

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg.

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

Klinik für Innere Medizin; SP Gastroenterologie/Stoffwechsel/Endokrinologie

Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

Expressionsmusteranalyse der 5 Somatostatinrezeptor-Subtypen in humanen Tumorzelllinien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin



Hansjörg Aust
Marburg/Lahn 2003

Ernst zu nehmende Forschung
erkennt man daran,
daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher
nur eines gegeben hat.

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)



Aus dem Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg.
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold
Klinik für Innere Medizin; SP Gastroenterologie/Stoffwechsel/Endokrinologie
Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

Expressionsmusteranalyse
der 5 Somatostatinrezeptor-Subtypen in
humanen Tumorzelllinien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Hansjörg Aust
aus Karl-Marx-Stadt

Marburg/Lahn 2003

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am: 24. Juli 2003

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: PD Dr. Ch. Fehmann
Korreferent: Prof. Dr. Eilers

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	<u>12</u>
1.1	Allgemeiner Teil	12
1.1.1	Das Problem Krebs	12
1.1.2	Krebs- eine teilautonome, bösartige Neubildung	13
1.2	Spezieller Teil	14
1.2.1	Somatostatin –das Hormon	14
1.2.1.1	Somatostatin – die Effekte	16
1.2.1.2	Somatostatin – die Sekretion	17
1.2.2	Somatostatinrezeptoren [SSTR]	18
1.2.2.1	SSTR - allgemeiner Bau und Funktion	19
1.2.2.1.1	Identität der Aminosäure-Sequenzen bei SSTR	21
1.2.2.2	SSTR – intrazelluläre Effekte	21
1.2.2.2.1	intrazelluläre Kopplung der SST-Rezeptoren	24
1.2.2.3	SSTR - Regulation der Rezeptoren	25
1.2.2.3.1	Rezeptor-Expression	26
1.2.2.3.2	Rezeptor-Gen-Expression (RGE)	27
1.2.2.3.2.1	Bekannte Expressionen von SSTR1-5 in humanem Gewebe und in Zelllinien	27
1.2.3	Somatostatinanaloga	28
1.2.3.1	Auswahl natürlicher und synthetischer Peptid- und non-Peptidagonisten der SST-Rezeptor- familie mit Überblick ihrer Bindungseigenschaften	30
1.3	Aufgabenstellung	31
1.3.1	Erläuterung zur Aufgabenstellung	31
2	<u>Material und Methoden</u>	<u>32</u>

2.1	Zelllinien	32
2.1.1	Zelllinien in eigener Kultur	32
2.1.1.1	Zellkultur	33
2.1.2	Zelllinien anderer Labore	35
2.2	Grundlagen	37
2.2.1	DNA – DesoxyRiboNucleinAcid.	37
2.2.2	RNA – RiboNucleinAcid	38
2.3	RNA – Präparation	39
2.3.1	RNAzol – Präparation	39
2.3.2	RNA-Präparation nach Qiagen	40
2.3.3	RT [Reverse Transcriptase]–PCR-Methode und Anlage einer cDNA–Sammlung	41
2.3.3.1	RT-PCR-Reaktion	42
2.3.3.1.1	RT-PCR-Ansatz 1fach mit vorgeschaltetem DNase-Verdau:	43
2.3.3.2	RT-PCR-Grundprogramm mit DNase-Verdau	43
2.3.3.3	Anlage einer cDNA-Sammlung	44
2.3.4	cDNA – Check mit β -Actin – PCR	44
2.3.4.1	β -Actin – PCR	45
2.4	Hauptversuch	45
2.4.1	PCR - Technik	45
2.4.2	PCR – Reaktion	46
2.4.2.1	Optimierung	47
2.4.2.2	PCR-Grundprogramm:	48
2.4.2.3	PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 1	48
2.4.2.4	PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 2	49
2.4.2.5	PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 3	49
2.4.2.6	PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 4	50
2.4.2.7	PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 5 Primerpaar (1) – kurzes Fragment Primerpaar (2) – langes Fragment	50
2.4.3	Agarosegele	51

2.4.4	Ergebnisskontrolle über informative Restriktionsanalyse	52
2.4.4.1	Restriktionsanalyse für die einzelnen Somatostatinrezeptoren	53
2.4.4.1.1	Tabelle V Übersicht Restriktionsanalyse	53
3	<u>Ergebnisse</u>	<u>55</u>
3.1	Allgemeine tabellarische Ergebnisübersicht:	55
3.2	Einzelergebnisse	59
4	<u>Diskussion</u>	<u>66</u>
4.1	Fehlerquellen	66
4.1.1	Interpretierbarkeit	66
4.1.2	Zellen	66
4.1.3	Systemische und Systematische Fehler	66
4.1.4	RNAse	67
4.1.5	residuale genomische DNA	67
4.2	Hauptversuch in kritischer Betrachtung	68
4.3	Ergebnisse im Kontext	69
4.4	Zusammenfassung	73
5	<u>Tabellen und Lösungen</u>	<u>75</u>
5.1	Zelllinien - Charakterisierung und Herkunft	75
5.1.1	Tabelle VII Zelllinien: 103H, H661, U-1810, 97TM1, H23, DMS79, 510A	76
5.1.2	Tabelle VIII Zelllinien H1092, H146, H187, H526, H60, H69, H82, H841, 24H	77
5.1.3	Tabelle IX Zelllinien 86M1, 272H, A549, H125, EPLC-32M1, H157, H596	78

5.1.4	Tabelle X Zelllinien U-1752, MCF-7, MFM-223, T-47D, Colo-320, CX-1, HT-29, SW-403, ASPC-1	79
5.1.5	Tabelle XI Zelllinien Capan-2, H-Paf-2, MiaPaCa-2, PaTu-8902, PaTu-8988s, PaTu-8988t, PC II	80
5.1.6	Tabelle XII Zelllinien PC 44, PC III, HEC-1-A, EFO-21, EFO-27, NIH-Ovar-3, SK:Ovar-3, MSTO-211H	81
5.1.7	Tabelle XIII Zelllinien Bon-1, LCC-18, LN-18, PATHO II, Ishikawa cells, SW-210.5	82
5.2	Lösungen	83
5.3	Chemikalien/Enzyme/Proteine/Puffer	85
5.3.1	Tabelle XIV verwendete Chemikalien 1	85
5.3.2	Tabelle XV verwendete Chemikalien 2	86
5.3.3	Tabelle XVI verwendete Chemikalien 3	87
5.3.4	Tabelle XVII Verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 1	88
5.3.5	Tabelle XVIII verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 2	89
5.3.6	Tabelle XIX verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 3	90
5.3.7	Tabelle XX verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 4	91
5.4	Zellkulturmaterial	92
5.4.1	Tabelle XXI Zellkultur	92
6	<u>Abkürzungen</u>	<u>93</u>
7	<u>Verzeichnis der akademischen Lehrer</u>	<u>95</u>
8	<u>Quellenverzeichnis</u>	<u>97</u>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Schematische Darstellung von Säuger-Somatostatin; gekennzeichnet sind die mono- und dibasischen Prozessierungsstellen sowie bekannte Endprodukte 15
- Abbildung 2: Aminosäuresequenz von Somatostatin. Die Pfeile zeigen potentielle Ansatzstellen der unspezifischen Hirnproteasen, basierend auf der Freisetzung von Aminosäureresten im Hirnextrakt von Ratten nach 1 Stunde Inkubation mit SST. 17
- Abbildung 3: Modell des Somatostatinrezeptors in der Plasmamembran. Die Sequenz entspricht dem SSTR 2. CHO- potentielle N-terminale Bindungsstellen der Oligosaccharide; Cys-115 und Cys-193 tragen eine Disulfidbrücke; Cys-328 ist C-terminal über einen Palmitinrest in der Membran verankert; kleines Bild: mögliche Anordnung der sieben transmembranen α -Helix-Domänen (TM1-TM2) in Anlehnung an das Strukturprotein Rhodopsin 19
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktion bei SST-Rezeptoren. Aktivierung der Protein-Thyrosin-Phosphatase stellt die Schlüsselreaktion zu: a.) Zellwachstumsinhibition via SSTR 1, 2, 4, 5 (über vorherige Zwischenschritte zur Aktivierung der MAPK und Induktion von Rb (Retinoplastoma tumor supressor Protein); p-21 (Zyclinabhängiger Kinase Inhibitor) b.) Apoptose via SSTR 3 über dephosphorylationsabhängige Aktivierung von p53 (Tumor suppressor Protein) und Bax (pro-Apoptose Protein) 23

-
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktion bei SST-Rezeptoren. Rezeptoraktivierung führt zu: Reduktion des intrazellulären cAMP (Inhibition der Adenylatcyclase); Verminderung des Ca^{2+} -Einstromes (Aktivierung der $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ Ionenkanäle); Stimulation von Phosphatasen wie Calzineurin (hemmt Exozytose); Serin/Threonin Phosphatase Aktivierung (dephosphoryliert und aktiviert $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ Ionenkanalproteine) 23
- Abbildung 6: Kontrolle der cDNA-Qualität mittels β -Actin-Nachweis. β -Actin wurde in der cDNA ausgewählter Zelllinien durch RT-PCR und anschließender Elektrophorese detektiert. 45
- Abbildung 7: Darstellung der Rezeptoren über PCR aus genomischer DNA im Agarosegel 47
- Abbildung 8: Agarosegelbilder der Restriktionsanalyse der SSTR 2 und 5, sowohl an Amplifikaten aus genomischer DNA wie auch der Zelllinien T47D (Rez. 2) und BON (Rez. 5 in beiden Amplikatvarianten) 50
- Abbildung 9: Graphische Darstellung der Expression von SSTR, bezogen auf alle Zelllinien 57
- Abbildung 10: Darstellung der Häufigkeit von Rez. 2 und 5 sowie deren Verknüpfungen. 57
- Abbildung 11: Gegenüberstellung der gefundenen Expression von SSTR 5 nach Einsatz von zwei unterschiedlichen Primerpaaren (Fragmentunterschied 1:10) 58
- Abbildung 12: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die Lungentumore 59
- Abbildung 13: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei Lungentumoren; U-1810 (GZ) pos. für Rez. 2; DMS79 (KZ) pos. für Rez 2 und 5;

H526 (KZ) neg. für alle Rez.; [links Positivreihe (+), rechts Negativkontrolle (-) -siehe Kapitel 2]	60
Abbildung 14: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die gynäkologischen Tumore von Mamma, Endo- metrium und Ovar	61
Abbildung 15: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei gynäkol. Tumoren; HEC-1-A (Endom.) pos. für Rez. 5; EFO 27 (Ovar) allg. neg.	61
Abbildung 16: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die Tumore der Verdauungsorgane – speziell Kolon und Pankreas	62
Abbildung 17: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei Tumoren des Verdauungstraktes; Colo320 (Kolon) allgemein neg.; HT29 (Kolon) pos. für Rez. 5; Capan2 (Panc) allgemein neg.; PC 44 (Panc) pos. für Rez. 5	63
Abbildung 18: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die restlichen einzelnen Zelllinien (Carzinoid, Mesotheliom, Gliom)	64
Abbildung 19: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei weiteren Zelllinien; MSTO-211H (Mesotheliom), BON-1 (Karzinoid) pos. für Rez. 5; LCC-18 (Karzinoid), LN18 (Gliom) allgemein neg.	65

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

1.1.1 Das Problem Krebs

Der Kampf des Menschen gegen die in ihm wohnende Krankheit ist so alt wie der Mensch selbst. Vom Aberglauben über Heilkräuter, bis zu unseren heutigen Behandlungsverfahren und Medikamenten – immer versucht der Mensch seinen Körper zu beeinflussen, um Krankheit und Übel zu besiegen.

Durch das immer währende Forschen und Testen sind gerade in den letzten 150 Jahren die Infektionskrankheiten, welche lange die Geißel der Menschheit - und Haupttodesursache waren - erfolgreich bekämpft worden.

Der Mensch wird älter, und somit treten andere Probleme in den Vordergrund. An erster Stelle der Todesursachen stehen heute Herz/Kreislaufkrankungen und Krebs.

Während die Gefäßerkrankungen bei den Menschen als „natürliche“ Altersrisiken akzeptiert werden, hat der Krebs die Aura eines unvorhersehbaren, schicksalhaften Leidens. Dies kommt zum einen daher, daß Gefäßerkrankungen oft einen plötzlichen und Krebserkrankungen dagegen einen langen Leidenstod bewirken. Weiterhin auch daran, daß trotz der intensiven Forschung der Krebs selbst heute noch schwer zu beherrschen ist.

Insgesamt erkranken in Deutschland pro Jahr etwa 338.300 Menschen an Krebs. Von diesen sind die meisten über 60 Jahre alt. Dickdarm-, Prostata-, Lungen- und Brustkrebs nehmen immer mehr zu.¹ Auf 860.389 Sterbefälle im Jahr 1995 kamen 209.233 Krebstote. Somit stehen die bösartigen Neubildungen inzwischen mit 24,3% an zweiter Stelle der Todesursachen.²

1.1.2 Krebs- eine teilautonome, bösartige Neubildung

Die Forschung hat gezeigt, daß es drei große Klassen der Tumore gibt – die weit überwiegenden Karzinome, die Sarkome und die Lymphome/Leukämien. Jeder Krebs oder Tumor hat als Ursprung eine gesunde, normal in den Zellverband eingegliederte Zelle. Bei den Karzinomen sind dies die epithelialen Zellen, bei den Sarkomen die Zellen des Bindegewebes und die Lymphome/Leukämien stammen von den blutbildenden Zellen des Knochenmarks und der Lymphknoten. Durch krebserzeugende Faktoren wie Strahlung, Chemikalien aber auch Viren, verliert die Zelle einen Teil ihrer Abhängigkeit an die Wachstumskontrollsysteme unseres Körpers. Sie vermehrt sich uneingeschränkt und zerstört dabei die umliegenden Strukturen. Was bringt eine normale Zelle dazu, sich derart abzukoppeln? Die Antwort liegt in der Zelle selbst. In vielen Krebszellen wurden Krebsgene entdeckt – Onkogene – deren Aktivierung zur Transformation der Zelle beiträgt. Sie arbeiten unaufhörlich und bewirken das Krebsverhalten. Krebszellen haben vielfältige Eigenschaften. Unkontrolliertes Wachstum ist nur die Augenscheinlichste. Weiterhin ist die morphologische Zellgestalt häufig verändert und sie durchbrechen die territorialen Regeln des normalen Zellverbandes. Oft ist der anaerobe Zuckerstoffwechsel dieser Zellen stark erhöht. Weiterhin wird die äußere Zellmembran verändert – das heißt, mit speziellen Tumor-Antigenen besetzt. Somit entstehen ganz charakteristische immunologische Tumoreigenschaften. Diese Liste wäre durchaus fast endlos fortzuführen. (Weinberg et al.³)

Dennoch ist die Tumorzelle vom Körper abhängig und muß mit ihm kommunizieren. Zum Beispiel kann sich kein Tumor ohne die hormonelle Induktion eines eigenen Kapillarsystems ausbreiten. (Folkman⁴) Je nach Ursprungsorgan und

Differenzierungsgrad existiert auch weiterhin eine gewisse Abhängigkeit an hormonelle Botenstoffe der gesunden Zelle. (z.B. bei Urogenitaltumoren an Geschlechtshormone). Dies bedeutet, daß die einzelnen Krebsarten bei genauer Kenntnis ihrer Struktur, dem Arzt und Wissenschaftler, trotz ihrer bösartigen Entartung, die Möglichkeit der Einflußnahme auf Wachstum und Differenzierung bieten können. Beispiele hierzu sind die Gabe oder der Entzug von Hormonen an vorhandenen Rezeptoren, Kopplung von Medikamenten mit rezeptorbindenden Strukturen und Verwendung von spezifisch-selektiven Analoga. Da wir heute mindestens 100 verschiedene Krebsarten kennen, und jede für sich durch Gewebeherkunft, Entstehungsursache, Differenzierung bis hin zur metastatischen Potenz einen eigenen Komplex darstellt, ist die Kenntnis und Behandlung von Krebs immer noch äußerst schwierig.

Diese Arbeit soll - mit dem Screening von 53 eigenständigen malignen Zelllinien auf die Expression der Somatostatin-Rezeptorfamilie - einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Tumore bringen und durch das Expressionsmuster, Hinweise auf mögliche hormonelle Einflußmöglichkeiten auf die einzelnen Tumorfamilien geben.

1.2 Spezieller Teil

das Hormon Somatostatin und seine Rezeptorfamilie

1.2.1 Somatostatin –das Hormon

Somatostatin [SST] – auch Somatotropin Release Inhibiting Hormone [SRIH]– genannt, gehört zu den Hormonen des Wachstumshormon-Systems. Chemisch ist es ein zyklisches Polypeptid aus 14 oder 28 Aminosäuren.

Wie viele andere Protein-Hormone, wird auch Somatostatin zuerst innerhalb eines Präpeptids aus 116 AS am Ribosom synthetisiert. (à Abb. 1) Ein Präpeptid ist ein langes Proteinmolekül in welchem viele einzelne Proteinprodukte in einem Strang zusammenhängend synthetisiert wurden und anschließend enzymatisch gespalten werden.

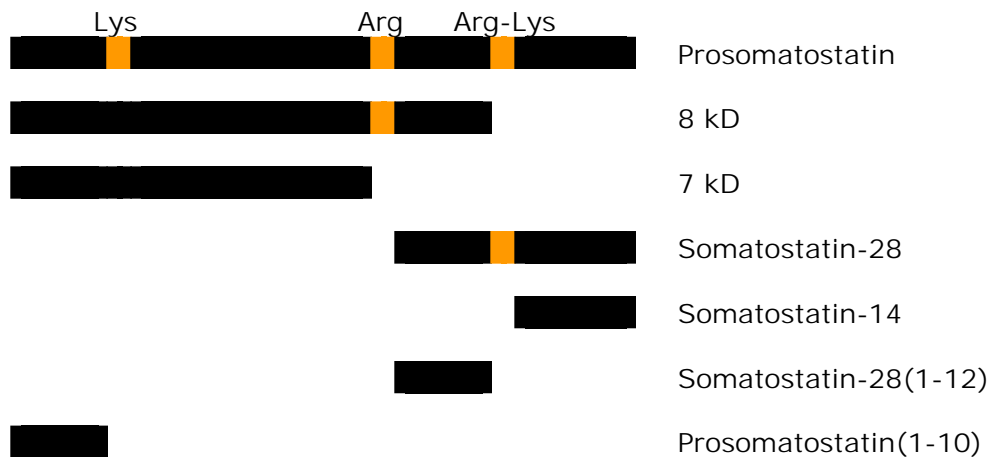


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Säuger-Somatostatin; gekennzeichnet sind die mono- und dibasischen Prozessierungsstellen sowie bekannte Endprodukte (aus Patel et al. 1995)⁵

Das Gen für dieses Hormon befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 3.

Das proSomatostatin der Säuger ist ein 92 AS haltiges Proteinmolekül, welches hauptsächlich am C-terminalen Ende prozessiert wird, wobei zwei bioaktive Endprodukte – Somatostatin-14 [SST-14] und Somatostatin-28 [SST-28]– entstehen. (Patel et al. 1999)⁶

Welches der beiden Somatostatinarten bevorzugt entsteht, ist abhängig von der synthetisierenden Zelle. Dies hat seinen Ursprung in einer unterschiedlichen Prozessierung. SST-14 entsteht hauptsächlich in den Inseln des Pankreas, in den Zellen des Magens, im neuronalen Gewebe des Magen-Darm-Trakts sowie des Nervengewebes (auch in peripheren Nerven) und ist die einzige Form in der Retina.

SST-28 hat einen Anteil von 20-30% am gesamten immunreaktiven SST im Gehirn. Hierbei ist nicht klar, ob es mit SST-14 coproduziert wird oder in getrennten Neuronen entsteht.⁶ Ebenso wird es in intestinalen Mucosazellen synthetisiert. Darüber hinaus wird das Hormon auch in vielen anderen Strukturen – wie Schilddrüse, Zellen des Immunsystems und Tumoren - in unterschiedlicher Menge gebildet.

1.2.1.1 Somatostatin – die Effekte

Das Hormon wirkt hauptsächlich inhibitorisch und arbeitet sowohl als endokriner als auch parakriner Botenstoff. SST ist ein physiologischer Wachstumsinhibitor. Es wirkt suppressiv auf zahlreiche Zellarten. Insbesondere werden die basale - wie auch die stimulierte Freisetzung des Wachstumshormons Somatotropin vermindert. SST wirkt im Gehirn als Neurotransmitter und beeinflusst so die kognitiven, lokomotorischen, sensorischen und autonomen Funktionen. Es hemmt die Freisetzung von Dopamin im Mittelhirn sowie von Thyrotropin-freisetzendem-Hormon(TRH), Choriotropin-freisetzendem-Hormon(CRH) und Noradrenalin aus dem Hypothalamus.

Auch bei Schilddrüsen-stimulierendem-Hormon(TSH) werden die basale- wie auch die stimulierte- Sekretion negativ beeinflusst. Es ist allerdings kein Effekt auf das Lutenisierende-Hormon(LH), Folikel-stimulierende-Hormon(FSH), und Adrenocortikotrope-Hormon(ACTH) beim Gesunden nachzuweisen. Im Falle von krankheitsbedingten Erhöhungen von ACTH wirkt es suppressiv. An der Schilddrüse wird durch SST, der von TSH angeregte Thyroxin(T4) und Trijodthyronin(T3) Anstieg gemindert. Ein weiterer Wirkungsbereich fällt in das adrenerge System. Hier kommt es zur Inhibition des durch Angiotensin II angeregten Aldosteronanstiegs sowie des ACH stimulierten

Katecholaminausstoßes. Wichtige Effekte an den Nieren sind die Hemmung der Reninfreisetzung sowie der durch Antidiuretisches-Hormon(ADH) gesteuerten Wasserrückresorption. (Epelbaum et al. 1994)⁷ (Reichlin et al. 1983)⁸

In Ergänzung dazu, senkt dieses Hormon im Gastrointestinaltrakt die Magensäure-, Pepsin-, und Gallensaftsekretion. Weiterhin verringert es den Insulin- und Gastrinspiegel. Als dritter Angriffspunkt wird die motorische Aktivität der Darmsegmente gedämpft, wie auch die Entleerung von Magen- und Gallenblase verzögert. (Pinski et al. 1992)⁹

Als inhibitorisches Hormon blockt Somatostatin ebenfalls die Freisetzung der Wachstumsfaktoren (IGF-I, EGF, PDGF) und der Zytokine (IL-6, INF- γ) (Elliot et al. 1998)^{10 11}

Weitere inhibitorische Effekte hat dieses Hormon auf die Proliferation von Lymphozyten, Vorläuferzellen für intestinale Mucosa, Knorpel, Knochen und weiße Blutzellen. Zusätzlich wirkt es auch noch vasokonstriktiv. ^{8 12 13 14 15}

Die Somatostatinwirkung wird über schnelle proteolytische Spaltung durch unspezifische Proteasen (à Abb. 2) im Plasma beendet. Die Plasmahalbwertszeit liegt für dieses Hormon zwischen drei – vier Minuten.

