

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Fischer)

**Somatostatin und Somatostatinrezeptoren im Tränenwegsystem
und an der Augenoberfläche**

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

von Ivonne Minsel
geboren am 06.07.1982 in Lauchhammer

Betreuer: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen

Gutachter: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen, Institut für Anatomie und Zellbiologie,
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein, Anatomisches Institut,
Christian-Albrechts-Universität Kiel

Öffentliche Verteidigung am 05.06.2009

Referat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung des Peptidhormons Somatostatin (SS) und seiner fünf Rezeptoren (hSSTR) an der Augenoberfläche und im Tränenwegssystem untersucht werden.

Jüngste Untersuchungen zeigen das Vorkommen von SS im exokrinen System der Tränendrüse und in der Tränenflüssigkeit. Um nähere Erkenntnisse über die mögliche Bedeutung und das Expressionsmuster von SS und der hSSTR an der Augenoberfläche und im Tränenwegssystem zu gewinnen, wurden Untersuchungen mittels RT-PCR, Real-time PCR, Western blot und Immunhistochemie an Tränendrüse, Tränenflüssigkeit, Konjunktiva, Kornea, ableitenden Tränenwegen, sowie an humanen Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinien durchgeführt. Zellkultur-experimente wurden ebenfalls zur Analyse der hSSTR-Regulation nach Zytokin-, SS- oder VEGF-Stimulation mit Hilfe der Real-time PCR durchgeführt. Außerdem wurde mittels eines Korneadefektmodells der Einfluß von SS auf die korneale Wundheilung von Mäusen untersucht.

Die Ergebnisse bestätigen das Vorkommen von SS in der Tränendrüse und Tränenflüssigkeit. Die hSSTR1, 2 und 5 können in Konjunktiva, ableitenden Tränenwegen und Tränendrüse nachgewiesen werden. In der Kornea und den humanen Epithelzelllinien werden die hSSTR1 und 2 detektiert (Kornea-epithelzelllinie nur hSSTR2). Nach Stimulation der humanen Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinien mit Zytokinen, SS oder VEGF zeigt sich eine Regulation der hSSTR1 und 2. Außerdem konnte mit Hilfe des Korneadefektmodells an der Maus gezeigt werden, dass eine Konzentration von 10ng/ml SS die korneale Wundheilung signifikant verbessert.

SS wird von Azinuszellen der Tränendrüse gebildet und in die Tränenflüssigkeit abgegeben. Die Ergebnisse deuten auf eine autokrine und parakrine Rolle von SS im Tränenwegssystem und an der Augenoberfläche hin. Die Effekte werden vorrangig über die hSSTR1 und 2 vermittelt. Des Weiteren implizieren die Befunde eine Bedeutung von SS bei der Regulation der kornealen Angiogenese und Antiangiogenese und als Immunmodulator im Rahmen von Infektionen und Entzündungen an der Augenoberfläche.

Minsel, Ivonne: Somatostatin und Somatostatinrezeptoren im Tränenwegssystem und an der Augenoberfläche. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 72 Seiten, 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielstellung	4
3	Material und Methodik	5
3.1	Eingesetzte Materialien und Chemikalien	5
3.1.1	Chemikalien	5
3.1.2	Gebrauchswaren und Geräte	7
3.1.3	Sterilisation von Lösungen und Geräten	9
3.1.4	Molekulargewichtstandards	9
3.2	Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials	9
3.2.1	Herkunft der Gewebeproben	9
3.2.2	Herkunft der Zelllinien	10
3.3	Medien und Kultivierung	10
3.3.1	Stimulationsversuche	11
3.4	RNA-Isolierung	11
3.4.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	11
3.4.2	RNA-Isolierung aus Zellen	12
3.5	DNase Verdau	13
3.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung	14
3.7	Reverse Transkription	15
3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
3.9	Agarosegel-Elektrophorese	18
3.10	Real-time Quantitative PCR	19
3.11	Proteinisolierung	22
3.11.1	Proteinisolierung aus Gewebe	22
3.11.2	Proteinisolierung aus Zellen	22
3.12	Proteinkonzentration	23
3.13	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse	23
3.14	Western Blot	25
3.15	Dot-Blot	26
3.16	Immunhistochemie	27
3.16.1	Paraffinschnitt an Gewebe	27
3.16.2	Gefrierschnitt an Gewebe	29

3.16.3	Gefrierschnitt an Zellkulturen	29
3.17	Tierversuch	30
3.18	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Nachweis von Somatostatin an der Augenoberfläche	33
4.1.1	Somatostatin in der Tränendrüse	33
4.1.2	Somatostatin in der Tränenflüssigkeit	33
4.1.3	Somatostatin und humane Epithelzelllinien	34
4.2	Somatostatinrezeptoren an der Augenoberfläche	34
4.2.1	Nachweis auf RNA-Ebene	34
4.2.2	Nachweis auf Proteinebene	36
4.2.3	Immunhistochemischer Nachweis	36
4.3	Somatostatinrezeptoren an der Augenoberfläche nach Zytokinstimulation	37
4.3.1	Qualitativer Nachweis auf RNA-Ebene	37
4.3.2	Quantitativer Nachweis auf RNA-Ebene	38
4.3.3	Immunhistochemischer Nachweis	41
4.4	Somatostatinrezeptoren an der Augenoberfläche nach Stimulation mit Somatostatin oder VEGF	42
4.4.1	Qualitativer Nachweis auf RNA-Ebene	42
4.4.2	Nachweis auf Proteinebene	44
4.5	Somatostatin/Octreotid und korneale Wundheilung	44
5	Diskussion	46
5.1	Somatostatin und Augenoberfläche	46
5.2	Immunmodulierende Rolle von Somatostatin	48
5.3	Effekte von Somatostatin und Octreotid auf die korneale Wundheilung	52
5.4	VEGF und Augenoberfläche	53
5.5	Ausblick	56
6	Zusammenfassung	58
7	Literaturverzeichnis	60
8	Thesen	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidisulfat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
°C	Grad Celcius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
con	Konjunktiva
cor	Kornea
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCE	humane korneale Epithelzelllinie
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hSS	humanes Somatostatin
hSSTR	humaner Somatostatinrezeptor
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
Ig	Tränendrüse
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl, Stichprobenumfang
NaOH	Natronlauge
nd	ableitende Tränenwege
NHC	humane Konjunktivaepithelzelllinie
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Oct	Octreotid
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	phosphatgepufferte Saline
PGN	Peptidoglycan
Pk	Pankreas
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
rpm	revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sRNA	small nuclear-RNA
SS	Somatostatin
TAE	Trisaminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Trisgepufferte Saline
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Units
UV	ultraviolett

1 Einleitung

Die Augenoberfläche des Menschen wird von Kornea und Konjunktiva gebildet. Die Konjunktiva besteht aus mehreren bindegewebigen Blättern und ist von einem mehrschichtigen unverhornenden Plattenepithel überzogen, das Becherzellen enthält. Sie reicht von der Rückseite der Lider (*conjunctiva palpebrae*) über die vorderen Abschnitte des Augapfels (*conjunctiva bulbi*) und geht am *Limbus cornea* in die Kornea über. Das Stroma (*Tela subconjunctiva*) besteht aus lockerem Bindegewebe und enthält Immunzellen, Mastzellen und Blutgefäße, die am *Limbus cornea* ein Randschlingennetz bilden. Die Kornea ist etwa 0,5mm dick und bildet den vorderen Abschluss des Augapfels. Sie besteht aus Epithel, Stroma und Endothel und ist frei von Blutgefäßen. Die Kornea wird nach außen von einem mehrschichtig unverhornenden Plattenepithel, das der Bowman'schen Membran aufsitzt, begrenzt. Die flachen, oberflächlichen Zellen bilden eine Diffusionsbarriere gegenüber der Tränenflüssigkeit. Von der Basalschicht aus wird das Epithel innerhalb von sieben Tagen erneuert, sodass Epitheldefekte schnell ausheilen. Das Epithel verhindert das Eindringen von Krankheitskeimen und beteiligt sich an der Regulation des Wassergehalts im Korneastroma. Nach innen schließt sich das korneale Stroma, das etwa 90% der Korneadicke ausmacht, an. Es enthält Kollagenfibrillen, Proteoglykane, Wasser und Keratozyten. Das einschichtige Endothel haftet an der Descemet-Membran und bedeckt die Hinterfläche. Es bildet eine Diffusionsbarriere gegenüber der mit Kammerwasser gefüllten Vorderkammer und ist durch die Aufrechterhaltung eines osmotischen Gradienten für Wasser in Richtung Vorderkammer wesentlich an der Transparenz der Kornea beteiligt. Das Endothel ist nicht regenerationsfähig, sodass ein Zellverlust beispielsweise durch Entzündungen oder Verletzungen zur Trübung der Kornea führt.

Die Tränendrüse liegt hinter dem temporalen oberen Orbitalrand in der *Fossa lacrimalis*. Die tubuloalveoläre Drüse ist in Läppchen gegliedert und mündet mit etwa zehn Ausführungsgängen in den oberen Fornix (*Fornix superior conjunctivae*). Die Endstückzellen sezernieren isotone Tränenflüssigkeit, Muzine und verschiedene antimikrobielle Stoffe, wie Defensine, Lactoferrin oder Lysozym.

Der Tränenfilm benetzt die Oberfläche der Epithelien und sorgt für die Reinigung,

Befeuchtung und Immunabwehr an der Augenoberfläche. Er wird reflektorisch von der Tränendrüse und kontinuierlich durch die akzessorische Tränendrüsen, Becherzellen und Meibomdrüsen produziert. Die isotone Tränenflüssigkeit macht den Hauptteil des Tränenfilms aus, sie enthält die oben genannten antimikrobiellen Stoffe und Muzine. Hauptfunktion der Muzine ist die Stabilisierung des Tränenfilms. An der Luft/Wassergrenze befindet sich eine Schicht Lipide, die der Verdunstung entgegenwirkt. Eine innere Muzinschicht (membrangebundene Muzine) vermittelt die Haftung des Tränenfilms an der Plasmamembran.

Das natürliche Somatostatin ist ein aus 14 oder 28 Aminosäuren bestehendes zyklisches Polypeptid, das aus dem Hypothalamus bei der Suche nach einem Faktor, der das Wachstumshormon (STH) hemmen kann, isoliert wurde (Krush et al., 1968; Brazeau et al., 1973). Somatostatin kommt außerdem in der Hypophyse, im Gastrointestinaltrakt, dem Pankreas und an der Augenoberfläche vor und hat diverse biologische Eigenschaften. Besonders wichtig sind seine inhibitorischen, antisekretorischen, antiproliferativen und antientzündlichen Eigenschaften (Patel, 1999). Der biologische Effekt von Somatostatin wird über fünf verschiedene hochaffine Oberflächenrezeptoren (hSSTR1-5) vermittelt. Eine klinische Anwendung von Somatostatin war auf Grund der Notwendigkeit einer intravenösen Verabreichung, der kurzen Halbwertszeit und der Hypersekretion von Somatotropin, Insulin und Glukagon nach intravenöser Verabreichung nur beschränkt möglich (Guillemin, 1978). Wesentlich potenter ist das vollsynthetische Somatostatinanalogon Octreotid, das heute erfolgreich bei der Behandlung der diabetischen Retinopathie angewendet wird (Lang, 2004). In vitro Studien der Ulmer Arbeitsgruppe um C. W. Spraul, G. K. Lang und G. E. Lang zeigen außerdem den inhibierenden Effekt von Octreotid auf Wachstumsfaktoren (Amann et al., 2000; Spraul et al., 2002).

Bakterielle Keratitiden und Konjunktividen zählen zu den häufigsten augenärztlichen Problemen. Sie bilden eine wichtige Komponente zahlreicher Infektionen des Auges, besonders bei Patienten nach penetrierenden Hornhautverletzungen, nach langem Tragen von Kontaktlinsen und nach refraktiver Hornhautchirurgie (Baum, 1995; Gritz and Whitcher, 1998; Brennan and Chantal Coles, 1997; Levartovsky et al., 2001).

Das „Trockene Auge“ (synonym – Sicca-Syndrom oder Keratoconjunctivitis sicca) ist als „multifaktorielle Störung von Tränenfilm und Augenoberfläche anzusehen, die mit

physisch-psychischem Unbehagen oder visueller Beeinträchtigung einhergeht. Inflammatorische Prozesse und ein hyperosmolarer Tränenfilm sind wichtige Faktoren, die mit diesem Krankheitsbild assoziiert werden“ (Jacobi et al., 2006).

Von kultivierten Zellen des Rattenhirns ist bekannt, dass Somatostatin durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF α und IL-6 in den Zellen induzierbar ist (Scarborough et al., 1989,1990). Untersuchungen beim Menschen haben ergeben, dass Somatostatin von Fettgewebszellen (Adipozyten) durch Entzündungen und Infektionen des Gewebes induziert und sezerniert wird und den Entzündungsverlauf beeinflussen kann (Seboek et al., 2004). An der Augenoberfläche kommt Somatostatin in der Tränenflüssigkeit vor, somit ist der mögliche Einfluss des Polypeptids als Immunmodulator bei kornealen Infektionen oder Entzündungen im Rahmen der oben erwähnten Krankheitsbilder und der kornealen Wundheilung von großer Bedeutung.

Des Weiteren sind Gefäßneubildungen ernste Komplikationen bei ischämischen Erkrankungen der Retina wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie, retinalen Ast- und Zentralvenenverschlüssen, sowie Retinopathien bei Frühgeburt. Neovaskularisationen können aber auch im Rahmen von Entzündungen, Infektionen und Verletzungen der Kornea und der Limbusstammzellen auftreten, insbesondere bei chronischem Krankheitsverlauf. Konsequenz solcher kornealen Gefäßneubildungen kann nicht nur ein ernstzunehmender Visusverlust bis hin zur Erblindung sein, sondern die Neovaskularisationen werden auch, bedingt durch den Verlust des Immunprivilegs der Kornea, für die schlechte Prognose einer Korneatransplantation verantwortlich gemacht (Khodadoust, 1973; Coster, 1981).

Zahlreiche Studien belegen, dass der Gefäßwachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor; VEGF) eine entscheidende Rolle in der Gefäßbildung sowie bei pathologischen Gefäßneubildungen spielt (Ferrara et al., 1991; Kenyon et al., 1996; Phillips et al., 1994).

An der gesunden Augenoberfläche werden ein oder mehrere Anti-angiogenesefaktoren sezerniert, die für die Balance zwischen Antiangiogenese und Angiogenese wichtig sind. Einer dieser Inhibitoren ist das Somatostatinanalogon Octreotid (Danesi et al., 1997). Somit lässt der beschriebene antiproliferative Effekt von Somatostatin ebenfalls an eine funktionelle Bedeutung für die Transparenz der Kornea durch eine lokal ausgelöste Wirkung denken.

2 Zielstellung

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- 1) Qualitative Analyse der Expression des Peptidhormons Somatostatin in humaner Tränendrüse, in einer Kornea- und einer Konjunktivaepithelzelllinien und Bestimmung der Somatostatinkonzentration in der Tränenflüssigkeit
 - Immunhistochemischer Nachweis von Somatostatin in der Tränendrüse
 - Untersuchung der Somatostatinexpression in Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinien mittels RT-PCR
 - Bestimmung der Somatostatinkonzentration in der Tränenflüssigkeit durch densitometrische Auswertung einer Dot-blot Analyse

- 2) Qualitativer Nachweis der Somatostatinrezeptoren 1-5 in Konjunktiva, Kornea, ableitenden Tränenwegen, sowie Kornea- und Konjunktivazelllinien
 - Nachweis der Somatostatinrezeptoren durch RT-PCR, Western Blot und Immunhistochemie

- 3) In-vitro-Regulation der Somatostatinrezeptoren 1-5 durch Stimulation mit Zytokinen oder Bakterienbestandteilen sowie Stimulation mit VEGF oder Somatostatin verschiedener Konzentrationen
 - Analyse des Einflusses der Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β , 20U/ml), Interleukin-1 α (IL-1 α , 10ng/ml), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α , 10ng/ml) und der Bakterienbestandteile Peptidoglycan (PGN, 1 μ g/ml) aus *Staphylococcus aureus* und Lipopolysaccharid (LPS, 1 μ g/ml) aus *Pseudomonas aeruginosa* auf die Regulation der Somatostatinrezeptoren nach 6h und 24h durch RT-PCR, Real-time PCR, Western-Blot und immunhistochemische Untersuchungen
 - Analyse des Einflusses von SS (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) oder VEGF (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) auf die Regulation der Somatostatinrezeptoren nach 6h durch Real-time PCR

- 4) In-vivo Analyse der Wirkung des Peptidhormons Somatostatin und dessen Analogon Octreotid auf die korneale Wundheilung an einem Korneadefektmodell der Maus

3 Material und Methodik

3.1 Eingesetzte Materialien und Chemikalien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid Solution	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
AEC Substratlösung	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Amphoterin B	Biochrom, Berlin, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Biotinylierte Zweitantikörper	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Bradford-Reagenz	Bio-RAD Laboratories GmbH
Bromphenol Blau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DNA Ladder (100bp)	Promega, WI, USA
10nM dNTP's	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
0,1M DTT (1,4-Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland (D.)
Ethidiumbromid	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Entwickler-6 Fixierlösung (GBX Developer & Fixer Twin Pack)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fluoreszein	SE Thilo Alcan Pharma GmbH

3. Material & Methodik

5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D.
Ketavet 100ng/ml	Pharmacia GmbH
Medium: DMEM/HAM's F12	Biochrom, Berlin, Deutschland
50mM MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
0,9% NaCl	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
NaOH	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Normalserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaninchenserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Octreotid	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
10x PCR Rxn Buffer (-MgCl ₂)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Platinum SYBR-Green qPCR SuperMix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphataseinhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Primärantikörper Somatostatin	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Primärantikörper Somatostatin- rezeptor 1, 2 und 5	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Rnase-Free Water	Promega, Mannheim, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Rompun 20mg/ml	Beyer, Düsseldorf, Deutschland
RLT-Buffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RQ 1 Dnase 10x Reaktion-Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ 1 Dnase Stop-Solution	Promega, Mannheim, Deutschland

RQ 1 Rnase-Free Dnase (1U/μl)	Promega, Mannheim, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Somatostatin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Strept ABComplex/HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Super Script II Rnase H ⁻ (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA Polymerase (5U/μl) Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenamin)	Bio-RAD Laboratories GmbH
Tris	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
30% Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.

3.1.2 Gebrauchswaren und Geräte

BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dentalwachs	Yeti Dental, Engen, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Filterpapierscheibchen	Whatman Filterpapier Nr. 1450 070
Gelkassetten	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HistoBond Adhesion Micro Slides	Marienfeld, Deutschland
Hybond-ECL	Amersham Biosciences, NJ, USA
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, NJ, USA
Milchpulver (Sucofin)	TSI Trade Service Int., Zeven, D.
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Deutschland
Nitrocellulose Membran	Kodak BioMax MS-1 Film
PCR Softlubes	Biozym, Oldendorf, Deutschland

3. Material & Methodik

Petrischalen	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Pipette 5, 10, 50ml	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen, kristall 0,5 – 10µl	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, gelb 5 – 100µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Pipettenspitzen, blau 100 – 1000µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Stericankanüle, grau	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
6-Well-Platten	TPP, Switzerland
24-Well-Platten	TPP, Switzerland
Zellkulturflaschen (50ml)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Brutschrank	Forma Series II Water Jacketed CO ₂ - Incubatio Hepa Class 100
Cryocut	Cryocut E Reicher-Jung
Digital-Kamera	Sony Cyber Shot DSC-F717, Osaka, Japan
Endoskop	Firma Storz, Tuttlingen, Deutschland
Gelkammer	Agagel Maxi, Biometra
Microtom	Microm GmbH Type HM400R
PCR-Geräte	PTC – 200 Peltier Thermal Cycler Mastercycler gradient Eppendorf Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland
Photomikroskop	PTC – 200 DNA Engine Cycler
Real Time PCR	CFD – 3200 Opticon 2 Detector MJ Research
Real Time PCR-Software	Opticon Monitor 2 MJ Research
SpeedVac	Genevac SF50, Biometra
Spektrometer	Ultrospec 3300pro Amersham Bioscience, NJ, USA
Sterilbank	Thermo electon corporation Holton Lamin Air
Western blot und Dot blot	ChemiDoc-It Imaging System, UVP
Zentrifugen	Centrifuge 5415C Eppendorf Biofuge fresco Heraeus

3.1.3 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Hitze unempfindliche Lösungen und Gebrauchswaren wurden für 30min bei 120°C und 10⁵ Pascal autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen wurden über einen Sterilfilter mit 0,2µm Porengröße sterilgefiltert.

3.1.4 Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards	DNA Molecular Weight Marker VIII (0,019 – 1,11kbp), Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (80 – 1031bp), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Protein-Längenstandards	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (11 – 170kDa), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

3.2 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

3.2.1 Herkunft der Gewebeproben

Für histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen werden Gewebeproben aus Tränendrüse, Konjunktiva, Kornea, ableitenden Tränenwegen und Lunge von 4 männlichen und 11 weiblichen Körperspendern im Alter von 53-89 Jahren des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität zu Halle/Wittenberg gewonnen. Die Gewebeproben werden bis zur Untersuchung bei –80°C gelagert oder in Paraffin eingebettet.

