

Aus dem Zentrum für Innere Medizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Charakterisierung antiproliferativer Effekte von Somatostatin-Analoga in hepatozellulären Karzinomzellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Dorothee Krebs-Schmitt
aus Köln

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 05.11.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD. Dr. M. Bläker

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A. De Weerth

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. T. Strate

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Anglizismen.....	4
1. Zielsetzung.....	5
2. Einleitung.....	7
2.1 Das hepatozelluläre Karzinom	7
2.2 Somatostatin und sein Analogon Octreotid	8
2.3 Der Somatostatinrezeptor und seine Subtypen	11
2.4 Signaltransduktion von Somatostatinrezeptoren.....	12
2.5 IGF und der IGF-Rezeptor.....	14
2.6 Zusammenspiel von Rezeptoren - „Receptor cross talk“	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Zellen	18
3.1.2 Substanzen.....	18
3.1.3 Antikörper:	21
3.1.4 Primer.....	22
3.1.5 Kulturmedien.....	22
3.1.6 Puffer.....	23
3.1.7 Lösungen	24
3.1.8 Gele.....	24
3.1.9 Geräte und sonstige Materialien.....	25
3.2 Methoden	27

Inhaltsverzeichnis	2
<hr/>	
3.2.1 Zellkultur.....	27
3.2.2 Zählversuche.....	27
3.2.3 Zellproliferations-Assay mit Tritium markiertem Thymidin.....	28
3.2.4 Reverse Transkription - Polymerase Ketten Reaktionen (RT-PCR).....	29
3.2.5 Immuncytochemie	33
3.2.6 Western Blot.....	34
4. Ergebnisse.....	38
4.1 RT-PCR	38
4.2 Immuncytochemie	39
4.3 Proliferationsassays	40
4.4 Thymidinuptake.....	42
4.5 Western Blot.....	43
5. Diskussion.....	46
5.1 Wirkungen des Somatostatin Analogons Octreotid	46
5.2 Signaltransduktion.....	51
5.3 „Receptor crosstalk“	52
5.4 Ausblick	54
6. Zusammenfassung.....	55
Literaturverzeichnis	56
Danksagung	62
Lebenslauf	63
Eidesstattliche Versicherung	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Primärstrukturen des Hormons Somatostatin und seines Analogons Octreotid, einem zyklischen Oktapeptid.	11
Abbildung 2: Sieben-Transmembranrezeptor mit der Kopplung an ein G-Protein.	12
Abbildung 3: Die Map Kinasenkaskade.	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Tyrosinkinaserzeptor (IGF 1 Rezeptor)...	16
Abbildung 5: Zwölf-Loch-Platte mit der Versuchsanordnung für die Zählversuche.....	28
Abbildung 6: Nachweis von Proteinen im Western blot mit der ECL-Reaktion.	37
Abbildung 7: Bestimmung der SSTR-Subtypen mittels RT-PCR.	39
Abbildung 8: Immunzytochemischer Nachweis von Somatostatinrezeptoren auf HepG ₂ -Zellen.....	40
Abbildung 9: Untersuchung des Einflusses von Octreotid auf die Proliferation von HepG ₂ -Zellen.....	41
Abbildung 10: Thymidinuptake in HepG ₂ -Zellen.....	43
Abbildung 11: Kinetik der Map Kinasen Phosphorylierung nach Stimulation mit IGF-1. .	45
Abbildung 12: Kinetik der Map Kinasen Phosphorylierung nach Stimulation mit IGF-1 und Octreotid.	45
Abbildung 13: Interaktion von SSTRs mit P53, Bax und MAP-Kinasen.....	51

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AFP	Alpha-Fetoprotein
DAB	3,3-Diaminobenzidin
EKC	Ethylketocyclazocine
ERK	Extrazellulär regulierte Signalkaskade
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IGF-1	Insulin like growth factor I
Map	Mitogen activated Protein
Min	Minuten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RAS	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
RT	Raumtemperatur
SSTR	Somatostatinrezeptor
S	Vorwärtsprimer
AS	Rückwärtsprimer

Anglizismen

Counter	Zähler
Cross talk	Interaktion
Hepatocyte growth factor	Hepatozyten Wachstumsfaktor
Inward rectifying	Einwärts gleichrichtend
Messenger	Bote
Release	Freisetzung
Semi-dry	Halbtrocken
Well	Napf

1. Zielsetzung

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) zählen weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren. Bei Diagnosestellung liegt das HCC in den meisten Fällen in einem inoperablen Tumorstadium vor, so dass alternative therapeutische Konzepte herangezogen werden müssen. Interventionelle Strategien, wie Alkoholinjektion oder transarterielle Chemoembolisation sind mit Komplikationen und Nebenwirkungen behaftet. Systemische medikamentöse Strategien in Form verschiedener Chemotherapie Protokolle haben sich bei erheblicher Toxizität als wenig wirksam erwiesen.

Zu den neueren medikamentösen Therapieoptionen zählt das Somatostatin-Analogon Octreotid. Neben geringer Nebenwirkungsrate und guter Verträglichkeit wurden in ersten Studien ausgeprägte positive Effekte auf Mortalität und Lebensqualität beim HCC demonstriert. Weitere Studien erbrachten keine positiven Ergebnisse, so dass die Datenlage kontrovers ist.

Molekulare Grundlage einer Therapie mit Somatostatin-Analoga ist die Expression von Somatostatinrezeptoren (SSTR) im Tumorgewebe. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HCCs ein individuell spezifisches Expressionsmuster für die fünf verschiedenen Somatostatin-Subtypen aufweisen. Aus anderen Tumorsystemen ist bekannt, dass die Subtypen SSTR2, SSTR3, und SSTR 5 antiproliferative Effekte vermitteln. Ein entsprechender Rezeptorbesatz konnte auch für HCC-Zelllinien nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten die antiproliferativen und zellulären Effekte von Somatostatin und seinen Analoga in HepG₂-Zellen (einer hepatozellulären Karzinomzelllinie) *in vitro* untersucht werden. Hierzu sollte zunächst der Nachweis von entsprechenden SSTR mittels RT-PCR und Immunzytochemie erfolgen. Durch Inkubation mit dem Somatostatin-Analogon sollte der Effekt dieser Substanzen auf die Zellteilung und das Zellwachstum mit Proliferations-Assays (Zählung viabler Zellen,

Thymidinuptake) untersucht werden. Die den Effekten auf die Proliferation zugrunde liegende Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege (MAPK) sollte ebenfalls analysiert werden. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die molekularen Wirkmechanismen von Somatostatin-Analoga im HCC aufzuklären.

2. Einleitung

2.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Das HCC gehört mit einem Auftreten von 500.000 Fällen pro Jahr zum fünfthäufigsten bösartigen Tumor der Welt (Thomas and Abbruzzese 2005). Ostasien und Afrika sind Gebiete mit der höchsten Inzidenz, was in engem Zusammenhang mit der Zahl der Hepatitis B und C Infektionen steht. Eine stetig ansteigende Zahl von neu aufgetretenen Fällen wird jedoch auch in westlichen Ländern, wie zum Beispiel den USA, registriert (Bosch, Ribes et al. 2005). Als entscheidender Risikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms gilt die Leberzirrhose (Sherman 2005), die durch Alkoholkonsum, Diabetes und Adipositas sowie Infektionen mit Hepatitis B und C entstehen kann (Marrero 2005; Marrero, Fontana et al. 2005; Lee, Hung et al. 2006). Ebenso werden seltener Ursachen, wie die Hämochromatose oder Aflatoxin B Ingestion als Ursache angenommen (El-Serag and Mason 1999).

Die bisher einzige potentiell kurative Therapie des HCC ist die Leberteileresektion oder Hepatektomie mit anschließender Transplantation. Andere interventionelle Strategien bei lokalisierten, wenig fortgeschrittenen Tumoren sind die Ultraschall gesteuerte perkutane Ethanolinjektion, Radiofrequenz-, Mikrowellen- oder Lasertumorablation, sowie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) (Wu, Wang et al. 2005). Systemische medikamentöse Strategien in Form verschiedener Chemotherapie Protokolle haben sich bei erheblicher Toxizität als wenig wirksam erwiesen (Thomas and Abbruzzese 2005) So bleibt die Behandlung von inoperablem HCC bisher weiterhin unbefriedigend (Liu, Huo et al. 2004).

Ein alternatives medikamentöses Therapieverfahren ist die Gabe des Somatostatin Analogons Octreotid (Raderer, Hejna et al. 2000). Die Wirkungen von Octreotid auf hepatozelluläre Karzinomzellen sind Gegenstand dieser Doktorarbeit.

2.2 Somatostatin und sein Analogon Octreotid

Somatostatin ist ein Peptidhormon, das von neuroendokrinen Zellen und inflammatorischen Zellen des Immunsystems gebildet wird und regulatorische Funktion besitzt. Es wird aus Vorläuferproteinen durch enzymatische Spaltung hergestellt (Patel 1999), wobei zwei biogene Formen entstehen, Somatostatin 14 und Somatostatin 28 (Abbildung 1). Die Wirkung von Somatostatin im Körper des Menschen ist vielfältig (Fehmann and Arnold 1996). Es vermindert die Resorption von Nahrungssubstraten und Elektrolyten sowie die Kontraktur von Magen-, Darm- und Gallenblasenmuskulatur. Zu seinen Funktionen gehört außerdem die Hemmung der exokrinen sekretorischen Funktionen von Speicheldrüsen, Magen, Dünndarm, Pankreas und Leber. Eine für diese Arbeit wichtige Beobachtung ist zudem eine Inhibition der Proliferation von Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt (Lehy, Dubrasquet et al. 1979).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Somatostatin negativ auf das Wachstum von gesunden Zellen und Tumorzellen wirkt. Dieser Effekt entsteht zum einen durch direkte antiproliferative Effekte wie die Modulation von Map Kinasen und des pro apoptotischen Proteins Bax. Er entsteht aber auch durch indirekte Faktoren wie die Hemmung der Sekretion von Wachstumsfaktoren, Hemmung von Angiogenese und Modulation des Immunsystems über Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose (Ferjoux, Bousquet et al. 2000).

Der klinische Einsatz von Somatostatin wird durch seine sehr kurze Halbwertszeit von unter drei Minuten bei intravenöser Applikation stark eingeschränkt (Lamberts, van der Lely et al. 1996), so dass für den therapeutischen Einsatz nach Alternativen gesucht wurde. Ein

länger wirksames Analogon ist Octreotid mit einer Eliminationshalbwertszeit von zwei Stunden nach subkutaner Gabe. Octreotid ist strukturell ein kurzes, synthetisch hergestelltes Octapeptid (Abbildung 1) (Patel 1999).

Der therapeutische Nutzen von Somatostatin und seinen Analoga für die Behandlung von neuroendokrinen Tumoren ist unumstritten, während die Datenlage in Bezug auf andere Tumoren, wie zum Beispiel das HCC, kontrovers ist (Hejna, Schmidinger et al. 2002).

Zur HCC-Therapie mit Octreotid oder Lanreotid, einem anderen Somatostatinanalogon mit langer Halbwertszeit, wurde eine Reihe von klinischen Studien mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen durchgeführt. Eine kontrolliert randomisierte Studie aus dem Jahre 1998 von Kouroumalis et al. fand eine signifikant erhöhte Überlebensrate nach 6 und 12 Monaten bei Patienten mit HCC nach subkutaner Gabe von Octreotid (Kouroumalis, Skordilis et al. 1998). Analog dazu wurde gezeigt, dass Octreotid das postoperative Wiederauftreten von Tumoren hemmen kann (Liu, Huo et al. 2004). Eine andere Arbeitsgruppe dagegen konnte in einer randomisiert Placebo kontrollierten Studie mit Octreotid weder einen lebensverlängernden Effekt noch eine Tumorregression oder Reduktion des Alpha-Fetoproteinlevels nachweisen (Yuen, Poon et al. 2002). Alpha-Fetoprotein (AFP) gilt als ein etablierter Tumormarker für das HCC (Qin and Tang 2004). Ferner werden dem Serum-AFP-Level prognostische Bedeutung sowie eine Aussagekraft über die postoperative Wiederauftretenswahrscheinlichkeit des HCC zugeschrieben (Peng, Chen et al. 2004; Morimoto, Nagano et al. 2005). In einer weiteren Studie konnte zwar keine signifikante Lebenszeitverlängerung, jedoch eine Verbesserung der Lebensqualität bei 30% der Probanden durch regelmäßige Lanreotidgaben erzielt werden (Raderer, Hejna et al. 2000). Rabe et al. führten eine retrospektive Studie durch, in der bei 63 Patienten mit fortgeschrittenem HCC kein verlängertes Überleben gezeigt werden konnte (Rabe, Pilz et al. 2002). In einer Veröffentlichung von Samonakis et al. zeigte sich bei einer Gruppe von

Patienten, die an einem inoperablen HCC litt, sowohl eine Lebenszeitverlängerung als auch eine Verbesserung der Lebensqualität nach regelmäßigen Gaben eines langwirksamen Somatostatinanalogons (LASA) (Samonakis, Moschandreas et al. 2002), zu ähnlichen Ergebnissen gelangte auch Dimitroulopoulos et al. (Dimitroulopoulos, Xinopoulos et al. 2002). Die kürzlich veröffentlichte randomisierte Doppelblindstudie HECTOR zeigte keine Verlängerung der Lebenszeit bei Patienten die aufgrund eines HCC mit einem langwirksamen Somatostatinanalogons im Gegensatz zu Plazebo behandelt wurden (Becker, Allgaier et al. 2007).

Eine Arbeitsgruppe konnte *in vitro* zeigen, dass Octreotid in etablierten HCC-Zelllinien (HepG₂, SMMC-7721) die Zellproliferation und die Produktion von AFP hemmen kann und Apoptose induziert. (Liu, Huo et al. 2004).

Nicht nur Somatostatin und seine Analoga, sondern auch Opioide (z.B. EKC) binden an Somatostatinrezeptoren. Zudem konnten Notas et al. zeigen, dass EKC Zellproliferation inhibiert und Apoptose induziert. Unter diesem Gesichtspunkt und der Tatsache, dass Opioide weltweit als Analgetika insbesondere in der Onkologie eingesetzt werden könnte hier ein Grund für die sehr unterschiedlichen Studienergebnisse liegen (Notas, Kampa et al. 2006).