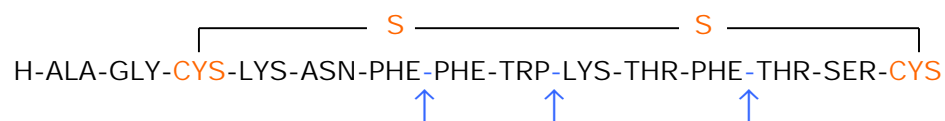


Abbildung 2: Aminosäuresequenz von Somatostatin. Die Pfeile zeigen potentielle Ansatzstellen der unspezifischen Hirnproteasen, basierend auf der Freisetzung von Aminosäureresten im Hirnextrakt von Ratten nach 1 Stunde Inkubation mit SST.¹⁶

1.2.1.2 Somatostatin – die Sekretion

Die SST-Genexpression und Sekretion unterliegt einem weiten Kreis von sekretionsaktivierenden Stoffen – angefangen bei Ionen und anderen Nahrungsbestandteilen, über

Neuropeptide/Transmitter bis hin zu Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. (Patel et al. 1992)¹⁷

Einige dieser sekretiven Stoffe wirken ubiquitär gleich, andere organspezifisch. Dies ist durch die selektive oder ubiquitäre Expression von Rezeptoren für diese stimulierenden Stoffe, oder durch Paralleleffekte bei der Freisetzung anderer Hormone zu erklären. Die Freisetzung von SST nach Membrandepolarisation – gezeigt bei Neuronen und peripheren SST-sekretierenden Zellen - scheint der Hauptmechanismus der Freisetzung zu sein. Nahrungsstoffe wie Fette, Aminosäuren und Glukose bewirken eine spezifische SST-Freisetzung in den D-Zellen der Pankreasinseln. Dagegen wird die hypothalamische Sekretion durch Glukose gehemmt.

Nach bisherigen Ergebnissen scheinen alle bisher getesteten Neuropeptide/Transmitter den Somatostatinhaushalt zu beeinflussen, wobei Opiate und GammaAminoButtersäure(GABA) immer inhibitorisch wirksam sind.

Zytokine (IL-1, TNF- α und IL-6) verstärken die Sekretion und mRNA-Menge von SST. (Scarborough et al. 1989)^{18 45}

1.2.2 Somatostatinrezeptoren [SSTR]

Die Wirkung von Somatostatin wird durch selektive, hochaffinitive, plasmamembranständige 7-Trans-Membran-Rezeptoren (7TM-Rezeptoren) vermittelt.

SST-Rezeptoren wurden zum ersten Mal für die Hypophysen-Tumorzelllinie GH₄C₁ durch Bindungsanalyse beschrieben. (Schönbrunn et al. 1978)¹⁹ Genau 20 Jahre nach der Entdeckung des Hormons Somatostatin war die Struktur des ersten Rezeptors durch molekulares Kloning aufgedeckt. (Yamada et al. 1992)²⁰

Insgesamt existieren innerhalb der SSTR-Familie 5 eigenständige Rezeptortypen (SSTR 1-5), welche über ihre

unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften und Expressionsmuster die physiologischen Wirkungen von Somatostatin vermitteln. (Reisine et al. 1995)²¹

1.2.2.1 SSTR - allgemeiner Bau und Funktion

Die Somatostatin-Rezeptoren gehören zur Klasse der 7TM-Rezeptoren und zu den Glycoproteinen. Innerhalb dieser Rezeptorklasse sind sie den Opioid-Rezeptoren am engsten verwandt. Es finden sich innerhalb der Aminosäure-Sequenzen von Somatostatin-Rezeptoren und Opioid-Rezeptoren 30% Übereinstimmung. (Yasunda et al. 1993)²²

Das Rezeptorprotein besteht in dieser Rezeptorart aus verschiedenen intra-, extra- und transmembranen Abschnitten. 7TM umfaßt in dieser Klasse also 7 α -helixförmige - durch die Plasmamembran laufende - Domänen.

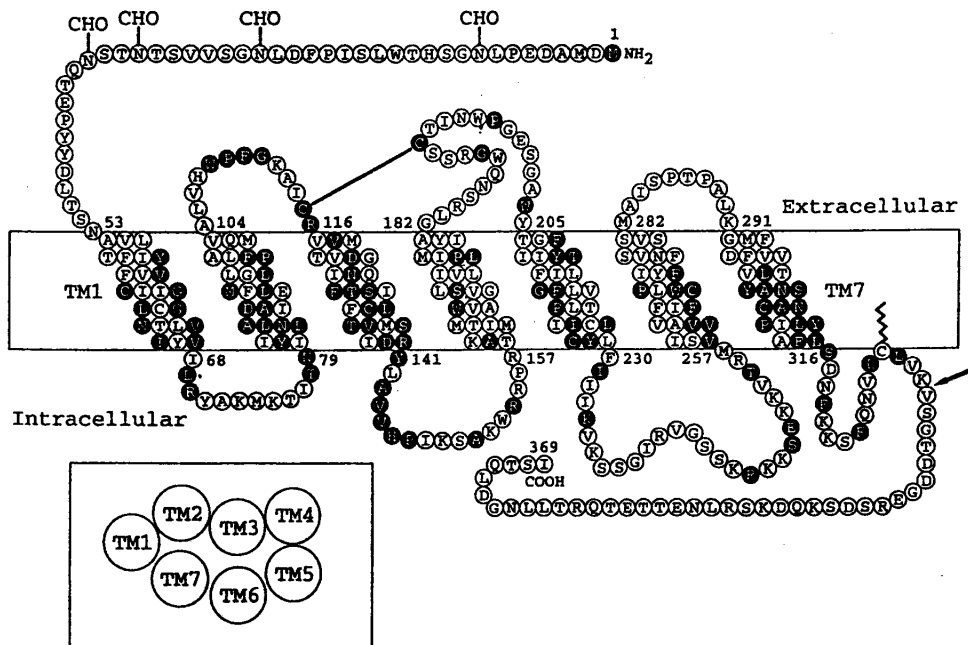


Abbildung 3: Modell des Somatostatinrezeptors in der Plasmamembran. Die Sequenz entspricht dem SSTR 2. CHO- potentielle N-terminale Bindungsstellen der Oligosaccharide; Cys-115 und Cys-193 tragen eine Disulfidbrücke; Cys-328 ist C-terminal über einen Palmitinrest in der Membran verankert; kleines Bild: mögliche Anordnung der sieben transmembranen α -Helix-Domänen (TM1-TM7) in Anlehnung an das Strukturprotein Rhodopsin (Schertler et al 1993²³); Einzelbuchstabenabkürzung der Aminosäuren (engl.); kennzeichnet die Stelle, an der

sich beim Maus-SSTR 2 SSTR 2A und SSTR 2B durch unterschiedliches Splicing unterscheiden. (aus Bell et al 1995²⁶)

N-terminal sind Oligosaccharide kovalent gebunden, welche sehr wahrscheinlich mit für die hohe Affinität zu Somatostatin verantwortlich sind.²⁶

Innerhalb der extrazellulären Schleifen 1 und 2 sind Cysteinreste enthalten, welche möglicherweise über Disulfidbrücken die externe Rezeptorstruktur stabilisieren.

Die Rezeptoren 1, 2, 4 und 5 tragen außerdem auf ihrem intrazellulären C-terminalen Ende eine Lysin-Cystein-Lysin-Sequenz, an welcher ein Palmitinrest als Membrananker vermutet wird.²⁶

Es besteht zur Zeit noch keine klare Erkenntnis über den Bau der Liganden-Bindungs-Domäne. (à Abb. 3) Die zwei Modelle dazu gehen entweder von einer durch Aminosäureresten geformten Bindungstasche innerhalb der 3D-Struktur des Rezeptors aus (Strader et al., 1995)²⁴, oder von keiner vorgeformten Struktur - sondern von einer Bindung des Liganden an besondere Aminosäurereste im Bereich der extrazellulären- aber auch der TM-Region, wodurch spontane Konformations-änderungen des Rezeptorproteins stabilisiert werden. (Schwartz et al, 1996)²⁵

Sicher ist man sich allerdings, daß Teile der TM II-VII - Regionen und die 2. extrazelluläre Schleife eine wesentliche Rolle hierbei spielen.⁴⁵

Die humanen Somatostatin-Rezeptoren variieren in ihrer Größe zwischen 364 (SSTR 5) und 418 (SSTR 3) Aminosäuren, wobei zwischen den 5 Unterarten eine 46-41%ige Sequenzhomologie feststellbar ist. (siehe Tabelle I)

Die Sequenzen innerhalb der 7 α -Helix förmigen TM-Bereiche haben die höchste Übereinstimmung, während die der C- und N-Termini die größten Differenzen aufweisen. (Bell et al. 1995)²⁶

1.2.2.1.1 Identität der Aminosäure-Sequenzen bei SSTR ²⁶

Tabelle I

Rezeptor	SSTR 1	SSTR 2	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
SSTR 1	100%	47%	46%	61%	49%
SSTR 2		100%	51%	47%	52%
SSTR 3			100%	46%	59%
SSTR 4				100%	51%
SSTR 5					100%

Alle Somatostatin-Rezeptor-Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert (siehe einzelne SSTR). Diese Gene haben keine klassischen Introns. Betrachtet man nun aber nicht nur menschliches Gewebe, sondern auch tierisches, findet man im Genom der Maus ein Intron bei SSTR 2. Es existieren dort somit 2 Varianten – eine ungespaltete (SSTR 2A-mRNA) und eine gespaltete (SSTR 2B-mRNA) Form. Die mRNA gespalten, kodiert für 346 AS (B) und die ungespaltete für 369 AS (A). 2A und 2B unterscheiden sich jedoch letztlich nur in der Länge und Sequenz des intrazellulären C-terminalen Rests – alles Übrige ist komplementär. (Patel et al.1999)⁴⁵ Derzeit sind Transkripte zu SSTR 2B nur in Mausgewebe veröffentlicht. Bei menschlichem Gewebe existiert derzeit kein Hinweis auf dieses Phänomen.²⁶

Wenn man funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit der SST-Rezeptoren miteinander vergleicht, kann man 2 Hauptklassen unterteilen - zum einen, die Rezeptoren vom SSTR1-Typ (SSTR1, SSTR4) und zum anderen die vom SSTR2-Typ (SSTR2, SSTR5). SSTR3 steht für sich. (Bruhns et al. 1995) ²⁷

1.2.2.2 SSTR – intrazelluläre Effekte

Die Vermittlung der Somatostatineffekte erfolgt über die Kopplung der Rezeptoren an intrazelluläre Regelkreisläufe – oft

in Form von Verbindung mit einer Proteinkinase oder eines Elektrolytkanals.

Diese Kopplung wird zum größten Teil durch Pertussistoxin sensible G-Proteine vermittelt, welche im Ruhezustand mit dem Rezeptor einen stabilen Komplex bilden und im Falle einer Rezeptor-Ligandenbindung als intrazellulärer „Botenstoff“ abgespalten werden.

SSTR 1ⁱ

Größe: 391 AS
 genomische Lage: 14q; 13
 nachgewiesene Kopplung an: $G_{i\alpha 3}$ – Block der Adenylatcyclase

SSTR 2ⁱ

Größe: 369 AS
 genomische Lage: 17q; 24
 nachgewiesene Kopplung anⁱⁱ: $G_{o\alpha 2}$ – Block von Kalziumkanälen
 $G_{i\alpha 3}$ – Block der Adenylatcyclase
 $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$
 Selektivitätsbestimmung: über [¹²⁸I]MK678
 absolute/relative Selektivität: Modellierung der GH-Sekretion, Immunreaktion, Glukagon-Sekretion

SSTR 3ⁱ

Größe: 418 AS
 genomische Lage: 22q; 13,1
 nachgewiesene Kopplung anⁱⁱ: $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 4}$, $G_{i\alpha 6}$
 besondere Eigenschaften: gluteinreiche Bezirke C-Terminal

ⁱ Patel, 1999⁴⁵; Bruhns, 1995²⁷; Reisine 1995

ⁱⁱ in GH₄C₁ Zellen und CHO-Zellen

	(Glu 9-12x)
Selektivitätsbestimmung:	über BIM 23056
SSTR 4 ⁱ	
Größe:	388 AS
genomische Lage:	20p; 11,2
besondere Eigenschaften:	61% identisch zu SSTR1
Selektivitätsbestimmung:	nicht möglich
SSTR 5 ⁱ	
Größe:	364 AS
genomische Lage:	16p; 13,3
Selektivitätsbestimmung:	über L-362, 855
absolute/relative Selektivität:	Modellierung der GH-Sekretion, Insulin-Sekretion

1.2.2.2.1 intrazelluläre Kopplung der SST-Rezeptoren

Tabelle II ⁴⁵

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Kopplung an:					
Adenylatzyclase					
Protein-Tyrosin-Phosphatase					
Einwärts-K ⁺ -Kanäle ⁱⁱⁱ		∅			
spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle ^{iv}			∅	∅	∅
Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher		∅	n.u.	n.u.	n.u.
Phospholipase A2 ^v					
Phospholipase C-IP ₃ ^{vi}				∅	
AMPA/kainate Glutamatkanäle					
↓ =inhibiert		∅	=kein Effekt		
↑ =aktiviert / stimuliert		n.u.	=nicht untersucht		

In Verbindung mit diesen Erkenntnissen kann man feststellen, daß die Sekretionshemmung durch Somatostatin über die Blockade von intrazellulärer cAMP-Synthese und Ca²⁺-Einstrom (proximaler Effekt) sowie mit Hilfe von stärker potenten distalen Effekten (wie direkte Exozytosehemmung via SST-abhängiger Aktivierung von Calzineurin) entsteht. (à Abb. 5) SSTR 1, 2, 4, 5 vermitteln über PTP-abhängige Modulation der mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) eine Zellproliferationshemmung (cell cycle arrest). (à Abb. 4)

Somatostatin-Rezeptor 3 bewirkt eine PTP-abhängige Apoptose, welche mit der Aktivierung von p53 und dem Pro-Apoptose-Protein Bax einhergeht. ⁴⁵

ⁱⁱⁱ bei Xenopus oocyten

^{iv} Ratten-Insulinom-Zellen

^v in CHO-K1-Zellen

^{vi} in COS-7 und F4C1 Hypophysen-Zellen

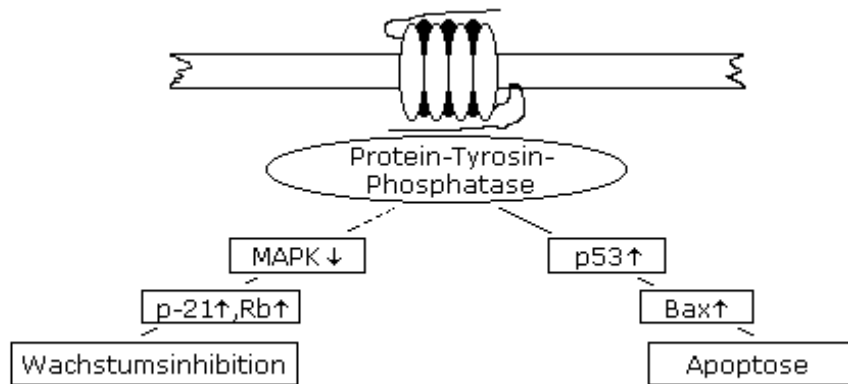


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktion bei SST-Rezeptoren. Aktivierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase stellt die Schlüsselreaktion zu: a.) Zellwachstumshemmung via SSTR 1, 2, 4, 5 (über vorherige Zwischenschritte zur Aktivierung der MAPK und Induktion von Rb (Retinoplastoma tumor suppressor Protein); p-21 (Zyclinabhängiger Kinase Inhibitor) b.) Apoptose via SSTR 3 über dephosphorylationsabhängige Aktivierung von p53 (Tumor suppressor Protein) und Bax (pro-Apoptose Protein)⁴⁵

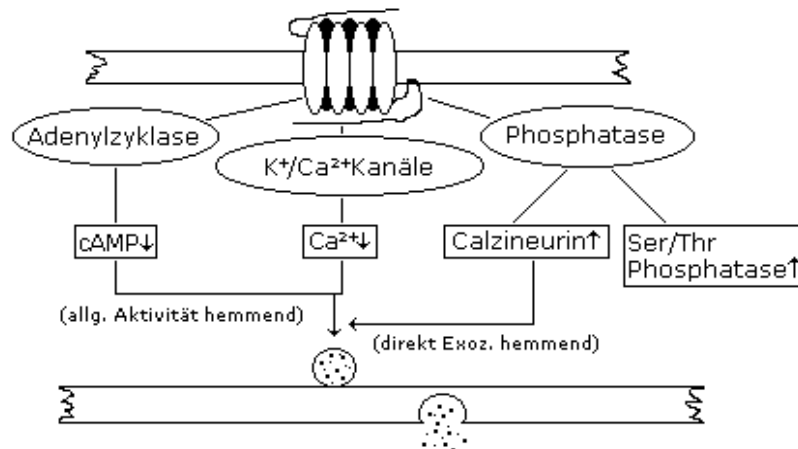


Abbildung 5: Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktion bei SST-Rezeptoren. Rezeptoraktivierung führt zu: Reduktion des intrazellulären cAMP (Inhibition der Adenylatzyklase); Verminderung des Ca²⁺Einstromes (Aktivierung der K⁺/Ca²⁺ Ionenkanäle); Stimulation von Phosphatasen wie Calcineurin (hemmt Exozytose); Serin/Threonin Phosphatase Aktivierung (dephosphoryliert und aktiviert K⁺/Ca²⁺ Ionenkanalproteine)⁴⁵

1.2.2.3 SSTR - Regulation der Rezeptoren

Das Vorkommen von Somatostatin-Rezeptoren in der Plasmamembran wird von der Zelle sowohl schnell (=reaktiv auf Ant-/Agonisten) als auch langsam (z.B. bei Krankheit) reaktiv variiert. Man unterscheidet zwischen der Rezeptor-Expression

und der Rezeptor-Gen-Expression. Diese wird nun im Folgenden erläutert.

1.2.2.3.1 Rezeptor-Expression

Die SSTR-Expression ist agonistenabhängig. Je länger die Exposition dauert, desto geringere Wirkung wird an der Zielzelle entfaltet. Es konnten verschiedene Wirkungsmechanismen der agonistenabhängigen Regulation aufgezeigt werden. u.a.

- a.) schnelle temperatur- und zeitabhängige (ab 60 min.) Internalisation (Endozytose) der Rezeptoren SSTR2 (20%), SSTR3 (78%), SSTR4 (29%), SSTR5 (66%).^{vii}
- b.) akute Desensibilisierung bei der Kopplung an die Adenylatzyklase (SSTR 1, 2, 3, 5)

Einer der Desensibilisierungsmechanismen ist die Phosphorylierung des C-terminalen Restes und der intrazellulären Schleifen. (besonders SSTR 2A, 3, 5)^{viii}

Bei künstlicher Langzeitexposition (12-24 h) konnte eine Mehrexpression an Somatostatin-Rezeptoren festgestellt werden. Nach 22 h fand man den SSTR 1 um 110 % erhöht. Für die übrigen galt: SSTR = 26 %, SSTR 4 = 22 %, SSTR 3 und 5 konstant.

Die erhöhte Expression beruhte nicht auf einer erhöhten Genexpression, sondern auf der Nutzung des vorhandenen zytoplasmatischen Pools an SST-Rezeptoren. Dies ist abhängig von molekularen Signalen am C-terminalen Ende.

^{vii} gezeigt bei CHO-K1-Zellen

^{viii} gezeigt an Ratten- und humaner Hypophyse

1.2.2.3.2 Rezeptor-Gen-Expression (RGE)

Die SSTR-Gene werden entwicklungsbedingt auf Basis von Zeitpunkt und Gewebeidentität reguliert. Beim Erwachsenen sind sie dazu noch hormon- und krankheitsabhängig.

Stresssituationen – wie Hungern oder diabetischer Insulinmangel gehen zum Beispiel mit Reduktion der SST-Rezeptoren 1-3 in der Hypophyse einher.

Hormone wie Östrogene (SSTR (1, 2, 3)↑, (5)↓), Kortikoide (Langzeitgabe: SSTR (1, 2)↓; Kurzzeitgabe: SSTR (1, 2)↑) und Schilddrüsenhormone (SSTR (1, 5)↑) modulieren die RGE ebenfalls. Weitere Botenstoffe dieser Art sind zyclisches AdenosinMonoPhosphat (cAMP), Gastrin, Erythrozyten-Wachstumsfaktor (EGF) sowie Somatostatin selbst. (Patel, et al.⁴⁵)

Ein weiterer Aspekt ist eine veränderte Somatostatin-Rezeptor-Expression bei maligner Entartung der Zellen.

1.2.2.3.2.1 Bekannte Expressionen von SSTR1-5 in humanem Gewebe und in Zelllinien

Tabelle III

Gewebe/ Zelllinie	Anz ahl	SSTR 1	SSTR 2	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5	Met hod e	Quel le
BON		+	+	(+)	n.u.	n.u.		28
CAPAN2		+	-	-	+	+		29
MiaPaCa		-	+	-	+	+		29
T47D		-	+	+	-	-		30
MCF7		-	-	-	-	+		31
Panc1		n.u.	-	n.u.	n.u.	n.u.	R	32
H69		+	+	-	-	-		33
HT29		-	-	-	-	+	R	35
Pankreas	8	100%	100%	0	100%	88%		34

exokrin.CA	12	85%	0	0	92,5%	68%	R	29/35
Pank.Inseln	1	+	+	-	+	-	R	36
ICT prim.T	10	70%	100%	50%	70%	80%		34
Insulinom	9	76%	91%	68%	100%	61%		28/34
Glucagonom	2	100%	100%	100%	100%	0		36
Karzinoide	7	83%	83%	14%	100%	83%	R	34/36
Mamma	8	12%	62%	0	0	37%	R	37
MammaCA	53	4%	98%	8%	12%	34%	R	37
Magen	2	+	+	+	+	+		28
Gastrinom	14	65%	85%	50%	85%	85%		28
Ileum	1	-	+	-	+	+		28
Kolon	1	-	+	-	+	+		35
K.Adenom	5	40%	40%	0	100%	60%	R	35
KolonCA	54	32%	71%	22%	24%	54%	R	35/38
K.Mukosa	31	27%	86%	12%	10%	45%	R	38
Rektum		29%	62%	20%	9,5%	60%	R	39
RektumCA		57%	57%	14%	17%	71%	R	39
Hirn		+	+	+	+	+	R	40
Gliome	12	92%	100%	32%	67%	32%	R	41
Menigiome	12	82%	100%	58%	58%	75%	R	40

+ expremiert

- nicht expremiert

n.u. nicht untersucht

% bezieht sich immer auf die Anzahl der untersuchten Zellen/Gewebe)

R RT-PCR

1.2.3 Somatostatinanaloga

Da Somatostatin so vielseitig hemmend auf den Hormonhaushalt des Körpers wirkt, wurden schon bald auch therapeutische Anwendungsmöglichkeiten gesucht.

