



## Production and preliminary characteristics of polyclonal antibodies specific to SSTR2A and SSTR5 receptors in pituitary

Zbigniew Bartoszewicz<sup>\*\*</sup>, Anna Baran<sup>\*</sup>, Anna M. Makowska<sup>\*</sup>, Ewa Matyja<sup>\*\*</sup>, Ewa Bar-Andziak<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of Internal Diseases and Endocrinology, Medical University of Warsaw

<sup>\*\*</sup>Department of Endocrinology; <sup>\*\*</sup>Department of Neuropathology, M. Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

### Summary

The increasing interest in somatostatin receptors (SSTR) is mainly due to their involvement in the regulation of hormone secretion and the role in somatostatin analogue treatment of patients with pituitary adenomas. The efficiency of this treatment is highly dependent on receptor expression in tissue which on the protein level requires specific anti-receptor antibodies for testing.

In this paper we introduced the principles for the production of several polyclonal antibodies specific for C-terminal intracellular part or N-terminal extracellular part of SSTR2A and SSTR5 receptors. The antibodies were highly specific for peptides used for immunization

of animals, had low cross-reaction activities for other SSTR2A and SSTR5 peptides and reacted with receptors on immunoblots and in immunohistochemistry.

The final verification of the antibodies' specificity would allow us to perform the research concerning the structure and posttranslational modifications of SSTR and avoid dependency of commercial sources.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 1(56): 7-13)

**Key words:** somatostatin receptors, polyclonal antibodies, Western blotting, immunohistochemistry

## Otrzymywanie oraz wstępna charakterystyka poliklonalnych przeciwciał swoistych dla receptorów SSTR2A i SSTR5 przysadki

Zbigniew Bartoszewicz<sup>\*\*</sup>, Anna Baran<sup>\*</sup>, Anna M. Makowska<sup>\*</sup>, Ewa Matyja<sup>\*\*</sup>, Ewa Bar-Andziak<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Akademii Medycznej w Warszawie,

<sup>\*\*</sup>Zakład Endokrynologii; <sup>\*\*</sup>Zakład Neuropatologii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

### Streszczenie

Wzrastające zainteresowanie receptorami somatostatyny (SSTR) wynika przede wszystkim z ich udziału w regulacji sekrecji hormonów oraz roli, jaką odgrywają w leczeniu analogami somatostatyny pacjentów z guzami przysadki. Skuteczność takiego leczenia uzależniona jest między innymi od ekspresji na poziomie białkowym danego receptora w tkance, do określenia której konieczne są swoiste przeciwciała.

W niniejszej pracy przedstawiliśmy założenia konieczne do otrzymywania oraz wstępną charakterystykę szeregu poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko części wewnętrzkomórkowej C-końca oraz zewnętrzkomórkowej N-końca receptorów SSTR-2A i SSTR-5.

Przeciwciała te wykazywały wysoką swoistość w stosunku do peptydów użytych do immunizacji zwierząt, niskie wiązanie krzyżowe z innymi peptydami sekwenjii aminokwasowej receptorów oraz reagowały z receptorami SSTR2A i SSTR5 w immunoblotingu i immunohistochemii.

Pozytywna weryfikacja specyficzności otrzymanych przeciwciał pozwoliłaby na zwiększenie możliwości badawczych dotyczących struktury i posttranslacyjnych modyfikacji SSTR oraz częściowe uniezależnienie od rynku komercyjnego.