Zur densitometrischen Auswertung einer Dot-blot Analyse wird Tränenflüssigkeit von sechs Probanden mit Schirmerstreifen gesammelt. Analysiert wird die Tränenflüssigkeit von drei weiblichen Probanden im Alter von 24, 31 und 55 Jahren und drei männlichen Probanden im Alter von 22, 26 und 40 Jahren.

3.2.2 Herkunft der Zelllinien

Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC

Die morphologische und funktionelle Charakterisierung (Diebold et al., 2003) der spontan immortalisierten IOBA (Instituto Universitario de Oftalmobiologia Aplicada, Universidad de Valladolid, Spain) –NHC (normal human conjunctiva) Zelllinie zeigt, dass die Zelllinie die Konjunktiva des Menschen weitgehend repräsentiert und somit als Model nutzbar ist. Die Zellen besitzen eine hohe Proliferationsrate. Eine Chromosomenanalyse hat die humane Herkunft der IOBA-NHC-Zelllinie bestätigt.

Corneaepithelzelllinie HCE

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte humane corneale Epithelzelllinie (HCE). Die Zelllinie wurde aus einer Spenderhornhaut generiert und mit dem Simian Virus 40 (SV40), das das Large T-Antigen enthält, transfiziert und immortalisiert. Die HCE-Zelllinie zeigt mit normalen humanen cornealen Epithelzellen vergleichbare Eigenschaften.

3.3 Medien und Kultivierung

- Medium: DMEM/HAM's F-12 (PAA, Pasching, Austria)
- Zusatz: fetales Kälberserum
- Phosphatgepufferte Saline (PBS)
- 0,25%-ige Trypsin/EDTA-Lösung
- Insulin
- Hydrocortisol

Die Corneaepithelzelllinie (HCE) und die Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) werden in sterilen Gewebekulturflaschen als Monolayer kultiviert. Das Medium, DMEM/HAM's F12 im Verhältnis 1:1, wird mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Zusätzlich wird das Medium der Konjunktivaepithelzellen mit 1µg/ml Insulin und 5µg/ml Hydrocortisol angereichert. Auf weitere Zusätze wie Antibiotika wird verzichtet. Die Zellkulturen wachsen in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 18% Sauerstoff. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank durchgeführt.

3.3.1 Stimulationsversuche

Um die immunmodulierende Rolle von Somatostatin im Rahmen kornealer Infektionen und Entzündungen zu untersuchen, werden die Zelllinien mit unterschiedlichen Agenzien stimuliert. Die verwendeten Substanzen entsprechen denen, die beim Ablauf einer Infektion im Gewebe vorkommen. Nachdem die Zellen zu 80% konfluent gewachsen sind, kultiviert man die Zellen zunächst zwei Stunden in serumfreiem Kulturmedium. Die Agenzien werden mit serumfreiem Medium verdünnt bis die gewünschte Konzentration erreicht ist und auf die Zellen appliziert. Die Zelllinien werden mit 1µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), 1µg/ml Peptidoglycan (PGN), 10ng/ml Tumornekrosefaktor alpha ($TNF\alpha$), 10ng/ml Interleukin-1 α (IL-1 α) und 20U/ml Interleukin-1 β (IL-1 β) für jeweils 6h und 24h inkubiert. Unbehandelte Kontrollen werden mitgeführt.

3.4 RNA-Isolierung

3.4.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wird hierzu das RNeasy Mini Kit verwendet. Das Prinzip des Kits und dessen Spezifität beruht darauf, dass in Gegenwart eines chaotropen Salzes Nukleinsäuren spezifisch an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden werden. Die Bindungsreaktion wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und ihrer Wechselwirkung mit den gelösten Nukleinsäuren verursacht. Durch eine DNase Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies werden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. Nach einfachen Waschschrritten kann die RNA frei von Begleitsubstanzen in RNase freies Wasser eluiert werden.

Die bei -80° C gelagerten Gewebeproben werden für den Gewebeaufschluss mit einem Mörser und Pistill direkt in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Gewebepulver wird in ein RNase-freies, mit Flüssigstickstoff gekühltes 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 600µl stark denaturierendem Guanidinium-Isothiocyanat-haltigem Lysepuffer und 6µl 14,3M β -Mercaptoethanol versetzt, um RNasen zu inaktivieren, die in allen Geweben vorkommen und innerhalb weniger Minuten große Mengen RNA degradieren können (Bekman et al., 1986). Dabei sollte die Ausgangsmenge der zerkleinerten Probe

maximal 30mg betragen, damit später die Bindungskapazität der Säulen (100µg RNA) und die Lysekapazität des Puffers nicht überschritten werden. Von zellarmen Geweben dagegen, wie zum Beispiel Cornea, müssen für die Isolierung mindestens 100mg Gewebe eingesetzt werden, um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu erzielen. Mit einem Rotor-Stator-Homogenisator werden die Gewebeproben weiter aufgeschlossen und dabei zugleich in Lysepuffer homogenisiert. Eine unvollständige Homogenisierung beeinträchtigt die Bindung der RNA an die RNeasy Membran und damit die RNA-Ausbeute.

Das Homogenat wird anschließend für 3min bei 13000U/min und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5ml Tube überführt und mit 70%igem Ethanol auf das doppelte Volumen aufgefüllt, um die Bindungseigenschaften der RNA zu erhöhen. Das Gemisch wird in ein Mikroreaktionsgefäß mit einer Silikagelmembran gegeben und anschließend bei 10000U/min für 15sec zentrifugiert. In den folgenden Schritten wird die RNA mit zwei verschiedenen Puffern von Verunreinigungen freigeschrieben. Hierzu werden zunächst 350µl RW1-Puffer auf die Silikagelmembran gegeben und für 15sec bei 10000U/min zentrifugiert. Der Puffer wird in einem 2ml Sammelgefäß aufgefangen und verworfen. Es folgt der DNase Verdau, für den jeweils 10µl Dnase I und 70 µl DNase-Puffer eingesetzt werden. Der Ansatz wird 15min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit 350µl RW1-Puffer für 15sec bei 10000U/min zentrifugiert. Anschließend werden in zwei sich wiederholenden Schritten jeweils 500µl RPE-Puffer auf die Membran pipettiert, erst 15sec, dann 2min bei 10000U/min zentrifugiert, Puffer und Sammelgefäß danach verworfen. Abschließend wird die an die Silikagelmembran gebundene RNA mit 2 x 30µl RNase freiem Wasser in ein 1,5ml Reaktionsgefäß eluiert. Bei -80°C kann die RNA für mehrere Wochen gelagert werden. Durch diese Prozedur werden in erster Linie RNA-Moleküle isoliert, die größer als 200 Nukleotide sind. Kleine Nukleotide, wie 5,8S RNA, 5S RNA oder tRNA bindet die Silikagelmembran nicht quantitativ.

3.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Um RNA aus Zellen der Zellkultur zu extrahieren, wird 1ml Trizol pro Petrischale direkt auf die Zellen gegeben, nachdem das Kultur- bzw. Stimulationsmedium entfernt wurde. Die Zellen werden durch das Trizol vom Schalenboden gelöst und können nun aus der Schale pipettiert werden. Das Gemisch wird bei -80°C

eingefroren. Nach dem Auftauen werden 200µl Chloroform hinzugegeben, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und 15min bei 10000U/min zentrifugiert. Nach der Phasentrennung durch die Zentrifugation wird die wässrige Phase zur Fällung der RNA mit Isopropanol (-20°C) 10min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10min bei 10000U/min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das entstandene Pellet zweimal mit kaltem 70%-igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wird anschließend in einer SpeedVac unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet und in 30µl DEPC-Wasser bei 70°C gelöst. Die Messung der Konzentration erfolgt photometrisch, wie unter 3.6 beschrieben.

3.5 DNase Verdau

Da es bei der RNA-Isolierung von Zellen immer zu einer Kontamination mit geringen DNA-Mengen kommt, wird ein zusätzlicher DNA-Verdau mit DNase I durchgeführt (30min bei 37°C). Aufgrund der hohen Sensitivität der Polymerasekettenreaktion können kleinste Mengen DNA drastische Auswirkungen auf die Befunde haben. Aus diesem Grund muß man sichergehen, daß das RNA-Eluat absolut DNA-frei ist. Die verwendete Dnase darf keine RNA-abbauende Aktivität besitzen, um die RNA nicht in Mitleidenschaft zu ziehen. Sieben µg RNA werden nach der Isolierung und anschließender Konzentrationsbestimmung für den DNA-Verdau eingesetzt. Folgender Reaktionsansatz wird verwendet (Tab.1):

Tab.1 Reaktionsansatz DNase Verdau

	Volumen
Rnase-freier DNase 10 x Reaktionspuffer	2µl
Rnase-freie DNase 1U/µg	7µl
RNA-Lösung aus Extraktion	xµl
Nuklease-freies Wasser	11µl – xµl
Gesamtvolumen	20µl

Der Reaktionsansatz wird bei 37°C für 30min inkubiert. Um die Reaktion zu unterbrechen werden nachfolgend 2µl DNase-Stop-Lösung dazugegeben und 10min bei 65°C inkubiert. Nach dem Verdau erfolgt nochmals eine photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung, wie unter 3.6 beschrieben.

3.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA im Eluat kann durch Messung der optischen Dichte bei 260nm (OD_{260}) in einem Spektrophotometer bestimmt werden. Aufgrund der Spektralcharakteristika ihrer Basen, die ein Absorptionsmaximum bei 260nm zeigen, absorbieren Nukleinsäuren Licht zwischen einer Wellenlänge von 250-270nm. Bei Verdünnung der RNA in Wasser entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 42,1µg/ml Gesamt-RNA (Sambrook et al., 1989). Durch folgende Gleichung läßt sich die RNA-Konzentration der eingesetzten Proben errechnen:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times 42,1 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Vor der Messung wird das RNA-Eluat mit DEPC-Wasser 1:100 verdünnt und das Spektrophotometer mit 100µl DEPC-Wasser auf Null geeicht. Der Quotient OD_{260} / OD_{280} erlaubt einen Rückschluß auf die Reinheit der isolierten RNA hinsichtlich möglicher Kontamination durch UV-absorbierende Stoffe wie zum Beispiel Proteinen. Allerdings ist der Quotient OD_{260} / OD_{280} stark vom pH-Wert abhängig. Ein niedriger pH-Wert resultiert in einem zu niedrigen Meßergebnis für OD_{260} / OD_{280} und reduziert zudem die Sensitivität gegenüber Protein-Verunreinigungen. Für sehr reine RNA gilt dann:

$$OD_{260} / OD_{280} = 1,9 - 2,1$$

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA kann anhand einer Agarosegel-Elektrophorese nachvollzogen werden, bei der die Banden der 28S und 18S ribosomalen RNA (rRNA) nach erfolgter Ethidiumbromid-Inkubation bei 5,0 und 1,9 Kilobasen (kb) begutachtet werden können. Die jeweiligen Banden der rRNA sollten scharf begrenzt in dem Agarosegel erscheinen.

3.7 Reverse Transkription

Der reversen Transkription (Kogan et al., 1987) liegt eine Umschreibung von RNA in komplementäre DNA mit anschließender PCR zugrunde. Die mRNA liegt in den Zellen in nur sehr geringer Kopienzahl vor. Eine Möglichkeit, bestimmte Sequenzen in dem RNA-Gemisch nachzuweisen, ist die selektive Amplifikation dieser Sequenzen. Dazu muß die mRNA zunächst durch ein virales Enzym, die reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Kawasaki, 1989). Das Enzym benötigt als Startpunkt ein kurzes Stück doppelsträngiger Nukleinsäure. Man setzt daher p(dT)-Oligomere als Primer ein, die mit den Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren und so den Startpunkt für die Transkription liefern. Für die Erststrangsynthese werden 2µg RNA aus dem DNase Verdau eingesetzt und der Superscript™ II-RT-Kit von Invitrogen nach folgendem Standardprotokoll verwendet (Tab.2):

Tab.2 Standardprotokoll Reverse Transkription

	Volumen
2µg RNA aus DNase Verdau	xµl
Primer OligoT	1µl
DEPC-Wasser	11µl – xµl
Gesamtvolumen	12µl

Der Reaktionsansatz wird 10min bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Im Anschluss daran werden die Reaktionsgefäße für eine Minute auf Eis abgekühlt. Danach werden je 8µl des Mastermixes (Tab.3) zu jedem Ansatz hinzugegeben.

Tab.3 Zusammensetzung Mastermix

	Volumen
5 x Puffer	4µl
0,1M DTT	2µl
10mM dNTP's	1µl
Reverse Transkriptase	1µl
Gesamtvolumen	8µl

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wird der Ansatz mit 20µl DEPC-Wasser aufgefüllt, sodass eine Endkonzentration von 1µg/ml entsteht.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) erlaubt es, in vitro eine enorme Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren (Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987). Dazu nutzt man bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation. Eine DNA-Polymerase erzeugt aus dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) Kopien von Teilen der vorgelegten cDNA. Die von der Polymerase als Matrize benötigte Einzelstrang-DNA erzeugt man durch Erhitzen doppelsträngiger DNA fast bis zum Siedepunkt. Für den Start der DNA-Synthese braucht die Polymerase jedoch ein kurzes Stück doppelsträngige DNA. Durch Zugabe eines Paares verschiedener Oligonukleotidprimer, die sich komplementär an beiden Enden der gesuchten Sequenz anlagern, können Start- und Endpunkt der DNA-Synthese festgelegt werden. So erhält man als Produkt einen ganz speziellen, von den Bindungsstellen der Primer flankierten DNA-Strang. Jeder der so neusynthetisierten Stränge enthält wiederum Primer-Bindungsstellen und kann bei einer erneuten Polymerisation wie der Altstrang als Matrize dienen. Die Zunahme der Kopienzahl des Fragments erfolgt daher nicht linear, sondern exponentiell. Durch mehrfache Wiederholung eines Temperaturzykluses in einem Thermocycler werden die Reaktionsschritte (1) Trennung der Doppelstränge (Denaturierung, 94°C), (2) Anlagerung der Primer (Annealing, 50-60°C) und (3) Elongation (72°C) so oft durchlaufen, bis das gewünschte Fragment in ausreichender Kopienzahl vorliegt. Nach n Reaktionszyklen enthält das Reaktionsgemisch ein theoretisches Maximum von 2^n doppelsträngigen DNA-Molekülen, die Kopien der Sequenz zwischen den Primern darstellen (Watson et al., 1992). Die Anzahl der Reaktionszyklen wird üblicherweise zwischen 25 und 40 gewählt, je nach Menge der Ausgangs-cDNA. Ein Erhöhen der Zykluszahl ergibt nicht notwendigerweise eine größere Menge an PCR-Produkt, sondern kann zur Bildung von unspezifischen Produkten führen. Die PCR ist so sensitiv, dass sich selbst einzelne Moleküle zu nachweisbaren Mengen amplifizieren lassen.

In der vorliegenden Arbeit werden je 1µg cDNA mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert (Tab.4):

Tab.4 Reaktionsansatz PCR

	Volumen
cDNA	2µl
Primer Mix	0,6µl
10mM dNDP's	0,6µl
10 x Buffer (- MgCl ₂)	3µl
50mM MgCl ₂	0,9µl
RNase-freies Wasser	22,72µl
Taq-Polymerase	0,18µl
Gesamtvolumen	30µl

Es wird ein PCR-Programm mit 40 Reaktionszyklen angewendet, die einzelnen Reaktionsschritte werden wie folgt festgelegt (Tab.5):

Tab.5 Reaktionsschritte PCR

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Vordenaturierung	94°C	3min
2	Denaturierung	94°C	30sec
3	Annealing	primerspezifisch	30sec
4	Elongation	72°C	45sec
	40 Zyklen Schritt 2 – 4		
5	Elongation	72°C	10min

Die Annealing-Temperatur wird nach Angaben von Baldino et al. (1989) errechnet und beträgt für hSS 56°C, für hSSTR1 und hSSTR2 57°C, für hSSTR3 und hSSTR4 59°C und für hSSTR5 61°C. Als Negativkontrolle wird die cDNA im Reaktionsansatz durch Wasser ersetzt. Die PCR-Produkte werden durch die Agarosegel-Elektrophorese identifiziert. Für die PCR werden folgende Primer verwendet (Tab.6):

Tab.6 Primer PCR

Primer		Sequenz	Größe des Produktes
Aktin	sense	5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'	275bp
	antisense	5'-TCCTTCTGCATCCTGTCTGGCA-3'	
hSS	sense	5'-GATGCTGTCCTGCCGCCTCCAG-3'	349bp
	antisense	5'-ACAGGATGTGAAAGTCTTCCA-3'	
hSSTR1	sense	5'-GGAGCCGGTTGACTATTACGCC-3'	107bp
	antisense	5'-AGGTGCCATTACGGAAGACGC-3'	
	sense	5'-GGA ACTCTATGGTCATCTA -3'	542bp
	antisense	5'-GAGGGCCACCATGCGCATCTT -3'	
hSSTR2	sense	5'-CCGCTATGCCAAGATGAAGACC-3'	182bp
	antisense	5'-TGCTGGTGA ACTGATTGATGCC-3'	
	sense	5'-CGGAGCAACCAGTGGGGGA -3'	377bp
	antisense	5'-GGGTTGGCACAGCTGTTAGC -3'	
hSSTR3	sense	5'-TTATGGCTTCCTCTCCTACCGC-3'	120bp
	antisense	5'-TCCTCCTCCTCAGTCTTCTCCG-3'	
	sense	5'-CCC GCGGCATGAGCACCTG -3'	376bp
	antisense	5'-GGGTTGGCACAGCTGTTGG -3'	
hSSTR4	sense	5'-CCTGTGCTACCTGCTCATCGTG-3'	137bp
	antisense	5'-CATCCAGCAGAGCACAAAGACG-3'	
	sense	5'-GCAGACACCAGACCGGCTC -3'	371bp
	antisense	5'- GGGTTGGCGCAGCTGTTGG-3'	
hSSTR5	sense	5'-CCAAGATGAAGACCGTCACCAA-3'	181bp
	antisense	5'-CAGAAGACACTGGTGA ACTGGTTG-3'	
	sense	5'-AGGAGGGCGGTACCTGCAA -3'	361bp
	antisense	5'-GGGTTGGCACAGCTGTTGG- 3'	

3.9 Agarosegel-Elektrophorese

Im Anschluß an die RT-PCR wird die amplifizierte DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Nukleinsäuren haben aufgrund der negativen Nettoladung ihrer Phosphatgruppen die Fähigkeit in einem elektrischen Feld zur Anode zu wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Maschen-Struktur des Agarosegels ist von der Größe und Form der Nukleinsäuren abhängig. Dazu wird ein 2%iges Agarosegel verwendet. 2g Agarose werden in 100ml 1xTAE-Puffer durch wiederholtes Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Mit Hilfe eines Gelschlittens und einer Gießkammer wird unter Verwendung eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen. Sobald die Agarose erstarrt ist, wird das Gel in eine

Elektrophoresekammer gegeben und Elektrophoresepuffer (1x TAE-Puffer) zugegeben, bis das Gel knapp bedeckt ist. Damit die DNA in dem Elektrophoresepuffer nicht aufschwimmt, werden die Impfschlitze mit einem Gemisch aus 10µl DNA und 1µl Ladepuffer beschickt. Zusätzlich wird eine Geltasche mit einem Größenmarker (100bp DNA Ladder) gefüllt, um nach der Elektrophorese die spezifischen DNA-Banden identifizieren zu können. Anschließend wird eine Spannung von 80 bis 120 Volt bei 180mA angelegt. Der im Ladepuffer enthaltene niedermolekulare Farbstoff Bromphenol Blau dient als Farbmarker, um den Verlauf der Elektrophorese beurteilen zu können. Ist die DNA ausreichend weit im Gel gelaufen, werden die nun voneinander getrennten DNA-Fragmente im Gel durch Fluoreszenz bei 366nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit Hilfe der Herolab E.A.S.Y 429K Photo-Dokumentationsanlage digital abgespeichert und ausgedruckt. Die im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen sind einzelne, repräsentative Auswertungen von PCR-Reaktionen. Nur PCR-Resultate, die in der Wiederholung identische Expressionsmuster aufweisen, werden im Ergebnisteil berücksichtigt.

3.10 Real-time Quantitative PCR

Bei vielen Fragestellungen ist eine Quantifizierung spezifischer mRNA im Probegewebe notwendig. Die Quantifizierung mittels herkömmlicher PCR ist jedoch nur möglich, solange sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet. Dieses ist bei jeder Reaktion verschieden und nur schwer und mit unverhältnismäßigem Aufwand zu überprüfen, indem beispielsweise nach jedem Zyklus ein Aliquot aus der Reaktion entfernt und auf ein Gel aufgetragen wird.

