

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

---

**Hormonelle Regulation der Enzymaktivität,  
Proteinexpression und Bedeutung der Neutralen  
Endopeptidase in Zelllinien der benignen  
Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanmedizin  
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
**Sonja Gillen**  
aus Freiburg

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg,  
am 09.06. 2005, gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. G. Aumüller

Co-Referent: Prof. Dr. Hofmann

Für Wolfgang und Christine Gillen

## **Teile der folgenden Promotionsarbeit wurden veröffentlicht**

### Originalarbeiten

Albrecht M., Doroszewic J., Gillen S., Gomes I., Wilhelm B., Stief T., Aumüller G.  
Proliferation of prostate cancer cells and activity of neutral endopeptidase is regulated by bombesin and IL-1 $\beta$  with IL-1 $\beta$  acting as a modulator of cellular differentiation.

Prostate. 2004 Jan 1;58(1):82-94

Albrecht M., Gillen S., Wilhelm B., Doroszewicz J, Aumüller G.

Expression, localization and activity of neutral endopeptidase in cultured cells of benign prostate hyperplasia and prostate cancer.

Journal of Urology: 2002 Jul;168(1):336-42

### Poster

Albrecht M, Doroszewicz J, Gillen S, Gomes I, Wilhelm B, Aumüller G  
Activity of prostatic cell-surface bound neutral endopeptidase and cellular differentiation is regulated by IL-1 $\beta$  and by neuropeptides.  
28th Meeting of the American Society of Andrology, Phoenix, USA, 2003

Albrecht M, Gillen S, Wilhelm B, Doroszewicz J, Song J, Aumüller G  
Neutral endopeptidase is expressed by cultured cells of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.

DGZ-Jahrestagung, Strasbourg, France, 2001.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Morphologie und Histologie der humanen Prostata	1
2. Pathologische Veränderungen der humanen Prostata	4
2.1. Die benigne Prostatahyperplasie	4
2. 2. Das Prostatakarzinom	6
3. Die Neutrale Endopeptidase	8
<b>II. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>III. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
1. Materialien	15
2. Verwendete Zelllinien	22
3. Methoden	22
3. 1. Zellkulturmethoden	22
3. 2. Proteinbestimmungen	25
3. 3. NEP–Assay (Papandreou et al., 1998)	27
3. 4. Elektronenmikroskopie	30
3. 5. Immunfluoreszenzuntersuchungen	31
3. 6. Western-Blot-Analyse	32
3. 7. Statistische Auswertung	35

---

<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
1. NEP-Aktivität in Zellfraktionen	36
2. Western-Blot-Analyse der Proteinexpression der NEP	39
3. Immunfluoreszenzmikroskopie der Zelllinien	41
4. NEP-Standardkurve	44
5. In vitro-Inkubationsversuche	46
<b>V. Diskussion</b>	<b>56</b>
1. Lokalisation, Expression und Aktivität der NEP im Prostata - Gewebe	56
2. Hormonelle Regulation der Proliferation und NEP-Aktivität im Prostata-Gewebe	59
<b>VI. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>VII. Literatur</b>	<b>73</b>
<b>VIII. Anhang</b>	<b>89</b>
1. Lebenslauf	90
2. Akademische Lehrer	91
2. Danksagung	92
3. Ehrenwörtliche Erklärung	93

## Abkürzungen

<b>Abs.</b>	<b>A</b> bsorption
<b>A. dest.</b>	<b>A</b> qua <b>dest</b> illata
<b>AK</b>	<b>A</b> ntikörper
<b>BPH</b>	<b>B</b> enigne <b>P</b> rostate <b>H</b> yperplasie
<b>CHAPS</b>	(3-((3- <b>ch</b> olaminopropyl)dimethyl <b>am</b> ino)-1- <b>pro</b> pane <b>sul</b> fonate
<b>cAMP</b>	<b>c</b> yclic <b>a</b> denosine <b>m</b> onophosphate
<b>CRL-1803</b>	<b>c</b> alcitonin <b>r</b> eceptor <b>l</b> ike
<b>DHT</b>	<b>D</b> ihydrotestosteron
<b>DMSO</b>	<b>D</b> imethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<b>d</b> esoxyribonucleic <b>a</b> cid (Desoxyribonukleinsäure)
<b>EDTA</b>	<b>E</b> thylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	<b>E</b> nzyme-linked immunosorbent <b>a</b> ssay
<b>EtBr</b>	<b>E</b> thidium <b>b</b> romid
<b>EtOH</b>	<b>E</b> thanol
<b>FKS</b>	<b>F</b> ötales <b>K</b> älberserum
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>hPCP</b>	<b>h</b> uman <b>P</b> rietary <b>C</b> ulture of the <b>P</b> rostate stromal compartment
<b>kDa</b>	<b>k</b> ilo <b>D</b> alton
<b>IL</b>	<b>I</b> nterleukin
<b>LH-RH</b>	<b>L</b> uteinisierungshormon- <b>R</b> eleasing <b>H</b> ormon
<b>LNCaP</b>	<b>L</b> ymph <b>N</b> ode <b>C</b> arcinoma of the <b>P</b> rostate
<b>mRNA</b>	<b>m</b> essenger <b>r</b> ibonucleic <b>a</b> cid
<b>NE</b>	<b>N</b> euro <b>e</b> ndokrin
<b>NEP</b>	<b>N</b> eutrale <b>E</b> ndopeptidase
<b>PBS</b>	<b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline
<b>PC</b>	<b>P</b> rostate <b>C</b> ancer; Prostatakarzinom
<b>PCR</b>	<b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction; Polymerasekettenreaktion
<b>PrSC</b>	<b>P</b> rostatic <b>S</b> tromal <b>C</b> ells; stromale Prostatazellen
<b>PrEC</b>	<b>P</b> rostatic <b>E</b> pithelial <b>C</b> ells; epitheliale Prostatazellen
<b>RNA</b>	<b>r</b> ibonucleic <b>a</b> cid
<b>rpm</b>	<b>r</b> ounds <b>p</b> er <b>m</b> inute
<b>RPMI</b>	<b>R</b> oswell <b>P</b> ark <b>M</b> emorial Institute;
<b>Rt</b>	<b>R</b> aum <b>t</b> emperatur

<b>SCBM</b>	Prostate <b>S</b> tromal <b>C</b> ells <b>B</b> asal <b>M</b> edium
<b>SDS</b>	<b>S</b> odium <b>D</b> odecyl <b>S</b> ulfate
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>Tris</b>	<b>Tris</b> (hydroxymethyl) aminomethan
<b>v/v</b>	<b>V</b> olume per <b>V</b> olume
<b>w/v</b>	<b>W</b> eight per <b>V</b> olume
<b>x g</b>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )



## I. Einleitung

### 1. Morphologie und Histologie der humanen Prostata

Die Prostata gehört zu den Androgen-abhängigen, akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes. Sie liegt als fibromuskuläres und drüsiges Organ kaudal der Harnblase, wird nach ventral über Ligamenta puboprostatica an der Symphysis pubis befestigt, nach dorsal durch die zweilagige Denonvilliersche Faszie vom Rektum getrennt und nach kaudal durch das Diaphragma urogenitale unterstützt. Die normale Prostata des Erwachsenen wiegt ca. 20 Gramm und enthält die beiden schräg von hinten eintretenden Ductus ejaculatorii, die in die Pars prostatica der in der Längsachse der Prostata verlaufenden Harnröhre münden. Nach McNeal lassen sich 4 unterschiedliche Zonen identifizieren: das anteriore fibromuskuläre Stroma, das wenige Drüsenzellen besitzt, die periphere Zone, aus der sich bevorzugt das Prostatakarzinom entwickelt, die zentrale Zone, und das so genannte präprostatiche Gewebe mit der Übergangszone, das die periurethralen (Schleimhaut-) Drüsen, aus dem die Harnröhrendivertikel hervorgehen, enthält und das Ausgangspunkt der benignen Prostatahyperplasie ist (Aumüller, 1989).

Die Prostata wird von einer dünnen fibrösen Kapsel umgeben, unter der zirkulär angeordnete glatte Muskelfasern mit kollagenem Bindegewebe die Harnröhre umschließen (Sphincter vesicae internus). Die Ausführungsgänge der Prostata-Drüsen vereinigen sich, eingebettet in das prostatiche Stroma, zu ca. 25 Hauptausführungsgängen, die in die gesamte Zirkumferenz der prostatichen Harnröhre einmünden. In 98 % der Fälle geht das Prostatakarzinom vom Drüsenepithel aus.

Als Testosteron-regulierte exokrine Drüse produziert die Prostata ein schwach saures Sekret (pH 6,4), das bei der Ejakulation mit der Samenflüssigkeit vermischt wird und unter anderem der Regulation der Spermienmotilität dient (Aumüller & Seitz, 1990; Denmeade & Isaacs, 1997), und das sehr reich an Enzymen, wie Proteasen zur Verflüssigung des Ejakulates oder auch der sauren Phosphatase ist.

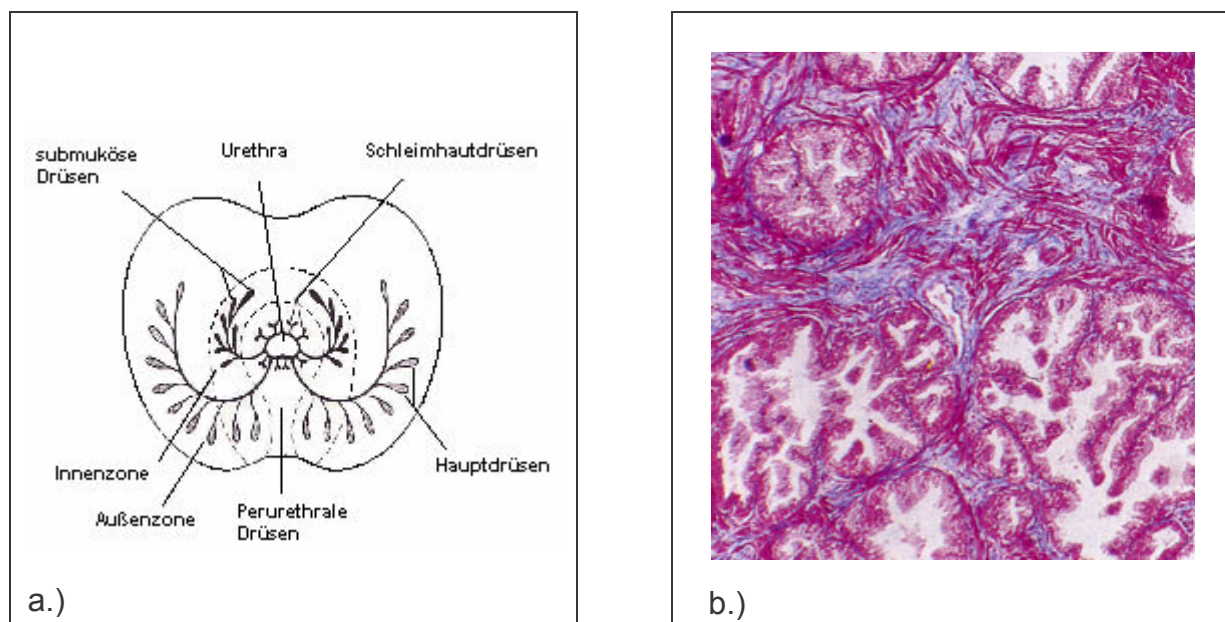


Abb. 1. a.) Schematische Darstellung der Gliederung der Prostata in die verschiedenen Zonen

Abb. 1. b.) mikroskopische Ansicht der Prostata als tubuloalveoläre Drüse, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 300 x Vergrößerung (beide aus Schiebler, T. H., Histologie, 4. Aufl.)