Vor dem Hintergrund dieser widersprüchlichen Studien sollte in dieser Doktorarbeit die Wirkung von Octreotid auf die hepatozellulären Karzinomzellen HepG₂ untersucht werden.

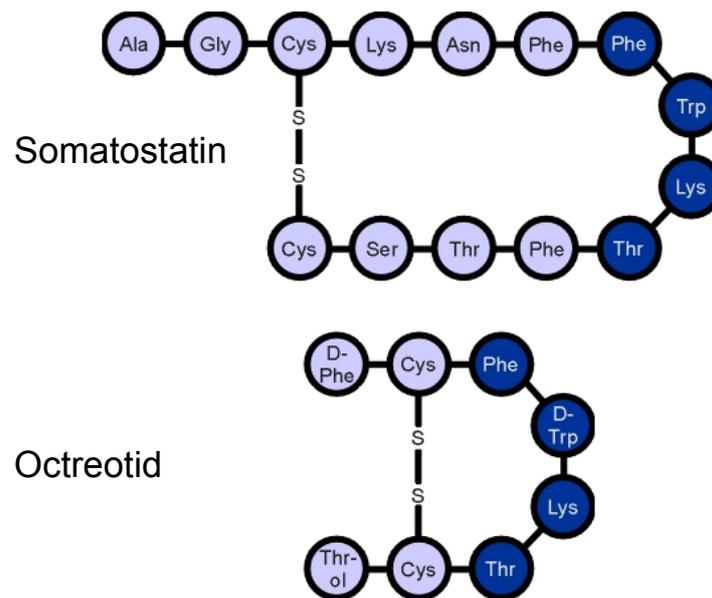


Abbildung 1: Primärstrukturen des Hormons Somatostatin und seines Analogons Octreotid, einem zyklischen Oktapeptid.

2.3 Der Somatostatinrezeptor und seine Subtypen

Es sind fünf verschiedene Somatostatinrezeptoren bekannt (SSTR 1-5), über die Somatostatin und seine Analoga ihre Wirkung vermitteln (Notas, Kolios et al. 2004). Alle fünf Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Sieben-Transmembranrezeptoren (Abbildung 2) (Krantic, Goddard et al. 2004). In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das hepatozelluläre Karzinom sowie kolorektale Tumoren, Brust-, Pankreas-, Lungen- und Prostatakarzinome Somatostatinrezeptoren exprimieren (Notas, Kolios et al. 2004). Dabei zeigen HCC individuell spezifische Expressionsmuster für die fünf verschiedenen Somatostatinrezeptorsubtypen (Bläker, Schmitz et al. 2004).

Alle Somatostatinrezeptoren binden Somatostatin 14 und Somatostatin 28, letzteres hat jedoch eine etwas höhere Affinität zu SSTR 5 als Somatostatin 14 (Krantic, Goddard et al. 2004), während Octreotid nur an Rezeptoren der Untergruppe 2, 3 und 5 mit der geringsten Affinität zu SSTR 3 bindet (Lahlou, Guillermet et al. 2004) (Lamberts, van der Lely et al.

1996) und keine Bindungsaffinität zu SSTR-1 und 4 zeigt (Kouroumalis 2001). Aus anderen Tumorsystemen ist bekannt, dass die Subtypen SSTR2, SSTR3 und SSTR5 antiproliferative Effekte vermitteln und dass Octreotid genau an diese Rezeptorsubtypen bindet. In dieser Arbeit sollte die Expression von Somatostatinrezeptoren in HepG₂ Zellen und die spezifische Wirkung auf sie untersucht werden.

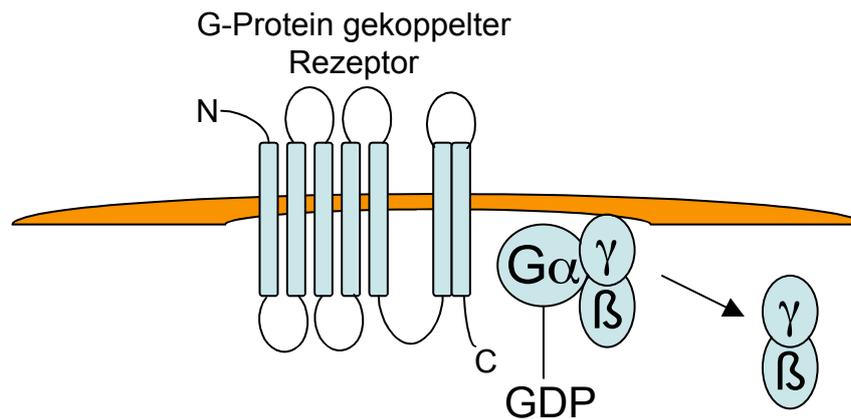


Abbildung 2: Sieben-Transmembranrezeptor mit der Kopplung an ein G-Protein. Sieben-Transmembranrezeptoren benutzen heterotrimere große G-Proteine, deren Aktivierung mit der Abdissoziation des gebundenen GDP beginnt. Ausgelöst wird diese Reaktion durch den aktivierten Sieben-Transmembranrezeptor, der hier als Guaninnucleotid-releasing-Protein (GNRP) fungiert. Gleichzeitig erfolgt die Anlagerung der $\beta\gamma$ -Untereinheit an die α -Untereinheit. Der Komplex aus aktiviertem Rezeptor und dem leeren heterotrimeren G-Protein bindet nun GTP, was zur Abdissoziation des aktivierten Rezeptors und zur Freisetzung der $\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Die α -Untereinheit des G-Proteins ist nun aktiv und aktiviert bzw. inaktiviert nun ihrerseits die für die biologische Antwort verantwortlichen Proteine, die auf diese Art und Weise Reaktionskaskaden auslösen können.

2.4 Signaltransduktion von Somatostatinrezeptoren

Die meisten der in die Plasmamembran integrierten Hormonrezeptoren lösen eine Reihe unterschiedlicher intrazellulärer Antworten aus. Viele Hormone, wie auch das Somatostatin, zeichnen sich durch eine Wirkung innerhalb von Sekunden bis Minuten aus,

dabei wird die Wirkung zum Beispiel durch die Aktivierung spannungsabhängiger Calcium Kanäle hervorgerufen. Somatostatinrezeptoren vermitteln über Blockade von mitogenen Signalen, die zum Wachstumsarrest und/oder Induktion von Apoptose führen, die Hemmung von Tumorzellwachstum (Pagliacci, Tognellini et al. 1991; Candi, Melino et al. 1995; Patel, Greenwood et al. 1996; Srikant 1997).

Die fünf Rezeptorsubtypen wirken über G-Protein gekoppelte Mechanismen. Als second messenger benutzen sie Wege wie die Inhibition der Adenylatzyklase, die Aktivierung der Phosphotyrosin-Phosphatase und die Modulation der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) (Abbildung 3). Einige der Subtypen sind auch an „inward rectifying“ Kalium Kanäle (SSTR 2, 3, 4 und 5), spannungsabhängige Calcium Kanäle (SSTR 1 und 2), Phospholipase C (SSTR 2 und 5) und Phospholipase A2 (SSTR 4) gekoppelt (Patel 1999). Der benutzte Signaltransduktionsweg ist abhängig von dem die SSTRs exprimierenden Gewebe (Fehmann and Arnold 1996). SSTR 1, 4 und 5 induzieren Zellzyklusarrest durch Wirkung auf die MAP Kinasen Signalkaskade und SSTR 2 und 3 können sowohl über p53 abhängige als auch unabhängige Mechanismen Apoptose auslösen. (Ferjoux, Bousquet et al. 2000).

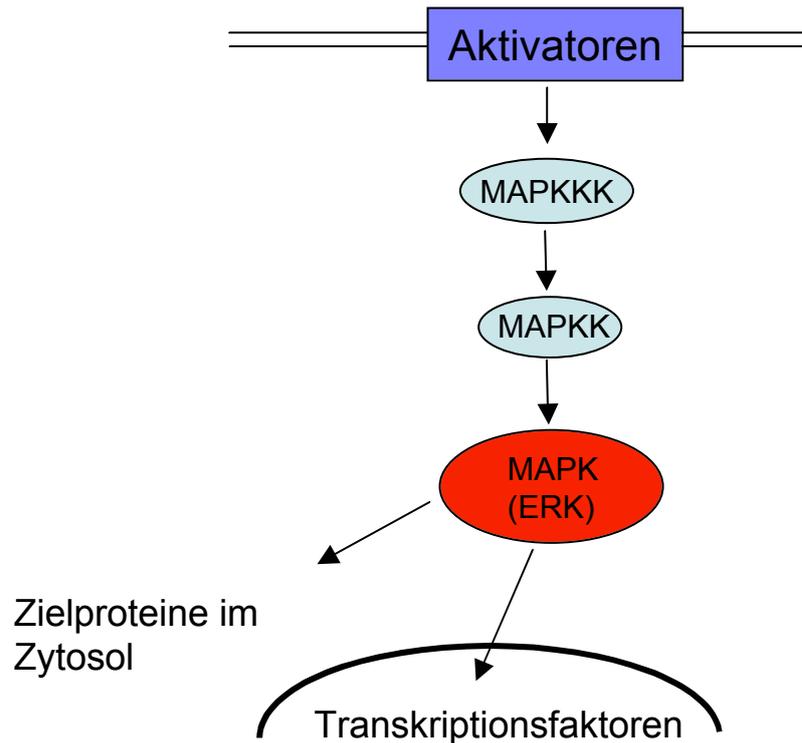


Abbildung 3: Die Map Kinasenkaskade. Jede MAP Kinasenkaskade beinhaltet die gleichen Grundzüge. Am Anfang steht die Aktivierung eines kleinen GTP bindenden Proteins (z.B. RAS). Dieser Reaktion folgt die sequentielle Stimulation mehrerer zytoplasmatischer Proteine, die als mitogen-activated protein kinases (MAPK) bekannt sind. Das erste Enzym der Kaskade ist die MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK). Dieses Enzym phosphoryliert und aktiviert ein nächstes Enzym mit dem Namen Map Kinase Kinase, welches wiederum die mitogen-aktivierte-protein-Kinase (MAPK) an zwei Seiten an einem Tyrosin- und Threoninrest phosphoryliert und damit aktiviert. Nach dieser Reaktion kann die MAPK vom Zytosol in den Nucleus wandern und dort Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und damit gleichzeitig aktivieren (Janeway 2001)

2.5 IGF und der IGF-Rezeptor

Unter der Einwirkung von Wachstumshormon werden in der Leber und zu einem geringen Anteil auch im peripheren Gewebe die Somatomedine oder auch Insulin like growth factors 1 und 2 (IGF-1 und IGF-2) gebildet. Sie sind einkettige Polypeptide mit 67 bzw. 70 Aminosäuren, die etwa 50% Homologie zu Insulin und 70% zueinander aufweisen. Im

Gegensatz zum Insulin weisen sie ein verlängertes Carboxyende auf und behalten das C-Peptid. Sie entstehen aus Vorläuferproteinen mit 130 bzw. 180 Aminosäuren.

Die IGFs zirkulieren im Blut an sechs verschiedene hochmolekulare Trägerproteine gekoppelt, so dass sie Halbwertzeiten von mehreren Stunden aufweisen (Denley, Cosgrove et al. 2005). Besonders bevorzugt findet eine Bindung an das Bindungsprotein 3 statt, das 95% der IGFs im Blut transportiert. Die Bindungsproteine werden ähnlich wie die IGFs hauptsächlich in der Leber gebildet und stehen ihrerseits unter dem regulativen Einfluss von STH, Insulin und möglicherweise auch noch anderen Hormonen. Im peripheren Gewebe wirken die IGFs autokrin und parakrin. Das IGF-System spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von embryonalem und postnatalem Wachstum. Es ist essentiell für die Funktion des Immunsystems und des Knochenwachstums sowie vielen weiteren physiologischen Funktionen im menschlichen Körper. (LeRoith and Roberts 2003; Denley, Cosgrove et al. 2005)

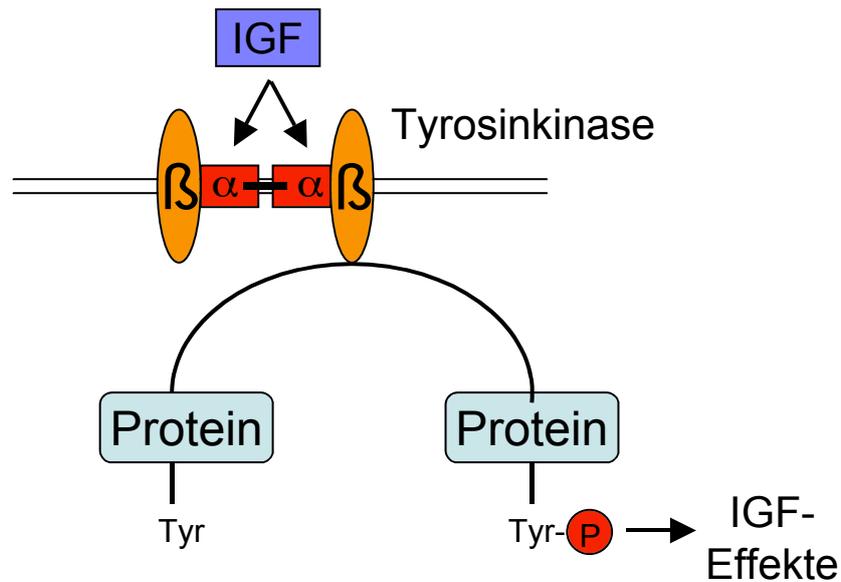


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Tyrosinkinaserzeptor (IGF 1 Rezeptor). Der IGF 1 Rezeptor stellt ein aus je zwei α - und β -Untereinheiten bestehendes Tetramer dar, das große Ähnlichkeit zu dem Insulinrezeptor aufweist. Die β -Untereinheit besitzt Tyrosinkinaseaktivität, die α -Untereinheit bindet das IGF 1 Molekül (Bohula, Playford et al. 2003).