Die Real Time PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR, ist somit ein Verfahren zur schnellen und vollautomatisierten Quantifizierung von DNA. Dabei werden in einem geschlossenen System Amplifikation, PCR-Produkt Detektion und -Quantifizierung kombiniert, ohne dass weitere Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind (Higuchi et al., 1993; Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996). Durch diese Methode ist es möglich über die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Reporterfarbstoffs zum Beispiel SYBR Green, kontinuierlich die Menge des akkumulierenden PCR Produkts während der PCR zu

bestimmen. Die Fluoreszenzfarbstoffe binden während des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA und werden durch eine Lichtquelle angeregt. Das dabei entstehende Signal korreliert quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann mit Hilfe einer Software in Echtzeit (Real-time) dargestellt werden. So wird bei der Real-time PCR heute nicht mehr primär die DNA Produktmenge oder Produktkonzentration berechnet, sondern der Fluoreszenz-Schwellenwert, der so genannte Threshold Cycle oder C_t -Wert. Der C_t -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Er befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Je mehr Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind notwendig, um diesen Wert zu erreichen. Generell können mit Hilfe der Real-time PCR zwei verschiedene Quantifizierungsstrategien verfolgt werden.

1. Die *absolute Quantifizierung* wird anhand einer vorgegebenen Kalibrierungskurve realisiert und basiert auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten, mit der die absoluten Werte (z.B. Kopienzahl) für die Ausgangskonzentration unbekannter Proben ermittelt werden kann.

2. Bei der *relativen Quantifizierung* wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Referenzgen bezogen. Diese Methode wird auch als Normalisierung des Expressionsergebnisses bezeichnet. Das Expressionslevel eines idealen Referenzgens sollte konstant sein und nicht aktiv reguliert werden oder unter experimentellen Bedingungen variieren. Neben ribosomaler RNA wie 18S-rRNA dienen vorzugsweise „Housekeeping Gens“ als Referenzgene. Diese kodieren Proteine, die zur Erhaltung der Zellfunktion lebensnotwendig sind, wie zum Beispiel β -Aktin und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Die Berechnung der relativen Quantifizierung erfolgt über die sogenannte $\Delta\Delta C_t$ Methode. Dabei wird im ersten Schritt die Differenz (ΔC_t) zwischen dem C_t -Wert des Referenzgens (18S-rRNA) und dem C_t -Wert des zu untersuchenden Gens berechnet. Nach dieser Normierung wird dem ΔC_t -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔC_t -Wert einer Kontrollprobe abgezogen. Der relative Expressionsunterschied zwischen behandelter Probe und Kontrollprobe ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Ob der Expressionsunterschied signifikant ist, wird mit Hilfe der Software SigmaStat für Windows ($p < 0,05$) ermittelt. Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Analyse der Schmelzkurven überprüft.

In der vorliegenden Arbeit kommt ausschließlich die relative Quantifizierung

zusammen mit 18S-rRNA als Referenzgen zum Einsatz, das in den verschiedenen Versuchen die höchste Konstanz zeigte.

Für die Quantitative Real-time PCR werden nachfolgende Mengen eingesetzt (Tab.7) und amplifiziert (Tab.8). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 gezeigt.

Tab.7 Reaktionsansatz Real-time PCR

	Volumen
SYBR-Green qPCR Supermix	10µl
PCR-H ₂ O	5,2µl
Primer Mix	0,8µl
cDNA	4µl
Gesamtvolumen	20µl

Tab.8 Amplifikationschritte

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Enzymaktivierung	50°C	2min
2	Vordenaturierung	95°C	1,5min
3	Denaturierung	95°C	20sec
4	Annealing	18S-rRNA 57°C hSSTR1/2 60°C	1min
	40 Zyklen, Schritt 3-4		
	Schmelzkurve	55°C-95°C	1sec jeweils 0,5°C

Tab.9 Primer Real-time PCR

Primer		Sequenz	Größe des Produkts
18S-rRNA	sense antisense	5'-ACTCAACACGGGAAACCTCACC-3' 5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'	111bp
hSSTR1	sense antisense	5'-GGCGAAATGCGTCCCAGAA-3' 5'-GAGTAGATGAAAGAGATCAGGA-3'	75bp
hSSTR2	sense antisense	5'-GTCCTCTGCTTGGTCAAGGTG-3' 5'-TGGTCTCATTTCAGCCGGGATT-3'	85bp

3.11 Proteinisolierung

Die intrazellulären Zytosol- und Kernproteine müssen zuvor aus den zu untersuchenden Zellen und Geweben isoliert werden, um sie später für die Western Blot und Dot Blot Analyse einsetzen zu können.

3.11.1 Proteinisolierung aus Gewebe

Die Gewebeproben werden für den Gewebeaufschluss mit einem Mörser und Pistill direkt in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Gewebepulver wird bis zur 200µl Markierung eines 2ml Eppendorf Tube gefüllt, mit 300µl Ripa-Puffer versetzt und mit einem Rotor-Stator-Homogenisator aufgeschlossen und dabei zugleich in dem Lysepuffer homogenisiert. Anschließend wird Phosphataseninhibitor (1ml/100ml) und Proteaseninhibitor (2µl/1ml) hinzugefügt. Dieses Gemisch wird 30min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran für 30min mit 13000rpm bei 4°C zentrifugiert. Die im Überstand gewonnenen Proteine werden in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe 3.12) gemessen.

3.11.2 Proteinisolierung aus Zellen

Zu Beginn werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von den Kulturflaschenböden abgelöst, in PBS aufgenommen und 5min bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das entstandene Pellet in 1ml PBS resuspendiert und erneut für 5min bei 2000rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet in frisch zubereiteten Zelllysepuffer (150µl Triton-Puffer + Proteaseninhibitor 2µl/1ml Triton) lysiert und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Lösung erneut 5min bei 13000rpm zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine werden in ein neues Eppendorf Tube überführt und deren Konzentration ebenfalls mittels Bradford-Methode (siehe 3.12) bestimmt.

3.12 Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1979) ist eine der gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden. Sie beruht auf der Stabilisierung des Farbstoffs Coomasie Brilliant Blue G-250 durch ionische Wechselwirkungen mit den kationischen Aminogruppen der Proteine im sauren Milieu. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465nm auf 595nm und verursacht in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration eine intensive Blaufärbung. Die Zunahme der Absorption bei 595nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

Die Proteinbestimmung wird mit Hilfe des Protein Assay Kits bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure durchgeführt. In einer Einmal-Küvette werden 1µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 200µl des Bradford-Reagenz versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1ml aufgefüllt. Die Proteinkonzentration der Proben wird durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm in einem Spektrophotometer bestimmt. Mit Hilfe einer Standard-Proteineichkurve, die vorher mit dem im Kit enthaltenen Rinderserumalbuminstandard erstellt wurde, wird der Umrechnungsfaktor der optischen Dichte zu µg Gesamtprotein errechnet (0,0781) und damit der Proteingehalt (µg/µl) bestimmt. 800µl destilliertes Wasser und 200µl Bradford-Reagenz in einer Einmal-Küvette dienen als Leerwert. Die isolierten und gemessenen Proteine werden anschließend bei -80°C gelagert. Mit der Bestimmung der Proteinkonzentration wird gewährleistet, dass bei späteren Analysen gleiche Proteinmengen eingesetzt werden.

3.13 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse

Zur Analyse von Proteingemischen werden die Proteine nach der Laemmli-Methode unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Natrium Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz und besteht aus einer aliphatischen Kette von 12 C-Atomen mit einer hydrophilen Sulfatgruppe. Diese Kette lagert sich entlang der Aminosäurenkette der Proteine an und bildet einen SDS-Proteinkomplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtete, negative Sulfatgruppen aufweist. Somit wird die Eigenladung des Proteins im Vergleich zur negativen Gesamtladung des SDS-

Proteinkomplexes vernachlässigbar. Alle Proteine sind damit über ein konstantes Ladung / Massen - Verhältnis vergleichbar und die Mobilität des Proteins ist somit proportional zum Molekulargewicht.

Das Polyacrylamid-Gesamtgel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, deren Konzentration entsprechend der zu erwartenden Proteingröße variiert werden kann. In den vorliegenden Versuchen werden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 10% verwendet. Dadurch ist es möglich, eine Auftrennung von Proteinen zu erreichen, deren Molekulargewicht zwischen 10 und 60kDa liegt. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt folgende Tabelle (Tab.10):

Tab.10 Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

Bestandteil	10% Trenngel	4% Sammelgel
Acrylamid (30%)	2,5ml	1ml
Sol. 2	2,5ml	-
Sol. 3	-	2,5ml
Destilliertes Wasser	5ml	6,5ml
TEMED	20µl	20µl
APS 10%	100µl	100µl

Zu Beginn wird das 10%-ige Trenngel in eine Vertikalgelkammer gegossen und mit gesättigtem Butanol bedeckt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wird das Butanol restlos entfernt und das Sammelgel aufgegossen, in das zur Ausbildung von Probenfächerchen ein Kamm eingesetzt wird. Im Anschluss an die Polymerisation des Sammelgels wird das fertige Gel in die Elektrophoresekammer gespannt, die mit Elektrophoreselaufpuffer 1x SDS-Page-Puffer gefüllt wird und der Kamm entfernt. Abschließend werden 30-40µg der Proteine mit 15µl Probenpuffer aufgetragen, nachdem die Proben für 5min bei 90°C denaturiert und 9000rpm kurz anzentrifugiert worden sind. In die erste Tasche werden 5µl des Molekulargewichtstandards pipettiert und in die verbleibenden leeren

Taschen werden 10µl des Probenpuffers gefüllt, um einen gleichmäßigen Lauf zu gewährleisten. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 125V für 90min.

3.14 Western Blot

Bei der Western Blot Analyse werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamid-Trenngel zum späteren immunologischen Nachweis mittels Sandwich-Verfahren auf eine geeignete Membran transferiert. Dazu wird das SDS-Gel luftblasenfrei auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, die zuvor 15min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Es folgen sowohl zur Anode als auch zur Kathode hin zwei Lagen mit Transferpuffer angefeuchtetes Filterpapier und zwei bis drei Lagen Schwämme. Alle vier Sandwichkomponenten (SDS-Gel, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Schwamm) werden auf Gelgröße zugeschnitten und zwischen Anode und Kathode gepresst (Abb.1)

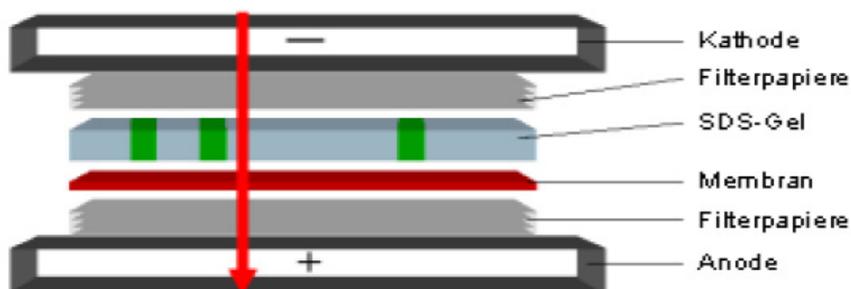


Abb.1 Schematische Zeichnung eines Western Blot Aufbaus

Anschließend erfolgt der Elektrotransfer (Blot) der Proteine für 90min bei 25V und 125mA. Die Effizienz des Western Blot Transfers wird durch Anfärben der Membran mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau S kontrolliert. Dazu wird die Membran für fünf Minuten in der Ponceau S Farblösung geschwenkt und anschließend mit Wasser entfärbt. Hierbei werden die Proteinbanden sichtbar. Der nachfolgende immunologische Nachweis wird durch die Färbung nicht beeinflusst.

Zu Beginn der Antikörperreaktion erfolgt für eine Stunde die Inkubation der Membran mit 5%igen BSA in TBS-T oder 5%igen Milchpulver in TBS-T, um alle unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blockieren. Danach wird die Membran mit der primären Antikörperlösung (hSSTR1, 2, 5; siehe 3.16) über Nacht bei 4°C in verschließbaren 50ml Polypropylenzentrifugenröhrchen auf einem Kipproller inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal für 15min mit TBS-T gespült, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wird die Membran mit dem sekundären Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um den störenden Hintergrund zu entfernen werden mehrere Waschschrte mit TBS-T und TBS angeschlossen. Alle weiteren Schritte zur Sichtbarmachung der Proteine werden mit Hilfe der Enhanced Chemoluminescence (ECL) Methode durchgeführt. Dazu wird die Membran 5min mit jeweils 2ml ECL-1 und ECL-2 Gemisch inkubiert. Die am Sekundärantikörper haftende Meerettich-Peroxidase oxidiert unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das zyklische Diacylhydrazid Luminol. Dadurch befindet sich das Luminol kurzzeitig in einem angeregten Zustand. Dieser Zustand wird unter Emission von Lichtquanten wieder verlassen. Phenole verstärken die Reaktion um das 1000-fache und verlängern sie darüber hinaus noch. Die Chemoluminescence auf dem Blot wird in der Dunkelkammer durch das Auflegen eines Röntgenfilms und die damit verbundene Schwärzung lokalisiert. Die Dauer des Auflegens (Belichtungszeit) richtet sich nach der Menge des zu detektierenden Proteins oder der Qualität der Antikörpersysteme und variiert zwischen 5min und 60min.

3.15 Dot-Blot

Bei dieser Methode werden für einen spezifischen Nachweis Proteinproben punktförmig (dot) auf eine Nitrocellulosemembran gesaugt. Dies geschieht in einer Apparatur, die mikrotiterplattenartig kleine Löcher aufweist und mit einer Saugpumpe in Verbindung steht. Zunächst wird die Membran 20min mit TBS-T getränkt und anschließend in die Apparatur integriert. 5 - 10µl des zu untersuchenden Mediums (Tränenflüssigkeit) werden in die Slots pipettiert, nachdem diese zweimal mit TBS-T durchgespült worden sind. Durch Anlegen eines schwachen Unterdrucks von ca. -100mbar werden die Proteine in die Nitrocellulosemembran absorbiert. Abschließend wird die Membran erneut dreimal mit TBS-T gespült. Der anschließende

Ablauf ist mit einem Western Blot vergleichbar. Die Membran wird zur Absättigung überschüssiger Bindungskapazitäten für eine Stunde mit 5%-igem BSA in TBS-T-Blockpuffer oder 5%-igen Milchpulver in TBST-Blockpuffer inkubiert und anschließend mit dem Primärantikörper (hSS; siehe 3.16) behandelt. Die Bindung des Sekundärantikörpers wird wie beim Western Blot über die Enhanced Chemoluminescence (ECL) Methode nachgewiesen. Die Auswertung der Dot-Blot Analysen erfolgt mit dem Programm Lab Works.

3.16 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen werden die in der folgenden Tabelle (Tab.11) aufgeführten Primärantikörper verwendet.

Tab.11 Primärantikörper

Antikörper	Klonalität	Code	Donor	Verdünnung	Hersteller
Somatostatin	Polyklonal	A0566	rabbit	1:200-1:300	DAKO
Somatostatinrezeptor 1	Polyklonal	sc-11603	goat	1:10-1:100, 1:30	Santa Cruz
Somatostatinrezeptor 2	Polyklonal	sc-11606	goat	1:10-1:100, 1:30	Santa Cruz
Somatostatinrezeptor 5	Polyklonal	sc-11623	goat	1:10-1:100, 1:30	Santa Cruz

3.16.1 Paraffinschnitt an Gewebe

Für immunhistochemische Untersuchungen werden die Präparate wie folgt aufbereitet:

- Fixierung der Gewebeproben in 4% Paraformaldehyd für 24h
- Auswaschen der Fixierlösung (24h fließend wässern)
- Entwässern mit Xylol in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 100%)
- Einbettung in Paraplast

Mit dem Grundschlittenmikrotom werden Paraffinschnitte von 7µm Schnittdicke angefertigt und auf HistoBond Adhesion Micro Slides aufgebracht. Für jede Probe wird eine Negativkontrollen mitgeführt, die statt des Primärantikörpers mit TBS-Puffer inkubiert wird. Als Positivkontrolle dient für Somatostatin humanes Pankreasgewebe und für die Somatostatinrezeptoren humanes Hypophysengewebe.

Zur Darstellung der Existenz und der Verteilung zellulärer Protein in Geweben wird die Immunhistochemie angewandt. Am ersten Tag werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mit Datum, Gewebeart und der Antikörperverdünung beschriftet. Anschließend werden sie in Küvetteneinsätze sortiert und über Nacht bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt, um das Herauslösen des Paraffins zu erleichtern. Am nächsten Tag werden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Endogene Peroxidasen werden mit 3%igem Wasserstoffperoxid geblockt. Die Schnitte werden zur Darstellung von Somatostatin und der –rezeptoren zur Epitopdemaskierung in der Mikrowelle nach dem Verfahren von Cattoretti vorbehandelt. Hierzu werden die Schnitte in eine mit Natriumcitratpuffer (pH 6,0) gefüllte Plastikschaale gestellt und für 10min in der Mikrowelle gekocht. Nach 5min wird der Vorgang kurz unterbrochen, um den bereits verdampften Natriumcitratpuffer zu ersetzen. Danach lässt man die Schnitte 20min abkühlen und spült sie abschließen dreimal mit TBS-Puffer.

Zur Verhinderung einer übermäßig starken, unspezifischen Hintergrundfärbung werden die Schnitte mit Normalserum entsprechend dem Donor des Sekundärantikörpers geblockt. Nach 20min wird das Serum abgeklopft und die Gewebeschnitte anschließend mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit behandelt. Nach Spülen mit TBS-Puffer wird der Primärantikörper entsprechend den Angaben des Herstellers mit TBS-Puffer verdünnt, auf die Schnitte aufgebracht und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am dritten Tag folgt erneutes Spülen in TBS-Puffer und die Inkubation der Schnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach abgelaufener Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper werden alle Schnitte dreimal 5min in TBS-Puffer gespült. Es folgt eine weitere Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Strept-Avidin-Biotin-Komplex für 30min. Nach abschließendem Spülen in TBS-Puffer werden die Schnitte mit einem AEC Chromogen inkubiert. Hieraus resultiert bei Vorhandensein des Antigens ein rotes Reaktionsprodukt. Diese Färbemethode basiert auf folgender Grundlage: Streptavidin und Avidin (Hühnereiweiß)

zeigen eine hohe Affinität für Biotin und reagieren mit dem zuvor eingesetzten biotinylierten Sekundärantikörper, sodass ein Komplex entsteht. Die Enzymaktivität der Peroxydase wird genutzt, um ein geeignetes Substrat in einen Farbstoff zu überführen. In der vorliegenden Arbeit wird 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet. AEC bildet unter Oxidation ein rotes Endprodukt, das alkohollöslich ist. Die Färbezeit richtet sich nach der gewünschten Intensität der rötlichen Färbung des Gewebeschnitts und schwankt zwischen einer halben Stunde und fünf Minuten. Nachdem eine rötliche Färbung sichtbar wird, werden die Schnitte auf eine gesonderte Ablage abgetropft und in destilliertes Wasser überführt. Abschließend werden alle Präparate für 30sec mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt, erneut mit destilliertem Wasser gespült und mit Aquatex eingedeckt. Die digitale Dokumentation erfolgt mit dem Photomikroskop der Fa. Zeiss. AEC ist empfindlich gegenüber fortschreitender Oxidation und starker Lichteinwirkung, so dass die Lagerung der Schnitte im Dunkeln erfolgen muss.

3.16.2 Gefrierschnitt an Gewebe

Nach Entnahme des Gewebes werden die Proben, möglichst von kleinerer Größe, bei -80°C tiefgefroren.

Die auf diese Weise vorbereiteten Präparate werden zur Gefrierschnitterstellung mit einem Tropfen Wasser auf dem Metallpräparatehalter befestigt. Die Schnitte werden in einem Kryostat bei -20°C etwa 4-6µm dick geschnitten und bis zur Färbung wieder tiefgefroren.

Die Färbeprozedur (H₂O₂, Normalserum, Avidin/Biotin Blocking Kit, Primärantikörper, Sekundärantikörper, StreptAB-HRP-Komplex, AEC-Substratlösung, Hämalaun nach Meyer, Aquatex) entspricht der beim Paraffinschnitt unter 3.16.1.

3.16.3 Gefrierschnitt an Zellkulturen

Die Auswirkungen der bereits unter 3.3.1 beschriebenen Stimulantien auf die Somatostatinrezeptoren soll ebenfalls immunhistochemisch untersucht werden. Dazu werden Zellen in 6-Well-Platten auf sterilen Deckgläschen ausgesät und in einem Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 18% Sauerstoff kultiviert. Nachdem die Zellen zu 60% konfluent sind, wird das serumhaltige Medium durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen nach 2h mit den entsprechenden Agenzien stimuliert.

Nach 6h oder 24h wird die Stimulation abgebrochen. Das Stimulationsmedium wird abgenommen und die Zellen werden dreimal mit TBS-Gebrauchslösung gespült und anschließend mit 4% Paraformaldehyd, gelöst in TBS, auf den Deckgläschen fixiert. Nach dreimaliger Spülung mit TBS-Gebrauchslösung werden die Zellen für 30min in einer Glycinlösung (1g/100ml) inkubiert. Die weiteren Schritte (Normalserum, Avidin/Biotin Blocking Kit, Primärantikörper, Sekundärantikörper, StreptAB-HRP-Komplex, AEC-Substratlösung, Hämalaun nach Meyer, Aquatex) entsprechen ebenfalls dem Vorgehen beim Paraffinschnitt, wie unter 3.16.1 beschrieben.