Man erkennt, dass im Bindegewebe der Prostata zwischen den Tubuli viele glatte Muskelzellen vorkommen. Alle Zonen der Prostata enthalten Drüsen, das Epithel der prostatistischen Drüsen ist uneinheitlich, ein- und mehrschichtig, teils hochprismatisch, teils platt oder kubisch. Um die Drüsen liegt das prostatistische Stroma, das aus Bindegewebe, elastischen Fasern und glatten Muskelzellen besteht, und in das Nervenendigungen eingebettet sind, die Neuropeptide sezernieren und somit das Wachstum und die Differenzierung der Prostata steuern (Nagakawa et al., 1998). Neuropeptide sind interzelluläre Botenstoffe, die lokal und systemisch Immunprozesse, Entzündungsreaktionen, Zellwachstum und Reifung regulieren. Man weiß, dass Substanzen wie IL-1, IL-6, Bombesin, Calcitonin, Substanz P einen Einfluss auf das normale Wachstum, aber auch auf das Karzinomwachstum der Prostata haben. Sie entstammen entweder den freien Nervendigungen oder den neuroendokrinen Zellen, die sich im Epithel der Prostata befinden (Gkonos et al., 1995).

Im prostatistischen Drüsenepithel liegen verschiedene Zelltypen vor, die aufgrund der exprimierten Marker und des Zytokeratingerüsts von Xue et al., (1998) eingeteilt wurden. Die Zellen des Basalzellkompartiments sind für Proliferation verantwortlich

und gelten als so genannte pluripotente Stammzellen, aus denen sich so genannte intermediäre Zellen entwickeln, die sich im Verlauf sowohl zu endokrinen als auch exokrinen Zellen entwickeln sollen. Durch Reifungsprozesse differenzieren sie sich weiterhin entweder zu den Androgen-abhängigen exokrinen Luminalzellen, die für die Sekretion verantwortlich sind, oder zu den ebenfalls im epithelialen Kompartiment gefundenen neuroendokrinen Zellpopulationen (Renneberg et al., 2001). Aumueller et al. (2000) beschrieben eine duale Stammzellhypothese, bei der sich die NE-Zellpopulation aus undifferenzierten und differenzierten Zellen der Neuralleiste entwickeln sollen und daß Zellen, denen der Androgenrezeptor fehlt, bereits in der Fetalzeit angelegt werden und zeitlebens in ihrer Anzahl konstant bleiben.

Diese NE-Zellen produzieren Neuropeptide, die über parakrine Mechanismen ebenfalls die Proliferation der umgebenden Zellen und deren Differenzierung kontrollieren und in der Lage sind, die Kontraktilität des Prostatastromas zu beeinflussen (Ventura et al., 2000a; Ventura et al., 2000b; Buljubasich et al., 1999). Sie spielen sowohl bei der Entstehung von Karzinomen und der BPH eine bedeutende Rolle (Nagakawa et al., 1998), und auch die Prognose dieser beiden Erkrankungen scheint entscheidend von Anzahl und Differenzierung der NE-Zellen abzuhängen. Neuroendokrine Zellen werden vor allem mit der Entstehung von Androgen-unabhängigen Karzinomen, bzw. dem Übergang eines primär Androgen-abhängigen Prostatakarzinoms in einen Androgen-unabhängigen Tumor in Verbindung gebracht (Bonkhoff et al., 1995).

Man hat seit einiger Zeit die Möglichkeit, mit Hilfe von in vitro-Modellen verschiedene epitheliale sowie stromale Prostata-Zelllinien zu kultivieren, und somit die Entstehung der BPH und des PC sowie die damit einhergehenden zellulären und subzellulären Veränderungen näher zu untersuchen.

Zunächst konnten sekretorisch differenzierte Prostata-Karzinomzellen in Kultur genommen werden. In immunhistologischen Untersuchungen konnten bisher folgende Marker nachgewiesen werden: Prostataspezifisches Antigen (PSA), saure Phosphatase (PAP) und ein spezifisches Zytokeratingerüst.

Eine der ersten etablierten Prostata-Zelllinien ist die Androgen-unabhängige Prostata-Karzinomzelllinie DU-145 (Stone et al., 1978). Diese epithelialen Zellen entstammen dem Gewebe einer Hirnmetastase eines Prostatakarzinoms bei einem 69 Jahre alten Mann. Kaighn et al., (1979) beschrieben die Isolierung und Charakterisierung der ebenfalls Androgen-unabhängigen Zelllinie PC-3 aus einer

Knochenmetastase eines 62-jährigen Prostatakarzinom-Patienten. 1980 konnte die bislang einzige humane Androgen-abhängige Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP von (Horoszewicz et al., 1980) etabliert werden. Sie stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines an einem Prostatakarzinom erkrankten Patienten.

In letzter Zeit gelang es, neben den eben beschriebenen epithelialen Zelllinien, auch stromale Zellen der Prostata zu isolieren und in Kultur zu nehmen. Derartige stromale Prostatazellen (hPCP „humane Primary Culture of the Prostate stromal compartment“) wurden u. a. von Janssen et al. (2000) und Planz et al. (1999) isoliert aufgereinigt und charakterisiert. Diese Zellen exprimieren stroma-spezifische Marker auf ihrer Zelloberfläche weisen keine epithelialen Marker (s. o.) auf. Die Proliferation dieser Zellen lässt sich durch Inkubation mit „basic fibroblast growth factor (bFGF)“ steigern, durch eine Stimulation mit DHT, Östradiol und Flutamid kann keine Proliferationssteigerung erreicht werden (Janssen et al., 2000). Sie exprimieren unter anderem Rezeptoren für Androgene und für den Wachstumsfaktor „keratinocyte growth factor“ (KGF).

## **2. Pathologische Veränderungen der humanen Prostata**

### **2.1. Die benigne Prostatahyperplasie**

Die Ätiologie der benignen Prostatahyperplasie ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Im Bereich der so genannten Übergangszone kommt es ab dem 30. Lebensjahr zur Formation neuer Drüsenkomplexe zwischen den Sphinkter-Muskelfasern, die im Laufe der Zeit weiter auswachsen und zur Hauptmasse der BPH beitragen. Im Alter zwischen 70 und 80 Jahren lässt sich bei 90 % der Männer eine Vergrößerung der Prostata feststellen. Verschiedene Hypothesen versuchen das erneute postembryonale Wachstum der zunächst ruhenden paraurethral angelegten Drüsenknospen zu erklären. Entgegen früherer Annahmen konnten Shapiro et al., (1997) dokumentieren, dass sich das Verhältnis stromaler zu epithelialen Zellen im hyperplastischen Gewebe kaum ändert, so dass man annehmen kann, dass bei BPH nicht nur eine stromale Fehlregulation zugrunde liegt. Die stromalen Anteile bestehen

hauptsächlich aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche von den Stromal-Zellen produzierte Wachstumsfaktoren beschrieben, die über parakrine oder autokrine Mechanismen Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen nehmen.

Als weitere ätiologische Einflüsse werden hormonelle Faktoren diskutiert. Ein hormonelles Ungleichgewicht zwischen Androgenen und Östrogenen (erhöhter Östrogen/Testosteron Quotient) wurde schon vor einiger Zeit von verschiedenen Autoren diskutiert (Aumüller, 1992). Mit zunehmendem Alter steigen die Östradiolspiegel, was sich vor allem auf die Zellen der periurethralen Region auswirkt, da diese Östrogenrezeptoren besitzen. Außerdem weiß man, dass erhöhte Östrogenspiegel über eine Aktivierung der Stromal-glatten Muskelzellen zu einer erhöhten Bildung von Bindegewebsfasern führen (Zhao et al., 1992). Hierin liegt die Begründung für die antiöstrogene Therapie.

Der proliferative Effekt des 5- $\alpha$ -Dihydrotestosteron, das intraprostatisch synthetisiert wird, ist bekannt und bildet die Grundlage der antiandrogenen Therapie. Androgenentzug führt über Aktivierung des programmierten Zelltodes (Apoptose) zu einem Untergang des sekretorischen Epithels der Prostata.

Androgen-ablative Therapie kann durch verschiedene Therapeutika erreicht, wie zum Beispiel Flutamid, ein reines Antiandrogen, steroidale Antiandrogene, wie Cypronacetat, LH-RH Analoga oder 5- $\alpha$ -Reduktasehemmer.

Durch die medikamentöse Therapie ist eine Reduktion des Prostatavolumens um ca. 25-30 % zu erreichen, was nur bei ca. der Hälfte aller Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der Symptomatik führt.

Insgesamt sind die Ergebnisse der konservativen Therapie der BPH unbefriedigend, und sie dient daher primär der Symptomlinderung. Bis heute gibt es keinen erfolgsversprechenden Ansatz, die BPH-Entwicklung zu verhindern oder eine bereits symptomatische Prostatahyperplasie rückgängig zu machen.

Eine weitere Theorie der Entstehung der BPH begründet sich auf dem Vorhandensein der bereits erwähnten neuroendokrinen Zellen (Bonkhoff and Remberger, 1998). Diese Theorie geht von der Beobachtung aus, dass nach einer durch Androgenentzug induzierten Involution der Prostata sich durch erneute Androgengabe immer wieder das gleiche Drüsenvolumen entwickelt. Man konnte nachweisen, dass sich eine bestimmte Population Hormon-unabhängiger

neuroendokriner Stammzellen in der Prostata befindet, die durch Sekretion verschiedener Neuropeptide benachbarte Zellen parakrin zur Proliferation anregen soll. Die Anzahl dieser Androgen-unabhängigen Zellen ist in bei BPH im Vergleich zur normalen Prostata erhöht (Cockett et al., 1993) und ist für die Entstehung der BPH von entscheidender Bedeutung (Yu et al., 2001).

Eine erhöhte Konzentration von Neuropeptiden, zum Beispiel durch fehlende Inaktivierung, ist ebenfalls als ein Faktor für die Entstehung der BPH schon früh in die Diskussion gekommen, besonders deshalb, weil man nachweisen konnte, dass sich bei der BPH regelmäßig histologisch Entzündungszeichen nachweisen lassen (Nickel et al., 1999), wie sie sich durch die Einwirkung von Neuropeptiden entwickeln.

Die Neutrale Endopeptidase, auf die im folgenden weiter eingegangen werden soll, hat neben ihrer Fähigkeit zur Inaktivierung von Neuropeptiden, eine weitere wichtige Rolle, da sie an der Regulation von Entzündungsvorgängen beteiligt ist (Di Maria et al., 1998).

## **2. 2. Das Prostatakarzinom**

Das Prostatakarzinom ist der häufigste urologische Tumor des älteren Mannes, und in den westlichen Industrienationen ist es der dritt-häufigste Tumor des Mannes überhaupt. Trotz intensiver Forschungen herrscht über die Ätiologie weiterhin noch Uneinigkeit (Boring et al., 1993). Es entsteht in 98 % aus dem Drüsenepithel der Prostata. Abgesehen von Adenokarzinomen treten in seltenen Fällen Übergangszellkarzinome, neuroendokrine Tumore, Rhabdomyosarkome oder Leiomyosarkome auf, auf die im Weiteren nicht näher eingegangen wird. In Deutschland betrifft das Prostatakarzinom ca. 20500 Neuerkrankungen pro Jahr und führt zu ca. 11000 Todesfällen (Weingaertner et al., 1994).

Als gesichert gilt, dass die Prostata für ihr Wachstum Androgene benötigt. Die Behandlung der Wahl des nicht operativ kurablen Karzinoms erfolgt als antiandrogene Therapie und geht zurück auf die Beobachtungen von Charles Huggins, dass die Prostata ein hormonabhängiges Organ darstellt, und der dafür 1941 den Nobelpreis erhielt. Durch die Blockade des Androgensignals wird in Prostatazellen der „Programmierte Zelltod“ (Apoptose) induziert (Ruijter et al., 1999). Verwendet werden Antiandrogene wie Flutamid oder Cypronacetat, das durch

kompetitive Hemmung am Testosteronrezeptor in Konkurrenz zu Dihydrotestosteron tritt.