Im Gegensatz zu endogen am gewünschten Wirkungsort freigesetztem SST und seiner durch schnelle Proteolyse lokal

bleibenden Wirkung, ergeben sich bei iatrogenen Anwendung verschiedene Probleme.

Diese reichen von der geringen PlasmaHalbwertsZeit (PHWZ) von < 3min, bei einzig möglicher systemischer i.v. Gabe, über die Multieffekte im gesamten Körper, dem Posttransfusionsrebound gedrosselter Hormone, bis zu Nebenwirkungen wie ein initialer Blutzuckerabfall, Hitzegefühl, Brechreiz^{ix} und Magen-Darm-Phänomenen.

Aufgrund dieser Probleme kam es schnell zu der Suche und Entwicklung von Somatostatinanaloga mit besseren Anwendungseigenschaften.

Das erste klinisch voll angewendete synthetische Analoga für Somatostatin war ein Oktreotid (SMS 201-995, Sandostatin[®]) [Bauer et al. 1982⁴²].

Die verbesserten Eigenschaften umfaßten: s.c. Gabe, 2 Stunden PHWZ, kein Reboundeffekt und, wie an Rhesusaffen gezeigt werden konnte, stärkere inhibitorische Wirkung als natürliches Somatostatin (45x bei Wachstumshormon (GH)), 11x bei Glukagon, 1,3x bei Insulin) (Lamberts et al. 1995)⁴³

Es zeigte sich beim Studium von SST-14, daß das aktive Zentrum von Somatostatin aus den Aminosäuren Phenylalanin(7), Tryptophan(8), Lysin(9), Threonin(10) besteht, um welche die Analoga synthetisiert werden müssen.

Bis auf SST-14, SST-28 und ihre direkten Strukturderivate, zeigten alle bis jetzt erfolgreich hergestellten Stoffe allerdings nur eine Affinität zu einigen Rezeptorsubtypen. Bisher konnte nichts gefunden werden, welches an alle 5 Typen effektiv bindet. (Patel et al. 1984)⁴⁴

^{ix} Hitzegefühl und Brechreiz entstehen bei zu schneller Gabe

1.2.3.1 Auswahl natürlicher und synthetischer Peptid- und non-Peptidagonisten der SST-Rezeptorfamilie mit Überblick ihrer Bindungseigenschaften

Tabelle IV⁴⁵

Agonist	Art	SSTR 1	SSTR 2	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
SST-14	kPA	SST-14 \geq SST-28				10-15x mehr SST-28
SST-28	kPA					
rCST-29	sPA	gleich SST-14	5-100x \leq kPA	gleich SST-14	gleich SST-14	5-100x \leq kPA
SMS 201-995 Octreotid	sPA	keine Bindung	gleich SST-14	mode- rate Bindung	keine Bindung	gleich SST-14
BIM23014 Lanreotide	sPA					
MK678 Seglitid	sPA	keine Bindung	gleich SST-14	mode- rate Bindung	keine Bindung	gleich SST-14
CH275	sPA	selektiv	keine Bindung	keine Bindung	selektiv	keine Bindung
L-797591	nPA	120-6200x kPA		keine Bindung	285x kPA	keine Bindung
L-796778	nPA	?	?	50x kPA	?	?

kPA = körpereigenes SST-Analoga
sPA = synthetisches SST-Analoga
nPA = nonPeptit SST- Analoga

In der letzten Zeit konnten auch zunehmend Stoffe identifiziert, werden, welche als Somatostatin-Antagonisten eingesetzt werden können. Einer dieser Antagonisten ist [AC-4-NO₂-Phe-c (d-Cys-Tyr-D-Tyr-Lys-Tyr-Cys)-D-Tyr-NH₂]. Er bindet an SSTR-2 und SSTR-5 mit nanomolarer Affinität und inhibiert dabei die Kopplung an Adenylatcyclase. BIM 23056 ist, durch die bei seiner Bindung an SSTR-5 erfolgende Blockade dieses Rezeptors, sehr wahrscheinlich ebenfalls zu den Antagonisten zu zählen. (Lamberts et al. 1995)⁴⁵

1.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Screeninguntersuchung von 53 humanen Tumorzelllinien auf die Expression von Somatostatin-Rezeptoren nach ihren Subklassen durchgeführt.

1.3.1 Erläuterung zur Aufgabenstellung

Mit Hilfe von RT-PCR sollte auf RNA-Ebene die Expression von Somatostatin-Rezeptoren – getrennt für jeden SSTR-Typ – in humanen Tumorzelllinien [Karzinoid (2 Zelllinien), Mesothel (1) sowie der Organe Lunge (24), Mamma (3), Ovar (4), Endometrium (2), Kolon (4), Pankreas (12), Hirn (1)] untersucht werden.

2 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen, Enzyme und Zelllinien sind im (à) Kapitel 7 Tabellen/Lösungen noch einmal in genauer Beschreibung nachzuschlagen.

2.1 Zelllinien

2.1.1 Zelllinien in eigener Kultur

In dieser Arbeit wurden 53 Tumorzelllinien auf die Somatostatin-Rezeptor-Expression untersucht. 17 dieser Zelllinien wurden während dieser Zeit selbst in Zellkultur gehalten. Jede dieser Tumorzelllinien wurde erst 2-3 Wochen auf Zellkulturschalen herangezogen, bevor die RNA isoliert wurde.

Übersicht:

MCF7	Mamma, Adenokarzinom	F
MFM223	Mamma, Adenokarzinom	F
T-47D	Mamma Ca –duktal	F
Ishikawa cells	endometriales Adenokarzinom	F
HEC-1-A	endometriales Adenokarzinom	F
EFO 21	ovariales Zystadenom	F
EFO 27	ovariales Zystadenom	F
NIH:Ovar-3	Ovar, Adenokarzinom	F
SK:Ovar-3	Ovar, Adenokarzinom	F
MSTO-211H	Mesotheliom (biphasig)	F
BON-1	Karzinoid (neuroendokrin)	E
LCC-18	Karzinoid (neuroendokrin)	E
LN 18	malignes Gliom	P
Colo 320	Kolon Adenokarzinom	A
CX1	Kolon Adenokarzinom	A

HT29	Kolon Adenokarzinom	A
SW-403	Kolon Adenokarzinom	A

E = Zelllinien der eigenen Arbeitsgruppe

F = erhalten von der Frauenklinik Marburg, Prof. Schulz

A = erworben von ATCC, USA

P = erhalten aus der Pathologie Marburg

2.1.1.1 Zellkultur

Grundsätzlich wurden allen Arbeiten, bei denen die Gefahr der Kontamination bestand, unter einer Sterilbank mit vertikalem Luftstrom (Modell Lamin Air[®] HB 2448) und nach gründlicher Desinfektion der Hände durchgeführt.

Zellanzucht

Das Heranziehen der einzelnen Zelllinien erfolgte in Zellkulturplatten (Ø10 cm, Falcon[®], Becton Dickinson Labware) und Kulturflaschen (200 ml, Cellstar[®], Greiner Labortechnik), die mit 25 ml FetalesKälber(FB)Serum-haltigem RPMI 1640 Medium gefüllt waren. Das Wachstum der Zellen erfolgte im Brutschrank (Heraeus Instruments BB 6220), bei gleichbleibendem Klima von 37° C, feuchtigkeitsgesättigter Luft und Begasung mit CO₂. Die Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid diente dabei zur Stabilisation des pH-Wertes von dem Hydrogencarbonat-Puffers innerhalb der Kulturmedien. Zellkulturflaschen wurden daher auch nicht fest verschlossen, da ein Gasaustausch gewährleistet sein mußte.

Nährmedienwechsel

Je nach Zelldichte und Farbindikation des Mediums wurde alle 3 – 5 Tage ein Medienwechsel durchgeführt. Dabei wurde das alte Medium abgesaugt und lauwarmes, frisches zugegeben.

Passagierung

Beim Erreichen einer Konfluenzdichte der Zellen von ca. 75 %, wurde die Zellpopulation 1:3 bzw. 1:4 geteilt, um ein unbeeinflusstes Wachsen zu garantieren. Das Medium wurde abgesaugt und 3ml PBS-EDTA hinzugegeben. Nach kurzem Einwirken konnten die Zellen mit dem Pipettenstrahl abgespült

und in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden. Nach der Zentrifugation mit 1000 rpm (~ 0,17 g) für 1 min wurde dann das PBS-EDTA abgesaugt und durch serumhaltiges Medium ersetzt. Je nach Konfluenz sind die resuspendierten Zellen auf 3 oder 4 neue Kulturplatten/flaschen aufgeteilt worden. Mit jeder Teilung erhöhte sich die Passage der Zellen um eins.

Einige der Zellen wie Ishikawa cells und T-47-D, waren teilweise sehr schwer ablösbar. Hier wurden dann 3 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und diese dann 5 min im Brutschrank inkubiert. Wenn auch jetzt noch keine Ablösung erfolgte, konnte man die Zellen mit dem Zellschaber abgelösen. Dies sollte aber aufgrund der Schäden an den Zellen so selten wie möglich erfolgen - mußte in Einzelfällen aber angewendet werden.

Zellkonservierung

Der Zellrasen wurde abgelöst (siehe Passagierung), zweimal mit PBS-Puffer gespült und dann im Zentrifugenröhrchen pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und die Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (FB-Serum mit 10 % DMSO) wieder resuspendiert.

Diese 1,5 ml wurden dann in Plastikkryoröhrchen gegeben und stufenweise bis auf -80 °C gekühlt und gelagert.

Auftauen

Konservierte Zellen sind dadurch wieder in Kultur genommen worden, daß die gefrorenen Zellen nach kurzem Antauen im Kryoröhrchen in 25 ml lauwarmes Medium gegeben wurden und im Brutschrank ihren Stoffwechsel wieder regenerierten.

Wachstumskontrolle

Jede einzelne der Zellkulturplatten/flaschen wurde regelmäßig unter dem Lichtmikroskop nach Wachstum der Zellen und Kontamination mit Bakterien oder Pilzen überprüft.

Farbe und Trübung des Mediums waren ebenfalls gute Parameter für die Situation in den Kulturen. Verbrauchtes Medium verfärbt

sich gelblich, Bakterien trüben allgemein und Pilze bilden Inseln oder Rasen im Medium.

Durch einige Wochen des Übens an LCC-18-Zellen konnten die Arbeitsschritte gut gelernt und verfestigt werden, bevor andere Zelllinien in Kultur genommen wurden.

2.1.2 Zelllinien anderer Labore

Von allen weiteren 36 Zelllinien wurde uns durch die Arbeitsgruppen Jaques und Simon - beide Philipps-Universität-Marburg - isolierte RNA zur Verfügung gestellt.

Übersicht:

LCLC-103H	großzelliges Lungen Ca	J
U-1810	großzelliges Lungen Ca	J
LCLC-97TM1	großzelliges Lungen Ca	J
NCI-H23	großzelliges Lungen Ca	J
DMS79	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-510°	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H1092	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H146	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H187	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H526	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H60	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H69	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H82	kleinzelliges Lungen Ca	J
NCI-H841	kleinzelliges Lungen Ca	J
SCLC-24H	kleinzelliges Lungen Ca	J
SCLC-86M1	kleinzelliges Lungen Ca	J
SW 210.5	kleinzelliges Lungen Ca	J
EPLC-272H	epidermoides Lungen Ca	J
A549	Lunge Adenokarzinom	J
NCI-H125	squamouses Lungenzell Ca	J
EPLC-32M1(EPLC-32H)	squamouses Lungenzell Ca	J

NCI-H157	squamouses Lungenzell Ca	J
NCI-H596	squamouses Lungenzell Ca	J
U-1752	squamouses Lungenzell Ca	J
ASPC1	Pankreas Adenokarzinom	S
Capan2	Pankreas Adenokarzinom	S
H PAF 2	Pankreas Adenokarzinom	S
MIA PaCa-2	Pankreas Ca	S
Panc1	Pankreas Ca	S
PA-TU-8902	Pankreas Adenokarzinom	S
PA-TU-8988S	Pankreas Adenokarzinom	S
PA-TU-8988T	Pankreas Adenokarzinom	S
PC 2	Pankreas Adenokarzinom	S
PC 44	Pankreas Adenokarzinom	S
PC 3	Pankreas Adenokarzinom	S
Patho II	Pankreas Adenokarzinom	S

J = von Hämatologie/Onkologie Marburg, PD Dr. Jaques, G.

S = von AG Dr.Simon, B. Abt. Gastroenterologie

2.2 Grundlagen

Zum besseren Verständnis der angewendeten Methoden wie PCR (Polymerase-chain-reaction) und RT – PCR (Reverse-transcriptase-Polymerase-chain-reaction) sollen hier zunächst noch einmal kurz die Grundlagen des RNA (RiboNucleinAcid)- und des DNA (DesoxyRiboNucleinAcid) Aufbaus dargestellt werden.

2.2.1 DNA –DesoxyRiboNucleinAcid.

Unser Genom liegt in den Strängen einer DNA-Doppelhelix verschlüsselt vor, deren kleinste Baueinheit das Nukleotid ist. Dieses besteht aus einer der vier Basen (Adenosin, Thymin [Purine = Basen mit doppeltem Ringsystem], Cytidin und Guanin [Pyrimidine = Basen mit einfachem Ringsystem]), einem Zucker (Desoxyribose) und einer Phosphatgruppe.

Die Phosphatgruppe verbindet die Nukleotide untereinander zu einem DNA-Einzelstrang. Die Basen sind in Tripletts geordnet, welche für einzelne Aminosäuren codieren. Zu jedem Einzelstrang legt sich nun ein genau komplementärer, antiparalleler Strang an, welcher durch Wasserstoffbrückenbindung der Basen (A-T ; G-C) mit diesem verbunden ist.

Durch die hier miteinander verbundenen Baueinheiten entsteht nun die Doppelhelix der DNA- des menschlichen Genoms.

Um die Kohlenstoffatome der Zucker von denen der Basen unterscheiden zu können, werden sie beim Zucker mit Apostroph gekennzeichnet. Da die Phosphatgruppen in den Einzelsträngen immer das 3´ mit dem 5´ C-Atom verbinden, entstehen an den Strängen C 3´- bzw. C 5´- Enden. Wie schon erwähnt, sind das C 3´- Ende des einen und das C 5´- Ende des anderen Stranges innerhalb der Doppelhelix einander komplementär.

2.2.2 RNA – RiboNucleinAcid

Allgemein entspricht die RNA dem Bau der DNA und stellt die Grundlage der Proteinsynthese dar.

Im Zellkern wird die Doppelhelix der DNA aufgetrennt und eine RNA-Polymerase synthetisiert einen Einzelstrang – den RNA-Strang, welcher das Transkriptat des entsprechenden DNA-Abschnitts darstellt. Je nach RNA-Polymerase werden unterschiedliche RNAs synthetisiert. Polymerase I und III synthetisieren für den Proteinsyntheseprozess wichtige „Arbeits“-RNA-Moleküle, während durch die Polymerase II die eigentlichen messengerRNA (mRNA) entstehen. Nur die mRNA dient am Ribosom als „Bauplan“ der Proteine.

Im Einzelnen unterscheidet sich die RNA von der DNA durch folgende Merkmale:

RNA ist einzelsträngig

RNA hat Ribose als Zucker im Nukleotid

RNA hat als vierte Base Uracil anstatt Thymin

Da die mRNA als Grundlage für alle Proteinsynthesen in der Zelle synthetisiert werden muß, entspricht das mRNA-Muster einer Zelle ihrer Expression an Proteinstrukturen.

Dies ist auch die Grundlage für den hier durchgeführten Expressionsnachweis von zellmembranständigen Rezeptorproteinen.

2.3 RNA – Präparation

2.3.1 RNAzol – Präparation

Die in der Zellkulturschale gewachsene Zellschicht wurde durch Absaugen von Mediumresten befreit und mit 10 ml PBS 1x gespült. Anschließend wurden 5 ml kaltes RNAzol zugegeben und durch schwenken gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden durch das Phenolreagenz abgelöst (wenn nötig gescraped) und mittels Pipette in kalte, autoklavierte Zentrifugenröhrchen überführt. In diesen Röhrchen waren 500 µl kaltes Chloroform vorgelegt. Es wurde 15 s auf höchster Stufe gevortext und die Probe dann 10 min auf Eis gestellt.

Es trennten sich nun zwei Phasen. Diese Trennung wurde durch die folgende Zentrifugation mit 5000 rpm (~1,2 g) (bei 4° C für 20 min) verstärkt.

Die obere RNA-haltige Phase wurde entnommen und mit einem äquivalenten Volumen eiskaltem Isopropanol gemischt. Nach weiteren 10 min auf Eis ist die RNA abzentrifugiert (14000 rpm (~1,1 g), 4° C, 15 min) worden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 200 µl DNase-Puffer aufgenommen. 20 Units DNase I wurden der Probe zugegeben und alles bei 37° C für 30 min inkubiert.

Als nächster Schritt folgte die Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform und Zentrifugation (14000 rpm (~1,1 g), 20° C, 10 min). Nun folgte die Ausfällung der RNA aus der oberen Phase mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat-Lösung und Volumen eiskaltem Ethanol bei -80° C über Nacht.

Es wurde anschließend erneut zentrifugiert (14000 rpm (~1,1 g), 4° C, 15 min)

und das trocken gesaugte Pellet in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Reinheitsgrad und RNA-Gehalt konnten durch Absorptionsspektroskopie ermittelt werden.

Gleichzeitig wurde über ein 1 % Agarosegel die RNA nach Abbau und DNA-Kontamination überprüft.

Die gewonnene RNA wurde bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

2.3.2 RNA-Präparation nach Qiagen

Aufgrund der hohen RNase-Aktivität in einigen der Zelllinien wurde neben der eben erklärten Methode ein weiteres Präparationsverfahren für RNA angewandt – mittels RNeasy MirKits von Qiagen. Diese Methode baut auf der selektiven Bindungseigenschaft von RNA an Silica-Gel-Membranen auf und kombiniert diese mit der Mikrospin Technologie. Durch die Bindung der RNA-Moleküle an die Membran, welche durch die Zugabe von Ethanol noch verbessert wird, können nach verschiedenen Waschschritten mit dieser Methode bis zu $100\ \mu\text{g}$ intakter RNA pro Reaktionsröhrchen isoliert werden. Durch den Einsatz eines denaturierenden Guanidinium-Isothiocyant-haltigem Puffers (GITC) werden sofort und effektiv alle RNAsen inaktiviert.

Da kleine RNA-Moleküle, deren Größe noch unter 200 Nukleotiden liegt, bei den hier verwandten Reaktionsbedingungen nicht binden, können lange RNA-Stücke angereichert werden. 5 sRNA- und tRNA-Anteile werden somit stark vermindert.

Die auf Kulturschalen ($\varnothing\ 10\ \text{cm}$) ausgesäten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 75 % (etwa $5\text{-}7 \times 10^6$ Zellen) für die RNA-Gewinnung verwendet.

Alle Arbeitsschritte und Mengenangaben der entsprechenden Puffer, wurden dem im Kit enthaltenen Protokoll (RNA-Extraktion aus humanen oder tierischen Zellen) entnommen.

Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen noch auf den Platten durch mit β -Merkaptoethanol versetztem GITC-haltigem RLT-Puffer lysiert und mit Hilfe von einem Zellschaber von den Platten abgekratzt. Die zähe Masse wurde in Shredder (QIASHredder) überführt und bei der Zentrifugation durch „Membranfilter“ homogenisiert. Durch die bei diesem Schritt erfolgte Scheerung der genomischen DNA, reduziert sich die Viskosität des Lysats. Dem Homogenat ist dann ein Volumen 70%iges Ethanol zugegeben und das Gemisch auf eine Extraktionssäule geladen worden. Durch Zentrifugation und mehrere Waschschrte wurde die RNA gewonnen und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die Extraktion der RNA aus den Zellen einer Kulturschale, wurde die Lysatmenge (ca. 600-700 μ l) auf zwei Shredder und zwei Säulen verteilt. Dies garantierte uns eine hohe und qualitativ hochwertige RNA.

Auch hier wurde das Ergebnis nach Gehalt, Reinheit, Abbau und Kontamination überprüft bzw. quantifiziert.

Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80° C.

2.3.3 RT [Reverse Transcriptase]–PCR-Methode und Anlage einer cDNA–Sammlung

Der Nachweis von Somatostatinrezeptoren wurde auf der RNA-Ebene durchgeführt, wobei die eigentliche Nachweismethode die PCR^x darstellte. Diese Methode verlangt als Template DNA. Somit mußte die uns vorliegende RNA in eine _{COPY}DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese Umschreibung erfolgt im PCR – Cycler mit Hilfe einer Reversen-Transcriptase in der RT-Reaktion.

^x Siehe 2.3.1. PCR - Technik

Das Enzym Reverse Transcriptase kopiert ein vorliegendes RNA-Template in DNA-Struktur. Dies bedeutet, daß das Kopieprodukt aus Desoxyribonukleinsäuren aufgebaut ist, wobei bei den Basen Uracil durch Thymin ersetzt wurde.

Die entstandenen _{COPY}DNA stellt somit ein genaues, übertragenes Abbild der in der Zelle vorhandenen RNA-Muster dar. Über die cDNA kann nun durch die PCR-Reaktion das RNA-Muster untersucht werden.

2.3.3.1 RT-PCR-Reaktion

Für die RT-PCR werden freie Desoxynucleotid- und Oligonucleotidprimer mit einem 5fachRT-Puffer und dem Enzym MuLV Reverse Transcriptase zusammen mit dem RNA-Template bei 37° C inkubiert.

Da ein Großteil der RNA von den verschiedensten Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt wurde, war der RNA – Gehalt sowie ihr Reinheitsgrad nicht bekannt. Um ganz sicher zu sein, daß im Produkt nur in cDNA umgeschriebene Fragmente enthalten waren, wurde vor jede Transcriptase – Reaktion ein DNase-Verdau der eventuell noch zwischen der RNA vorhandenen DNA-Fragmenten durchgeführt.

Es wurde angestrebt, daß für die RT- Reaktion immer eine RNA-Menge von 1 µg eingesetzt wurde.

