, J., L. Kvols, et al. (1990). "Detection of somatostatin receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas." Cancer Res **50**: 5969 - 5977.

Reubi, J. and A. Landolt (1989). "The growth hormone responses to octreotide in acromegaly correlate with adenoma somatostatin receptor status." J Clin Endocrinol Metab **68**: 844 - 850.

Reubi, J., J. Schaer, et al. (1997). "Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance." Yale J Biol Med **70**(5 - 6): 471 - 479.

Reubi, J. and B. Waser (2003). "Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(5): 781 - 793.

Reubi, J., B. Waser, et al. (1993). "Somatostatin (SRIH) messenger ribunucleic acid expresseion in human neuroendocrine and brain tumors using in situ hybridization histochemistry: Comparison with SRIH receptor content." J Clin Endocrinol Metab **76**: 642 - 647.

Rivier, J., D. Kirby, et al. (2005). "Somatostatin receptor 1 selective analogues: 3. Dicyclic peptides." J Med Chem **48**(2): 515 - 522.

Rocheville, M., N. Hukovic, et al. (1998). "Functional dimerization of the human somatostatin receptor subtype 5 (hSSTR5)." Program Annual Meeting US Endocrine Society, New Orleans, 1998(115 [Abstract OR46-6]).

Rocheville, M., D. Lange, et al. (2000). "Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity." Science **288**: 154 - 157.

Rocheville, M., D. Lange, et al. (2000). "Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers." J Biol Chem **275**: 7862 - 7869.

Rohrer, L., F. Raulf, et al. (1993). "Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor." Proc Natl Acad Sci USA **90**: 4196 - 4200.

Rohrer, S., E. Birzin, et al. (1998). "Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry." Science **282**: 737 - 740.

Rohrer, S. and J. Schaeffer (2000). "Identification and characterization of subtype selective somatostatin receptor agonists." J Physiol Paris **94**(3 - 4): 211 - 215.

Roosterman, D., G. Glassmeier, et al. (1998). "A somatostatin receptor 1 selective ligand inhibits Ca^{2+} currents in rat insulinoma 1046-38 cells." FEBS Lett **425**: 137 - 140.

Roth, A., H. Kreienkamp, et al. (1997). "Phosphorylation of four amino acid residues in the carboxyl terminus of the rat somatostatin receptor subtyp 3 is crucial for its desensitization and internalization." J Biol Chem **38**: 23769 - 23774.

Roth, A., H. Kreienkamp, et al. (1997). "Endocytosis of the rat somatostatin receptors - Subtype discrimination, ligand specifity and delineation of carboxyterminal positive and negative sequence motifs." DNA Cell Biol **16**: 111 - 119.

Sasi, R., L. Puebla, et al. (1998). "Polymorphism in the 5' flanking region of he human somatostatin receptor type 5 (hSSTR5)." Gene **214**: 45 - 49.

Saveanu, A., G. Gunz, et al. (2001). "BIM 23244, a somatostatin receptor subtype 2 and 5 selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas." J Clin Endocrinol Metab **86**: 140 - 145.

Saveanu, A., E. Lavaque, et al. (2002). "Demonstration of enhanced potency of a chimeric somatostatin-dopamine molecule, BIM 23A387, in suppressing growth hormone and prolactin secretion from human pituitary somatotroph adenoma cells." J Clin Endocrinol Metab **87**: 5545 - 5552.

Scarborough, D., S. Lee, et al. (1989). "Interleukin-1ß stimulates somatostatin biosynthesis in primary cultures of fetal rat brain." Endocinology **124**: 549 - 551.

Scarpignato, C. and I. Pelosini (2001). "Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview." Chemotherapy **47 (Suppl. 2)**: 1 - 29.

Scherubl, H., J. Hescheler, et al. (1993). "Molecular mechanisms of somatostatin's inhibition of hormone release: participation of voltage-gated calcium channels and G-proteins." Horm Metab Res Suppl **27**: 1 - 4.

Schindler, M., P. Humphrey, et al. (1996). "Somatostatin receptors in the central nervous system." Prog Neurobiol **50**(1): 9 - 47.

Schonbrunn, A. and A. J. Tashjian (1978). "Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture." J Biol Chem **253**: 6473 - 6483.

Schwartz, T. and M. Rosenkilde (1996). "Is there a lock for all agonist keys in 7 TM receptors." TIPS **17**: 213 - 216.

Schweitzer, R., S. Madamba, et al. (1990). "Arachidonic acid metabolites as mediator of somatostatin-induced increase of neuronal M-current." Nature **346**: 464 - 466.

Seboek, D., P. Linscheid, et al. (2004). "Somatostatin is expressed and secreted by human adipose tissue upon infection and inflammation." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 4833 - 4839.

Senogles, S. (1994). "The D2 dopamine receptor isoforms signal through distinct Gi alpha proteins to inhibit adenylyl cyclase. A study with site-directed mutant Gi alpha proteins." J Biol Chem **269**(37): 23120 - 23127.

Sharma, K., Y. Patel, et al. (1999). "C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and Gi cell cycle arrest." Mol Endocrinol **13**: 82 - 90.

Sharma, K., Y. Patel, et al. (1996). "Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3." Mol Endocrinol **10**(12): 1688 - 1696.

Sharma, K. and C. Srikant (1998). "G protein coupled receptor signaled apoptosis is associated with activation of a cation insensitive acidic endonuclease and intrcellular acidification." Biochem Biophys Res Commun **242**: 134 - 140.

Sharma, K. and C. Srikant (1998). "Induction of wild type p53, bax and acidic endonuclease during somatosatin signaled apoptosis in MCF-7 breast cancer cells." Int J Cancer **76**: 259 - 266.

Shimon, I. (2003). "Somatostatin receptors in pituitary and development of somatostatin receptor subtype-selective analogs." Endocrine **20**(3): 265 - 269.

Shimon, I., J. Taylor, et al. (1997). "Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary culture." J Clin Invest **99**: 789 - 798.

Sims, S., B. Lussier, et al. (1991). "Somatostatin activates an inwardly rectifying K^+ conductance in freshly dispersed rat somatotrophes." J Physiol **441**: 615 - 637.

Smith, M., J. Liu, et al. (2000). "OctreoTher: ongoing early clinical development of a somatostatin-receptor-targeted radionuclide antineoplastic therapy." Digestion **62 (Suppl. 1)**: 69 - 72.

Smitha, M., M. Maggi, et al. (2004). "Somatostatin receptors in non-endocrine tumours." Dig Liver Dis **36 (Suppl. 1)**: S78 - S85.

Srikant, C. (1995). "Cell cycle dependent induction of a apoptosis by somatostatin analog SMS201-995 in AtT-20 mouse pituitary tumor cells." Biochem Biophys Res Commun **209**: 400 - 407.

Srikant, C., K. Murthy, et al. (1992). "Photoaffinity labelling of the somatostatin receptor: Identification of molecular subtypes." Endocinology **130**: 2937 - 2946.

Srikant, C. and Y. Patel (1981). "Receptor binding of somatostatin-28 is tissue specific." Nature **294**: 259 - 260.

Srikant, C. and S. Shen (1996). "Octapeptide somatostatin analog SMS 201-995 induces translocation of intracellular PTP1C to membranes in MCF-7 human breast cancer adenocarcinoma cells." Endocinology **137**: 3461 - 3468.

