

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe  
Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie  
Leiter: Prof. Dr. G. Aumüller

# **Lokalisation und Gen - Expressionsregulation der neutralen Endopeptidase in der humanen Prostata**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanbiologie  
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von

**Jian Song**

aus Huhhot

VR China

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am 03. 02. 2004. Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Professor Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. G. Aumüller

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Garten

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2.1	Gliederung der menschlichen Prostata.....	5
2.2	Pathologische Veränderungen der Prostata im Alter .....	7
2.3	Sekretion und Funktionen von Neuropeptiden .....	8
2.4	Zellkultursysteme als in vitro Modelle der Prostata .....	9
2.5	Neutrale Endopeptidase .....	10
2.6	Regulation der Genexpression in Eukaryoten.....	12
2.6.1	Promotorstrukturen .....	12
2.6.2	Transkriptionsfaktoren.....	13
2.6.3	NF-Y und Die Familien der Sp-Transkriptionsfaktoren.....	15
2.7	Struktur und Expression des NEP-Gens .....	17
2.8	Zielsetzungen der Arbeit.....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
	<b>I Material</b> .....	<b>20</b>
3.1	Geräte .....	20
3.2	Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien.....	20
3.2.1	Chemikalien .....	20
3.2.2	Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme .....	22
3.2.3	Bakterienkultur .....	22
3.2.4	Zellkultur.....	22
3.2.5	Radioaktive Verbindungen .....	23
3.2.6	Verbrauchsmaterialien .....	23
3.3	Bakterienstämme.....	23
3.4	Gewebe und Zelllinien .....	23
3.5	Oligonukleotide.....	24
3.6	Plasmide .....	24
3.7	Antikörper .....	25
3.8	Puffer und Lösungen.....	26
	<b>II Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.9	Zellkulturmethoden.....	28
3.9.1	Kultivierung von Zellen.....	28

3.9.2	Zellzahlbestimmung, Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	29
3.10	Morphologische Methoden .....	29
3.10.1	Objektträgerbeschichtung .....	29
3.10.2	Paraffineinbettung von Geweben (Romeis, 1989).....	30
3.10.3	Zellen für die Immunhistochemie und In Situ RT-PCR .....	30
3.11	Immunhistochemische Methoden .....	30
3.11.1	Indirekte Immunfluoreszenz .....	31
3.11.2	Doppelfluoreszenz-Markierung .....	31
3.11.3	Fluoreszenz-Kernfärbung .....	31
3.12	Molekularbiologische Methoden .....	32
3.12.1	In Situ RT-PCR.....	32
3.12.2	Isolierung von DNA.....	34
3.12.3	Präparation von RNA.....	34
3.12.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	35
3.12.5	Herstellung von Zellysat .....	35
3.12.6	Quantifizierung von Proteinen.....	35
3.12.7	PCR und RT-PCR.....	35
3.12.8	Gelelektrophorese .....	37
	3.12.8.1 DNA-Agarosegele .....	37
	3.12.8.2 Polyacrylamidgele .....	37
	3.12.8.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen .....	38
3.12.9	Northern blot-Analyse .....	39
	3.12.9.1 Formaldehyd-Agarosegel .....	39
	3.12.9.2 Transfer der RNA auf Nylonmembranen .....	39
	3.12.9.3 Northern Hybridisierung .....	40
3.12.10	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren .....	41
	3.12.10.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	41
	3.12.10.2 Ligation von DNA in Plasmidvektoren .....	41
	3.12.10.3 Ligation und Klonierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kits“ .....	42
	3.12.10.4 PCR-vermittelte in vitro-Mutagenese .....	43
	3.12.10.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	44
	3.12.10.6 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	44
	3.12.10.7 Analytische Lysate .....	44

3.12.11	Präparation von Plasmid-DNA .....	45
3.12.12	Transiente Transfektion .....	45
3.12.12.1	<i>Calcium-Phosphat-Methode</i> .....	45
3.12.12.2	<i>Bestimmung der Luciferase-Aktivität</i> .....	46
3.12.12.3	<i>Bestimmung der <math>\beta</math>-Galaktosidase-Aktivität</i> .....	46
3.12.13	Herstellung von Kernextrakten .....	47
3.12.14	DNase I Footprint .....	47
3.12.14.1	<i>Endmarkierung</i> .....	48
3.12.14.2	<i>Sequenzierung, modifiziert nach Maxam-Gilbert</i> .....	49
3.12.14.3	<i>Bindungsreaktion und DNase I Verdau</i> .....	49
3.12.14.4	<i>Sequenziergelelektrophorese</i> .....	50
3.12.15	Gelretardations-Experimente (EMSA) .....	51
3.12.15.1	<i>Oligonukleotide</i> .....	51
3.12.15.2	<i>Bandshifts und Supershifts</i> .....	52
3.13	Immunologische Methoden .....	52
3.13.1	Western Blot-Analyse .....	52
3.14	Computerprogramme für Grafikbearbeitung, Biologische Analyse und Statistik .....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>54</b>
4.1	Lokalisation der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen und Prostatagewebe .....	54
4.1.1	Verteilung der NEP in der normalen adulten Prostata .....	54
4.1.2	Verteilung der NEP bei benigner Prostatahyperplasie (BPH) .....	54
4.1.3	Verteilung der neutralen Endopeptidase beim Prostatakarzinom .....	57
4.1.4	Immunhistochemischer Nachweis der neutralen Endopeptidase in epithelialen und stromalen Prostatazellen .....	57
4.2	Expression der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen und Prostatagewebe .....	60
4.2.1	Immunologischer Nachweis der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen mit dem Westernblot .....	60
4.2.2	Molekularbiologischer Nachweis der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen und Prostatagewebe .....	60
4.2.2.1	<i>RT-PCR mit Total-RNA aus LNCaP-Zellen und hPCPs-Zellen</i> .....	60

4.2.2.2	<i>In situ RT-PCR an Paraffinschnitten der humanen Prostata und an den Prostatazellen</i> .....	63
4.3	Effekt von Androgenen und Neuropeptiden auf die Synthese der neutralen Endopeptidase .....	66
4.3.1	Molekularbiologischer Nachweis der Androgen- und Neuropeptid-Wirkung auf die NEP-Expression in epithelialen und in stromalen Zellen .....	66
4.4	Regulation der NEP-Expression über Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen am NEP-Typ II Promotor in humanen Prostatazellen .....	68
4.4.1	Lokalisation cis-regulatorischer Elemente durch Deletionsanalysen ..	68
4.4.1.1	<i>Deletionsanalysen in der LNCaP-Zelllinie unter Androgen-Stimulation</i> .....	70
4.4.2	Charakterisierung regulatorischer Elemente durch DNA/Protein-Interaktionen .....	72
4.4.2.1	<i>DNase-Protektionsversuche</i> .....	73
4.4.2.2	<i>Gelretardations-Experimente (Bandshifts) und Gelretardations-Experimente mit polyklonalen Antikörpern (Supershifts)</i> .....	76
4.4.2.2.1	<i>Die Bindung von NF-Y an die reverse CCAAT-Box im NEP-Promotor</i> .....	76
4.4.2.2.2	<i>Die Bindung von SP Familie-Protein an die GC-Box im NEP-Promotor</i> .....	79
4.4.3	Funktion von NF-Y und Sp Faktoren im NEP Typ II -Promotor .....	82
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>84</b>
5.1	Expression und Lokalisation der NEP in der humanen Prostata .....	84
5.2	NEP-Expression und der Einfluß von Androgenen und Neuropeptiden auf die NEP-Genexpression in epithelialen und stromalen Prostatazelllinien....	87
5.3	Identifizierung regulatorischer Bereiche am NEP-Typ II Promotor durch Deletionsanalysen .....	88
5.4	Identifizierung regulatorischer Elemente am NEP-Typ II Promotor.....	89
5.5	NF-Y ist ein wichtigerer Transkriptionsfaktor für die basale Aktivität des NEP Typ II - Promotors .....	92
5.6	Androgen-Response des NEP-Gens .....	96
5.7	Wie funktioniert NEP in der Prostata?.....	101
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>108</b>

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>128</b>
9.1	Danksagung.....	128
9.2	Verzeichnis der Akademischen Lehrer .....	129
9.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	130

# 1 Abkürzungen

Aminosäuren (Ein- und Drei-Buchstaben Code)

A (Ala) Alanin	I (Ile) Isoleucin	R (Arg) Arginin
C (Cys) Cystein	K(Lys) Lysin	S (Ser) Serin
D (Asp) Asparaginsäure	L (Leu) Leucin	T (Thr) Threonin
E (Glu) Glutaminsäure	M (Met) Methionin	V (Val) Valin
F (Phe) Phenylalanin	N (Asn) Asparagin	W (Trp) Tryptophan
G (Gly) Glycin	P (Pro) Prolin	Y (Tyr) Tyrosin
H (His) Histidin	Q (Gln) Glutamin	

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATCC	Bezugsquelle für Zellen (American tissue culture collection)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosinmonophosphate)
CBF	Transkriptionsfaktor (CCAAT-binding factor)
cDNA	komplementäre DNS (complementary DNA)
C / EBP	Transkriptionsfaktor (Enhancer binding protein)
CMV	Cytomegalie Virus
cpm	Zählungen pro Minute (counts per minute)
d	Tage (days)

---

Da	Dalton
DAB	3', 3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Zellkulturmedium (Dulbecco's modified Eagles medium)
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat (N = A, T, G, C)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (acid)
Etbr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde (hour)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-Ethanol sulfonsäure)
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
lac Z	β-Galaktosidase-Gen
LB	Luria Bertani

---

Luc.	Luciferase
m	Meter
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min.	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MOPS	3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
N	beliebige Base (A, C, G, T bzw. U)
NF-Y	Transkriptionsfaktor (Nuclear Factor-Y)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
O.D.	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pm	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
Poly dI / dC	Poly-Desoxyinosin / Desoxycytosin

---

RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
Sp1	Transkriptionsfaktor (Specificity protein 1)
Sp3	Transkriptionsfaktor (Specificity protein 3)
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
U	Uracil
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
W	Watt
WT	Wildtyp

## **2 Einleitung**

Die Prostata ist trotz intensiver weltweiter Forschung in ihrer Physiologie und Pathologie ein bis heute weitgehend unverstandenes Organ. Die Drüse ist der Entstehungsort der häufigsten benignen und malignen Proliferationsprozesse beim Mann, der benignen Prostatahyperplasie (BPH) bzw. des Prostatakarzinoms. Betrachtet man allein die Zahl der diagnostizierten Prostatakarzinom-Fälle in den USA – 1996 waren es 317.000 (Gao et al., 1997) und das Prostatakarzinom stellt damit in den USA die zweithäufigste durch neoplastische Erkrankungen hervorgerufene Todesursache bei Männern über 55 Jahren (Carter & Coffey, 1990; Parker et al., 1997) dar – erklärt sich die Bedeutung der Prostataforschung.

### **2.1 Gliederung der menschlichen Prostata**

Die kastaniengroße Vorsteherdrüse (Prostata, gr. prostates = Vorsteher, Vordermann) gehört zu den androgenabhängigen, exokrinen, akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes und wiegt 15 bis 20 Gramm. Topographisch befindet sie sich oberhalb des Diaphragma urogenitale und umschließt den Blasenhalss sowie die Pars prostatica der Urethra. Das Drüsenparenchym der Prostata besteht aus 30 bis 50 tubuloalveolären Einzeldrüsen, die von fibromuskulärem Stroma umgeben sind und peripher von einer muskulären Kapsel umschlossen werden.

Das Epithel der Prostata ist zu komplexen Falten aufgeworfen und besteht aus 3 Arten von Epithelzellen: sekretorischen Oberflächenzellen, Basalzellen und neuroendokrinen Zellen. Sekretorische Zellen sind polare Zellen von 8-25 µm Höhe und 8-10 µm Breite, die sich jeweils in fünf funktionelle Zonen unterteilen lassen: einen basalen, einen nukleären, einen supranukleären, einen Golgi- und einen apikalen Bereich (Aumüller & Seitz, 1990). Die Basalzellen sind von flacher linsenförmige Gestalt mit etwa 9-11 µm Länge und 4-6 µm Bereit. Lokalisiert sind diese nicht polarisierten Zellen zwischen der Basalmembran und den Drüsenzellen. Die neuroendokrinen Zellen gehören in die Klasse der APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) - Zellen. Als APUD-Zellen werden endokrine Zellen bezeichnet, die Polypeptide mit hormoneller Wirkung und deren Vorstufen enthalten. Das Stroma enthält neben kollagenfasrigem und elastischem Gewebe viel glatte Muskulatur und Bindegewebszellen. (Abb. 2-1).

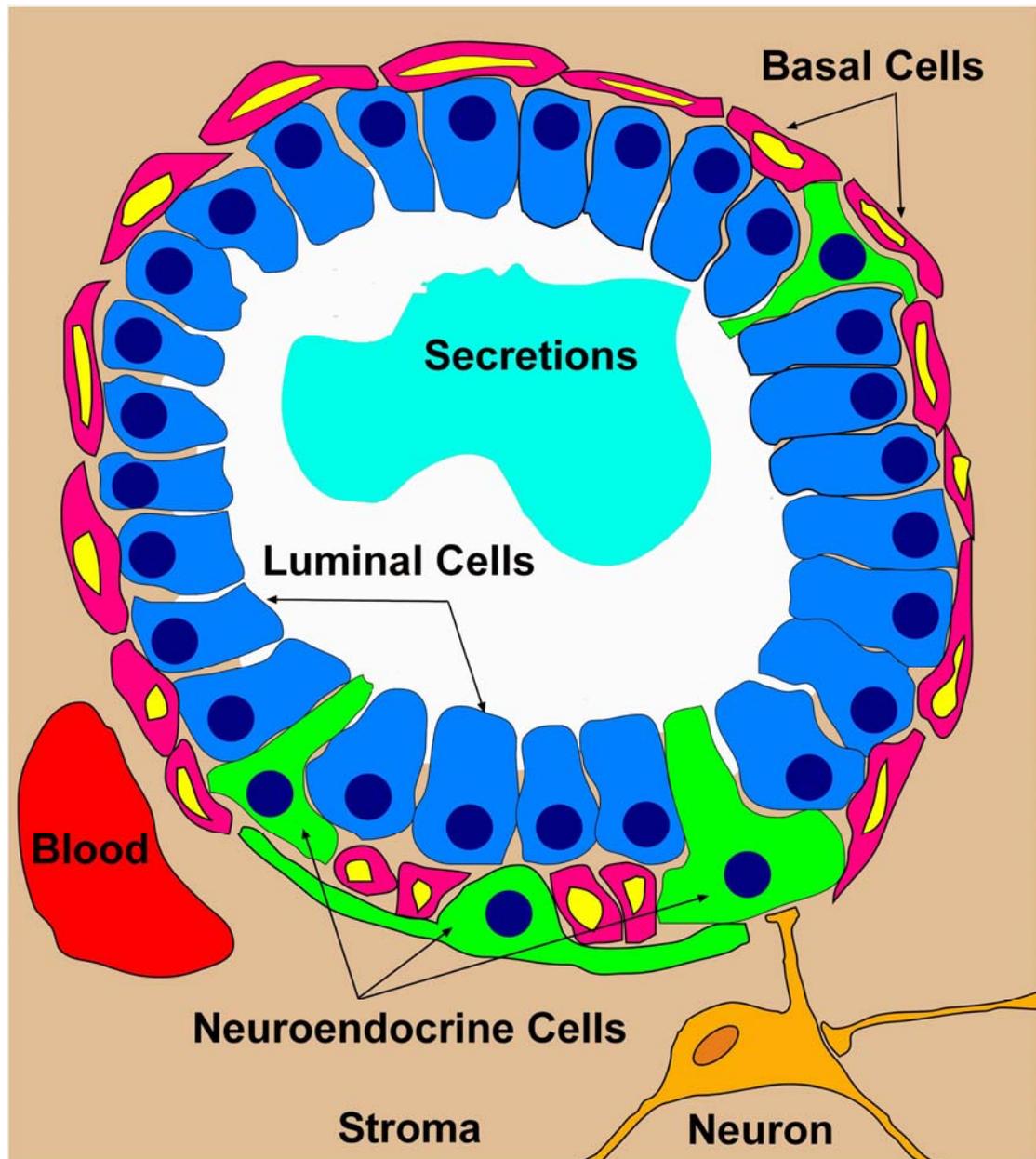


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der humanen Prostatazellen

Als exokrine, urethrale Drüse beeinflusst die Prostata zum einen die innere Oberfläche der Harnsamenröhre, zum anderen wirkt sie als akzessorische Geschlechtsdrüse. Ihr schwach saures Sekret wird bei der Ejakulation mit der Samenflüssigkeit vermischt und dient unter anderem der Regulation der Spermienmotilität (Aumüller & Seitz, 1990; Denmeade & Isaacs, 1997).

## 2.2 Pathologische Veränderungen der Prostata im Alter

Unter der BPH versteht man eine nicht-maligne, pathologische Vergrößerung der Prostata, die bei 70% der Männer über 70 Jahren zu diagnostizieren ist. Der BPH liegt eine vermehrte Proliferation von stromalen und epithelialen Anteilen zugrunde, vor allem in der sogenannten Transitions- oder Übergangszone der Drüse. Dieses Zellwachstum kann zu obstruktiven Beschwerden führen und durch Druck auf die Urethra Auswirkungen auf Harnflussrate und Harnrückstaubildung haben. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung ist bisher nur teilweise verstanden, als wichtige pathogenetische Faktoren werden Lebensalter, Ernährung, Androgen / Östrogen – Ungleichgewicht und Wachstumsfaktoren diskutiert (McNeal, 1978; Aumüller, 1994). Für einen hormonalen Einfluss spricht, dass durch Entfernung des Hodens oder der Hypophyse vor der Geschlechtsreife das Wachstum der Prostata verhindert wird, während die Gabe von Östradiol und Androstandiol sich positiv auf das Wachstum der Prostata auswirkt (Krause & Rothauge, 1981).

Anders stellt sich das Bild beim Prostatakarzinom dar. In 98% der Fälle entsteht das Prostatakarzinom aus den Drüsenzellen der sogenannten „Außenzone“ der Prostata und unterscheidet sich somit auch in Bezug auf die Lokalisation grundlegend von der BPH, welche im Inneren der Drüse ihren Ursprung hat. Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor in der Urologie und der häufigste Tumor bei Männern über 40 Jahren (Fair, 1992). Epidemiologische Studien deuten auf die weltweit ansteigende Inzidenz (Hussain, 1996) und einen Zusammenhang zwischen der Entstehung des Prostatakarzinoms und bestimmten Risikofaktoren hin. Dazu gehören neben genetischen und geographischen auch ethnische Faktoren. Die Inzidenz für das Prostatakarzinom ist am höchsten in der schwarzen amerikanischen Bevölkerung mit 229 Fällen pro 100.000 Personen (US Cancer Statistics: 1999 Incidence, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion) und am niedrigsten bei Chinesen mit 3.3 Fällen pro 100.000 Personen (Jin et al., 1999). Eine signifikante Korrelation zwischen Serumtestosteron-Konzentration und der Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu erkranken, konnte bislang nicht gezeigt werden (Buck, 1995). Momentan ist aber die Erfassung des invasiven Potentials und der Aggressivität des Tumors mit den bekannten Parametern nicht abschätzbar, und nur die frühzeitig erkannten Tumoren können kurativ behandelt werden. Für Organ-überschreitende, metastasierende Tumoren und Tumorrezidive ist die palliative

Therapie durch Androgenentzug die einzige Behandlungsmöglichkeit (Huggins et al., 1941). Trotz intensiver Untersuchungen zur Pathogenese des Prostatakarzinoms und neuer Therapieansätze wie der Blockade der Angiogenese und Induktion von Apoptose in Androgen-unabhängigen Prostatazellen konnte die Mortalitätsrate des Prostatakarzinoms in den vergangenen Jahren nicht signifikant gesenkt werden (Johansson et al., 1992; Denmeade & Isaacs, 1997).

### **2.3 Sekretion und Funktionen von Neuropeptiden**

In den meisten Drüsen besteht eine Innervation durch Neurone, in denen Neuropeptide vorhanden sind. Über deren Funktion in den männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen herrscht noch weitgehend Unklarheit, jedoch gibt es einige Studien über ihre Funktion in anderen Drüsen, z.B. den Speicheldrüsen. In den sechziger Jahren wurde herausgefunden, daß die Produktion und Sekretion von Speichel nicht nur über die klassischen Transmitter des Sympathikus (Noradrenalin) und des Parasympathikus (Acetylcholin) geregelt wird. So fanden Bertaccini und De Caro (Bertaccini & De Caro, 1965) heraus, daß Physalaemin die Speichelsekretion auslösen kann. Auch für Substance P konnte diese Wirkung kurze Zeit später nachgewiesen werden (Leeman & Hammerschlag, 1967; Lembeck & Starke, 1968). Diese Ergebnisse bezogen sich auf Tierversuche unter der Gabe von Substanzen, die die Wirkung von Acetylcholin (ACh) und Noradrenalin (NA) aufhoben. Später konnte auch gezeigt werden, daß eine Atropin-resistente Speichelsekretion unter Stimulation der parasympathischen Nerven bei Ratten (Thulin, 1976; Ekström et al., 1983) und Frettchen erfolgt (Ekström & Olgart, 1986). Etwa zeitgleich wurden verschiedene Neuropeptide in den Nerven der Speicheldrüsen entdeckt, z.B. Substance P (Hökfelt et al., 1977), VIP (Wharton et al., 1979; Uddman et al., 1980) und CGRP (Ekström et al., 1988).

Ekström (1987) fand in einem in vivo-Experiment an der Glandula parotis der Ratte heraus, daß es in der Abwesenheit von Atropin bei Reizung des parasympathischen Nerven zu einer nicht-adrenergen, nicht-cholineren (NANC) Transmitterfreisetzung kommt. Als Transmitter wurden Substance P (SP), VIP, CGRP und Substanz K (SK) beschrieben. Diese sind für die Sekretion von Amylase und auch für die wässrige Sekretion mitverantwortlich. Keines der genannten Peptide induziert alleine die atropinresistente parasympathische Sekretion. Die Wirkung der einzelnen Peptide war unterschiedlich: Substance P (SP) und Substance K (SK) waren für eine wässrige

Sekretion verantwortlich, während VIP eine kleine Menge eines amylasereichen Sekrets hervorrief. Es gibt also Hinweise auf den modulierenden und oder regulierenden Effekt der peptidergen Innervation auf die Sekretion von Speichel.

Im männlichen Genitaltrakt konnten ebenfalls Effekte von verschiedenen Neuropeptiden nachgewiesen werden: VIP inhibiert konzentrationsabhängig die Kontraktionen der glatten Muskulatur von Prostata, Blase, Urethra, und Ductus deferens (Larsen et al., 1981). Außerdem wird eine Funktion in der Regulation der Sekretion angenommen (Moss et al., 1987). Stickoxyd (NO) und die elektrische Stimulation von Nerven können eine durch Noradrenalin ausgelöste Kontraktion wieder relaxieren (Hedlund et al., 1997). Es existiert also wie auch bei VIP eine muskelrelaxierende Wirkung. Dagegen ist für NPY eine kontrahierende Wirkung auf die glatte Muskulatur bekannt (Yuri, 1990). Dieses könnte bei dem Transport von Sekreten in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen eine Rolle spielen und könnte auch eine Rolle als Antagonist zu VIP bei der Kontrolle des Muskeltonus spielen (Larsen et al., 1981; Polak & Bloom, 1984).

Bei der Behandlung von Geweben mit sensorischen Neurotoxinen zeigt sich, daß eine im Kontrollgewebe vorhandene Immunreaktivität von CGRP und SP nicht mehr nachzuweisen ist (Persson et al., 1997). Dieses könnte für die Funktion von CGRP als Transmitter in sensorischen Nervenfasern sprechen.

In verschiedenen Arbeiten konnten für einige Substanzen proliferationsfördernde Effekte nachgewiesen werden. Zu diesen Substanzen gehören Bombesin (Bologna et al., 1989), Calcitonin (Shah et al., 1994), Katalcalcin, CGRP und Serotonin (di Sant'Agnese & Cockett, 1996).

## **2.4 Zellkultursysteme als in vitro Modelle der Prostata**

Die Entwicklung geeigneter in vitro Zellkultursysteme der humanen Prostata konnte in den letzten zwei Jahrzehnten forciert werden, so daß zum heutigen Zeitpunkt sowohl epitheliale als auch stromale Kultursysteme zur Verfügung stehen. Diese in vitro Modelle bieten die Möglichkeit, die Entstehung der BPH und des Prostatakarzinoms sowie die damit einhergehenden zellulären und subzellulären Veränderungen zu untersuchen. Diese Systeme stellen ein entscheidendes Werkzeug für die Entwicklung neuer Ansätze in Diagnostik und Therapie von BPH und Prostatakarzinom dar. Eine der ersten etablierten immortalen Prostata-Zelllinien ist

die DU-145 Prostatakarzinom-Zelllinie (Stone et al., 1978). Diese epithelialen Zellen stammen aus dem Gewebe einer Hirnmetastase eines 69 Jahre alten Mannes. 1979 beschrieben Kaighn (Kaighn et al., 1979) die Isolierung und Charakterisierung der immortalen Zelllinie PC-3 aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen Prostatakarzinom-Patienten. Die LNCaP Zellen stellen die bislang einzige etablierte humane Androgen-abhängige Prostatakarzinom-Zelllinie dar. Sie stammen aus einer Lymphknotenmetastase und konnten von Horoszewicz (Horoszewicz et al., 1980) isoliert werden. Weitere weniger gebräuchliche Prostatakarzinom-Zelllinien sind: TSU-Pr1 (Iizumi et al., 1987), PPC-1 (Brothman et al., 1989) sowie DUPro-1 (Gingrich et al., 1991). In neuerer Zeit ist es gelungen, neben den beschriebenen epithelialen Zelllinien, stromale Zellen der Prostata zu isolieren und in Kultur zu nehmen. In vitro Zellkultursysteme stromaler Prostatazellen aus normalem oder BPH-Gewebe werden durch Kollagenaseverdau des Gewebes und anschließende Kultivierung der Zellen in geeigneten Medien etabliert. Derartige stromale Prostatazellen wurden von Planz et al. (Planz et al., 1999) und Janssen et al. (Janssen et al., 2000) isoliert, aufgereinigt und charakterisiert.

## **2.5 Neutrale Endopeptidase**

Die neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11; weitere Synonyme: Neprilysin, CD 10, CALLA) ist ein Typ II - integrales Membranenzym in Säugerzellen. Als Zink enthaltende Endopeptidase inaktiviert und baut sie eine Reihe hochwirksamer bioaktiver Peptide ab. Das Substratspektrum in vitro umfaßt u.a. Enkephaline, Neuropeptide wie Neurotensin (Moody et al., 1998), Substanz P (Sturiale et al., 1999), Bradykinin (Kokkonen et al., 1999), Endotheline und atriales natriuretisches Polypeptid, also Substanzen, die teilweise in primär afferenten Neuronen bei der Regulation einer ganzen Reihe von physiologischen Funktionen bedeutsam sind. Wegen ihrer modulierenden Funktion von nociceptiven, proinflammatorischen und pressorezeptorischen Reaktionen hat man pharmakologisch versucht, spezifische Inhibitoren der NEP als neue Analgetika oder Antihypertensiva zu entwickeln (Oefner et al., 2000).

Die Lokalisation, Verteilung und Regulation der NEP in den verschiedenen menschlichen Organen und Gewebe ist variabel und bisher nur für einige Organe untersucht z.B. Herz (Raut et al., 1999); Niere (Di Marco et al., 1998); Lunge (Jackman et al., 1995; Bunn et al., 1998; Cohen et al., 1998; Dusser, 1999); Leber

(Dragovic et al., 1997); Prostata (Moody et al., 1998; Olerud et al., 1999; Renneberg et al., 2001), Olerud et al. (Olerud et al., 1999) haben bei Standardinzisionen in der menschlichen Haut die NEP immunhistochemisch beschränkt auf das Basalzell-Kompartiment vorgefunden. Nach einigen Stunden trat das Enzym dann auch in den übrigen Zellschichten des Wundbereichs auf und erst ab dem 28. Tag nach der Inzision war die Lokalisation wieder auf die Basalzellschicht begrenzt. Eine ähnliche differentielle Expression der NEP fanden Kletsas et al. (Kletsas et al., 1998) in Haut- und Lungenfibroblasten; in fetalen und juvenilen Zellen war sie nur gering vorhanden, bei Erwachsenen und älteren Menschen hingegen deutlich vermehrt. ACTH-Stimulation von Fibroblasten führt bei juvenilen Zellen zum Aktivitätsanstieg der NEP, bei Zellen von älteren Spendern zum Aktivitätsabfall. Diese Befunde deuten auf eine hormonabhängige Expression und eine Rolle beim Alterungsprozess der Haut hin.

Die Hormonabhängigkeit der NEP-Expression, die insbesondere in der Prostata eine Rolle spielt, läßt sich auch bei der NEP in der uterinen glatten Muskulatur nachweisen (Pinto et al., 1999). So fand sich nach Östradiolgabe *in vitro* eine vierfache Verminderung der NEP-Expression, die einherging mit spezifischen Veränderungen der Kontraktilität der Zellen. Gleichzeitig wurde der (Tachykinin-) NK-1-Rezeptor auf das Doppelte hochreguliert. Eine Glukokortikoid-abhängige Stimulation der NEP-Expression in Glattmuskelzellen aus Nabelvenen bzw. Coronararterien fanden Graf et al. (Graf et al., 1998). Zusammen mit der eindeutigen Androgenabhängigkeit der NEP in der menschlichen Prostata ist also eine Regulation der Biosynthese über Steroidhormon-responsive Elemente im NEP-Promotor sehr wahrscheinlich.

Besonderes Interesse hat der Zusammenhang der Verteilung und Funktion von neuroendokrinen Zellen, Neuropeptidsynthese und Proliferation in Abhängigkeit von der NEP-Expression in der Lunge beim Asthma (Dusser, 1999) und beim Lungenkarzinom (Bunn et al., 1998; Cohen & Miller, 1999) gefunden. Während beim Erwachsenen eine große individuelle Variabilität in der pulmonalen NEP-Expression besteht, möglicherweise abhängig von der Anzahl an Alveolarmakrophagen (Jackman et al., 1995), ist sie in der Regel beim Lungenkarzinom deutlich erniedrigt. Bei der sog. idiopathischen diffusen Hyperplasie der pulmonalen neuroendokrinen Zellen (IDHPNC) ist die NEP jedoch besonders stark exprimiert. In diesem Zusammenhang und im Bezug auf die Situation beim Prostatakarzinom (Papandreou et al., 1998) ist die Beobachtung von Bunn et al. (Bunn et al., 1998) von Bedeutung, daß die

Inkubation von Lungenkarzinomzellen *in vitro* mit humaner rekombinanter NEP (h-rNEP) zu einer Zeit- und einer Dosis-abhängigen Wachstumshemmung der Lungenkarzinom-Zelllinien führt. Dies soll auf einer Unterbrechung der auto/parakrinen Wachstumsstimulation der Karzinomzellen beruhen.

Eine analoge Beobachtung und Interpretation wurde bei Prostatakarzinomzellen gemacht. Papandreou et al. (Papandreou et al., 1998) publizierten eine Hypothese, die von der reduzierten Aktivität bzw. fehlenden Membranexpression der NEP beim Prostatakarzinom ausgeht. Die Funktion der NEP im normalen Prostataepithel soll in einem Abbau von parakrin proliferationssteigernd wirksamen Neuropeptiden bestehen, die aus „amphikrinen“ (d.h. gemischt exo- und endokrin aktiven) bzw. den Androgen-unabhängigen neuroendokrinen Zellen der Prostata stammen. Die Autoren spekulieren, daß die fehlende Membranexpression des Enzyms auf Prostatakarzinomzellen den Neuropeptiden aus benachbarten neuroendokrinen Zellen die ungehinderte parakrine Stimulation der Prostatakarzinomzellen ermöglicht. Androgenentzug kann somit bei den zunächst Androgen-abhängigen Tumorzellen die Androgenresponsivität reduzieren bzw. blockieren; gleichzeitig wird bei Androgen-abhängigen Zellen die Oberflächenexpression der NEP durch Androgenentzug reduziert. Dafür spricht auch die Abnahme an NEP-mRNA in LNCaP-Zellen nach Androgenentzug bzw. die Überexpression der NEP nach Testosteron-Stimulation. Inkubation von Androgen-unabhängigen PC-3 Prostatakarzinomzellen mit h-rNEP führt zu einer Hemmung der Proliferation, also ein ähnlicher Effekt, wie er bei den neuroendokrin stimulierten Lungenkarzinomzellen beschrieben wurde.

## **2.6 Regulation der Genexpression in Eukaryoten**

### **2.6.1 Promotorstrukturen**

Die Steuerung der Genaktivität von höheren Organismen erfordert sehr komplexe Regulationsmechanismen, da immer nur die Expression eines Teils des Genoms zur Herstellung und Aufrechterhaltung einer Zell- oder Organfunktion notwendig ist. Der erste Schritt, die Übertragung von DNA-Information auf mRNA (Transkription) ist hierbei als Startelement von besonderer Bedeutung für die Genregulation. Weitere Kontrollstufen sind z.B. die DNA - Methylierung, Gen - Amplifikation, posttranskriptionelle mRNA-Modifikationen, die Umsetzung der von der mRNA übernommenen Information in die Proteinbiosynthese (Translation) und

posttranslationale Proteinmodifikationen. Die für die Steuerung einer korrekten Transkription verantwortliche Region eines von RNA-Polymerase II regulierten Gens liegt bei Eukaryoten zum größten Teil in der 5'-Richtung direkt vor dem Gen, dem 5'-flankierenden Bereich. Einen darin enthaltenen DNA-Bereich, von dem aus die Transkription gesteuert wird, bezeichnet man als Promotor. Durch den Vergleich der Nukleotidsequenzen vieler verschiedener Promotorregionen zeigte sich, daß bestimmte Sequenzmotive in dieser Region immer wieder nachzuweisen sind, z.B. die TATA-Box, die oft etwa 30~80 bp in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstart liegt und an die ein stabiler Multiproteinkomplex, TFIID, bindet (Dymlach et al., 1991; Weinzierl et al., 1993). Die TATA-Box und die Transkriptionsstartstelle, die Cap-site, stellen den Grundpromotor einiger Gene dar und bilden mit anderen basalen Transkriptionsfaktoren einen stabilen Präinitiationskomplex mit der RNA-Polymerase II (Saltzman & Weinmann, 1989; Hori & Carey, 1994). Die Aktivität dieses Grundpromotors kann durch weitere Bindungssequenzen, die stromaufwärts gelegen sein können, gesteigert werden, wie die CCAAT - Box (McKnight & Tjian, 1986) und die Sp1- Box („specificity protein 1“), eine GC-reiche Sequenz, die in vielen Genen mit oder ohne TATA - Box gefunden wird (Dymlach et al., 1985). Alle diese Elemente sind essentiell für eine effiziente Transkription und werden als UPEs („upstream promoter elements“) bezeichnet. Neben diesem konstitutiven Promotorbereich kann man funktionell noch regulative Kontrollabschnitte unterscheiden, die mit den UPEs verflochten sind, aber auch stromauf- oder abwärts vom Promotorbereich gelegen sein können. Inzwischen konnten viele dieser *cis*-regulatorischen, d.h. spezifische Erkennungssequenzen für DNA-bindende Proteine enthaltende, Elemente identifiziert werden, die signalabhängig durch Hormone, Wachstumsfaktoren u.a. die Promotoraktivität gewebe- oder zelltypspezifisch in verstärkender (Aktivator, Enhancer) (Voss & Pongs, 1986; Dymlach, 1989) oder hemmender (Silencer) (Brand et al., 1985; Shore & Nasmyth, 1987) Weise beeinflussen. So können auch DNA - Abschnitte, die stromaufwärts, stromabwärts oder innerhalb einer Transkriptionseinheit liegen, zum Teil über große Distanzen die Genexpression beeinflussen.

## 2.6.2 Transkriptionsfaktoren

Die beschriebenen DNA-Elemente sind Voraussetzung für die Expression und transkriptionelle Regulation eines Gens, sie erlangen aber erst im Zusammenwirken

mit Transkriptionsfaktoren, die an diese *cis*-regulatorischen Bereiche binden, in vivo Bedeutung. Die Bindungsdomänen dieser Proteine weisen trotz unterschiedlicher Sequenzen strukturelle Ähnlichkeiten auf, da sie sich dem Aufbau der DNA-Doppelhelix anpassen, aber auch ihre spezifische Bindungssequenz erkennen müssen. So kann ein Teil der DNA-bindenden Proteine gemäß ihrer Struktur in Familien unterteilt werden (Schleif, 1988; Krajewska, 1992; Pabo & Sauer, 1992).

**Helix-Turn-helix (HTH):** Das erste bekannte DNA-Bindungsmotiv besteht aus einer 60 Aminosäuren (AS) langen Homöodomäne, bei der zwei  $\alpha$ -Helices über ein  $\beta$ -Faltblatt miteinander verbunden sind und so das Helix-Knick-Helix-Motiv bilden. Die zweite Helix liegt dabei über der ersten und bildet die Erkennungshelix für basenspezifische Kontakte (Schleif, 1988).

**Leucin-zipper:** Die Gruppe dieser Transkriptionsfaktoren kann nur als Dimer an die DNA binden (Vinson et al., 1989). Die Proteine zeigen dabei eine zweiteilige Struktur, einen etwa 30 AS langen Abschnitt mit positiver Nettoladung, der an die DNA bindet und einen direkt angrenzenden  $\alpha$ -helikalen Bereich, der alle sieben AS ein Leucin aufweist. Über die Bildung einer schraubenförmigen (nicht wie ursprünglich angenommen nach Reißverschluß-zipper-Prinzip) Windung der beiden parallelen Helices erfolgt ein Konformationswechsel der basischen Region, der so ebenfalls eine  $\alpha$ -helikale Struktur annimmt und mit der sauren DNA binden kann (Johnson & McKnight, 1989).

**Helix-Loop-helix (HLH):** Hier liegen im Gegensatz zum HTH-Motiv zwei  $\alpha$ -Helices vor, bei denen sich alle geladenen AS auf einer Seite befinden und durch eine nicht-helikale Schleife (loop) getrennt werden (Murre et al., 1989). Die Transkriptionsfaktoren ähneln der Familie der Leucin-Zipper, da sie ebenfalls nur als Dimere und über eine positiv geladene Domäne an die DNA binden (Davis et al., 1990).

**Zink-Finger:** Bei den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um wiederholte Motive, in denen zwei Cystein- und zwei Histidin-Reste ( $C_2-H_2$ ) sich zu einer dreidimensionalen Struktur um ein koordinierendes Zinkion falten (Evans & Hollenberg, 1988). Die Schlaufen der Zink-Finger bestehen aus 12 AS mit mehreren basischen Resten und gehen den Kontakt mit der DNA ein. Die Bindung ist dabei von dem Zusammenspiel mehrerer benachbarter Zink-Finger abhängig, so daß immer

mehrere Kopien des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Motivs innerhalb eines Transkriptionsfaktors vorkommen (Parraga et al., 1988). Der Transkriptionsfaktor Sp1 gehört zu dieser Familie (Kadonaga et al., 1987). Neben diesen vier Familien (Abb.2-2) gibt es noch weitere Transkriptionsfaktoren, die nicht in Familien eingeteilt werden können, so daß bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung noch viele Fragen geklärt werden müssen.