Die testikuläre Androgenausschüttung wird durch den Hypophysenvorderlappen über das Luteinisierende Hormon (LH) gesteuert, was selbst durch ein Releasing Hormon (RH) des Hypothalamus gesteuert wird. Durch Gabe von LH-RH Analoga kommt es zu einer Sistieren der Testosteron-Produktion.

Heute geht man davon aus, dass ca. 80 % der Prostatakarzinome hormonsensitiv sind. Trotzdem erleidet die Mehrzahl der Patienten binnen 2 Jahren ein erneutes Tumorwachstum. Therapierefraktion und Tumorprogression der Erkrankung werden in direkten Zusammenhang mit der Proliferation der oben bereits beschriebenen Androgen-unabhängigen neuroendokrinen Zellpopulation in Verbindung gebracht (Papandreou et al., 1998). Diese Androgen-unabhängigen Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für bestimmte Neuropeptide, wie Neutensin (Moody et al., 1998), Bombesin und Endothelin 1. Durch erhöhte Konzentrationen dieser Botenstoffe werden die Zellen stimuliert, ihrerseits Wachstumsfaktoren zu produzieren. Solche erhöhten Konzentrationen von Neuropeptiden im Serum wurden bei Patienten mit erneutem Tumorwachstum gefunden (Cussenot et al., 1996). Diese führen zu einer vermehrten Differenzierung in neuroendokrine Zellen (Aprikian et al., 1994) und gehen mit einer schlechteren Prognose einher (Bollito et al., 2001). Auch die Metastasierung steht im Zusammenhang mit der vermehrten Differenzierung in NE-Zellen (Bostwick et al., 2002).

Eine vermehrte Entstehung von NE-Zellen wurde unter antiandrogener Therapie gefunden (Ismail et al., 2002), da es unter Androgenentzug über verminderte Aktivität der NEP zu einer vermehrten Stimulation der Zellen durch Neuropeptide kommt und die Zellen somit Androgen-unabhängig werden (Sumitomo et al., 2000a).

Zusätzlich scheinen bei der Entstehung und der Progression des Prostatakarzinoms Entzündungen, Entzündungsmediatoren und Neuropeptide eine wichtige Rolle zu spielen (Liu et al., 2002).

In der Prostata befinden sich verschiedene Enzyme, die Interaktionen von Neuropeptiden mit ihrem Rezeptor an der Zelloberfläche negativ beeinflussen können. Es handelt sich hierbei um bestimmte Ektoenzyme, die die Neuropeptide durch Spaltung ihrer Peptidbindungen inaktivieren können. Eine dieser Peptidasen ist die Neutrale Endopeptidase, auf die im Folgenden noch näher eingegangen werden soll.

### 3. Die Neutrale Endopeptidase

Die Neutrale Endopeptidase (NEP, E.C. 3.4.24.11; Nephrolysin, CD 10, CALLA) ist ein 90–110 kDa schweres, zinkabhängiges, integrales Membranenzym, das verschiedene biologisch aktive Peptide, wie Neurotensin (Moody et al., 1998), Bombesin (Shipp et al., 1991), Substanz P (Sturiale et al., 1999), Endothelin-1, Atrionatriuretischen Faktor (ANF) (Seymour et al., 1991), Bradykinin (Kokkonen et al., 1999), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) und ACTH inaktiviert, durch Lösung der Peptidbindungen am Amino-terminalen Ende. Es wurde erstmals 1974 von Kerr und Kenny aus einer Kaninchenniere extrahiert und aufgereinigt. Eine exakte Strukturanalyse der NEP (Abb. 2) wurde von Oefner et al. (2004) veröffentlicht. Dargestellt sind die Proteinkette, das zentrale Zinkion, und die chemischen Gruppen, die die Substrate binden können.

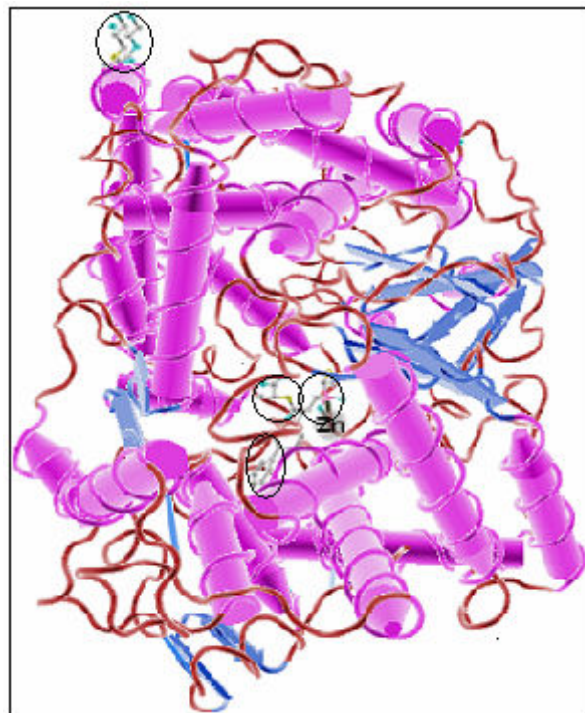


Abb. 2. Strukturanalyse der NEP (Oefner et al., 2004). Proteinkette(●), das zentrale Zinkion und die chemischen Gruppen N-Acetyl-D-Glucosamin und N-(3-Phenyl-2-Sulfanylpropanyl) Phenylalanylalanin (○)

Mittlerweile konnte NEP bereits in vielen verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel in der Niere (Vlahovic und Stefanovic, 1998), der Bronchialschleimhaut (Cohen et al., 1996), den Fibroblasten der Haut (Kletsas et al., 2000) und dem Gefäßendothel (Graf et al., 1995) nachgewiesen werden und wird hier bereits mit der Tumorentstehung (Gohring et al., 1998) und Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht (Graf et al., 1995). Verlust der NEP hat zur Folge, dass durch mangelnde Inaktivierung von Neuropeptiden die zelluläre Homöostase verändert wird und somit die Tumorentwicklung beeinflusst werden kann.

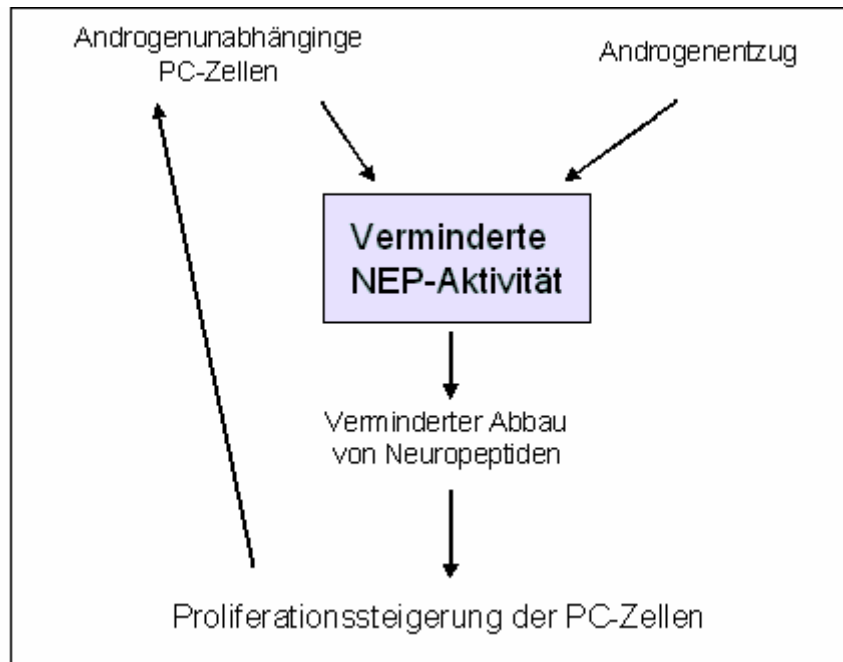


Reguliert wird die NEP-Aktivität durch durch verschiedene Mediatoren, wie zum Beispiel Glukokortikoide, Proteinkinase C (Graf et al., 1998) und Östrogene (Pinto et al., 1999). Gehemmt werden kann die Aktivität der NEP durch Phosphoramidon (Oefner et al., 2000).

Auch in der Prostata konnte sowohl im epithelialen als auch im stromalen Kompartiment der Prostata NEP-RNA sowie enzymatische NEP-Aktivität nachgewiesen werden (Renneberg et al., 2001). Sie ist hier entscheidend an der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Abbau und Aktivität der von den NE-Zellen parakrin sezernierten, proliferationssteigernden Neuropeptiden beteiligt (Papandreou et al., 1998). Man fand außerdem einerseits einen Tumorsupprimierenden Effekt auf die Androgen-unabhängigen Karzinomzellen heraus (Dai et al., 2001), andererseits konnte man jedoch auch feststellen, dass die NEP entscheidend am Übergang der hormonell regulierten, Androgen-abhängigen Zellen in Androgen-unabhängige Zellen beteiligt ist (Papandreou et al., 1998).

Die NEP-Aktivität wird in der Prostata zum Teil über Androgene reguliert. Bei Androgen-ablativer Therapie sinkt die NEP-Expression, dadurch steigen die Konzentrationen mitogener Neuropeptide, und das Tumorstadium beginnt erneut (Usmani et al., 2000). Es wurde bereits nachgewiesen, dass Androgen-abhängige schlecht differenzierte Zellen wie DU-145 und PC-3 geringe Konzentrationen von NEP (Protein und mRNA) enthalten, während die gut differenzierten LNCaP-Zellen höhere Konzentrationen (ca. 90-mal höhere Konzentrationen) von NEP aufweisen (Usmani et al., 2002). Man geht aufgrund dieser Beobachtungen davon aus, dass der Differenzierungsgrad der Prostata-Karzinomzellen eng mit der NEP-Konzentration zusammenhängt (Krongrad et al., 1997). In den stromalen hPCP-Zellen, die ebenfalls Androgenrezeptoren exprimieren, wurden bisher keine Angaben zur NEP-Konzentration gemacht, während man jedoch mittels Polymerasekettenreaktionen NEP-RNA nachweisen kann (Gomes et al., 2003). In Abwesenheit von Androgenen, zum Beispiel unter Androgen-ablativer Therapie reagieren die LNCaP-Zellen mit einer vermehrten Sekretion von Neurotensin und stimulieren somit das Größenwachstum des Tumors (Sehgal et al., 1994). Die verminderte NEP-Expression in Androgen-unabhängigen Zellen, verleitet zu der Annahme, dass Neuropeptide ungehindert die Wachstumsstimulation der Androgene ersetzen können (Papandreou et al., 1998). Papandreou et al. (1998) fanden ebenso heraus, dass Patienten mit Androgen-unabhängigen Karzinomen bei in vivo-Messungen eine

weitgehend verminderte NEP-Expression aufweisen. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass eine Zugabe von NEP (z. B. rekombinanter NEP) zu den Zellen in einer Reduktion des Größenwachstums der Zellen resultiert. Man kann daher annehmen, dass NEP-Reduktion z.B. durch Androgen-ablative Therapie das Entstehen eines Androgen-unabhängigen PC unterstützt.



