



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Krebszellen als Targets für VIP-Rezeptor-Liganden ?

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasserin:

Anna Ortner

Matrikel-Nummer:

9712341

Studienrichtung (lt. Studien-
blatt):

A449

Betreuerin:

a.o. Univ.-Prof. Dr. Sabine Glasl

Wien, am 08.10.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1	Vasoaktives Intestinales Peptid.....	3
1.1.1	Biologische Aktivität.....	3
1.1.2	Struktur	4
1.1.3	VPAC-Rezeptoren	4
1.1.4	Signaltransduktion	5
1.1.5	Rezeptor-Bindung.....	5
1.2	VIP und Krebs.....	5
1.2.1	Tumordiagnostik	8
2.	Fragestellung.....	10
3.	Material und Methoden	12
3.1	Zelllinien.....	12
3.1.1	PC-3.....	12
3.1.2	MCF-7.....	13
3.1.3	Caco-2	13
3.1.4	HT-29.....	14
3.1.5	HCT-15	15
3.1.6	Capan-1	15
3.2	Zellkulturmedien und Puffer	16
3.2.1	RPMI 1640-Medium.....	16
3.2.2	DMEM.....	16
3.2.3	10xPBS.....	16
3.2.4	Trypsin-Lösung	17
3.2.5	Fetales Kälberserum, FCS.....	17
3.3	Passagieren von Zellen.....	17
3.4	Einfrieren von Zellen	18
3.5	Auftauen von Zellen	18
3.6	Auszählen von Zellen.....	19
3.7	Vitalfärbung von Zellen.....	19
3.8	Peptide	19
3.9	Modifizierter MTT-Test	20
3.10	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	21
3.10.1	Aufbau des Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops	21
3.10.2	Internalisierungstudien.....	23
4.	Resultate	25
4.1	Proliferationsstudien.....	25
4.1.2	Proliferationstests von PC-3-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	29
4.1.3	Proliferationstests von Capan-1-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	30
4.1.4	Proliferationstests von HT-29-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	30
4.1.5	Proliferationstests von Caco-2-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	31
4.1.6	Proliferationstests von MCF-7 Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	31
4.1.7	Proliferationstests von HCT-15 Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	32
4.2	Rohdaten MTT-Tests	33

4.2.1	PC-3 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	33
4.2.2	Capan-1 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	34
4.2.3	HT-29 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32.....	35
4.2.4	Caco-2 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	36
4.2.5	MCF-7 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32.....	37
4.2.6	HCT-15 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32	38
4.3	Internalisierung von VIP bzw. VIP-A7	39
4.3.1	Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie PC-3	45
4.3.2	Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie Capan-1	45
4.3.3	Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie HT-29.....	46
4.3.4	Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie Caco-2	46
4.3.5	Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie MCF-7.....	46
4.4	Rohdaten Konfokal-Mikroskopie	47
4.4.1	PC-3 mit VIP-Cy3	47
4.4.2	PC-3 mit VIP-A7-Cy3.....	47
4.4.3	Capan-1 mit VIP-Cy3.....	48
4.4.4	Capan-1 mit VIP-A7-Cy3	48
4.4.5	HT-29 mit VIP-Cy3.....	48
4.4.6	HT-29 mit VIP-A7-Cy3	49
4.4.7	Caco-2 mit VIP-Cy3	49
4.4.8	Caco-2 mit VIP-A7-Cy3.....	49
4.4.9	MCF-7 mit VIP-Cy3.....	50
4.4.10	MCF-7 mit VIP-A7-Cy3	50
5.	Diskussion	51
5.1	Einfluss von VIP und synthetischen Analoga auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen unterschiedlicher Genese..	51
5.2	Einfluss von VIP und synthetischen Analoga auf das Internalisierungsverhalten von Tumorzellen unterschiedlicher Genese	56
5.3	Mögliche klinische Anwendungsgebiete.....	59
5.3.1	Nuklearmedizin	59
5.3.2	Kopplung mit Chemotherapeutika.....	61
6.	Zusammenfassung.....	63
7.	Abkürzungen.....	64
8.	Abbildungsverzeichnis	67
9.	Tabellenverzeichnis	69
10.	Literaturverzeichnis	70
11.	Lebenslauf	78

1. Einleitung

1.1 Vasoaktives Intestinales Peptid

Das Vasoaktive Intestinale Peptid, kurz VIP, wurde erstmals 1970 von Said und Mutt aus Schweinedarm isoliert¹. Sie identifizierten ein Peptid mit gefäß-erweiternden und blutdrucksenkenden Eigenschaften. 1976 beschrieb Said in Zusammenarbeit mit Rosenberg² VIP auch im zentralen und peripheren Nervensystem, und bis heute wurde VIP als ein häufig vertretenes Neuropeptid in vielen Organen und Geweben nachgewiesen.

Herz, Lunge, Schilddrüse, Nieren, Genitalien und das Immunsystem benötigen VIP als Neurotransmitter oder Neuromodulator.

1.1.1 Biologische Aktivität

Die Multifunktionalität dieses Peptids ist auf seine unterschiedliche Lokalisation im menschlichen Organismus zurückzuführen. Neben seinen bereits erwähnten vasodilatierenden und blutdrucksenkenden Eigenschaften spielt VIP auch eine große Rolle bei der Erhöhung des Blutzuckerspiegels, der Relaxation der glatten Muskulatur, der Bronchodilation, Immunsuppression, Hormonsekretion und auch bei der Wachstumsregulation von Föten und Tumorzellen und bei der Entwicklung des embryonalen Gehirns³. Weiters konnte bewiesen werden, dass VIP auch beim Schmerzempfinden⁴ und bei der Suppression von Entzündungen⁵ eine Rolle spielt. Sein klinisches Potential wurde schon bei mehreren Krankheitsbildern wie Impotenz, Asthma, Lungenerkrankungen, wie pulmonale Hypertonie (PPH)⁶, nervendegenerativen Erkrankungen⁷ und bei verschiedenen Krebsarten genutzt.

1.1.2 Struktur

VIP ist ein 28 Aminosäuren umfassendes Neuropeptid und hat strukturelle Ähnlichkeiten mit vielen anderen Hormonen des Gastrointestinaltraktes, wie PACAP-27 (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) und das am Carboxyl-Terminus verlängerte PACAP-38, Sekretin, Glucagon, GLP (glucagon like peptide), GIP (gastric inhibitory peptide), GRF (growth hormone-releasing factor) und Helodermin. Die exakte Bezeichnung für diese Peptidgruppe lautet Glucagon-growth hormone releasing factor-Sekretin Superfamilie. Bezogen auf Struktur und Funktion besitzen VIP und PACAP die größte Analogie⁸.

1.1.3 VPAC-Rezeptoren

VIP und PACAP binden mit hoher Affinität an die sogenannten VPAC-Rezeptoren. Diese sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) der Klasse II mit 7 Transmembrandomänen. VIP-Rezeptoren wurden schon in den frühen 70ern in Leber⁹, Fettgewebe¹⁰, Pankreas¹¹ und im Darmepithel¹² beschrieben. Ebenfalls erkannte man schon früh, dass menschliche Krebszellen eine hohe Dichte an VIP-Rezeptoren exprimieren. Bis jetzt sind drei unterschiedliche Rezeptoren bekannt, der VPAC₁-, VPAC₂- und PAC₁-Rezeptor. Der PAC₁-Rezeptor hat eine sehr geringe Affinität für VIP, aber eine sehr hohe für PACAP. VPAC-Rezeptoren wurden von Menschen, Ratten, Mäusen, Hühnern, Fischen und Fröschen kloniert¹³. Mittlerweile wird angenommen, dass es noch mehrere Rezeptorsubtypen gibt, so z.B. wurde die Präsenz eines PACAP-unabhängigen VIP-spezifischen Rezeptors beschrieben¹⁴.

1.1.4 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion erfolgt über drei verschiedene Transduktionswege, den Adenylatcyclase/Proteinkinase A-Pathway, den Phospholipase-Proteinkinase C-Pathway bzw. über MAPkinase-Pathways¹⁵.

1.1.5 Rezeptor-Bindung

Von den drei genannten Rezeptoren (PAC₁, VPAC₁ und VPAC₂) wurde der VPAC₁-Rezeptor am intensivsten analysiert, weil er ursprünglich als einziger VIP-Rezeptor beschrieben wurde¹⁶. Wie bei allen Klasse II-Rezeptoren der Superfamilie GPCRs spielt der N-terminale Bereich, der isoliert vom Rest des Proteins im extrazellulären Medium liegt, eine wichtige Rolle. Eine exakte Aminosäuren-Reihenfolge (Glu³⁶, Trp⁶⁷, Asp⁶⁸, Trp⁷³, Gly¹⁰⁹ und Lys¹⁴³) in diesem Fragment ist entscheidend für die VIP-Bindungsaffinität. Weiters stabilisieren sechs Cystein-Bausteine mit ihren Disulfid-Brücken die natürliche Konformation des Rezeptors und stellen so eine VIP-Bindung sicher. Zusätzliche Bereiche, die für die Peptidbindung von Bedeutung sind, liegen in den extrazellulären Schleifen und in der dritten transmembranen Region des VPAC₁¹⁷.

1.2 VIP und Krebs

Viele Tumore des menschlichen Organismus exprimieren Peptidrezeptoren, in vielen Fällen ist die Dichte der Rezeptoren beim Tumor wesentlich höher als beim gesunden Gewebe. G-Protein gekoppelte Rezeptoren, zu denen wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben die VPAC-Rezeptoren gehören, haben eine besondere Eigenschaft. Nach der Bindung ihres Liganden an der Zellmembran können sie gemeinsam mit dem Bindungspartner in die Zelle internalisieren¹⁸. Peptide, die radioaktiv markiert¹⁹ werden oder an die ein Chemotherapeutikum²⁰ gekoppelt wird, können somit selektiv in die Tumorzellen eindringen und diese schädigen. Außer-

dem spielen Peptide oft eine wichtige Rolle im Wachstumsprozess von Tumorzellen. Wird mit bestimmten Peptid-Derivaten diese Funktion blockiert²¹, kann entscheidend in die Proliferation der Krebszellen eingegriffen werden. Auch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften sind ideal. Peptide lassen sich relativ leicht synthetisieren, modifizieren und markieren. Sie sind groß genug, um mit Chelatmolekülen gekoppelt zu werden, die zelltoxische Komponenten in sich tragen. Nach einer Injektion können sie aufgrund ihrer Größe und Hydrophilie schnell zum Tumorgewebe vordringen. Nebenwirkungen beschränken sich auf ihre biologische Funktion und lassen sich dadurch gut einschätzen²². Auch die Gefahr einer Überdosierung ist durch ihre geringe biologische Halbwertszeit kaum gegeben.

VIP und seine Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese.

VPAC-Rezeptoren werden von fast allen häufig vorkommenden Tumoren, wie Prostata-²³, Brust-, Pankreas-, Dickdarm-, Lungen- oder Eierstockkrebs²⁴ und Hirntumoren²⁵ exprimiert (siehe Tab.1). Die Dichte der VPAC-Rezeptoren ist zum Teil wesentlich höher als bei gesundem Gewebe. Ebenfalls konnte bereits in in-vivo Experimenten die Visualisierung von Tumoren mittels VIP-Rezeptor-Szintigraphie/Immunoszintigraphie²⁶ erzielt und die Auswirkung von VIP oder diverser Analoga auf die Proliferation von Tumorzellen gezeigt werden. In der folgenden Tabelle ist die VPAC-Rezeptor-Expression des gesunden Gewebes jener des Tumorgewebes gegenübergestellt.

Organ	Gewebe	VPAC-Rezeptor	Tumor	VPAC-Rezeptor
Leber	Hepatozyten	VPAC ₁	HCC	VPAC ₁
Magen	Mukosa	VPAC ₁	Magenkarzinom	VPAC ₁
Magen	Muskulatur glatt	VPAC ₂	Leiomyom	VPAC ₂
Dickdarm	Mukosa	VPAC ₁	Kolonkarzinom	VPAC ₁
Brust	Milchgang/Lappen	VPAC ₁	Duktales od. lobuläres Mammakarzinom	VPAC ₁
Schilddrüse	Follikel	VPAC ₁	Schilddrüsenkarzinom	n.d.
Prostata	Drüsen	VPAC ₁	Prostatakarzinom	VPAC ₁
Prostata	Stroma	VPAC ₂	--	--
Niere	Glomeruli	VPAC ₁	--	--
Blase/Harnleiter	Urothelium	VPAC ₁	Urothelialkarzinom	VPAC ₁
Lunge	Acini	VPAC ₁ VPAC ₂ *	NSCLC	VPAC ₁
Pankreas	Acini	PAC ₁	Acinäres Pankreaskarzinom	n.d.
Pankreas	Drüsengang	VPAC ₁	Duktales Pankreaskarzinom	VPAC ₁
Nebennieren	Medulla	PAC ₁ VPAC ₁	Catecholamin sezernierender Tumor Paragangliom	PAC ₁ VPAC _{1/2} *
Hypophyse	--	n.d.	Hypophysenadenom	PAC ₁ VPAC _{1/2} *
Ohrspeicheldrüse	--	VPAC ₁	--	--
Vesicula seminalis	Muskulatur glatt	VPAC ₂	--	--
Uterus	Drüsen	VPAC ₁ PAC ₁ VPAC ₂ *	Endometriales Karzinom	PAC ₁ VPAC _{1/2} *
Uterus	Stroma	VPAC ₂	--	--
Lymphgewebe	--	--	--	--
Lymphknoten	--	VPAC ₁	Non-Hodgkin Lymphome	VPAC ₁
Milz	PALS	VPAC ₁	--	--
Thymus		VPAC ₁ VPAC ₂	--	--
Meningen	--	n.d.	Meningiom	VPAC ₁
PNS	Plexus myentericus	PAC ₁	--	--
ZNS	--	n.d.	Gliom	PAC ₁ VPAC _{1/2} *
Blutgefäße	Muskulatur glatt	VPAC ₁ VPAC ₂	--	--

Tab. 1:VPAC-Rezeptoren im gesunden und kranken menschlichen Gewebe ²⁷

Abkürzungen in der Tabelle siehe Anhang Seite 65-67

n.d. not detected

* wird zwar exprimiert, ist aber nicht der dominierende Rezeptor

Neben der unterschiedlichen Rezeptorexpression sind auch die Auswirkungen von VIP auf die Proliferation von Krebszellen sehr komplex.

Je nach Entstehungsort des Tumors wird das Wachstum gehemmt, gefördert oder gar nicht beeinflusst ²⁸. Die folgende Tabelle zeigt die unterschiedlichen Auswirkungen von VIP auf verschiedenen Krebszelllinien.

Krebszelllinie (Herkunftsorgan)	Promotion der Proliferation	Hemmung der Proliferation	Kein Effekt
MCF-7 (Mamma)	X ²⁹		
NSCLC (Lunge)	X ³⁰		
SCLC (Lunge)		X ³¹	
Caco-2 (Kolon)		X ³²	
HT-29 (Kolon)		X ³²	
SW403 (Kolon)		X ³²	
COLO320 (Kolon)	X ²⁸		
HCT-15 (Kolon)		X ²⁸	
LNCaP (Prostata)			X ³³
MiaPaCa-2 (Pankreas)			X ³³
Capan-1 (Pankreas)	X ²⁸		
Panc-1 (Pankreas)			X ²⁸
BxPC-3 (Pankreas)		X ²⁸	
ASPC-1 (Pankreas)		X ²⁸	

Tab. 2: Einfluss von VIP auf die Proliferation von verschiedenen Krebszelllinien

1.2.1 Tumordiagnostik

Für die Tumordiagnostik ist es ausgesprochen wichtig, die Physiologie und Pathophysiologie der unterschiedlichen Gewebe und ihre jeweiligen Entartungen genau zu kennen. Verschiedene Tumore desselben Organs, wie z.B. der Lunge, reagieren völlig unterschiedlich auf dasselbe Peptid. Eine schlechte bzw. übereilte

Diagnose und damit eine falsche Therapie könnten genau die gegenteilige Wirkung haben.

Die Diagnose-Methode der Wahl für VIP und seine Derivate ist die Peptid-Rezeptor-Szintigraphie. Essentiell ist hier das „Tumor : Hintergrund-Verhältnis“. Nur in Regionen, die unter physiologischen Bedingungen keine hohe Dichte an VPAC-Rezeptoren exprimieren, ist eine Diagnose möglich. Man detektiert mit einem klaren „Tumor : Hintergrund-Verhältnis“ ausschließlich den Tumor. Exprimiert auch das umgebende Gewebe dieselben Rezeptoren, ist kein deutliches Signal und damit auch kein eindeutiges Ergebnis zu sehen. Ideale Regionen für diese Art der Diagnose sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Für die Diagnose von Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes (GIT) wird bereits radioaktiv-markiertes VIP eingesetzt. Vorrangig gilt es nun, neue, nicht-radioaktive Methoden zu finden, die die Patienten weniger belasten. Eine Möglichkeit ist, die Peptide mit einem Cyanin-Farbstoff zu koppeln. Becker et al. synthetisierten solche Derivate, sie könnten als Fluoreszenzkontrastmittel für die Endoskopie eingesetzt werden³⁴.

