

Genetische Analyse des Somatostatin-Systems

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Thomas Zeyda
geb. in Mainz

Mainz, 1999

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.1999

Meinen Eltern

Planung und praktische Durchführung dieser Arbeit erfolgten am „National Institute of Mental Health“ (NIMH), Teil der „National Institutes of Health“ (NIH), Bethesda, Maryland (USA) innerhalb der „Clinical Neuroscience Branch“ in der Arbeitsgruppe („Unit on Genetics“) von Prof. Dr. U. H.

Die hier dargestellten Ergebnisse beruhen auf meiner eigenen Arbeitsleistung, wobei das Vektorkonstrukt zur Inaktivierung des Somatostatin-Gens freundlicherweise durch Prof. Dr. H. bereitgestellt wurde. Alle weiteren Schritte zur Genmutation (Somatostatin, Somatostatin-Rezeptoren 3 / 4) und der genetischen bzw. physiologischen Analyse (Somatostatin-*Knockout*) sind im Rahmen meiner Tätigkeit erbracht worden.

Teile dieser Arbeit werden in Kürze zur Publikation vorgelegt.

An dieser Stelle möchte ich allen Personen mein herzliches Dankeschön aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran Prof. H. und Prof. B., meinen Lehrern, die meinen Blick für das wissenschaftlich Wesentliche schärften und deren Einstellung mir als Vorbild diente. Dr. G. und seinen Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei vielen „Kleinigkeiten“, besonders Dr. T. und Dr. M., die mir gegen Ende meiner Arbeit ihr methodisches Know-how zur Verfügung stellten; das gleiche gilt auch für das Injektionsteam und alle Personen der „mouse facility“. Zu erwähnen sind auch die Sekretärinnen K. K. und L. A., die organisatorische Hürden zu überwinden halfen. Danke auch an Dr. P. für die Unterstützung bei den Verhaltensversuchen und Dr. L. und Dr. T. bei der Anwendung der SELDI™-Massenspektrometrie.

Meine Anerkennung auch an das Laborteam, „Unit on Genetics“: Dr. N. D., Dr. L. Y., A. L. und N. S.; es hat Spaß gemacht, mit euch zusammenzuarbeiten.

Dank auch an Prof. Dr. T., der durch sein Entgegenkommen im Rahmen der Zuständigkeit der Johannes Gutenberg-Universität Mainz diese Arbeit erst ermöglichte. Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. M. für sein Interesse und seine Unterstützung dankbar.

Meine Dankbarkeit gilt besonders den „Haymännern“, die mich in ihre Familie aufnahmen, D. F., die mir mehr als nur ein Dach über dem Kopf gab und den Ts. deren Gast ich sein durfte. Ein besonderes Dankeschön an A., die immer für mich da war.

Göttingen, im Mai 1999

1.0 EINLEITUNG	Seite: 1
1.1 Genetische Analyse	1
1.2 Das Somatostatin-System	2
1.2.1 Somatostatin.....	2
1.2.1.1 Entdeckung	2
1.2.1.2 Genkonservierung	2
1.2.1.3 Genregulation.....	4
1.2.1.4 Prozessierung	7
1.2.2 Rezeptoren	11
1.2.2.1 Entdeckung	11
1.2.2.2 Genregulation.....	12
1.2.2.3 Genkonservierung	13
1.2.2.4 Membrantopologie.....	17
1.2.2.5 Bindungsverhalten	19
1.2.2.6 Desensitisierung und Internalisierung.....	20
1.2.2.7 Signaltransduktion	22
1.2.3 Systemdefinition	24
1.2.3.1 Bestandteile, neue	24
1.2.3.2 Expression.....	24
1.2.3.3 Funktion	27
2.0 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	29
3.0 METHODEN	30
3.1 Molekularbiologie	31
3.1.1 Genomische Klone.....	31
3.1.2 Subklonieren	31
3.1.3 PCR/RT-PCR.....	32
3.1.4 Southern	34
3.1.5 Northern.....	34
3.1.6 DNA-Präparationen	35
3.1.7 RNA-Präparation	36

3.2 Zellkultur	36
3.2.1 Embryonale Fibroblasten (EFB)	36
3.2.2 Embryonale Stammzellen (ES)	37
3.2.3 Elektroporation	38
3.2.4 Klonisolierung	38
3.2.5 Chromosomen-Analyse	38
3.3 Maus-Produktion	39
3.3.1 Blastocysten und Ammenmäusen	39
3.3.2 Microinjektion	40
3.3.3 Embryotransfer	40
3.3.4 Kreuzung von Chimären	40
3.3.5 Etablierung des mutierten Allels	41
3.4 Analysen	41
3.4.1 Serum/Plasma	41
3.4.2 Morphologie	42
3.4.3 Autoradiographie	42
3.4.4 Deoxy-Glukose	42
3.4.5 Verhalten	43
4.0 ERGEBNISSE	45
4.1 Mutagenese in ES -Zellen	45
4.1.1 Genomische Klone	46
4.1.2 Vektoren	47
4.1.3 Transfektion und Selektion	52
4.1.4 Identifizierung und Verifizierung	52
4.1.5 Karyotyp-Analyse	54
4.2 Generation von Mausmutanten	55
4.2.1 Injektion von ES-Zellen	57
4.2.2 Embryonentransfer	57
4.2.3 Testen von Chimären	57
4.2.4 Etablieren von Mutantenlinien	59
4.2.5 Verifizierung der Nullmutanten	60
4.3 Analyse des Phänotyps	62
4.3.1 Beobachtung	63
4.3.2 Endokrinologie	63
4.3.3 Serumanalyse	65
4.3.4 Morphologie	67

4.3.5 SST-Systemkomponenten.....	68
4.3.6 Gehirnmotabolismus	69
4.3.7 Verhaltensanalyse	70
5.0 DISKUSSION.....	75
5.1 Bewertung der Mutationsanalyse in einem komplexen System	75
5.2 Selektive Analyse.....	78
5.2.1 Wachstumshormon	78
5.2.1.1 Bewertung der dreifach erhöhten GH-Werte	78
5.2.2 Glucocorticoide.....	82
5.2.2.1 Bewertung der dreifach erhöhten Corticosteron-Werte	82
5.3 Systematische Analyse	85
5.3.1 Serum.....	86
5.3.1.1 Quantitative Veränderungen	86
5.3.2 Verhalten.....	87
5.3.2.1 Bewertung der gestörten motorischen Lernfähigkeit.....	87
5.4 Perspektiven	94
6.0 ZUSAMMENFASSUNG / Abstract (English Version).....	96/97
7.0 ANHANG.....	98
7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	99
7.2 Abkürzungsverzeichnis	100
7.3. Literaturverzeichnis	102
7.4 Lebenslauf.....	entfällt

1.0 EINLEITUNG

1.1 Genetische Analyse der Maus

Molekulargenetische Untersuchungsmethoden kamen ursprünglich bei einzelligen Organismen zur Anwendung und wurden seitdem erweitert für Fragestellungen in multizellulären, eukaryontischen Versuchsobjekten.

Der Erzeugung von Veränderungen des Erbmaterials, d.h. Mutationen, kommt in funktionsorientierten genetischen Analysen eine entscheidende Bedeutung zu [1].

Grundlegende Arbeiten Ende 1970 und Anfang 1980 an *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* führten hin zur gezielten genetischen Manipulation der Maus.

Hier zwei Paradebeispiele:

Orr-Weaver et al. führten in *Saccharomyces* eine Insertioninaktivierung basierend auf homologer Rekombination durch [2]. Rubin und Spradling gelang die gezielte Keimbahntransformation über P-Elemente in *Drosophila* [3]. Damit war die prinzipielle Richtung vorgegeben, die Erzeugung von Nullmutationen in der Keimbahn von Säugern; weitere Fortschritte in der Kultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) ermöglichten dann die erste *Knockout*-Maus [4, 5].

Diese Art der Genmanipulation erzeugt genau definierte Mutationen im Gesamtorganismus. Die Beobachtung des resultierenden Phänotyps, also funktioneller Aberrationen, erlaubt so Rückschlüsse auf die Genfunktion. Neuere *Gene Targeting*-Techniken beinhalten mittlerweile die konditionelle und/oder induzierbare Mutagenese und ermöglichen Genanalysen in einem gewebspezifischen und entwicklungsabhängigen Kontext [6].

Nach dieser kurzen Einführung in die Entwicklung des *Gene Targeting* möchte ich nun die Komponenten vorstellen, die Ziel meiner genetischen Analyse sind.

1.2 Das Somatostatin-System

1.2.1 Somatostatin

1.2.1.1. Entdeckung

Biologische Aktivität in Verbindung mit Somatostatin wurde zum ersten Mal 1968 gezeigt. Krulich et al. identifizierten stimulierende wie auch inhibierende Wirkungen von Hypothalamus-Extrakten für die Freisetzung von Wachstumshormon [7].

Ein Inhibitor paßte allerdings nicht in das damalige Modell, das nur Wachstumshormon aktivierende Faktoren im Hypothalamus vorsah und deshalb kritisch betrachtet wurde [8].

Ein Jahr später belegten Hellman und Lernmark eine die Insulinsekretion hemmende Substanz im Pankreas, also einen völlig anderen Effekt [9].

Diese beiden unabhängigen Beobachtungen beruhen auf einer gemeinsamen Komponente, dem Somatostatin-Peptid.

Mit seiner chemischen Charakterisierung und der Wiederentdeckung des durch Krulich beschriebenen inhibitorischen Einflusses legte die Arbeitsgruppe um Roger Guillemin 1973 [10] den Grundstein für eine ganze Reihe von biochemischen Untersuchungen, die inzwischen so verschiedene, grundlegende biologische Prozesse wie Entwicklung, Stoffwechsel und Verhalten berühren.

Diese funktionelle Vielfalt basiert auf der Interaktion der strukturellen Komponenten des Somatostatin-Systems, deren Beschreibung sich anschließt.

1.2.1.2 Genkonservierung

Immunologische Nachweise für Somatostatin in verschiedenen Organismen belegen seinen frühen evolutionären Ursprung. *Tetrahymena pyriformis*, ein Protozoe, *Ciona intestinalis*, ein Deuterostomier und *Nicotiana tabacum*, die Tabakpflanze, sind Beispiele, die das Vorkommen von strukturell verwandten Molekülen im Tier- und Pflanzenreich dokumentieren [11-13].

Somatostatin ist ein Sammelbegriff für phylogenetisch ursprüngliche Peptide, die durch eine Multigenfamilie kodiert werden. Ihre Gene sind uneinheitlich in verschiedenen Organismen repräsentiert (siehe Tab. 1).

Präproproteine stellen die primären Genprodukte dar, aus denen nach Prozessierung sekundär unterschiedliche Peptide entstehen (siehe 1.2.1.4 Prozessierung).

Physiologische Effekte lassen sich bisher auf zwei biologisch aktive Peptidtypen eingrenzen. Aus Somatostatin–Polypeptidgenen entstehen aus mono- oder im weitesten Sinn polycistronischen mRNAs die grundlegenden Peptidvarianten SST14 bzw. SST28. Sie gehen aus jeweils getrennten (z.B. bei Telostiern) oder einem gemeinsamen Vorläufergen/Protein (bei Mammaliern) hervor.

Organismen	Anzahl der Gene	Vorläuferpeptide	Biologisch aktive Peptide
<i>Mammalia</i>	SST- I (Somatostatin) CST (Cortistatin)	PräProSST- I PräProCST	SST14 + SST28 CST14 + CST29 ⁽¹⁾
<i>Amphibia</i>	SST- I SST- 2 ⁽²⁾	PräProSST- I PräProSST-II	SST14 + SST28 SST14 ⁽³⁾
<i>Pisces</i>	SST- I SST-II ⁽⁴⁾	PräProSST- I PräProSST-II	SST14 SST22, SST25 bzw. SST28 ⁽⁵⁾

Tab. 1 Beispiele der Somatostatin-Multigenfamilie und ihrer Peptidprodukte

- Das Cortistatin-Gen wird den Somatostatinen zugerechnet; CST29 ist bisher nicht als Produkt belegt, Daten beziehen sich auf *Rattus*.
- Das zweite Somatostatin-Gen in Amphibien ist sehr wahrscheinlich nicht gleichzusetzen mit dem zweiten Gen bei Fischen (SST-II). Es könnte sich um eine Cortistatin-Variante oder um ein völlig neues Gen handeln.
- Das SST14 Peptid des SST-2 Gens ist nicht identisch mit dem Peptidprodukt des SST-I Gens
- SST-II bezeichnet eine Gruppe von Genen, die innerhalb der Fische entweder SST22, 25 oder 28 Peptide kodieren.
- Beim Katzenfisch resultiert aus dem SST-II Gen das SST22 Peptid. Aufgrund der geringen Sequenzenübereinstimmung ist es allerdings fraglich, ob dieses Gen zur Gruppe der SST-II Gene gehört. SST25 (Lachs), SST28 (Anglerfisch) zeigen dagegen eine ausgedehnte Homologie.

Daten zusammengestellt nach Conlon et al. (1997) [14]

Die unterschiedliche Art der Kodierung und Sequenzvariationen innerhalb der Somatostatin-Peptidfamilie ergeben bisher ein heterogenes Bild der zugrundeliegenden evolutionären Vorgänge [15]. Auf sie soll in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Es gibt mindestens zwei unterschiedlich schnell evolvierende Somatostatin-Gene in jeder Vertebraten-Klasse. Ihr Ursprung liegt wahrscheinlich in einer Genduplikation mit dem Auftreten der Chordata. Die exakte Richtung des evolutionären Geschehens ist hingegen nicht bekannt und damit auch nicht die genaue Anzahl aller zur Somatostatin-Familie gehörenden Gene [14]. Indizien für diese Annahme basieren z.T. auf der Entdeckung des Cortistatin–Gens in Säugern und zweier unterschiedlicher SST14-Gene bei Amphibien [16, 17].

Dies hat Konsequenzen für die Analyse des Somatostatin-Systems, worauf in gesonderten Punkten eingegangen wird (siehe Einleitung: 1.2.3 Systemdefinition und Diskussion: 5.1 Bewertung der Mutationsanalyse in einem komplexen System).

1.2.1.3 Genregulation

Innerhalb der Säuger erscheint das Somatostatin-System sehr einheitlich. Somatostatin ist extrem konserviert im Bereich der Peptide SST14 und SST28; zusätzlich ist ein hoher Grad an Übereinstimmung für Prä- und Propeptideabschnitte gegeben. Am besten untersucht ist die Genstruktur bei der Ratte, deren Details repräsentativ für Säuger angegeben werden (siehe Abb. 1).

Die Transkriptionseinheit besteht aus zwei Exons mit 238 und 367 Basenpaaren, die durch ein Intron von 621 Basenpaaren unterbrochen sind. Der offene Leserahmen beinhaltet 348 bp der Exons und kodiert das Somatostatin-Präpropeptid mit 116 Aminosäuren Länge.

Genregulatorische Elemente sind eine CAAT-Box 92 bp und eine TATA-Boxvariante 26 bp vor dem Transkriptionsstart. Sie bilden mit dem CRE-Enhancer-Motiv (*cyclic AMP response element*, 5'TGACGTCA-3'-Palindrom), das sie flankieren, den eigentlichen Promotor [18, 19].

Zusätzlich sind weitere in cis wirkende Sequenzen bekannt. Sie werden mit einer basalen und/oder regulierten Genexpression in spezifischen Zellen in Verbindung gebracht. Dazu gehören z.B. der in endokrinen D-Zellen des Pankreas aktive Enhancer SMS-UE (*Somatostatin gene upstream enhancer element*). Er beginnt 78 bp vor dem Transkriptionsstart des SST-Genes und reguliert synergistisch mit CRE die selektive Expression in der D-Zelllinie im Pankreas [20]. Andere regulatorische Elemente mit TATA-Motiv befinden sich in 5'-Richtung (T1/2/3) [21].

Im selben Zelltyp regeln zusätzlich proximale Silencer-Sequenzen (PS1 und PS2) 250 bzw. 120 bp vor dem Transkriptionsstart die SST-Produktion; ferner gibt es Hinweise auf weitere distale negative Regulatoren [22].

Potentielle Z-DNA-Abschnitte rahmen das Gen 628 bp in 5'- und 2 kb in 3'-Richtung ein (vom Transkriptionsstart bzw. von der PolyA-Stelle gemessen). Diese linksgängigen DNA-Konformationen beruhen auf der alternierenden Folge von Purin und Pyrimidin-Nucleotiden (GpT). Für sie wird ebenfalls genregulatorische Aktivität vermutet [23].

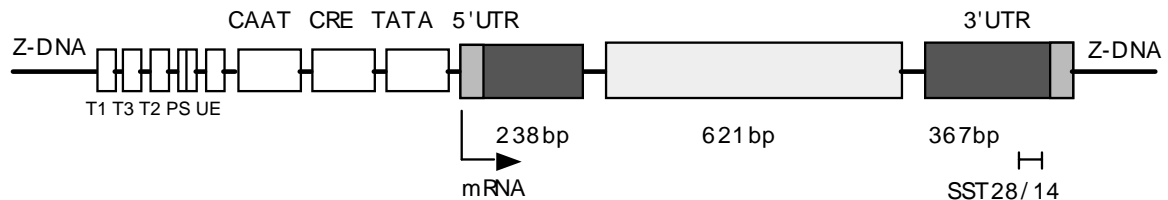


Abb. 1

Schematische Darstellung der Somatostatin-Genstruktur (graue Boxen) und Verteilung *cis*-regulatorischer Elemente (weiße Boxen) basierend auf Patel (1992), Schwartz und Vallejo (1998) und Goudet et al. (1999) [21, 24, 25]. UTR: nichttranslationierter Bereich, weitere Erklärungen siehe Text.

Die Ansteuerung des Somatostatin-Gens gilt als Prototyp für die Regulation der Transkription durch den cAMP/CREB-Signalweg.

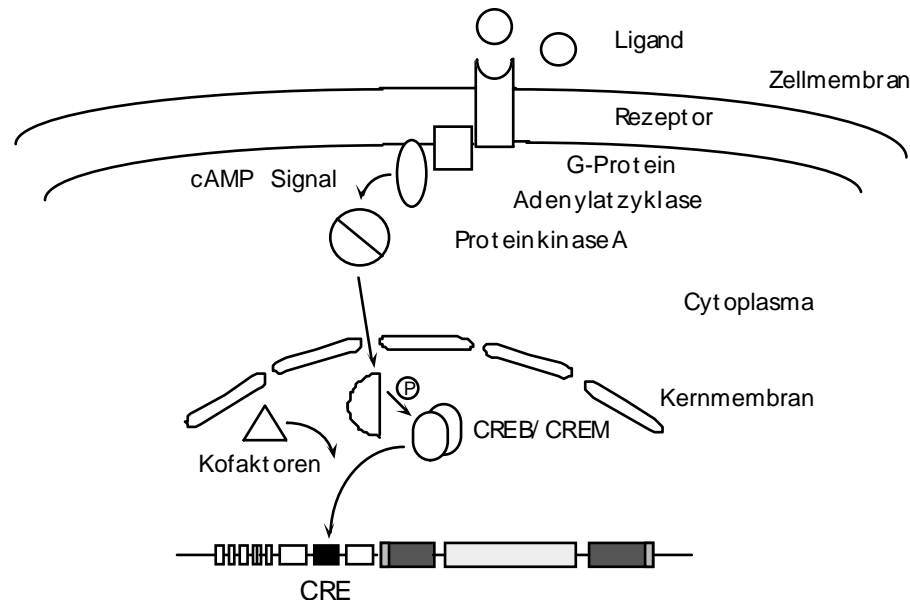
Das erste Indiz für die Transkriptionskontrolle des Somatostatin-Gens durch den sekundären Botenstoff (cAMP) lieferten Montminy et al.. Nach Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin reagierten primäre Diencephalon-Kulturen und eine transgene Zelllinie mit verstärkter Somatostatin-mRNA-Synthese [26].

Deletionsanalysen von Fusionsproteinen bestehend aus putativen SST-Kontrollsequenzen und CAT-Reportergenen charakterisierten das CRE-Palindrom als die Zielsequenz für das ursprünglich durch cAMP gegebene Signal [19].

CRE-Sequenzen sind cAMP regulierte Enhancer. Basierend auf der CRE-Konsensussequenz gelang es mittels sequenzabhängiger Affinitätschromatographie, das mit ihr in Wechselwirkung tretende Protein (CREB = CRE *binding protein*) zu identifizieren [27]. Proteinkinase (PK-A) defiziente Zelllinien zeigten sich insensitiv für cAMP Signale. Dies legte einen Phosphorylierungsschritt im CREB-Protein oder in einem anderen Faktor nahe. Kotransfektionsexperimente bewiesen dann die Wechselwirkung von Proteinkinase-A, CREB und CRE im Zusammenhang mit der cAMP-Antwort [28].

Damit sind die grundlegenden Komponenten für die cAMP-regulierte Transkription des Somatostatin-Gens vorgestellt.

Abb. 2 Schematische Darstellung der durch cAMP/CREB induzierten Transkription des Somatostatin-Gens nach Della Fazia (1997) [29]. Ausgangspunkt bildet die Ligand/Rezeptor vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase, Endpunkt die Promotoraktivierung mittels CREB.



Das generelle Modell für die Signaltransduktion zum Somatostatin-Promotor und dessen Aktivierung beinhaltet folgende Abläufe: Ein cAMP-Signal induziert die Ablösung der katalytischen Untereinheiten des Proteinkinase-A- Holoenzym. Diese gelangen in den Nucleus und treffen dort auf den Somatostatin-Transaktivator (CREB), dessen N-terminaler Serin-Baustein133 als Phosphoakzeptor fungiert. Die Phosphorylierungsdomäne in CREB ist auch Ziel anderer Kinasen darunter z.B. Proteinkinase-C, welche zur CREB-Dimerisierung beiträgt (*Leuzin-Zipper*) und damit seine Affinität zur CRE-Sequenz erhöht. Weitere Module des CREB-Proteins interagieren mit Transkriptionsfaktoren, wie z.B. dem TATA-Box-bindenden Protein TFIID und anderen Transkriptionsaktivierungsfaktoren (TAFs), um dann als Komplex in Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase II zu treten [30, 31].

Ein grundlegendes konzeptionelles Problem bleibt allerdings bestehen. Wie wird die Variabilität in der Steuerung des Somatostatin-Gens durch ein einzelnes DNA-Element (CRE) erreicht? Zur Klärung dieser Frage müssen zusätzliche Komponenten einbezogen werden. Dazu gehören weitere Promotorelemente (siehe oben) und Proteine, die das Regulationsspektrum erweitern.

- So können innerhalb der CREB-Molekülfamilie Heterodimere zur Interaktion mit der CRE-Sequenz gebildet werden [32]
- Kofaktoren wie CBP (*CREB binding protein*), CREM (*CRE modulator*) und ICER (*inducible cAMP early repressor*) greifen steuernd ein [29, 33]
- Zellspezifische Proteine sind ebenfalls beteiligt, z.B. STF1 (*Somatostatin Transcriptionfactor-1*) [34]
- Wechselwirkungen mit weiteren Signaltransduktionswegen bestehen (z.B. Einflüsse auf Proteinkinase-C, Bindung von Jun/Fos-Dimeren an das CRE-Palindrom) [35, 36]

Zur Zeit ist unklar, ob Glucocorticoide, Wachstumshormon, Cytokine oder etwa Calciumionen die Somatostatin-Genexpression ausschließlich CRE-vermittelt aktivieren, oder ob andere cAMP-unabhängige Signalwege über unbekannt Promotorinteraktion steuernd eingreifen [33].

Abgesehen von der differentiellen Expressierung des Somatostatin-Gens ergeben sich Variationsmöglichkeiten durch die alternative Prozessierung des Genproduktes, einem Präpropeptid.

1.2.1.4 Prozessierung

Bei Eukaryonten steuern Kaskaden modifizierender Prozesse den Aktivitätszustand von Peptiden und Proteinen [37-39].

Ein grundlegender Mechanismus für sekretorisch-regulatorische Faktoren - darunter Polypeptidhormone und Neuropeptide - sind endoproteolytische Reaktionen [40, 41].

Somatostatin gehört zu der genannten Stoffklasse, deren biologisch aktive Komponenten aus höher-molekularer Vorläufern resultieren.



Abb. 3 Das Somatostatin-Präpropeptid

Signalsequenz, Prohormon und Somatostatin-Peptide 14 und 28 sind hervorgehoben. Die zyklische Sekundärstruktur (Disulfidbrücke) ist Teil beider Peptidformen, die durch unterschiedliche Prozessierungsschritte entstehen (Peptidtermini sind markiert).

Die Umwandlung der Protein/Peptid- Vorstufen steht im unmittelbaren Zusammenhang mit dem exozytotischen Transportweg eukaryontischer Zellen. Zwei wesentliche Faktoren bilden hierbei ihre Kompartimentierung und Enzymausstattung [42].

Das Präprohormon wird am rauhen endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert und in das ER-Lumen sezerniert. Dort wird die N-terminale Zielsequenz abgetrennt und das verbleibende Prohormon mittels *budding coated vesicles* durch den Golgi zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert. *Clatrin coated-* oder *Non Clatrin coated-*Vesikel übernehmen dann die Verteilung zum regulierten bzw. konstitutiven Transportweg. Diese Exozytosen liefern letztendlich sekretorische oder membranständige Peptide bzw. Proteine zum jeweiligen Zielort [43].

Ihre Umwandlung in bioaktive Formen erfolgt in Abhängigkeit der differentiellen Enzymausstattung der verschiedenen Golgi-Komponenten unterschiedlicher Zellen.

Bisher sind sieben prohormon-konvertierende Enzyme (PCs) bekannt, die als Kandidaten für die Prozessierung von Somatostatin in Betracht kommen. Es handelt sich hierbei um Furin, PC1/PC3, PC2, PACE-4, PC4, PC5/PC6 und PC7/8. Ihnen gemeinsam ist eine Subtilisin ähnliche katalytische Domäne. Hierauf basierend erfolgte die Einordnung dieser Ca^{2+} -regulierten Serin-Proteasen in die Subtilisin-Familie von Konvertasen [44, 45].

Sie erkennen Schnittstellen im Peptidvorläufer anhand spezieller Sequenzmotive, z.B. einzelner und/oder gepaarter basischer Aminosäuren, wobei Sekundärstrukturen zusätzlich die Prozessivität beeinflussen [46-48]. Eine strikte Substratspezifität des jeweiligen Enzyms existiert jedoch nur eingeschränkt.

Im Säuger-Somatostatin-Prohormon finden sich C-terminal eine dibasische (Arg-Lys) und eine monobasische (Lys) und N-terminal eine weitere monobasische (Arg) Restriktionsstelle. Produkte der Prozessierung sind sechs zum Teil überlappende Peptidformen. Aus dem 10 kDa ProSomatostatin mit 92 Aminosäuren werden zwei Propeptide (63 bzw. 76 AS), ein N-terminales Peptid mit der Bezeichnung Antrin (10AS) sowie SST28 (28 AS) und zwei seiner Spaltungsprodukte, eine SST28-Variante (12 AS) und SST14 (14 AS) gebildet (siehe Abb. 5) [49, 50].

Die zyklische Aminosäureabfolge des SST14 ist N-terminal verlängert in SST28 (28 AS) enthalten und definiert Somatostatin strukturell und funktionell. Alle anderen abgeleiteten Peptide, abgesehen vom Prohormon, besitzen diese Sequenz nicht. Damit erklärt sich ihre Unfähigkeit, mit den bekannten Somatostatin-Rezeptoren zu interagieren. Ihnen wird deshalb bisher keine biologische Bedeutung zugeschrieben [24].

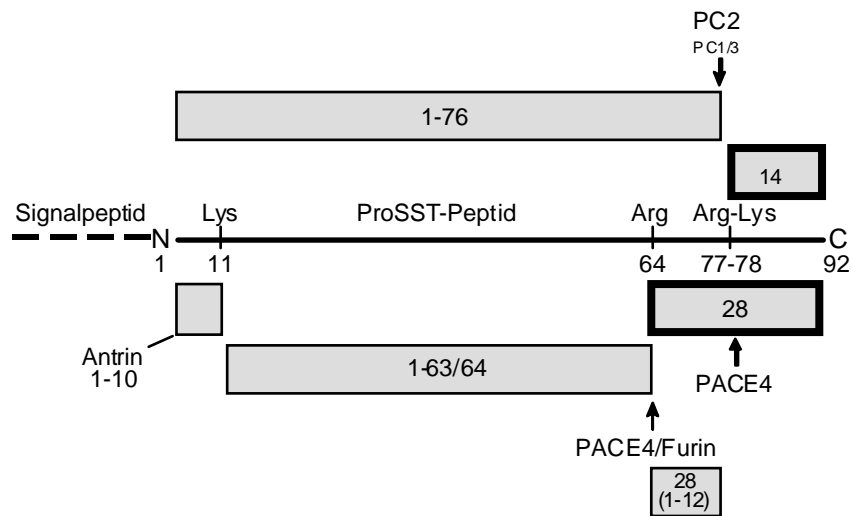


Abb. 4 Die Prozessierung des Somatostatin-Vorläufermoleküls

Die Positionen von Aminosäuren, welche die Endoproteolyse dirigieren, sind im zentralen Bereich dargestellt. Graue Blöcke geben die Peptidprodukte an. SST14 und SST28 sind aufgrund ihrer bewiesenen biologischen Funktion hervorgehoben. Pfeile verweisen auf die Beteiligung von Enzymen an der differentiellen Prozessierung.

Die beiden eigentlichen Somatostatin-Peptide, SST14 und SST28, werden differentiell prozessiert und zeigen gewebsspezifische Verteilungen.

Im Hypothalamus und cerebralen Cortex überwiegt SST14 mit 4:1; es dominiert fast ausschließlich im Magen, den Inselzellen des Pankreas, enterischen Nervenzellen und der Retina, während SST28 in intestinalen Mukosazellen überwiegt und im Gehirn 20-30% der SST-positiven Immunreaktion ausmacht [51].

Bisher konnte allerdings nur für einige Mitglieder der Subtilisin-Familie eine Korrelation zum Prosomatostatin hergestellt werden.

PC4, PC5/6 und PC7/8 sind in puncto SST noch unzureichend untersucht. PACE-4 und eingeschränkt das Subtilisin Furin, sind für die Prozessierung im konstitutiv sekretorischen Transport überwiegend an der Bildung von SST28 beteiligt. PACE-4 akzeptiert darüber hinaus SST28 als Substrat für die Produktion von SST14. PC1/3-Aktivität trägt ebenfalls zu seiner Herstellung bei [52, 53].

Im regulierten Transport übernehmen die Konvertasen PC1/3 und besonders PC2 die SST14-Produktion direkt vom Propeptid aus, ohne SST28 als Substrat zu verwenden [54]. Die Bedeutung von PC2 für die SST14-Produktion konnte zusätzlich durch eine entsprechende enzymdefiziente Mausmutante unterstrichen werden. In deren Pankreas

fehlt es nun völlig, während SST28 dagegen akkumuliert. Seine Prozessierung ist nicht behindert [55]. SST28 wird in regulierten Zellen ebenfalls durch Furin und PACE-4 gebildet. Für Zellen, die sowohl zum regulierten als auch konstitutiven Transport fähig sind, gibt es eine deutliche Trennung zwischen SST14 und SST28. Ihre granulären Vesikel enthalten jeweils nur eine Somatostatin-Variante [24].

Zusammenfassend lassen sich folgende generelle Tendenzen aufzeigen:

SST28 fungiert nur eingeschränkt als Vorstufe für die Bildung von SST14 [54]. Beide SST-Peptide werden zumeist unabhängig voneinander aus dem längeren Vorläufermolekül in mindestens zwei verschiedenen Verteilungs- und Prozessierungswegen gebildet [56].

Die Spezifität der Spaltungsreaktion wird entscheidend durch die Kolokalisation von Enzym und Edukt erreicht. Zusätzlich unterliegen die Endoproteasen einer Regulation, z.B. durch kompetitive Hemmung unprozessierter Enzymvorstufen, ihre eigene differentielle Prozessierung oder das Auftreten von Isoformen der Enzyme [57].

Lokalisation und Aktivierungszustand der genannten Subtilisine bedingen z.T. in kombinatorischer Weise die unterschiedlichen Anteile der Somatostatin-Peptide verschiedener Zelltypen.

Die differentielle Ausstattung dieser Zellen mit Somatostatin-Rezeptoren entscheidet dann weiter über die peptidbedingten physiologischen Reaktionen (siehe 1.2.2 Somatostatin-Rezeptoren).

1.2.2 Somatostatin–Rezeptoren

1.2.2.1 Entdeckung

1978 demonstrierten Schonbrunn und Tashjian als erste hochaffine Bindungsstellen für Somatostatin an einer klonalen Zelllinie der Hypophyse [58].

Damit ließ sich die Hemmung der Wachstumshormon-Freisetzung dieser Drüse auf eine Ligand-Rezeptor-Interaktion zurückführen.

Weiterführende kompetitive Bindungsstudien zwischen jodierten Somatostatin-Molekülen (z.B. 125-Tyr11-SRIF14) und anderen Analoga implizierten zwei verschiedene Arten von Bindungsstellen. Im Cortex, dem Hippocampus und Striatum verdrängte Octreotid (ein SST-Analog) markiertes SST biphasisch, während dies z.B. in der Hirnanhangdrüse monophasisch geschah [59, 60]. Zwei heterogene Rezeptorpopulationen schienen also zu existieren.

Die Klonierung der Somatostatin-Rezeptoren lieferte dann ein genaueres Bild als durch pharmakologische Studien angenommen. Zuerst gelang dies Yamada et al.. Sie nahmen zu Recht an, daß SST-Akzeptoren zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Degenerierte Primer lieferten dann aus Pankreas mRNA nach reverser Transkription und cDNA–Screening zwei Klone, von denen einer nach Transfektion in eine Zelllinie spezifisch mit Somatostatin interagierte [61].

Heute sind insgesamt fünf Somatostatin-Rezeptoren in verschiedenen Spezies entdeckt [62-66].

Somatostatin–Rezeptoren erfüllen zwei wesentliche Aufgaben. Sie sind Bindungsstellen der Peptide SST14 und SST28, nachdem deren Ausschüttung hormonal oder neuronal induziert wurde. Sie konservieren das ansonsten relativ kurzlebige Peptidsignal [67] und kodieren die funktionelle Antwort auf Somatostatin in entwicklungs- und zellspezifischer Weise durch ihre differentielle Expression und der an sie gekoppelten Signaltransduktions-Mechanismen.

Die Steuerung der Expression der Somatostatin–Rezeptoren bildet somit einen wichtigen Ansatzpunkt für ein Verständnis der Somatostatin zugrundeliegenden Effekte.

1.2.2.2 Genregulation

Generell gilt: Im Promotorbereich der bekannten Somatostatin-Rezeptoren befinden sich GC-reiche Abschnitte, TATA- und CAAT-Boxen sind jedoch nicht vorhanden. Im allgemeinen verbindet man mit dieser Struktur Promotoren von *Housekeeping*-Genen, die konstitutiv exprimiert werden. Andere reguliert transkribierte G-Protein-gekoppelte Rezeptorgene besitzen ähnliche Charakteristika, z.B. in den Promotoren des Serotonin 5-HT₂ oder des beta₁ adrenergen Rezeptors [68, 69].

Die Promotorstruktur des SSTR2 ist am besten untersucht und verdeutlicht ein differenzierteres Bild der Transkriptionskontrolle als bisher für SSTRs angenommen. Wie auch bei anderen Somatostatin-Rezeptoren gezeigt, können sich aus ihrer Promotororganisation multiple Startpunkte für die Transkription ergeben und bedingen mRNAs mit unterschiedlichen 5'-Enden. Primer-Extension- und RNase-Protektionsanalyse weisen auf zwei alternative Transkriptionsstarts in SSTR2 hin [70]. Sequenzmotive für die Wechselwirkung mit den Faktoren AP1, AP2, AP3 und GCF sind in Übereinstimmung mit anderen SST-Rezeptoren vorhanden.

Es bestehen jedoch auch weitreichende Unterschiede in der Promotorsteuerung und Struktur. So ermöglicht ein nicht näher definierter 5'-Abschnitt 17beta-Estradiol-gesteuerte Transkription des Rezeptors [70]. In Verbindung mit den Transkriptionsstarts stehen eine E-Box und eine T-reiche Sequenz als Orte der Transkriptionsinitiation. Sie alleine bedingen eine starke Promotoraktivität in verschiedenen transfizierten Zelllinien. Durch Screening einer Expressionsbibliothek mit dem Initiationsabschnitt wurde ein E-Box-spezifischer Faktor, SEF-2 identifiziert. Seine hohe Expressionsrate im Gehirn verweist auf seine spezifische Funktion für die SSTR2-Transkription in diesem Organ. Neben der T-Sequenz, die wahrscheinlich einen strukturellen Einfluß ausübt, wurde zusätzlich ein weiteres Bindungsmotiv für das Initiatorprotein YY1 entdeckt, welches nicht unmittelbar für die SEF-2-Aktivität erforderlich ist [71].

Introns in der 5'-nichttranslationierten Region von SSTR3 deuteten bereits eine womöglich komplexe Promotorstruktur an. Für SSTR2 ist dies jetzt gezeigt durch eine auf ~50 kb ausgedehnte Analyse [72]. 5' außerhalb dreier Exons, getrennt durch zwei ~25 kb Introns, liegt jeweils ein spezifisch regulierter Promotor [73].

Charakteristische mRNAs dieser Promotoren sind differentiell in verschiedenen Organen lokalisiert. DNA-Sequenzen für die Bindung von YY1, Glucocorticoiden (GRE), cAMP (CRE) und Estradiol (ERE) sind unterschiedlich in den Promotorregionen verteilt.

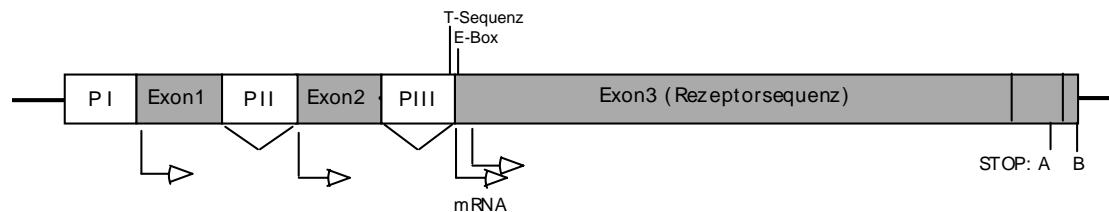


Abb. 5 Promotor- und Genstruktur des Somatostatin-Rezeptors 2 (SSTR2, Maus) nach Kraus et al. (1998) [72]. Promotorbereiche umfassen PI-PIII und einen Teil des Exons 3 (E-Box). PII/PIII sind promotorhaltige Introns (gekennzeichnet durch Klammern). Sie besitzen in *cis*-wirkende Steuerelemente (siehe Text). Die Transkriptionsstartpunkte der Exons sind durch Pfeile hervorgehoben. Die graue Box mit Stoppkodon A stellt ein alternatives Intron dar; es kann herausgespleißt werden, dadurch ergeben sich Rezeptoren mit unterschiedlich langen C-Termini (SSTR2A, Stoppkodon A und SSTR2B, gespleißt, Stoppkodon B).

Die alternative Nutzung verschiedener Promotoren verdeutlicht in diesem Fall die selektive Wechselwirkung spezifischer DNA-Elemente und ihrer korrespondierenden Proteinfaktoren für eine zellspezifische Somatostatin-Rezeptorexpression. Es gilt jetzt zu überprüfen, inwieweit ähnlich modulartige Promotoren in anderen Spezies und deren SSTRs vorliegen [74]. Damit würde eine molekulare Basis geschaffen, um Einflüsse auf die Rezeptortranskription durch Moleküle wie TSH (*thyroid stimulating hormone*) oder EGF (*epidermal growth factor*) weiter aufzuschlüsseln.

1.2.2.3 Genkonservierung

Die fünf bisher identifizierten Rezeptor-Subtypen (SSTR1-5) bilden eine eigenständige Familie G-Protein-gekoppelter, membranständiger Glykoproteine.

Sequenzvergleiche grenzen SSTRs von anderen membranständigen Rezeptoren ab und definieren zwei Somatostatin-Rezeptorklassen (SSTR1/4 und SSTR2/3/5)[75]. Es besteht ~30% Identität zur Aminosäuresequenz der ihnen nahe stehenden Opioidrezeptoren; untereinander variieren die verschiedenen Somatostatin-Subtypen zwischen 45 und 61% Identität. Stellt man die jeweiligen Subtypen verschiedener Spezies einander gegenüber, wird das Ausmaß ihrer Konserviertheit deutlich. Für Ratten und Mäuse ergeben sich Identitätswerte zwischen 95 und 98% [76].