3.17 Tierversuch

Der Einfluß von Somatostatin und dessen Analogon Octreotid auf die korneale Wundheilung wird mit Hilfe eines Kornea-Defektmodells (Alkali-Verätzungs-Defektmodell) an 129SV Mäusen untersucht. Für das Tierexperiment liegt eine Tierversuchsgenehmigung vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt (Aktenzeichen 42502-2-723 MLU) vor.

Vor Versuchsdurchführung werden die ca. 8 Wochen alten, weiblichen 129SV Mäuse in fünf Gruppen a fünf Tiere entsprechend der folgenden Tabelle (Tab.12) aufgeteilt.

Tab.12 Einteilung der Versuchstiere

1. Fünf Tiere Kontrollgruppe	2. Fünf Tiere Somatostatingruppe 1ng/ml	4. Fünf Tiere Octreotidgruppe 1ng/ml
	3. Fünf Tiere Somatostatingruppe 10ng/ml	5. Fünf Tiere Octreotidgruppe 10ng/ml

Alle Mäuse werden durch intramuskuläre Injektion eines Mastermixes aus 60µl Rompun, 180µl Ketavet und 1560µl NaCl 0,9% entsprechend ihres Körpergewichtes anästhesiert. Nach Einsetzen der Narkose wird jeweils zentral auf die Kornea beider Augen ein kreisrundes 2mm messendes Filterpapierscheibchen, das mit 0.5N NaOH getränkt ist, aufgelegt und dort für 2min belassen. Dabei wird das korneale Epithel im Filterplättchenbereich vollständig weggedaut, korneales Stroma und Endothel bleiben intakt. Anschließend wird der Defektbereich mit 0,9% NaCl-Lösung gespült, um das verbleibende NaOH vollständig aus dem Auge zu entfernen.

Die Mäuse erwachen anschließend aus der Narkose und verbleiben in ihren Käfigen. 6h nach Defektbeibringung werden die Mäuse in einer CO₂-Kammer getötet, die Augenbulbi als Ganzes entnommen und in 24-Well-Platten, die am Boden mit Dentalwachs ausgegossen sind, mit Nadeln so befestigt, dass der Defekt nach oben zeigt (Abb. 2). Anschließend werden die Wells mit serumfreiem Medium, das entsprechend der Gruppeneinteilung Somatostatine oder Octreotide in einer bestimmten Konzentration (1ng/ml, 10ng/ml) oder keinen Zusatz (Kontrollgruppe) enthält, aufgefüllt. Die Medien enthalten außerdem Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, 10ml/l und Amphotericin B, 10ml/l). Die so präparierten Bulbi werden nun unter Standardbedingungen in einem Brutschrank kultiviert.

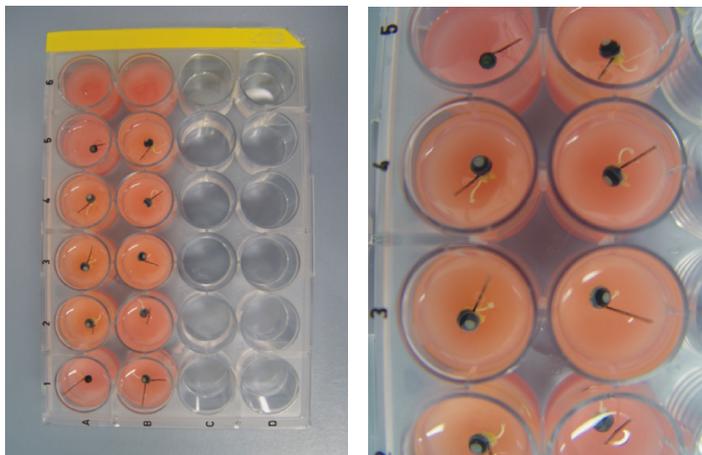


Abbildung 2. Befestigung der Mäuseaugenbulbi mit Nadeln auf Wachs in 24-Well-Platten (links). Bei höherer Vergrößerung (rechts) erkennt man den am Bulbus hängenden Nervus opticus.

Die Dokumentation des Experimentes zu den Zeitpunkten 0h, 12h, 18h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h erfolgt mit Hilfe eines Endoskops mit einer 0°-Optik, mit Blaulicht- und Fluoreszenzfilter sowie mit Fotodokumentationsanschluss, mit dessen Hilfe fluoreszierende Stoffe sichtbar gemacht werden können. Zur Photodokumentation wird eine Digitalkamera vor die Optik gesetzt, die wiederum an einem dreibeinigen Standardstativ befestigt wird. Im Rahmen der Dokumentation wird das Medium zu den entsprechenden Zeitpunkten abpipettiert, jeder Augenbulbus mit einem Tropfen Fluorescein versehen und digital fotografiert. Nach jedem Fotodokumentationszeitpunkt wird das Fluorescein mit serumfreiem Medium abgespült und die Wells wieder mit serumfreiem Medium und den entsprechenden Zusätzen an Somatostatin und Octreotide für jede Versuchsgruppe aufgefüllt.

Die mit Hilfe der Digitalkamera generierten Bilder werden für jedes Auge einzeln auf einem Computer in verschiedenen Dateien abgelegt und anschließend ausgewertet. Dabei werden die Bilder entsprechend der Versuchszeitpunkte für jedes Auge der Versuchsgruppe einzeln in Zeitpunktreihen angeordnet. Anschließend wird der Verlauf der Wundheilung durch Umzeichnen des Defekts, Vermessung und Auswertung der Defektgröße mit Hilfe der Programme Corel Graphics Suit 11, SigmaScan[®]Pro 5 und SPSS 8 ausgewertet.

3.18 Statistik

Die Ergebnisse der Real-time PCR Untersuchungen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgt mit der Software SigmaStat für Windows. Der Vergleich der einzelnen Gruppen mit Bezug auf die Kontrollgruppe wird mit Hilfe der Dunnett's Method durchgeführt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Auswertung des Tierversuchs erfolgt mit dem Statistikprogramm SPSS 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Als Testmethoden werden die einfaktorielle ANOVA Analyse und der Student T-Test herangezogen. Ein p-Wert unter 0,05 wird als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von Somatostatin an der Augenoberfläche

4.1.1 Somatostatin in der Tränendrüse

Die Produktion von Somatostatin ist in der Tränendrüse des Menschen immunhistochemisch nachweisbar. In Abb.3 ist Somatostatin an dem roten Reaktionsprodukt erkennbar, im Bereich der Ausführungsgänge der Tränendrüse und im Zytoplasma der serösen Zellen ist der Nachweis positiv.

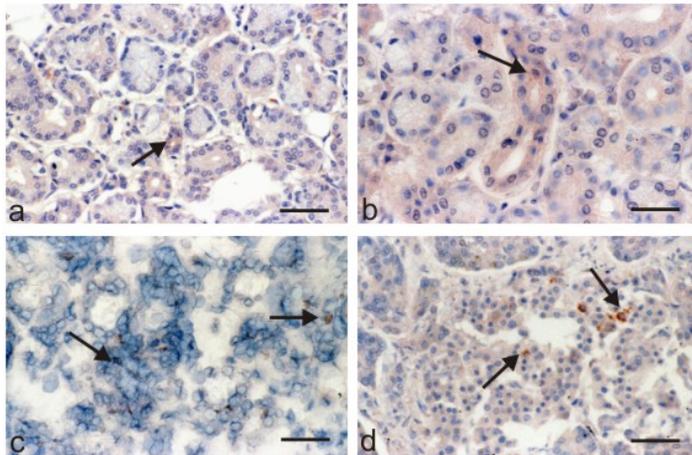


Abb.3 Immunhistochemischer Nachweis von Somatostatin in der Tränendrüse. **a, b, d** Paraffinschnitte, **c** Gefrierschnitt. **a, b, d** Somatostatin ist an dem roten Reaktionsprodukt erkennbar. Pfeile in **a** und **b** markieren Ausführungsgänge; Pfeile in **c** und **d** zeigen den positiven Nachweis von Somatostatin. **D** ist eine Positivkontrolle – Pankreasinsel mit Somatostatin-produzierenden D-Zellen. Der Balken entspricht in **a, d** 43,3 μ m; in **b, c** 27,5 μ m

4.1.2 Somatostatin in der Tränenflüssigkeit

In der Tränenflüssigkeit des Menschen kommt Somatostatin ebenfalls vor, die densitometrische Auswertung einer Dot-Blot Analyse mit Tränenflüssigkeit zeigt, dass die Somatostatinkonzentration zwischen 0.07nmol bis 1.0nmol schwankt (Abb.4).

Zur Analyse dieser Ergebnisse wurde Tränenflüssigkeit von fünf Probanden mit Schirmerstreifen gesammelt, mit verschiedenen Verfahren extrahiert (Abb.4 A, B, C) und im Verhältnis zu einer Standardreihe rekombinanten Somatostatins untersucht. Von den zu analysierenden Proben wurden jeweils 1 μ l und 10 μ l eingesetzt; in A schwankt die Somatostatinkonzentration zwischen 0,8nmol bis 1nmol, in B zwischen

4. Ergebnisse

0,7nmol bis 0,9nmol und in C zwischen 0,85nmol bis 0,9nmol (Abb.4 A, B, C). Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den fünf Probanden nachweisbar.

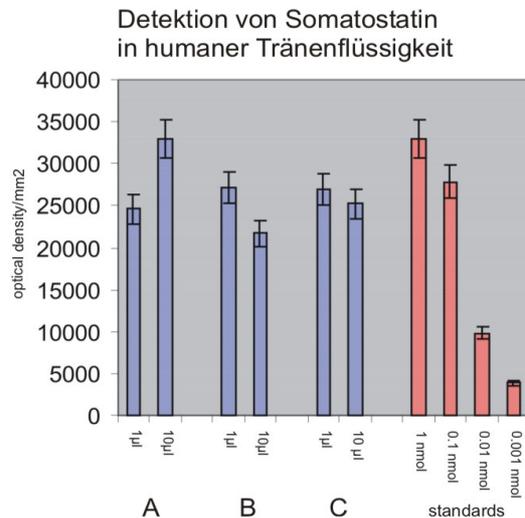


Abb.4 Densitometrische Auswertung einer Dot-Blot Analyse. **A** Extraktion von Somatostatin mittels NaCl/Hepes, **B** Extraktion mittels Acetonitril/TFA, **C** reine Tränenflüssigkeit. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen Somatostatin.

4.1.3 Somatostatin und humane Epithelzelllinien

In der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (NHC) und in der humanen kornealen Epithelzelllinie (HCE) ist Somatostatin auf RNA-Ebene nicht nachweisbar, die RT-PCR Analyse ist negativ (Abb.5). Als Positivkontrolle dient Pankreasgewebe, in dem der Somatostatinnachweis deutlich positiv ist.

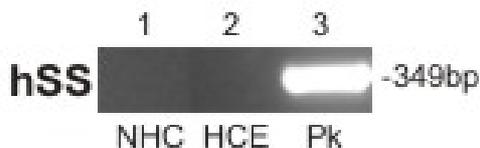


Abb.5 Expression von Somatostatin in Gewebe und verschiedenen Zelllinien.

NHC humane Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC – spontan immortalisiert); **HCE** humane korneale Epithelzelllinie (mit SV40 transfiziert); **Pk** Pankreasgewebe

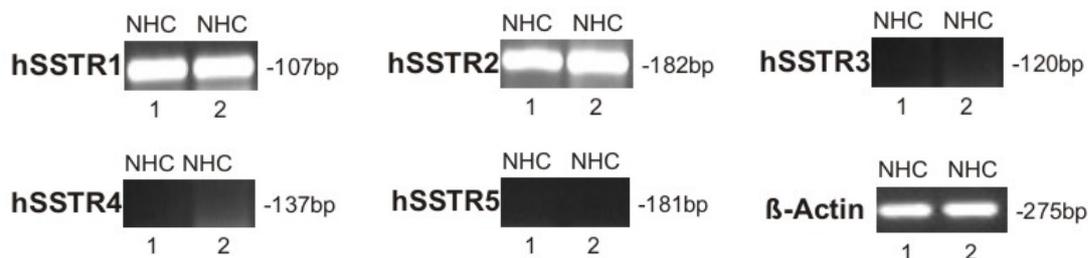
4.2 Somatostatinrezeptoren an der Augenoberfläche

4.2.1 Nachweis auf RNA-Ebene

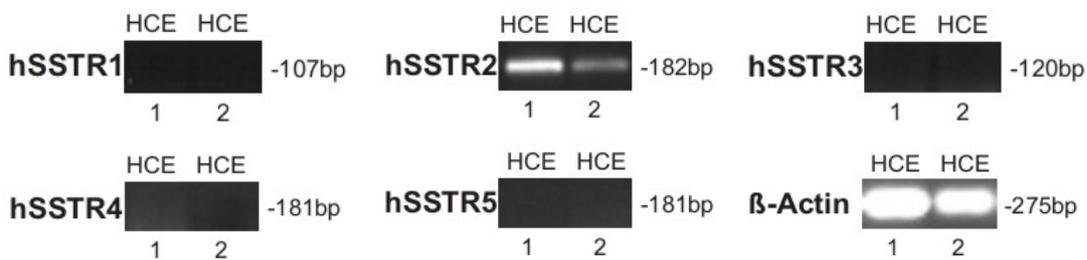
Die folgenden Untersuchungen sollen die Expression der Somatostatinrezeptoren (hSSTR) in verschiedenen Geweben und humanen Zelllinien analysieren. Die in

Abb.6 dargestellten RT-PCR Untersuchungen zeigen den Nachweis der hSSTR1 und 2 in Konjunktiva, ableitenden Tränenwegen, Kornea, Tränendrüse (Abb.6 C) und der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (Abb.6 A). In der humanen kornealen Epithelzelllinie ist der hSSTR2 nachweisbar, der hSSTR1 hingegen nicht (Abb.6 B). Der hSSTR5 wurde in Konjunktiva, ableitenden Tränenwegen und Tränendrüse detektiert, in Kornea und den beiden humanen Epithelzelllinien jedoch nicht. Eine Expression der hSSTR3 und 4 ist in den untersuchten Geweben und humanen Epithelzelllinien durchgängig nicht detektierbar.

A



B



C

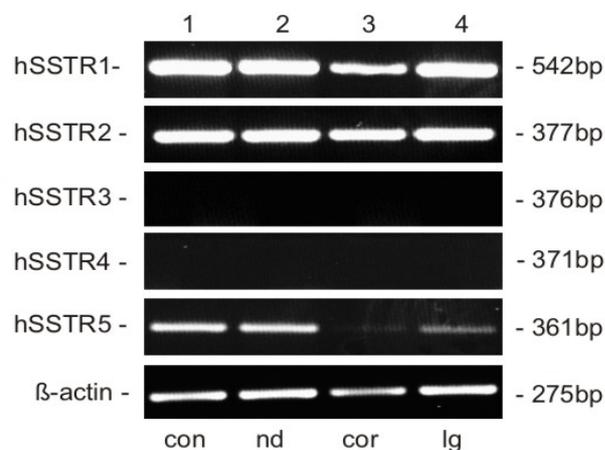


Abb.6 Expression der hSSTR1-5 in verschiedenen Geweben und Zelllinien. **A** humane Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC – spontan immortalisiert); **B** humane korneale Epithelzelllinie- HCE (mit SV40 transfiziert); in A und B wurden pro Somatostatinrezeptor sechs Proben aufgetragen **C** con – Konjunktiva (Reihe 1), nd – ableitende Tränenwege (Reihe 2), cor – Kornea (Reihe 3), lg – Tränendrüse (Reihe 4)

4.2.2 Nachweis auf Proteinebene

Die Expressionsstudien lassen sich auf Proteinebene mittels Western-Blot bestätigen (Abb.7). Lunge, Tränendrüse, ableitende Tränenwege, Konjunktiva und Kornea enthalten die hSSTR1 und 5. Dem gegenüber wird der hSSTR2 auf Proteinebene nur von den ableitenden Tränenwegen, Konjunktiva und Tränendrüse exprimiert, in Kornea und Lunge kommt der Rezeptor nicht vor.

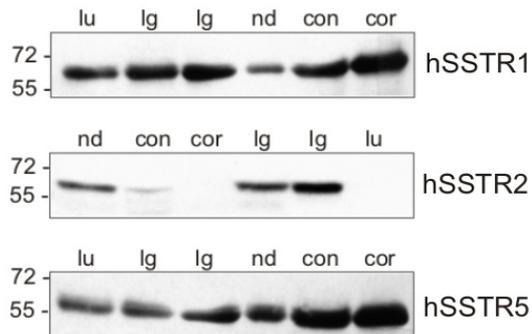


Abb.7 Western Blot Analyse der Somatostatinrezeptoren (hSSTR) 1, 2, und 5 in lu – Lunge, lg – Tränendrüse, nd – ableitendem Tränenweg, con – Konjunktiva und cor – Kornea. Der Somatostatinrezeptor 2 kommt in Kornea und Lunge nicht vor.

4.2.3 Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemisch lassen sich an Gefrierschnitten aus der Tränendrüse ebenfalls die hSSTR1, 2 und 5 detektieren (Abb.8). Besonders im Zytoplasma der Azinuszellen findet man ein starkes, rotes Reaktionsprodukt. Untersuchungen an Schnitten durch die Hypophyse dienen als Positivkontrolle für die Spezifität der Antikörper gegen die hSSTR1, 2 und 5.

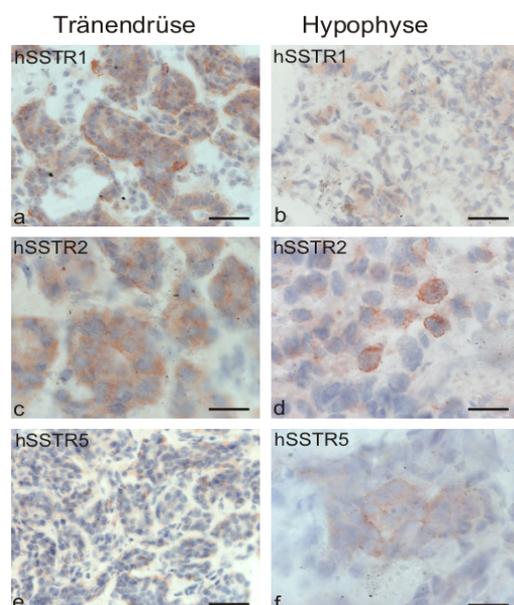


Abb.8 Immunhistochemischer Nachweis der Somatostatinrezeptoren, hSSTR1 (a), hSSTR2 (c) und hSSTR5 (e) in der Tränendrüse. Schnitte durch die Hypophyse dienen als Positivkontrolle (b, d, f). Der Balken entspricht in a, b, e 43.3µm, c, d, f 27.5µm.

4.3 Somatostatinrezeptoren an der Augenoberfläche nach Zytokin-stimulation

4.3.1 Qualitativer Nachweis auf RNA-Ebene

Wie schon unter 4.2 beschrieben, exprimieren die beiden humanen Epithelzelllinien ohne Stimulation die hSSTR1 und 2 (HCE nur hSSTR2). Um eine mögliche Regulation der Somatostatinrezeptoren zu analysieren, werden die beiden bekannten Epithelzelllinien mit den Zytokinen Interleukin 1 beta (IL-1 β) [20U/ml], Interleukin 1 alpha (IL-1 α) [10ng/ml], Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) [10ng/ml] und den Bakterienbestandteilen Lipopolysaccharid (LPS) [1 μ g/ml] aus *P.aeruginosa* und Peptidoglycan (PGN) [1 μ g/ml] aus *S.aureus* für jeweils 6h und 24h stimuliert. Nach Stimulation der humanen Epithelzelllinien für 6h oder 24h und Analyse der Expression durch RT-PCR ergeben sich im Vergleich zu den unstimulierten Proben sehr ähnliche Ergebnisse. Die hSSTR1 und 2 sind in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (Abb.9) und der hSSTR2 ist in der humanen kornealen Epithelzelllinie (Abb.10) nach beiden Stimulationszeiten nachweisbar. Der hSSTR1 wird in der humanen kornealen Epithelzelllinie zu keinem Zeitpunkt exprimiert (Abb.10). Dies gilt ebenfalls für die hSSTR3, 4 und 5 in beiden humanen Epithelzelllinien.