2. Fragestellung

Der Effekt des Vasoaktiven Intestinalen Peptids auf die Proliferation von Krebszellen ist vom Zelltyp, der Konzentration und dem Stadium der Tumorgenese abhängig. Je nach Zusammenspiel dieser Parameter kann es das Zellwachstum fördern, hemmen bzw. gar nicht beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von VIP und zwei synthetischen Peptidanaloga (VIP-A7 und VIP-A32) auf das Proliferationsverhalten anhand eines repräsentativen Querschnitts von Tumorzelllinien mittels nicht-radioaktiver Proliferationstests (MTT-Tests) untersucht werden. Neben den Auswirkungen auf die Proliferation sollte mit fluoreszenzmarkierten Derivaten der Peptide auch der Transport der jeweiligen Peptide in die Zellen verfolgt werden. Unter Verwendung konfokalmikroskopischer Techniken sollten Unterschiede im Internalisierungsverhalten, basierend auf der Peptidstruktur, analysiert werden.

Mithilfe dieser beiden Untersuchungsmethoden galt es abzuklären, ob und für welche Tumorarten VIP und die zwei synthetischen Analoga als Therapeutikum bzw. in der Tumordiagnose eingesetzt werden können.

Für die Therapie sind die Peptideffekte auf die Proliferation ausschlaggebend. Hemmen die Peptide das Wachstum signifikant, können sie als Einzeltherapie, mit vielen Vorteilen gegenüber der Chemotherapie (siehe Kapitel 1.2), in Kombination mit Chemotherapeutika oder als Vehikelmoleküle für diese eingesetzt werden.

Für die Krebsdiagnostik spielen sowohl das Proliferations-, als auch das Internalisierungsverhalten eine wichtige Rolle. Ein Diagnostikum darf auf keinen Fall das Wachstum des Tumors beschleunigen. Von essentieller Bedeutung wäre darüber hinaus eine Blockade des Rezeptors, das bedeutet der Ligand wird nicht mit dem

Rezeptor internalisiert, sondern lagert sich an der Zellmembran an. Da er nicht in die Zelle eindringt nimmt er auch nicht an ihrem Stoffwechsel teil und belastet somit das gesunde Gewebe, das unter Umständen ebenfalls VPAC-Rezeptoren exprimiert, nicht (siehe Tab. 1).

3. Material und Methoden

Das folgende Kapitel befasst sich mit der Charakterisierung der untersuchten Zelllinien und ihrer Kultivierung. Es folgen genaue Beschreibungen der durchgeführten Analysenmethoden wie MTT-Tests und Konfokal-Mikroskopie und eine Angabe der allgemeinen Parameter.

3.1 Zelllinien

Nachfolgend werden die untersuchten Krebszelllinien, eine Prostata-, eine Mamma-, drei Kolon- und eine Pankreaskarzinomzelllinie anhand des jeweiligen Tumorstadiums, ihres Wachstumsverhaltens und ihrer Rezeptorexpression beschrieben.

3.1.1 PC-3

Die Zelllinie PC-3 (ATCC CRL-1435) wurde aus dem Prostataadenokarzinom (Grad IV) eines 62jährigen Mannes (caucasian type), etabliert. Die Zelllinie, die hormoninsensitiv und chemoresistent ist, weist eine geringe Saure-Phosphatase- und Testosteron-5- α -Reduktaseaktivität auf. Sie wächst adhärent und wird in RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert. PC-3-Zellen exprimieren VPAC₁- und VPAC₂-Rezeptoren.

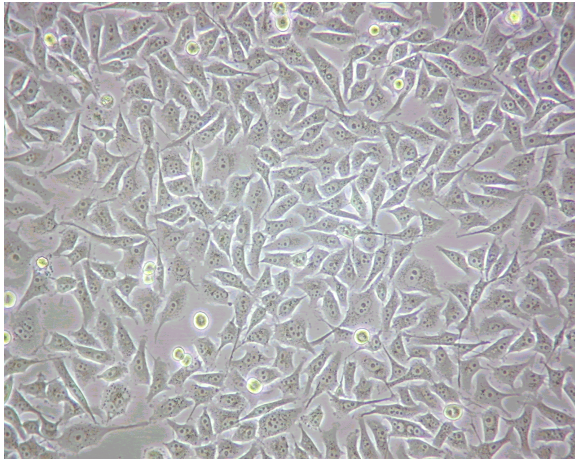


Abb. 1: PC-3-Zellen

3.1.2 MCF-7

Bei der Zelllinie MCF-7 (ATCC HTB-22) handelt es sich um ein Adeno-karzinom epithelialer Herkunft. Sie wurde aus dem Mammakarzinom einer 69jährigen Frau (caucasian type) etabliert und exprimiert in hohem Maße Östrogen- und Progesteronrezeptoren, zusätzlich VPAC₁-Rezeptoren.

Sie wächst adhärent und wird in Dulbecco's Medium ohne Phenolrot mit 10% FCS und 1% Pen/Strep kultiviert.

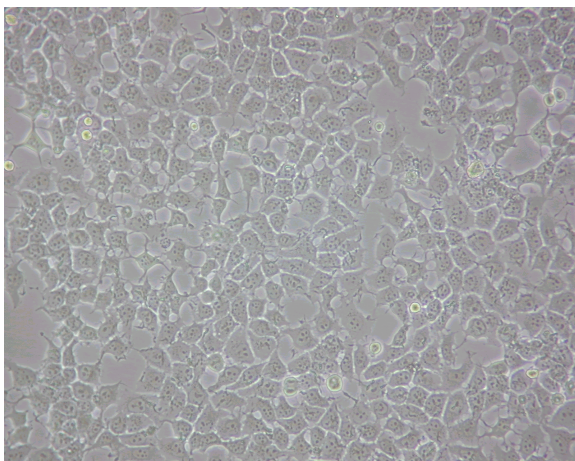


Abb. 2: MCF-7-Zellen

3.1.3 Caco-2

Diese Zelllinie (ATCC HTB-37) wurde aus dem Colonkarzinom eines 72jährigen Mannes (caucasian type) etabliert. Nach Erreichen der Konfluenz zeigen sich

Charakteristika einer enterozytischen Differenzierung. Caco-2 Zellen exprimieren das „retinoic acid binding protein I“ und das „retinol binding protein II“ und sind keratinpositiv. Sie wachsen ebenfalls adhärent und werden in RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Pen/Strep kultiviert.

Diese Zelllinie exprimiert VPAC₁-Rezeptoren.

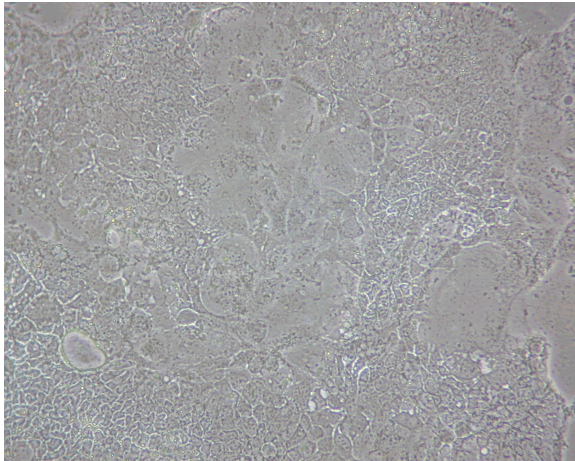


Abb. 3: Caco-2-Zellen

3.1.4 HT-29

HT-29 (ATCC HTB-38) war die erste Colonkarzinomzelllinie, die aus dem Adenokarzinom einer 44jährigen Frau (caucasian type) etabliert wurde (1964). Diese Zellen wachsen adhärent und werden in RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Pen/Strep kultiviert. Auch HT-29 exprimieren VPAC₁-Rezeptoren.

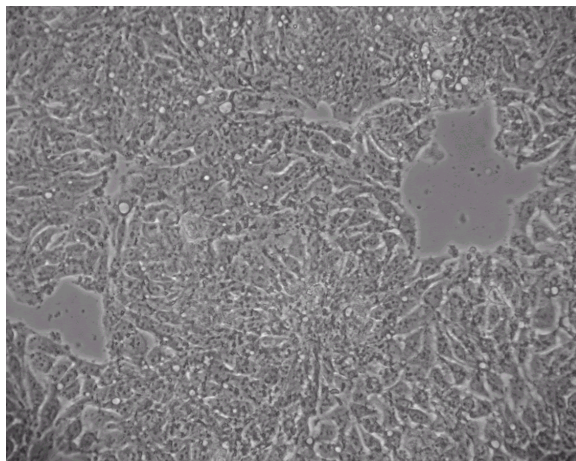


Abb. 4: HT-29-Zellen

3.1.5 HCT-15

Diese Zelllinie mit der ATCC-Nr. CCL-225 wurde aus einem Kolonkarzinom (Tumorstadium Duke's Type C) etabliert. Sie weist adhärentes Wachstum auf und wird in RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Pen/Strep kultiviert.

HCT-15 exprimieren VPAC₁-Rezeptoren.

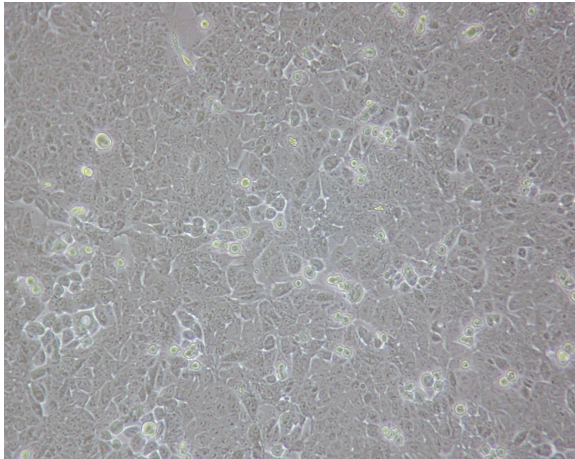


Abb. 5: HCT-15-Zellen

3.1.6 Capan-1

Die Zelllinie Capan-1 (ATCC HTB-79) wurde aus dem Pankreaskarzinom eines 40jährigen Mannes (caucasian type) etabliert. Capan-1-Zellen wachsen adhärent und werden in RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Pen/Strep kultiviert. Auch diese Zellen exprimieren VPAC₁-Rezeptoren.

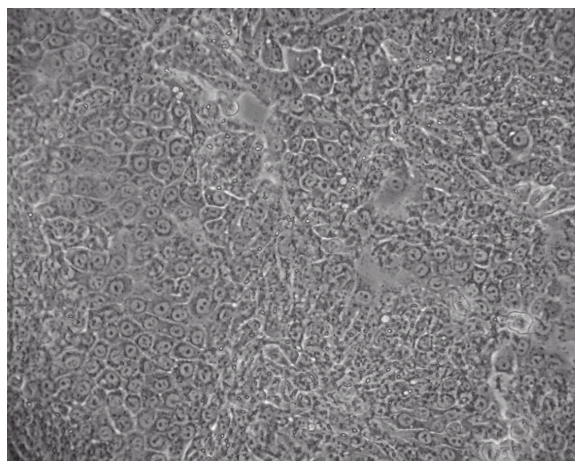


Abb. 6: Capan-1-Zellen

3.2 Zellkulturmedien und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, werden alle Medien und Puffer sterilfiltriert (Filter System, CA Membran 0,22 µm) und vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.2.1 RPMI 1640-Medium

500ml RPMI 1640 (Sigma)

0,3g/l L-Glutamin (Sigma)

10% FCS (PAA)

1% Pen/Strep (PAA)

Phenolrot (Sigma)

3.2.2 DMEM

500ml Dulbecco's Medium ohne Phenolrot (GIBCO)

1000mg/l Glucose (GIBCO)

0,3g/l L-Glutamin (GIBCO)

17 I.E. Insulin from bovine pancreas (Sigma)

10% FCS (PAA)

1% Pen/Strep (PAA)

3.2.3 10xPBS

Für den 10xPBS-Puffer werden die unten angeführten Reagenzien der Firma Merck in Aqua bidest. gelöst, auf 1000ml aufgefüllt und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Der 10xPBS-Puffer stellt eine konzentrierte Stocklösung dar, zur Kultivierung der Zellen wird eine 1:10-Verdünnung verwendet.

NaCl	80g
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄	14,4g

1xPBS wird durch Herstellen einer 1:10-Verdünnung von 10xPBS mit Aqua bidest hergestellt. Der pH-Wert (pH=7,3) wird mit einem pH-Meter überprüft und wenn nötig mit Salzsäure oder Natronlauge korrigiert.

3.2.4 Trypsin-Lösung

Viralex Trypsin/EDTA (PAA)

Die Trypsinlösung wird aliquotiert und bei –20°C gelagert. Wichtig ist eine möglichst kurze Erwärmzeit auf 37°C, da Trypsin sich sonst selbst proteolysiert und nicht mehr aktiv ist.

3.2.5 Fetales Kälberserum, FCS

Fetales Kälberserum (FCS) (PAA) wird bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert und nach dem Aliquotieren bei –20°C gelagert.

3.3 Passagieren von Zellen

Alle Zellen werden in 25 bzw. 75 cm²- Kulturflaschen mit Filtereinsatz (Szabo-Scandic) in 8 bzw. 20ml des entsprechenden Nährmediums bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und anschließend passagiert. Die Zellen werden mit auf 37°C erwärmtem 1xPBS 1-2mal gewaschen und mit 1 bzw. 2ml Trypsinlösung solange im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden ablösen. Die Dauer variiert bei den verschiedenen Zelllinien. Anschließend

werden die Zellen in 10ml entsprechendem Medium (37°C) aufgenommen und bei 1000 rpm 5 Minuten lang abzentrifugiert.

Nach dem Absaugen wird das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:8 wieder in den Kulturflaschen ausgesät.

Da MCF-7-Zellen dazu neigen, in Multilayern zu wachsen bzw. Kolonien zu bilden und für die Versuche stets Monolayer benötigt werden, muss man diese Zellen zusätzlich zum üblichen Resuspendieren anschließend noch weitere viermal mittels Kanülen (2x 27G und 2x 26G) resuspendieren.

3.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden passagiert und nach dem Resuspendieren gezählt. Pro Einfrier-Röhrchen (Nunc) werden 1×10^6 Zellen eingefroren.

Einfriermedium:

1ml entsprechendes Medium

20% FCS (PAA)

10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma)

Die Zellen werden im Einfriermedium in das Einfrier-Röhrchen transferiert und in einer Einfrierbox 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Anschließend werden sie über Nacht bei –80°C vorgekühlt, um dann im flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert zu werden.

3.5 Auftauen von Zellen

Zur Rekultivierung der Zellen werden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Röhrchen schnell im Wasserbad (37°C) erwärmt, in 10ml Medium resuspendiert und zentrifugiert (5 Minuten bei 1000 rpm und Raumtemperatur). Das Pellet wird in

5ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-Kulturflasche transferiert.

3.6 Auszählen von Zellen

Zur Bestimmung der Zelldichte wird die Anzahl der Zellen einerseits durch Auszählen mit der Zählkammer nach Bürker-Türk ermittelt; andererseits erfolgt die Zählung durch einen Cell Counter (CASY, Schärfe-System).

Dabei wird die Widerstandsänderung beim Durchgang durch eine Kapillare gemessen.

50µl der Zellsuspension (Zellen/Medium) werden jeweils in ein CASY-Probenröhrchen zu 10ml Casyton-Lösung pipettiert. Bei einer Verdünnung von 1:200 wird dann die Zellzahl unter Berücksichtigung der Zellgröße und des entsprechenden Messbereichs bestimmt.

3.7 Vitalfärbung von Zellen

Um die Viabilität der Zellen auszutesten, wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der die intakte Zellmembran nicht penetrieren kann. Die Farbstoffaufnahme der Zellen ist stark pH-abhängig, das Maximum liegt bei pH 7,5. Die Zellen werden nach der Trypsinisierung in Nährmedium resuspendiert und mit einer Trypanblaulösung (0.25% Trypanblau (Sigma) in 1xPBS) im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend werden die Zellen in einer Bürker-Türk-Zählkammer ausgezählt und das Verhältnis lebende Zellen (ungefärbt) : tote Zellen (blau) berechnet.

3.8 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma piCHEM (piCHEM, Graz, Austria) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

VIP H₂N-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys- Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

VIP-A7 [Dip¹⁸] VIP(9-28)

VIP-A32 VIP(10-28)-NH₂

Für die Internalisierungsstudien wurden die Peptide am Carboxyl-Terminus mit Cy3 fluoreszenzmarkiert.

3.9 Modifizierter MTT-Test

Mit Hilfe dieses nicht-radioaktiven Zellproliferationstests kann die Gesamtzahl intakter Zellen einer Zellpopulation detektiert werden. Das Testprinzip beruht auf der Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in lebenden Zellen, unabhängig davon, ob diese DNA synthetisieren oder nicht. Somit werden mit Hilfe dieser Methode auch jene Zellen detektiert, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden.

Die lebenden Zellen wandeln farblose bis schwach gefärbte Tetrazoliumsalze (EZ4U-Kit Biomedica) in intensiv gefärbte Formazanderivate um, deren Absorption bei 450nm mit einem Spektrophotometer vermessen werden kann.

Für den Test werden die Zellen 96 Stunden lang in einer 96-well Microtiterplatte (Becton & Dickinson) mit dem entsprechenden Peptid, in den Konzentrationen 10µM, 10nM und 10pM, unter Zellkulturbedingungen inkubiert (37°C, 5% CO₂). Die ideale Zellzahl wurde durch eine Zellverdünnungsreihe bestimmt und liegt je nach Zelllinie bei 4x10³ bzw. 1x10⁴ Zellen/well. Anschließend wird das Substrat in der Aktivatorlösung gelöst und je 20µl in jedes well der Platte pipettiert. Die Platte wird unter Lichtschutz im Brutschrank inkubiert und danach die Absorption im Ab-

stand von 15 Minuten mit einem Spektrophotometer (Anthos HT II) bei 450nm, Referenzwellenlänge 620nm, gemessen. Die Inkubations- und Messzeit sind von der Umsetzungskapazität der entsprechenden Zelllinie abhängig. Die Absorption eines Leerwertes (Substrat ohne Zellen) wird von den Messwerten abgezogen. Als Kontrolle werden Zellen ohne Peptidlösung inkubiert, der erhaltene Wert wird einem 100%igen Überleben gleichgesetzt.