Rezeptor 1 scheint am stärksten zwischen unterschiedlichen Spezies konserviert zu sein. So stimmt die humane Form zu 97% mit dem der Ratte und zu 99% mit dem der Maus überein; Rezeptor 5 hingegen ist divergenter im Speziesvergleich. Er zeigt hier nur 81 bzw. 85% Übereinstimmung [77, 78].

```

SSR1_HUMAN      MFPNGTASSPSSSSPSPGSCGEGGSRGPGGAGAADGMEEPGRNASQNGTLSEGGQSAIL
SSR1_MOUSE      MFPNGTASSPSSSSPSPGSCGEGACSRGPGSGAADGMEEPGRNASQNGTLSEGGQSAIL
SSR1_RAT        MFPNGTASPSTSSPSSSSPGGCGEGVCSRGPGGAGAADGMEEPGRNSSQNGTLSEGGQSAIL
SSR2_HUMAN      -----MDMADEPLN-GSHTWLSIPFDLNGSVVSTNTSNQTEPYDLTSSNAV
SSR2_MOUSE      -----MEMSSEQLN-GSQVWVSSPFDLNGSLGPSNGSNQTEPYDMTSSNAV
SSR2_RAT        -----MELTSEQFN-GSQVWIPSPFDLNGSLGPSNGSNQTEPYDMTSSNAV
SSR3_HUMAN      -----MDMLHPPSSVSTTSEPENASSAWPPDATLGNVSAGPSPAGLAVSGVL
SSR3_MOUSE      -----MATVTYPSSEPMTLDPGNTSSTWPLDITTLGNTSAGASLTGLAVSGIL
SSR3_RAT        -----MAAVTYPSSVPTLDPGNASSAWPLDITSLGNASAGTSLAGLAVSGIL
SSR4_HUMAN      -----MSAPSTLPPGGEEGLGTAWPSAANASSAPAEAEAEAVAGPGD-ARAAGMVA
SSR4_MOUSE      -----MNPATLLRGVED---TTWTPGINASWAPEQEEEDAMGSDG--TGTAGMVT
SSR4_RAT        -----MNTPATLPLGGED---TTWTPGINASWAPDEEEDAVRSDG--TGTAGMVT
SSR5_HUMAN      -----MEPLFPASTPSWNASSPGAASGGGDNRTLVGPAPSAGARAVL
SSR5_MOUSE      -----MEPLSLASTPSWNAS---AASSGSHNWSLVDVPSPMGARAVL
SSR5_RAT        -----MEPLSLASTPSWNAS---AASSGNHNWSLVGSASPMGARAVL
    
```

```

                                TM1                                TM2
SSR1_HUMAN      ISFIYSVVCLVGLCGNSMVIYVILRYAKMKTATNIYILNLAIADELMLLSVPFLVTSTLL
SSR1_MOUSE      ISFIYSVVCLVGLCGNSMVIYVILRYAKMKTATNIYILNLAIADELMLLSVPFLVTSTLL
SSR1_RAT        ISFIYSVVCLVGLCGNSMVIYVILRYAKMKTATNIYILNLAIADELMLLSVPFLVTSTLL
SSR2_HUMAN      LTFIYFVVCIIGLCGNTLVIYVILRYAKMKTITNIYILNLAIADELFMLGLPFLAMQVAL
SSR2_MOUSE      LTFIYFVVCVVGLCGNTLVIYVILRYAKMKTITNIYILNLAIADELFMLGLPFLAMQVAL
SSR2_RAT        LTFIYFVVCVVGLCGNTLVIYVILRYAKMKTITNIYILNLAIADELFMLGLPFLAMQVAL
SSR3_HUMAN      IPLVYLVCVGLLGNLSLVIYVILRHTASPSVTNVYILNLAIADELFMLGLPFLAAQNAL
SSR3_MOUSE      ISLVYLVCVGLLGNLSLVIYVILRHTSSPSVTSVYILNLAIADELFMLGLPFLAAQNAL
SSR3_RAT        ISLVYLVCVGLLGNLSLVIYVILRHTSSPSVTSVYILNLAIADELFMLGLPFLAAQNAL
SSR4_HUMAN      IQCIYALVCLVGLVGNALVIFVILRYAKMKTATNIYLLNLAIADELFMLSVPFVASSAAL
SSR4_MOUSE      IQCIYALVCLVGLVGNALVIFVILRYAKMKTATNIYLLNLAIADELFMLSVPFVRSAAAL
SSR4_RAT        IQCIYALVCLVGLVGNALVIFVILRYAKMKTATNIYLLNLAIADELFMLSVPFVASAAL
SSR5_HUMAN      VPVLYLLVCAAGLGGNTLVIYVILRYAKMKTITNVYILNLAIADELFMLGLPFLATQNAV
SSR5_MOUSE      VPVLYLLVCTVGLGGNTLVIYVILRYAKMKTITNVYILNLAIADELFMLGLPFLATQNAV
SSR5_RAT        VPVLYLLVCTVGLSGNTLVIYVILRHAKMKTITNVYILNLAIADELFMLGLPFLATQNAV
    
```

```

                                TM3
SSR1_HUMAN      R-HWPFGALLCRLVLSVDAVNMF'TSIYCLTVLSVDRYVAVVHPIKAARYRRPTVAKVVNL
SSR1_MOUSE      R-HWPFGALLCRLVLSVDAVNMF'TSIYCLTVLSVDRYVAVVHPIKAARYRRPTVAKVVNL
SSR1_RAT        R-HWPFGALLCRLVLSVDAVNMF'TSIYCLTVLSVDRYVAVVHPIKAARYRRPTVAKVVNL
SSR2_HUMAN      V-HWPFGKAI CRVVM'TVDGINQF'TSIFCLTVMSIDRYLAVVHPIKSAKRRRPTAKMITM
SSR2_MOUSE      V-HWPFGKAI CRVVM'TVDGINQF'TSIFCLTVMSIDRYLAVVHPIKSAKRRRPTAKMINV
SSR2_RAT        V-HWPFGKAI CRVVM'TVDGINQF'TSIFCLTVMSIDRYLAVVHPIKSAKRRRPTAKMINV
SSR3_HUMAN      S-YWPFGSLMCRLVMAVDGINQF'TSIFCLTVMSVDRYLAVVHPTRSARWRTPAVARTVSA
SSR3_MOUSE      S-YWPFGSLMCRLVMAVDGINQF'TSIFCLTVMSVDRYLAVVHPTRSARWRTPAVARTVSR
SSR3_RAT        S-YWPFGSLMCRLVMAVDGINQF'TSIFCLTVMSVDRYLAVVHPTRSARWRTPAVARMVSA
SSR4_HUMAN      R-HWPFGSVLCRAVLSVDGLNMF'TSVFCLTVLSVDRYVAVVHPLRAATYRRPSVAKLINL
SSR4_MOUSE      R-HWPFGAVLCRAVLSVDGLNMF'TSVFCLTVLSVDRYVAVVHPLRTATYRRPSVAKLINL
SSR4_RAT        R-HWPFGAVLCRAVLSVDGLNMF'TSVFCLTVLSVDRYVAVVHPLRAATYRRPSVAKLINL
SSR5_HUMAN      S-FWPFGPVLCRLVMTLDGINQF'TSIFCLTVMSVDRYLAVVHPLRSARWRRPRVAKLASA
SSR5_MOUSE      VSYWPFGSFLCRLVMTLDGINQF'TSIFCLTVMSVDRYLAVVHPLRSARWRRPRVAKLASA
SSR5_RAT        VSYWPFGSFLCRLVMTLDGINQF'TSIFCLTVMSVDRYLAVVHPLRSARWRRPRVAKMASA
    
```


SSR1_HUMAN	-----SWMDNAAEEEPVDYYATALK-----SRAY
SSR1_MOUSE	-----SWMDNAAEEEPVDYYATALK-----SRAY
SSR1_RAT	-----SWMDNAAEEEPVDYYATALK-----SRAY
SSR2_HUMAN	-----VSGTDDGERSD-----SKQD
SSR2_MOUSE	-----VSGTEDGERSD-----SKQD
SSR2_RAT	-----VSGAEDGERSD-----SKQD
SSR3_HUMAN	RVRSQEPVGPPEKTEEE-DEEEEDG--EESREGGKGKEMNGRVSQITQPGTSGQERPPS
SSR3_MOUSE	RIRSQEPGSGPPEKTEEEEDDEEEERREEEERRMQRGQEMNGRLSQIAQAGTSGQQRPC
SSR3_RAT	RVRSQEPGSGPPEKTEEEEDDEEEERREEEERRMQRGQEMNGRLSQIAQPGPSGQQRPC
SSR4_HUMAN	LL---EGAGGAEPLDYATALK-----SKGG
SSR4_MOUSE	LL---ETTGGAEPLDYATALK-----SRGG
SSR4_RAT	LL---ETTGGAEPLDYATALK-----SRGG
SSR5_HUMAN	-----GSGAKDADATE-----PRPD
SSR5_MOUSE	-----GYGVEDADAIE-----PRPD
SSR5_RAT	-----GYGMEDADAIE-----PRPD
	.
SSR1_HUMAN	SVEDFQPENLESGGVFRNGTCTSRITTL----
SSR1_MOUSE	SVEDFQPENLESGGVFRNGTCASRISTL----
SSR1_RAT	SVEDFQPENLESGGVFRNGTCASRISTL----
SSR2_HUMAN	KSRLNETTETQRTLLNGDLQTSI-----
SSR2_MOUSE	KSRLNETTETQRTLLNGDLQTSI-----
SSR2_RAT	KSRLNETTETQRTLLNGDLQTSI-----
SSR3_HUMAN	RVASKEQQLLPQEASTGEKSSTMRISYL----
SSR3_MOUSE	TGTAKEQQLLPQEATAGDKASTLSHL-----
SSR3_RAT	TGTAKEQQLLPQEATAGDKASTLSHL-----
SSR4_HUMAN	AGCMCPPLPCQQEALQPEPGRKRIPLTRTTTF
SSR4_MOUSE	AGCICPPLPCQQEPVQAEFGCKQVPFTKTTTF
SSR4_RAT	PGCICPPLPCQQEPMQAEPAKRVPFKTTTF
SSR5_HUMAN	RIRQQEATRPRATAAANGLMQTSKL-----
SSR5_MOUSE	KSGRPQTTLPTRSCEANGLMQTSRL-----
SSR5_RAT	KSGRPQATLPTRSCEANGLMQTSRI-----

Abb. 6 Aneinanderreihung der Aminosäuresequenzen der Somatostatin-Rezeptoren 1 – 5 für Maus, Ratte und Mensch durch Clustal W (1.4) [79].

In allen Rezeptoren einheitlich konservierte Aminosäuren sind durch Sterne und graue Blöcke hervorgehoben. Punkte implizieren Bereiche mit konservativen Aminosäuresubstitutionen. Die relativen Positionen der transmembranen Bereiche (TM1-7) sind durch graue Linien gekennzeichnet.

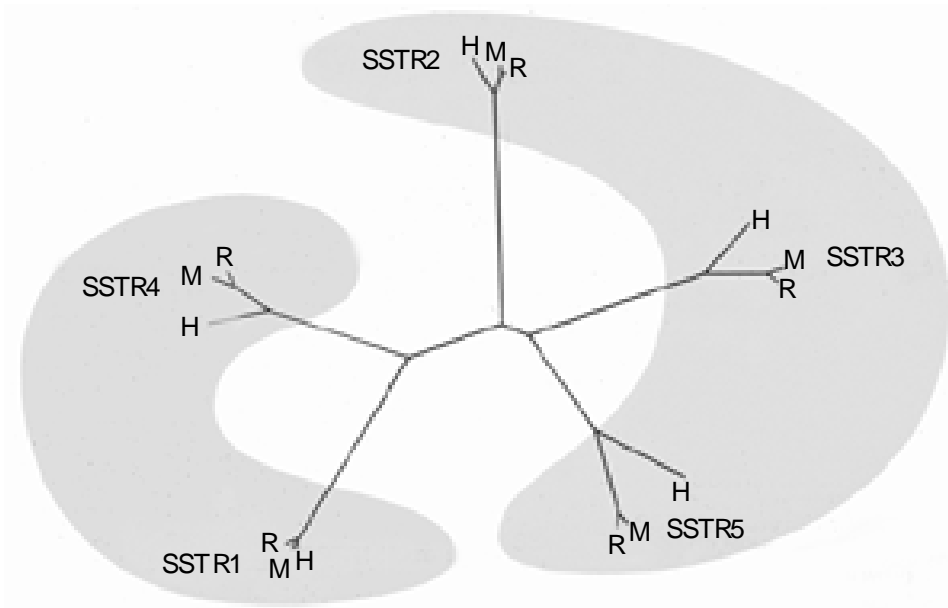


Abb. 7 Graphische Zusammenfassung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Somatostatin-Rezeptoren für die Organismen: Maus (M), Ratte (R), Mensch (H). Basierend auf den Aminosäuresequenzen (*Alignment* in Clustal W (1.4)) wurde durch das Programm Phylip Version 3.572 ein Stammbaum (*Unrooted Tree*) erstellt [80]. Durch Schattierungen hervorgehoben sind die Rezeptorgruppen SSTR1/4 und SSTR2/3/5. Sequenzvariationen der Rezeptoren innerhalb der verschiedenen Spezies sind durch unterschiedliche Astlängen gezeigt. Rezeptor 1 ist am stärksten konserviert innerhalb der verschiedenen Spezies.

1.2.2.4 Membrantopologie

Die Membranlokalisierung der Somatostatin-Rezeptoren basiert auf dem typischen sieben α -Helixmotiv G-Protein-gekoppelter Rezeptoren [81]. Konservierte Sequenzstrukturen sind bevorzugt Teil der transmembranen Domänen (siehe Abb. 6). Darüber hinaus finden sich in ihnen auch allgemein G-Protein typische Aminosäureabfolgen, deren Tertiärstrukturen wahrscheinlich generell zur Funktionalität beitragen [77]. In den jeweiligen Transmembranregionen (TM) sind dies die Aminosäuremotive:

GN..V (TM1), NLA.AD (TM2), S...L...S.DRY (TM3), W..S.....P (TM4)

F..P (TM5), F..CW.P (TM6), NS..NP..Y (TM7)

Mehrere *Consensus*-Sequenzen für eine N-glykosidische Bindung an Asparagin befinden sich im extrazellulären Bereich des Aminoendes (Asn-X-Ser/Thr).

In der ersten und zweiten extrazellulären Schleife besitzen alle Somatostatin-Rezeptoren zwei konservierte Cysteinbausteine, welche eine Disulfidbrücke eingehen könnten und wohl zur Stabilisierung der Struktur erforderlich sind.

C-terminal haben SSTR1/2/4 und 5 potentielle Palmytiolierungsstellen (LCL) als Membrananker in Übereinstimmung mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor.

Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen befinden sich in den intrazellulären Schleifen zwei und drei und im C-terminalen Abschnitt.

Die Zielsequenz R..SE (Phosphorylierung) in der dritten Schleife ist spezifisch in SST-Rezeptoren invariant. Dies gilt auch für die Sequenz L.YANSCANP.LY.FLS in der siebten transmembranen Domäne.

Ihre Konserviertheit ist in der SST-Rezeptorfamilie besonders ausgeprägt und gilt deshalb als besonderes Kennzeichen.

Als Prototyp für die Darstellung der verschiedenen strukturellen Merkmale dient hier Rezeptor 2 (Abb. 8).

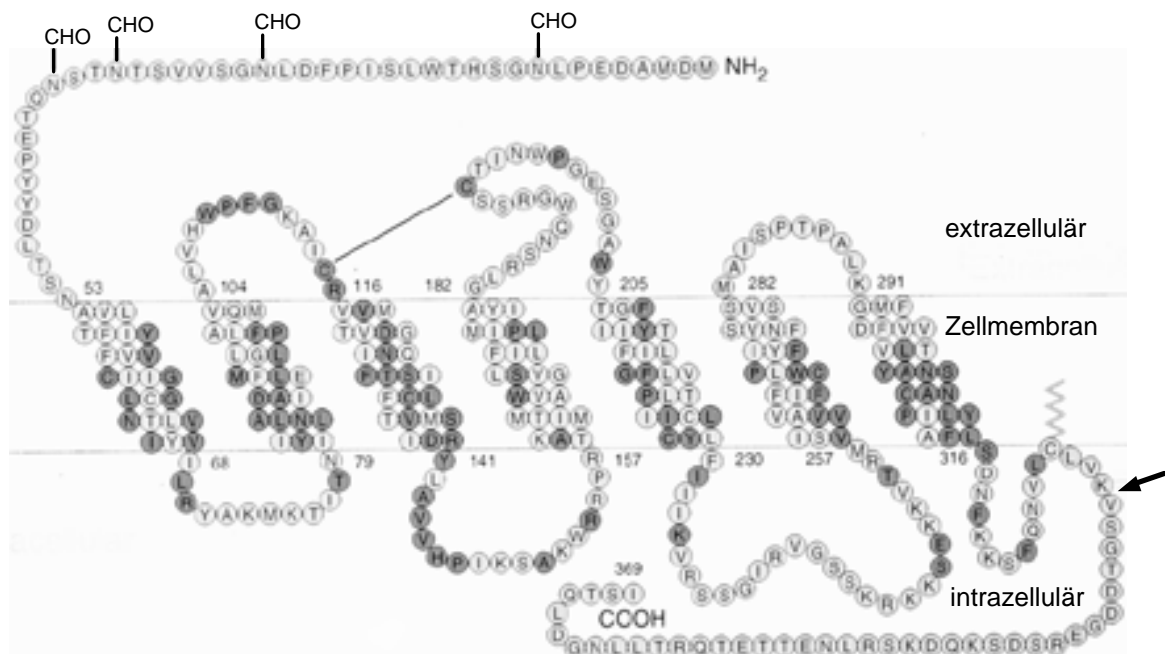


Abb. 8 Modell der Orientierung von Somatostatin-Rezeptoren in der Plasmamembran (SSTR2): Konservierte Aminosäuren sind dunkel abgesetzt. Dünne Begrenzungslinien verdeutlichen die Zellmembran. CHO, PO₄ sind mögliche Glykosilierungs- bzw. Phosphorylierungsstellen. Eine Palmitoylierung am C-terminalen Cystein ist durch ein Korkenziehermotiv kenntlich gemacht. Der Pfeil gibt an, ab welchem Punkt an sich SSTR2A und SSTR2B durch alternatives Spleißen unterscheiden (nach Bell et al. 1995 [77]).

1.2.2.5 Bindungsverhalten

Rezeptorbestandteile, über die eine Interaktion mit natürlichen oder synthetischen Liganden erfolgt, wurden durch Studien von Punktmutanten oder Chimärenrezeptormolekülen in verschiedenen Zelllinien identifiziert.

Anhand von Beispielen sollen hier nun einige Prinzipien vorgestellt werden:

Im SSTR1 ist die Bindungsbucht der integralen Proteinabschnitte näher definiert. Spezifische Aminosäuren in den transmembranen Domänen sechs und sieben bilden eine hydrophobe Umgebung für lipophile Wechselwirkungen mit SST14, während Aminosäuren in der dritten Helix einen elektrostatischen Beitrag leisten. Damit erklärt sich auch das schlechte Bindungsverhalten des synthetischen Moleküls SMS 201-995 an SSTR1. Es ist sterisch inflexibler als SST14 und hat deshalb nur eingeschränkten Zugang zu den spezifischen Aminosäuren in der Bindungsregion. Die Änderung einer Aminosäure jedoch macht die Bindungsstelle frei und erhöhte die Affinität um den Faktor 100 [82].

Durch Aminosäuresubstitution in der sechsten Domäne von SSTR5 gelang es, sein Bindungsverhalten für SST14 dem der anderen Somatostatin-Rezeptoren anzugleichen [83]. Chimäre Rezeptoren, bei denen ein Rezeptorsubtyp durch einen anderen schrittweise ersetzt wird, zeigten, daß die Bindungsunfähigkeit des SSTR1 für MK678 (SST-Analog) durch die zweite und dritte extrazelluläre Schleife von SSTR2 überwunden werden kann [84]. Zuckerbestandteile im N-terminalen Abschnitt von SSTR2 wirken an der Bindung von MK678 mit. Spezifische Antikörper maskieren sie und blockieren damit den Zugang zum Epitop [85, 86]. Na-Ionen können das Bindungsverhalten negativ beeinflussen; die verantwortliche Aminosäure in SSTR2 wurde identifiziert [87].

Allgemein gilt:

In dem aktuellen Bindungsmodell sind besonders die konservierten transmembranen Regionen drei bis sieben an der Herstellung einer Akzeptorstelle beteiligt. Den extrazellulären Schleifen kommt die Vermittlung des selektiven Bindungsverhaltens der verschiedenen Subtypen zu. Dies steht in Übereinstimmung mit den in diesen Regionen gefundenen subtypspezifischen Sequenzvariationen. Es ist auch eine Reaktion auf den Glykosilierungsgrad des N-Terminus gezeigt, wodurch Abstufungen in der Bindungsaffinität erzielt werden könnten. Weiteren Einfluß auf das Bindungsverhalten üben zytosolisch gebundene G-Proteine aus. In diesem Zusammenhang sollen Natriumionen wirken, indem sie zur Dissoziation des G-Proteins vom Rezeptor beitragen und so die Affinität für den Liganden durch eine Konformationsänderung reduzieren [88].

Die Gruppierung in zwei SST-Rezeptorklassen ist neben entsprechenden Sequenzhomologien auch durch ihr Bindungsverhalten bestimmt. Im allgemeinen binden die natürlichen SST-Peptide SST14 und SST28 an alle Rezeptoren mit vergleichbar hoher Affinität ($pK_i \geq 9$).

Tendenziell ergibt sich aber eine Zweiteilung, die auf der Affinität für synthetische Liganden beruht [89]. Zwei SST-Analoga, Octreotid und Seglitid binden zwischen einer und zwei Größenordnungen besser an die SSTR2/3/5- als an die SSTR1/4-Gruppe (siehe Tab. 2).

Problematisch jedoch ist die absolute Bestimmung der Affinität und die Identifizierung von für jeden Rezeptortyp hoch selektiven Molekülen. Die Streuung der Daten ist wohl begründet in speziesspezifischen Unterschieden der Rezeptorsubtypen, in Variationen bedingt durch Messungen in verschiedenen Zelllinien und in der Verwendung unterschiedlicher Radioliganden [90].

Es finden sich in der Literatur zwar Hinweise auf wirklich spezifische Liganden, doch schränken andere Studien dies wieder ein; es bleibt abzuwarten, inwieweit neuere Experimente, die sogar SST-Rezeptor spezifische Antagonisten postulieren [90-94], einen funktionalen Zusammenhang zu den entsprechenden Rezeptoreigenschaften herstellen können.

1.2.2.6 Desensitisierung und Internalisierung

Längere Einwirkung signalgebender Agonisten auf ihre G-Protein gekoppelten Rezeptoren führt häufig zur einer abgeschwächten Signalantwort. Dieses Phänomen wird als Desensitisierung bezeichnet und beinhaltet Phosphorylierung und Internalisierung des beladenen Rezeptors.

β -Arrestin und Clatrin-Vesikel dirigieren dann diese Komplexe zum endozytotischen Transportweg, von dem aus die Rezeptoren wieder der Zelloberfläche zugeführt werden können (Sensitisierung) [95].

Für das Somatostatin-System sind diese Vorgänge von grundlegender Bedeutung, denn sie stellen eine weitere Stufe potentieller Regulationsmechanismen dar.

Das Peptidsignal scheint jeden Somatostatin-Rezeptorsubtyp in charakteristischer Weise zu desensibilisieren und erneut zu sensibilisieren. Dieses spezifische Reaktionsmuster beeinflusst somit die Signalleitung über die Zellmembran hinweg [96].

Hinweise auf diesen Sachverhalt lieferten z.B. klinische Studien, in denen Peptidanaloga von Somatostatin zur Langzeittherapie neuroendokriner Tumore der Hypophyse und der Bauchspeicheldrüse eingesetzt wurden.

Ziel war hier, die Hormonsekretion einzuschränken und das Zellwachstum zu hemmen. In einigen Fällen wurde dieser Ansatz jedoch durch die Desensitierung der Rezeptoren behindert und erzielte nur einen vorübergehenden Effekt [97].

Weitere Studien belegen einen Einfluß verwendeter Zelllinien und Analoga auf die Desensitierung der Rezeptorsubtypen. In GH4C1 Zellen (Hypophyse) konnte kein Einfluß auf die Signaltransduktion festgestellt werden, während in CHO-K1 Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) SSTR2, 3 und 4 sensitiv und SSTR1 insensitiv gegenüber diesem Vorgang sind [98, 99]. Embryonale Zelllinien der Leber und des Pankreas (Insulinoma) zeigen Endozytose der Rezeptoren SSTR1, 2 und 3 in Reaktion auf beide Somatostatin-Peptide. SSTR 5 reagierte allerdings nur auf SST28 und SSTR4 überhaupt nicht [100, 101].

Diese Beobachtungen sind an strukturelle Merkmale der Somatostatin-Rezeptoren gekoppelt.

Mit Hilfe von Mutationsanalysen gelang es, spezifische Sequenzen zu identifizieren, die Einfluß auf die Internalisierung nehmen. Für SSTR3 konnten im C-terminalen Abschnitt vier Aminosäuren entdeckt werden, deren Transfer auf SSTR4 dessen Endozytose induzierte [95]. Kreienkamp et al. gelang es, durch Austausch nur einer Aminosäure SSTR4 zu internalisieren; weitere Determinanten fehlten allerdings, was den intrazellulären Transport behinderte und ein Recycling unmöglich machte [102].

Phosphorylierungsschritte als Antwort auf Bindung des Liganden wurden für SSTR2 und SSTR3 bewiesen. Bei beiden Rezeptorsubtypen stimmen die für die Endozytose erforderlichen Aminosäuren z.T. mit Phosphoakzeptorstellen überein [95, 103].

Die Internalisierung ist damit ein Prozeß, der zwei Regulationsschritte am Rezeptor beinhaltet: die extrazelluläre Interaktion mit dem Liganden und intrazelluläre Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren.

Die Verteilung und Signalbereitschaft der Somatostatin-Bindungsstellen ist damit durch einen weiteren Steuermechanismus geregelt.

Die verschiedenen Rezeptorfunktionen resultieren aus Signaltransduktionsmechanismen, die im Anschluß dargestellt sind.

1.2.2.7 Signaltransduktion

Somatostatin–Rezeptoren transmittieren das externe Peptidsignal über G–Proteinmodule an intrazelluläre Effektoren.

Den G–Proteinen kommt die Funktion von molekularen Schaltern zu, die durch ihre GTPase–Aktivität bedingt, zwischen inaktivem, GDP-bindenden und aktivem GTP-bindenden Zustand pendeln [106].

Die dritte zytosolische Rezeptorschleife und der C-terminale Abschnitt sollen dabei entscheidend für die Interaktion mit der GTP-bindenden Proteinfamilie sein [104, 105].

Die schwierige Vergleichbarkeit unterschiedlicher experimenteller Systeme hat für die Signalweiterleitung, wie auch bei Bindungsstudien, zu teilweise kontroversen Ergebnissen geführt (unterschiedliche Proteinausstattung der Zelllinien). Anhand von Beispielen sollen deshalb nur die grundlegenden Faktoren vorgestellt werden.

Generell sind Somatostatin–Rezeptorsubtypen in der Lage, alternative Gruppen von G–Proteinenklassen zu aktivieren, die dann selektiv verschiedene Effektoren ansprechen.

Adenylatzyklase wird wohl durch alle SST-Rezeptoren inaktiviert unter Verwendung von inhibierenden G-Proteinen wie $G_{i\alpha 1 \text{ bis } 3}$, für die Pertussis–Toxin–Sensitivität besteht [107].

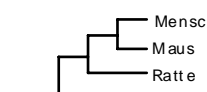
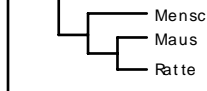
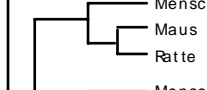
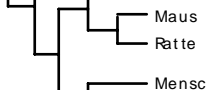
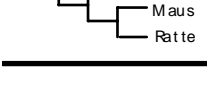
Spannungsgesteuerte Ca-Kanäle lassen sich durch ein G_o -Protein von SSTR2 blockieren und verhindern den Ca-Einstrom ohne Beteiligung von cAMP [108]. Die negative Regulierung eines Na/H-Austauschers benötigt weder cAMP noch G-Proteine [109].

Die Stimulierung von SSTR2 kann Neurone hyperpolarisieren ohne Einfluß von cAMP, jedoch unter Einwirkung von G-Proteinen durch Öffnung von Kaliumkanälen (Kaliumausstrom) [110]. Ein anderer Kaliumkanal (M-Typ) wird durch Arachidonsäure aktiviert, die durch Stimulierung von Phospholipase A2 entstanden ist [111].

Phosphotyrosin-Phosphatase (PTP)-Aktivität wird ebenfalls über G-Proteine gesteigert, was z.B. Rezeptoren durch Dephosphorylierung inaktivieren kann [112].

Für PhospholipaseC (IP3) und die Phosphatase (PP2A) sind ebenfalls stimulierende Wirkungen mit bzw. ohne Pertussi-Toxin-Sensitivität belegt [113, 114]. Auch MAP, die klassische Rezeptor-Tyrosinkinase des Ras-Signalweges, ist von Somatostatin reguliert [115] (siehe Tab. 2 für eine Übersicht).

Damit sind die Effektoren bzw. *sekundary messsenger*-Moleküle vorgestellt, die rezeptorvermittelt auf Somatostatin reagieren. Offen bleibt allerdings die Frage, wie jeder einzelne Rezeptorsubtyp flexibel mit verschiedenen G-Proteinen und/oder mehreren Signalwegen in spezifischen Zellen reagiert.

Homologie	Bindungsverhalten				Signaltransduktion					
	SST14	SST28	Octreotid	Segletid	Az G	K Ca	PLC Na/H	PTP PLA	MAP	
	SSTR1	0,7	0,6	290	>1000	•	•	•	•	•
	SSTR4	1,3	7,9	>1000	>1000	•	•	•	•	•
	SSTR2	0,2	0,2	0,4	0,1	•	•	•	•	•
	SSTR3	0,3	0,3	5,8	36	•	•	•		
	SSTR5	0,5	0,4	5,6	13	•	•	•	•	

Tab. 2 Charakterisierung der Somatostatin-Rezeptoren durch Studien der Sequenzhomologie, des Bindungsverhaltens und der Signaltransduktion

- Homologie: nach Bruns et al. (1995) [75]. Aufgrund der starken Konserviertheit innerhalb des SSTR1 Subtyps bedingen minimale Variationen eine relative Nähe von SSTR1 des Menschen und der Maus (siehe hierzu auch den Stammbaum Abb. 7)
- Bindungsverhalten: IC₅₀-Werte (Ligandkonzentration zur Blockierung von 50% der Rezeptoren) in nmol/l für humane Rezeptoren nach Bruns et al. (1996) [116]. Die Somatostatin-Analoga Octreotid und Segletid betonen Unterschiede zwischen den Rezeptorgruppen SSTR1/4 und SSTR2/3/5.
- Signaltransduktion: Zuordnung von Rezeptoren und Signalkomponenten: G-Proteine (G), Adenylatzyklase (Az), Calciumkanal (Ca), Kaliumkanal (K), Natrium/Wasserstoff-Austauscher (Na/H), PhospholipaseC (PLC), PhospholipaseA (PLA), Phosphotyrosinphosphatase (PTP), Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP) Es gibt überschneidende und spezifische Folgereaktionen der Rezeptortypen. Für Angaben zu Effektorsimulation oder Inhibition siehe Text. Daten nach Meyerhof (1998), Reisine und Bell (1995) [76, 96].

1.2.3. Systemdefinition

1.2.3.1 Neue Bestandteile

Die Beschreibung des Somatostatin-Systems anhand seiner Bestandteile ist der erste Schritt zur Erschließung seiner komplexen Funktionen.

Bisher existiert nur eine unvollständige Definition der beteiligten Strukturen.

So sind in den meisten Studien der letzten Jahre neue, potentielle Komponenten des Somatostatin-Systems nicht einbezogen.

Die Entdeckung weiterer G-Protein gekoppelter Rezeptoren auf Basis von Sequenzhomologien zu Opioid/Somatostatinrezeptoren ist keineswegs abgeschlossen (z.B. SLC-1, GPR25) [117, 118]. Spezifische Interaktionen mit den SST-Liganden sind jedoch bisher nicht nachgewiesen [119, 120].

Mögliche Bindungsstellen für Somatostatin könnten aber auch stark abweichende Strukturen aufweisen. Dies ist in der Tat der Fall. Eine Untereinheit des Autoantigens Ku und ein Faktor des GABA(A)-Rezeptorkomplexes sind Akzeptoren für Somatostatin [121, 122].

Phylogenetische Studien in verschiedenen Spezies deuteten bereits die Möglichkeit eines weiteren Somatostatin-Gens in Säugern an (siehe auch 1.2.1.2 Genkonservierung).

Cortistatin (CST) ist ein solches [123]. Sein Präpropeptid liefert nach kontrollierter Proteolyse wahrscheinlich zwei Peptidformen, CST14 und CST29 (*Rattus*). Die erste Variante besitzt ausgeprägte Sequenzübereinstimmung zu dem SST14-Peptid. Im C-Terminus stimmen 11 von 14 Aminosäuren zwischen beiden überein. Das Bindungsverhalten von CST14 bzw. seiner humanen Form CST17 gleicht dem von SST14, auch inhibiert es übereinstimmend die Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion [124]. Für alle fünf Somatostatin-Rezeptoren konnte gleichermaßen hohe Affinität dieses Peptids demonstriert werden [125].

1.2.3.2 Expression

Welchen funktionellen Beitrag liefert das Somatostatin-System nun im Organismus?

Erste Hinweise gibt die Verteilung der Liganden und Rezeptoren.

Somatostatin zirkuliert in Körperflüssigkeiten, im Blut, im Magendarmtrakt, in der cerebrospinalen Flüssigkeit und im Sperma. Somatostatin produzierende Zellen finden sich ausgeprägt im zentralen und peripheren Nervensystem, im endokrinen Pankreas und

im Darm; weniger konzentriert in der Nebennierendrüse, dem Thymus, den Nieren, der Prostata und Placenta. In der Ratte befinden sich 65% der Somatostatin-Gesamtmenge im Darm, 25% im Gehirn, 5% im Pankreas und 5% in den verbleibenden Organen [24].

Die Expression der Somatostatin-Rezeptoren korrespondiert mit dieser regionalen Verteilung der Somatostatin-Peptide. Tabelle 3 gibt eine Übersicht.

Gehirn	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Cortex	++++	++++	++	++	++
Striatum	+ -	+	++	+	++
Hippocampus	++	++	++	++	++
Amygdala	+++++	++	+++	+	++
Rindrinde	++	++	++	++	++
Thalamus	++	+	+	+ -	++ (-)
Hypothalamus	++	++	+	+ -	+++++
Präoptisches Gebiet	+	+	+	+	+++++
Cerebellum	+ -	+ -	+++++	-	-
Mittelhirn	+	+	+(++)	+ - (++)	++
Brücke	+	+	+	+ -	-
Periphere Organe					
Hirnanhangdrüse	++	+++	++	+	++++
Bauchspeicheldrüse	-	+	-	-	-
Inselzellen	++	++++	+	++	+
Magen	+	+	+	+	+
Dünndarm	++	-	+	+	++
Leber	-	-	++	-	-
Lunge	-	-	-	++	-
Niere	-	+	+	+	-
Herz	+	-	+	++++	-
Milz	++	+	++++	+	+
Nebennierenrinde	+	++++	+	-	-

Tab. 3

Gewebsspezifische Expression der Somatostatin-Rezeptorgene der Ratte

Angegeben sind die relativen mRNA-Konzentrationen. Daten nach Hoyer et al. (1994) und Patel et al. (1995) [89, 126] (abweichende Werte in Klammern hervorgehoben).

Es gibt zudem Hinweise auf vom Entwicklungsstand des Organismus beeinflusste lokale quantitative und qualitative Änderungen der Somatostatin-Peptide und Rezeptoren:

Im Hypothalamus der Ratte ist Somatostatin ab dem 14ten Tag der Embryonalentwicklung (E14) an nachweisbar und steigt um das Sechsfache bis zum Erreichen des Erwachsenenstadiums [127]. Das Somatostatin-Gen wird im Hypothalamus vor Abschluß der neuronalen Differenzierung exprimiert, d.h. bevor die nervöse Regelung der Wachstumshormon-Freisetzung erfolgt.

Zeitlich veränderliche Verteilungsmuster für SST finden sich in verschiedenen neuronalen Systemen, wie dem cerebralen Cortex, dem Hippocampus und dem Cerebellum [128]. Im occipitalen Cortex erreicht der Somatostatin-Gehalt ein Maximum zwischen dem 15ten und 16ten embryonalen Tag (E15/16), um dann während E18/21 wieder abzusinken [129]. In der Cortexentwicklung existiert Somatostatin in früh differenzierten Zellen, die später durch Apoptose verschwinden. Solche Veränderungen des Peptidgehaltes aufgrund der sich ändernden Anzahl von Neuronen sind z.B. auch für den Hippocampus belegt [130, 131]. Im Cerebellum alterniert die Somatostatin-Produktion in der Entwicklung zwischen zwei Zelltypen. Zunächst exprimieren die Körnerzellen Somatostatin, um dann durch die Purkinje-Zellen abgelöst zu werden, bis schließlich mit Entwicklungsabschluß die Somatostatin-Produktion fast ganz endet [132].

Für die drei genannten Gehirnabschnitte existieren ebenfalls vorübergehende Maxima in der Anzahl der Somatostatin-Bindungsstellen [133].

Im sich entwickelnden Cortex der pränatalen Ratte ist Rezeptor 1 weit verbreitet, im adulten Tier jedoch auf tiefe cortikale Schichten beschränkt [133]. Die SSTR1-Expression ist postnatal im Hippocampus höher als im adulten Tier [134]. Im Cerebellum schwankt der Rezeptorgehalt unterschiedlich. So ist SSTR3 zunächst nicht präsent, wird dann aber mit Abschluß der Entwicklung als einziger Akzeptor übrigbleiben. SSTR1 und SSTR4 zeigen frühe Maxima, gehen dann kontinuierlich zurück, während SSTR2 zunächst einmal konstant bleibt [135].

Diese Beispiele progressiver und regressiver Phasen der Expressierung von Ligand und Rezeptoren legen eine Beteiligung an Entwicklungsvorgängen nahe.

1.2.3.3 Funktion

Noch diffiziler als eine strukturelle Definition gestaltet sich die funktionelle Beschreibung des Somatostatin-Systems. In Übereinstimmung mit seiner anatomischen Verteilung fungiert Somatostatin als ein primärer Botenstoff mit breitem Wirkungsspektrum im und außerhalb des Nervensystems sowie vor und nach abgeschlossener Entwicklung.

Im wesentlichen ist es eine neuroaktive Substanz, die als Neurotransmitter/Modulator, Neurohormon oder als endokriner/autokriner Regulator, d.h. als klassisches Hormon wirkt [136, 137].

Auf zellulärer Ebene steuert Somatostatin vier Prozesse:

Die Neurotransmission (A), Drüsensekretion (B), Kontraktion glatter Muskulatur (C) und Zellproliferation (D).

Die biologische Bedeutung dieses Moleküls ist in ihrer Gesamtheit nicht bekannt und kann nur exemplarisch beschrieben werden. Bedingt durch die ubiquitäre Verteilung der Komponenten ergibt sich eine enorme funktionelle Vielfalt.

Zu A:

Gezielte Herabsetzung der Somatostatin-Konzentration im Gehirn durch Cysteamin hat verhaltensbiologische Konsequenzen für z.B. Lernfähigkeit und Gedächtnis oder angeborene Verhaltensweisen [138, 139].

Zu B:

Als "*Paninhibin*" der Hormonausschüttung kontrolliert Somatostatin die Sekretion u.a. von Wachstumshormon, Schilddrüse stimulierendem Hormon (TSH, Hirnanhangdrüse) oder Insulin und Glukagon (Bauchspeicheldrüse) [140, 141].

Zu C:

Es hemmt die glatte Eingeweide-Muskulatur, z.B. des Dickdarms und der Gallenblase und beeinflusst auch das Muskelzellwachstum [142-144].

Zu D:

Somatostatin besitzt einen antiproliferativen Effekt. Diverse Zelllinien transfiziert mit verschiedenen Rezeptoren reagieren negativ auf die Zugabe von SST-Analoga. In Zellkultur kann es aber auch einen positiven neurotrophen Einfluß ausüben [113, 145].

Allen funktionalen Studien - ob in vivo oder in vitro - ist gemeinsam, daß sie einen selektiven Aspekt möglicher SST-Wirkung herausgreifen, z.B. durch Limitierung auf einen bestimmten Zelltyp, durch die Verwendung rezeptorspezifischer Analoga oder spezifischer Antikörper etc. .

Hieraus resultieren zwar viele wissenschaftliche Ansatzpunkte, jedoch ist es bisher nur eingeschränkt gelungen, Effekte auf die Interaktion spezifischer Komponenten des Somatostatin-Systems zurückzuführen, oder einen Einblick in die Wirkung des Gesamtsystems zu bekommen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, das Somatostatin–System leitet kaskadenartig mindestens drei Peptidsignale (SST14/28 und CST14) zu seinen fünf Rezeptoren, die dann die entsprechende biologische Antwort über Effektoren und ihre sekundäre Botenstoffe größtenteils G-Protein gesteuert einleiten (siehe Abb. 9).