*Abb. 3. Modell der Entstehung des Androgen-unabhängigen PC nach Papandreou (1998) Eine verminderte Aktivität der NEP, führt zu einem verminderten Abbau der Neuropeptide, die ungehindert die Prostatazellen stimulieren können. Durch Androgenentzug nimmt der Anteil der Androgen-unabhängigen Zellen zu, was zu mehr Zellen mit vermindeter NEP-Aktivität und somit zu einem Circulus vitiosus führt.*

Das Modell veranschaulicht die oben beschriebenen Zusammenhänge. Eine verminderte Aktivität der NEP, zum Beispiel durch Androgenentzug oder in Androgen-unabhängigen Zellen führt zu einem verminderten Abbau der Neuropeptide, die dann ungehindert die Prostatazellen stimulieren können. Da durch Androgenentzug der Anteil der Androgen-unabhängigen Zellen im PC jedoch im Verhältnis zunimmt, werden vor allem diese Zellen, die wiederum eine verminderte Aktivität der NEP aufweisen, angeregt zu proliferieren, was insgesamt zu einem Circulus vitiosus führt.

Neuropeptide, die sowohl durch direkte Wirkung auf die Zielzellen über Rezeptorbindung und Signaltransduktion als auch durch ihre Wirkungen auf die Immunzellen Einfluss nehmen, spielen außerdem eine sehr wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen (Erdos et al., 1989). Sowohl für das Prostatakarzinom als auch für die Entstehung der BPH sind Entzündungsreaktionen histologisch nachgewiesen worden. Als Erklärung nimmt man an, dass Neuropeptide, die normalerweise in ausreichendem Maße von der Neutralen Endopeptidase abgebaut werden, einerseits die Funktionen von Mastzellen und einwandernden Immunzellen modulieren (Gibbs et al., 2001; Scholzen et al., 2001) und andererseits die durch Sekretion bestimmter Faktoren aktivierten und in bestimmte Gewebe migrierten Immunzellen, die Genexpression und Proliferation benachbarter Zielzellen beeinflussen können.

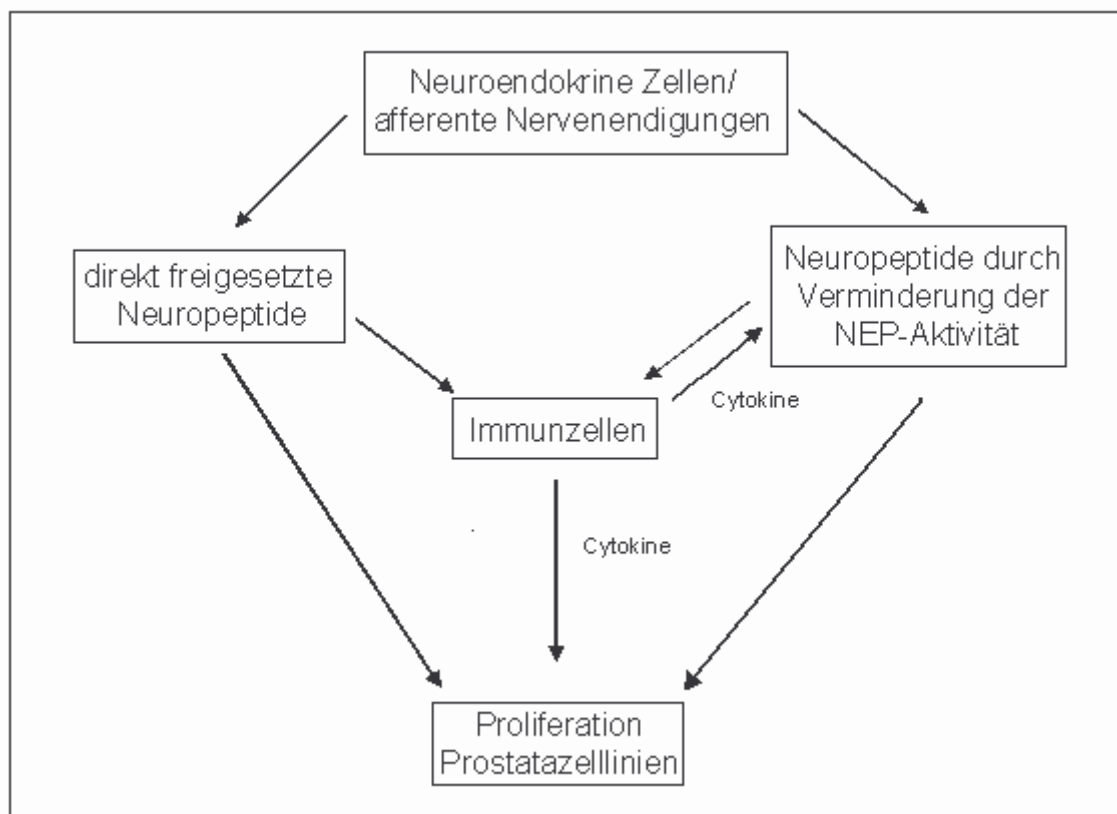


Abb. 4. Zusammenhang zwischen neuroendokrinen Zellen, Neuropeptiden und NEP und ihre Wirkungen auf die Zielzellen. Freigesetzte Neuropeptide bzw. durch verminderte NEP-Aktivität erhöhte Konzentrationen an Neuropeptiden führen ebenso wie, von den durch Neuropeptiden stimulierten Immunzellen freigesetzte Cytokine zu einer vermehrten Proliferation der Prostatazellen.

Das Modell soll die Regulation von Proliferation und Genexpression durch Neuropeptide, Cytokine und NEP veranschaulichen. Von primär afferenten Neuronen oder neuroendokrinen Zellen freigesetzte Neuropeptide können die Proliferation und Genexpression benachbarter Zellen, die enzymatische NEP-Aktivität und die Sekretion von Cytokinen beeinflussen. Diese Faktoren wiederum regulieren die Proliferation und Genexpression durch eine direkte Wirkung auf die Zielzelle. Cytokine können auch indirekt durch Beeinflussung der NEP-Aktivität die Zellproliferation und Genexpression steuern. Chronische Entzündungsprozesse, wie sie z.B. bei der BPH aber auch beim PC postuliert wurden, zeigen also sowohl eine indirekte über eine Verminderung der Expression und Aktivität der NEP sowie eine direkte Wirkung auf die Proliferation der Prostata-Zellen und stehen daher auch im Verdacht, an der Entstehung und Progression einer BPH bzw. PC ursächlich beteiligt zu sein.

## II. Zielsetzung der Arbeit

Trotz intensiver Forschung sind die zellulären Differenzierungsprozesse und insbesondere die parakrinen Mechanismen, die zur Entstehung pathologischer Prozesse innerhalb der humanen Prostata beitragen, noch weitgehend ungeklärt.

Neuropeptide und immunregulatorische Mediatoren spielen neueren Studien zufolge eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression pathologischer Prozesse innerhalb der humanen Prostata.

Ziel war es, die Proteinexpression der Neutralen Endopeptidase sowie das proliferative Verhalten der bisher noch wenig untersuchten stromalen Zelllinien der hPCP-Zellen, sowie der PrSC-Zellen vergleichend in Bezug auf die epitheliale Prostata-Karzinomzelllinien LNCaP-Zellen zu untersuchen. Dazu konnte in unserem Labor ein von Papandreou et al. (1998) beschriebener enzymatischer Assay etabliert werden, der den spezifischen Substratumsatz der NEP durch Absorptionsänderung sichtbar und messbar werden ließ.

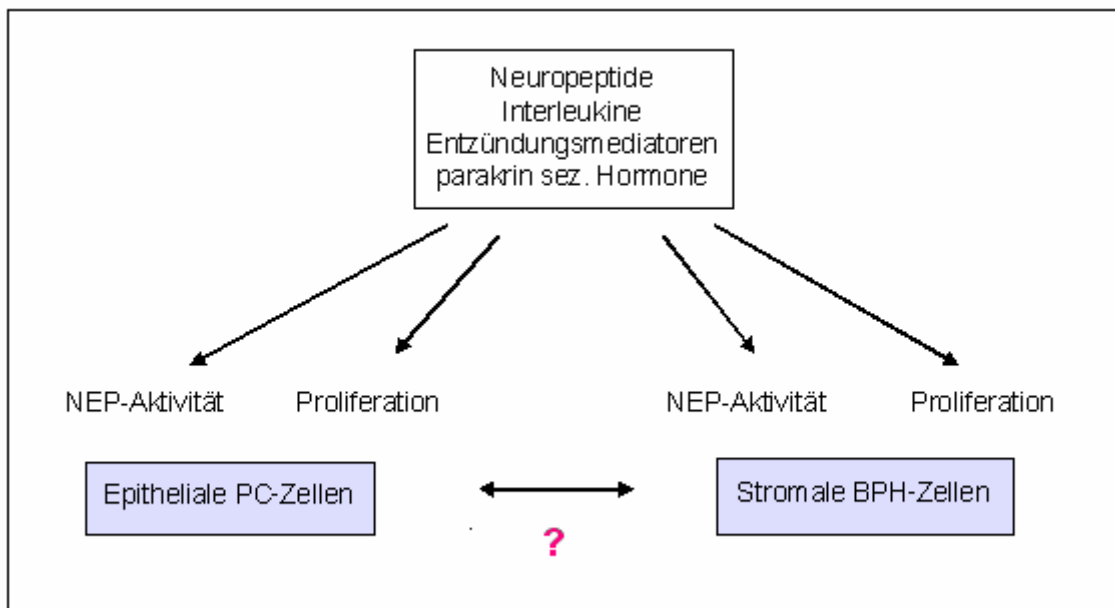
Mit Hilfe dieses colorimetrischen NEP-Aktivitätsassays sollte die basale Aktivität der NEP ohne Stimulation in Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zu den BPH-Zelllinien ermittelt werden. Gleichzeitig wurde die Proteinexpression der NEP, eines 95 kD schweren Proteins, in den verschiedenen Zelllinien untersucht.

Weiterhin sollte mit Hilfe Immunfluoreszenzmarkierung mittels spezifischer Antikörper die Lokalisation der Neutralen Endopeptidase in den einzelnen untersuchten Zelllinien verglichen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen dienten zu Beginn der Untersuchungen dem Nachweis, dass sich in den untersuchten Fraktionen auch Membranen, somit auch NEP befanden.

Im Anschluss sollte mittels des colorimetrischen Aktivitätsassays in Verbindung mit Proliferationsmessungen untersucht werden, ob Neuropeptide und Cytokine die Aktivität der NEP und die Proliferationsrate von humanen Prostatazelllinien beeinflussen können. Als Modulatoren wurden Interleukine, wie IL-1 $\beta$ , Cytokine wie Bombesin und Substanz P, Flutamid, ein Antiandrogen, das Androgen Dihydrotestosteron und  $\beta$ -Östradiol verwendet.

Desweiteren wurde die Wirkung von Pro-Calcitonin auf die Enzymaktivität und die Zellproliferation untersucht. Hierfür wurden konditionierte Medien der Schilddrüsenzelllinie CRL-1803 verwendet.

Die Untersuchung der Veränderung der Zellproliferation sowie der NEP-Aktivität nach Inkubation mit den verschiedenen Modulatoren scheinen bei der Progression des Prostatakarzinoms und der Entstehung der benignen Prostatahyperplasie von entscheidender Bedeutung zu sein.



*Abb. 1. Zielsetzung der Arbeit. Es soll die Proliferation und die Änderung der NEP-Aktivität nach Inkubation der epithelialen sowie der stromalen Zelllinie mit verschiedenen Modulatoren untersucht werden, um Rückschlüsse auf Progression des PC und der BPH ziehen zu können.*

Die verschiedenen Zelllinien sollen vergleichend beurteilt werden, um Rückschlüsse aus den Zelllinien auf die damit verbundenen Krankheitsbilder des Prostatakarzinoms und benignen Prostatahyperplasie ziehen zu können.

Das in vitro-Verhalten der Zelllinien nach Stimulation kann wichtige Hinweise auf die ursächlichen Aspekte der krankhaften Veränderungen der Prostata geben und so eventuell neue therapeutisch verwendbare Ansätze liefern.