IGF-1 und -2 binden mit hoher Affinität an zwei membranständige Rezeptoren, die beide zu der Gruppe der Tyrosinkinase Rezeptoren gehören (Ward, Garrett et al. 2001). Der IGF-1 Rezeptor wird von vielen Tumoren exprimiert (Miller and Yee 2005). Er vermittelt Wachstum und Schutz vor Apoptose. Für den IGF1 Rezeptor wurde gezeigt, dass seine Inhibition zu einer Abnahme von Tumorwachstum und Metastasierung, als auch zu einer Sensibilisierung für zytotoxische Substanzen und Strahlentherapie führte. Probleme im Rahmen der therapeutischen Nutzung sind hierbei mögliche Kreuzreaktionen mit dem Insulinrezeptor und Reaktionen mit IGF1 Rezeptoren in gesundem Gewebe (Bohula, Playford et al. 2003). In dieser Arbeit wurde IGF 1 als Stimulans für Zellwachstum und zur Aktivierung der MAP Kinasen Signalkaskade genutzt.

2.6 Zusammenspiel von Rezeptoren - „Receptor cross talk“

Ein für die Ergebnisse dieser Arbeit interessantes Phänomen ist, dass unterschiedliche Rezeptoren gleiche Signalwege benutzen oder ihre Signale untereinander modulieren können, was im Englischen auch als „receptor cross talk“ bezeichnet wird. Dies kann zu einer Schwächung oder Verstärkung des jeweils über einen Rezeptor vermittelten Effekts führen (Werry, Wilkinson et al. 2003). Dieser „cross talk“ kann auf verschiedenen Ebenen der zellulären Signaltransduktion stattfinden. Verschiedene Rezeptoren, G-Proteine oder second messenger scheinen miteinander kooperieren zu können und damit zu einer Feinabstimmung des Signals führen (Cordeaux and Hill 2002). Wie weiter oben beschrieben, können sowohl Somatostatin, als auch IGF über ihre Rezeptoren auf die MAP Kinasen Signalkaskade einwirken und so vielleicht gegenseitig in die Wirkung der jeweils anderen Substanz eingreifen. MAP Kinasen Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren schließt häufig den „cross talk“ mit klassischen Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Adhäsionskomplexen ein, dies kann ein Gerüst für den RAS-Aktivierungskomplex darstellen (Luttrell 2005). In dieser Arbeit werden die Auswirkungen von IGF, Somatostatin und deren Zusammenspiel auf das Wachstum und die Signaltransduktion von HepG₂ Zellen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

HepG ₂ Zellen	Cell Lines Service, Heidelberg
TT-Zellen	American Type Culture Collection, Rockville, USA

3.1.2 Substanzen

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Bio Rad Laboratories, Ca (USA)
Agarose	Eurogentec, Köln
Ammoniumpersulfat	Bio Rad Laboratories, Ca (USA)
Aprotinin	Sigma bio Science, Deisenhofen
BCA Protein Assay Kit (BSA = bicinchoninic acid)	Pierce, Rockford, IL (USA)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAB Chromogen	Dako Corporation, Carpinteria, CA (USA)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma bio Science, Deisenhofen
DNA Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNTP-Mix (10mM) (Desoxynukleotidtriphosphat-Mix)	Invitrogen, San Diego, CA (USA)

DTT (Dithiothreitol)	Gibco BRL, Karlsruhe
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM 1000 mg/ml D-Glucose)	Gibco BRL, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma bio Science, Deisenhofen
Entellan	Merck, Darmstadt
ECL Entwicklerlösung (Enhanced ChemiLuminescence)	Amersham Bioscience, Buckinghamshire (England)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, MO (USA)
Fetales Rinderserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
First Strand Puffer (10x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycerol	Sigma bio Science, Deisenhofen
Glycin	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt
³ H-Thymidin	Amersham Bioscience, Buckinghamshire (England)
Hepes	Gibco BRL, Karlsruhe
Insulin like Growth Factor I	Peppo Tech Inc., London (England)
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma bio Science, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (50mM)	Gibco BRL, Karlsruhe

Natriumchlorid	Sigma bio Science, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate = SDS)	Bio Rad Laboratories, Ca (USA)
Natriumfluorid	Sigma bio Science, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma bio Science, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma bio Science, Deisenhofen
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Karlsruhe
Oligo dt-Primer	Gibco BRL, Karlsruhe
PCR Puffer (10x)	Invitrogen, San Diego, CA (USA)
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung =phosphate buffered saline (PBS)	Gibco BRL, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethansulfonylchlorid)	Sigma bio Science, Deisenhofen
Protein Marker (Bench Mark Protein Ladder)	Invitrogen, San Diego, CA (USA)
Ribonuclease H	Gibco BRL, Karlsruhe
Rinderserumalbumin =bovine serum albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Substratpuffer	Dako Corporation, Carpinteria, CA (USA)
Superscript II Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Karlsruhe
Taq – Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe
Temed (Tetramethylethylendiamin)	Bio Rad Laboratories, Ca (USA)

Tris Base	Invitrogen, San Diego, CA (USA)
Tri Reagent	Molecular Research Centre, Inc. Cincinnati (USA)
Triton X 100	Merck, Darmstadt Ultima Gold
Trypsin EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Scintillationsflüssigkeit	Packard, Groningen (Niederlande)

3.1.3 Antikörper:

Phospho p42/44 Map-Kinase-Antikörper vom Kaninchen, polyklonal (Map = mitogen activated Protein)	Cell signaling, Beverly, MA (USA)
p42/44 Map-Kinase-Antikörper vom Kaninchen, polyklonal	Cell signaling, Beverly, MA (USA)
Anti –Kaninchen IgG Meerrettich-Peroxidase konjugiert von der Ziege, polyklonal	Cell signaling, Beverly, MA (USA)
Antikörper gegen Somatostatin Rezeptor SSTR 1, SSTR 2, SSTR 3, SSTR 4, SSTR 5 vom Kaninchen, polyklonal	Gramsch, Schwabhausen

Antikörper anti Kaninchen

EnVision Polymer von der Ziege

Peroxidase konjugiert

Dako Corporation, Carpinteria, CA,
(USA)

3.1.4 Primer

Primer SSTR 1-5

Molbiol, Berlin

Primer β -Actin

Molbiol, Berlin

3.1.5 Kulturmedien

DMEM M1	DMEM, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat, 1% Penicillin-Streptomycin, 1,5g/l Natrium Bicarbonat und 10% FCS
DMEM M2	DMEM, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat, 1% Penicillin-Streptomycin, 1,5g/l Natrium Bicarbonat und 20% FCS
DMEM M0	DMEM, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat, 1% Penicillin-Streptomycin, 1,5g/l Natrium Bicarbonat und 5% FCS

3.1.6 Puffer

TBE Puffer	89mM Tris Base, 89mM Borsäure, 2mM EDTA
Lysispuffer	50mM HEPES pH 7,6, 4mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X 100, 200mM PMSF, 2µg/ml Aprotinin, 5µg/ml Leupeptin, 2mM Natriumvanadat, 100mM Natriumfluorid, 50mM Natriumpyrophosphat, pH-Wert 7,5-7,6
Trenngelpuffer	1,5M Tris-Base, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5M Tris Base, pH 6,8
Laufpuffer	25mM Tris Base, 192mM Glycin, 0,1% SDS, Aqua dest; pH 8,3
Lämmli-Puffer	0,002% Bromphenolblau, 10mM Natriumhydrogenphosphat/Natriumdihydrogenphosphat, pH-Wert 7, 10%Glycerol, 2% SDS
Semi-Dry-Transferpuffer	48mM Tris Base, 1,3mM SDS, 20% Methanol, 21mM Glycin; pH 9,2
TBS	25mM Tris Base, 137mM NaCl; pH 7,4
TBS/T	25mM Tris Base, 137mM NaCl, 0,1% Tween 20; pH-Wert 7,4

3.1.7 Lösungen

2% ige Trypanblau-Lösung	2% Trypanblau in 0,9% NaCl
DEPC H ₂ O	0,1% DEPC in Aqua dest
Reverse Transkription Mix	First strand buffer (10x), MgCl ₂ (50mM), dNTP-Mix (10mM), DTT, im Verhältnis 2:2:1:2
PCR-Mix	PCR buffer (10x), MgCl ₂ (50mM), dNTP-Mix(10mM), Taq-Polymerase, H ₂ O; im Verhältnis 20:6:16:1:7
DAB plus Substratlösung	Substratpuffer mit 2% DAB Chromogen
Block Lösung	5% Magermilch in TBS/T

3.1.8 Gele

Trenngel 12,5 %ig	25% Trenngelpuffer, 12,5% Acrylamid, 0,1% SDS, Aqua dest, 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,005% Temed
Sammelgel 4%ig	25% Sammelgelpuffer, 4% Acrylamid, 0,1% SDS, Aqua dest, 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,2% Temed
Agarosegel	50 ml TBE-Puffer, 0,6 g Agarose, 2,5 µl Ethidiumbromid

3.1.9 Geräte und sonstige Materialien

Acht-Loch Objektträger	Roth, Karlsruhe
Agarosegelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
β-Counter	Packard, Groningen (Niederlande)
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Deckgläser	Assistent, Sondheim
Digitalkamera DP 500	Olympus, Hamburg
Fastblotgerät	Biometra, Göttingen
Filterpapier (Whatmanpaper)	Schleicher&Schuell GmbH, Dassel
Gel Kammern	Bio Rad Laboratories, Hercules, Ca (USA)
Heizblock	Techne, Cambridge (England)
Kühl-Gefrierschrank	Siemens, München
Kulturgefäße und	
Kunststoffeinmalartikel	Nunc Intermed, Wiesbaden, Deutschland, Falcon, Oxnard, Ca, USA, Costar, Cambridge, Ma (USA) Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Magnetrührer/ Heizplatte	Sigma bio Science, Deisenhofen
Mikrotiterplattenreader	Bio Tek Instruments, Inc. Highland Park (USA)
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim
Nitrocellulose	Schleicher&Schuell GmbH, Dassel
PCR Maschine	Biometra, Göttingen
PH-Meter	WTW, Weilheim

Photometer	Jenway, Gransmore Green (England)
Polaroidfilm	Polaroid, Enschede (Niederlande)
Power Supply Power Pac 200	Bio Rad Laboratories, Hercules, Ca (USA)
Röntgenfilm	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, (England)
Röntgenfilmkassette	RMT Rego, Haan
Röntgenfilmentwicklermaschine (Curix 1600)	Agfa, Köln
Scanner	Canon, Amsterdam (Niederlande)
Schüttler	Bühler, Tübingen
Vortexgerät	Jahnke & Kunkel, Staufen
Werkbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sigma 3K30	Braun, Boston, Mass. (USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

HepG₂ Zellen sind hepatozelluläre Karzinomzellen eines männlichen Kaukasiers.

Die Kultivierung der HepG₂ Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte in 175 cm² großen Kulturflaschen. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin-EDTA für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden dann in ein 10 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Die Hälfte dieser Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche mit 25 ml Medium M1 gegeben.

3.2.2 Zählversuche

Mit Hilfe der Zählversuche sollte die Proliferation von HepG₂ unter Behandlung von IGF 1 (insulin like growth factor), Octreotid und IGF mit Octreotid untersucht werden.

Dazu wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben trypsiniert, zentrifugiert und anschließend resuspendiert. Von der entstandenen Zellsuspension wurden 10 µl 1:1 mit 2%-iger Trypanblau-Lösung vermischt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden Zwölf-Loch-Platten mit je 20000 Zellen und 1 ml serumhaltigem Medium pro Loch beschickt (Abbildung 5). Nach 24 Stunden wurde das alte Medium abgesaugt und stattdessen jeweils 1 ml serumfreies Medium (M0) auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen das erste Mal mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Jeweils 3 Ansätze bekamen nur serumfreies Medium, um die basale Zellproliferation zu erfassen. Die nächsten drei

erhielten IGF mit einer Endkonzentration von 13 pM. Die dritte Reihe wurde mit Octreotid in einer Endkonzentration von 100 μ M behandelt. Die letzte Reihe erhielt schließlich IGF (13 pM) plus Octreotid (100 μ M). Die Stimulantien wurden jeden Tag frisch auf die Zellen gegeben, das Medium nach 3 Tagen gewechselt. Die Zellen wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen gezählt. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen in 200 μ l Trypsin EDTA resuspendiert. 10 μ l der Suspension wurden entnommen und 1:1 mit 2 %-iger Trypanblau Lösung gemischt, um beim Auszählen in der Neubauer Zählkammer die Zahl der vitalen Zellen bestimmen zu können. Entsprechend der vorgenommenen Verdünnungsschritte wurde die Zellzahl pro Loch errechnet.

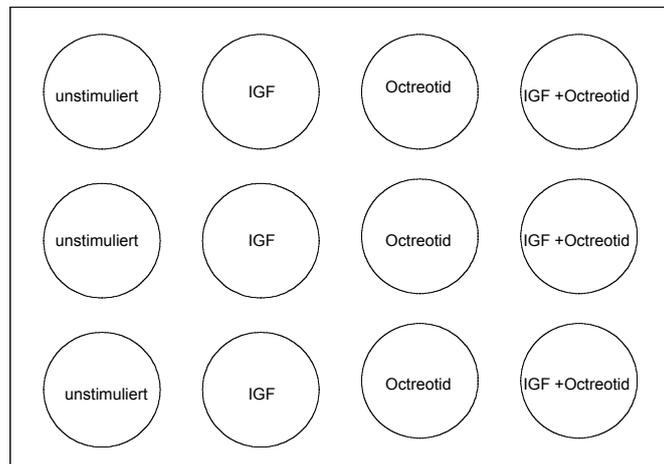


Abbildung 5: Zwölf-Loch-Platte mit der Versuchsanordnung für die Zählversuche. Jedes Loch wurde mit jeweils 20000 Zellen und 1 ml Medium beschickt. Anschließend wurden die Zellen mit IGF-1, Octreotid und IGF-1 plus Octreotid behandelt und täglich gezählt.

3.2.3 Zellproliferations-Assay mit Tritium markiertem Thymidin

Mit diesem Versuch sollte die Replikation unter der Wirkung von IGF und IGF plus Octreotid im Vergleich zu der DNA Synthese von unbehandelten Zellen bestimmt werden. Zur Messung der Inkorporation von Tritium markiertem Thymidin wurden 50000 HepG₂ Zellen pro Loch auf einer Zwölf-Loch-Platte ausgesät. Die optimale Zellzahl wurde durch

Vorversuche ermittelt, um sicher zu stellen, dass auch nach sieben Tagen Inkubation noch keine vollständige Konfluenz der Zellen erreicht wurde. Nach 24 Stunden wurde das Medium auf serumfreies Medium (M0) umgestellt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen wie oben bei den Zählversuchen beschrieben täglich stimuliert. Die ersten drei Löcher wurden benutzt, um den basalen Einbau von Thymidin zu bestimmen. Die nächsten drei wurden mit IGF, die darauf folgenden mit Octreotid und die letzten drei Löcher mit IGF plus Octreotid behandelt und der Thymidineinbau nach sieben Tagen Stimulation gemessen. Dazu wurde das Medium abgesaugt und jeweils 200 µl Thymidin auf die Zellen gegeben. Die Proben wurden dann in vorbereitete Scintillationsröhrchen, die bereits mit jeweils 5 ml Scintillationsflüssigkeit befüllt wurden, gegeben. Die Scintillation wurde dann im β -Counter in Counts per minute (cpm) gemessen.