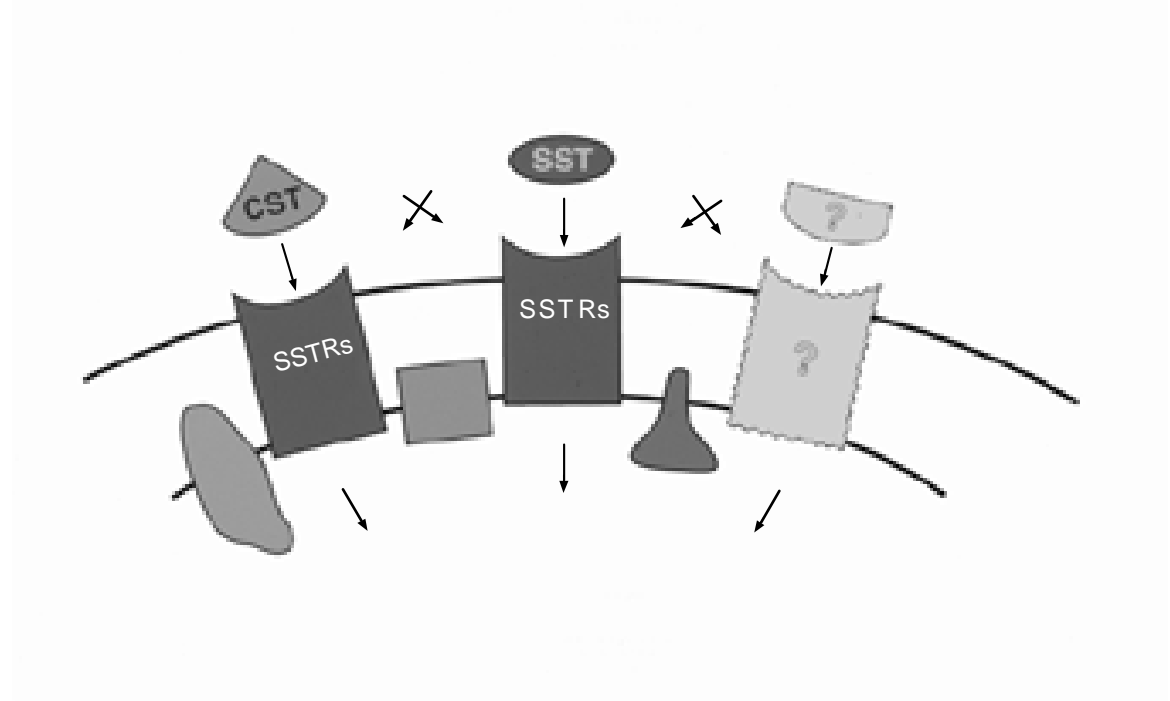


Abb. 9 Interaktionen im Somatostatin-System

Die Pfeile implizieren parallele und diagonale Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen, die zur Weiterleitung des Peptidsignals ins Zellinnere führen. Cortistatin (CST) und Somatostatin (SST) sprechen die gleiche Gruppe von Rezeptoren an. Denkbar ist aber auch die Existenz einer neuen Gruppe CST spezifischer Rezeptoren bzw. weiterer SST-Akzeptoren. Es könnten aber zudem bisher unbekannte Liganden bzw. Rezeptoren mit dem Somatostatin-System kreuzreagieren (siehe Fragezeichen).

Diese Organisation der Systemkomponenten versucht der experimentelle Ansatz meiner Dissertation zu berücksichtigen (2.0 Fragestellung der Arbeit)

In Verbindung mit meinen Ergebnissen soll dann im Diskussionsteil detaillierter auf einige physiologische Wirkungen eingegangen werden.

2.0 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel meines Projektes ist es, die Beziehung von Strukturen und ihrer Funktionen im Somatostatin–System der Maus zu untersuchen.

Hunderte von Einzelergebnissen weisen auf eine Beteiligung von Somatostatin an verschiedensten biologischen Prozessen hin. Dies erklärt allerdings nur eingeschränkt seine Signifikanz für den Gesamtorganismus. Nach dem Prinzip der transgenen Mutagenese, allgemein auch als *Gene Targeting* bekannt, sollen Funktionsverluste von Komponenten des Somatostatin–Systems zu seiner Analyse beitragen.

Phänotypische Effekte sind auf physiologischer, morphologischer und verhaltensbiologischer Ebene zu untersuchen (siehe Titel).

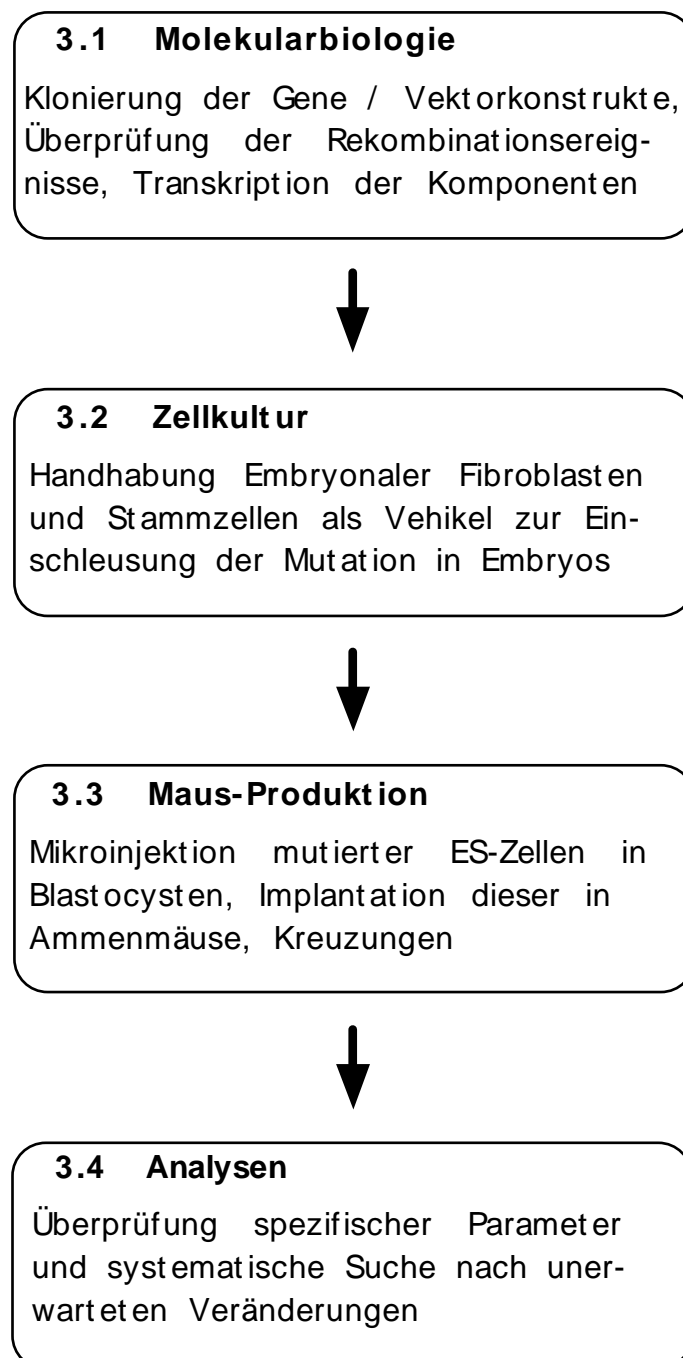
Damit eröffnet sich die Möglichkeit, bisherige Hypothesen zu überprüfen bzw. neue Funktionen aufzudecken.

Ausfallmutationen der Somatostatin-Peptide SST14/28 und zwei seiner Rezeptoren, SSTR3 und SSTR4 sollen hierfür einen Betrag leisten.

3.0 Methoden

- Es werden hier nur Experimente und Versuchsbedingungen aufgeführt, die im direkten Zusammenhang mit dem Ergebnisteil stehen. Standardmethoden und hinführende Versuche werden verkürzt angegeben.
- Einzelheiten werden nur beschrieben, wenn von einer gegebenen Vorschrift abgewichen wurde.
- Für einige weniger gebräuchliche Methoden wird auch das experimentelle Prinzip näher erläutert.
- Das Schema ordnet die Methoden den einzelnen Zwischenschritten der Herstellung und Analyse von *Knockout*-Mäusen zu.

Abb. 10 Flußdiagramm: Methoden



3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Genomische Klone

Sie lieferten das Ausgangsmaterial für den Zusammenbau der *Targeting*-Vektoren.

Die Gene für Somatostatin, Somatostatin-Rezeptor 3 und 4 wurden aus dem Genom der Mauslinie 129Sv mittels der Genbibliothek Lambda FIX[®] II (Stratagene) isoliert. Phagen-Klone wurden durch Hybridisierung mit einer Somatostatin spezifischen cDNA der Ratte bzw. für die Rezeptoren mit degenerierten Oligonucleotiden detektiert und dann entsprechend subkloniert. Sequenzierungen überprüften die Identität der isolierten Klone (nicht im Ergebnisteil dargestellt).

SST-Rezeptor spezifische Primer: (Variationen der Sequenz sind hervorgehoben)

Primer M1: 5' AT GGG GTT GGC ACA GCT GTT GGC ATA 3'

Primer M2: 5' AT GGG GTT GGC **GCA** GCT GTT GGC ATA 3'

Primer M3: 5' AT GGG GTT **TGC** **GCA** GCT GTT GGC ATA 3'

3.1.2 Subklonierung

Sequenzabschnitte mit den jeweiligen Genen wurden aus entsprechenden Lambda-Klonen in pUC19 Plasmide umkloniert. Diese Vektorintegrate bzw. Bestandteile der Lambda-Klone dienten dem Zusammenbau der *Targeting*-Konstrukte.

Subklon SST in pUC19: 4.6kb BglII-HindIII (Exon 2); 1.3kb PstI (Exon 1)

Subklon SSTR3 in pUC19: 6.5kb XbaI Insertion

Subklon SSTR4 in pUC19: 6.7kb HindIII Insertion

Für den Somatostatin-*Targeting*-Vektor wurde als kurzer Arm ein 1.3kb PstI Fragment und als langer Vektorarm ein 4.7kb PstI-BglIII Fragment zu beiden Seiten einer SV40^E-tk^P-Neomycinkassette plaziert.

Für SST-Rezeptor 3 und 4 Vektoren wurde nach gleichem Schema verfahren:

SSTR3: 5' 1.7kb SacI Fragment + Neokassette + 6.5kb SalI-BglIII Fragment 3'

SSTR4: 5' 6.7kb SacI Fragment + Neokassette + 1.1kb HincII-EcoRI Fragment 3'

(siehe Ergebnisteil: 4.1.2 Vektoren)

Für die Subklonierung und den Vektorzusammenbau kamen Standardtechniken zur Anwendung, die hier nur kurz genannt werden.

Radioaktive Markierung von Primern und Fragmenten mit ³²P durch Kinasereaktion (T4-Polynucleotidkinase, Boehringer, Mannheim) bzw. durch Nicktranslation (Nicktranslation kit, N 5000, Amersham); Ligation mit T4 DNA Ligase (Boehringer, Mannheim); Dephosphorylierung (alkalische Phosphatase, CIAP, GibcoBRL) von DNA Fragment-

Enden zur Klonierung; DNA-Fragmentisolierung mit Hilfe von Glasmilch (GeneClean II[®] Kit, Bio 101 Inc.); Transfektion von *E. coli* (Max Efficiency DH5 α [™], GibcoBRL) mit DNA durch Elektroporation (Gene Pulser I, Bio-Rad Laboratories); Restriktionen (Enzyme Boehringer, Mannheim) von genomischer und Plasmid DNA; Gele für die Präparation von DNA und für den Transfer von DNA (Southern) und RNA (Northern) gemäß den Vorschriften in *Molecular Cloning* (Sambrook, Fritsch und Maniatis, 1989) [146].

3.1.3 PCR / RT-PCR

Polymerasekettenreaktionen wurden verwendet, um

1. die zielgenaue Integration des *Targeting*-Vektors zu überprüfen
2. den Mausexperimenten auf Gegenwart des mutierten bzw. Wildtyp-Allels zu testen
3. die mutierten Transkripte zu untersuchen (RT-PCR)

Für alle PCRs kamen Taq DNA Polymerase (5 units/ μ l) plus mitgelieferter Puffer und Desoxynucleotide von Boehringer, Mannheim zum Einsatz. Die Thermokontrolle geschah durch die PTC-100[™] Einheit von MJ Research, Inc., Massachusetts.

Beispielhaft sind Ergebnisse im Ergebnisteil aufgeführt.

Zu 1.

Primer außerhalb des kurzen Vektorarms für *Targeting*-Test

SST:

Primer Msst2: 5' GAA TGG TGT CAG AAT GCA CC 3'

SSTR3:

Primer 125 : 5' CCA GAT TCG CTA GAC CCA GCT CAA 3'

Primer 259 : 5' CAA AGC CAC ACA CTG TAG GCA ACG 3'

SSTR4:

Primer 148 : 5' CCT TCC CCC TCA TAG CAT AGC TCG 3'

Primer 230 : 5' ATG GCT TTT CAC TGT GGT CAT CAT 3'

Primer in der Neomycinkassette:

SST und SSTR3:

Primer MB4-L : 5' GGG GAC TTT CCA CAC CCT AAC TGA 3'

SSTR4:

Primer MB5-L : 5' ATC CAG GAA ACC AGC AGC GGC TAT 3'

PCR – Bedingungen:

1µl DNA (100 ng genomische DNA bzw. 0,001ng Plasmid
DNA(Testkonstrukt = 1 Kopie Testkonstrukt pro Genom)
2µl 2mM dNTP-Mix
2µl 10µM Primer (5' vom Vektorarm)
2µl 10µM Primer (in der Neokassette)
2µl 10x Puffer
0,2µl Taq Polymerase
10,8µl H₂O
20,0µl Σ Volumen

Programmschritte:

1. 94°C 3 Min.
 2. 94°C 45 Sec.
 3. 69°C 40 Sec.
 4. 72°C 2 Min
- (30x Schritte 2 bis 4)

Zu 2.

SST:

Wildtyp-Allel:

WTF - 5' TCG GAC CCC AGA CTC CGT CAG 3'

WTR - 5' TCT GCC AAG AAG TAC TTG GCC AG 3'

Mutiertes Allel:

MTF: 5' GTC TCC AGT GCG CCC TGG CT 3'

MTR: 5' GGG ACT TTC CAC ACC CTA ACT GA 3'

SSTR3:

Wildtyp-Allel:

Primer Δ R3 F3: 5' GTT ACC TAT CCC TCA TCC GAG CCT 3'

Primer Δ R3 R1/4: 5' AAG AAG CCC AGT GCG GCC ATG TAG 3'

Mutiertes Allel:

Primer Neo1: 5' ACA GAC AAT CGG CTG CTC TGA TGC 3'

Primer Neo2: 5' CTC GTC AAG AAG GCG ATA GAA GGC 3'

SSTR4

Wildtyp-Allel:

Primer Δ R4 F3: 5' GAC AGC GGG CAT GGT CAC TAT CCA 3'

Primer Δ R4 R2: 5' ACC ACC ATT AGC ACG AGC CTA GTG 3'

Mutiertes Allel:

Primer Neo1: 5' ACA GAC AAT CGG CTG CTC TGA TGC 3'

Primer Neo2: 5' CTC GTC AAG AAG GCG ATA GAA GGC 3'

PCR-Bedingungen wie unter Punkt 1. Der Programmschritt 4 ist jedoch verkürzt auf 30 Sekunden.

Zu 3.

RT-PCR wurde nur für die Transkripte im Zusammenhang mit den Rezeptor-*Knockouts* 3 und 4 verwendet.

RNA-Präparation (siehe gesonderter Gliederungspunkt)

Die reverse Transkription erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (SUPERSCRIPT™ II RNase H Reverse Transcriptase, GibcoBRL).

PCR-Prinzip: Genspezifische Primer, die im Bereich des deletierten Abschnittes liegen (cDNA), gaben im Fall des normalen Allels ein Signal, für das mutierte hingegen nicht.

Verwendete Primer: gemäß Punkt 2, ebenso PCR-Ansatz.

3.1.4 Southern

Southernhybridisierungen dienten der Analyse der genomischen Lambda-Klone und erfolgten im Zusammenhang mit den *Targeting*-Vektoren. Vorschriften gemäß *Molecular Cloning* [146] bzw. QuikHyb®-Protokoll (Stratagene).

Probenmaterial ist im entsprechenden Ergebnisteil beschrieben.

3.1.5 Northern

Northernhybridisierungen dienten der Transkriptanalyse.

Vorschriften gemäß Sambrook et al. [146] bzw. QuikHyb® (Stratagene).

Probenmaterial entsprechend Ergebnisteil:

Rezeptorspezifische cDNAs : Für jeden Rezeptor wurde ein circa 1kb langes PCR-Fragment amplifiziert, gelgereinigt und durch Nicktranslation radioaktiv markiert. Die jeweils benutzten Primer sind im folgenden aufgelistet:

SSTR1: 5' CTC TCC CTC CTC TTC TCC AA 3'
 5' CAG CGT TAT CCA TCC AGC TG 3'

SSTR2: 5' TCT AGA CGG AGT GGA AAG CAG 3'
 5' GAC CAA GCA AAG AAC ATT CTG G 3'

SSTR3: 5' ATA CCA CCC TGG GGA ACA CAT CCG 3'
 5' TCC TGG CTC CGA ATG CGA CGT GAT G 3'

SSTR4: 5' AGA CAT GAA CGC GCC AGC AAC 3'
 5' TGT TTC CAG GAG ACA GCA GCG 3'

SSTR5: 5' TAG TGC CTG TGC TCT ACC TGT TGG 3'
 5' TGG GGG TGA ATG CAT CTC AGC AAA 3'

Cyclophilin-cDNA:

Ein 700bp BamHI-Fragment wurde aus dem Plasmid p1B15 isoliert [147].

Cortistatin-cDNA:

Plasmid mCORT-A3 (generös von Dr. Luis de Lecea zur Verfügung gestellt) enthält die Maus-Cortistatin-cDNA. Ein 500bp EcoRI-NotI Fragment wurde isoliert und zur Hybridisierung radioaktiv markiert.

3.1.6 DNA-Präparationen

DNA wurden aus folgenden Organismen bzw. Organteilen isoliert:

1. Lambda-Phagen
2. E. coli
3. Embryonale Stammzellen
4. Mausleber
5. Schwanzspitze der Maus

Zu 1.

Lambda-DNA-Isolation wurde gemäß dem Protokoll von Promega (Lambda Magic™ DNA Purification System) durchgeführt.

Zu 2.

Minipräps wurden mit dem Perfectprep™ Kit (5 Prime, 3 Prime, Inc.) durchgeführt; Midipräps mit dem JETSTAR Plasmid Midiprep Kit (Genomed, Inc.); Maxipräps gemäß der Vorschrift von Sambrook et al. für CsCl-Reinigung von Plasmid-DNA [146].

Zu 3.

Minipräps erfolgten in 96er Mikrotiterplatten gemäß dem Protokoll von Bradley in *Methods in Enzymology* [148].

Maxipräps: Ausgangsmaterial waren dichtbewachsene ES-Kulturen auf 6cm Petrischalen. Zur Lyse wurde folgender Puffer verwendet:

1 mM EDTA
10 mM Tris (pH 8)
1 % SDS
in H₂O

Die Folgeschritte mit Proteinase K-Behandlung, RNase-Behandlung, und Dialyse erfolgten ebenfalls gemäß Sambrook et al..

Zu 4.

Gewebe wurde in PBS (Gibco BRL) gewaschen und in obigem Puffer homogenisiert, allerdings ohne SDS; das Volumen bestimmt und 1 vol % SDS zugegeben.

Die Folgeschritte mit Proteinase K-Behandlung usw. entsprechen dem Maxipräp. Protokoll unter Punkt 3.

Zu 5.

Die DNA-Präparation geschah gemäß dem Protokoll von Laird et al. (1991) [149].

3.1.7 RNA -Präparation

RNA wurde gemäß den Anweisungen des RNA STAT-60TM Kit (TEL-TEST, Inc.) aus Mausgehirnen präpariert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Embryonale Fibroblasten (EFBs)

Für ein undifferenziertes Wachstum über einen längeren Zeitraum benötigen embryonale Stammzellen (ES *cells*) neben LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) auch embryonale Fibroblasten (EFBs). Letztere wurden aus Embryonen einer neomycinresistenten Mauslinie (JAX stock # JR2354) gewonnen.

Folgendes Protokoll ist eine Variation der Vorschrift von Wurst und Joyner in *Gene Targeting a Practical Approach* [150].

- 1) Trächtige Maus (zwischen dem 12.5 und 14.5 Tag *post coitus*) präpariert
- 2) Sezierung der Embryonen nach Wurst und Joyner
- 3) Trypsinisierung in 50 ml Röhrchen (2 ml 0,05% Trypsin/EDTA pro Embryo) bei 37°C für 30 Min. unter hoch- und runter pipettieren, alle 5 Min.
- 4) Mit gleichem Volumen EFB-Medium ergänzen, mixen; für 5 Min. absetzen lassen, den Überstand verwerfen und den Rest ausplattieren
- 5) Volumen entsprechend einem Embryo auf 15 cm Petrischalen transferieren, in 40 ml EFB bei 37°C, 5% CO₂ inkubieren
- 6) Nährmediumwechsel alle 2 Tage (25 ml)
- 7) Wachstum zu hoher Zelldichte
- 8) Pro Petrischale 2 Kryotubes (1,5ml) nach Gefrierprotokoll behandelt (teilungsfähige EFBs); eine Petrischale weiter kultiviert, siehe 9)
- 9) Zellpassage: jeweils 1/5 Volumen auf 5 Petrischalen (15) verteilt und kultiviert
- 10) Wachstum zu hoher Zelldichte, dann Zellpassage wie unter 9), Gesamtzahl der Petrischalen 25
- 11) Wachstum zu hoher Zelldichte, anschließend Zellpräparation wie folgt: zeitgleich 5 Petrischalen trypsinisiert, repräsentativ Zellzahl bestimmt, Zellen zentrifugiert, dann 4×10^6 Zellen in 0,25ml EFB – Medium resuspendiert und gamma-bestrahlt (3500 Rads), Zugabe von gleichem Volumen 2x Gefriermedium, aliquotiert zu 4×10^6 Zellen/0,5ml pro Kryotube und entsprechend Gefrierprotokoll vorgegangen; für restliche Petrischalen entsprechend verfahren; Lagerung bei –80°C für 1-2 Monate bzw. in flüssigem Stickstoff für Langzeitkonservierung (teilungsunfähige Zellen)
- 12) Ein Kryotube (4×10^6 Zellen) ist geeignet für jeweils: eine 10cm Petrischale, zwei 6cm Petrischalen, eine 24er Kulturplatte oder eine 96er Mikrotiterplatte
- 13) Für eine Neupräparation von teilungsunfähigen Zellen verwende teilungsfähige Fibroblasten siehe 8) und verfahren von 9) an, wie beschrieben

Wachstumsbedingungen für embryonale Fibroblasten (EFBs):

EFB-Medium, 37°C, 5% CO₂ (Inkubator), Gelatinisierung der Kulturbehältnisse hilfreich
EFB-Medium wie ES-Medium, jedoch 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, ohne β -Mercaptoethanol ohne LIF (siehe 2.2.2 Embryonale Stammzellen, ES)
Zellzahl für 6cm Petrischale: 2×10^6 , für größere Behältnisse entsprechend mehr

3.2.2 Embryonale Stammzellen (ES)

Sie sind abgeleitet aus der inneren Zellmasse von 3,5 Tage alten Mausblastocysten nach Evans und Kaufmann (1981) [151]. Verwendet wurde die J1 Zelllinie von Jaenisch, die isogenisch zum Genom der 129SvEv Maus ist [152].

Wachstumsbedingungen für ES-Zellen:

ES-Medium, 37°C, CO₂ 5% (Inkubator), Gelatinisierung der Kulturbehältnisse erforderlich, EFBs und LIF zwingend notwendig; Kulturen zur DNA-Präparation können auch ohne EFBs auskommen, differenzieren dann aber stark.

Zellzahl für 6cm Petrischale: $1,5 \times 10^6$, für größere Behältnisse entsprechend mehr.

Nach 2 Tagen Kultivierung sind $1-2 \times 10^7$ Zellen zu erwarten.

ES-Medium:

nach Joyner und Wurst (*Gene Targeting a Practical Approach*) [150], Variation: 1mM Natriumpyruvat hier optional, gesamtes Medium gefiltert (2 μ m),
Mediumwechsel alle 1-2 Tage notwendig.

Trypsinisierung:

zur Vereinzelung von ES-Zellen für Zellpassagen oder Elektroporation

0,25% Trypsin/0,02% EDTA (pH 8) Lösung in PBS, gefiltert (2 μ m)

Vorschrift für 6cm Petrischale, für größere Behältnisse entsprechend mehr:

- 1) Wasche Zellrasen mit PBS, entferne Flüssigkeit
- 2) Zugabe von 1,5ml Trypsin-Lsg., 2RT dann 5Min. 37°C
- 3) Lösung des Zellrasens durch leichtes Aufklopfen des Behälters, mixen durch Pipettieren
- 4) Zugabe von ES-Medium entsprechend Verwendungszweck

Gelatinisierung von Kulturgefäßen:

0,1% Gelatine (Sigma) in PBS, autoklaviert.

Gefäßboden beschichtet, nach 2 Std. Flüssigkeit entfernt und verwendet bzw.

Kulturgefäße in handelsüblicher Klarsichtfolie verpackt und bei RT gelagert.

Phosphatgepufferte Salzlösung:

verwendet für Waschschritte bei verschiedenen Anwendungen;
ohne Calciumchlorid und ohne Magnesiumchlorid (Gibco-BRL)

Konservierung der ES-Zellen:

nach Trypsinisierung und Zugabe von ES-Medium entsprechend Kulturgefäßvolumen
Hinzufügen von 2x Gefrierlösung (optimale Zelldichte: $5-10 \times 10^6$ /ml) und sofortiges Verpacken der Kryptubes oder 96er Mikrotiterplatten in Styroporbox mit Styroporfüllmaterial in -80°C Gefrierschrank.

Auftauen von ES- bzw. EFB-Zellen

Plazierung der Kryotubes bzw. 96er Mikrotiterplatten in 37°C Wasserbad nur solange, bis gerade aufgetaut und dann entsprechend Kulturbedingungen ausplattiert.

3.2.3 Elektroporation

Sie diente der Transfektion mit linearisierten *Targeting*-Konstrukten und folgte weitgehend der Versuchsanweisung von Bradley (*Methods in Enzymology*) [148]. Nur davon abweichende Schritte sind aufgelistet:

- 1:2 gesplittete ES-Zellen des Vortages (auf $4-8 \times 10^6$ Fibroblasten/10cm Petrischale) erhalten 3h vor der eigentlichen Elektroporation neues ES-Medium
- Zellkonzentration für Elektroporation: 1×10^7 /ml Elektroporationspuffer der Firma *Specialty Media*, NJ, USA
- Einstellungen des Bio-Rad Gene Pulser: 300V, 250 μ F
- Standardkultivierungsbedingungen für ES-Zellen mit Mediumwechsel alle 1-2 Tage

3.2.4 Klonisolation

Nach 8-12 Tagen ist die Wachstumsselektion abgeschlossen und ES-Zellkolonien sind mit bloßem Auge sichtbar. Alle Folgeschritte, transferieren, konservieren und testen der Kolonien, entsprechen exakt dem Protokoll in "*Methods in Enzymology*" und werden in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Dieses Verfahren hat entscheidende Vorteile: geringerer Materialverbrauch (Kulturgefäße, Medium), bessere Handhabung (Multipipettor), bessere Konzeption (schnelles Wachstum der Klone, geringer Zeitaufwand, viele Klone unter ähnlichen Bedingungen gehalten, Klone werden in Gruppen entsprechend einem Raster gehandhabt und nicht individuell betrachtet).

Ergänzung zu den Kultivierungsbedingungen: Schnell bzw. langsam wachsende ES-Zellkolonien wurden beim Transferieren von 10cm Platten auf 96er Mikrotiterplatten jeweils in Gruppen zusammengefaßt, um eine bessere Angleichung für die DNA-Präparation und Konservierung zu erreichen.

3.2.5 Chromosomen-Analyse

Verfahren wurde gemäß der Vorschrift in *Manipulating the Mouse Embryo: a laboratory manual* von Hogan et al., Seite 311-315 [154].

3.3 Mausproduktion

3.3.1 Blastocysten und Ammenmäuse

Ziel ist die Gewinnung von Blastocysten und die Bereitstellung von Ammenmäusen. Prinzip: durch Hormongaben wird in weiblichen Mäusen der Ovarialzyklus ausgelöst. PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*, Sigma) besitzt follikelstimulierende Aktivität, während hCG (*human chorionic Gonadotropin*, Sigma) die Ovulation steuert. Damit gelingt es, die Follikelreifung und den Eisprung der benötigten Weibchen zu synchronisieren und man erreicht höhere Ausbeuten an befruchtungsfähigen Eizellen in den Eileitern.

Kreuzung von hormonbehandelten C57BL/6 Weibchen mit geschlechtsreifen Männchen führte zu C57BL/6 Embryonen. Sie dienten als kompatible Wirte für 129 ES-Zellen.

Das Ausspülen dieser Embryonen aus den Ovidukten erfolgte gemäß dem Protokoll von Papaioannou und Johnson (*Gene Targeting a Practical Approach*) [153].

Embryonen, d.h. Blastocysten des 3,5ten Tages, werden nach Einbringen der ES-Zellen in einen neuen Wirt, in eine pseudoschwangere Ammenmaus transferiert. Diese Funktion übernahmen B6D2 Mäuse, F1-Nachkommen einer Kreuzung von C57BL/6 mit DBA. Diese F1-Mäuse haben sich bewährt im Austragen von Schwangerschaften und guter Versorgung ihrer Neugeborenen.

Nach Paarung mit vasektomierten Männchen (siehe hierzu ebenfalls Papaioannou und Johnson) [153] erhält man pseudoschwangere Weibchen.

Tab. 4 faßt die zeitliche Koordination zur Gewinnung von Blastocysten und die Bereitstellung von scheinträchtigen Mäusen zusammen. Die Uhrzeiten zur Superovulation beziehen sich auf einen 12-stündigen Tag/Nacht-Zyklus von 4:00 bis 16:00 Uhr.

Tag	Manipulationen	Mauslinie	Uhrzeit
Dienstag	Injektion von 0,1ml PMSG (7,5units)	C57BL/6	12:00
Donnerstag	Injektion von 0,1ml hCG (5,0units)	C57BL/6	10:00
Freitag	Kreuzung über Nacht	C57BL/6	8:00
	Überprüfung auf Vaginalpfropf		
	Separierung der Tiere		
Samstag	Kreuzung für Ammenmäuse	B6D2	
Sonntag	Überprüfung auf Vaginalpfropf	B6D2	
	Separierung der Tiere		
Montag	Ausspülen der Blastocysten	C57BL/6	
	Injizieren von ES-Zellen		
	Transplantieren injizierter		
	Blastocysten in Ammenmäuse		

Die weiteren Punkte beschreiben die einzelnen zur Anwendung gekommenen Verfahren.

3.3.2 Mikroinjektion

Die Manipulation der Blastocysten erfolgt mit einem relativ hohen apparativen Aufwand. Die Handhabung der Geräte ist prinzipiell einfach, benötigt aber einiges an Erfahrung und variiert mit dem verwendeten System.

Für den Transfer von ES-Zellen in Blastocysten wurde eine Mikroinjektionsanlage verwendet, die folgende Kernkomponenten besitzt:

- gedämpfter Arbeitstisch
- ein Umkehrmikroskop der Firma Nikon
- Mikromanipulatoren von Narashige zur Steuerung der Injektions- und Haltekapillare
- feinverstellbare Spritzen zur Druckverteilung in den Kapillaren
- gekühlte Injektionskammer mit Vertiefung

Für eine detaillierte Beschreibung der Mikromanipulation und der Herstellung von Kapillaren sei hier auf das Handbuch von Hogan et al. (*Manipulating the Mouse Embryo*) verwiesen [154].

ES-Zellen und Blastocysten wurden entsprechend der Vorschrift von Papaioannou und Johnson gehandhabt [153].

3.3.3 Embryotransfer

Die Implantation von mit ES-Zellen injizierten Blastozysten erfolgte beidseitig in die uterinen Hörner der Ammenmäuse. In der Regel wurden 6 Embryonen pro Horn implantiert, d.h. 12 Embryonen pro Maus.

3.3.4 Kreuzung von Chimären

Die C57BL/6 Embryonen besitzen ein Fellmarkergen, das rezessiv zum Agouti-Allel der injizierten 129Sv ES-Zellen ist und damit eine einfache Bewertung des chimären Nachwuchses erlaubt. Gewöhnlich wurden nur Tiere mit mehr als 95% veränderter Fellfarbe für Kreuzungen verwendet.

Der Test auf Transgenität der Mutation beruht auf der Weitergabe des mutierten Allels an die Folgegeneration durch männliche Chimären.

Als Kreuzungspartner dienten Weibchen der Mauslinien 129SvEv-Tac bzw. C57BL/6, deren Nachkommen durch PCR getestet wurden (siehe PCR im Methodenteil).

3.3.5 Etablierung des mutierten Allels

Aus oben aufgeführten Kreuzungen ergibt sich eine F1-Generation, in der beeinflusst durch den Grad der Keimbahnkolonisation der ES-Zellen, Tiere heterozygot für die Mutation sind, d.h. ein Allel des homologen Chromosomenpaares die Mutation trägt.

Erst durch F1x F1-Kreuzungen dieser heterozygoten Partner ergeben sich reinerbig mutierte Mäuse (*Knockout*-Mäuse) in einem Viertel der Nachkommen.

Es ist zu beachten, daß das Genom der ES-Zellen aus der Mauslinie 129SvEv stammt und nun in die Mauslinie 129SvEv bzw. C57BL/6 eingekreuzt wurde. Hieraus folgt eine uneinheitliche Verteilung der Allele der verschiedenen Mauslinien in der F2-Generation – man sagt auch, der genetische Hintergrund variiert.

Deshalb wurden Rückkreuzungen entsprechend der Vorschrift von Papaioannou und Johnson vorgenommen [153].

3.4 Analysen

3.4.1 Serum/Plasma

Probenmaterial wurde entsprechend den Angaben der Hersteller aufbereitet und getestet.

Wachstumshormon (GH)-Bestimmung durch das *Rat growth hormone (rGH) [¹²⁵I] assay system with magnetic separation* (Amersham)

Corticosteron –Bestimmung durch das *Corticosterone 125I RIA KIT* (ICN Biomedicals)

Thyroxin (T4) und Glukose wurden durch Anilytics, Inc., Gaithersburg, MD bestimmt.

Massenspektrometrie:

Sie erfolgte mittels des Gerätepaketes von Ciphergen Biosystems Inc., Palo Alto, USA () bestehend aus ProteinChips™, einem Massenspektrometer und einem Computer zur Steuerung der Einheit und Verarbeitung der Daten.

Die Ionisation geschah mittels Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisation durch den Transfer geladener Moleküle in die Gasphase, deren Geschwindigkeit bei gleicher Energie umgekehrt proportional zur Querschnittsfläche ihrer Masse ist. Masse und Flugzeit werden also korreliert (siehe Abb. 11).

Es wurden Proteinchips mit Anionen- und Kationenaustauscher-Eigenschaften verwendet. Zur Datenanalyse wurde die systemeigene Software verwendet. Anionen- und Kationenspektren für jeweils Wildtyp-Mäuse und Mutanten zusammengefaßt und verglichen und in Relation zueinander quantifiziert.

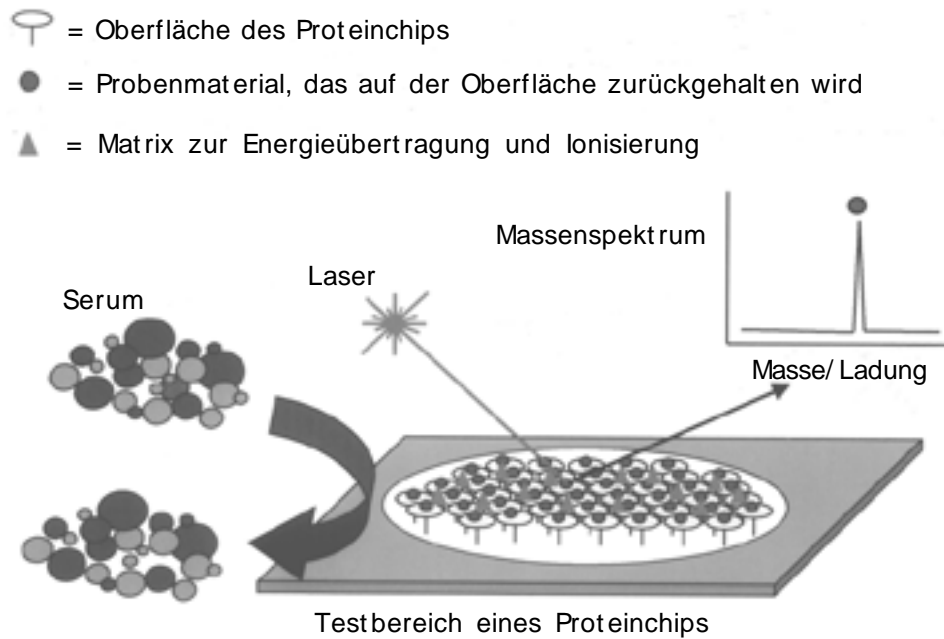


Abb. 11 Übersichtsschema: SELDI-Technologie

3.4.2 Morphologie

Gewebe wurde nach Perfusion in 10% gepuffertem Formalin gesammelt und in 20-fachem Volumen 10%igem gepuffertem Formalin aufbewahrt und dann in Parafinblocks fixiert, geschnitten und angefärbt entsprechend der Standardmethoden von American Histolabs, Inc., Gaithersburg, USA

3.4.3 Autoradiographie

Kryostat-Schnitte des Gehirns wurden inkubiert mit ^{125}I -markiertem SST-Peptid, gewaschen und auf Film exponiert. Das Vorgehen erfolgte nach Young und Kuhar [155].

3.4.5 Deoxy-Glukose

Mäuse wurden mit $0.2\mu\text{Ci}$ pro Gramm ^{14}C -Deoxy-Glukose intravenös (Schwanzvene) injiziert. Zwei Stunden später wurde das Gehirn präpariert und Blöcke koronaler Schnitte für Kryostat-Sektionierung hergestellt. Kryostat-Schnitte auf Objektträgern wurden dann auf Kodak Biomax MR Film exponiert.

3.4.6 Verhalten

Mäuse wurden unter Standardbedingungen mit einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Die Verhaltensexperimente entsprachen den NIMH/ACUC-Richtlinien. Zehn Wildtypen (7 männlich, 3 weiblich) und fünfzehn Mutanten (8 männlich, 7 weiblich) wurden zwischen der 8ten bis 16ten Lebenswoche getestet.

Die verschiedenen Verhaltensversuche wurden durchgeführt entsprechend der Beschreibung von Lijam und Paylor et al. 1997; Crawley und Paylor 1997 und Paylor et al. 1994 [156-158].

Näher aufgeführt sind hier Verfahren zur Eingrenzung des abweichenden Verhaltens von *Knockout*-Mäusen.

Rotarod: Typ: Ugo Basile, beschleunigend, Stabdurchmesser: 30mm, Apparatur von Stoelting (Modell 7650). Mäuse wurden in drei konsekutiven Testreihen (1h Intervall) einer Beschleunigung von 4 auf 40 U/min innerhalb von 5 Minuten ausgesetzt; die Verweilzeit auf dem Stab bestimmt.

Die gleiche Aparatur mit konstanter Geschwindigkeit (12U/min) innerhalb des 5 Minutenintervalles testete 5 Wildtypen und 10 Mutanten.

Wire-Hang Test: die Vorderpfoten der Mäuse wurden auf einen Draht mit 1mm Durchmesser plaziert und der Draht erhöht postiert. Die Zeitdauer, die sich die Maus am Draht halten konnte, wurde gemessen.

Vertical Pole Test: Eine Maus wird auf einen tuchbespannten Stab (1,9cm Durchmesser, Länge 43cm) plaziert, so daß sie nach Verlagerung des Stabes in eine vertikale Position nach oben schaut. Das Verhalten wird entsprechend eines Schlüssels in einer Punktwertung veranschaulicht.

- 0 = Balanceverlust bevor der Stab einen Winkel von 45° erreicht hat
- 1 = Balanceverlust bevor der Stab einen Winkel von 90° erreicht hat
- 2 = Balanceverlust nach 0 –10sec am vertikal positionierten Stab
- 3 = wie oben aber nach 11 – 20sec
- 4 = wie oben aber nach 21 – 30sec
- 5 = wie oben aber nach 31 – 40 sec
- 6 = wie oben aber nach 41 –50sec
- 7 = wie oben aber nach 51 – 60sec
- 8 = wie oben aber nach 60sec bis zur Hälfte des Stabes heruntergeklettert
- 9 = wie oben aber nach 60sec die unter Hälfte erreicht
- 10 = Herunterklettern vom Stab nach 51 – 60sec
- 11 = wie oben aber nach 41 – 50sec
- 12 = wie oben aber nach 31 – 40sec
- 13 = wie oben aber nach 21 – 30sec
- 14 = wie oben aber nach 11 – 20
- 15 = wie oben aber nach 1 – 10sec

Es erfolgte eine zweifache Analyse der Varianz; Student's t-Tests und Mann-Whitney u-Tests wurden verwendet, um die Daten von Wildtyp und Mutanten auf Signifikanz zu testen ($P < 0,05$) [157, 159].

4.0 Ergebnisse

4.1 Mutagenese in ES-Zellen

Embryonale Stammzellen dienen als Vehikel zur Einführung von Mutationen in die Keimbahn der Maus. Aus den klonierten Genen SST, SSTR3 und SSTR4 wurden Zielvektoren abgeleitet, die durch homologe Rekombination spezifisch das jeweilige Allel im Genom der ES-Zellen mutierten. Die Arbeitsschritte sind chronologisch im Übersichtsdiagramm (Abb. 12) dargestellt.