3.10 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Diese von Marvin Minsky 1957 eingeführte Methode ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen Licht- und Fluoreszenzmikroskopie eine verbesserte Darstellung verschiedener zellulärer Strukturen durch eine größere Schärfe, verstärkten Kontrast und bessere Auflösung sowie durch eine gesteigerte Detektionssensitivität.

3.10.1 Aufbau des Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

Der Aufbau eines konfokalen Mikroskops besteht aus einem optischen System eines klassischen Mikroskops, das zur Lichtanregung mit einer Laserquelle ausgestattet ist (siehe Abb. 7). Der monochromatische Laserlichtstrahl gelangt durch das Scanning System zum Objektiv, das den Laserstrahl punktförmig auf eine bestimmte Ebene der Probe fokussiert. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird über das Objektiv zurück zum Scanning System geleitet und durch einen dichroischen Spiegel auf einen Detektor gelenkt. Davor sind Filter und eine Lochblende angebracht, die nur die Fluoreszenzstrahlung der Fokusebene auf den Detektor leiten. Die Lochblende vor dem Detektor steht konfokal, das heißt dort, wo sich der Brennpunkt der von der Probe emittierten Strahlen befindet. Als Detektor wird für gewöhnlich eine Lichtverstärkerröhre (photomultiplied tube, PMT) verwendet, die Lichtenergie in elektrische Energie umwandeln kann.

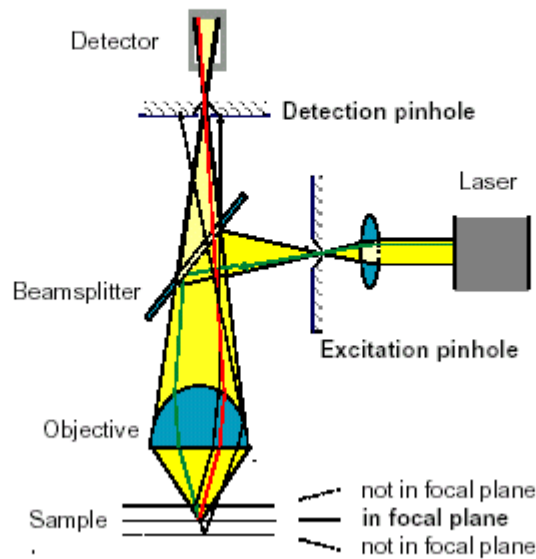


Abb.7: Prinzip eines Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops
(Abbildung von der Firma Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland zur Verfügung gestellt)

In einem konventionellen Lichtmikroskop erfolgt die Transformation Objekt-zu-Bild für alle Objektpunkte gleichzeitig, also parallel. Dagegen wird in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop die Probe punktwise (d.h. seriell) bestrahlt und die physikalische Wechselwirkung, die das Laserlicht in der gerade bestrahlten Objektstelle hervorruft (z.B. die Fluoreszenz), wird ebenso seriell gemessen. Information über die gesamte Probe erhält man nur dann, wenn der Laserstrahl über die Probe bewegt wird (oder die Probe relativ zum Laserstrahl).

Leica TCS SP2/MP2: System Optics Overview

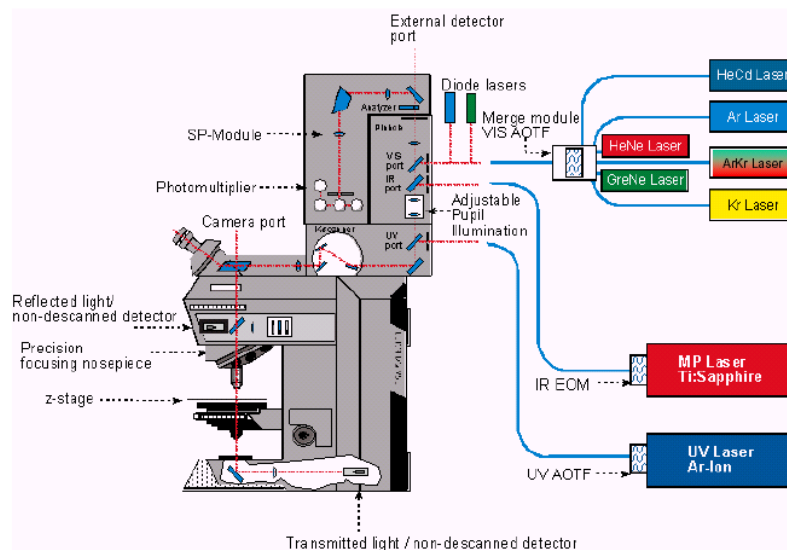


Abb.8: Aufbau eines Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops
(Abbildung von der Firma Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
zur Verfügung gestellt)

3.10.2 Internalisierungstudien

Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica DM IRBE) wurden Internalisierungsstudien an lebenden Zellen durchgeführt. Für diese Versuche werden die Zellen passagiert, gezählt und je nach Zelllinie 8×10^4 oder 12×10^4 Zellen auf einem Deckglas (Stölzle) sternförmig ausgesät und zum Adhärenz 3 Stunden inkubiert (37°C , 5% CO_2).

Für die Zelllinie MCF-7 werden glass bottom dishes (WillCo Wells BV) verwendet, da diese Zellen auf unbeschichtetem Glas nicht adhären können. Die Zellen werden 2-3 Tage, bis zum Erreichen von 80-90% Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, zum Blockieren der unspezifischen Bindungen mit fetalem Kälberserum (5% in PBS) versetzt und 20 Minuten bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Nach dem Blocken werden die Zellen mit einer Lösung von $1\mu\text{M}$ Cy3-markiertem VIP bzw. VIP-A7 versetzt. Für die

Kernfärbung wird dieser Lösung TO-PRO[®]-3 Iodid-Lösung im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Die Inkubationszeiten betragen 15, 30, 45 und 60 Minuten (37°C, 5% CO₂).

Als Referenzwert werden Zellen mit einer 1µM Lösung unmarkiertem VIP bzw. VIP-A7 und TO-PRO[®]-3 Iodid 15 Minuten lang inkubiert. Anschließend werden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und schnell unter Lichtausschluss auf einen Objektträger aufgebracht und mikroskopiert.

Um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern, wird als Medium eine spezielle Lösung (Citifluor, Gröpl) verwendet, die selbst keine störenden Komponenten beinhaltet.

4. Resultate

4.1 Proliferationsstudien

Die Proliferationsstudien wurden wie in Material und Methoden (Kapitel 3) beschrieben durchgeführt. Die Effekte der Peptide VIP, VIP-A7 und VIP-A32 auf das Proliferationsverhalten von PC-3-, Capan-1-, HT-29-, Caco-2-, MCF-7- und HCT-15-Zellen wurden mittels MTT-Test ermittelt (Kapitel 3.9). Als Kontrollwert wird die Proliferation von Zellen, die ohne Peptidlösung inkubiert wurden, herangezogen, und dieser Wert einem 100%igem Überleben gleichgesetzt.

In den Vorversuchen stellte sich heraus, dass die Proliferation bei der Zelllinie HT-29 bei Inkubation mit VIP oder VIP-A7 nicht linear ab- bzw. zunimmt, sondern nur im 10nM-Bereich ein Effekt zu beobachten ist. Um diesen Effekt besser darstellen zu können, wurden neben den drei Standardkonzentrationen noch weitere Verdünnungen der Peptidlösungen bis 10pM verwendet.

Die Wachstumskurven der oben genannten Zelllinien sowohl nach der Behandlung mit unterschiedlichen Peptidkonzentrationen, als auch ohne Peptideinwirkung (=cont) ist in den Abbildungen 9–15 dargestellt. Jedes Experiment wurde fünf bis zwölf mal (genaue Daten siehe Kapitel 4.2) mit denselben Peptidkonzentrationen wiederholt, und daraus errechneten sich die in den Abbildungen dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen. Sämtliche Rohdaten, die für die Erstellung der Abbildungen relevant sind, sind in Kapitel 4.2 zusammengefasst. Genaue Auswertungen der Abbildungen finden sich in den Kapiteln 4.1.2–4.1.7, eine eingehende Diskussion in Kapitel 5.1.

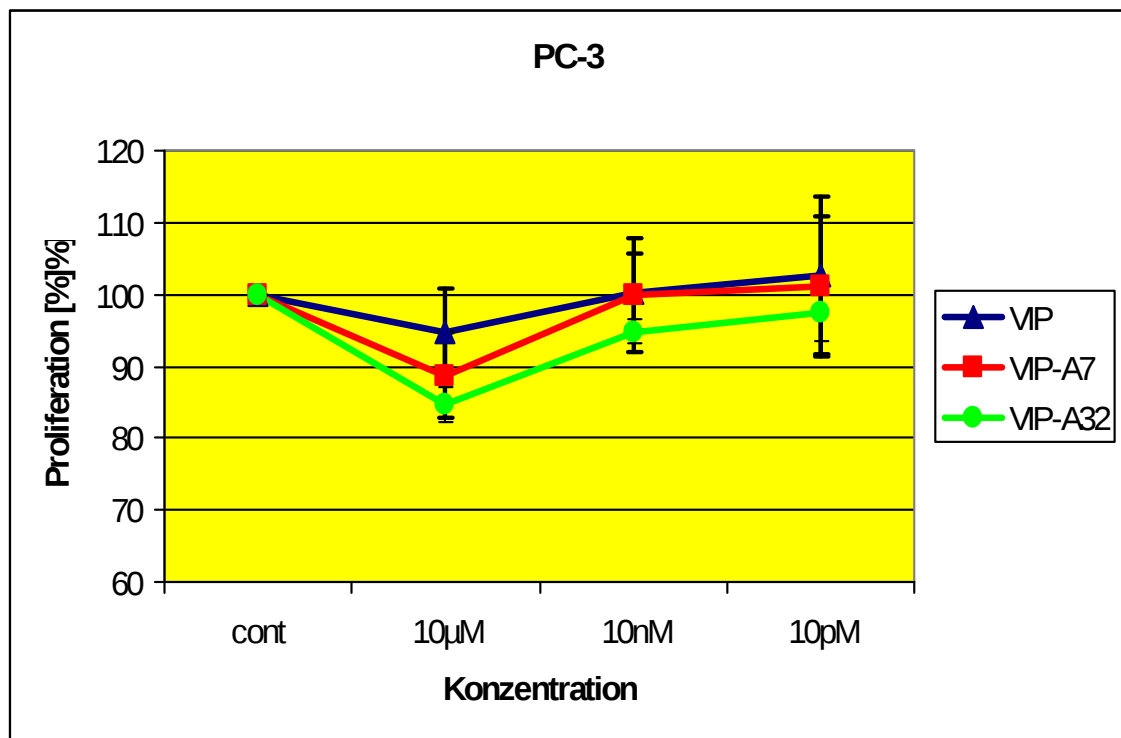


Abb. 9: Proliferationstests der Zelllinie PC-3 inkubiert mit 10µM, 10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

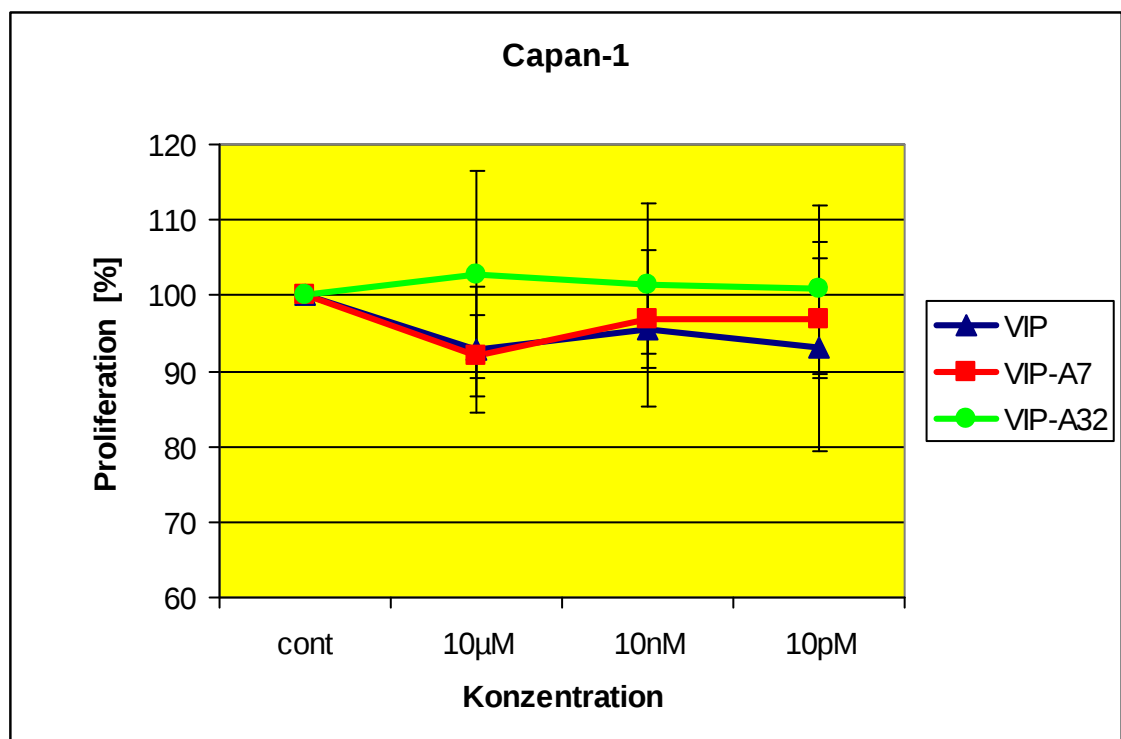


Abb. 10: Proliferationstests der Zelllinie Capan-1 inkubiert mit 10µM, 10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

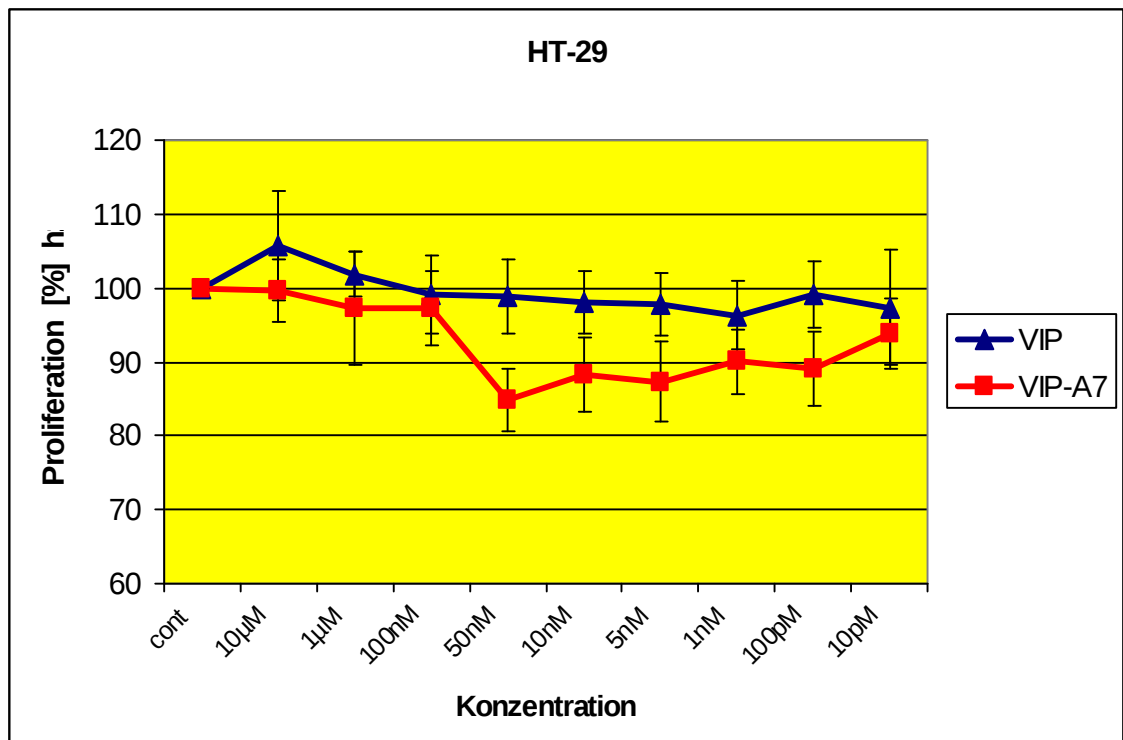


Abb. 11: Proliferationstests der Zelllinie HT-29 inkubiert mit 10µM, 1µM, 100nM, 50nM, 10nM, 5nM, 1nM, 100pM und 10pM VIP und VIP-A7 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