Stafford, N., L. Condon, et al. (2004). "The immunohistochemical localisation of somatostatin receptors 1, 2, 3, and 5 in acoustic neuromas." J Clin Pathol **57**(2): 168 - 171.

Strader, C., T. Fong, et al. (1995). "The family of G protein coupled receptors." FASEB J **9**: 745 - 754.

Sullivan, S. and A. Schonbrunn (1988). "Distribution of somatostatin receptors in RINm5F insulinoma cells." Endocrinology **122**: 1137 - 1145.

Sung, J., S. Chung, et al. (1993). "Octreotide infusion or emergency sclerotherapy for variceal haemorrhage." Lancet **342**: 637 - 641.

Szepeshazi, K., A. Schally, et al. (2003). "Preclinical evaluation of therapeutic effects of targeted cytotoxic analogs of somatostatin and bombesin on human gastric carcinomas." Cancer **98**(7): 1401 - 1410.

Takaki, R., J. Ono, et al. (1986). "Isolation of glucagon-secreting cell lines by cloning insulinoma cells." In Vitro Cell Dev Biol **22**(3 (Pt. 1)): 120 - 126.

Takeba, Y., N. Suzuki, et al. (1997). "Modulation of synovial cell function by somatostatin in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheumatism **40**: 2128 - 2138.

Tallent, M. and T. Reisine (1992). "Gi alpha 1 selectivity couples somatostatin receptors to andenylyl cyclase in pituitary-derived AtT-20 cells." Mol Pharmacol **41**: 452 - 455.

Taylor, J. and D. Coy (1997). "The receptor pharmacology of somatostatin agonists and antagonists: Implications for clinical utility." J Endocrinol Invest **20 (Suppl. 7)**: 8 - 10.

Thomas, R., B. Holt, et al. (1992). "Longterm agonist exposure induces upregulation of β3-adrenergic receptor expression via multiple cAMP response elements." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 4490 - 4494.

Thoss, V., J. Perez, et al. (1995). "Embryonic and postnatal mRNA ditribution of five somatostatin receptor subtypes in the rat brain." Neuropharmacology **34**: 1673 - 1688.

Thoss, V., J. Perez, et al. (1996). "Expression of five somatostatin receptor mRNAs in the human brain and pituitary." Arch Pharmacol **354**: 411 - 419.

Tostivini, H., I. Likrmann, et al. (1996). "Occurrence of two somatostatin variants in the frog brain: Characterization of the cDNAs, distribution of the mRNAs and receptor-binding affinities of the peptides." Proc Natl Acad Sci USA **93**: 12605 - 12610.

Tran, V., M. Beal, et al. (1985). "Two types of somatostatin receptors differentiated by cyclic somatostatin analogs." Science **228**: 492 - 495.

Tsuzaki, S. and A. Moses (1990). "Somatostatin inhibits deoxyribunucleic acid sythesis induced by both thyrotropin and insulin-like growth factor I in FRTL5 cells." Endocrinology **126**: 3131 - 3138.

Valenzuela, J., T. Schubert, et al. (1989). "A multicenter, randomized, double-blind trial of somatostatin in the management of acute haemorrhage from esophageal varices." Hepatology **10**: 958 - 961.

van der Hoek, J., L. Hofland, et al. (2005). "Novel subtype specific and universal somatostatin analogues: clinical potential and pitfalls." Curr Pharm Des **11**(12): 1573 - 1592.

van der Hoek, J., M. Waaijers, et al. (2005). "Distinct functional properties of native Somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **In print progress**.

van Hagen, P., G. Baarsma, et al. (2000). "Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases." Eur J Endocrinol **143 (Suppl. 1)**: S43 - S51.

Vanetti, M., M. Kouba, et al. (1992). "Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B)." FEBS Lett **311**: 290 - 294.

Veber, D., R. Saperstein, et al. (1984). "A superactive cyclic hexapeptide analog of somatostatin." Life Sci **34**: 1371 - 1378.

Viana, F. and B. Hille (1996). "Modulation of high voltage-activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons." J Neurosci **16**: 6000 - 6011.

Vidal, C., I. Rauly, et al. (1994). "Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells." Mol Pharmacol **46**: 97 - 104.

Viguerie, N., N. Tahiri-Jouti, et al. (1989). "Direct inhibitory effects of a somatostatin analog, SMS201-995, on AR4-2J cell proliferation via pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate-binding protein-independent mechanism." Endocrinology **124**: 1017 - 1025.

Visser-Wisselaar, H., C. Van Uffelen, et al. (1997). "17 estradiol dependent regulation of somatostatin receptor expression in the 7315 b prolactin secreting rat pituitary tumor in vitro and in vivo." Endocrinology **138**: 1180 - 1189.

Wang, H., C. Bogen, et al. (1989). "Somatostatin-14 and somatostatin-28 induce opposite effects on potassium currents in rat neocortical neurons." Proc Natl Acad Sci USA **86**: 9616 - 9620.

Warner, R. and T. O'dorisio (2002). "Radiolabeled peptides in diagnosis and tumor imaging: clinical overview." Semin Nucl Med **32**(2): 79 - 83.

Weckbecker, G., U. Briner, et al. (2002). "SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs." Endocrinology **143**(10): 4123 - 4130.

Weckbecker, G., F. Raulf, et al. (1993). "Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer." Pharmacol Ther **60**(2): 245 - 264.

Weckbecker, G., L. Tolcsvai, et al. (1994). "Somatostatin analogue octreotide enhances the antineoplastic effects of tamoxifen and ovariectomy on 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene-induced rat mammary carcinomas." Cancer Res **54**(24): 6334 - 6337.

Weinstock, J. and D. Elliott (1998). "The substance P and somatostatin interferon-gamma immunoregulatory circuit." Ann N Y Acad Sci **840**: 532 - 539.

Weiss, R., A. Reddi, et al. (1981). "Somatostatin can locally inhibit proliferation and differentiation of cartilage and bone precursor cells." Calcif Tissue Int **33**: 425 - 430.

White, R., A. Schonbrunn, et al. (1991). "Somatostatin stimulates Ca^{2+}-activated K^{+} channels through protein dephosphorylisation." Nature **351**: 570 - 573.

Wilkinson, G., M. Feniuk, et al. (1997). "Characterization of human recombinant somatostatin sst5 receptors mediating activation of phosphoionositide metabolism." Br J Pharmacol **121**: 91 - 96.

Wollheim, C., B. Winiger, et al. (1990). "Somatostatin inhibition of hormone release: Effects on cytosolic Cal' and interference with distal secretory events." Metabolism **39 (Suppl. 11)**: 101 - 104.

Wulbrand, U., M. Feldman, et al. (2002). "A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes." Cancer **94 (Suppl. 4)**: 1293 - 1297.

Wyndick, D., J. Anderson, et al. (1989). "Resistance to metastatic pancreatic tumors after long-term treatment with the somatostatin analogue octreotide (SMS 201-995)." Clin Endocrinol (Oxf) **30**: 385 - 388.

Xu, Y., M. Berelowitz, et al. (1995). "Characterization of the proximal region of the rat somatostatin receptor gene, SSTR4." Biochem Biophys Res Commun **206**: 935 - 941.