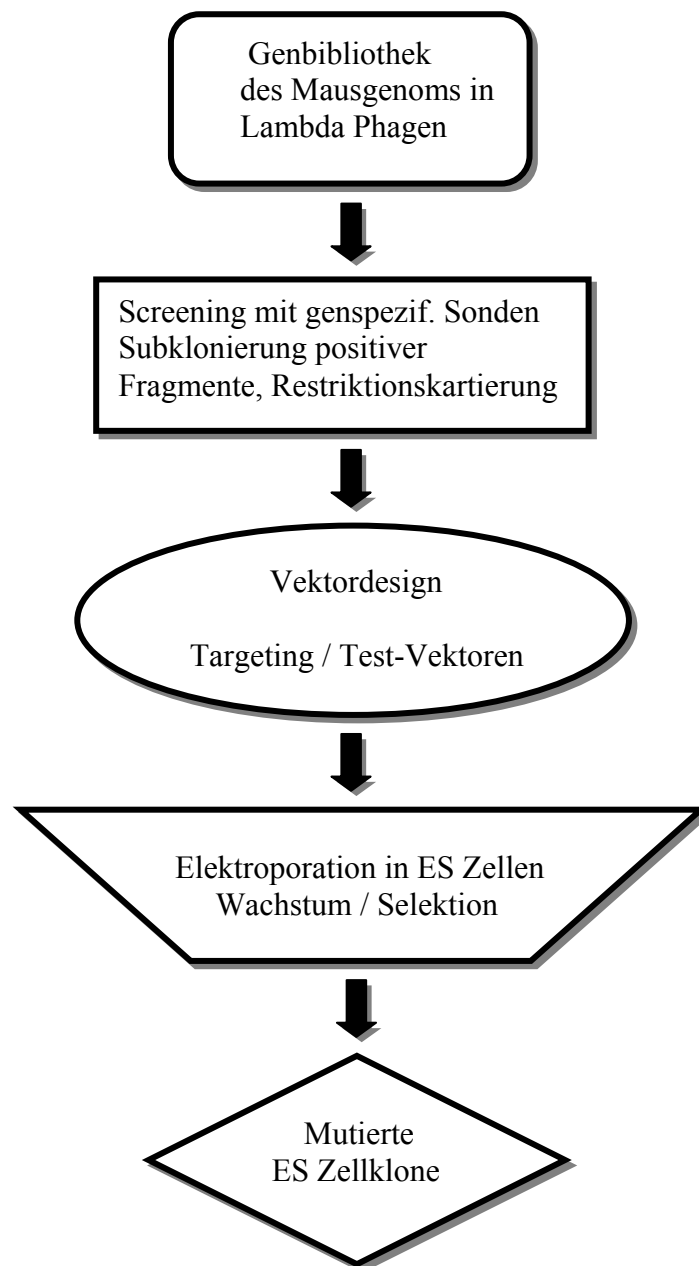


Abb. 12 Von der genomischen Sequenz zu mutierten ES-Zellen

4.1.1 Genomische Klone

Genomische Klone für SST, SSTR3 and SSTR4 wurden aus einer Phagen-Genbank isoliert. Die Genbank (Lambda Fix, Stratagene, La Jolla, California) enthält genomische DNA der Mauslinie 129Sv, der gleichen Mauslinie, aus der die benutzten embryonalen Stammzellen (ES) abgeleitet wurden.

Zur Isolation des Maus-SST-Gens [160] wurden 10^6 genomische Phagenklone mit einer SST-cDNA-Sonde hybridisiert. Ein das SST-Gen enthaltender genomischer Klon wurde identifiziert, gereinigt und zur DNA-Präparation benutzt.

Zur Isolierung der SST-Rezeptorgene wurde die folgende Strategie verfolgt: 10^6 genomische Phagenklone wurden mit einer Mischung von drei Oligonucleotid-Sonden (M1/2/3) hybridisiert. Die Sequenzen der Oligonucleotide waren jeweils identisch mit einer konservierten Region in der siebten transmembranen Domäne der zu dem Zeitpunkt bekannten Maus-SSTR-Gene 1, 2, und 3 [61, 66]. Dieses Experiment ergab die Identifizierung von genomischen Phagenklonen für die Mausgene von SSTR2, 3 und 4 [64]. Jeweils ein Phagenklon für SSTR3 und 4 wurde zur DNA-Präparation benutzt (Abb. 13.1). Für die jeweiligen Phagenklone wurden detaillierte Restriktionskarten erstellt unter Benutzung von Enzymen mit gut klonierbaren Schnitten (z.B. EcoRI, BamHI, Sall, HindIII, XbaI, XhoI, SacI, BglIII, KpnI, NotI). Restriktionsfragmente mit Längen geeignet für die verschiedenen Komponenten der Zielvektoren wurden subkloniert (Abb. 13.2)

Die Verteilung von Restriktionsstellen in der Genomsequenz wird im Zusammenhang mit dem Rekombinationsvorgang angegeben (siehe Abb. 14).

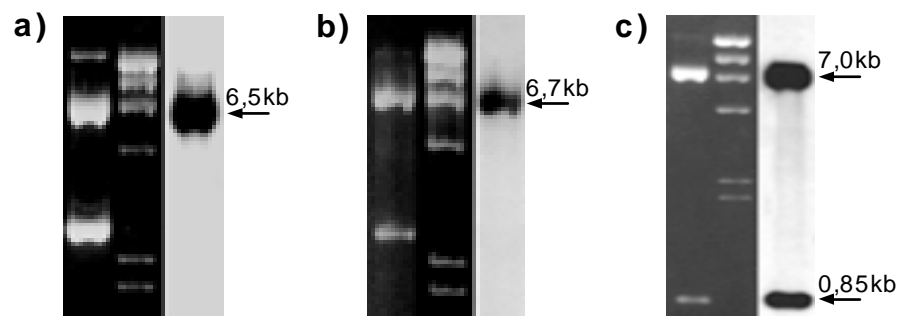


Abb. 13.1 Subklonierung der Zielgene

Gezeigt sind aus der Lambda-Genbank in pUC19 subklonierte Fragmente anhand von Restriktionen und Hybridisierungen, die SST(c) bzw. SSTR3(a) und SSTR4(b) plus genomische Sequenz beinhalten. Die Hybridisierung diente der Verifizierung der Gene (siehe Pfeile).

- a) SSTR3: ca. 6,5kb XbaI-Fragment beinhaltet SSTR3-Gen, Sonde: M3-Oligonucleotid
- b) SSTR4: ca. 6,7kb HindIII-Fragment beinhaltet SSTR4-Gen, Sonde: M1-Oligonucleotid
- c) SST: ca. 7,0kb HindIII- und 0,85kb HindIII-Fragmente mit SST-Sequenzen, Sonde: cDNA des SST-Gens der Ratte

Längenstandard: λ HindIII, jeweils in der Mitte

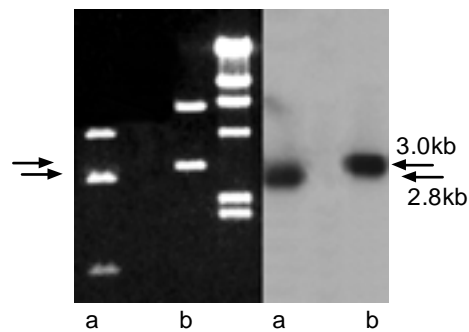


Abb. 13.2 Southernhybridisierung zur Bestimmung von Restriktionsstellen

Beispielhaft ist hier das methodische Vorgehen dargestellt. Verdeutlicht wird das Auftreten einer HincII-Schnittstelle in dem 3,0kb SacI-Fragment im 5'-Terminus des SSTR4-Subklons. Nach SacI/HincII-Doppelverdau (a) und Hybridisierung (a) mit einer 3,0kb SacI-Sonde ist die Verschiebung der verkürzten SacI-Bande im Vergleich zur SacI-Einzelrestriktion (b) und Hybridisierung zu sehen. Längenstandard: λ -HindIII in der Mitte.

4.1.2 Vektoren

Zwei Typen von Vektorkonstrukten sind jeweils erforderlich: ein Zielvektor für die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen und ein "Testvektor" als positive Kontrolle zur Identifizierung von homologen Rekombinationsereignissen durch PCR-Experimente. Das Design dieser Vektoren orientiert sich an den Erfordernissen einer Geninaktivierung durch homologe Rekombination und deren Nachweis. Sie entsprechen dem Grundtyp des *Replacement*-vektors, der nach folgendem Schema aufgebaut ist:

Zwei, das jeweilige Gen flankierende, genomische Fragmente dienen der Vermittlung der doppelreziproken, homologen Rekombination zwischen Vektor und Zielgen. Die Lokalisation der Vektorarme ist so gewählt, daß sie eine teilweise Deletion des Zielgenes bedingen. In ihrer Mitte befindet sich eine Neomycinkassette, die zwei Funktionen ausübt. Sie wirkt als Mutagen, indem sie den Leserahmen unterbricht, und sie ermöglicht die positive Selektion transfizierter embryonaler Stammzellen durch Expression des Selektionsmarkers Neomycin. Um eine stabile Selektion, unabhängig von der Expression des Zielgenes zu ermöglichen, beinhaltet die Neomycinkassette alle Elemente für ihre Aktivität (SV40-Enhancer, Thymidinkinase-Promotor).

Die die Neomycinkassette flankierenden genomischen Abschnitte sind von unterschiedlicher Länge: Ein DNA-Abschnitt ist so lang wie möglich, mindestens aber 4 kb („langer Vektorarm“). Die Mindestlänge für eine effiziente homologe Rekombination dieses Zielvektorarms ist empirisch definiert [161]. Der andere, „kurze“ Arm ist ein Kompromiß zwischen der minimal für die Rekombination erforderlichen Sequenz und einer Länge, die noch eine effiziente PCR erlaubt. Die PCR-Primer zur Identifizierung

des Rekombinationsereignisses starten von der Neomycinkassette und vom Ziellocus außerhalb des Zielvektors und umspannen somit die gesamte Länge des "kurzen Vektorarms" (siehe Abb. 14).

Tabelle 5 zeigt Basisdaten der *Targeting*-Vektoren.

Vektordaten	SST	SSTR3	SSTR4
Kurzer Arm	1.3 kb	1.7 kb	0.9 kb
Langer Arm	4.7 kb	6.5 kb	6.7 kb
Neo-Kassette	1.7 kb	1.7 kb	1.7 kb
Gen-Deletion	0.030 kb	0.427 kb	0.592 kb

Im Allelaustausch wurden Gene einschließlich benachbarter Sequenzen ersetzt. Die Identifizierung eines solchen homologen Rekombinationsvorganges erfolgt zunächst durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Da es sich hierbei um den Nachweis eines veränderten Allels im Gesamtgenom handelt, ist für die PCR eine Positivkontrolle notwendig. Diese Funktion übernahmen Testvektoren. Sie imitieren den Rekombinationsvorgang, indem sie neben der Neomycinkassette und den kurzen Vektorarmen auch deren benachbarte genomische Sequenzen beinhalten, was einem Rekombinationsvorgang des kurzen Vektorarms mit dem Ziellocus entspricht. Die Testvektoren stellen somit die komplementäre Sequenzen für den Funktionstest der Primerpaare als auch einen Größenmarker (PCR-Produkt) für einen korrekten Rekombinationsvorgang bereit (siehe Abb. 14).

Abb. 14 Übersichtsschema der Geninaktivierung (SST, SSTR3, SSTR4)

Veranschaulicht werden jeweils die Restriktionskarten der Wildtyp-Loci (a), *Targeting*- (b) und Testvektoren (d) als auch Beispiele zur Überprüfung der Rekombinationsvorgänge (PCR (e), Southern, dünne Linien) .

Für die Vektoren sind nur die relevanten Fragmente und Restriktionsenzyme, nicht jedoch die restlichen Plasmidabschnitte dargestellt. Es handelt sich bei ihnen um Derivate der pUC-Vektoren für SST und SSTR3 und des pBluescript-Vektors (Stratagene) für SSTR4.

Schwarze Balken bezeichnen die Gene bzw. Exons (für SST), graue Balken außerhalb liegende Genomsequenz. Die Neomycin-Selektionskassette in weiß dargestellt. Kleine Pfeile machen Bereiche , die in die *Targeting*-Vektoren eingebaut wurden, deutlich. Große Pfeile weisen auf den resultierenden, mutierten Locus hin. Kreuze verdeutlichen die Rekombination zwischen homologen Sequenzen der Vektoren und der Zielloci. Dünne Linien zeigen Sonden bzw. Restriktionsfragmente. Pfeile in den Testvektoren (d) bezeichnen die relativen Primerpositionen.

Im weiteren Verlauf wird mehrfach auf diese Abbildung zurückgegriffen.

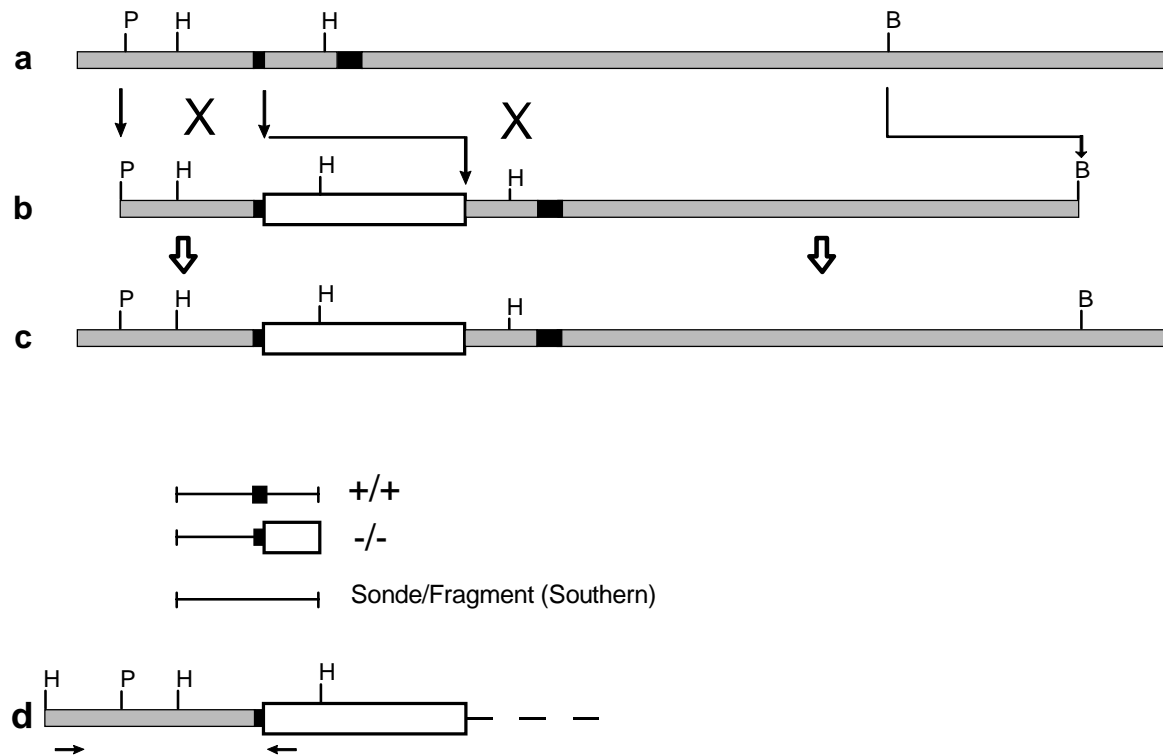


Abb. 14.1 Somatostatin

Schematische Darstellung des Wildtyp-Allels (zwei Exons, schwarz) (a), des SST-Zielvektors (b), des mutierten Allels (c) nach erfolgreicher homologer Rekombination. Testvektor (d) dient der PCR-Kontrolle. Für den Zielvektor wurde ein 1.3kb PstI-Fragment vor das 5'-Ende und ein 4.7kb PstI-BglIII-Fragment hinter das 3' Ende der Neomycinkassette kloniert. Die Insertion der Neomycinkassette in das SST-Gen verursachte eine Deletion von 30bp des Exon 1 und von 39bp des Intron 1. Im Testvektor ist das 1.3kb PstI-Fragment durch ein 1.8kb HindIII-PstI-Fragment ersetzt; dadurch enthält der Testvektor eine 500bp 5' verlängerte Sequenz im Vergleich zum Zielvektor. Die PCR-Primer sind 290bp vor dem 5'-Beginn und 40bp nach dem 3'-Ende des kurzen Arms lokalisiert; das PCR-Fragment im Falle homologer Rekombination ist somit 1.6kb.

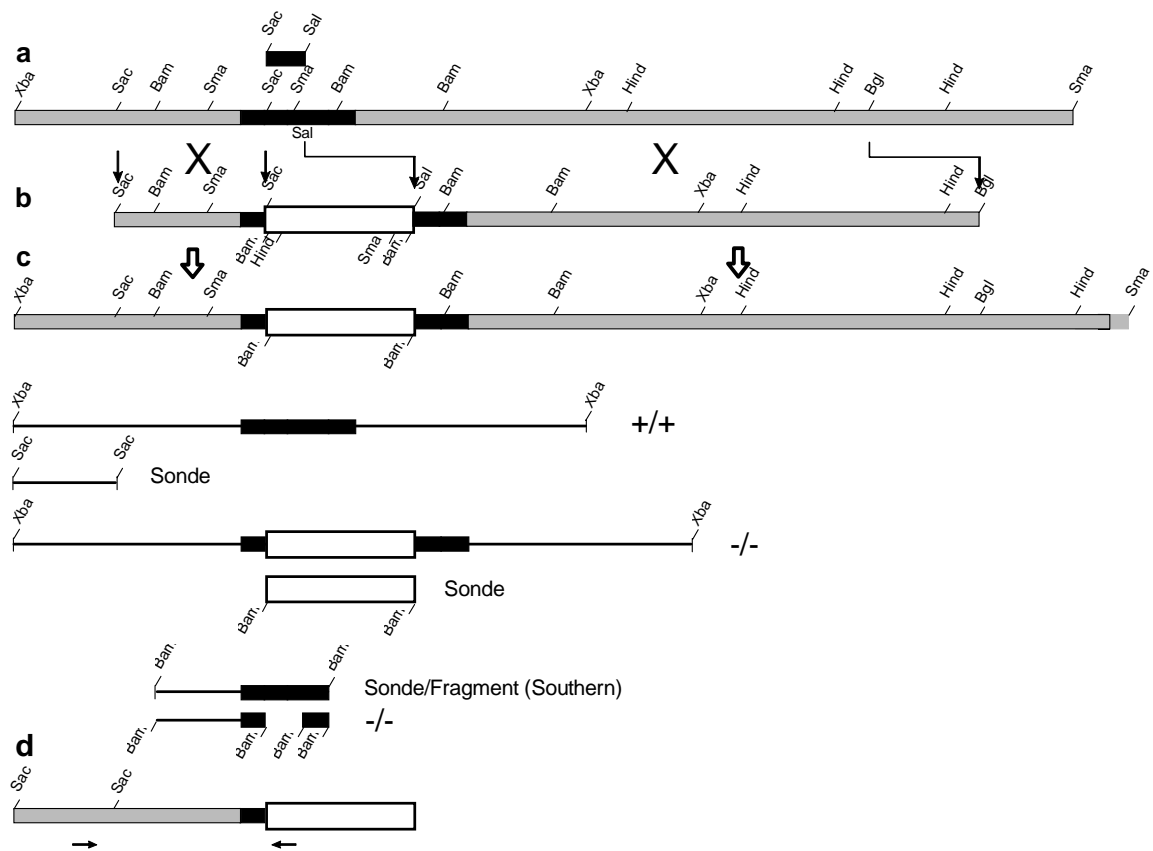


Abb. 14.2 SST-Rezeptor 3

Der Zielvektor (b) besteht hier aus einem 5' 1.7kb SacI-Fragment, das den kurzen Vektorarm und einem 3' 6.5kb SalI-BglIII-Fragment, welches den langen Vektorarm bildet. Die Neomycinkassette wird von beiden flankiert. Die Gendeletion (a, Sac-Sal-Fragment) beträgt hier 427bp in der durchgehenden Kodierungssequenz. Im Testvektor (d) ist der kurze Vektorarm um ein 1.1kb SacI-Fragment genomischer Sequenz verlängert. Innerhalb dieses Bereiches liegen die homologen Sequenzen für den außerhalb des *Targeting*-Konstrukts bindenden Primer. Der Referenzprimer hybridisiert in der Neomycinkassette. Aufgrund der räumlicher Nähe der Neo-Expressions-kassette und des Ziellokus nach erfolgter Rekombination (c) bzw. dem entsprechend im Testvektor (d) ergibt die PCR ein 1.8kb Fragment.

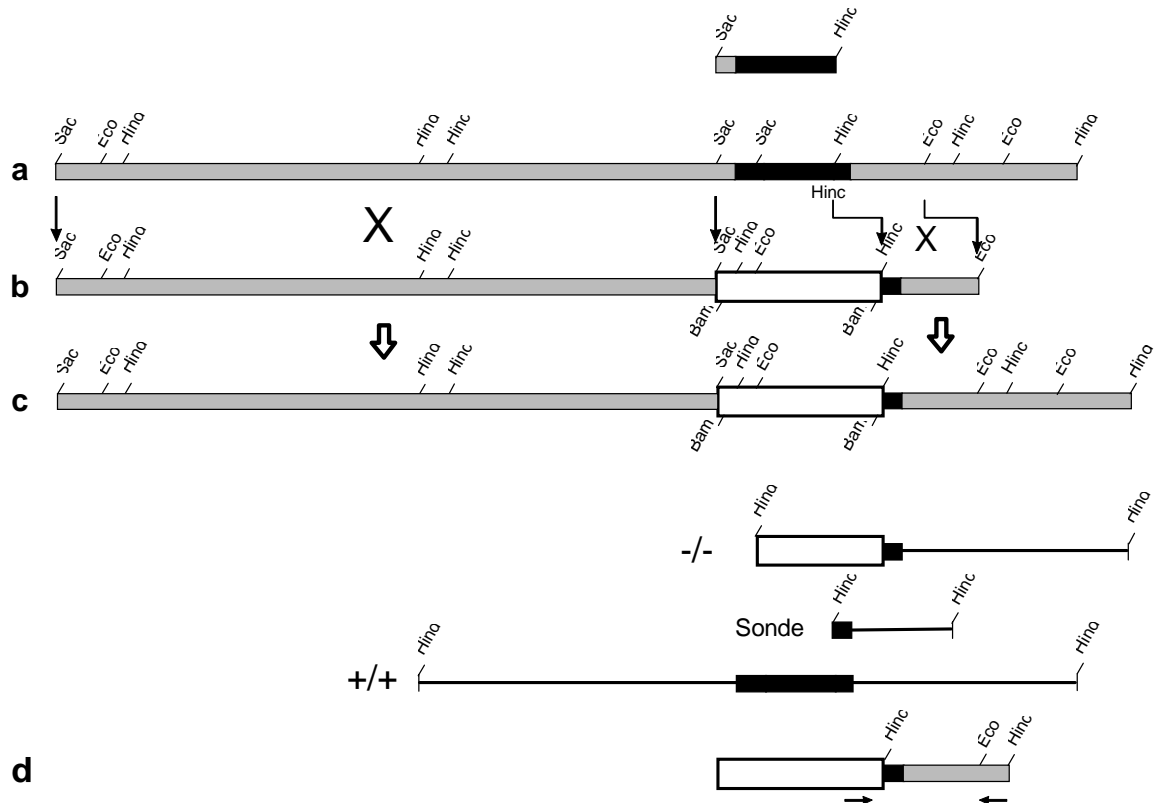


Abb. 14.3 SST-Rezeptor 4

Der Zielvektor (b) besteht hier aus einem 3' 0.9kb HincII-EcoRI-Fragment, das den kurzen Vektorarm und einem 5' SacI-Fragment, welches den langen Vektorarm bildet. Die prinzipielle Organisation des *Targeting*-Vektors stimmt mit der von SSTR3 überein. Die rekombinante Neomycinkassette unterbricht die intronlose Kodierungssequenz; zu ihren Seiten liegen die Vektorarme. Die Deletion beträgt 592bp (a, Sac-Hinc-Fragment). Der Testvektor (d) ist 3' bis zum HincII-Fragment verlängert, um homologe Bereiche für die Primer zum Test auf korrekte Rekombination bereitzustellen. Der Testvektor (d) bzw. rekombinate Klone (c) ergeben ein 1.1kb Fragment nach Amplifikation.

4.1.3 Transfektion und Selektion

Für die Transfektion von ES-Zellen durch Elektroporation wurden hochgereinigte DNA-Präparationen der entsprechenden Zielvektoren hergestellt. Jeweils 10^7 ES-Zellen wurden mit 20 μg linearisierter Plasmid-DNA transfiziert. Nach Elektroporation der ES-Zellen mit den Zielkonstrukten erfolgte zunächst eine positive Selektion mit Geneticin (G418). ES-Zellen, die keine stabile Vektorintegration in ihr Genom vorwiesen, wurden im Zeitraum von 4 bis 8 Tagen durch das Antibiotikum abgetötet. Lebensfähige Zellen, also solche, die die Neomycinkassette in ihr Genom integriert hatten, wuchsen in 8 bis 12 Tagen zu Kolonien heran. Individuelle Kolonien wurden isoliert und weiter kultiviert und schließlich kryokonserviert. Parallel wurde für die PCR-Analyse von allen Klonen DNA präpariert.

Tab. 6 Zusammenfassung der Ergebnisse der drei Zielloci.

Ziellocus	Elektroporierte ES-Zellen	Selektionierte ES-Zellen (Neomycin)	Positive ES-Zellklone (PCR)
SST	5×10^7	455	20
SSTR3	4×10^7	400	2
SSTR4	8×10^7	800	2

Die Häufigkeit einer homologen Rekombination (PCR-positiv getestete ES-Zellen) gegenüber einer heterologen (Neomycin-resistente ES-Zellen) kann im günstigen Fall von 1:10 oder mehr, im ungünstigen Fall bis zu 1:10000 oder weniger reichen. Alle Ursachen für diese Unterschiede sind nicht bekannt; Hauptfaktor ist jedoch der Ziellocus im Genom. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Frequenzen homologer Rekombinationsereignisse sollte man beachten, daß die Wahrscheinlichkeit, einen positiven ES-Zellklon zu finden, von Größen wie Transformationsrate, überlebende ES-Zellen nach Elektroporation und Zuverlässigkeit der Testmethoden beeinflusst wird.

4.1.4 Identifizierung und Verifizierung

Die gezielte homologe Rekombination führt zu einer Umstrukturierung des Ziellocus durch Integration der Neomycinkassette im Deletionsbereich. Damit kommt es zu einer Anordnung, in der die Neomycinkassette eine genau definierte Position zu außerhalb des Zielvektors gelegenen Wildtyp-Sequenzen einnimmt. Dies läßt sich nun nutzen, um transfizierte ES-Zellklone durch PCR auf ein homologes Rekombinationsereignis hin zu untersuchen. Dazu wurden Primer in der Neomycinkassette und in genomischen Abschnitten außerhalb der kurzen Vektorarme gewählt (siehe Abb. 14). Nur eine homologe Integration des Zielvektors führt zu exponentieller Amplifizierung des zwischen diesen Primern gelegenen DNA-Abschnittes. Zielvektor allein oder

genomischer Ziellocus allein (jeweils im Falle nicht-homologer Integration) führen nur zu linearer Amplifizierung und damit zu einem nicht sichtbaren PCR-Fragment.

Der PCR-Test dient der ersten Identifizierung von ES-Zellklonen mit homologer Rekombination. Dieser Test schließt heterologe Vorgänge an anderen Stellen im Genom nicht aus. Zu diesem Zweck erfolgten Restriktionsverdau und Southernhybridisierungen (Abb. 16). Zufällige Vektorintegrationen liefern zusätzliche Fragmente, die von der erwarteten definierten Länge abweichen und deshalb in der Hybridisierung als distinkte Banden sichtbar werden. So hatten zum Beispiel in der gezielten Mutagenese des SST-Locus 7 der 20 PCR-positiven Klone eine oder mehrere heterologe Integrationen des Zielvektors (siehe Abb. 15). Diese Klone sind nicht geeignet zur Etablierung von mutanten Mauslinien, da eine solche heterologe Integration selbst zu einer Mutation in einem anderen Gen führen kann und damit zum Phänotyp der Mausmutante beitragen würde.

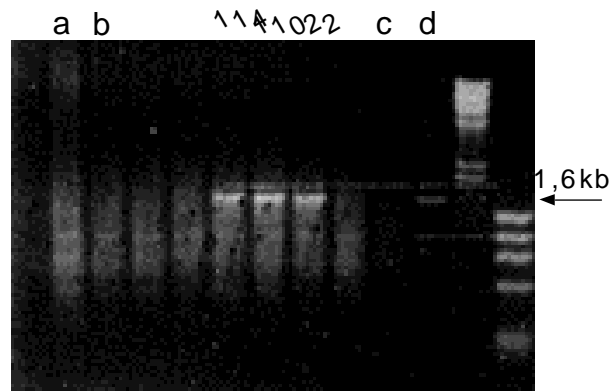


Abb. 15.1 PCR-positive ES-Zellklone

Zu sehen sind hier die 1.6kb PCR-Produkte spezifisch für den Rekombinationsvorgang zwischen dem Somatostatin-Gen und seinem Zielvektor. Als Negativkontrollen sind hier H₂O (a), DNA embryonaler Fibroblasten (b), genomische DNA der Mauslinie 129 SvEv (c) und als Positivkontrolle Somatostatin-Testkonstrukt (d) verwendet. Klone Nr. 114/110/22 sind PCR-positiv (1,6kb Bande)



Abb. 15.2 Screeningvorgang für SSTR3-Targeting durch PCR und Hybridisierung

Das Testkonstrukt ist hier in den Lambda-Marker gemixt und gibt ein PCR-Signal (a), das auf gleicher Höhe (1,8kb) mit dem positiven Klon (a) liegt. Die Hybridisierung (b) überprüft zusätzlich die Identität der PCR-Produkte. Primer: MB4L/125. Sonde: Primer 44 (Sequenz innerhalb des kurzen Vektorarms).

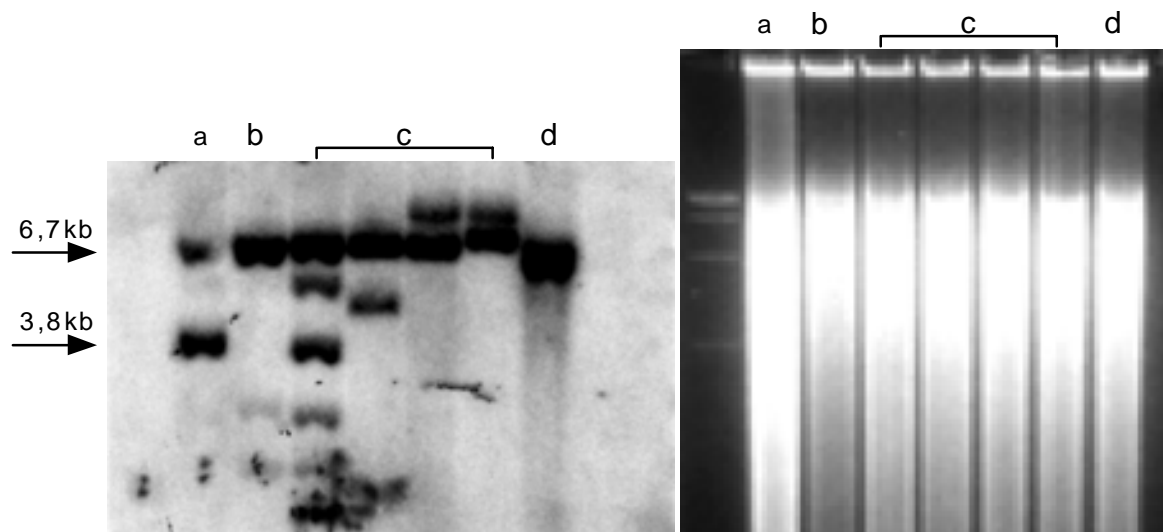


Abb. 16 ES-Zellklon positiv in der Southernhybridisierung

PCR-positive ES-Zellklone wurden in Kultur expandiert und hochmolekulare DNA wurde präpariert. Ein Restriktionsverdau mit HindIII wurde durchgeführt (Foto, rechts), die DNA (ES-Zelle, *SSTR4-Targeting*) vom Gel auf eine Nylonmembran transferiert, und diese dann mit einer radioaktiv markierten Sonde (1.1kb HincII-Fragment) hybridisiert (Foto, links). Die 3.8kb Bande entsteht bei homologer Rekombination und repräsentiert das mutierte Allel, während die 6.7kb Bande sich aus dem Wildtyp-Allel ableitet (siehe Abb. 14, Restriktionsfragmente und Sonden als dünnen Linien hervorgehoben). Rekombinante ES-Zellen (*SSTR4-Targeting*) sind heterozygot für diese Allele und zeigen diese Banden in der Hybridisierung (a). Andere Klone besitzen nur die Wildtyp (b,d) oder auch zusätzliche Fragmente wegen inkorrektter Integrationen des Zielvektors (c).

4.1.5 Karyotyp-Analyse

Bevor ES-Zellklone zur Etablierung von Mauslinien benutzt werden, sollten sie auf ihre Chromosomenzahl hin untersucht werden. Eine euploide Mauszelle hat 40 Chromosomen. Häufige Passagen in Zellkultur können zur Selektion von Zellklonen mit nicht-euploiden Chromosomensätzen führen. Diese aneuploiden Zellen können in der Regel nicht mehr zur Keimzellenbildung in Chimären beitragen und sind somit nicht geeignet, mutante Mauslinien zu etablieren. Daher wurden die ES-Zellklone, die zur Injektion in Blastocysten benutzt werden sollten, einer Chromosomenanalyse unterzogen. Durch Colcemidbehandlung von ES-Zellen wurden Metaphasenpräparationen hergestellt. Die Chromosomen wurden durch Giemsa-Färbung sichtbar gemacht und gezählt. Alle untersuchten Zellklone hatten einen euploiden Chromosomensatz von 40. Ein Beispiel ist in der folgenden Abbildung gezeigt.



Abb. 17 Chromosomensatz einer euploiden ES-Zelle der Maus

4.2 Generation von Mausmutanten

Aus genetisch manipulierten ES-Zellen wurden Mauschimären produziert, deren Nachkommen reinerbig mutierte Mauslinien ergaben.

Die gezielte Mutagenese in ES-Zellen veränderte nur eines der beiden Allele im ES-Zellgenom. Die ES-Zellen sind also heterozygot für die Mutation. Nach ihrer Injektion in Blastocysten und Implantation dieser Embryonen in pseudoschwangere Ammenmäuse war es notwendig, die erhaltenen chimären Mäuse auf Vererbbarkeit der Mutation durch ihre Keimzellen zu testen. War dies der Fall, wurde durch Kreuzung die Homozygotie des mutierten Locus hergestellt (siehe Abb. 18).

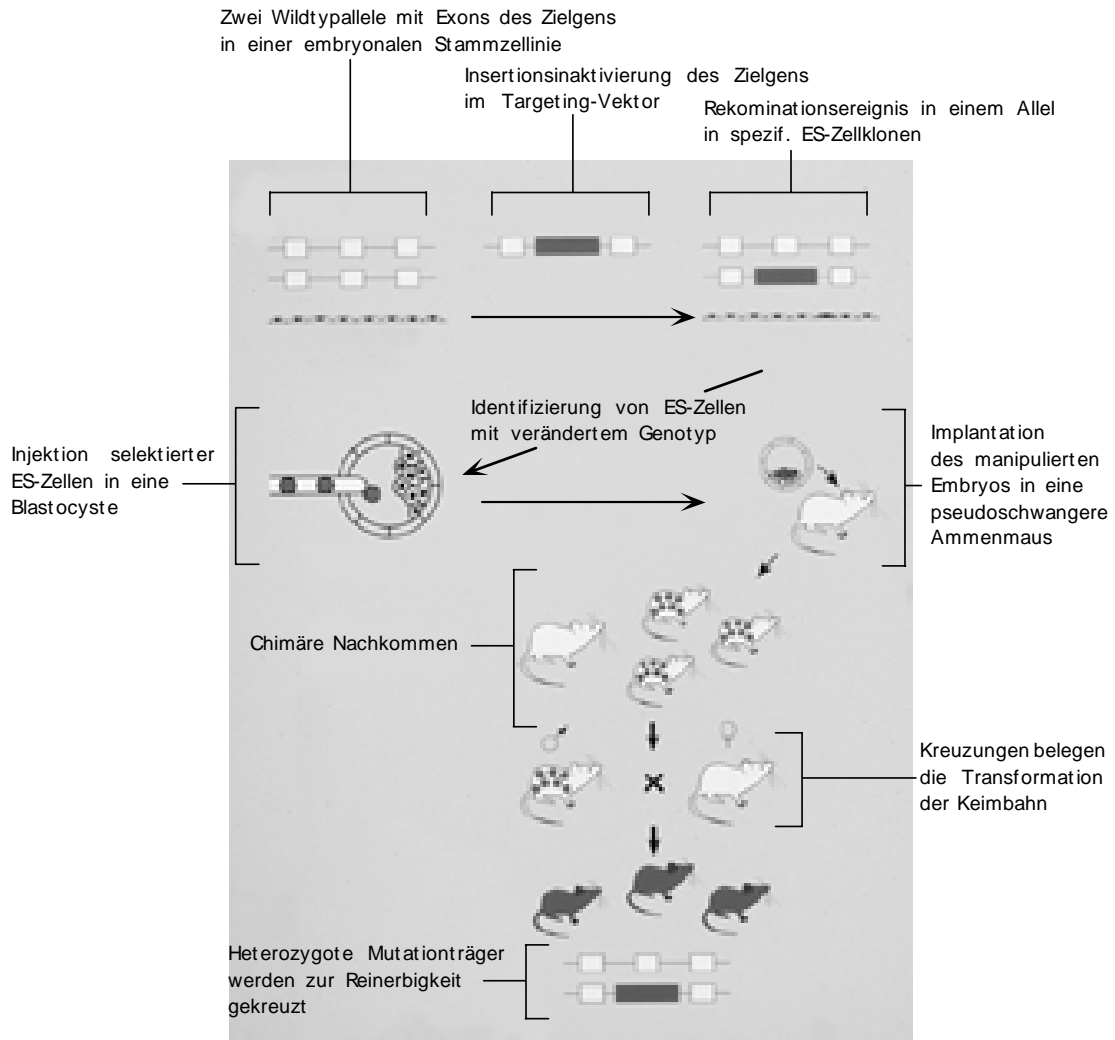


Abb. 18 Von der mutierten ES-Zelle zur *Knockout*-Maus

Dokumentiert sind die einzelnen Schritte, jedes Zwischenergebnis wird in den jeweiligen Gliederungspunkten kurz aufgeführt.

4.2.1 Injektion von ES-Zellen

Blastocysten, d.h. Embryonen 3.5 Tage nach der Befruchtung, wurden aus den Uterushörnern der Spendertiere herausgespült und mit Hilfe von Mikromanipulatoren unter dem Mikroskop mit ES-Zellen injiziert. Das Foto zeigt die Platzierung von ES-Zellen im Blastocoel. Im Durchschnitt wurden 15 bis 20 ES-Zellen pro Blastocyst injiziert.

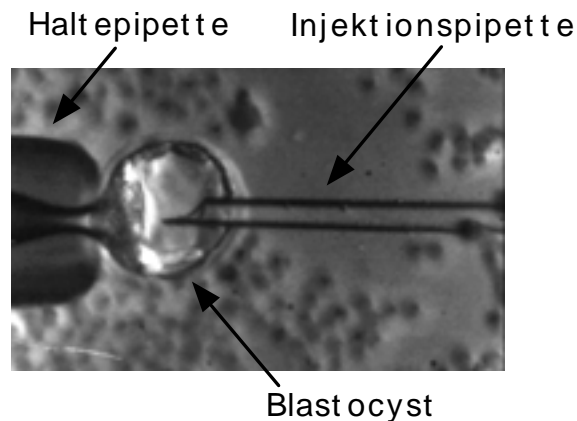


Abb. 19 Blastocysteninjektion

4.2.2 Embryonentransfer

Durch Paarung mit sterilen Männchen wurden Weibchen zu Ammenmäusen, die als Rezipienten für die injizierten Embryonen (Blastocysten) dienen. Die Kopulation induziert Hormonsignale, die einem Befruchtungsvorgang entsprechen und so die Mäuse in einen Zustand der Pseudoschwangerschaft versetzen. Damit wird der Reproduktionstrakt für Embryonen vorbereitet. Am 2.5ten Tag der Pseudoschwangerschaft erfolgte der Transfer 3.5 Tage alter Blastocysten in die beiden Uterushörner der weiblichen Ammenmäuse. Aufgrund der Manipulationen werden die Blastocysten in ihrer Entwicklung angehalten; daher implantieren sie besser in Ammenmäusen am 2.5ten Tag der Schwangerschaft (statt am 3.5ten Tag). Sechs Embryonen wurden in jedes Uterushorn plaziert. Nach erfolgreichem Embryonentransfer wurden nach 19 bis 21 Tagen Tragzeit Mauschimären geboren.

4.2.3 Testen von Chimären

Mauschimären sind genetische Mosaik, d.h. Individuen, deren Gewebe aus Zellen zwei verschiedener Genomtypen aufgebaut sind. Zum einen sind die embryonalen Zellen des Wirtembryos (C57BL/6) mit normalem Wildtyp-Genom, zum andern die implantierten ES-Zellen (129SvEv) mit heterozygotem, rekombinatem Genom an der Ontogenese

beteiligt. Die beiden Mauslinien, die Wirtsembryo- und die ES-Zellen, unterscheiden sich unter anderem auch in der Kodierung der Fellfarbe: C57BL/6 sind schwarz und 129SvEv sind agouti, wobei "agouti" dominant ist über "schwarz". Dieser Unterschied läßt sich nutzen, um den Beitrag, den mutierte ES-Zellen zur Entwicklung geleistet haben, abzuschätzen. Ein Fellmuster, das zu mehr als 80% "agouti" ist, also auf mutierten ES-Zellen beruht, ist ein gutes Indiz für einen hohen Entwicklungseinfluß dieser Stammzellen am Gesamtorganismus.