### III. Material und Methoden

#### 1. Materialien

Steriles Wasser: wurde mit Hilfe einer MilliQ-Reinstwasseranlage der Fa. Millipore (Eschborn) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherbombe (Ministil P21) der Firma Christ (Osterode/Harz) hergestellt.

##### 1.1. Zellkultur

Inkubator: Steri-Cult 200 Incubator Modell 3862 SIN 27 293-808, Firma Scientific

##### Zellkulturmedien:

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen): mit 10 % FKS (fetales Kälberserum; Linaris, Bettingen), und 0,25 % (v/v) Natriumbikarbonat, 4mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B (alle: Seromed, Berlin).
- Gestripptes RPMI (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) RPMI nach Entfernung der Steroide durch Dextran-Holzkohle-Behandlung
- SCBM („prostate stromal cells basal medium“, Clonetics, USA)
- PrECBM („prostate epithelial cells basal medium“, Clonetics, USA)
- PBS (Biochrom) Natriumphosphat–Puffer, pH 7,4;
- Trypsin/EDTA (0,025 % (w/v), (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

##### Zellkulturflaschen:

- Cellstar Standard Cap: (Greiner Bio-One, Nürnberg), 250 ml, 75 cm<sup>2</sup> für die Kultur stromaler Zellen
- Cellstar Filter Cap: (Greiner Bio-One, Nürnberg), 250 ml, 75 cm<sup>2</sup> für die Kultur epithelialer Zellen

##### Zellkulturplatten:

- Mikrotest Tissue Culture Plate: (Falcon, Becton Dickinson Labware, USA), 96-Well-Platte (96-Loch-Platte), steril, mit Deckel.

- Multiwell Tissue Culture Plate (Falcon, Becton Dickinson Labware, USA), 12-Well-Platte (12-Loch-Platte), steril, Flachboden, mit Deckel

Pipetten und Röhren (15 ml, 50 ml) (Greiner Bio-One, Nürnberg)

Zentrifuge (Heraeus, Hanau)

#### Substanzen für Stimulationsversuche

- angesetzt in gestripptem RPMI mit 10 % FKS

5-alpha-Dihydrotestosteron (Sigma-Aldrich, Nürnberg)

Dexamethason (wasserlöslich) (Sigma-Aldrich, Nürnberg)

Flutamid (Sigma-Aldrich, Nürnberg)

β-Östradiol (Sigma-Aldrich, Nürnberg)

- angesetzt in RPMI 1640 mit 10 % FKS

Interleukin-1β (Repro Tech Inc., Rocky Hill, New Jersey)

Substanz P (Sigma-Aldrich, Nürnberg)

Bombesin (Sigma-Aldrich, Nürnberg)

#### Zellfraktionierung

Lysispuffer	1 ml 0,5M NaOH 2 ml 1M Tris (pH 7,5) 4 ml 20 % SDS ad 40 ml A. dest.
Lysispuffer mit Chaps	+ 0,5 % Chaps

Cell Scraper (Sarstedt, Nürnberg), PP-Röhren, 15 ml, steril (Cellstar, Greiner Bio-One, Nürnberg)

Eppendorfcups, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml



## 1.2. Proteinbestimmungen

### Amidoblack-Assay

- Fixierlösung: 10 % Formalin, 9 % Essigsäure, 0,1M Na-Acetat
- Färbelösung: 10 % Eisessig, 8,2 g/l Na-Acetat, 1 g Amidoschwarz (NBB)
- Waschlösung: 7 Tropfen HCL 1M auf 500 ml A. dest.
- Elutionslösung: 50 mM NaOH
- ELISA-Reader (Dynatech MR 500) Messfilter 620 nm, Referenzfilter 490 nm

### BioRad Prinzip

- Reagenz: 100 mg Coomassie-Blau G 250, 50 ml Ethanol, 85 %H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf 1000 ml A. dest
- Standard: 0,1M NaOH gelöstes Ovalbumin (Serva, Heidelberg).
- Photometer Ultrospec III (Pharmacia)

## 1.3. NEP-Aktivitätsmessung

- Tris-HCL Puffer: 100mM, pH 7,5 (beides Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Aminopeptidase M (Boehringer, Mannheim) (E.C. 3.4.11.2)
- Substrat: Suc-Ala-Ala-Phe-pNA (Bachem), 20mM in DMSO (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Trichloressigsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) 50 % (w/v)
- ELISA-Reader (Dynatech MR 500) Mess- und Referenzfilter bei 405 nm
- Aufgereinigte NEP (Dr. G. E. Dale, F. Hoffmann-LaRoche, Basel)
- Phosphoramidon: N-( $\alpha$ -Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphiniyl)-Leu-Trp gelöst in Eisessig (beides Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

## 1.4. Elektronenmikroskopie

- 2,5 % Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,3)
- Ethanol 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, Isopropanol 100 %

Uranylacetat-Lsg., alkalischer Bleicitrat-Lsg

Ultramikrotom Firma Reichert

Elektronenmikroskop Firma Zeiss

### 1.5. Immunfluoreszenz

- 100 % Methanol
- 0,01 % Triton X-100 in PBS
- DAPI (4',6'-Diamidin-2'-Phenylidol-Dihydrochlorid)

#### Antikörper

Primärantikörper:

- Anti-CD 10, monoklonal, 1:100 (Jackson)
- Anti-Saure-Phosphatase 1, polyklonal, 1:200 (Jackson)
- Anti- $\beta$ -Aktin, monoklonal, 1:600 (Jackson)

Sekundärantikörper:

- Anti-mouse CY2-konjugiert 1:100 (Jackson)
- Anti-rabbit CY2-konjugiert, 1:100 (Jackson)
- Rabbit-anti-mouse, Biotin-konjugiert, IgG 1:200 (Jackson)
- Mouse-anti-rabbit, Biotin-konjugiert, IgG 1:200 (Jackson)
- Streptavidin CY3-konjugiert, 1:100 (Jackson)

Mikroskop: Leica DM RD-Mikroskop

Filme: FUJI chrome Sensia 400

### 1.6. Western-Blot-Analyse

- Mini-Protean II System<sup>TM</sup> (BioRad, München) für die Herstellung der Gele, und die Elektrophorese
- Acrylamid (AA) Lösung 28,2 %
- N,N'-Bisacrylamid (Bis) 0,8 %

- Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v)
- Tetramethyldiamin (Temed) 10 % (w/v)
- Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10 % (w/v) (Sigma-Aldrich, Nürnberg)
- Detection Reagenz: Super Signal Ultra Chemiluminiscent Substrate (Pierce)

Nitrocellulosemembranen (Schleicher&Schuell): Porengröße 0,45 µm

Röntgenfilme: ECL-Hyperfilm (Amersham-Life Science)

Filmentwickler und Fixierung (Firma Adefo Chemie)

Antikörper (AK):

- Primär-AK: CD 10 (H-321, Santa Cruz), polyklonal, anti-rabbit, 1:800 in Absättigungspuffer.
- Sekundär-AK: (goat anti-rabbit IgG, Pierce), Peroxidase-konjugiert, 1:8000 in Absättigungspuffer.

Aufarbeitung der Proben

Probenpuffer	4 ml A. dest. 1 ml Tris/HCL 0,5M, pH 6,8 0,8 ml Glycerin 1,6 ml SDS 640 mg Dithioerytriol (DTE) Bromphenolblau 0,05 % ad 200 µl A. dest.
--------------	---

- RIPA-Puffer: 50mM Tris-HCL pH 7,5, 150mM NaCl, 0,5 % Na-Desoxycholate, 0,1 % SDS
- Proteasen-Inhibitoren (complete Mini-Tabletten, Hoffman-LaRoche) ½ Tablette auf 10 ml RIPA-Puffer

Herstellung der Gele

Trenngel 10 %	1,8 ml Acrylamid-Lsg. 2,0 ml A. dest. 1,25 ml Tris/HCL 1,5M, pH 8,8 100 µl SDS 25 µl APS 2,5 µl Temed
Sammelgel 4 %	0,65 ml Acrylamid-Lsg 3 ml A. dest 1,25 ml Tris/HCL 0,5M, pH 6,8 50 µl SDS 25 µl APS 5 µl Temed
Elektrophoresepuffer (EPP)	3 g Tris 14 g Glycin 1 g SDS ad 1000 ml A. dest.

- Referenz-Marker-Proteingemisch (SDS-Page “molecular weight standards“, high, Bio-Rad, München)

Blotting:

Kathodenpuffer	2,62 g Amino-n-Caprinsäure 1,51 g Tris 100 ml Methanol 500 ml A. dest
Anodenpuffer	1,82 g Tris 100 ml Methanol 500 ml A. dest.
Konzentrierter Anodenpuffer	18,2 g Tris 100 ml Methanol 500 ml A. dest.

- Ponceau S-Färbelösung: Ponceau S (Serva, Heidelberg) 2g, auf 1000 ml 3 % (w/v) Trichloressigsäure
- Horizontale Blotkammer (Firma Keutz)

Analyse:

Absättigungspuffer (AP):	1,21 g Tris 9 g NaCl 50 g Magermilchpulver (Töpfer, Dietmannsried) 1000 ml A. dest.
Waschpuffer (WP):	6,06 g Tris 14,6 g NaCl 1,1 g EDTA 0,5 g Tween 20 1000 ml A. dest

Coomassie-Blau-Färbung:

- Coomassie-Färbelösung: Coomassie-Blau G 250 (Serva, Heidelberg) 1,125g, Methanol 227 ml, A. dest 227 ml, Eisessig 46 ml
- Entfärbelösung: Methanol 50 ml, Eisessig 75 ml auf 1000 ml A. dest

## 2. Verwendete Zelllinien

### Stromale Zelllinien:

hPCP („human primary culture of the prostate stromal compartment“) aus eigenem Labor

PrSC („prostatic stromal cells“) (Bio Whittacker, Walkersville, USA)

### Epitheliale Zelllinien:

LNCaP-Zellen (FGC), („Lymph node carcinoma of the prostate“) (ATCC, American Type Culture Collection, Maryland, USA)

PrEC („prostatic epithelial cells“) (Bio Whittacker, Walkersville, USA)

### Medulläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie:

CRL-1803 („calcitonin receptor like“) (ATCC, American Type Culture Collection, Maryland, USA)

## 3. Methoden

### 3. 1. Zellkulturmethoden

#### **Kultivierung und Weiterbehandlung der Zelllinien**

##### **Auftauen und Aussaat der Zellen**

Die Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen und für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Hier nach wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, 10 min bei 48 x g zentrifugiert, und nach Abnahme des Mediums wurde das Pellet in 2-5 ml RPMI mit 10 % FKS (bzw. dem der Zelllinie zugehörigen Medium) aufgenommen. Die Mediumzusammensetzung des RPMI 1640-Mediums wurde von Moore et al. (1967) am Roswell Park Memorial Institute erstmal veröffentlicht und basiert auf einem Bikarbonat-Puffersystem, unter Zugabe von verschiedenen Aminosäuren und Vitaminen. Dann konnten die Zellen in den jeweiligen Flaschen bzw. Platten ausgesät werden.

### **Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das Wachstum der Zellen wurde täglich mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert und je nach Wachstum wurden die Zellen regelmäßig gesplittet.

### **Splitten der Zellen**

Es wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, um weitere Mediumreste zu entfernen, und durch Zugabe von 40 µl Trypsin/EDTA (0,025 % (w/v), Trypsin/1mM, EDTA)-Lösung /cm<sup>2</sup> abtrypsiniert. Die Zellen, deren Zell-Zell- bzw. Zell-Substratverbindung durch die Zugabe von Trypsin, einer Protease gespalten werden, und sich somit abrunden, wurden 3 min bei 37°C in der Lösung inkubiert, und durch Abklopfen vom Untergrund gelöst. Die Inaktivierung von Trypsin erfolgte durch Zugabe 10 ml RPMI + 10 % FKS. Die abgelösten Zellen wurden mit einer Pipette aufgezogen und so in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 48 x g, RT, 10 min abzentrifugiert. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen, und das Pellet je nach Größe in 2- 5 ml frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung (Zellzahl/µl) erfolgte durch Auszählung in der Neubauer Zählkammer, bevor die Zellen in neue Kulturflaschen oder Platten ausgesät wurden.