(*Endokrynol Pol* 2005; 1(56): 7-13)

**Słowa kluczowe:** receptory somatostatyny, przeciwciała poliklonalne, immunobloting, immunohistochemia



Dr Zbigniew Bartoszewicz  
Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii  
Akademii Medycznej w Warszawie,  
ul. Banacha 1A  
02-097 Warszawa

Praca finansowana ze środków grantu KBN nr 6 P05B 05720

## Wprowadzenie

Stosowanie analogów somatostatyny w leczeniu chorób przysadki wymaga szczegółowej wiedzy dotyczącej grupy funkcjonalnych białek wiążących, zwanych receptorami somatostatyny (SSTR). Dotychczas sklonowano i scharakteryzowano pięć podtypów SSTR (SSTR1 – SSTR5), różniących się pod względem lokalizacji chromosomalnej, wielkości mRNA oraz długości łańcucha polipeptydowego [1, 2]. Od ich budowy, ekspresji i usytuowania w błonie komórkowej zależy łatwość tworzenia oraz rodzaj wiązania z analogami somatostatyny, a w konsekwencji uzyskany efekt terapeutyczny. Jakkolwiek struktura i geny kodujące SSTR zostały opisane [3], to kwestie modyfikacji posttranslacyjnych oraz wpływu analogów na desensytyzację oraz internalizację receptorów pozostają nadal otwarte [1].

Zarówno w wydzielających, jak i nieczynnych hormonalnie guzach przysadki wykryto obecność receptorów somatostatyny, głównie SSTR2A i SSTR5 [4, 5]. Wydaje się, że efekt terapeutyczny występujący po podaniu analogów somatostatyny jest związany z obecnością właśnie tych rodzajów receptorów w tkance guza, gdyż dotychczas wprowadzone do leczenia analogi działają głównie na SSTR2A i SSTR5 [6].

Od kilku lat dostępne są komercyjne przeciwciała reagujące z epitopami sekwencji aminokwasowej C-końca SSTR2A i SSTR5, jednak wysoka cena ogranicza możliwości ich zastosowania przede wszystkim do diagnostyki immunohistochemicznej. Opracowanie biochemicznych metod izolacji SSTR, badania ich ekspresji, struktury oraz modyfikacji posttranslacyjnych wymagają dużych ilości oczyszczonych frakcji swoistych przeciwciał.

Za szczególnie przydatne należy uznać przeciwciała różnicujące poszczególne fragmenty cząsteczki receptora.

**Celem pracy** było otrzymanie swoistych dla SSTR2A i SSTR5, poliklonalnych przeciwciał wiążących się z cytoplazmatyczną (koniec C) lub zewnątrzkomórkową (koniec N) częścią receptora.

## Materiał i metodyka

### Immunizacja

Do immunizacji królików rasy New Zeland zastosowano wybrane peptydy o sekwencji odpowiadającej fragmentom łańcucha polipeptydowego ludzkich receptorów somatostatyny SSTR2A i SSTR5 od strony końca aminowego (N) oraz karboksylowego (C) (tab. I). Skład aminokwasów tworzących poszczególne peptydy stanowił o ich obojętnym ładunku chemicznym oraz sile jonowej, zapewniając dobrą rozpuszczalność w buforach wodnych. Zsyntetyzowane w firmie Mimotopes (Francja) peptydy posiadały dodatkowy aminokwas – cysteinę na N- lub C- końcu, wykorzystywany do przyłączenia, poprzez dwufunkcyjny łącznik (sulfo MBS lub sulfo-SMCC, Sigma, USA), białka nośnikowego hemocyaniny skałoczepa (KLH) [7]. Króliki immunizowano w oparciu o procedurę opracowaną dla otrzymywania przeciwciał glikobiałka związanego z mieliną (MAG) w National Institute of Neurological Disorders and Stroke (Bethesda, USA) (nr protokołu #94-032). Weryfikację specyficzności otrzymanych przeciwciał przeprowadzono w oparciu o następujące metody: ELISA, immunoprecypitacja, immunobloting oraz immunohistochemia.