Xu, Y., M. Berelowitz, et al. (1995). "Dexamethasone regulates somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in rat pituitary GH_4C_1 cells." Endocrinology **136**: 5070 - 5075.

Xu, Y., M. Berelowitz, et al. (1998). "Characterization of the promotor region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen responsiveness." Mol Cell Endocrinol **139**: 71-77.

Xu, Y., M. Berelowitz, et al. (1998). "Characterization of the promotor region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness." Mol Cell Endocrinol **139**: 71 - 77.

Yamada, Y., S. Post, et al. (1992). "Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract and kidney." Proc Natl Acad Sci USA **89**: 251 - 255.

Yamada, Y., T. Reisine, et al. (1992). "Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase." Mol Endocrinol **6**(12): 2136 - 2142.

Yang, L., S. Berk, et al. (1998). "Synthesis and biological activities of potent peptidomimetics selective for somatostatin receptor subtype 2." Proc Natl Acad Sci USA **95**(18): 10836 - 10841.

Yasuda, K., S. Rens-Domiano, et al. (1992). "Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenyl cyclase." J Biol Chem **1992**: 20422 - 20428.

Yoshitomi, H., Y. Fujii, et al. (1997). "Involvement of MAP kinase and cfos signalling in the inhibition of cell growth by somatostatin." Am J Physiol Endocrinol Metab **35**: E769 - E774.

Zatelli, M., D. Piccin, et al. (2004). "Evidence for differential effects of selective somatostatin receptor subtype agonists on alpha-subunit and chromogranin a secretion and on cell viability in human nonfunctioning pituitary adenomas in vitro." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5181 - 5188.

Zeggari, M., J.-P. Esteve, et al. (1994). "Copurification of a protein tyrosine phosphatase with activated somatostatin receptors from rat pancreatic acinar membranes." Biochem J **303**: 441 - 448.

Zheng, H., A. Bailey, et al. (1997). "Somatostatin receptor subtype 2 knock out mice are refractory to growth hormone negative feedback on arcuate neurons." Mol Endocrinol **11**: 1709 - 1717.

Zhu, L., K. Krempels, et al. (1998). "The localisation of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptors 1, 2, and 3 in rat testes." Endocinology **139**: 350 - 357.

8 Verzeichnis der Abbildungen:

Abbildung 1: Peptidsequenz des humanen SST-Vorläufers Preprosomatostatin, aus dem nach Abspaltung der Signalsequenz der eigentliche Vorläufer Prosomatostatin wird. Dunkel markiert ist die Position der mono- bzw. dibasischen Prozessierungsstelle, die zu SST-14 bzw. SST-28 führt (Reisine and Bell 1995). 1–10

Abbildung 2: Aminosäuresequenz des beim Menschen gefundene Cortistatin-17 (Patel 1999) 1–11

Abbildung 3: Darstellung der bekannten Produkte des Prosomatostatins, einschließlich der Positionen zur enzymatischen Spaltung (Patel and Galanopoulou 1995). 1–15

Abbildung 4: Peptidsequenz der beiden humanen SST-Varianten. Hervorgehoben ist jeweils der Teil der Sequenz, der für die biologische Aktivität entscheidend ist. Dabei gelten das Trp in Pos. 8 und das Lys in Pos. 9 als essenziell, wogegen das Phe^{7} und das Thr^{10} geringgradig verändert werden können (z. B. Phe in Tyr bzw. Thr in Ser oder auch Val) (Patel 1999)..... 1–16

Abbildung 5: Potentielle Prozessierungsstellen der unspezifischen Proteasen beim Abbau des SST-14 (Scarpignato and Pelosini 2001). 1–16

Abbildung 6: Schematische Darstellung des alternativen Varianten des Maus SSTR2 nach Splicing und die Länge der jeweiligen Aminosäuresequenz (Reisine and Bell 1995). 1–22

Abbildung 7: Modell zur Darstellung der Struktur der Aminosäuresequenz in der Plasmamembran am Beispiel des humanen SSTR2 (Reisine and Bell 1995)..... 1–22

Abbildung 8: Chromosomlokalisation und Länge der Aminosäuresequenz der humanen SSTR (Reisine and Bell 1995)..... 1–23

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Koppelung eines typischen GPCR an die intrazelluläre Signaltransduktion (Behr, Kann et al. 2003). 1–34

Abbildung 10: Beispiele für Rezeptoroligomerisation – links die Homodimerisation zweier Somatostatinrezeptoren sowie rechts die Heterodimerisation eines Somatostatinrezeptors und eines anderen Vertreters der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Krantic, Goddard et al. 2004). 1–39

Abbildung 11: Schematische Darstellung der SSTR-vermittelten Inhibition der zellulären Sekretion (Patel 1999). 1–40

Abbildung 12: Schematische Darstellung der zu Proliferationsstop bzw. Apoptose führenden SSTR-Wirkung, ausgehend von der PTP (Patel 1999; Lahlou, Saint-Laurent et al. 2003). 1–42

Abbildung 13: Vergleich der Rezeptor-typischen Profile für die Internalisation nach Kurzzeitexposition mit einem Agonisten und Hochregulation bei chronischer Exposition (Hukovic, Panetta et al. 1996). 1–46

Abbildung 14: Effekte verschiedener Mediatoren auf die intrazelluläre mRNA-Konzentration des SST und seiner Rezeptoren (Patel 1999) 1–49

Abbildung 15: Darstellung der immunhistochemischen Verteilung der SSTR-Subtypen auf humanen Inselzellen (Kumar, Sasi et al. 1999) 1–52

Abbildung 16: Typische Peptidanaloga des Somatostatins. Octreotide (SMS 201-995), Lanreotide (BIM 23014), Vapreotide (RC-160) und Steglitide (MK-678) mit Darstellung des für die Stabilisierung des ß-Turns nötigen Verbindung (Janecka, Zubrzycka et al. 2001). 1–55

Abbildung 17: Struktur des neuen Somatostatinanalogon SOM230 (Lewis, Bauer et al. 2003) 1–55

Abbildung 18: Struktur der rezeptorselektiven nicht-Peptid-Agonisten der Somatostatinrezeptoren. Von links oben nach rechts unten entspricht die Selektivität des Moleküls dem jeweiligen Rezeptorsubtyp SSTR1, -2, -3, -4 bzw. -5 (Janecka, Zubrzycka et al. 2001). 1–56

Abbildung 19: Der rezeptorselektive Antagonist PRL 2970 bindet an den SSTR2. Er stellt den bis dato potentesten Antagonisten dar, der bisher synthetisiert werden konnte (Janecka, Zubrzycka et al. 2001). 1–57

Abbildung 20: Hauptcharakteristiken und führende Symptome neuroendokriner Tumoren (Arnold, Simon et al. 2000) 1–60

Abbildung 21: Beispiel eines Somatostatinrezeptor-Szintigrams eines Patienten mit einem metastasierten neuroendokrinen Pankreastumor. Die linke Bildhälft zeigt dabei die a.p.-, die rechte die p.a.-Aufnahme. 1–65

Abbildung 22: 3D-Strukturformel des cAMP (links) und des Forskolin (rechts). Datenquelle: www.chemfinder.cambridgesoft.com 3–78