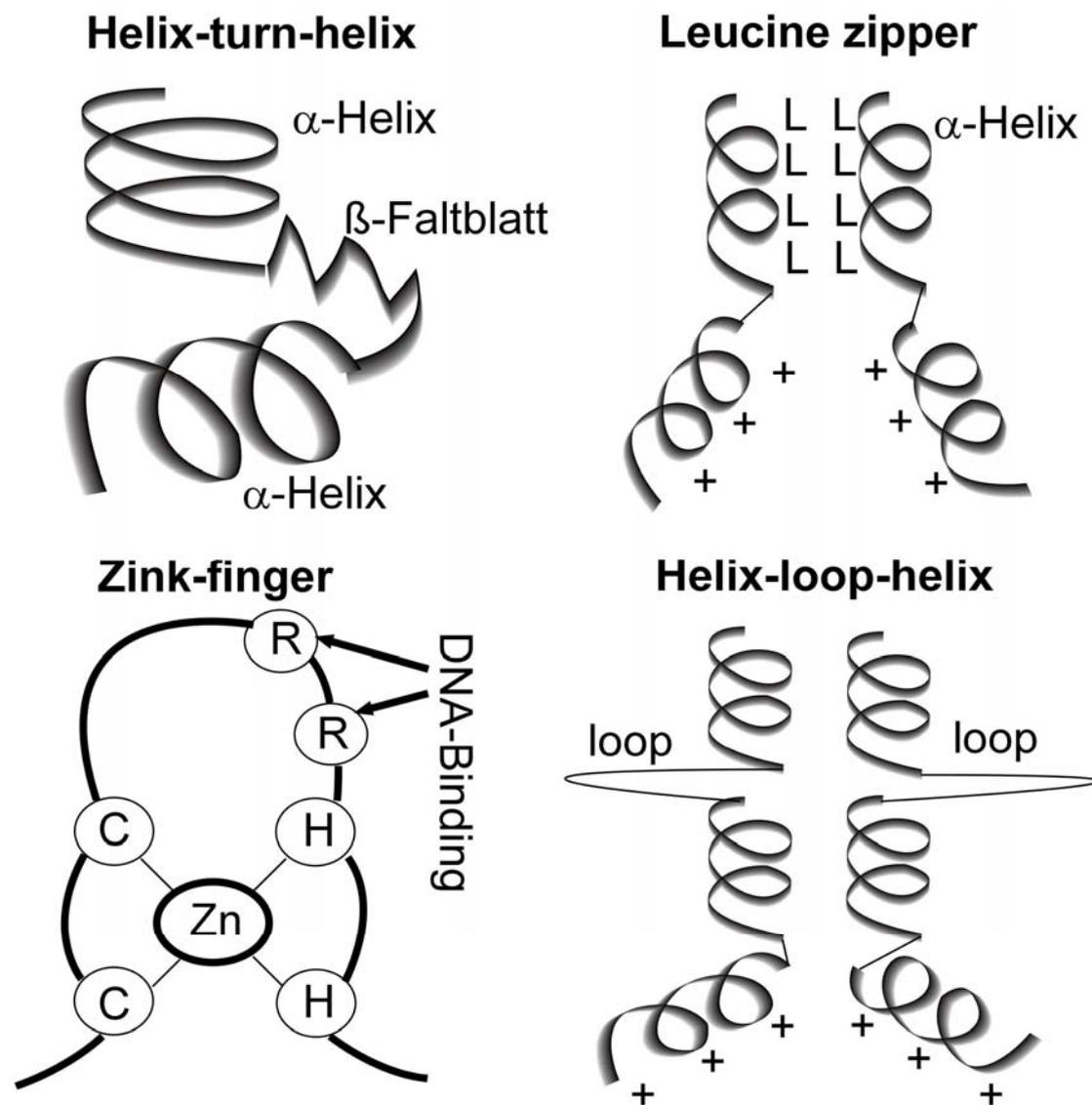


Abb. 2-2: DNA-Bindungsmotive

### 2.6.3 NF-Y und Die Familien der Sp-Transkriptionsfaktoren

Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor Sp1 spielt bei der Aktivierung vieler eukaryotischer und viraler Promotoren eine Rolle. Er gehört zu den

Zinkfingerproteinen, die für ihre korrekte Funktion die Anwesenheit von Zink benötigen und wurde aus HeLa-Zellen isoliert (Dyan & Tjian, 1983; Briggs et al., 1986). Aus dem Vergleich des „frühen“ Promotors des SV40-Virus und anderen RNA-Polymerase II-abhängigen Promotoren wurde die Sequenz der Kernbindungsstelle CCGCC, bzw. GGGCGG hergeleitet, da die Aktivierung des Gens durch Sp1 unabhängig von der DNA-Orientierung ist (Dyan & Tjian, 1983; Gidoni et al., 1985; Wildeman, 1988). Auch Gene, deren Promotor keine TATA-Box enthält, weisen Bindungsstellen für Sp1 auf (Azizkhan et al., 1993; Lu et al., 1994). Weitere Untersuchungen und die Klonierung der cDNA für Sp1 (Kadonaga et al., 1987) zeigten, daß die DNA-bindende Domäne des Proteins drei tandemartig sich wiederholende Zinkfinger-Motive aufweist. In der Zwischenzeit wurden andere Mitglieder der Sp1-Familie identifiziert, die an GC- oder GT-Boxen (GGGTGTGGC) binden können, wie Sp2, Sp3 und Sp4 (Hagen et al., 1992; Kingsley & Winoto, 1992; Hagen et al., 1995). Sp3 und Sp4 weisen dabei signifikante Homologien zu Sp1 auf, so daß sie auch Bindung an ähnliche DNA-Elemente zeigen (Hagen et al., 1994). Sp2 wird wie Sp1 und Sp3 ubiquitär exprimiert, wobei die Bindung an GC- und GT-Boxen durch eine geringere Homologie zu erklären ist (Kingsley & Winoto, 1992). Eine Rolle in der Transkriptionsregulierung konnte für Sp2 noch nicht nachgewiesen werden. Sp1 ist bisher nur als aktivierender Faktor bekannt (Birnbaum et al., 1995; Kumar et al., 1995; Bigger et al., 1996), wogegen Sp3 zum einen als Faktor, der die Sp1-vermittelte Aktivierung durch Competition um die Bindungsstelle unterdrückt (Majello et al., 1994; Hagen et al., 1995; Majello et al., 1995; Kumar & Butler, 1997), zum anderen ebenfalls als aktivierender Faktor beschrieben wird (Liang et al., 1996; Bigger et al., 1997; Netzker et al., 1997). Dies läßt vermuten, daß die Funktion von Sp3 von Umfeld, Kofaktoren oder Zelltyp abhängig ist (Suske, 1999). Der aktivierende Transkriptionsfaktor Sp4 kommt nicht ubiquitär vor und kann im Gegensatz zu Sp1 nicht synergistisch durch angrenzende Bindungsstellen wirken (Hagen et al., 1995).

NF-Y gehört zu den Helix-loop-Helix-Proteinen und besteht aus drei Untereinheiten, deren Proteine jeweils Glutamin-reiche und Serin-Threonin-reiche Domänen besitzen (Hoof van Huijsduijnen et al., 1987). NF-Y bindet an die CCAAT-Box, wirkt als Aktivator und ist z. B. an der Regulation von Albumin (Mantovani et al., 1992) und  $\beta$ -Actin (Danilition et al., 1991) beteiligt. Für eine Reihe von Genen wurde außerdem

ein Zusammenwirken von NF-Y und Sp-Faktoren bei ihrer Regulation beschrieben. So wurde für die Gene der Carnitinpalmitoyltransferase I (CPT-I $\alpha$ ) (Steffen et al., 1999) und der Fettsäuresynthase (Roder et al., 1999) eine Interaktion von NF-Y und Sp1 gezeigt, an der Regulation des Gens für die extrazelluläre signalabhängige Proteinkinase 2 (ERK2) sind NF-Y und Sp3 beteiligt (Sugiura & Takishima, 2000). Auch für die Regulation des NEP-Gens ist ein solches Zusammenwirken denkbar. Nach wie vor ist ungeklärt, ob im Falle der Gene, die keine TATA-Box tragen, die NF-Y bzw. Sp-Faktoren die Bildung eines Präinitiationskomplexes aus RNA-Polymerase und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren über einen Mechanismus fördern, der für die TATA-Box-haltigen Gene bekannt ist.

## **2.7 Struktur und Expression des NEP-Gens**

Eine Untersuchung der entwicklungs-, zellspezifischen und physiologischen Regulation des humanen NEP-Gens wurde durch die Klonierung der 5'-flankierenden Sequenzen möglich (Shipp et al., 1988). Das humane NEP-Gen ist auf Chromosom 3 lokalisiert und umfaßt etwa 80kb mit 24 Exons: die für unübersetzte Teile kodierenden Exon 1, Exon 2 und Exon 3 sowie Exon 4 bis Exon 24, die für den Prepro-NEP-Vorläufer kodieren, aus dem nach mehreren enzymatischen Schritten das bioaktive NEP freigesetzt wird (D'Adamio et al., 1989).

NEP-Gen-Transkription hat 4 Typen, bei den die NEP-mRNA 5'- unübersetzte Sequenzen enthält. Die vier mRNA-Spezies, sogenannten Typ 1, Typ 2a, Typ 2b, und Typ 3, stammen von drei unkodierenden Exons (Exon 1, Exon 2 und Exon 3) des humanen Gens ab (D'Adamio et al., 1989; Li et al., 1995b). Zwei Transkriptionen, Typ 2a und Typ 2b, stammen von Exon 2 durch alternatives Spleißen ab. (Abb.2-3).

NEP Typ 1 und Typ 2 Transkriptionen sind durch separate Regulationselemente reguliert, die multiple Transkription-Initiationsstellen und keine klassische TATA-Box enthalten. Die GC-reiche Typ 2 Regulationsregion enthält eine reverse CCAAT-Box und multiple putative Spl Bindungsstellen (Ishimaru et al., 1997).

Die Typ 2-, Typ 3-Transkriptionen wurden in humaner Niere und Lunge gefunden, die Typ 1-Transkription wurde in Niere, Lunge und Gehirn beschrieben. Zwar ist in vielen humanen Prostatakarzinomzelllinien Typ 2-Transkription reichlich, aber sie wurde in LNCaP Zellen bisher noch nicht beschrieben (Li et al., 1995a; Li et al., 1995b)

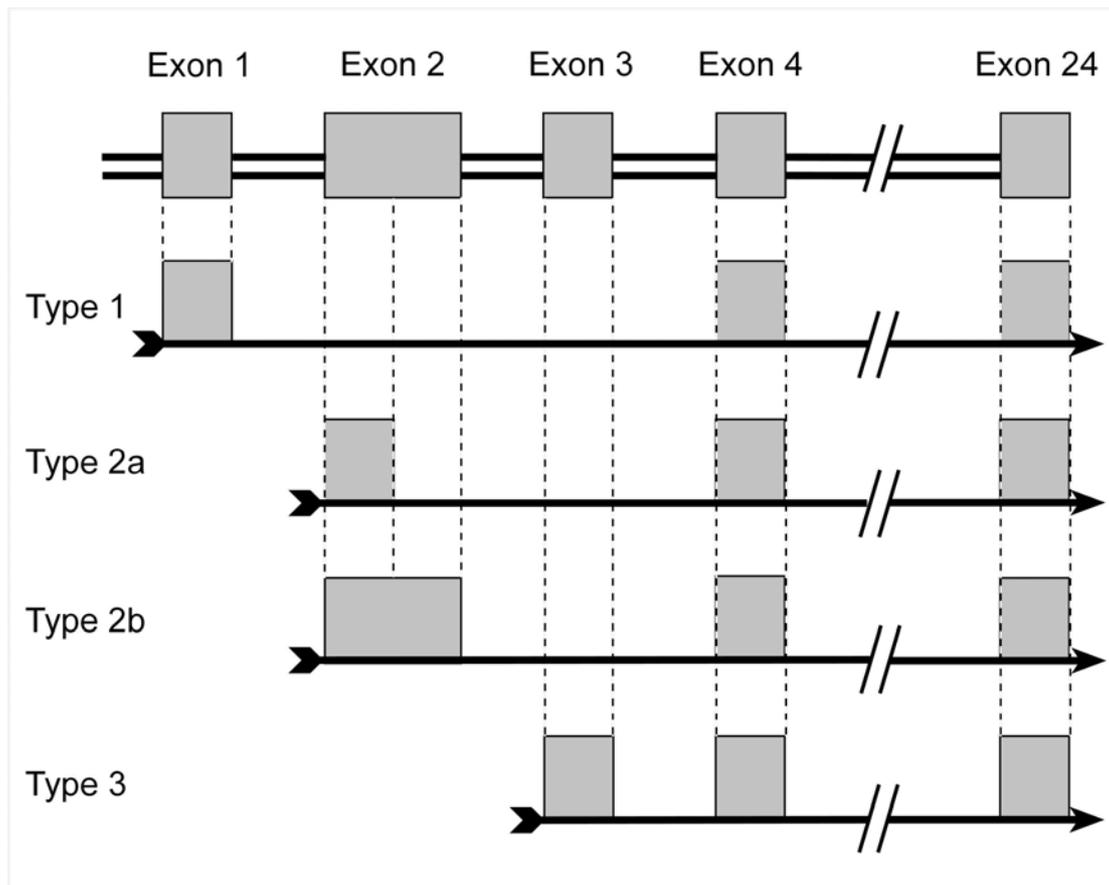


Abb.2-3: Schematische Darstellung der Struktur des humanen NEP-Gens sowie des NEP-Gen-Transkriptionstyps.

## 2.8 Zielsetzungen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, (a) die zelluläre Lokalisation des NEP-Proteins in Prostatazellen und Prostatagewebe mit NEP-Antikörper, durch Fluoreszenzstudien und Fluoreszenzmikroskopie, (b) die zelluläre Lokalisation der NEP-mRNA in Prostatazellen und Prostatagewebe mit spezifischen NEP-Primern, durch In Situ RT-PCR, (c) quantitative Analyse der Steroidhormon-Sensitivität des NEP Proteins und des NEP mRNAs in LNCaP -, bzw. hPCPs - Zellen mittels Western - und Nortern-Blot, (d) die molekularen Mechanismen der Expression von NEP in Prostatakarzinomzellen (LNCaP) zu untersuchen. Dazu erfolgten funktionelle und strukturelle Untersuchungen der NEP Typ 2 - Promotorregion in Prostatakarzinom - Zelllinien, um *cis*-regulatorische Regionen zu identifizieren. DNA - Bindungsstudien sollten Aufschluß über die dort bindenden Proteine liefern und über einen Vergleich mit bekannten Transkriptionsfaktoren diese identifizieren. Die so ermittelten

Prostatakarzinom-spezifischen Regulationsmechanismen des NEP-Gens sollen zum besseren Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen führen und so die Grundlage zur Entwicklung neuer gentherapeutischer Ansätze unter Verwendung des NEP-Promotors zum Targeting von Effektormolekülen bilden.

### **3 Material und Methoden**

#### **I Material**

##### **3.1 Geräte**

Bakterien Inkubator	Memmert, Schwabach
Diaphot 300 Mikroskop	Nikon, Japan
Fluoreszenz- und Licht-Mikroskop	Leica MD KD
Gel Electrophoresis Chambers	Biorad, Hercules, CA,USA
Geltrockner Modell 583	Biorad, München
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
Luminometer AutoLumat 953	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Phosphorimager FLA3000 und Screen	FUJIFILM, Japan
PTC-200 DNA Engine thermal cycler	Biozym Diagnostik, Oldendorf/Hess
Sterile Werkbank Lamin Air HLB 2448	Kendro, Hanau
Liquid Scintillation Counter	HP, USA
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckmann, München
Zellkultur Inkubator BBD6220	Kendro, Hanau

##### **3.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien**

###### **3.2.1 Chemikalien**

2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphat (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
4',6'-Diamidino-2-Phenylindol Hydrochlorid (DAPI)	Serva, Heidelberg
Acrylamid / Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe

---

Agarose	Gibco-BRL, Neu Isenburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
DIG-labeled Uridine Triphosphat (11-dUTP)	Boehringer, Mannheim
DNA and protein size markers	Boehringer, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glacial acetic acid	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG)	Applichem, Darmstadt
NBT / BCIP Stammlösung	Boehringer, Mannheim
Phenol / Chloroform / Isopropanol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Poly (dI-dC)	Sigma-Aldrich, Seelze
Rotiphorese Gel 30, 40	Roth, Karlsruhe
Sodium acetate	Roth, Karlsruhe
Sodium azide	Merck, Darmstadt
Sodium chloride	Sigma-Aldrich, Seelze
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
TESAP (3'-Triethoxysilyl-propylamine)	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	Roth, Karlsruhe
Urea	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Amersham Biosciences, Freiburg
Triton x-100	SERVA, Heidelberg
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe

### 3.2.2 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

DNase I	[10 U/ $\mu$ l] RNase free	Boehringer, Mannheim
DNase I	[1 U/ $\mu$ l] RNase free	Promega, Madison/USA
RNase A		Boehringer, Mannheim
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase	[2 U/ $\mu$ l]	MBI, Vilnius/Litauen
Pfu Turbo DNA polymerase	[2.5 U/ $\mu$ l]	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	[60 U/ $\mu$ g]	Sigma, Taufkirchen
recombinant <i>Thermus thermophilus</i> (rTth) - DNA polymerase	[2.5 U/ $\mu$ l], EZ rTth RNA PCR Kit	Perkin Elmer, Langen
Restriktionsendonukleasen		MBI, Vilnius/Litauen Boehringer, Mannheim Pharmacia, Freiburg
Rnasin	[20 U/ $\mu$ l]	Perkin Elmer, Langen
T4-Polynukleotidkinase	[10 U/ $\mu$ l]	Boehringer, Mannheim
Taq DNA Polymerase	[ 5 U/ $\mu$ l]	Boehringer, Mannheim

### 3.2.3 Bakterienkultur

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Gibco-BRL, Neu Isenburg
Bacto-yeast extract	Gibco-BRL, Neu Isenburg
Borate	Merck, Darmstadt
Calcium Chloride	Merck, Darmstadt

### 3.2.4 Zellkultur

Amphotericin B	Gibco-BRL, Karlsruhe
Ampicillin	Gibco-BRL, Karlsruhe

DMEM und RPMI 1640 medium	Gibco-BRL, Karlsruhe
FCS, trypsin, glutamine,	Gibco-BRL, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco-BRL, Karlsruhe

### 3.2.5 Radioaktive Verbindungen

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP (3000 ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP (3000 ci/mmol)	Amersham, Braunschweig

### 3.2.6 Verbrauchsmaterialien

Biodyne®, B nylon membranes	Pall Gelman Laboratory
BioMax Röntgenfilme	KODAK, USA
Deckglas	Superior, Lauda-Königshofen
ECL Nitrocellulose Membranes	Amersham, Braunschweig
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger ohne und mit Vertiefung	Superior, Lauda-Königshofen
Probe Purification Columns	Stratagene, Heidelberg
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0.5 ml (thin)	Perkin Elmer, Foster City/USA
Reaktionsgefäße 0.5, 1.5 und 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg

### 3.3 Bakterienstämme

E. coli DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983)

### 3.4 Gewebe und Zelllinien

Normale Prostata-, Prostatakarzinom- und BPH-Präparate stammten aus dem eigenen Archiv (AG Aumüller, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Marburg).

Es wurden weiterhin die humanen Prostata-Zelllinien LNCaP (Horoszewicz et al., 1980) und stromale Zellen aus Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (Janssen et al., 2000) verwendet.

### 3.5 Oligonukleotide

NEP -380 us 5'-TTC GAT ATC GAG AGC AGG CTG GAG CAG-3'

NEP -154 us: 5'-AGG ATA TCA CTG CCA CCC GGC C-3'

NEP -48 ds 5'-ACG GAT CCC CCT CAG CTC GCT C-3'

NEP -6 ds 5'-TGG ATC CGG CTC CCA GCG CCC-3'

NEP +40 ds 5'-ACC GGA TCC CAG CCG CTC CCC TCG GCT-3'

NEP +227 ds 5'-AGA GCC AAC CTG ACG TGA CT-3'

NEP In-Situ us 5'-TGT GGC CAG ATT GAT TCG TC-3'

NEP In-Situ ds 5'-TTG TAG GTT CGG CTG AGG CT-3'

### 3.6 Plasmide

**pCR II-TOPO:** abgewandelter Bluescript-Vektor mit TOPO-Klonierungsstelle, für die direkte Ligation von PCR-Produkten ohne vorherige Aufreinigung (InvitroGen, Groningen, NL). (Abb. 3-1)

**pGAW:** Luciferase-Reportervektor wurde bei Braun & Suske (Braun and Suske, 1998) dargestellt. Im Luciferase-Grundvektor pGL3 (Promega, Mannheim) wurde eine interne BamH I - Schnittstelle zerstört, indem der Vektor mit BamH I geschnitten, die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt und der Vektor religiert wurde. Der erhaltene Vektor wurde mit Asp 718 I und Hind III geschnitten und das Oligonukleotid PEESB-Polylinker eingesetzt. Der PEESB-Polylinker enthält folgende Schnittstellen: Pst I, EcoR I, EcoR V, Hind III, BamH I, Bgl II, Xho I, Sma I, Nhe I, Sac I und Kpn I. (Abb. 3-2)

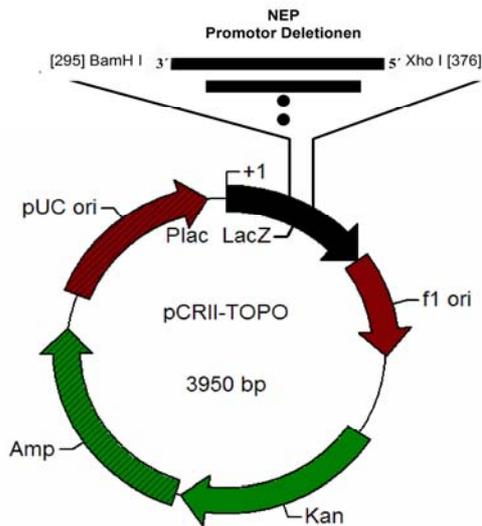


Abb.3-1 Schematisches Diagramm der in den TOPO-Vektor transferierten NEP Promotor-Fragmente

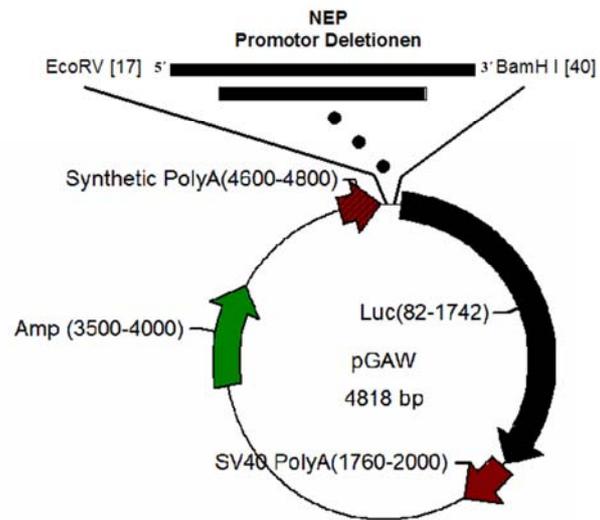


Abb.3-2 Schematisches Diagramm der NEP-Promotor-Deletionskonstrukte

**pRSV-βGal (pCH110):** β-Galaktosidaseexpressionskonstrukt zur Normalisierung von Transfektionseffizienzen in Mammaliazellen (Amersham Biosciences, Freiburg).

**pRSV-Luc:** Luciferaseexpressionskonstrukt zur Normalisierung von Transfektionseffizienzen in Mammaliazellen (de Wet et al., 1987).

### 3.7 Antikörper

In der Arbeit wurden folgende mono- und polyklonale Antikörper verwandt.

#### Erstantikörper

Anti-h-CD10/NEP	monoklonale Anti-Maus	Neomarkers, Fremont/USA
	1:100 für IHC	
Anti-h-CD10/NEP	polyklonale Anti-Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
	1:500 für Western Blot	
Anti-h-PSA	polyklonale Anti-Kaninchen	Dako, Hamburg
	1:150	
Anti-Myosin	polyklonale Anti-Kaninchen	Dako, Hamburg
	1:100 für IHC	

### Zweitantikörper und Antikörper für Molekularbiologische Methoden

Cy <sup>TM</sup> 2 markiert	polyklonale Anti-Kaninchen 1:150 für IHC	Dianova, Hamburg
Cy <sup>TM</sup> 3 markiert	monoklonale Anti-Maus 1:350 für IHC	Dianova, Hamburg
Anti-DIG-AP Konjugat	polyklonale Schaf-Anti-DIG 1:200 für In Situ RT-PCR	Boehringer, Mannheim
ECL <sup>TM</sup> horseradish peroxidase (HRP)- conjugated Antibody	polyklonale Anti-Kaninchen 1:10,000 für Western Blot	Amersham, Wien/Österreich
NF-Y Antibody	polyklonale Ziege-Anti-NF-Y	Santa Cruz, Heidelberg
Sp1, Sp3 Antibody	polyklonale Kaninchen-Anti- Sp1, Sp3	Guntram Suske, Jörg Klug IMT, Marburg

### 3.8 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Wasser angesetzt, das über ein Milli-Q-Wassersystem (Millipore, Eschborn) aufgereinigt wurden.

**20×SSC:** 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0

**Denhardt's reagent:** 1% (w/v) Ficoll 400, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 1% (w/v) bovine serum albumin

**Formamide-Ladepuffer:** 95% formamide, 10mM EDTA (pH 8.0), 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol

**PBS (pH 7.4):** 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Protein Isolierungspuffer:** 20 mM HEPES pH 7.9, 15% Glycerol, 0.2 mM EDTA, 10 ug/ml Leupeptin, 1 mM PMSF

**Lysepuffer:** 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40

**TE (pH 8.0):** 10mM Tris (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)

**TB Puffer:** 10mM HEPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, before adding MnCl<sub>2</sub> adjust pH to 6.7 with KOH

**TAE (pH 8.0):** 40mM Tris-acetate, 2mM EDTA (pH 8.0)

**TBE:** 90mM Tris, 90mM boric acid, 2mM EDTA

**Tris-glycine SDS Puffer (Laemmli-Puffer):** 25 mM Tris-Cl, 250 mM glycine, 0.1% SDS

**SDS Gel-Ladepuffer:** 100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue, 20% (w/v) glycerol, 200 mM DTT

**10x MOPS-Puffer:** MOPS 0,2 M, NaAc 50 mM, EDTA 10 mM (pH 7,0)

**10x Kinasepuffer (pH 8,2):** 500 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin

**1x STE-Puffer (pH 8):** 0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

**HeBS (2x) (pH 7,1) (sterilfiltriert):** 21 mM HEPES, 5 mM KCl, 6 mM Dextrose, 137 mM NaCl, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**Chloroquin (100 mM) (sterilfiltriert):** 52 mg Chloroquine Diphosphate, 1 ml H<sub>2</sub>O, bei -20°C lagern.

## II Methoden

### 3.9 Zellkulturmethoden

#### 3.9.1 Kultivierung von Zellen

Das durch transurethrale Resektion gewonnene humane Prostatagewebe wurde unter sterilen Bedingungen in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten. Diese Gewebstücke wurden unter Schütteln enzymatisch mit 0,25% Kollagenase Typ III (Biochrom, Solingen) bei 37°C für 15 min in Medium verdaut. Das hier und im weiteren verwendete Standardmedium besaß folgende Zusammensetzung: RPMI 1640 mit 10% FKS (fötales Kälberserum), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B. Der Überstand wurde verworfen und nach einen Waschschrift in PBS (15 min, 37°C) wurde das Gewebe mit einer Trypsin / EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,025% EDTA) 10 min bei 37°C inkubiert. Das Gewebe wurde nochmals gewaschen und die Trypsinbehandlung wiederholt. Nach einem weiteren Waschschrift in Standardmedium wurden die Gewebefragmente in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen überführt. Diese Explantate wurden in Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte wie unten beschrieben, nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers. In den Explantat-Kulturen des BPH-Gewebes dominierten nach 3 Wochen im wesentlichen Zellen mit stromalen Charakteristika. Diese Zellen wurden "human primary culture of the prostate stromal compartment" (hPCPs) genannt.

Die humanen Prostata-Zelllinie LNCaP wurde in dem DMEM-Standardmedium (mit 10% FCS und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Passagierung erfolgte zweimal wöchentlich. Hierzu wurde das Medium entfernt und alle Zelltypen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 40 µl Trypsin [0,05% (w/v)] / EDTA [0,025% (w/v)] - Lösung pro cm<sup>2</sup> abtrypsinisiert. Die Zellen wurden maximal 3 min bei 37°C mit der Lösung inkubiert und durch Klopfen vom Untergrund gelöst. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 10 ml RPMI + 10% FKS. Die abgelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 48 x g und RT 10 min abzentrifugiert. Das Medium wurde

dekantiert und das Pellet, je nach Größe, in 2-5 ml frisches Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte wie unten beschrieben, bevor die Zellen in neue Kulturflaschen oder Platten ausgesät wurden.

### **3.9.2 Zellzahlbestimmung, Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden abtrypsiniert und das Zellpellet in 2-5 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. Alle Zellzahlbestimmungen wurden als Duplikate oder Triplikate angelegt und die Mittelwerte errechnet.

Die abtrypsinierten Zellen wurden bei 48 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 900 µl RPMI 1640 Medium resuspendiert. Danach wurde die Lösung in ein Kryoröhrchen überführt und bei 4°C 1-2 Stunden gekühlt. Es folgte die Zugabe von 900 µl Einfriermedium [20% DMSO (v/v) in Standardmedium, 4°C] und das Herunterkühlen auf -80°C in einer Styroporbox. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C gelagert.

Das Auftauen erfolgte möglichst schnell im warmen (37°C) Wasserbad, anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium für 10 min (48 x g, RT) zentrifugiert, das Pellet in neuem Medium resuspendiert und in eine vorbereitete Gewebekulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde nochmals das Medium gewechselt, um ein optimales Anwachsen zu erreichen.

## **3.10 Morphologische Methoden**

### **3.10.1 Objektträgerbeschichtung**

Beschichtung mit TESAP (3'-Triethoxysilyl-propylamine):

Objektträger mit Aqua dem. und 70% Ethanol waschen  
und bei 60°C trocknen

2% TESAP/Aceton	30sec
Aceton	30sec
Aceton	30sec
Aqua dest.	5 sec
Aqua dest.	5 sec
Trocknen	bei 42°C

### **3.10.2 Paraffineinbettung von Geweben (Romeis, 1989)**

Die Fixation der frisch entnommenen Gewebe erfolgte in Bouin'scher Lösung für 72h.

Bouin'scher Lösung:       15 Teile gesättigte, wäßrige Pikrinsäure  
                                  5 Teile Formalin  
                                  1 Teil Eisessig

Nach Entwässerung in 80-100% Ethanol (3-4 Stunden) wurden die Gewebe in Methylbenzoat I-IV (je 24 Stunden) überführt. Über Benzol I-III (je 30 min) und Paraffin mit steigenden Schmelzpunkten (42-56°C, je 2 Stunden) erfolgte die Einbettung in Paraplast. Hierzu wurden Metallwinkel, entsprechend der Größe des Materials, zusammengefügt und die Präparate in dem noch flüssigen Paraplast ausgerichtet

Mit einem Schlittenmikrotom wurden von den Präparaten ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt, in 40°C warmes Aqua dest. überführt und auf beschichteten Objektträgern (für immunhistochemische Versuche: ohne Vertiefung; für in situ RT-PCR: mit Vertiefung) aufgefangen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 50°C.

### **3.10.3 Zellen für die Immunhistochemie und In Situ RT-PCR**

Nach der 48-72 h Zellkultur auf Φ12mm Deckglas in 24-well-Platten, wurden die auf Deckgläschen angewachsenen Zellen in Aceton / Methanol (1:1) 5 min bei 4°C fixiert und für ca. 20 min luftgetrocknet. Danach wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

## **3.11 Immunhistochemische Methoden**

Diese Methoden erlauben den Nachweis antigener Komponenten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern in Gewebeschnitten oder Zellausstrichen. Die Markierung kann hierbei durch fluoreszierende Farbstoffe geschehen. Die Inkubationen der Antiseren erfolgten in feuchter Kammer. Die Konzentrationen der 1. Antikörper wurden für alle Markierungsversuche in Verdünnungsreihen ausgetestet und optimiert.

Die Paraffinschnitte wurden über Xylol I-III entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert. 3x Isopropanol, 2x 96% Ethanol, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol je 5 min, Aqua dest. 5 min.

### **3.11.1 Indirekte Immunfluoreszenz**

Die Reaktion wurde mit Erstantikörper und fluoreszenzmarkiertem 2. Antikörper an Paraffinschnitten und an den Zell (auf Deckgläschen) durchgeführt. Diese Fluorochrome werden mit Licht definierter Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt.

- 3 mal mit PBS gewaschen
- Inkubation bei 4°C für 12 h mit dem Erstantikörper
- 3 mal mit PBS gewaschen
- Inkubation bei RT für 1 h mit fluoreszenzmarkiertem 2. Antikörper, im Dunkeln
- 3 mal mit PBS gewaschen
- Negativkontrollen wurden durch Weglassen des Erstantikörpers durchgeführt

Das Eindecken der Präparate erfolgte in Propylgallat:

- Propylgallat 1.5 g
- ad 100 ml Glycerin (50%) in PBS

Die Schnitte wurden bei 4°C dunkel aufbewahrt.

### **3.11.2 Doppelfluoreszenz-Markierung**

Antigene können durch die Verwendung monoklonaler Antikörper in Kombination mit polyklonaler Antikörper unterschiedlicher Spezies simultan auf demselben Präparat dargestellt werden. Hierzu wurden die Schnitte analog der indirekten Fluoreszenzmethode zuerst mit dem ersten Primärantikörper plus Cy<sup>TM</sup>3-Detektionssystem und nachfolgend mit dem zweiten Primärantikörper und einem Cy<sup>TM</sup>2-markierten Detektions-Antikörper inkubiert. Die Lokalisation der Antigene wird durch die unterschiedlichen Fluoreszenzlichtwellenlängen der assoziierten Fluorochrome möglich.

### **3.11.3 Fluoreszenz-Kernfärbung**

Zur Kernfärbung wurde der DNA-spezifische-Fluoreszenzfarbstoff DAPI eingesetzt. Er besitzt ein Absorptionsmaximum von 340 nm und ein Fluoreszenzmaximum bei 488 nm. Nach der Inkubation der Antikörper und Waschen in PBS wurden die

Schnitte für 20 min (RT) in die Farbstofflösung (DAPI-Lösung: 1 µg/ml in Aqua dest., Aufbewahrung bei 4°C) überführt und anschließend in PBS gewaschen.

### 3.12 Molekularbiologische Methoden

#### 3.12.1 In Situ RT-PCR

In situ RT-PCR ist eine neue molekularbiologische Methode für die Forschung und Diagnostik, die die Empfindlichkeit einer Polymerasenkettenreaktion mit dem Vorteil der In-situ-Hybridisierung verbindet, gesuchte mRNA-Abschnitte spezifisch einzelnen Zellen zuzuordnen. Zusätzlich kann durch optische Kontrolle des Reaktionsproduktes die Gefahr falsch-positiver Resultate durch Kontamination mit Fremd-DNA minimiert werden.

Nach der Präparat-Vorbereitung, der Versuch erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Am Paraffingewebe	An den Kulturzellen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schnitt 2 mal mit PBS (oder H<sub>2</sub>O) gewaschen</li> <li>• Proteinase K (2.5µg/ml) - Verdau: 3-10 min bei 25°C (RT)</li> <li>• 3 mal mit PBS gewaschen</li> <li>• DNase - Verdau: 18-24h bei 37°C in feuchter Kammer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellen (auf Φ12mm Deckglas) 2 mal mit PBS gewaschen</li> <li>• Für Zellen ist Proteinase K - Verdau unnötig</li> <li>• DNase - Verdau: 18-24h bei 37°C in feuchter Kammer</li> </ul>

DNase I Lösung:	DNase Puffer, 10x	2 µl
	RNase-freier DNase (10U/µl)	2 µl
	Aqua dest.	15 µl
	RNasin (20-40U/µl)	1 µl

Per Schnitt: 20µl (1x ohne DNase I für positive Kontrolle)  
(1x mit RNase A / DNase I als 1. negative Kontrolle)

- 2 mal mit DEPC Aqua dest. gewaschen
- In 100% Isopropanol 3-5 min gewaschen und für ca.60-90 min luftgetrocknet.

- Reaktion-Mix zugegeben

In Situ PCR Reaktion-Mix	EZ Puffer, 5x (EZ rTth RNA PCR Kit)	10	μl
	dATP, dCTP, dGTP, dTTP Mix, 10x	1	μl
	DIG-dUTP, 10x (PCRDIG-Mix)	1	μl
	RNasin (20U/μl)	1	μl
	Primer1 (100pM)	3	μl
	Primer2 (100pM)	3	μl
	Mn(OAc)2 (10mM)	6	μl
	rTth (2.5U/μl)	2	μl
	DEPC-H <sub>2</sub> O	auf 50	μl

Per Schnitt: 50μl (1x ohne Primer als 2. negative Kontrolle)

- 50μl Mineral-Öl auf Reaktion-Mix zugegeben
- Objektträger auf PCR Block gelegt
- „One Step“ RT-PCR durchgeführt

RT-PCR Programm	1. Umschreibung	62°C	für	45	min
	2. Denaturierung	94°C	für	3	min
	3. Denaturierung	94°C	für	90	sec
	4. Primeranlagerung	62°C	für	90	sec
	5. Kettenverlängerung	68°C	für	2	min
	6. Schritte 3. – 5.			30	Zyklen
	7. Abbruch	15°C	für	---	
	8. Ende				

- Objektträger in 0.1x SSC (/0.1% BSA) bei 60°C für 15 min gewaschen
- Anti-DIG-AP Konjugat 1:100-150 (in 1M Tris, pH7.5 /0.1M NaCl) zugegeben und bei 37°C in feuchter Kammer für 30-60 min inkubiert.
- 10μl NBT/BCIP Stammlösung werden mit 1 ml 1M Tris, pH9.5/1 M NaCl

versetzt, danach per Schnitt 50-100 µl zugegeben.

- 5-15 min Inkubation bei 37°C oder RT
- mit Aqua dest. spülen
- Eindeckeln mit Kaisers Glycerin-Gelatine

### **3.12.2 Isolierung von DNA**

Genomische DNA wird mit der Phenol/Chloroform Methode (Sambrook, J. et al., 1989) aus Zellkernen extrahiert. Dazu wird vorher ein RNA-Verdau mit RNaseA (20 µg/ml Endkonzentration) für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt, und der Ansatz mit Proteinase K (50 µg/ml Endkonzentration) und SDS (0.25%) über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Probenvolumen wird mit 1 x TE auf 100 µl aufgefüllt, zweimal mit einem Volumen Phenol und einmal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Die entstehenden Phasen werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 12000 g getrennt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 3 Volumen -20°C-kaltem 100 % Ethanol wird die DNA für mindestens eine Stunde bei -20°C ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 17000 g für 20 Minuten bei 4°C wird die DNA pelletiert und kann anschließend in 100 µl 10 mM Tris / HCl, pH > 7.0 resuspendiert werden. Lagerung der DNA-Lösung ist bei 4°C möglich.