Mutierte ES-Zellen tragen außer zur Fellfarbe natürlich auch zu allen Organen der sich entwickelnden Maus bei, einschließlich der Keimbahn. Ihre Entwicklungsrichtung kann durch den männlichen Genotyp der verwendeten ES-Zellen dirigiert werden. Ist der Wirtsembryo männlich, formt sich ein genetisches Mosaik der Keimbahn. Die sich bildenden Gameten sind männlich und tragen gemäß dem Ausmaß der ES-Zell-Kolonisierung den haploiden Chromosomensatz des Wirtsembryos oder des ES-Zellgenoms. Ist der Wirtsembryo weiblich und die männlichen ES-Zellen kolonisieren die Keimbahnanlage, dann steuern die ES-Zellen die Geschlechtsdifferenzierung der Chimären, da das Y-Chromosom der ES-Zellen die Keimbahnanlage in den männlichen Phänotyp zwingt. In diesem Fall sind die sich bildenden Gameten männlich und alle tragen den haploiden Genomsatz der ES-Zellen.

Der Nachweis für eine gelungene Keimbahntransformation liegt in der Weitergabe des ES-Zellgenoms durch männliche Gameten auf die Folgegeneration. Dazu wird wieder die Fellfarbe als Indikator genutzt. Männliche Chimären werden mit weiblichen C57BL/6 Mäusen gepaart. Finden sich unter den resultierenden Nachkommen Mäuse mit der agouti Fellfarbe, ist die Keimbahn der betreffenden Chimäre transformiert, da der dominante agouti Marker nur von den ES-Zellen stammen kann.

Tabelle 7 faßt die Resultate zur Erzeugung von Mauschimären zusammen.

Ziellocus	ES-Zellen (injizierte Klone)	Mauschimären (männliche)	Mauschimären (mit Keimbahn- transformation)
SST	#250	4	0
	#441	0	0
	#328	13	8
SSTR3	#1	1	1
	#3	26	7
SSTR4	#6	23	5
	#170	22	0

Erläuterung: Die Beteiligung der ES-Zellen an der Fellfarbe war 90 bis 100% für diejenigen Chimären, die letztendlich eine transformierte Keimbahn aufwiesen. Chimären von den gleichen ES-Zellklonen, deren Keimbahn jedoch nicht transformiert war, hatten eine Beteiligung von 15 bis 100 % der "agouti"-Farbe des Fells. Zellklone, die in keinem Fall eine Keimbahntransformation zeigten, hatten im Durchschnitt einen geringeren "agouti"-Anteil im Fell (20-60%). Es ist anzunehmen, daß diese ES-Klone einen größeren Anteil bereits differenzierter, somit nicht länger pluripotenter Stammzellen hatten.

4.2.4 Etablieren von Mutantenlinien

Die gewünschte Mutation ist auf einem Allel des 129SvEv Genoms. Um eine reinerbige Mutantenlinie zu etablieren, wurden die Chimären mit weiblichen 129SvEv Wildtyp-Mäusen gekreuzt. Träger der Mutation wurden durch Genotyp-Bestimmung identifiziert. Hierzu wurde von dem Ende der Maus-Schwanzspitze DNA präpariert und einer PCR-Analyse mit Primern für das Neomycin-Gen unterzogen. Positive DNA indizierte einen heterozygoten Träger des *Knockout*-Allels. Um die Mutantenlinie zu erhalten, wurden männliche Träger fortlaufend mit 129SvEv Wildtyp-Weibchen gekreuzt. Um homozygote Mutanten zu erhalten, wurden heterozygote Männchen und Weibchen gekreuzt.

Auf lange Sicht ist es auch sinnvoll, eine Mutation in einer anderen reinerbigen Mauslinie zu haben, z. B. C57BL/6. Drei Gründe sind anzuführen:

Erstens lassen sich die Phänotypen in zwei reinerbigen Linien vergleichen, was Aufschlüsse über genomspezifische Einwirkungen (genetischer Hintergrund) für die phänotypische Ausprägung des mutierten Locus gibt.

Zweitens erzielen verschiedene Mauslinien insbesondere in verhaltensbiologischen Tests durchaus unterschiedliche Ergebnisse [158], was mögliche Einwirkungen des mutierten Locus auf ein bestimmtes Verhalten in einer Mauslinie verdecken, in der anderen Mauslinie aber aufdecken könnte.

Drittens sind eine Anzahl von induzierten Mausmutanten nur als C57BL/6-Linien verfügbar. In diesen Fällen lassen sich dann die entsprechenden Mausmutanten bei Kreuzungen reinerbig erhalten.

Aus diesen Gründen wurden die drei Chimären (SST, SSTR3, SSTR4) außer mit 129SvEv Weibchen auch mit C57BL/6 Wildtyp-Weibchen gekreuzt. Träger des mutierten Allels wurden wie oben beschrieben durch Genotyp-Bestimmung identifiziert. Männliche Träger wurden mit C57BL/6 Wildtyp-Weibchen zurückgekreuzt und deren männliche Nachkommen auf Trägerschaft des mutierten Locus untersucht und wiederum zurückgekreuzt usw..

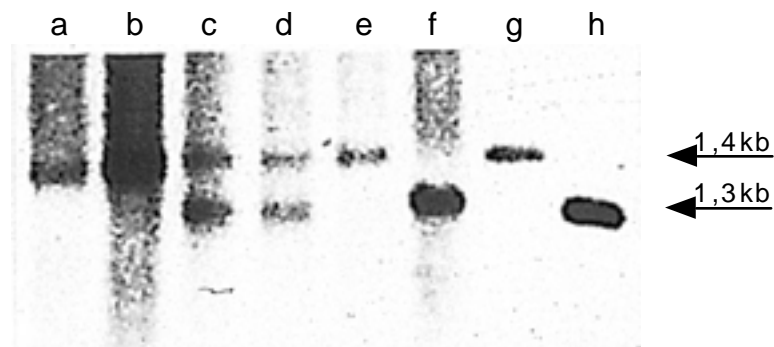
Nach ungefähr 10 Generationen von Rückkreuzungen kann angenommen werden, daß der mutierte Locus in reinem C57BL/6 Genom integriert ist.

4.2.5 Verifizierung der Nullmutanten

Durch Paarung heterozygoter Männchen und Weibchen wurden Nachkommen erzeugt, die die gewünschte Mutation auf beiden Allelen tragen, also homozygot mutiert sind. In diese Nullmutanten wurde auf drei Ebenen die korrekte Ausschaltung des mutierten Gens verifiziert.

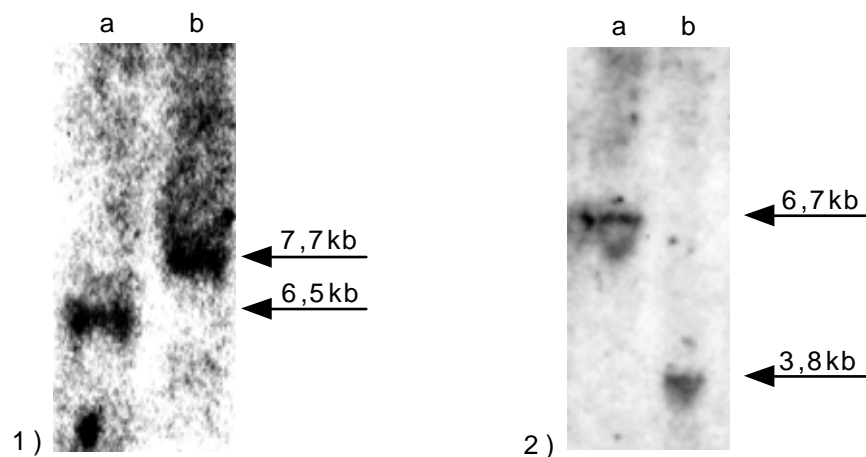
Restriktionen und Southernhybridisierungen von Wildtyp- bzw. heterozygot oder homozygot mutierter Mäuse dienten der Überprüfung der Umstrukturierung des Ziellocus. Abb. 20 zeigt informative Southernhybridisierungen für die drei Zielloci SST, SSTR3 und SSTR4 (vergleiche mit Abb. 14).

Abb. 20.1 HindIII-Verdau und Southernhybridisierung (siehe auch Abb. 14)



Kontrollen: a = C57BL/6 Mäuse, b = 129SvEv Mäuse, g = normales Gen im Phagenklon, h = Testkonstrukt
c, d = heterozygoter Mutationsträger, e = Wildtyp (normales Gen), f = homozygoter Mutationsträger

Abb. 20.2 SSTR3 und SSTR4 Restriktion und Southernhybridisierung



1) SSTR3: Xba-Verdau, a) Wildtyp, b) homozygoter Mutationsträger
2) SSTR4: HindIII-Verdau, a) Wildtyp, b) homozygoter Mutationsträger

Die Inaktivierung der Transkription des mutierten Gens wurde durch Northern-Analyse (SST) und Reverse Transkriptions-PCR (SSTR3 und 4) überprüft. In allen drei Loci führte die gezielte Mutation des Gens zu einem Ausfall der Transkription und somit zu keinem *Messenger-RNA*-Produkt. Abb. 21 zeigt die Resultate der Northern-Hybridisierungen bzw. RT/PCRs.

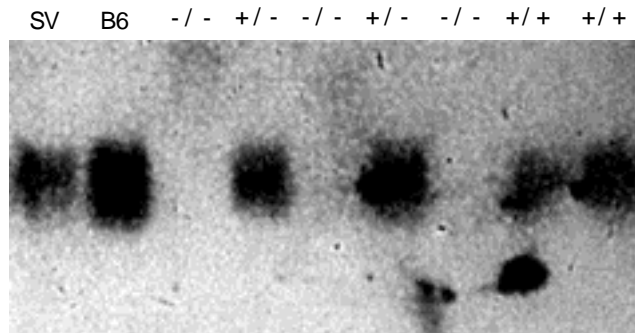


Abb. 21.1 Northern-Verifizierung (SST-*Knockout*)

Mit plus und minus ist jeweils der Genotyp bezeichnet. SV steht für die Mauslinie 129SV und B6 für die Linie C57BL/6. In den Mutanten wurde kein Transkript detektiert. Als Probe wurde radioaktive SST-cDNA benutzt, die mit beiden Exons hybridisiert.

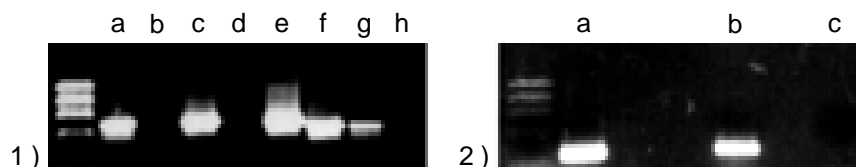


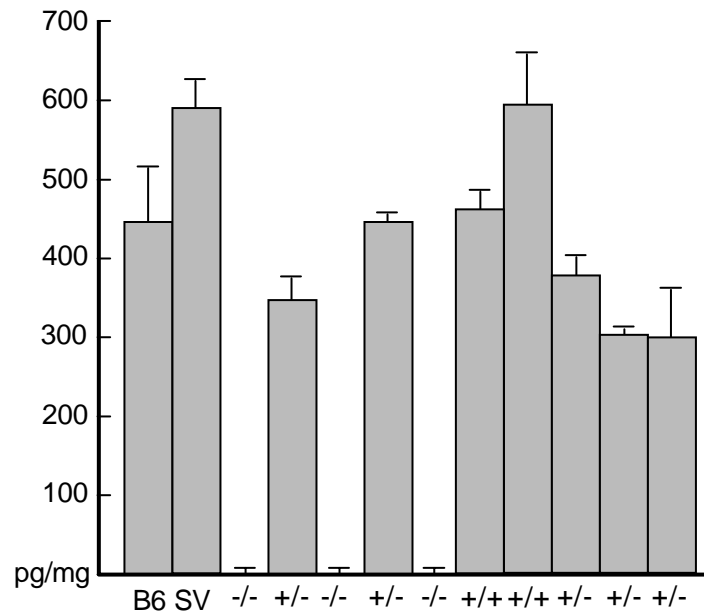
Abb. 21.2 Verifizierung durch RT/PCR

Als Kontrollen wurde verwendet: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase spezifische Primer in Exon 11 und 13 als Test auf Verunreinigung mit DNA (in dieser Abb. nicht gezeigt), Wildtyp-DNA als Positivkontrolle für alle verwendeten Primer (1: a=Neo, f=SSTR3-Deletion und 2: a=SSTR4-Deletion). Verifizierung des Genotyps und der RT/PCR durch Neomycin spezifische Primer anhand der cDNA (1: b=++, c=SSTR3 - -, d=++, e=SSTR4- -). Mutanten zeigen Banden, Wildtypen nicht.

Die Existenz funktionsfähiger Transkripte (Wildtyp-Allel ohne Gen-Deletion) wurde für die mutierten Allele SSTR3 (1) und SSTR4 (2) ausgeschlossen, da in ihrer Deletions-region Wildtypprimer nicht mehr binden können und somit eine Bande fehlt (1: h=SSTR3 - - und 2: c=SSTR4 - -). Ergebnis: Weder für den SSTR3- noch für den SSTR4-*Knockout* sind Transkripte nachweisbar (Primer spezifisch für die jeweils deletierte Region).

Zusätzlich wurde für das mutierte Somatostatin-Gen der Ausfall des Peptids sichergestellt. Ein *Radioimmunoassay* mit homogenisiertem Mittelgehirn zeigte ein völliges Fehlen von SST-Peptid in Nullmutanten. Abb. 22 stellt die Ergebnisse des RIA graphisch dar.

Abb. 22 Radioimmunoassay für SST



4.3 Analyse des Phänotyps

Die Analyse des Effektes einer Genmutation auf den Gesamtorganismus orientiert sich zunächst an der Frage: ist die homozygote Mutante lebensfähig; falls ja, lassen sich grobe Ausfälle, morphologisch oder im Verhalten beobachten? Wenn dies nicht der Fall ist, erfolgt eine an Hypothesen orientierte Analyse. Das Wissen aus Experimenten verschiedener Forschungsgebiete hat zu Annahmen zur Genfunktion geführt, die nun in der mutierten Maus getestet werden. Die umfassendste Untersuchung erfolgt schließlich durch eine systematische, hypothesenfreie Analyse. Da Annahmen über die Funktion eines Proteins immer begrenzt sind durch die wiederum hypothesengeleitete Auswahl der Experimente, kann eine ungerichtete, systematische Untersuchung neue und unerwartete Aspekte über die Funktion eines Gens bzw. Proteins aufdecken.

Im folgenden wird die phänotypische Analyse der Somatostatin-Nullmutanten in umfassender Weise dargestellt.

4.3.1 Beobachtung

Alle drei Nullmutanten sind lebensfähig. Keiner der drei Typen von Nullmutanten zeigt offensichtliche Veränderungen im Wachstum, Verhalten, Gesundheitszustand oder der Fortpflanzungsfähigkeit. Unter gegebenen, pathogenfreien Haltungsbedingungen unterscheiden sich die *Knockout*-Mäuse nicht vom Wildtyp.

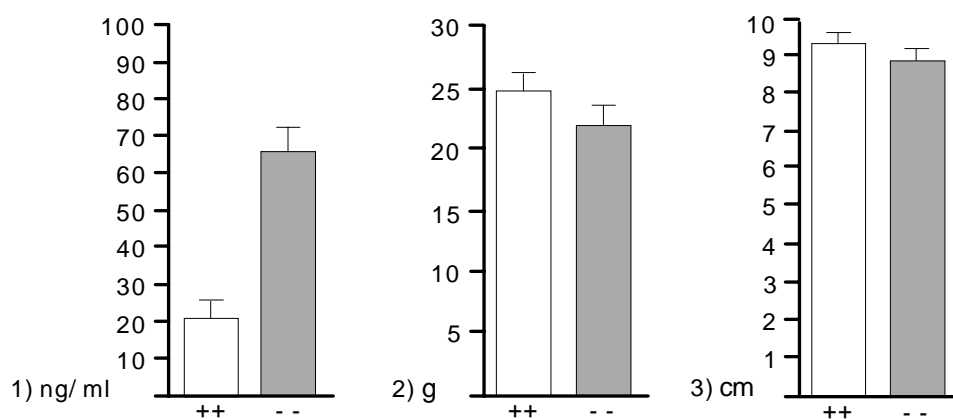
Damit ist belegt: Weder Somatostatin noch seine Rezeptoren 3 und 4 erfüllen eine lebensnotwendige Funktion in der Entwicklung der Maus; phänotypische Konsequenzen des Ausfalls von SST oder seiner Rezeptoren 3 und 4 entziehen sich der direkten Beobachtung.

Aus diesem Grund wurden zunächst physiologische Parameter getestet, um bekannte Effekte Somatostatins nun am Gesamtorganismus zu beurteilen.

4.3.2 Endokrinologie

Ausgangspunkt bildete die historische Definition Somatostatins als Hemmfaktor der Wachstumshormon-Freisetzung (siehe Einleitung). Ein Fehlen von SST sollte nach dieser Hypothese eine Erhöhung des Wachstumshormons im Plasma zur Folge haben (siehe Abb. 23). Übereinstimmend mit dieser Funktion ergaben sich dreifach erhöhte Werte des Hormons. Der erhöhte Wachstumshormon-Spiegel (1) führte jedoch nicht zu einem abweichenden Gewicht (2) oder einer veränderten Körperlänge (3).

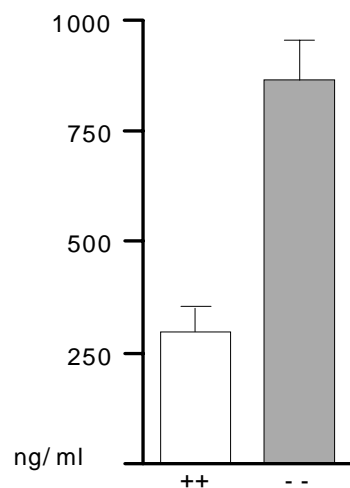
Abb. 23 Somatostatin: Wachstumshormon



Die Tatsache, daß ein Fehlen von SST eine Deregulation von Wachstumshormon hervorruft, belegt seinen funktionellen Einfluß in der regulierten Freisetzung dieses Hormons.

Eine weitere Rolle im Hinblick auf die Freisetzung von Wachstumshormon kommt Somatostatin während akuter und chronischer Streßeinwirkung zu. Streßzustände führen *in vivo* zu erhöhten Corticoidwerten; diese wiederum stimulieren die Ausschüttung von Somatostatin im Hypothalamus. Als Resultat kann es dadurch in Streßsituationen zu einer Unterdrückung der Sekretion von Wachstumshormon kommen [162]. Messung von Corticosteron (in der Maus funktionell äquivalent zu menschlichem Cortisol), ergab eine signifikante Erhöhung dieses Steroids in den Mausmutanten (siehe Abb. 24). Sie trat permanent und streßunabhängig auf.

Abb. 24 Somatostatin: Corticosteron

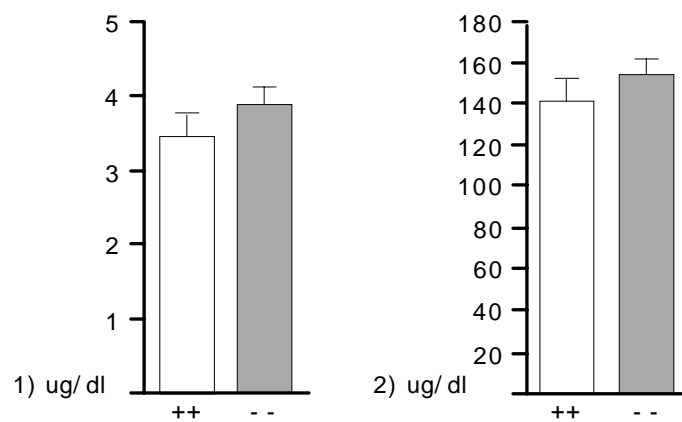


Für Somatostatin wird auch angenommen, daß es die Abgabe von Schilddrüse stimulierendem Hormon (TSH, *Thyroid-stimulating Hormone*) inhibiert [163]. TSH stimuliert eine Proteolyse, die zur Freisetzung zweier Spaltprodukte, Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3) führt.

T4 wurde als Indikator der TSH-Aktivität verwendet. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen lassen sich jedoch in den Mutanten keine signifikant veränderten T4-Werte nachweisen (Abb. 25 (1)).

Die Insulinsekretion steht ebenfalls unter negativem Somatostatin-Einfluß [164]. Als Indiz für mögliche Auswirkungen der SST-Geninaktivierung auf Insulin wurde der Blutzuckerspiegel bestimmt. Die Glukosekonzentrationen in mutierten und Wildtyp-Mäusen weichen nicht signifikant voneinander ab (siehe Abb. 25 (2)).

Abb. 25 Somatostatin: Thyroxin und Glukose



4.3.3 Serumanalyse

Die vergleichende Bestimmung von Wachstumshormon, Corticosteron, T4 und Glukose überprüfte gängige Hypothesen zur endokrinologischen Funktion Somatostatins.

Zusätzlich wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, generelle quantitative Veränderungen im Serum der Mausmutanten zu identifizieren, die auch unbekannte Komponenten einschließen könnten.

Dazu wurde eine neue Protein-Chip-Technologie angewendet. Probenmaterial, d.h. Serum, wurde zusammen mit einer Matrix auf Metallchips mit spezifischen physikalischen Eigenschaften appliziert. Mittels Laser-Desorption/Ionisierung wurden die Molekülmassen und die relativen Konzentrationen bestimmt (Massenspektrometrie nach der SELDI ProteinChipTM Technology).

Eine statistisch abgesicherte Aussage war bei Abschluß der Experimente noch nicht möglich, da der Schwankungsbereich der Messung im Durchschnitt fünffach variierte. Hierzu trugen methodische Probleme bei, zudem galt es, die natürlichen Schwankungen im Serum der normalen und mutierten Mäuse zu berücksichtigen, was durch die geringe Probenzahl (*Knockout*-Mäuse, n=4) nur eingeschränkt möglich war.

Eine eingehende Bewertung der Fehlerquellen (siehe Diskussion, 5.3.1) erlaubte zu einem späteren Zeitpunkt eine genauere Analyse, die zunächst (aufgrund ihrer Verfügbarkeit) nur Wildtyp-Mäuse einschloß. Abb. 26 und 27 demonstrieren die Anwendung dieser Methodik.

Abb. 26 Reproduzierbarkeit der Proteinspektren

Dargestellt ist die Mehrfachmessung des Serums einer 129SvEv Maus im Bereich bis 8000 Da. Hervorgehoben sind jeweils vier Peaks. Ihre maximale Variationsbreite der Peakintensitäten (Y-Achse), d.h. der relativen Konzentrationen, ist hier nur gering. Der Serumgehalt, der durch ihr Molekulargewicht bezeichneten Moleküle (X-Achse), variiert jeweils für die kleinsten und größten Werte 1.6- bzw. 1.7-fach. Methodische Fehler sind hier weitestgehend eliminiert. Damit wird deutlich, dieselbe Probe liefert einheitlich reproduzierbare Ergebnisse. Die Variationsbreite markierter Peaks ist hier eingetragen in den Programmausdruck. Die vergleichende Auswertung der Spektren erfolgte mittels der systemeigenen Software (siehe auch Abb. 27).

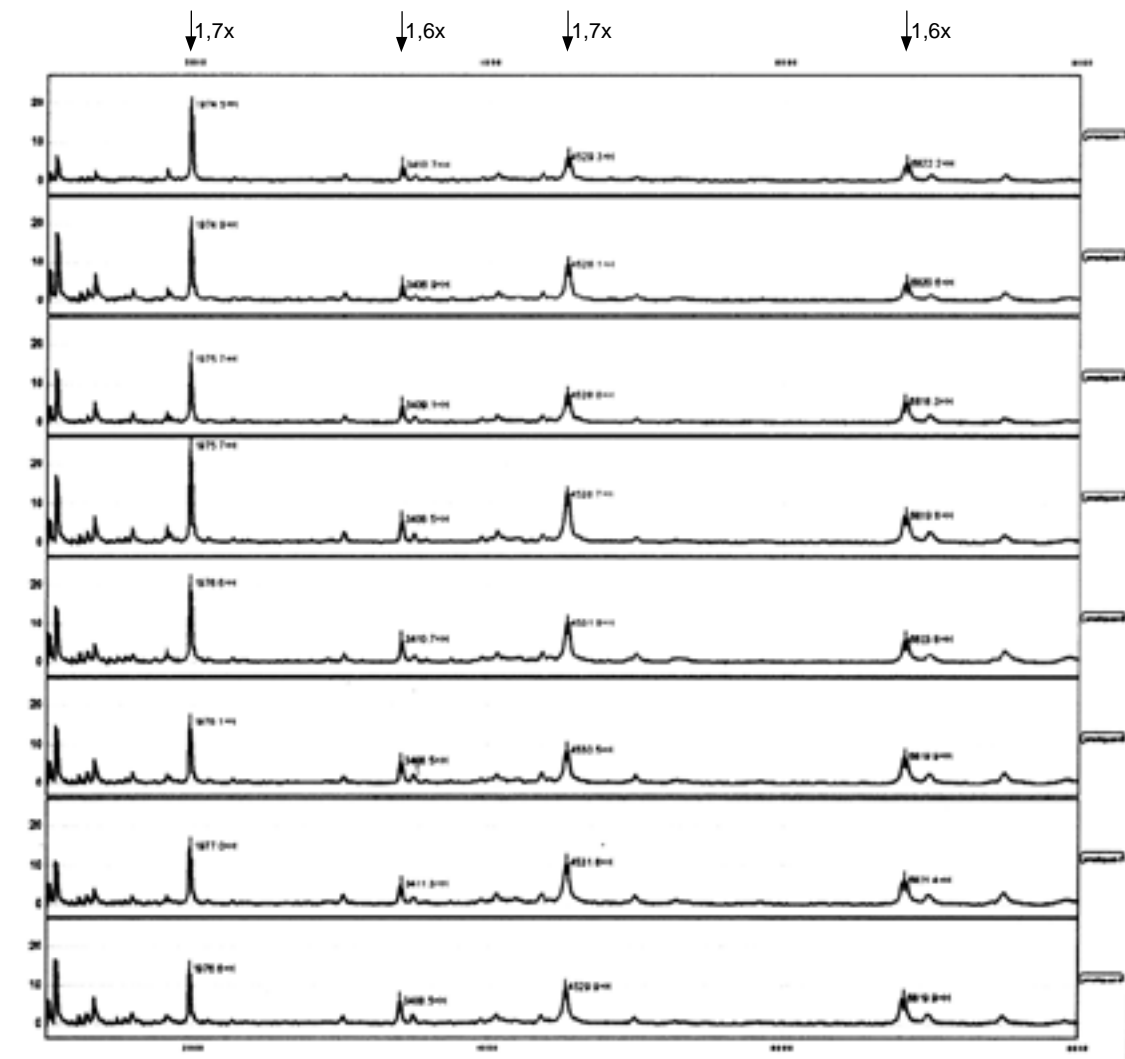
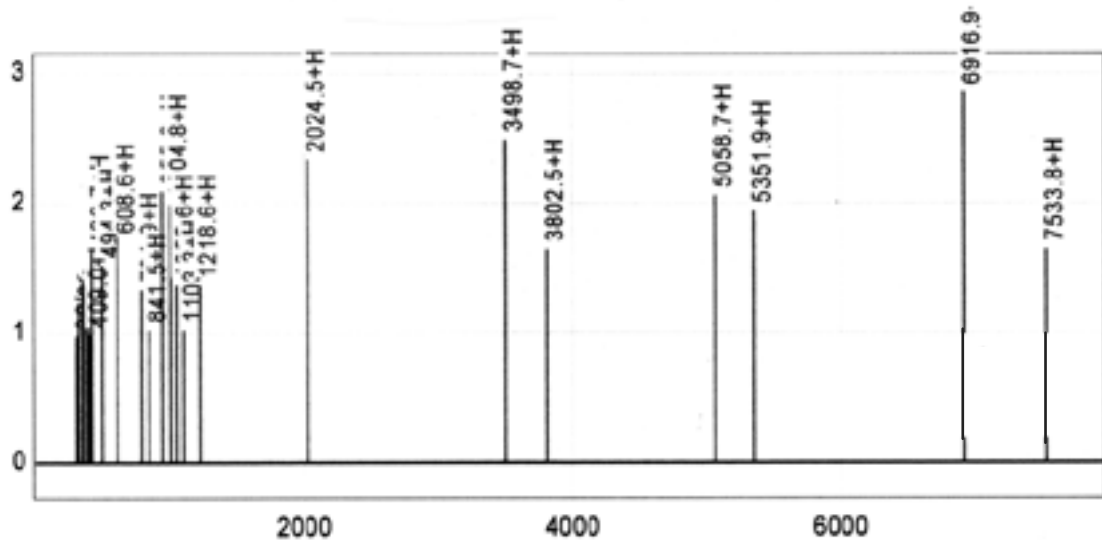


Abb. 27 Homogenität der Serumproben

Die Massenspektren von 2 verschiedenen Wildtyp-Mäusen wurden hier einander gegenübergestellt. Die Software erkennt Peaks aufgrund ihres Molekulargewichts und wandelt diese in Linien um, deren Höhe der Peakintensität entspricht. Identische Peaks, d.h. in beiden Mäusen vorkommende Moleküle, wurden identifiziert und quantitativ verglichen. Gezeigt ist das Ergebnis nach Division übereinstimmender Peaks (Y-Achse) am Originalausdruck. Daraus folgt: Identische Moleküle variieren in ihren relativen Serumgehalten in beiden Mäusen nicht mehr als 3-fach. Prinzipiell lassen sich also die Seren individueller Mäuse quantitativ vergleichen.

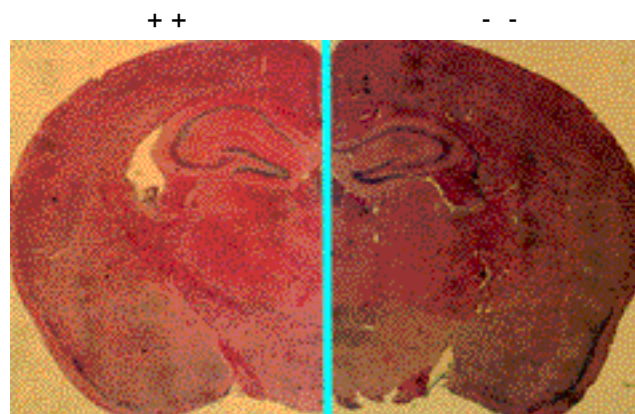


4.3.4 Morphologie

Weder im makroskopischen noch im mikroskopischen Bereich sind auffällige Veränderungen in der SST-Nullmutante festzustellen. Ein Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp erfolgte für folgende Organe: Gehirn, Hypophyse, Schilddrüse, Nebenniere, Pankreas, Lunge, Leber, Milz, Niere, Magen, Dünndarm und Testes bzw. Ovarien.

Abb. 28

Hier dargestellt ein koronaler Schnitt des Maushirns nach Hämatoxylin/Eosin-Anfärbung. Die zentrale ovale Struktur ist der Hippocampus.



4.3.5 SST-Systemkomponenten

Das Fehlen von Somatostatin könnte sich potentiell auch in einer abweichenden Expression von SST-Systembestandteilen, den Rezeptoren äußern. Um dies zu überprüfen, wurden Northernhybridisierungen durchgeführt, die semiquantitativ die relativen Konzentrationen von mRNAs von mutierten und Wildtyp-Mäusen veranschaulichten. Verglichen wurden mRNAs im Gesamtgehirn im Hinblick auf die Expression der Somatostatin-Rezeptoren SSTR1 bis SSTR5 und des mit SST verwandten Peptids Cortistatin; als qualitative und quantitative Kontrolle für die mRNA-Präparationen diente eine Sonde (p1B15) für das ubiquitär exprimierte Cyclophilin. In dieser Analyse, die spezifische Gehirnregionen nicht berücksichtigt, sondern das gesamte Gehirn, ist kein genereller Effekt des fehlenden SSTs auf die Expression von SST Systembestandteilen erkennbar (siehe Abb. 29).

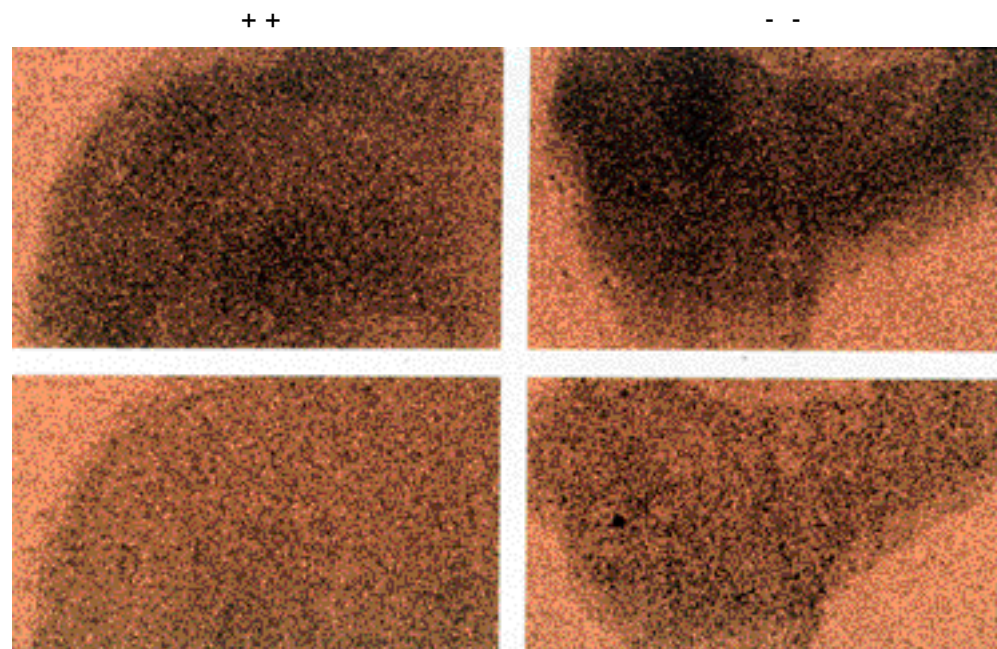


Abb. 29 Northernhybridisierungen von Systemkomponenten

Auch die Autoradiographie mit ^{125}I -markiertem SST zeigt keine Regionen mit auffällig verändertem Bindungsverhalten der Rezeptoren (siehe Abb. 30).

Die unteren Fotos verdeutlichen den Signalhintergrund der in den oberen Photos gezeigten Signalstärke. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Hippocampus-Region.

Abb. 30 Autoradiographie mit Somatostatin als Strahler



4.3.6 Gehirnmotabolismus

Funktionell und mikroskopisch nicht sichtbare Veränderungen im Gehirn der Somatostatin-Mutante könnten einen abweichenden Gehirnstoffwechsel hervorrufen. Dies läßt sich durch die Deoxy-Glukose-Methode sichtbar machen. Radioaktiv-markierte Deoxy-Glukose wird injiziert, bei Nutzung im Gehirnstoffwechsel lokal deponiert und dann autoradiographisch sichtbar gemacht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Glukosenutzung zwischen Mutante und Wildtyp beobachtet. Als Beispiel ist hier ein Ausschnitt aus der Hippocampus-Region gezeigt (Abb. 31).

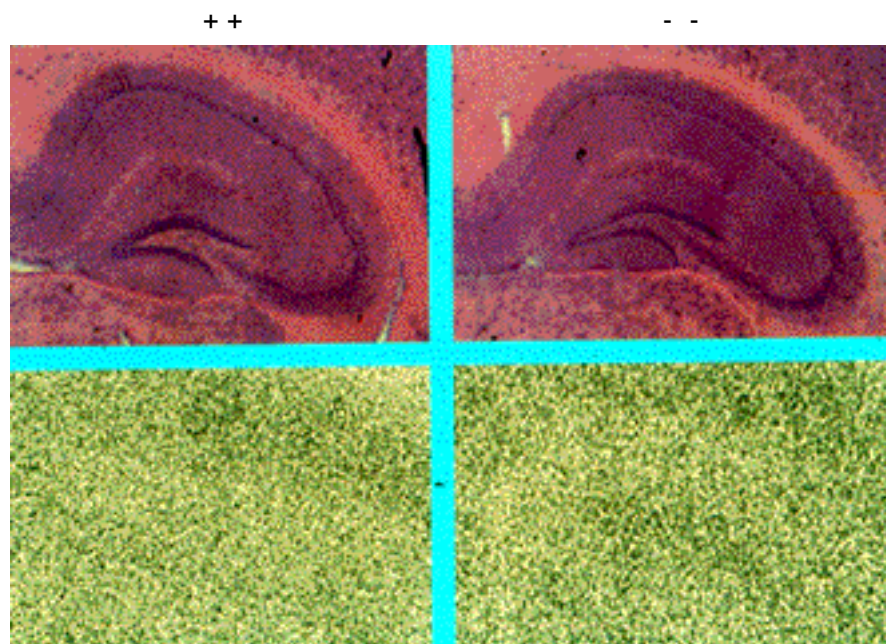


Abb. 31 Gehirnaktivität: Deoxy-Glukose

4.3.7 Verhaltensanalyse

Hypothesen über die zentralnervösen Funktionen von SST basieren auf der ausgedehnten anatomischen Verteilung dieses Peptids im Gehirn und auf einer Anzahl von *in vivo* Experimenten, in denen Zugabe von exogenem SST oder Blockierung von endogenem SST zu Verhaltensänderungen u.a. in bezug auf Schlaf, Schmerzwahrnehmung und Gedächtnis führen.

Aufgrund verschiedener Versuchsanordnungen sind jedoch viele dieser Resultate widersprüchlich. Statt jede aufgestellte Hypothese über die Rolle von SST im Verhalten der Maus individuell zu testen, wurde eine systematische Test-Batterie durchgeführt.

Sie überprüfte unterschiedliche Aspekte neuronaler Funktion, angefangen mit einfachen motorischen und sensorischen Reflexen, lokomotorische Aktivität, Angst/Furcht-Verhalten, bis hin zu sensomotorischen Integrationsleistungen - Lernen und Gedächtnis -.

Durch diese Vorgehensweise wurden die wichtigsten neurologischen und neuropsychologischen Funktionen überprüft.

Gleichzeitig war die Möglichkeit gegeben, bestehende Hypothesen über die Rolle von SST in der Regulation von Verhalten zu bestätigen oder zu widerlegen, als auch aufgrund des systematischen und hypothesenfreien Untersuchungsansatzes völlig neue Einsichten zu gewinnen.

Die Ergebnisse der Test-Batterie sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Signifikante Abweichungen traten allerdings nur für einen Verhaltenstest auf, der als gesonderter Punkt behandelt wird.

Category	Test	Measure	Wildtype	Mutant
Basic Neurological Function	Cage Observations (% of Subjects showing Behavior)	Wild running	0%	0%
		Freezing	0%	0%
		Sniffing	100%	100%
		Rearing	100%	100%
		Jumping	0%	0%
		Defecation	67%	40%
		Urination	33%	50%
	Relexes (% of Subjects showing Normal reflex)	Body Adjustment in moving cage	100%	100%
		Righting	100%	100%
		Eye-blink	100%	100%
Ear twitch		100%	100%	
Whisker orientation		100%	100%	
Visual Reaching (% of Subjects showing normal reflex)		100%	100%	
		Mean (+/-SEM)		
Behavior on Elevated Plattform	Latency to edge	4.1 (2.2)	5.5 (1.9) p>0.6	
	Exploration (Nose pokes over edge)	7.4 (1.5)	5.5 (1.2) p>0.3	
Open-Field Exploratory Activity		30 min totals		
		Locomotor activity	3255 (290.4)	2760.3 (331.5) p>0.3
		Rearing	63.8 (18.8)	27.9 (11.2) p>0.08
Anxiety Related Behaviors	Open-field	% Distance in Center	8.7 (2.3)	5.3 (2.1) p>0.3
	Light-Dark Explorations Test	Latency to enter dark	9.2 (3.6)	11 (3) p>0.6
		Time in dark	454 (31.8)	527 (23.2) p>0.08
		Transitions	30.4 (6.0)	16.9 (4.7) p>0.1
Sensorimotor Responses	Acoustic Startle Response	Startle Amplitude Average %	1558.7 (177.6)	1492.1 (139.5) p>0.5
	Prepulse Inhibition	Inhibition (using 74,78,82, 86 and 90 dB prepulse sounds)	55.7 (5.1)	50.7 (2.9) p>0.35
Learning and Memory	Conditioned Fear	Contextual fear conditioning	26 (7.6)	20.9 (4.3) p>0.4
		Auditory-cue fear conditioning	32.8 (3.9)	38.5 (5.4) p>0.4

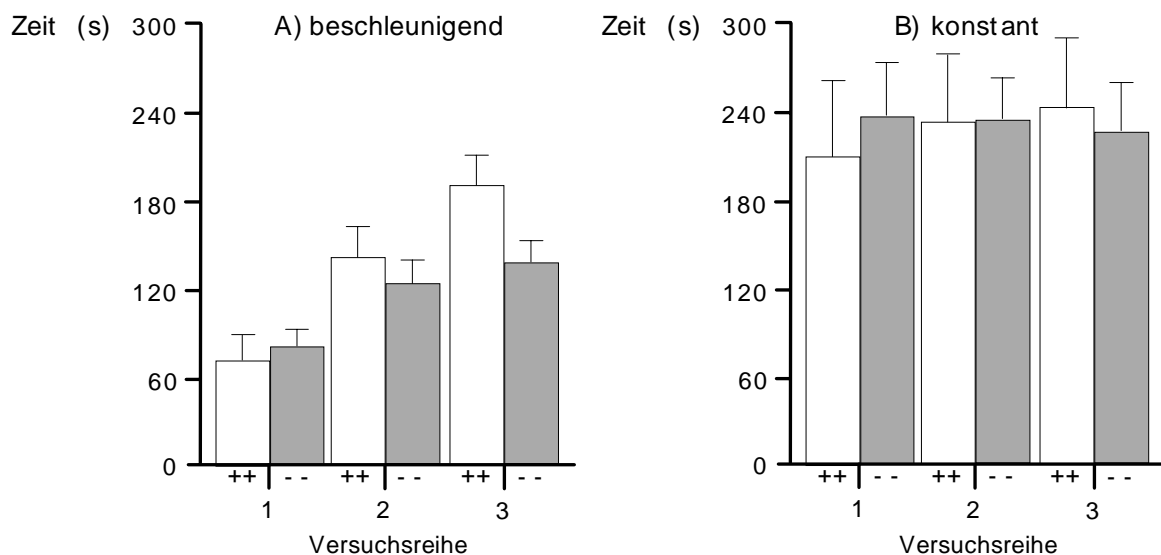
Tab. 8 Verhaltensversuche (Auf die Übersetzung der Fachtermini wurde hier verzichtet) Mutanten unterschieden sich nicht signifikant von Wildtypen, in den hier aufgeführten Versuchsreihen. Die einzige Ausnahme bildet ihr Verhalten in einem Versuch zur Motorkoordination und Lernfähigkeit („*RotaRod*“-Test). Diese Abweichung im Verhalten der SST-Nullmäuse wird im folgenden detailliert erläutert.