In den Fällen, wo die Konzentration nicht bekannt war - und sich, durch zu geringe Mengen, auch nicht bestimmen ließ - betrug das Volumen der verwendete RNA - Lösung 3 µl.

2.3.3.1.1 RT-PCR-Ansatz 1fach mit vorgeschaltetem DNase-Verdau^{xi}:

5fach	RT-Puffer [Perkin Elmer]	6	µl
2 µM	dNTP-Mischung [Roche]	3	µl
	RNAse Inhibitor [Perkin Elmer]	1	µl
	DNase I, RNAse free [Stratagene]	1	µl
	cDNA –Template	X	µl
	mit autoklaviertem Wasser auffüllen auf	27	µl

2.3.3.2 RT-PCR-Grundprogramm mit DNase-Verdau

1.Cyclus1x

1	2	3	4	5
37° C	37° C	37° C	72° C	72° C
20 s	900 s	900 s	20 s	300 s

2.Cyclus1x = Break 1

mit Zugabe der p(dt)₁₅ Primer (je 2 µl 80 µM)

3.Cyclus1x

1	2	3	4
65° C	65° C	37° C	37° C
20 s	300 s	20 s	600 s

4.Cyclus1x = Break 2

mit Zugabe der MuLV Reverse Transcriptase (je 1 µl)

5.Cyclus1x

1	2	3	4	5	6	7	8	9
37° C	37° C	37° C	37° C	37° C	72° C	72° C	4° C	4° C
20 s	900 s	900 s	900 s	900 s	20 s	300 s	60 s	99 s

Anschließend folgten beliebige Kühlzyklen von 4° C

Für jede Zelllinie wurden je zwei RT-PCR-Reaktionen gleichzeitig durchgeführt, wobei nur eine der beiden Ansätze im Break 2 mit MuLV Reverse Transcriptase versetzt wurde (+). Der zweite

^{xi} siehe 7.2. Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung

Ansatz ohne Enzym (-) ist als Kontrolle (DNA-frei) mitgeführt worden. Die Produkte wurden dann nur für die weitere Diagnostik verwendet, wenn im Agarosegel der β -Aktin-Kontrolle für (+) ein 800 BP-Signal und für (-) keinerlei Banden zu finden waren.

2.3.3.3 Anlage einer cDNA-Sammlung

Für alle 53 verwendeten Tumorzelllinien erfolgten insgesamt 3 unabhängige RT-PCR-Synthesen. Soweit es vom Material möglich war, wurden auch jedesmal unterschiedliche RNA-Präparate verwendet.

Die erhaltenen cDNA-Präparate wurden langfristig bei -20°C und während der Reaktionen bei 4°C aufbewahrt.

Diese cDNA-Sammlung bildete den Grundstock für alle Nachweisreaktionen.

2.3.4 cDNA – Check mit β -Actin – PCR

Um die cDNA als Ergebnis der RT-PCR-Reaktion überprüfen zu können, wurde nach jeder Synthese $1\ \mu\text{l}$ des Produkts in einer PCR-Reaktion auf β -Actin untersucht. (à Abb. 6).

β -Actin ist ein Strukturprotein, welches ubiquitär in allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt. Daher ist in jeder Zelle auch ein RNA-Template für dieses Protein vorhanden.

Wenn die RT-PCR-Reaktion regelrecht stattgefunden hat, kann man so in allen Proben auch cDNA-Templates dieses Strukturproteins finden und über eine PCR-Reaktion nachweisen.

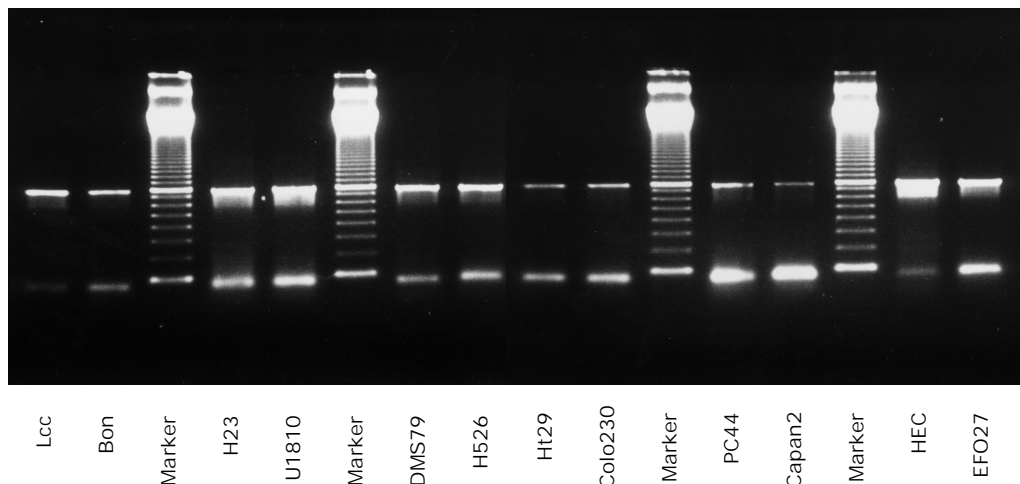


Abbildung 6: Kontrolle der cDNA-Qualität mittels β -Actin-Nachweis. β -Actin wurde in der cDNA ausgewählter Zelllinien durch RT-PCR und anschließender Elektrophorese detektiert.

2.3.4.1 β -Actin – PCR^{xii} 46

C3´Primer (Lokalisation 797-822)

gtg cct cag ggc agc gga acc gct ca (MWG-BioTech)

C5´Primer (Lokalisation 45-71)

gat gat gat atc gcc gcg ctc gtc gtc (MWG-BioTech)

erwartetes Produkt: 778 BP

Folgende Parameter waren dem Cycloerprogramm

zugrundegelegt:

Denaturierung: 95° C / 40 s Anlagerung: 62° C / 30 s

Synthese: 72° C / 90 s

2.4 Hauptversuch

Die letztendliche Untersuchung der Tumorzelllinien auf die Expression von Somatostatin-Rezeptoren wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion durchgeführt.

2.4.1 PCR - Technik 47

Die PCR Technik wurde 1985 von Kary Mullis in Kalifornien, USA, entwickelt und ist eine in vitro Technik, um gezielt ausgesuchte Desoxyribonukleinsäure-(DNA)abschnitte zu vervielfältigen.

Die Auswahl erfolgt über 2 bekannte DNA-Sequenzen, welche das gesuchte DNA-Stück einschließen.

^{xii} siehe 2.4.1. PCR-Technik

2.4.2 PCR – Reaktion

Bei der PCR-Reaktion mischt man das DNA-Template mit freien Desoxynucleotiden und Oligonucleotidprimern (kurzen einsträngigen DNA-Molekülen, die dem C 5´- bzw. dem C 3´-Ende einer definierten DNA-Sequenz entspricht).

Durch Temperaturerhöhung wird die Doppelhelixstruktur der DNA aufgebrochen und bei der anschließenden Abkühlung erfolgt die komplementäre Anlagerung der Primersequenzen an das Template. Nun kann eine DNA-Polymerase ausgehend von den Primern mit Hilfe der freien Nucleotide den fehlenden Teil komplementär herstellen.

Durch einen periodischen Wechsel der Temperaturen und der wachsenden Zahl an DNA-Vorlagen, erhöht sich die Zahl der spezifischen Sequenzen rasch. Während der ersten beiden Zyklen sind die Längen der neuen DNA-Stränge zwar noch ohne definierte Länge, aber ab dem dritten Zyklus werden nur noch Stücke mit der gleichen, festgelegten Ziellänge gebildet. Ihre Anzahl steigt nun exponentiell.

Enthält die eingesetzte cDNA die gesuchten Rezeptorsequenzen, werden diese daher in sehr hoher Stückzahl vervielfältigt.

PCR-Ansatz 1fach^{xiii}:

10fach	PCR-Puffer [Perkin Elmer]	3	µl
2 µM	dNTP-Mischung [Roche]	3	µl
5 µM	C 3´Primer [MWG-Biotech]	3	µl
5 µM	C 5´Primer [MWG-Biotech]	3	µl
	Taq DNA Polymerase [Perkin Elmer]	0,2	µl
	cDNA –Template	1	µl

^{xiii} siehe 7.2. Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung

(je nach Rezeptortyp wurde dem Ansatz DMSO in 0 %; 5 % = 1,5 µl; 7,5 % = 2.25 µl zugegeben)

Die gesamte Reaktionsmischung wurde mit einem Tropfen Mineralöl als Verdunstungssperre überschichtet.

Als Reaktionsgefäße sind 0,5 ml PCR-Gefäße GenAmp der Firma Perkin Elmer verwendet worden. Der PCR-Cycler (V45 Thermocycler Fa. Landgraf) wurde für jede Reaktion spezifisch, nach den durch Optimierung gewonnenen Parametern, programmiert.

2.4.2.1 Optimierung

Unter Optimierung versteht man das Ermitteln von PCR-Reaktionsbedingungen, unter welchen man für die eingesetzten Primerpaare, Polymerase und Template das optimale Amplifikationsergebnis erwarten kann. (Darstellung der gesuchten Sequenzen nach Optimierung und bei Verwendung von genomischer DNA (à Abb. 7) Dazu werden die Primer und die Polymerase mit einem für das Produkt positiven Template, bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen getestet.

Um die Ergebnisse noch stärker zu optimieren, können dabei auch die DMSO oder die Salzkonzentrationen (z.B. Magnesium) bei den unterschiedlichen Temperaturen verändert werden. Die ermittelten Werte stellen dann die Grundlage der PCR-Programmierung bei den eigentlichen Nachweisreaktionen dar.

Alle hier verwendeten Primerpaare wurden bei folgenden Parametern getestet:

Primeranlagerungstemperatur:

50° C / 52° C / 54° C / 56° C / 58° C / 60° C / 62° C / 64° C / 66° C / 67° C / 68° C

DMSO-Konzentration: kein DMSO / 5 % / 7,5 % / 10 %

Die hier ermittelten Parameter waren:

SSTR1	67° C	DMSO 7,5 %
SSTR2	62° C	DMSO 0 %
SSTR3	58° C	DMSO 5 %
SSTR4	60° C	DMSO 5 %
SSTR5 ^{xiv}	62° C	DMSO 5 %
SSTR5 ^{xv}	67° C	DMSO 5 %

2.4.2.2 PCR-Grundprogramm:

1.Cyclus 1x

1	2	3
95° C	95° C	AT° C
30 s	300 s	20 s

2.Cyclus 44x

1	2	3	4	5	6
AT° C	AT° C	72° C	72° C	95° C	95° C
20 s	30 s	20 s	40 s	20 s	40 s

3.Cyclus 1x

1	2	3	4	5	6
AT° C	AT° C	72° C	72° C	4° C	4° C
20 s	30 s	20 s	200 s	60 s	999 s

Anschließend folgten beliebige Kühlzyklen von 4° C

[AT = ermittelte optimale Anlagerungstemperatur]

2.4.2.3 PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 1⁴⁸

Es wurden folgende Primersequenzen verwendet

(MWG-Biotech AG):

C3´Primer (Lokalisation 1177-1200)

ctc aga gcg tcg tga tcc ggg ac

^{xiv} Primer5 für 154 BP Fragment

^{xv} Primer5 für 1133 BP Fragment

C5´Primer (Lokalisation –9-15)

tca gct ggg atg ttc ccc aat ggcd

erwartetes Produkt: 1209 BP

Dem Ansatz wurden 2,75 µl DMSO (7,5 %) zugesetzt.

Folgende Parameter waren dem Cycloerprogramm zugrundegelegt:

Denaturierung: 95° C / 40 s Anlagerung: 67° C / 30 s

Synthese: 72° C / 90 s

2.4.2.4 PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 2 ⁴⁸

Hier wurden folgende Primer eingesetzt:

C3´Primer (Lokalisation 1112-1137)

ggt cag ata ctg gtt tgg agg tct cc

C5´Primer (Lokalisation –9-16)

aaa gca gcc atg gac atg gcg gat g

erwartetes Produkt: 1146 BP

Bei diesem Ansatz wurde kein DMSO zugegeben.

Die ermittelten Syntheseparameter waren:

Denaturierung: 95° C / 40 s Anlagerung: 62° C / 30 s

Synthese: 72° C / 90 s

2.4.2.5 PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 3 ⁴⁹

Die Primer der SSTR 3-Synthese waren:

C3´Primer (Lokalisation 439-457)

cat gac cag gcg gca cat ga

C5´Primer (Lokalisation 97-116)

cat gga cat gct tca tcc at

erwartetes Produkt: 360 BP

Die DMSO-Konzentration betrug 5 % (1,5 µl) pro Ansatz.

Folgende Parameter wurden angewandt:

Denaturierung: 95° C / 40 s Anlagerung: 58° C / 30 s

Synthese: 72° C / 90 s

2.4.2.6 PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 4 ⁵⁰

Die Primersequenzen

C3´Primer (Lokalisation 944-963)

atc aag gct ggt cac gac ga

C5´Primer (Lokalisation 643-662)

atc ttc gca gac acc aga cc

wurden für die Synthese genutzt.

erwartetes Produkt: 321 BP

Auch hier wurden 5 % (1,5 µl) DMSO dem Ansatz zugegeben.

Als Parameter der Synthese galten:

Denaturierung: 95° C / 40 s Anlagerung: 60° C / 30 s

Synthese: 72° C / 90 s

2.4.2.7 PCR für Somatostatinrezeptor Subtyp 5

Primerpaar (1) – kurzes Fragment ⁵¹ Primerpaar
(2) – langes Fragment ⁴⁸

Das gesuchte Fragment des Rezeptors 5 wurde von folgenden

Primern eingerahmt:

C3´Primer(1) (Lokalisation 1033-1050)

ccg tgg cgt cag cgt cct cg

C5´Primer(1) (Lokalisation 897-917)

gcc ggc ctc tac ttc ttc gtg g

erwartetes Produkt(1): 154 BP

C3´Primer(2) (Lokalisation 1102-1126)

tgc act ctc aca gct tgc tgg tct g

C5´Primer(2) (Lokalisation –7-16)

tgc cgc cat gga gcc cct gtt cc

erwartetes Produkt(2): 1133 BP

Die DMSO-Menge betrug 1,5 µl (5 %) pro Ansatz.

Optimale Syntheseparameter der PCR für diesen Rezeptor waren:

Denaturierung: 95° C / 40 s

Anlagerung: (1) 62° C / 30 s / (2) 67° C / 30 s

Synthese: 72° C / 90 s

Neben den Reaktionsproben mit spezifischen Templates wurden pro Analyse ein Leeransatz sowie ein Ansatz mit genomischer DNA mit-synthetisiert. Es wurden für jede Zelllinie alle Rezeptor-analysen in Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Analyse lag eine getrennte cDNA-Synthese und, so weit möglich, auch eine unterschiedliche RNA-Präparation zu Grunde.

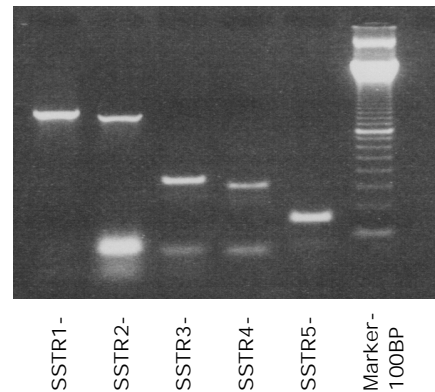


Abbildung 7: Darstellung der Rezeptoren über PCR aus genomischer DNA im Agarosegel

2.4.3 Agarosegele

Nach Beendigung der PCR sind die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt worden.

Die Gele wurden je nach erwartetem Fragment in einer Konzentration von 1 % bzw. 1,5 % aus Agarose (Sigma) und TBE-(Trisborate)Puffer gegossen.

Pro Gelträger wurden 0,4 g bzw. 0,6 g Agarose mit 40 ml 1fach TBE-Puffer für eine Minute aufgekocht und unter Rühren abgekühlt. Nun konnte als Indikator jeder Mischung 3 µl Ethidium-Bromide (Sigma) je Gel zugegeben werden.

Als Laufmedium wurde ebenfalls 1fach TBE-Puffer verwendet. Zum Auftragen wurden jedem Reaktionsgefäß 10 µl entnommen, mit je 3 µl DNA-Auftragspuffer gemischt und in die Kammern des Gels pipettiert. Als Standard lief in jeder Kammer eine 100 BP-Leiter mit.

An die Kammern wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Alle Ergebnisse wurden im UV-Licht durch die DNA-interkalierung mit Ethidium-Bromide als spezifisches Bandenmuster sichtbar gemacht und über einen Videoprinter dokumentiert.

2.4.4 Ergebnisskontrolle über informative Restriktionsanalyse

Um die erhaltenen DNA-Sequenzen auch definitiv dem Somatostatinrezeptor zuordnen zu können, wurde einmalig ein Reaktionsprodukt eines jeden Primerpaares und genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Anschließend wurden die Fragmente über ein 1,5 % Agarosegel aufgetrennt.

In allen Fällen konnte mit Hilfe einer 100 BP-Leiter das erhaltene Bandenmuster der einzelnen Verdau dem erwarteten Bild zugeordnet werden.

Für die positiven Reaktionsergebnisse bei den Rezeptoren 2 und 5 wurden ebenfalls stichprobenartige Verdau durchgeführt. (für SSTR 2 in 2, für SSTR 5 in 1^{xvi} bzw. 4^{xvii} Fällen. Die erhaltenen Muster wurden mit den Vorergebnissen verglichen.

^{xvi} Primer(1) für 154 BP Fragment
^{xvii} Primer(2) für 1133 BP Fragment

2.4.4.1 Restriktionsanalyse für die einzelnen Somatostatinrezeptoren

Für die Analyse wurden 10 µl des erhaltenen PCR-Produkts mit 2 µl des entsprechenden Reaktionspuffers versetzt und auf eine Gesamtmenge von 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden nun bei konstanter, spezifischer Temperatur über Nacht inkubiert. Als letzter Schritt erfolgte die Auftrennung im Gel. (à Abb. 8)

2.4.4.1.1 Tabelle V Übersicht Restriktionsanalyse ^{xviii}

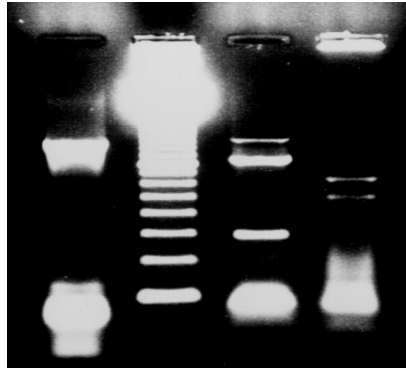
Rezeptor	Enzym	Konzentration	Puffer	Temperatur	Fragmente in BP
SSTR 1	STY I	5 IU/Ansatz	3	37° C	530/679
	BFAi	5 IU/Ansatz	4	37° C	50/299/ 860
SSRT 2	PSP 1406i	5 IU/Ansatz	4	37° C	285/861
	BCL I	5 IU/Ansatz	3	50° C	461/655
SSTR 3	Alu I	5 IU/Ansatz	2	37° C	86/274
	MBO I	5 IU/Ansatz	3	37° C	138/222
SSTR 4	ACC I	5 IU/Ansatz	4	37° C	92/229
	HPH I	5 IU/Ansatz	4	37° C	93/228
SSTR 5(1) ^{xix}	Ban I	5 IU/Ansatz	4	37° C	24/130
	Pvu II	5 IU/Ansatz	2	37° C	44/110
SSTR 5(2) ^{xx}	Aat II	5 IU/Ansatz	4	37° C	267/866
	BstY I	5 IU/Ansatz	4	60° C	86/1047

^{xviii} siehe 7.4 Übersicht der verwendeten Enzyme/Proteine/Puffer

^{xix} Primer(1) für 154 BP Fragment

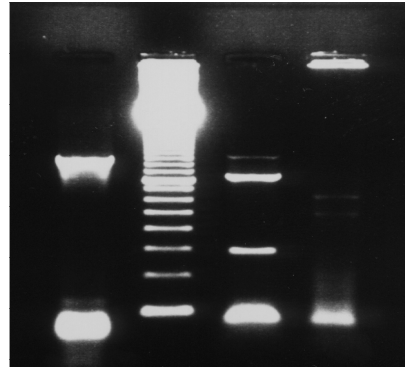
^{xx} Primer(2) für 1133 BP Fragment

Verdaumuster SSTR2 (genomisch)



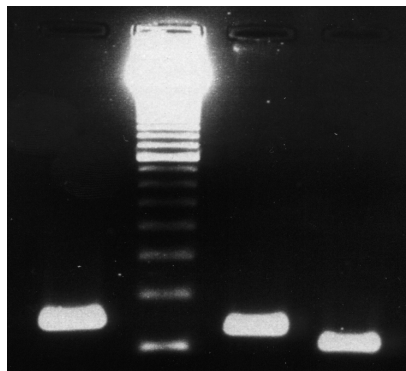
unge-spalten
1146BP
Marker
100BP
PSP1406i
285/861
BCL I
461/655

Verdau SSTR2-PCRprodukt T47D



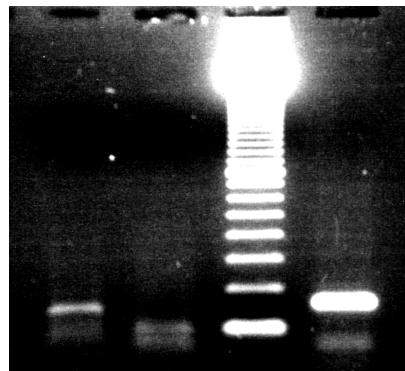
unge-spalten
1146BP
Marker
100BP
PSP1406i
285/861
BCL I
461/655

Verdaumuster SSTR5 kl (genomisch)



ungespalten
154BP
Marker
100BP
Ban I
24/130
Pvu II
44/110

Verdau SSTR5-PCRprodukt kl BON

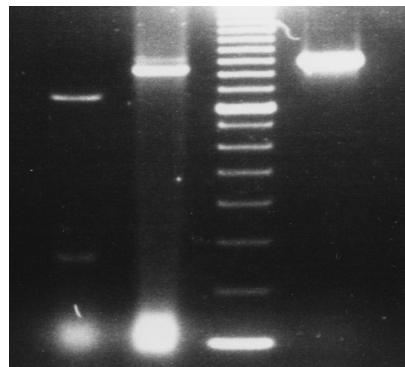


Ban I
24/130
Pvu II
44/110
Marker
100BP
ungespalten
154BP

Abbildung 8: Agarosegelbilder der Restriktionsanalyse der SSTR 2 und 5, sowohl an Amplifikaten aus genomischer DNA, wie auch der Zelllinien T47D (Rez.2) und BON (Rez.5 in beiden Amplikatvarianten)

Enzym
Schnittfragmente

Verdau SSTR5-PCRprodukt groß BON



Aat II
267/866
BstY I
86/1047
Marker
100BP
ungespalten
1133BP

3 Ergebnisse

Das in dieser Arbeit gewonnene Expressionsmuster von Somatostatinrezeptoren in Tumorzelllinien bezieht sich nur auf die RNA-Analyse über RT-PCR mit anschließender analytischer PCR.