### **3.12.3 Präparation von RNA**

Die vollständige RNA-Isolierung aus Kulturzellen erfolgte mittels der TRIzol-Methode (Gibco) modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Das zu untersuchende Gewebe wurde mit TRIzol-Reagenz im Verhältnis 100 mg Gewebe/ml TRIzol mit einem Ultraturrax (Ika-Werk, Janke & Kunkel, Staufen) bei max. 200 rpm auf Eis homogenisiert und nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform / ml TRIzol<sup>TM</sup> mit 12000 x g bei RT 5 min zentrifugiert. Man erhält auf diese Art drei Phasen: Eine obere wässrige Phase mit Gesamt-RNA, eine mittlere weißliche Phase, die Proteine enthält und eine untere rötliche Phase mit der genomischen DNA. Der farblose Überstand wurde nochmals mit Chloroform extrahiert und, wie oben erwähnt, zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase erneut abgenommen, mit 0,5 ml Isopropanol / ml TRIzol versetzt und 30 min auf Eis stengelassen. Es folgte die Zentrifugation der gefällten RNA mit 12000 x g bei 4°C, 15 min und die

anschließende Aufnahme in 50 µl autoklaviertem Millipore-Wasser (mit 30 Einheiten RNasin, Perkin Elmer, Langen).

### **3.12.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

DNA, RNA und Oligonukleotide wurden durch photometrische Messung bei 260 nm quantifiziert. Gleichzeitig gab der Quotient von 260/280 nm Hinweise auf den Reinheitsgrad der Präparation. Eine saubere Präparation sollte einen Quotient zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen. Bei einer optischen Dichte von 1 in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm, liegen 50 µg/ml doppelsträngige DNA vor, 40 µg/ml einzelsträngige DNA oder RNA und 33 µg/ml Oligonukleotid.

### **3.12.5 Herstellung von Zellysat**

Zur biochemischen Untersuchung der Proteinexpression war es notwendig, die Zellen zu lysieren. Hierzu wurden die Kulturflaschen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mechanisch mit einem Zellschaber in wenig PBS abgelöst. Durch Zentrifugation (1 min, 5000 rpm) wurde das PBS abgetrennt und die pelletierten Zellen entweder zur Lagerung bei -80°C eingefroren oder zur sofortigen Verwendung in Lysepuffer resuspendiert (50 µl Zellen auf 250 µl Lysepuffer). Die Suspension wurde durch Zentrifugation (60 min, 10.000 rpm. bei 4°C) von Zelltrümmern abgetrennt und der klare Überstand für die folgenden Experimente weiterverwendet.

### **3.12.6 Quantifizierung von Proteinen**

Die photometrische Bestimmung von Proteinen erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Das Biorad Reagenz wurde 1:5 verdünnt und je 1 ml zu 1 bis 10µl der zu bestimmenden Probe, bzw. zu 1 bis 12 µg eines BSA-Proteinstandards gegeben und die Lösung bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde aufgrund der Eichgeraden des BSA-Standards berechnet.

### **3.12.7 PCR und RT-PCR**

Die Polymerasekettenreaktion, abgekürzt PCR (polymerase chain reaction), ist eine Methode, die die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte ermöglicht. Die Voraussetzung für eine gezielte Anreicherung eines DNA-Abschnittes ist die Kenntnis flankierender Sequenzbereiche. Diese Bereiche dienen der Anlagerung synthetisch hergestellter Oligonukleotide, die der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase ein freies 3'-OH Ende anbieten, an dem die DNA Elongation startet.

Durch zyklische Wiederholungen des Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Polymerisierungsschrittes wird eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erzielt. Die Reaktionsansätze umfaßten ein Volumen von 50 µl und setzten sich folgendermaßen zusammen:

Template-DNA (1–200 ng)	x	µl
Sense Oligonukleotide (0,01 pmol/µl-100 pmol/µl)	1	µl
Antisense Oligonukleotide (0,01 pmol/µl-100 pmol/µl)	1	µl
dNTP (2,5 mM pro dNTP)	2	µl
Magnesiumchlorid (10 mM)	1-3	µl
10x PCR Puffer	5	µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0.2-1	µl

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermoblock nach folgendem Basisprogramm durchgeführt:

1	Denaturierung	94 °C	120	sec
2	Denaturierung	94 °C	30	sec
3	Primeranlagerung	55 °C	45	sec
4	Kettenverlängerung	72 °C	60	sec
5	2. - 4. 20-35 Zyklen			
6	Kettenverlängerung	72 °C	300	sec
7	Abbruch	15°C	---	---

Die Reaktionsprodukte wurden schließlich in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die RT-PCR ist die empfindlichste Technik, um die Gegenwart oder Abwesenheit von RNAMolekülen zu bestimmen. Außerdem ermöglicht die RT-PCR die Klonierung von seltenen Transkripten ohne die Notwendigkeit, eine cDNA Bibliothek zu konstruieren.

**Die 2-Schritt-Methode:** Die cDNA-Synthese wird mit Reverser Transkriptase in einem ersten Schritt durchgeführt. Anschließend wird durch Zugabe einer entsprechenden thermostabilen Polymerase die entstandene cDNA amplifiziert.

**Die 1-Schritt-Methode:** cDNA-Synthese und PCR werden in einem optimierten Puffer und mit einem entsprechenden Enzym zwar nacheinander, aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien durchgeführt. Die Zweischritt-Methode hat den Vorteil, daß man zuerst cDNA herstellt und dann noch in der eigentlichen PCR variieren kann. Dafür muß man das Reaktionsgefäß öffnen und entsprechende Reagenzien hinzugeben. Die hierbei auftretenden Fehlerquellen werden durch die Einschritt-Methode vermieden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die 1-Schritt-Methode verwendet.

### 3.12.8 Gelelektrophorese

#### 3.12.8.1 DNA-Agarosegele

Eine Trennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde sowohl für analytische Zwecke als auch für präparative DNA-Isolierungen in 0,5x TBE-Puffer durchgeführt. Die Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8 bis 2 % in 0,5x TBE aufgekocht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Etbr) versetzt und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in eine Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen.

Aufgrund der negativen Ladungen werden DNA-Fragmente in Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid ermöglicht dann die Darstellung der aufgetrennten Nukleotidfragmente. Die planaren Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen die Basenpaare der Nukleotide und können durch kurzweiliges UV-Licht (260 nm) zur Emission von orange-rotem Fluoreszenzlicht (590 nm) angeregt werden.

#### 3.12.8.2 Polyacrylamidgele

Denaturierende SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen sind aus einem Sammel- und einem Trenngel aufgebaut. In dieser Arbeit wurden 10 bis 15% Polyacrylamidgele verwendet.

15% Trenngel	30 % Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung	15	ml
	1.5 M Tris-HCl, pH 8,8	7,5	ml

H <sub>2</sub> O	6,9	ml
10 % SDS	0,3	ml
10 % APS	0,3	ml
TEMED	0,012	ml

Nach dem Gießen wird das Gel mit Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberkante zu erhalten. Nach der Polymerisierung wird das Ethanol abgegossen und die verbleibende Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgenommen. Anschließend kann das Sammelgel gegossen werden.

4.9% Sammelgel	30 % Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung	1.3	ml
	1 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0	ml
	H <sub>2</sub> O	5.5	ml
	10 % SDS	0.08	ml
	10 % APS	0.08	ml
	TEMED	0.008	ml

Die Proben für die Gelelektrophorese werden mit SDS Gel-Ladepuffer versetzt und vor dem Auftragen für etwa 3 min bei 100°C gekocht. Der Gellauf erfolgt nun bei 25mA für etwa 1.5-2 h mit Tris-glycine SDS Puffer (Laemmli-Puffer) als Laufpuffer. Nach dem Gellauf können die Proteine durch Elektrobotten auf eine Membran überführt werden.

### 3.12.8.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose- oder Polyacrylamid-Gel wird das QIAEX II Gelextraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Die zu isolierenden DNA-Fragmente werden durch UV-Licht in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dieser Vorgang sollte nicht zu lange dauern, da die UV-Bestrahlung zur Schädigung der DNA führen kann. Das ausgeschnittene Gelstück wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt und gewogen. Die Extraktion der DNA erfolgt anschließend nach dem Protokoll der Firma Qiagen.

Zur Isolierung radioaktiver DNA-Fragmente aus Polyacrylamidgelen wurde das Gel in Plastikfolie eingeschlagen und nach fünfminütiger Autoradiographie des Gels das Fragment mit Hilfe des entwickelten Films detektiert und ausgeschnitten. Das isolierte Gelstück wurde zerkleinert in ein mit Glaswolle präpariertes, am Boden durchlöchertes Reaktionsgefäß gegeben und für zwei Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dem Auftauen wurde das Reaktionsgefäß in ein neues gestellt und für 5 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das gewonnene Eluat wurde Phenol/Chloroform-extrahiert, präzipitiert und gewaschen.

### **3.12.9 Northern blot-Analyse**

Northern-Blots dienen dem Nachweis einzelner RNAs mittels spezifischer Sonden. Dazu wird die RNA in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der Sonde hybridisiert.

#### **3.12.9.1 Formaldehyd-Agarosegel**

Die Trennung der RNA in Agarosegelen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Trennung von DNA. Der Geltrog wurde mit Tesafilm abgedichtet und der Kamm in die vorgesehene Stellung gebracht. Die fertig zusammengebaute Apparatur wurde dann mit 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  gefüllt und zur Inaktivierung der RNasen mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde alles mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült.

Drei Gramm Agarose wurden in 260 ml  $\text{H}_2\text{O}$  durch Kochen gelöst und auf  $50^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Anschließend wurden 30 ml 10x MOPS und 15,3 ml 37 % Formaldehyd unter dem Abzug zugefügt. Nach kurzem Mischen wurde das Gel gegossen. Zur Vorbereitung der Proben wurden Aliquots der isolierten RNA mit 20  $\mu\text{l}$  Probenpuffer versetzt und 15 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 1,5  $\mu\text{l}$  0,3% Ethidiumbromid zugefügt. Das polymerisierte Gel wurde mit 1x MOPS überschichtet und mit den Proben und zwei RNA-Größenmarker beladen. Die Trennung war nach ca. 2 h bei 90 V abgeschlossen. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert und zur Vorbereitung für ein Northern Blot 30 min mit 0,05 M NaOH äquilibriert.

#### **3.12.9.2 Transfer der RNA auf Nylonmembranen**

Durch die Kapillarkräfte wurde die RNA nun auf die Nylon-Membran übertragen, die dem Gel direkt auflag. Dabei diente 0.01N NaOH/3M NaCl als Transferpuffer. Die Zeit, in der die RNA vom Gel auf die Membran übertragen wurde, betrug 1 Stunde

(Thomas, 1980). Durch eine Behandlung mit dem 254 nm UV-Crosslinker bei 1.5 J/cm<sup>2</sup> für 105 sec wurde die DNA kovalent auf der Membran fixiert. Der Northern Blot wird wie folgt aufgebaut (Abb. 3-3):

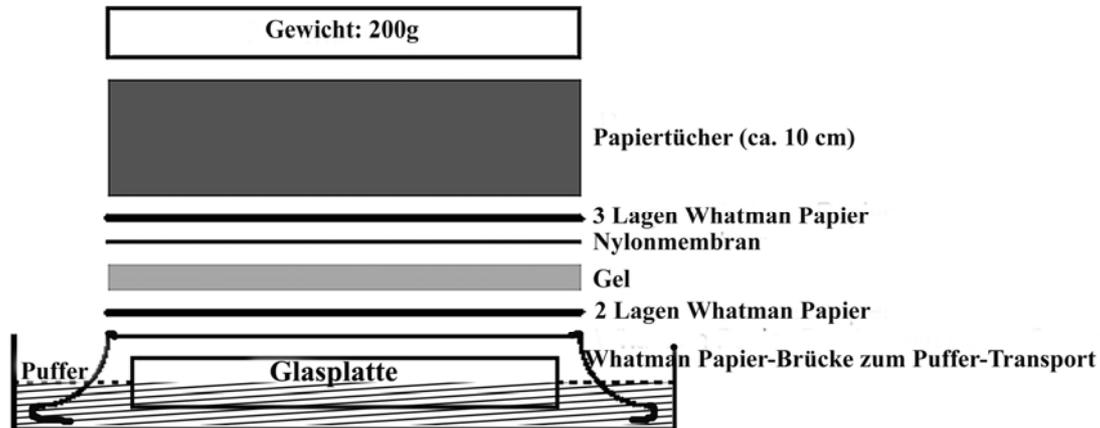


Abb. 3-3: Northern Blot Anlage

### 3.12.9.3 Northern Hybridisierung

Die Membran wird in einem verschlossenen Plastikbeutel für 2 Stunden bei 68°C in Hybridisierungspuffer (6×SSC, 2×Denhardt's reagent, 0.1% SDS, und 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA) prähybridisiert und äquilibriert.

Eine doppelsträngige DNA-Sonde wurde über [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP radioaktiv markiert (Feinberg & Vogelstein, 1983). Die Markierung wird mit dem Megaprime<sup>TM</sup>-labelling Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt, und die DNA-Sonde mit einer Aktivität von ca. 5-8x10<sup>8</sup> cpm/µg konnte zu einer Hybridisierung weiterverwendet werden. Bei der Verwendung von markierten DNA-Sonden wurde die Hybridisierungstemperatur unter die Schmelztemperatur gesetzt. Bevor die Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben wurde, wurde sie für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die hitzedenaturierte Sonde wurde auf Eis gestellt und dann zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei der angegebenen Temperatur. Am nächsten Tag wurde die nicht gebundene Sonde entfernt. Dazu wurde die Hybridisierungslösung verworfen, die Membran zweimal 5 min bei RT in 1 x SSC, 0.1% SDS gewaschen und danach für dreimal 10 min bei 68°C in 0.5 x SSC, 0.1% SDS. Danach wurde die Membran auf mit Plastiktüten beklebten Kartons ausgelegt und mit Haushaltsfolie abgedeckt. In einer

Expositionskammer wurde die Membran auf Kodak Biomax Filmen bei -80 °C für 1-5 Tage exponiert.

Der Film wurde mit dem ursprünglichen Gelfoto zur Deckung gebracht und auftretende Banden identifiziert. Semiquantitative Gelanalysen wurden densitometrisch mit Hilfe der Systemsoftware von BioSciTec (Marburg) durchgeführt.

### **3.12.10 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren**

NEP type II Promotor-Fragmente wurden über Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA als Template amplifiziert. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren gibt es viele Möglichkeiten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Fragmente gerichtet kloniert, so daß sich das zu klonierende Fragment in einer bestimmten Orientierung im Vektor befindet. Hierzu müssen sowohl im Vektor als auch in dem zu klonierenden Fragment durch Restriktionsenzyme verschiedene Enden hergestellt werden. Zusätzlich wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe eines käuflich erworbenen Reaktionssatzes (pPCR-Script) in den Vektor ligiert.

#### **3.12.10.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Alle Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Die zehnfach konzentrierten, bei -20°C gelagerten Puffer wurden kurz vor Gebrauch aufgetaut, 10 U des betreffenden Restriktionsenzym pro µg zu schneidender Plasmid-DNA und BSA in einer Endkonzentration von 0,1 µg/µl hinzugegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde so gewählt, daß die zugegebene Enzymlösung mindestens 1:10 verdünnt wurde. Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden nach Dephosphorylierung von Vektoren mit alkalischer Phosphatase gelelektrophoretisch aufgetrennt und zur weiteren Verwendung aus dem Agarosegel isoliert.

#### **3.12.10.2 Ligation von DNA in Plasmidvektoren**

Bei der Ligation von Vektor-DNA und dem zu klonierenden Fragment wurde dieses und die Vektor-DNA in bestimmten molaren Verhältnissen eingesetzt (Revie et al., 1988). Hierbei war es notwendig, zuvor auf einem Agarosegel die Konzentrationen von Vektor-DNA und dem zu klonierenden DNA-Fragment zu bestimmen. Für die

Ligation sollten Vektor und Fragment mindestens äquimolar eingesetzt werden, besser sollte jedoch das zu klonierende Fragment im Überschuß zu der Reaktion gegeben werden. In den meisten Ligationen wurde dabei ein Verhältnis von 1:2 oder 1:3 von Vektor zu Insert verwendet.

In den Ligrationsansatz wurde zu 50-100 ng dephosphoryliertem Vektor ein zwei - bis dreifach molarer Überschuß an zu klonierender Insert-DNA gegeben. Der Ansatz enthielt außerdem noch 0,1 VT 10x Ligationpuffer, sowie 1 Unit T4-Ligase. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Kryobad. Im Anschluß daran konnte eine Transformation von kompetenten Zellen mit dem Ligrationsansatz vorgenommen werden. Wurde er nicht sofort weiterverwendet, konnte er bei -20 °C eingefroren werden.

### **3.12.10.3 Ligation und Klonierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kits“**

Der "TOPO TA Cloning Kit" bietet eine spezielle Möglichkeit, um PCR-Fragmente ohne Blunt-Reaktion, Dephosphorylieren des Vektors oder DNA-Aufreinigung über ein Gel in den PCR-Script Vektor zu klonieren. Der Reagenziensatz zeichnet sich durch eine hohe Klonierungseffizienz aus.

Bei dieser Methode wird das PCR-Fragment direkt in die Ligation mit dem Vektor gegeben. Dieser ist schon geschnitten und wird durch eine Topoisomerase an der Religation gehindert. Bei der Ligation löst sich die Topoisomerase innerhalb weniger Minuten und das Fragment ligiert mit dem Vektor.

Die einzigen Voraussetzungen für diese Art der Klonierung sind eine hohe DNA - Konzentration und PCR - Fragmente mit überhängenden Enden.

PCR-Fragmente, die mit Taq-Polymerase erstellt wurden, tragen ein zusätzliches Adenosinnukleotid, das die Polymerase an die generierten PCR-Enden anhängt. Bei Pfu-Polymerase geschieht dies nicht. Diese Polymerase beendet ihre Aktivität immer ohne Überhänge. In diesem Versuch können entweder Pfu-generierte Fragmente verwendet werden, oder PCR - Fragmente, die mit Pfu - Polymerase poliert wurden. Dabei wird das überhängende A entfernt und die Fragmente liegen ebenfalls „blunt-end“ vor.

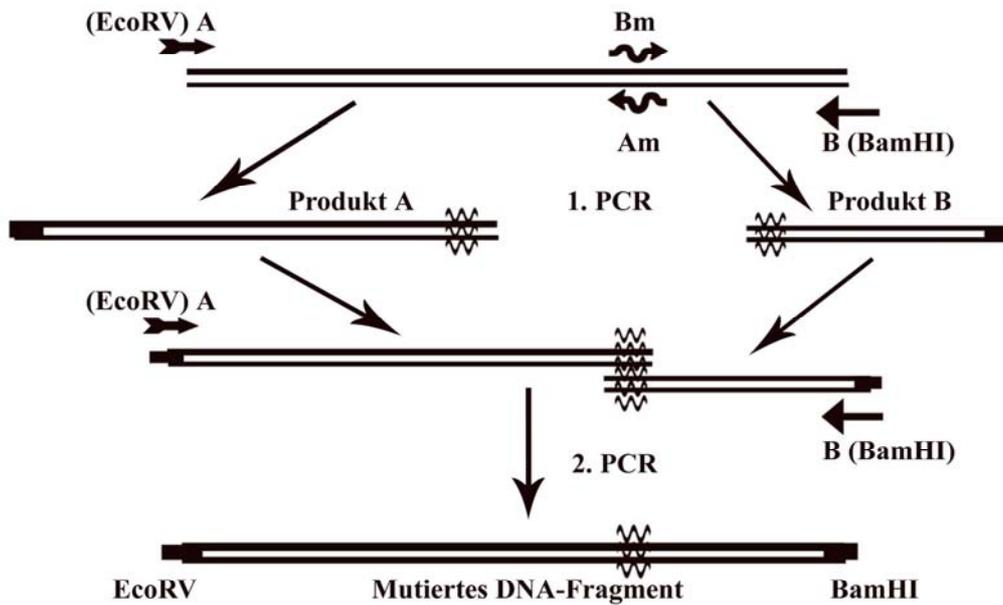


Abb. 3-4: PCR-vermittelte Mutagenese

#### 3.12.10.4 PCR-vermittelte in vitro-Mutagenese

Mutationen wurden über PCR-vermittelte Mutagenese eingeführt (Klug et al., 1991; Good & Nazar, 1992). Für jede Mutante wurden jeweils vier Oligonukleotide benötigt. Zwei Oligonukleotide bestimmten das 5'- (A) und das 3'- Ende (B) des mutierten Fragments, und durch zwei überlappende Oligonukleotide (Am, Bm) wurde die jeweilige Veränderung der DNA-Sequenz eingeführt (Abb. 3-4). Das 5'-Oligonukleotid führte eine EcoR V- Schnittstelle, das 3'-Oligonukleotid eine BamH I- Schnittstelle in das PCR-amplifizierte Fragment ein. Für die erste PCR wurden die Oligonukleotide A, B, Am, und Bm so gewählt, daß der hybridisierende 3'-Bereich eine T<sub>m</sub> (Schmelztemperatur) von ca. 60°C aufwies. Gleichzeitig wurden die Oligonukleotide Am und Bm so gewählt, daß die entstehende Überlappung in der zweiten PCR ebenfalls eine T<sub>m</sub> von ca. 60°C aufwies. Die Produkte der ersten PCR wurden durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, das Produkt der zweiten PCR über eine QIAquick Spin Column (Qiagen, Hilden). Alle PCRs wurden in einem PTC-200 DNA Engine thermal cyler (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) mit PfuTurbo™ Polymerase für 30 Zyklen, 30 sec bei 94°C, 40 sec bei 58°C und 30 sec

bei 72°C und zum Ende 7 min bei 72°C durchgeführt. Die so generierten DNA-Fragmente wurden dann zur Klonierung der Reporter-Konstrukte eingesetzt.

### **3.12.10.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen**

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  wurde nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983), durchgeführt. Dabei wurde ein Aliquot des Stammes auf einer Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert, davon eine Einzelkolonie gepickt und wiederum über Nacht in 5 ml LB-Medium inkubiert. 1 ml von diesem Ansatz wurden in 250 ml SOB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0.5 $\pm$ 0.1 bei 200 rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde dann für 3 min auf Eis geschwenkt und anschließend 15 min bei 4°C, 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 2x50 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und in gleicher Weise zentrifugiert. Es erfolgte eine Resuspendierung in 15 ml eiskaltem 0,1 M TB mit 1050  $\mu$ l DMSO (7% v/v). Daraufhin wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert, in Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.12.10.6 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Die Transformation der *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  wurde mit Plasmiden durchgeführt. Dabei wurde der Ligationsansatz (ca. 25 bis 50 ng Plasmid-DNA in 10 $\mu$ l 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5) mit 50  $\mu$ l kompetenten Bakterien versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock von 90 sec bei 42°C und Abkühlung von 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l SOC-Medium inkubierte der Ansatz für 45 min bei 37°C. Anschließend wurden aufsteigende Mengen (z.B. 10, 50 und 100  $\mu$ l) auf LB<sub>amp</sub>-Platten (LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten die sichtbaren Kolonien für Minilysate verwendet werden. Die erzielte Transformationseffizienz betrug zwischen 1x 10<sup>6</sup> bis 10<sup>8</sup> Kolonien pro  $\mu$ g DNA.

### **3.12.10.7 Analytische Lysate**

Zur Analyse von transformierter DNA im Restriktionsverdau wurden einzelne Kolonien gepickt und „Übernacht“-Kulturen in 10 ml LB<sub>amp</sub> angesetzt. Die Hälfte des Ansatzes wurde bei 5000 rpm zentrifugiert und anschließend Minilysate mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers angefertigt. Im Falle eines

positiven Restriktionsverdau konnte die andere Hälfte des Ansatzes für die präparative Plasmidgewinnung verwendet werden.

### **3.12.11 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur präparativen Plasmidgewinnung wurde ein Aliquot einer „Übernacht“-Kultur in 500 ml LB<sub>amp</sub> überimpft und bei 200 rpm für 16-20 h inkubiert. Das durch Zentrifugation bei 5000 rpm über 20 min gewonnene Pellet wurde mit Hilfe des Plasmid-Präparationskits (Nucleobond®AX Kit PC 500) bei Raumtemperatur aufgearbeitet. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 250 µl TE-Puffer, pH8 aufgenommen und restriktionsenzymatisch kontrolliert.

### **3.12.12 Transiente Transfektion**

Das Einführen von DNA in eukaryonte Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Bei der transienten Transfektion soll es dabei zu einer vorübergehenden Expression des fremden Gens kommen. Der Nachweis der Genexpression nach der Transfektion kann dabei mit Hilfe des Luciferase-Reportergens (pGAW) erfolgen, das hinter die NEP-Promotorsequenzen kloniert wurde. Unterschiede der Transfektionseffizienz wurden durch Kotransfektion mit dem Kontrollplasmid pSV-β-Gal (pCH110), welches NEP exprimiert, kontrolliert und normalisiert. Als Negativkontrolle diente das promotorlose Luciferaseplasmid (pGAW). Als Positivkontrolle diente der Vektor pRSV-Luc, der ein hinter den SV40-Promotor geschaltetes Luciferasegen enthält und so zur Kontrolle der Transfektionseffizienz dient.

#### **3.12.12.1 Calcium-Phosphat-Methode**

Bei der Zelllinie LNCaP führte die Calcium-Phosphat-Methode (Jordan, 1996) zu einer guten Transfektionseffizienz. Die Zellen in gewünschter Dichte ( $1-4 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) wurden in Falcon 50 ml Gewebekulturflaschen in DMEM Medium plus 10% FCS ausgesät, daß sie am nächsten Tag zu 70% konfluent waren. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Je Flasche wurden 5 µg Plasmid-DNA und 0.5 µg pSV-β-Gal.-Plasmid in 250 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung in einem Röhrchen gemischt und langsam in ein zweites Röhrchen mit 250 µl 2x HeBS überführt. Dieser Ansatz wurde 1 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann in die inzwischen mit DMEM-Medium versehenen Flaschen gegeben. Nach der Addition der Calcium-Phosphat-DNA-Co-Präzipitat wurde 100 mM Chloroquin mit End-Konzentration 0.1 mM vorsichtig direkt in Kulturflaschen verdünnt, und für 4 h im Brutschrank

inkubiert. Nach der Inkubation wurden das Medium abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit 1×PBS vorsichtig gewaschen und mit 1.5 ml/Flasche 15% Glycerol/1×HeBS bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1×PBS vorsichtig gewaschen und je Flasche 5 ml von vorgewärmtem Komplette-Medium (mit oder ohne Hormone) wurden gegeben, dann wieder im Inkubator bei 37°C für 48 h inkubiert.

### 3.12.12.2 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen dreimal mit 1×PBS gewaschen und durch Zugabe von 350µl Lysispuffer lysiert. Das Lysat wurde in 1,5ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg), die auf Eis gestellt wurden, überführt (nach diesem Schritt ist eine Lagerung über Nacht bei -80°C möglich) und anschließend 5min bei 13.000UpM und 4°C abzentrifugiert. Für jede Luciferinreaktion wurden 100µl des Überstandes zu 360µl Luziferase-Reaktionspuffer in Polystyrolröhrchen (Greiner, Nürtingen) pipettiert. Die Messung erfolgte im Luminometer Typ AutoLumat LB 953 (Berthold, Wildbad), in dem automatisch vor jeder Messung 100µl Luziferinlösung zur Probe injiziert wurden. Dabei wurde das Integral der Lumineszenz über ein Intervall von 10ms gemessen.

**Lysispuffer:** 25mM Glyzylglyzin (Sigma, Deisenhofen) pH 7.8 (mit 4M KOH eingestellt), bei -20°C / 4°C lagern, 1% (v/v) Triton X-100, 15mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM EGTA, pH 8.0, bei 4°C lagern, 1mM DTT (kurz vor Gebrauch zugeben)

**Luciferase-Reaktionspuffer:** 25mM Glyzylglyzin, pH 7.8, 15mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.8, 15mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM EGTA, pH8.0, 2mM ATP, bei 4°C lagern, 1mM DTT (kurz vor Gebrauch zugeben)

**Luziferin-Meßlösung:** 0.2mM D-Luciferin (kristallin, Sigma, Deisenhofen), Stocklösung: 1mM D-Luziferin, 25mM Glyzylglyzin, 10mM DTT, bei -80°C lagern, 25mM Glyzylglyzin, pH7.8, 1mM DTT, sofort verwenden und vor Licht schützen.

### 3.12.12.3 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Als interner Standard wurde das pSV-β-Gal.-Plasmid kotransfiziert. 40 µl Überstand aus der Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde mit 60 µl ONPG sodium phosphate solution (4 mg/ml) und 250µl Puffer Z für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gegeben und die Lösung bei 420 nm im Photometer gemessen.

**Buffer Z:** 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaHPO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM β-Mercaptoethanol, pH 7.8.

### 3.12.13 Herstellung von Kernextrakten

Die auf diese Weise hergestellten Extrakte konnten sowohl für Gelretardations-Experimente als auch für DNaseI-Footprint-Reaktionen verwendet werden (Dignam et al., 1983). Die geernteten, dreimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschenen, bei 1500 rpm für 5 min pelletierten Zellen wurden in 5-fachem Zellvolumen Puffer A resuspendiert, auf Eis für 10 min inkubiert, anschließend bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die aufgeschwollenen Zellen wurden nun in 2-fachem Zellvolumen Puffer A aufgenommen und durch mechanische Beschädigung lysiert. Die Kerne wurden daraufhin bei 12000 rpm in dickwandigen Zentrifugenröhrchen für 1 min pelletiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Kernpellet wurde dann in 1-fachem Pelletvolumen Puffer C resuspendiert und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14.500 rpm in dickwandigen Zentrifugenröhrchen wurde der proteinhaltige Überstand zweimal gegen Puffer D für 2 h dialysiert. Anschließend wurden die gewonnenen Kernproteine in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

**Buffer A:** 10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF

**Buffer C:** 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF

**Buffer D:** 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF

### 3.12.14 DNase I Footprint

Die DNase I Footprint-Technik ermöglicht die genauere Aufklärung über die Kontaktregion eines sequenzspezifisch bindenden Proteins auf DNA-Ebene. Hierbei wird ein einseitig endmarkiertes DNA-Fragment einem partiellen Verdau durch DNase I ausgesetzt, so daß im Durchschnitt jedes DNA-Molekül nur einmal geschnitten wird. Bei anschließender Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt sich so eine Leiter aller möglichen Spaltprodukte dar. Werden vor der DNaseI-Behandlung spezifisch bindende Proteine mit der DNA inkubiert, so verhindert die Proteinbindung

an dieser Stelle den DNaseI-Verdau, und es kommt zum Fehlen von Banden. Eine parallel verlaufende Sequenzreaktion desselben DNA-Fragments ermöglicht die genaue Zuordnung der Kontaktregion.

### 3.12.14.1 Endmarkierung

Das die potenzielle Bindungsstelle enthaltene DNA-Fragment sollte nur an einem Ende markiert sein.

Um die 3'-Enden des oberen Strangs (NEP-Promotor, -379/+40) mit E.coli DNA-Polymerase I, welche im Gegensatz zum Holoenzym keine 5'-3' Exonukleaseaktivität aufweist (Klenow-Fragment, USB/Amersham, Braunschweig), nach der „random prime“-Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) in Gegenwart von dATP, dTTP, dGTP und [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP zu auffüllen, wurden zunächst 6 mg pGAW-Konstrukt mit Xho I für 40 min bei 37°C geschnitten und die 3'-Nische Stelle wurde anschließend durch das Klenow-Enzym mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP markiert. Vor der Verdauung mit dem zweiten Enzym EcoR I wurden Xho I und Klenow-Fragment bei 70°C für 10 min inaktiviert. Um die 3'-Nische Stelle des unteren Strang (NEP-Promotor, -379/+40) von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP zu auffüllen, wurden zunächst 6 mg TOPO pcrII-Konstrukt mit Xho I für 40 min bei 37°C geschnitten und die 3'-nische Stelle wurde anschließend durch das Klenow Enzym mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP markiert. Vor der Verdauung mit dem zweiten Enzym BamH I wurden Xho I und Klenow-Fragment bei 70°C für 10 min inaktiviert.

Das markierte DNA-Fragment wurde nach der Aufreinigung über die 5% native Polyacrylamidgel-Elektrophorese durch Einsatz von 10 $\mu\text{l}$  des Eluats für radioaktive Markierung nach folgendem Reaktionsansatz radioaktiv markiert:

DNA	6	$\mu\text{g}$
10 $\times$ Klenow-Reaktionspuffer	2	$\mu\text{l}$
Klenow-Fragment, 2U/ $\mu\text{l}$	1	$\mu\text{l}$
dNTP-Mix (je 10mM dATP, dGTP, dTTP)	1	$\mu\text{l}$
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP ( 50 $\mu\text{Ci}$ )	4	$\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	auf 20	$\mu\text{l}$

Messung von 1 µl Eluat im Szintillationszähler (Liquid scintillation counter, HP) bestimmt. Das fertig markierte DNA-Fragment wurde bei -20 °C tiefgefroren.

### 3.12.14.2 Sequenzierung, modifiziert nach Maxam-Gilbert

Um eine genaue Lage von Proteinbindungsstellen bei Footprintreaktionen zu erhalten, war die Herstellung einer Sequenzleiter, die nach der Maxam-Gilbert-Methode hergestellt wurde, notwendig. Da die NEP-Promotorsequenz des über PCR gewonnenen 419 bp großen Teilstücks bekannt ist, waren lediglich eine G-Modifizierung und Spaltung durchzuführen. Die Reaktionen setzen sich aus einem basenmodifizierenden Schritt (durch DMS, Hydrazin und Ameisensäure) sowie einem diese Modifikation spaltenden Schritt (durch Piperidin) zusammen. So kommt es pro DNA-Molekül im Durchschnitt zu einer Spaltung, und die auf diese Weise entstandene DNA-Population weist ein einheitlich markiertes und unterschiedlich basenspezifisch gespaltenes Ende auf. Die basenspezifischen Modifikationsreaktionen wurden nach folgendem Protokoll bei Raumtemperatur durchgeführt:

Reaktion	DNA	Reagenz	Reaktionszeit	Stopplösung
G	10 µl DNA (20.000 cpm)	1 µl DMS	3 min	50 µl DMS-Stopplösung
	200 µl TE Puffer			750 µl EtOH (100 %)

Nach Zugabe der Stopplösungen wurden die Proben bei 4°C für 15-30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Ethanol resuspendiert und wieder zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 100 µl 10% (v/v) Piperidin (frisch hergestellt) aufgenommen und für 30 min bei 90°C inkubiert. Es folgten eine weitere Fällung und eine anschließende Waschung der DNA. Das getrocknete Pellet wurde in 3 bis 6 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert und vor dem Laden des Sequenzgels bei 90°C für 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt (Maxam & Gilbert, 1977).

**DMS-Stopplösung:** 1 M β-Mercaptoethanol, 250 µg/ml Hefe-tRNA, 1,5 M NaOAc, pH 7.0

### 3.12.14.3 Bindungsreaktion und DNase I Verdau

Zur Identifikation der Bindungsstelle wurden die Proben mit und ohne Kernextrakt angesetzt.

Markierte DNA	$7 \times 10^4$	cpm
Poly (dI-dC)	2	$\mu\text{g}$
Kernextrakt	30	$\mu\text{g}$
1x Bindungspuffer	auf 25	$\mu\text{l}$

Die Proben wurden für 20 Min bei RT inkubiert. Nach Zugabe der DNase I (20 ng und 40 ng verdünnt in 1x Bindungspuffer ) wurde 1 min lang bei 20°C verdaut und die Reaktion mit 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung gestoppt. Nach der Inkubation bei 45°C für 40 min die Reaktionsansätze wurden zum Entfernen der DNase I dreimal mit Phenol / Chloroform gereinigt und anschließend mit Ethanol gefällt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und vor dem Beladen des Gels aufgetaut und mit 5-10  $\mu\text{l}$  Formamid-Ladepuffer gemischt.

#### 3.12.14.4 Sequenziergelelektrophorese

Um die für das Sequenziergel benötigten Glasplatten von Fett, Staub und Seifenresten zu befreien, die ein gleichmäßiges Gießen des Gels behindern könnten, wurden diese nacheinander mit 20% SDS, Aceton, destilliertem Wasser und 70% Ethanol gereinigt. Die Platte wurde einmal mit 5 ml hydrophobe Repell-Silane beschichtet, was eine spätere Ablösung der Platte vom Gel wesentlich erleichterte. Die so vorbereiteten Platten wurden seitlich mit Spacern abgedichtet und mit Klammern befestigt.

Gelansatz für ein 6% Polyacrylamidgel:

Harnstoff	42	g
40 % Acrylamid/Bisacrylamid	15	ml
5x TBE	20	ml
H <sub>2</sub> O	29.7	ml
APS (10 % in H <sub>2</sub> O)	200	$\mu\text{l}$
TEMED	20	$\mu\text{l}$

Die Lösung wurde gut gemischt und zwischen die horizontal liegenden Glasplatten gegossen. Das Gel war nach ca. 2 h polymerisiert und konnte so zur späteren Verwendung bis zu eine Woche bei 4°C gelagert werden. Für die Elektrophorese

wurde das Acrylamidgel vertikal in die Vertikal-Gelapparatur eingespannt und die Kammer mit 0,6x TBE-Puffer befüllt. Nach einem Vorlauf von 30 min. bei 50°C, während dem die Spannung durch das Spannungsgerät (Feathervolt; Stratagene, Heidelberg) temperaturabhängig gesteuert wurde (nach Erreichen von 50°C bei ca. 3800 V), wurden die Proben für 3-5 min bei 90°C denaturiert, in die markierten Slots aufgetragen und das Gel für weitere 1 – 1,5 h laufen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Glasplatte entfernt, das Gel auf Whatmann-Papier transferiert und mit einem Gel-Trockner (BioRad, München) für ca. 60 min bei 80°C getrocknet.

Das trocknete Gel wurde in den “phosphorimage screen” für 12 h gelegt und mit dem Fuji Phosphorimager FLA3000G (Raytest, Straubenhardt) analysiert.

**2×Bindungspuffer:** 20 mM HEPES-KOH, pH 7.9 (critical), 17% Glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA and 0.4 mM DTT

**DNase I Stopplösung:** 20 mM Tris, pH 7.6, 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 100 ng / ml Glycogen, 100 µg / ml Proteinase K

### 3.12.15 Gelretardations-Experimente (EMSA)

Zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen wurden radioaktiv markierte doppelsträngige Oligonukleotide mit verschiedenen Kernextrakten sowie unspezifischer Kompetitor-DNA (hier poly – dI / dC) inkubiert und über Gelelektrophorese aufgetrennt. An Proteine gebundene DNA wandert dabei langsamer als freie DNA und erscheint als Bande, deren Lage durch Größe, Ladung und Struktur des Bindungskomplexes bestimmt wird. Die Bindungsspezifität der Proteine wurde durch Kompetition der Komplexbildung durch Zugabe von nicht markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden im Überschuß überprüft.

#### 3.12.15.1 Oligonukleotide

Von den zu verwenden Oligonukleotiden wurden jeweils 2.5 µg des einzelsträngigen Oligonukleotids („Top“- bzw. „Bottom-Strand“-Oligonukleotid) eingesetzt, 100µl Annealing-Puffer hinzugefügt und 5 min bei 95°C inkubiert. Hierauf folgte eine 2 h Abkühlung bei RT. Zur radioaktiven Markierung mit [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP und Klenow-Fragment wurden ca. 50 ng Oligonukleotid-Duplexe verwendet und danach mit Nick<sup>TM</sup> Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt.