### **Einfrieren der Zellen**

Die Zellen wurden abtrypsiniert (s. o.) und bei 48 x g 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 900 µl RPMI 1640 Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt und bei 4°C 1-2 Stunden gekühlt. Es erfolgte 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.

## Stimulation der Zellen

### Ansetzen der Substanzen

- in gestripptem RPMI mit 10 % FKS

DHT (5-alpha-Dihydrotestosteron)	$10^{-8}$ M, $10^{-6}$ M
Flutamid	$10^{-8}$ M, $10^{-6}$ M
$\beta$ -Östradiol	$10^{-8}$ M, $10^{-6}$ M
Dexamethason (wasserlöslich)	$10^{-8}$ M, $10^{-6}$ M

- in RPMI 1640 mit 10 % FKS

Interleukin-1 $\beta$	0,5 ng/ml, 2,5 ng/ml
Bombesin	$10^{-8}$ M, $10^{-6}$ M
Substanz P	$10^{-8}$ M, $10^{-6}$ M

### **Inkubation der Zellen mit verschiedenen Modulatoren**

Bei der Stimulation der Zellen wurde die Substanz in verschiedenen Verdünnungen im entsprechenden Medium auf die Zellen entweder in Flaschen oder in 96-Well-Platten gewachsenen Zellen gegeben und die Zellen über 3 Tage damit im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Pro Flasche wurden 10 ml des verdünnten Stimulans verwendet, pro Well wurden 100  $\mu$ l des Mediums mit verdünntem Stimulans zugefügt. Das Zellwachstum wurde regelmäßig mit Hilfe des Lichtmikroskops kontrolliert.

### **Herstellung konditionierter Medien und Stimulation**

Konditionierte Medien wurden hergestellt um einen Hinweis zu haben, ob die Zellen während ihrer Proliferation intakte Wachstumsfaktoren ins Medium abgeben. Für den Versuch wurden stromale Zelllinien (hPCP und PrSC) und eine epitheliale Zelllinie (LNCaP-Zellen) ausgewählt, sowie Schilddrüsenzellen des medullären Schilddrüsen Karzinoms (CRL-1803). Die verschiedenen Zelllinien wurden über vier Tage in FKS-Medium wachsen gelassen. Das Medium wurde danach vorsichtig abgesaugt, die Konzentrationen von Pro-Calcitonin im Labor von Herrn Dr. Stief gemessen. Anschließend wurde das abgesaugte Medium als Stimulans verwendet, indem die



Zellen ebenfalls 3 Tage inkubiert wurden, um den Einfluss von Pro-Calcitonin auf die Zelllinien heraus zu finden.

## **Zellfraktionierung**

### **Protokoll von Papandreou et al., (1998)**

Die in einer 75cm<sup>2</sup> Flasche über 3 Tage in ihrem Medium gewachsenen Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und anschließend wurden 4 ml gekühlter Lysispuffer (50mM Tris/150mM NaCl) zugegeben. Alle Reaktionsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Scraper vom Boden gelöst und in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit dem Ultraturrax bei 1500 rpm und 50 Strokes homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 100000g (33000rpm) für 45 min bei 4°C ultrazentrifugiert. (Mit einem TI 1 70 Rotor, wobei die entsprechenden Röhrchen bis auf 2 Nachkommastellen ausgewogen werden müssen). Das Pellet wurde anschließend in etwa 1 ml Lysispuffer mit 0,5 % CHAPS resuspendiert, und konnte so für weitere Untersuchungen verwendet werden.

### **Verwendung der Zellfraktionen:**

- für NEP-Aktivitätsassay: Aufnahme des Pellets in 250 µl Lysispuffer mit Chaps
- für die Elektronenmikroskopie: Aufnahme des Pellets in 350 µl Lysispuffer
- für Western-Blot Aufnahme des Pellets in 250 µl Lysispuffer

## **3. 2. Proteinbestimmungen**

### **Amidoblack-Proliferationsassay (Schulz et al., 1994)**

#### An den intakten Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten gewachsenen Zellen

Zunächst wurde das Medium abgegossen und in jedes Well werden je 100 µl Fixierlösung gegeben. Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung jeweils durch 100 µl Färbelösung ersetzt, und

die Platte für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung wurden die Wells mit zunächst 100 µl, danach nochmals mit 200 µl Waschlösung gespült. Nach Entfernung der Waschlösung wurden die Platten über Nacht bei RT getrocknet. Nach Zugabe der Elutionslösung wurden die Platten für 1 Stunde geschüttelt, um den proteingebundenen Farbstoff zu lösen und eine homogene Elution zu erreichen. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption im ELISA-Reader bei 620 nm Messwellenlänge und 490 nm Referenzwellenlänge. Färbung bzw. Absorption korrelieren direkt mit der Zellzahl.

#### An den in 75 ml Flaschen gewachsenen Zellen

Hier erfolgte ebenfalls zunächst die vorsichtige Entfernung des Mediums, anschließend wurden in jede der Flaschen 5 ml Fixierlösung gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach Absaugen der Fixierlösung erfolgte die Inkubation für 30 min in 5 ml Amidoblack Färbelösung. Nun erfolgte die 2-malige Zugabe von H<sub>2</sub>O als Waschlösung, zunächst 5 ml, danach 10 ml. Wie bereits beschrieben, wurden die Flaschen über Nacht trocknen gelassen, und am nächsten Tag die Elutionslösung hinzugegeben und die Flasche für ca. 1 Stunde geschüttelt. Die Messung erfolgte ebenfalls im ELISA-Reader bei 620 nm Mess- und 490 nm Referenzwellenlänge. Dafür wurden aus den Flaschen jeweils 200 µl der geschüttelten Lösung genommen und in eine 96-Well-Platte gegeben. Pro Flasche wurden jeweils in 3 Wells pipettiert und aus den Messungen jeweils der Mittelwert errechnet.

#### ***BIO RAD-Assay (Bradford 1976)***

Das Prinzip des Assays beruht auf der photometrisch messbaren Absorptionsänderung von Coomassie-Blau G 250 durch Bindung von Proteinen.

#### Für Proteinbestimmung in Probenaufarbeitungen für die Western-Blot-Analyse (s. u.)

Es wurde 1 ml Reagenz und 20 µl Probenlösung (s. u. Probenaufarbeitung für die Western-Blot-Analyse) gemischt und in ein Eppendorf-Cup gegeben. Nach 20 min

wurden die Extinktionen bei 595 nm jeweils in Doppelbestimmungen gegen den Leerwert gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 20 µl A. dest. Als Standard wurde in 0,1M NaOH gelöstes Ovalbumin verwendet. Gemessen wurden die Ansätze mit Hilfe des Photometer Ultrospec III. Den Messwerten ließen sich anhand der Standardkurve, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die entsprechenden Proteinkonzentrationen zuordnen.

#### Für Proteinbestimmung in Zellfraktionen für NEP-Aktivitäts-Assay (s. u.)

Die Proben wurden hierbei vorverdünnt: 1:100, 1:200. Anschließend wurden 20 µl Probe + 1 ml Bioradreagenz 15 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen (Leerwert: Lysispuffer mit 0,5 % CHAPS) und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve ermittelt.

### **3. 3. NEP–Assay (Papandreou et al., 1998)**

#### **Vorarbeiten und Standardisierung des Assays**

Das Prinzip des colorimetrischen Assays nach Papandreou et al. (1998) beruht auf der enzymatischen Umsetzung des Substrates (Suc-Ala-Ala-Phe-pNA) durch die Neutrale Endopeptidase, wobei durch Spaltung des Anilingerüsts und die nachfolgende Zugabe der Aminopeptidase eine Färbung bzw. Absorptionsänderung der Lösung entsteht.

Gemessen wurde die Aktivität des Enzyms sowohl auf den intakten Zellen, die den membrangebundenen Anteil der NEP-Aktivität darstellt, als auch in verschiedenen Zellfraktionen, um Rückschlüsse auf im Zytoplasma vorhandene Aktivität ziehen zu können. Parallel wurden Amidoblack-Assays zur Zellzahlbestimmung durchgeführt und zu der gemessenen Aktivität der Neutralen Endopeptidase ins Verhältnis gesetzt, um einen Einfluss der Zellzahl auf die Aktivität auszuschließen.

Mit Hilfe von aufgereinigter NEP konnte durch Verdünnungsschritte eine Standardkurve ermittelt werden und Positivkontrollen bei jedem Versuch mitgeführt werden.

Um nachweisen zu können, dass in der beschriebenen Versuchsanordnung die NEP das Substrat umsetzt, wurde durch Zugabe von Phosphoramidon, welches die Aktivität der Neutralen Endopeptidase spezifisch hemmt, eine deutliche Reduktion erreicht.

### **Messung der NEP–Aktivität**

#### Auf intakten Zellen

In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden die Zellen über drei Tage in ihren Medien wachsen gelassen. Am Versuchstag wurde das Medium abgegossen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde folgender Ansatz in jedes Well gegeben:

200 µl Tris-HCL Puffer  
20 µl 20mM Substrat  
10 µl Aminopeptidase

und die Platte für 10 min bei 37°C inkubiert.

Positivkontrollen wurden durch Zugabe von 10 µl aufgereingter NEP, in 20 µl Tris–HCL Puffer, Negativkontrollen durch Zugabe von 30 µl Puffer angefertigt.

Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 60 µl einer 50 %-iger TCA abgestoppt, und die Platte 10 min geschüttelt.

Anschließend konnte die Absortionsänderung im ELISA-Reader (Mess- und Referenzwellenlänge: 405 nm) gemessen werden.

Um eine Referenz zu haben wurden gleichzeitig Proteinbestimmungen mittels des Amidoblack-Assays (s. o.) durchgeführt.

#### In den Zellfraktionen

Die Zellfraktionen wurden wie in 3.1. beschrieben hergestellt.

Nun wurde folgender Ansatz in einem Eppendorfgefäß vorgelegt:

200 µl Tris-HCL Puffer  
20 µl 20mM Substrat  
10 µl Aminopeptidase M

Hierzu wurden nun 30 µl des in CHAPS-Puffer resuspendierten Pellets, bzw. 30 µl des Überstandes hinzugefügt, und der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert.

Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 250 rpm, wurden 200 µl des entstandenen Überstandes in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorptionsänderung im ELISA-Reader wie oben beschrieben gemessen. Hier wurden ebenfalls Proteinbestimmungen durchgeführt, wobei die Proben vorverdünnt wurden (Leerwert: Lysispuffer mit 0,5 % CHAPS): 1:100, 1:200; anschließend wurden 20 µl Probe + 1 ml Bioradreagenz 15 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration aus der Eichkurve ermittelt (s. o).

### **Erstellung einer NEP-Standardkurve**

- Aufgereinigte NEP (Dr. G. E. Dale, F. Hoffmann-LaRoche, Basel)

Für die Standardkurve wurde aufgereinigte NEP in folgenden Verdünnungen verwendet: 10000 ng/ml, 5000 ng/ml, 2500 ng/ml, 1250 ng/ml, 625 ng/ml, 312 ng/ml, 156 ng/ml, 78 ng/ml, 39 ng/ml, 19,5 ng/ml, und 9,8 ng/ml. Der gesamte Ansatz wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt, wobei jeweils der bereits oben beschriebene Ansatz vorgelegt wurde. Anschließend wurden jeweils 30 µl der verdünnten NEP hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader wie unter 4.2. beschrieben.