3.1 Allgemeine tabellarische Ergebnisübersicht:

Tabelle VI

Zelllinie	Art	Rez. 1	Rez. 2	Rez. 3	Rez. 4	Rez. 5
LCLC-103H	GZ	n	pos	n	n	n
U-1810	GZ	n	pos	n	n	n
LCLC-97TM1	GZ	n	n	n	n	pos
NCI-H23	GZ	n	pos	n	n	pos
DMS79	KZ	n	pos	n	n	pos
NCI-510A	KZ	n	n	n	n	n
NCI-H1092	KZ	n	pos	n	n	pos
NCI-H146	KZ	n	n	n	n	pos
NCI-H187	KZ	n	n	n	n	n
NCI-H526	KZ	n	n	n	n	n
NCI-H60	KZ	n	pos	n	n	n
NCI-H69	KZ	n	pos	n	n	n
NCI-H82	KZ	n	pos	n	n	pos
NCI-H841	KZ	n	pos	n	n	pos
SCLC-24H	KZ	n	pos	n	n	n
SCLC-86M1	KZ	n	n	n	n	n
SW 210.5	KZ	n	pos	n	n	pos
EPLC-272H	epiderm L	n	pos	n	n	pos
A549	adeno L	n	n	n	n	pos
NCI-H125	squam L	n	n	n	n	n
EPLC-32M1	squam L	n	n	n	n	pos

NCI-H157	squam L	n	pos	n	n	n
NCI-H596	squam L	n	n	n	n	pos
U-1752	squam L	n	n	n	n	n
MCF7	Mamma	n	n	n	n	n
MFM223	Mamma	n	n	n	n	pos
T-47D	Mamma	n	pos	n	n	n
Colo 320	Kolon	n	n	n	n	n
CX 1	Kolon	n	n	n	n	pos
HT 29	Kolon	n	n	n	n	pos
SW-403	Kolon	n	n	n	n	pos
ASPC1	Panc	n	n	n	n	pos
Capan2	Panc	n	n	n	n	n
H PAF 2	Panc	n	n	n	n	pos
MIA PaCa-2	Panc	n	n	n	n	pos
Panc1	Panc	n	n	n	n	pos
PA-TU-8902	Panc	n	n	n	n	pos
PA-TU-8988S	Panc	n	n	n	n	pos
PA-TU-8988T	Panc	n	n	n	n	pos
PC 2	Panc	n	n	n	n	pos
PC 44	Panc	n	n	n	n	pos
PC 3	Panc	n	n	n	n	pos
Patho II	Panc	n	n	n	n	n
HEC-1-A	Endometr	n	n	n	n	pos
Ishikawa cells	Endometr	n	pos	n	n	n
EFO-21	Ovar	n	n	n	n	pos
EFO 27	Ovar	n	n	n	n	n
NIH:OVCAR-3	Ovar	n	n	n	n	n
SK-OV-3	Ovar	n	n	n	n	pos
MSTO-211H	Mesothel	n	n	n	n	pos
BON-1	Karzinoid	n	n	n	n	pos

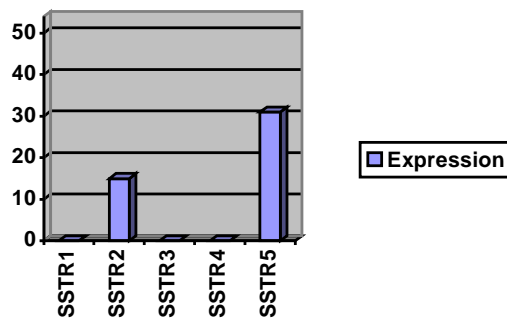
LCC-18	Karzinoid	n	n	n	n	n
LN18	Gliom	n	n	n	n	n

Als Grundlage dieser Ergebnisse diente eine 2facher Analyse aller Zelllinien.

Wenn unterschiedliche Ergebnisse auftraten, wurde für diese Zelllinie eine erneute RT-PCR und Rezeptoranalyse durchgeführt. Dies war allerdings in weniger als 20% aller Versuchsreihen nötig.

Mit dem hier angewandten Untersuchungsverfahren konnten für die 54 Tumorzelllinien nur eine Teilexpression der Rezeptoren 2 und 5 nachgewiesen werden. (à Abb. 9)

Abbildung 9: Graphische Darstellung der Expression von SSTR, bezogen auf alle Zelllinien



Allgemein trugen 15 Zelllinien den Rezeptor 2 und 31 den Rezeptor 5 (bei allen Analysen wurde eine Positivkontrolle mitgeführt und die RNA durch β -Actin auf Funktionsfähigkeit überprüft).

Keine der Zelllinien exprimierte mehr als diese Rezeptoren.

Rezeptor 2 und 5 waren wie folgt verteilt: (à Abb. 10)

8 Zelllinien exprimierten nur den Rezeptor 2, 24 den Rezeptor 5, 7 zeigten beide und 14 keinerlei Rezeptor.

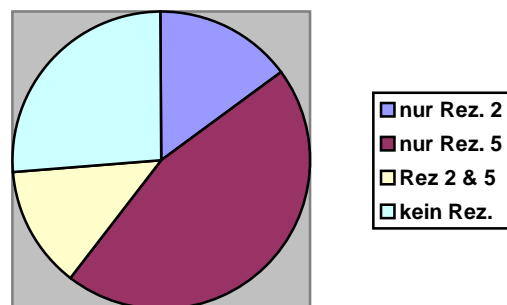


Abbildung 10: Darstellung der Häufigkeit von Rez. 2 und 5 sowie deren Verknüpfungen.

Durch ` Fischers exakten Test ` konnten keine signifikanten Abhängigkeiten der Rezeptorexpressionen 2 und 5 voneinander nachgewiesen werden.

Der Chi-Quadrat-Test ergab aber eine höchst signifikante*** ($p < 0,001$) Expressionswahrscheinlichkeit von Somatostatin-Rezeptoren allgemein. (39/54)

Interessant ist die Tatsache, daß durch den Einsatz eines 2. differenten Primerpaares (Produkt 1133 BP) für den Somatostatin-Rezeptor 5 – mit welchem alle mit dem ersten Primerpaar (Produkt 154 BP) als positiv gewerteten Zelllinien überprüft wurden - eine andere Exressionshäufigkeit ergab.

Es konnte nur für die BON-1 Tumorzelllinie mit beiden Primern eine Expression des Rezeptors 5 nachgewiesen werden.
(à Abb. 11)

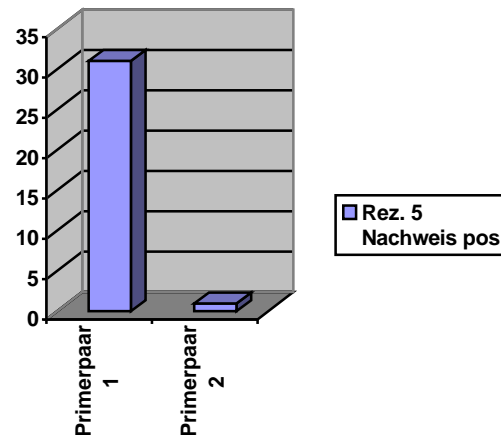


Abbildung 11: Gegenüberstellung der gefundenen Expression von SSTR 5 nach Einsatz von zwei unterschiedlichen Primerpaaren (Fragmentunterschied 1:10)

3.2 Einzelergebnisse

Lungentumore

Insgesamt wurden 24 Lungentumore untersucht.

Darunter waren 4 Großzeller, 13 Kleinzeller und 7 andere Tumore. (à Abb.12)

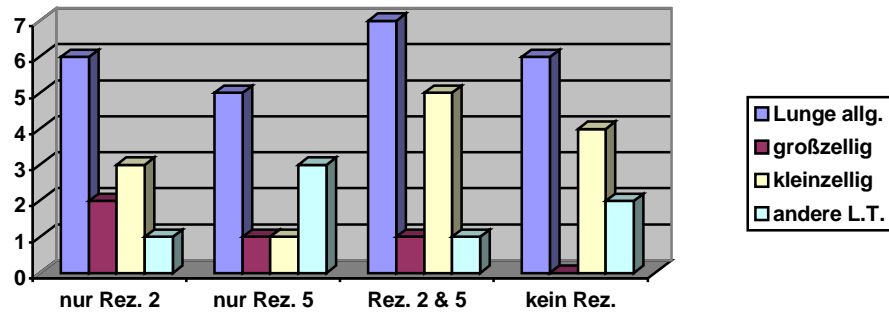


Abbildung 12: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die Lungentumore

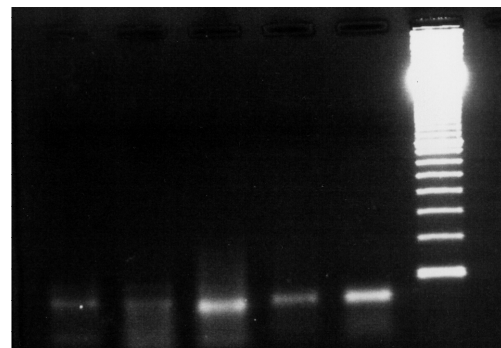
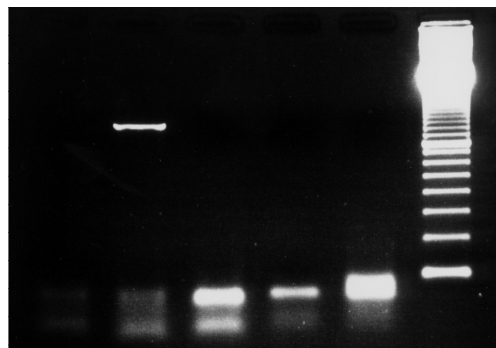
Interessant ist die vermehrte kombinierte Rezeptorexpression der kleinzelligen Tumore. Allerdings stellten sich die, in diesem Diagramm erscheinenden Expressionsunterschiede, im statistischen Test (teilweise aufgrund der zu geringen Fallzahlen) als nicht signifikant heraus. Signifikant* dagegen ist die allgemeine Rezeptorexpression der Lungentumore für Somatostatin bei 18 von 24 Linien mit Rezeptor. ($p=0,014$) (à Abb. 13)

PCR-Ergebniss SSTR 1-5

U-1810+

PCR-Ergebniss (neg. Kontrolle)

U-1810 --



SSTR1

SSTR2

SSTR3

SSTR4

SSTR5

Marker
100BP

SSTR1

SSTR2

SSTR3

SSTR4

SSTR5

Marker
100BP

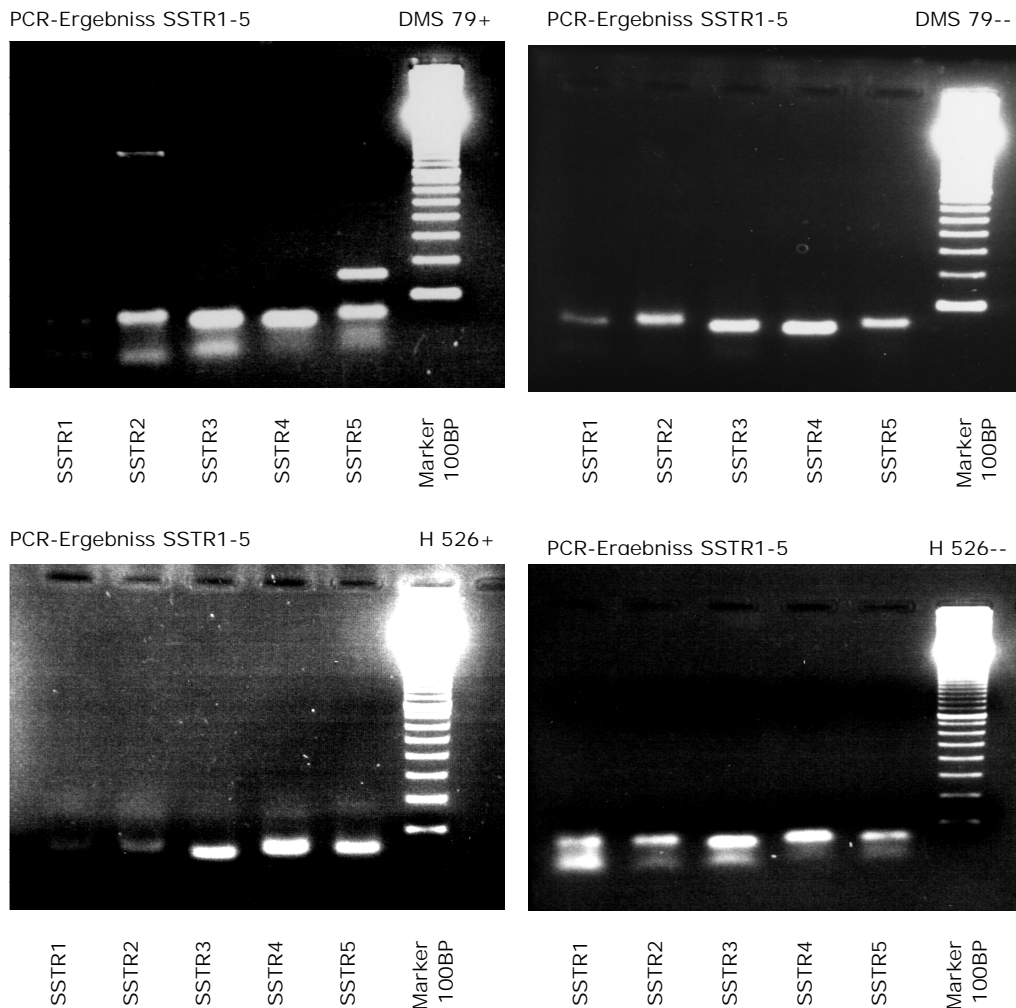


Abbildung 13: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei Lungentumoren; U-1810 (GZ) pos. für Rez. 2; DMS79 (KZ) pos. für Rez 2 und 5; H526 (KZ) neg. für alle Rez.; [links Positivreihe (+), rechts Negativkontrolle (--) -siehe Kapitel 2]

Gynäkologische Tumore

In dieser Arbeit waren auch 9 gynäkologische Tumore vertreten. Es wurden 4 Ovarialkarzinome, 2 Endometrial- sowie 3 Mammatumore untersucht und in (à) Abbildung 14/15 dargestellt.

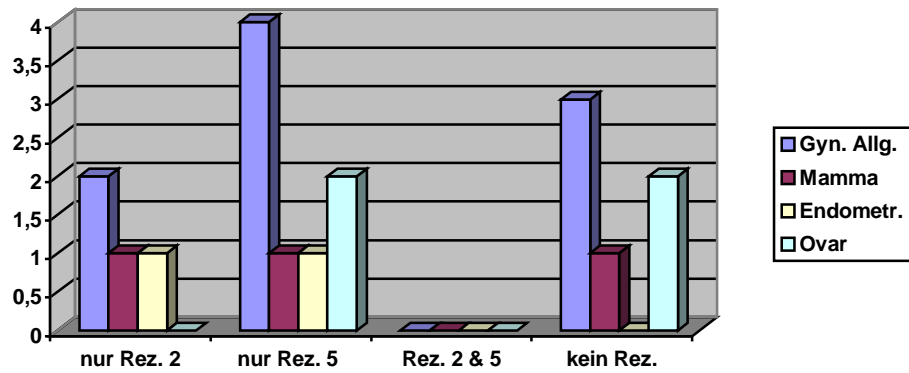


Abbildung 14: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die gynäkologischen Tumore von Mamma, Endometrium und Ovar

Auch im Falle dieser Tumorfamilie konnte durch die geringe Anzahl der untersuchten Tumore kein signifikantes Ergebnis dargestellt werden.

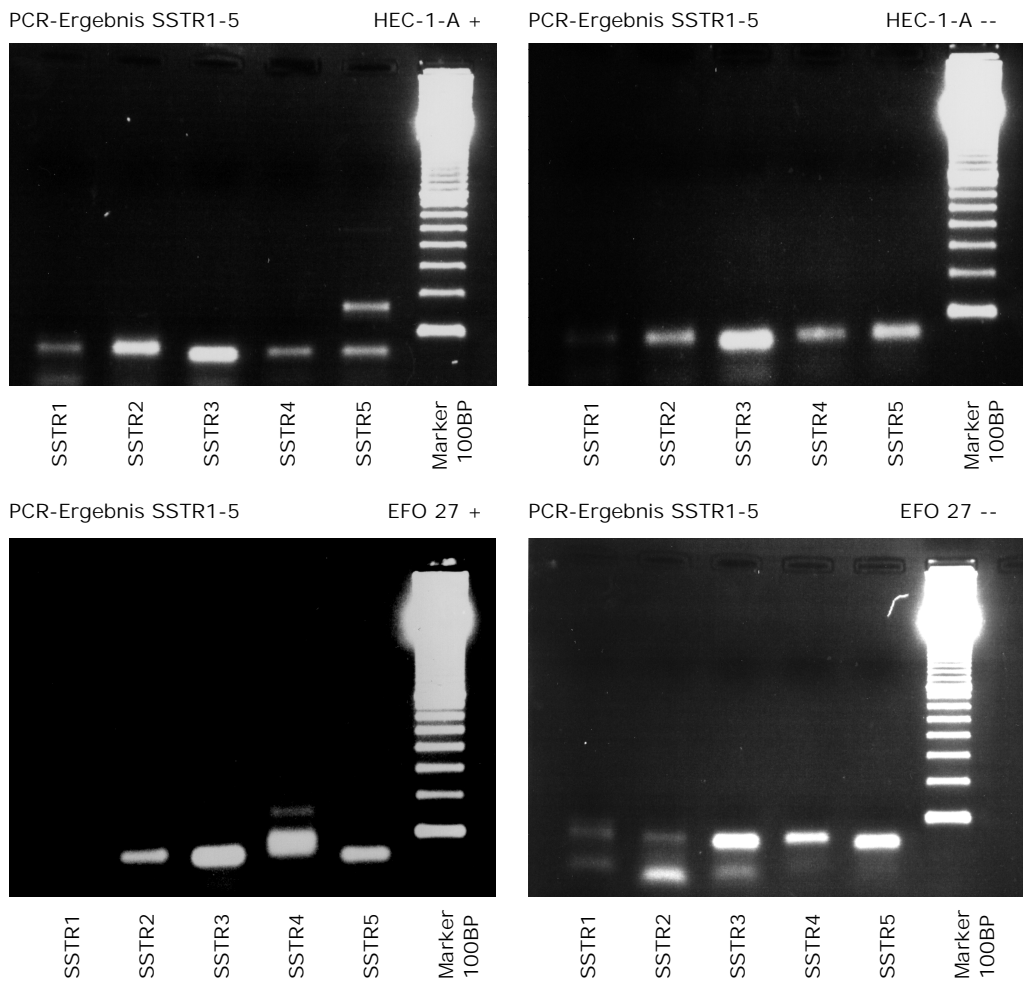


Abbildung 15: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei gynäkol. Tumoren; HEC-1-A (Endom.) pos. für Rez. 5; EFO 27 (Ovar) allg. neg.

Verdauungstrakt

Die hier untersuchten Tumore des Verdauungstrakts waren Kolontumore und 12 Pankreaskarzinome. Im Gegensatz zu allen anderen Tumoren konnte hier, trotz der geringen Fallzahl, eine signifikante alleinige Expression (à Abb. 16) für den Somatostatinrezeptor 5 gefunden werden.

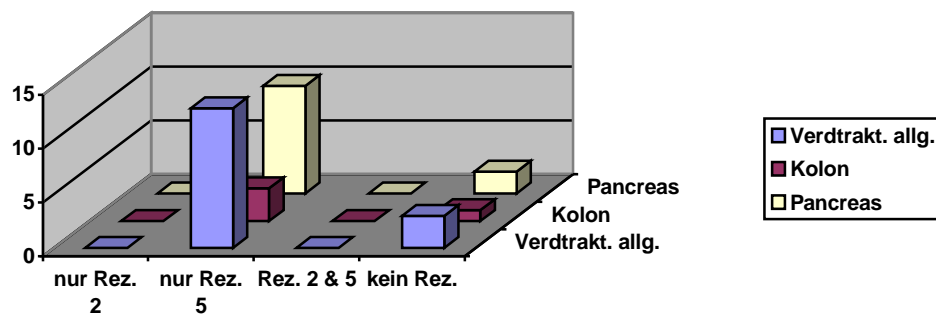


Abbildung 16: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die Tumore der Verdauungsorgane – speziell Kolon und Pankreas

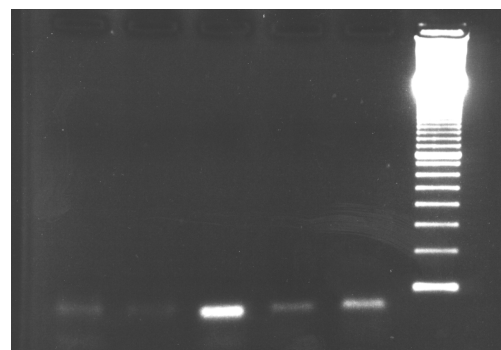
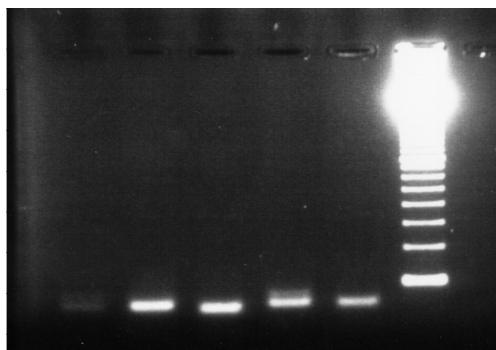
Die alleinige Expression des Rezeptors 5 für die Tumore des Organsystems (à Abb. 17) ist nach dem Chi-Quadrat-Test mit $p < 0,001$ höchst signifikant***. Für die Einzelorgane ist diese Wertung bei Pankreas $p = 0,002$ sehr signifikant** und bei Kolon aufgrund der geringen Fallzahl bei $p = 0,083$ grenzwertig.