### **3.12.15.2 Bandshifts und Supershifts**

3 µg Kernextrakt nach Dignam et al. (1983) wurden auf Eis aufgetaut und so in 1×Bindungspuffer pipettiert, daß bei einem Endvolumen von 20 µl folgende Konzentrationen vorlagen: 10 mM HEPES-KOH, pH 7.9 (critical), 8.5% Glycerol, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM DTT und 0.5 µg poly dI / dC. Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend das markierte Oligonukleotid hinzugegeben (20.000 cpm pro Ansatz) und nochmals 10 bis 20 min auf Eis inkubiert. 50 ng unmarkierte Oligonukleotide wurden als Kompetitor-DNA verwendet (50 bis 100 facher Überschuß). Danach wurden die Proben mit je 3 µl Ladepuffer auf ein inzwischen bei 20 mA vorgelaufenes 4% native Polyacrylamide EMSA-Gel (0,5x TBE) aufgetragen und ca. 2 Stunden bei 40°C aufgetrennt (Bromphenolblau am unteren Ende des Gels). Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

Zum genauen Nachweis, um welche Protein-DNA-Komplexe es sich bei den Bandshifts handelt, wurden bei ähnlichem Versuchsaufbau zusätzlich polyklonale Antikörper mitinkubiert (Supershifts). Es standen polyklonale Antikörper gegen NF-Y und die Zinkfingerproteine Sp1, Sp3 zur Verfügung (Prof. Dr. G. Suske, Dr. J. Klug, IMT, Marburg). Durch die zusätzliche Bindung der Antikörper an die Protein-DNA-Komplexe verändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Bandenhöhe.

**Annealing buffer:** 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 30 mM KCl

## **3.13 Immunologische Methoden**

### **3.13.1 Western Blot-Analyse**

Im Western-Blot werden die Proteine oder Zellysate nach der Elektrophorese mittels Elektroblothing bei 140 mA für 90 min (Fastblot B33, Biometra, Göttingen) auf eine Nitrocellulose-Transfermembran (ECL nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert. Die nächsten Schritte dienen dem Nachweis des NEP-Proteins auf der Membran. Dafür wurden zuerst über 2 h unspezifische Bindungen mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Becton Dickinson) in PBS bei RT auf dem Schüttler blockiert. Dann erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit polyklonale NEP-Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg) in 5% Magermilchpulver. Nichtgebundener Antikörper wurde mit PBS entfernt und die Membran mit ECL

Detection Reagenz (1:1 / Reagenz 1 und Reagenz 2) für 60 sec (Amersham Biosciences, Freiburg) behandelt. Danach wurde die Membran mit Haushaltsfolie abgedeckt. In einer Expositions-kammer wurde die Membran auf Kodak Biomax Filmen für 1-15 min exponiert.

### **3.14 Computerprogramme für Grafikbearbeitung, Biologische Analyse und Statistik**

#### **Grafikbearbeitung:**

Photoshop v.7.01	Adobe. USA
FreeHand MX v.11	Macromedia. USA
Corel Graphics Suite v.11	Corel Inc. USA

#### **Biologische Analyse:**

DNASStar Lasergene v5.01	DNASStar. Inc. USA
GELSCAN 3D v2.5	BioSciTec. Deutschland
Oligo v6.65	Molecular Biology Insights. Inc. USA
SimVector v2.01	Premier Biosoft. Canada

#### **Statistik und Grafik:**

STATISTICA v6.0	StatSoft. Inc. USA
-----------------	--------------------

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Lokalisation der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen und Prostatagewebe**

Um zu prüfen, ob Unterschiede in der NEP-Verteilung in der normalen und der pathologisch veränderten Prostata als auch in der Prostatazellen bestehen, wurde die NEP-Lokalisation mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz - Methode an Prostatazellen und Paraffinschnitten der humanen Prostata untersucht. Bei den Negativkontrollen, die durch Weglassen des Primärantikörpers durchgeführt wurden, war keine Immunreaktion zu erkennen.

#### **4.1.1 Verteilung der NEP in der normalen adulten Prostata**

In der normalen adulten Prostata, wurde die NEP hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran detektiert. Weder die Basalzellen noch die neuroendokrinen Zellen zeigten eine Immunreaktivität mit dem NEP-Antikörper. Im Stroma wurden die Endothelzellen der Kapillaren und einige glatte Muskelzellen schwach gefärbt. Mit dem PSA-Antikörper sind alle Schnitte markiert (Abb. 4-1).

#### **4.1.2 Verteilung der NEP bei benigner Prostatahyperplasie (BPH)**

In hyperplastischen Drüsen war die Immunreaktivität der NEP in den adluminalen Zellen an der apikalen Plasmamembran nachzuweisen. Im Stroma wurden auch die Endothelzellen der Kapillaren und glatte Muskelzellen gefärbt. Mit dem Myosin-Antikörper, wurden die zahlreichen hyperplastischen glatten Muskelzellen deutlich gezeigt (Abb. 4-2).

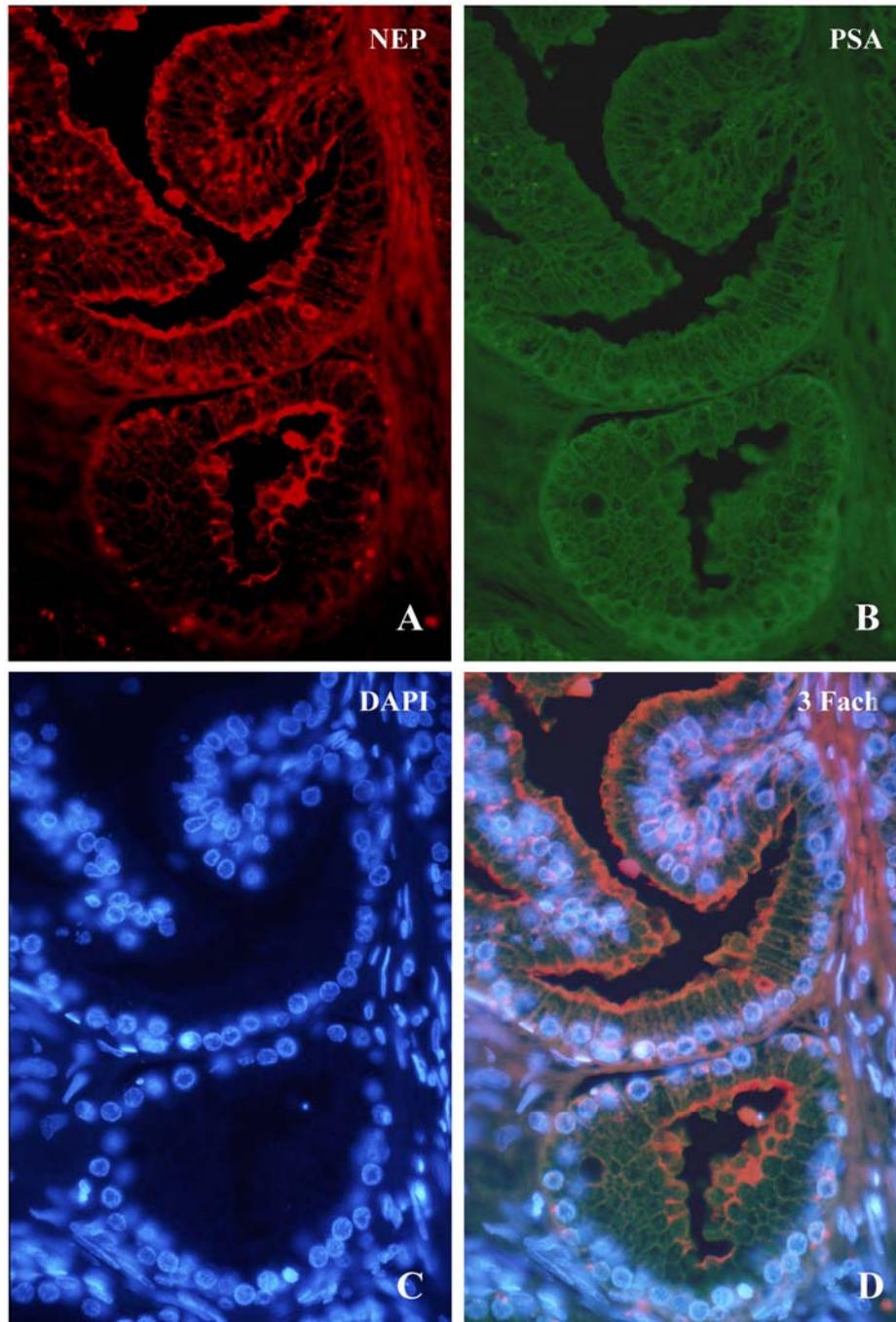


Abb. 4-1: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung der NEP und PSA in der normalen adulten Prostata. Mit dem NEP-Antikörper, ist die apikale Plasmamembran der glandulären Zellen sehr stark positiv, im Stroma werden die Endothelzellen der Kapillaren und einige glatte Muskelzellen schwächer gefärbt (A). Mit dem PSA-Antikörper zeigte sich der Drüsenzellen das supra-nukleäre und apikale Cytoplasma markiert. Das Stroma und die Basalzellen waren nicht markiert (B). Die Zellkerne sind mit DAPI markiert (C), (D) ist eine dreifach-Aufnahme. (400×)

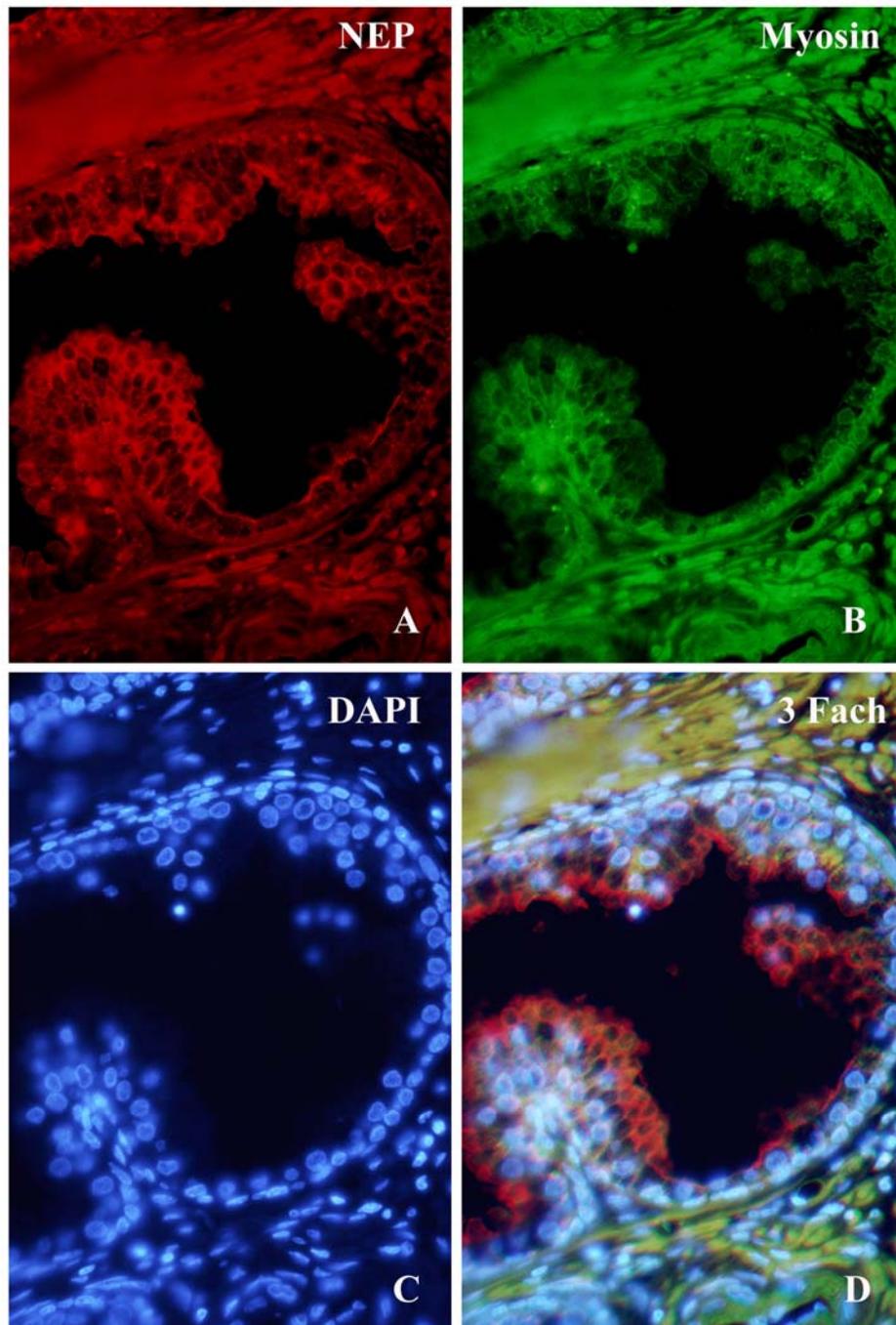


Abb. 4-2: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung der NEP und Myosin bei benigner Prostatahyperplasie (BPH). Die apikalen Plasmamembran der adluminalen Zellen sind stark positiv, viele glatte Muskelzellen reagieren schwacher positiv (A). Mit dem Myosin-Antikörper, wurden die zahlreichen hyperplastische glatten Muskelzellen deutlich dargestellt (B). Die Zellkerne sind mit DAPI markiert (C), (D) ist eine Dreifach-Markierung. (400×)

### **4.1.3 Verteilung der neutralen Endopeptidase beim Prostatakarzinom**

Im Prostatakarzinom war meist eine generalisierte Immunreaktivität der Zellen vorhanden und die NEP war nicht auf die apikale Plasmamembran beschränkt. Sie verteilte sich vielmehr im gesamten Zytoplasma und ist damit offensichtlich ein Indikator für den Polaritäts- bzw. Differenzierungsverlust in anaplastischen Prostatakarzinomzellen. Die adluminalen Zellen zeigten eine sehr starke Immunreaktivität mit dem PSA-Antikörper (Abb.4-3).

### **4.1.4 Immunhistochemischer Nachweis der neutralen Endopeptidase in epithelialen und stromalen Prostatazellen**

Die Expression der NEP auf der Oberfläche von LNCaP und hPCPs Zellen wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die LNCaP zeigten eine intensive Färbung der Plasmamembran, das gesamte Zytoplasma wurde schwächer gefärbt, während die hPCPs nach Inkubation mit dem Antikörper nur eine schwache Reaktion in Zytoplasma aufwiesen. Die Zellkerne sind negativ (Abb. 4-4).

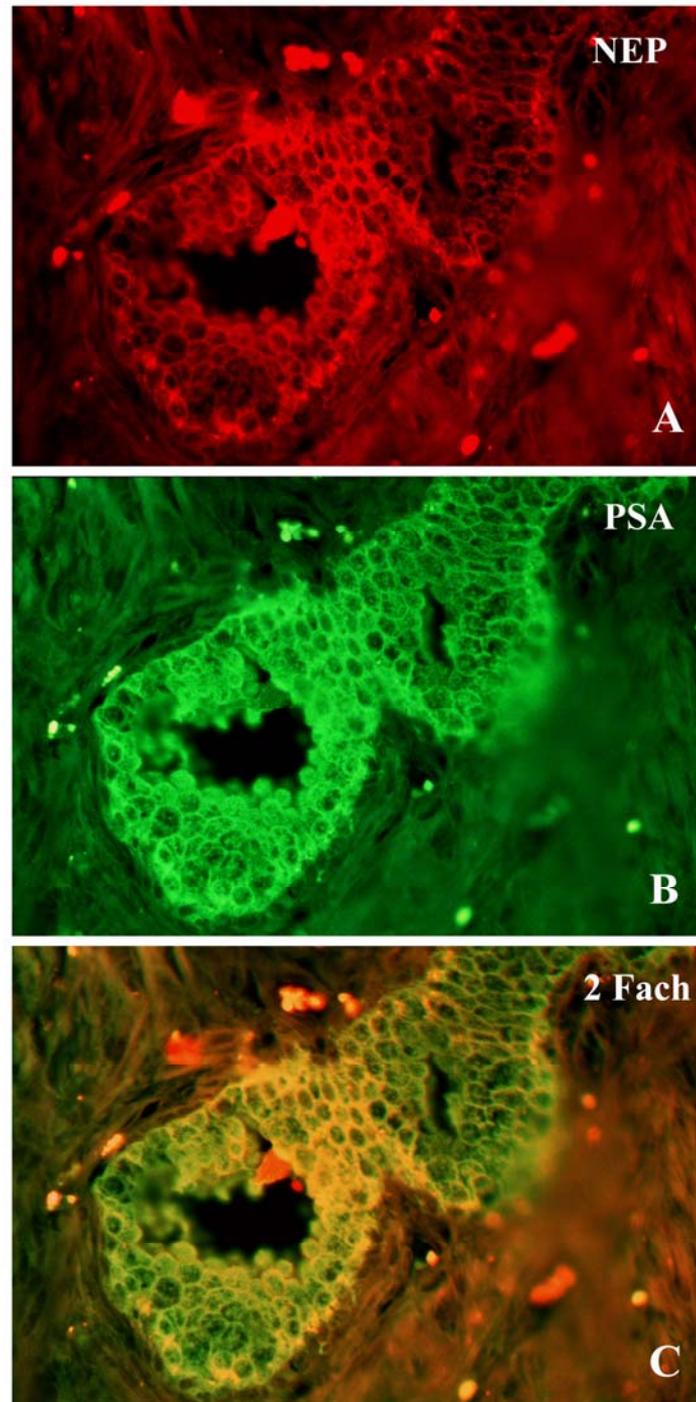


Abb. 4-3: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung der NEP und PSA beim Prostatakarzinom. Plasmamembran und das gesamte Zytoplasma sind immunreaktiv (A). Die adluminalen Zellen zeigten eine sehr starke Immunreaktivität mit dem PSA-Antikörper (B), (C) ist eine Doppelexposition (400 $\times$ )

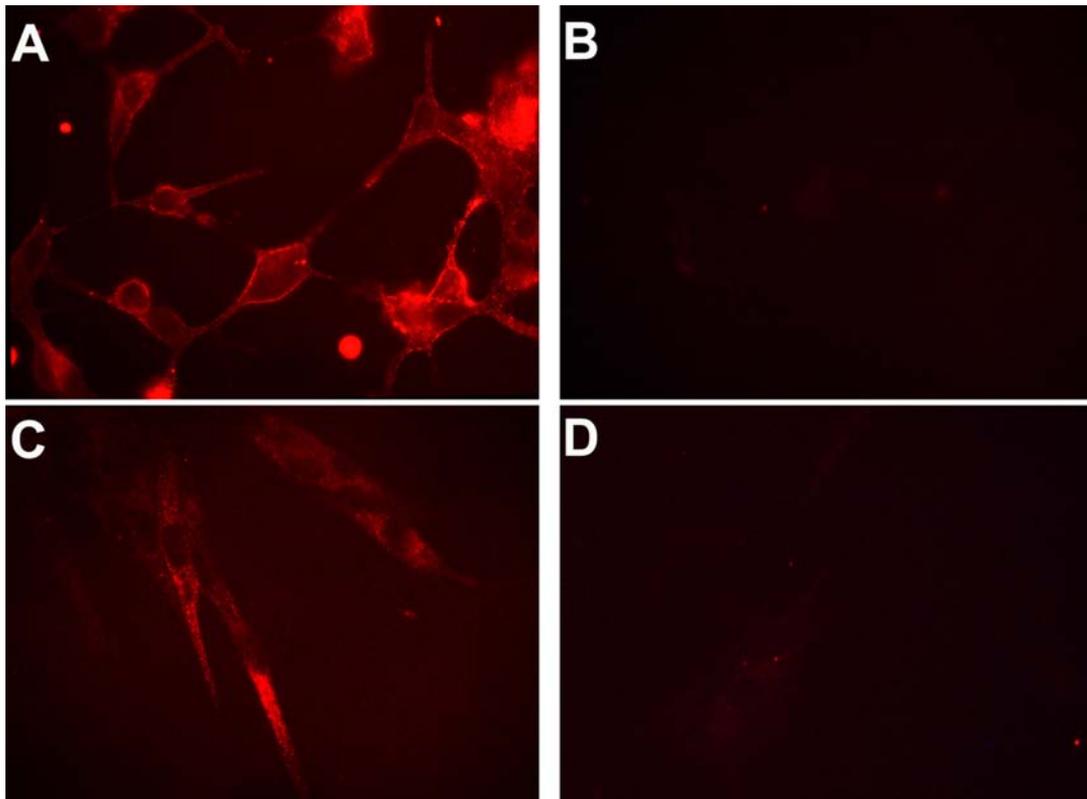


Abb. 4-4: Immunfluoreszenzmarkierung der NEP in epithelialen und stromalen Prostatazellen. Die Plasmamembran der LNCaP-Zellen ist intensiv immunreaktiv, das Zytoplasma zeigte eine relativ schwache Immunreaktivität (A). In hPCPs-Zellen ist Zytoplasma ausschließlich schwach immunreaktiv (C), wogegen die Zellkerne keine NEP-Reaktivität aufwiesen. (B) und (D) sind Negativkontrollen. (600×)

## **4.2 Expression der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen und Prostatagewebe**

Um NEP-Protein und NEP-mRNA in Prostatazellen und Prostatagewebe weiterhin nachzuweisen, wurden Westernblot, RT-PCR und In situ RT-PCR verwendet.

### **4.2.1 Immunologischer Nachweis der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen mit dem Westernblot**

Die NEP wurde mit Hilfe der Westernblot-Analyse an Lysaten der epithelialen LNCaP und der stromalen hPCPs nachgewiesen. Unter Verwendung eines polyklonalen NEP-Antikörpers sc-9149 konnte dabei bei beiden untersuchten Zellarten eine Bande bei etwa 100 kDa detektiert werden. Weiterhin waren Signale in einem 110 kDa Molekulargewichtsbereich bei stromalen hPCPs vorhanden, bei denen es sich vermutlich um Mutationsprodukte des Ausgangsmoleküls und subzelluläre Lokalisation der NEP handelt. Das als Kontrolle verwendete aufgereinigte humane NEP (ohne Intrazellulär-Domänen) zeigte Banden im Bereich 95 kDa. (Abb. 4-5).

### **4.2.2 Molekularbiologischer Nachweis der neutralen Endopeptidase in Prostatazellen und Prostatagewebe**

#### **4.2.2.1 RT-PCR mit Total-RNA aus LNCaP-Zellen und hPCPs-Zellen**

Um Informationen über die Expression der NEP in der pathologisch veränderten Prostata zu erhalten, wurden 1-Schritt-RT-PCR Versuche mit NEP-spezifischen Primern (seq: 5'- TGT GGC CAG ATT GAT TCG TC-3' and 5'-TTG TAG GTT CGG CTG AGG CT-3') (Papandreou et al., 1998) bei den Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und den stromalen Prostatazellen (hPCPs) durchgeführt. In allen untersuchten Proben konnte die NEP-mRNA detektiert werden, und die NEP-Expressionsquantität bei hPCPs ist deutlich geringer als bei LNCaP (Abb. 4-6).

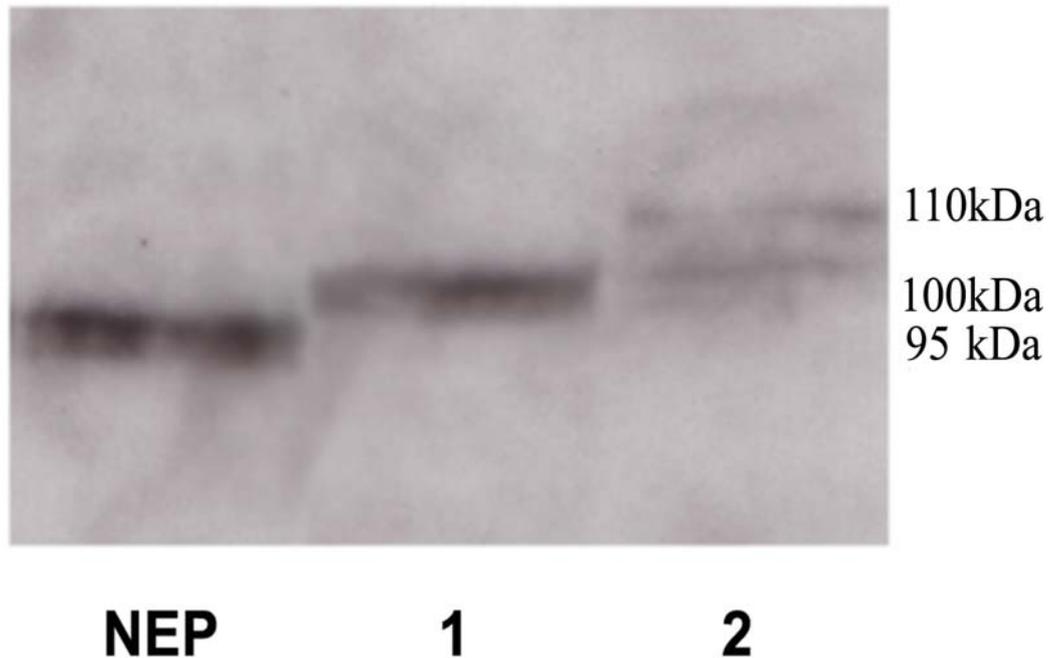


Abb. 4-5: Westernblot mit einem polyklonalen Antikörper gegen humane NEP.

Spur 1: LNCaP-Zellysate. Spur 2: hPCPs-Zellysate. Spur NEP: Positivkontrolle. Bei dem Zellysate der LNCaP ist eine prominente Band bei 100 kDa Molekulargewichts zu erkennen. Jedoch sind bei dem Zellysate der hPCPs zwei Bande bei 100 kDa und 110 kDa Molekulargewicht zu erkennen. Auf Grund der fehlenden Intrazellular-Domäne liegt die Bande für die aufgereinigte humane NEP im Bereich um 95 kDa, wie in der Spur NEP zu erkennen ist.

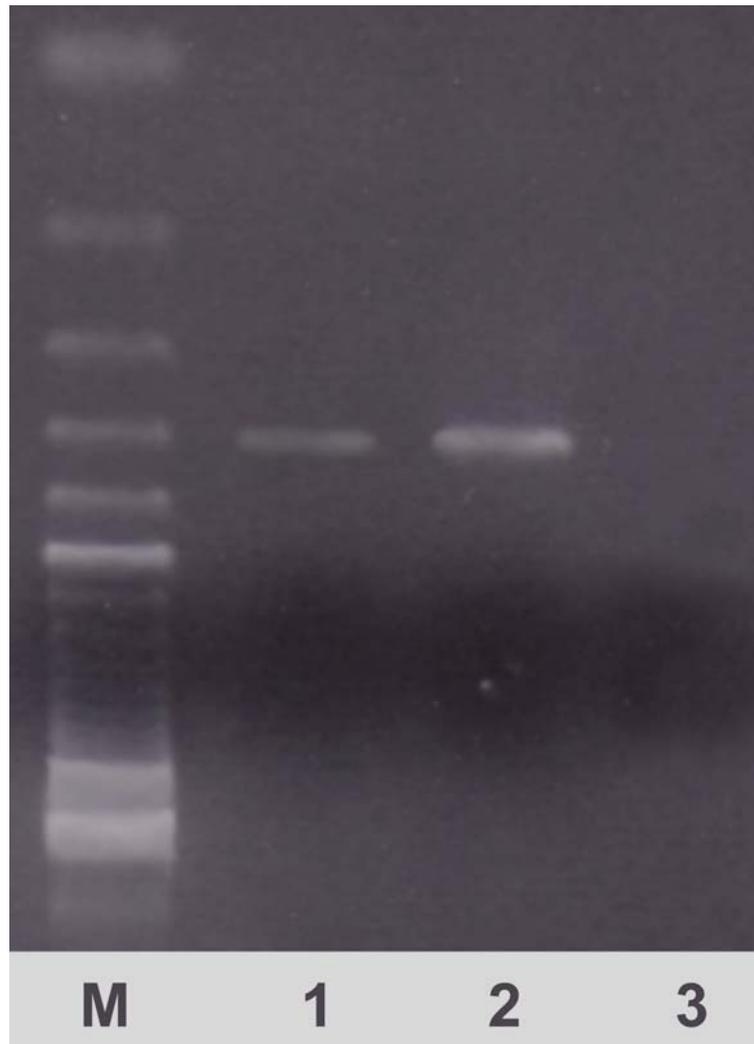


Abb. 4-6: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der NEP RT-PCR Produkte.

Spur M: 100 bp Molekulargewichtsstandard, Spur 1: hPCPs Zellen, Spur 2: LNCaP Zellen; die NEP-Expressionsquantität bei hPCPs ist niedriger als bei LNCaP, Spur 3: Negativkontrolle mit der durch RNase A degradierten Total-RNA.

#### **4.2.2.2 In situ RT-PCR an Paraffinschnitten der humanen Prostata und an den Prostatazellen**

Um Informationen über die zelluläre Expression der NEP-mRNA in Prostatagewebe und Prostatazellen zu erhalten, wurden In situ RT-PCR Versuche mit NEP-spezifischen Primern (seq: 5'- TGT GGC CAG ATT GAT TCG TC-3' and 5'-TTG TAG GTT CGG CTG AGG CT-3') (Papandreou et al., 1998) auf den bei den Immunfluoreszenz Versuchen verwendeten Präparaten (Serienschnitte) durchgeführt. Bei diesen Methoden zeigt sich eine gut sichtbare Darstellung des Amplifikationsproduktes bei optimal erhaltener Gewebemorphologie, und die NEP-mRNA wurde in allen Präparaten detektiert.

In der normalen adulten Prostata (Abb. 4-7 A, B) bzw. hyperplastischen Prostata (Abb. 4-7 C), läßt sich starke zytoplasmatische Anfärbung in zahlreichen adluminalen Zellen erkennen, bei Prostatakarzinom (Abb. 4-7 E) sind die verhältnismäßig schwachen zytoplasmatischen Signale in malignen proliferativen adluminalen Zellen zu finden. Bei allen Präparaten zeigen die Basalzellen keine Signale. Im Stroma (Abb. 4-7 D) wurden die Endothelzellen der Kapillaren und glatte Muskelzellen leichthin gefärbt. Die Zellkerne sind nicht gefärbt.

In den LNCaP-Zellen bzw. hPCPs-Zellen wurden intensivere Signale im Zytoplasma deutlich detektiert, und die Zellkerne waren negativ (Abb. 4-8 A, E).

Um Falschaussagen zu vermeiden, wurden für jedes Präparat zwei Negativkontrollen und eine Positivkontrolle dargestellt. In situ RT-PCR wurde mit NEP-Primern auf den mit RNase inkubierten Schnitten (ohne Template) als 1. Negativkontrolle (Abb. 4-7G; 4-8 C, G) bzw. ohne NEP-Primern auf den normalen Schnitten als 2. Negativkontrolle durchgeführt (Abb. 4-7 H; 4-8 D, H). Die Negativkontrollen zeigten keinerlei Färbung. Bei den Positivkontrollen, die nicht durch DNase verdaut waren, wurden intensivere Signale in Zellkernen detektiert (Abb. 4-7 F; 4-8 B, F).

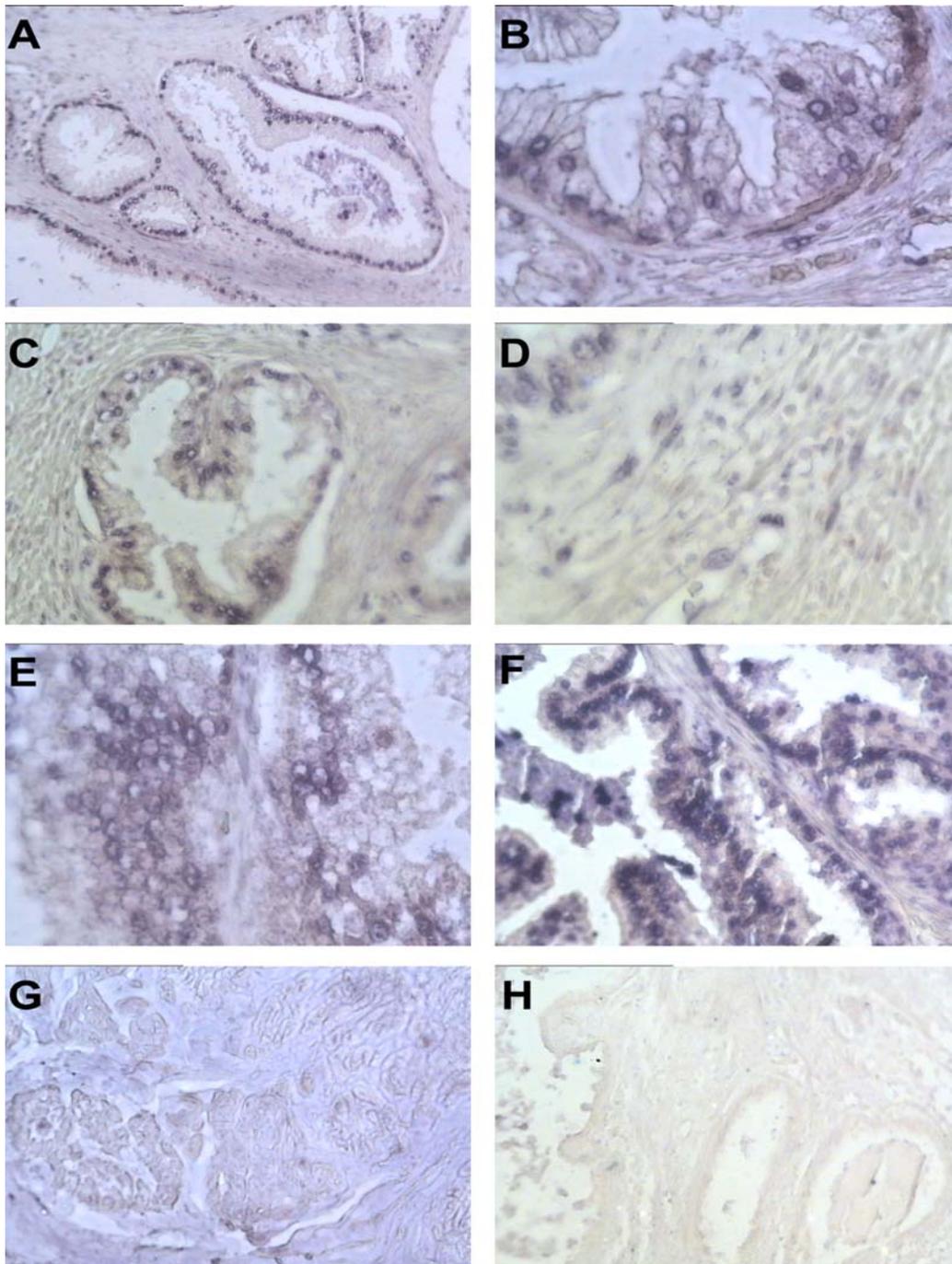


Abb. 4-7: In situ RT-PCR an Schnittpräparaten. In normaler Prostata (A, B) und BPH (C) zeigen die adluminalen Zellen eine starke perinukleäre zytoplasmatische Anfärbung. Das Prostatakarzinom (E) zeigt Signale im perinukleäre Zytoplasma der malignen proliferativen adluminalen Zellen. Im Stroma (D) wurden die Endothelzellen der Kapillaren und glatte Muskelzellen leicht gefärbt. Die Positivkontrolle (F) zeigt intensivere Signale in Zellkernen. Die Negativkontrollen 1. (G) und 2. (H) zeigen keinerlei Anfärbungen. (A, 200×; C, F, G, H, 400×; B, D, E, 800×)

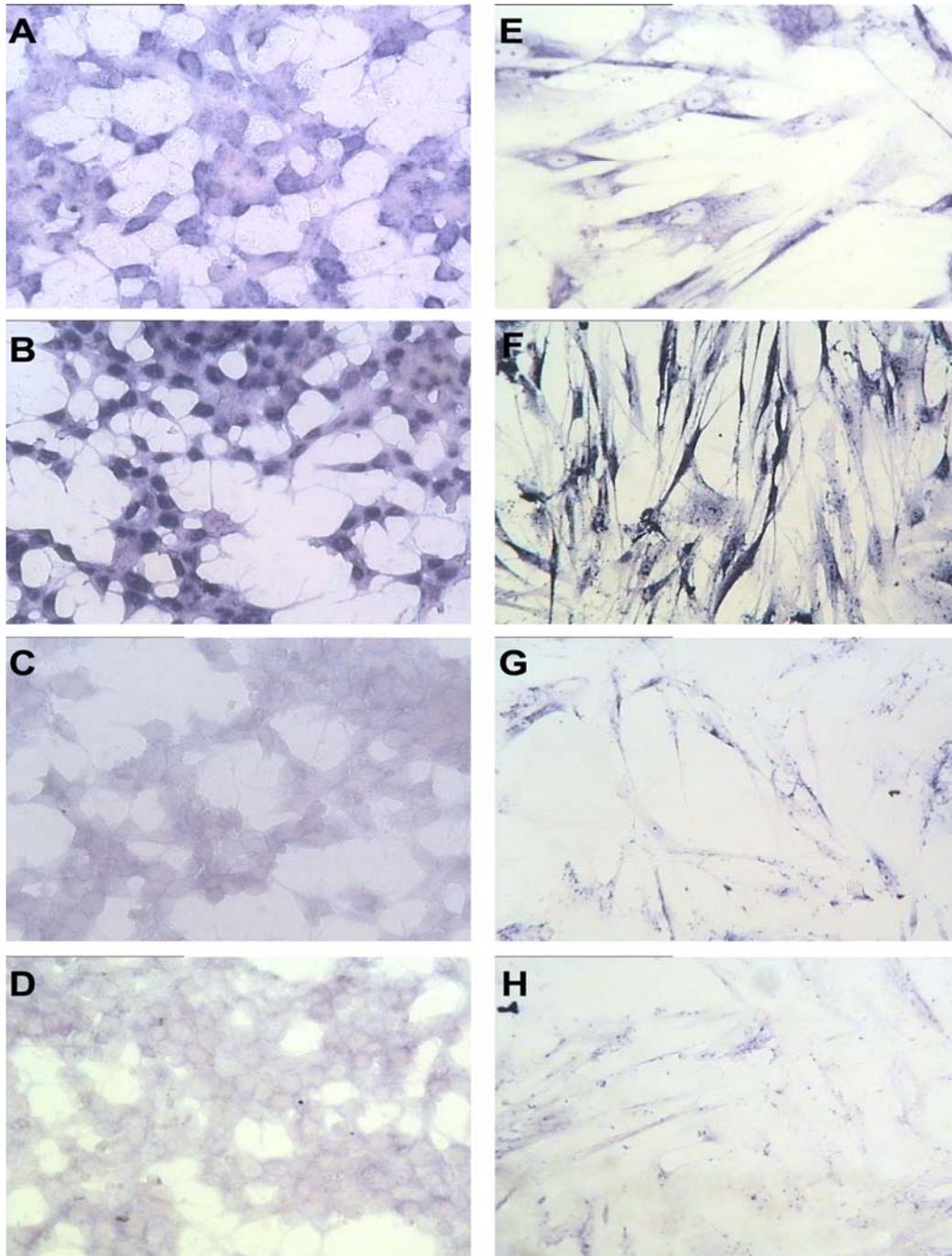


Abb. 4-8: In situ RT-PCR an Prostatazellen. LNCaP-Zellen (A) und hPCPs-Zellen (E) zeigen eine deutliche zytoplasmatische Anfärbung. Die Positivkontrollen (B, F) zeigen intensivere Signale in Zellkernen. Die Negativkontrollen 1. (C, G) und 2. (D, H) zeigen keinerlei Anfärbungen. (400×)

### **4.3 Effekt von Androgenen und Neuropeptiden auf die Synthese der neutralen Endopeptidase**

#### **4.3.1 Molekularbiologischer Nachweis der Androgen- und Neuropeptid-Wirkung auf die NEP-Expression in epithelialen und in stromalen Zellen**

Um zu untersuchen, ob Androgene und Neuropeptide in die Expression der NEP in LNCaP- bzw. hPCPs-Zellen involviert sind, wurden die Zellen für 12 Stunden mit DHT ( $10^{-8}$  M) bzw. Bombesin ( $10^{-8}$  M) inkubiert, um die Expression der NEP durch Northern-Blot-Analyse der Total-RNA zu untersuchen.