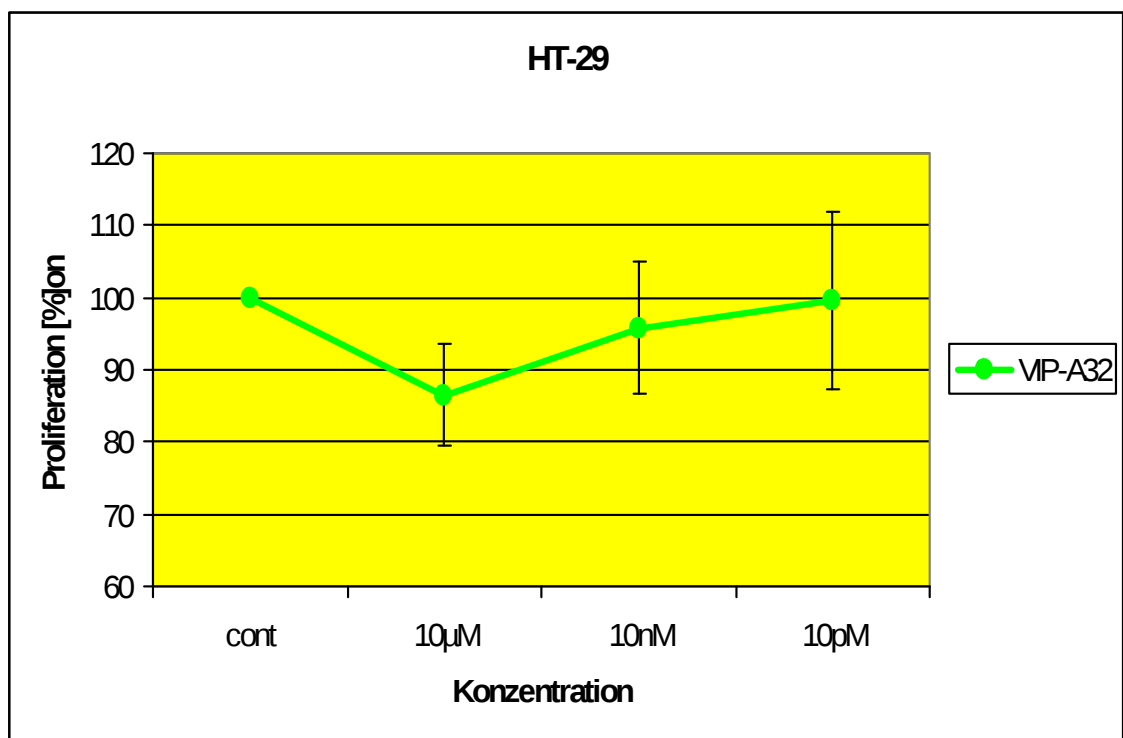


Abb.12: Proliferationstests der Zelllinie HT-29 inkubiert mit 10µM, 10nM und 10pM VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

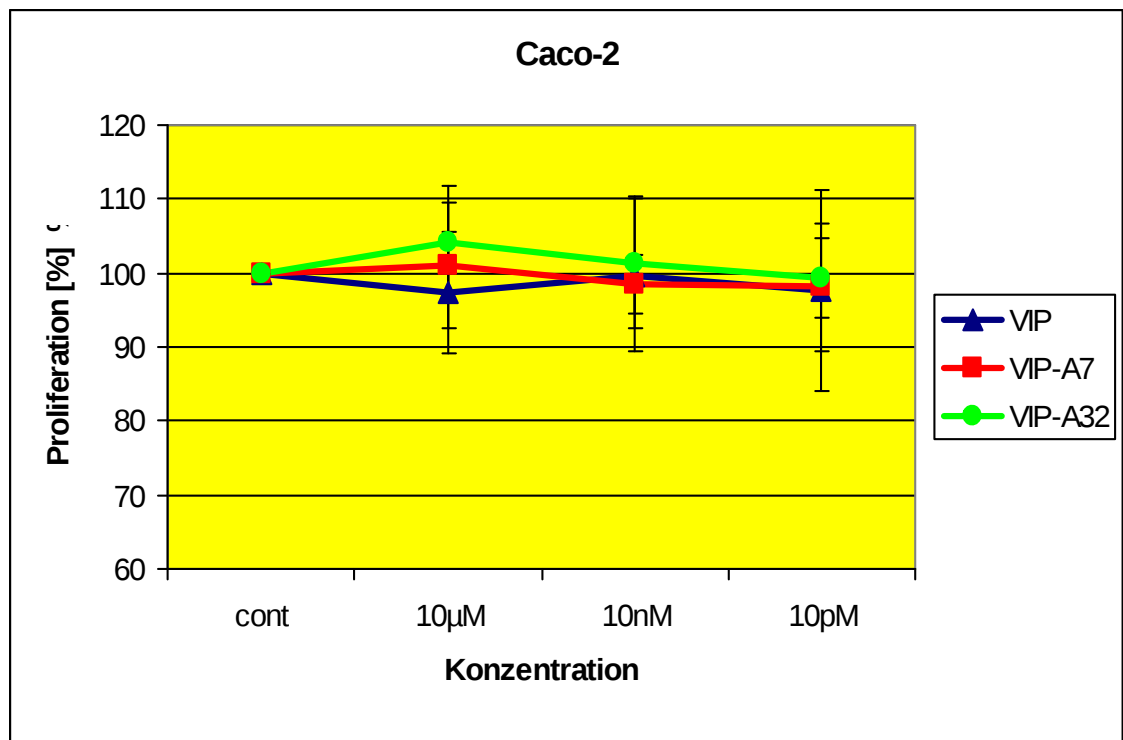


Abb. 13: Proliferationstests der Zelllinie Caco-2 inkubiert mit 10µM, 10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

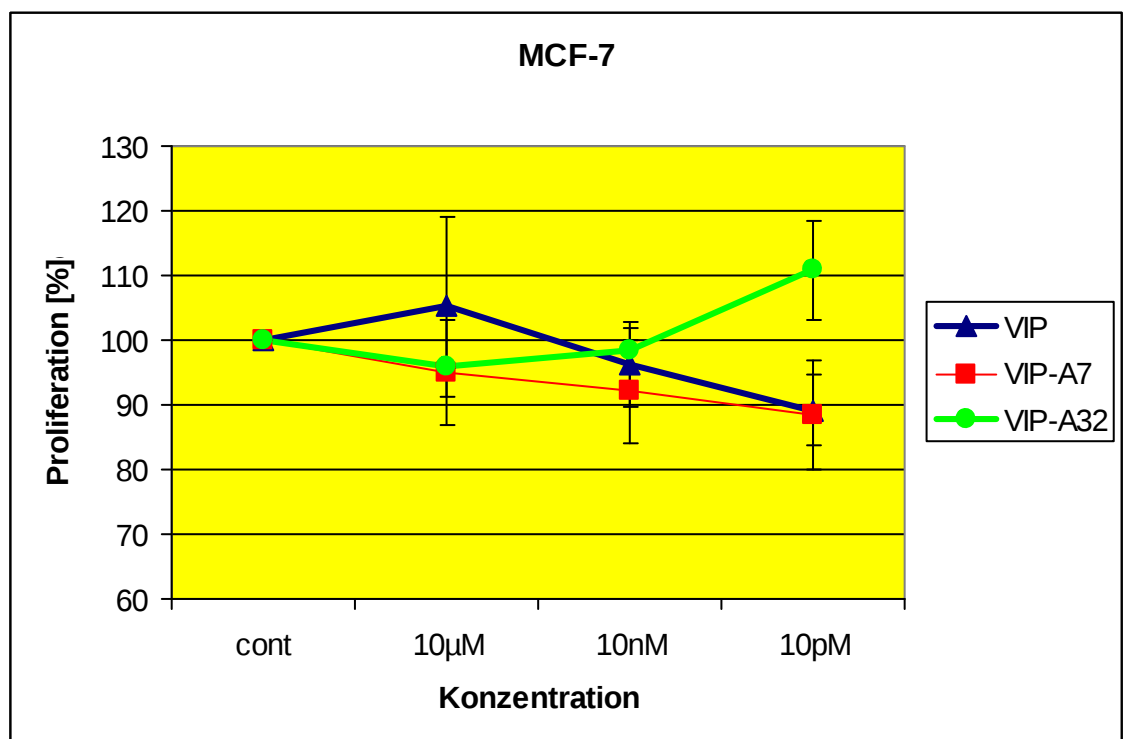


Abb. 14: Proliferationstests der Zelllinie MCF-7 inkubiert mit 10µM, 10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

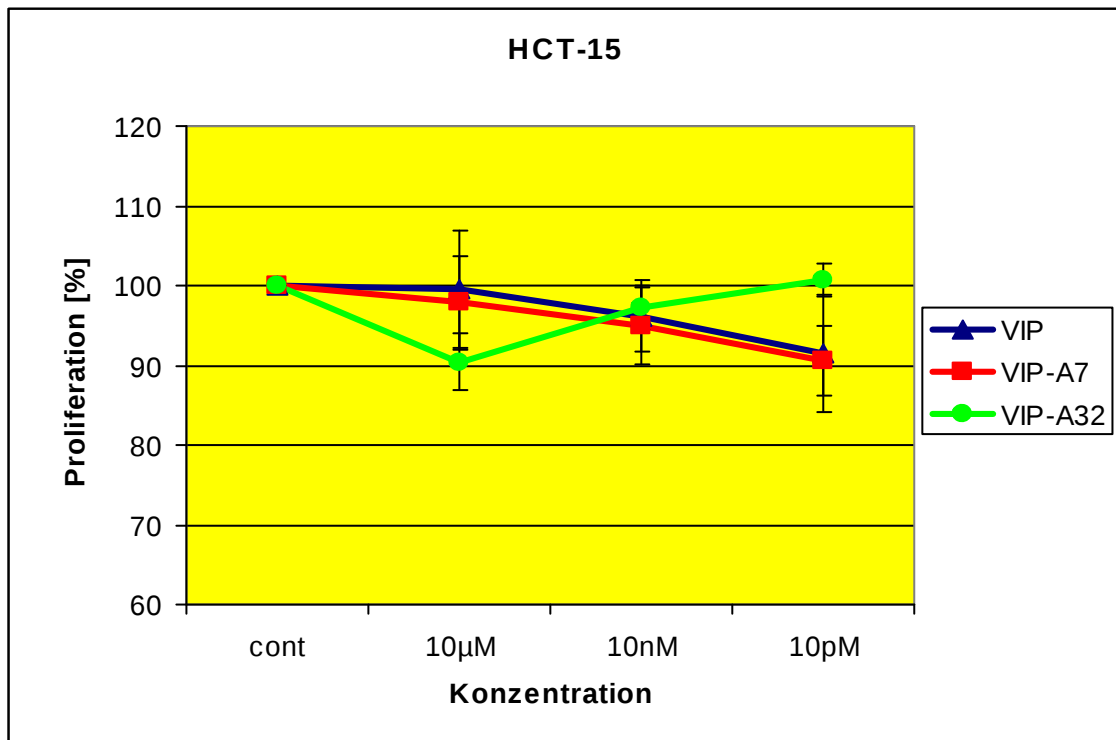


Abb. 15: Proliferationstests der Zelllinie HCT-15 inkubiert mit 10µM, 10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

4.1.2 Proliferationstests von PC-3-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Alle verwendeten Peptide zeigen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation (siehe Abb. 9). In hohen Konzentrationen (10µM) hat VIP einen schwach inhibierenden Effekt, die Proliferationsrate der Tumorzelllinie sinkt um fünf Prozent. Eine 10nM Lösung von VIP hat so gut wie keine Wirkung und Konzentrationen von 10pM VIP wirken schwach proliferationssteigernd (zwei Prozent).

VIP-A7 wirkt im 10µM-Bereich etwas stärker proliferationsinhibierend als VIP, seine Hemmung beträgt zwölf Prozent. Peptidlösungen mit den Konzentrationen 10nM und 10pM haben jedoch keinen Effekt auf das Zellwachstum.

Mit fünfzehn Prozent hemmt VIP-A32 (10µM) am stärksten das Wachstum von PC-3, auch im 10nM- und 10pM-Bereich gibt es noch eine schwache Inhibierung des Wachstums um fünf und zwei Prozent.

4.1.3 Proliferationstests von Capan-1-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

VIP hat auf diese Zelllinie in allen verwendeten Konzentrationen eine schwach wachstumshemmende Wirkung zwischen fünf und acht Prozent (siehe Abb. 10). VIP-A7 verhält sich annähernd gleich, die beiden niedrigeren Konzentrationen haben beinahe den gleichen Effekt, die Proliferationsrate beträgt 96%.

VIP-A32 hat als einziges Peptid eine schwach proliferationsfördernde Wirkung, der Effekt ist allerdings bei allen Konzentrationen sehr gering, mit einer Proliferationssteigerung um ein bis drei Prozent.

4.1.4 Proliferationstests von HT-29-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

VIP zeigt den am stärksten proliferationsfördernden Effekt (sieben Prozent) (siehe Abb. 11) bei einer Konzentration von 10µM. Alle anderen Konzentrationen führen zu einer Plateauphase mit einer ganz schwachen Wachstumsinhibierung zwischen ein und vier Prozent, bei 100pM zeigt sich hingegen wieder eine schwache Steigerung der Proliferation um ein Prozent.

VIP-A7 hemmt die Proliferation am stärksten bei einer Konzentration von 50nM und zwar um fünfzehn Prozent. Eine Inhibierung von zehn Prozent erfolgt in den Konzentrationen bis 100pM. In den Konzentrationsbereichen von 10µM bis 100nM ist ein proliferationshemmender Effekt nicht zu sehen. Es zeigt sich, dass die proliferationshemmende bzw. –fördernde Wirkung beider Peptide keinem linearen Verlauf folgt.

VIP-A32 hingegen zeigt eine lineare, konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation (siehe Abb. 12), in hohen Konzentrationen wird die Proliferation um ca. sechzehn Prozent gehemmt, 10nM-Lösungen des Peptids hemmen das Wachstum noch um fünf Prozent und eine 10pM Lösung von VIP-A32 hat keine Auswirkung auf das Zellwachstum.

4.1.5 Proliferationstests von Caco-2-Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Bei der Zelllinie Caco-2 sind unter der Peptideinwirkung von VIP nur marginale Effekte auf das Zellwachstum zu beobachten (siehe Abb. 13).

VIP inhibiert die Zellproliferation um drei Prozent nur unter Verwendung höchster Konzentrationen (10 μ M), und zeigt keinen Effekt bei 10nM und 10pM.

VIP-A7 hat in keiner verwendeten Konzentration Einfluss auf das Zellwachstum, VIP-A32 hingegen wirkt in der höchsten Konzentration (10 μ M) proliferationssteigernd (fünf Prozent). 10nM und 10pM Lösungen des Peptids erzielen keinen Effekt.

4.1.6 Proliferationstests von MCF-7 Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Bei der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 erzielen die 3 Peptide unterschiedliche Wirkungen auf das Proliferationsverhalten (siehe Abb. 14).

VIP fördert das Wachstum um fünf Prozent bei einer Konzentration von 10 μ M, und hemmt das Zellwachstum um vier Prozent bei 10nM, bei einer Konzentration von 10pM sogar um elf Prozent.

VIP-A7 hemmt das Proliferationsverhalten von MCF-7 Zellen am stärksten im niedrigsten Konzentrationsbereich (10pM), nämlich um zwölf Prozent. Unter Verwendung von 10nM um acht Prozent und bei 10 μ M um vier Prozent.

VIP-A32 hemmt zwar das Zellwachstum im 10 μ M- und 10nM-Bereich gering (ein bis vier Prozent), im 10pM-Bereich stimuliert dieses Peptid aber die Proliferation um zehn Prozent.

4.1.7 Proliferationstests von HCT-15 Zellen mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

HCT-15 Zellen weisen unter Inkubation mit VIP bzw. VIP-A7 ein ähnliches Proliferationsverhalten auf (siehe Abb. 15). Konzentrationen von 10 μ M zeigen keine Änderung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle, im 10nM-Bereich wird das Wachstum um fünf Prozent gehemmt und bei 10pM um zehn Prozent.

Im Gegensatz dazu bewirkt eine 10 μ M Lösung von VIP-A32 eine Proliferation von 90%, während Konzentrationen von 10nM nur zu einer drei-prozentigen Wachstumsinhibierung führen. Eine 10pM Lösung von VIP-A32 zeigt keine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten.

4.2 Rohdaten MTT-Tests

Die im Rahmen der MTT-Tests ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte sind in den folgenden Kapiteln zusammengestellt. Die graphische Darstellung dieser Zahlenwerte sind in den Abbildungen 9-15 zu finden.