PCR-Ergebnis SSTR1-5

Colo 320 +

PCR-Ergebnis SSTR1-5

Colo 320 --



SSTR1
SSTR2
SSTR3
SSTR4
SSTR5
Marker
100BP

SSTR1
SSTR2
SSTR3
SSTR4
SSTR5
Marker
100BP

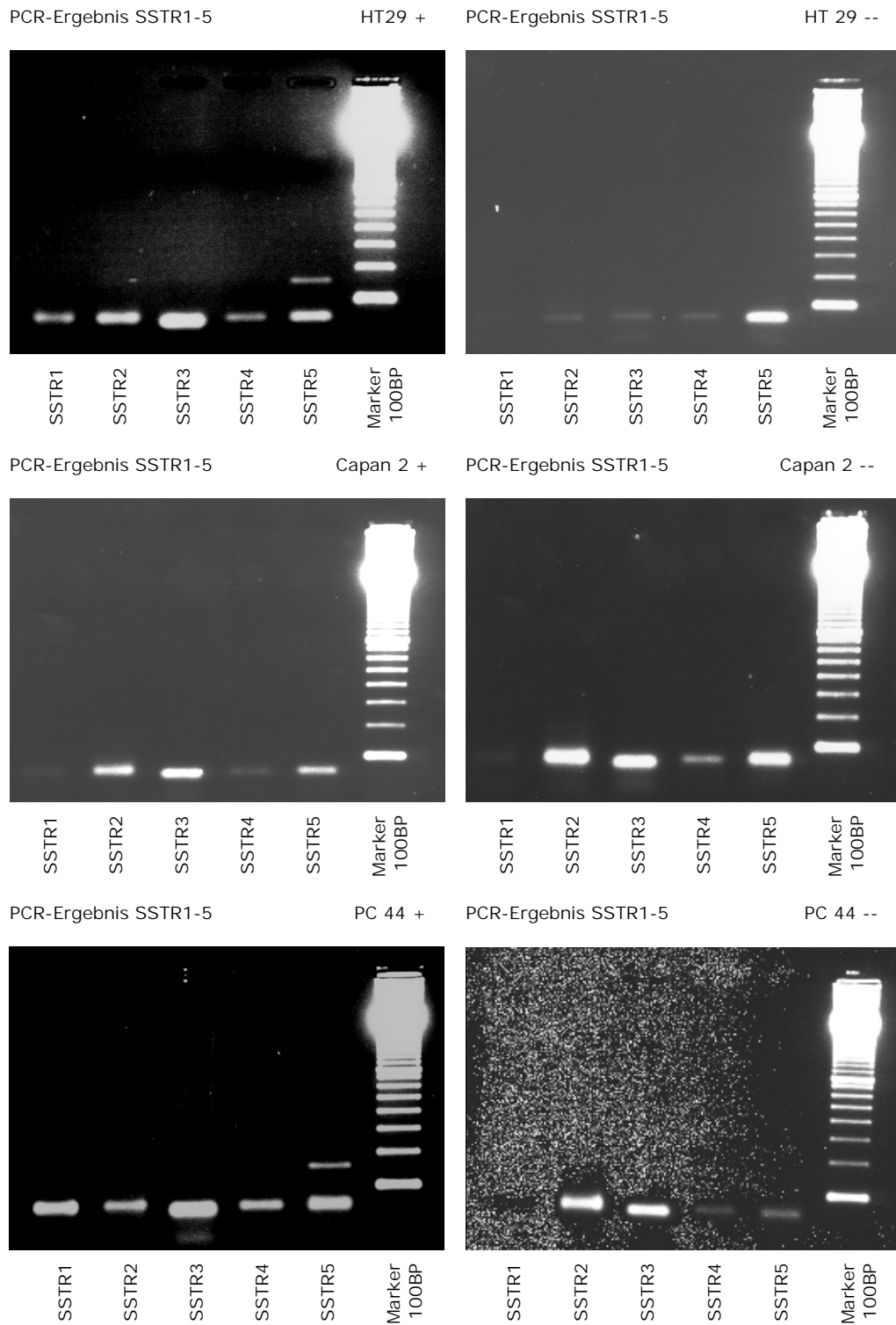


Abbildung 17: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei Tumoren des Verdauungstraktes; Colo320 (Kolon) allgemein neg.; HT29 (Kolon) pos. für Rez. 5; Capan2 (Panc) allgemein neg.; PC 44 (Panc) pos. für Rez.5

weitere Tumore

Für die restlichen Tumorzelllinien ergab sich folgendes Bild:

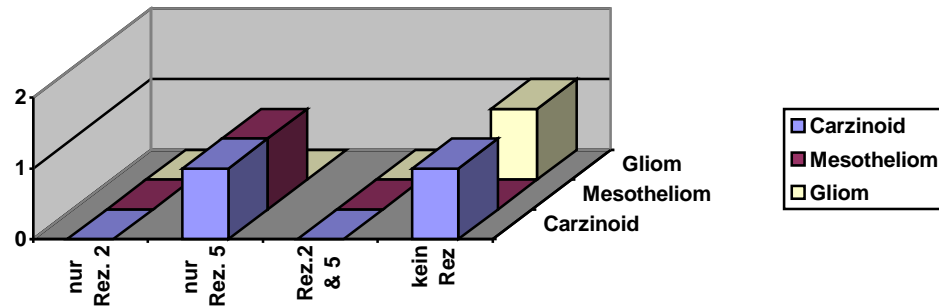
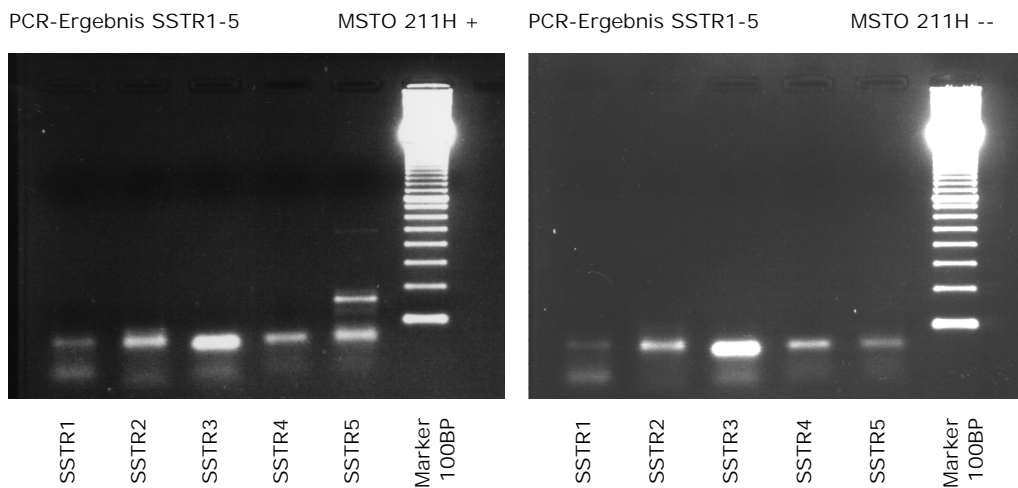


Abbildung 18: Darstellung der Untersuchungsergebnisse für die restlichen, einzelnen Zelllinien (Carzinoid, Mesotheliom, Gliom)

Zu den übrigen untersuchten Zelllinien zählen 2 Karzinoide, und jeweils ein Gliom und Mesotheliom. (à Abb.18) Diese Tumore wurden nur in der Gesamtstatistik mit einbezogen. Die zugehörigen Gelbilder sind in der hier folgenden (à) Abbildung 19 dargestellt.



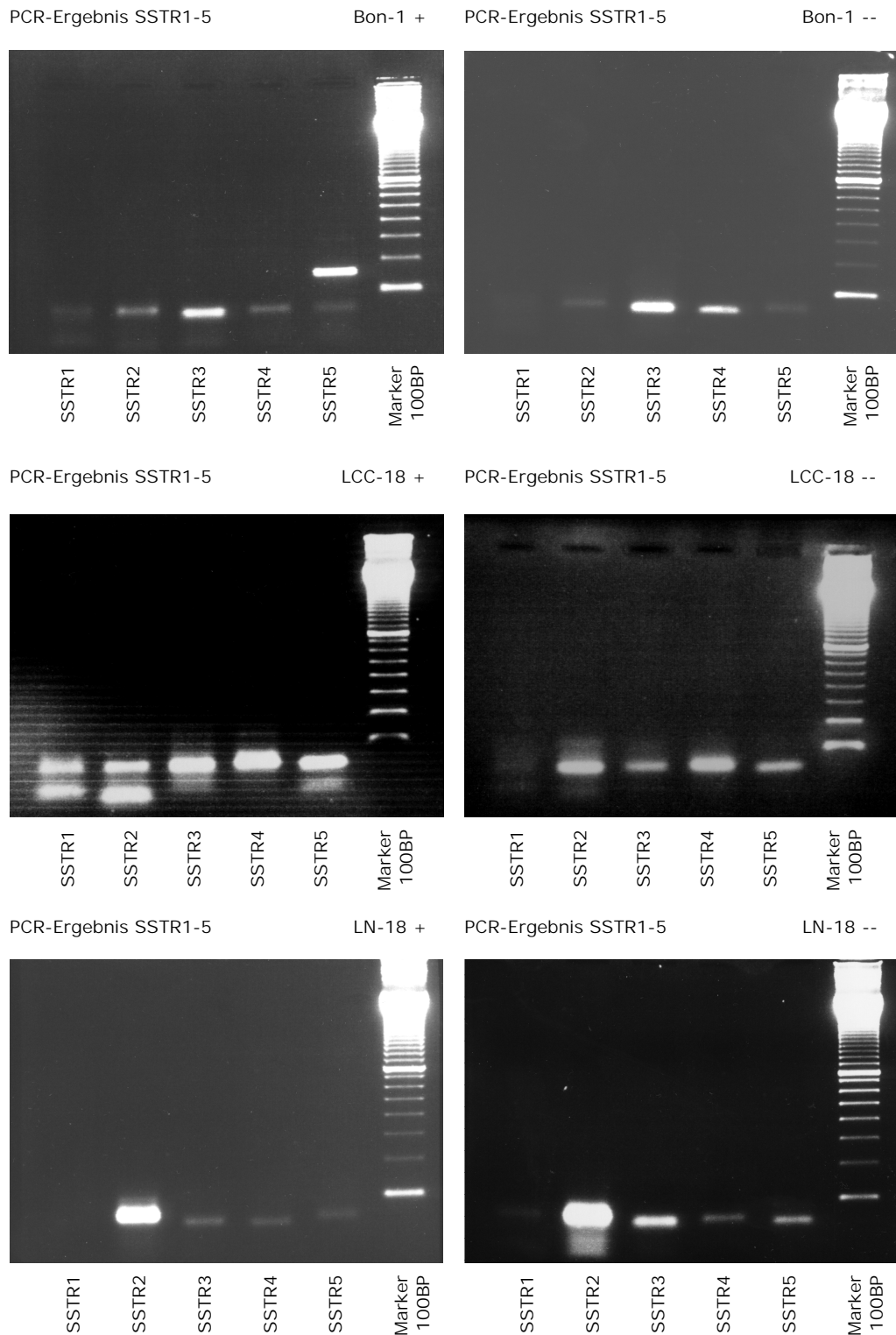


Abbildung 19: Agarosegelbilder zum Nachweis der SSTR 1-5 bei weiteren Zelllinien; MSTO-211H (Mesotheliom), BON-1 (Karzinoid) pos. für Rez. 5; LCC-18 (Karzinoid), LN18 (Gliom) allgemein neg.

4 Diskussion

4.1 Fehlerquellen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse werden in ihrer Allgemeingültigkeit durch folgende Sachverhalte eingeschränkt:

4.1.1 Interpretierbarkeit

Die hier untersuchten Zellen stammen aus Zelllinien und nicht aus frischem Tumorgewebe. Gleichzeitig sind die Ergebnisse nur an einigen existierenden Zelllinien erzielt worden, wobei für einige scheinbar ähnliche Zelllinien schon andere Ergebnisse publiziert wurden. Das Ergebnis dieser Arbeit versteht sich somit nur aus dem Kontext und sollte richtungsweisend bzw. als Grundlagenarbeit verstanden werden.

4.1.2 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammen aus Zelllinien, welche schon vor Jahren hergestellt wurden. Mit jeder Passagierung steigt die Wahrscheinlichkeit von Spontanmutationen, so daß sich die Kluft zwischen den Zellen in vivo und in vitro immer mehr verstärken kann, und Ergebnisse dieser und voriger Arbeiten nicht direkt vergleichbar sein können.

4.1.3 Systemische und Systematische Fehler

Trotz aller Sorgfalt lassen sich systemische und systematische Fehler nicht ganz ausschließen.

Nur knapp ein Drittel der Zellen wurde selbst in Zellkultur geführt und die RNA daraus isoliert. Alle weiteren RNA-Proben kamen von unterschiedlichen Laboren, und somit war die Qualität der Zelllinien und deren Kulturbedingungen nicht klar einzuschätzen. Die Qualität der RNA wurde im Gel überprüft.

Bei allen von uns mehrfach verwendeten Lösungen sind Verunreinigungen und ihr Effekt auf die Kulturzelle sowie das RNA-Präparat nicht klar auszuschließen.

Schwankungen von Medium-pH, der CO₂-Konzentration der Atmosphäre und Zellstreß bei der Passagierung können die Zellen geschädigt oder in ihrem Stoffwechsel beeinflusst haben. Diese Effekte können Veränderungen der Rezeptorexpression der Kulturzellen bewirken.

Um zufällige Fehler bei der Durchführung der PCR auszugleichen, wurden alle Versuche in Doppelbestimmung gemacht.

4.1.4 RNase

Bei der Arbeit auf RNA-Ebene, ist in den Zellen immer mit unspezifischer RNase-Tätigkeit zu rechnen. Die verwendeten Präparationsprotokolle enthalten zwar RNase inaktivierende Schritte und es wurden durch Agarosegel und β -Actin-PCR Qualitätskontrollen durchgeführt, aber inwieweit dennoch Teilmengen der Gesamt-RNA abgebaut wurden, läßt sich nicht feststellen.

4.1.5 residuale genomische DNA

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eingeschleppte- oder residuale DNA-Reste auszuschließen, wurden allen Reaktionen mit vorgeschaltetem DNase-Verdau und mitgeführten Negativkontrollen durchgeführt. Daher ist diese Fehlerquelle nahezu auszuschließen.

4.2 Hauptversuch in kritischer Betrachtung

Nach der Erstellung der cDNA-Sammlung für sämtliche Tumor-Zelllinien wurden die einzelnen Linien auf das Vorhandensein von SSTR-RNA, für jeden Rezeptortyp spezifisch, mittels PCR-Analyse untersucht.

Es konnte eine statistisch signifikante Expression von Somatostatin-Rezeptoren in Tumorzelllinien gefunden werden.

Allerdings wurde für keine der Zelllinien eine eindeutige Expression der Somatostatin-Rezeptor-Typen 1, 3, 4 nachgewiesen - es fand sich also eine alleinige Expression der Rezeptoren SSTR 2 und 5.

Dabei zeigte sich eine ebenfalls statistisch sichere häufigere Expression des Rezeptors SSTR 5. In der Organverteilung konnte man eine spezifische Einzelexpression des SST-Rezeptors 5 im Magen-Darm-Trakt erkennen. Innerhalb der Lunge waren die zwei Rezeptoren in etwa gleich verteilt. Alle anderen Zelllinien tragen nur in ihrer Summe zum Gesamtbild bei, sind aber durch die kleine Zahl pro Organ allein nicht spezifisch aussagekräftig.

Für alle SSTR5 positiven Zelllinien (PCR-Produkt=154 BP (entspricht der VI-Transmembranen Region)) wurden mit einem zweiten Primerpaar (PCR-Produkt=1133 BP (entspricht fast dem gesamten Genom des Rez.)) eine zweite PCR nachgeschaltet, bei dem nur eine Zelllinie (BON) noch einen Expressionsnachweis erbrachte. Die Syntheseprodukte beider Primer sind mit Restriktionsanalyse eindeutig als Rezeptor 5-Fragment identifiziert worden, so daß hier die Expression eines strukturveränderten Rezeptors zu diskutieren ist. Für die Rezeptoren 1 und 2 ist dieses Phänomen nicht auszuschließen (gesuchtes PCR-Produkt=1209 BP bzw. 1146 BP), es wurde aber keine Gegenkontrolle mit Primern für ein kürzeres Fragment durchgeführt. Für SSTR 3 und 4 gab es trotz Analyse mit

Primern für kurze Fragmente (360 BP, 321 BP) keinen Expressionshinweis.

Alle Ergebnisse sind ausschließlich mit der RT-PCR-Technik erarbeitet worden.

Beide gefundenen SST-Rezeptortypen gehören zur gleichen Unterklasse (Rezeptoren vom SSTR2-Typ) und modellieren insbesondere die GH-Sekretion (Patel, 1999⁴⁵). Somit ist anzunehmen, daß diese Rezeptoren zu den allgemein häufigsten Rezeptoren in Tumorzellplasmamembranen zählen.

Die hohe Expressionsdichte an SSTR5 in Pankreastumoren deckt sich mit der engen spezifisch-selektiven Kopplung an den Insulinhaushalt.

Das komplette Fehlen der anderen Rezeptorsubtypen ist erstaunlich, jedoch, soweit es durch Positiv-Kontrollen und funktionellem cDNA/RNA-Test über β -Actinnachweis überprüfbar war, nicht versuchsbedingt.

4.3 Ergebnisse im Kontext

Als 1978 von Schonbrunn¹⁹ zum ersten Mal in der Hypophysen-Tumorzelllinie GH₄C₁ durch Bindungsanalyse ein Rezeptor des Hormons Somatostatin beschrieben wurde, wußte keiner, welches hochkomplexes Rezeptorsystem, aus einer Kombination von mindestens 5 ähnlichen Rezeptoren, für dieses Hormon sich dahinter verbarg.

Hormone, welche direkt in die Zellproliferation eingreifen, bieten bei dem heutigen Stand der Wissenschaft eine breite Front an diagnostischen und therapeutischen Ansatzmöglichkeiten.

Schon seit den achtziger Jahren wächst die Bedeutung von Somatostatin und seinen Analoga zunehmend. Während bei dem Einsatz als Therapeutikum die Effekte sichtbar werden, ist bei der diagnostischen Verwendung das Ergebnis kritischer zu sehen. Visualisationen von Tumoren in vivo durch nuklear-

medizinische Methoden unter der Verwendung von radioaktiv markierten Somatostatin-Analoga (Reubi 1987⁵²; Krenning 1989⁵³; 1993⁵⁴) erfassen immer nur die Tumore, welche Rezeptoren für dieses Analoga- in diesem Falle SSTR2 und 5 exprimieren. Andere Subklassen bzw. Tumore, ohne Rezeptor-Expression, werden nicht erfaßt. Da bei maligner Entartung die Expressionseigenschaften der Zellen in Bezug auf SSTR veränderlich sein können - wie von Buscail⁵⁵ (an Pankreas- und Kolontumoren) und von Sinisi⁵⁶ (bei Prostata) beschrieben - ist im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit (geringere Expressionshäufigkeit als angenommen und Unterschiede der Ergebnisse bei verschiedenen PCR-Fragmentlängen), die Frage nach der Reliabilität dieser diagnostischen Methoden zu stellen. Hierzu gehört auch die Frage, in wieweit man von einer Bindung auf eine intrazelluläre Funktionsfähigkeit des Rezeptors schließen kann.

Grundlegend allerdings deckt sich die, in den Zelllinien gefundene Hauptexpression der Rezeptoren 2/5, mit der Wirksamkeit der Octreotide in Arbeiten der anderen Arbeitsgruppen. Aufgrund der von uns gefundenen deutlichen Unterschiede zwischen den Gewebearten, ist eine bessere Kenntnis des Expressionsverhaltens der Tumore allerdings absolut notwendig. Da diese Arbeit als Grundlagenforschung gedacht ist und wir daher ausschließlich Tumorzelllinien untersucht haben, ist die Übertragbarkeit auf frisches Tumorgewebe, aus den im vorigen Abschnitt genannten Gründen, natürlich mit in die Betrachtung einzubeziehen. Die Expression des Rez. 5 wurde von anderen Arbeitsgruppen für Tumore im Durchschnitt mit ca. 55,5% angegeben, welches auch unseren Beobachtungen bei den Zelllinien entspricht, solange man die Ergebnisse für die RT-PCR mit kurzem Fragment beurteilt. Für SSTR 2 lag der Wert bei ca.84% welches ein Dreifaches unseres Wertes (24%) darstellt.

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen konnten aber auch Expressionen der anderen Rezeptoren, besonders SSTR1 und 4, nachgewiesen werden.

Betrachtet man nun ausschließlich Ergebnisse hinsichtlich auch in dieser Arbeit verwendeter Zelllinien (Eden 1993²⁸ – H69; H187; A549; MCF7/ Buscail⁵⁴ 1996 – Capan 2; MiaPaCa/ Fisher³² 1996 – Capan2; MiaPaCa; Panc1/ Jonas²⁸ 1995 – Bon/ Hatzoglou³⁰ 1995 – T47D), so liegt die Übereinstimmung der Ergebnisse bei ca. 55,5 %. Dabei wurden von uns allerdings nie neue positive Ergebnisse gefunden. Auch die als positiv beschriebenen Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen konnten, durch unserer Analyse in 44,5 % der Fälle, nicht nachvollzogen werden.

Diese Unterschiede sind unklar, beruhen aber sehr wahrscheinlich auf den unterschiedlichen angewandten experimentellen Verfahren oder der höheren Passagen unserer Linien. Neben differenter Methoden zur RNA-Extraktion (Eden RNA Isolation Kit MRC Inc. USA; Fisher TRIzol; Jonas CSCL-Präparation) wurden auch keine mit uns übereinstimmenden PCR-Primer angewandt.

Gleichzeitig führten Jonas, Fisher und Hatzoglou keine DNase-Behandlung der RNA durch, um DNA-Reste zu entfernen.

Besonderes Augenmerk wurden den Arbeiten von Hatzoglou (T47D) und Buscail (Capan 2; MiaPaCa) gewidmet.

Die Arbeit mit T47D ähnelt bei dieser Arbeitsgruppe der unsrigen in einigen Teilen sehr. Die Ergebnisse der PCR sind dabei fast identisch, wobei die ca. 11 % SSTR 3 RNA von uns nicht gefunden wurde. Dies kann aber durch die nur bei diesem Rezeptor verwendeten, extrem langen PCR-Schritte (annealing bei 67° C / 240 s, 40 Zyklen) bei fehlender DNase-Behandlung der RNA in dieser Arbeitsgruppe verfälscht sein.

Buscail konnte für seine untersuchten Zelllinien wesentlich mehr Rezeptoren nachweisen als wir. Bei gleicher RNA-Präparation und anschließendem DNase-Verdau sind die Differenzen wahrscheinlich in den Chargen der Zelllinien, oder aber in der unterschiedlichen Primerlage innerhalb des Genoms zu erklären. Die von uns gefundenen Expressionshäufigkeiten sind in ihrer Differenz von 24% (SSTR 2) zu 55% (SSTR 5) im Kontext zu Teijero (Teijero 2002⁵⁷) auffällig. Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass es einen von Bax und p53/p73 (Apoptosemechanismus SSTR 3) unabhängigen Apoptoseinduktionsweg gibt, welcher über SHP-1^{xxi} und seine Kopplung an SSTR 2 abläuft. In singular SSTR 2 exprämierenden, p53/p73-freien HL-60 Zellen, konnte Apoptose ausgelöst werden. Somit lässt sich, wie bei SSTR 3, ein Rezeptorsuppressionsvorteil ableiten - bei allerdings bestehender Abhängigkeit einiger Zellformen an SSTR 2.