Als Hybridisierungsproben für die Northern Analyse dienten  $^{32}\text{P}$ -markierte NEP cDNA-Sonde und  $^{32}\text{P}$ -markierte 18S rRNA-Sonde zur Untersuchung der Expression der NEP.

Die Abbildung 4-9 zeigt das Autoradiogramm der Northern Analyse und semiquantitative Gelanalyse. Ohne Stimulation ist eine grundlegende NEP-Expression in den LNCaP-Zellen detektierbar (Spur 1), während die Hybridisierung mit 18S rRNA-Sonde, die konstitutiv und unabhängig von der Stimulation ist, eine deutliche Bande zur Folge hat. Die Behandlung mit DHT bzw. Bombesin führt zu einer 4-Fach-Erhöhung (mit DHT, Spur 2) und einer 3.6-Fach-Erhöhung (mit Bombesin, Spur 3) der NEP-Expression. In den hPCPs-Zellen ist kaum eine NEP-Expression detektierbar und die Expression ist unabhängig von DHT- oder Bombesin-Stimulation (Spur 4, 5, 6). Die basale NEP-Expression in den hPCPs-Zellen besitzt im Vergleich zu den LNCaP-Zellen nur eine um ca. 30% Menge.

Dies deutet darauf hin, daß Androgen- und Neuropeptid-Stimulation in die NEP-Expression ausschließlich in LNCaP-Zellen involviert sind und die NEP-Expression in den hPCPs-Zellen unabhängig von Androgenen und Neuropeptiden ist.

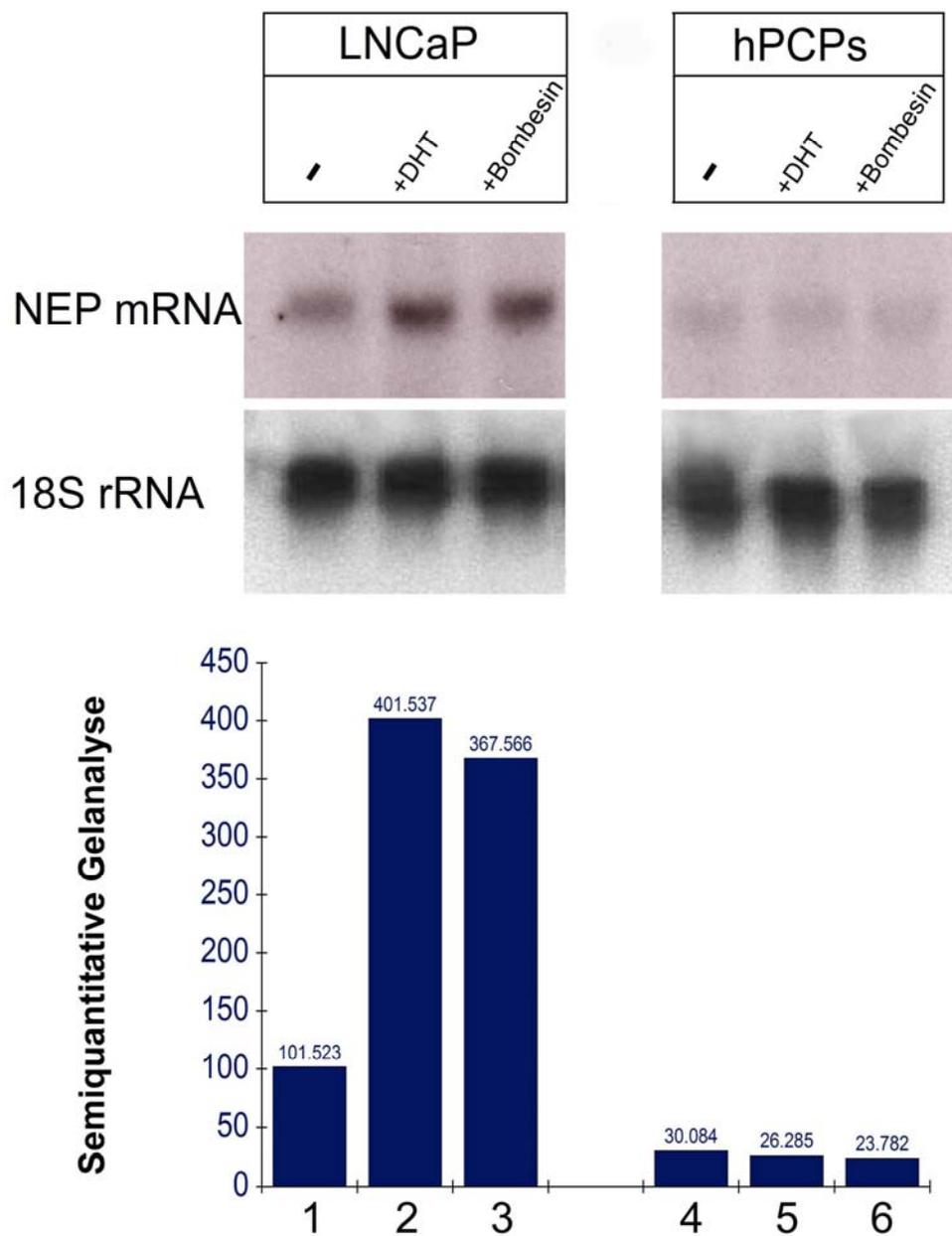


Abb. 4-9: Einfluß der DHT- und Bombesin-Stimulation auf die NEP-Expression in LNCaP- und hPCPs-Zellen.

Northern Blot Analyse wurde mit 30µg Total RNA aus LNCaP -, und hPCPs - Zellen (Spur 1, 4) ohne Stimulation, mit DHT - (Spur 2, 5) und Bombesin - (Spur 3, 6) Stimulation durchgeführt. Total-RNA mit 18S rRNA-Sonde wurde als Kontrolle verwendet. Semiquantitative Gelanalysen wurden densitometrisch mit Hilfe der Systemsoftware von BioSciTec (Marburg) durchgeführt.

## **4.4 Regulation der NEP-Expression über Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen am NEP-Typ II Promotor in humanen Prostatazellen**

### **4.4.1 Lokalisation *cis*-regulatorischer Elemente durch Deletionsanalysen**

Durch die Klonierung der 5'-flankierenden Sequenzen des NEP-Gens war bereits die Identifizierung regulatorischer Bereiche des Promotors in einigen Organsystemen möglich.

Die Untersuchungen anderer Autoren haben auf eine Regulation des Promotors durch NF-Y mit Bindung an eine reverse CCAAT-Box hingewiesen (Ishimaru et al., 1997). Welche Bereiche eine Rolle bei der Aktivierung in LNCaP-Zellen spielen, ist jedoch weitgehend unbekannt.

Zur Identifizierung lag das 625 bp große Reportergenkonstrukt des NEP-Promotors mit Deletionskonstrukten vor, die in den promotorlosen Expressionsvektor pGAW subkloniert wurden und so in Prostatakarzinom - Zelllinien (LNCaP) transfiziert werden konnten. Zur Übersicht ist ein Teil des NEP-Promotors mit dem nichtkodierenden Exon 2a, der bekannten Typ II - Transkriptionsstartstelle und den bereits vorliegenden Deletionskonstrukten in Abbildung 4-10 dargestellt.

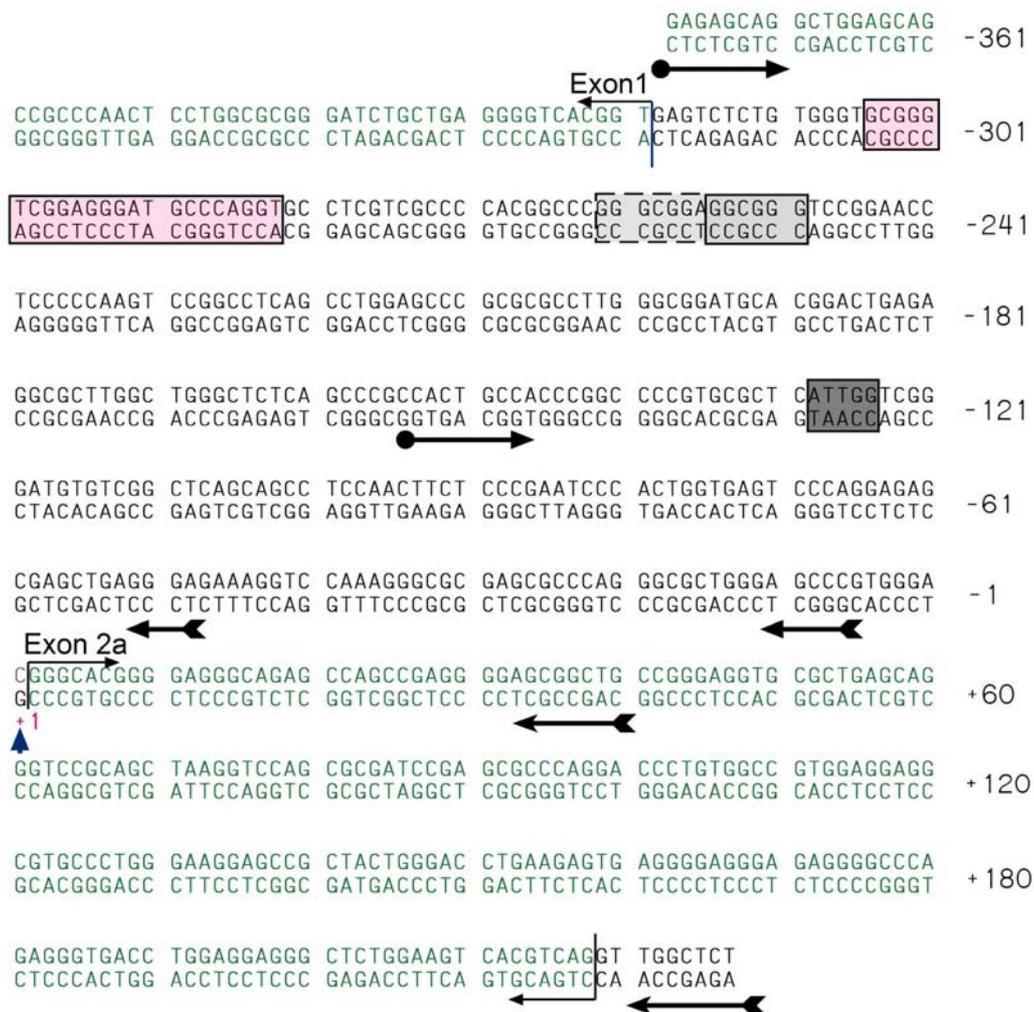


Abb. 4-10: Sequenz der 5'-flankierenden DNA des humanen NEP-Gens. Das nichtkodierende Exon 2a ist grün markiert, der Typ II - Transkriptionsstartpunkt wird durch den Pfeil dargestellt. Mögliche Sequenzmotive als Bindungsstelle für Androgen-responsiv-Elemente ist rot, Sp-Familie ist hellgrau und die reverse CCAAT-Box dunkelgrau unterlegt. Der Beginn der Deletionskonstrukte (- Luc) ist jeweils mit einem Punktpeil gekennzeichnet.

#### 4.4.1.1 Deletionsanalysen in der LNCaP-Zelllinie unter Androgen-Stimulation

Um relevante *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren, wurden Deletionskonstrukte des NEP-Reportergenkonstruktes NEP-(-379~+227)-Luc hergestellt. Die Deletionskonstrukte NEP-(-379~+227)-Luc, NEP-(-379~+40)-Luc, NEP-(-154~+40)-Luc, NEP-(-154~-6)-Luc, NEP-(-154~-48)-Luc wurden in die LNCaP-Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert ( $n > 3$ ) und die transkriptionelle Aktivität durch die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfaßt. Das Plasmid pGAW diente dabei als Negativ-, pGAW-SV40 als Positivkontrolle. Alle Konstrukte wurden bei MWG sequenziert. Luciferasewerte wurden anhand der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben.

Die Ergebnisse der transienten Transfektion der LNCaP-Zellen werden in Abbildung 4-11 gezeigt. Für alle Konstrukte war die grundlegend transkriptionelle Aktivität niedrig, und nur gering individuell verschieden. Nach der Stimulation mit Androgen (DHT,  $10^{-8}$  M, 36h) zeigten die NEP-Promotorkonstrukte NEP-(-379~+227)-Luc und NEP-(-379~+40)-Luc eine induzierte Steigerung in der Aktivität um ca. 6.5 fach. Eine Reduktion von ca. 30 % in der induzierten Aktivität zeigten die Deletionen von NEP-(-379~+40)-Luc nach NEP-(-154~+40)-Luc. Der Abfall der Aktivität weist auf eine positive faktor-Bindungsregion im Deletionsbereich (-379~-154) hin.

Einen geringeren Abfall der induzierten Promotoraktivität zeigte die Deletion von NEP-(-154~+40)-Luc nach NEP-(-154~-6)-Luc. Im Gegensatz dazu wiesen die Deletionen von NEP-(-154~-6)-Luc nach NEP-(-154~-48)-Luc einen geringeren Anstieg der Promotoraktivität auf, so daß sich hier relevante negativ *cis*-regulatorische Elemente befinden könnten.

Mit dem Transfac-Datenbestand und mit dem MatInspector-Programm von Internet (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC> oder <http://www.gene-regulation.com>), ergab ein Vergleich der bekannten Sequenz der 5' flankierenden DNA des NEP-Gens und der Bereiche mit einem starken Anstieg oder Reduktion der Promotoraktivität mit möglichen Protein-Bindungsstellen bei einer Konzentration auf den näher zur Typ II – Transkriptionsstartstelle gelegenen Bereich folgende mögliche Protein-Bindungsstellen: Als positiv *cis*-regulatorische Elemente GC-Box von -262 nach -250,

Androgen-responsiv-Elemente von -305 nach -283 (Shen et al., 2000) und reverse CCAAT-Box von -129 nach -124 (Ishimaru et al., 1997). Ein unbekanntes negativ *cis*-regulatorisches Element fand sich im Bereich zwischen -48 und -6.

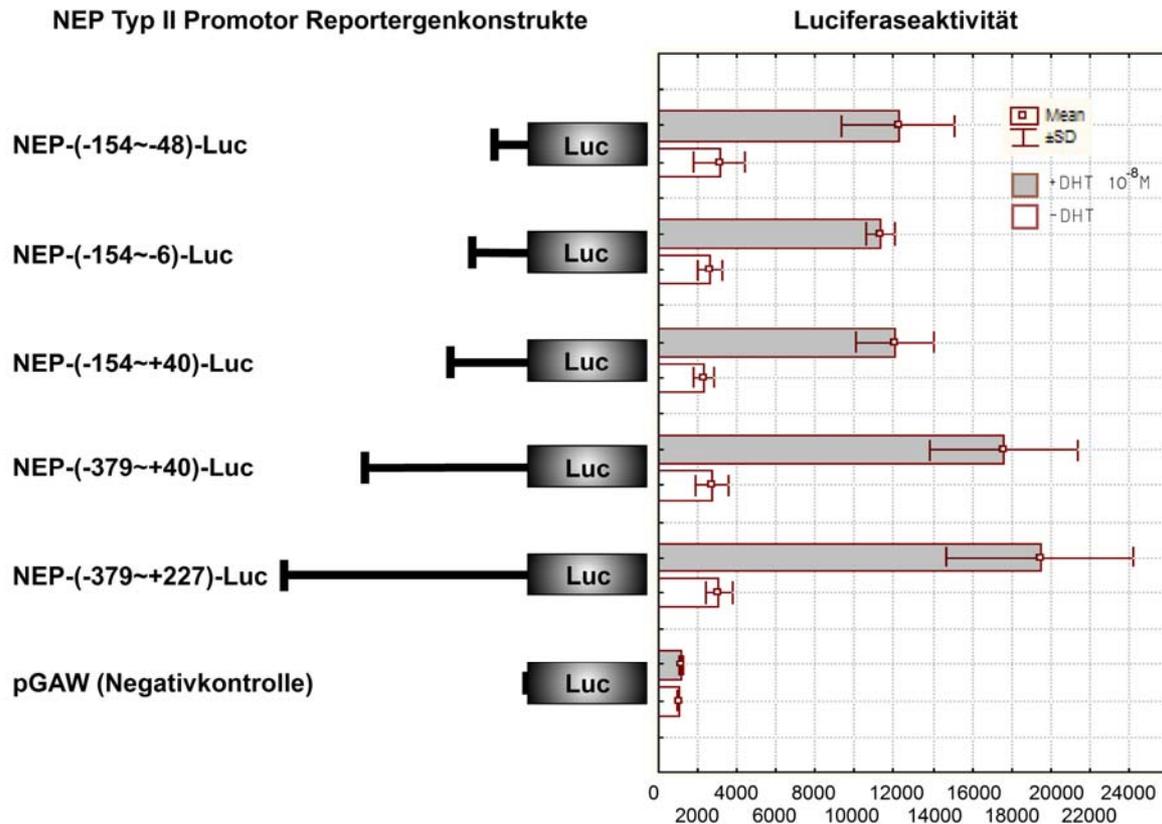


Abb. 4-11: Promotoraktivität der 5'-Deletionskonstrukte in der Prostata-Zelllinie LNCaP. Im linken Teil sind die Benennung und schematisch die Struktur der NEP-Reportergenkonstrukte dargestellt, der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der Messung der Luciferaseaktivität als Ausdruck der Promotoraktivität der betreffenden Konstrukte. Die Transfektion wurde mit  $5\mu\text{g}$  Konstrukt und  $0.5\mu\text{g}$  RSV- $\beta$ -Galaktosidase (als innere Kontrolle) durchgeführt. Die Zellen wurden mit  $10^{-8}$  M DHT für 36 h stimuliert. Die Luciferasewerte wurden anhand der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression normalisiert und in relativen Lichteinheiten angegeben.

#### 4.4.2 Charakterisierung regulatorischer Elemente durch DNA/Protein-Interaktionen

Die Charakterisierung der Deletionskonstrukte der 5'-flankierenden DNA des NEP Typ II - Promotors in der Prostata-Zelllinie LNCaP weist auf mehrere regulatorische Elemente in der Nähe des Type II-Transkriptionsstartpunktes hin.

Die Sequenzanalyse dieser Region zeigte zwei potentielle Sp1-Bindungsstellen mit einer GGCGG-Sequenz im Bereich von -262 bis -250 sowie eine reverse CCAAT-Box von -129 bis -124. Es wurde daher untersucht, ob Sp1 und NF-Y in diesem Bereich des NEP-Promotors binden. Der Nachweis der Protein-Bindung an die NEP-Promotorsequenz erfolgte durch DNase-Protektionsversuche und Gelretardations-Experimente mit und ohne Antikörperzusatz. Zur Übersicht ist die Sequenz der untersuchten DNA-Region mit den Bindungsstellen, den Schnittstellen und den Oligonukleotiden für die Gelretardations-Experimente in Abbildung 4-12 dargestellt.

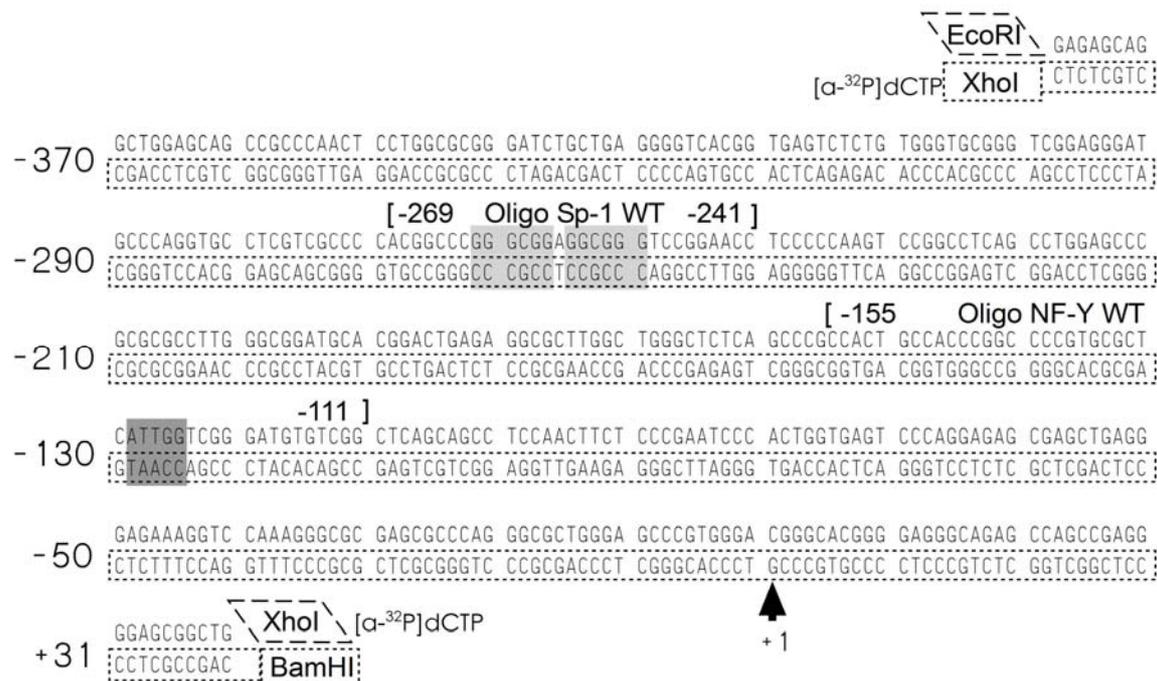


Abb. 4-12: Sequenz des NEP-Promotors, proximal zur Typ II - Transkriptionsstartstelle. Die potentiellen Sp1-Bindungsstellen sind hellgrau, reverse CCAAT-Box dunkelgrau unterlegt. Über der Sequenz sind die für die Gelretardationsexperimente verwendeten Sequenzen als Oligonukleotide in Eckklammern mit Positionsnummern gekennzeichnet und die Schnittstellen (des oberen Strangs und des unteren Strangs) für die DNase-Protektionsversuche eingetragen.

#### 4.4.2.1 DNase-Protektionsversuche

Um eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an den NEP-Promotor nachzuweisen, wurden DNase-Protektionsversuche (DNase-Footprinting) durchgeführt. Dazu wurde ein Fragment des NEP-Promotors von -379 bis +40 eingesetzt, das nur an 3'-Ende radioaktiv markiert wurde. Um eine genaue Zuordnung der protektierten Bereiche zu ermöglichen, wurde ein Teil der markierten DNA chemisch sequenziert (Maxam & Gilbert, 1977). Der DNase-Protektionsversuch erfolgte mittels der Bindung von Proteinen an die markierte DNA durch Inkubation mit Zellkernextrakten (30 µg Protein) aus HeLa-Zellen oder LNCaP-Zellen, die mit oder ohne DHT kultiviert wurden. Inkubation mit nackter DNA und ohne Zellkernextrakten diente als Negativkontrolle zum Vergleich. Nach einer anschließenden partiellen DNase-Spaltung wurden die DNA-Fragmente zusammen mit dem Sequenzierungsansatz auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Bindet das zugesetzte Protein, so ist dieser Abschnitt der DNA vor der Spaltung durch die DNase geschützt. Die Autoradiographie des DNase-Footprinting zeigte an dem unteren Strang des NEP - Promotors (Abb. 4-13) einen deutlichen Schutz bei der Bindung mit Zellkernextrakten aus LNCaP- und HeLa-Zellen an vier Bereichen, zum einen die reverse CCAAT-Sequenz von -125 bis -129, was bereits in humanen fetalen bronchialen Epithelzellen und humanen akuten lymphoblastären Leukämie-Zellen gezeigt werden konnte (Ishimaru et al., 1997), zum anderen die GGCGG-Box von -250 bis -262, zum einen die bekannte GCGGGTCGGAGGGATGCCCA-Sequenz von -282 bis -305, was bereits als ARR (Androgen-responsiv-Elemente) in Simian-Niere-Zellen (COS-7) gezeigt werden konnte (Shen et al., 2000) und zum einen die unbekannte Sequenz von -153 bis -174. An dem oberen Strang des NEP-Promotors (Abb. 4-14) zeigte das DNase-Footprinting einen LNCaP- spezifischen Schutz bei der Bindung mit Zellkernextrakten aus mit DHT gewachsenen LNCaP-Zellen an zwei Bereichen -106 bis -87 und -66 bis -26.

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß sowohl in der LNCaP-Zelllinie als auch der HeLa-Zelllinie NF-Y und Sp1 am NEP-Promotor binden und zwar an der GGCGG-Sequenz von -250 bis -262 und der CCAAT-Box von -125 bis -129 und an der Regulation des NEP-Promotors beteiligt sind.

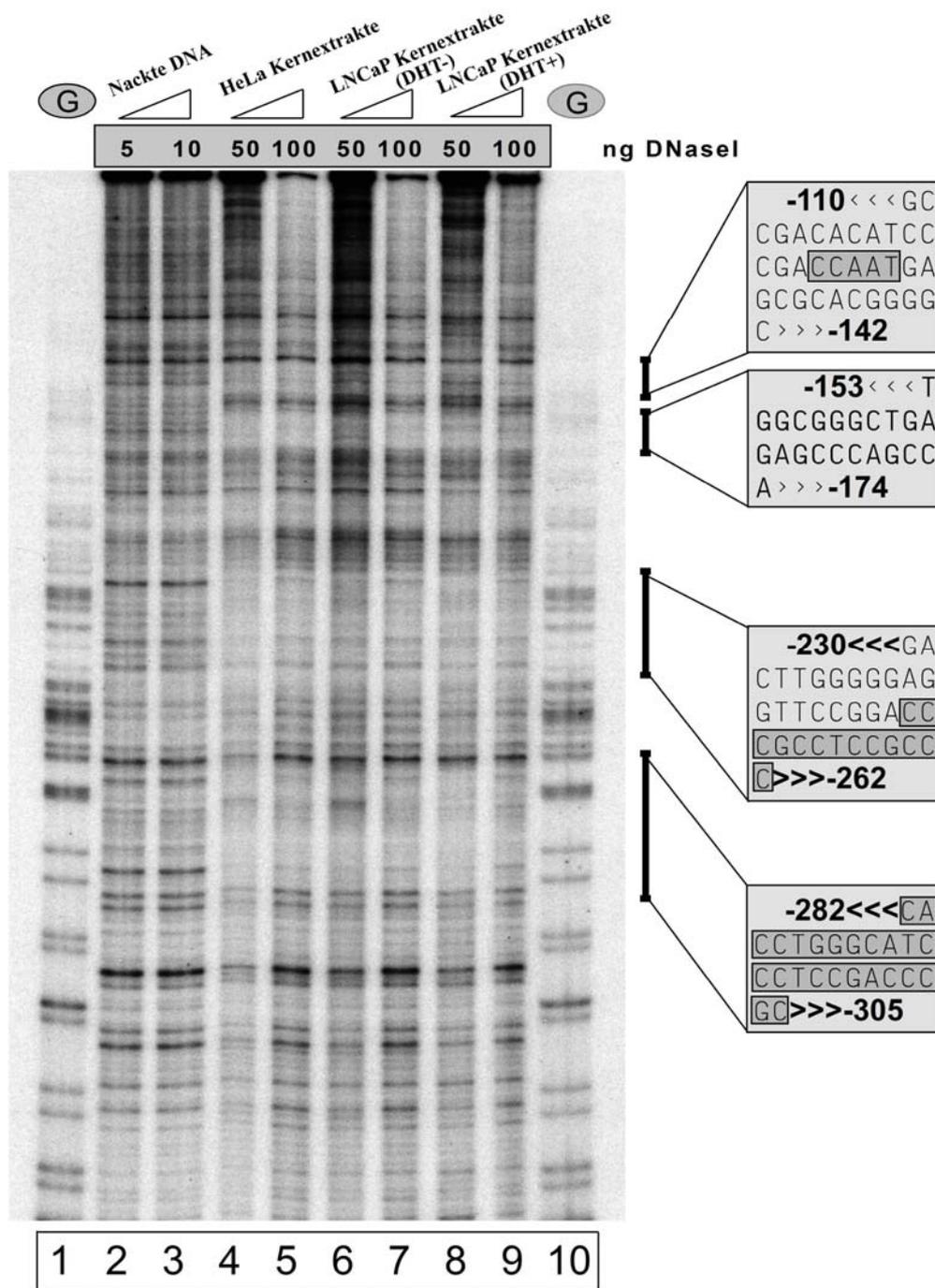


Abb. 4-13: DNase-Footprinting: Der untere Strang des -379/+40 Xho I/BamH I NEP-Promotor-Fragments wurde an 3'-Ende (upstream end) radioaktiv markiert. Zum direkten Vergleich ist jeweils in Bande 1 und 10 die Maxam-Gilbert G-Sequenzreaktion dargestellt. Die Spuren 2 und 3 sind Kontrollen, die ohne Zellkernextrakten durchgeführt wurden und keine Protektion zeigen. DNA-Fragmente wurden mit LNCaP- (Spuren 6-9) und HeLa- (Spuren 4-5) Kernextrakten bei verschiedenen DNase-Konzentrationen inkubiert.

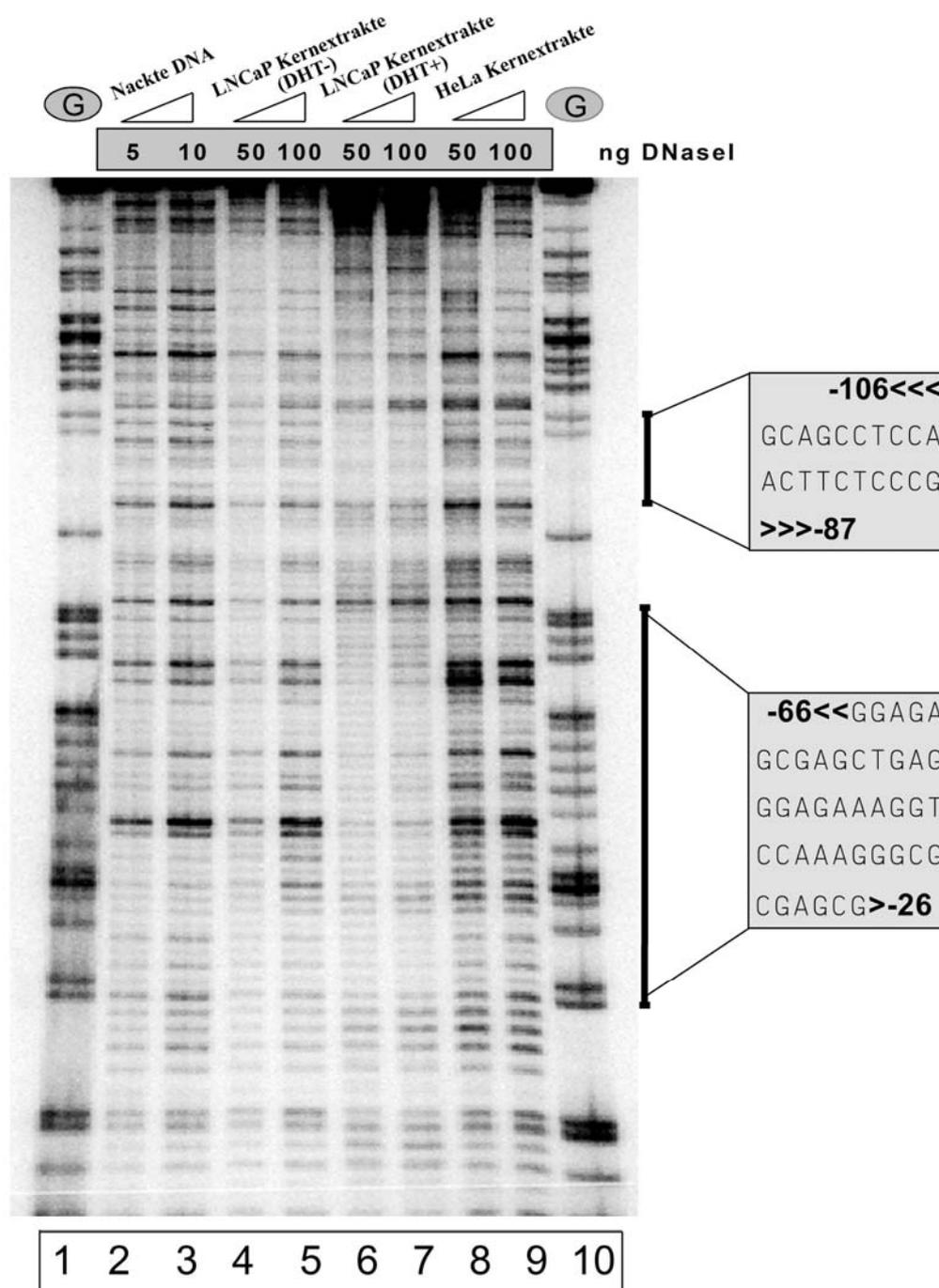


Abb. 4-14: DNase-Footprinting: Der obere Strang des -379 / +40 Xho I / BamH I NEP-Promotor-Fragments wurde an 3'-Ende (downstream end) radioaktiv markiert. Zum direkten Vergleich ist jeweils in Bande 1 und 10 die Maxam-Gilbert G-Sequenzreaktion dargestellt. Die Spuren 2 und 3 sind Kontrollen, die ohne Zellkernextrakten durchgeführt wurden und keine Protektion zeigen. DNA-Fragmente wurden mit LNCaP- (Spuren 4-7) und HeLa- (Spuren 8-9) Kernextrakten bei verschiedenen DNase-Konzentrationen inkubiert.

#### **4.4.2.2 Gelretardations-Experimente (Bandshifts) und Gelretardations-Experimente mit polyklonalen Antikörpern (Supershifts)**

Zur weiteren Charakterisierung der Bindung von Proteinen an die untersuchten *cis*-regulatorischen Sequenzen im NEP-Promotor wurden Gelretardations-Experimente durchgeführt. Die DNase-Protektionsversuche wiesen auf eine Beteiligung von Proteinen aus der NF-Y und aus der Sp-Familie hin, so daß Versuche mit zwei DNA-Fragmenten durchgeführt wurden; die CCAAT-Box (Ishimaru et al., 1997) enthielt das Fragment von -155 bis -111 und die Sp1-Bindungsstelle enthielt das Fragment von -269 bis -241 (Abb. 4-12). Dazu wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende radioaktiv markiert, hybridisiert und mit den verschiedenen Zellkernextrakten inkubiert. Zum Vergleich wurden die HeLa-Zelllinie und mutierte DNA-Fragmente herangezogen. Die Spezifität der Protein-DNA-Bindung wurde durch Kompetitionsversuche gezeigt.

Aufgrund der Sequenzanalyse der DNA - Fragmente und dem Vergleich des Migrationsverhaltens von aufgereinigten NF-Y und Sp-Proteinen konnte verändert werden, daß es sich bei den an diesen Elementen bindenden Kernproteinen um NF-Y und Sp-Proteine handelt. Es wurden daher Gelretardations-Experimente mit polyklonalen Antikörpern gegen NF-Y, Sp1 und Sp3 durchgeführt.

##### **4.4.2.2.1 Die Bindung von NF-Y an die reverse CCAAT-Box im NEP-Promotor**

NF-Y steht für „Nuclear Factor-Y“, wobei das Y die sog. Y-Box bezeichnet, das Bindemotiv für diesen Transkriptionsfaktor im MHC-Klasse II-Promoter (Benoist & Mathis, 1990). Um die Hypothese, daß NF-Y an die reverse CCAAT-Box des NEP-Type II Promoters bindet, zu testen, wurden Gelretardationsanalysen mit Oligonukleotiden, die die Motive von NEP-Typ II Promoters bzw. eine bona fide NF-Y-Bindestelle aus dem MHC-Klasse II-Promotor, Ea-Y (Dorn et al., 1987) enthielten, durchgeführt. Die Lage der verschiedenen Oligonukleotide sind in Abb. 4-15 eingezeichnet.

Abb. 4-16 zeigt, daß mit allen Zellkernextrakten ein Komplex gleicher Mobilität detektiert werden konnte. Die Proteinbindung konnte durch Einsatz von Ea-Y als Kompetitor an die reverse CCAAT-Box aufgehoben werden. Es handelte sich jeweils um spezifische Bindungen, da ein Oligonukleotid mit beliebiger Sequenz und ein

Oligonukleotid mit mutierter NEP NF-Y Sequenz , als Kompetitor eingesetzt, keine Auswirkung auf die Komplexbildung an die reverse CCAAT-Box hatte, aber diese durch Selbstkompetition verhindert wurde.

#### NEP Promotor NF-Y Box

```

5'-ATCCCGCCACTGCCACCCGGCCCCGTGCGCTCATTGGTCGGGATGTGTCCG-3'
3'-TAGGGCGGTGACGGTGGGCCGGGGCACGCGAGTAACCAAGCCCTACACAGCCCTAG-5'

```

#### NEP Promotor NF-Y Box Mut

```

5'-ATCCCGCCACTGCCACCCGGCCCCGTGCGCTCATGAGTCGGGATGTGTCCG-3'
3'-TAGGGCGGTGACGGTGGGCCGGGGCACGCGAGTACTCAGCCCTACACAGCCCTAG-5'

```

#### Ea-Y Box

```

5'-AGCTGGCTGTTTTCTGATTGGTTAAACT-3'
3'-CCGACAAAAGACTAACC AATTTTGAAGCT-5'

```

#### Kanonische NF-1 Box

```

5'-CCTTTGGCACTGTGCCAAG-3'
3'-GAAACCGTGACACGGTTTCC-5'

```

Abb. 4-15: Oligonukleotide für NF-Y und NF-1 Gelretardations-Experimente. Die Bindungsstelle und Mutationspositionen sind gezeichnet.

Im Gegensatz hierzu zeigte der Gelretardationsassay, bei dem eine bona fide NF-1-Bindungsstelle (Meisterernst et al., 1988) als Kompetitor verwendet worden war, keinen Einfluß auf die Bindung an die reverse CCAAT-Box hat.

Um zu zeigen daß es sich bei dem mit den reversen CCAAT-Boxen interagierenden Protein tatsächlich um NF-Y handelt, wurde ein „Supershift“ mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch eine Untereinheit des NF-Y (CBF-A) erkennt, durchgeführt. Spur 12 zeigt, daß bei den reversen CCAAT-Boxen der Proteinkomplex durch die Antikörper-Bindung eine geringere Mobilität erhielt, und es somit zu einer Verschiebung der Proteinbande („Supershift“) im Gelretardationsassay kam. Präimmunserum als Kontrolle hingegen führte zu keiner Veränderung der Mobilität (Spur 13). Dieser Gelretardationsassay zeigt, daß NF-Y oder ein zumindest sehr nah verwandtes Protein das mit den reversen CCAAT-Boxen interagierende Protein ist.