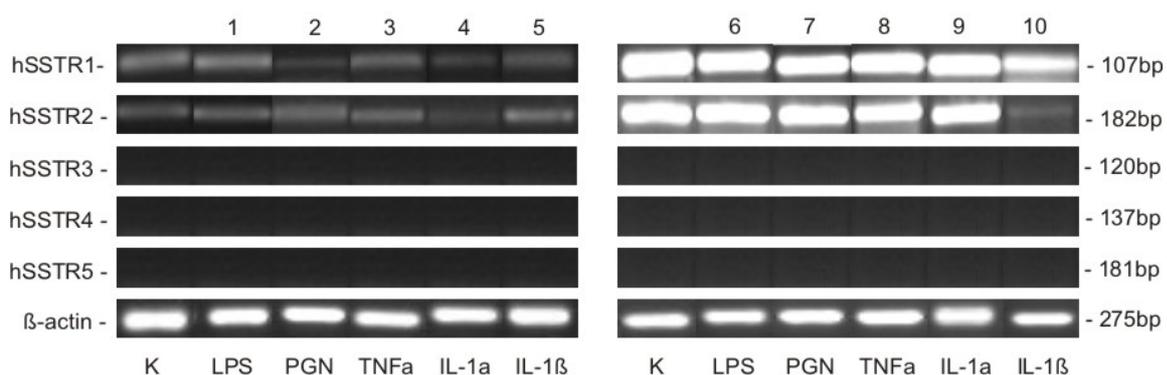


Abb.9 Expression der Somatostatinrezeptoren (hSSTR) 1-5 in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC). Die Proben wurden mit LPS, PGN, TNF α , IL-1 α und IL-1 β stimuliert. Reihe 1 bis 5 – 6h. Reihe 6 bis 10 – 24h Stimulationsdauer

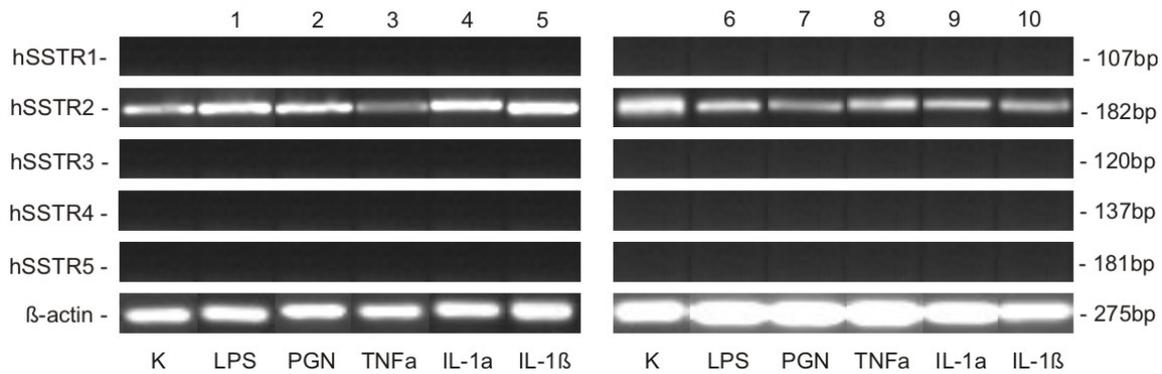


Abb.10 Expression der Somatostatinrezeptoren (hSSTR) 1-5 in der humanen kornealen Epithelzelllinie (HCE). Die Proben wurden mit LPS, PGN, TNF α , IL-1 α und IL-1 β stimuliert. Reihe 1 bis 5 – 6h, Reihe 6 bis 10 – 24h Stimulationsdauer

4.3.2 Quantitativer Nachweis auf RNA-Ebene

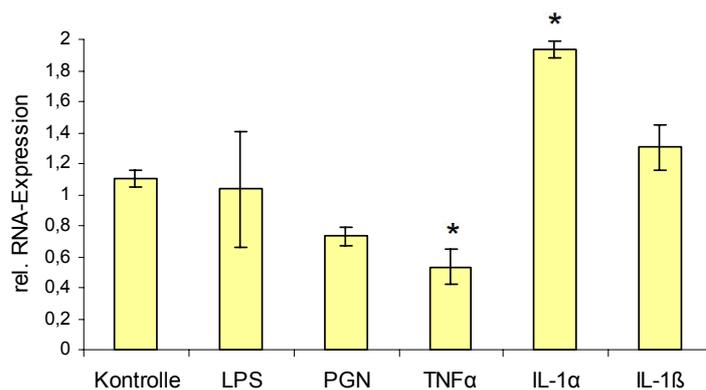
Da mittels RT-PCR nur eine bedingte Quantifizierung der stimulierten Proben gegenüber den Kontrollproben erfolgen kann, wird die relative hSSTR mRNA-Expression mit Hilfe der Real-time PCR ermittelt.

Die in Abb.11 dargestellten Stimulationsexperimente der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) mit LPS, PGN, TNF α , IL-1 α und IL-1 β zeigen, dass nur IL-1 α eine signifikante (*) Erhöhung der relativen hSSTR1 mRNA-Expression nach 6h bewirkt. TNF α führt im Gegensatz dazu nach 6h zu einer signifikanten Erniedrigung der relativen hSSTR1 mRNA-Expression. LPS, PGN und IL-1 β haben nach 6h und 24h keinen signifikanten Effekt auf die relative hSSTR1 mRNA-Expression, wie auch TNF α und IL-1 α nach 24h.

Im Gegensatz dazu wird die relative hSSTR2 mRNA-Expressionserhöhung nach 6h in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) durch Bakterienbestandteile und Zytokine bewirkt (Abb.12 A). LPS und PGN weisen eine 1,5fache Erhöhung und IL-1 α und IL-1 β eine 0,8 bis 1,2fache Erhöhung der relativen hSSTR2 mRNA-Menge nach 6h auf. Dieser Effekt ist nach 24h aufgehoben (Abb.12 B); LPS, PGN und IL-1 β zeigen keine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression mehr. IL-1 α führt nach dieser Zeit zu einer Erniedrigung der hSSTR2 mRNA-Expression um das 0,5fache. TNF α hat sowohl nach 6h, als auch nach 24h keinen Einfluss auf den hSSTR2.

Zytokine und Bakterienbestandteile führen in der humanen kornealen Epithelzelllinie ebenfalls zu einer Hochregulation des hSSTR2. Nach 6h bewirkt PGN eine 0,5fache Erhöhung und IL-1 β eine 1fache Erhöhung der relativen hSSTR2 mRNA-Expression (Abb.13 A), die nach 24h ebenfalls noch nachzuweisen sind (Abb.13 B). IL-1 α zeigt nach 6h eine 1-fache und damit höchste Steigerung der relativen hSSTR2 mRNA-Expression. Dieser Anstieg ist nach 24h nicht mehr detektierbar (Abb.13 A/B). Umgekehrt wirkt der Einfluss von LPS auf die relative hSSTR2 mRNA-Epression; erst nach 24h ist eine signifikante Erhöhung um das 0,6fache nachweisbar. TNF α hat nach 6h und 24h wiederum keinen Effekt auf die hSSTR2-Expression (Abb.13 A/B).

A hSSTR1 IOBA-NHC (6h)



B hSSTR1 IOBA-NHC (24h)

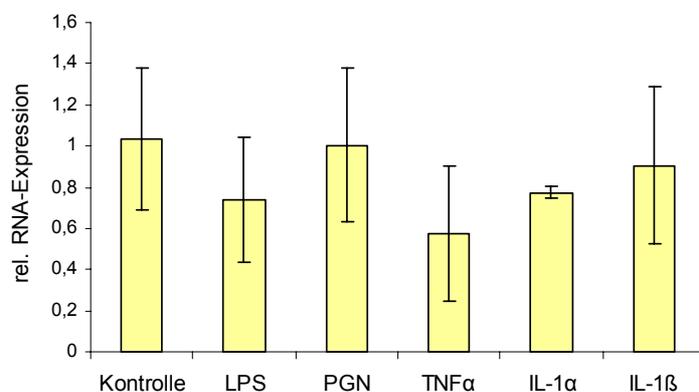
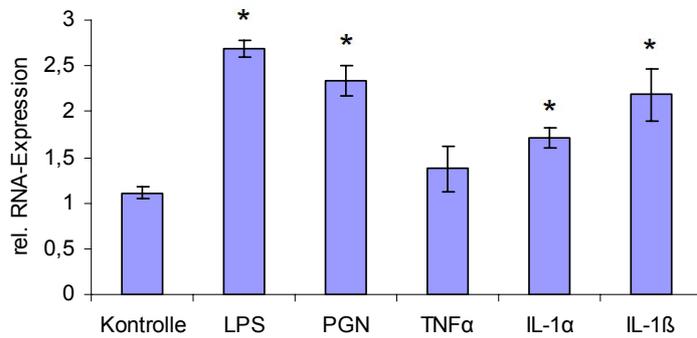


Abb.11 Real-time PCR der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC). Die Proben wurden mit LPS, PGN, TNF α , IL-1 α und IL-1 β stimuliert. Die Abb. zeigt die relative mRNA-Expression von hSSTR1 im Vergleich zur Kontrolle nach 6h (**A**) und 24h (**B**) Stimulationsdauer. $p < 0,05$

A hSSTR2 IOBA-NHC (6h)



B hSSTR2 IOBA-NHC (24h)

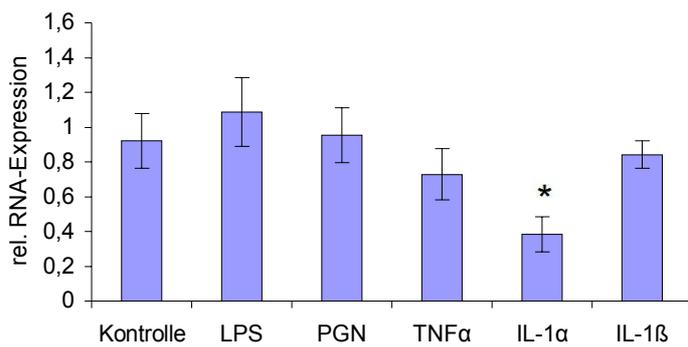
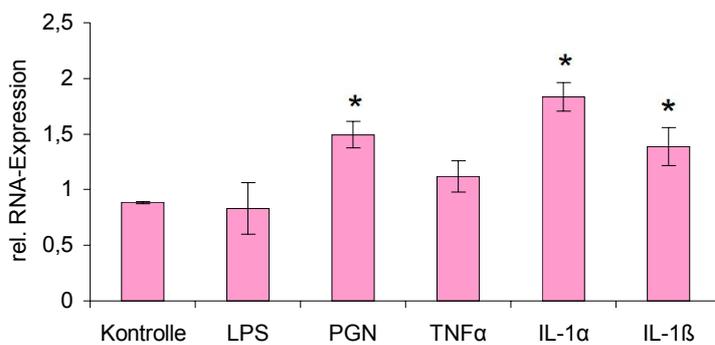


Abb.12 Real-time PCR der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC). Die Proben wurden mit LPS, PGN, TNFα, IL-1α und IL-1β stimuliert. Die Abb. zeigt die relative mRNA-Expression von hSSTR2 im Vergleich zur Kontrolle nach 6h (**A**) und 24h (**B**) Stimulationdauer. $p < 0,05$

A hSSTR2 HCE (6h)



B hSSTR2 HCE (24h)

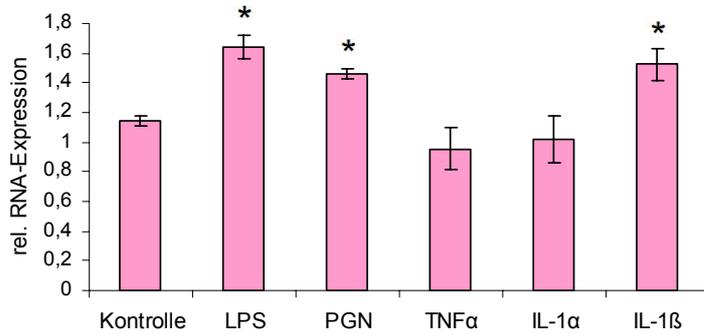


Abb.13 Real-time PCR der humanen kornealen Epithelzelllinie (HCE). Die Proben wurden mit LPS, PGN, TNFα, IL-1α und IL-1β stimuliert. Die Abb. zeigt die relative mRNA-Expression von hSSTR2 im Vergleich zur Kontrolle nach 6h (A) und 24h (B) Stimulationsdauer. p<0,05

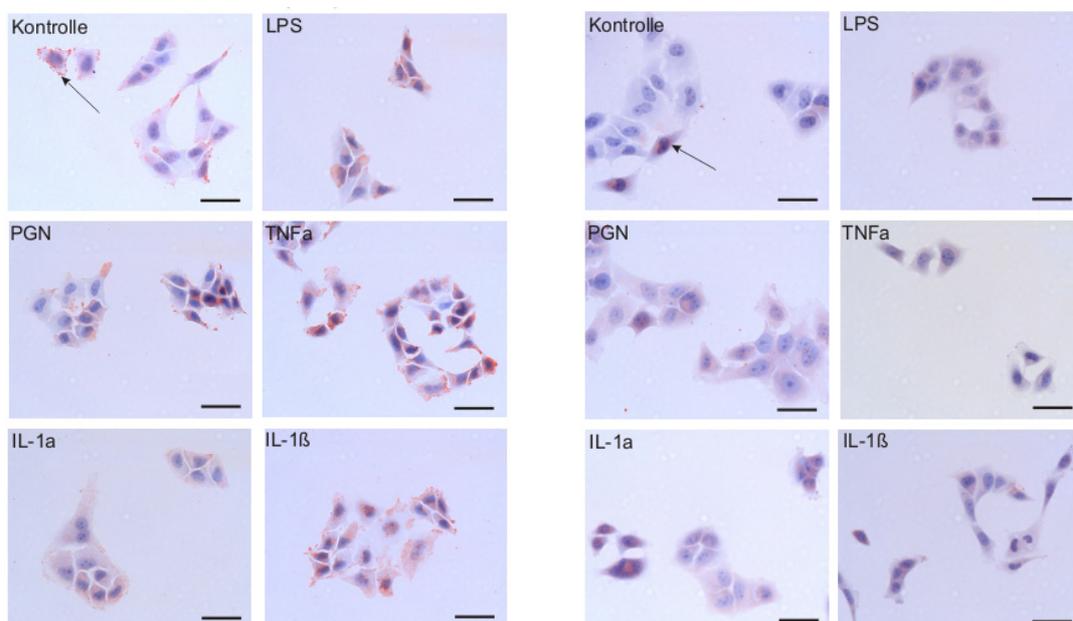
4.3.3 Immunhistochemischer Nachweis

Durch immunhistochemische Untersuchungen an auf Deckgläschen kultivierter Zellen lassen sich die hSSTR1 und 2 nach Stimulation mit Zytokinen (TNFα, IL-1α, IL-1β) und Bakterienbestandteilen (LPS, PGN) ebenfalls darstellen.

In der humanen kornealen Epithelzelllinie (HCE) und in der Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) ist die Expression von hSSTR1 und hSSTR2 nach 6h oder 24h Stimulationsdauer gut am roten Reaktionsprodukt erkennbar (Abb.14 A-C).

A hSSTR1 IOBA-NHC (24h)

B hSSTR2 IOBA-NHC (6h)



C hSSTR2 HCE (6h)

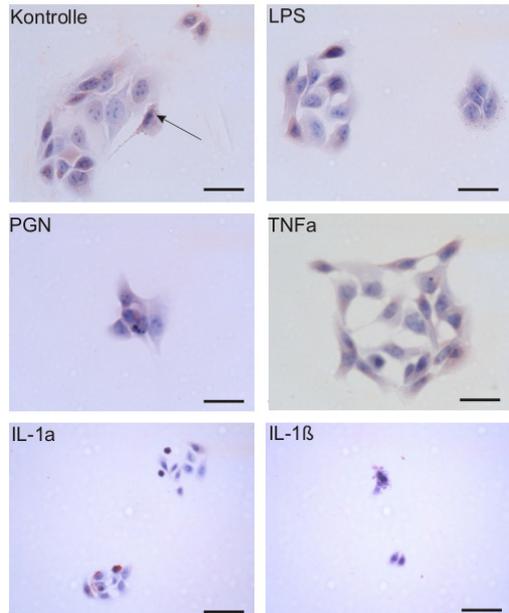


Abb.14 Immunhistochemischer Nachweis der Somatostatinrezeptoren (hSSTR) 1 und 2 in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (A, B) und der humanen kornealen Epithelzelllinie (C) nach 6h oder 24h. An der roten Färbung (Pfeil) ist der Nachweis des jeweiligen Rezeptors erkennbar. Der Balken entspricht in A, B, C 27.5µm (in C IL-1α, IL-1β 43.3µm).

4.4 Somatostatinrezeptoren an der Augenoberfläche nach Stimulation mit Somatostatin oder VEGF

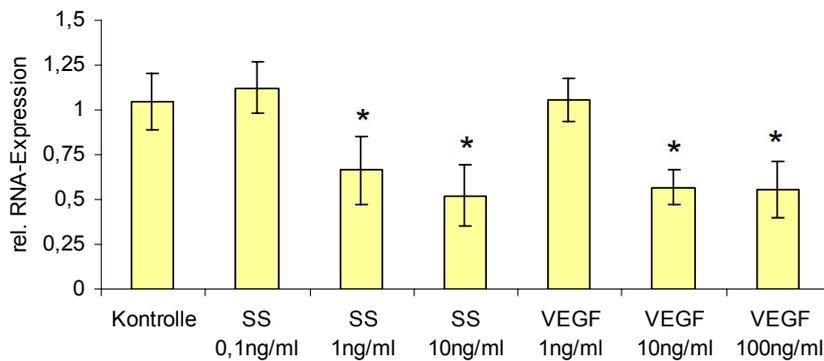
4.4.1 Quantitativer Nachweis auf RNA-Ebene

Um einen möglichen Einfluß von Somatostatin (SS) oder Vascular endothelial growth factor (VEGF) auf den hSSTR1 und 2 zu analysieren, werden Stimulationsexperimente der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) mit verschiedenen Konzentrationen von Somatostatin [0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml] und VEGF [1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml] durchgeführt (Abb.15).

Es wird deutlich, dass Somatostatin und VEGF in Abhängigkeit von der Konzentration die relative hSSTR1 mRNA-Expression nach 6h Stimulationsdauer senken (Abb.15 A). Die analysierten Somatostatinkonzentrationen 1ng/ml und 10ng/ml führen zu einer 0,4 bis 0,6fachen Senkung der hSSTR1 mRNA-Expression; 0,1ng/ml Somatostatin hat hingegen keinen signifikanten Effekt. Nach 6h bewirken 10ng/ml und 100ng/ml VEGF ebenfalls eine 0,5fache Erniedrigung der relativen mRNA-Expression von hSSTR1, die niedrigste gewählte Konzentration (1ng/ml VEGF) hat wiederum keinen Einfluss auf den hSSTR1. Im weiteren zeitlichen Verlauf wird die signifikante mRNA-Erniedrigung des hSSTR1 wieder aufgehoben.

Eine gegensätzliche Wirkung von VEGF wird auf den hSSTR2 deutlich (Abb.15 B)
 Alle Konzentrationen von VEGF (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) erhöhen die relative mRNA-Expression um das 0,6 bis 1,4fache. Somatostatin hat keinen nachweisbaren Effekt auf die Regulation des hSSTR2.

A hSSTR1 IOBA-NHC (6h)



B hSSTR2 IOBA-NHC (6h)

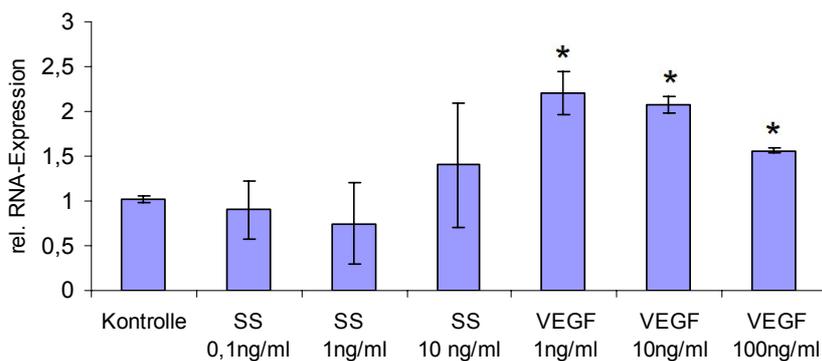


Abb.15 Real-time PCR der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC). Die Proben wurden mit SS (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) und VEGF (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) stimuliert. Die Abb. zeigt die relative mRNA-Expression von hSSTR1 (**A**) und hSSTR2 (**B**) im Vergleich zur Kontrolle nach 6h Stimulationsdauer. $p < 0,05$

4.4.2 Nachweis auf Proteinebene

Der Effekt von VEGF kann auf Proteinebene mittels Western blot bestätigt werden. Ab einer Konzentration von 10ng/ml kommt es in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie ebenfalls zu einer Induktion des hSSTR2 (Abb.16).

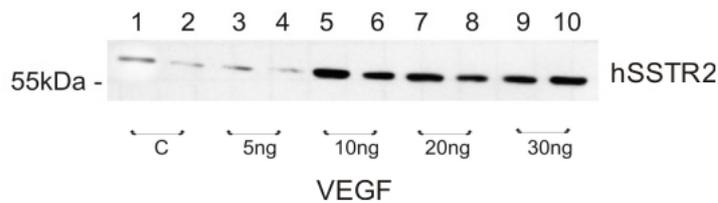


Abb. 16 Western-Blot Analyse des hSSTR2 in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von VEGF. C – Kontrolle ohne Stimulation

4.5 Somatostatin/Octreotid und korneale Wundheilung

Der mögliche Einfluss von Somatostatin oder Octreotid auf die korneale Wundheilung wurde mit Hilfe eines Korneadefektmodells an der Maus untersucht. Die Abb.17 und 18 zeigen deutlich, dass eine Konzentration von 10ng/ml Somatostatin im Vergleich zur Kontrolle einen positiven Effekt auf die korneale Wundheilung von Mäusen hat.