### **Hemmung der NEP-Aktivität mit Phosphoramidon**

- Phosphoramidon: N-( $\alpha$ -Rhamnopyranosyloxyhydroxyphosphiniyl)-Leu-Trp gelöst in Eisessig

Um nachweisen zu können, dass in Versuchsordnung die Neutrale Endopeptidase das Substrat umsetzt, wurden weitere Verdünnungsreihen wie beschrieben

hergestellt, in diesen wurde die NEP spezifisch durch Zugabe von 30 µl Phosphoramidon gehemmt. Phosphoramidon wurde in 10 mM Konzentration in Eisessig gelöst verwendet. Um Interaktionen auszuschließen, wurde deshalb ebenfalls eine Standardkurve unter Zugabe von 30 µl Eisessig erstellt.

### **3. 4. Elektronenmikroskopie**

Nachdem die Zellen 3 Tage in Standardmedium kultiviert worden waren, wurden die Zellen fraktioniert (s. o.), um die in den Fraktionen vorhandenen Strukturen beurteilen zu können. Nach der Fraktionierung wurden die Pellets jeweils in 350 µl Lysispuffer aufgenommen.

Die Fixierung der Zellfraktionen erfolgte nach Transfer auf Deckgläschen für 4 h bei 4°C mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,3). Anschließend wurden die Fixierungen erneut mit Na-Cacodylatpuffer gewaschen und die Osmierung in 1 % OsO<sub>4</sub> für 60 min bei RT durchgeführt.

Danach erfolgt eine stufenweise Entwässerung der Objekte durch eine aufsteigende Alkoholreihe: Äthanol 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % sowie Isopropanol 100 %. Die Präparate verblieben ca. 2-4 Stunden in den einzelnen Alkoholen. Nun wurden die Fixierungen mit Epon penetriert, wobei die Deckgläschen kopfüber auf Epon gefüllte Gelatine kapseln gelegt wurden. Die Polymerisation erfolgte 48 Stunden bei 60°C. Nach Entfernung der Deckgläschen in flüssigem Stickstoff, wurden auf dem Reichert Ultramikrotom mit dem Diamantmesser 50-70 nm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit alkoholischer Uranylacetat-Lsg. und alkalischer Bleicitrat-Lsg. gefärbt. Die Untersuchung erfolgte dann mit dem EM 10 Elektronenmikroskop der Firma Zeiss.

### 3. 5. Immunfluoreszenzuntersuchungen

#### Antikörper

##### Primärantikörper

Anti-CD 10, monoklonal	1: 100
Anti-Saure-Phosphatase-1, polyklonal	1: 200
Anti- $\beta$ -Aktin, monoklonal	1: 600

##### Sekundärantikörper

Anti-mouse, CY2-konjugiert	1:100
Anti-rabbit, CY2-konjugiert	1:100
Rabbit-anti-mouse, Biotin-konjugiert, IgG	1:200
Mouse-anti-rabbit, Biotin-konjugiert, IgG	1:200
Streptavidin, CY3-konjugiert	1:100

Die stromalen Prostata-Zelllinien hPCP und PrSC wurden in einer 12-Well-Platte für 3 Tage in RPMI kultiviert. Nun wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurde das gekühlte Methanol zur Fixierung der Zellen in die Wells gegeben und 2-3 Minuten einwirken lassen. Nach Abnahme des Methanols wurde erneut 2 x mit PBS gewaschen, bevor die Zellen dann für 10 Minuten in 0,01 % Triton X –100 in PBS belassen wurden. Nach weiterem Waschen mit PBS wurden die Zellen 10 Minuten in PBS mit 2 % BSA äquilibriert. Alle Schritte verliefen bisher bei Raumtemperatur. Nun wurden die Fixierungen auf gesäuberte Objektträger überführt und über Nacht bei 4°C mit dem in PBS und 2 % BSA verdünnten (Verdünnungen s. o.) Erstantikörper inkubiert. Dabei wurde bei beiden Zelllinien jeweils auf ein Drittel Anti-CD10, auf ein Drittel Anti-Saure-Phosphatase-1, und auf ein Drittel Anti- $\beta$ -Aktin gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass ab jetzt alle Vorgänge in einer feuchten Kammer stattfanden, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach Abschütten des AKs wurden die Fixierungen 2 x mit PBS gewaschen, und 1 x mit PBS mit 2 % BSA. Da zwei verschiedene Techniken der Darstellung gewählt wurden, weshalb jeweils die Hälfte der Fixierungen einer Zelllinie mit einem bestimmten Antikörper inkubiert wurde (s. u.)

### Immunfluoreszenz

Hierbei wurde der CY2-konjugierte Sekundärantikörper entsprechend verdünnt mit PBS und 2 % BSA zugegeben, und bei RT 20 min im Dunkeln inkubiert.

### Streptavidin-Biotin-Bindung

Hierbei wurde auf die fixierten Zellen zunächst mit einem biotinylierten Sekundär-AK, entsprechend verdünnt in PBS mit 2 % BSA, aufgetragen und 30 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift, 3 x mit PBS, wurde mit dem mit Streptavidin CY3-konjugierten AK für 30 min inkubiert.

Nachdem die zugegebenen Antikörper (sowohl CY2-konjugiert als auch CY3-konjugiert) abgegossen worden waren, erfolgte nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS die Kernfärbung mit DAPI für 15 min. Nun wurde noch 1 x mit PBS und 3 x A. dest. gewaschen, und die Präparate mit A. dest. eingedeckt. Die Auswertung erfolgte dann mit Hilfe eines Leica DM RD-Mikroskops, mit den Vergrößerungen x 40, x 63, x 100. Für die Aufnahmen wurde ein FUJI Chrome Sensia 400 Film verwendet.

## **3. 6. Western-Blot-Analyse**

Das Prinzip der als Western-Blot-Analyse beschriebenen Methode beruht auf der Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einer Gelelektrophorese und der anschließenden immunhistochemischen Identifikation auf einer Trägermembran.

### Antikörper (AK)

- Primär AK: CD 10 (H-321), Santa Cruz, polyklonal, anti-rabbit, 1:800 in AP.
- Sekundär AK: goat anti-rabbit IgG, Pierce, Peroxidase-konjugiert, 1:8000 in AP.



### Aufarbeitung der Proben

Die Aufarbeitung erfolgte zur Isolierung der Membranproteine. Es wurden folgende Zelllinien verwendet: hPCP-Zellen und LNCaP-Zellen.

Nachdem die Zellen in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen über 3 Tage gewachsen waren, wurden sie 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer mit Proteasen-Inhibitoren und Inkubation der Zellen für 1 Stunde bei 4°C auf dem Taumler. Der Überstand wurde nun in ein Eppendorf-Cup überführt und 15 min bei 4°C mit 10000g zentrifugiert. Der Überstand, der nun die Membranproteine enthält, wurde in ein weiteres Eppendorf-Cup gegeben.

Gleichzeitig wurde die Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe der Methode nach Bradford (s. o.) bestimmt. Es wurden jeweils 15 µg Protein eingesetzt, 1:1 verdünnt mit Probenpuffer und mindestens 5 min bei 95°C denaturiert.

### Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Trenngel wurde in die Gelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Gels, ca. 45 min, wurde das Wasser abgeschüttet, die Kammer mit 1 ml Sammelgel aufgefüllt und der Probenkamm eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurde der Probenkamm entfernt und die Gele in die Elektrophoresekammer eingebaut.

Nun wurden die 15 µg Protein enthaltenden Proben in die Probenaschen eingebracht und vorsichtig mit EPP überschichtet und die Pufferkammer ebenfalls mit EPP gefüllt. Die Laufzeit betrug 60 min bei 200V.

Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein gefärbtes Referenz-Marker-Proteingemisch (SDS-Page "molecular weight standards", high, BioRad) in einer Spur. Als Positivkontrolle wurde 0,05 µg aufgereingte NEP (Dr. G. E. Dale, F. Hoffmann-LaRoche, Basel) aufgetragen.

### Blotting

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entnommen, in Kathodenpuffer überführt und die horizontale Blotkammer aufgebaut:

Anode(+)

4 Lagen Filterpapier in konzentrierten Anodenpuffer getränkt

4 Lagen Filterpapier in Anodenpuffer getränkt

Nitrocellulosemembran in Anodenpuffer getränkt

Gel in Kathodenpuffer getränkt

4 Lagen Filterpapier in Kathodenpuffer getränkt

Kathode (-)

Der Transfer erfolgte bei 60 mA pro Gel für 1,5 h bei RT. Anschließend wurde die Membran zur Kontrolle der Proteinübertragung und zur Markierung der Eichmarker in Ponceau-S-Färbelösung für 1-2 min gefärbt. Nach Spülen mit A. dest wurde das Proteinmuster sichtbar.

### Western-Blot-Analyse

Hierfür wurde die Membran vorsichtig in Absättigungspuffer überführt und dort 3 x 10 min auf dem Taumler belassen, um spezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit den Membranen abzuschwächen. Anschließend wurde der gegen die NEP gerichtete polyklonale Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:800 in Absättigungspuffer auf die Membran aufgetragen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Danach werden die Membranen 3 x 10 min mit WP gewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit dem, gegen den Fc-Teil des PrimärAKs gerichteten und Peroxidase gekoppelten, Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:8000 in AP für 1 Stunde. Danach erneutes Waschen 3 x 10 min mit WP. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System der Fa. Pierce. Dabei wurde die Membran für 5 min mit den im Verhältnis 1:1 gemischten Lösungen inkubiert, danach in Frischhaltefolie eingeschweißt und dem Röntgenfilm exponiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm unter Sicht entwickelt und fixiert.

### Coomassie-Blau-Färbung

Nach dem Blotting wurden die Gele bei 50°C im Schüttelwasserbad etwa 60 min mit Coomassie-Färbelösung inkubiert.

Das Entfärben erfolgte unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung ebenfalls im Schüttelwasserbad bei 50°C für ca. 120 Minuten. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Lagen in A. dest. getränkter Einmachfolie gelegt, in einen Rahmen eingespannt und getrocknet.

### **3. 7. Statistische Auswertung**

Amidoblack-Assay und NEP-Aktivitätsbestimmungen wurden bei jeder Versuchsdurchführung in Doppelbestimmung durchgeführt und jeweils ein Mittelwert errechnet. Insgesamt wurden die Proteinbestimmungen und Aktivitätsmessungen jeweils 3mal voneinander unabhängig durchgeführt. Zur Auswertung wurde SPSS for Windows, und p-Werte mittels des T-Tests für unverbundene Stichproben errechnet. NEP-Verdünnungsreihen und Phosphoramidon Hemmtests wurden 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt, gezeigt wird stellvertretend ein repräsentatives Ergebnis.

Western Blots wurden ebenfalls 3-mal voneinander unabhängig durchgeführt, wobei repräsentativ nur ein Ergebnis gezeigt wird.