Die *RotaRod*-Versuchsordnung besitzt als wesentliches Element eine in ihrer Längsachse drehbaren Stange, auf die die Maus plaziert wird. Trennscheiben sorgen für die Unterteilung in mehrere Bereiche, um mehrere Mäuse gleichzeitig zu testen (Abb. 32).

Abb. 32 Die *RotaRod*-Versuchsanordnung

Die Geschwindigkeit der rotierenden Stange ist veränderbar; Sensoren registrieren, wenn eine Maus die Balance verliert und von ihr abstürzt. Bei dem Versuch mit dem beschleunigt rotierenden Stab verändert sich die Umdrehungsgeschwindigkeit von 4 rpm bis zu 40 rpm in einer Zeitspanne von 5 Minuten. Gemessen wird die Zeit, die sich Mäuse beider Versuchsgruppen (Mutanten und Wildtypen) auf der Stange halten können.

Nach der ersten Testreihe nehmen dieselben Mäuse an zwei weiteren teil, die durch zwischengeschaltete Ruhephasen unterbrochen sind. Die zweite und dritte Wiederholung erlauben die Beantwortung der eigentlich getesteten Frage, nämlich inwieweit eine Maus in der Lage ist, von vorhergehenden Tests zu lernen.

Abb. 33 *Rotarod*-Daten

Die Ausübung dieser Verhaltensaufgabe stellt Anforderungen an die Motorkoordination und die Regulation des Gleichgewichtes. Der Versuch A aus drei Testreihen verdeutlicht das relative Ausmaß mit dem beide Gruppen in der Lage sind, ihre Motorkoordination zunehmenden motorischen Anforderungen anzupassen.

SST-Mutanten waren in den ersten beiden Tests (Abb. 33 A) in zum Wildtyp vergleichbarem Ausmaß in der Lage, ihre Balance auf dem sich beschleunigenden Stab zu halten. Von der zweiten zur dritten Wiederholung waren die Wildtyp-Mäuse jedoch fähig, sich noch einmal deutlich zu verbessern. Im dritten Versuch blieben die Wildtyp-Mäuse signifikant länger auf dem Stab als die Mutanten. Für letztere war keine deutliche Verbesserung vom zweiten zum dritten Test zu verzeichnen. Die maximale Leistung von Mutanten in diesem Test lag signifikant unter der des Wildtyps (Abb. 33, Versuch A: beschleunigter *Rotarod* mit drei Versuchsreihen).

Beide Versuchsgruppen, Wildtyp und Mutante, lernen zunächst sich der Aufgabe anzupassen, d.h. nach Training können sie sich länger auf der Stange halten. Dieser Lernvorgang geschieht im Wildtyp kontinuierlich, während die Mutante ein vorzeitiges Plateau erreicht. Die motorische Lernfähigkeit der SST-Mutante ist also geringer ausgebildet.

Um eine verringerte motorische Lernfähigkeit abzugrenzen von Verminderungen in der generellen Koordinationsfähigkeit, der Ausdauer oder Muskelstärke, wurden zusätzliche Tests durchgeführt. Die Tatsache, daß in dem Versuch mit dem sich beschleunigt drehenden Stab (Abb. 34 A), Mutanten sich zunächst nicht vom Wildtyp unterscheiden (Versuchsreihe 1 und 2), macht eine verringerte motorische Koordination als Erklärung hierfür wenig wahrscheinlich.

Das wurde bestätigt durch den vertikalen Stabtest, in dem sich die Mutanten ähnlich dem Wildtyp verhalten. Dieser Test erfordert koordinierte Bewegungen, um sich an dem Stab festzuhalten, sich umzudrehen und an dem Stab herunterzuklettern (hier nicht gezeigt). Einfache Koordination *per se* ist in SST-Mutanten nicht eingeschränkt.

Eine weitere Möglichkeit, warum Mutanten sich nicht so lange auf dem rotierenden Stab halten können, wäre fehlende Ausdauer und/oder Muskelschwäche. Diese Erklärung ist jedoch ebenfalls nicht sehr wahrscheinlich, da in dem Versuch B (Abb. 33) bei konstanter, niedriger Umdrehungszahl des Stabes, Mutanten sich genau so lange halten können wie der Wildtyp, ihre Ausdauer ist identisch. Das Verhalten auf dem beschleunigenden Stab ist somit nicht eine Folge von leichter Ermüdbarkeit (Abb. 33 vergleiche Versuch A und B). In ähnlicher Weise wie Wildtyp-Mäuse waren die SST-Mutanten im Draht-Hänge-Test fähig, ihr eigenes Körpergewicht für eine bestimmte Zeit zu halten (nicht gezeigt).

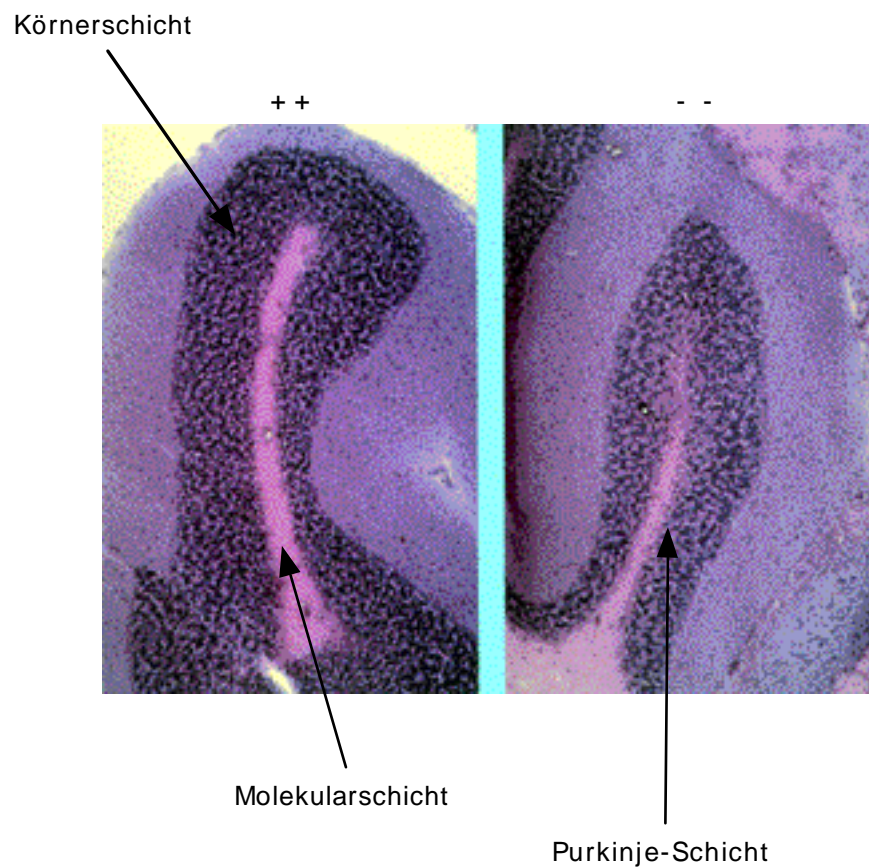
Die gegebenen Daten stimmen am besten überein mit der Hypothese, daß die verminderte Balancefähigkeit von SST-Mutanten auf dem sich beschleunigt drehenden Stab auf eine gestörte motorische Lernfähigkeit zurückzuführen ist. SST-Mutanten haben

Schwierigkeiten, die Koordination von Bewegungen zu erlernen, sie werden den sich erhöhenden Testanforderungen nicht im gleichen Maße wie die Wildtyp-Mäuse gerecht.

Motorisches Lernen, d.h. die Fähigkeit, motorische Koordination sich verändernden Anforderungen anzupassen, hat sein anatomisches Korrelat im Cerebellum. Morphologisch lassen sich im Cerebellum der erwachsenen SST-Mutante allerdings keine groben Abweichungen nachweisen (siehe Diskussion).

Abb. 34 zeigt einen Ausschnitt einer H&E-Anfärbung von Wildtyp- und Mutanten-Cerebellum. Die typische Schichtung in Molekular-, Körner- und Purkinje-Zellschicht läßt sich in beiden Schnitten erkennen.

Abb. 34 Cerebellum



5.0 Diskussion

5.1 Bewertung der Mutationsanalyse in einem komplexen System

Bevor eine Auseinandersetzung mit den Ergebnissen erfolgen kann, sollen hier die Rahmenbedingungen des experimentellen Systems erörtert werden.

Die Fragestellung der Arbeit geht von dem Postulat aus, daß die Ausfallmutanten des Somatostatin-Propeptids und der beiden Rezeptoren qualitativ verschieden sein können. Bei einer rein linearen Abhängigkeit ist durch den Wegfall von Somatostatin die Informationsweiterleitung zu allen Rezeptoren unterbrochen, während umgekehrt mit der Inaktivierung jeweils eines Rezeptors, Phänotypen entstehen würden, die nur Teilbereiche des gesamten Somatostatin^{-/-}-Erscheinungsbildes ausmachen (siehe Abb. 9, Einleitung).

Diese Überlegung läßt jedoch folgende Abläufe außer acht (siehe Abb. 9):

- Diagonale Wechselwirkungen: d.h. Konkurrenz verschiedener Liganden um identische Rezeptoren
und/oder
- Parallele Wechselwirkungen: d.h. Existenz zusätzlicher Bindungsstellen, wie auch die konstitutive Aktivierung von Rezeptoren, d.h. Signalübertragung vom Rezeptor ohne Bindung eines Liganden (siehe unten).

Wie aus der Beschreibung des Somatostatin-Systems hervorgeht, sind derart komplexe Wechselwirkungen denkbar (siehe Einleitung).

Für die SST-Nullmaus ist unklar, ob die Signalleitung zu den Rezeptoren vollständig unterbrochen ist, da Cortistatin als potentieller Ligand im Gehirn weiterhin zur Verfügung steht. Dies könnte sich zudem auf die Expression der Rezeptoren bzw. ihren Aktivitätszustand (Internalisierung, Desensibilisierung, siehe Einleitung) auswirken. Auch in Abwesenheit eines Bindungsfaktors könnten die transmembranen Rezeptoren immer noch einen funktionellen Beitrag liefern, indem ihre zytosolischen Bereiche weiterhin mit anderen Komponenten wechselwirken. So wird eine Aktivierung von G-Proteinen ohne Bindung eines Liganden für bestimmte Rezeptoren angenommen [165].

In beiden Rezeptor-*Knockouts* sind spezifische Bindungsstellen sowohl für Somatostatin als auch für Cortistatin ausgeschaltet. Damit sind für die Analyse des Phänotyps auch hier überlagernde Effekte möglich, da nun zwei Liganden die Rezeptoren entzogen wurden.

Ein oft erhobender Einwand bei *Knockouts* ist der der Genredundanz. Demzufolge kompensieren andere Gene den Funktionsausfall mutierter. Dies soll anhand zweier Beispiele diskutiert werden:

- In der Maus konnte der letale Phänotyp des mutierten En-1 Gens durch induzierte Expression des En-2 Gens revertiert werden [166].
- Doppelmutanten für den Wachstumsfaktor (PDGFB) und seinen β -Rezeptor lieferten nur einen milden Phänotyp der Niere; alle anderen Organe, die diesen Rezeptor exprimieren, waren nicht betroffen. Ersatzweise Bindung eines weiteren Liganden (PDGFA) an den α -Rezeptor soll hierfür verantwortlich sein [167].

Diese *Knockouts* besitzen entscheidende Gemeinsamkeiten: es handelt sich jeweils um strukturell verwandte Moleküle aus Genfamilien. Dies gilt auch für das Somatostatin-System. Es ist jedoch zu bedenken, Genredundanz ist nicht gleichzusetzen mit einer beliebigen Austauschbarkeit der Familienmitglieder [168].

Strukturell ähnliche Gene konnten nur auf Grundlage spezifischer Eigenschaften evolvieren, d.h. "redundante" Gene unterliegen keinem identischen Selektionsdruck. Als Kriterium für ihre Existenz kommt, trotz überlappender Funktionen, nur eine selektive Aufgabe des jeweiligen Gens in Frage [169].

Die obigen Beispiele für Redundanz verdeutlichen dies ebenfalls. En-2 zeigt ein von En-1 abweichendes Expressionsmuster, entsprechend einer abweichenden Funktion und korrigierte den En-1^{-/-} Phänotyp erst, indem es durch *Gene Targeting* analog zu En-1 exprimiert wurde. Im Fall des Wachstumsfaktors (PDGFB) und des Rezeptors wird ihre selektive Funktion in der Niere deutlich, denn dort ist eine funktionelle Redundanz nicht gegeben.

Die Analogie zum Somatostatin-System liegt auf der Hand. Es ist anzunehmen, in einem Gewebe werden gewisse Funktionen austauschbar durch mehrere Liganden bzw. Rezeptoren ausgeübt, in einem anderen Gewebe hingegen besteht eine hoch selektive Verwendung der Komponenten. Prinzipiell ist es also möglich, bestimmten Strukturen bestimmte Funktionen zuzuordnen. Im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse wird dies belegt werden.

Ein weiterer Kritikpunkt zweifelt die Aussagekraft von Nullmutationen aus einem anderen Blickwinkel an. Die *Knockout*-Technologie sei völlig ungeeignet zur Analyse von Molekülfunktionen. Denn es sei nicht klar, ob der Funktionsverlust oder die Anpassung des biologischen Systems an das Fehlen einer Komponente den Phänotyp

bedingen. Danach sollen *Knockout*-Mäuse nur “Reaktionismen” (eingedeutscht) darstellen, die nichts mit dem Funktionsverlust an sich zu tun haben, sondern “Adaptationen” des Organismus an diesen sind [170].

Hierzu ist anzumerken: Gerade für Moleküle, die wie Somatostatin einen Entwicklungseinfluß ausüben könnten, ist zu vermuten, daß ihre Abwesenheit während der Ontogenese zu Umorganisationen betroffener Strukturen beiträgt und sich dies auch funktionell äußert. Dies liegt jedoch in der Natur des Untersuchungsgegenstandes und hat eigentlich wenig mit dem methodischen Ansatz (*Genetargeting*) zu tun. Da *in vivo* Funktionen des Somatostatin-Systems komplex sind, sind auch komplexe Regulationsmechanismen zu erwarten (siehe Ergebnisteil).

Die hier diskutierten Begriffe wie Genredundanz und Reaktionsmus des Gesamtsystems (*Reactionism*) sind eigentlich keine Kritikpunkte der Methode, sondern nur die Beschreibung komplexer biologischer Zustände [171].

Das heißt allerdings nicht *a priori*, daß ein derartiger experimenteller Ansatz, wie er hier gewählt ist, keine Aussagekraft habe, sondern vielmehr, daß unser Bezugssystem gewisse Grenzen hat und somit nicht 100%ig der biologischen Vielfalt gerecht werden kann.

In diesem Rahmen ist meine Arbeit eine erste systematische Auseinandersetzung mit dem Somatostatin-System durch *Genetargeting*. Zunächst sollte ein möglichst breiter Einfluß auf Vorgänge im System ausgeübt werden. Der Phänotyp der Somatostatin defizienten Maus steht deshalb im Vordergrund.

Im Hintergrund dieser experimentellen Basis sind die erzielten Ergebnisse zu bewerten.

5.2 Selektive Analyse

5.2.1 Wachstumshormon (GH)

5.2.1.1 Bewertung der dreifach erhöhten GH-Werte

Die neuroendokrine Regulation von Wachstumshormon (GH, *Growth Hormone* oder *Somatotrophin*) war namensgebend für Somatostatin, das auch als *Somatotrophin Release Inhibitory Hormone* (SRIH) in der Literatur geführt wird.

Die Kontrolle dieses Vorgangs ist ein zentrales biologisches Geschehen und ist auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Zum Verständnis der Somatostatin-Nullmutante werden hier einige prinzipielle Vorgänge erläutert. (Wesentliche Informationen befinden sich in den Übersichtsartikeln von Gilles und Bertherat [162, 172]).

Das neuronale Netzwerk zur Kontrolle von Wachstumshormon ist dreistufig. Ein zentrales, neurohormonales System bestehend aus den Antagonisten Somatostatin und GH-releasing hormone (GHRH) wechselwirkt mit extrahypothalamischen wie noradrenergen und cholinergen bzw. weiteren intrahypothalamischen, z.B. Proopiomelanocortin (POMC) und Galanin haltigen Neuronen.

Vom Hypothalamus aus erfolgt die grundlegende Steuerung der Wachstumshormon-Sekretion der Hirnanhangdrüse, genauer ihres Vorderlappens, der Adenohypophyse. Man spricht deshalb von der Hypothalamus-Hypophyse-Achse der pulsatilen Wachstumshormon-Freisetzung (Abb. 35).

Desweiteren bestehen zusätzliche Funktionen dieser beiden Bereiche für emotionale und homöostatische Reaktionen, auf die hier nicht eingegangen werden kann. Distinkte Areale und Kerngebiete des Hypothalamus werden mit spezifischen neuroendokrinen Funktionen assoziiert. Zwei Strukturen im Hypothalamus sind die wesentlichen Kontrolleinheiten der somatotrophen Zellen der Hypophyse. Im periventriculären Nucleus (PEV) produzieren neurosekretorische Neurone Somatostatin und im arkuatischen Nucleus (ARC) Somatostatin und Wachstumshormon-Freisetzungshormon (GHRH). Diese *Inhibiting* bzw. *Releasing* Hormone gehen nach axonalem Transport zur *Eminentia mediana* in das portale Gefäßnetz über und wirken dann im drüsigen Anteil der Hypophyse durch SST-Rezeptoren bzw. den GHRH-Rezeptor. Zusätzlich gibt es reziproke Interaktionen der beiden Peptide innerhalb des Hypothalamus. Subpopulationen GHRH haltiger Neurone des arkuatischen Nucleus (ARC) besitzen die Somatostatin-Rezeptoren 1 und 2 [173]. Dies legt eine direkte inhibitorische Modulation von GHRH durch SST nahe. Umgekehrt können SST haltige Neurone des periventriculären Nucleus (PEV) durch GHRH des arkuatischen Nucleus (ARC) stimuliert werden. Dieser Effekt ist Opioid vermittelt, da der

Antagonist Naloxon ihn blockiert [174]. Daraus deutet sich an, die Kommunikation zwischen beiden Strukturen (ARC und PEV) erfolgt auch indirekt durch zwischengeschaltete neuronale Systeme. Diese verwenden unter anderem auch Galanin- und Neuropeptid Y-Signale (Abb. 35).

Zu ergänzen sei hier, Wachstumshormon steuert seine eigene Sekretion im Sinne einer negativen Rückkopplung wahrscheinlich auf zwei Ebenen. Im Hypothalamus mittelbar durch Aktivierung von Somatostatin haltigen Neuronen [175]. In der Adenophyse unmittelbar durch Hemmung somatotropher Zellen [176]. Auch IGF-I und IGF-II (*insulin like growth factors*) wirken jeweils hemmend über die Achse Hypothalamus–Hypophyse [162].

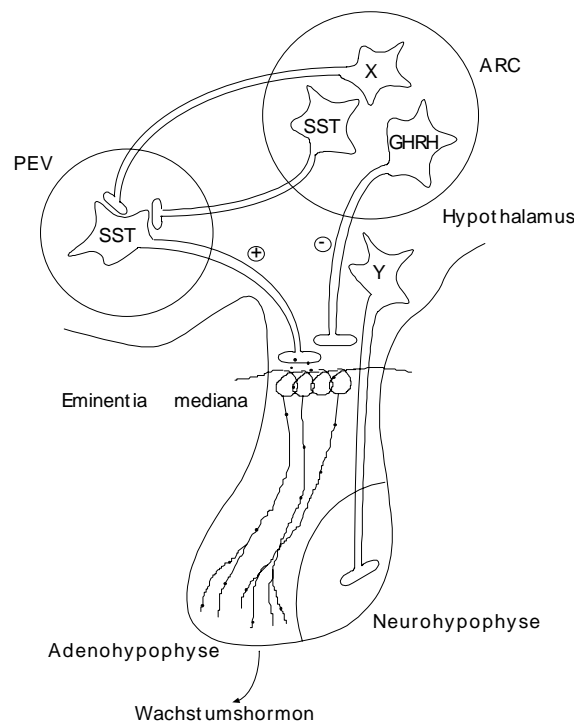


Abb. 35

Intrahypothalamisches Netzwerk zur Kontrolle der Wachstumshormon-Freisetzung
Zwei Steuerzentren - der periventrikuläre Nucleus (PEV) und der arkuatische Nucleus (ARC) kommunizieren untereinander durch nervöse Vorgänge und kontrollieren die Wachstumshormon-Sekretion hormonell. Somatostatin (SST) und Wachstumshormon-Freisetzungshormon (GHRH) sind die zwei wesentlichen Neuropeptide mit positivem bzw. negativem Einfluß auf die Wachstumshormonfreisetzung. Mit X sind Interneurone bezeichnet, die z.B. Galanin, POMC oder Neuropeptid Y ausschütten und ebenfalls regulatorisch wirken. Die Neurohypophyse ist nicht Teil dieses Regelkreises. Neurosekretorische Zellen (Y) sekretieren Oxytocin bzw. Vasopressin. Schema nach Gillies, Bertherat et al. und Bluet-Pajot et al. [162, 172, 177].

Für die SST-Nullmutante heißt dies, es sind verschiedene Signalwege der Wachstumshormonkontrolle betroffen. Diese komplexe Situation ergibt keinen einfachen Funktionsverlust, vielmehr handelt es sich um einen zusammengesetzten Phänotyp der Deregulierung. Somatostatin fehlt als Ligand an GHRH-haltigen Neuronen für eine

intrahypothalamische Kommunikation; GH modulierende Einflüsse anderer Neurotransmittersysteme laufen ins Leere; Rückkopplungsmechanismen sind wahrscheinlich gestört. Dies betrifft ebenfalls die negative Rückkopplung der Somatostatin-Sekretion über Autorezeptoren [178].

Damit überrascht es eigentlich nicht mehr, keinen gesteigerten Wachstumseffekt in der SST-Nullmaus vorzufinden, da die Wachstumskontrolle auf dieser Ebene nicht nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip funktioniert. Dennoch konnte eine spezifische Veränderung im Regulationsgeschehen detektiert werden. In der Mutante sind Wachstumshormon-Werte dreifach erhöht. Dies zeigt die Relevanz von Somatostatin für Prozesse der Wachstumshormon-Regulation. Aus der Tatsache, daß die Deregulation relativ gering ist und keine Konsequenzen für Gewicht und Körperlänge hat, läßt sich schließen, daß derartige hormonale Regulationsvorgänge stark gepuffert sind und wahrscheinlich eine größere Anzahl von mitwirkenden Faktoren einschließen.

Auch wenn man zusätzlich morphologische Veränderungen in der Achse Hypothalamus-Hypophyse annehmen kann, so wird trotzdem der funktionelle Charakter von Somatostatin als GH-Inhibitor deutlich.

Die Vielschichtigkeit der Steuerungsmechanismen bedingt auch z.T. unerwartete Reaktionen. Paradoxerweise ist Somatostatin wohl auch für die optimale Wirkung von GHRH notwendig. Seine antagonistische Wirkung auf GHRH führt zu einer verstärkten Speicherung von Wachstumshormon in der Hirnanhangdrüse. Damit wird das nötige Reservoir für physiologisch wirksame GH-Impulse aufgebaut [179]. Dieser Vorgang könnte in der Mausmutante gestört sein. Ins Bild eines regulatorischen Netzwerkes passen ebenfalls duale Effekte. Ramirez et al. belegten kürzlich *in vitro*, Somatostatin kann dosisbedingt auch als Stimulator der GH-Sekretion fungieren [180].

Auch eine Überproduktion von Wachstumshormon führt nicht immer zu einem gesteigerten Wachstum. In transgenen Mäusen, die GH lokal im Hypothalamus überexprimieren, greift ein Rückkopplungsmechanismus mit Reduzierung des GHRH-Gehalts und bedingt Zwergwuchs durch die Erniedrigung der somatotrophen Sekretion [181]. Für GHRH-überexprimierende transgene Mäuse ist belegt, erhöhtes Wachstum resultiert erst durch ein mindestens siebenfach kontinuierlich erhöhtes GH-Niveau im Plasma [182].

Die SST^{-/-}-Maus liegt unter diesem Wert. Bisher ist nicht untersucht, inwieweit die Expression von GH- und GHRH-Rezeptoren durch das Fehlen von SST betroffen ist bzw. die GH-Überproduktion selbst wieder bestimmte Effekte hervorruft.

Die SST-Nullmutante könnte also einen schwachen Wachstumshormon-Phänotyp zeigen. Es ist bekannt, daß die chronisch erhöhte Bildung von GH multiple Effekte haben kann. Darunter fallen neben Wachstumseffekten, z.B. Auswirkungen auf die IGF-I

Konzentration und Morphologie der Hypophyse [183], die Fertilität [182], die Lebenszeit [184], die Größe von Motoneurone [185], die Insulinsensitivität [186], die Somatostatin-Expression [187], das GH- und GHRH-Bindungsverhalten [188]. All dies sind natürlich Ansatzpunkte einer weiter ausweiteten Analyse.

Hervorzuheben ist allerdings, daß es in unserer Mutante nicht zu einer extremen GH-Überproduktion, wie bei transgenen Mäusen kommt. Dies liegt wahrscheinlich auch daran, daß die GH-Produktion durch Somatostatin-Inaktivierung auf einem übergeordneten regulatorischen Zentrum, dem Hypothalamus und dessen Regelkreisen, beruht, während eine transgen-induzierte GH-Bildung von der Hypophyse ausgeht. Für die SST-Nullmaus wäre es auch notwendig, zwischen basaler und pulsatiler GH-Sekretion zu unterscheiden, um zu belegen, welcher Anteil verändert ist bzw. herauszufinden, wie externe Stimuli sich nun auf Wachstumshormon-Level auswirken.

Seit Jahren ist bekannt, daß SST-Antisera und Cysteamin die GH-Sekretion erhöhen und daß eine Immunneutralisation von SST die Wachstumshormon-Reaktion auf Streßreize nicht mehr zuläßt [189-193].

Diese Manipulationen des Somatostatin-Systems werden durch unseren und einen weiteren transgenen Ansatz ergänzt. Eine Somatostatin-Rezeptor 2 defiziente Mausmutante ist in der negativen Rückkopplung von Wachstumshormon auf den Hypothalamus gehemmt. Diese Wirkung wurde überprüft durch ein synthetisches Wachstumshormon freisetzendes Peptid, das analog einem bisher unbekanntem GH-*Releasing* Molekül ist. Der entsprechende Rezeptor findet sich im Hypothalamus und der Hypophyse. Sowohl Wachstumshormon als auch Somatostatin heben die Wirkung des synthetischen Peptides unter Nutzung von SST-Rezeptor 2 auf. Dieser antagonistische Einfluß kann mit Wegfall von SSTR2 nicht mehr ausgeübt werden. GH und SST können die durch das Peptid stimulierte GH-Freisetzung nicht mehr hemmen [194]. Interessant wäre in diesem Fall, ob dieses Experiment in der SST-Mutante zum gleichen Ergebnis führt, oder welchen Phänotyp eine SST / SSTR2-Doppelmutante bedingen würde.

Mit der Somatostatin-Mutante steht nun ein weiteres Modell zur Überprüfung dieses Wachstumshormon-Regelkreises zur Verfügung.

Die Messung weiterer physiologischer Parameter in der SST-*Knockout*-Maus, wie TSH/Thyroxin und Insulin/Glukose, ergab allerdings keinen Befund. Mutanten und Wildtypen weichen unter Standardhaltungsbedingungen nicht signifikant voneinander ab. Der direkte Beweis von Auswirkungen der Somatostatin-Defizienz auf die genannten Moleküle gelang nicht. Es gilt also, weiter nach Anhaltspunkten für mögliche Fehlfunktionen zu suchen bzw. Versuchsbedingungen so zu wählen, daß unterschwellige Veränderungen hervortreten.

Für einen weiteren physiologischen Parameter konnte jedoch eine Abweichung von der Norm identifiziert werden. Corticosteron, ein Glucocorticoid, weicht in der SST^{-/-}-Maus ca. 3fach vom Normalwert ab.

5.2.2 Glucocorticoide (GCs)

5.2.2.1 Bewertung der dreifach erhöhten Corticosteron-Werte

Seit langem ist bekannt, daß chronischer Streß bzw. glucocorticoide Streßhormone negativ das Körperwachstum beeinflussen können [195, 196].

Die primäre, neuroendokrine Reaktion auf verschiedene Streßauslöser folgt einem festen Schema. *Corticotrophin releasing hormone* (CRH) des Hypothalamus stimuliert die Sekretion von *Adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) des vorderen Abschnitts der Hirnanhangdrüse. Dadurch wird die Synthese und Sekretion von Glucocorticoiden (GCs) (z.B. Cortisol oder Corticosteron) der Nebennierenrinde angekurbelt. Sie sind die eigentlichen Streßmediatoren des Körpers und nehmen unter anderem Einfluß auf das somatische Wachstum. Streßantwort und Wachstumsreaktion verlaufen zunächst beide über die Achse Hypothalamus-Hypophyse und könnten miteinander durch ein gemeinsames Bindeglied, das Somatostatin-Peptid, interagieren [162].

Verschiedene Beobachtungen deuten eine wechselseitige Abhängigkeit an. Chronisch erhöhte Glucocorticosteron-Level bzw. Langzeitinjektionen mit dem GC-Analog Dexamethason erniedrigen dauerhaft die Konzentration von Wachstumshormon [197]. Durch Immunoneutralisation des negativen GH-Regulators (Somatostatin) gelang es, den Steroideinfluß auf das Wachstum zumindest teilweise zu revertieren [198]. Dies impliziert, Corticosteron könnte Somatostatin vermittelt die Wachstumshormon-Freisetzung regulieren. In der Tat kann der Gehalt an Somatostatin-mRNA durch kurzzeitige Einwirkung von Corticosteron erhöht werden. Längere Einwirkung von GCs verstärkt auch die Somatostatin-Rezeptorexpression [199].

Glucocorticoid-Rezeptoren sind auf Somatostatin-haltigen Neuronen des periventriculären Nucleus des Hypothalamus nachgewiesen [200]; dem Ort, von dem die eigentliche Somatostatin-Sekretion aus erfolgt. Hypothalamische, somatostatinerge Neuronen sprechen zudem direkt auf akuten Streß an [201].

Diese Darstellung des Sachverhaltes ist allerdings eine Vereinfachung der tatsächlich zu erwartenden Vorgänge. *In vivo* und *in vitro* Studien liefern gegensätzliche Ergebnisse; auch variieren sie mit der Glucocorticoid-Dosis und der Dauer der Einwirkung.

Eine Erklärung für die Diskrepanz der Glucocorticoid-Wirkungen: *in vitro* Wachstumshormon-Stimulation und *in vivo* Wachstumshormon-Hemmung ist bisher nicht detailliert möglich. Allgemein wird vermutet, daß im Wechselspiel dualer Kontrollsysteme unter den jeweiligen Versuchsbedingungen eine der beiden physiologisch möglichen Richtungen eingeschlagen wird.

Dies könnte mit den zwei bekannten Regelzentren der Wachstumshormon-Freisetzung zusammenhängen. Es wäre damit zu trennen zwischen Glucocorticoid-Effekten für die Steuerung von Wachstumshormon, GHRH und Somatostatin-Rezeptoren der Hypophyse und Einwirkungen auf GHRH, SST und GH-Rezeptoren des Hypothalamus [202].

In diesem Bereich scheint der Phänotyp der Somatostatin-*Knockout*-Maus anzusetzen. *In vivo* schließen sich hohe Corticosteron- und Wachstumshormon-Werte aus. Mit Wegfall des hypothalamischen Somatostatin-Bindeglieds ergibt sich für beide eine chronische Überproduktion.

Durch Entfernung der Nebenniere ist bekannt, ohne Glucocorticoide sinkt der Somatostatin-Gehalt *in vivo*. Heißt dies im Umkehrschluß, wegen fehlendem Feedback von Somatostatin reagiert der Organismus mit erhöhter Steroidproduktion, um die Somatostatin-Herstellung hochzufahren?

Wenn dem so ist, dann würden Glucocorticoide auch streßunabhängig die Somatostatin-Produktion steuern bzw. Somatostatin die der Glucocorticoide.

Ein minimaler Streß bei der Handhabung der Tiere ist jedoch nicht auszuschließen; bei den hier dargestellten Ergebnissen könnte es sich damit auch um eine überschießende Streßantwort handeln, der das entsprechende Somatostatin-Feedback fehlt. Oder handelt es sich hier um Wachstumshormon bedingte Auswirkungen; sind erhöhte Glucocorticoid-Level, Reaktionen auf die gesteigerte Wachstumshormon-Produktion und nicht auf das Fehlen von Somatostatin? Ist dies ein negativer Regelmechanismus von Wachstumshormon zu Steroiden oder löst die GH-Überproduktion selbst eine interne Streßantwort aus?

Eine weitere Frage, die allerdings in Zukunft leichter zu beantworten sein wird, ist die Rolle von GHRH in diesem Zusammenhang. Indizien für einen steuernden Einfluß der GCs auf GHRH-haltige Neurone lassen seine Beteiligung als möglich erscheinen. Ist es herunterreguliert, wie bei einer Streßreaktion und wirkt damit auch dem weiteren

Ansteigen des Wachstumshormons entgegen oder vielleicht erhöht? Duale Einflüsse auf seine Sekretion durch GCs können angenommen werden [197].

Auch ist unklar, welchen Effekt die fehlende Balance im Hypothalamus verursacht. Führt die Entfernung des negativen Gegenspielers (Somatostatin) zu einer ungehemmten Sekretion oder reagieren die GHRH-Neurone differentiell; inwieweit ist ihre Aktivität durch das Zusammenspiel mit den SST-Neuronen bestimmt? Anhand der Wachstumshormon-Überproduktion ist nicht notwendigerweise davon auszugehen, daß GHRH verstärkt gebildet bzw. sekretiert wird.

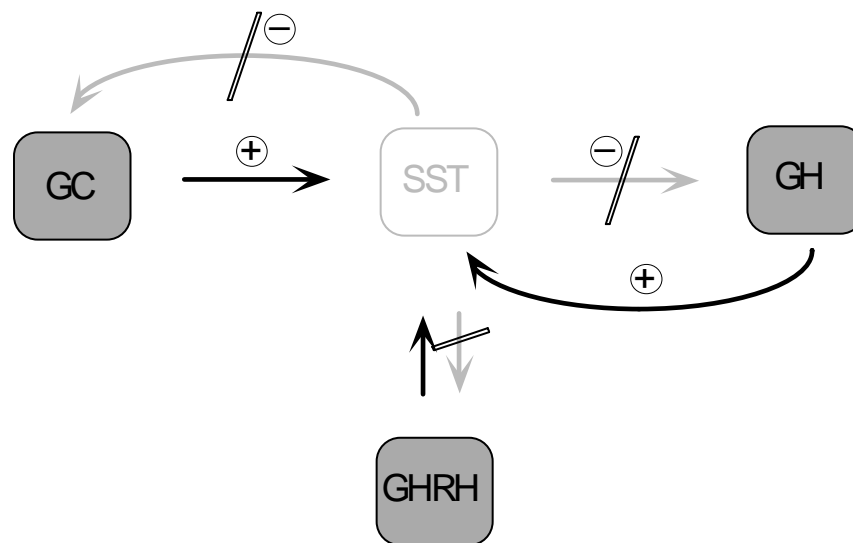


Abb. 36 Somatostatin als Bindeglied zwischen Glucocorticoiden und Wachstumshormon
In vivo-Effekte im intakten Somatostatin-System sind durch graue und schwarze Pfeile mit positiven bzw. negativen Vorzeichen dargestellt.

Balken verweisen auf gestörte Signalwege bedingt durch den Verlust von Somatostatin (graue Box). Glucocorticoide unterliegen nicht mehr dem negativen Einfluß von Somatostatin. Gleichzeitig können sie auch keine hemmende Wirkung mehr auf Wachstumshormon ausüben. Die Folgen sind gesteigerte Steroid- und Wachstumshormonproduktion.

Für Wachstumshormon überexprimierende Mäuse (bovines GH) ist bewiesen, daß sie sowohl basal als auch streßinduziert gesteigerte Corticosteron-Werte besitzen. Cecim et al. belegten, daß dies wohl auf einem chronisch erhöhten ACTH-Gehalt beruht [203].

In Analogie zu unseren Beobachtungen zeigten Cheung et al., Immunoneutralisation von Somatostatin in Hühnern hat einen direkten stimulatorischen Effekt auf die Corticosteron-Bildung [204]. Cysteamin, welches ebenfalls den SST-Gehalt senkt, wirkt übereinstimmend [205].

Chronische Präsenz von Somatostatin hingegen stört neben der Funktion auch die Morphologie der Nebenniere (*Zona glomerulosa*, Atrophie) [206].

Diese Fakten implizieren, die in der SST-Mutante gemessenen Corticosteron-Werte resultieren aus dem Wegfall eines negativen Regulators der Steroidproduktion. Was endokrinologische Untersuchungen nahelegen ist hier gezeigt. Somatostatin ist ein wesentliches inhibitorisches Kontrollelement der Steroidlevel *in vivo*.

Die Somatostatin-*Knockout*-Maus vereint also in einem System verschiedene endokrinologische Effekte, die ursächlich mit Funktionen dieses Peptides zusammenhängen. Damit fungiert sie als ein Modellsystem für Abläufe im Wechselspiel Wachstumshormon – Somatostatin - Corticosteron.

5.3 Systematische Analyse

Die Somatostatin-Nullmaus, obwohl auf den ersten Blick scheinbar unverändert, offenbarte Abweichungen vom Normalzustand in der Messungen der Parameter Wachstumshormon und Corticosteron.

Wie oben schon ausgeführt wurde, erschien es naheliegend, Somatostatin als Kreuzungspunkt zwischen der Streßantwort und der Wachstumsregulation anzunehmen. Es gelang, seine Funktion als Corticosteron-Hemmer im Gesamtorganismus nachzuweisen.

Obwohl unsere Vorgehensweise zur Untersuchung der mutierten Maus erfolgreich war, ist anzumerken:

Experimentell erscheint es wenig effizient und nahezu unmöglich, jede bestehende Hypothese der Somatostatin-Funktion zu überprüfen, um ihre biologische Signifikanz zu bestimmen.

Es geht darum, Ansatzpunkte für eine Analyse zu verwenden, die das gesamte biologische System berücksichtigen, und es erlauben, auch bisher unbekannte Funktionen aufzudecken.

Aus diesem Grund wurde eine konzeptionell andere Vorgehensweise zur Bestimmung von phänotypischen Konsequenzen in *Knockout*-Mäusen gewählt.

- Die massenspektrometrische Untersuchung (SELDI, siehe Methoden) sollte quantitative Veränderungen von beliebigen Peptid- und/oder Proteinbestandteilen des Blutserums aufzeigen.
- Verhaltensversuche wurden eingesetzt, um Aufschlüsse über Gehirnfunktionen des Somatostatin-Systems zu erlangen.

Beide Fragestellungen zielten auf die systematische Analyse des Phänotyps, ohne Hypothesen aufzuarbeiten, sondern „hypothesen-frei“ nach Veränderungen zwischen Mutante und Wildtyp zu suchen.

5.3.1 Serum

5.3.1.1 Quantitative Veränderungen

Der Begriff Proteom wurde zum ersten Mal 1994 durch Wilkins verwandt. Er bezeichnet die Summe komplementär zum Genom exprimierter Proteine [207]. Die funktionelle Untersuchung dieses Zusammenhangs zwischen genomischer Sequenz (*Genomics*) und Reaktionen der Genprodukte (*Proteomics*) erfordert es, globale Veränderungen auf zellulärer Ebene deutlich zu machen [208].