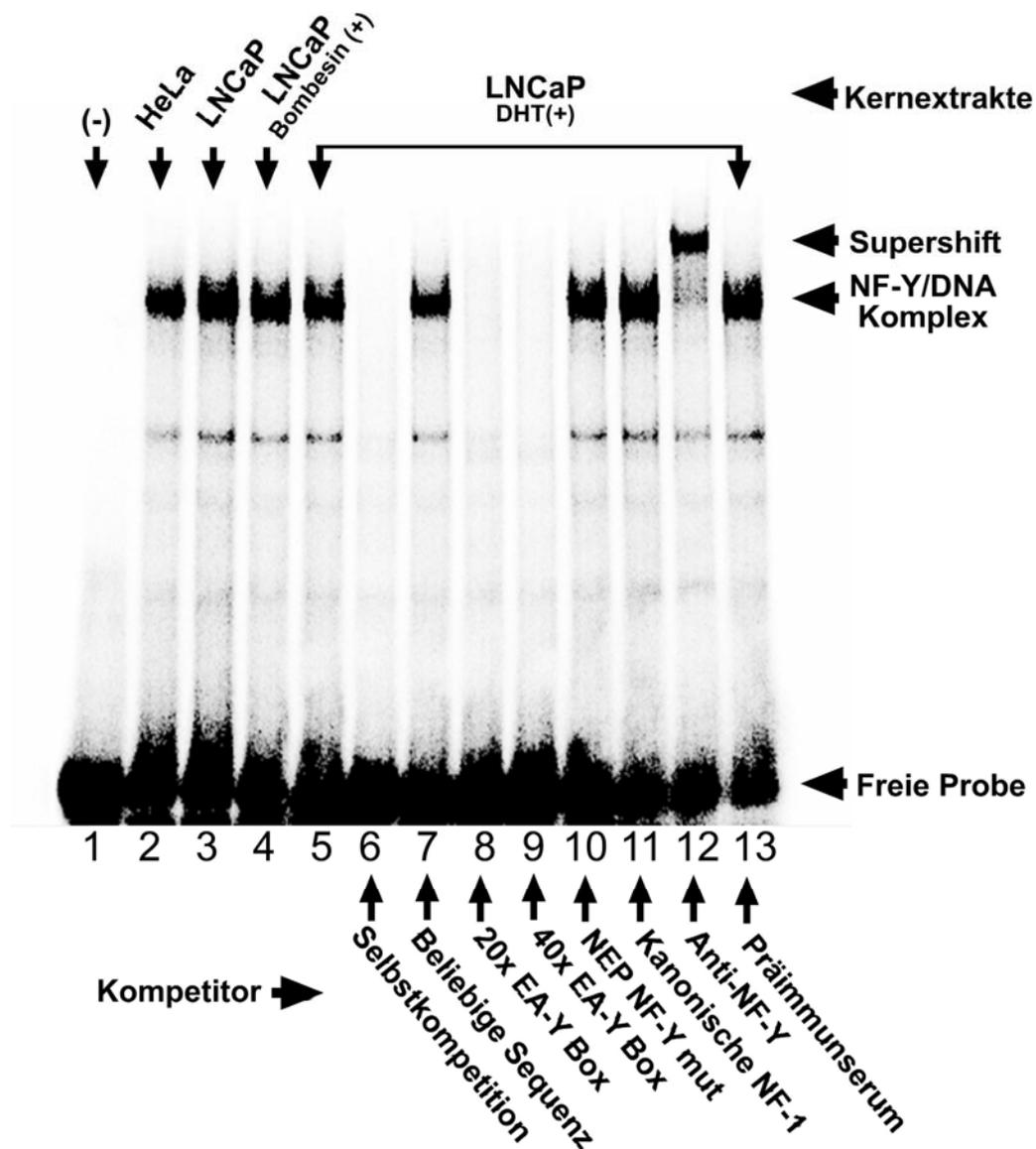


Abb. 4-16: „Bandshift“ und „Supershift“ mit Zellkernextrakten aus HeLa und LNCaP Zellen, die mit oder ohne DHT kultiviert wurden, und mit den Oligonukleotid, die die Motive von NEP Typ II Promotor NF-Y Box enthalten, in Abwesenheit oder Gegenwart eines polyklonalen Antikörpers (CBF-A), der gegen die NF-Y gerichtet ist. Die Gelretardationsanalyse wurde in Abwesenheit oder Gegenwart eines Kompetitors (ca. 40-facher Überschuß gegenüber der Probe) durchgeführt. Als Kompetitor wurden die Bindesequenzen von NEP-Promotor-NF-Y Box und mutierter NEP-NF-Y Box bzw. der bona finden NF-Y-Bindestelle (Ea-Y) verwendet. Spuren 1-5: ohne Kompetitor; Spur 6: Selbstkompetition; Spur 7: Kompetitor mit beliebiger Sequenz.

#### 4.4.2.2 Die Bindung von SP Familie-Protein an die GC-Box im NEP-Promotor

Mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten sollte überprüft werden, ob es tatsächlich Sp-Faktoren sind, die an den NEP-Promotor binden, und um welche es sich handelt. Da sich die Bindungssequenz von Sp2 (GGTGTGGG) von den Bindungssequenzen der anderen Sp-Faktoren (GGGGCGGG) unterscheidet, können nur Sp1, Sp3 oder Sp4 an den NEP-Promotor binden. Während Sp1 und Sp3 ubiquitär exprimiert werden, findet man Sp4-Expression vor allem im Gehirn und im zentralen Nervensystem (Suske, 1999). Da Sp4 also nicht in den Geweben mit starker NEP-Expression exprimiert wird, wurden in den weiteren Versuchen nur die beiden Faktoren Sp1 und Sp3 näher untersucht.

Für die Gelretardations-Experimente wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide mit Kernproteinen aus verschiedenen Zellen (HeLa-Zellen, LNCaP-Zellen mit und ohne DHT, LNCaP mit Bombesin) inkubiert und in einem PAGE-Gel aufgetrennt. Die Lage der verschiedenen Oligonukleotide sind in Abb. 4-17 eingezeichnet.

##### NEP Promotor GC Box



##### NEP Promotor GC Box Mut



##### Kanonische GC-Box



Abb. 4-17: Oligonukleotide für Sp Gelretardations-Experimente. Die Bindungsstelle und Mutationspositionen sind gezeichnet.

Abb. 4-18 zeigt, daß mit allen Zellkernextrakten ein Komplex gleicher Mobilität detektiert werden konnte. Die Proteinbindung konnte durch Einsatz von kanonischer GC-Box (Suske, 1999) als Kompetitor an die Sp-Bindungsstelle (GC-Box)

aufgehoben werden. Es handelte sich jeweils um spezifische Bindungen, da ein Oligonukleotid mit beliebiger Sequenz und ein Oligonukleotid mit mutierter NEP Sp-Bindungsstelle, als Kompetitor eingesetzt, keine Auswirkung auf die Komplexbildung an die GC-Box hatte, aber diese durch Selbstkompetition verhindert wurde.

Schließlich wurden der Reaktion von Kernproteinen aus mit DHT gewachsenen LNCaP-Zellen noch Antikörper gegen Sp1 bzw. Sp3 (polyklonale Antikörper, hergestellt und zur Verfügung gestellt von Prof. G. Suske, Marburg) zugegeben. Bei Zugabe von anti-Sp1 traten weiterhin beide Banden auf, bei Zugabe von Anti-Sp3 trat die untere Bande nicht mehr auf. Bei Kombination beider Antikörper war auch die obere Bande sehr schwach erkennbar. Offensichtlich bindet vor allem der Transkriptionsfaktor Sp3 an die NEP-Sp-Bindungsstelle, in geringem Maß kann jedoch auch Sp1 an diese Bindungsstelle binden.

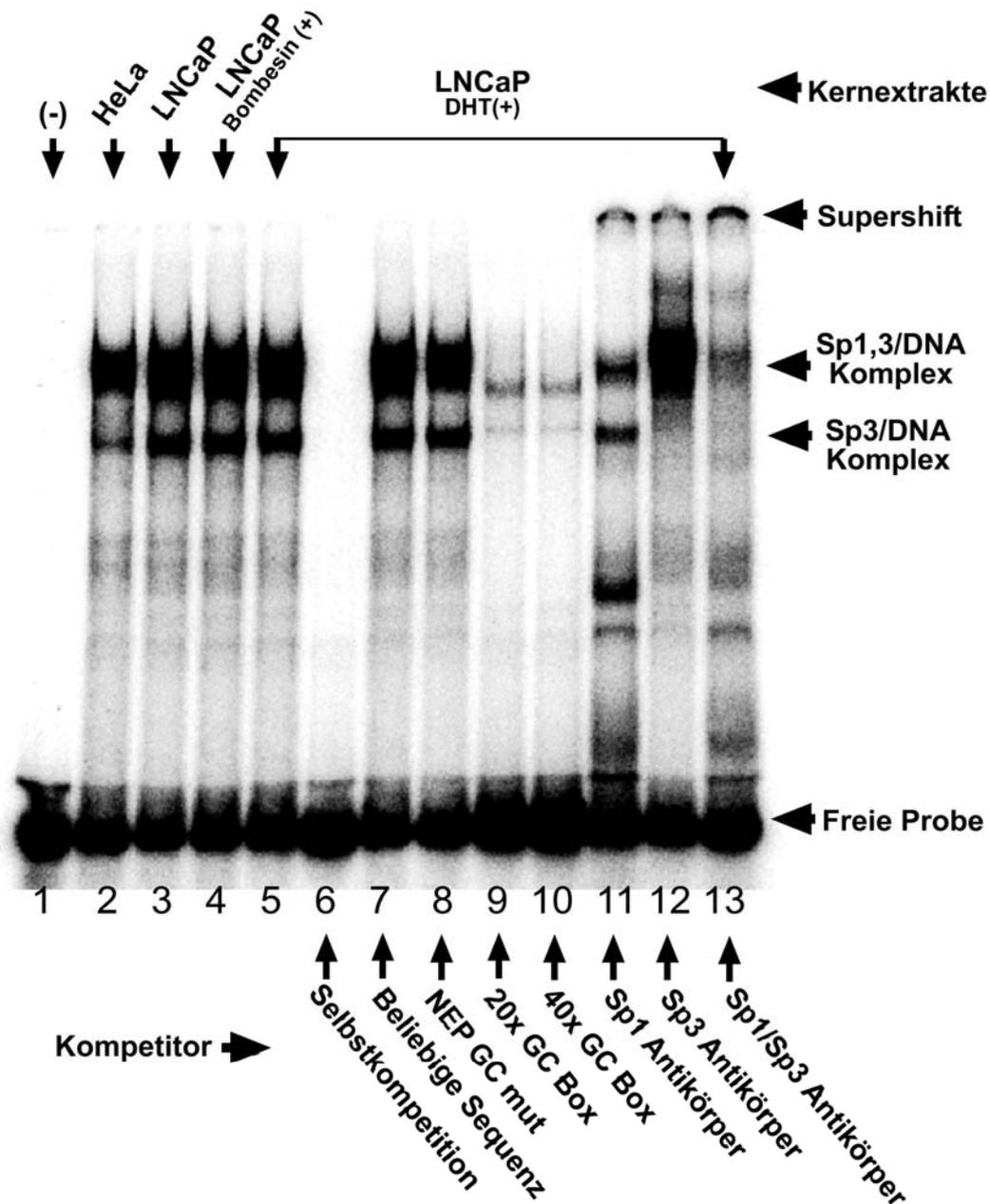


Abb. 4-18: „Bandshift“ und „Supershift“ mit Zellkernextrakten aus HeLa- und LNCaP-Zellen, die mit oder ohne DHT kultiviert wurden, und mit den Oligonukleotiden, die die Motive der NEP Typ II Promotor GC Box enthalten, in Abwesenheit oder Gegenwart von polyklonalen Antikörpern (Anti-Sp1/-Sp3), die gegen den Sp1/Sp3 gerichtet sind. Die Gelretardationsanalyse wurde in Abwesenheit oder Gegenwart eines Kompetitors (ca. 40-facher Überschuss gegenüber der Probe) durchgeführt. Als Kompetitor wurden die Bindesequenzen der NEP Promotor - GC Box und mutierter NEP Promotor GC Box bzw. kanonischer GC-Box verwendet. Spuren 1-5: ohne Kompetitor; Spur 6: Selbstkompetition; Spur 7: Kompetitor mit beliebiger Sequenz.

#### 4.4.3 Funktion von NF-Y und Sp Faktoren im NEP Typ II - Promotor

In dem Sequenzabschnitt des NEP TypII Promotors, der für die Aktivierung der Luciferase verantwortlich war (Position -379 bis +40), befinden sich zwei Bereiche zu den Bindungsstellen der Sp-Faktoren und der NF-Y Faktor. Um zu überprüfen, ob tatsächlich an diese Bindungsstellen, die für die Aktivierung verantwortlichen Transkriptionsfaktoren binden, wurden in die Konstrukte NEP-(-379~+40)-Luc Mutationen eingeführt. Dabei wurde in den Sp-Bindungsstellen die Kernsequenz der Sp-Faktoren (GGGCGG), die für die Bindung notwendig ist, durch TTGCTG ersetzt, und die Kernsequenz der NF-Y-Faktor (ATTGG) in der NF-Y-Bindungsstelle wurde durch ATGAG ersetzt. Dadurch sollte die putative Bindung der Transkriptionsfaktoren verhindert werden. In der Folge sollte die Luciferaseaktivität geringer sein. Die Transfektionsexperimente bestätigten diese Vermutung (Abb. 4-19). Bei Verwendung der mutierten NEP-(-379~+40)-Luc-Konstrukte war eine deutliche Reduktion der Aktivität festzustellen.

Ein beobachtetes Phänomen ist, daß durch die Mutation der CCAAT-Box die Androgen-Responsewirkung nicht deutlich schwächer wurde (5.4 / 5.6 fach; t-test  $P > 0.05$ ), aber bei der Sp-Bindungsstelle-Mutation relativ schwächer wurde (5.4 / 4.3 fach; t-test  $P < 0.05$  Abb. x). Im Gegensatz hierzu zeigte die Deletionsanalyse eine geringere Androgen-Responsewirkung, wenn die Promotorfragmente keine Androgen-Responseelement und Sp-Bindungsstelle [NEP-(-154~+40)-Luc] enthalten (von 6.5 bis 4.5 fach; t-test  $P < 0.01$  Abb. 4-11). Das deutet darauf hin, daß der NF-Y Faktor wichtig für die basale NEP-Expression ist, und der Sp Faktor wichtig für die Androgen-Responsewirkung mit Androgen-Responseelement ist.

Die Beteiligung dieser Bindungsregionen an der Steroidhormon - (Androgen, Östrogen) vermittelten Regulation der Genexpression soll in weiteren Transfektions- und Stimulationsexperimenten aufgeklärt werden.

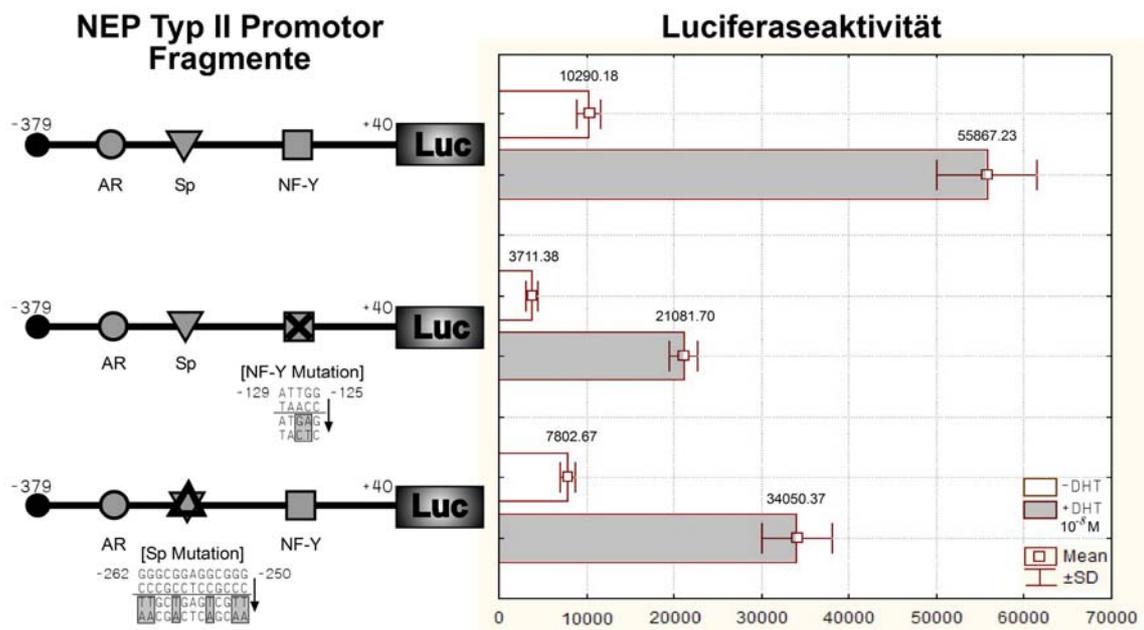


Abb. 4-19 : Schema der Mutationskonstrukte und Ergebnisse der Transfektionen

In das Luciferasekonstrukt NEP-(-379~+40)-Luc wurden die Sp-Bindungsstelle und die NF-Y-Bindungsstelle mutiert. Die Bindungsstellen sind mit einem Kreis, die mutierten mit einem x oder ▲ gekennzeichnet. Die Messergebnisse nach der DHT - Stimulation sind mit hellgrauen, die der ohne Stimulation mit weißen Balken dargestellt.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Expression und Lokalisation der NEP in der humanen Prostata**

Die Expression der NEP in den verschiedenen menschlichen Organen und Gewebe ist variabel und bisher nur für einige Organe untersucht z.B. Herz (Raut et al., 1999); Niere (Di Marco et al., 1998); Lunge (Jackman et al., 1995; Bunn et al., 1998; Cohen et al., 1998; Dusser, 1999); Leber (Dragovic et al., 1997); Prostata (Moody et al., 1998; Olerud et al., 1999; Renneberg et al., 2001)

Durch Untersuchungen der NEP in frühen Stadien der embryonalen Prostataentwicklung wurde gezeigt, daß der NEP-Antikörper bereits ab der 19. Schwangerschaftswoche die Stelle der beginnenden Lumenbildung mit präsumptiven Azinus-Zellen markierte (Renneberg et al., 1997). Während sekretorische Proteine wie PSA und PAP erst im Verlauf der Pubertät nachweisbar werden, war die NEP-Immunreaktivität bereits in den frühesten Stadien der Drüsenentwicklung im Foetus ausgeprägt und ermöglichte die Differenzierung zwischen Basalzellen und den stärker differenzierten, präsumptiven sekretorischen Zellen. Erst mit einsetzender Androgenexposition in der Pubertät erfolgte die Expression sekretorischer Proteine in den adluminalen Zellen, die bereits die NEP enthielten (Renneberg et al., 1995; Renneberg et al., 1997).

Licht- und elektronenmikroskopisch wurde die humane Prostataentwicklung bereits von Kellokumpu-Lehtinen (Kellokumpu-Lehtinen et al., 1980) untersucht. Die postnatale Entwicklung wird normalerweise in vier Phasen eingeteilt: a) eine perinatale Regressionsphase, b) eine infantile Ruhephase, c) eine pubertäre Wachstumsphase und d) eine pubertäre Reifungsphase (Swyer, 1944; Andrews, 1951; Aumüller, 1979). Während in der Regressions- und Ruhephase keine wesentlichen Unterschiede der Immunreaktivität der NEP gegenüber den vorhergehenden Phase erkennbar waren, begann mit einsetzender Pubertät die Neubildung von Gängen, und das zunächst mehrreihige Epithel nahm seine definitive Form mit flachen Basal- und zylindrischen Drüsenzellen an. Dabei vergrößerte sich der Azinusburchmesser, d.h. die Zellen mit apikaler Immunreaktivität für NEP entfernten sich voneinander. Gleichzeitig verschwanden die letzten Reste der metaplastischen Plattenepithelzellen

und der Glycoprotein-produzierende Zellen (Aumüller, 1995). Die Bildung der sekretorisch aktiven Azini beginnt normalerweise mit 15 bis 16 Jahren und konnte anhand der einsetzenden Immunreaktivität für die Androgen-abhängig sezernierten Proteine PSA und PAP verfolgt werden. Ein wichtiger Aspekt ist die Expression der NEP in einem Stadium fehlender bzw. geringer Androgen-Sensitivität, bei der die intraprostatatischen Androgenspiegel sehr niedrig sind (Zondek et al., 1986). Diese Hormon-unabhängige Expression läßt einen frühzeitigen Nachweis von präsumptiven sekretorischen Zellen zu.

Durch Immunhistochemie konnte die Verteilung der NEP in normalem, BPH- und Prostatakarzinomgewebe beschrieben werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Lokalisation der NEP im Epithel der normalen und der BPH-Prostata, während das Enzym beim Prostatakarzinom eine sehr heterogene Verteilung aufwies (Albrecht et al., 2002).

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz - Methode, in der normalen, ausdifferenzierten adulten Prostata wurde die NEP hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran des adluminalen Epithels detektiert. Weder die Basalzellen noch die neuroendokrinen Zellen zeigten eine Immunreaktivität mit dem NEP-Antikörper. Im Stroma wurden die Endothelzellen der Kapillaren und einige glatte Muskelzellen schwächer gefärbt (Kapitel 4.1.1). Diese polare, apikale Lokalisation der NEP in den Drüsenzellen veränderte sich jedoch in pathologisch transformiertem Prostataepithel.

In hyperplastischen Drüsen war die Immunreaktivität der NEP in den adluminalen Zellen auch an der apikalen Plasmamembran nachzuweisen. Im Stroma wurden die Endothelzellen der Kapillaren und die zahlreiche hyperplastische glatte Muskelzellen gefärbt (Kapitel 4.1.2).

Ähnlich wie in der Embryonalentwicklung entsteht in differenzierten bzw. Kribriformen Karzinomen eine Lumenbildung, die mit dem NEP-Antikörper verfolgt werden konnte (Renneberg et al., 1996; Renneberg et al., 1997). Diese Lumenbildung ist ein wesentlicher Schritt in der Entwicklung eines drüsigen Organs und ein offenbar stark regulierter und genetisch determinierter Prozess, der nach maligner Transformation der Zellen reaktiviert werden kann. Die Lokalisation der NEP war dabei in Karzinomen nicht mehr auf die apikale Zellmembran beschränkt, sondern ähnelte der membranständigen Verteilung in metaplastischem Epithel fetaler Prostata

und deutete auf einen Polaritätsverlust der Zellen hin. Als Besonderheit trat in stark anaplastischen Zellen die NEP-Immunreaktivität nicht auf die Zellmembran begrenzt, sondern generalisiert im gesamten Zytoplasma auf. Dieser Wechsel des NEP-Verteilungsmusters innerhalb der anaplastisch transformierten Zellen spricht für ein gestörtes intrazelluläres Positionieren des neugebildeten Membranproteins bzw. einen fehlerhaften intrazellulären Transport (Renneberg et al., 1997).

Die Expression der NEP auf der Oberfläche von LNCaP- und hPCPs-Zellen wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP zeigten eine intensive Färbung auf die Plasmamembran, das gesamte Zytoplasma wurde schwächer gefärbt, während die hPCPs nach Inkubation mit dem Antikörper nur eine sehr schwache Reaktion in Zytoplasma aufwiesen. Die Zellkerne sind negativ (Kapitel 4.1.4). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine deutliche Markierung der Plasmamembran normaler Prostataepithelzellen nach Inkubation mit Immunogold gekoppelten NEP-Antikörpern, während nur wenige Immunogold-Partikel an der Plasmamembran der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP zu finden waren (Renneberg et al., 2001).

In situ RT-PCR ist eine neue molekularbiologische Methode für Forschung und Diagnostik, die die Empfindlichkeit einer Polymerasenkettenreaktion mit dem Vorteil der In-situ-Hybridisierung verbindet. Diese Methode wird ebenfalls dazu benutzt, um das Expressionsmuster eines spezifischen Gens darzustellen. Bei dieser Methode wird kein Fragment des zu untersuchenden Gens als Sonde markiert, sondern mittels einer RT-PCR versucht, die spezifische RNA direkt im Gewebe zu amplifizieren, gesuchte mRNA-Abschnitte spezifisch einzelnen Zellen zuzuordnen. Zusätzlich kann durch optische Kontrolle des Reaktionsproduktes die Gefahr falsch-positiver Resultate durch Kontamination mit Fremd-DNA minimiert werden. Der Nachweis erfolgte über DIG-markierte Nukleotide, die bei dieser Reaktion in das Amplifikat eingebaut wurden (Komminoth & Long, 1993; Nuovo, 1996; Krams et al., 2000).

Durch In Situ RT-PCR in der normalen adulten Prostata bzw. hyperplastischen Prostata, läßt sich eine starke zytoplasmatische Anfärbung in zahlreichen adluminalen Zellen erkennen, bei Prostatakarzinom sind die verhältnismäßig schwachen zytoplasmatischen Signale in malignen proliferativen adluminalen Zellen zu finden. Bei allen Präparaten zeigen die Basalzellen keine Signale. Im Stroma wurden die Endothelzellen der Kapillaren und glatte Muskelzellen leicht gefärbt. Die Zellkerne

sind nicht gefärbt. In den LNCaP-Zellen bzw. hPCPs-Zellen wurden intensivere Signale im Zytoplasma deutlich detektiert und die Zellkerne zeigen negative (Kapitel 4. 2. 2. 2).

Außer der NEP-Lokalisation deuten die bisher geschilderte Ergebnisse darauf hin, daß der Expressionsspiegel der NEP in epithelialen und in stromalen Zellen der Prostata unterschiedlich ist.

## **5.2 NEP-Expression und der Einfluß von Androgenen und Neuropeptiden auf die NEP-Genexpression in epithelialen und stromalen Prostatazelllinien**

Durch Modifikation des von Papandreou et al. (Papandreou et al., 1998) beschriebenen enzymatischen NEP-Assays konnte die Aktivität der membrangebundenen NEP quantifiziert werden. Mit diese Methode konnte gezeigt werden, daß die NEP in der Plasmamembran der stromalen Zellen lokalisiert ist und im Vergleich zu den LNCaP-Zellen eine um 25% verminderte Aktivität besitzt. Die enzymatische Aktivität der membrangebundenen NEP unterliegt bei den hPCPs-Zellen keiner Regulation durch Androgene und Östrogene (Albrecht et al., 2002).

Um Informationen über die Expression der NEP in der pathologisch veränderten Prostata zu erhalten, wurden 1-Schritt-RT-PCR-Versuche mit NEP-spezifischen Primern bei den Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und den stromalen Prostatazellen hPCPs durchgeführt. In allen untersuchten Proben konnte die NEP-mRNA detektiert werden, und die NEP mRNA-Expressionsquantität bei hPCPs ist deutlich geringer als bei LNCaP

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse wurde die NEP in Lysaten der epithelialen LNCaP und der stromalen hPCPs nachgewiesen. Unter Verwendung eines polyklonalen NEP-Antikörpers konnte dabei bei beiden untersuchten Zellarten eine Bande bei etwa 100 kDa detektiert werden. Weiterhin waren Signale in einem 110 kDa Molekulargewichtsbereich bei stromalen hPCPs vorhanden, bei denen es sich vermutlich um Mutationsprodukte des Ausgangsmoleküls und subzellulärer abwachsender Lokalisation der NEP handelt. Außerdem war das Signal aus LNCaP Zellen schwächer als die aus hPCPs Zellen. Die als Kontrolle verwendete aufgereinigte humane NEP (ohne Intrazellular-Domänen) zeigte Banden im Bereich 95 kDa (Kapitel 4. 2. 1).

Durch Immunfluoreszenz, In Situ RT-PCR, RT-PCR und Westernblot konnte die NEP-Genexpression in Prostatagewebe und Zelllinien detektiert werden. Aber alle diese sind nicht quantitative Methoden. Um die Genexpression sehr genau quantifizieren zu können, müssen andere Methoden verwendet werden, die den Vorteil einer höherer Sensitivität haben,

Um zu untersuchen, ob Androgene und Neuropeptide in die Expression der NEP in LNCaP- bzw. hPCPs-Zellen involviert sind, wurden die Zellen für 12 Stunden mit DHT ( $10^{-8}$  M) bzw. Bombesin ( $10^{-8}$  M) inkubiert, und die Expression der NEP durch Northern-Blot-Analyse der Total-RNA untersucht. Als Hybridisierungsproben für die Northern Analyse dient eine  $^{32}\text{P}$ -markierte NEP cDNA-Sonde zur Untersuchung der Expression des NEP und eine  $^{32}\text{P}$ -markierte 18S rRNA-Sonde. Das Ergebnis zeigt, daß ohne Stimulation eine basale NEP-Expression in den LNCaP-Zellen detektierbar ist, während die Hybridisierung mit der 18S rRNA-Sonde, die konstitutiv und unabhängig von der Stimulation ist, eine deutliche Bande zur Folge hat. Die Behandlung mit DHT bzw. Bombesin führt zu einer 4-fach-Erhöhung (mit DHT) und einer 3.6-fach-Erhöhung (mit Bombesin) der NEP-Expression. In den hPCPs-Zellen ist kaum eine NEP-Expression detektierbar und die Expression ist unabhängig von DHT- oder Bombesin-Stimulation. Die basale NEP-Expression in der hPCPs-Zellen im Vergleich zu den LNCaP-Zellen besitzt eine um ca. 30% verminderte Menge.

Dies deutet darauf hin, daß Androgen- und Neuropeptid-Stimulation in die NEP-Expression ausschließlich in LNCaP-Zellen involviert sind und die NEP-Expression in den hPCPs-Zellen nur gering und unabhängig von Androgene bzw. Neuropeptid ist.

### **5.3 Identifizierung regulatorischer Bereiche am NEP-Typ II Promotor durch Deletionsanalysen**

Mit verschiedenen Zelllinien wurden mehrere *cis*-regulatorische Elemente oder Bereiche am NEP-Typ II Promotor identifiziert. Eine reverse CCAAT-Sequenz von -125 bis -129, eine Bindungsregion für einen unbekanntes positiven factor von -93 bis -54 und eine Bindungsregion für einen unbekanntes negativen factor von -52 bis -23 in humanen fetalen bronchialen Epithelzellen und humanen akuten lymphoblastischen Leukämie-Zellen (Ishimaru et al., 1997), eine bekannte GCGGGTCCGAGGGATG CCCA - Sequenz als ARR (Androgen-responsiv-Elemente) von -282 bis -305 in

Simian-Niere-Zellen (COS-7) (Shen et al., 2000), konnten von verschiedenen anderen Autoren gezeigt werden.

Durch Deletionsanalyse und Transfektionsexperiment der Promotorkonstrukte wurden mehrere *cis*-regulatorische Elemente am NEP-Typ II Promotor identifiziert. Dazu wurden Deletionskonstrukte des NEP-Reportergenkonstruktes NEP-(-379~+227)-Luc hergestellt. Die Deletionskonstrukte NEP-(-379~+227)-Luc, NEP-(-379~+40)-Luc, NEP-(-154~+40)-Luc, NEP-(-154~-6)-Luc, NEP-(-154~-48)-Luc wurden in die LNCaP-Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert ( $n > 3$ ) und die transkriptionelle Aktivität durch die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfaßt.

Für alle Konstrukte war die basale transkriptionelle Aktivität niedrig, und nur gering individuell verschieden. Nach der Stimulation mit Androgen (DHT,  $10^{-8}$  M, 36 h) zeigten die NEP-Promotorkonstrukte NEP-(-379~+227)-Luc und NEP-(-379~+40)-Luc eine induzierte Steigerung in der Aktivität um ca. 6.5 fach. Eine Reduktion von ca. 30 % in der induzierten Aktivität zeigten die Deletionen von NEP-(-379~+40)-Luc nach NEP-(-154~+40)-Luc. Der Abfall der Aktivität weist auf positiv *cis*-regulatorische Elemente im Deletionsbereich hin.

Einen geringeren Abfall der induzierten Promotoraktivität zeigte die Deletion von NEP-(-154~+40)-Luc nach NEP-(-154~-6)-Luc. Im Gegensatz dazu wiesen die Deletionen von NEP-(-154~-6)-Luc nach NEP-(-154~-48)-Luc einen geringeren Anstieg der Promotoraktivität auf, so daß sich hier relevante negativ *cis*-regulatorische Elemente befinden könnten.

#### **5.4 Identifizierung regulatorischer Elemente am NEP-Typ II Promotor**

Die Deletionsanalyse der 5'-flankierenden DNA des NEP Typ II - Promotors in der Prostata-Zelllinie LNCaP weist auf mehrere *cis*-regulatorische Elemente in der Nähe des Typ II - Transkriptionsstartpunktes hin.

Die Sequenzanalyse dieser Region zeigte zwei Sp1-Bindungsstellen mit einer GGCGG-Sequenz im Bereich von -262 bis -250 sowie eine reverse CCAAT-Box von -129 bis -124. Es wurde daher untersucht, ob Sp1 und NF-Y in diesem Bereich des NEP-Promotors binden. Der Nachweis der Protein-Bindung an die NEP-

Promotorsequenz erfolgte durch DNase-Protektionsversuche und Gelretardations-Experimente.

Um eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an den NEP-Promotor nachzuweisen, wurden DNase I-Protektionsversuche (DNase I-Footprinting) durchgeführt. Dazu wurde ein Fragment des NEP-Promotors von -379 bis +40 eingesetzt. Die Autoradiographie des DNase I-Footprinting zeigte an dem unteren Strang des NEP-Promotors einen deutlichen Schutz bei der Bindung mit Zellkernextrakten aus LNCaP- und HeLa-Zellen an vier Bereichen. Zum einen die reverse CCAAT-Sequenz von -125 bis -129, was bereits in humanen fetalen bronchialen Epithelzellen und humanen akuten lymphoblastischen Leukämie-Zellen gezeigt werden konnte (Ishimaru et al., 1997), zum anderen die GGCGG-Box von -250 bis -262, weiterhin die bekannte GCGGGTCGGAGGGATGCCCA-Sequenz von -282 bis -305, was bereits als ARR (Androgen-responsiv-Elemente) in Simian-Niere-Zellen (COS-7) gezeigt werden konnte (Shen et al., 2000) und schließlich die unbekannte Sequenz von -153 bis -174.

An dem oberen Strang des NEP-Promotors zeigte das DNase I-Footprinting einen LNCaP-spezifischen Schutz bei der Bindung mit Zellkernextrakten aus mit DHT gewachsenen LNCaP-Zellen an zwei unbekanntem Bereichen -106 bis -87 und -66 bis -26.

Zur weiteren Charakterisierung der Bindung von Proteinen an die untersuchten *cis*-regulatorischen Sequenzen im NEP-Promotor wurden Gelretardations-Experimente („Bandshifts“ und „Supershifts“) durchgeführt. Die DNase-Protektionsversuche wiesen auf eine Beteiligung von Proteinen aus NF-Y und aus der Sp-Familie hin, so daß Versuche mit zwei DNA-Fragmenten durchgeführt wurden, die die CCAAT-Box (Ishimaru et al., 1997) von -155 bis -111 und die Sp1-Bindungsstelle von -269 bis -241 enthielten.

Die Gelretardations-Experimente zeigten, daß mit allen Zellkernextrakten ein Komplex gleicher Mobilität detektiert werden konnte. Die Proteinbindung konnte durch Einsatz von Ea-Y (Dorn et al., 1987) als Kompetitor an die reverse CCAAT-Box aufgehoben werden. Es handelte sich jeweils um spezifische Bindungen, da ein Oligonukletid mit beliebiger Sequenz und ein Oligonukletid mit mutierter NEP NF-Y

Sequenz, als Kompetitor eingesetzt, keine Auswirkung auf die Komplexbildung an die reverse CCAAT-Box hatte, aber diese durch Selbstkompetition verhindert wurde.

Um zu zeigen daß es sich bei dem mit den reversen CCAAT-Boxen interagierenden Protein tatsächlich um NF-Y handelt, wurde ein „Supershift“ mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch eine Untereinheit des NF-Y (CBF-A) erkennt, durchgeführt. Spur 12 zeigt, daß bei den reversen CCAAT-Boxen der Proteinkomplex durch die Antikörper-Bindung eine geringere Mobilität erhielt, und es somit zu einer Verschiebung der Proteinbande („Supershift“) im Gelretardationsassay kam. Dieser Gelretardationsassay zeigt, daß NF-Y oder ein zumindest sehr nah verwandtes Protein das mit den reversen CCAAT-Boxen interagierende Protein ist.

Mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten sollte überprüft werden, ob es tatsächlich Sp-Faktoren sind, die an den NEP-Promotor binden, und um welche es sich handelt. Da sich die Bindungssequenz von Sp2 (GGTGTGGG) von den Bindungssequenzen der anderen Sp-Faktoren (GGGGCGGG) unterscheidet, können nur Sp1, Sp3 oder Sp4 an den NEP-Promotor binden. Während Sp1 und Sp3 ubiquitär exprimiert werden, findet man Sp4-Expression vor allem im Gehirn und im zentralen Nervensystem (Suske, 1999). Da Sp4 also nicht in den Geweben mit starker NEP-Expression exprimiert wird, wurden in den Versuchen nur die beiden Faktoren Sp1 und Sp3 näher untersucht.

Das Ergebnis zeigt, daß mit allen Zellkernextrakten, die aus HeLa-Zellen und LNCaP-Zellen (mit / ohne DHT und mit Bombesin) hergestellt wurden, ein Komplex gleicher Mobilität detektiert werden konnte. Die Proteinbindung konnte durch Einsatz von kanonischer GC-Box (Suske, 1999) als Kompetitor an die Sp-Bindungsstelle (GC-Box) aufgehoben werden. Es handelte sich jeweils um spezifische Bindungen, da ein Oligonukleotid mit beliebiger Sequenz und ein Oligonukleotid mit mutierter NEP Sp-Bindungsstelle, als Kompetitor eingesetzt, keine Auswirkung auf die Komplexbildung an die GC-Box hatte, aber diese durch Selbstkompetition verhindert wurde.

Schließlich wurden der Reaktion von Kernproteinen aus mit DHT gewachsenen LNCaP-Zellen noch Antikörper gegen Sp1 bzw. Sp3 (polyklonale Antikörper, hergestellt und zur Verfügung gestellt von Prof. G. Suske, Marburg) zugegeben. Bei Zugabe von anti-Sp1 traten weiterhin beide Banden auf, bei Zugabe von Anti-Sp3 trat

die untere Bande nicht mehr auf. Bei Kombination beider Antikörper war auch die obere Bande sehr schwach erkennbar. Offensichtlich bindet vor allem der Transkriptionsfaktor Sp3 an die NEP Sp-Bindungsstelle, in geringem Maß kann jedoch auch Sp1 an diese Bindungsstelle binden.

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß sowohl in der LNCaP-Zelllinie als auch der HeLa-Zelllinie NF-Y und Sp1 am NEP-Promotor binden und zwar an der GGCGG-Sequenz von -250 bis -262 und der CCAAT-Box von -125 bis -129 und an der Regulation des NEP-Promotors beteiligt sind.

### **5.5 NF-Y ist ein wichtigerer Transkriptionsfaktor für die basale Aktivität des NEP Typ II - Promotors**

Durch DNase - Footprinting des -379 / +40 NEP Typ II - Promotorfragments wurde ein starker Schutzbereich in Positionen -142 / -110 aufgedeckt. Weil dieser Schutzbereich nicht nur mit Kernextrakten aus durch DHT induzierten oder nicht induzierten LNCaP Zellen beobachtet wurde, aber auch mit Hela-Zellkernextrakt, deutet darauf hin, daß dieser Schutzbereich wahrscheinlich durch ubiquitär vorhandene Proteine verursacht werden. Die Sequenzanalyse in Verbindung mit vermutlich ubiquitär vorhandenen Proteine führte zu der Hypothese, daß der Nuclear Factor Y (NF-Y) in diesem Schutzbereich des NEP-Promotors bindet. Diese Hypothese wurde durch Gelretardations-Experiment in vitro bestätigt. Das Experiment zeigte, daß LNCaP - und Hela - Kernextraktproteine eine CCAAT-Box um ungefähr -125 innerhalb der Mitte vom Schutzbereich beim Footprint erkennen.