Um die Abweichung der Erosiogröße in den einzelnen Gruppen zum Zeitpunkt 0h zu testen, wurde eine einfaktorielle ANOVA Analyse durchgeführt. Dabei erkennt man keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,775$) zwischen den einzelnen Gruppen. Die Ausgangsgröße des Defekts ist somit in allen fünf Gruppen vergleichbar. Anschließend werden die Gruppen im zeitlichen Verlauf paarweise mit Hilfe des Student T-Tests (Kontrolle versus Somatostatin 1,0ng/ml, Kontrolle versus Somatostatin 10,0ng/ml, Kontrolle versus Octreotid 1,0ng/ml, Kontrolle versus Octreotid 10,0ng/ml) auf ihre Signifikanz überprüft. Dabei ergibt sich eine statistisch schnellere Heilung des Epitheldefekts ab dem Zeitpunkt 24h ($p=0,027$) bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 84h ($p=0,006$) in der Gruppe, die mit 10ng/ml Somatostatin behandelt wurde. Die Konzentrationen 1ng/ml Somatostatin ($p=0,194$), 1ng/ml Octreotid ($p=0,946$) und 10ng/ml Octreotid ($p=0,807$) haben nach 84h im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Wirkung auf die korneale Wundheilung der untersuchten Mäusen.

4. Ergebnisse

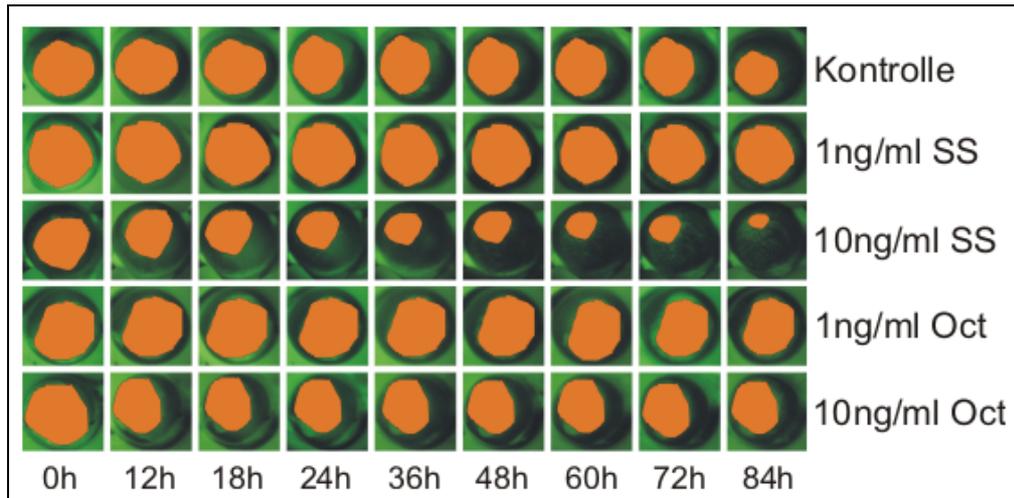


Abb.17 Tierexperiment. Mausbulbi mit einem genormten epithelialen Defekt wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1ng/ml, 10ng/ml) Somatostatin oder Octreotid behandelt und zu bestimmten Zeitpunkten fotografiert. Der Epitheldefekt wurde zur besseren Beurteilbarkeit rot markiert. n=6, p<0,05

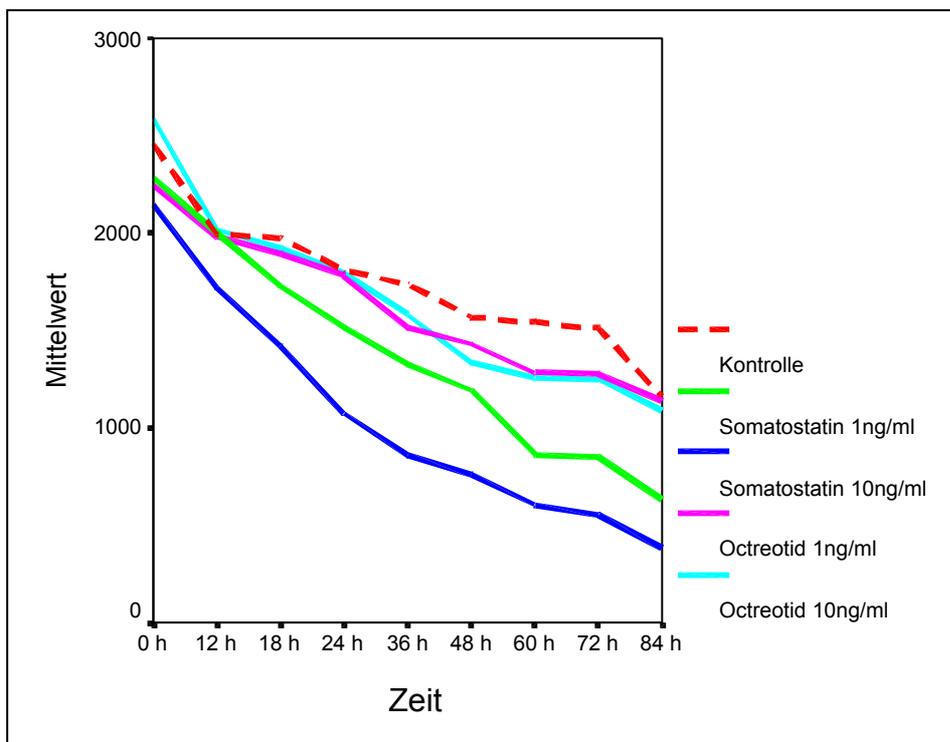


Abb.17 Liniendiagramm. Die Mittelwerte der Erosiogrößen (in Pixel) der Bulbi in den verschiedenen Gruppen sind im zeitlichen Verlauf dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Somatostatin und Augenoberfläche

Somatostatin ist ein zyklisches Polypeptid und natürlicher Ligand der Somatostatinrezeptoren. Es besteht aus 14 (ss-14) oder 28 (ss-28) Aminosäuren; beide Formen werden durch posttranslationale Prozessierung aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül, dem Preprosomatostatin, gebildet (Shen and Rutter, 1984; Patel et al., 1997). Somatostatin kommt in vielen Geweben des menschlichen Körpers in spezifischen Konzentrationen vor. Große Mengen werden im Gastrointestinaltrakt, dem Pankreas und im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert. In Niere, Nebenniere, Lunge, Schilddrüse, Hoden und Milz konnten kleinere Mengen nachgewiesen werden (Reichlin, 1983; Dalm et al., 2004). Dementsprechend vielfältig ist die Wirkung von Somatostatin, es hemmt beispielsweise die Freisetzung des Wachstumshormons Somatotropin aus der Hypophyse (Bertherat et al., 1995) oder inhibiert endo- und exokrine Prozesse in Pankreas und anderen Organen (Guillermet-Guibert et al., 2005). Darüber hinaus wirkt es als Neurotransmitter im Gehirn und peripheren Nervenzellen (Patel, 1999).

Der Effekt von Somatostatin wird über fünf hochaffine Oberflächenrezeptoren (hSSTR1-5) vermittelt. Die membranständigen Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und stellen eine bedeutsame Rezeptorfamilie dar. Somatostatinrezeptoren kommen ebenfalls in vielen Geweben vor und sind die Bindungsstellen für ss-14 oder ss-28 (Patel, 1999). Sie kodieren die funktionelle Antwort auf Somatostatinbindung durch ihr differentes Vorkommen und die an sie gekoppelten Signaltransduktions-Mechanismen in spezifischer Weise. Die fünf Somatostatinrezeptoren können auf Grund struktureller Unterschiede und pharmakologischer Eigenschaften in zwei Untergruppen, die SRIF1 und SRIF2 Rezeptoren, unterteilt werden. Die SRIF1 Rezeptorengruppe besteht aus hSSTR2, 3, 5 und zeichnet sich durch die Bindungsfähigkeit der klassischen Somatostatinanaloga (Octreotid, Lanreotid) aus. Diese Eigenschaft besitzt die SRIF2 Gruppe, zu der hSSTR1 und 4 gehören, nur in sehr geringem Maß.

Verschiedene Befunde weisen das Vorkommen von Somatostatin an der Augenoberfläche nach. Bereits Ende der achtziger und Anfang der neunziger Jahre wurde demonstriert, dass Somatostatin in der Harder Drüse von Ratten, dem

Äquivalent der Meibom Drüsen des Menschen produziert wird (Puig-Domingo et al., 1988; Peinado et al., 1990). Somatostatin konnte ebenfalls in der Tränenflüssigkeit von Kaninchen nachgewiesen werden (Taylor and Yee, 2003). Immunhistochemische Untersuchungen von Lober (2002) bestätigen die Produktion von Somatostatin in der Tränendrüse des Menschen und werfen gleichzeitig die Frage nach der funktionellen Bedeutung des Hormons am Auge auf.

Somatostatin wird von Azinuszellen in der Tränendrüse gebildet und in die Tränenflüssigkeit abgegeben. An der Augenoberfläche selbst ist Somatostatin nicht nachweisbar, die humane Korneaepithelzelllinie und auch die humane Konjunktivaepithelzelllinie exprimieren keine Somatostatin mRNA. Die hSSTR1, 2 und 5 werden in Tränendrüse, Konjunktiva, Kornea (hSSTR2 nur mRNA), ableitenden Tränenwegen auf RNA und Proteinebene nachgewiesen. Die humane Konjunktiva- und Korneaepithelzelllinie exprimiert die hSSTR1 und 2 auf RNA-Ebene. Diese Ergebnisse lassen sowohl auf eine autokrine Wirkung als auch auf eine parakrine Wirkung von Somatostatin an der Augenoberfläche schließen.

Auf Grund des antisekretorischen Effektes von Somatostatin ist eine Hemmung der Flüssigkeitssekretion der Tränendrüse denkbar. Bausher et al. haben 1990 bereits einen modulierenden Einfluß von Somatostatin auf die Produktion des Kammerwassers beim Kaninchen beschrieben. Ein ähnlicher Effekt wurde von Kapicioglu et al. (1998) nach intraperitonealer Injektion von Octreotid, einem Somatostatinanalogon, in der Ratte beschrieben. Allerdings handelt es sich um einen systemischen Effekt mit einer hohen Dosis von Octreotid. Des Weiteren lassen die antiproliferativen Eigenschaften von Somatostatin an eine funktionelle Bedeutung für die Transparenz der Kornea denken. Dies wird durch immunhistochemische Befunde gestützt, die zeigen konnten, dass die humane Kornea in ihrem Stroma und auf den Endothelzellen die hSSTR1 und 2 trägt (Klisovic et al., 2001). Auch die durch Somatostatin vermittelten immunmodulatorischen Effekte, wie Beeinflussung der Lymphozytenproliferation oder Interleukin- und Zytokinfreisetzung (Buscail et al., 2002), lassen an eine Wirkung an der Augenoberfläche im Rahmen kornealer Infektionen und Entzündungen denken. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass Somatostatin auch immunologische Wirkung an den ableitenden Tränenwegen besitzt, da die hSSTR1, 2 und 5 in diesem Gewebe nachweisbar sind. Die Ausstattung der ableitenden Tränenwege mit verschiedenen unspezifischen

Abwehrsystemen, die beispielsweise der Ausbildung von Dakryozystitiden entgegen wirken wurde von Paulsen et al. (2001 und 2002) beschrieben. Vergleichende anatomische Studien haben des Weiteren die Möglichkeit der Rückresorption von Tränenflüssigkeitsbestandteilen, welche ein Feedbacksignal für die Tränendrüse darstellen können, diskutiert (Föge et al., 2000 und 2001). Die Ergebnisse der angeführten Studien wurden zwar beim Kaninchen erhoben, sind aber mit geringen Einschränkungen auf den Menschen übertragbar, da das Tränenableitungssystem des Kaninchens dem des Menschen sehr ähnlich ist. Somit könnte die mögliche Absorption von Somatostatin durch das Epithel der ableitenden Tränenwege aus der Tränenflüssigkeit ein antisekretorisches Feedbacksignal für die Tränendrüse darstellen.

Die beschriebenen Wirkungen des Hormons werden an der Augenoberfläche hauptsächlich über die hSSTR1 und 2 vermittelt. Durch Expressionsanalysen der Somatostatinrezeptoren konnte gezeigt werden, dass die hSSTR1 und 2 die am häufigsten exprimierten Rezeptoren im Gewebe des menschlichen Auges sind (Klisovic et al., 2001). Dieses Ergebnis korreliert mit der Verteilung der Somatostatinrezeptoren in anderen Studien untersuchter Gewebe und Zelllinien (Elliott et al., 1999; Shaoyu Yan et al., 2005). Der hSSTR5 kann an der Augenoberfläche nur teilweise nachgewiesen werden, die hSSTR3 und 4 sind in keiner der untersuchten Proben detektierbar. Interessanter Weise konnte am Beispiel der humanen Konjunktivaepithelzelllinie gezeigt werden, dass der hSSTR1 nach konzentrationsabhängiger Somatostatinstimulation (1ng/ml, 10ng/ml) signifikant herabreguliert wird. Der hSSTR2 hingegen unterliegt im dem gewählten Konzentrationsbereich keiner Regulation durch Somatostatin. Dieser Befund ist eher unerwartet, da auch bei diesem Rezeptor eine Down-Regulation und/oder eine Desensitivierung durch Somatostatin zu erwarten wäre. Es ist anzunehmen, dass diese Regulationsmechanismen erst nach einer längeren Stimulationsdauer erfolgen. Möglicherweise ist dies mit der funktionellen Bedeutung des hSSTR2 und der Aufrechterhaltung bestimmter Regulationsmechanismen assoziiert.

5.2 Immunmodulierende Rolle von Somatostatin

Neuropeptidhormone sind an komplexen Regulationsvorgängen zwischen dem menschlichen neuroendokrinen System und dem Immunsystem beteiligt (Levite et al.,

2001). Eine Beteiligung von Somatostatin und seiner Rezeptoren bezüglich dieser Interaktionen wird ebenfalls angenommen. Zahlreiche Studien haben sich mit der Verteilung von Somatostatin und der Somatostatinrezeptoren in endokrinen Geweben beschäftigt (Dalm et al., 2004), die komplexe Rolle von Somatostatin im menschlichen Immunsystem ist aber bis heute nur wenig aufgeklärt. Bisher konnte gezeigt werden, dass verschiedene Neuropeptide, so auch Somatostatin, in der Lage sind, die Zytokinsekretion von T-Zellen zu induzieren. Außerdem wurde eine Inhibition der durch TNF α und Bakterien ausgelösten Sekretion von IL-8 und IL-1 β durch Somatostatin in zwei intestinalen Zelllinien beschrieben (Levite et al., 2001). Der Somatostatinrezeptor 2 wird im menschlichen Organismus von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und ist durch Stimulation mit Lipopolysaccharid signifikant hochregulierbar (Dalm et al., 2003). In Tiermodellen wurde die Rolle von Somatostatin in immunmodulatorischen Geweben bereits früher untersucht. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Somatostatin direkt an T-Zell-Somatostatinrezeptoren (SSTR2) wirkt und dadurch die IFN γ Synthese herabreguliert (Weinstock and Elliot, 2000; Elliot et al., 1999). Bei Ratten wird Somatostatin ebenfalls von T- und B-Lymphozyten des Thymus und der Milz synthetisiert und sezerniert (Aguila et al., 1991).

Auf die Frage, ob Somatostatin als Immunmodulator bei kornealen Infektionen und Entzündungen an der Augenoberfläche des Menschen Bedeutung zukommt, liegen bislang keine Ergebnisse vor. Ziel der Untersuchungen war es daher, den Einfluß von Zytokinen (TNF α , IL-1 α , IL-1 β) und Bakterienbestandteilen (PGN, LPS) auf die Somatostatinrezeptor-Expression in einer humanen Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinie nach 6h und 24h zu analysieren.

Die Expressionsanalysen beschränken sich dabei auf die hSSTR1 und 2, die weiteren hSSTR3, 4 und 5 werden von den humanen Zelllinien nicht exprimiert. Der ubiquitär nachgewiesene hSSTR2 kann in beiden Zelllinien untersucht werden, der hSSTR1 wird hingegen nur in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie exprimiert.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bakterienbestandteile LPS und PGN, sowie auch das proinflammatorische Zytokin IL-1 β nur Einfluß auf die mRNA Expression des hSSTR2 haben, den hSSTR1 zu keinem untersuchten Zeitpunkt regulieren. Die Stimulantien führen zu einer signifikanten relativen RNA-Erhöhung des hSSTR2 in der Konjunktivaepithelzelllinie nach 6h Stimulationsdauer, nach 24h ist dieser Effekt aufgehoben. In der humanen Korneaepithelzelllinie führen nur PGN

und IL-1 β zu einer Hochregulation des Somatostatinrezeptor 2 nach 6h. Nach 24h Stimulationsdauer ist die Hochregulation des hSSTR2, im Vergleich zur Konjunktivaepithelzelllinie, noch immer signifikant. Die Regulation des hSSTR2 durch LPS, PGN, IL-1 β ist also in der Korneaepithelzelllinie von längerer Dauer als in der Konjunktivaepithelzelllinie.

Das proinflammatorische Zytokin TNF α reguliert in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie hingegen ausschließlich den hSSTR1. Nach 6h führt TNF α zu einer signifikanten Erniedrigung der relativen RNA-Expression, die nach 24h wieder aufgehoben ist. Dieser Befund korreliert mit den Untersuchungen von Shaoyu Yan et al. (2005), die ebenfalls eine Reduktion der mRNA Expression von Somatostatin und der Somatostatinrezeptoren 1, 2 und 5 nach TNF α -Stimulation in humanen Koronarendothelzellen beschreiben. Die fehlende Beeinflussung des hSSTR2 durch TNF α in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie ist möglicherweise auf die organspezifische Wirkung zurückzuführen.

Die Genexpressionslevel sind offensichtlich sehr sensitiv für IL-1 α Stimulation, denn nach 6h führt IL-1 α immer zu einer signifikanten Erhöhung der hSSTR1 und 2 Expression in den einzelnen Epithelzelllinien. Nach 24h ist die Expressionserhöhung nicht mehr nachweisbar, sodass davon auszugehen ist, dass die Rezeptorregulation auf mRNA-Ebene durch dieses Zytokin, aber auch durch andere Stimulantien, nach 6h auf ihrem Höhepunkt ist und nach 24h schon wieder herunter- oder gegenreguliert wird.

Ursprünglich sollte außerdem die Wirkung der angegebenen Stimulantien auf die Somatostatinregulation direkt untersucht werden, sofern die humane Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinie Somatostatin mRNA exprimieren. Da dies allerdings nicht der Fall ist, wurden die Regulationsuntersuchungen auf die Somatostatinrezeptoren beschränkt.

Aus den Ergebnissen der Expressionsanalysen wird deutlich, dass Zytokinen und Bakterienbestandteilen an der Augenoberfläche im Rahmen von immunmodulatorischen Vorgängen Bedeutung zukommt. Die Stimulantien beeinflussen die Regulation der hSSTR1 und 2 deutlich, ein direkter Einfluß auf die Somatostatinexpression an der Kornea oder Konjunktiva ist allerdings unwahrscheinlich. Die immunologischen Eigenschaften von Somatostatin bei Infektionen oder Entzündungen können über die veränderte Expression der Rezeptoren und damit erhöhten Bindungsmöglichkeit von Somatostatin vermittelt

werden. Außerdem ist ein Feedback-Mechanismus zur Tränendrüse denkbar, bei dem beispielsweise durch Entzündungsmediatoren die Somatostatinsekretion regulatorisch erhöht wird. Somatostatin wirkt seinerseits meist hemmend auf die sekretorische Aktivität von Immunzellen, wie auf die Immunglobulinproduktion von aktivierten B-Lymphozyten, die Zytokinproduktion von aktivierten T-Lymphozyten oder die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen durch Basophile oder Monozyten (Peluso et al., 1996; Krantic et al., 2004). Durch diese verminderte Mediatorsekretion wird wiederum die Somatostatinrezeptorexpression verändert und die Immunantwort reguliert. Des Weiteren verändert Somatostatin die Aktivität von natürlichen Killerzellen und die phagozytotische Aktivität von humanen Monozyten und Makrophagen sowie die Chemotaxis von Neutrophilen (Sirianni et al., 1994; Jenkins et al., 1986; Chao et al., 1995; Krantic et al., 2004). Im menschlichen Organismus wird der Somatostatinrezeptor 2 von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, somit kann Somatostatin auch direkt auf die Immunzellen einwirken und deren Funktionen beeinflussen (Dalm et al., 2003). Eine andere Möglichkeit des Somatostatinsystems auf parakrinen, sowie auch die Eigenschaften der Immunzellen auf autokrinen Weg zu beeinflussen, wäre die Sekretion von Somatostatin oder eines somatostatin-ähnlichen Neuropeptids durch die Immunzellen selbst. Dalm et al. (2003) beschreibt die Expression von Cortistatin, aber das fehlende Vorkommen von Somatostatin bei Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Cortistatin ist ein somatostatin-ähnliches Peptid und zeigt eine hohe Affinität für alle fünf Somatostatinrezeptoren (Spier and de Lecea, 2000). Auf Grund der fehlenden Nachweisbarkeit von Somatostatin in den durchgeführten Untersuchungen wird Cortistatin von den Autoren eine große Bedeutung bei der Vermittlung von Immunvorgängen zugesprochen. Auch an der Augenoberfläche könnte Cortistatin ähnliche Wirkung zukommen. Der fehlende Nachweis impliziert allerdings nicht gleichzeitig, dass Somatostatin durch Cortistatin ersetzt wird. Vielmehr ist ein ergänzender Mechanismus zwischen beiden Peptiden zu vermuten, der durch weitere Forschungsvorhaben verifiziert werden muss.