Die SELDI-Methode hatte zum Ziel, quantitative Abweichungen im Peptid- und Proteingehalt als Konsequenz der Inaktivierung des Somatostatin-Gens zu untersuchen.

Aus Maus-Sera wurden Spektren im Bereich von 300 bis 8000 Dalton erstellt. Ihre relative Vergleichbarkeit genügte allerdings nicht den Erfordernissen, da vor allem methodische Faktoren eine genaue Quantifizierung zum damaligen Zeitpunkt nicht zuließen.

Die Meßfehler setzten sich wie folgt zusammen:

- Veränderung des Auftreffwinkels des Lasers beim Beschuß verschiedener Bereiche der Metallplatte. Dadurch ergab sich wahrscheinlich ein uneinheitlicher Energietransfer auf das Probenmaterial und damit abweichende Peakintensitäten, die als Maß für die relativen Konzentrationen dienten. Eine genauere Ausrichtung des Lasers hat dieses Problem später behoben.
- Beim Verdampfen der Matrix durch Absorption der Laserenergie wird die Ionisierung des Probenmaterials gefördert. Der genaue Ablauf dieses Vorgangs ist bisher nicht verstanden. Es ist jedoch bekannt, daß jede Matrix einen eigenen Energiebereich besitzt, in dem eine optimale Ionisierung möglich ist. Für die verwendete Matrix (α -Cyano-4-hydroxymizinsäure) ist dieser Bereich sehr eng, d.h. kleine Schwankungen in der Anregung mittels Laserbeschuß führen zu uneinheitlichen Ionenwolken, was wiederum quantitative Untersuchungen behindert (persönliche Mitteilung Sau-Mei Leung, Ciphergen Inc.). Eine Matrix, die einen einheitlichen Energietransfer erlaubt, sollte deshalb verwendet werden. (Verschiedene Matrices sind zu testen.)

- Die systemeigene Software hatte unter Standardeinstellungen Probleme, für alle Peaks des gesamten Spektrums die Basislinie einheitlich anzupassen. Als Konsequenz variierten scheinbar die Peakintensitäten, d.h. die relativen Konzentrationen (auch dieses Problem konnte später behoben werden).
- Um Abweichungen innerhalb des biologischen Systems Maus (Aggression, Fortpflanzungsverhalten, geschlechtsspezifische Unterschiede etc.) zu nivellieren ist es erforderlich, eine hinreichend große, einheitliche Population von Tieren (Wildtypen und *Knockouts*) zu testen. Leider standen während des Testzeitraums nicht ausreichend Nullmutanten zur Verfügung.

Messungen des Serums von Wildtyp-Mäusen ergaben nach Fehlerkorrektur sehr einheitliche Spektren und bestätigten die Einflüsse obiger Fehlerquellen (siehe Ergebnisse). Basierend auf aktuellem Erkenntnisstand sollte es nun möglich sein, anhand eines Vergleiches beider Maustypen eine Korrelation zwischen Somatostatin und anderen Verbindungen im Serum abzuleiten.

5.3.2. Verhalten

Verhalten resultiert aus der Beziehung des Organismus zu seiner Umwelt. Es erfolgt auf Grundlage genetisch definierter Produkte und Prozesse zur Organisation von Informationsaufnahme, -verarbeitung, -speicherung und -abgabe [209].

Die Annahme, Somatostatin habe zentralnervöse Bedeutung, ist begründet in seiner anatomischen Verteilung (siehe Einleitung, Tab. 3) und einer Vielzahl von *in vivo* Experimenten. Im wesentlichen untersuchten sie die Effekte temporär induzierter Änderungen des Somatostatin-Gehalts. Daraus wurde ein Einfluß auf sensorische, motorische und kognitive Funktionen abgeleitet [210, 211].

5.3.2.1 Bewertung der gestörten motorischen Lernfähigkeit

Die Analyse der SST-Nullmaus erfolgte in Form einer Testreihe, die ein breites Spektrum an Verhaltenskategorien berücksichtigte.

Jeder Kategorie wurden entsprechende Verhaltensparadigma zugeordnet und getestet. So kamen z.B. zur Überprüfung der Kategorie - angstbezogenes Verhalten -, der "Offene Feldtest und der "Hell-Dunkel-Erkundungstest" als entsprechende Verhaltensparadigma zum Einsatz (Einen Überblick gibt Tabelle 8).

Die Verifizierung einzelner Hypothesen zur Funktion von Somatostatin stand hier bewußt nicht im Vordergrund, da es sich hier um ein erstes *Screening* handelte. Grobe Abweichungen von der Norm, die mit detaillierteren Verhaltensanalysen interferieren könnten, wurden überprüft. Dies geschah in Form von einfachen Tests des generellen Gesundheitszustandes, verschiedener Reflexe sowie der Bewegungsmotorik, Sensorik und Gedächtnisleistung (Zur Theorie der Verhaltensanalyse von *Knockout*-Mäusen siehe Crawley and Paylor (1997) [157]).

Nur ein Verhaltensparadigma offenbarte eine eindeutige Veränderung in der SST-Mutante. Im Rotationsstab-Test (*rotarod test*) sind die Mäuse in ihrem motorischen Lernverhalten limitiert.

Ihre Lernkurve verläuft weniger steil. In der dritten Testreihe unterscheiden sie sich dann wesentlich von den Wildtypen. *Pole climb test* und *Wire hang test* schlossen grundlegende motorische Einschränkungen aus und untermauern den kognitiv motorischen Defekt.

Motorisches Handeln ist in diesem Fall also ein Teilaspekt des Lernvorgangs und wurde deshalb getrennt durch weitere Tests untersucht. Daraus wurde gefolgert: Mutierte Mäuse liegen in der Fähigkeit, das Balancieren auf einem rotierenden Stab einzuüben, hinter den Wildtyp-Mäusen zurück, ohne aber generell motorisch beeinträchtigt zu sein (siehe Ergebnisse).

Lernen gilt als ein entscheidender Faktor durch den das Individuum mit der Umwelt interagiert [212]. Indikatoren für einen Lernprozeß sind dadurch bedingte Verhaltensänderungen, wie z.B. das unterschiedliche Erlernen des Balancevermögens gemessen im *rotarod test*.

Motorikoordination, -lernen und -gedächtnis werden allgemein dem Kleinhirn (Cerebellum) zugeordnet [213]. Die Tatsache, daß wahrscheinlich ein Zentrum entscheidend für diese Funktionen verantwortlich ist, macht es schwierig, diese klar voneinander abzugrenzen. Weitere Verhaltensexperimente sind deshalb angebracht, diskrete Aspekte speziell des motorischen Lernens zu untersuchen.

Hierfür kommen z.B. Tests angelehnt an den vestibulo-okulären und den Lid-Reflex in Frage. Die gesamte Theorie zur "neuronalen Lernmaschine" Kleinhirn darzustellen, liegt außerhalb des gesteckten Rahmens. Zu betonen ist jedoch, beide motorischen Reflexe lassen sich durch Lernvorgänge modifizieren. Plastische Veränderungen im Cerebellum sollen daran grundlegend beteiligt sein. Eine gute Übersicht geben Raymond et al. (1996) [214].

Der Lidschlagreflex ist klassisch konditionierbar. Er wird bedingt durch einen un konditionalen Auslöser, in Form eines Luftstoßes. Durch wiederholte zeitliche Kopplung mit dem neutralen Reiz erfolgt eine Konditionierung, die einen ursprünglich indifferenten Reiz (z.B einen Ton) zum Stimulus für den Reflex (Luftstoß-Lidschlag) werden läßt. Lernen erfolgt hier als Assoziation zwischen neutralem Stimulus und reflexartigem motorischem Verhalten [215].

Der vestibulo-okuläre Reflex erzeugt kompensatorische Augenbewegungen. Um bei der horizontalen Wendung des Kopfs Netzhautbilder zu stabilisieren erfolgt eine entgegengesetzte, ausgleichende Bewegung der Augen. Diese ist kontrolliert durch eine offene Reflexschleife, d.h. die Augenmotorik ist quantitativ veränderbar, falls eine Abweichung zwischen Kopfbewegung und Netzhautabbildung auftritt. Diese Diskrepanz kann durch verschiedene experimentelle Bedingungen erzeugt werden (Linsen, Prismen, Bewegung von Objekt und Beobachter) und führt zu einer erlernten, motorischen Adaptation (Anpassung der Augenbewegung) [216].

Beide Lernvorgänge sind sensitiv gegenüber Läsionen bestimmter Kleinhirnabschnitte. Zusätzlich manifestiert sich in den für die Verhaltenstests notwendigen neuronalen Verschaltungen ein charakteristisches Feuerverhalten. Es handelt sich hierbei um die Langzeitdepression (LTD), d.h. Amplituden und Dauer postsynaptischer Signale werden über längere Dauer erniedrigt. Man vermutet, dies könnte das elektrophysiologische Äquivalent eines Lernvorgangs im Cerebellum sein [217].

Genetisch induzierte Veränderungen geben weitere Hinweise auf an cerebralen Lernprozessen beteiligte Komponenten.

Abweichungen in der Konditionierung des Lidschlußreflexes (motorisches Lernen) sind z.B. für folgende *Knockout*-Mäuse belegt: GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), mGlu₁-Rezeptor (*metabotropic glutamate receptor type 1*) [218, 219]. Beide zeigen ebenfalls

beeinträchtigte LTDs, wobei erstere Maus jedoch nicht in ihrer Motorkoordination eingeschränkt ist.

Daraus folgt, Defekte cerebraler Komponenten müssen nicht immer mit einer allgemein verschlechterten Motorik einhergehen. Auch resultiert die Mutagenese nicht immer in einer morphologischen Disorganisation des Kleinhirns (Im Fall der Glu₁-Rezeptor-negativen Maus ist dies der Fall.).

Diesem Schema entspricht die Somatostatin-Nullmaus: Ohne offensichtliche mikroskopische Veränderungen des Cerebellums zeigt sie kein motorisches, sondern ein kognitiv-motorisches Defizit. Zusätzlich steht ihr Verhalten im Lernparadigma Rotationsstabtest in Übereinstimmung mit anderen *Knockout*-Phänotypen des Cerebellums:

In der mGlu₄-Rezeptor (*metabotropic glutamate receptor 4*) defizienten Maus ist die motorische Plastizität in diesem Test vergleichbar eingeschränkt. Eine generelle motorische Behinderung besteht hier ebenfalls nicht, obwohl dieser Rezeptortyp hochkonzentriert in der Körnerzellschicht des Kleinhirns exprimiert wird. Mögliche morphologische Veränderungen aufgrund des Verlusts dieser Glutamatbindungstelle sind bisher nicht beschrieben [220].

Im Gegensatz dazu, führt die Inaktivierung des *Homeobox* haltigen Transkriptionsfaktors *En-2* zu einer veränderten Cerebellumanatomie. Es kommt zu einer abnormen cerebralen Furchung, einem gestörten Muster der Genexpression und zu Zellverlusten [221, 222]. Dennoch sind generelle Motorfunktionen nicht betroffen. Motorisches Lernen allerdings, getestet im Rotierenden Stabtest, ist behindert.

Ein weiterer interessanter Bezug zu Somatostatin ist die sehr selektive Expression des *En-2* Gens innerhalb des Kleinhirns.

Wie unter dem Gesichtspunkt – Redundanz – bereits diskutiert, sind in morphologischen Strukturen mit hoch selektiver Genexpression kompensatorische Effekte weniger wahrscheinlich, um so deutlicher sollten dann Geninaktivierungen sich dort bemerkbar machen.

Analog zu *En-2* dominiert im Kleinhirn des adulten Organismus die SST-Rezeptor 3-Transkription. Dies hat zur Folge, daß die Redundanz des Somatostatin-Systems in diesem Gehirnabschnitt stark eingeschränkt ist, da im wesentlichen nur ein Akzeptortyp zur Verfügung steht bzw. generell die Dichte der anderen Rezeptoren gering ist. (Die

physiologische Rolle dieses Sachverhalts ist allerdings schwierig zu bewerten, da Bindungsstellen im ausgereiften Kleinhirn kaum nachzuweisen sind.) [223].

Das Cerebellum könnte aber auch aus einem anderen Grund sehr sensitiv gegenüber der Verlustmutation des Liganden sein: Es sind zeitlich und örtlich exakt definierte Expressionsmuster der verschiedenen Rezeptoren während der Entwicklung bewiesen (siehe Einleitung). Im Sinne einer erweiterten Neurotransmittertheorie könnte Somatostatin Entwicklungseinflüsse ausüben, die dann im *Knockout* gestört wären [224]. Im Gegensatz zu anderen Gehirnabschnitten wie z.B. dem Cortex könnte die relativ einfache und einheitliche Struktur des Kleinhirns es auch besonders anfällig für funktionelle und strukturelle Veränderungen machen [225].

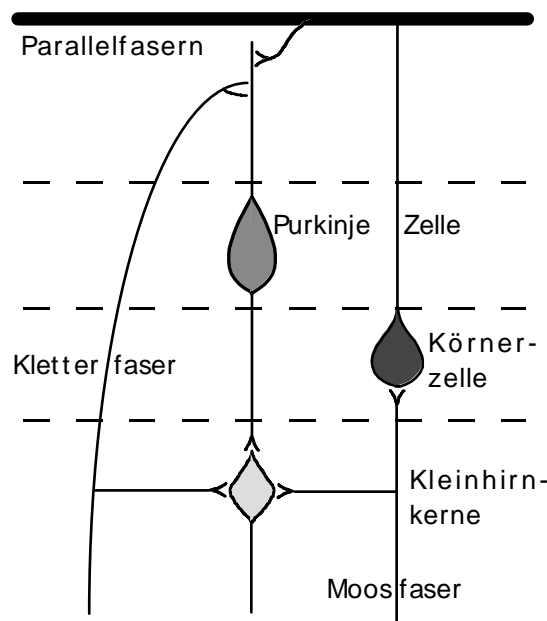


Abb. 37 Vereinfachte Darstellung der Organisation des cerebralen Cortex

Die Kleinhirnrinde besteht aus drei den Bereichen Molekular-, Purkinje- und Körnerschicht. Purkinje-Zellen sind die einzigen Ausgangsneurone; ihre Axone wirken hemmend auf nachgeschaltete Nervenzellen. Kletterfasern hingegen leiten einen erregenden Input zu den Purkinje-Zellen. Moosfasern sind ebenfalls exzitatorisch; sie projizieren auf Körnerzellen, deren Axone sich T-förmig verzweigen und die Parallelfasern bilden. Die Synapsen letzterer wirken erregend. Hemmende Einflüsse gehen von intrinsischen Neurontypen aus (hier nicht dargestellt). Ihre gesamten Dendriten und Axonverzweigungen liegen innerhalb der Kleinhirnrinde. Sternzellen und Korbzellen kontaktieren Purkinjezellen, während Golgi-Zellen mit der Körnerschicht verschaltet sind (Braitenberg in Schmidt, 1998 [225]).

Es ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht möglich, strikt zwischen fehlendem Neurotransmitter-Einfluß und veränderten neuronalen Schaltkreisen zu differenzieren.

An dieser Stelle bleibt anzumerken: Genetisch induzierte Somatostatin-Defizienz ist nicht unbedingt identisch mit der durch Cysteamin erzeugten Somatostatin-Insuffizienz. Die *SST-Knockout*-Maus zeigt nicht den gleichen Verhaltensphänotyp wie die endokrinologischen Mausexperimente nach Cysteamin-Einwirkung implizieren.

Verschiedene Faktoren könnten dazu beitragen: Auf Seiten der *Knockout*-Maus ist dies, wie schon erwähnt, der fehlende Entwicklungseinfluß Somatostatins und damit vielleicht eine Umorganisation betroffener Strukturen. Der Zeitpunkt des Somatostatinmangels wäre damit kritisch für funktionelle Untersuchungen.

Für Cysteamin (2-Mercaptoethylamin) ist der genaue Wirkungsmechanismus bisher nicht bekannt. Weder Entleerung der Somatostatin-Depots noch selektiver Zelltod oder verstärkter Abbau scheinen eine Rolle zu spielen. Am wahrscheinlichsten ist eine induzierte Konformationsänderung von Somatostatin, die zu seiner funktionellen Inaktivierung führt [226]. Es gibt allerdings auch gegensätzliche Effekte der Droge auf die SST-Expression [227]. Seine Effektivität und Selektivität sind nicht genau umrissen, so ist z.B. bekannt, daß es die Norepinephrin- und Dopaminkonzentration erniedrigen kann [211, 228].

Tatsache ist, Cysteamin überführt Somatostatin in eine immunologisch (SST-Antikörper) nicht detektierbare Form und dies hat in der Tat Auswirkungen auf das Mausverhalten (z.B. Beeinträchtigungen in der *open field activity* und der *acoustic startle response*) [139, 229].

Die wichtigste Frage ist die nach dem Reaktionsschema der Cysteamin-Wirkung. Ohne eine definitive Antwort ist keine Aussage über seine Selektivität möglich. Es ist nicht auszuschließen, daß Cortistatin aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Somatostatin (siehe Einleitung) ebenfalls durch Cysteamin inaktiviert wird. Damit würden sich hier überlagerende Effekte ergeben, die im Gegensatz zur selektiven Inaktivierung des Somatostatin-Präpropeptides stehen.

Die Expression der einzelnen Komponenten des Somatostatin-Systems könnte zwar im *Knockout* abweichen, doch die mRNA-Präparationen des gesamten Mausgehirns ließen in Northernhybridisierungen keinen Rückschluß auf wesentlich vom Wildtyp abweichende Transkriptionsraten erkennen. Dies schließt jedoch nicht aus, daß mit sensitiveren Techniken (z.B. quantitative RT-PCR) in gewissen Gehirnarealen Unterschiede zu messen wären.

Auch Aussagen über Desensitisierung und Internalisierung der Somatostatin-Rezeptoren als Folgeeffekte sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Wahrscheinlich spielen sie in der *Knockout*-Maus eine eher untergeordnete Rolle, da sie normalerweise Reaktionen auf Stimulation mit einem Liganden darstellen (siehe Einleitung). Sie sind also Funktionen eines intakten Somatostatin-Systems.

In der SST defizienten Maus hingegen ging es genau darum, die Signalleitung in diesem System zu unterbrechen. Qualitative und quantitative Veränderungen der Rezeptoren können deshalb außer acht gelassen werden, wenn man nur die beiden Somatostatin-Peptide betrachtet und Cortistatin nicht berücksichtigt. Seine Funktionen wären hingegen eingeschränkt, falls es wirklich ausschließlich über SST-Rezeptoren agiert.

Warum aber konnten nur wenige klar hervortretenden Defizite in der Mausmutante gefunden werden, obwohl endokrinologische Studien vielfältige Funktionen für das Somatostatin-System implizierten?

Die Lösung dieses Problems liegt in der Biologie lebender Systeme. Die Verschachtelung von Kontroll- und Rückkopplungsmechanismen macht es notwendig, außerhalb von Standardbedingungen, wie sie hier gewählt wurden, nach Effekten zu suchen. Grenzbereiche der endokrinen Kontrolle, z.B. Streßsituationen sollten mehr Defizite aufdecken als dies bisher der Fall war.

Desweiteren ist die Unterschiedlichkeit der Bezugssysteme zu beachten. Die *Knockout* – Maus ist ein in sich verändertes biologisches System. Im Gegensatz dazu stehen wissenschaftliche Ansätze, die versuchen, am intakten System der Wildtyp-Maus anzusetzen, obwohl auch hier jeder Eingriff wiederum eine Manipulation darstellt.

5.4 Perspektiven

In der Diskussion wurden schon einige neue Ansatzpunkte für eine weitere, ausgedehnte Analyse angesprochen.

Zunächst bietet es sich natürlich an, die Veränderungen des Wachstumshormon- und Corticosteron-Gehalts näher zu definieren. Für diesen Zweck wären z.B. Messungen der GHRH-, CRF- und ACTH-Freisetzung angebracht. Von Interesse wäre auch, Störungen der pulsatilen Sekretion von Wachstumshormon unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. Streßzuständen zu testen.

Variationen innerhalb des Somatostatin-Systems könnten durch quantitative RT-Polymerasekettenreaktionen oder Bindungsstudien genauer untersucht werden. Zusätzlich ließen sich durch Rezeptorspezifische Antikörper bzw. selektive Liganden fluoreszenzvermittelt unterschiedliche Verteilungen der Rezeptoren sichtbar machen. Rezeptorstudien wären ebenfalls im Zusammenhang mit Glucocorticoiden und Wachstumshormon hilfreich.

Detailliertere morphologische Studien könnten durch Überprüfung der verschiedenen Rezeptoren (Verteilung und Bindungsverhalten) zielgerichteter erfolgen.

Abgesehen von dieser ergebnisorientierten Vorgehensweise ließen sich die Somatostatin- bzw. die Rezeptor-*Knockouts* als Modellsysteme für verschiedene wissenschaftliche Experimente verwenden.

So besteht nun die Möglichkeit Cysteamin-Effekte, die ohne Beteiligung von Somatostatin erfolgen, deutlich zu machen.

Injektionen von Somatostatin bzw. seiner Analoga könnten Anwendung finden, um direkte Antworten des Somatostatin-Systems auf plötzliche Exposition des Liganden zu veranschaulichen. Dies wäre durch direkte Applikation in verschiedene Gehirnstrukturen gekoppelt mit Verhaltensversuchen oder Ableitungen an Neuronen durchführbar.

Generell lassen sich jetzt endokrinologische Hypothesen zur Funktion des Somatostatin-Systems genauer analysieren. Es sollte jetzt gezielter möglich sein, physiologische Effekte den einzelnen, inaktivierten Komponenten zuzuordnen. Dies kann *in vivo* aber auch *in vitro* anhand von Zelllinien bzw. Gewebeproben der *Knockouts* geschehen.

Einflüsse von Somatostatin in Verbindung mit verschiedenen Krankheitsbildern sind bekannt. Darunter fallen z.B. kanzerogene Veränderungen der Schilddrüse, Alzheimer,

Parkinson und chronische Schmerzzustände [230-234]. Zu fragen wäre nun, in welcher Beziehung die Störung des Somatostatin-Systems zu diesen Erkrankungen steht.

Um die Beteiligung an Lernvorgängen und Gedächtnis weiter zu vertiefen, bietet sich die Untersuchung des Hippocampus an. Indizien für einen Einfluß Somatostatins bestehen: Chronische Cysteamin-Einwirkungen bedingen Alterungserscheinungen im Hippocampus mit kognitiven Defiziten [235]. Die Reduzierung des Somatostatin-Gehalts führt im Hippocampus, ähnlich wie auch hippocampale Läsionen, zu verändertem Lernverhalten [236]. Somatostatin fördert die Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) in den CA1 und CA3 Regionen des Hippocampus [237, 238]. Dies könnte ein weiteres Anzeichen für einen Einfluß auf dort stattfindende Lernvorgänge sein.

Es ist nun auch möglich, durch Kreuzung der verschiedenen Mutanten mehrfache Geninaktivierungen (Rezeptoren und Ligand) in einer Mauslinie zu erzeugen und so das Somatostatin-System schrittweise weiter einzuschränken. Diese Limitierung der Komponenten könnte dann stärkere phänotypische Veränderungen hervorrufen, als bisher beobachtet.

6.0 ZUSAMMENFASSUNG

Somatostatin ist ein Molekül mit multifunktionellem Charakter, dem Neurotransmitter-, Neuromodulator- und (Neuro)-Hormoneigenschaften zugeschrieben werden. Gemäß seiner ubiquitären Verteilung in Geweben beeinflusst es Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse bis hin zu Lern- und Gedächtnisleistungen. Diese Wirkungen resultieren aus dem lokalen und zeitlichen Zusammenspiel eines Liganden und fünf G-Protein gekoppelter Rezeptoren (SSTR1-5).

Zur Charakterisierung der biologischen Bedeutung des Somatostatin-Systems im Gesamtorganismus wurde eine Mutationsanalyse einzelner Systemkomponenten durchgeführt. Sie umfaßte die Inaktivierung der Gene für das Somatostatin-Präpropeptid und die der Rezeptoren SSTR3 und SSTR4 durch *Gene Targeting*. Die entsprechenden Ausfallmutationen belegen: Weder die Rezeptoren 3 und 4 noch Somatostatin sind für das Überleben des Organismus unter Standardhaltungsbedingungen notwendig. Die entsprechenden Mauslinien zeigen keine unmittelbar auffälligen Einschränkungen ihrer Biologie.

Die Somatostatin-Nullmaus wurde zum Hauptgegenstand einer detaillierten Untersuchung aufgrund der übergeordneten Position des Liganden in der Signalkaskade und verfügbaren Hinweisen zu seiner Funktion. Folgende Schlußfolgerungen konnten nach eingehender Analyse gezogen werden:

Der Ausfall des Somatostatin-Gens hat erhöhte Plasmakonzentrationen an Wachstumshormon (GH) zur Konsequenz. Dies steht im Einklang mit der Rolle von Somatostatin als hemmender Faktor der Wachstumshormon-Freisetzung, die in der Mutante aufgehoben ist.

Durch die Somatostatin-Nullmaus wurde zudem deutlich:

Somatostatin interagiert als wesentliches Bindeglied zwischen der Wachstums- und Streßachse. Permanent erhöhte Corticosteron-Werte in den Mutanten implizieren einen negativen tonischen Einfluß für die Sekretion von Glucocorticoiden *in vivo*. Damit zeigt die *Knockout*-Maus, daß Somatostatin normalerweise als ein entscheidendes inhibierendes Kontrollelement der Steroidfreisetzung fungiert.

Verhaltensversuche offenbarten ein Defizit im motorischen Lernen. Somatostatin-Nullmäuse bleiben im Lernparadigma "Rotierender Stabtest" hinter ihren Artgenossen zurück, ohne aber generell in Motorik oder Koordination eingeschränkt zu sein. Diese motorischen Lernvorgänge sind von einem funktionierenden Kleinhirn abhängig. Da Somatostatin und seine Rezeptoren kaum im adulten, wohl aber im sich entwickelnden Kleinhirn auftreten, belegt dieses Ergebnis die Funktion transient in der Entwicklung exprimierter Neuropeptide – eine lang bestehende, aber bislang experimentell nicht nachgewiesene Hypothese.

Die Überprüfung weiterer physiologischer Parameter und Verhaltenskategorien unter Standard-Laborbedingungen ergab keine sichtbaren Abweichungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Damit steht nun ein Tiermodell zur weiterführenden Analyse für die Somatostatin-Forschung bereit: In endokrinologischen, elektrophysiologischen und verhaltensbiologischen Experimenten ist nun eine unmittelbare Korrelation selektiv mit dem Somatostatin-Peptid bzw. mit den Rezeptoren 3 und 4, aber auch in Kombination nach Kreuzungen der jeweiligen Null-Mäuse möglich.

ABSTRACT (Translation of page 96)

Somatostatin is a multifunctional molecule which is a neurotransmitter, attributed with neuromodulator and neurohormone functions. Based on its ubiquitous tissue distribution it influences metabolic and developmental processes, as well as learning and memory tasks. Those actions depend on local and temporal interactions of a ligand and five G protein-coupled receptors (SSTR1-5).

In order to characterize the biological importance of the somatostatin system in the organism, a mutational analysis of single system components was performed. It involved the inactivation of the somatostatin prepropeptide and the SSTR3 and SSTR4 receptors by gene targeting. The respective null mutations proved: neither SSTR3 and SSTR4 nor somatostatin are necessary for the survival of the organism under standard animal housing conditions. The knockout mouse lines do not exhibit obvious limitations in their biology.

The somatostatin null mouse was chosen to be the main target of a detailed analysis because of the superior role of the ligand in the signaling cascade and available information about its function. The following conclusion could be drawn after an in-depth analysis. Loss of the somatostatin gene leads to increased plasma concentrations of growth hormone (GH). This is in agreement with the role of somatostatin as an inhibiting factor of growth hormone release, which is abolished in the mutant.

In addition, the somatostatin null mouse also clarified that somatostatin is acting as a crucial link between the growth and stress axes. Permanently increased corticosterone levels in the mutant imply its negative tonic influence on the secretion of glucocorticoids *in vivo*. Thus, this knockout mouse emphasizes that somatostatin normally functions as an inhibiting control element of steroid release.

Behavioral experiments displayed a deficit in motor learning. Somatostatin null mice are less capable than their wildtype littermates in a learning paradigm based on the rotarod test—without being generally restricted in their motor coordination. Motor learning processes are dependent on a functional cerebellum. As somatostatin and its receptors are hardly expressed in the adult, in contrast to the developing cerebellum, this result implies a transient function of developmentally expressed neuropeptides—a long-standing but until now, experimentally unproven hypothesis.

The evaluation of additional physiological parameters and behavioral categories did not reveal differences compared to wildtype mice under standard laboratory conditions.

Consequently, an animal model for further analysis is provided for somatostatin research. Endocrinological, electrophysiological and behavioral experiments now allow a correlation between selective somatostatin peptide or SSTR3 and SSTR4 actions, as well as combinations of them, by mating the respective null mice.

7.0 ANHANG

7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Angaben gemäß der Reihenfolge im Text (Titel sind z.T. verkürzt angegeben).

Tab. 1: Beispiele der Somatostatin-Multigenfamilie und ihrer Peptidprodukte.....	Seite 3
Abb. 1: Schematische Darstellung der Somatostatin-Genstruktur.....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung der durch cAMP/CREB induzierten Transkription.....	6
Abb. 3: Das Somatostatin-Präpropeptid.....	7
Abb. 4: Die Prozessierung des Somatostatin-Vorläufermoleküls.....	9
Abb. 5: Promotor- und Genstruktur des Somatostatin-Rezeptors 2.....	13
Abb. 6: Aneinanderreihung der Aminosäuresequenzen der Somatostatin-Rezeptoren.....	14
Abb. 7: Graphische Zusammenfassung der Verwandtschaftsbeziehungen.....	17
Abb. 8: Modell der Orientierung von Somatostatin-Rezeptoren.....	18
Tab. 2: Charakterisierung der Somatostatin-Rezeptoren.....	23
Tab. 3: Gewebsspezifische Expression der Somatostatin-Rezeptorgene.....	25
Abb. 9: Interaktionen im Somatostatin-System.....	28
Abb.10: Flußdiagramm: Methoden.....	30
Tab. 4: Zeitliche Koordination zur Gewinnung von Blastocysten/Ammenmäusen.....	39
Abb.11: Übersichtsschema:SELDI-Technologie.....	42
Abb.12: Von der genomischen Sequenz zu mutierten ES-Zellen.....	45
Abb.13: Subklonierung und Southernhybridisierung.....	46
Tab. 5: Basisdaten der <i>Targeting</i> -Vektoren.....	48
Abb.14: Übersichtsschema der Geninaktivierung (SST, SSTR3, SSTR4).....	48
Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der drei Zielloci.....	52
Abb.15: PCR-positive ES-Zellklone: Beispiele Somatostatin und SSTR3.....	53
Abb.16: ES-Zellklon positiv in der Southernhybridisierung.....	54
Abb.17: Chromosomensatz einer euploiden ES-Zelle der Maus.....	55
Abb.18: Von der mutierten ES-Zelle zur <i>Knockout</i> -Maus.....	56
Abb.19: Blastocysteninjektion.....	57
Tab. 7: Resultate zur Erzeugung von Mauschimären.....	58
Abb.20: Southernhybridisierung: SST, SSTR3 und SSTR4.....	60
Abb.21: Northern- und RT/PCR-Verifizierung.....	61
Abb.22: Radioimmunoassay für SST.....	62

Abb.23: Somatostatin: Wachstumshormon.....	63
Abb.24: Somatostatin: Corticosteron.....	64
Abb.25: Somatostatin: Thyroxin und Glukose.....	65
Abb.26: Reproduzierbarkeit der Proteinspektren.....	66
Abb.27: Homogenität der Serumproben.....	67
Abb.28: Koronaler Schnitt des Maushirns.....	67
Abb.29: Northernhybridisierung von Systemkomponenten.....	68
Abb.30: Autoradiographie mit Somatostatin als Strahler.....	69
Abb.31: Gehirnaktivität: Deoxy-Glukose.....	69
Tab. 8: Verhaltensversuche.....	71
Abb.32: Die <i>Rotarod</i> -Versuchsanordnung.....	72
Abb.33: <i>Rotarod</i> -Daten.....	72
Abb.34: Cerebellum.....	74
Abb.35: Intrahypothalamisches Netzwerk der Wachstumshormon-Freisetzung.....	79
Abb.36: Somatostatin als Bindeglied zwischen Glucocorticoiden/Wachstumshormon...84	
Abb.37: Darstellung der Organisation des cerebralen Cortex.....	91

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Erläutert sind nur die wichtigsten Abkürzungen.

A, Ala.....	Alanin
ACTH.....	Adrenokortikotropes Hormon
cAMP.....	zyklisches Adenosinmonophosphat
ARC.....	arkuatische Nucleus
C, Cys.....	Cystein
AS.....	Aminosäure
CRE.....	cyclic AMP response element
CRF.....	Corticotropin releasing factor (hormone)
CREB.....	CRE bindendes Protein
CST.....	Cortistatin
D, Asp.....	Asparaginsäure
EFB.....	Embryonale Fibroblasten
ES.....	Embryonale Stammzellen
GABA.....	gamma-Aminobuttersäure
G, Gly.....	Glycin
GC.....	Glucocorticoide
GH.....	Wachstumshormon
GHRH.....	Wachstumshormon freisetzendes Hormon
GPR.....	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRE.....	Glucocorticoid response element
E, Glu.....	Glutaminsäure
EGF.....	Epidermal growth factor
En.....	engrailed = homeobox gene
ERE.....	Estradiol response element
F, Phe.....	Phenylalanin
G418.....	Gentamycin-Derivat
H, His.....	Histidin
H&E.....	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
I, Ile.....	Isoleucin
IGF.....	Insulin like growth factor
K, Lys.....	Lysin
L, Leu.....	Leucin
LTD.....	Langzeitdepression

LTP.....	Langzeitpotenzierung
M, Met.....	Methionin
N, Asn.....	Asparagin
PC.....	Prohormon konvertierendes Enzym
PDGF.....	platelet-derived growth factor
P, Pro.....	Prolin
PBS.....	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEV.....	periventriculäre Nucleus
Q, Gln.....	Glutamin
R, Arg.....	Arginin
RIA.....	Radioimmunoassay
S, Ser.....	Serin
SELDI.....	Surface enhanced laser desorption/ionization (Massenspektrometrie)
SLC.....	mit Somatostatin verwandter Rezeptor
SMS-UE.....	Somatostatin gene upstream enhancer element
SRIF.....	Somatotrophin release inhibiting factor = Somatostatin
SST.....	Somatostatin
SSTR.....	Somatostatin-Rezeptor
SSTR2A, SSTR2B.....	Splicevarianten des SSTR2
T, Thr.....	Threonin
T3.....	Triiodthyronin
T4.....	Thyroxin
TM.....	transmembraner Bereich
TSH.....	Thyroid stimulating hormone
UTR.....	untranslated region
V, Val.....	Valin
W, Trp.....	Tryptophan
Y, Tyr.....	Tyrosin

7.3 Literaturverzeichnis

1. **Davies, R.W., E.J. Gallagher, and A. Savioz**, *Reverse genetics of the mouse central nervous system: targeted genetic analysis of neuropeptide function and reverse genetic screens for genes involved in human neurodegenerative disease*. *Prog Neurobiol*, 1994. 42: p. 319-31.
2. **Orr-Weaver, T.L., J.W. Szostak, and R.J. Rothstein**, *Yeast transformation: a model system for the study of recombination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78: p. 6354-8.
3. **Spradling, A.C. and G.M. Rubin**, *Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes*. *Science*, 1982. 218: p. 341-7.
4. **Bradley, A., M. Evans, M.H. Kaufmann, and E. Robertson**, *Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. *Nature*, 1984. 309: p. 255-60.
5. **Capecchi, M.R.**, *The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting*. *Trends in Genetics*, 1989. 5: p. 70-6.
6. **Sauer, B.**, *Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system*. *Methods*, 1998. 14: p. 381-92.
7. **Krulich, L., A.P. Dhariwal, and S.M. McCann**, *Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro*. *Endocrinology*, 1968. 83: p. 783-90.
8. **Guillemin, R.**, *Somatostatin: the early days*. *Metabolism*, 1992. 41: p. 2-4.
9. **Hellman, B. and A. Lernmark**, *Inhibition of the in vitro secretion of insulin by an extract of pancreatic alpha-1 cells*. *Endocrinology*, 1969. 84: p. 1484-8.
10. **Brazeau, P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, and R. Guillemin**, *Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone*. *Science*, 1973. 179: p. 77-9.
11. **Berelowitz, M., et al.**, *Somatostatin-like immunoactivity and biological activity is present in Tetrahymena pyriformis, a ciliated protozoan*. *Endocrinology*, 1982. 110: p. 1939-44.
12. **Falkmer, S., R.P. Elde, C. Hellerstrom, B. Petersson, S. Efendic, J. Fohlman, and J.B. Siljevall**, *Some phylogenetical aspects on the occurrence of somatostatin in the gastro-entero pancreatic endocrine system. A histological and immunocytochemical study, combined with quantitative radioimmunological assays of tissue extracts*. *Arch Histol Jpn*, 1977. 40 Suppl: p. 99-117.

13. **Werner, H., M. Fridkin, D. Aviv, and Y. Koch,** *Immunoreactive and bioactive somatostatin-like material is present in tobacco (Nicotiana tabacum)*. Peptides, 1985. 6: p. 797-802.
14. **Conlon, J.M., H. Tostivint, and H. Vaudry,** *Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives*. Regul Pept, 1997. 69: p. 95-103.
15. **Su, C.J., J.W. White, W.H. Li, C.C. Luo, M.L. Frazier, G.F. Saunders, and L. Chan,** *Structure and evolution of somatostatin genes*. Mol Endocrinol, 1988. 2: p. 209-16.
16. **de Lecea, L., et al.,** *A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties*. Nature, 1996. 381: p. 242-5.
17. **Tostivint, H., et al.,** *Occurrence of two somatostatin variants in the frog brain: characterization of the cDNAs, distribution of the mRNAs, and receptor-binding affinities of the peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93: p. 12605-10.
18. **Tavianini, M.A., T.E. Hayes, M.D. Magazin, C.D. Minth, and J.E. Dixon,** *Isolation, characterization, and DNA sequence of the rat somatostatin gene*. J Biol Chem, 1984. 259: p. 11798-803.
19. **Montminy, M.R., K.A. Sevarino, J.A. Wagner, G. Mandel, and R.H. Goodman,** *Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83: p. 6682-6.
20. **Vallejo, M., C.P. Miller, and J.F. Habener,** *Somatostatin gene transcription regulated by a bipartite pancreatic islet D-cell-specific enhancer coupled synergetically to a cAMP response element*. J Biol Chem, 1992. 267: p. 12868-75.
21. **Schwartz, P.T. and M. Vallejo,** *Differential regulation of basal and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate-induced somatostatin gene transcription in neural cells by DNA control elements that bind homeodomain proteins*. Mol Endocrinol, 1998. 12: p. 1280-93.
22. **Vallejo, M., C.P. Miller, W. Beckman, and J.F. Habener,** *Repression of somatostatin gene transcription mediated by two promoter silencer elements*. Mol Cell Endocrinol, 1995. 113: p. 61-72.
23. **Hayes, T.E. and J.E. Dixon,** *Z-DNA in the rat somatostatin gene*. J Biol Chem, 1985. 260: p. 8145-56.
24. **Patel, Y.C.,** *General Aspects of the Biology and Function of Somatostatin*, in *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*, C. Weil, E.E. Müller, and M.O. Thorner, Editors. 1992, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 1-16.

25. **Goudet, G., S. Delhalle, F. Biemar, J.A. Martial, and B. Peers**, *Functional and Cooperative Interactions between the Homeodomain PDX1, Pbx, and Prepl Factors on the Somatostatin Promotor*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. 274: p. 4067-73.
26. **Montminy, M.R., M.J. Low, L. Tapia-Arancibia, S. Reichlin, G. Mandel, and R.H. Goodman**, *Cyclic AMP regulates somatostatin mRNA accumulation in primary diencephalic cultures and in transfected fibroblast cells*. J Neurosci, 1986. 6: p. 1171-6.
27. **Montminy, M.R. and L.M. Bilezikjian**, *Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene*. Nature, 1987. 328: p. 175-8.
28. **Gonzalez, G.A. and M.R. Montminy**, *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133*. Cell, 1989. 59: p. 675-80.
29. **Della Fazia, M.A., G. Servillo, and P. Sassone-Corsi**, *Cyclic AMP signaling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM*. FEBS, 1997. 410: p. 22-4.
30. **Montminy, M., P. Brindle, J. Arias, K. Ferreri, and R. Armstrong**, *Regulation of somatostatin gene transcription by cyclic adenosine monophosphate*. Metabolism, 1996. 45: p. 4-7.
31. **Bullock, B.P. and J.F. Habener**, *Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge*. Biochemistry, 1998. 37: p. 3795-809.
32. **Walton, K.M., R.P. Rehfuss, J.C. Chrivia, J.E. Lochner, and R.H. Goodman**, *A Dominant Repressor of Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate (cAMP)-Regulated Enhancer-Binding Protein Activity Inhibits the cAMP-Mediated Induction of the Somatostatin Promotor in Vivo*. Molecular Endocrinology, 1992. 6: p. 647-55.
33. **Montminy, M., P. Brindle, J. Arias, K. Ferreri, and R. Armstrong**, *Regulation of somatostatin gene transcription by cAMP*. Ciba Found Symp, 1995. 190: p. 7-20; discussion -5.
34. **Leonard, J., B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee, and M.R. Montminy**, *Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells*. Mol Endocrinol, 1993. 7: p. 1275-83.
35. **Habener, J.F., T.E. Meyer, Y. Yun, G. Waeber, and J.P. Hoeffler**, *Characterization of a cAMP-regulated enhancer-binding protein*. Metabolism, 1990. 39: p. 13-6.