3.2.4 Reverse Transkription - Polymerase Ketten Reaktionen (RT-PCR)

Zu Bestimmung der Expression von Somatostatinrezeptoren in HepG₂ Zellen wurde das Verfahren der RT-PCR angewandt. Die Polymerase Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Segmenten. Bei der reversen Transkription wird die RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Die PCR Reaktionen wurden in 25 µl Ansätzen durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen variierte zwischen 39 und 44. Die Extensions-Temperaturen und -Zeiten entsprachen den Angaben des Herstellers (Taq Polymerase: 72°C). Vor Beginn der Amplifikation erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt bei 94-95°C für 5,5 Minuten. Die PCR-Amplifikate wurden in einem Ethidiumbromid gefärbtem Gel sichtbar gemacht.

Die einzelnen Schritte werden im Folgenden ausführlich beschrieben.

3.2.4.1 RNA Isolierung

Zur RNA Isolierung wurde eine voll bewachsene Flasche mit HepG₂ Zellen oder TT-Zellen in 2 ml Tri Reagent suspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 0,2ml Chloroform/1 ml Tri-Reagent versetzt, für 15 sec. gevortext und erneut für 2-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde die Zellsuspension bei 4°C mit 12000 g für 15 min abzentrifugiert. Dann wurde die obere Phase (RNA-Phase) sorgfältig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend folgte die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol/ml Tri-Reagent in das neue Gefäß mit der RNA Phase und eine weitere Ruhezeit von 5-10 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die RNA bei 4°C mit 12000 g für 8 min abzentrifugiert, zweimal mit 70 % Ethanol/DEPC-H₂O gewaschen und dann erneut bei 4° C mit 7500 g für 5 min zentrifugiert, um die Lösung RNase frei zu bekommen. DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine und führt zu kovalenten Bindungen, wodurch die Aktivität der RNasen zerstört wird. Das Ethanolgemisch wurde abgenommen und die Unterphase unter dem Abzug luftgetrocknet. Als letztes wurde dann die RNA in 50-100 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Qualität der RNA-Präparation wurde auf einem Ethidiumbromid gefärbten Gel überprüft.

3.2.4.2 DNase Verdau

Für den DNase Verdau wurde die RNA Konzentration mit dem Photometer bestimmt. Die RNA wurde hierzu mit Aqua dest. 1:25 auf ein Volumen von 100 µl verdünnt. Es sollte mindestens ein 1 µg RNA eingesetzt werden. Als nächstes wurde 2,5 µl MgCl₂ (25 mM) zur RNA hinzu gegeben, dann 2 µl DNase I und die Proben auf 10µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 37°C inkubiert, daraufhin mit 6

μl 0,2 M EDTA-DEPC pH 8,0 versetzt und für 5 min auf 65°C erwärmt. Als letztes wurden noch 34 μl DEPC-H₂O dazu pipettiert.

3.2.4.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Nach dem DNase Verdau wurde eine Phenol-/Chloroformextraktion mit 50 μl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol durchgeführt, um unerwünschte Verschmutzungen, vor allem mit Proteinen zu entfernen. Danach wurde für 15 sek gevortext und dann 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase ist dann in ein sauberes Reaktionsgefäß pipettiert und 105 μl EtOH abs. hinzu gegeben worden. Als nächstes wurden 2,5 μl Natriumacetat (3M) (1:20) zugesetzt und das Gemisch für 15 min bei -80°C gekühlt. Danach wurde es für 15 min bei 4°C bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Dieser wurde unter dem Abzug bei Raumtemperatur getrocknet und nach dem Trocknen in 25 μl DEPC-H₂O gelöst. 11 μl von der Lösung wurden für die cDNA Synthese eingesetzt.

3.2.4.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurde ein Gemisch aus 1-5 μg RNA und 1 μl Oligo dt-Primer mit DEPC-H₂O auf 12 μl aufgefüllt. Dann wurden die Proben für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend für eine Minute auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend wurden 7 μl RT-Mix hinzugegeben. Als nächstes wurde das Gemisch noch einmal für 5 min auf 42°C erhitzt. Es folgte die Zugabe von 1 μl Superscript II RT. Dann wurden die Proben noch mal für 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C erhitzt und anschließend für 5 min bei 4°C gekühlt. Als letztes wurden die Proben mit 1 μl RNase H versetzt und für 20 min auf 37°C erwärmt. Danach konnte die cDNA in die PCR eingesetzt werden.

3.2.4.5 PCR

Die RT-PCR wurde mit Primern für die Somatostatinrezeptoren 1-5 und β -Actin durchgeführt. Mit ihrer Hilfe sollten spezifische Sequenzen, der vorher synthetisierten cDNA im Thermocycler amplifiziert werden. Als Positivkontrolle diente cDNA von TT-Zellen, von denen bekannt ist, dass sie alle 5 Somatostatinrezeptorsubtypen exprimieren. Als Negativkontrolle wurde DEPC-H₂O statt cDNA eingesetzt. Die β -Aktin-Primer dienten als zusätzliche Positivkontrolle für das Funktionieren der rt-PCR, da β -Aktin als Teil des Zytoskeletts in fast alle Zellen exprimiert wird.

Für jeden RT-PCR Ansatz wurden 15,5 μ l H₂O, 5,5 μ l PCR-Mix und 2 μ l Primer mit 2 μ l cDNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert und dann nach einem spezifischen Programm im Thermocycler amplifiziert. Ein RT-PCR Programm besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Die Anzahl der PCR-Zyklen lag zwischen 44 Zyklen (SSTR 1-4) und 39 Zyklen für SSTR 5. Die Denaturierung, das heißt die Trennung der DNA-Stränge erfolgte bei 94°-95°C für 5,5 Minuten. Es folgte das Annealing bei denen den Primern die Gelegenheit gegeben wurde an die DNA zu hybridisieren für 1 Minute bei unterschiedlichen Temperaturen (SSTR 1 und 5 bei 62°C, SSTR 2 und 4 bei 64°C und SSTR 3 bei 67°C). Als letzter Schritt folgte dann die Elongation bei 72°C für 11,15 (SSTR5) bis 12 Min (SSTR 1-4).

Primersequenzen:	
SSTR 1 S AS	AGC CGG TTG ACT ATT ACG CC GCT CTC ACT TCT ACC ATT GTC
SSTR 2 S AS	GGT GAA GTC CTC TGG AAT CC CCA TTG CCA GTA GAC AGA GC
SSTR 3 S AS	TCA TCT GCC TCT GCT ACC TG GAG CCC AAA GAA GGC AGG CT
SSTR 4 S	CGG CAG TCT TCG TGG TCT AC

AS	GCA TCA AGG TCG GTC ACG AC
SSTR 5	
S	AAC ACG CTG GTC ATC TAC GTG GT
AS	AGA CAC TGG TGA ACT GGT TGA C
β-Aktin	
S	ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG
AS	TCC AGA CGC AGG ATG GCA TGG

3.2.4.6 Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Agarosegele wurden TBE-Puffer und Agarose zunächst in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Ethidiumbromid hinzugegeben und das noch flüssige Gel in einen Gelschlitten gegossen. Das dann auspolymerisierte Gel wurde mit einer Mischung aus je 5 µl des PCR-Produkts und 2 µl Bromphenolbau pro Tasche beladen. In die erste Tasche wurden 5 µl des DNA Markers pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 80 Volt für ca. 1 Stunde durchgeführt. Das mit der DNA interkalierte Ethidiumbromid konnte nach dem Gellauf unter UV-Licht sichtbar gemacht und somit das PCR Produkt fotografiert werden.

3.2.5 Immuncytochemie

Mit Hilfe der Immuncytochemie sollte der spezifische Somatostatinrezeptorenbesatz von HepG₂ Zellen untersucht werden. Mit dieser Methode kann man mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion Proteine in intakten, auf einem Objektträger fixierten Zellen nachweisen.

Für die Immuncytochemie wurden Acht-Loch-Objektträger mit je 20 µl Zellkultur a 12000 Zellen HepG₂ pro Loch beimpft und für 24 Stunden in einer sterilen Feuchtkammer bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Objektträger in mit Medium (M2) geflutete Petrischalen überführt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Als nächstes wurden die Objektträger in einem Glashalter für 15 Minuten in einem Acetonbad fixiert, bei Raumtemperatur getrocknet, mit PBS gespült und für weitere 5 Minuten in PBS gebadet. Die Zellen wurden

dann mit 15 μ l vom ersten Antikörper für 45 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Der AK wurde mit 1 % PBS/BSA und einer Verdünnung von 1:1000 angesetzt. Für die Negativkontrolle wurde statt des 1. Antikörpers nur PBS verwandt, für die Positivkontrolle Antikörper gegen α -Fetoprotein.

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Objektträger erneut mit PBS gespült und dann zweimal für 5 Minuten in PBS gebadet. Als nächstes wurde eine Inkubation mit fertig verdünnter Envision (Dako) für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit je 15 μ l pro Loch durchgeführt. Darauf folgten erneut zwei Waschschriffe. Zur Visualisierung der Immunreaktion folgte die Inkubation mit DAB-Chromogen (Dako, 1 ml Pufferlösung + 1 Tropfen Substrat = 1:50) für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 20 μ l pro Loch, danach wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült und die Kerne im Hämalaunbad gegengefärbt. Anschließend wurden die Objektträger für 2-3 min mit Leitungswasser gewaschen und mit Entellan eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch, die Objektträger wurden anschließend mit einer Digitalkamera fotografiert.

3.2.6 Western Blot

Beim Western-Blot werden einzelne Komponenten einer Proteinmischung gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Membran überführt und dort mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. In dieser Arbeit sollten auf diese Weise die Phosphorylierung von Map Kinase Proteinen nach Inkubation mit IGF-1 und IGF-1 plus Octreotid untersucht werden.

3.2.6.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Proteinernte wurden jeweils 200000 Zellen HepG₂ in Petrischalen (3,5 cm Durchmesser) ausgesetzt. Nach drei bis fünf Tagen bei ca. 80 % Konfluenz der Zellen wurde das Medium von M1 auf M0 umgestellt und die HepG₂ Zellen für weitere 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen gehalten. Für die Kinetiken wurden die Zellen dann 0,5; 1; 2,5; 5; 15; 30 und 60 Minuten mit IGF-1 und IGF-1 plus Octreotid stimuliert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und das jeweilige Stimulans mit der entsprechenden Endkonzentration (Octreotid 100 µM, IGF-1 13 pM) mit 2 ml Medium M0 für die entsprechende Zeit auf die Zellen gegeben. Nach der angegebenen Zeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um die Reaktion zu stoppen. Danach wurden die Zellen auf Eis in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und für eine halbe Stunde bei 4°C geschüttelt, dann bei 4°C 10 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen für die Proteinbestimmung und den Western Blot überführt.

3.2.6.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ von Pierce nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde auf einer Mikrotiterplatte zunächst eine Standardreihe mit BSA und Aqua dest. und die zu messenden Proteinproben aufgetragen. Hinzu kamen jeweils 200 µl des Reaktionsgemisches Reagenz A 51 Teile und Reagenz B 1Teil. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu²⁺ in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺ Ionen werden zu Cu¹⁺ reduziert und diese wiederum lassen unter Bindung mit Bicinchinon-Säure einen violetten Farbkomplex entstehen. Die Absorption ist mit Hilfe eines Elisa-Readers bei 540 nm messbar.

Entsprechend der Extinktion wurde dann die genaue Proteinkonzentration des Zelllysates errechnet und 25-100 µg in die Western Blots eingesetzt.

3.2.6.3 Gelelektrophorese

Zum Beladen der Gele wurden die Proteinproben mit jeweils 5 µl Lämmli-puffer und 5 µl DTT gemischt und anschließend bei 100° C für 10 Minuten denaturiert. Die Gele wurden währenddessen in die Western Blot Kammer eingespannt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Die erste Tasche des Gels wurde mit 5 µl Protein Marker und Lysis-puffer gefüllt, die anderen Taschen mit den entsprechenden Proben beladen. Die Proben wurden zunächst bei 80 Volt langsam in das Gel laufen gelassen, die eigentliche Elektrophorese wurde dann bei 120 Volt durchgeführt.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens auf eine Nitrocellulose Membran (NC) überführt. Dazu wurde das Gel zusammen mit den Filterpapieren und der Nitrozellulose- (NC) Membran mit Blotpuffer befeuchtet und in das Blotgerät gelegt. Die Proteine wurden dann für 45 Minuten bei 400 mA auf die NC-Membran transferiert.

Die Detektion der geblotteten Proteine erfolgte, nachdem die NC-Membran zunächst 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in einer Milchpulverlösung inkubiert wurde, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper p42/44 phospho Map Kinase (1:500) für 24 Stunden bei 4°C und für zwei weitere Stunden mit dem Peroxidase konjugierten Sekundär-Antikörper (1:2000) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation folgten drei fünfminütige Waschschriffe. Dann wurde die Chemilumineszenzreaktion mit dem "ECL Western blotting detection reagent" (Abb. 2) durchgeführt. Die Membran wurde

mit einer Plastikfolie bedeckt, ein Hyperfilm ECL (Roche) für wenige Sekunden bis mehrere Minuten aufgelegt und entwickelt.