^{xxi} SHP-1 eine zytoplasmatische Phosphotyrosin-Phosphatase

4.4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

Der in den Zelllinien vorherrschende Subtyp an Somatostatinrezeptoren, sind die oktreotidempfindlichen Rezeptoren - also SSTR 2 und SSTR 5.

Andere Subklassen konnten nicht in den Zelllinien gefunden werden.

Somit ist das Expressionsmuster der SST-Rezeptoren in malignen Zellen different zu dem biologisch gesunden Ursprungsgewebe. Somatostatin ist ein inhibitorisches Hormon mit cell arrest Funktion. Daher scheinen eine Veränderung des Expressionsmusters und -vielfalt den Zellen einen Vorteil zu verschaffen. Ausgehend von diesem Gedanken lässt sich aus dem Kontext anderer Arbeiten die hohe Expression des SSTR 5 - als ungefährlicher Rezeptor- und die Suppression von SSTR 2 - apoptotische Potenz- sowie das Fehlen von SSTR 3 - Apoptoseinduktion- verstehen.

Das Fehlen der SSTR 1 - Klasse (SSTR 1 und 4) sollte dazu ebenfalls weiter untersucht werden.

Angesichts der Tatsache, dass dennoch eine allgemeine Signifikanz der SSTR-Expression in Tumorzellen nachweisbar ist, muß hier eine gewisse Abhängigkeit der Zellen an Somatostatin angenommen werden - gerade in Bezug zu SSTR 2 (Expression trotz apoptotischer Potenz). Bezogen auf die intrazellulären Effekte der Rezeptoren, scheint dies die Abhängigkeit an die SSTR 2-Klasse mit besonders enger Kopplung an GH zu sein.

Aus dieser Arbeit lassen sich somit folgende Arbeitsansätze ableiten:

Die Expression des SSTR scheint in den einzelnen Geweben nach Art und Dichte stark zu variieren. Eine genaue Studie des

Expressionsverhaltens der einzelnen Gewebe ist somit für eine medizinische Nutzung des Hormons und seiner Analoga in Therapie und Diagnostik unabdingbar.

Das absolute Fehlen von SSTR 3 in Tumorgewebe und seine hohe apoptotische Potenz können einen gentherapeutischen Ansatz bieten. Die therapeutische Induktion des Rezeptors könnte, durch die dabei erreichte Apoptoserate, zu einer besseren Kontrolle der Tumore führen. Diese Hypothese sollte in weiteren Arbeiten in vitro/vivo überprüft werden.

Bei hoher, gesicherter Expressionsrate von SSTR wäre, durch selektive Liganden, auch eine verbesserte Diagnostik und Therapie denkbar.

Da für SSTR 2 eine apoptotische Potenz nachweisbar ist¹ und ein Teil der Zellen diesen Rezeptor exprimiert, kann langfristig auch hier ein therapeutisch bedeutender Ansatz vermutet werden.

5 Tabellen und Lösungen

5.1 Zelllinien - Charakterisierung und Herkunft

5.1.1	Tabelle VII Zelllinien: 103H, H661, U-1810, 97TM1, H23, DMS79, 510A	76
5.1.2	Tabelle VIII Zelllinien H1092, H146, H187, H526, H60, H69, H82, H841, 24H	77
5.1.3	Tabelle IX Zelllinien 86M1, 272H, A549, H125, EPLC-32M1, H157, H596	78
5.1.4	Tabelle X Zelllinien U-1752, MCF-7, MFM-223, T-47D, Colo-320, CX-1, HT-29, SW-403, ASPC-1	79
5.1.5	Tabelle XI Zelllinien Capan-2, H-Paf-2, MiaPaCa-2, PaTu-8902, PaTu-8988s, PaTu-8988t, PC II	80
5.1.6	Tabelle XII Zelllinien PC 44, PC III, HEC-1-A, EFO-21, EFO-27, NIH-Ovar-3, SK: Ovar-3, MSTO-211H	81
5.1.7	Tabelle XIII Zelllinien Bon-1, LCC-18, LN-18, PATHO II, Ishikawa cells, SW-210.5	82

5.1.1 Tabelle VII Zelllinien: 103H, H661, U-1810, 97TM1, H23, DMS79, 510A

Zelllinie	Gewebeart	Alter/ Ge- schlecht	Herkunfts- gewebe	Bemerkung	Code	Quelle
LCLC-103H	großzelliges Lungen Ca	61/m/k	Pleuraerguß – Punktat	mit RieBenzellen, post Therapie Chemo/Bestrahlung	d ACC 384	Beppler G et al. ⁵⁸
U-1810	großzelliges. Lungen Ca	33/m/k	pleurales Punktat bei primärem Lungentumor	produziert Somatostatin		Bergh J et al. ⁵⁹
LCLC-97TM1	großzelliges Lungen Ca	44/m/k	Xenotransplantat des primären Tumors	prä Therapie		Beppler G et al. ⁵⁸
NCI-H23	großzelliges Lungen Ca AdenoCA	51/m/ afrikanisch		prä Therapie	a CRL- 5800	Gazdar AF et al. ⁶⁰
DMS 79	kleinzelliges Lungen Ca	65/ /k	Pleuraerguß – Punktat	post Therapie (Cytosan, Vincristin, Methotrexat und Bestrahlung)	a CRL- 2049	Pettengill OS et al. ⁶¹
NCI-510A	kleinzelliges Lungen Ca	56/m/k	Knochenmarks- metastase	extrapulmonale Metastase (Nebenniere)	a HTB- 184	Carney DN et al. ⁶²

5. 1.2 Tabelle VIII Zelllinien H1092, H146, H187, H526, H60, H69, H82, H841, 24H

NCI -H1092	kleinzelliges Lungen Ca	67/m/k	Metastase im Knochenmark	schnell wachsend, mit 120 packyears. stage E	Carney DN et al. ⁶³
NCI -H146	kleinzelliges Lungen CA	59/m/k	Pleura-punktat	prä Therapie	Carney DN et al. ⁶²
NCI -H187	kleinzelliges Lungen CA	47/m/k	Pleura-punktat	prä Therapie	Carney DN et al. ⁶²
NCI -H526	kleinzelliges Lungen CA	55/m/k	Knochenmarks metastase	prä Therapie	Carney DN et al. ⁶²
NCI -H60	kleinzelliges Lungen CA	51/w/k	Pleura-punktat	post Chemo/Bestrahlung Raucher 53 packyears. stage E	Carney DN et al. ⁶³
NCI -H69	kleinzelliges Lungen CA	55/m/k		aneuploid	Gazdar AF et al. ⁶⁰
NCI -H82	kleinzelliges Lungen CA	40/m/k	Pleura-punktat	Morphologie des originalen Tumors nicht charakteristisch auf SCLC	Carney DN et al. ⁶²
NCI -H841	kleinzelliges Lungen CA	51/m/k	Lymphknoten-metastase	post Chemo/Bestrahlung Raucher 70 packyears Stage L	Carney DN et al. ⁶³
SCLC-24H	kleinzelliges Lungen CA	55/m/k	Pleura-punktat	post Chemo/Bestrahlung oat cell typ	Bepler et al. ⁶⁴

5.1.3 Tabelle IX Zelllinien 86M1, 272H, A549, H125, EPLC-32M1, H157, H596

SCLC-86M1	kleinzelliges Lungen CA	74/f/k	Pleurapunktat	prä Therapie oat cell typ	Bepler et al. ⁶⁴
EPLC-272H	kleinzelliges Lungen CA	57/m/k	Primärtumor	prä Therapie undifferenzierte squamous- Zell Ca	Bepler & Koehler ⁶⁵ ACC 383
A549	epidermoides Lungen CA	58/m/k	Primärtumor re. unt. Lappen	produziert Surfactant	Lieber M et al. ⁶⁶ ACC 107
NCI -H125	AdenoCA Lunge				Giard, D et al ⁶⁷
EPLC-32M1 (EPLC-32H)	Plattenepithel CA Lunge	32H: 68/m/k	Xenotransplantat von EPLC-32H in Passage 15	undifferenziert (32H: prä Therapie, moderat differenziert)	Bepler, G et al. ⁵⁸
NCI -H157	Plattenepithel CA Lunge	59/m/k	Pleurapunktat	prä Therapie	Banks- Schlegel SP et I. ⁶⁸ a CRL- 5802
NCI -H596	Plattenepithel CA Lunge	73/m/k	Tumormasse in Brustwand Adenosquam.CA	präTherapie Zellen zeigen multiple Marker der squam. Differenzierung	Banks- Schlegel SP et al. ⁶⁸ a HTB- 178

5.1.4 Tabelle X Zelllinien U-1752, MCF-7, MFM-223, T-47D, Colo-320, CX-1, HT-29, SW-403, ASPC-1

	Plattenepithel CA Lunge	39/m/K	Pleurapunktat bei prim. Tumor	Kolonie bildend	Bergh J et al ⁶⁹
U-1752	Mamma Adeno- karzinom	69/w	Pleurapunktat	post Chemo/ Bestrahlung	Soule HD et al. ⁷⁰
MCF-7	Mamma Adeno- karzinom	69/w	Pleurapunktat	post- menopausal	ACC 115
MFM-223	Mamma Adeno- karzinom		Pleurapunktat		Hackenberg et al. ⁷¹
T-47D	Mamma- karzinom	54/w	Pleurapunktat bei infil- tierendem duktalem CA		Keydar I et al. ⁷²
Colo 320	Kolon Adeno- karzinom	55/w	Sigmoid	Hormon- produzierend (ACTH; PTH)	Quinn et al. ⁷³
CX1k	Kolon Adeno- karzinom	44/w	Primärtumor	gut differenziert	Goldin et al. ⁷⁴
HT-29	Kolon Adeno- karzinom	44/w	Primärtumor	Urokinase- rezeptoren	Fogh & Trempe ⁷⁵
SW-403	Kolon Adeno- karzinom	51/w/k	Primärtumor	Grad III	Leibovitz et al. ⁷⁶
ASPC-1	Pankreas Adenokarzinom	62/w/k	Aszitespunktat	unterschiedliche diff. Stadien	Chen WH et al. ⁷⁷

5.1.5 Tabelle XI Zelllinien Capan-2, H-Paf-2, MiaPaCa-2, PaTu-8902, PaTu-8988s, PaTu-8988t, PC II

Capan 2	Pankreas Adeno-karzinom	56/m/k	produziert Mucin d (apo-mucin, MUC-ACC 245 1, MUC-2)	dahiya R et al. ⁷⁸
H-Paf 2	Pankreas Adeno-karzinom	44/m/k	spont. Variante von HPAF-I unlim.replik. Mögl.	Kim YW et al. ⁷⁹
MIA PaCa-2	Pankreas CA	65mk	sensibel zu Asparaginase	Yunis AA CRL-1420 et al. ⁸⁰
Panc 1	Pankreas CA	56/m/k	epitheloides CA, duktales Gewebe	Lieber M CRL-1469 et al. ⁸¹
PaTu-8902	Pankreas Adeno-karzinom	44/w/k	primär duktales Adeno-karzinom (Grad II)	starke metastatische Potenz Elsässer et al. ⁸²
PaTu-8988s	Pankreas Adeno-karzinom	64/w/k	Lebermetastase bei primärem Adenokarzinom	Schwesterlinie: PA-TU-8988T, ACC 204 (DSM ACC 162) Elsässer et al. ⁸³
PaTu-8988t	Pankreas Adeno-karzinom	64/w/k	Lebermetastase bei primärem Adenokarzinom	Schwesterlinie: PA-TU-8988S (DSM ACC 204) Elsässer et al. ⁸³
PC II	Pankreas Adeno-karzinom	57/m/k	Primärtumor	niedrig differenziert Bülow et al. ⁸⁴

5.1.6 Tabelle XII Zelllinien PC 44, PC III, HEC-1-A, EFO-21, EFO-27, NIH-Ovar-3, SK:Ovar-3, MSTO-211H

PC 44	Pankreas Adeno CA	keine Literatur veröffentlicht	Bülow et al. ⁸⁴
PC III	Pankreas Adeno CA	73/w/k Primärtumor	Bülow et al. ⁸⁴
HEC-1-A	Endo- metrium Adeno CA	71/w Patient mit stage IA endometrialem Ca	a Kuramoto HTB-112 H et al. ⁸⁵
EFO-21	ovariales Zystadeno CA	56/w Aszitespunktat	d Simon et ACC 235 al. ⁸⁶
EFO-27	ovariales Zystadeno CA	36/w solide omentale Metastase (papilläres CA des Ovars)	d Simon et ACC 191 al. ⁸⁶
NIH:Ovar-3	ovariales Adeno CA	60/w/k Aszitespunktat	a Hamilton HTB-161 TC et al. ⁸⁷
SK:Ovar-3	ovariales Adeno CA	64/w/k Aszitespunktat	a Fogh J ⁸⁸ HTB-77
MSTO-211H	Meso- theliom (biphasig)	62/m/k Pleurapunktat bei vorhandenem metastatischem Bezirk	d Bepler G ACC 390 et al. ⁵⁸

Resistent zu Tumor-
nekrosefaktor/zyto-
tox.Med.(diphtheria-
toxin, cis-Platin)

prä Therapie

5.1.7 Tabelle XIII Zelllinien Bon-1, LCC-18, LN-18, PATHO II, Ishikawa cells, SW-210.5

Bon-1	Karzinoid (neuroendokrine Zelllinie)	28/m	Lymphknotenspecimen eines metastasierenden Karzinoidtumors des Pankreas	neuroendokrin	89
LCC-18	Karzinoid (neuroendokriner Kolon Tumor)	27/m/austral	primärer Kolontumor	neuroendokrine Differenzierung. prior Therapie, Sarkoidosepatient	Lundqvist, M. et al. ⁹⁰
LN-18	malignes Gliom	61/m	primärer Tumor der rechten temporalen Region	gering differenziert Grade IV	Diserens, A.C. et al. ⁹¹
Patho II	Pankreas AdenoCA		keine Literatur veröffentlicht		
Ishikawa cells	endmetriales AdenoCA	39/w/A		Steroidrezeptoren (Östrogen Progesteron)	Nishida, M. et al. ⁹²
SW-210.5	kleinzelliges LungenCA				Kerbel et al ⁹³

5.2 Lösungen

DNA-Loading Buffer (10 ml)

8	ml	Formamid	
1	ml	TE-Puffer	
0,5	ml	Bromphenol Blue-Xylene Cyanole dyeSolution	
0,5	ml	autoklaviertes Wasser	

PBS-EDTA 1fach - Puffer

0,54	mM	EDTA	
2,7	mM	Kalium-Chlorid	(KCl)
1,47	mM	Kalium-Dihydrogenphosphat	(KH ₂ PO ₄)
137,0	mM	Natrium-Chlorid	(NaCl)
6,45	mM	diNatrium-Hydrogenphosphat	(Na ₂ HPO ₄)

eingestellter pH 7,4 (mit Natronlauge (NaOH))

PBS 1fach - Puffer

2,7	mM	Kalium-Chlorid	(KCl)
1,47	mM	Kalium-Dihydrogenphosphat	(KH ₂ PO ₄)
137,0	mM	Natrium-Chlorid	(NaCl)
6,45	mM	diNatrium-Hydrogenphosphat	(Na ₂ HPO ₄)

eingestellter pH 7,4 (mit Natronlauge (NaOH))

5fach RT-Puffer

125	mM	TRIS-PufferANTris-(hydroxylmethyl)aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	
188	mM	Kalium-Chlorid	(KCl)
7,5	mM	Magnesium-Chlorid	(MgCl ₂)
25	mM	DTTDithiothreitol	(C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)

eingestellter pH 8,3 (mit Natronlauge (NaOH))

1fach DNase I -Puffer

40	mM	TRIS-PufferANTris-	
		(hydroxylmethyl)aminomethan	(C ₄ H ₁₁ NO ₃)
6	mM	Magnesium-Chlorid	(MgCl ₂)
2	mM	Kalzium-Chlorid	(CaCl ₂)

eingestellter pH 7,5 (mit Natronlauge (NaOH))

1fach TE-Puffer

10	mM	TRIS-PufferANTris-	
		(hydroxylmethyl)aminomethan	(C ₄ H ₁₁ NO ₃)
1	mM	EDTANa ₂	(C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ 2H ₂ O)

eingestellter pH 7,5 (mit Natronlauge (NaOH))

3M Natrium-Acetat-Lösung

3mol		Natriumazetat wasserfrei	(CH ₃ COONa)
1 l		biDest - Wasser	(H ₂ O)

eingestellter pH 5,2 (mit Konz. Essigsäure)

HITES -Medium

500	ml	RPMI - Medium mit Glutamin	
5	%	fötale Kälberserum	
1,8	µg	Hydrokortisol	
0,67	mg	Insulin	
20	mg	Transferrin	
0,55	µg	17-β-Estradiol	
1,93	µg	Natrium-Selenium	
100	U/ml	Penicillin	
100	mg/ml	Streptomycin	

5.3 Chemikalien/Enzyme/Proteine/Puffer

5.3.1 Tabelle XIV verwendete Chemikalien 1

Chemikalie	Formel	Molekular- Gewicht	Qualität	Lieferant	Verwendung
Salzsäure	HCl	36,46 g/mol	p. a. 25%	Merck	DNase I-Puffer RT-Puffer
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	60,05 g/mol	min. 99,8%	Riedel-de Haen	RNA-Präparation
Natronlauge	NaOH	40,00 g/mol		Merck	Puffer- einstellung
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ • 2H ₂ O	147,02 g/mol	p. a.	Merck	DNase I-Puffer
Magnesiumchlorid- hexahydrat	MgCl ₂ • 6H ₂ O	203,30 g/mol	p. a.	Merck	DNase I-Puffer RT-Puffer
Kaliumdihydrogen- phosphat	KH ₂ PO ₄	136,09 g/mol	p. a.	Merck	PBS-EDTA für Zellkultur
diNatriumhydrogen- phosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	177,99 g/mol	p. a.	Merck	PBS-EDTA für Zellkultur
Natrium-Chlorid	NaCl	58,44 g/mol	p. a.	Merck	PBS-EDTA für Zellkultur
Kalium-Chlorid	KCl	74,56 g/mol	p. a.	Merck	RT-Puffer PBS-EDTA für
Natriumacetat wasserfrei	CH ₃ COONa	82,03 g/mol	p. a.	Roth	RNA-Präparation

5.3.2 Tabelle XV verwendete Chemikalien 2

TRIS-PufferAN Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	121,14 g/mol	≥99,7% p.a.	Roth	DNase I-Puffer RT-Puffer TE-Puffer
EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$ Ethylenediamin tetraacetic acid	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ $2H_2O$	372,24 g/mol	≥99,0% p.a.	Sigma	TE-Puffer PBS-EDTA für Zellkultur
10xTBE-Puffer	1M TRIS; 0,9M Borsäure; 0.01M EDTA		Ultra Pure	Life- techno- logies	Agarose-Gele
Bromphenol Blue-Xylene Cyanole dye Solution			lyophilized powder	Sigma	DNA-Loading Buffer
Formamid	CH_3NO	45,05 g/mol	≥99% Ultra Pure	Life- techno- logies	DNA-Loading Buffer
Ethanol absolut	C_2H_6O	46,07 g/mol	p.a.	Riedel-de Haen	RNA-Präparation
Isopropanol	C_3H_8O	60,10 g/mol	für molekular Biologie	Sigma	RNA-Präparation

5.3.3 Tabelle XVI verwendete Chemikalien 3

Chloroform	CHCl ₃	119,38 g/mol	p.a.	Merck	RNA-Präparation
Phenol/Chloroform	Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol 25:24:1 in TE-Puffer		Für molekular Biologie	Roth	RNA-Präparation
Agarose			for routine use	Sigma	Agarose-Gele
Ethidium Bromide			Aqueous Solution 10 mg/ml	Sigma	Agarose-Gele
Mineral Oil	Light White Oil	d= 0,84 g/ml		Sigma	PCR
RNA-Clean	Guanidinetio- cyanat 2- mercaptoethanol Phenol			AGS-GmbH	RNA-Präparation
Dimethylsulfoxid DMSO	H ₃ C-SO-CH ₃	78,13g/mol	high concentrated	Sigma	PCR

5.3.4 Tabelle XVII Verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 1

Enzym/Protein/ Reaktionspuffer	Herkunft	Konzentration	Reaktionspuffer /Temperatur	Lieferant	Verwendung
MuLV Reverse Transcriptase	E.Coli	50 U/µl	RT-Puffer	Perkin Elmer	cDNA-Synthese
RNAse Inhibitor	50 kDa recombinant enzyme			Perkin Elmer	cDNA-Synthese
DNase I, RNAse frei	Mixtur von vier Isoenzymen	100000 U/ml		Strata-Gene	cDNA-Synthese
p(dt) ₁₅ Primer		8 nmol		Roche	cDNA-Synthese
AmpliTaq® DNA Polymerase	Thermus aquaticus	5 U/µl	PCR-Puffer	Perkin Elmer	PCR
GeneAmp® 10x PCR Buffer	100mMTris-HCl pH 8,3 500mM KCl; 15mM MgCl ₂ 0.01% w/v gelatine			Perkin Elmer	PCR
100 Base-Pair Ladder (100 Basenpaar-Leiter)	2 mit Restrictions- enzymen geschnittene E.Coli-	1 µg/µl		Amersham Pharmacia Biotech	Gel - Standard

5.3.5 Tabelle XVIII verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 2

Deoxy-CTP, sodium salt solution PCR Grade	25 µmol	Roche	PCR
Deoxy-GTP, sodium salt solution PCR Grade	25 µmol	Roche	PCR
Deoxy-TTP, sodium salt solution PCR Grade	25 µmol	Roche	PCR
Deoxy-ATP, sodium salt solution PCR Grade	25 µmol	Roche	PCR
Restrictionsendonuclease Sty I	10000 U/ml	NEBuffer 3 NewEngland 37°C BioLabs	Restrictions- analyse
Restrictionsendonuclease BFAI	5000 U/ml	NEBuffer 4 NewEngland 37°C BioLabs	Restrictions- analyse
Restrictionsendonuclease PSP1406i	10000 U/ml	NEBuffer 4 MBI 37°C Fermentas	Restrictions- analyse
Restrictionsendonuclease BCL I	10000 U/ml	NEBuffer 3 Roche 50°C	Restrictions- analyse
Restrictionsendonuclease Alu I	8000 U/ml	NEBuffer 2 Roche 37°C	Restrictions- analyse