Transfektion des Reportergenkonstruktes mit durch Mutation standene Variation der Verbindungsstelle, die in EMSAs die DNA-Bindung blockieren kann, zeigte, daß NF-Y für die basale Aktivität des Promotors wichtig ist,

Das CCAAT Motiv ist eins der allgemeinen DNA-Bindungselemente, die in den Promotoren von ungefähr 30% aller Säugetier-Gene beim Nukleotidvergleich von 502 nicht relevanten RNA-Polymerase II Promotoren vorhanden sind (Bucher, 1990). Das Motiv wird häufig zwischen - 80 bp und - 100 bp stromaufwärts von der Transkriptionsanfangsstelle gefunden, aber in die meisten ATTGG-TATA-freien Promotoren (62%) sind die NF-Y Bindungsstelle zwischen - 41 bp und - 80 bp. Wenn Gene verglichen werden, werden die Sequenzen um den CCAAT-Box in hohem

Grade konserviert. Hier befindet sich die NEP CCAAT-Box (ATTGG-TATA-less) in Position -125 (1998).

NF-Y, auch genannt CCAAT-Bindungsfaktor (CBF), ist ein einzigartiges DNA-Bindungsprotein, das auf das CCAAT Motiv einwirkt, das auch eine Y-Box genannt wird. Die Affinität von NF-Y, das an DNA bindet, schwankt abhängig von den Sequenzen, die an CCAAT angrenzen. Hochaffine CBF-Bindungsstellen sind durch PCR-vermittelte randomisierte Bindungsstelleauswahl definiert worden und das Konsensus 5'- [T/C][A/G][A/G ] CCAAT CA - 3 ' wurden erbracht (Bi et al., 1997). Durch eine Übersicht von 178 CCAAT-Box, an den NF-Y bindet, wurde die CCAAT Sequenz als die absolute Anforderung für eine leistungsfähige Bindung bestätigt und wurden die spezifischen flankierenden Sequenzen - C, Pu, Pu auf der 5'-Seite und C/G, A/G, G, A/C, G auf der 3'-Seite auch gezeigt, die für eine leistungsfähige Bindung erforderlich werden (Mantovani, 1998). Die flankierenden Sequenzen der NEP CCAAT-Box (5'-CGA-CCAAT-GAGCG-3 ') zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit der angrenzenden Sequenzen. Zusammen mit den Ergebnissen, die von den EMSA Gelretardations-Experimenten mit der hohen Affinität der Maus MHC II EA Y-Box (Kapitel 4.4.2.2), erreicht werden, kann man feststellen, daß das NEP CCAAT Motiv auch eine vergleichbar hohe Affinität für NF-Y besitzt.

Es ist bekannt, daß einige Proteine an CCAAT-Motive binden können. Aber unter diesen, erfordert nur NF-Y einen sehr hohen Grad der Sequenzkonservierung. Andere CCAAT - Bindungsproteine schließen CTF / NF1 und CCAAT / Enhancer-Bindungsprotein (C / EBP) ein, aber ihre Bindungsstellen enthalten häufig nicht den kompletten CCAAT - Box. Folglich kann NF-Y von anderen CCAAT-Bindungsproteinen auf der Basis der die Bindung erfordernde DNA-Sequenz unterschiedet werden (Maity & de Crombrughe, 1998).

Promotoren mit CCAAT-Motiven können in drei Gruppen geteilt werden, die auf dem Effekt einer CCAAT Mutation auf die Promotoraktivität basieren (Maity & de Crombrughe, 1998). Gruppe 1 Promotoren z.B. der Promotor in der Maus MHC Klasse II EA (Dorn et al., 1987) zeigen eine verringerte basale Transkription durch Abwesenheit des Stimulationswirkstoffes. In Gruppe 2 werden Promotoren durch das Addition eines Induktionswirkstoffes oder durch den Entzug eines repressiven Wirkstoffes aktiviert, die Stimulation der Transkription erfordert dabei ein intaktes CCAAT Motiv. Gruppe 3 Promotoren werden während der Zell-Proliferation reguliert

und mehrere von ihnen enthalten multiple CCAAT Motive. Infolgedessen und wegen der Tatsache, daß eine Mutation in der Y-Box nur die basale Transkription beeinflußt, besitzt das SCGB Gen ein Gruppe 1 CCAAT Motiv.

NF-Y besteht aus drei Untereinheiten B, A und C, die auch als CBF A / NF-Y B, CBF B / NF-Y A und CBF C / NF-Y C beschrieben worden sind (Maity & De Crombrughe, 1996). In jeder Untereinheit wird das Segment, das für Anordnung des NF-Y / DNA-Komplexes benötigt wird, von Hefe zu Mensch konserviert (Chodosh et al., 1988). Interessant ist, dass CBF A / NF-Y B und C / NF-Y C eine Domäne enthalten, die mit dem Histonfaltungsmotiv der eukaryotische Histone übereinstimmend ist. Die Histonfaltungsmotive von CBF A / NF-Y B und CBF C / NF-Y C wirken auf einander ein, um ein beständiges Heterodimer zu bilden, das sich mit Untereinheit B / NF-Y A verbindet, um ein heterotrimeres NF-Y Molekül zu bilden (Abb. 5-1), das dann an DNA binden kann (Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996). Keine der NF-Y einzelnen Untereinheiten oder des NF-Y BC Heterodimers, sondern nur der heterotrimere Komplex bindet an DNA.

Obleich dieser heterotrimere Komplex die NF-Y Funktionseinheit ist, ist unterschiedliche Expression der Untereinheit B unter spezifischen Bedingungen in einigen Zell-Linien beobachtet worden, die auch eine Änderung der NF-Y abhängigen Promotoraktivität ergaben. Diese Zell-spezifische Änderung der Synthese der Untereinheit B ergibt variable NF-Y Aktivität in den unterschiedlichen Zellen. Das deutet darauf hin, obgleich der NF-Y ein ubiquitär vorhandener Transkriptionsfaktor ist, differentiale Expression der NF-Y Untereinheiten während des Wachstums und der Differenzierung der individuellen Zell-Linien auftreten könnte (Maity & de Crombrughe, 1998). In einigen Promotoren kann die Y Box ein Target für die Regulation sein. In den embryonalen Geweben wirkt ein anderes Protein, das CCAAT-Displacement Protein (CDP), bindet an den CCAAT Boxen und verhindert, daß NF-Y sie erkennt (Kim et al., 1997).

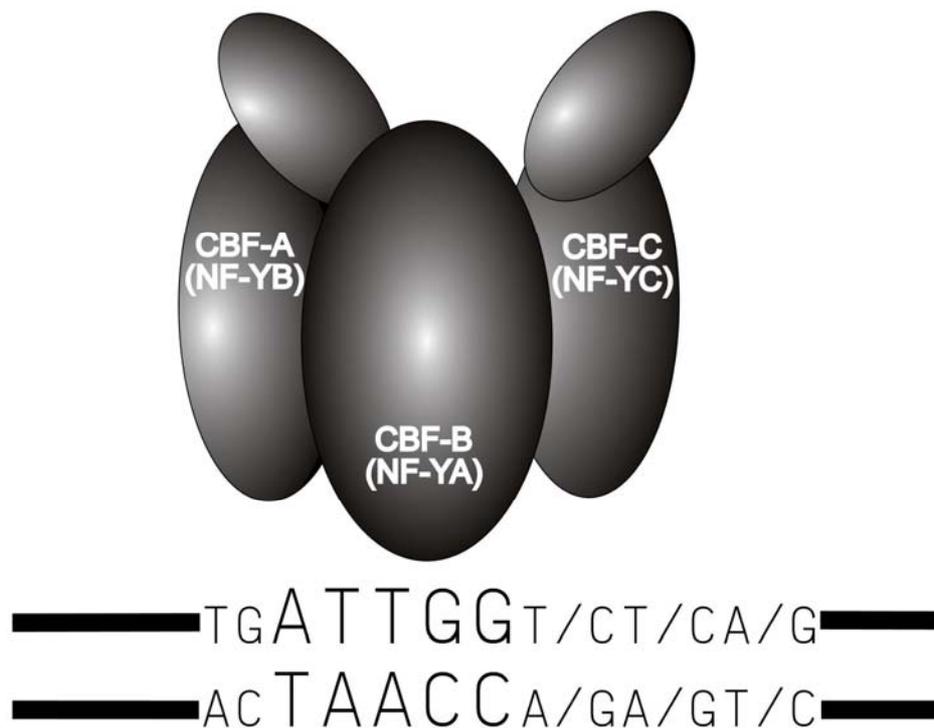


Abb. 5-1: Das heterotrimere NF-Y Molekül bindet an DNA (Maity and Crombrughe, 1998). Die Nukleotidsequenz stellt eine allgemeine NF-Y Bindungsstelle dar (CCAAT im unteren DNA-Strand). A, B, C sind die NF-Y Untereinheiten. Teile von NF-Y A und C außerhalb des heterotrimeren Komplexes enthalten Transkriptionsaktivierungselement.

Eine Möglichkeit, durch die NF-Y die Transkription regulieren könnte, ist durch kooperative Interaktionen mit anderen Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren gegeben. Der Leber-spezifische Serumalbuminpromotor enthält z.B. eine NF-Y Bindungsstelle, die neben einer starken Bindungsstelle für C/EBP liegt. NF-Y und C/EBP aktivieren die Transkription synergistisch in Leberkernextrakten *in vitro*. Jedoch wurde dieser transkriptionale Synergismus nicht beobachtet, wenn die NF-Y Bindungsstelle 10 bp weg von der C/EBP-Bindungsstelle verschoben wird. So wird die genaue Positionierung der C/EBP- und NF-Y-Bindungsstellen im Albuminpromotor für optimale Anordnung eines beständigen Transkriptionskomplexes erfordert (Milos & Zaret, 1992).

Ein anderes Beispiel ist der MHC Klasse II EA Promotor, der ein stereospezifisches Alignment einer sogenannten X-Box und der Y-Box enthält. Eine Mutation in der Y-Box, die die NF-Y Bindung verhindert, verhindert auch *in vivo* die Bindung der

Transkriptionsfaktoren, die die X-Box erkennen. Aber umgekehrt haben Mutationen in der X-Box nur geringe Wirkung auf die NF-Y-Bindung *in vivo*. Diese und andere Ergebnisse deutet darauf hin, daß NF-Y eine entscheidende Rolle hat, die mit seinen Histonfaltungsmotiven zusammenhängen kann, wenn es korrekte Promotorbedingung herstellt (Wright et al., 1994; Linhoff et al., 1997).

## 5.6 Androgen-Response des NEP-Gens

Der DNase I footprint des -379 / +40 NEP-Typ II Promotorfragments deckte auch zwei schwache Schutzbereiche in Positionen -262 / -230 und in Positionen -305 / -282 auf.

Der Schutzbereich in Positionen -305 / -282 wurde nur mit dem Kernextrakt von DHT behandelten LNCaP-Zellen beobachtet, aber der Schutzbereich in Positionen -262 / -230 wurde mit den Kernextrakten von DHT behandelten oder unbehandelten LNCaP Zellen auch mit Kernextrakt von den Helazellen beobachtet werden

Die Sequenzanalyse führte zu der Hypothese, daß ein Sp-Faktor an der GC-Box von -250 bis -262 in diesem Schutzbereich -262 / -230 des NEP-Promotors bindet. Diese Hypothese wurde durch Gelretardations-Experimente *in vitro* bestätigt. Das Experiment zeigte, daß LNCaP - und HeLa - Kernextraktproteine eine GC-Box im Schutzbereich beim Footprint erkennen. Der Schutzbereich in Positionen -305/-282 enthält eine bekannte GCGGGTCGGAGGGATGCCCA-Sequenz, die als ARE (Androgen-Responsiv-Elemente) im NEP-Gen in Simian-Niere-Zellen (COS-7) identifiziert wurde (Shen et al., 2000).

Um zu überprüfen, ob Sp-Faktoren tatsächlich an die Bindungsstelle von -250 bis -262 binden, wurden in die Konstrukte NEP-(-379~+40)-Luc Mutationen eingeführt. Dabei wurde in den Sp-Bindungsstellen die Kernsequenz der Sp-Faktoren (GGGCGG), die für die Bindung notwendig ist, durch TTGCTG ersetzt. Dadurch wurde die putative Bindung der Transkriptionsfaktoren verhindert. In der Folge sollte die Luciferaseaktivität geringer sein. Die Transfektionsexperimente bestätigten diese Vermutung (Abb. 4-19). Bei Verwendung der mutierten NEP-(-379~+40)-Luc-Konstrukte war eine deutliche Reduktion der Aktivität festzustellen.

Ein beobachtetes Phänomen ist, dass durch die Sp-Bindungsstelle-Mutation die Androgen-Responsewirkung relativ schwächer wurde (5.4 / 4.3 fach; t-test  $P < 0.05$  Abb. 4-19), im Gegensatz hierzu zeigte die Deletionsanalyse eine geringere

Androgen-Responsewirkung, wenn die Promotorfragmente kein Androgen-Responseelement und keine Sp-Bindungsstelle [NEP-(-154~+40)-Luc] enthält {von 6.5 [NEP-(-379~+40)-Luc] bis 4.5 [NEP-(-154~+40)-Luc] fach; t-test  $P < 0.01$  Abb. 4-11}. Das deutet darauf hin, dass der Sp-Faktor wichtig für die Androgen-Responsewirkung des Androgen-Responseelements ist.

Die Mechanismen der zugrundeliegenden Regulation des NEP-Gens durch Androgen in den Prostatakarzinomzellen sind unbekannt. Progesteron erhöht NEP mRNA- und Protein-Expression in den humanen endometrialen Stromazellen (Casey et al., 1991) und Glucocorticoide erhöhen die NEP - Expression in SV40 transformierten humanen Tracheal-Epithelzellen (Borson & Gruenert, 1991), in humanen bronchialen Epithel-BEAS-2B Zellen (van der Velden et al., 1998) und in humanen glatten Muskelzellen der Gefäße (Graf et al., 1998). Diese Daten sprechen für das Vorhandensein von Hormone-Response-Elementen (HRE) in der NEP-DNA, die Androgen - (AR), Glukocorticoid - (GR) und Progesteron - (PR) Rezeptoren binden und die Transkription regulieren können.

Die HRE für diesen Subfamilie besteht aus zwei indirekten Wiederholungen eines unvollständigen Sechs - Basenpaares, die durch einen Abstand von 3 Nukleotiden getrennt werden, G G A/T A C A nnn T G T T C T (Roche et al., 1992; Rundlett & Miesfeld, 1995). Diese Sequenz vermittelt Androgen-induzierte, sowie Glukocorticoid- und Progesteron-induzierte Genexpression.

Steroid-Induzierbarkeit wird durch Gewebe-spezifische Expression der Steroid-Hormon-Rezeptoren und Protein-Protein Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren begrenzt (Mader et al., 1993). Viele Androgen-Responsive-Elemente (AREs) bestehen aus HRE ähnlichen Sequenzen mit einer umgekehrten Bindungsstelle, die durch eine Distanzscheibe des 3-bp Nukleotids getrennt wird. Anderes AREs enthalten nur eine einzelne Sequenz der Bindungsstelle (Rennie et al., 1993; Cleutjens et al., 1996).

Im NEP-Gen wurde über die Identifikation und Charakterisierung einer ARE in den 3'-Enden (in Exon 24) des NEP - Gens berichtet. Die Sequenz dieses Elements ist den vorher berichteten HREs ähnlich, die Steroid / Hormon Responsivität der Gene, z.B. PSA regulieren, jedoch sitzen diese Elemente überwiegend in der 5'-flankierenden Region der Transkriptionsanfangstelle (Shen et al., 2000). Die NEP-ARE Sequenz ist

homolog zur Sequenz von vorher berichteten AREs (Roche et al., 1992) und vermittelt Androgen-abhängiges Erhöhen der Transkription in CV-1:AR- und PC-3:AR-Zellen. Diese NEP-ARE (in Exon 24) funktioniert auch mit GR und PR und deshalb kann Dexamethason und Progesteron abhängige Transkription vermitteln.

Ein zweites NEP-ARE, das AR - aber nicht GR - Protein selektiv binden kann, wurde im NEP-Typ II Promotor durch DNA Footprint Analyse gefunden, und induzierte Transkription in einem Reportervektor, der in PC-Zellen transfiziert wurde, ist abhängig von DHT, aber nicht von anderen Steroidhormonen (Shen et al., 2000). Diese Region wird in Abb. 4-13 auch gezeigt. Obgleich die AR Proteine stark auf den NEP-ARE einwirkten, war die Erhöhung der Transkription in einem Thymidin-Kinase-Promotor nur zweifach. Diese schwache Induktion ist der ähnlich, die mit einem homologen Element beobachtet wird, das im Promotor des PSA-Gens identifiziert wird (Cleutjens et al., 1996).

SP Faktoren bilden zwei Untergruppen innerhalb der Familie der Sp / XKLF Transkriptionsfaktoren (Philipsen & Suske, 1999) der Untergruppe 1, die vier Mitglieder Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 einschließt. Sp1 ist ein ca. 100 kDa Polypeptid, aber erscheint als doppelte Bande in den Western Blot, die wahrscheinlich durch Post-Translationalmodifikation verursacht wird, wie z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung. Sp3 hat vier unterschiedliche Isoformen, zwei lange 110-115 kDa Isoforms (G. Suske, unveröffentlichte Beobachtung) und zwei ungefähr 60-70 kDa beschnittene Varianten. Alle vier Proteine werden vom gleichen Gen, aber von den unterschiedlichen Anfangscodons, einschließlich eines sehr seltenen AUA - Anfangscodons für die lange Isoform, übersetzt (Hernandez et al., 2002).

Alle Mitglieder der Sp-Familie zeigen sehr ähnliche strukturelle Eigenschaften (Philipsen & Suske, 1999; Suske, 1999). Ihre in hohem Grade konservierte DNA Bindungsdomäne (81 Aminosäure) (DBD) enthält drei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typ Zinkfinger nah an dem C - Terminus und die Glutamin-reiche-Aktivitätsdomäne neben Serin / Threonin dehnt sich in ihre N - Terminus Regionen aus. Wegen der hohen Konservierung des DBD, erkennen Sp1, Sp3 und Sp4 eine GC-Box mit der gleichen Affinität (Hagen et al., 1992, 1994).

Jeder Zinkfinger von Sp1 erkennt ein DNA-Triplet durch spezifische Interaktionen mit einer Erkennungshelix. Molekulare Dynamiksimulationen deuteten darauf hin,

daß die Triplet TGG, GGG und GAG in Triplet-Position 1 bevorzugt werden. Triplet-Position 3 wird von TGG, GGG, GAG, GGA oder GAA bevorzugt, während Triplet-Position 2 ist dadurch eingeschränkt, daß nur GCG oder GAG hier zugelassen werden, und GGG stark ausgeschlossen wird. Die starke Präferenz für GCG und GAG in Triplet-Position 2 ist auch in der Matrix der Sp1 Bindungsstelle von MatInspector (<http://www.gene-regulation.com>) offensichtlich. Aus 108 biologisch nachgewiesenen Mammalia - Sp1- Bindungsstellen trat GCG in Triplet-Position 2 in 80 Fällen auf, während in 19 Fällen das Triplet GAG gefunden wurde. In 9 Fällen wurde GTG gefunden (Marco et al., 2003).

Einige neue Studien haben gezeigt, daß einige Hormonresponsive Gene irgendein nicht entsprechendes Hormoneresponsiveselement in ihrem Promotor oder nur eine nicht-funktionelle Halb-Stelle enthalten. Stattdessen wird die Hormonresponsivität durch Bindungsstellen für SP-Familie-Transkriptionsfaktoren vermittelt, z.B. ist im Cathepsin-D Gen eine zusammengesetzte GC-box / halb-Stelle ERE Element für die Oestrogeninduktion erforderlich (Krishnan et al., 1994). Wenn die GC-box mutiert und folglich die Bindung der SP - Faktoren unmöglich ist, hat die Oestrogeninduktion verloren (Porter et al., 1996). Mutation der ERE halvesite beeinflusste die Oestrogeninduktion im Transfektionsexperiment nicht. Außerdem wurde für Sp1 und ER gezeigt, daß sie physikalisch aufeinander ein wirken und die DNA-Bindungsdomäne des ER nicht für den Funktionssynergismus beider Faktoren erforderlich ist (Porter et al., 1997). In beiden Fällen ist ein dreifacher Komplex von Sp1, ER und GC-box / halvesite-ERE Probe im EMSA-Versuch gezeigt worden. Ebenso ist die Oestrogeninduktion des Retinoic-Acid-Receptor Gens von der Vollständigkeit von zwei Sp Bindungsstellen funktionell abhängig (Sun et al., 1998).

In einigen anderen HRE-enthaltenen Genen wird die Hormonresponsivität durch Sp - Faktoren moduliert. Im Promotor des Kaninchen-Uteroglobins z.B. ist eine angrenzende Sp-Bindungsstelle ein wesentliches Teil einer zusammengesetzten Oestrogen-Response-Einheit. Das Oestrogen induziert Verstärkung der Oestrogenaktivierung, die von Sp1, aber nicht von Transkriptionsfaktor Sp3 vermittelt wurde (Scholz et al., 1998).

Eine physische Interaktion von AR und Sp-Faktoren würde eine unkomplizierte Erklärung für die Miteinbeziehung der Sp Faktoren sein, wenn sie eine Hormonresponse vermittelt, entweder durch einen genomischen Weg mit Hilfe eines

HRE oder nicht-genomisch über Protein-Protein Interaktionen. Solch eine direkte Interaktion von AR und Sp1 wurde durch Mammalian-One-Hybrid Untersuchung und Koimmunpräzipitations-Experimente entdeckt (Lu et al., 2000). Lu et al. erforschten den Promotor des cyclin-dependent Kinase inhibitor p21, das ein kanonisches Androgen-Response-Element und sechs Bindungsstellen für Sp-Faktoren enthält. Es wurde gefunden, daß Deletion von ARE die Androgenresponse nicht völlig eliminierte, während Mutation der dritten Sp-Bindungsstelle die basale Aktivität sowie Androgenresponse fast eliminierte.

Eine Interaktion zwischen AR und Sp Faktoren konnte auch durch ein Brückeprotein vermittelt werden. Small Nuclear RING Finger Protein (SNURF) wurde in Two Hybrid Untersuchung der Hefe mit der DNA Verbindungsdomäne von AR als Brücke entdeckt (Moilanen et al., 1998). SNURF wirkt auf AR in der Hefe und in den Mammaliazellen mit einer Hormon-abhängigen Form und erhöht nicht nur die Androgen-, Glukocorticoid- und Progesteron-Rezeptor-abhängige Transkription, sondern auch die basale Transkription von Steroid-regulierten Promotoren. SNURF wurde gezeigt, daß die Sp1-Verbindung an der GC-box über die RING-Finger-Domäne erhöht, und mit Sp1 auf die Transkriptionsaktivität (Poukka et al., 2000) einwirkt. Folglich wurde es gedeutet, daß SNURF als eine Funktionsverbindung zwischen Steroid- und Sp1-regulierter Transkription dienen und eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Androgenresponse des NEP-Promotors spielen könnte.

Zusammenfassend möchten wir spekulieren, daß AR und Transkriptionsfaktor Sp1 nach der Bindung an ihren jeweiligen Bindungsstellen innerhalb des NEP-Typ II Promotors miteinander einen Komplex bilden. Die Formation dieses Komplex als Response auf Androgene könnte die Verbindung anderer Co-Aktivatoren und allgemeiner Transkriptionsfaktoren erleichtern, um einen Preinitiationskomplex für die Gentranskription zu bilden (Abb. 5-2). Die Konsequenz dieses Effektes würde Expression des NEP-Gens erhöhen.

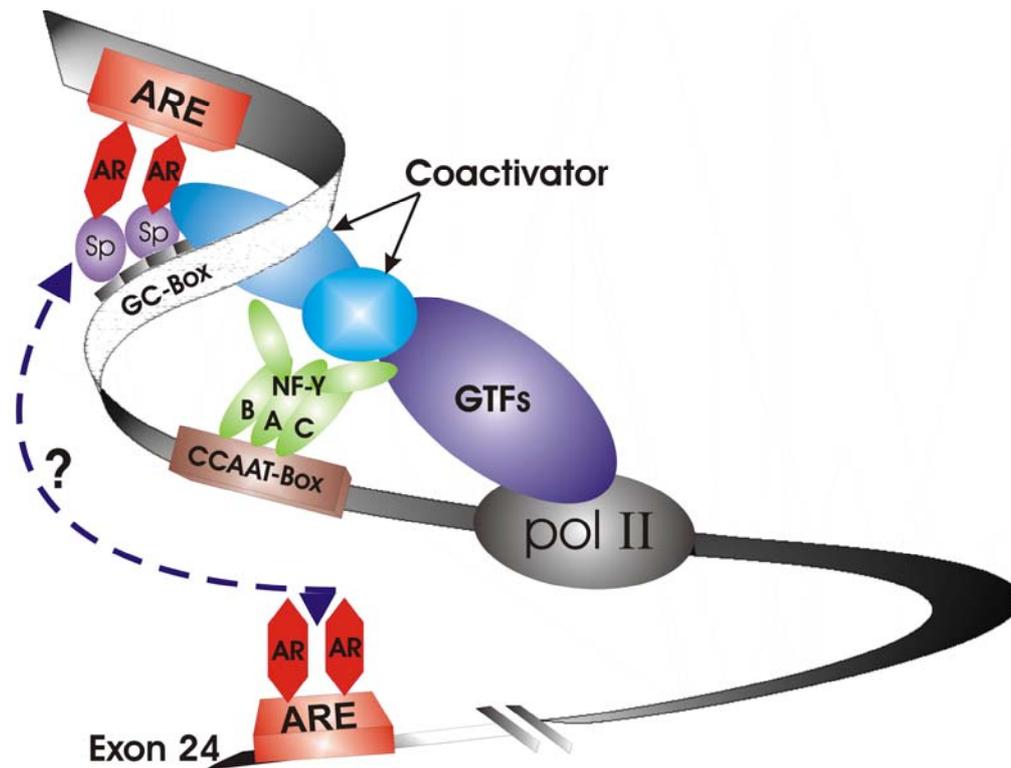


Abb. 5-2: Der mögliche zusammengesetzte Effekt von ARE und Sp1 Bindungsstelle auf die Induktion des NEP-Gens durch Androgen.

Die Konformations-Änderung von AR nach Androgen-Bindung ermöglicht dem Receptor an das ARE zu binden und auf Transkriptionsfaktor Sp1 zu einwirken. Diese Funktionsinteraktion zwischen AR und Transkriptionsfaktor Sp1 erleichtert den Zusammenbau des Transkription-Präinitiation-Komplexes aus Transkriptions-Koaktivatoren und aus allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs). Dies resultiert in einer erhöhten Expression des NEP-Gens. NF-Y, das aus seinen drei Untereinheiten, NF-Y A, B und C besteht, ist nur für basale Expression angeforderlich.

## 5.7 Wie funktioniert NEP in der Prostata?

NEP / CD10 (EC 3.4.24.11; Clan MA; Familie M13; MEROPS-ID: M13.001) ist ein Membranenzym. Es ist Mitglied einer vor kurzem beschriebenen Genfamilie, die die Kell-Blutgruppenproteine sowie „endothelin converting enzyme“ (ECE-1 und -2) einschließt (Turner & Tanzawa, 1997). Das Enzym wird auch als neutrale Endopeptidase 24.11, Neprilysin, Enkephalinase bzw. CALLA (common acute

lymphatic leukemia antigen) bezeichnet. 1974 wurde es von John Kenny und Mitarbeitern aus Kaninchennieren aufgereinigt (Kerr & Kenny, 1974). Unabhängig davon wurde NEP / CD10 später als verantwortliches Ektoenzym für die Inaktivierung von Enkephalinen (endogene Morphin-ähnliche Pentapeptide) im Hirn entdeckt (Matsas et al., 1983). Nach Klonieren und Sequenzieren des Enzyms wurde klar, daß es mit dem leukozytären Oberflächenmolekül CALLA identisch ist (Malfroy et al., 1988; Shipp et al., 1988).

NEP / CD10 ist eine Metalloprotease der Zink enthaltendes Protein - Familie und spaltet Oligopeptide (bis 40 Aminosäuren) bevorzugt am Aminoende hydrophober Aminosäurereste (Abb. 5-3) und wird, ähnlich wie Thermolysin, von Phosphoramidon und Thiorphan gehemmt (Hersh & Morihara, 1986). Das Enzym kommt ubiquitär vor, mit besonders hohen Konzentrationen in den Epithelzellen der Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli, von Dünndarm und Plazenta. Auch findet man es auf Fibroblasten, lymphoiden Vorläuferzellen in Knochenmark und Thymus sowie auf reifen Granulozyten. Eine lösliche Form findet sich im Serum und soll u. a. mit der bronchialen Hyperreaktivität korrelieren (Ratti et al., 2001) und ist besonders hoch in der Synovia von RA-Patienten (Appelboom et al., 1991). Prostatosomen enthalten NEP / CD10 auch (Renneberg et al., 2001). Die Funktion des Enzyms variiert mit seiner Lokalisation; in den Nieren werden Peptide des Ultrafiltrates, Kinine und der „atrial natriuretic factor“ gespalten, im ZNS Opioidpeptide wie Substanz P und Enkephaline, in der Lunge Bombesin und auf Neutrophilen das chemotaktische Peptid FMLP (Painter et al., 1988; Erdos & Skidgel, 1989; Shipp et al., 1991). Im Hirn ist es hauptverantwortlich für den Abbau des Amyloid- $\beta$ -Peptids (Takaki et al., 2000). Knock-out-Mäuse für NEP / CD10 zeigen eine erhöhte Sensibilität für septischen Schock, was durch den verminderten Abbau von Mediatoren wie Endothelin, Bradykinin, Tachykinine oder Enkephaline verursacht sein könnte (Lu et al., 1995). Ein Verlust der Expression von NEP / CD10 auf Prostatakarzinomzellen geht mit einer gesteigerten Migration der Tumorzellen einher (Sumitomo et al., 2000), ein Vorgang, der wahrscheinlich durch direktes Signaling über das Membranenzym ausgelöst wird.



Abb 5-3: Durch NEP / CD10 gespaltene Bindungen in Peptidsubstraten (LeBien & McCormack, 1989; Shipp et al., 1991).

In der Prostata werden Neuropeptide von neuroendokrinen Zellen gebildet, die sich im Epithel des Organs befinden (Aumüller et al., 1999; Aumüller et al., 2001). Neuropeptide kontrollieren durch parakrine, endokrine, autocrine, neurocrine, oder lumencrine Mechanismen die Proliferation der umgebenden Zellen und scheinen zudem eine Rolle bei dem Prostatakarzinom und bei der Pathogenese der benignen Prostatahyperplasie (BPH) zu spielen (Di Sant'Agnese et al., 1987; di Sant'Agnese & Cockett, 1996). Auch das Wachstum von hyperplastischem Prostatagewebe steht in engem Zusammenhang mit der Aktivität neuroendokriner Zellen (Yu et al., 2001). In der humanen Prostata und in der Prostata des Hundes fördert Androgenentzug die Differenzierung von neuroendokrinen Zellen (Ismail & Barth, 2001). Bei Prostatakarzinompatienten geht das Vorkommen neuroendokriner Zellen im Tumor fast immer mit einer schlechten klinischen Prognose einher (Bollito et al., 2001). Wie bei der umstrittenen Herkunft der neuroendokrinen Zellen des Magen-Darm-Trakts aus Derivaten der Neuralleiste (Andrew et al., 1998) wurde auch bei verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien eine Ableitung der neuroendokrinen Zellen aus undifferenzierten Vorläuferzellen angenommen, die in Zelllinien (Qiu et al., 1998), in transgenen Mäusen (Garabedian et al., 1998) oder Xenograft-Modellen (Jongsma et al., 1999) nach Inkubation mit verschiedenen Induktoren (Androgenentzug, Interleukin-6-Behandlung) auftreten. Cox et al. (2000) und Bang et al. (1994)

beschrieben die Entstehung neuroendokriner Zellen aus LNCaP-Zellen nach Aktivierung der Protein Kinase A bzw nach Stimulation mit cAMP und Liu et al. (2002a) fanden einen G1-Arrest und neuroendokrine Differenzierungsprozesse nach Inkubation von LNCaP-Zellen mit Jolkinolide B. Zwei basische helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, human acheate-scute homologue-1 (HASH-1) und hairy/enhancer of split homologue-1 (HES-1) scheinen von entscheidender Wichtigkeit für die Entwicklung neuroendokriner bzw. neuronaler Zellen zu sein. HES-1 ist ein dem Drosophila Protein Hairy homologer Transkriptionsfaktor, der die neuronale Differenzierung negativ reguliert. Eine Herunterregulation der HES-1 Expression in sich entwickelnden Neuroblasten ist vermutlich entscheidend an der Induktion einer regulatorischen Kaskade von bHLH-Aktivatorproteinen beteiligt, welche wiederum das Fortschreiten neuronaler Differenzierungsprozesse, wie z.B. das Auswachsen von Neuriten, steuern (Strom et al., 1997; Castella et al., 1999). Grynfeld et al. (Grynfeld et al., 2000) konnten zeigen, dass die funktionelle Differenzierung von Neuroblastomzellen eng mit einer transienten Aktivierung der HES-1 und Herunterregulation der HASH-1-Expression assoziiert ist. Mit der verminderten Expression von HASH-1 geht ein Auswachsen von Neuriten und die Expression neuronaler Markerproteine einher (Soderholm et al., 1999). Ein wichtiges Zielgen des HASH-1 Proteins ist PACE4, welches für eine Proprotein-Convertase kodiert, die TGF- $\beta$  ähnliche Proteine aktiviert (Yoshida et al., 2001).

Eine grosse Zahl inflammatorischer Erkrankungen besitzt eine neurogene Komponente oder wird zumindest von Neuropeptiden beeinflusst. Primär afferente Nervenfasern geben Neuropeptide ab, welche die Funktionen von Mastzellen und einwandernden Immunzellen modulieren. Die aktivierten Immunzellen können in definierte Bereiche des Organs / Gewebes migrieren und durch die Sekretion spezifischer Cytokine (Scholzen et al., 1998; Gibbs et al., 2001; Weiss & Brown, 2001) die Genexpression und mitogene Aktivität benachbarter Zellen beeinflussen. Aus den genannten Gründen ist die NEP neben ihrer Funktion als Neuropeptid-abbauendes Enzym von wesentlicher Bedeutung für die Regulation entzündlicher Prozesse. Histologisch finden sich gehäuft inflammatorische Reaktionen bei Patienten mit Symptomen einer BPH (Nickel et al., 1999) und auch bei der Entstehung und der Progression des Prostatakarzinoms scheinen Entzündungen eine wichtige, bislang unterschätzte Rolle zu spielen (Liu et al., 2002b). Abb. 5-4 zeigt ein hypothetisches

Modell zur Regulation von Proliferation und Genexpression durch Neuropeptide und NEP.

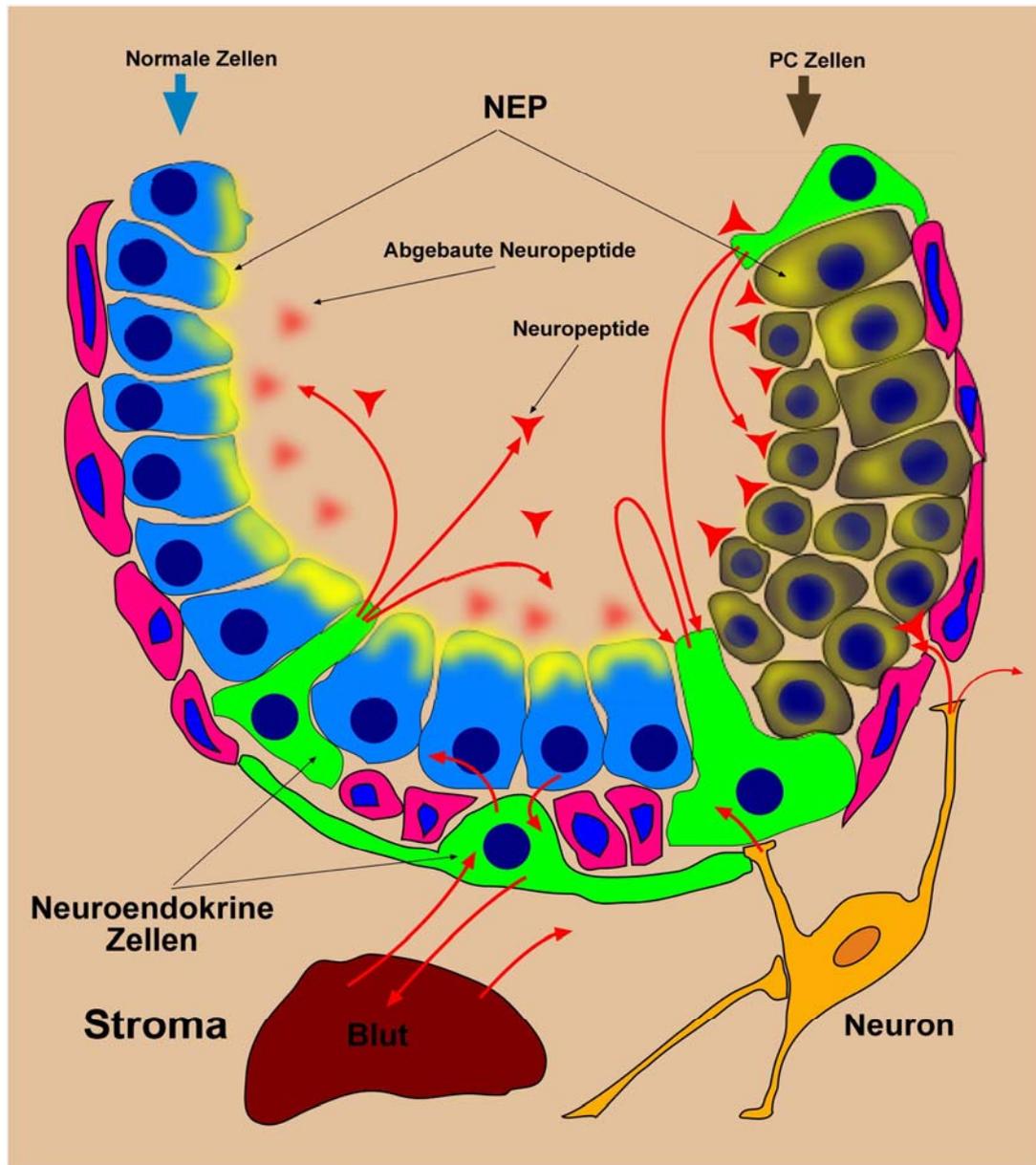


Abb. 5-4: Hypothetisches Modell zur Regulation von Proliferation und Genexpression der Prostata durch Neuropeptide und NEP. Ihre Sekretion könnte apokrin, parakrin, autokrin, neurokrin oder lumenkrin sein und kann die Proliferation und Genexpression benachbarter Zellen (normale und Prostatakarzinom-Zellen), die NEP-Aktivität und die Sekretion von Neuropeptide beeinflussen.