**Tabela I.**  
Charakterystyka peptydów użytych do immunizacji królików.

Peptyd	Receptor	Królik	Kolejność aminokwasów	Sekwencja*	Sumaryczny ładunek
9.1	SSTR2A-N	Rb 66 Rb67	32-42	H-NQTEPYDYLTSC - NH <sub>2</sub>	-2
9.5	SSTR2A-C	Rb 74 Rb 77	337-352	H-CDGERSDSKQDKSRLNE-OH	-1
9.3	SSTR5 – N	Rb 68 Rb 69	27-37	H-RTLVPAPSAGC - NH <sub>2</sub>	+1
9.4	SSTR5 – C	Rb 70 Rb 76	322-334	H-CRKGSGAKDADATE-OH	-1
7.4	SSTR2A-N	Rb36	10-21	H-GSHTWLSIPFDLC- NH <sub>2</sub>	-1

\* Sekwencja na podstawie pozycji piśmiennictwa nr 3.

**Table I.**  
The characteristics of peptides used for immunizing subsequent rabbits.

Peptide	Receptor	Rabbit	Amino acid sequence*		Charge
9.1	SSTR2A-N	Rb 66 Rb67	32-42	H-NQTEPYDYLTSC - NH <sub>2</sub>	-2
9.5	SSTR2A-C	Rb 74 Rb 77	337-352	H-CDGERSDSKQDKSRLNE-OH	-1
9.3	SSTR5 – N	Rb 68 Rb 69	27-37	H-RTLVPAPSAGC - NH <sub>2</sub>	+1
9.4	SSTR5 – C	Rb 70 Rb 76	322-334	H-CRKGSGAKDADATE-OH	-1
7.4	SSTR2A-N	Rb36	10-21	H-GSHTWLSIPFDLC- NH <sub>2</sub>	-1

\* amino acid sequences were determined with reference number 3

### ELISA

Poszczególne peptydy opłaszczono w stężeniu 10 µg/ml na płaskodennych płytkach (Costar, USA), a następnie inkubowano z otrzymanymi surowicami w rozcieńczeniach w zakresie 1 : 100 – 1 : 51 200 według standardowej procedury [8]. Jako kontrole negatywne zastosowano (i) inkubację z surowicą uzyskaną od królików przed rozpoczęciem immunizacji (Rb-0) oraz (ii) pominięcie w procedurze inkubacji z surowicami otrzymanymi po ostatniej immunizacji (Rb-L)

Nieswoiste reakcje krzyżowe testowano inkubując uzyskane surowice (1:2000, 0,1%BSA) z opłaszczonymi na płytkach ELISA peptydami (10 µg/ml), innymi niż peptyd użyty do danej immunizacji. W celu weryfikacji swoistości przeciwciał właściwą inkubację z peptydami opłaszczonymi na płytkach ELISA poprzedzono preinkubacją surowic (1:1000, 0,1% BSA) z odpowiadającymi im peptydami (20µg/ml) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

Wszystkie przedstawione wartości absorbancji ( $\lambda = 450$  nm) stanowią średnie z dwóch niezależnych eksperymentów. Pomiarów dokonano przy użyciu czytnika Stat Fax 2100 (Awareness Technology, USA).

### Immunoprecypitacja i immunobloting

Materiał stanowiły białka frakcji upłynnionych błon plazmatycznych ludzkich przysadek [9], które inkubowano (1 godzina, temperatura +4°C) z surowicami immunizowanych królików w buforze PBS zawierającym 0,25% SDS, 0,25 % Triton X-100 oraz mieszaninę inhibitorów proteaz Complete (Roche, Niemcy).

Następnie dodawano proteinę A-agarozę (Sigma, USA) zawieszoną w buforze PBS i delikatnie mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu białka związane z proteiną A lub homogenaty błonowe przysadek gotowano (10min) w buforze LDS (Invitrogen, USA), rozwijano w elektroforezie na 4-12% gradientowych żelach BisTris (Invitrogen, USA) i przenoszono na membranę nitrocelulozową (Invitrogen, USA). Nitrocelulozę inkubowano przez 1 godzinę w 5% roztworze mleka odtłuszczonego (Bio-Rad, USA), a następnie z otrzymanymi przeciwciałami (1:500, 1% mleko, przez noc, +4°C). Kolejny etap stanowiła inkubacja (1h, temperatura pokojowa) z króliczą immunoglobuliną IgG znakowaną peroksydazą (Cappel, USA). Związane z nitrocelulozą białka wybarwiano przy użyciu odczynnika CN/DAB (Pierce, USA) lub zestawu ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Do oszacowania ciężarów cząsteczkowych białek używano barwnych standardów SeeBlue Plus2 (Invitrogen, USA).