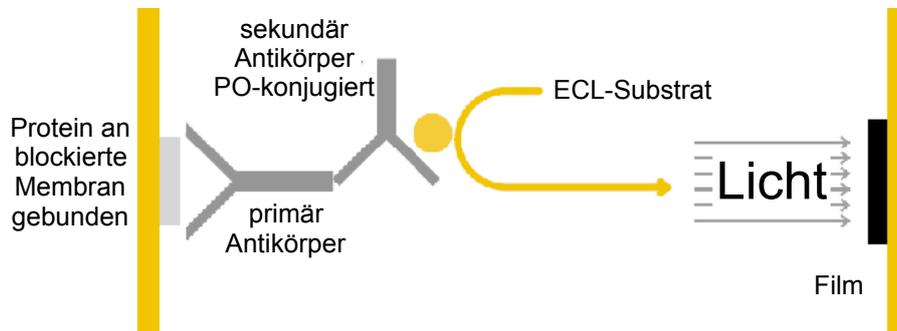


Abbildung 6: Nachweis von Proteinen im Western blot mit der ECL-Reaktion. An eine Membran gebundene Proteine werden mit einem Primär Antikörper und einem Peroxidase-konjugierten (PO) Sekundär Antikörper markiert. Die Peroxidase kann dann das ECL-Substrat spalten und emittiert Licht, das mit einem speziellen Film nachgewiesen werden kann. (modifiziert nach Amersham-Biosciences Katalog „Powerful solutions for Western blotting“)

3.2.6.4 Beladungskontrolle

Nach der ersten Entwicklung wurde die NC-Membran für 30 Minuten bei 60°C im Wasserbad mit Stripping-Puffer gewaschen, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Es folgten zwei weitere Waschschrte. Danach wurde erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und wiederum der 1. Antikörper p42/44 Map Kinase in 5% Magermilch TBS/T in einer Verdünnung von 1:1000 für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf den Blot gegeben. Nach dreimaligem Waschen für fünf Minuten wurde der 2. Antikörper anti rabbit (s.o.1:2000) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder 4°C über Nacht auf den Blot gegeben und danach wie oben beschrieben mit ECL inkubiert und entwickelt. Die Banden wurden mit dem Programm ImageJ ausgemessen und ausgewertet

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in drei Teile. Der erste Teil dient dem Nachweis von Somatostatinrezeptoren (SSTR 1-5) auf der Oberfläche von HepG₂-Zellen mit Hilfe von Immunzytochemie und mittels RT-PCR. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Zellteilung und dem Zellwachstum von HepG₂-Zellen nach Behandlung mit IGF-1, Octreotid und IGF-1 plus Octreotid. Die den Effekten auf die Proliferation zugrunde liegende Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege wird im dritten Teil näher untersucht.

4.1 RT-PCR

Mit Hilfe von RT-PCR-Untersuchungen sollte die Expression der unterschiedlichen Somatostatinrezeptor-Subtypen (SSTR 1-5) in HepG₂-Zellen auf molekularer Ebene untersucht werden. Bei der RT-PCR wird mit Hilfe der reversen Transkriptase aus RNA cDNA synthetisiert und diese anschließend als Template für eine PCR verwandt. Als Positiv-Kontrolle diente der Nachweis von β -Actin, einem Zytoskelettprotein, welches ubiquitär exprimiert wird (Pagliarulo, George et al. 2004). Zudem wurde cDNA von TT-Zellen benutzt. Von dieser humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie ist bekannt, dass sie alle fünf Somatostatinrezeptor-Subtypen exprimiert (Zatelli, Tagliati et al. 2001). Als Negativkontrolle wurde TT-Zell- und HepG₂-RNA in die PCR eingesetzt.

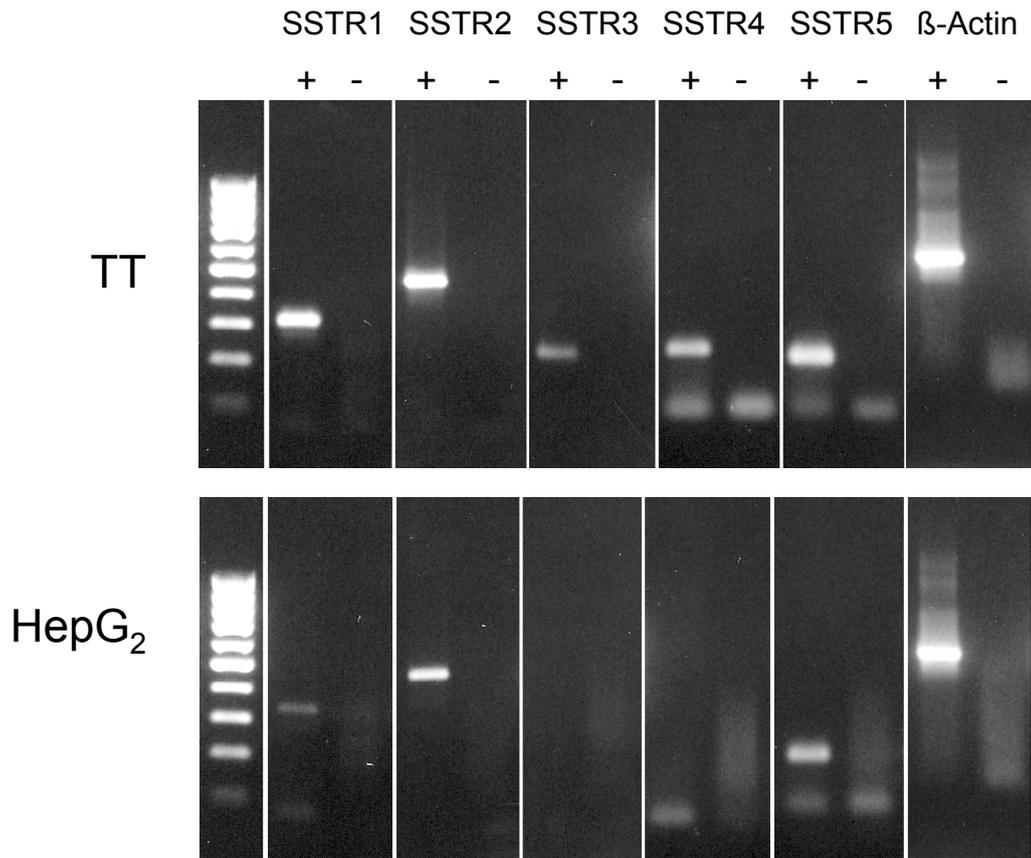


Abbildung 7: Bestimmung der SSTR-Subtypen mittels RT-PCR. Bei den HepG₂-Zellen fand sich ein positiver Rezeptornachweis für die Subtypen 1,2 und 5 und ein negatives Ergebnis für die Somatostatinrezeptor-Subtypen 3 und 4. Erwartungsgemäß konnten SSTR 1-5 in der cDNA von TT-Zellen nachgewiesen werden, während in der RNA-Kontrolle der TT-Zellen kein DNA-Amplifikat nachweisbar war, während mittels RT-PCR in HepG₂-Zellen nur die Somatostatinrezeptorsubtypen 1,2 und 5 detektierbar sind. Zudem wurde als Positivkontrolle β-Actin und als Negativkontrolle HepG₂- und TT-Zell-RNA aufgetragen. 1. SSTR 1: 334bp (+), SSTR 2: 462bp (+), SSTR 3: 221bp (-), SSTR 4: 247bp (-), SSTR 5: 210bp (+), β-Actin: 577bp (+).

4.2 Immuncytochemie

Mit Hilfe von immuncytochemischen Färbungen sollte das Expressionsmuster von Somatostatinrezeptorsubtypen in HepG₂-Zellen spezifiziert und das Ergebnis der RT-PCR Untersuchungen auf Proteinebene bestätigt werden. Dazu wurden HepG₂-Zellen auf Objektträgern ausgesät mit für die Somatostatinrezeptorsubtypen spezifischen Antikörpern

und anschließend mit einem Peroxidase konjugiertem Antikörper-Anti-Kaninchen inkubiert. Ein positiver Nachweis der entsprechenden Rezeptorsubtypen zeigt sich in einer Braunfärbung der Zellen, während eine Blaufärbung für ein negatives Ergebnis spricht. In diesen Untersuchungen konnte belegt werden, dass die hier verwendeten HepG₂-Kulturzellen die Somatostatinrezeptorsubtypen (SSTR) 1,2 und 5 exprimieren (siehe Abb. 9). Für die Positivkontrolle wurde ein Erstantikörper gegen Alpha-Fetoprotein benutzt, während für die Negativkontrolle kein Primärantikörper eingesetzt wurde.

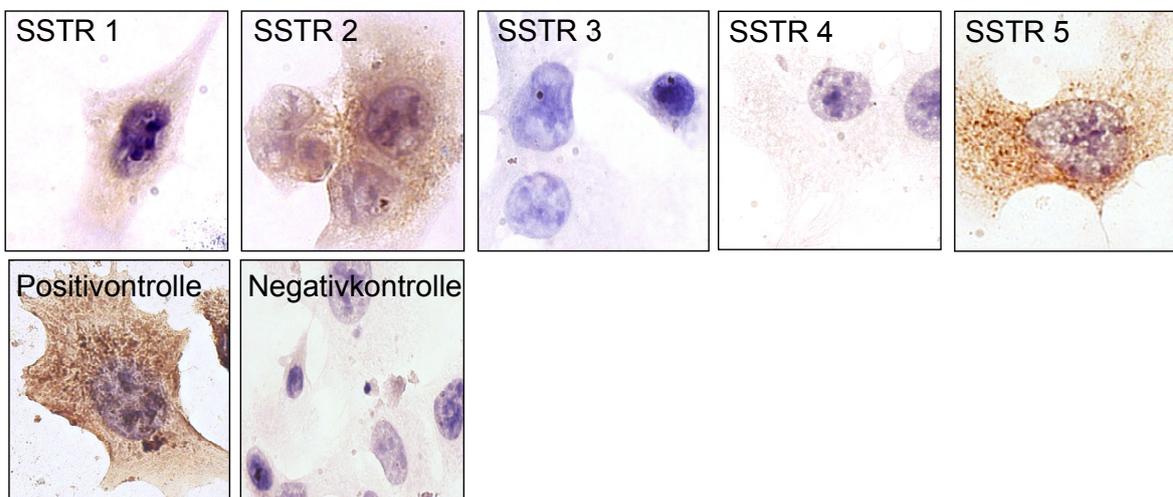


Abbildung 8: Immunzytochemischer Nachweis von Somatostatinrezeptoren auf HepG₂-Zellen. Die Abbildung zeigt immunzytochemische Färbungen von SSTR 1-5 bei HepG₂-Kulturzellen. Eindeutig positiv waren die Untersuchungen für die Somatostatinrezeptorsubtypen 1, 2 und 5 (Braunfärbung des Zytoplasmas), während die Ergebnisse für die Subtypen 3 und 4 negativ waren (Blaufärbung des Zytoplasmas).

4.3 Proliferationsassays

Über SSTR kann eine Proliferationshemmung vermittelt werden. Wachstumsfaktoren wie IGF-1 können vereinfacht dargestellt hingegen zu einer Proliferation von Zellen führen. In den folgenden Versuchen sollten HepG₂-Kulturzellen mit IGF-1, Octreotid und IGF-1 plus Octreotid inkubiert und der Einfluss dieser Substanzen auf die Zellproliferation untersucht werden.

Dazu wurden HepG₂-Zellen auf 12-well Platten ausgesät, täglich mit den oben angegebenen Substanzen behandelt und jeden Tag jeweils 3 wells gezählt und daraus ein Mittelwert gebildet. Die Stimulation mit IGF-1 führte zu einer Zunahme der Zellproliferation gegenüber den unbehandelten Zellen. Es kam zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl bei Behandlung mit Octreotid und Octreotid plus IGF-1 im Vergleich zur Stimulation mit IGF-1 allein. Die Zellzahl lag auch unterhalb der unstimulierten Zellreihe, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

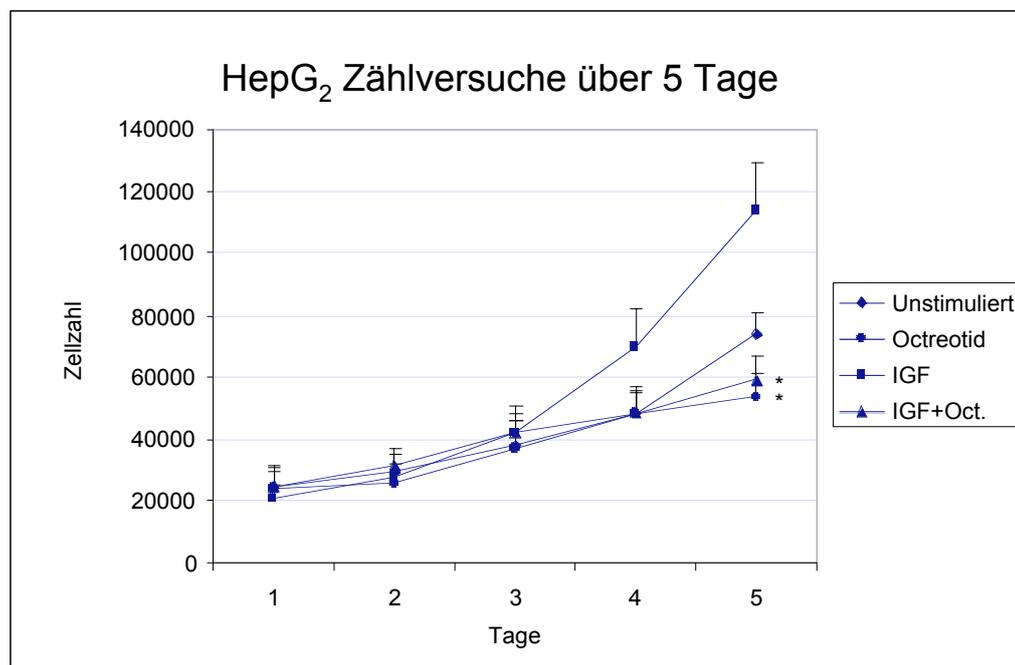


Abbildung 9: Untersuchung des Einflusses von Octreotid auf die Proliferation von HepG₂-Zellen. HepG₂-Zellen wurden an 5 Tagen unter serumfreien Bedingungen mit IGF-1, Octreotid und IGF-1 plus Octreotid behandelt und täglich gezählt, wobei täglich eine neue Reihe wells (n=3) auf einer Platte gezählt wurde. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Zellzahl unter der Stimulation mit IGF-1, während die mit den anderen Substanzen behandelten Zellen im Vergleich dazu signifikant weniger wuchsen. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Zellen, bei denen nur regelmäßig das serumfreie Medium gewechselt wurde (unstimuliert). Mittelwerte am 5. Tag: unstimuliert: 74233,33, IGF-1 150400,57, Octreotid 53866,66, IGF-1 plus Octreotid 58900 Zellen. p (Octreotid vs. IGF-1) 0,031; p (Octreotid plus IGF-1 vs. IGF-1) 0,039.