## 6 Zusammenfassung

Die neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11; weitere Synonyme: Neprilysin, CD 10, CALLA) ist ein Typ II - integrales Membranenzym in Säugerzellen, die als Zink enthaltende Endopeptidase die lokale Konzentrationen der Peptidsubstrate und der dazugehörigen Peptid-vermittelten Signalübertragungsprozesse steuern kann. Im Gegensatz zu den angedachten, die von NEP-Aktivität und -Regulation in den Prostataepithelzellen handeln, nur einige Studien sind auf dem zellulären Expression und der Lokalisation der NEP in den Stromal- und Karzinom-zellen der Prostata vorhanden.

Um zu prüfen, ob Unterschiede in der NEP-Verteilung in der normalen und der pathologisch veränderten Prostata als auch in der Prostatazellen bestehen, wurde die NEP-Lokalisation mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz - Methode an Prostatazellen und Paraffinschnitten der humanen Prostata untersucht. In der normalen adulten Prostata, wurde die NEP hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran detektiert. Im Stroma wurden die Endothelzellen der Kapillaren und einige glatte Muskelzellen schwach gefärbt. In hyperplastischen Drüsen war die Immunreaktivität der NEP in den adluminalen Zellen an der apikalen Plasmamembran nachzuweisen. Im Stroma wurden auch die Endothelzellen der Kapillaren und glatte Muskelzellen gefärbt. Im Prostatakarzinom war meist eine generalisierte Immunreaktivität der Zellen vorhanden und die NEP war nicht auf die apikale Plasmamembran beschränkt. Sie verteilte sich vielmehr im gesamten Zytoplasma und ist damit offensichtlich ein Indikator für den Polaritäts- bzw. Differenzierungsverlust in anaplastischen Prostata-karzinomzellen. Die LNCaP zeigten eine intensive Färbung der Plasmamembran, das gesamte Zytoplasma wurde schwächer gefärbt, während die hPCPs nach Inkubation mit dem Antikörper nur eine schwache Reaktion in Zytoplasma aufwiesen.

NEP-Genexpression wurde von RT-PCR überwacht, und NEP mRNA im menschlichen Prostatagewebe und in Prostatazellen wurde mittels in-situ-RT-PCR ermittelt. Prostatagewebe zeigte starke Signale im glandulären Epithel und schwache Signale im Stroma, kultivierte Zellen zeigten starke Signale in den Prostatakrebszellen (LNCaP) und schwache Signale in den stromal Zellen an (hPCPs).

Die NEP-Protein wurde mit Hilfe der Westernblot-Analyse an Lysaten der epithelialen LNCaP und der stromalen hPCPs nachgewiesen. Die Experimente bestätigen den Expression von NEP nach beiden Zelle Arten, jedoch zeigte das Experiment mit hPCPs Zellen zwei Bänder.

Um zu untersuchen, ob Androgene und Neuropeptide in die Expression der NEP in LNCaP- bzw. hPCPs-Zellen involviert sind, wurde die Expression der NEP durch Northern-Blot-Analyse der Total-RNA untersucht. Ohne Stimulation ist eine grundlegende NEP-Expression in den LNCaP-Zellen detektierbar, Die Behandlung mit DHT bzw. Bombesin führt zu einer 4-Fach-Erhöhung der NEP-Expression. In den hPCPs-Zellen ist kaum eine NEP-Expression detektierbar und die Expression ist unabhängig von DHT- oder Bombesin-Stimulation. Die basale NEP-Expression in den hPCPs-Zellen besitzt im Vergleich zu den LNCaP-Zellen nur eine um ca. 30% Menge.

Die Sequenzanalyse des NEP-Promotors deckt zwei Androgenresponselemente einschließlich ein typisches ARE auf, welches Androgen-, Progesteron- und Glukocorticoid-Rezeptoren bindet und ein einzigartiges ARR, das nur Androgenreceptor bindet. Durch Deletionsanalyse und Transfektionsexperiment der Promotorkonstrukte wurden mehre cis-regulatorische Elemente am NEP-Typ II Promotor identifiziert. Mit Deletionsanalyse und Transfektionsexperiment der Promotorkonstrukte, DNase I Footprinting und Bandshift wurden zwei an die proximale Promotorregion bindene Faktoren identifiziert, ein Sp-Faktor an der GC-Box von -250 bis -262 bindet und ein NF-Y Faktor an der CCAAT-Box im Schutzbereich -142 / -110 des Promotors bindet. Transfektion des Reportergenkonstruktes mit durch Mutation standene Variation der Verbindungsstelle, die in EMSAs die DNA-Bindung blockieren kann, zeigte, daß NF-Y für die basale Aktivität des Promotors wichtig ist und daß der Sp-Faktor wichtig für die Androgen-Responsewirkung des Androgen-Responselements ist.

## 7 Summary

Neutral endopeptidase (NEP / CD10) is a cell surface zinc metalloproteinase that functions as part of a regulatory loop controlling local concentrations of peptide substrates and associated peptide-mediated signal transduction processes. In contrast to the encouraging data dealing with NEP activity and regulation in prostate epithelial cells, only a few studies are available on the cellular expression and localization of neutral endopeptidase in the prostatic stromal and cancer cells.

Immunofluorescence and western blot experiments were performed to control the expression and distribution of the NEP in normal and malignant human prostatic tissues and cell lines. NEP gene expression was monitored by RT-PCR, NEP mRNA was detected in human prostatic tissue and in cultured cells by means of in situ RT-PCR. Prostatic tissue showed strong signals in the glandular epithelium and weak signals in the stroma, cultured cells displayed strong signals in prostate cancer cells (LNCaP) and weak signals in stromal cells (hPCPs). NEP-immunofluorescence was strong in normal prostatic epithelium and confined to the apical plasma membrane. In dedifferentiated prostate cancer specimens, immunofluorescence of apical plasma membranes was lost, and both the cytoplasm and portions of the plasma membrane were immunoreactive for NEP. Prostate cancer cells (LNCaP) showed a strong immunoreaction of the plasma membrane and the cytoplasm. In comparison with LNCaP cells, only a weak cytoplasmic immunofluorescence was found in some stromal cells (hPCPs). Western blot experiments were performed using whole cells extracts to proof the presence of NEP protein in LNCaP and hPCPs. The experiments confirm the expression of NEP by both cell types, however, the experiment with hPCPs cells showed two bands.

To study the regulation of NEP expression, Northern blot analysis of total RNA from LNCaP cells showed that NEP-mRNA was 4-fold increased by DHT and bombesin. Expression of NEP in hPCPs cells was very low and was not induced by DHT or bombesin.

Sequence analysis reveals two androgen response elements including a typical ARE which binds androgen, progesterone and glucocorticoid receptors, and a unique ARR

which only binds androgen receptor. Analysis of promoter deletions using luciferase reporter constructs showed that -379~-154 fragment of the promoter still containing the Sp-1 binding site are sufficient to confer androgen responsiveness to the reporter gene. DNase I footprinting identified two factors binding to the proximal promoter region that were found to be the ubiquitous Sp family transcription factors and CCAAT-box transcription factor NF-Y. Analyses of promoter constructs with mutations in the Sp and NF-Y binding sites demonstrated that NF-Y factor significantly contributes to the basal activity, and that Sp helps to mediate the androgen response.

## 8 Literaturverzeichnis

- Albrecht M, Gillen S, Wilhelm B, Doroszewicz J, Aumüller G. 2002. Expression, localization and activity of neutral endopeptidase in cultured cells of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* 168:336-342.
- Andrew A, Kramer B, Rawdon BB. 1998. The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word? *J Pathol* 186:117-118.
- Andrews G. 1951. The histology of the human foetal and prepubertal prostates. *J Anat*:44.
- Appelboom T, de Maertelaer V, de Prez E, Hauzeur JP, Deschodt-Lanckman M. 1991. Enkephalinase: a physiologic neuroimmunomodulator detected in the synovial fluid. *Arthritis Rheum* 34:1048-1051.
- Aumüller G. 1979. Prostate gland and seminal vesicles. *Handb. Mikr. Anat.* Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- Aumüller G. 1995. Hormonal control of prostatic differentiation and morphogenesis: the impact of apoptosis and steroid hormone receptor expression. *Apoptosis in hormone-dependent cancer.* Berlin-Heidelberg-New York: Springer. pp 1-33.
- Aumüller G. 1994. Molekulare Mechanismen bei der Regulation des Prostatawachstums und der Entstehung der benignen Prostatahyperplasie. *Niere, Blase, Prostata.* pp 53-59.
- Aumüller G, Leonhardt M, Janssen M, Konrad L, Bjartell A, Abrahamsson PA. 1999. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* 53:1041-1048.
- Aumüller G, Leonhardt M, Renneberg H, von Rahden B, Bjartell A, Abrahamsson PA. 2001. Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate* 46:108-115.
- Aumüller G, Seitz J. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* 121:127-231.
- Azizkhan JC, Jensen DE, Pierce AJ, Wade M. 1993. Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3:229-254.

- Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha MJ, Tsokos M, Sheahan MD, Nguyen P, et al. 1994. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5330-5334.
- Benoist C, Mathis D. 1990. Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol* 8:681-715.
- Bertaccini G, De Caro G. 1965. The effect of physalaemin and related polypeptides on salivary secretion. *J Physiol* 181:68-81.
- Bi W, Wu L, Coustry F, de Crombrughe B, Maity SN. 1997. DNA binding specificity of the CCAAT-binding factor CBF/NF-Y. *J Biol Chem* 272:26562-26572.
- Bigger CB, Casanova EA, Gardner PD. 1996. Transcriptional regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes. Functional interactions between Sp1 and the rat beta4 subunit gene promoter. *J Biol Chem* 271:32842-32848.
- Bigger CB, Melnikova IN, Gardner PD. 1997. Sp1 and Sp3 regulate expression of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4 subunit gene. *J Biol Chem* 272:25976-25982.
- Birnbaum MJ, van Wijnen AJ, Odgren PR, Last TJ, Suske G, Stein GS, Stein JL. 1995. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 34:16503-16508.
- Bollito E, Berruti A, Bellina M, Mosca A, Leonardo E, Tarabuzzi R, Cappia S, Ari MM, Tampellini M, Fontana D, Gubetta L, Angeli A, Dogliotti L. 2001. Relationship between neuroendocrine features and prognostic parameters in human prostate adenocarcinoma. *Ann Oncol* 12 Suppl 2:S159-164.
- Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M. 1989. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 63:1714-1720.
- Borson DB, Gruenert DC. 1991. Glucocorticoids induce neutral endopeptidase in transformed human tracheal epithelial cells. *Am J Physiol* 260:L83-89.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brand AH, Breeden L, Abraham J, Sternglanz R, Nasmyth K. 1985. Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* 41:41-48.

- Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP, Tjian R. 1986. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234:47-52.
- Brothman AR, Lesho LJ, Somers KD, Wright GL, Jr., Merchant DJ. 1989. Phenotypic and cytogenetic characterization of a cell line derived from primary prostatic carcinoma. *Int J Cancer* 44:898-903.
- Bucher P. 1990. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* 212:563-578.
- Buck AC. 1995. *Prostate cancer : questions and answers*. Basingstoke: Merit.
- Bunn PA, Jr., Helfrich BA, Brenner DG, Chan DC, Dykes DJ, Cohen AJ, Miller YE. 1998. Effects of recombinant neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) on the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 4:2849-2858.
- Carter HB, Coffey DS. 1990. The prostate: an increasing medical problem. *Prostate* 16:39-48.
- Casey ML, Smith JW, Nagai K, Hersh LB, MacDonald PC. 1991. Progesterone-regulated cyclic modulation of membrane metalloendopeptidase (enkephalinase) in human endometrium. *J Biol Chem* 266:23041-23047.
- Castella P, Wagner JA, Caudy M. 1999. Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1. *J Neurosci Res* 56:229-240.
- Chodosh LA, Olesen J, Hahn S, Baldwin AS, Guarente L, Sharp PA. 1988. A yeast and a human CCAAT-binding protein have heterologous subunits that are functionally interchangeable. *Cell* 53:25-35.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J. 1996. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271:6379-6388.
- Cohen AJ, King TE, Jr., Gilman LB, Magill-Solc C, Miller YE. 1998. High expression of neutral endopeptidase in idiopathic diffuse hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1593-1599.

- Cohen AJ, Miller YE. 1999. Neuroendocrine differentiation, neuropeptides, and neprilysin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:1-3.
- Cox ME, Deeble PD, Bissonette EA, Parsons SJ. 2000. Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *J Biol Chem* 275:13812-13818.
- D'Adamio L, Shipp MA, Masteller EL, Reinherz EL. 1989. Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7103-7107.
- Danilition SL, Frederickson RM, Taylor CY, Miyamoto NG. 1991. Transcription factor binding and spacing constraints in the human beta-actin proximal promoter. *Nucleic Acids Res* 19:6913-6922.
- Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H. 1990. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60:733-746.
- de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7:725-737.
- Denmeade SR, Isaacs JT. 1997. Prostate cancer: where are we and where are we going? *Br J Urol* 79 Suppl 1:2-7.
- Di Marco GS, Quinto BM, Juliano M, Carmona AK, Stella RC, Plavnik FL, Casarini DE. 1998. Purification and characterization of a neutral endopeptidase-like enzyme from human urine. *J Hypertens* 16:1971-1978.
- di Sant'Agnese PA, Cockett AT. 1996. Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 78:357-361.
- Di Sant'Agnese PA, Davis NS, Chen M, de Mesy Jensen KL. 1987. Age-related changes in the neuroendocrine (endocrine-paracrine) cell population and the serotonin content of the guinea pig prostate. *Lab Invest* 57:729-736.
- Dignam JD, Martin PL, Shastry BS, Roeder RG. 1983. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* 101:582-598.
- Dorn A, Bollekens J, Staub A, Benoist C, Mathis D. 1987. A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell* 50:863-872.

- Dragovic T, Sekosan M, Becker RP, Erdos EG. 1997. Detection of neutral endopeptidase 24.11 (neprilysin) in human hepatocellular carcinomas by immunocytochemistry. *Anticancer Res* 17:3233-3238.
- Dusser DJ. 1999. Role of neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme in asthma. *Pediatr Pulmonol Suppl* 18:103-104.
- Dynan WS. 1989. Modularity in promoters and enhancers. *Cell* 58:1-4.
- Dynan WS, Saffer JD, Lee WS, Tjian R. 1985. Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4915-4919.
- Dynan WS, Tjian R. 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35:79-87.
- Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R. 1991. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66:563-576.
- Ekström J. 1987. Neuropeptides and secretion. *J Dent Res* 66:524-530.
- Ekström J, Ekman R, Hakanson R, Sjogren S, Sundler F. 1988. Calcitonin gene-related peptide in rat salivary glands: neuronal localization, depletion upon nerve stimulation, and effects on salivation in relation to substance P. *Neuroscience* 26:933-949.
- Ekström J, Mansson B, Tobin G, Garrett JR, Thulin A. 1983. Atropine-resistant secretion of parotid saliva on stimulation of the auriculo-temporal nerve. *Acta Physiol Scand* 119:445-449.
- Ekström J, Olgart L. 1986. Complementary action of substance P and vasoactive intestinal peptide on the rat parotid secretion. *Acta Physiol Scand* 126:25-31.
- Erdos EG, Skidgel RA. 1989. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *Faseb J* 3:145-151.
- Evans RM, Hollenberg SM. 1988. Zinc fingers: gilt by association. *Cell* 52:1-3.
- Fair WR. 1992. The natural history of locally confined prostate cancer: a review. *Prostate Suppl* 4:79-84.
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.
- Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE, Honn KV. 1997. Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate* 31:264-281.

- Garabedian EM, Humphrey PA, Gordon JI. 1998. A transgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15382-15387.
- Gibbs PJ, Sadek SA, Cameron C, Tan LC, Howell WM. 2001. Immunomonitoring of renal transplant recipients in the early posttransplant period by analysis of cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Transplant Proc* 33:3285.
- Gidoni D, Kadonaga JT, Barrera-Saldana H, Takahashi K, Chambon P, Tjian R. 1985. Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science* 230:511-517.
- Gingrich JR, Tucker JA, Walther PJ, Day JW, Poulton SH, Webb KS. 1991. Establishment and characterization of a new human prostatic carcinoma cell line (DuPro-1). *J Urol* 146:915-919.
- Good L, Nazar RN. 1992. An improved thermal cycle for two-step PCR-based targeted mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 20:4934.
- Graf K, Schaper C, Grafe M, Fleck E, Kunkel G. 1998. Glucocorticoids and protein kinase C regulate neutral endopeptidase 24.11 in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 93:11-17.
- Grynfeld A, Pahlman S, Axelson H. 2000. Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int J Cancer* 88:401-410.
- Hagen G, Dennig J, Preiss A, Beato M, Suske G. 1995. Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 270:24989-24994.
- Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 20:5519-5525.
- Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. 1994. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* 13:3843-3851.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Hedlund P, Ekström P, Larsson B, Alm P, Andersson KE. 1997. Heme oxygenase and NO-synthase in the human prostate--relation to adrenergic, cholinergic and peptide-containing nerves. *J Auton Nerv Syst* 63:115-126.

- Hernandez EM, Johnson A, Notario V, Chen A, Richert JR. 2002. AUA as a translation initiation site in vitro for the human transcription factor Sp3. *J Biochem Mol Biol* 35:273-282.
- Hersh LB, Morihara K. 1986. Comparison of the subsite specificity of the mammalian neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) to the bacterial neutral endopeptidase thermolysin. *J Biol Chem* 261:6433-6437.
- Hökfelt T, Elfvin LG, Schultzberg M, Goldstein M, Nilsson G. 1977. On the occurrence of substance P-containing fibers in sympathetic ganglia: immunohistochemical evidence. *Brain Res* 132:29-41.
- Hoof van Huijsduijnen RA, Bollekens J, Dorn A, Benoist C, Mathis D. 1987. Properties of a CCAAT box-binding protein. *Nucleic Acids Res* 15:7265-7282.
- Hori R, Carey M. 1994. The role of activators in assembly of RNA polymerase II transcription complexes. *Curr Opin Genet Dev* 4:236-244.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA. 1980. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37:115-132.
- Huggins C, Stevens R, Hodges C. 1941. Studies on prostatic cancer. II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg*:209.
- Hussain M. 1996. Future directions in prostate cancer treatment: an oncologist's perspective. *Prostate Suppl* 6:26-30.
- Iizumi T, Yazaki T, Kanoh S, Kondo I, Koiso K. 1987. Establishment of a new prostatic carcinoma cell line (TSU-Pr1). *J Urol* 137:1304-1306.
- Ishimaru F, Mari B, Shipp MA. 1997. The type 2 CD10/neutral endopeptidase 24.11 promoter: functional characterization and tissue-specific regulation by CBF/NF-Y isoforms. *Blood* 89:4136-4145.
- Ismail AA, Barth JH. 2001. Endocrinology of gynaecomastia. *Ann Clin Biochem* 38:596-607.
- Jackman HL, Tan F, Schraufnagel D, Dragovic T, Dezso B, Becker RP, Erdos EG. 1995. Plasma membrane-bound and lysosomal peptidases in human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:196-204.

- Janssen M, Albrecht M, Moschler O, Renneberg H, Fritz B, Aumüller G, Konrad L. 2000. Cell lineage characteristics of human prostatic stromal cells cultured in vitro. *Prostate* 43:20-30.
- Jin F, Devesa SS, Chow WH, Zheng W, Ji BT, Fraumeni JF, Jr., Gao YT. 1999. Cancer incidence trends in urban shanghai, 1972-1994: an update. *Int J Cancer* 83:435-440.
- Johansson JE, Adami HO, Andersson SO, Bergstrom R, Holmberg L, Krusemo UB. 1992. High 10-year survival rate in patients with early, untreated prostatic cancer. *Jama* 267:2191-2196.
- Johnson PF, McKnight SL. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 58:799-839.
- Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, Van Weerden WM, Martens GJ, van der Kwast TH, Schroder FH, van Steenbrugge GJ. 1999. Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *Am J Pathol* 154:543-551.
- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51:1079-1090.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16-23.
- Kellokumpu-Lehtinen P, Santti R, Pelliniemi LJ. 1980. Correlation of early cytodifferentiation of the human fetal prostate and Leydig cells. *Anat Rec* 196:263-273.
- Kerr MA, Kenny AJ. 1974. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 137:477-488.
- Kim EC, Lau JS, Rawlings S, Lee AS. 1997. Positive and negative regulation of the human thymidine kinase promoter mediated by CCAAT binding transcription factors NF-Y/CBF, dbpA, and CDP/cut. *Cell Growth Differ* 8:1329-1338.
- Kim IS, Sinha S, de Crombrughe B, Maity SN. 1996. Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol Cell Biol* 16:4003-4013.

- Kingsley C, Winoto A. 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12:4251-4261.
- Kletsas D, Caselgrandi E, Barbieri D, Stathakos D, Franceschi C, Ottaviani E. 1998. Neutral endopeptidase-24.11 (NEP) activity in human fibroblasts during development and ageing. *Mech Ageing Dev* 102:15-23.
- Klug J, Wolf M, Beato M. 1991. Creating chimeric molecules by PCR directed homologous DNA recombination. *Nucleic Acids Res* 19:2793.
- Kokkonen JO, Kuoppala A, Saarinen J, Lindstedt KA, Kovanen PT. 1999. Kallidin- and bradykinin-degrading pathways in human heart: degradation of kallidin by aminopeptidase M-like activity and bradykinin by neutral endopeptidase. *Circulation* 99:1984-1990.
- Komminoth P, Long AA. 1993. In-situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64:67-73.
- Krajewska WM. 1992. Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int J Biochem* 24:1885-1898.
- Krams M, Peters J, Boeckel F, Raether A, Ambros PF, Parwaresch R, Harms D. 2000. In situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction demonstration of the EWS/FLI-1 fusion transcript in Ewing's sarcomas and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Virchows Arch* 437:234-240.
- Krause W, Rothauge C-F. 1981. *Andrologie*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- Krishnan V, Wang X, Safe S. 1994. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269:15912-15917.
- Kumar AP, Butler AP. 1997. Transcription factor Sp3 antagonizes activation of the ornithine decarboxylase promoter by Sp1. *Nucleic Acids Res* 25:2012-2019.
- Kumar AP, Mar PK, Zhao B, Montgomery RL, Kang DC, Butler AP. 1995. Regulation of rat ornithine decarboxylase promoter activity by binding of transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 270:4341-4348.
- Larsen JJ, Ottesen B, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L. 1981. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the male genitourinary tract: concentration and motor effect. *Invest Urol* 19:211-213.

- LeBien TW, McCormack RT. 1989. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10)--emancipation from a functional enigma. *Blood* 73:625-635.
- Leeman SE, Hammerschlag R. 1967. Stimulation of salivary secretion by a factor extracted from hypothalamic tissue. *Endocrinology* 81:803-810.
- Lembeck F, Starke K. 1968. [Substance P and salivary secretion]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259:375-385.
- Li C, Booze RM, Hersh LB. 1995a. Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (neprilysin) mRNAs. *J Biol Chem* 270:5723-5728.
- Li C, Chen G, Gerard NP, Gerard C, Bozic CR, Hersh LB. 1995b. Comparison of the structure and expression of the human and rat neprilysin (endopeptidase 24.11)-encoding genes. *Gene* 164:363-366.
- Liang Y, Robinson DF, Dennig J, Suske G, Fahl WE. 1996. Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors. *J Biol Chem* 271:11792-11797.
- Linhoff MW, Wright KL, Ting JP. 1997. CCAAT-binding factor NF-Y and RFX are required for in vivo assembly of a nucleoprotein complex that spans 250 base pairs: the invariant chain promoter as a model. *Mol Cell Biol* 17:4589-4596.
- Liu WK, Ho JC, Qin G, Che CT. 2002a. Jolkinolide B induces neuroendocrine differentiation of human prostate LNCaP cancer cell line. *Biochem Pharmacol* 63:951-957.
- Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Klausner A, Preston C, Holland JF, Levine AC. 2002b. Prostaglandin E(2) stimulates prostatic intraepithelial neoplasia cell growth through activation of the interleukin-6/GP130/STAT-3 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 290:249-255.
- Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF, Jr., Bozza M, Zurakowski D, Finco O, Carroll MC, Gerard C. 1995. Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J Exp Med* 181:2271-2275.
- Lu J, Lee W, Jiang C, Keller EB. 1994. Start site selection by Sp1 in the TATA-less human Ha-ras promoter. *J Biol Chem* 269:5391-5402.
- Lu S, Jenster G, Epner DE. 2000. Androgen induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene: role of androgen receptor and transcription factor Sp1 complex. *Mol Endocrinol* 14:753-760.

- Mader S, Leroy P, Chen JY, Chambon P. 1993. Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem* 268:591-600.
- Maity SN, De Crombrughe B. 1996. Purification, characterization, and role of CCAAT-binding factor in transcription. *Methods Enzymol* 273:217-232.
- Maity SN, de Crombrughe B. 1998. Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem Sci* 23:174-178.
- Majello B, De Luca P, Hagen G, Suske G, Lania L. 1994. Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res* 22:4914-4921.
- Majello B, De Luca P, Suske G, Lania L. 1995. Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene* 10:1841-1848.
- Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. 1988. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett* 229:206-210.
- Mantovani R. 1998. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res* 26:1135-1143.
- Mantovani R, Pessara U, Tronche F, Li XY, Knapp AM, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D. 1992. Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription. *Embo J* 11:3315-3322.
- Marco E, Garcia-Nieto R, Gago F. 2003. Assessment by molecular dynamics simulations of the structural determinants of DNA-binding specificity for transcription factor Sp1. *J Mol Biol* 328:9-32.
- Matsas R, Fulcher IS, Kenny AJ, Turner AJ. 1983. Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3111-3115.
- Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:560-564.
- McKnight S, Tjian R. 1986. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46:795-805.

- McNeal JE. 1978. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 15:340-345.
- Meisterernst M, Gander I, Rogge L, Winnacker EL. 1988. A quantitative analysis of nuclear factor I/DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16:4419-4435.
- Milos PM, Zaret KS. 1992. A ubiquitous factor is required for C/EBP-related proteins to form stable transcription complexes on an albumin promoter segment in vitro. *Genes Dev* 6:991-1004.
- Moilanen AM, Poukka H, Karvonen U, Hakli M, Janne OA, Palvimo JJ. 1998. Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Mol Cell Biol* 18:5128-5139.
- Moody TW, Mayr CA, Gillespie TJ, Davis TP. 1998. Neurotensin is metabolized by endogenous proteases in prostate cancer cell lines. *Peptides* 19:253-258.
- Moss HE, Crowe R, Burnstock G. 1987. The seminal vesicle in eight and 16 week streptozotocin-induced diabetic rats: adrenergic, cholinergic and peptidergic innervation. *J Urol* 138:1273-1278.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- N.N. 1998. Papers to appear in forthcoming issues. *Gynecol Oncol* 69:182.
- Netzker R, Weigert C, Brand K. 1997. Role of the stimulatory proteins Sp1 and Sp3 in the regulation of transcription of the rat pyruvate kinase M gene. *Eur J Biochem* 245:174-181.
- Nickel JC, Downey J, Young I, Boag S. 1999. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 84:976-981.
- Nuovo GJ. 1996. The foundations of successful RT in situ PCR. *Front Biosci* 1:c4-c15.
- Oefner C, D'Arcy A, Hennig M, Winkler FK, Dale GE. 2000. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 296:341-349.
- Olerud JE, Usui ML, Seckin D, Chiu DS, Haycox CL, Song IS, Ansel JC, Bunnett NW. 1999. Neutral endopeptidase expression and distribution in human skin and wounds. *J Invest Dermatol* 112:873-881.

- Pabo CO, Sauer RT. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61:1053-1095.
- Painter RG, Dukes R, Sullivan J, Carter R, Erdos EG, Johnson AR. 1988. Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J Biol Chem* 263:9456-9461.
- Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM. 1998. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 4:50-57.
- Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. 1997. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 47:5-27.
- Parraga G, Horvath SJ, Eisen A, Taylor WE, Hood L, Young ET, Klevit RE. 1988. Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1. *Science* 241:1489-1492.
- Persson K, Johansson K, Alm P, Larsson B, Andersson KE. 1997. Morphological and functional evidence against a sensory and sympathetic origin of nitric oxide synthase-containing nerves in the rat lower urinary tract. *Neuroscience* 77:271-281.
- Philipsen S, Suske G. 1999. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27:2991-3000.
- Pinto FM, Armesto CP, Magraner J, Trujillo M, Martin JD, Candenias ML. 1999. Tachykinin receptor and neutral endopeptidase gene expression in the rat uterus: characterization and regulation in response to ovarian steroid treatment. *Endocrinology* 140:2526-2532.
- Planz B, Kirley SD, Wang Q, Tabatabaei S, Aretz HT, McDougal WS. 1999. Characterization of a stromal cell model of the human benign and malignant prostate from explant culture. *J Urol* 161:1329-1336.
- Polak JM, Bloom SR. 1984. Localisation and measurement of VIP in the genitourinary system of man and animals. *Peptides* 5:225-230.
- Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. 1997. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11:1569-1580.

- Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S. 1996. Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol* 10:1371-1378.
- Poukka H, Aarnisalo P, Santti H, Janne OA, Palvimo JJ. 2000. Coregulator small nuclear RING finger protein (SNURF) enhances Sp1- and steroid receptor-mediated transcription by different mechanisms. *J Biol Chem* 275:571-579.
- Qiu Y, Robinson D, Pretlow TG, Kung HJ. 1998. Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3644-3649.
- Ratti H, Zhang M, Kunkel G. 2001. Correlation between neutral endopeptidase (NEP) 3.4.24.11 in serum and the degree of the bronchial hyperreactivity. *Regul Pept* 97:181-186.
- Raut R, Rouleau JL, Blais C, Jr., Gosselin H, Molinaro G, Sirois MG, Lepage Y, Crine P, Adam A. 1999. Bradykinin metabolism in the postinfarcted rat heart: role of ACE and neutral endopeptidase 24.11. *Am J Physiol* 276:H1769-1779.
- Renneberg H, Albrecht M, Kurek R, Krause E, Lottspeich F, Aumüller G, Wilhelm B. 2001. Identification and characterization of neutral endopeptidase (EC 3. 4. 24. 11) from human prostasomes--localization in prostatic tissue and cell lines. *Prostate* 46:173-183.
- Renneberg H, Aumüller G, Galuschge S, Weingärtner K, Bittinger A. 1996. Verteilung eines Prostata-spezifischen Membranantigens während der Prostataentwicklung und in unbehandelten bzw. Androgen-supprimierten Prostatakarzinomen. *Exp Clin Endocrinol* 104:176.
- Renneberg H, Bittinger A, Krause W, Galusche S, Aumüller G. 1995. Immunohistochemical localization of surface antigens during prostatic development and in prostate cancer. *Eur J Cell Biol*:213.
- Renneberg H, Wennemuth G, Konrad L, Aumüller G. 1997. Immunohistochemistry of a prostate membrane specific protein during development and maturation of the human prostate. *J Anat* 190 ( Pt 3):343-349.
- Rennie PS, Bruchofsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA, Cheng H, Snoek R, Hamel A, Bock ME, MacDonald BS, et al. 1993. Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol Endocrinol* 7:23-36.

- Revie D, Smith DW, Yee TW. 1988. Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions. *Nucleic Acids Res* 16:10301-10321.
- Roche PC, Ryan RJ, McCormick DJ. 1992. Identification of hormone-binding regions of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor using synthetic peptides. *Endocrinology* 131:268-274.
- Roder K, Wolf SS, Sickinger S, Schweizer M. 1999. FIRE3 in the promoter of the rat fatty acid synthase (FAS) gene binds the ubiquitous transcription factors CBF and USF but does not mediate an insulin response in a rat hepatoma cell line. *Eur J Biochem* 260:743-751.
- Romeis B. 1989. *Mikroskopische Technik*. Stuttgart: Urban und Schwarzenberg.
- Rundlett SE, Miesfeld RL. 1995. Quantitative differences in androgen and glucocorticoid receptor DNA binding properties contribute to receptor-selective transcriptional regulation. *Mol Cell Endocrinol* 109:1-10.
- Saltzman AG, Weinmann R. 1989. Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *Faseb J* 3:1723-1733.
- Schleif R. 1988. DNA binding by proteins. *Science* 241:1182-1187.
- Scholz A, Truss M, Beato M. 1998. Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium. *J Biol Chem* 273:4360-4366.
- Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. 1998. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 7:81-96.
- Shah GV, Rayford W, Noble MJ, Austenfeld M, Weigel J, Vamos S, Mebust WK. 1994. Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> transients. *Endocrinology* 134:596-602.
- Shen R, Sumitomo M, Dai J, Hardy DO, Navarro D, Usmani B, Papandreou CN, Hersh LB, Shipp MA, Freedman LP, Nanus DM. 2000. Identification and characterization of two androgen response regions in the human neutral endopeptidase gene. *Mol Cell Endocrinol* 170:131-142.
- Shipp MA, Richardson NE, Sayre PH, Brown NR, Masteller EL, Clayton LK, Ritz J, Reinherz EL. 1988. Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4819-4823.

- Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL. 1991. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10662-10666.
- Shore D, Nasmyth K. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51:721-732.
- Sinha S, Kim IS, Sohn KY, de Crombrughe B, Maity SN. 1996. Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Mol Cell Biol* 16:328-337.
- Soderholm H, Ortoft E, Johansson I, Ljungberg J, Larsson C, Axelson H, Pahlman S. 1999. Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256:557-563.
- Steffen ML, Harrison WR, Elder FF, Cook GA, Park EA. 1999. Expression of the rat liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I $\alpha$ ) gene is regulated by Sp1 and nuclear factor Y: chromosomal localization and promoter characterization. *Biochem J* 340 ( Pt 2):425-432.
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21:274-281.
- Strom A, Castella P, Rockwood J, Wagner J, Caudy M. 1997. Mediation of NGF signaling by post-translational inhibition of HES-1, a basic helix-loop-helix repressor of neuronal differentiation. *Genes Dev* 11:3168-3181.
- Sturiale S, Barbara G, Qiu B, Figini M, Geppetti P, Gerard N, Gerard C, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM. 1999. Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) terminates colitis by degrading substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11653-11658.
- Sugiura N, Takishima K. 2000. Regulation of the gene promoter for extracellular signal-regulated protein kinase 2 by transcription factors NF-Y and Sp3. *Biochem J* 347 Pt 1:155-161.
- Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, Boileau G, Papandreou CN, Giancotti FG, Knudsen B, Nanus DM. 2000. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 106:1399-1407.

- Sun G, Porter W, Safe S. 1998. Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. *Mol Endocrinol* 12:882-890.
- Suske G. 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238:291-300.
- Swyer G. 1944. Postnatal growth changes in the human prostate. *J Anat*:130.
- Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Lee HJ, Shirotani K, Saido TC. 2000. Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J Biochem (Tokyo)* 128:897-902.
- Thomas PS. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5201-5205.
- Thulin A. 1976. Motor and secretory effects of nerves on the parotid gland of rat. *Acta Physiol Scand* 96:506-511.
- Turner AJ, Tanzawa K. 1997. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J* 11:355-364.
- Uddman R, Fahrenkrug J, Malm L, Alumets J, Hakanson R, Sundler F. 1980. Neuronal VIP in salivary glands: distribution and release. *Acta Physiol Scand* 110:31-38.
- van der Velden VH, Naber BA, van der Spoel P, Hoogsteden HC, Versnel MA. 1998. Cytokines and glucocorticoids modulate human bronchial epithelial cell peptidases. *Cytokine* 10:55-65.
- Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246:911-916.
- Voss D, Pongs O. 1986. Upstream sequences modulate in vitro transcription from *Drosophila* yolk protein genes I and II. *Eur J Biochem* 158:25-32.
- Weinzierl RO, Ruppert S, Dynlacht BD, Tanese N, Tjian R. 1993. Cloning and expression of *Drosophila* TAFII60 and human TAFII70 reveal conserved interactions with other subunits of TFIID. *Embo J* 12:5303-5309.
- Weiss DL, Brown MA. 2001. Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression. *Immunol Rev* 179:35-47.

- Wharton J, Polak JM, Bryant MG, Van Noorden S, Bloom SR, Pearse AG. 1979. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in salivary glands. *Life Sci* 25:273-280.
- Wildeman AG. 1988. Regulation of SV40 early gene expression. *Biochem Cell Biol* 66:567-577.
- Wright KL, Vilen BJ, Itoh-Lindstrom Y, Moore TL, Li G, Criscitiello M, Cogswell P, Clarke JB, Ting JP. 1994. CCAAT box binding protein NF-Y facilitates in vivo recruitment of upstream DNA binding transcription factors. *Embo J* 13:4042-4053.
- Yoshida I, Koide S, Hasegawa SI, Nakagawara A, Tsuji A, Matsuda Y. 2001. Proprotein convertase PACE4 is down-regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor hASH-1 and MASH-1. *Biochem J* 360:683-689.
- Yu DS, Hsieh DS, Chen HI, Chang SY. 2001. The expression of neuropeptides in hyperplastic and malignant prostate tissue and its possible clinical implications. *J Urol* 166:871-875.
- Yuri K. 1990. Immunohistochemical and enzyme histochemical localization of peptidergic, aminergic and cholinergic nerve fibers in the rat seminal vesicle. *J Urol* 143:194-198.
- Zondek T, Mansfield MD, Attree SL, Zondek LH. 1986. Hormone levels in the foetal and neonatal prostate. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112:447-456.

## **9 Anhang**

### **9.1 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Aumüller für die Überlassung des Themas, seine Betreuung, seine praktische Hilfe und die Arbeitsmöglichkeit in seiner AG.

Für die Diskussion über Molekularbiologie, die technische Unterstützung, die enge und fruchtbare Zusammenarbeit, möchte ich Herrn Dr. Jörg Klug, Herrn Dr. Fei Xiao und Herrn Prof. Dr. Guntram Suske, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität, Marburg danken.

Danken möchte ich weiterhin allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mir ihre Unterstützung zuteil werden ließen: Frau Dr. Beate Wilhelm, Herrn Dr. Gunther Wennemuth, Herrn Dr. M. Albrecht, Frau Irmgard Dammshäuser, Herrn Michael Dreher, Frau Anne Henkeler, Herrn Gerd Jennemann, Frau Claudia Keppler, Frau Gabriella Nicholls, Frau Elke Völk-Badouin.

## **9.2 Verzeichnis der Akademischen Lehrer**

### **in Marburg:**

Herr Prof. Dr. Gerhard Aumüller, Herr Prof. Dr. Guntram Suske, Herr PD Dr. Hannes Westphal, Herr Dr. Jörg Klug, Herr Prof. Dr. Jürgen Seitz, Herr Prof. Dr. Klaus Michael Heeg, Herr PD Dr. Lutz Konrad, Herr Prof. Dr. Miguel Beato, Frau Prof. Dr. Monika Löffler, Herr Prof. Dr. Walter Krause.

### **in Giessen:**

Herr Prof. Dr. Andreas Meinhardt, Herrn Prof. Dr. Bernd Hoffmann, Frau Dr. Chistiane Pfarrer, Frau PD Dr. vet. Elvira Hinsch, Herr Prof. Dr. Klaus-Dieter Hinsch, Herr PD Dr. Klaus Steger, Herr Prof. Dr. Martin Bergmann, Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser, Herr PD Dr. Uwe Lang, Herr Prof. Dr. Dr. Wolf-Bernhard Schill, Herr Prof. Dr. Wolfgang Weidner.

### **9.3 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Lokalisation und Gen-Expressionsregulation der neutralen Endopeptidase in der humanen Prostata“ am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. G. Aumüller ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 20. 11. 2003