### Immunohistochemia

Do badań immunohistochemicznych wykorzystywano utrwalone w parafinie skrawki tkankowe

pochodzące z guzów przysadki wydzielających hormon wzrostu, uzyskane w trakcie operacji neurochirurgicznych pacjentów chorych na akromegalię. Skrawki odparafinowano i uwodniono, a następnie zablokowano aktywność endogennej peroksydazy (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 min, +4°C) oraz wiązania niespecyficzne (5% BSA, 20min, +4°C). Inkubację z przeciwciałami Rb 70-L i Rb74-L (1:1000, 3% BSA) prowadzono przez noc w temp +4°C. Następnie skrawki inkubowano z biotynylowanym przeciwciałem przeciwko króliczym IgG oraz koniugatem awidyny z peroksydazą (zestaw ExtrAvidin, Sigma, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Preparaty wybarwiano diaminobenzzydynam (DAB, zestaw dwuskładnikowy, Sigma, USA).

Kontrolę negatywną stanowiły wybarwione preparaty, dla których w procedurze immunohistochemicznej (i) pominięto inkubację z pierwszym przeciwciałem lub (ii) zastosowano preinkubację surowic z peptydem użytym do immunizacji (100 µg/ml przez noc, temp +4°C) przed właściwą inkubacją. Za kontrolę pozytywną uznano reakcję badanych skrawków z komercyjnymi przeciwciałami rozpoznającym SSTR2A i SSTR5 (odpowiednio SS 800 i SS890, Biotrend, USA).

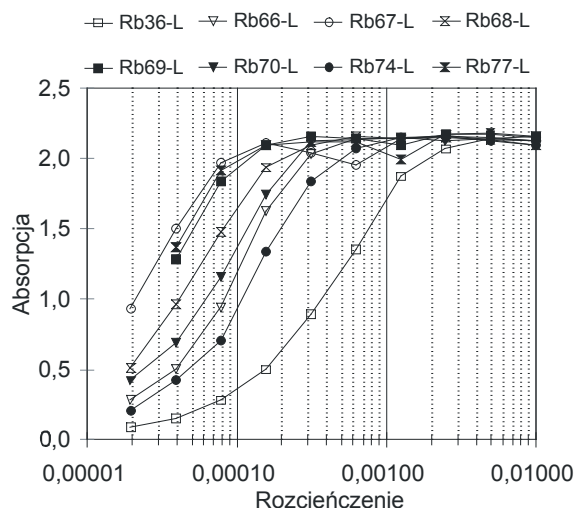
Protokoły otrzymywania przeciwciał oraz użycia tkanek ludzkich uzyskały akceptację Pierwszej Lokalnej Komisji Etycznej Instytutu Biologii Doświadczalnej oraz Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Warszawie.

### Wyniki

Powinowactwo otrzymanych przeciwciał względem peptydów użytych do immunizacji badano na płytkach ELISA. Krzywe rozcieńczeń (ryc. 1) wykazały zależność pomiędzy stężeniem surowicy a intensywnością reakcji barwnej. Wartości absorpcji (rozcieńczenia 1:100 – 1:25600) uzyskane dla wszystkich surowic poza Rb36-L przewyższały wartości otrzymane dla surowicy kontrolnej (Rb-0) lub z pominięciem surowicy badanej (ryc. 1).