4.2.1 PC-3 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

PC-3	VIP	n=7
	Proliferation	Standardabweichung
Kontrolle	100	0
10μM	94,80	5,94
10nM	100,31	5,33
10pM	102,77	10,98
	VIP-A7	n=12
Kontrolle	100	0
10μM	88,73	6,02
10nM	99,85	8,02
10pM	101,21	9,69
	VIP-A32	n=5
Kontrolle	100	0
10μM	84,74	2,40
10nM	94,87	1,61
10pM	97,35	3,88

Tab. 3: Rohdaten MTT-Tests: PC-3 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

4.2.2 Capan-1 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Capan-1	VIP	n=12
	Proliferation	Standardabweichung
Kontrolle	100	0
10µM	92,80	8,36
10nM	95,60	10,42
10pM	93,14	13,89
	VIP-A7	n=6
Kontrolle	100	0
10µM	91,94	5,37
10nM	96,81	4,59
10pM	96,98	7,95
	VIP-A32	n=6
Kontrolle	100	0
10µM	102,76	13,72
10nM	101,33	10,86
10pM	100,83	11,21

Tab. 4: Rohdaten MTT-Tests: Capan-1 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

4.2.3 HT-29 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

HT-29	VIP	n=7
	Proliferation	Standardabweichung
Kontrolle	100	0
10µM	105,82	7,37
1µM	101,88	3,11
100nM	99,10	5,26
50nM	98,86	5,06
10nM	98,14	4,19
5nM	97,71	4,26
1nM	96,33	4,67
100pM	99,15	4,48
10pM	97,34	7,77
	VIP-A7	n=7
Kontrolle	100	0
10µM	99,66	4,21
1µM	97,33	7,67
100nM	97,21	4,96
50nM	84,75	4,21
10nM	88,22	5,04
5nM	87,29	5,48
1nM	90,04	4,45
100pM	89,05	4,93
10pM	93,76	4,80
	VIP-A32	n=5
Kontrolle	100	0
10µM	86,55	7,14
10nM	95,83	9,03
10pM	99,66	12,27

Tab. 5: Rohdaten MTT-Tests: HT-29 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

4.2.4 Caco-2 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Caco-2	VIP	n=12
	Proliferation	Standardabweichung
Kontrolle	100	0
10µM	97,35	8,08
10nM	99,65	10,30
10pM	97,69	13,67
	VIP-A7	n=10
Kontrolle	100	0
10µM	101,07	8,49
10nM	98,49	3,85
10pM	98,14	8,67
	VIP-A32	n=5
Kontrolle	100	0
10µM	104,11	7,77
10nM	101,35	8,94
10pM	99,20	5,38

Tab. 6: Rohdaten MTT-Tests: Caco-2 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

4.2.5 MCF-7 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

MCF-7	VIP	n=10
	Proliferation	Standardabweichung
Kontrolle	100	0
10µM	105,22	13,97
10nM	96,15	6,59
10pM	89,18	5,39
	VIP-A7	n=8
Kontrolle	100	0
10µM	94,95	8,04
10nM	92,04	7,87
10pM	88,49	8,43
	VIP-A32	n=5
Kontrolle	100	0
10µM	95,80	0,28
10nM	98,42	3,47
10pM	110,82	7,72

Tab. 7: Rohdaten MTT-Tests: MCF-7 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

4.2.6 HCT-15 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

HCT-15	VIP	n=7
	Proliferation	Standardabweichung
Kontrolle	100	0
10µM	99,49	7,40
10nM	96,15	4,54
10pM	91,50	7,43
	VIP-A7	n=5
Kontrolle	100	0
10µM	97,85	5,91
10nM	94,89	4,89
10pM	90,51	4,34
	VIP-A32	n=5
Kontrolle	100	0
10µM	90,43	3,63
10nM	97,24	2,74
10pM	100,64	2,07

Tab. 8: Rohdaten MTT-Tests: HCT-15 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

4.3 Internalisierung von VIP bzw. VIP-A7

Die Internalisierung der fluoreszenzgefärbten Peptide wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt (siehe Kapitel 3.10). Für eine Verifizierung der Daten wurden pro Zelllinie und Peptid zumindest 4 repräsentative Versuche verwendet. Die Ergebnisse der Internalisierungsstudien sind für die Zelllinien PC-3, Capan-1, HT-29, Caco-2 und MCF-7 in den nachfolgenden Abbildungen beschrieben (siehe Abb. 16-20).

Im Beobachtungszeitraum von einer Stunde wurden jeweils nach 15, 30, 45 und 60 Minuten die mit dem jeweiligen Peptid inkubierten Zellen mikroskopiert. Als Kontrollwert wurden die Zellen mit einer Lösung des entsprechenden unmarkierten Peptids für 15 Minuten inkubiert und mikroskopiert. Das rote Signal steht jeweils für das Cy3-markierte VIP bzw. sein Analogon VIP-A7. Der Kern wurde mittels TO-PRO[®]-3 Iodid-Lösung gefärbt und ist blau dargestellt. Bei manchen Zelllinien konnte keine homogene Kernfärbung erzielt werden.

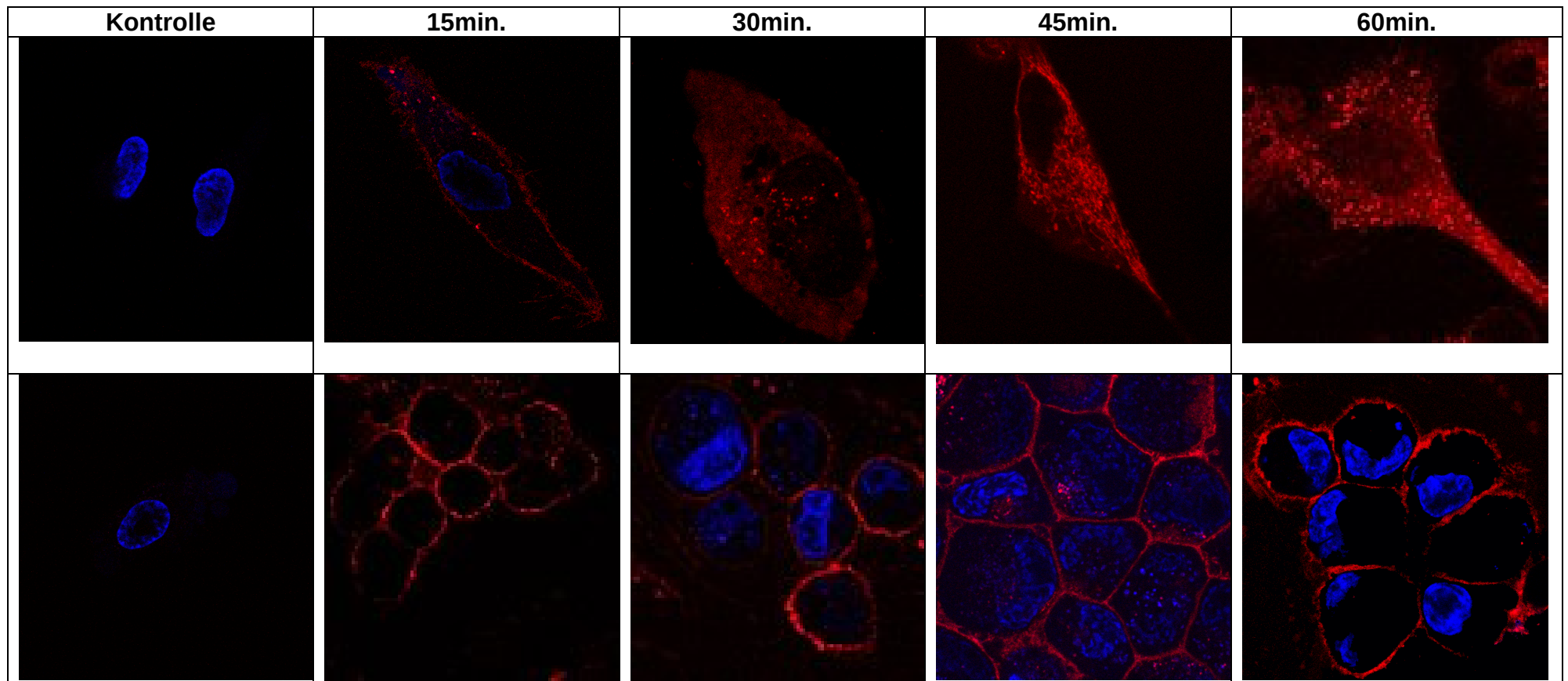


Abb.16:
Internalisierungsstudien der Zelllinie PC-3 mit Cy3-markiertem VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf (siehe Kapitel 3.10.2)

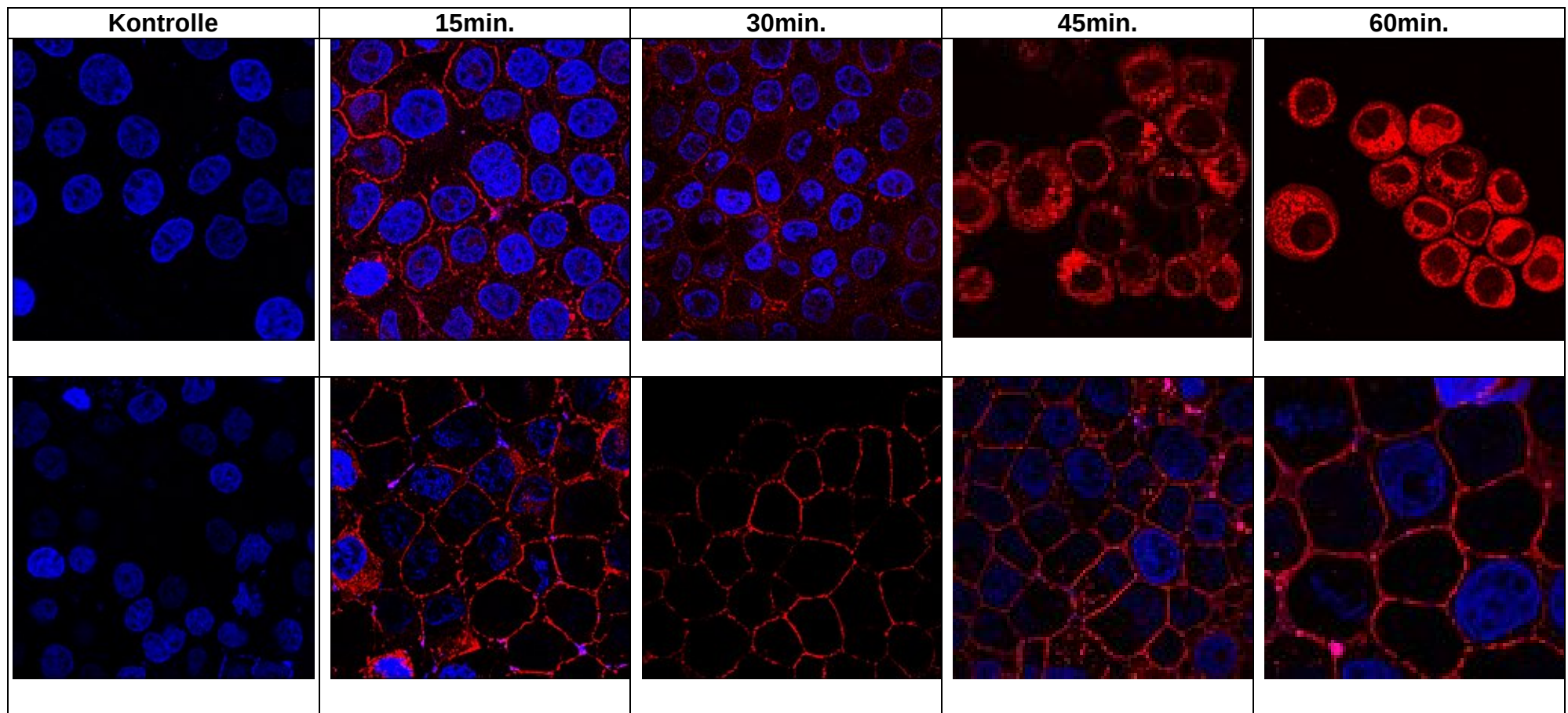


Abb. 17:
Internalisierungsstudien der Zelllinie Capan-1 mit Cy3-markiertem VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf (siehe Kapitel 3.10.2)

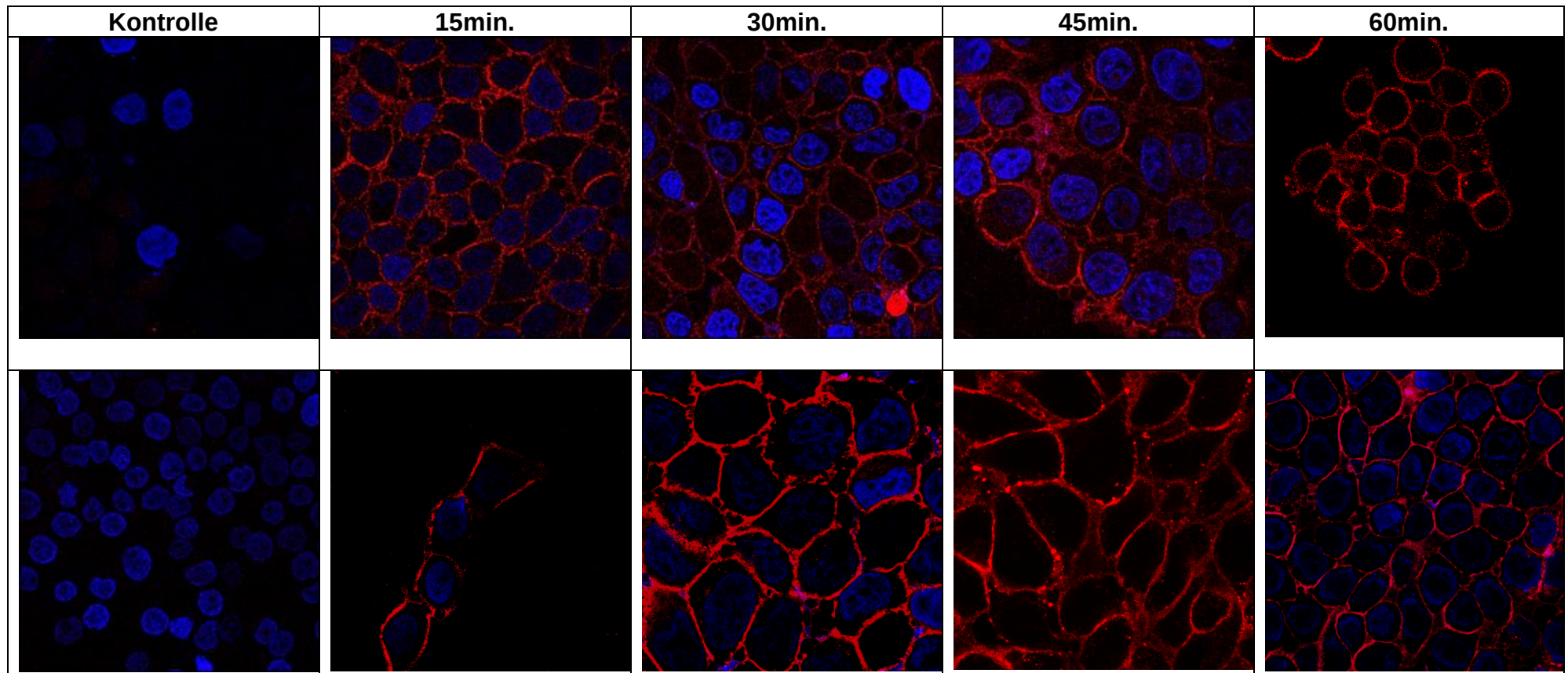


Abb. 18:
Internalisierungsstudien der Zelllinie HT-29 mit Cy3-markiertem VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf (siehe Kapitel 3.10.2)

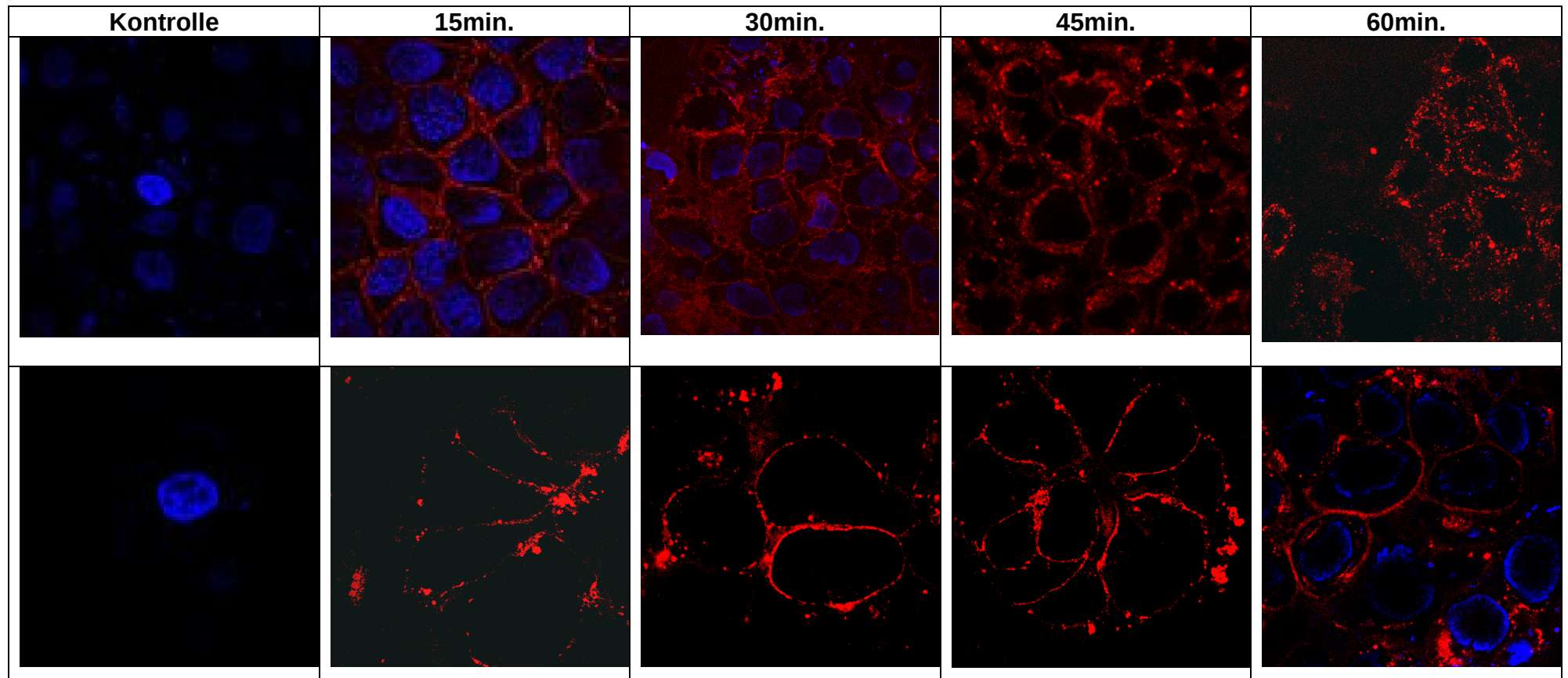


Abb. 19:
Internalisierungsstudien der Zelllinie Caco-2 mit Cy3-markiertem VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf (siehe Kapitel 3.10.2)