Klinische Relevanz kann Somatostatin auf Grund der vielfältigen Wirkungen und Interaktionen mit dem Immunsystem in der Behandlung von bakteriellen Keratitiden und Konjunktividen erlangen. Da auch das Trockene Auge mit einer erhöhten Infektionsrate der Augenoberflächenepithelien assoziiert ist (Jacobi et al., 2006) und

Somatostatin in der Tränenflüssigkeit vorkommt, ist eine potentielle Bedeutung im Rahmen des Sicca-Syndroms ebenfalls wahrscheinlich. Somatostatin kann somit eine wichtige Rolle als Immunmodulator im Rahmen entzündlicher Prozesse spielen. Auf der anderen Seite ist denkbar, dass Somatostatin die Bildung lokaler Androgene beeinflusst, wie dies für verschiedene andere Hormone bereits nachgewiesen wurde. Zirkulierende und lokal gebildete Androgene sind in den vergangenen Jahren im Rahmen der Pathogenese des Trockenen Auges in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Die Reduktion des Androgenspiegels unter einen bestimmten Grenzwert führt zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, vor allem IL-1 β , IL2, INF γ und TNF α , aus zirkulierenden Lymphozyten im Drüsengewebe (Tränendrüse, akzessorische Tränendrüsen, Meibom-Drüsen) (Dogru and Tsubota, 2004).

5.3 Effekte von Somatostatin und Octreotid auf die korneale Wundheilung

Untersuchungsergebnisse im Rahmen der Behandlung von gastrointestinalen und pankreatischen Fisteln zeigen, dass Somatostatin und seinem länger wirksamen Analogon Octreotid Bedeutung bei der Wundheilung zukommen (Hesse et al., 2001; Leandros et al., 2004). Die verbesserte Wundheilung durch Somatostatin wird von den Autoren durch die inhibitorischen Effekte auf die gastrointestinale Sekretion und damit verbesserten Wundverhältnisse erklärt. Daneben sind weitere, wie oben bereits beschrieben, immunmodulatorische Regulationsmechanismen denkbar, die den Entzündungsverlauf und damit die Wundheilung positiv beeinflussen. Da Somatostatin in die Tränenflüssigkeit abgegeben wird, somit entsprechender Bestandteil des Tränenfilms ist und die Kornea die hSSTR1, 2 und 5 bildet, ist ein Effekt auf die korneale Wundheilung denkbar. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit in einem Korneadefektmodell an der Maus untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von 10ng/ml Somatostatin den Heilungsverlauf der kornealen Erosionen signifikant verbessert. Bereits nach 24h Beobachtungszeit ist die signifikant verbesserte Korneaepithelheilung nachweisbar, die bis zum Ende des Versuchs nach 84h anhält.

Eine Konzentration von 1ng/ml Somatostatin hat hingegen keinen signifikanten Einfluß auf die korneale Wundheilung. In diesem Zusammenhang hat sich in einigen Studien die Dosisabhängigkeit der Somatostatinapplikation gezeigt, denn sowohl

Unter- als auch Überdosierung führen zu einer Reduktion der durch Somatostatin vermittelten Effekte. Inhibitorische Effekte werden beispielsweise durch Somatostatinkonzentrationen im Nanomolarbereich erreicht, im Micromolarbereich werden diese Effekte reduziert oder aufgehoben (Hofland et al., 1999). Dies deutet auf eine schnelle Desensitivierung der Rezeptoren oder auch auf eine mögliche Rezeptorinternalisierung hin. Daher ist es wichtig die Stimulantien richtig zu dosieren, um eine optimale Wundheilung zu fördern. Octreotid hat im Versuch in den Konzentrationen 1ng/ml und 10ng/ml ebenfalls keinen signifikanten Einfluß auf die korneale Wundheilung. Die unterschiedliche Wirkung von Octreotid und Somatostatin in gleicher Konzentration (10ng/ml) ist unerwartet, da es sich bei Octreotid lediglich um ein länger wirksames Analogon handelt. Scheinbar haben die molekularen Unterschiede der eingesetzten Stoffe und auch die unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten größere Bedeutung. Die Somatostatinrezeptoren 2, 3 und 5 zeichnen sich durch die Bindungsfähigkeit der klassischen Somatostatinanaloge, wie Octreotid aus. Diese Eigenschaft besitzen die Somatostatinrezeptoren 1 und 4 nur in sehr geringem Maß. Die Kornea exprimiert die Somatostatinrezeptoren 1, 2 und 5, dementsprechend könnte dem Somatostatinrezeptor 1 eine besondere Rolle bei der Vermittlung der kornealen Wundheilung zukommen. Im Gegensatz zu Octreotid besitzt Somatostatin eine entsprechend hohe Bindungsaffinität zu diesem Rezeptor, dies könnte den fehlenden Effekt nach Octreotidapplikation erklären. Des Weiteren ist es möglich, dass Octreotid in höheren Dosierungen ähnlich positive Effekte auf die korneale Wundheilung hat. Die Wirkung von Octreotid auf die Wundheilung wird in verschiedenen Studien kontrovers beschrieben, einige Autoren zeigen beispielsweise eine signifikante Verbesserung der Fistelheilung nach Octreotidbehandlung auf (Leandros et al., 2004; Barnes et al., 1993), andere hingegen konnten keine Wirkung nachweisen (Sancho et al., 1995). Verschiedene Erklärungen, wie ein Rebound-Effekt zwischen verschiedenen Dosen, die fehlende Affinität zu bestimmten Somatostatinrezeptoren oder die Downregulation der Somatostatinrezeptoren werden für diese Beobachtungen herangezogen. Letzterer ist auch ein wichtiger Punkt für den Einsatz von Somatostatin bei der Behandlung von Erosionen, denn es ist nicht geklärt wie lange sich die Applikation positiv auf die Wundheilung auswirkt, bevor es zu eventuellen Gewöhnungseffekten kommt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass Somatostatin in einer Konzentration von 10ng/ml eine signifikant verbesserte korneale Wundheilung bewirkt. Zwar sind die Fallzahlen

in der durchgeführten Untersuchung relativ klein, können aber korrelierend mit anderen Studienergebnissen auf ein Benefit nach Somatostatinbehandlung schließen lassen. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Rolle von Somatostatin im Rahmen der kornealen Wundheilung aufzuklären.

5.4 VEGF und Augenoberfläche

Vascular endothelial growth factor (VEGF) gehört zur Familie der Peptid-Wachstumsfaktoren und wurde ursprünglich als dimeres, 34-45kDa großes Heparin-bindendes Glykopeptid identifiziert, das von Tumorzellen und Endothelzellen sezerniert wird (Senger et al., 1983, 1990; Ferrara and Henzel, 1989). Durch alternatives Splicen der mRNA können fünf verschiedene Spliceformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) entstehen (Leung et al., 1989; De Vries et al., 1992), die unterschiedliche biologische Aktivität besitzen. Die kürzeren Formen, wie VEGF₁₂₁ bis VEGF₁₆₅ sind weitgehend frei diffusibel und haben ein hohes angiogenetisches Potential. Besonders VEGF₁₂₁ kann über weite Distanzen wirken. Die größeren Splice-Varianten, wie beispielsweise VEGF₁₈₉ binden an Heparansulfatreste und sind daher nur wenig diffusibel. VEGF₁₆₅ ist in der Mehrzahl von Geweben, unter anderem auch in der Konjunktiva nachweisbar (Ferrara et al., 1991; Kim et al., 1999). VEGF wirkt über zwei hochaffine Rezeptor-Tyrosinkinasen, Flt-1 oder VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1) und KDR/Fik-1 oder VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2), die beide die Bildung von Blutgefäßen initiieren (Terman et al., 1992; Millauer et al., 1993; Quinn et al., 1993).

Im Gegensatz zu anderen Angiogenesefaktoren wie beispielsweise des sauren und des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (aFGF, bFGF) und des Plättchen-abgeleiteten-Endothelzell-Wachstumsfaktors (PDEGF) ist VEGF ein weitgehend Endothelzell-spezifisches Peptid (Ferrara et al., 1991; Leung et al., 1989), dass zahlreiche Schritte der Angiogenese einschließlich Proliferation, Migration, proteolytische Aktivität und Bildung von Kapillaren beeinflusst (Plouet et al., 1989; Connolly, 1991; Wang and Keiser, 1998) und somit essentiell für die normale als auch für die pathologische Blutgefäßbildung ist.

Es ist anzunehmen, dass an der gesunden Augenoberfläche ein oder mehrere Antiangiogenesefaktoren sezerniert werden, die den angiogenetischen Stimuli

entgegenwirken. Wenn es zu einer Störung der Balance zwischen Antiangiogenese und Angiogenese kommt, kann dies unter anderem zur Neovaskularisation der Kornea führen. Es konnte demonstriert werden, dass VEGF die Angiogenese in einem nicht-entzündlichen Neovaskularisationsmodell der Mäusekornea stimuliert (Kenyon et al., 1996) und als endogener Gefäßwachstumsfaktor für die Neovaskularisation der Kornea bei Entzündung verantwortlich ist (Amano et al., 1998; Philipp et al., 2000; Mimura et al., 2001; Zheng et al., 2001). Hypoxie ist ein weiterer wichtiger Faktor, durch den es zur vermehrten VEGF und VEGF-Rezeptor Expression und damit Neoangiogenese kommt (Detmar et al., 1997; Minchenko et al., 1994). Ursächlich dafür wird unter anderem das übermäßige Tragen von Kontaktlinsen angesehen. Für den Prozess der kornealen Angiogenese scheint dem kornealen Limbus entscheidende Bedeutung zuzukommen. Ma et al. (1999) konnten in Zellkulturexperimenten zeigen, dass Limbusepithelzellen eine starke antiangiogenetische Potenz besitzen. VEGF kommt in geringer Konzentration auch in der gesunden Kornea vor (Philipp et al., 2000). Es wird hier besonders von Epithel- und Endothelzellen, aber auch schwach von Keratinozyten gebildet. VEGFR1 und 2 wurden im Limbusendothel und VEGFR1 im Hornhautendothel nachgewiesen (Philipp et al., 2000). Außerdem scheint VEGF eine aktive Rolle in der Physiologie von Konjunktivaepithelzellen zu spielen (Gebhardt et al., 2005).

In vitro Studien zeigen einen inhibierenden Effekt des Somatostatinanalogons Octreotid auf Wachstumsfaktoren (Baldysiak-Figiel et al., 2005; Amann et al., 2000; Spraul et al., 2002). Ein ähnlicher Effekt wird ebenfalls für Somatostatin in verschiedenen Studien beschrieben (Wu et al., 2002). Sowohl Octreotid als auch Somatostatin vermindern die VEGF Produktion in den untersuchten Endothel- und Epithelzellen (Sall et al., 2004; Lawnicka et al., 2000). Auf Grundlage dieser Kenntnisse sollte die Regulation der humanen Somatostatinrezeptoren nach VEGF-Stimulation an der Augenoberfläche ermittelt werden. Vorerst liegen nur die Ergebnisse der humane Konjunktivaepithelzelllinie vor, da aber für die humane Korneaepithelzelllinie ähnliche Ergebnisse zu erwarten sind, können bezüglich dieser Fragestellung durchaus Rückschlüsse auf die Eigenschaften von Konjunktiva- und Korneaepithel gezogen werden. Auf Proteinebene induziert VEGF ab einer Konzentration von 10ng/ml den hSSTR2. Auf RNA-Ebene kann diese Expressionssteigerung durch VEGF bereits ab 1ng/ml beobachtet werden, dies liegt vermutlich daran, dass die Real-time PCR ein sensitiveres Verfahren ist und sehr

geringe Veränderungen ermittelt werden können. Interessanterweise wird der hSSTR1 ab einer VEGF Konzentration von 10ng/ml signifikant herabreguliert, beide Rezeptoren verhalten sich also entgegengesetzt. Somit ist an der Augenoberfläche wahrscheinlich der hSSTR2 für die inhibitorische Reaktion auf VEGF besonders wichtig. Dieses Ergebnis korreliert mit Untersuchungen, bei denen die VEGF Produktion in Retinapigmentepithelzellen, Pankreas- oder Gliomazelllinien, nach Applikation von Somatostatin oder eines SSTR2-selektiven Agonisten durch Interaktion mit dem Somatostatinrezeptor 2 deutlich reduziert wurde (Sall et al., 2004; Kumar et al., 2004; Mentlein et al., 2001). Kontrovers wird die Frage nach der Dauer und Stabilität des inhibitorischen Effektes des SSTR2-Gens diskutiert. Einige Autoren gehen von einer Langzeitinhibition durch Somatostatin aus, andere von einem kurzzeitigen Effekt, da es zu einer Down-Regulation und Desensitivierung des SSTR2 durch andauernde Somatostatinstimulation kommen könnte (Kumar et al., 2004; Hipkins et al., 1997). Somatostatin sowie auch die Somatostatinanaloga könnten die VEGF Expression nicht nur direkt, sondern auch auf indirektem Weg beeinflussen. Besonders in inflammatorischen Gebieten werden zahlreiche Zytokine und andere Mediatoren freigesetzt, die die Bildung von VEGF und VEGF-Rezeptoren initiieren könnten (Planck et al., 1997; Li et al., 1995). Aktivierte Makrophagen können ebenfalls eine wichtige Quelle für VEGF sein. Da Somatostatin meist hemmend auf die sekretorische Aktivität von Immunzellen, wie auf die Zytokinproduktion von aktivierten T-Lymphozyten oder die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen durch Basophile oder Monozyten wirkt und ferner die Aktivität von natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen beeinflusst, ist ein inhibierender Effekt auf VEGF auch indirekt durch immunmodulatorische Einflussnahme denkbar.

5.5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sollten durch weitere Forschungsvorhaben ergänzt werden, um die Komplexität der durch Somatostatin vermittelten Effekte an der Augenoberfläche weiter aufzuklären. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang den direkten Einfluß von Somatostatin oder Octreotid auf VEGF unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise Hypoxie, zu analysieren. Das

Korneadefektmodell an der Maus könnte mit variierten Konzentrationen von Somatostatin oder Octreotid wiederholt werden. Außerdem könnten Untersuchungen an Gewebe der Tränendrüse durchgeführt werden, um den direkten Einfluß der Bakterienbestandteile und Zytokine auf Somatostatin zu ermitteln. Die aus diesen Untersuchungen gewonnenen Daten könnten mit großer Sicherheit sehr gut mit dem Kontext der vorliegenden Arbeit verknüpft werden und so zum detaillierteren Verständnis der Wirkung von Somatostatin und der Somatostatinrezeptoren an der Augenoberfläche beitragen.

6 Zusammenfassung

Somatostatin ist ein Polypeptid mit multifunktionellem Charakter, dem zahlreiche, vor allem inhibitorische, Eigenschaften zugeschrieben werden. Auf Grund seiner ubiquitären Verteilung in Geweben ist Somatostatin an endo- und exokrinen, sowie auch an immunologischen Vorgängen beteiligt. Diese biologischen Effekte resultieren aus dem Zusammenspiel eines Liganden und fünf verschiedenen G-Protein gekoppelten Oberflächenrezeptoren (hSSTR1-5). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung von Somatostatin (SS) und der Somatostatinrezeptoren (hSSTR) an der Augenoberfläche und im Tränenwegsystem zu untersuchen. Aus klinischer Sicht wird der Frage nachgegangen, ob Somatostatin als potentiell Immunmodulator eine Bedeutung im Rahmen kornealer Infektionen oder Entzündungen zukommt und ob Somatostatin als Antiangiogenesefaktor pathologische Neovaskularisationsprozesse positiv beeinflussen kann.

Somatostatin wird von Azinuszellen in der Tränendrüse gebildet und in die Tränenflüssigkeit abgegeben. An der Augenoberfläche selbst wird Somatostatin vermutlich nicht gebildet. Die hSSTR1, 2 und 5 werden in Tränendrüse, Konjunktiva, Kornea, ableitenden Tränenwegen und in humanen Epithelzelllinien (nur hSSTR1 und 2) exprimiert. Die Expressionsmuster lassen sowohl auf eine autokrine Wirkung als auch auf eine parakrine Wirkung von Somatostatin an der Augenoberfläche schließen.

Eine komplexe Rolle von Somatostatin im menschlichen Immunsystem ist sehr wahrscheinlich, aber bis heute nur wenig aufgeklärt. Mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen wird deutlich, dass Somatostatin immunmodulatorische Wirkungen zeigt. Zytokine und Bakterienbestandteile beeinflussen die Regulation der hSSTR1 und 2 an der Augenoberfläche deutlich; Interaktionen verschiedenster Immunzellen sind an den komplexen Regulationsvorgängen des Somatostatinsystems beteiligt. Somatostatin kann somit eine wichtige Rolle als Immunmodulator im Rahmen entzündlicher Prozesse und Infektionen spielen.

Der Effekt von Somatostatin auf die korneale Wundheilung wurde mit Hilfe eines Korneadefektmodells an der Maus untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von 10ng/ml Somatostatin den Heilungsverlauf von kornealen Erosionen signifikant verbessert. Bereits nach einem Beobachtungszeitraum von 24h ist eine signifikant verbesserte Korneaepithelheilung nachweisbar, die bis zum Ende des Versuchs nach 84h anhält. Eine Konzentration von 1ng/ml Somatostatin, sowie 1ng/ml oder 10ng/ml Octreotid hat hingegen im untersuchten Beobachtungszeitraum von 84h keinen signifikanten Einfluß auf die korneale Wundheilung.

VEGF ist ein weitgehend Endothelzell-spezifisches Peptid, das zahlreiche Schritte der Angiogenese beeinflusst und somit essentiell für die normale als auch pathologische Blutgefäßbildung ist. Eine Störung der Balance zwischen Antiangiogenese und Angiogenese kann unter anderem zur Neovaskularisation der Kornea führen. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass VEGF in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie zu einer Herabregulation des hSSTR1 und zu einer Heraufregulation des hSSTR2 führt. Der hSSTR2 rückt dabei besonders in den Mittelpunkt und könnte wesentlich für die direkte inhibitorische Reaktion auf VEGF sein. Die Dauer und Stabilität des inhibitorischen Effekts des SSTR2-Gens auf VEGF ist allerdings nicht geklärt. Außerdem ist ein indirekter Einfluß von Somatostatin auf VEGF denkbar, da Somatostatin meist hemmend auf die sekretorische Aktivität von Immunzellen, die ebenfalls eine Quelle für VEGF sein können, wirkt.

7 Literaturverzeichnis

1. Aguila MC, Dees WL, Haensly WE, McCann SM. "Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:11485-11489.
2. Amann J, Kaven C, Spraul CW, Lang GK, Lang GE. "Einfluss von Octreotid in Kombination mit Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von RPE-zellen in vitro." Ophthalmologe 2000;97:737-741.
3. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Toentino M, Adamis AP. "Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization." Invest Ophthalmol Vis Sci 1998;39:18-22.
4. Baldysiak-Figiel A, Jong-Hesse YD, Lang GK, Lang GE. "Octreotide inhibits growth factor-induced and basal proliferation of lens epithelial cells in vitro." J Cataract Refract Surg 2005;31:1059-1064.
5. Barnes SM, Kontny BG, Prinz RA. "Somatostatin analog treatment of pancreatic fistulas." Int J Pancreatol 1993;14:181-188.
6. Baum J. "Infections of the eye." Clin Infect Dis 1995;21:479-86.
7. Bausher LP, Horio B. "Neuropeptide Y and somatostatin inhibit stimulated cyclic AMP production in rabbit ciliary processes." Curr Eye Res 1990;9:371-378.
8. Bekman EM, Denisenko MF, Grigor'ev Mlu, Arion VlaM. "Autolytic degradation of RNA; the effect of various factors on the dynamics of the process." Mol Biol (Mosk) 1986;20:527-535.
9. Bertherat J, Chanson P, Dewailly D, Enjalbert A, Jaquet P, Kordon C, Peillon F, Timsit J, Epelbaum J. "Resistance to somatostatin (SRIH) analog therapy in acromegaly. Re-evaluation of the correlation between the SRIH receptor status of the pituitary tumor and the in vivo inhibition of GH secretion in response to SRIH analog." Horm Res 1992;38:94-99.

10. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone." *Science* 1973;179:77-79.
11. Brennan NA, Coles ML. "Extended wear in perspective." *Optom Vis Sci* 1997;74:609-623.
12. Buscail L, Vernejoul F, Faure P, Torrisani J, Susini C. "Regulation of cell proliferation by somatostatin." *Ann Endocrinol (Paris)* 2002;63:2S13-18.
13. Chao TC, Chen HP, Walter R. "Somatostatin and macrophage function: modulation of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF release." *Regul Pep* 1995;58:1-10.
14. Connolly DT. "Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function." *J Cell Biochem* 1991;47:219-223.
15. Coster DJ. "Factors affecting the outcome of corneal transplantation." *Ann R Coll Surg Engl* 1981;63:91-97.
16. Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Langerak AW, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. "Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system." *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:270-276.
- 17 Dalm VA, van Hagen PM, de Krijger RR, Kros JM, van Koetsveld PM, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. "Distribution pattern of somatostatin and cortistatin mRNA in human central and peripher tissues." *Clin Endocrinol* 2004;60:625-629.
18. Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Achilefu S, Houtsmuller AB, Pols DH, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. "Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dentritic cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E344-E353.
19. Danesi R, Agen C, Benelli U, Paolo AD, Nardini D, Bocci G, Basolo F, Campagni A, Tacca MD. "Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995)." *Clin Cancer Res* 1997;3:265-272.

20. De Fries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor." *Science* 1992;255:989-991.
21. Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackmann RW, Elicker BW, Dvorak HF, Claffey KP. "Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin." *J Invest Dermatol* 1997;108:263-268.
22. Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Saez V, Siemasko KF, Stern ME, Diebold. "Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4263-4274.
23. Dogru M, Tsubota K. "New insights into the diagnosis and treatment of dry eye." *Ocul Surf* 2004;2:59-75.
24. Elliott DE, Li J, Blum AM, Metwali A, Patel YC, Weinstock JV. "SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release." *Eur J Immunol* 1999;29:2454-2463.
25. Ferrara N, Leung DW, Phillips HS. "Molecular characterization and distribution of vascular endothelial growth factor." In: Müller EE, MacLeod RB, eds. *Neuroendocrine Perspectives*. New York, Springer-Verlag 1991;9:127.
26. Ferrara N, Henzel WJ. "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851-858.
27. Föge M, Paulsen FP, Thale B, Tillmann B. "Comparative anatomy of the efferent tear ducts." *J Anat* 2000;198:354.
28. Föge M, Paulsen FP, Thale B, Tillmann B. "Anatomy of the lacrimal passage: a comparative study of different vertebrates." *Ann Anat* 2001;183:230-231.

29. Gebhardt M, Mentlein R, Schaudig U, Pufe T, Recker K, Nölle B, Al-Samir K, Geerling G, Paulsen FP. "Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia." *Ophthalmology* 2005;112:1023-1030
30. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res* 1996;6:995-1001.
31. Gritz DC, Witcher JP, Jr. "Topical issues in the treatment of bacterial keratitis." *Int Ophthalmol Clin* 1998;38:107-114.
32. Guillemin R. "Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron." *Science* 1978;202:390-402.
33. Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Cordelier P, Bousquet C, Pyronnet S, Susini C. "Physiology of somatostatin receptors." *J Endocrinol Invest* 2005;28:5-9.
34. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. "Real time quantitative PCR." *Genome Res* 1996;6:986-994.
35. Hesse U, Ysebaert D, de Hemptinne B. "Role of somatostatin-14 and its analogues in the management of gastrointestinal fistulae:clinical data." *Gut* 2001;49:iv11-iv20.
36. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." *Biotechnology (NY)* 1993;11:1026-1030.
37. Hipkins RW, Friedman J, Clark RB, Eppler CM, Schonbrunn A. "Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor." *J Biol Chem* 1997;272:13869-13876.
38. Hofland LJ, van Hagen PM, Lamberts SWJ. "Functional role of somatostatin receptors on immune cells." *Ann Med* 1999;31:23-27.
39. Jacobi C, Dietrich T, Cursiefen C, Kruse FE. "Das trockene Auge." *Ophthalmologie* 2006;103:9-17.

40. Jenkins SA, Baxter JN, Day DW, Al-Sumidaie AM, Leinster SJ, Shields R. "The effect of somatostatin and SMS 201-995 on experimentally-induced pancreatitis and endotoxaemia in rats and on monocyte activity in patients with cirrhosis and portal hypertension." *Klin Wochenschr* 1986;64:100-106.
41. Kapicioglu Z, Kalyoncu IN, Deger O, Can G. "Effect of a somatostatin analogue (SMS 201-995) on tear secretion in rats." *Int Ophthalmol* 1998;22:43-45.
42. Kenyon BM, Voest EE, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ. "A model of angiogenesis in the mouse cornea." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1625-1632.
43. Khodadoust AA. "The allograft rejection reaction: the leading cause of late failure of clinical corneal grafts." In: Jones BR, ed. *Corneal Graft Failure (Ciba Foundation symposium)*. Amsterdam, Elsevier:1973:151-164.
44. Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Agular S, Miller JW, Adamis AP. "Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2115-2121.
45. Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE, Sall JW, Balster D, O'Dorisio TM, Craig E, Lubow M. "Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2193-2201.
46. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. "An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A." *N Engl J Med* 1987;317:985-990.
47. Krantic S, Goddard I, Saveanu A, Giannetti N, Fombonne J, Cardose A, Jaquet P, Enjalbert A. "Novel modalities of somatostatin actions." *Eur J Endocrinol* 2004;151:643-655.
48. Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. "Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro." *Endocrinology* 1968;83:783-790.

49. Kumar M, Liu Zh-R, Chang Q, Wang D-Y, Qin R-Y. "Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression." *World J Gastroenterol* 2004;10:393-399.
50. Lang GE. "Medikamentöse Therapie der diabetischen Retinopathie." *Ophthalmologie* 2004;101:1165-1170.
51. Lang GE. "Therapie der diabetischen Retinopathie mit Somatostatinanaloga." *Ophthalmologie* 2004;101:290-293.
52. Lawnicka H, Stepień H, Wyczolkowska J, Kolago B, Kunert-Radek J, Komorowski J. "Effect of somatostatin and octreotide on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion from murine endothelial cell line (HECa10) culture." *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:567-571.
53. Leandros E, Antonakis PT, Albanopoulos K, Dervenis C, Konstadoulakis MM. "Somatostatin versus octreotide in the treatment of patients with gastrointestinal and pancreatic fistulas." *Can J Gastroenterol* 2004;18:303-306.
54. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science* 1989;246:1306-1309.
55. Levartovsky S, Rosenwasser G, Goodman D. "Bacterial keratitis after [correction of following] laser in situ keratomileusis." *Ophthalmology* 2001;108:321-325.
56. Levite M, Chowars Y. "Nerve-driven immunity: neuropeptides regulate cytokine secretion of T cells and intestinal epithelial cells in a direct, powerful and contextual manner." *Ann Oncol* 2001;12 Suppl2:S19-25.
57. Li DQ, Tseng SC. "Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface." *J Cell Physiol* 1995;163:61-79.
58. Lober M. "Somatostatin-like immunoreactivity in the embalmed human lacrimal gland." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:186 (ARVO Abstract).

59. Ma DH, Tsai RJ, Chu WK, Kao CH, Chen JK. "Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1822-1828.
60. Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, Held-Feindt J. "Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells." *Int J Cancer* 2001;92:545-550.
61. Millauer B, Witzmann-Voos S, Schnürch H. "High affinity VEGF binding and development expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis." *Cell* 1993;72:835-846.
62. Mimura T, Amano S, Usui T, Kaji Y, Oshika T, Ishii Y. "Expression of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in corneal lymphangiogenesis." *Exp Eye Res* 2001;72:71-78.
63. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. "Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo." *Lab Invest* 1994;71:374-379.
64. Mullis KB, Faloona FA. "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
65. Patel YC. "Somatostatin-14, somatostatin-28, and prosomatostatin are independently and efficiently processed from prosomatostatin in the constitutive secretory pathway in islet somatostatin tumor cells." *Mol Cell Endocrinol* 1997;131:183-94.
66. Patel YC. "Somatostatin and its receptor family." *Front Neuroendocrinol* 1999;20:157-98.
67. Paulsen FP, Pufe T, Schaudig U, Held-Feindt J, Lehmann J, Schröder JM, Tillmann BN. "Detection of natural peptides antibiotics in human nasolacrimal ducts." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2157-2163.
68. Paulsen FP, Pufe T, Schaudig U, Held-Feindt J, Lehmann J, Thale A, Tillmann BN. "Protection of human efferent tear ducts by antimicrobial peptides." *Adv Exp Med Biol* 2002;506:547-553

69. Peinado MA, Fajardo N, Hernandez G, Puig-Domingo M, Viader M, Reiter RJ, Webb SM. "Immunoreactive somatostatin diurnal rhythms in rat pineal, retina and hardierian gland: effects of sex, season, continuous darkness and estrous cycle." *J Neural Transm Gen Sect* 1990;81:63-72.
70. Philipp W, Speicher L, Humpel C. "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2514-2522.
71. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. "Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea." *In Vivo* 1994;8:961-965.
72. Planck SR, Rich LF, Ansel JC, Huang XN, Rosenbaum JT. "Trauma and alkali burns induce distinct patterns of cytokine gene expression in the rat cornea." *Ocul Immunol Inflamm* 1997;5:95-100.
73. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. "Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells." *EMBO J* 1989;8:3801-3806.
74. Puig-Domingo M, Guerrero JM, Reiter RJ, Peinado MA, Sabry I, Viader M, Webb SM. "Identification of immunoreactive somatostatin in the rat hardierian gland: regulation of its content by growth hormone, beta-adrenergic agonists and calcium channel blockers." *Peptides* 1988;9:571-574.
75. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. "Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium." *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7533-7537.
76. Reichlin S. "Somatostatin." *N Engl J Med* 1983;309:1495-1501
77. Reichlin S. "Somatostatin (second of two parts)." *N Engl J Med* 1983;309:1556-1563
78. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 1985;230:1350-1354.

79. Sall JW, Klisovic DD, O`Doriso MS, Katz SE. "Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 2004;79:465-476.
80. Sambrook J, Gething MJ. "Protein structure. Chaperones, paperones." *Nature* 1989; 342:224-225.
81. Sancho JJ, di Costanzo J, Nubiola P, Larrd A, Beguiristain A, Roqueta F, Franch G, Oliva A, Gubern JM, Sitges-Serra A. "Randomized double-blind placebo-controlled trial of early octreotide in patients with postoperative enterocutaneous fistula." *Br J Surg* 1995;82:638-641.
82. Scarborough DE. "Somatostatin regulation by cytokines." *Metabolism* 1990;39:108-111.
83. Scarborough DE, Lee SL, Dinarello CA, Reichlin S. "Interleukin-1 beta stimulates somatostatin biosynthesis in primary cultures of fetal rat brain." *Endocrinology* 1989;124:549-551.
84. Seboek D, Linscheid P, Zulewski H, Langer I, Christ-Crain M, Keller U, Muller B. "Somatostatin is expressed and secreted by human adipose tissue upon infection and inflammation." *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4833-4839.
85. Senger DR , Connolly DT, van de Water L, Feder J, Dvorak HF. "Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor." *Cancer Res* 1990;50:1774-1778.
86. Senger DR, Galli SJ, Dvorak Am, Peruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." *Science* 1983;219:983-985.
87. Shen S, Rutter WJ. "Sequenz of the human somatostatin I gene." *Science* 1984;224:168-71.
88. Sirianni MC, Annibale B, Fais S, Delle Fave G. "Inhibitory effect of somatostatin-14 and some analogues on human natural killer cell activity." *Peptids* 1994;15:1033-1036.

89. Spier AD, de Lecea L. "Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptid family with distinct physiological functions." *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33:228-241.
90. Spraul CW, Baldysiak-Figiel A, Lang GK, Lang GE. "Octreotide inhibits growth factor-induced bovine choriocapillary endothelial cells in vitro." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240:227-231.
91. Taylor AW, Yee DG. "Somatostatin is an immunosuppressive factor in aqueous humor." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;80:179-185.
92. Terman BI, Dougher VM, Carrion ME. "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor." *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579-1586.
93. Wang H, Keiser JA. "Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells:role of flt-1." *Circ Res* 1998;83:832-840.
94. Weinstock JV, Elliott D. "The somatostatin immunoregulatory circuit present at sites of chronic inflammation." *European Journal of Endocrinology* 2000;143:S15-S19.
95. Wu PC, Liu CC, Chen CH, Kou HK, Shen SC, Lu CY, Chou WY, Sung MT, Yang LC. "Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:63-69.
96. Yan S, Li M, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. "TNF- α decreases expression of somatostatin, somatostatin receptors and cortistatin in human coronary endothelial cells." *Journal of Surgical Research* 2005;123:294-301.
97. Zheng M, Deshpande S, Lee S, Ferrara N, Rouse BT. "Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis." *J Virol* 2001;75:9828-9835.

8 Thesen

1. Somatostatin kommt in vielen Geweben des menschlichen Körpers in spezifischen Konzentrationen vor. Auch an der Augenoberfläche und im Tränenwegsystem ist Somatostatin nachweisbar. Somatostatin hat diverse biologische Eigenschaften, besonders wichtig sind die inhibitorischen, antientzündlichen, antisekretorischen und antiproliferativen Eigenschaften des zyklischen Polypeptids.
2. Somatostatin wird von Azinuszellen in der Tränendrüse gebildet und in die Tränenflüssigkeit abgegeben. An der Augenoberfläche selbst wird Somatostatin nicht gebildet.
3. Die Wirkung des Hormons Somatostatin wird an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwegen hauptsächlich über die hSSTR1 und 2 vermittelt; der hSSTR5 wird in den untersuchten Proben nur teilweise exprimiert und die hSSTR3 und 4 sind nicht detektierbar.
4. Das Expressionsmuster von Somatostatin und den Somatostatinrezeptoren läßt auf eine autokrine, sowie auch parakrine Wirkung von Somatostatin an der Augenoberfläche schließen.
5. Auf Grund der Nachweisbarkeit von Somatostatin in der Tränendrüse ist ein antisekretorischer Effekt auf die seröse Drüse anzunehmen.
6. Eine konzentrationsabhängige Somatostatinstimulation (1ng/ml, 10ng/ml) führt bei der humanen Konjunktivaepithelzelllinie zu einer signifikanten Herabregulation des hSSTR1, welche am ehesten durch eine Herabregulation und/oder eine Desensitivierung des Rezeptors zu erklären ist. Die fehlende Regulation des hSSTR2 in diesem Zeitraum könnte mit der längeren Aufrechterhaltung wichtiger Regulationsmechanismen durch diesen Rezeptor assoziiert sein.
7. Zytokinen und Bakterienbestandteilen kommt an der Augenoberfläche im Rahmen immunmodulatorischer Vorgänge Bedeutung zu. Die Stimulantien beeinflussen die Regulation der hSSTR1 und 2 deutlich, ein direkter Einfluß auf die Somatostatinexpression ist unwahrscheinlich.

8. LPS, PGN und IL-1 β haben nur Einfluß auf die mRNA Expression des hSSTR2, regulieren den hSSTR1 zu keinem untersuchten Zeitpunkt. Hingegen wirkt TNF α in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie ausschließlich auf den hSSTR1.
9. Die Genexpressionslevel der hSSTR1 und 2 sind sehr sensitiv für IL-1 α Stimulation. Dabei ist davon auszugehen, dass die Rezeptorregulation durch IL-1 α , aber auch durch andere Stimulantien, nach 6h auf ihrem Höhepunkt ist.
10. Die immunologischen Eigenschaften von Somatostatin bei Infektionen oder Entzündungen können über die veränderte Expression der Rezeptoren und damit erhöhten Bindungsmöglichkeit von Somatostatin vermittelt werden. Außerdem ist ein Feedback-Mechanismus zur Tränendrüse denkbar, bei dem beispielsweise durch Entzündungsmediatoren die Somatostatinsekretion regulatorisch erhöht wird.
11. Somatostatin wirkt meist hemmend auf die sekretorische Aktivität von Immunzellen. Durch die daraus resultierende verminderte Mediatorsekretion wird die Somatostatinrezeptorexpression beeinflusst und die Immunantwort reguliert.
12. Es liegt die Vermutung nahe, dass Somatostatin auch eine immunologische Wirkung an den ableitenden Tränenwegen besitzt und beispielsweise an der Verhinderung von Dakryozystitiden beteiligt ist.
13. An der Augenoberfläche könnte Cortistatin, einem somatostatin-ähnlichen Peptid, Bedeutung bei der Vermittlung von Immunvorgängen zukommen.
14. Klinische Relevanz kann Somatostatin auf Grund der vielfältigen Wirkungen und Interaktionen mit dem Immunsystem in der Behandlung von bakteriellen Keratitiden und Konjunktividen erlangen. Eine potentielle Bedeutung im Rahmen des Sicca-Syndroms ist ebenfalls wahrscheinlich, da auch das Trockene Auge mit einer erhöhten Infektionsrate der Augenoberflächenepithelien assoziiert ist.
15. Eine Konzentration von 10ng/ml Somatostatin verbessert den Heilungsverlauf von kornealen Erosionen bei Mäusen bereits nach 24h Behandlungszeit signifikant. Die Konzentrationen 1ng/ml Somatostatin, sowie 1ng/ml oder 10ng/ml Octreotid haben hingegen im untersuchten Beobachtungszeitraum von 84h keinen signifikanten Einfluß auf die korneale Wundheilung.
16. VEGF, ein weitgehend Endothelzell-spezifisches Peptid, das zahlreiche Schritte der Angiogenese beeinflusst, führt in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie zu einer Herabregulation des hSSTR1 und zu einer Heraufregulation des hSSTR2. An der Augenoberfläche rückt der hSSTR2 besonders in den Mittelpunkt und

könnte wesentlich für die direkte inhibitorische Reaktion auf VEGF sein. Die Dauer und Stabilität des inhibitorischen Effekts des SSTR2-Gens auf VEGF ist nicht geklärt.

17. Der antiproliferative Effekt von Somatostatin lässt auf eine funktionelle Bedeutung für die Transparenz der Kornea durch Beeinflussung der kornealen Neovaskularisation schließen.
18. Ein indirekter inhibitorischer Einfluß von Somatostatin auf VEGF ist außerdem möglich, da Somatostatin hemmend auf die sekretorische Aktivität von Immunzellen, die eine Quelle für VEGF sein können, wirkt.

Lebenslauf

06.07.1982	als erstes Kind von Dietmar Minsel und Silvia Friedrich, geb. Hänßgen, in Lauchhammer geboren
1989-1995	Besuch der Grundschule Großthiemig
1995-2002	Besuch des Elsterschloß-Gymnasiums Elsterwerda
2002	Abitur
2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
2004	Erste Ärztliche Prüfung
2005	Beginn der vorliegenden Dissertation
2006	Preisträgerin der Sicca-Forschungsförderung des Ressorts Trockenes Auge im BVA

Hinweise auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

1. Minsel I, Mentlein R, Sel S, Diebold Y, Bräuer L, Mühlbauer E, Paulsen F (2008) Somatostatin is secreted by the human lacrimal gland into the tear film and acts via somatostatin receptors 1, -2, and -5 which are modulated by inflammatory processes at the ocular surface. Endocrinology (in Revision)
2. Minsel I, Bräuer L, Sel S, Paulsen F (2008) Somatostatin, its role in corneal wound healing and the regulation of its receptors at the ocular surface by VEGF and somatostatin itself. Invest Ophthalmol Vis Sci (eingereicht)
3. Minsel Ivonne (2006) Somatostatin und Trockenes Auge. Der Augenspiegel 12: 30-31
4. Paulsen F, Risch M, Minsel I, Kindler C, Diebold Y, Mentlein R, Sel S, Recker K (2006) Somatostatin and somatostatin receptors in the lacrimal apparatus and at the ocular surface. ARVO Abstract 06-A-1822

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Danksagung

Ich möchte all denen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen und für seinen steten und hilfreichen Rat während der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Michaela Risch und Frau Ute Beyer bin ich sehr dankbar für die Anleitung, Betreuung und hilfreichen Ratschläge während der Durchführung meiner Untersuchungen.

Herrn Dr. med. Saeddetin Sel und Frau Dr. rer. nat. Kristin Jäger danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Ergebnisse.

Herrn Fabian Garreis möchte ich für seine Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten und die zahlreichen Ratschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein, Anatomisches Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel, sei herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der Dot-Blot Analyse gedankt.

Herrn Dr. rer. nat. Eckart Mühlbauer danke ich recht herzlich für die Bereitstellung von humaner Pankreas mRNA als Kontrollgewebe.

Auch den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Paulsen möchte ich für die entgegengebrachte Unterstützung danken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld und Unterstützung danken, die mir stets entgegengebracht wurden.