Swoistość otrzymanych przeciwciał względem peptydów użytych do immunizacji testowano, preinkubując surowice z odpowiednimi peptydami. Preinkubacja powodowała zablokowanie aktywności przeciwciał i w efekcie negatywne wyniki reakcji immunoenzymatycznej (ryc. 2). Niskie reakcje krzyżowe, wyrażone absorpcją reakcji barwnej, otrzymanych przeciwciał z peptydami innymi niż użyte do immunizacji przedstawiono na ryc. 3. Wartości absorpcji były porównywalne z otrzymanymi dla surowicy kontrolnej (Rb76-0), preinkubowanej z peptydem 9.4 oraz niższe od wartości absorpcji po preinkubacji komercyjnych przeciwciał SS800 i SS890 z peptydami 9.4 i 9.5 (ryc. 3).

Analiza immunoreaktywności upłynnionych białek gruczolaka przysadki z przeciwciałem Rb74-L wykazała w Western blotingu główny prążek

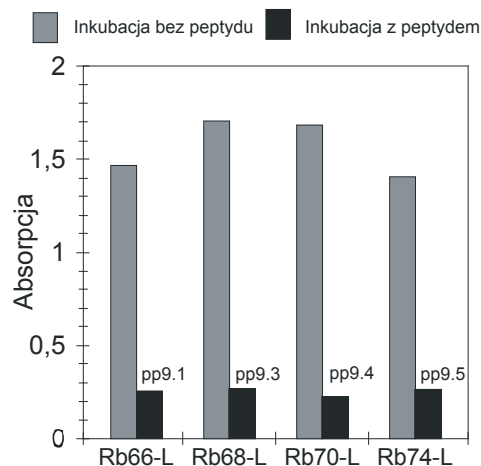


**Rycina 1.**

Wpływ stężenia otrzymanych przeciwciał na reakcję z peptydami użytymi do immunizacji (ELISA).

**Figure 1**

The influence of antibody concentration on peptide binding (ELISA).

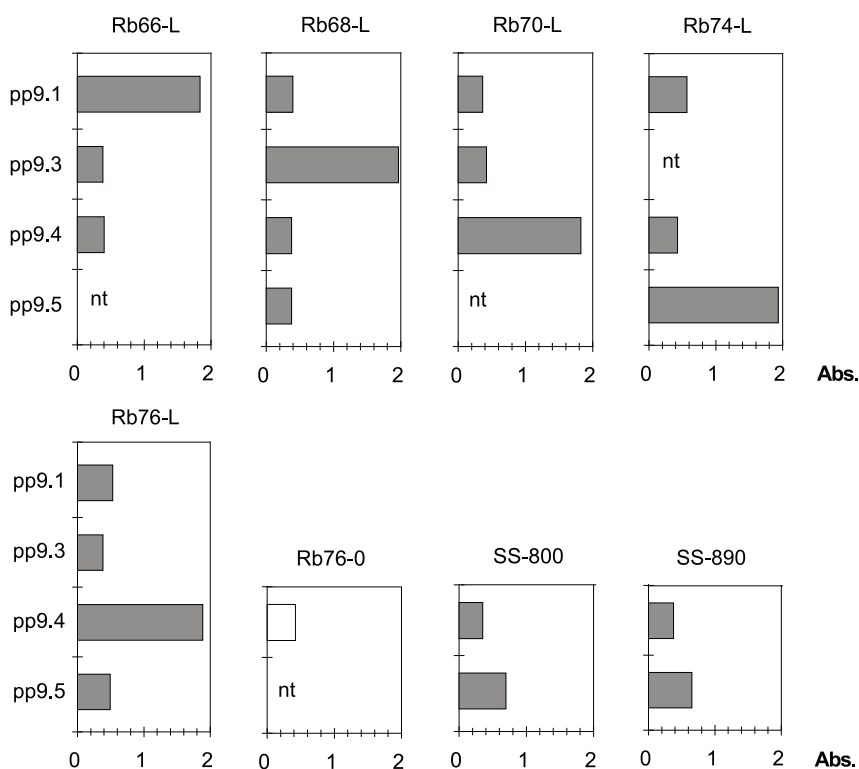


**Rycina 2**

Wpływ preinkubacji przeciwciał z peptydami na wynik testu ELISA.