Abbildung 23: Standardbelegung der 96-Well-Platte des Biotrak Enzymeimmunoassay RPN225 für die Analyse des intracellulären cAMP-Spiegels. "B"=Background, "NSB"=Non-specific-binding, "0 - 3200"=entsprechende Wells für die Standardkonzentrationen, "S"=Sample. Aus den Herstellerinstruktionen (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003) 3–80

Abbildung 24: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs (Herstellerinformationen auf www.amersham.com, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003) 3–81

Abbildung 25: Funktionsprinzip des verwendeten cAMP-EIA- Kit nach den Herstellerinstruktionen (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003) 3–82

Abbildung 26: Empfohlene graphische Darstellung der Standards gemäß der Herstelleranweisung. (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 2003) 3–83

Abbildung 27: Darstellung des zur transienten Transfektion benutzte pGL2 Vektor. Oben erkennt man die Ampicillinresistenz, unten das Luciferasegen und rechtsseitig der Insertionsbereich mit den zugehörigen Restriktionsendonukleasen. Darstellung gemäß Herstellerinformationen (Promega, Mannheim, Deutschland) 3–84

Abbildung 28: Beispielklone und INR1-G9-Kontrolle der Screeningphase. Im Falle der rezeptortragenden Klone [hierbei gilt: cS1 E19 = SSTR1-tragend, cS3 21 = SSTR3-tragend, S4 8 = SSTR4-tragend] sieht man ein gutes Verdrängungsverhalten (ca. 30-50% maximal), im Gegensatz zur nicht-rezeptortragenden Negativ-Kontrolle pTRE (<10% maximal). Die natürliche Positiv-Kontrolle G9 weist hier eine exzellente Verdrängung von ca. 70% maximal auf. Alle hier aufgeführten stabil transfizierten Zellklone gingen in die Mischklone des jeweiligen Rezeptors mit ein..... 4–92

Abbildung 29: Vergleich der Ergebnisse der Rate of Displacement (ROD) mehrerer Versuchstage für den SSTR1-tragenden Zellklone c S1E22. Aufgezeigt sind die Verdrängungswerte in %, die sich aus der Reduktion der gemessenen Aktivität an den entsprechenden Meßpunkten im Vergleich zum Leerwert errechnet. Dieser Zellklon ging als Bestandteil des SSTR1-Mischklones in die Untersuchungen des Hauptversuches ein. 4–93

Abbildung 30: SST-14-Bindungsanalyse an SSTR1-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–95

Abbildung 31: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-14 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR1 [Mischklon] und c S1 4 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen. Gut sichtbar dabei die Unterschiede zwischen den rezeptortragenden Zellen und der rezeptorlosen pTRE-Kontrolle. 4–96

Abbildung 32: SST-14-Bindungsanalyse an SSTR3-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–97

Abbildung 33: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-14 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR3-tragenden Klonen SSTR3 [Mischklon] und c S3 22 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen..... 4–97

Abbildung 34: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-14 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR4-tragenden Klonen SSTR4 [Mischklon] und c S4 19 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen. Gut sichtbar sind die hohen ROD-Werte im Vergleich zu denen der Positiv-Kontrolle G9. Die SSTR4-tragenden Klone des Hauptversuches zeigen im Vergleich zu den SSTR1- und den SSTR3-tragenden Zellen die höchsten Verdrängungsraten..... 4–98

Abbildung 35: SST-14-Bindungsanalyse an SSTR4-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–98

Abbildung 36: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-28 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR1 [Mischklon] und c S1 4 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen..... 4–99

Abbildung 37: SST-28-Bindungsanalyse an SSTR1-tragenden Zellen, der G9-Positiv - und der pTRE-Negativkontrolle. 4–100

Abbildung 38: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-28 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR3 [Mischklon] und c S3 22 [Einzelklon]. Gleichermaßen dargestellt sind die Mittelwerte der RODs der mitgeführten Kontrollen.....4–100

Abbildung 39: SST-28-Bindungsanalyse an SSTR3-tragenden Klonen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–101

Abbildung 40: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für SST-28 an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR4-tragenden Klonen SSTR4 [Mischklon] und c S4 19 [Einzelklon].....4–101

Abbildung 41: SST-28-Bindungsanalyse an SSTR4-tragenden Klonen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–102

Abbildung 42: Poly-SST-Bindungsanalyse an SSTR1-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–103

Abbildung 43: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für Poly-SST an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR1-tragenden Klonen SSTR1 [Mischklon] und c S1 4 [Einzelklon]. Es ist ein deutlicher Unterschied zu den entsprechenden Darstellungen der Ergebnisse mit den physiologischen Liganden zu erkennen. Unterhalb einer Poly-SST-Konzentration von 1,00E-06 mol/l kann nicht mehr von einer verläßlichen Verdrängung ausgegangen werden. Auch die mittleren RODs der Positivkontrolle G9 erscheinen im Verhältnis zu den Werten mit physiologischen Liganden auffallend reduziert. 4–104

Abbildung 44: Poly-SST-Bindungsanalyse an SSTR3-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–105

Abbildung 45: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für Poly-SST an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR3-tragenden Klonen SSTR3 [Mischklon] und c S3 22 [Einzelklon]. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zu den entsprechenden Darstellungen der Ergebnisse mit den physiologischen Liganden zu erkennen. 4–105

Abbildung 46: Poly-SST-Bindungsanalyse an SSTR-4-tragenden Zellen, der G9-Positiv- und der pTRE-Negativkontrolle. 4–106

Abbildung 47: Grafische Darstellung der ROD-Mittelwerte für Poly-SST an den, in den Hauptversuchen untersuchten SSTR4-tragenden Klonen SSTR4 [Mischklon] und c S4 19 [Einzelklon]. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zu den entsprechenden Darstellungen der Ergebnisse mit den physiologischen Liganden zu erkennen. 4–107

Abbildung 48: Darstellung der Ergebnisse eines cAMP-EIA am SSTR1-tragenden Einzelklon c S1 4. Gut zu sehen ist die konzentrationssteigernde Wirkung des Forskolin gegenüber dem Basalwert „0" sowie die konzentrationsabhängige Reduktion der cAMP-Spiegel durch SST-14. 4–108

Abbildung 49: cAMP-EIA mit SST-14 an SSTR1-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–109

Abbildung 50: cAMP-EIA mit SST-14 an SSTR3-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–110

Abbildung 51: cAMP-EIA mit SST-14 an SSTR4-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–111

Abbildung 52: cAMP-EIA mit SST-28 an SSTR1-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–112

Abbildung 53: cAMP-EIA mit SST-28 an SSTR3-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–112

Abbildung 54: cAMP-EIA mit SST-28 an SSTR4-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–113

Abbildung 55: cAMP-EIA mit Poly-SST an SSTR1-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–114

Abbildung 56: cAMP-EIA mit Poly-SST an SSTR3-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–114

Abbildung 57: cAMP-EIA mit Poly-SST an SSTR4-tragenden Klonen und der G9-Positivkontrolle.....4–115

Abbildung 58: Chromogranin A-Promotor-Studie mit Untersuchung der SSTR-Subtyp-tragenden Mischklone, der pTRE-Negativ- und der BON-Positivkontrolle.....4–117

Abbildung 59: Aufbau des pTet-On Expressionsvektors mit Darstellung der möglichen Schnittstellen sowie der zugehörigen Restriktionsendonukleasen. Unten ist die Ampicillin- und links die Neomycinresistenz zu sehen. Darstellung gemäß Vektordatenbank der Internetpräsenz der Fa. Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/catabc.shtml).....10–161