4.4 Thymidinuptake

Mit Hilfe von Thymidinuptakes sollte die Proliferation von HepG₂-Zellen mit einer zweiten Methode untersucht werden. Dazu wurden HepG₂-Zellen ausgesät und für sieben Tage mit IGF-1, Octreotid und IGF-1 plus Octreotid behandelt. Am siebten Tag wurde mit Tritium markiertes Thymidin zu den Zellen gegeben und der Einbau nach sechs Stunden Inkubation bei 37°C im β -Counter gemessen. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Einbaus unter IGF-1 nach 7 Tagen ($p=0,017$) sowie eine Reduktion der durch IGF-1 hervorgerufenen Stimulation unter Koinkubation der Zellen von IGF-1 mit Octreotid. (Abb. 13). Als Referenz diente wiederum eine Zellreihe, bei der nur täglich das serumfreie Medium gewechselt wurde (unstimuliert).

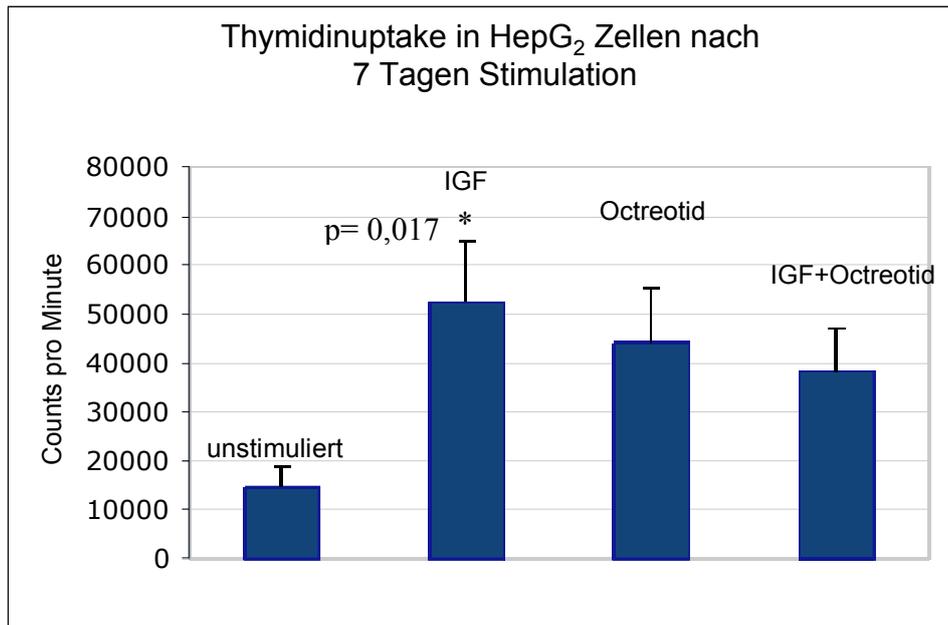


Abbildung 10: Thymidinuptake in HepG₂-Zellen. HepG₂ Zellen wurden für 7 Tage unter serumfreien Bedingungen mit IGF-1, IGF-1 plus Octreotid und Octreotid allein inkubiert. Anschließend wurde Tritium markiertes Thymidin zu den Zellen gegeben und im β -Counter der Einbau gemessen. Es zeigte sich eine signifikante Proliferation unter dem Einfluss von IGF-1 versus unstimuliert. Diese IGF-1 induzierte Proliferation konnte durch Koinkubation mit Octreotid gehemmt werden.

4.5 Western Blot

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der Einfluss des Somatostatinanalogons Octreotid allein und bei Koinkubation mit IGF-1 auf intrazelluläre Signalwege näher charakterisiert werden. Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, über den beide Rezeptoren agieren, ist die Map Kinasen Signalkaskade (Patel 1999; Alexia, Fourmatgeat et al. 2006).

Mit Hilfe von Western Blots wurde die Phosphorylierung von Map Kinasen unter dem Einfluss von IGF-1 und IGF-1 plus Octreotid analysiert. Dazu wurden Kinetiken mit diesen Substanzen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit den Hormonen stimuliert und dann die Reaktion auf Eis nach 0,5; 1; 2,5; 5; 15 und 30 Minuten gestoppt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und das Zelllysate in Western Blots eingesetzt. Die Detektion

der Map Kinasen Phosphorylierung erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper vom Kaninchen [Phospho-specific p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody Kit]. Als Zweitantikörper wurde ein Meerrettich Peroxidase konjugierter Antikörper (polyklonales AntiKaninchen IgG) verwendet. Um falsche Ergebnisse durch ungleiche Beladung der Taschen beim Western Blot auszuschließen, wurde die Nitrocellulose Membran nach der ersten Detektion von Antikörper befreit und dann erneut mit einem Antikörper gegen p42/44 Map Kinase inkubiert; dieser Antikörper bindet gleichermaßen an phosphorylierte wie an nicht modifizierte Map-Kinasen. Zweitantikörper war der gleiche wie bei der ersten Detektion. Die Banden wurden dann eingescannt und mit Hilfe des Programms Image J ausgemessen. Die Stärke der bei der ersten Detektion entstandenen Banden wurde dann durch die bei der zweiten Detektion entstandenen geteilt. Das Ergebnis wurde in Excel Tabellen eingegeben und graphisch dargestellt. Man erhielt zusammenfassend die in den Abbildungen 11 und 12 gezeigten Werte.

Erwartungsgemäß ließ sich unter der Wirkung des Wachstumsfaktors IGF-1 nach 30 Minuten Inkubation eine Steigerung der Phosphorylierung um das 2,5-fache nachweisen. In Abb. 12 ist die Wirkung von IGF-1 und Octreotid auf die Phosphorylierung dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass die stark stimulierende Wirkung von IGF-1 durch Octreotid zumindest reduziert, wenn auch nicht aufgehoben werden kann. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass Octreotid unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie z.B, IGF in der Lage ist, die Zellteilung zu hemmen.

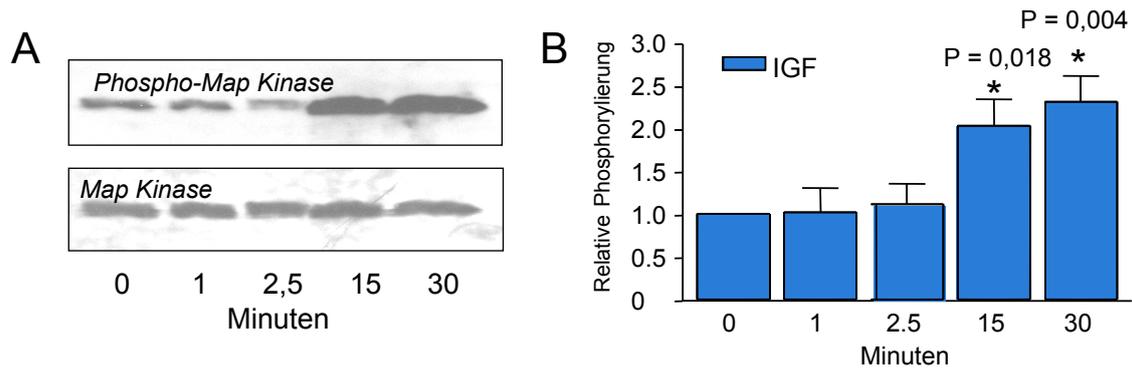


Abbildung 11: Kinetik der Map Kinasen Phosphorylierung nach Stimulation mit IGF-1. HepG₂ Zellen wurden mit IGF-1 für 0,5; 1; 2,5; 5; 15 und 30 Minuten stimuliert. Abschnitt **A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die oberen Banden zeigen die Phosphorylierungszunahme unter IGF-1 nach Detektion mit dem p42/44 phospho-Map Kinase Antikörper. Die unteren Banden geben die Beladungskontrolle wider. **(B)** Die detektierten Banden wurden mit Hilfe des Programms Image J ausgemessen und die relative Phosphorylierung errechnet. In der Abbildung wurden vier unabhängige Experimente zusammengefasst. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der relativen Phosphorylierung nach 15 und 30 Minuten.

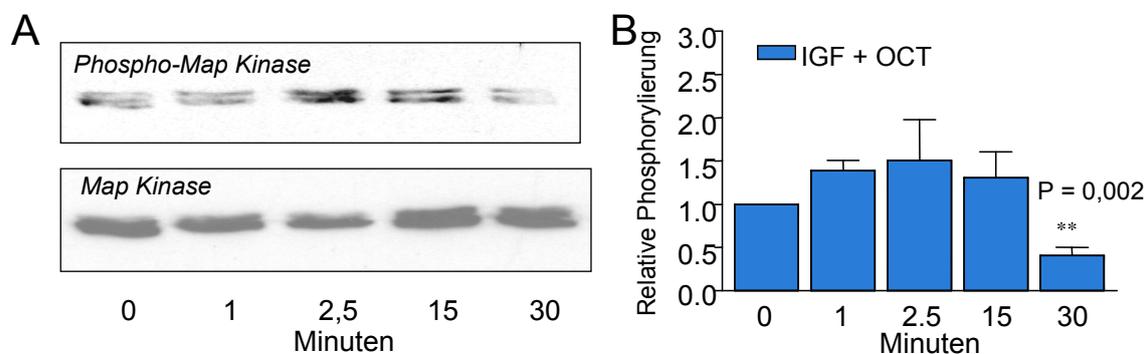


Abbildung 12: Kinetik der Map Kinasen Phosphorylierung nach Stimulation mit IGF-1 und Octreotid. HepG₂ Zellen wurden mit IGF-1 und Octreotid für 0,1; 2,5; 5; 15; und 30 Minuten stimuliert. **A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die oberen Banden zeigen die Phosphorylierungszunahme unter IGF-1 nach Detektion mit dem p42/44 phospho-Map Kinase Antikörper. Die unteren Banden geben die Beladungskontrolle wider. **(B)** Die detektierten Banden wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgemessen und die relative Phosphorylierung errechnet. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung bei 30 Minuten nach Zusammenfassung der durchgeführten Western Blots (n=4).

5. Diskussion

5.1 Wirkungen des Somatostatin Analogons Octreotid

Das Hepatozelluläre Karzinom gehört weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren (Thomas and Abbruzzese 2005). In mehreren klinischen Studien wurde der therapeutische Effekt von Somatostatin und seinen Analoga auf das HCC untersucht. Dabei kam man zu unterschiedlichen Ergebnissen, die von einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit, über eine reine Verbesserung der Lebensqualität bis hin zu keiner Wirkung reichten.

Aufgrund der möglichen Nebenwirkungen und der hohen Therapiekosten sollten der Anwendung von Octreotid fundierte Studienergebnisse zugrunde gelegt werden. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu der in vitro Wirkung von Octreotid auf die HCC-Zelllinie HepG₂ durchgeführt.

Der antiproliferative Effekt, der durch Somatostatinrezeptorsubtypen hervorgerufen wird, beruht auf zwei verschiedenen Mechanismen. Zum einem werden zytostatische (Zellzyklusarrest) und zum anderen zytotoxische (Apoptose) Mechanismen in Gang gesetzt. Dabei benutzt nicht jeder Rezeptorsubtyp die gleichen Wege der intrazellulären Signalweitergabe, unter anderem dadurch sind die Funktionen der einzelnen Subtypen vielfältig. Im Folgenden sollen einige der rezeptortypischen Wirkungen dargestellt und zur Interpretation der Versuchsergebnisse herangezogen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Octreotid als Einzelsubstanz nicht zu einer Inhibition des Zellwachstums führte. Weder kam es bei Proliferationsassays zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl von HepG₂-Zellen (Abb. 10), noch wurde die Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin und damit die Neusynthese von DNA durch die Inkubation mit Octreotid gesenkt (Abb. 11). Unter der Wirkung von IGF-1 war erwartungsgemäß eine starke Zunahme der HepG₂-Proliferation zu verzeichnen.

Alle Versuche wurden unter serumfreien Bedingungen durchgeführt, da in Vorversuchen unter Standardzellkulturbedingungen keine signifikanten Ergebnisse zu erzielen waren. Dieser Effekt beruht vermutlich darauf, dass in dem von uns für die Zellkultur verwendeten Kälberserum wachstumsfördernde Hormone enthalten sein können, so dass durch Zugabe von IGF-1 kein additiver proliferationsfördernder Effekt erzielt werden konnte.

Interessanterweise konnte Octreotid jedoch die durch Inkubation mit IGF-1 hervorgerufene Proliferation der Zellen verhindern. Da Octreotid allein keine hemmende Wirkung zeigte, scheint es keine direkte apoptotische Wirkung von Octreotid auf HepG₂-Zellen zu geben. Vielmehr ist eine Induktion von Zellzyklusarrest sehr viel wahrscheinlicher. Dieser Effekt macht sich in einem durch die IGF-1 Wirkung heraufreguliertem System besonders bemerkbar.

Liu et al. wiesen in HepG₂-Zellen nach Inkubation mit Octreotid eine Karyopyknosis, Karyorrhesis sowie eine Zunahme apoptotischer Körperchen nach; dieses legte nahe, dass die Zellen dabei waren, in Apoptose zu gehen. Zudem konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die Alpha-Fetoprotein Konzentration (AFP) als Marker für Tumoraktivität im Zellüberstand signifikant unter der Behandlung mit Octreotid abnahm (Qin and Tang 2004). Allerdings zeigten die von Liu et al. untersuchten HepG₂-Zellen ein anderes Expressionsmuster von Somatostatinrezeptoren als die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten (Liu, Huo et al. 2004) (s. Tabelle 1).

Die Entwicklung polyklonaler Antikörper gegen Peptidfragmente aller fünf bekannten SSTR erlaubt die unabhängige Darstellung der verschiedenen Subtypen mittels Immunzytochemie. Eine weitere sehr sensitive Methode ist der Nachweis mittels RT-PCR. In dieser Arbeit wurden beide Methoden angewandt, um das spezifische Expressionsmuster von Somatostatinrezeptorsubtypen in HepG₂-Kulturzellen zu

untersuchen. Es konnte übereinstimmend mit beiden Verfahren gezeigt werden, dass HepG₂-Zellen die Somatostatinrezeptorsubtypen 1, 2 und 5 exprimieren (Abbildungen 8 und 9).