**Figure 2.**

The effect of antibody - peptide preincubation on ELISA results.



**Rycina 3**

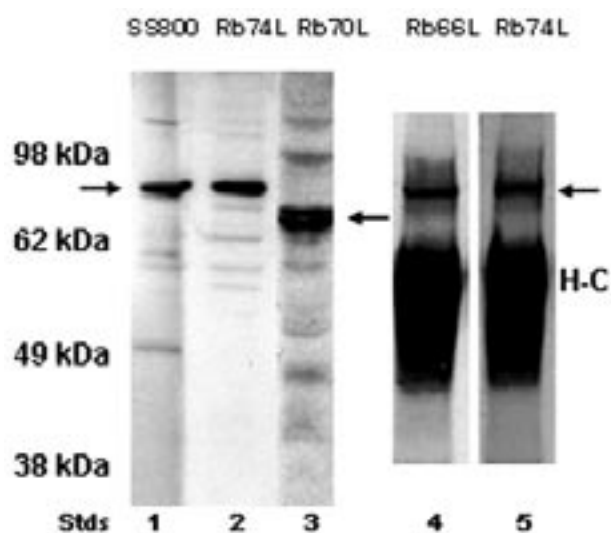
Reakcje krzyżowe przeciwciał z peptydami (ELISA).  
nt – nie testowano

**Figure 3.**

Cross-reactions between subsequent antibodies and peptides (ELISA).  
nt – non tested

o ciężarze cząsteczkowym rzędu 80 kDa (ryc. 4, linie 1 i 2), odpowiadający prążkowi SSTR2A po reakcji z komercyjnym przeciwciałem SS800. Analogiczny ciężar cząsteczkowy miały prążki pochodzące z immunoprecypitatu białek gruczolaka przysadki z przeciwciałami Rb66-L i Rb74-L skierowanymi przeciwko SSTR2A (ryc. 4, linie 4 i 5). Szeroki prążek rzędu 70 kDa po immunoreakcji z przeciwciałem RB70-L odpowiada receptorowi SSTR5 (ryc. 4, linia 3)

Zastosowanie otrzymanych przeciwciał (Rb70-L i Rb 74-L) do barwienia immunohistochemicznego preparatu gruczolaka przysadki wykazało dodatnią reakcję, porównywalną z wynikiem uzyskanym przy zastosowaniu przeciwciał dostępnych na rynku komercyjnym (SS 800 oraz SS 890) (ryc. 5). Zarówno pominięcie w procedurze pierwszego przeciwciała, jak i preinkubacja z peptydem immunizującym dały ujemne wyniki reakcji immunohistochemicznej.

**Rycina 4.**

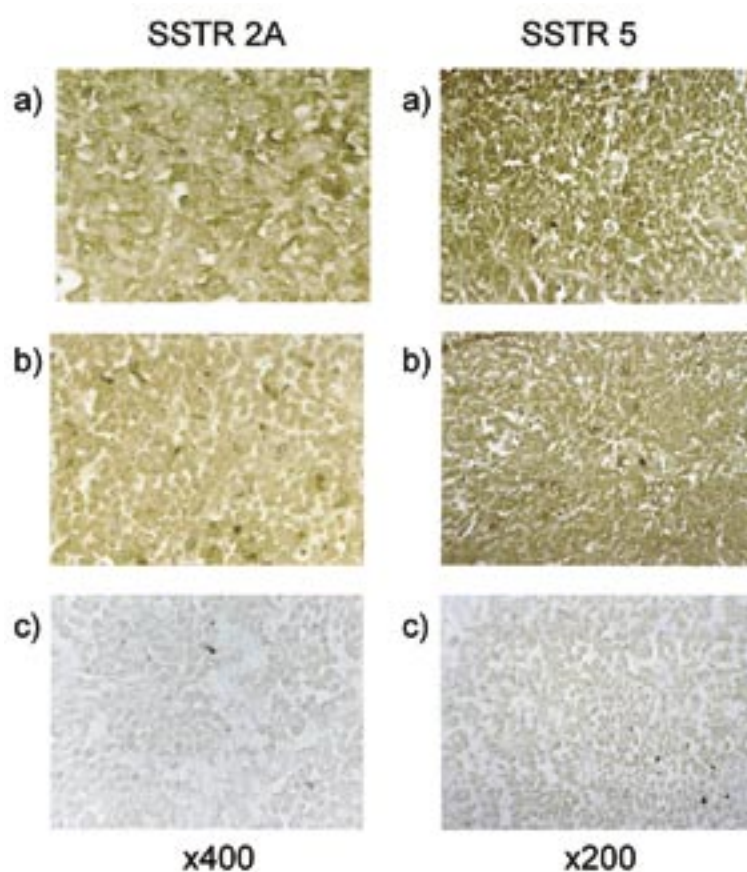
Immunobloting białek gruczolaka przysadki z przeciwciałami skierowanymi przeciw SSTR2A i SSTR5.