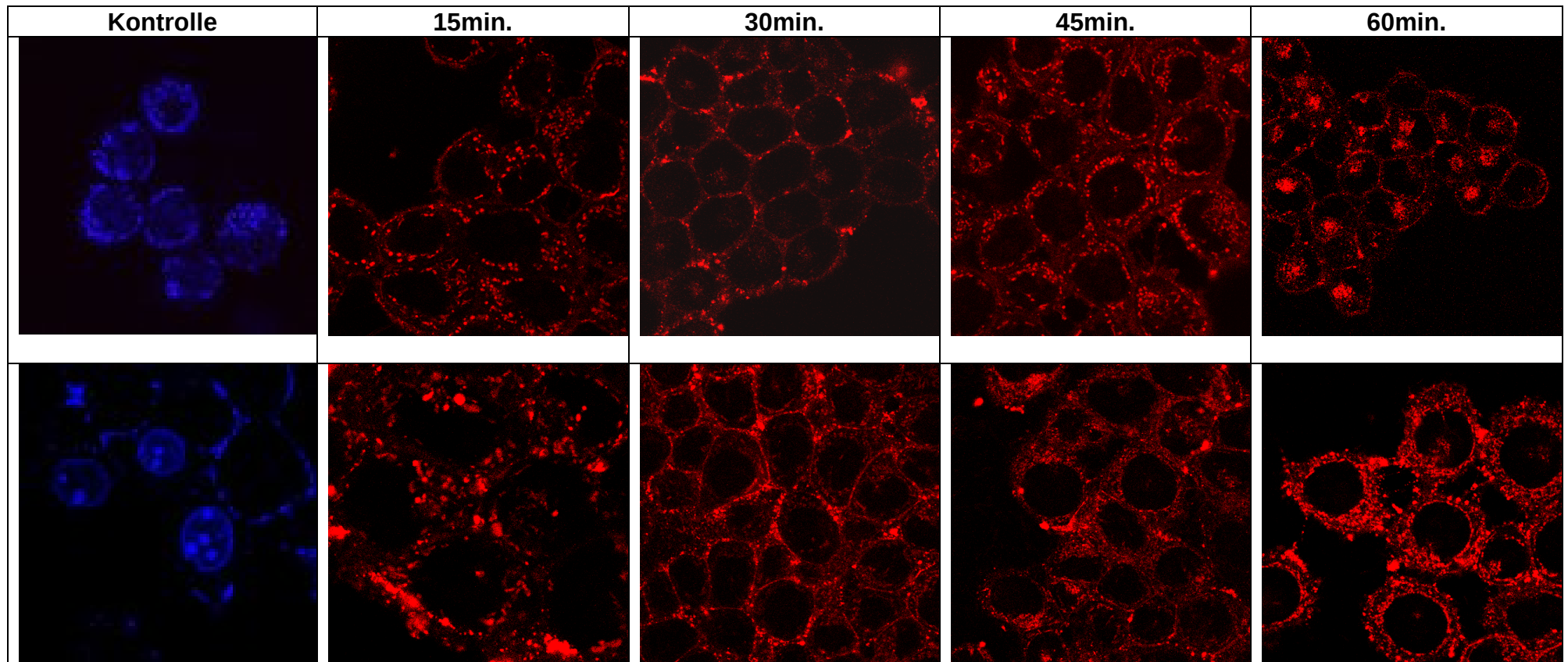


Abb. 20:
Internalisierungsstudien der Zelllinie MCF-7 mit Cy3-markiertem VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf (siehe Kapitel 3.10.2)

4.3.1 Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie PC-3

Die Zelllinie PC-3 besitzt sowohl VPAC₁- als auch VPAC₂-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.1.1). Man erkennt nach 15 Minuten eine verstärkte Anreicherung von VIP-Cy3 an der Zellmembran, die Internalisierung ins Cytoplasma ist nur sehr schwach zu sehen (siehe Abb. 16). Allerdings beginnt schon nach 30 Minuten eine starke Akkumulierung des Cy3-Signals im Cytoplasma. Diese nimmt im Zeitverlauf zu. Fluoreszenzmarkiertes VIP wird also deutlich von dieser Zelllinie internalisiert.

Dieselbe Zelllinie wurde auch mit dem Cy3-markierten VIP-Analogon VIP-A7 versetzt. Bereits nach 15 Minuten ist eine Akkumulierung des Signals an der Zellmembran zu sehen. Auch zu den anderen Zeitpunkten ist keine Internalisierung ins Cytoplasma zu erkennen, allerdings eine Verstärkung des Signals an der Zellmembran.

4.3.2 Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie Capan-1

Capan-1-Zellen besitzen VPAC₁-, nicht aber VPAC₂-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.1.6). Im Zeitverlauf ist zu erkennen, dass fluoreszenzmarkiertes VIP nach anfänglicherer Anlagerung an die Zellmembran rasch und vollständig ins Cytoplasma internalisiert wird, und dass das Signal mit zunehmender Inkubationsdauer immer stärker wird (siehe Abb. 17).

Werden die Zellen mit VIP-A7-Cy3 versetzt, kann man im gesamten Zeitverlauf keine Internalisierung beobachten. Das Signal befindet sich ausschließlich an der Zellmembran und wird mit der Zeit immer intensiver.

4.3.3 Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie HT-29

Ebenso wie bei Capan-1 exprimieren diese Tumorzellen VPAC₁-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.1.4). Auch hier kann man die deutliche Internalisierung von VIP-Cy3 im Zeitverlauf verfolgen, allerdings ist das Signal im Vergleich zu den anderen Zellen schwächer (siehe Abb. 18).

Die Anreicherung von VIP-A7-Cy3 bleibt auf die Zellmembran beschränkt.

4.3.4 Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie Caco-2

Auch diese Colonkarzinomzelllinie exprimiert den VPAC₁-Rezeptor (siehe Kapitel 3.1.3). VIP-Cy3 wird im Zeitverlauf ins Cytoplasma transportiert und die Signalstärke nimmt kontinuierlich zu (siehe Abb. 19).

Wie bei den anderen Tumorzellen wird mit VIP-A7 ein gegensätzlicher Effekt erzielt: eine Akkumulierung an der Zellmembran mit zeitabhängiger Signalverstärkung.

4.3.5 Internalisierungsstudien mit VIP-Cy3 und VIP-A7-Cy3 an der Zelllinie MCF-7

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 besitzt ebenfalls keinen VPAC₂-Rezeptor, sondern nur den VPAC₁-Rezeptor (siehe Kapitel 3.1.2).

Fluoreszenzmarkiertes VIP wird von diesen Zellen im Zeitverlauf immer stärker internalisiert (siehe Abb. 20).

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zelllinien wird VIP-A7-Cy3 in MCF-7-Zellen zeitabhängig ins Zytoplasma transportiert.

4.4 Rohdaten Konfokal-Mikroskopie

In den folgenden Kapiteln sind die genauen mikroskopischen Daten der in Abb. 16–20 gezeigten Photographien zusammengefasst.

4.4.1 PC-3 mit VIP-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
15min.	2.222463	63x1,32 Öl UV	71.420821	71.420821
30min.	1.835125	100x1,4 Öl UV	54.492188	54.492188
45min.	1.830206	100x1,4 Öl UV	54.638672	54.638672
60min.	1.738540	100x1,4 Öl UV	57.519531	57.519531

Tab. 9: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: PC-3 mit VIP-Cy3

4.4.2 PC-3 mit VIP-A7-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.734124	63x1,32 Öl UV	91.533358	91.533358
15min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
30min.	1.542169	100x1,4 Öl UV	64.843750	64.843750
45min.	2.896747	63x1,32 Öl UV	54.796007	54.796007
60min.	1.723180	100x1,4 Öl UV	58.032227	58.032227

Tab. 10: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: PC-3 mit VIP-A7-Cy3

4.4.3 Capan-1 mit VIP-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.141583	100x1,4 Öl UV	87.597656	87.597656
15min.	1.141583	100x1,4 Öl UV	87.597656	87.597656
30min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
45min.	1.463903	100x1,4 Öl UV	68.310547	68.310547
60min.	1.057851	100x1,4 Öl UV	94.531250	94.531250

Tab. 11: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Capan-1 mit VIP-Cy3

4.4.4 Capan-1 mit VIP-A7-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
15min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
30min.	1.180063	100x1,4 Öl UV	84.741211	84.741211
45min.	1.259920	100x1,4 Öl UV	79.370117	79.370117
60min.	2.280624	100x1,4 Öl UV	43.847656	43.847656

Tab. 12: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Capan-1 mit VIP-A7-Cy3

4.4.5 HT-29 mit VIP-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
15min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
30min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
45min.	1.272050	100x1,4 Öl UV	78.613281	78.613281
60min.	1.052145	100x1,4 Öl UV	95.043945	95.043945

Tab. 13: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: HT-29 mit VIP-Cy3

4.4.6 HT-29 mit VIP-A7-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.000000	63x1,32 Öl UV	158.730159	158.730159
15min.	1.166287	100x1,4 Öl UV	85.742188	85.742188
30min.	1.744463	100x1,4 Öl UV	57.324219	57.324219
45min.	1.463903	100x1,4 Öl UV	68.310547	68.310547
60min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000

Tab. 14: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: HT-29 mit VIP-A7-Cy3

4.4.7 Caco-2 mit VIP-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
15min.	1.156082	100x1,4 Öl UV	86.499023	86.499023
30min.	1.115772	100x1,4 Öl UV	89.624023	89.624023
45min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
60min.	1.115772	100x1,4 Öl UV	89.624023	89.624023

Tab. 15: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Caco-2 mit VIP-Cy3

4.4.8 Caco-2 mit VIP-A7-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.872885	100x1,4 Öl UV	53.393555	53.393555
15min.	1.410954	100x1,4 Öl UV	70.874023	70.874023
30min.	2.051077	100x1,4 Öl UV	48.754883	48.754883
45min.	1.474442	100x1,4 Öl UV	67.822266	67.822266
60min.	1.760963	100x1,4 Öl UV	56.787109	56.787109

Tab. 16: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Caco-2 mit VIP-A7-Cy3

4.4.9 MCF-7 mit VIP-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	2.285714	63x1,32 Öl UV	69.444444	69.444444
15min.	1.219411	100x1,4 Öl UV	82.006836	82.006836
30min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
45min.	1.219411	100x1,4 Öl UV	82.006836	82.006836
60min.	1.339876	63x1,32 Öl UV	118.466332	118.466332

Tab. 17: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: MCF-7 mit VIP-Cy3

4.4.10 MCF-7 mit VIP-A7-Cy3

Foto	Zoom	Objektiv	Größe-Breite	Größe-Höhe
Kontrolle	1.229661	100x1,4 Öl UV	81.323242	81.323242
15min.	2.092999	100x1,4 Öl UV	47.778320	47.778320
30min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
45min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000
60min.	1.000000	100x1,4 Öl UV	100.000000	100.000000

Tab. 18: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: MCF-7 mit VIP-A7-Cy3

5. Diskussion

5.1 Einfluss von VIP und synthetischen Analoga auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen unterschiedlicher Genese

Das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP) beeinflusst das Wachstum menschlicher Tumorzellen auf unterschiedliche Weise. Bei manchen Zelllinien fördert VIP die Proliferation, andere werden in ihrem Wachstum gehemmt, manche Zelllinien reagieren gar nicht auf das Peptid ²⁸. In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstumsverhalten eines repräsentativen Querschnitts an Tumorzelllinien unter dem Einfluss von VIP und synthetischer Derivate untersucht (siehe Kapitel 4.1).

Tumore der Kolonregion gehören zu den idealen Kandidaten der Diagnose und Therapie mit VIP oder entsprechender Analoga. Zum einen liegt das an dem „Tumor : Hintergrund-Verhältnis“. Die gesunde Darmschleimhaut besitzt eine sehr geringe Dichte an VPAC₁-Rezeptoren, deren Expressionsmuster zusätzlich noch auf bestimmte Regionen beschränkt ist. Kolonkarzinome exprimieren ebenfalls VPAC₁-Rezeptoren, die Dichte ist hier wesentlich höher. Das bedeutet, das „Tumor : Hintergrund-Verhältnis“ ist sehr hoch. Bei einer Rezeptor-Szintigraphie²⁶ beispielsweise würden diese Karzinome als Hot-Spots zu erkennen sein, da der radioaktiv markierte Ligand entsprechend der hohen Dichte der Rezeptoren des Tumors in einer hohen Konzentration an das Karzinom bindet. Zum anderen wurde in der Kolonregion die höchste Konzentration an VIP (600pM/g) gemessen. Das lässt darauf schließen, dass VIP eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Dickdarms spielt ³².

Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit gleich drei Tumorzelllinien verschiedener Kolonkarzinome ausgewählt, HT-29 (siehe Abb. 4), HCT-15 (sie-

he Abb. 5) und Caco-2 (siehe Abb. 3). Jede dieser Zelllinien exprimiert ausschließlich VPAC₁-Rezeptoren. HT-29, die erste etablierte Krebszelllinie (1964), repräsentiert ein Karzinom in einem sehr fortgeschrittenen Tumorstadium. Das lässt sich deutlich an der Morphologie erkennen. HT-29-Zellen weisen eine spärliche Differenzierung auf, sie wachsen in Multilayern und ihre Zellzwischenräume sind sehr groß. Außerdem weisen sie keine für die Dickdarmregion typischen Mikrovilli auf, sondern bilden stattdessen große, unregelmäßige Zellfortsätze aus. Bei den Vorversuchen zeigte sich bei dieser Zelllinie ein konzentrationsabhängiger, nicht linearer Effekt auf VIP und VIP-A7. Moody et al. beobachteten denselben Effekt bei SCLC-Zellen (Lungenkrebs) und führten ihn auf eine Rezeptordesensibilisierung bzw. Down-Regulation der Rezeptoren zurück³⁵.

HCT-15-Zellen sind in ihrer Morphologie dieser Zelllinie sehr ähnlich und repräsentieren ebenfalls ein spätes Tumorstadium. Caco-2-Zellen hingegen sind der gesunden Dickdarmmukosa noch am ähnlichsten. Ihre Differenzierung ist noch sehr ausgeprägt, Mikrovilli sind ausgebildet. Die Zellen wachsen im Monolayer, die Zellverdopplungszeit ist ähnlich gesunden Zellen sehr groß. Wie bereits von Lelievre beobachtet korrelieren der Effekt von VIP und das Tumorstadium miteinander. Zellen, die ein spätes Stadium repräsentieren, wie HT-29 und HCT-15 reagieren wesentlich signifikanter auf VIP und seine Analoga (siehe Kapitel 4.1), als Zellen, die eine stärkere Differenzierung aufweisen (Caco-2) und damit den gesunden Zellen noch am ähnlichsten sind³². Die anderen untersuchten Zelllinien sind PC-3 (Prostatakarzinom, siehe Abb. 1), MCF-7 (Mammakarzinom, siehe Abb. 2) und Capan-1 (Pankreaskarzinom, siehe Abb. 6). Die Zelllinie PC-3 unterscheidet sich im Expressionsmuster von den anderen. Ebenso wie das gesunde Gewebe der Prostata

(siehe Tab. 1) exprimiert sie VPAC₁- und VPAC₂-Rezeptoren²⁷. Die Morphologie dieser Zelllinien (PC-3, MCF-7 und Capan-1) entspricht einem fortgeschrittenen Tumorstadium, die Zellverdopplungszeit ist sehr gering, auch die Differenzierung ist sehr spärlich. Die Bildung von Multilayern ist besonders bei MCF-7-Zellen sehr ausgeprägt, ohne eine spezielle Behandlung nach dem Passagieren bilden sie neben einem Multilayer auch kolonieähnliche Anhäufungen. Capan-1-Zellen wurden aus einem Pankreaskarzinom isoliert und repräsentieren ebenfalls ein spätes Tumorstadium.

Wie in den Abbildungen 9–15 deutlich zu sehen ist, zeigen die Zellen, die einen Tumor im Spätstadium repräsentieren, die signifikantesten Effekte in ihrem Zellwachstum unter Peptideinwirkung. Caco-2-Zellen hingegen, die ein sehr frühes Tumorstadium repräsentieren, zeigen kaum Veränderungen in ihrer Proliferation.

Die anderen Zellen unterscheiden sich jedoch durch die Konzentration der Peptid-Lösung, die für einen signifikanten Effekt benötigt wird. Während PC-3- (siehe Abb. 9) und Capan-1-Zellen (siehe Abb. 10) von hohen Konzentrationen an VIP gehemmt werden, reagieren MCF-7- (siehe Abb. 14) und HCT-15-Zellen (siehe Abb. 15) nur in physiologischen Konzentrationen mit einer Inhibierung ihres Wachstums.

Die Mammakarzinomzellen (siehe Abb. 14) reagieren am deutlichsten auf die unterschiedlichen Konzentrationen. Eine hohe Konzentration von VIP fördert die Proliferation, physiologische Konzentrationen erzielen eine Wachstumsinhibierung.

Gefördert wird auch das Wachstum der Zelllinie HT-29, allerdings nur in einem hohen Konzentrationsbereich (siehe Abb. 11 und 12).