36. **Tamai, K.T., L. Monaco, F. Nantel, E. Zazopoulos, and P. Sassone-Corsi**, *Coupling signalling pathways to transcriptional control: nuclear factors responsive to cAMP*. *Recent Prog Horm Res*, 1997. 52: p. 121-39; discussion 39-40.
37. **Creighton, T.E.**, *Proteins: structures and molecular properties*. 1993: W. H. Freeman and Company.
38. **Aletta, J.M., T.R. Cimato, and M.J. Ettinger**, *Protein methylation: a signal event in post-translational modification*. *Trends Biochem Sci*, 1998. 23: p. 89-91.
39. **Hutton, J.C.**, *Subtilisin-like proteinases involved in the activation of proproteins of the eukaryotic secretory pathway*. *Curr Opin Cell Biol*, 1990. 2: p. 1131-42.
40. **Fuller, R.S., R.E. Sterne, and J. Thorner**, *Enzymes required for yeast prohormone processing*. *Annu Rev Physiol*, 1988. 50: p. 345-62.
41. **Seidah, N.G., R. Day, and M. Chretien**, *The family of pro-hormone and pro-protein convertases*. *Biochem Soc Trans*, 1993. 21: p. 685-91.
42. **Creemers, J.W., R.S. Jackson, and J.C. Hutton**, *Molecular and cellular regulation of prohormone processing*. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. 9: p. 3-10.
43. **Rothman, J.E. and L. Orci**, *Molecular dissection of the secretory pathway*. *Nature*, 1992. 355: p. 409-15.
44. **Seidah, N.G. and M. Chretien**, *Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins*. *Curr Opin Biotechnol*, 1997. 8: p. 602-7.
45. **Munzer, J.S., et al.**, *In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7*. *J Biol Chem*, 1997. 272: p. 19672-81.
46. **Brakch, N., M. Rholam, H. Boussetta, and P. Cohen**, *Role of beta-turn in proteolytic processing of peptide hormone precursors at dibasic sites*. *Biochemistry*, 1993. 32: p. 4925-30.
47. **Rholam, M., P. Nicolas, and P. Cohen**, *Precursors for peptide hormones share common secondary structures forming features at the proteolytic processing sites*. *FEBS Lett*, 1986. 207: p. 1-6.
48. **Mitra, J., X. Tang, S.C. Almo, and D. Shields**, *Temperature-induced conformational changes in prosomatostatin-II: implications for processing*. *Biochem J*, 1998. 334: p. 275-82.
49. **Goodman, R.H., D.C. Aron, and B.A. Roos**, *Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes*. *J Biol Chem*, 1983. 258: p. 5570-3.

50. **Patel, Y.C. and O.N. W**, *Peptides derived from cleavage of prosomatostatin at carboxyl- and amino-terminal segments. Characterization of tissue and secreted forms in the rat.* J Biol Chem, 1988. 263: p. 745-51.
51. **Patel, Y.C., T. Wheatley, and C. Ning**, *Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and nonneural tissues and portal plasma of the rat.* Endocrinology, 1981. 109: p. 1943-9.
52. **Galanopoulou, A.S., N.G. Seidah, and Y.C. Patel**, *Direct role of furin in mammalian prosomatostatin processing.* Biochem J, 1995. 309: p. 33-40.
53. **Brakch, N., A.S. Galanopoulou, Y.C. Patel, G. Boileau, and N.G. Seidah**, *Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways.* FEBS Lett, 1995. 362: p. 143-6.
54. **Patel, Y.C., A.S. Galanopoulou, S.N. Rabbani, J.L. Liu, M. Ravazzola, and M. Amherdt**, *Somatostatin-14, somatostatin-28, and prosomatostatin[1-10] are independently and efficiently processed from prosomatostatin in the constitutive secretory pathway in islet somatostatin tumor cells (1027B2).* Mol Cell Endocrinol, 1997. 131: p. 183-94.
55. **Furuta, M., et al.**, *Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94: p. 6646-51.
56. **Brakch, N., P. Cohen, and G. Boileau**, *Processing of human prosomatostatin in AtT-20 cells: S-28 and S-14 are generated in different secretory pathways.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. 205: p. 221-9.
57. **Seidah, N.G., R. Day, M. Marcinkiewicz, and M. Chretien**, *Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins.* Ann N Y Acad Sci, 1998. 839: p. 9-24.
58. **Schonbrunn, A. and H. Tashjian, Jr.**, *Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture.* J Biol Chem, 1978. 253: p. 6473-83.
59. **Reubi, J.C., M. Perrin, J. Rivier, and W. Vale**, *High affinity binding sites for somatostatin to rat pituitary.* Biochem Biophys Res Commun, 1982. 105: p. 1538-45.
60. **Reubi, J.C.**, *Evidence for two somatostatin-14 receptor types in rat brain cortex.* Neurosci Lett, 1984. 49: p. 259-63.
61. **Yamada, Y., S.R. Post, K. Wang, H.S. Tager, G.I. Bell, and S. Seino**, *Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89: p. 251-5.

62. **Meyerhof, W., I. Wulfsen, C. Schonrock, S. Fehr, and D. Richter**, *Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of a somatostatin-14 receptor in rat brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89: p. 10267-71.
63. **Bruno, J.F., Y. Xu, J. Song, and M. Berelowitz**, *Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89: p. 11151-5.
64. **Schwabe, W., M.B. Brennan, and U. Hochgeschwender**, *Isolation and characterization of the mouse (*Mus musculus*) somatostatin receptor type-4-encoding gene (*mSSTR4*)*. Gene, 1996. 168: p. 233-5.
65. **Lublin, A.L., N.L. Diehl, and U. Hochgeschwender**, *Isolation and characterization of the gene encoding the type 5 mouse (*Mus musculus*) somatostatin receptor (*msst5*)*. Gene, 1997. 195: p. 63-6.
66. **Yasuda, K., S. Rens-Domiano, C.D. Breder, S.F. Law, C.B. Saper, T. Reisine, and G.I. Bell**, *Cloning of a novel somatostatin receptor, *SSTR3*, coupled to adenylylcyclase*. J Biol Chem, 1992. 267: p. 20422-8.
67. **Dahms, P. and R. Mentlein**, *Purification of the main somatostatin-degrading proteases from rat and pig brains, their action on other neuropeptides, and their identification as endopeptidases 24.15 and 24.16*. Eur J Biochem, 1992. 208: p. 145-54.
68. **Okawa, Y., A. Adachi, M. Ino, S. Nagumo, and H. Matsui**, *Further characterization of the 5'-flanking promoter region of the human beta1-adrenergic receptor gene*. Psychiatry Clin Neurosci, 1998. 52: p. 453-8.
69. **Ding, D., M. Toth, Y. Zhou, C. Parks, B.J. Hoffman, and T. Shenk**, *Glial cell-specific expression of the serotonin 2 receptor gene: selective reactivation of a repressed promoter*. Brain Res Mol Brain Res, 1993. 20: p. 181-91.
70. **Xu, Y., M. Berelowitz, and J.F. Bruno**, *Characterization of the promoter region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness*. Mol Cell Endocrinol, 1998. 139: p. 71-7.
71. **Pscherer, A., U. Dorflinger, J. Kirfel, K. Gawlas, J. Ruschoff, R. Buettner, and R. Schule**, *The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene*. Embo J, 1996. 15: p. 6680-90.
72. **Kraus, J., M. Woltje, N. Schonwetter, and V. Holtt**, *Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene*. FEBS Lett, 1998. 428: p. 165-70.

73. **Woltje, M., J. Kraus, and V. Holtt**, *Identification of a functional 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element within the second promoter of the mouse somatostatin receptor type 2 gene*. FEBS Lett, 1998. 440: p. 107-10.
74. **Ayoubi, T.A. and W.J. Van De Ven**, *Regulation of gene expression by alternative promoters*. Faseb J, 1996. 10: p. 453-60.
75. **Bruns, C., G. Weckbecker, F. Raulf, H. Lubbert, and D. Hoyer**, *Characterization of somatostatin receptor subtypes*, in *Somatostatin and its receptors*, D.J. Chadwick and G. Cardew, Editors. 1995, John Wiley & Sons. p. 89-101; discussion -10.
76. **Reisine, T. and G.I. Bell**, *Molecular biology of somatostatin receptors*. Endocr Rev, 1995. 16: p. 427-42.
77. **Bell, G.I., K. Yasuda, H. Kong, S.F. Law, K. Raynor, and T. Reisine**, *Molecular biology of somatostatin receptors*, in *Somatostatin and its receptors*, D.J. Chadwick and G. Cardew, Editors. 1995, John Wiley and Sons: Chichester. p. 65-79; discussion 80-8.
78. **O'Carroll, A.M., K. Raynor, S.J. Lolait, and T. Reisine**, *Characterization of cloned human somatostatin receptor SSTR5*. Mol Pharmacol, 1994. 46: p. 291-8.
79. **Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson**, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research, 1994. 22: p. 4673-80.
80. **Felsenstein, J.**, *PHYLIP, Phylogeny Inference Package (Version 3.2)*. Cladistics, 1993. 5: p. 164-6.
81. **Baldwin, J.M.**, *Structure and function of receptors coupled to G proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1994. 6: p. 180-90.
82. **Kaupmann, K., C. Bruns, F. Raulf, H.P. Weber, H. Mattes, and H. Lubbert**, *Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor*. Embo J, 1995. 14: p. 727-35.
83. **Ozenberger, B.A. and J.R. Hadcock**, *A single amino acid substitution in somatostatin receptor subtype 5 increases affinity for somatostatin-14*. Mol Pharmacol, 1995. 47: p. 82-7.
84. **Fitzpatrick, V.D. and R.L. Vandlen**, *6agonist selectivity determinants in somatostatin receptor subtypes I and II*. J Biol Chem, 1994. 269: p. 24621-6.
85. **Rens-Domiano, S. and T. Reisine**, *Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors*. J Biol Chem, 1991. 266: p. 20094-102.

86. **Patel, Y.C., R. Panetta, E. Escher, M. Greenwood, and C.B. Srikant**, *Expression of multiple somatostatin receptor genes in AtT-20 cells. Evidence for a novel somatostatin-28 selective receptor subtype*. J Biol Chem, 1994. 269: p. 1506-9.
87. **Kong, H., K. Raynor, K. Yasuda, G.I. Bell, and T. Reisine**, *Mutation of an aspartate at residue 89 in somatostatin receptor subtype 2 prevents Na⁺ regulation of agonist binding but does not alter receptor-G protein association*. Mol Pharmacol, 1993. 44: p. 380-4.
88. **Tian, W.N. and R.C. Deth**, *Precoupling of Gi/G(o)-linked receptors and its allosteric regulation by monovalent cations*. Life Sci, 1993. 52: p. 1899-907.
89. **Hoyer, D., H. Lubbert, and C. Bruns**, *Molecular pharmacology of somatostatin receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1994. 350: p. 441-53.
90. **Patel, Y.C. and C.B. Srikant**, *Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5)*. Endocrinology, 1994. 135: p. 2814-7.
91. **Hocart, S.J., R. Jain, W.A. Murphy, J.E. Taylor, B. Morgan, and D.H. Coy**, *Potent antagonists of somatostatin: synthesis and biology*. J Med Chem, 1998. 41: p. 1146-54.
92. **Baumbach, W.R., et al.**, *A linear hexapeptide somatostatin antagonist blocks somatostatin activity in vitro and influences growth hormone release in rats*. Mol Pharmacol, 1998. 54: p. 864-73.
93. **Roosterman, D., G. Glassmeier, H. Baumeister, H. Scherubl, and W. Meyerhof**, *A somatostatin receptor 1 selective ligand inhibits Ca²⁺ currents in rat insulinoma 1046-38 cells*. FEBS Lett, 1998. 425: p. 137-40.
94. **Bass, R.T., B.L. Buckwalter, B.P. Patel, M.H. Pausch, L.A. Price, J. Strnad, and J.R. Hadcock**, *Identification and characterization of novel somatostatin antagonists [published erratum appears in Mol Pharmacol 1997 Jan;51(1):170]*. Mol Pharmacol, 1996. 50: p. 709-15.
95. **Roth, A., H.J. Kreienkamp, W. Meyerhof, and D. Richter**, *Phosphorylation of four amino acid residues in the carboxyl terminus of the rat somatostatin receptor subtype 3 is crucial for its desensitization and internalization*. J Biol Chem, 1997. 272: p. 23769-74.
96. **Meyerhof, W.**, *The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1998. 133: p. 55-108.
97. **Bertherat, J., et al.**, *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: p. 94-9.

98. **Presky, D.H. and A. Schonbrunn**, *Somatostatin pretreatment increases the number of somatostatin receptors in GH4C1 pituitary cells and does not reduce cellular responsiveness to somatostatin*. J Biol Chem, 1988. 263: p. 714-21.
99. **Hukovic, N., R. Panetta, U. Kumar, and Y.C. Patel**, *Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation*. Endocrinology, 1996. 137: p. 4046-9.
100. **Roosterman, D., A. Roth, H.J. Kreienkamp, D. Richter, and W. Meyerhof**, *Distinct agonist-mediated endocytosis of cloned rat somatostatin receptor subtypes expressed in insulinoma cells*. J Neuroendocrinol, 1997. 9: p. 741-51.
101. **Roth, A., H.J. Kreienkamp, R.B. Nehring, D. Roosterman, W. Meyerhof, and D. Richter**, *Endocytosis of the rat somatostatin receptors: subtype discrimination, ligand specificity, and delineation of carboxy-terminal positive and negative sequence motifs*. DNA Cell Biol, 1997. 16: p. 111-9.
102. **Kreienkamp, H.J., A. Roth, and D. Richter**, *Rat somatostatin receptor subtype 4 can be made sensitive to agonist-induced internalization by mutation of a single threonine (residue 331)*. DNA Cell Biol, 1998. 17: p. 869-78.
103. **Hipkin, R.W., J. Friedman, R.B. Clark, C.M. Eppler, and A. Schonbrunn**, *Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor*. J Biol Chem, 1997. 272: p. 13869-76.
104. **Heerding, J., K. Raynor, and T. Reisine**, *The third intracellular loop of the delta opioid receptor is involved in coupling to adenylyl cyclase*. Soc Neurosci Abstr, 1994. 20: p. 907-10.
105. **Hukovic, N., R. Panetta, U. Kumar, M. Rocheville, and Y.C. Patel**, *The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization*. J Biol Chem, 1998. 273: p. 21416-22.
106. **Clapham, D.E.**, *The G-protein nanomachine [news; comment]*. Nature, 1996. 379: p. 297-9.
107. **Reisine, T.**, *Somatostatin*. Cell Mol Neurobiol, 1995. 15: p. 597-614.
108. **Kleuss, C.**, *Somatostatin modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in GH3 cells via a specific G(o) splice variant*. Ciba Found Symp, 1995. 190: p. 171-82; discussion 82-6.
109. **Hou, C., R.L. Gilbert, and D.L. Barber**, *Subtype-specific signaling mechanisms of somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2*. J Biol Chem, 1994. 269: p. 10357-62.

110. **Watson, T.W. and Q.J. Pittman**, *Somatostatin(14) and -(28) but not somatostatin(1-12) hyperpolarize CA1 pyramidal neurons in vitro*. Brain Res, 1988. 448: p. 40-5.
111. **Schweitzer, P., S.G. Madamba, and G.R. Siggins**, *Somatostatin increases a voltage-insensitive K⁺ conductance in rat CA1 hippocampal neurons*. J Neurophysiol, 1998. 79: p. 1230-8.
112. **Vantus, T., P. Csermely, I. Teplan, and G. Keri**, *The tumor-selective somatostatin analog, TT2-32 induces a biphasic activation of phosphotyrosine phosphatase activity in human colon tumor cell line, SW620*. Tumour Biol, 1995. 16: p. 261-7.
113. **Buscail, L., et al.**, *Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92: p. 1580-4.
114. **White, R.E., A. Schonbrunn, and D.L. Armstrong**, *Somatostatin stimulates Ca(2+)-activated K⁺ channels through protein dephosphorylation*. Nature, 1991. 351: p. 570-3.
115. **Bito, H. and et al.**, *Functional coupling of SSTR4, a major hippocampal somatostatin receptor, to adenylate cyclase inhibition, arachidonate release and activation of the mitogen-activated protein kinase cascade*. J Biol Chem., 1994. 269: p. 12722-30.
116. **Bruns, C., F. Raulf, D. Hoyer, J. Schloss, H. Lübbert, and G. Weckbecker**, *Binding Properties of Somatostatin Receptor Subtypes*. Metabolism, 1996. 45: p. 17-20.
117. **Kolakowski, L.F., Jr., et al.**, *Characterization of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors*. FEBS Lett, 1996. 398: p. 253-8.
118. **Jung, B.P., T. Nguyen, L.F. Kolakowski, Jr., K.R. Lynch, H.H. Heng, S.R. George, and O.D. BF**, *Discovery of a novel human G protein-coupled receptor gene (GPR25) located on chromosome 1*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 230: p. 69-72.
119. **O'Dowd, B.F., et al.**, *The cloning and chromosomal mapping of two novel human opioid-somatostatin-like receptor genes, GPR7 and GPR8, expressed in discrete areas of the brain*. Genomics, 1995. 28: p. 84-91.
120. **O'Dowd, B.F., et al.**, *Cloning and chromosomal mapping of four putative novel human G-protein- coupled receptor genes*. Gene, 1997. 187: p. 75-81.
121. **Tovari, J., et al.**, *A somatostatin analogue induces translocation of Ku 86 autoantigen from the cytosol to the nucleus in colon tumour cells*. Cell Signal, 1998. 10: p. 277-82.

122. **Vincens, M., F. Mauvais-Jarvis, and S. Behar**, *A novel recognition site for somatostatin-14 on the GABA(A) receptor complex*. Eur J Pharmacol, 1998. 344: p. R1-2.
123. **de Lecea, L. and J.G. Sutcliffe**, *Peptides, sleep and cortistatin [news]*. Mol Psychiatry, 1996. 1: p. 349-51.
124. **Fukusumi, S., et al.**, *Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 232: p. 157-63.
125. **Siehler, S., K. Seuwen, and D. Hoyer**, *[125I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998. 357: p. 483-9.
126. **Patel, Y.C., M.T. Greenwood, R. Panetta, L. Demchyshyn, H. Niznik, and C.B. Srikant**, *The somatostatin receptor family*. Life Sci, 1995. 57: p. 1249-65.
127. **Leroux, P., C. Bodenant, E. Bologna, B. Gonzalez, and H. Vaudry**, *Transient expression of somatostatin receptors in the brain during development*. Ciba Found Symp, 1995. 190: p. 127-37; discussion 37-41.
128. **Forloni, G., C. Hohmann, and J.T. Coyle**, *Developmental expression of somatostatin in mouse brain. I. Immunocytochemical studies*. Brain Res Dev Brain Res, 1990. 53: p. 6-25.
129. **Cavanagh, M.E. and J.G. Parnavelas**, *Development of somatostatin immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunocytochemical-autoradiographic study*. J Comp Neurol, 1988. 268: p. 1-12.
130. **Naus, C.C., J.H. Morrison, and F.E. Bloom**, *Development of somatostatin-containing neurons and fibers in the rat hippocampus*. Brain Res, 1988. 468: p. 113-21.
131. **Chun, J.J.M., N.M. J, and S.C. J**, *Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide immunoreactive neurons*. Nature, 1987. 325: p. 617-20.
132. **Naus, C.C.**, *Developmental appearance of somatostatin in the rat cerebellum: in situ hybridization and immunohistochemistry*. Brain Res Bull, 1990. 24: p. 583-92.
133. **Wulfsen, I., W. Meyerhof, S. Fehr, and D. Richter**, *Expression patterns of rat somatostatin receptor genes in pre- and postnatal brain and pituitary*. J Neurochem, 1993. 61: p. 1549-52.
134. **Hartmann, D., S. Fehr, W. Meyerhof, and D. Richter**, *Distribution of somatostatin receptor subtype 1 mRNA in the developing cerebral hemispheres of the rat*. Dev Neurosci, 1995. 17: p. 246-55.

135. **Viollet, C., et al.**, *Differential expression of multiple somatostatin receptors in the rat cerebellum during development*. J Neurochem, 1997. 68: p. 2263-72.
136. **Reichlin, S.**, *Somatostatin*. N Engl J Med, 1983. 309: p. 1495-501.
137. **Reichlin, S.**, *Somatostatin (second of two parts)*. N Engl J Med, 1983. 309: p. 1556-63.
138. **Schettini, G., T. Florio, G. Magri, M. Grimaldi, O. Meucci, E. Landolfi, and A. Marino**, *Somatostatin and SMS 201-995 reverse the impairment of cognitive functions induced by cysteamine depletion of brain somatostatin*. Eur J Pharmacol, 1988. 151: p. 399-407.
139. **Kungel, M., M. Koch, and E. Friauf**, *Cysteamine impairs the development of the acoustic startle response in rats: possible role of somatostatin*. Neurosci Lett, 1996. 202: p. 181-4.
140. **Buchs, A., F. Marki, and U. Keller**, *Effect of somatostatin and two of its analogues on basal and arginine-stimulated insulin and glucagon secretion in the dog*. Regul Pept, 1982. 4: p. 117-26.
141. **Scanes, C.G. and S. Harvey**, *Somatostatin inhibition of thyrotropin-releasing hormone- and growth hormone-releasing factor-induced growth hormone secretion in young and adult anesthetized chickens*. Gen Comp Endocrinol, 1989. 75: p. 256-64.
142. **Grant, M.B. and et al.**, *Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis?* Circulation., 1994. 89: p. 1511-7.
143. **Corleto, V.D., C. Severi, D.H. Coy, G. Delle Fave, and R.T. Jensen**, *Colonic smooth muscle cells possess a different subtype of somatostatin receptor from gastric smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1997. 272: p. G689-97.
144. **Yamasaki, T., K. Chijiwa, and Y. Chijiwa**, *Somatostatin inhibits cholecystokinin-induced contraction of isolated gallbladder smooth muscle cells*. J Surg Res, 1995. 59: p. 743-6.
145. **Ferriero, D.M. and et al.**, *Somatostatin enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells*. Brain Res Dev Brain Res., 1994. 80: p. 13-8.
146. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis**, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
147. **Danielson, P.E., S. Forss-Petter, M.A. Brow, L. Calavetta, J. Douglass, R.J. Milner, and J.G. Sutcliffe**, *p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin*. Dna, 1988. 7: p. 261-7.

148. **Ramirez-Solis, R., A.C. Davis, and A. Bradley**, *Gene targeting in embryonic Stem cells*, in *Methods in enzymology, guide to techniques in mouse development*, P.M. Wassarman and M.L. DePamphilis, Editors. 1993: Academic Press. p. 855-78.
149. **Laird, P.W., A. Zijderveld, K. Linders, M.A. Rudnicki, R. Jaenisch, and A. Berns**, *Simplified mammalian DNA Isolation procedure*. *Nucleic Acids Research*, 1991. 19: p. 4293.
150. **Wurst, W. and A.L. Joyner**, *Production of targeted embryonic stem cell clones*, in *Gene targeting: a practical approach*, A.L. Joyner, Editor. 1997, Oxford University Press: New York.
151. **Evans, M.J. and M.H. Kaufmann**, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature*, 1981. 292: p. 154-60.
152. **Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch**, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. *Cell*, 1992. 69: p. 915-26.
153. **Papayioannou, V. and J. Randall**, *Production of chimeras and genetically defined offspring from targeted ES cells*, in *Gene Targeting*, A.L. Joyner, Editor. 1997, Oxford University Press: New York.
154. **Hogan, B., F. Costantini, and E. Lacey**, *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. 1986, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
155. **Young, W.S.I. and M.J. Kuhar**, *A new method for receptor autoradiography: ³H-opioid receptors in rat brain*. *Brain Research*, 1979. 179: p. 255-70.
156. **Lijam, N., et al.**, *Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1*. *Cell*, 1997. 90: p. 895-905.
157. **Crawley, J.N. and R. Paylor**, *A Proposed Test Battery and Constellations of specific Behavioral Paradigms to Investigate the Behavioral Phenotypes of Transgenic and Knockout Mice*. *Hormones and Behavior*, 1997. 31: p. 197-211.
158. **Paylor, R., R. Tracy, J. Wehner, and J.W. Rudy**, *DBA/2 and C57BL/6 mice differ in contextual fear but not auditory fear conditioning*. *Behavioral Neuroscience*, 1994. 108: p. 810-7.
159. **Köhler, W., G. Schachtel, and P. Voleske**, *Biostatistik*. 2 ed. 1996, Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
160. **Fuhrmann, G., R. Heilig, J. Kempf, and A. Ebel**, *Nucleotide sequence of the mouse preprosomatostatin gene*. *Nucleic Acids Res*, 1990. 18: p. 1287.
161. **Hasty, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley**, *The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells*. *Molecular and Cellular Biology*, 1991. 11: p. 5586-91.

-
162. **Gillies, G.**, *Somatostatin: the neuroendocrine story*. Trends Pharmacol Sci, 1997. 18: p. 87-95.
163. **Siler, T.M., S.C. Yen, W. Vale, and R. Guillemin**, *Inhibition by somatostatin on the release of TSH induced in man by thyrotropin-releasing factor*. J Clin Endocrinol Metab, 1974. 38: p. 742-5.
164. **Alberti, K.G., et al.**, *Inhibition of insulin secretion by somatostatin*. Lancet, 1973. 2: p. 1299-301.
165. **Gierschik, P., D. Sidiropoulos, M. Steisslinger, and K.H. Jakobs**, *Na⁺ regulation of formyl peptide receptor-mediated signal transduction in HL 60 cells. Evidence that the cation prevents activation of the G- protein by unoccupied receptors*. Eur J Pharmacol, 1989. 172: p. 481-92.
166. **Hanks, M., W. Wurst, L. Anson-Cartwright, A.B. Auerbach, and A.L. Joyner**, *Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2 [see comments]*. Science, 1995. 269: p. 679-82.
167. **Shastry, B.S.**, *Genetic knockouts in mice: an update*. Experientia, 1995. 51: p. 1028-39.
168. **Tautz, D.**, *Redundancies, development and the flow of information*. Bioessays, 1992. 14: p. 263-6.
169. **Hochgeschwender, U. and M.B. Brennan**, *Redundant genes? [letter]*. Nat Genet, 1994. 8: p. 219-20.
170. **Routtenberg, A.**, *Knockout mouse fault lines [letter] [see comments]*. Nature, 1995. 374: p. 314-5.
171. **Hochgeschwender, U. and M.B. Brennan**, *Mouse knockouts rule OK [letter; comment]*. Nature, 1995. 375: p. 543.
172. **Bertherat, J., M.T. Bluet-Pajot, and J. Epelbaum**, *Neuroendocrine regulation of growth hormone*. Eur J Endocrinol, 1995. 132: p. 12-24.
173. **Tannenbaum, G.S., W.H. Zhang, M. Lapointe, P. Zeitler, and A. Beaudet**, *Growth hormone-releasing hormone neurons in the arcuate nucleus express both Sst1 and Sst2 somatostatin receptor genes*. Endocrinology, 1998. 139: p. 1450-3.
174. **Epelbaum, J.**, *Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications*. Prog Neurobiol, 1986. 27: p. 63-100.
175. **Lanzi, R. and G.S. Tannenbaum**, *Time course and mechanism of growth hormone's negative feedback effect on its own spontaneous release*. Endocrinology, 1992. 130: p. 780-8.

176. **Mertani, H.C., M.J. Waters, R. Jambou, F. Gossard, and G. Morel**, *Growth hormone receptor binding protein in rat anterior pituitary*. *Neuroendocrinology*, 1994. 59: p. 483-94.
177. **Bluet-Pajot, M.T., J. Epelbaum, D. Gourdji, C. Hammond, and C. Kordon**, *Hypothalamic and Hypophyseal Regulation of Growth Hormone Secretion*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1998. 18: p. 101-23.
178. **Beaudet, A., D. Greenspun, J. Raelson, and G.S. Tannenbaum**, *Patterns of expression of SSTR1 and SSTR2 somatostatin receptor subtypes in the hypothalamus of the adult rat: relationship to neuroendocrine function*. *Neuroscience*, 1995. 65: p. 551-61.
179. **Dickerman, Z., H. Guyda, and G.S. Tannenbaum**, *Pretreatment with somatostatin analog SMS 201-995 potentiates growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing factor in short children*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 77: p. 652-7.
180. **Ramirez, J.L., J.P. Castano, and F. Gracia-Navarro**, *Somatostatin at low doses stimulates growth hormone release from intact cultures of porcine pituitary cells*. *Horm Metab Res*, 1998. 30: p. 175-7.
181. **Flavell, D.M., T. Wells, S.E. Wells, D.F. Carmignac, G.B. Thomas, and I.C. Robinson**, *Dominant dwarfism in transgenic rats by targeting human growth hormone (GH) expression to hypothalamic GH-releasing factor neurons*. *Embo J*, 1996. 15: p. 3871-9.
182. **Hammer, R.E., R.L. Brinster, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans, and K.E. Mayo**, *Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth*. *Nature*, 1985. 315: p. 413-6.
183. **Palmiter, R.D., G. Norstedt, R.E. Gelinas, R.E. Hammer, and R.L. Brinster**, *Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice*. *Science*, 1983. 222: p. 809-14.
184. **Wanke, R., W. Hermanns, S. Folger, E. Wolf, and G. Brem**, *Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview*. *Pediatr Nephrol*, 1991. 5: p. 513-21.
185. **Chen, L., P.K. Lund, S.B. Burgess, B.E. Rudisch, and D.L. McIlwain**, *Growth hormone, insulin-like growth factor I, and motoneuron size*. *J Neurobiol*, 1997. 32: p. 202-12.
186. **Balbis, A., A. Bartke, and D. Turyn**, *Overexpression of bovine growth hormone in transgenic mice is associated with changes in hepatic insulin receptors and in their kinase activity*. *Life Sci*, 1996. 59: p. 1363-71.
187. **Hurley, D.L. and C.J. Phelps**, *Hypothalamic preprosomatostatin messenger ribonucleic acid expression in mice transgenic for excess or deficient endogenous growth hormone*. *Endocrinology*, 1992. 130: p. 1809-15.

188. **Sotelo, A.I., F.P. Dominici, C. Engbers, A. Bartke, F. Talamantes, and D. Turyn**, *Growth hormone-binding protein in normal mice and in transgenic mice expressing bovine growth hormone gene*. *Am J Physiol*, 1995. 268: p. E745-51.
189. **McLeod, K.R., D.L. Harmon, K.K. Schillo, S.M. Hileman, and G.E. Mitchell, Jr.**, *Effects of cysteamine on pulsatile growth hormone release and plasma insulin concentrations in sheep*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1995. 112: p. 523-33.
190. **Terry, L.C., J.O. Willoughby, P. Braseau, J.B. Martin, and Y. Patel**, *Antiserum to somatostatin prevents stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat*. *Science*, 1976. 192: p. 565-7.
191. **Terry, L.C. and R. Craig**, *Cysteamine effects on monoamines, dopamine-beta-hydroxylase and the hypothalamic-pituitary axis*. *Neuroendocrinology*, 1985. 41: p. 467-75.
192. **Jacovidou, N. and Y.C. Patel**, *Antiserum to somatostatin-28 augments growth hormone secretion in the rat*. *Endocrinology*, 1987. 121: p. 782-5.
193. **Tannenbaum, G.S., J. Epelbaum, E. Colle, P. Brazeau, and J.B. Martin**, *Antiserum to somatostatin reverses starvation-induced inhibition of growth hormone but not insulin secretion*. *Endocrinology*, 1978. 102: p. 1909-14.
194. **Zheng, H., et al.**, *Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons*. *Mol Endocrinol*, 1997. 11: p. 1709-17.
195. **Frantz, A.G. and M.T. Rabkin**, *Human growth hormone. Clinical measurement, response to hypoglycemia and suppression by corticosteroids*. *New England Journal of Medicine*, 1964. 271: p. 1375-81.
196. **Blodgett, F.M., L. Burgin, D. Iezzoni, D. Gribetz, and N.B. Talbot**, *Effects of prolonged cortisone therapy on the structural growth skeletal maturation and metabolic status of children*. *New England Journal of Medicine*, 1956. 254: p. 636-41.
197. **Ohyama, T., M. Sato, Y. Wada, and J. Takahara**, *Diverse effects of glucocorticoids on the hypothalamic pituitary axis in rat growth hormone secretion*. *Endocr J*, 1996. 43 Suppl: p. S115-7.
198. **Wehrenberg, W.B., P.J. Bergman, L. Stagg, J. Ndon, and A. Giustina**, *Glucocorticoid inhibition of growth in rats: partial reversal with somatostatin antibodies*. *Endocrinology*, 1990. 127: p. 2705-8.
199. **Xu, Y., M. Berelowitz, and J.F. Bruno**, *Dexamethasone regulates somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in rat pituitary GH4C1 cells*. *Endocrinology*, 1995. 136: p. 5070-5.

200. **Cintra, A., et al.**, *Central peptidergic neurons as targets for glucocorticoid action. Evidence for the presence of glucocorticoid receptor immunoreactivity in various types of classes of peptidergic neurons.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. 40: p. 93-103.
201. **Estupina, C., J. Belmar, L. Tapia-Arancibia, H. Astier, and S. Arancibia**, *Rapid and opposite effects of dexamethasone on in vivo and in vitro hypothalamic somatostatin release.* Exp Brain Res, 1997. 113: p. 337-42.
202. **Dieguez, C., et al.**, *Role of glucocorticoids in the neuroregulation of growth hormone secretion.* J Pediatr Endocrinol Metab, 1996. 9 Suppl 3: p. 255-60.
203. **Cecim, M., M. Alvarez-Sanz, L. Van de Kar, S. Milton, and A. Bartke**, *Increased plasma corticosterone levels in bovine growth hormone (bGH) transgenic mice: effects of ACTH, GH and IGF-I on in vitro adrenal corticosterone production.* Transgenic Res, 1996. 5: p. 187-92.
204. **Cheung, A., S. Harvey, T.R. Hall, S.K. Lam, and G.S. Spencer**, *Effects of passive immunization with antisomatostatin serum on plasma corticosterone concentrations in young domestic cockerels.* J Endocrinol, 1988. 116: p. 179-83.
205. **Kasprzak, A., P. Rebuffat, P.G. Andreis, G. Mazzocchi, and G.G. Nussdorfer**, *Effects of prolonged cysteamine administration on the rat adrenal cortex: evidence that endogenous somatostatin is involved in the control of the growth and steroidogenic capacity of zona glomerulosa.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. 38: p. 469-73.
206. **Rebuffat, P., A.S. Belloni, F.G. Musajo, S. Rocco, A. Markowska, G. Mazzocchi, and G.G. Nussdorfer**, *Evidence that endogenous somatostatin (SRIF) exerts an inhibitory control on the function and growth of rat adrenal zona glomerulosa. The possible involvement of zona medullaris as a source of endogenous SRIF.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1994. 48: p. 353-60.
207. **Dove, A.**, *Proteomics: translating genomics into products? [In Process Citation].* Nat Biotechnol, 1999. 17: p. 233-6 [MEDLINE record in process].
208. **Blackstock, W.P. and M.P. Weir**, *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins.* Trends in biotechnology, 1999. 17: p. 121-7.
209. **Wolf, G.h.**, *Neurobiologie.* 1988, Leipzig: VEB Bibliographisches Institut Leipzig.
210. **Rubinow, D.R., C.L. Davis, and R.M. Post**, *Somatostatin in Neuropsychiatric Disorders*, in *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*, C. Weil, E.E. Müller, and M.O. Thorner, Editors. 1992, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 29-42.
211. **Haroutunian, V., R. Mantin, G.A. Campbell, G.K. Tsuboyama, and K.L. Davis**, *Cysteamine-induced depletion of central somatostatin-like immunoactivity: effects on behavior, learning, memory and brain neurochemistry.* Brain Res, 1987. 403: p. 234-42.

-
212. **Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M.e. Jessell**, *Principles of Neural Science*. 3 ed. 1991, New York: Elsevier.
213. **Daum, I. and H. Achermann**, *Cerebellar contributions to cognition*. Behavioural Brain Research, 1995. 67: p. 201-10.
214. **Raymond, J.L., S.G. Lisberger, and M.D. Mauk**, *The cerebellum: a neuronal learning machine?* Science, 1996. 272: p. 1126-31.
215. **Kim, J.J. and R.F. Thompson**, *Cerebellar circuits and synaptic mechanisms involved in classical eyeblink conditioning*. TINS, 1997. 20: p. 177-81.
216. **Raymond, J.L. and S.G. Lisberger**, *Neural learning rules for the vestibulo-ocular reflex*. J Neurosci, 1998. 18: p. 9112-29.
217. **Llinas, R. and J.P. Welsh**, *On the cerebellum and motor learning*. Curr Opin Neurobiol, 1993. 3: p. 958-65.
218. **Shibuki, K., et al.**, *Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice*. Neuron, 1996. 16: p. 587-99.
219. **Aiba, A., et al.**, *Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice*. Cell, 1994. 79: p. 377-88.
220. **Pekhletski, R., et al.**, *Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor*. J Neurosci, 1996. 16: p. 6364-73.
221. **Kuemerle, B., H. Zanjani, A. Joyner, and K. Herrup**, *Pattern deformities and cell loss in Engrailed-2 mutant mice suggest two separate patterning events during cerebellar development*. J Neurosci, 1997. 17: p. 7881-9.
222. **Gerlai, R., K.J. Millen, K. Herrup, K. Fabien, A.L. Joyner, and J. Roder**, *Impaired motor learning performance in cerebellar En-2 mutant mice*. Behav Neurosci, 1996. 110: p. 126-33.
223. **Piwko, C., V.S. Thoss, A. Probst, and D. Hoyer**, *The elusive nature of cerebellar somatostatin receptors: studies in rat, monkey and human cerebellum*. J Recept Signal Transduct Res, 1997. 17: p. 385-405.
224. **Yew, D.T., W.Y. Chan, C.B. Luo, D.R. Zheng, and M.C. Yu**, *Neurotransmitters and Neuropeptides in the Developing Human Central Nervous System. a review*. Biol Signals Recept, 1999. 8: p. 149-59 [Record as supplied by publisher].
225. **Braitenberg, V. and A. Schüz**, *Allgemeine Neuroanatomie*, in *Neuro- und Sinnesphysiologie*, R.F. Schmidt, Editor. 1998, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. p. 25-30.

-
226. **Szabo, S. and S. Reichlin**, *Somatostatin depletion by cysteamine: mechanism and implication for duodenal ulceration*. Fed Proc, 1985. 44: p. 2540-5.
227. **Papachristou, D.N. and et al.**, *Cysteamine-induced reduction in tissue somatostatin immunoreactivity is associated with alterations in somatostatin mRNA*. Regul Pept., 1994. 49: p. 237-47.
228. **Cook, L.L., G. Bisette, K. Dole, and C.B. Nemeroff**, *A critical evaluation of cysteamine as a tool to deplete somatostatin in the rat central nervous system*. Endocrinology, 1989. 124: p. 855-61.
229. **Vecsei, L., R. Ekman, C. Alling, and E. Widerlov**, *Influence of cysteamine and cysteine on open-field behaviour, and on brain concentrations of catecholamines, somatostatin, neuropeptide Y, and corticotropin releasing hormone in the rat*. J Neural Transm Gen Sect, 1989. 78: p. 209-20.
230. **Buscail, L., et al.**, *Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer*. Cancer Res, 1996. 56: p. 1823-7.
231. **Tolis, G.**, *The role of somatostatin agonistic analogs in the treatment of acromegaly*. Metabolism, 1996. 45: p. 109-10.
232. **Strittmatter, M., H. Cramer, C. Reuner, D. Strubel, G. Hamann, and K. Schimrigk**, *Molecular forms of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of the Alzheimer type*. Biol Psychiatry, 1997. 41: p. 1124-30.
233. **Eve, D.J., A.P. Nisbet, A.E. Kingsbury, J. Temlett, C.D. Marsden, and O.J. Foster**, *Selective increase in somatostatin mRNA expression in human basal ganglia in Parkinson's disease*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. 50: p. 59-70.
234. **Betoin, F., et al.**, *Evidence for a central long-lasting antinociceptive effect of vapreotide, an analog of somatostatin, involving an opioidergic mechanism*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. 269: p. 7-14.
235. **Justino, L., S.A. Welner, G.S. Tannenbaum, and H.M. Schipper**, *Long-term effects of cysteamine on cognitive and locomotor behavior in rats: relationship to hippocampal glial pathology and somatostatin levels*. Brain Res, 1997. 761: p. 127-34.
236. **Guillou, J.L., J. Micheau, and R. Jaffard**, *The opposite effects of cysteamine on the acquisition of two different tasks in mice are associated with bidirectional testing-induced changes in hippocampal adenylyl cyclase activity*. Behav Neurosci, 1998. 112: p. 900-8.
237. **Ji, W.Q., C.C. Zhang, and G.H. Zhang**, *[Effect of somatostatin and GABA on long-term potentiation in hippocampal CA1 are in rats]*. Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao, 1995. 16: p. 380-2.

-
238. **Matsuoka, N., S. Kaneko, and M. Satoh**, *A facilitatory role of endogenous somatostatin in long-term potentiation of the mossy fiber-CA3 system in guinea-pig hippocampus*. *Neurosci Lett*, 1991. 129: p. 177-80.

7.4 Lebenslauf

- entfällt in dieser Version