Materiał stanowiły białka błonowe gruczolaka przysadki (100 µg, rymienki: 1-3) rozwinięte na żelu i przeniesione na nitrocelulozę a następnie inkubowane z przeciwciałami rozpoznającymi SSTR2A (Rb77-L i SS800) lub SSTR5 (Rb70-L). Immunoprecypitacja: Białka błonowe gruczolaka przysadki (około 200 µg) inkubowano z przeciwciałami Rb66-L lub Rb74-L. Immunoprecypitat nakładano na rymienki 4 i 5 żelu, przenoszono na nitrocelulozę, którą inkubowano z tymi samymi przeciwciałami Rb66-L lub Rb74-L. Strzałkami zaznaczono białka odpowiadające ciężarom cząsteczkowym odpowiednio receptorów SSTR2A i SSTR5. Stds – wzorce ciężarów cząsteczkowych znakowanych białek, H-C położenie łańcuchów ciężkich przeciwciał.

**Figure 4.**

Western blot of pituitary adenoma proteins immunostained with antibodies specific to SSTR2A or SSTR5.

1, 2, 3 - pituitary samples contained 100 µg protein; 4, 5 - SSTR receptors immunoprecipitated with Rb66-L or Rb74-L from 200 µg of pituitary proteins. Arrows indicated the molecular weight of SSTR2a and SSTR5 receptors; stds - prestained molecular weight standards, H-C molecular weight of heavy chains of antibody

**Rycina 5**

Immunohistochemiczna identyfikacja receptorów SSTR2A i SSTR5 w gruczolaku przysadki za pomocą przeciwciał: (a) Rb 70-L i Rb74-L, (b) SS800 i SS890 oraz (c) kontrola ujemna – pominięcie pierwszego przeciwciała, powiększenie 200x/400x.

**Figure 5**

Immunohistochemical detection of SSTR 2A and SSTR5 in pituitary adenoma performed with: (a) Rb 70-L and Rb 74-L, (b) SS 800 and SS 890 and (c) negative control – omitting the first antibody, magnification 200x/400x.

## Dyskusja

W literaturze istnieją doniesienia o otrzymywaniu przeciwciał swoistych dla receptorów somatostatyny [10, 11]. Część z nich jest dostępna komercyjnie, jakkolwiek są one w warunkach polskich trudne do pozyskania, szczególnie w ilościach wykraczają-

cych poza użycie w immunohistochemii. Dlatego opracowaliśmy schemat otrzymywania poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko SSTR2A i SSTR5 – dwóm receptorom, które wymieniane są jako najczęściej reagujące z analogami somatostatyny w leczeniu guzów przysadki [6]. Wybór peptydów z końca N i C sekwencji aminokwasowej

receptorów pozwalał na otrzymanie przeciwciał różnicujących cząsteczkę receptora pod względem jej usytuowania w błonie plazmatycznej komórki. Otrzymane przeciwciała reagowały z opłaszczonymi na płytkach ELISA peptydami użytymi do immunizacji zwierząt w rozcieńczeniach przekraczających  $2 \times 10^{-4}$ , co wskazuje na ich wysokie stężenia w surowicach oraz wysokie powinowactwo do badanych peptydów. Niskie i porównywalne z przeciwciałami komercyjnymi SS800 i SS890 reakcje krzyżowe z peptydami innymi niż te użyte do immunizacji stanowiły o swoistości otrzymanych przeciwciał.