Abbildung 60: Aufbau des pTRE-Vektors mit Darstellung der möglichen Schnittstellen sowie der zugehörigen Restriktionsendonukleasen. Darstellung gemäß Vektordatenbank der Internetpräsenz der Fa. Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/catabc.shtml).....10–162

Abbildung 61: Funktionsprinzip des Tet-On Systems in Abhängigkeit von Doxycyclin (hier mit DOX bezeichnet). Darstellung gemäß Benutzermanual (Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/index.shtml)).....10–162

Abbildung 62: Aufbau des pTK-Hyg Vektors, der die Hygromycin B-Resistenz vermittelt. Diese ist auf der unteren Seite der Darstellung zu sehen. Informationen gemäß Vektordatenbank der Internetpräsenz der Fa. Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/catabc.shtml).....10–163

Abbildung 63: Zusammenfassende Darstellung des Prinzips der durchgeführten doppelt-stabilen Transfektion. Darstellung gemäß Benutzermanual (Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/index.shtml)).....10–163

9 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

3D	dreidimensional
5-HIES	5-Hydroxyindolessigsäure
7TM	sieben transmembran
(V/V)	Volumen pro Volumen; Volumenprozent
(W/V)	Gewicht pro Volumen; Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µ	mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADC	Adenokarzinom
ADH	Anti-Diuretisches Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
APUD	amine precurser uptake and decarboxylation
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin / bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
CCK	Cholecystokinin
cDNA	komplementäre DNA
CgA	Chromogranin A
cpm	counts per minute
CRH	Corticotropin releasing hormon
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylebaminotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
FCS	fetal calve serum (Fötales Kälber Serum)

fmol	femto-molar
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm
GH	Growth hormone (Wachstumshormon/Somatotropin)
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HITES	Hydrokortisol, Insulin, Transferrin, Estradiol, Selen (LCC-18-Medium)
hSSTR	humaner Somatostatinrezeptor
In	Indium
ICT	Islet Cell Tumor
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.v.	intravenös
kD	Kilo Dalton (Molekulargewicht)
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
M	molar
m	Meter, milli
MAPK	mitogen aktivierende Proteinkinase
µ	Micro = 10^{-6}
min	Minute
mol	molar
mRNA	Messenger-RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomographie
NCI	National Cancer Institut
neg.	negativ
NET	neuroendokriner Tumor
nM	nano Mol
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Posphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pos.	positiv

RLU	relative light unit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROD	Rate of displacement = Verdrängungsrate
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
sec	Sekunde
SMS	Somatostatin
SMSR	Somatostatinrezeptor
SPECT	Single Photon Emission Computer Tomographie
SRIF	Somatotropine release inhibitory factor = Somatostatin
SRS	Somatostatin Rezeptor Subtype
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
TRH	Thyroitropin releasing hormon
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
t-RNA	Translations-RNA
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
U	Einheit enzymatischer Aktivität
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	ultravioltettes Licht
V.a.	Verdacht auf
v.a.	vor allem
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

10 Anhang:

10.1 Erläuterung: Generierung stabil transfizierter SSTR-Subtyp-Klone

Die Klonierungsarbeiten zur Entwicklung der stabil transfizierten SSTR-Subtyp-Klone fand innerhalb unserer Arbeitsgruppe unter maßgeblicher Führung von Herrn Dr. Ulrich Wulbrand statt (Wulbrand, Feldman et al. 2002). Die Klone wurden mir zur weiteren Analyse des Systems zur Verfügung gestellt. Da die hierbei gewonnenen Zellklone der Somatostatinrezeptoren 1, 3 und 4 Gegenstand des eigentlichen Themas sind, soll ihre Entwicklung mittels des Expressionsvektorsystems pTet-On (Clontech, Palo Alto, USA) nach dem Prinzip der doppelt stabilen Transfektion hier an dieser Stelle kurz erläutert werden.

10.1.1 Entwicklung der SSTR-Gene exprimierenden LCC-18-Klone

Im Vorgehen analog zu den Angaben des Herstellerprotokolls des Expressionsvektorsystems pTet-On (Clontech, Palo Alto, USA) wurden zunächst LCC-18-Klone hergestellt, die lediglich das Regulatorplasmid pTet-On als sogenannten Leervektor stabil exprimierten. Die Transfektion wurde mit dem Perfect Lipid pFX-3 Transfection Kit (Invitrogen, San Diego, USA) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.
Als Selektionsfaktor diente hierbei die im Plasmid enthaltene Neomycinresistenz, die dem, dem Zellkulturmedium beigemischten G418 (400 µg/ml) entgegenwirkte.

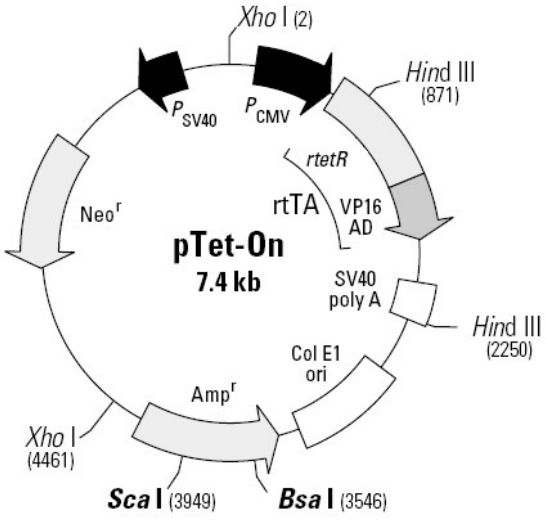

Abbildung 59: Aufbau des pTet-On Expressionsvektors mit Darstellung der möglichen Schnittstellen sowie der zugehörigen Restriktionsendonukleasen. Unten ist die Ampicillin- und links die Neomycinresistenz zu sehen. Darstellung gemäß Vektordatenbank der Internetpräsenz der Fa. Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/catabc.shtml)

Basierend auf den mit dem pTet-On-Expressionssystem stabil transfizierten Klonen, wurde der zweite Transfektionsschritt durchgeführt. Vorraussetzung hierbei war die Auswahl eines Klones mit hoher pTet-On-Aktivität bei gleichzeitig niedrigem Background.
Im zweiten Transfektionsschritt wurden, ebenfalls über das Perfect Lipid pFX-3 Transfection Kit, die ausgewählten pTet-On-tragenden Klone mit den SSTR-cDNA-tragenden Vektoren sowie einer Hygromycin B-vermittelnden Resistenz versehen. Als Plasmid zur Einschleusung der jeweiligen SSTR-cDNA-Sequenz diente dabei das doxycyclinabhängige Reportergen-Konstrukt pTRE (Clontech, Palo Alto, USA), welches nach Insertion der cDNA-Sequenz in E. coli amplifiziert worden war.