Capan-1, HT-29 und HCT-15 wurden auch von Hejna et al.²⁸ auf ihr Wachstumsverhalten unter dem Einfluss des Vasoaktiven Intestinalen Peptids untersucht. Sie untersuchten die Serumkonzentration an VIP in Patienten mit Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes und behandelten die oben genannten Tumorzellen mit den ermittelten Peptid-Konzentrationen. Vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse bei den Zelllinien HCT-15 und HT-29. Während Hejna bei Capan-1-Zellen jedoch eine signifikante Promotion des Wachstums von 20% beobachtete, wurden dieselben Zellen in der hier gezeigten Arbeit unter vergleichbaren Bedingungen von VIP in ihrem Wachstum gehemmt. Die Kulturbedingungen waren in beiden Arbeiten dieselben, der einzige Unterschied betrifft die VIP-Konzentrationen. Hejna et al. verwendeten eine 4mal höhere Konzentration (40pg/ml). Wie sowohl aus der Literatur²⁸ ersichtlich, als auch in unseren Versuchen gezeigt hat VIP einen Effekt auf das Wachstumsverhalten der genannten Zelllinien. Da jedoch sowohl hemmende als auch fördernde Effekte beobachtet wurden, kann man keine definitive Aussage treffen. Die verwendete Konzentration scheint auf alle Fälle eine wichtige Rolle zu spielen²⁸.

VIP-A7 hat als einziges Peptid die gleiche Wirkung auf alle Zellen, es hemmt ihre Proliferation (siehe Abb. 9–15). Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine Blockade des Zellstoffwechsels sein. Untersuchungen über seine Auswirkungen auf die Signaltransduktion könnten diese These verifizieren.

Im Gegensatz dazu steht das synthetische Analogon VIP-A32. Während PC-3- (siehe Abb. 9), HT-29- (siehe Abb. 12) und HCT-15-Zellen (siehe Abb. 15) unter dem Einfluss des Peptids ihre Zellverdopplungszeit verlängern, steigert es die Proliferation von Caco-2- (siehe Abb. 13) und Capan-1-Zellen (siehe Abb. 10).

Bei MCF-7-Zellen bewirken die verschiedenen Konzentrationsbereiche unterschiedliche Effekte auf das Wachstumsverhalten (siehe Abb. 14). Eine hohe Konzentration des Peptids hemmt die Proliferation, physiologische Konzentrationen erzielen eine Wachstumspromotion. VIP-A32 zeigt bei diesen Tumorzellen im Proliferationsverhalten eine einem Antagonisten vergleichbare Eigenschaft. Betrachtet man diese Daten, ist eine genaue Diagnose des zu behandelnden Tumors entscheidend. Ohne den Entstehungsort, das Stadium und die Sensibilität zu kennen, könnte eine Behandlung mit den genannten Peptiden gar keine und im schlimmsten Fall genau das Gegenteil der erwünschten Wirkung haben. Vergleicht man die beiden synthetischen Peptide mit VIP-Derivaten anderer Arbeitsgruppen und ihren Effekt auf gleiche, bzw. vergleichbare Tumorzellen, so ist der beobachtete Effekt auf das Proliferationsverhalten ($\pm 10\%$) in der vorliegenden Arbeit sehr gering. Diese Daten sprechen dafür, dass die untersuchten Peptide nur marginal in den Zellstoffwechsel eingreifen. Genau diese Ergebnisse sind für einen Einsatz in der Krebsdiagnostik von Vorteil (siehe Kapitel 5.2). Da den Patienten in diesem Fall die Peptide systemisch verabreicht werden, würde ein Eingriff in den Zellstoffwechsel wahrscheinlich diverse Nebenwirkungen verursachen. Die nachfolgend beschriebenen VIP-Analoga anderer Arbeitsgruppen haben weitaus signifikantere Effekte auf die Tumorzellproliferation und sind damit für die Krebstherapie geeignet. Moody et al. synthetisierten ein so genanntes VIPhybrid-Peptid, es blockiert alle drei VPAC-Rezeptoren. Von 56 untersuchten, menschlichen Tumorzelllinien wurden 51 davon signifikant in ihrem Wachstum gehemmt. Selbst bei in vivo Versuchen mit Mäusen hemmte sein Peptid-Analogon das Tumorwachstum³⁶. In einer anderen Arbeit untersuchte er die Wirkung von VIP-Ellipticin-Derivaten auf MCF-7-Zellen. Ellipticin ist ein

zytostatisch wirkendes Pyridocarbazolalkaloid, welches aus Ochrosia-Arten isoliert wird. Wieder wurde eine signifikante Hemmung des Zellwachstums erzielt ²⁹. Levy et al. entwickelten einen VIP-Antagonisten, das Neurotensin₆₋₁₁VIP₇₋₂₈. Nachdem nanomolare Konzentrationen des Antagonisten das Wachstum der Zelllinie HCT-15 signifikant hemmten, untersuchten sie auch die Wirkungen des Peptids in vivo. Bei Versuchen mit Ratten, in denen mit Azoxymethan Kolonkarzinome induziert wurden, konnten sie mit demselben VIP-Antagonisten eine Inhibierung des Tumorwachstums, eine Verminderung der Tumorfrequenz, eine Änderung im Entstehungsort und eine geringere Metastasierungsrate erzielen ³⁷.

Die Auswirkungen von VIP-Antagonisten auf Pankreas- und Prostatakarzinomzellen untersuchten Rekasi et al. Das Wachstum der beiden Krebszelllinien konnte zwischen 40 und 70% gehemmt werden ³³.

Betrachtet man die Daten der vorliegenden Arbeit, so unterscheiden sich die synthetischen Derivate, die einen unphysiologischen Eingriff in den Zellstoffwechsel darstellen, in ihrer Wirksamkeit kaum von ihrem nativen Analogon. Aber wie schon bei anderen VIP-Analoga³⁰ könnte deren Wirkung durch die Kombination oder Kopplung mit Chemotherapeutika potenziert werden.

5.2 Einfluss von VIP und synthetischen Analoga auf das Internalisierungsverhalten von Tumorzellen unterschiedlicher Genese

G-Protein gekoppelte Rezeptoren haben die Eigenschaft, gemeinsam mit ihrem Liganden ins Zellinnere zu internalisieren. Dieses Verhalten kann in der Tumordiagnostik und -therapie genutzt werden. In der Vergangenheit wurde das Internalisierungsverhalten von VIP und VPAC-Rezeptoren mittels radioaktiv markiertem VIP untersucht. Bindet VIP an den Rezeptor, führt das

zu einer raschen Phosphorylierung und Desensibilisierung des Rezeptors. Durch rezeptorvermittelte Endozytose wird der Ligand-Rezeptor-Komplex rasch ins Zellinnere internalisiert³⁸.

Im Zytoplasma kommt es zur Trennung dieses Komplexes. Der Großteil der Rezeptoren, wird wieder in die Zellmembran reinsertiert³⁹. Der Internalisierungsprozess ist von den Parametern Temperatur, Zeit, Konzentration und Zelltyp abhängig^{40 41}.

Mit fluoreszenzmarkierten Peptiden hat man die Möglichkeit, Bindungsaktivität und Internalisierungsstudien in Echtzeit und im Zeitverlauf an lebenden Zellen zu beobachten. Der limitierende Faktor dieser Methode ist der mögliche Unterschied in der Affinität zwischen dem nativen Peptid und seinem markierten Derivat. Fluoreszenzfarbstoffe wie Alexa-488^{42 43}, FITC⁴⁴ oder Cy3 sind für die Kopplung geeignet.

Parallel zur Qualität der mikroskopischen Auswertung kann auch mit denselben Liganden eine Quantifizierung der Rezeptorexpression mittels Fluorescence-activated cell sorter (FACS) durchgeführt werden⁴². Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden VIP und VIP-A7 zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert und ihr Internalisierungsverhalten mittels Konfokal-Mikroskopie beobachtet.

VIP-Cy3 wurde von allen untersuchten Zelllinien ins Zytoplasma internalisiert. Unterschiede gab es nur im Zeitverlauf. PC-3 (siehe Abb. 16), Capan-1 (siehe Abb. 17) und Caco-2 (siehe Abb. 19) zeigen beim ersten Messpunkt (15min) eine Anlagerung des Signals an die Zellmembran, doch schon beim zweiten Messpunkt (30min) ist eine deutliche Internalisierung ins Zytoplasma zu erkennen.

MCF-7- (siehe Abb. 20) und HT-29-Zellen (siehe Abb. 18) weisen schon nach 15 Minuten eine deutliche Akkumulierung des Signals im Zellinneren auf.

Ein interessanter Aspekt für die Tumordiagnostik wäre es, ein VIP-Analogon zu finden, dass nicht dem nativen Internalisierungsverhalten von VIP folgt, sondern sich an die Zellmembran anlagert. Das wäre ein Zeichen, dass diesem Derivat die biologische Aktivität des Vasoaktiven Intestinalen Peptids fehlt. Damit wären Nebenwirkungen bei einer systemischen Injektion minimiert, z.B. die vasodilatierenden Eigenschaften von VIP.

Das synthetische Derivat VIP-A7 zeigt bei den Zelllinien PC-3, Capan-1, HT-29 und Caco-2 genau dieses gegensätzliche Verhalten zu seinem Analogon (siehe Abb. 16 – 19). Während des gesamten Zeitverlaufs ist keine Internalisierung ins Zellinnere zu beobachten. Das Cy3-Signal lagert sich an der Zellmembran an und wird zeitabhängig intensiver.

Bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 hingegen verhält sich VIP-A7 wie sein natives Analogon. Schon nach 15 Minuten kommt es zu einer Anreicherung des Signals im Zellinneren und gewinnt zeitabhängig an Intensität (siehe Abb. 20). Dafür gibt es verschiedene Erklärungen, wie z.B. die Expression eines anderen Rezeptors der Sekretin-Familie, seine Anwesenheit wäre bei Mammakarzinomzellen sehr gut möglich. Es könnte aber auch eine Subtyp-Variation der VPAC-Rezeptoren von MCF-7-Zellen exprimiert werden, Splice-Varianten des PAC₁-Rezeptors sind schon bekannt³². Eine andere Erklärung wäre der Einfluss von Hormonen. Diese können die Rezeptoraktivitäten beeinflussen. Eine Studie zeigte eine Beeinträchtigung des VPAC₁-mRNA-Levels durch Estradiol. Es kommt zu einer Reduktion der mRNA und der Proteinkonzentration⁴⁵. Der Grund für dieses Verhalten ist noch nicht geklärt.

Weitere Unterschiede im Internalisierungsverhalten der einzelnen Zelllinien gibt es in der Intensität des Signals. Daraus lässt sich ein Rückschluss auf die Rezeptorendichte ziehen. Das stärkste Signal zeigen PC-3, Capan-1- und MCF-7-Zellen (siehe Abb. 16, 17 und 20), deutlich schwächer ist die Signalintensität bei HT-29 und Caco-2 (siehe Abb. 18 und 19).

Das bei den Proliferationsstudien beschriebene VIP-A32 wurde aus den Internalisierungsversuchen ausgeschlossen. In Vorversuchen konnte weder ein Signal im Zytoplasma noch an der Membran der Zellen detektiert werden. Modifikationen am Peptid können die drei-dimensionale Struktur verändern, sodass keine Bindung am Rezeptor mehr möglich ist. Auch die Möglichkeit einer Fragmentierung wäre eine Erklärung für dieses Phänomen.

5.3 Mögliche klinische Anwendungsgebiete

Eine klinische Anwendung von VIP und den untersuchten Analoga wäre in mehrfacher Hinsicht denkbar. Radioaktivmarkierte Derivate können sich nach systemischer Applikation am Tumorgewebe anreichern und somit eine effektive Diagnose gewährleisten.

Ebenso wäre die Kopplung mit Chemotherapeutika, entweder als Vehikel oder als Kombinationstherapie möglich.

5.3.1 Nuklearmedizin

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Peptiden machen sie zu einem idealen Werkzeug für die Diagnostik von Krebserkrankungen. Durch ihre hohe Gewebepерmeabilität erreichen sie nach systemischer Applikation rasch ihren Wirkort. Koppelt man sie mit radioaktivem Material oder Chelatmolekülen, ist ihre Größe ausreichend um eine Bindung an den Rezeptor zu gewährleisten. Da es sich um physiologische Komponenten des

menschlichen Organismus handelt, sind Nebenwirkungen auf ihre biologische Aktivität zurückzuführen und somit berechenbar²². Dass viele Tumore Rezeptoren für Hormone oder andere biologisch aktive Substanzen exprimieren ist seit Mitte der 80er Jahre bekannt⁴⁶. Solche neuroendokrine Tumore, häufigster Entstehungsort ist der Gastrointestinaltrakt, weisen eine sehr langsame Genese auf. Dadurch treten auch erste Symptome erst nach Jahren auf. Außerdem sind kleine Tumore mit herkömmlichen Methoden oft schlecht bzw. gar nicht zu diagnostizieren. Eine neue, wesentlich empfindlichere Methode ist die Peptid-Rezeptor-Szintigraphie, bei der die physiologische Eigenschaft des Peptids, rasch und selektiv an seinen Zielort zu gelangen ausgenutzt wird. So wurde z.B. ein Somatostatin-Analogon, das Octreotid (OctreoScan[®]), 1994 von der FDA überprüft und für die Szintigraphie an Patienten mit neuroendokrinen Tumoren freigegeben⁴⁷. Es weist eine 90%ige Sensibilität für primäre Tumore und Metastasen auf. Auch ¹²³I-markiertes VIP wurde bereits erfolgreich an der Universität Wien an Patienten getestet²⁶.

Auch VIP weist eine hohe Sensitivität bei primären Tumoren (84%) und Metastasen (82%) auf. Außerdem konnte mithilfe dieses Tracers bei Patienten, die zwar Symptome einer neuroendokrinen Entartung aufwiesen, bei denen jedoch mit konventionellen Methoden noch kein Tumor detektiert wurde, eine positive Diagnose durchgeführt werden. Ein Problem ergab sich jedoch durch die Pharmakokinetik des Vasoaktiven Intestinalen Peptids. Bei Untersuchungen des Lungengewebes wurden 40% des ¹²³I-VIPs bereits wenige Minuten nach der Applikation vom Gewebe selbst verbraucht⁴⁸. Genau dieses Problem könnte mit einem synthetischen Derivat, wie dem hier untersuchten VIP-A7, umgangen werden. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass VIP-A7,

bei vier von fünf beobachteten Zelllinien den Internalisierungsprozess blockiert. Weitere Untersuchungen werden Aufschluss über die biologische Aktivität von VIP-A7 geben. Sollte keine VIP-ähnliche Aktivität gegeben sein, so wäre dieses synthetische Derivat ein hervorragender Kandidat für die Peptid-Rezeptor-Szintigraphie.

5.3.2 Kopplung mit Chemotherapeutika

Für gezieltes Drug-Targeting in der Chemotherapie sind Peptide geeignete Kandidaten. Peptid-Arzneistoff-Komplexe, die ins Innere der Zelle internalisieren und nur direkt am Tumor ihre Wirkung entfalten, bzw. eine Kombinationstherapie, würden die Lebensqualität der Patienten entscheidend verbessern. Moody et al. synthetisierten VIP-Rezeptor-Antagonisten, wie VIPhyb und (SN)VIPhyb. Diese zeigten zwar zellwachstumshemmende Eigenschaften, wirklich signifikant waren die Ergebnisse jedoch nur, wenn ein Antagonist gemeinsam mit einem Chemotherapeutikum wie Taxol verabreicht wurde. Die Hemmung war höher als mit Taxol alleine. Wahrscheinlich fixieren die Antagonisten die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und/oder zwingen sie in die Apoptose⁴⁹. Eine andere Möglichkeit besteht darin, einen Agonisten mit einem Chemotherapeutikum zu koppeln, beide werden internalisiert, jedoch wirkt ausschließlich der Arzneistoff in der Zelle. Zu diesem Zweck koppelten Moody et al. Tetra- und Pentapeptid-Elliptizin-Derivate an den Carboxyl-Terminus des Vasoaktiven Intestinalen Peptids. Das N-terminale Ende ist für seine biologische Aktivität verantwortlich. Trotz des sperrigen Markers binden diese Derivate lediglich um den Faktor 3 schwächer als VIP selbst. Bei in vitro Studien an z. B. MCF-7-Zellen konnten die zytotoxischen Eigenschaften dieser Derivate nachgewiesen werden²⁹.

VIP-A7, das bei allen untersuchten Zelllinien eine Inhibierung des Zellwachstums erzielte, könnte für eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika geeignet sein. Bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die dieses Peptid wie sein natives Analogon internalisiert, sollte auch eine Kopplung mit einem Arzneistoff auf seine Auswirkungen untersucht werden. Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass VIP-A7 kaum in den Zellstoffwechsel eingreift. Da Medikamente dieser Art immer systemisch appliziert werden, könnten mit diesem Derivat die negativen Eigenschaften von VIP, insbesondere seine vasodilatierenden Eigenschaften, umgangen werden.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proliferations- und Internalisierungsverhalten verschiedener Tumorzelllinien unterschiedlicher Genese auf das Vasoaktive Intestinale Peptid und zwei synthetische Analoga (VIP-A7 und VIP-A32) untersucht. Das Proliferationsverhalten wurde an sechs Zelllinien (siehe Kapitel 4.1) und das Internalisierungsverhalten an fünf Zelllinien (siehe Kapitel 4.3) gemessen.

VIP und VIP-A32 zeigten abhängig vom Zelltyp und der Konzentration sowohl proliferationssteigernde, inhibierende als auch gar keine Effekte. VIP-A7 erzielte bei allen untersuchten Zellen eine zum Teil auch konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums.

Fluoreszenzmarkiertes VIP und VIP-A7 wurden mithilfe der Konfokal-Mikroskopie auf ihr Internalisierungsverhalten untersucht. Im Gegensatz zu VIP-A7 wird VIP von allen Tumorzellen im Zeitverlauf internalisiert. VIP-A7 bindet zwar an den Rezeptor, wird aber im Gegensatz zu VIP nicht internalisiert. Das Cy3-Signal lagert sich an der Zellmembran an und wird zeitabhängig intensiver. Nur die Brustkrebszelllinie MCF-7 internalisiert das synthetische Derivat gemeinsam mit dem Rezeptor, wie das native VIP.