5.3.6 Tabelle XIX verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 3

Restriktionsendonuklease Mbo I	Gen von <i>Moraxella bovis</i> in <i>E.coli</i>	5000 U/ml	NEBuffer 3 37°C	NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse
Restriktionsendonuklease Acc I	Gen von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> in <i>E.coli</i>	10000 U/ml	NEBuffer 4 37°C	NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse
Restriktionsendonuklease Hph I	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	4000 U/ml	NEBuffer 4 37°C	NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse
Restriktionsendonuklease Ban I	Gen von <i>Bacillus aneurinolyticus</i> in <i>E.coli</i>	20000 U/ml	NEBuffer 4 37°C	Roche	Restrictions- analyse
Restriktionsendonuklease Pvu II	Gen von <i>Proteus vulgaris</i> in <i>E.coli</i>	10000 U/ml	NEBuffer 2 37°C	Roche	Restrictions- analyse
Restriktionsendonuklease BstY I	<i>Bacillus stearothermophilus</i> Y	10000 U/ml	NEBuffer 4 +BSA 60°C	NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse
Restriktionsendonuklease Aat II	Gen von <i>Acetobacter acetii</i> in <i>E.coli</i>	20000 U/ml	NEBuffer 4 37°C	NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse
NEBuffer 1 (gelb)	10 mM Bis Tris Propane-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT (pH 7.0 at 25°C)			NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse
NEBuffer 2 (blau)	10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl; 1 mM DTT (pH 7.9 at 25°C)			NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse
NEBuffer 3 (rot)	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; 1 mM DTT (pH 7.9 at 25°C)			NewEngland BioLabs	Restrictions- analyse

5.3.7 Tabelle XX verwendete Enzyme/Proteine/Puffer 4

NEBuffer 4 (grün)	20 mM Tris-acetate; 10 mM Mag-nesium-acetat; 50 mM Kalium-acetat 1 mM DTT ; (pH 7.9 at 25°C)	NewEngland BioLabs	Restriktions-analyse
BSA bovine serum albumine		NewEngland BioLabs	Restriktions-analyse

5.4 Zellkulturmaterial

5.4.1 Tabelle XXI Zellkultur

Chemikalie/Medium/Lösung	Zusatzbezeichnung	Qualität/ Reinheit	Lieferant
RPMI 1640 Medium 500ml	mit Glutamine		Gibco-LifeScience
Foetal Bovine Serum 500ml		Mycoplasma screened Virus screened Performance tested	Gibco-LifeScience
Trypsin-EDTA (1x) 100ml	in HBSS W/O CA&MG W/EDTA: 4NA		Gibco-LifeScience
Penicillin – Strptomycin 100ml	10000 IU/ml - 10000 UG/ml		Gibco-LifeScience
Hydrocortisol		Approx. 98%, Cell culture tested	Sigma
H-Insulin 100 Hoechst® 100 IE/ml	Insulin human		Hoechst
Transferrin 100mg	from human serum	C >98% Eisensättigung ca. 30%	Roche
17-β-Estradiol	sterilized by γ-irradiation	Cell culture tested	Sigma
Natrium-Selenium 1mg Na ₂ SeO ₃	C >98% sterilized by γ-irradiation	Lyophilized Cell culture tested	Sigma

6 Abkürzungen

3D-Struktur	3 dimensionale Struktur
5S-RNA	Ribosomen-Ribonuklein-Säure
7TM-Rezeptoren	7-Trans-Membran-Rezeptoren
Abb.	Abbildung
ACH	Acetylcholin
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
AS	Aminosäuren
ATCC	American Tissue Cell Collection
BP	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-DesoxyRibonucleinSäure
CRH	corticotropinreleasing Hormon
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DesoxyRibonucleinSäure
dNTP	DesoxyNukleotidTriPhosphat
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	erythrocytes-growth-faktor
engl.	englisch
et al.	et aliter (und andere)
FCS	fötales Kälberserum
FSH	folikelstimulierendes-Hormon
GH	Wachstumshormon
GITC	Guanidinium-Isothiozyanat
h	Stunde
i.v.	intravenös
ICT	islet cell tumor
IGF-I	intermediate growthfactor I

IL-6	Interleukin-6
INF- γ	Interferon γ
LH	lutenisierendes Hormon
M	molar
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
neg.	negativ
PCR	PolymeraseChainReaction
PDGF	platelet derived growth factor
PHWZ	PlasmaHalbwertsZeit
pos.	positiv
prim. T.	primärer Tumor
Rez.	Rezeptoren
RGE	RezeptorGenExpression
RNA	RiboNukleinSäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s.c.	subcutan
SRIH	somatostatin release inhibiting factor
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
T3	Trijodthyronin
T4	Tetraiodthyronin = Thyroxin
TNF- α	tumor-necrosis-factor- α
TRH	thyreotropine releasing factor
tRNA	translationsRNA
TSH	thyroideastimulierendes-Hormon
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
z.B.	zum Beispiel

7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg waren:

Arnold; Aumüller; Bach; Barth; Baum; Basler; Bolm; Cetin; Christiansen; Czubayko; Daut; Feuser; Fruhstorfer; Fehmann; Geus; Gotzen; Gemsa; Gressner; Griss; Habermehl; Happle; Hellinger; Hesse; Hofmann; Joseph; Kern; Kleine; Klerk; Klose; Koolmann; Kretschmer; Krause; Lang; Lauer; Lennartz; Maisch; Moll; Moosdorf; Mueller; Oertel; Remschmidt; Röhm; Rosenow; Schachtschabel; Schäfer; Schreiber; Schulz; Schulze; Seifart; Seitz; Seyberth; Slenczka; Steininger; Vohland; Voigt; Werner; von Wichert; Westermann

Danksagung

Mein Dank für diese Arbeit geht an das Zentrum für Innere Medizin, Abt. Gastroenterologie unter der Leitung von Prof. Dr. Arnold, für die Aufnahme als Doktorand und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Innerhalb der Abteilung danke ich besonders meinem Doktorvater PD Dr. Christoph Fehmann für seine Anregungen und Ideen, welche mir so manches Mal die Augen geöffnet haben.

Dr. Ulrich Wulbrand war als mein Betreuer und Tutor die Geduld in Person - mit Ihm stand und fiel alles.

Mein Dank geht auch an Kathleen Dörsch, die mir tausend Fragen beantwortet hat und mir immer wieder hilfreich zur Seite stand.

Es waren so viele des Laborbereichs Ebene -3 welche mir mit Tipps und Anregungen immer wieder weitergeholfen haben. DANKE! Insbesondere möchte ich hier Petra Staats - bei der ich immer wieder Frust abladen oder einfach auch nur mal reden konnte - und Heike Priebe - welche mir oft mit Reagenzien oder praktisch aushalf - nennen.

Privat geht mein Dank an meine liebe Frau Mary, welche mir in den zahllosen Tag und Nachtstunden immer wieder den Rücken freihielt und einfach zuhörte, wenn nichts mehr laufen wollte.

In den Feinheiten der deutschen Sprache und in den Geheimnissen der Formatierung durfte ich zusätzlich, für Stunden, auf meine Eltern und meinen Schwager Tobias Benkert zurückgreifen. Die nötige Hard- und Software, zum Schreiben, stellte mein Schwiegervater. Habt vielen Dank.

Insgesamt darf ich sagen: „Es war eine schwere aber gute Zeit.“

8 Quellenverzeichnis

- ¹ Pressemitteilung des Robert Koch-Instituts 4.10.1999
Quelle: Internet www.rki.de/Krebs
- ² Krebshilfe-Statistik 1995
Quelle: Internet www.Krebshilfe.de/stat.htm
- ³ Weinberg, A.; Molekulare Grundlagen von Krebs
in: Schirmacher, Volker [Hrsg.] Krebs – Tumoren, Zellen, Gene
Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, 1986
- ⁴ Folkman, J.; Die Gefäßversorgung von Tumoren
in: Schirmacher, Volker [Hrsg.] Krebs – Tumoren, Zellen, Gene
Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, 1986
- ⁵ Patel, YC.; Galanopoulou, AS.; Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoproteases
Somatostatin and its receptors, 1995
Wiley, Chinchester
(Ciba Foundation Symposium 190) p 26-40
- ⁶ Patel, YC.; et al.; Production, action and degeneration of Somatostatin.
in: Jefferson LS. Cherrington AD. Eds. The Handbook of Physiology.
The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism.
New York: Oxford Univ. Press, 1999: in press
- ⁷ Epelbaum, J.; et al.; The Neurobiology of Somatostatin
Crit Rev Neurobiol 1994; 8: 25-44
- ⁸ Reichlin, S.; Somatostatin
N Engl J Med 1983; 309: 1495-1501, 1556-1563
- ⁹ Pinski, J.; et al.; Biological Activity and Receptor Binding Characteristics to Various Human Tumours

of Acetylated Somatostatin Analogous

P. Society for Experimental Biology and Medicine, 1992;
Vol 200: 49-55

¹⁰ Elliot, DE.; et al.;

Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by
inflammatory cells and induced by inflammatory mediators
and cytokines

J Immunol 1998; 160:3997-4003

¹¹ Blum, AM.; et al.; Granuloma T-Lymphocytes in murine
schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors
and respond to somatostatin with decreased INF- γ secretion.

J Immunol 1992; 149:3621-3626

¹² Aguila, MC.; et al.; Somatostatin antisense

oligodesoxynucleotide-mediated stimulation of lymphocyte
proliferation in culture

Endocrinology 1996; 137:1585- 1590

¹³ Karalis, K.; et al.;

Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction
in vivo

J Clin Invest 1994; 93:2000-2006

¹⁴ Takeba, Y.; et al.; Modulation of synovial cell function by
somatostatin in patients with rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheumatism 1997; 40:2128-2138

¹⁵ Weiss, RE.; et al.; Somatostatin can

locally inhibit proliferation and differentiation of cartilage
and bone precursor cells.

Calcif Tissue Int 1981; 33:425-430

¹⁶ Marks, N.; et al.; Inactivation of somatostatin (GH-RIH)
and its analogs by crude and partially purified rat brain
extracts.

FEBS Letters 1975; 55 (1):220-224

-
- ¹⁷ Patel, Y.C.; General aspects of the biology and function of Somatostatin.
In: Weil, C. Muller, E.E., Thorner, M.O., et al. Basic and Clinical Aspects of Neuroscience.
Berlin: Springer-Verlag, 1992; Vol 4: 1-16
- ¹⁸ Scarborough, D.; et al.;
Interleukin-1 β stimulates somatostatin biosynthesis in primary cultures of foetal rat brain.
Endocrinology 1989; 124: 549-551
- ¹⁹ Schonbrunn, A.; et al.; Characterisation of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture.
J Biol Chem 1978; 253: 6473-6483
- ²⁰ Yamada, Y.; et al.; Cloning and functional characterisation of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney.
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 251-255
- ²¹ Reisine, T.; et al.; Molecular biology of somatostatin receptors.
Endocr Rev 1995; 16: 427-442
- ²² Yasunda, K.; et al.; Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain.
Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 6736-6740
- ²³ Schertler, G.; et al.; Projektion structure of rhodopsin.
Nature 1993; 362: 770-772
- ²⁴ Strader, C.D.; et al.; The family of G-Protein coupled receptors
FASEB J 1995; 9: 745-754
- ²⁵ Schwartz, T.; et al.; Is there a lock for all

agonist keys in 7TM receptors.

Tips 1996; 17: 213-216

²⁶ Bell, G.; et al.;

Molecular biology of somatostatin receptors

Somatostatin and its receptors, 1995

Wiley, Chinchester

(Ciba Foundation Symposium 190) p 65-88

²⁷ Bruns,C.; et al.; Characterisation of somatostatin receptor subtypes

Somatostatin and is receptors, 1995

Wiley, Chinchester

(Ciba Foundation Symposium 190) p 89-110

²⁸ Jonas, S.; et al.; Somatostatin Receptor subtypes in Neuroendocrine tumor cell lines and tumor tissues

Langenbecks archiv of surgrey 1995; 380: 90-95

²⁹ Buscail, L.; et al.; Loss of Somatostatin Receptor Expression in Human Pancreatic and Colorectal Cancer

Cancer Research April 1996; 56: 1823-1827

³⁰ Hatzoglou, A.; et al.; Morphine Cross-React with Somatostatin Receptor SSTR2 in the Human Breast Cancer Cell Line and Decreases Cell Growth

Cancer Research 1995; 55: 5632-5636

³¹ Yun, X.; et al.; Estrogen regulates somatostatin receptor subtype 2 messenger ribonucleic acid expression in human cancer cells

Endocrinology 1996; Vol.137 (12): 5634-5641

³² Fisher, W.; et al.; Expression of the somatostatin receptor subtype-2 gene predicts response of human pancreatic cancer to octreotide

Surgery 1996; 129: 234-241

³³ Eden, P.; et al.;

Life Science 1993; 53: 85-90

- ³⁴ Jais, P.; et al.; Somatostatin receptor subtype gene expression in human endocrine gastro-pancreatic tumors
European Journal of Clinical Investigation 1997;
27:639-644
- ³⁵ Buscali, L.; et al.; Loss of
SST2 Somatostatin receptor gene expression in human
pancreatic and colorectal cancer
Cancer Research 1996; 56: 1823-1827
- ³⁶ Kubota, A.; et al.; Identification
of Somatostatin receptor subtypes and an Implication for
Efficacy of Somatostatin Analogue SMS 201-995 in
Treatment of Human Endocrine Tumours
J. Clin. Invest. 1994; 93: 1321-1325
- ³⁷ Evans, A.; et al.; Analysis of
somatostatin receptor subtype mRNA expression in human
breast cancer
British Journal of Cancer 1997; 75(6): 798-803
- ³⁸ Laws, S.; et al.; Somatostatin
receptor subtype mRNA expression in human colorectal
cancer and normal colonic mucosae
British Journal of Cancer 1997; 75(3): 360-366
- ³⁹ Vuaroqueaux, V.; et al.; No loss of
SST receptors gene expression in advanced stages of
colorectal cancer
European Journal of Endocrinology 1999; 140: 362-366
- ⁴⁰ Dutour, A.; et al.; Expression of
Somatostatin Receptor Subtypes in Human Brain Tumours
Int. J. Cancer 1998; 76: 620-627
- ⁴¹ Feindt, J.; et al.; Expression of
Somatostatin receptor Subtypes in Cultured Astrocytes and

Gliomas

J. Neurochem 1995; 65: 1997-2005

- ⁴² Bauer, W.; et al.; A very potent and selektive octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action
Life Science 1982; 31: 1133-1140
- ⁴³ Lamberts, S.; et al.; Somatostatin receptors: Clinical implications for endocrinology and oncology Somatostatin and its receptors.
1995 Wiley, Chichester
(Ciba Foundation Symposium 190) p 222-239
- ⁴⁴ Patel, Y.C.; et al.; Subtyp selectivity of peptide analogous for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr1-5)
Endocrinology 1984; 135: 2814-2817
- ⁴⁵ Patel, Y.C.; Somatostatin and its receptor family
Neuroendokrinol 1999 Jul; 20(3): 157-98
- ⁴⁶ Wulbrand, U.; et al.; Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours
European Journal of Clinical Investigation
1998; 28: 1038-1049
- ⁴⁷ Newton, C.; et al; (Labor im Fokus) PCR
Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl.,
1994-2. Aufl.- ISBN 3-8274-0190-9
- ⁴⁸ Romancer, M.; et al.;
Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes inhuman and rat gastric mucosae
Life Science 1996; 58: 1091-100
- ⁴⁹ Yamada, Y.; et al.;
Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterisation of human SSTR3, a protein couplet to adenyl cyclase

-
- Mol. Endocrinol. 1992; 6(12),2136-2142
- ⁵⁰ Rohrer, L.; et al.; Cloning and characterisation of a fourth human somatostatin receptor
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.1993; 90(9),4196-4200
- ⁵¹ Yamanda, Y.; et al.; Cloning, Functional expression and pharmacological characterisation of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype
Biochem.Biophys.Res.Commun. 1993; 195(2),844-852
- ⁵² Reubi, C.; et al.; Visualisation of Somatostatin Receptors and Correlation with Immunoreactive Growth Hormone and Prolactin in Human Pituitary Adenomas: Evidence for Different Tumor Subclasses
Journal of clinical Endocrinology and Metabolism (1987); Vol.65, No.1: 65-73
- ⁵³ Krenning, P.; et al.; Localisation of Endocrine-Related Tumours with Radioiodinated analogue of Somatostatin
the Lancet (1989); Feb. 4: 242-244
- ⁵⁴ Krenning, P.; et al.; Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octeotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients
European Journal of Nuclear Medicine (1993); 20: 716-731
- ⁵⁵ Buscail, L.; et al.; Loss of Somatostatin Receptor gene Expression in human Pancreatic and colorectal cancer
Cancer Research April 15 1996; 56: 1823-1827
- ⁵⁶ Sinii, A.; et al.; Different Expression Patterns of Somatostatin Receptor subtypes in Cultured Epithelial cells from Human Normal Prostate and Prostate Cancer
Journal of clinical Endocrinology and Metabolism (1997); Vol.82, No.8: 2566-2568
- ⁵⁷ Teijero, R; Activation of Human Somatostatin Receptor 2 Promotes Apoptosis Through a Mechanism that is

independent from Induction of p53.

Cell Physiol Biochem 2002; 12: 31-38

⁵⁸ Bepler, G.; et al.; Characterisation of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines

Differentiation 37: 158-171 (1988);

⁵⁹ Bergh, J.; et al.; Establishment and characterisation of cell lines from small cell and large cell carcinomas of the lung
Acta path. microbiol. immunolog. scand.

Sect.A 1985; 93: 133-147

⁶⁰ Gazdar, A.; et al.; Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties.

Cancer Res. 1987; 40: 3502-3507,

⁶¹ Pettengill, O.; et al.; Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small-cell carcinoma of the lung.

Cancer 1980; 45: 906-918,

⁶² Carney, D.; et al.; Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features.

Cancer Res. 1985; 45: 2913-2923

⁶³ NCI-Navy Medical oncology Branch Cell Line

Supplement. J. Cell. Biochem. 1996; Suppl. 24: 1-291

⁶⁴ Bepler, G.; et al.; Establishment, growth properties, and morphological characteristics of permanent human small cell lung cancer cell lines

J Cancer Res Clin Oncol 1987; 113: 13-40

⁶⁵ Bepler, G.; et al.; Cancer Genet.

Cytogenet. 1995; 84: 39-45

⁶⁶ Lieber, M.; et al.; A continuous tumor-cell line from a

human lung carcinoma with properties of type II
alveolar epithelial cells.

Int. J. Cancer 1976; 17: 62-70

⁶⁷ Giard, D.; et al.; In vitro cultivation of human tumors;
establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.
J Natl.Cancer Inst. 1973 ; 51(5): 1417-1423

⁶⁸ Banks-Schlegel, S.; et al.; Intermediate filament and
crosslinked envelope expression in human lung tumor
cell lines.

Cancer Res. 1985; 45: 1187-1197

⁶⁹ Bergh, J.; et al.; Establishment and characterization of a
continuous lung squamous cell carcinoma cell line (U-1752)
Anticancer Res 1981; 1(6): 317-322

⁷⁰ Soule, H.; et al.; A human cell line from a pleural
effusion derived from a breast carcinoma.

J. Natl. Cancer Inst. 1973; 51: 1409-1416

⁷¹ Hackenberg, et al.; Androgen Sensitivity of the new human
breast cancer cell line MFM-223

Cancer Res. 1991; 51: 5722-5727

⁷² Keydar, I.; et al.; Establishment and characterization of a
cell line of human breast carcinoma origin.

Eur. J. Cancer 1979; 15: 659-670

⁷³ Quinn, et al.; Cell lines from Human Colon Carcinoma
with unusual Cell Products, Double Minister, and
Homogeneously Staining Regions.

Cancer Res. 1979; 39: 4914-4924

⁷⁴ Goldin, et al.; Current Results of the Screening Program
at the division of Cancer Treatment, National cancer
Institute

Eur. J. Cancer 1981; 17: 129-142

⁷⁵ Fogh, et al.; in Human Tumor Cells in Vitro

(ed. Fogh J.),

Plenum Press, New York, 1975, pp. 115-159

- ⁷⁶ Leibovitz, et al.; Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines
Cancer Res. 1976; 36: 4562-4569
- ⁷⁷ Chen, W.; et al.; Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites.
In Vitro 1982; 18: 24-34
- ⁷⁸ Dahiya, R.; et al.; Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the MUC-1 mucin gene.
Cancer Res. 1993; 53: 1437-1443
- ⁷⁹ Kim, Y.; et al.; Characterisation of clones of a human pancreatic adenocarcinoma cell line representing different stages of differentiation.
Pancreas 1989; 4: 353-362
- ⁸⁰ Yunis, A.; et al.; Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase.
Int. J. Cancer 1977; 19: 128-135
- ⁸¹ Lieber, M.; et al.; Establishment of a continuous tumor cell line (Panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas.
Int. J. Cancer 1975; 15: 741-747
- ⁸² Elsässer, et al.; Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma.
Virchows Archiv B Cell Pathol. 1993; 64: 201-207
- ⁸³ Elsässer, et al.; Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from

-
- one primary human pancreatic adenocarcinoma
Virchows Archiv B Cell Pathol. 1992; 61: 295-306
- ⁸⁴ Bülow, M.; et al.; Establishment and characterisation of continuous tumor cell lines from human pancreatic carcinoma in vitro
Digestion 1982; 25: 17-18
- ⁸⁵ Kuramoto, H.; et al.; Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro.
Am. J. Obstet. Gynecol. 1972; 114: 1012-1019
- ⁸⁶ Simon, et al.;
J. Natl. Cancer Inst. 1983; 70: 839-845
- ⁸⁷ Hamilton, T.; et al.; Characterisation of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors.
Cancer Res. 1983; 43: 5379-5389
- ⁸⁸ Fogh, J.; ed., Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press; 1975:pp. 115-159
- ⁸⁹ Establishment and characterisation of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth.
Gastroenterology. 1991 Aug; 101(2): 303-11
- ⁹⁰ Lundqvist, M.; et al.; Characterisation of a cell line (LCC 18) from a cultured human neuroendocrine differentiated colon carcinoma
Eur J Cancer 1991; 27(12): 1663-8
- ⁹¹ Diserens, A.; et al.; Characterisation of an established human malignant glioma cell line: LN-18
Acta Neuropathol (Berl). 1981; 53(1): 21-8.
- ⁹² Nishida, M.; et al.; Establishment of a new endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors.

Acta Obstet Gynecol Jpn. 1985; 37:1103-1111

⁹³ Kerbel, et al.; Analysis of established human carcinoma cell lines for lymphoreticular associated membrane receptors

International Journal of cancer 1977; 20:673-679