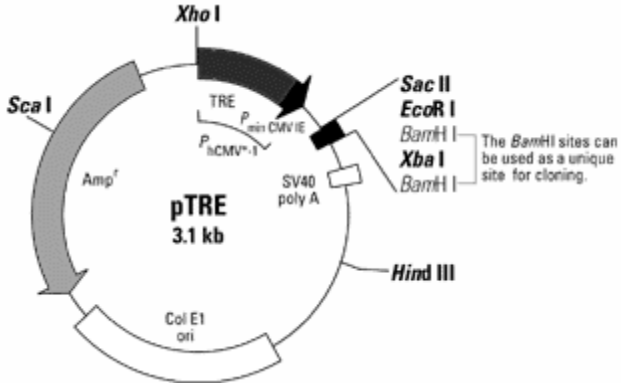

Abbildung 60: Aufbau des pTRE-Vektors mit Darstellung der möglichen Schnittstellen sowie der zugehörigen Restriktionsendonukleasen. Darstellung gemäß Vektordatenbank der Internetpräsenz der Fa. Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/catabc.shtml)

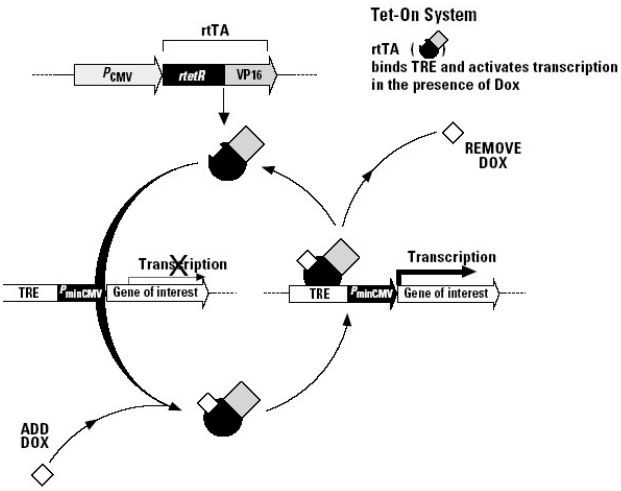

Abbildung 61: Funktionsprinzip des Tet-On Systems in Abhängigkeit von Doxycyclin (hier mit DOX bezeichnet). Darstellung gemäß Benutzermanual (Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/index.shtml))

Die Einbringung der Hygromycin-B-Resistenz erfolgte simultan mittels des pTK-Hyg-Plasmids (Clontech, Palo Alto, USA) und diente als Selektionsmittel für die Klone nach dem 2. Transfektionsschritt, deren Medium fortan mit Hygromycin B in einer Konzentration von 200 µg/ml versehen war.

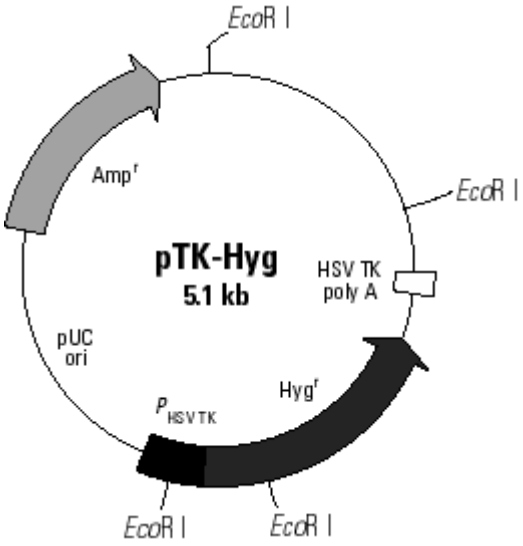

Abbildung 62: Aufbau des pTK-Hyg Vektors, der die Hygromycin B-Resistenz vermittelt. Diese ist auf der unteren Seite der Darstellung zu sehen. Informationen gemäß Vektordatenbank der Internetpräsenz der Fa. Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/catabc.shtml)

Klone, die nach dem 2. Transfektionsschritt gut im G418- und Hygromycin-B-haltigem Selektionsmedium wuchsen, wurden im weiteren Verlauf durch RT-PCR und Restriktionsanalysen auf Vorhandensein des Expressionssystems der jeweiligen SSTR-Subtypen getestet.

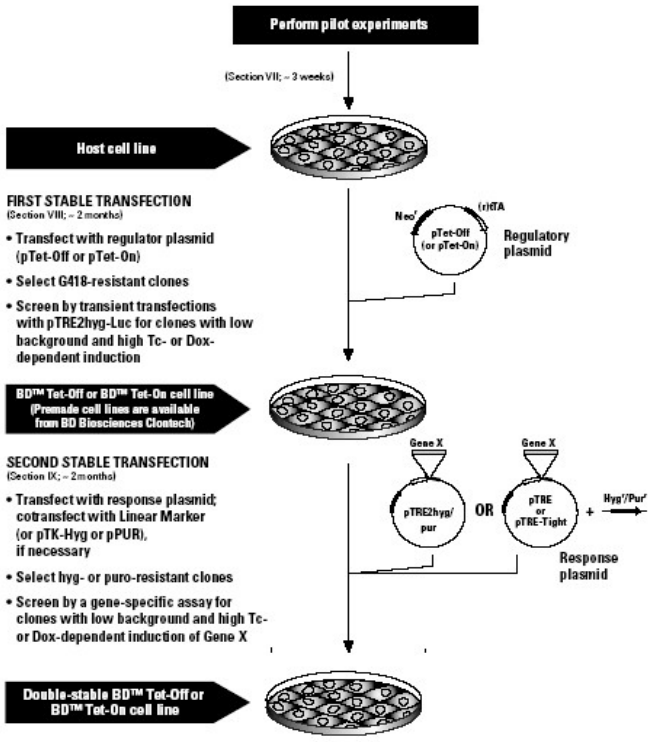

Abbildung 63: Zusammenfassende Darstellung des Prinzips der durchgeführten doppelt-stabilen Transfektion. Darstellung gemäß Benutzermanual (Clontech, Palo Alto, USA (http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/index.shtml))

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass auf diese Weise ein System eingerichtet wurde, welches es ermöglicht, durch Zugabe von Doxycyclin eine Expression der jeweiligen SSTR-cDNA mit hoher Aktivität zu erreichen.

Zur Aktivierung des Systems wurde einheitlich eine Vorbehandlung der Zellklone mit Doxycyclin-haltigem Selektionsmedium (2 µg Doxycyclin pro ml Medium) über einen Zeitraum von zwei Tagen gewählt.

10.1.2 Erstellung der Plasmide zur stabilen Transfektion

Die gesamte kodierende Sequenz der fünf humanen Somatostatinrezeptoren wurde unserer Arbeitsgruppe in Form von Cytomegalie-Virus-Plasmiden freundlicherweise durch Herrn Dr. F. Raulf (ehemals Sandoz, jetzt Novartis Pharma, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die spezifischen Sequenzen basierten auf folgenden Codenummern der EMBL-Datenbank (DKFZ, Heidelberg, Deutschland):

M81829	SSTR1
M81830	SSTR2
M96738	SSTR3
L07833	SSTR4
D16827	SSTR5

Die Plasmide sind wie folgt benannt:

pRc/CMV-srs1
pRc/CMV-srs2
pRc/CMV-srs3
pRc/CMV-srs4
pRc/CMV-srs5

Zur eigentlichen Klonierung wurde die folgenden PCR-Primer genutzt, die eine Einrichtung einer EcoRI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer XbaI-Schnittstelle am 3'-Ende ermöglichten.