Diese Ergebnisse stellen eine Basisinformation für weitere Untersuchungen im Bereich der Nuklearmedizin und der Therapie in Kombination oder Koppelung mit Chemotherapeutika dar.

7. Abkürzungen

Alexa-488	Fluoreszenzfarbstoff
Asp	L-Asparaginsäure
ASPC-1	Pankreaskarzinomzelllinie
ATCC	American type culture collection
BxPC-3	Pankreaskarzinomzelllinie
Caco-2	Kolonkarzinomzelllinie
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Capan-1	Pankreaskarzinomzelllinie
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Ovarzellen
COLO 320	Kolonkarzinomzelllinie
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoreszenzfarbstoff
GIP	gastric inhibitory peptide
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLP	glucagon like peptide
Glu	L-Glutaminsäure

Gly	Glycin
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRF	growth hormone-releasing factor
Gs α -Protein	Stimulatory guanine binding protein (α)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCT-15	Kolonkarzinomzelllinie
hGRF	human growth-releasing factor
HT-29	Kolonkarzinomzelllinie
IGF	insulin like growth factor
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
LoVo-Zellen	kolorektale Adenokarzinomzellen
Lys	L-Lysin
MCF-7	Mammakarzinomzelllinie
MiaPaCa-2	Pankreaskarzinomzelllinie
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MTT	Methyl-thiazolyl-2-tetrazoliumbromid
n.d.	not detected
NSCLC	non-small cell lung cancer
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PALS	periarterial lymphatic sheath
PAM	peptidylglycin- α -amidating-monooxygenase
Panc-1	Pankreaskarzinomzelllinie
PC-3	Prostatakarzinomzelllinie
PDGF, 4-6	Platelet derived growth factor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PHI	peptide histidine isoleucineamide

PHM	peptide histidine methionine
PMT	photomultipliertube
PNS	Peripheres Nervensystem
PPH	Primäre Pulmonale Hypertonie
rpm	rounds per minute
SCLC	small cell lung cancer
SST	Somatostatin
SW 403	Kolonkarzinomzelllinie
Trp	L-Tryptophan
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VIP-A7	synthetisches VIP-Derivat
VIP-A32	synthetisches VIP-Derivat
VPAC	VIP/PACAP
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: PC-3-Zellen

Abb. 2: MCF-7-Zellen

Abb. 3: Caco-2-Zellen

Abb. 4: HT-29-Zellen

Abb. 5: HCT-15-Zellen

Abb. 6: Capan-1-Zellen

Abb. 7: Prinzip eines Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

(Abbildung von der Firma Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland zur Verfügung gestellt.)

Abb. 8: Aufbau eines Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

(Abbildung von der Firma Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland zur Verfügung gestellt.)

Abb. 9: Proliferationstests der Zelllinie PC-3 inkubiert mit 10 μ M, 10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

Abb. 10: Proliferationstests der Zelllinie Capan-1 inkubiert mit 10 μ M, 10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

Abb. 11: Proliferationstests der Zelllinie HT-29 inkubiert mit 10 μ M, 1 μ M, 100nM, 50nM, 10nM, 5nM, 1nM, 100pM und 10pM VIP und VIP-A7 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

Abb. 12: Proliferationstests der Zelllinie HT-29 inkubiert mit 10 μ M, 10nM und 10pM VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle (=cont)

Abb. 13: Proliferationstests der Zelllinie Caco-2 inkubiert mit 10 μ M, 10nM

und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle
(=cont)

Abb. 14: Proliferationstests der Zelllinie MCF-7 inkubiert mit 10µM, 10nM
und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur Kontrolle
(=cont)

Abb. 15: Proliferationstests der Zelllinie HCT-15 inkubiert mit 10µM,
10nM und 10pM VIP, VIP-A7 und VIP-A32 im Vergleich zur
Kontrolle (=cont)

Abb. 16: Internalisierungsstudien der Zelllinie PC-3 mit Cy3-markiertem
VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf

Abb. 17: Internalisierungsstudien der Zelllinie Capan-1 mit Cy3-
markiertem VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im
Zeitverlauf

Abb. 18: Internalisierungsstudien der Zelllinie HT-29 mit Cy3-markiertem
VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf

Abb. 19: Internalisierungsstudien der Zelllinie Caco-2 mit Cy3-markiertem
VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf

Abb. 20: Internalisierungsstudien der Zelllinie MCF-7 mit Cy3-markiertem
VIP (oben) und Cy3-markiertem VIP-A7 (unten) im Zeitverlauf

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: VPAC-Rezeptoren im gesunden und kranken menschlichen Gewebe

Tab. 2: Einfluss von VIP auf die Proliferation von verschiedenen
Krebszelllinien

Tab. 3: Rohdaten MTT-Tests: PC-3 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Tab. 4: Rohdaten MTT-Tests: Capan-1 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Tab. 5: Rohdaten MTT-Tests: HT-29 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Tab. 6: Rohdaten MTT-Tests: Caco-2 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Tab. 7: Rohdaten MTT-Tests: MCF-7 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Tab. 8: Rohdaten MTT-Tests: HCT-15 mit VIP, VIP-A7 und VIP-A32

Tab. 9: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: PC-3 mit VIP-Cy3

Tab. 10: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: PC-3 mit VIP-A7-Cy3

Tab. 11: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Capan-1 mit VIP-Cy3

Tab. 12: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Capan-1 mit VIP-A7-Cy3

Tab. 13: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: HT-29 mit VIP-Cy3

Tab. 14: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: HT-29 mit VIP-A7-Cy3

Tab. 15: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Caco-2 mit VIP-Cy3

Tab. 16: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: Caco-2 mit VIP-A7-Cy3

Tab. 17: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: MCF-7 mit VIP-Cy3

Tab. 18: Rohdaten Konfokal-Mikroskopie: MCF-7 mit VIP-A7-Cy3

10. Literaturverzeichnis

- ¹ SI. Said, V. Mutt 1970: Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. *Science*; 169; 1217-1218
- ² PA. Rosenberg, Y. Li 1995: Vasoaktive intestinal Peptide regulates extracellular adenosine levels in rat cortical cultures. *Neurosci. Lett*; 200; 93-96
- ³ P. Nicole, JJ. Maoret, A. Couvineau, FA. Momany, M. Laburthe 2000: Tryptophan 67 in the human VPAC1 receptor: Crucial role for VIP binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 276; 654-659
- ⁴ T. Dickinson, SM. Fleetwood-Walker 1999: VIP and PACAP; very important in pain? *Trends Pharmacol. Sci.*; 20; 324-329
- ⁵ SI. Said, K. Dickman 1998: Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Peptides. (Editor Said, I.S.); 345-361; Marcel Dekker; New York
- ⁶ V. Petkov, W. Mosgoeller, R. Ziesche, M. Raderer, L. Stiebellehner, K. Vonbank, GC. Funk, G. Hamilton, C. Novotny, B. Burian, LH. Block 2003: Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.*; 111; 1339-1346
- ⁷ I. Gozes, O. Perl, E. Giladi, A. Davidson, O. Ashur-Fabian, S. Rubintraut, M. Fridkin 1999: Mapping the active site in vasoactive intestinale peptide to a core of four amino acids: Neuroprotective drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 96; 4143-4148
- ⁸ P. Vertongen, P. De Clerck, JC. Fourmet, H. Martelli, P. Helardot, C. Devalck, T. Peeters, E. Sariban, P. Robberecht 1997: Comparison between

vasoactive intestinale polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide levels in neuroblastoma tumor tissues. *Neuropeptides*; 31; 404-413

⁹ B. Desbuquois 1974: The interaction of vasoactive intestinale polypeptide and secretin with liver-cell membranes. *Eur. J. Biochem.*; 46; 439-450

¹⁰ D. Bataille, P. Freychet, G. Rosselin 1974: Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinale polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase. *Endocrinology*; 95; 713-721

¹¹ JP. Christophe, TP. Conlon, JD. Gardner 1976: Interaction of porcine vasoactive intestinale peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig: Binding of radioiodinated peptide. *J. Biol. Chem.*; 251; 4629-4634

¹² M. Laburthe, JC. Prieto, B. Amiranoff, et al. 1979: Interaction of vasoactive intestinale peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 2. Characterization and structural requirements of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3':5'-monophosphate. *Eur. J. Biochem.*; 96; 239-248

¹³ M. Laburthe, A. Couvineau 2002: Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regulatory Peptides*; 108; 165-173

¹⁴ P. Gressens, S. Marret, JM. Hill, DE. Brenneman, I. Gozes, M. Fridkin and P. Evrard 1997: Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J Clin Invest.*; 100; 390-397

- ¹⁵ I. Langer, C. Langlet and P. Robberecht 2005: Effect of inactivating mutations on phosphorylation and internalization of the human VPAC₂ receptor. *J. Mol. Endocrinology*; 34; 405-414
- ¹⁶ T. Ishihara, R. Shigemoto, K. Mori, K. Takahashi, S. Nagata 1992: Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *Neuron*; 8; 811-819
- ¹⁷ L. Lins, A. Couvineau 2001: The human VPAC1 receptor: three-dimensional model and mutagenesis of the N-terminal domain. *J. Biolog. Chem.*; 276; 10153-10160
- ¹⁸ CA. Ottaway 1992: Insertion and internalization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in murine CD4 T lymphocytes. *Regul. Peptides*; 41; 49-59
- ¹⁹ JA. Koenig, JM. Edwardson 1997: Endocytosis and recycling of G-protein-coupled receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.*; 18; 276-287
- ²⁰ AV. Schally, A. Nagy 1999: Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur. J. Endocrinol.*; 141; 1-14
- ²¹ TW. Moody, D. Chan, J. Fahrenkrug, RT. Jensen 2003: Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr. Pharm. Des.*; 9; 495-509
- ²² JC. Reubi 2003: Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews*; 24; 389-427

- ²³ MG. Juarranz, O. Bolanos, I. Gutierrez-Canas, et al. 2001: Neuroendocrine differentiation of the LNCaP prostate cancer cell line maintains the expression and function of VIP and PACAP receptors. *Cell Signal*; 13; 887-894
- ²⁴ JC. Reubi, U. Laderach, B. Waser, et al. 2000: Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissue of origin. *Cancer Res.*; 60; 3105-3112
- ²⁵ DM. Jaworsky 2000: Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and the PACAP-selective receptor in cultured rat astrocytes, human brain tumors, and in response to acute intracranial injury. *Cell. Tissue Res.*; 300; 219-230
- ²⁶ I. Virgolini, M. Raderer, A. Kurtaran, P. Anderberger, Q. Yang, M. Radosavljevic, M. Leimer, K. Kaserer, S.R. Li, G. Kornek, P. Hübsch, B. Niederle, J. Pidlich, W. Scheithauer, P. Valent 1996: ¹²³¹I-Vasoactive Intestinal Peptide receptor scanning: Update of imaging results in patients with adenocarcinomas and endocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Med. Biol.*; 23; 685-692
- ²⁷ J. C. Reubi 2000: In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissue. *Ann. NY Acad. Sci.*; 921; 1-25
- ²⁸ M. Hejna, G. Hamilton, T. Brodowicz, I. Haberl, W. C.C. Fiebiger, W. Scheithauer, I. Virgolini, W. J. Köstler, G. Oberhuber, M. Raderer 2001: Se-

rum levels of vasoactive intestinal peptide (VIP) in patients with adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Anticancer Research*; 21; 1183-1188

²⁹ TW. Moody, G. Czerwinski, NI. Tarasova and CJ. Michejda 2002: VIP-ellipticine derivatives inhibit the growth of breast cancer cells. *Life sciences*; 71; 1005-1014

³⁰ TW. Moody, J. Walters, M. Casibang, F. Zia and Y. Gozes 2000: VPAC1 receptors and lung cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; 921; 26-32

³¹ K. Maruno, A. Absood and SI. Said 1998: Vasoactive intestinal peptide inhibits human small-cell lung cancer proliferation in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 95; 14373-14378

³² V. Lelievre, AC. Meunier, E. Caigneaux, J. Falcon and JM. Muller 1998: Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. *Cell. Signal*; 10; 13-26

³³ Z. Rekasi, JL. Varga, AV. Schally, G. Halmos, P. Armatas, K. Groot and T. Czompoly 2000: Antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide inhibit tumor proliferation by different mechanisms: Evidence from in vitro studies on human prostatic and pancreatic cancers. *Endocrinology*; 141; 2120-2128

³⁴ A. Becker, C. Hessenius, S. Bhargava, C. Grötzinger, K. Licha, J. Schneider-Mergener, B. Wiedenmann and W. Semmler 2000: Cyanine dye labeled

Vasoactive Intestinal Peptide and Somatostatin analog for optical detection of gastroenteropancreatic tumors. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 921; 275-278

³⁵ T.W. Moody, F. Zia, A. Goldstein, P. Naylor, E. Sarin, D. Brenneman, et al. 1993: VIP analogues inhibit small cell lung cancer growth. Biomed. Res.; 13; 131-136

³⁶ TW. Moody, JM. Hill and RT. Jensen 2003: VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. Peptides; 24; 163-177

³⁷ A. Levy, R. Gal, R. Granoth, Z. Dreznik, M. Fridkin and I. Gozes 2002: In vitro and in vivo treatment of colon cancer by VIP antagonists. Reg. Peptides; 109; 127-133

³⁸ RM. Steinman, IS. Mellman, WA. Muller and ZA. Cohn 1983: Endocytosis and the recycling of plasma membrane. J. Cell. Biolog.; 96; 1-27

³⁹ G. Rosselin, A. Anteunis, A. Astesano, C. Boissard, P. Gali, G. Hejblum and JC. Marie 1988: Regulation of the Vasoactive Intestinal Peptide receptor. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 527; 220-237

⁴⁰ TP. McDonald, DM. Dinnis, CF. Morrison and AJ. Harmar 1998: Desensitization of the human Vasoactive Intestinal Peptide receptor (hVIP2/PACAP R): Evidence for agonist-induced receptor phosphorylation and internalisation. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 865; 64-72

- ⁴¹ I. Haberl, DS. Habringer, F. Andraea, A. Artl and W. Mosgoeller 2006: New non-radioactive techniques for Vasoactive Intestinal Peptide-receptor-ligand binding studies. Ann. N.Y. Acad. Sci.; in press
- ⁴² PM. Germano, J. Stalter, SV. Le, M. Wu, DJ. Yamaguchi, D. Scott and JR. Pisegna 2001: Characterization of the pharmacology, signal transduction and internalization of the fluorescent PACAP Ligand, fluor-PACAP, on NIH/3T3 cells expressing PAC1. Peptides; 22; 861-866
- ⁴³ SV. Le, DJ. Yamaguchi, CA. McArdle, K. Tachiki, JR. Pisegna and P. Germano 2002: PAC1 and PACAP expression, signalling, and the effect on the growth of HCT8, human colonic tumor cells. Reg. Peptides; 109; 115-125
- ⁴⁴ JC. Marie, C. Rouyer-Fessard, A. Couvineau, P. Nicole, H. Devaud, J. El Benna and M. Laburthe 2003: Serine 447 in the carboxyl tail of human VPAC1 receptor is crucial for agonist-induced desensitization but not internalization of the Receptor. Mol. Pharmacol.; 64; 1565-1574
- ⁴⁵ B. Madsen, B. Georg, MW. Madsen and J. Fahrenkrug 2000: Downregulation of VPAC1R expression in breast cancer cell lines. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 921; 33-36
- ⁴⁶ EP. Krenning, WH. Bakker, WA. Breeman, et al. 1989: Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of Somatostatin. Lancet; 1; 242-244

⁴⁷ EP. Krenning, DJ. Kwekkeboom, R. Valkema, S. Pauwels, LK. Kvolts and M. De Jong 2004: Peptide receptor radionuclide therapy. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 1014; 234-245

⁴⁸ M. Raderer, A. Kurtaran, M. Leimer, P. Angelberger, B. Niederle, H. Vierhapper, F. Vorbeck, MHL. Hejna, W. Scheithauer, J. Pidlich and I. Virgolini 2000: Value of peptide receptor scintigraphie using ¹²³I-Vasoactive Intestinal Peptide and ¹¹¹In-DTPA-D-Phe-Octreotide in 194 Carcinoid patients: Vienna University Experience, 1993 to 1998. J. Clin. Oncology; 18; 1331-1336

⁴⁹ TW. Moody, J. Leyton, D. Chan, DC. Brenneman, M. Fridkin, E. Gelber, A. Levy and I. Gozes 2001: VIP receptor antagonists and chemotherapeutic drugs inhibit the growth of breast cancer cells. Breast cancer Research and Treatment; 68; 55-64

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anna Ortner

Familienstand: ledig

Wohnort: Rennweg 68/21, 1030 Wien

Geburtsdatum: 19.06.1979

Ausbildung:

1985-1989 Volksschule Judendorf in Villach

1989-1995 BG und BRG Peral in Villach

1995-1997 BG und BRG St. Martin in Villach

1997-1998 Studium der Pharmazie an der Karl-Franzens-Universität Graz

Seit 1998 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

04.2005-10.2005 praktische Arbeiten zur vorliegenden Diplomarbeit am
Institut für Krebsforschung, Medizinische Universität Wien

Praktika und berufliche Tätigkeiten:

07.2000-08.2004 Freie wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Medizinische/Pharmazeutische Chemie

WS2000/01 und WS 2001/02 Tutoriumsauftrag am Institut für
Pharmakognosie

02.2001-04.2001 und 08.2001-10.2001 Praktikum Qualitätskontrolle Chroma
Pharma GmbH

Seit 01.2005 Regulatory Affairs S.Med GmbH