Wyniki dotychczasowych badań jednoznacznie określiły lokalizację chromosomalną receptorów somatostatyny oraz sekwencję aminokwasową białek receptorowych [3]. Kwestią dyskusyjną pozostają nadal ich zmienne ciężary cząsteczkowe. W zależności od rodzaju badanej tkanki wahają się one w przypadku SSTR2A od 60 do 85 kDa [11, 12] oraz od 55 do 115 kDa dla SSTR5 [13]. Zmienność ta tłumaczona jest modyfikacjami posttranslacyjnymi, którym mogą podlegać białka receptorowe - przede wszystkim procesami glikozylacji i dimeryzacji, [11, 13]. W niniejszej pracy metodą immunoblotingu otrzymano prążki odpowiadające zakresowi ciężarów cząsteczkowych SSTR2A i SSTR5 podawanych w literaturze.

Zdaniem autorów, otrzymane osobne przeciwciała rozpoznające koniec C i koniec N są nowym, potencjalnym narzędziem, służącym do badań nad strukturą SSTR, przede wszystkim ułatwiającym badania nad funkcjonalną rolą obu części receptora oraz lokalizacją modyfikacji posttranslacyjnych, jako że w tym zakresie biologia molekularna może okazać się techniką nie zawsze wystarczającą i miarodajną. Prezentowane wyniki immunohistochemii wskazują, że otrzymane przeciwciała rozpoznają SSTR w tkance gruczolaka analogicznie do przeciwciał komercyjnych (Biotrend). Stwarza to warunki do częściowego uniezależnienia się od rynku komercyjnego i zmianę statusu diagnostyki immunohistochemicznej w zakresie SSTR z formy jedynie eksperymentalnej na rutynową.

Konieczna jest dalsza charakterystyka otrzymanych przeciwciał w celu określenia ich przydatności i swoistości, szczególnie z użyciem frakcjonowanego materiału tkankowego o zwiększonym stężeniu receptorów oraz komórek transfekowanych genami dla SSTR2A i SSTR5.

4. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 836-846.
5. Pawlikowski M, Pisarek H, Kunert-Radek J, Radek A. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes in "clinically nonfunctioning" pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2003; 14: 231-238.
6. Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy. *Front Horm Res* 2004; 32: 235-252.
7. Immunizations. In: Harlow E, Lane D. *Antibodies - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988: 53-139.
8. Crowther J. *ELISA, Theory and Practise*. Humana Press, 1995.
9. Harrison LC, Itin A. Purification of the insulin receptor from human placenta by chromatography on immobilized wheat germ lectin and receptor antibody. *J Biol Chem* 1980; 255: 12066-12072.
10. Patel YC, Panetta R, Escher E, et al. Expression of multiple somatostatin receptor genes in AtT-20 cells. Evidence for a novel somatostatin-28 selective receptor subtype. *J Biol Chem* 1994; 269: 1506-1509.
11. Dournaud P, Gu YZ, Schonbrunn A, Mazella J, et al. Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J Neurosci* 1996; 16: 4468-4478.
12. Hofland LJ, Liu Q, van Koetsveld PM, et al. Immunohistochemical Detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 in human somatostatin receptor positive tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 775-780.
13. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, et al. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 2000; 275: 7862-7869.

## Piśmiennictwo

1. Schonbrunn A. Somatostatin receptors present knowledge and future directions. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 2: S17-21.
2. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 157-198.
3. Reisine T, Bell GI. Molecular Biology of Somatostatin Receptors. *Endocr Rev* 1995; 16: 427-442.