SSTR-Subtyp	Primersequenz
1	3’ cccgaattcgggtgcgcgaggagaaagccc 5’ tcctctagagagcccctgcgtggcccgggc
2	3’ cccgaattcggtgagaataagatctctgggc 5’ tcctctagacttggttctttcccacccc
3	3’ cccgaattcgctgtttttccttcccccaggc 5’ tcctctagagccatcctggctttccccaggccc
4	3’ cccgaattcgcagcgctagctccgccgcgc 5’ tcctctagagggtgggtaggggaagggc
5	3’ cccgaattccgtcctcccttcttctccttgcag 5’ tcctctagactcctgggggtgacacggggc

Für die PCR wurden dem Reaktionsansatz eines jeden Primerpaares 5% DMSO zugemischt. Es folgten nur zwanzig Zyklen mit einer eingestellten Anlagerungstemperatur von 63°C und einer als Vorlage (Template) eingesetzten Menge Plasmid-DNA von 1µg.
Nach Amplifikation der PCR-Produkte folgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und XbaI und eine Auftrennung mittels Horizontalgelelektrophorese.
Nach Auftrennung der Produkte im Agarosegel wurden die Banden ausgeschnitten und mittels des QIAEX Agarosegel Extraktion Protokolls (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Zeitgleich wurde ebenfalls das Expressionsplasmid pTRE (Clontech, Palo Alto, USA) einem Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und XbaI unterzogen und in gleicher Weise aufgereinigt. Im letzten Schritt folgte schließlich eine Insertion der SSTR-cDNA in die geöffneten pTRE-Sequenzen durch Ligation bei 16°C über Nacht mit Hilfe des DNA Ligation Kit (Stratagene, USA) gemäß des Herstellerprotokolls.
Bewusst wurde neben den fünf SSTR-cDNA-enthaltenden pTRE-Plasmiden ebenfalls SSTR-cDNA-freies pTRE-Plasmid zur Schaffung einer Negativ-Kontrolle, neben der in allen Versuchen zur Kontrolle immer mitgeführten Linie nicht-transfizierter LCC-18-Zellen, zur stabilen Transfektion eingesetzt. Diese mit SSTR-cDNA-freiem pTRE-Plasmid transfizierten LCC-18-Zellen wurden mit pTRE (Leervektor) benannt.

10.1.3 Erste Identifikation positiver Klone

Noch im Rahmen der Vorarbeiten, die schließlich zu dieser Arbeit führten, erfolgte der erste Nachweis der erfolgreichen stabilen Transfektion und der grundsätzlichen Funktion des Expressionskonstruktes durch den Nachweis SSTR-Gen-spezifischen cDNA nach Amplifikation durch PCR (Polymerase Chain Reaction). Die cDNA wurde durch RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) der durch die Doxycyclin-aktivierte Genexpression entstandenen RNA gewonnen und dann einer informativen Restriktionsanalyse unterzogen. Diese Kontrolluntersuchung wurde je Zellklon einmalig durchgeführt. Sie diente als Beweis dafür, dass auch wirklich die amplifizierte cDNA mit der Sequenz der genomischen DNA übereinstimmt. Das Prinzip der informativen Restriktionsanalyse basiert auf der Möglichkeit, eine bekanntes DNA-Stück mittels Restriktionsendonukleasen, deren Schnittpunktsequenz bekannt ist, „geplant" zu schneiden. Das bedeutet, es wird in der Nukleotidkette des DNA-Stücks bewusst nach einer Schnittstelle gesucht, nach deren Sequenz die zugehörige Endonuklease gefunden werden kann. Somit ist bereits vor der Analyse die Größe der DNA-Fragmente bekannt, die später durch Horizontalgelelektrophorese nachgewiesen werden können.
Als Reaktionsansatz diente ein Gemisch aus 10 µl der amplifizierten cDNA mit 2 µl eines von der einzusetzenden Restriktionsendonuklease abhängigen Reaktionspuffer sowie 5 IU des entsprechenden Enzyms. Dieses Gemisch wurde vor Inkubation bei 37°C über Nacht mit autoklaviertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 20 µl pro Reaktionsgefäß aufgefüllt. Am folgenden Tag wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Verwendete Enzyme, die zugehörigen Puffer, Schnittsequenzen und Fragmente:

SSTR1:	HpaI	NEBuffer 4	GGT^AAC	911 bp/298 bp
	BfaI	NEBuffer 4	C^THG	860 bp/299 bp/50 bp
SSTR3:	FokI	NEBuffer 4	$GGATG(N)_9$^	161 bp/60 bp
	AciI	NEBuffer 3	C^CGC	140 bp/81 bp
SSTR4:	SalI	NEBuffer 3	G^TCGAC	481 bp/147 bp
	PstI	NEBuffer 3	CTGCA^G	399 bp/229 bp
ß-Aktin:	BsmfI	NEBuffer 4	$GGGAC(N)_{10}$^	312 bp/247 bp/219 bp
	XcmI	NEBuffer 2	$CCA(N)_5$^$(N)_4TCC$	525 bp/174 bp/79 bp

Klone, die sich durch die informative Restriktionsanalyse als Träger des eingefügten Konstruktes erwiesen, wurden in die Vorversuche dieser Arbeit aufgenommen. Diese umfassten zunächst umfangreiche Bindungsstudien zur Ermittlung der für die Hauptversuche geeigneten Zellklone wie unter Punkt.

10.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Feldmann
Vorname:	Martin Jörg Walter
Geburtsdatum:	29.06.1975
Geburtsort:	Frankfurt am Main
Familienstand:	verheiratet
Ehefrau:	Feldmann, Nina, geb. Gajowiec
	Geboren am 10.07.1975 in Bytom, Polen
	Beruf: Fachkrankenschwester für Intensivpflege
Tochter:	Feldmann, Gesa Lilith
	Geboren am 01.01.2006 in Duisburg
Eltern:	Feldmann, Heinrich Volkmar
	Geboren am 26.11.1943 in Frankfurt am Main
	Verstorben am 14.09.1999
	Beruf: Diplombetriebswirt
	Feldmann, Ingrid, geb. Straka
	Geboren am 13.01.1944 in Frankfurt am Main
	Beruf: Diplombetriebswirtin
Geschwister:	Feldmann, Matthias
	Geboren am 09.09.1964 in Frankfurt am Main
	Beruf: Jurist

Ausbildung:

Schule:

Grundschule:	1981 - 1985	Grundschule Rüsselsheim - Königstädten
Gymnasium:	1985 - 1994	Gymnasium Philippinum, Marburg Abschluss mit der allg. Hochschulreife

Zivildienst:

	1994 - 1995	DRK KV Marburg, Rettungsdienst, mit Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium:

	1995 - 2002	Philipps-Universität Marburg, Medizinische Fakultät
		Famulaturen Innere (Hämatologie/Onkologie; Uni-Mbg) Innere (Endokrinologie; Uni-Mbg) Allgemeinchirurgie (DKH-Mbg) Nuklearmedizin (Uni-Mbg) Radiologie (Uni-Mbg) Traumatologie (Praxis; Mbg) Anästhesie/Intensivmedizin (Uni-Mbg) Innere (Diabetologie/Praxis; Mbg)
	Herbst 2000	Hospitation Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York City, NY, USA (Abteilung für Nuklearmedizin/medizinische Physik)
	April 2001 - März 2002	Praktisches Jahr: Innere (je 2 Monate Hämatologie/Onkologie und Pneumologie), Chirurgie (je 2 Monate Traumatologie/ Plastische Chirurgie und Allgemeinchirurgie /Endokrine Chirurgie), MKG (4 Monate)