Auch andere Arbeitsgruppen wiesen Somatostatinrezeptoren bei HepG₂-Zellen nach und kamen dabei zu abweichenden Ergebnissen. Einen Überblick bietet Tabelle 1. Die Arbeitsgruppe Notas et al. führte ebenfalls RT-PCR- und Immuncytochemie-Untersuchungen durch. Sie fanden die Somatostatinrezeptorsubtypen 2, 3 und 5 bei HepG₂ Zellen (Notas, Kolios et al. 2004). Im Gegensatz dazu führten Liu et al. den Nachweis von SSTR 2, 3 und 4 in HepG₂-Zellen mittels RT-PCR-Analysen (Liu, Huo et al. 2004). Zum gleichen Resultat kamen Raderer et al. mit Hilfe von Northern Blots (Raderer, Hejna et al. 2000).

Es ist bekannt, dass Tumorzellen eher zu spontanen Mutationen und Chromosomenaberrationen neigen als gesunde Zellen. Die Unterschiede im Expressionsmuster von Somatostatinrezeptorsubtypen in der Kulturzelllinie HepG₂, die durch verschiedene Arbeitsgruppen festgestellt wurde, könnten daher zum Beispiel durch solche Erbgutveränderungen entstanden sein.

Immuncytochemie und RT-PCR gelten als zuverlässige Verfahren zum Nachweis von Rezeptorproteinen. Fehlerquellen in der Methodik erscheinen daher beim übereinstimmenden Nachweis von SSTR durch zwei unabhängige Methoden, die einerseits auf molekulargenetischer und andererseits auf proteinbiochemischer Ebene arbeiten, als unwahrscheinlich.

Publikationen	Jahr	Nachweismethode	SSTR-Subtypen
Notas et al.	2004	RT-PCR Immuncytochemie	2,3,5
Liu et al.	2004	RT-PCR	2,3,4
Raderer et al.	2000	Northern Blot	2,3,4

Tabelle 1: Nachweis unterschiedlicher Somatostatinrezeptor Expressionsmuster in HepG₂-Zellen durch verschiedene Arbeitsgruppen.

In CHO (Chinese hamster ovary) Zellen, welche alle Somatostatinrezeptorsubtypen exprimieren, konnte gezeigt werden, dass Apoptose allein über SSTR 3 vermittelt wurde. Diese Apoptoseinduktion war jedoch abhängig vom Vorhandensein des p53-Tumorsuppressorgens (Sharma, Patel et al. 1996). Da wir keine Expression von SSTR3 in HepG₂-Kulturzellen nachweisen konnten, könnte der mangelnde apoptotische Effekt von Octreotid hierüber erklärt werden.

Die Arbeitsgruppe Guillermet et al. konnte in humanen Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) zeigen, dass über SSTR-2 ein Caspase-abhängiger apoptotischer Effekt vermittelt wird (Guillermet, Saint-Laurent et al. 2003). Nimmt man also die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe als Interpretationsgrundlage für die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, ist der fehlende apoptotische Effekt nicht allein auf das Expressionsmuster der Zellen zurückzuführen.

Beim Vergleich der SSTR Homologe von verschiedenen Spezies muss natürlich bedacht werden, dass die Rezeptoren speziesinterindividuelle Wirkungen vermitteln könnten. CHO-Zellen sind Hamsterzellen, während die in dieser Dissertation behandelten HepG₂-Zellen und die oben genannten BxPC-3 Zellen humanen Ursprungs sind. Entsprechend

muss auch bedacht werden, dass Somatostatinrezeptoren auf Zellen aus unterschiedlichen Organen zu differenten Effekten führen könnten.

Raderer et al. untersuchten die Wirkung des Somatostatinanalogons Lanreotid auf die Zellproliferation von HepG₂-Zellen. Sie bedienten sich dafür Tetrazolium assays, mit denen man die mitochondriale Aktivität messen kann (Raderer, Hejna et al. 2000). Diese Arbeitsgruppe sah unter Standardzellkulturbedingungen mit FCS keine Apoptose in HepG₂ Zellen, während unter serumfreien Bedingungen nach Inkubation mit Lanreotid ein signifikanter Unterschied zu sehen war. IGF-1 zeigte analog zu unseren Ergebnissen keinen proliferativen Effekt in Anwesenheit von FCS, unter serumfreien Bedingungen war dieser jedoch deutlich. Zugabe von Lanreotid konnte diesen proliferativen Effekt bei hohen Konzentrationen noch verstärken, während niedrigere Konzentrationen des Somatostatinanalogons einen inhibitorischen Effekt hervorriefen.

Alle fünf Rezeptorsubtypen binden Somatostatin mit hoher Affinität, aber nur die Subtypen 2, 3 und 5 binden auch die kurzen synthetischen Analoga, wie zum Beispiel Octreotid (Lahlou, Guillermet et al. 2004), wobei sie mit der höchsten Affinität an SSTR 2 und mit niedrigerer Affinität an SSTR 3 und 5 binden (Ferone, van Hagen et al. 2000). Für mehrere Zelltypen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von SSTR 2 zu Zellzyklusarrest führt (Pages, Benali et al. 1999; Benali, Cordelier et al. 2000). Wenn man davon ausgeht, dass Octreotid mit höchster Affinität an SSTR 2 bindet, ein Rezeptorsubtyp der vornehmlich Zellzyklusarrest vermittelt und nur mit sehr viel geringerer Affinität an SSTR 1 und 5, könnte das ebenfalls erklären, warum bei uns keine Apoptose festgestellt werden konnte.

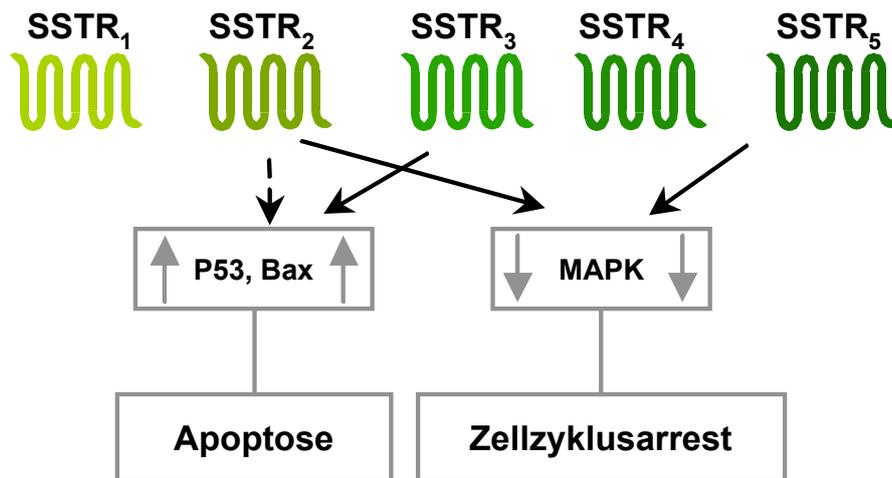


Abbildung 13: Interaktion von SSTRs mit P53, Bax und MAP-Kinasen. Stimulation von SSTR kann zu Zellzyklusarrest und oder Apoptose führen. Dabei wird Apoptose zum Beispiel über das p53 Tumorsuppressorgen oder BAX gesteuert.

5.2 Signaltransduktion

Für alle Somatostatinrezeptorsubtypen konnte in der Vergangenheit ein Einfluss auf den Map Kinasen Signalweg bewiesen werden (Patel 1999). Der Signaltransduktionsweg der extrazellulär regulierten Map Kinasen (ERK-1, -2) ist eine wichtige Determinante in der Kontrolle diverser zellulärer Prozesse wie zum Beispiel Proliferation, Überleben, Differenzierung und Motilität. Aber auch Apoptose und Zellzyklusarrest können durch sie vermittelt werden. Häufig ist dieser Weg in Tumorzellen, insbesondere auch im HCC, heraufreguliert und damit ein attraktives Ziel für die Antitumorthherapie (Gollob, Wilhelm et al. 2006; Kohno and Pouyssegur 2006).

Grundsätzlich gibt es zwei Wege, über die Apoptose vermittelt werden kann. Zum einen gibt es extrinsische Mechanismen. Ein bekanntes Beispiel ist die Familie der Todesrezeptoren (TNF-R1), die durch Liganden wie TNF- α aktiviert werden (Gardnerova, Blaque et al. 2000). Aber auch intrinsische Prozesse, die zum Beispiel durch Beschädigung der DNA ausgelöst werden, können die Apoptose einleiten. Beide Wege

involvieren die Aktivierung von Calcium-abhängigen Cysteinproteasen (Caspasen). Dies führt zu den typischen Veränderungen apoptotischer Zellen wie DNA-Fragmentierung und Ausstülpungen der Zellmembran (Guillermet, Saint-Laurent et al. 2003; Rodriguez and Schaper 2005).

MapKinasen-Aktivierung kann neben der Induktion von Apoptose auch zu Wachstumsarrest führen (Lahlou, Saint-Laurent et al. 2003).

Patel et al. beschrieben, dass 3 SSTR-Subtypen, nämlich SSTR 2, 3 und 5, in verschiedenen Zellsystemen inhibitorisch auf die Mapkinasen Signalkaskade wirkten, während SSTR 1 und 4 eine Aktivierung der selbigen hervorrief (Patel 1999).

5.3 „Receptor crosstalk“

In den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wird deutlich, dass IGF-1 zu einer Proliferation von HepG₂-Zellen unter serumfreien Bedingungen und zu einer signifikanten Aktivierung der Map Kinasen Kaskade führt. Die IGF-1-Signalkaskade besitzt potente proliferative und antiapoptotische Eigenschaften. Diese werden nicht allein über den konventionellen IGF-1-Rezeptor, sondern auch über Insulinrezeptoren und INSR/IGF-16F-1R Hybrid Moleküle vermittelt, die in einer Vielzahl von intrazellulären Signalen unter anderem auch in einer Aktivierung der Map Kinasen Signalkaskade resultieren (Breuhahn, Longerich et al. 2006). Nachdem in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass die proliferative Wirkung von IGF-1 unter serumfreien Bedingungen durch Octreotid inhibiert werden kann und beide Rezeptoren zu einer Aktivierung des Map Kinasen Signalwegs führen, ist interessant, welches Zusammenspiel von Signaltransduktion diesem Prinzip zugrunde liegt. Dieser „crosstalk“ könnte sich im Bereich der Rezeptoren, G-Proteine oder second messenger bewegen (Cordeaux and Hill 2002).

Beispielsweise konnte von der Arbeitsgruppe Lahlou et al. gezeigt werden, dass es über p27 Aktivierung nach Stimulation mit einem Somatostatinanalogon des

Somatostatinrezeptorsubtyps 2 zu Zellzyklusarrest kommt. Diese Wirkung kann durch Koinkubation mit Insulin noch potenziert werden. SSTR2 kann die durch Wachstumsfaktor hervorgerufene Zellproliferation über Aktivierung der Tyrosinphosphatase SHP-1 durch Induktion der Cyclin abhängigen Kinase Inhibitors p27Kip1 hemmen. Lahlou et al. untersuchten die Signalmoleküle, die SSTR2 mit p27Kip1 vernetzen. Sie konnten zeigen, dass das Somatostatinanalogon RC-160 vorübergehend ERK-2 Aktivität stimuliert und die Insulin stimulierte Erk2 Aktivität noch potenziert. RC-160 induzierte p27Kip1 Hochregulation und Inhibition der insulinabhängigen Zellproliferation können beide durch die Vorinkubation von CHO/SSTR2-Zellen mit dem MEK 1/2 Inhibitor PD 98059 verhindert werden. Außerdem konnten sie zeigen, dass die SSTR2 vermittelte ERK-2 Stimulation abhängig vom Pertussis sensitiven Gi/o Protein, der Tyrosin Kinase Src, den beiden G-Proteinen Ras und Rap1 und der MEK Kinase B-Raf ist, unabhängig ist sie dagegen von Raf-1. Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und die beiden Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 sind RAS und RAP-1 vorgeschaltet. Sie konnten zusammengenommen also einen neuen Weg zeigen, über den ein G-Protein gekoppelter Rezeptor Zellproliferation inhibiert, indem er ERK über eine SHP-1-SHP-2-PI3K/RAS-Rap1/B-Raf/MEK Kaskade aktiviert (Lahlou, Saint-Laurent et al. 2003).

Es gibt viele Beispiele für Crosstalk zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen und Rezeptoren, welche teilweise auch Einfluss auf die Malignität von Tumoren nehmen können. Die Gruppe Rasola et al. fand überexprimierte oder aktivierte Hepatocyte growth factor Rezeptoren kodiert vom MET Proto-Onkogen in einer Vielzahl von kolorektalen Tumoren. HGF (hepatocyte growth factor) stimuliert epitheliale Zellen zur Proliferation, Bewegung und komplexen Differenzierung wie Morphogenese und Angiogenese (Birchmeier and Gherardi 1998). Die Progression maligner Tumoren wird durch die transkriptionale Aktivierung von beta-Catenin hervorgerufen. Catenine sind

Verbindungsproteine zwischen Zytoskelett und Zelladhäsionsmolekülen. Besonders beta-Catenin ist jedoch auch Teil eines Signaltransduktionsweges (wnt-Signalweg). Der wnt-Signalweg reguliert verschiedene Prozesse in der Embryonalentwicklung und ist bei der Entstehung von Tumorzellen beteiligt (Taketo 2006). Rasola et al. konnten weiterhin zeigen, dass ein funktioneller Crosstalk zwischen MET und beta-Catenin die invasiven Eigenschaften des kolorektalen Karzinoms aufrecht erhält und erhöht (Rasola, Fassetta et al. 2006).

5.4 Ausblick

Der Einfluss von Somatostatin und seinen Analoga auf das Hepatozelluläre Karzinom wurde in vielen klinischen Studien untersucht, die dabei erzielten Ergebnisse waren jedoch inkongruent. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das häufig in klinischen Studien eingesetzte Octreotid eine IGF-1 vermittelte proliferationsfördernde Wirkung hemmen kann. Bei der immunhistochemischen Untersuchung verschiedener humaner HCC-Schnitte konnte ein individuelles Expressionsmuster der SSTR1-5 für einzelne HCCs nachgewiesen werden {Bläker, 2004 #18}. Octreotid bindet jedoch nur an die Rezeptorsubtypen SSTR 2,5 und 3 mit abnehmender Affinität. Eine Ursache für die mangelnde Wirkung von Octreotid in vivo könnte daher im individuellen Subtyp-Expressionsmuster des einzelnen Patienten liegen. Das Wissen um die individuelle Expression der einzelnen SSTRs beim HCC eines Patienten könnte man sich daher unter Umständen zunutze machen, um die Therapie mit Somatostatinanaloga genau an das entsprechende Somatostatinrezeptorsubtypmuster anzupassen und ein besseres Outcome zu erzielen.