Weitere Ausbildung:

Oktober 2002 - März 2004	AiP-Zeit in der Abteilung für Anästhesiologie, Intensiv- und Notfallmedizin am Klinikum Fulda (Direktor: Prof. Dr. R. Dölp)
Februar 2004	Fachkundenachweis Rettungsdienst
Seit Mai 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Essen (Direktor: Prof. Dr. J. Peters)

Wissenschaft:

Seitprojekt I:	WS 2000/01 - SS 2001	Thema „A novel somatostatin conjugate with a high affinitiy to all five somatostatin receptor subtypes" (Uniklinik Marburg, Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Gastroenterologie/ Endokrinologie; Karolinska Institute, Cancer Center Karolinska, Stockholm, Sweden; MAP Medical Technologies OY, Tikkakoski, Finnland)
	12.10.2000 - 14.10.2000	Vorstellung der Ergebnisse: „Eighth Conference on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer", Princeton, NJ, USA (siehe Cancer, Volume 94, Issue S4, 2002. Pages: 1293 - 1297, Supplement: Eighth Conference on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer)
Seitprojekt II:	Herbst 2000	Mitarbeit an initialen Laborstudien zur Entwicklung eines neuen Radio-Markers („^{66}Ga-DOTATOC") zur Verbesserung der Nachweisbarkeit SSTR-tragender Tumore im PET-Scan (am Sloan-Kettering Institute NYC, NY, USA)

Beschäftigungsverhältnisse:

Oktober 1995 - Oktober 1997	DRK KV Marburg, Rettungsdienst, Anstellung als studentische Teilzeitkraft in Funktion eines Rettungssanitäters auf RTW/NEF
November 1997 - November 2000	Marburger Krankenpflege Team gGmbH, als Tochtergesellschaft der DRK gGmbH Mittelhessen, Rettungsdienst, als studentische Teilzeitkraft in Funktion eines Rettungssanitäters auf RTW/NEF
August 1998 - Februar 1999	Schlafmedizinisches Labor, als studentische Hilfskraft in Funktion eines „Nachtmessers" (Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Pneumologie, Schwerpunkt Schlafmedizin)
Seit Februar 2004	Freiberufliche Tätigkeit als Notarzt am Marien-Hospital Mülheim/Ruhr
Seit Oktober 2004	Freiberufliche Tätigkeit als Notarzt am Philippus-Stift Essen
Seit April 2006	Mitarbeit im Ausbildungsteam der ADAC-Luftrettung für den Bereich „Intensivtransport", Schwerpunkt „Simulation - MedSim" am Standort Flughafen Münster/Osnabrück

10.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Philipps-Universität Marburg:

Arnold, R.; Aumüller, G.; Austermann, K. H.; Basler, H.-D.; Baum, E.; Barth, P.; Beato, M.; Behr, T.M.; Bertalanffy, H.; Bolm, G.; Christiansen, H.; Czubayko, F.; Daut, J.; Doss, M. O.; Engel, P.; Fehmann, H.C.; Feuser, B.; Fruhstorfer, H.; Gemsa, D.; Geus, A.; Görg, C.; Gotzen, L.; Gressner, A. M.; Griss, P.; Gröne, H.-J.; Grzeschick, K. H.; Gudermann, T.; Habermehl, A.; Happle, R.; Hasilik, A.; Hesse, L.; Hellinger, A.; Hofmann, R.; Joseph, K.; Jungclas, H.; Katschinski, M.; Kern, H. F.; Klenk, H.-D.; Klose, K. J.; Koolman, J.; Kretschmer, V.; Krieg, J.-C.; Krause, W.; Kroll, P.; Kuni, H.; Lammel, E.; Lang, R. E.; Lange, H.; Lennartz, H.; Leppek, R.; Maisch, B.; Moosdorf, R.; Mueller, U.; Mutters, R.; Neubauer, A.; Oertel, W. H.; Reichardt, C.; Remschmidt, H.; Richter, G.; Röhm, K.-H.; Rothmund, M.; Schachtschabel, D.-O.; Schäfer, H.; Schneider, J.; Schüffel, W.; Schulz, K.-D.; Schwarz, R. T.; Seitz, J.; Seyberth, H.; Slenczka, W.; Sommer, N.; Steiniger, B.; Sturm, G.; Suske, G.; Töllner, U.; Vohland, H.-W.; Voigt, K.; von Wichert, P.; Weihe, E.; Werner, J. A.; Westermann, R.; Wolf, M.

Memorial-Sloan-Kettering Cancer Center, New York:

Humm, J.; Larson, S.

10.4 Publikationen, Vorträge und Poster

Publikation:

A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes. Wulbrand U., Feldman M., Pfestroff A., Fehman H.C.† , Du J., Hiltunen J., Marquez M., Arnold R., Westlin J.E., Nilsson S., Holmberg A. R.
Cancer, Vol.94, Sup.4, 1293-7, Feb 15, 2002.

Vortrag:

Etablierung eines humanen Systems zur Analyse der Somatostatin-Rezeptor-Subtypen 1-5.
Pfestroff A., Feldmann M., Wulbrand U., Fehmann H.C.†, Arnold R., Holmberg A., Behr T.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 2.-5. April 2003, Essen.

Poster:

Characterisation of the five somatostatin receptor subtypes in a human model.
Pfestroff A., Feldman M., Wulbrand U., Fehman H.C.†, Arnold R., Behr T.
Jahrestagung der European Association Of Nuclear Medicine, 23.-27.August 2003, Amsterdam.

10.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Etablierung eines humanen Modellsystems zur funktionellen Analyse der Somatostatinrezeptoren Typ 1, Typ 3 und Typ 4 in der humanen Karzinoid Zell-Linie LCC-18" in der Klinischen Forschergruppe Gastroenterologie am Zentrum für Innere Medizin an der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H.C. Fehmann und nach dessen Tode unter Leitung von Prof. Dr. R. Göke ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, im August 2006

Martin Feldmann

10.6 Danksagung

Meine ganze Dankbarkeit gebührt an dieser Stelle all denen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Es gilt daher meinen herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. Hans Christoph Fehmann und, nach dessen frühen und tragischen Tod, Herrn Prof. Dr. Rüdiger Göke für die Überlassung des Themas und die Unterstützung, Herrn Dr. Ulrich Wulbrand für die exzellente Einarbeitung in die biochemischen Methoden, die wissenschaftlichen Diskussionen und Tipps, Frau PD Dr. Brigitte Lankat-Buttgereit für die intensive Unterstützung im Rahmen der Überarbeitung und Korrektur der Arbeit, Herrn Andreas Pfestroff für die konstruktive Zusammenarbeit, Frau Kathleen Dörsch, Frau Dr. Petra Staats und Herrn Harald Schmidt für die wertvollen Einblicke in Ihren Erfahrungsschatz, der DFG, deren Mittel die Arbeit in der Klinischen Forschergruppe ermöglichten, meiner Familie und Freunden, sowie all denjenigen, die ich hier nicht namentlich aufführen konnte, deren Unterstützung jedoch von existenzieller Wichtigkeit war, auszusprechen.