6. Zusammenfassung

Somatostatin ist ein Polypeptid-Hormon, das überwiegend inhibitorische Funktionen besitzt. In Tumorzellen kann es zu Apoptose und/oder Zellzyklusarrest führen. Diese Wirkungen werden über fünf verschiedene Somatostatinrezeptorsubtypen (SSTR 1-5) vermittelt, die alle zur Familie der G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptoren gehören. Die Bindung von Somatostatin oder einem entsprechenden Analogon führt zur Modulation einer Reihe G-Protein gekoppelter Signale (z. B. auch der Mitogen aktivierten Protein Kinase). Das in dieser Arbeit verwendete Somatostatinanalogon Octreotid hat die Somatostatin Rezeptorsubtypen (SSTR) 2, 3 und 5 als Angriffsziel. Die größte Affinität hat es dabei zu SSTR 2.

In dieser Arbeit wurden wachstumshemmende Effekte des Somatostatinanalogons Octreotid und zugrunde liegende intrazelluläre Mechanismen in der humanen Hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG₂ untersucht. Die SSTR Expression wurde durch RT-PCR und Immunzytochemie mit Subtyp spezifischen Oligonukleotiden bzw. Antikörpern ermittelt. In Proliferationsassays und Thymidinuptakes konnte dargelegt werden, dass IGF-1 zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation von Zellen führt, und dass eine Koinkubation mit Octreotid diesen Effekt deutlich reduziert, während es als Einzelsubstanz keinen signifikanten Effekt hat. In Western Blots zeigte sich, dass Octreotid die IGF-1 induzierte Phosphorylierung von Map Kinasen signifikant reduzieren kann. Vermittelt durch SSTR 2 und/oder 5 inhibiert Octreotid die durch IGF-1 induzierte Proliferation von HepG₂-Zellen. Dieser Effekt geht einher mit einer durch IGF-1 induzierten Phosphorylierung von Erk 1/2 und einem daraus resultierenden Zellzyklusarrest. In vivo könnten Somatostatinanaloga bei HCCs antiproliferative Eigenschaften durch Hemmung der Effekte von endogenem IGF-1 entfalten.

Literaturverzeichnis

- Alexia, C., P. Fourmatgeat, et al. (2006). "Insulin-like growth factor-I stimulates H4II rat hepatoma cell proliferation: dominant role of PI-3'K/Akt signaling." Exp Cell Res **312**(7): 1142-52.
- Becker, G., H. P. Allgaier, et al. (2007). "Long-acting octreotide versus placebo for treatment of advanced HCC: a randomized controlled double-blind study." Hepatology **45**(1): 9-15.
- Benali, N., P. Cordelier, et al. (2000). "Inhibition of growth and metastatic progression of pancreatic carcinoma in hamster after somatostatin receptor subtype 2 (sst2) gene expression and administration of cytotoxic somatostatin analog AN-238." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9180-5.
- Birchmeier, C. and E. Gherardi (1998). "Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase." Trends Cell Biol **8**(10): 404-10.
- Bläker, M., M. Schmitz, et al. (2004). "Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas." J Hepatol **41**(1): 112-8.
- Bohula, E. A., M. P. Playford, et al. (2003). "Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as anti-cancer treatment." Anticancer Drugs **14**(9): 669-82.
- Bosch, F. X., J. Ribes, et al. (2005). "Epidemiology of hepatocellular carcinoma." Clin Liver Dis **9**(2): 191-211, v.
- Breuhahn, K., T. Longerich, et al. (2006). "Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma." Oncogene **25**(27): 3787-800.
- Candi, E., G. Melino, et al. (1995). "Tamoxifen and somatostatin affect tumours by inducing apoptosis." Cancer Lett **96**(1): 141-5.
- Cordeaux, Y. and S. J. Hill (2002). "Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors." Neurosignals **11**(1): 45-57.
- Denley, A., L. J. Cosgrove, et al. (2005). "Molecular interactions of the IGF system." Cytokine Growth Factor Rev **16**(4-5): 421-39.

-
- Dimitroulopoulos, D., D. Xinopoulos, et al. (2002). "The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer." Hepatogastroenterology **49**(47): 1245-50.
- El-Serag, H. B. and A. C. Mason (1999). "Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States." N Engl J Med **340**(10): 745-50.
- Fehmann, H. C. and R. Arnold (1996). "[Molecular biology, pharmacology and signal transduction of 5 cloned human somatostatin receptors]." Z Gastroenterol **34**(11): 767-74.
- Ferjoux, G., C. Bousquet, et al. (2000). "Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation." J Physiol Paris **94**(3-4): 205-10.
- Ferone, D., M. P. van Hagen, et al. (2000). "Somatostatin receptor subtypes in human thymoma and inhibition of cell proliferation by octreotide in vitro." J Clin Endocrinol Metab **85**(4): 1719-26.
- Gardnerova, M., R. Blaque, et al. (2000). "The use of TNF family ligands and receptors and agents which modify their interaction as therapeutic agents." Curr Drug Targets **1**(4): 327-64.
- Gollob, J. A., S. Wilhelm, et al. (2006). "Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway." Semin Oncol **33**(4): 392-406.
- Guillermat, J., N. Saint-Laurent, et al. (2003). "Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 155-60.
- Hejna, M., M. Schmidinger, et al. (2002). "The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing?" Ann Oncol **13**(5): 653-68.
- Janeway, C. (2001). Immunobiology.
- Kohno, M. and J. Pouyssegur (2006). "Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy." Ann Med **38**(3): 200-11.

-
- Kouroumalis, E., P. Skordilis, et al. (1998). "Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study." Gut **42**(3): 442-7.
- Kouroumalis, E. A. (2001). "Octreotide for cancer of the liver and biliary tree." Chemotherapy **47 Suppl 2**: 150-61.
- Krantic, S., I. Goddard, et al. (2004). "Novel modalities of somatostatin actions." Eur J Endocrinol **151**(6): 643-55.
- Lahlou, H., J. Guillermet, et al. (2004). "Molecular signaling of somatostatin receptors." Ann N Y Acad Sci **1014**: 121-31.
- Lahlou, H., N. Saint-Laurent, et al. (2003). "sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation." J Biol Chem **278**(41): 39356-71.
- Lamberts, S. W., A. J. van der Lely, et al. (1996). "Octreotide." N Engl J Med **334**(4): 246-54.
- Lee, C. M., C. H. Hung, et al. (2006). "Viral etiology of hepatocellular carcinoma and HCV genotypes in Taiwan." Intervirolgy **49**(1-2): 76-81.
- Lehy, T., M. Dubrasquet, et al. (1979). "Effect of somatostatin on normal and gastric-stimulated cell proliferation in the gastric and intestinal mucosae of the rat." Digestion **19**(2): 99-109.
- LeRoith, D. and C. T. Roberts, Jr. (2003). "The insulin-like growth factor system and cancer." Cancer Lett **195**(2): 127-37.
- Liu, H. L., L. Huo, et al. (2004). "Octreotide inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells." Acta Pharmacol Sin **25**(10): 1380-6.
- Luttrell, L. M. (2005). "Composition and function of G protein-coupled receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity." J Mol Neurosci **26**(2-3): 253-64.
- Marrero, J. A. (2005). "Hepatocellular carcinoma." Curr Opin Gastroenterol **21**(3): 308-12.

-
- Marrero, J. A., R. J. Fontana, et al. (2005). "Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma." J Hepatol **42**(2): 218-24.
- Miller, B. S. and D. Yee (2005). "Type I insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in cancer." Cancer Res **65**(22): 10123-7.
- Morimoto, O., H. Nagano, et al. (2005). "Association between recurrence of hepatocellular carcinoma and alpha-fetoprotein messenger RNA levels in peripheral blood." Surg Today **35**(12): 1033-41.
- Notas, G., M. Kampa, et al. (2006). "The inhibitory effect of opioids on HepG2 cells is mediated via interaction with somatostatin receptors." Eur J Pharmacol.
- Notas, G., G. Kolios, et al. (2004). "Cortistatin production by HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line and distribution of somatostatin receptors." J Hepatol **40**(5): 792-8.
- Pages, P., N. Benali, et al. (1999). "sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1). Evidence for the role of SHP-1." J Biol Chem **274**(21): 15186-93.
- Pagliacci, M. C., R. Tognellini, et al. (1991). "Inhibition of human breast cancer cell (MCF-7) growth in vitro by the somatostatin analog SMS 201-995: effects on cell cycle parameters and apoptotic cell death." Endocrinology **129**(5): 2555-62.
- Pagliarulo, V., B. George, et al. (2004). "Sensitivity and reproducibility of standardized-competitive RT-PCR for transcript quantification and its comparison with real time RT-PCR." Mol Cancer **3**: 5.
- Patel, Y. C. (1999). "Somatostatin and its receptor family." Front Neuroendocrinol **20**(3): 157-98.
- Patel, Y. C., M. Greenwood, et al. (1996). "Molecular biology of somatostatin receptor subtypes." Metabolism **45**(8 Suppl 1): 31-8.
- Peng, S. Y., W. J. Chen, et al. (2004). "High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma:

- significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations." Int J Cancer **112**(1): 44-50.
- Qin, L. X. and Z. Y. Tang (2004). "Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature." J Cancer Res Clin Oncol **130**(9): 497-513.
- Rabe, C., T. Pilz, et al. (2002). "[Clinical outcome of a cohort of 63 patients with hepatocellular carcinoma treated with octreotide.]" Z Gastroenterol **40**(6): 395-400.
- Raderer, M., M. H. Hejna, et al. (2000). "Treatment of hepatocellular cancer with the long acting somatostatin analog lanreotide in vitro and in vivo." Int J Oncol **16**(6): 1197-201.
- Rasola, A., M. Fassetta, et al. (2006). "A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth." Oncogene.
- Rodriguez, M. and J. Schaper (2005). "Apoptosis: measurement and technical issues." J Mol Cell Cardiol **38**(1): 15-20.
- Samonakis, D. N., J. Moschandreass, et al. (2002). "Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues." Oncol Rep **9**(4): 903-7.
- Sharma, K., Y. C. Patel, et al. (1996). "Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3." Mol Endocrinol **10**(12): 1688-96.
- Sherman, M. (2005). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening." Semin Liver Dis **25**(2): 143-54.
- Srikant, C. B. (1997). "Human somatostatin receptor mediated antiproliferative action evokes subtype selective cytotoxic and cytostatic signaling." Yale J Biol Med **70**(5-6): 541-8.

-
- Taketo, M. M. (2006). "Wnt signaling and gastrointestinal tumorigenesis in mouse models." Oncogene **25**(57): 7522-30.
- Thomas, M. B. and J. L. Abbruzzese (2005). "Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma." J Clin Oncol **23**(31): 8093-108.
- Ward, C. W., T. P. Garrett, et al. (2001). "The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor." Mol Pathol **54**(3): 125-32.
- Werry, T. D., G. F. Wilkinson, et al. (2003). "Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺." Biochem J **374**(Pt 2): 281-96.
- Wu, F., Z. B. Wang, et al. (2005). "Advanced hepatocellular carcinoma: treatment with high-intensity focused ultrasound ablation combined with transcatheter arterial embolization." Radiology **235**(2): 659-67.
- Yuen, M. F., R. T. Poon, et al. (2002). "A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma." Hepatology **36**(3): 687-91.
- Zatelli, M. C., F. Tagliati, et al. (2001). "Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 differentially affect proliferation in vitro of the human medullary thyroid carcinoma cell line tt." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 2161-9

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Michael Bläker für die freundliche Überlassung des Themas meiner Dissertation. Ich möchte mich außerdem bei ihm für die hervorragende Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit und für die berufliche Förderung, die über die Grenzen dieser Doktorarbeit hinausging, bedanken.

Frau Sylvia Burghardt danke ich für die exzellente Einarbeitung und Anleitung während des experimentellen Teils. Für die Hilfestellung bei den RT-PCR-Untersuchungen danke ich Frau Martina Schulz ganz besonders. Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. Andrea Pace für die kompetente Beratung bei der Durchführung der Western blots bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas de Weerth danke ich herzlich für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe sowie für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und der Geräte.

Meinem Mann Christian danke ich für die geduldige und liebevolle Unterstützung während des experimentellen Teils und den Korrekturen dieser Arbeit.

Bei meiner Mutter Inge Schmitt und meinem Bruder Hendrik Schmitt bedanke ich mich für die Korrekturvorschläge zu dieser Promotionsschrift und für fortwährende Unterstützung während des Studiums. Meinem Vater Dr. Friedrich Schmitt danke ich dafür, dass er mein Interesse an der Medizin und der wissenschaftlichen Arbeit geweckt hat.

Lebenslauf

Name: Dorothee Elisabeth Krebs-Schmitt, geb. Schmitt

E-mail: d.schmitt@uke.uni-hamburg.de

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule
1988-1997 Gymnasium
1994/95 Wilderness High school in Adelaide, Australien
1997 Abitur

Studium: 1997-1999 Jura an der Universität Bonn
1999-2005 Medizinstudium an der Universität Hamburg
Ärztliche Prüfung

Dissertation: Seit 2003 in der Arbeitsgruppe für Molekulare Gastroenterologie der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des UKE bei PD Dr. med. M. Bläker zum Thema: „Charakterisierung antiproliferativer Effekte von Somatostatin-Analoga in hepatozellären Karzinomzellen“
Poster bei der Jahrestagung der DGVS 2005 in Köln:
„Octreotid inhibiert die IGF-1 induzierte Proliferation hepatozellulärer Karzinome *in vitro*“, M. Bläker, D. Schmitt, A. Pace, J. Kluwe, N. Pluntke, A. de Weerth
Abstract P262, Z Gastroenterol 2005;43:755-1000

Berufserfahrung:: Seit Januar 2006 als Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendmedizin des UKE

Hamburg, 02.08.2007

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 2. August 2007