## IV. Ergebnisse

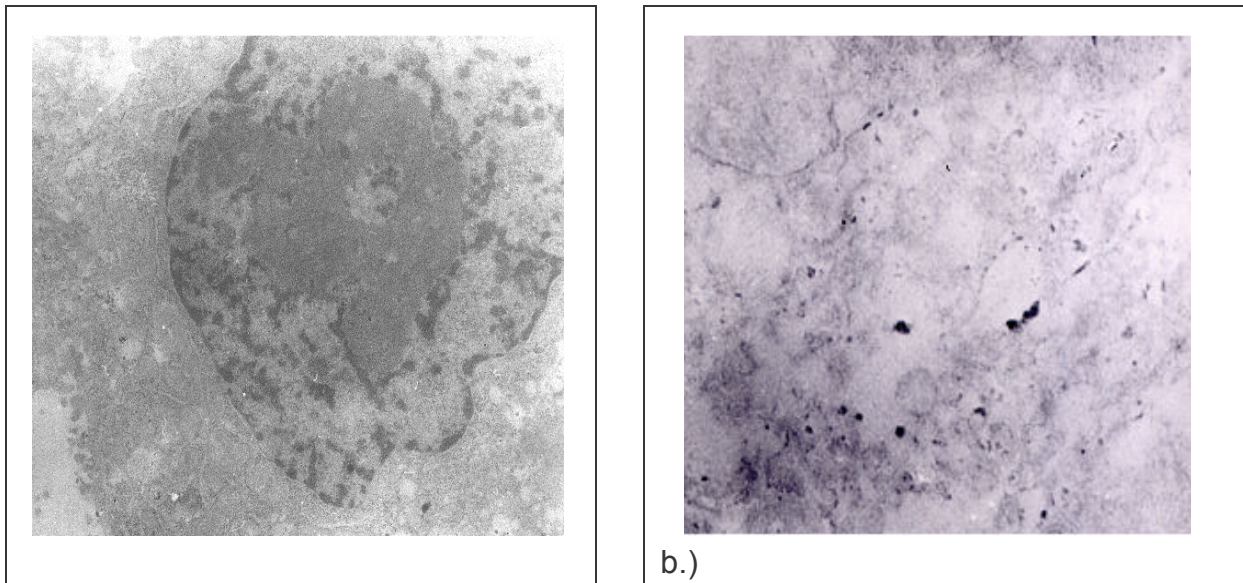
### 1. NEP-Aktivität in Zellfraktionen

Aus der Literatur wurde ein Assay nach Papandreou et al. (1998) in unserem Labor etabliert, mithilfe dessen Arbeitsgruppe um Papanadreou die Aktivität der Neutralen Endopeptidase (NEP) bereits in Fraktionen verschiedener Zelllinien untersucht hatte. Grundlage des Assays ist die enzymatische Umsetzung eines Substrates, der Suc-Ala-Ala-Phe-pNA, durch die NEP. Da das Substrat an einen Nitroanilin-Ring gebunden ist, der bei Spaltung eine Farbveränderung erbringt, wird diese Reaktion sichtbar und als Absorptionsänderung im ELISA-Reader bei 402 nm Messwellenlänge messbar. Als weitere für den Versuch notwendige Substanzen dient die Amino-peptidase und 50 %-ige Trichloressigsäure, die nach 20 min Reaktionszeit die Reaktion abstoppt.

Es waren eine Reihe Vorversuche nötig, um die für unser Labor geeigneten Medien und Konzentrationen herauszufinden.

Wie bei Papandreou et al. (1998) beschrieben, wurden zunächst Zellfraktionen verwendet, die man wie oben beschrieben herstellte. Die Zelllinien hPCP-Zelllinie und LNCaP-Zelllinie wurden über 3 Tage mit regelmäßigen Medienwechseln in Zellkulturflaschen in 10 %-igen FKS (teilweise gestripptes FKS), bzw. SCBM angezüchtet, anschließend die Zellen mittels Trypsin vom Untergrund gelöst, in 20 ml FKS aufgenommen und 10 min bei 500 U/min zentrifugiert. Man erhielt daraus das Membranpellet, das erneut in 10 ml FKS aufgenommen wurde und die Überstände mit Zytosol, als die 2 zu untersuchenden Fraktionen. Mittels Elektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, dass sich in der einen Fraktion jeweils die Membranen befanden, in der anderen jeweils Überstände aus Zytoplasma.

Repräsentativ werden hier Bilder der Fraktionen der LNCaP-Zellen gezeigt. Links sind die Membranen dargestellt, rechts die Überstände.



*Abb.1. Elektronenmikroskopische Darstellung der Fraktionen der LNCaP-Zellen  
a.) Membranfraktion, zeigt einen Zellkern mit anhängendem rauhen Endoplasmatischem Retikulum; b.) Zytosolfraktion, enthält wenige Membranen und vor allem vesikuläre Strukturen*

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man in der linken Membranfraktion verschiedene Membrananteile der Zellmembranen, des Zellkerns, und Membranen von endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat, das heißt die differentielle Aufreinigung dieser Fraktion war noch unvollständig. Rechts in den Überständen sind nur wenige Membranen zu erkennen, vor allem aber vesikuläres Material.

Da die NEP ein integrales Membranenzym darstellt, wurde untersucht, wie hoch die Aktivität der NEP in den Membranfraktionen ist, gleichzeitig auch die Aktivität in den Überstandfraktionen bestimmt um beide Ergebnisse vergleichend beurteilen zu können, wurden abschließend ebenfalls Proteinbestimmungen der verschiedenen Fraktionen durchgeführt. Dieser wurde mit Hilfe des Amidoblack-Assays, wie oben beschrieben, bestimmt.

Repräsentativ werden hier die Befunde für die NEP-Aktivität in Bezug auf den gemessenen Proteingehalt der Zelllinien hPCP und LNCaP aus diesen ersten Versuchen dargestellt.

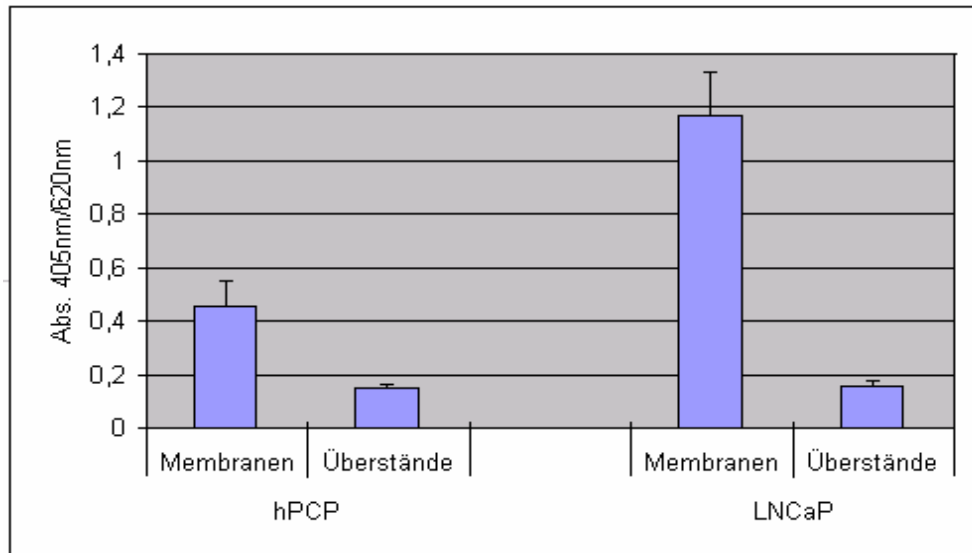


Abb. 2. NEP-Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen, links der hPCP-Zelllinie und rechts der LNCaP-Zelllinie im Verhältnis zum Proteingehalt. Gezeigt werden Ergebnisse aus jeweils 3 unabhängig voneinander durchgeführten Messungen und die jeweiligen Standardabweichungen.

Es zeigte sich das in den Membranfraktionen eine deutlich höhere Aktivität zu verzeichnen war; Die Aktivität der sich im Zytosol befindenden NEP in beiden Überständen war nahezu gleich ausgeprägt, während hingegen die Aktivität der NEP in der Membranfraktion der epithelialen LNCaP-Zellen fast drei mal so hoch war wie in der Membranfraktion der stromalen hPCP-Zellen.

Als weitere Untersuchung wurde der beschriebene NEP-Assay in dieser Weise modifiziert, dass der Versuchsansatz nun nicht mehr nur für die Messung der Aktivität in den Fraktionen verwendet wurde, sondern die Substanzen des Ansatzes direkt auf die intakten Zellen gegeben wurde. Hierfür wurden die Zellen in 96-Well-Platten ebenfalls für 3 Tage unter regelmäßigen Medienwechseln in ihren speziellen Medien (s. o.) kultiviert. Anschließend wurden die Medienreste abgesaugt und das Substrat zusammen mit Tris-HCL-Puffer und Aminopeptidase hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 20 min bei 37°C, bevor die Reaktion durch die Zugabe von 50 %-iger TCA abgestoppt wurde. Anschließend erfolgte wie auch bei der Messung der Aktivität in den Zellfraktionen die Messung der Absorptionsänderung mit Hilfe des ELISA-Readers bei 405 nm Mess- und Referenzwellenlänge.

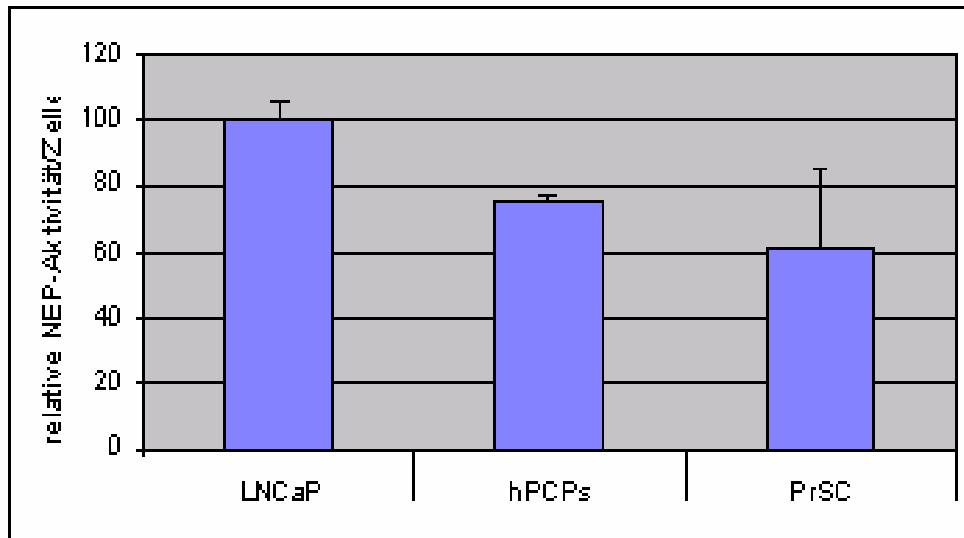


Abb. 3. NEP-Aktivität der einzelnen Zelllinien. Gezeigt wird die NEP-Aktivität, die mit Hilfe des oben beschriebenen enzymatischen Assays für die epitheliale und die beiden stromalen Zelllinien in Bezug auf die bestimmte Zellzahl gemessen wurde. Standardabweichungen resultieren aus drei voneinander unabhängigen Versuchsanordnungen.

Untersucht wurde die epitheliale Zelllinie der LNCaP und zwei stromale Zelllinien (hPCP und PrSC). Durch Voruntersuchungen in unserem Labor war eine geringere NEP-Aktivität bei der hPCP-Zelllinie bekannt gewesen, während jedoch über die NEP-Aktivität keine Voruntersuchungen vorlagen. Um Aussagen über das Verhältnis der NEP-Aktivität der einzelnen Zelllinien machen zu können, wurde die NEP-Aktivität der LNCaP-Zellen auf 100 % gesetzt. Verglichen mit den Prostata-Karzinomzellen LNCaP zeigte sich bei den stromalen Prostata-Zelllinien der hPCP-Zellen und PrSC-Zellen eine deutlich geringere Aktivität der NEP, die bei 75 % ( $\pm 2.5$  %) für die hPCP-Zellen und bei 60 % ( $\pm 24.0$  %) für die PrSC-Zellen lag.

## 2. Western-Blot-Analyse der Proteinexpression der NEP

Western-Blotting Experimente wurden durchgeführt, um die Konzentration und Molekülgröße der Neutralen Endopeptidase vergleichend abschätzen zu können, die in den Plasmamembranen der Prostata-Karzinomzellen und den Membranen der BPH-Zellen lokalisiert ist. Es wurde die oben bereits erwähnte Fraktion der Plasmamembranen verwendet.

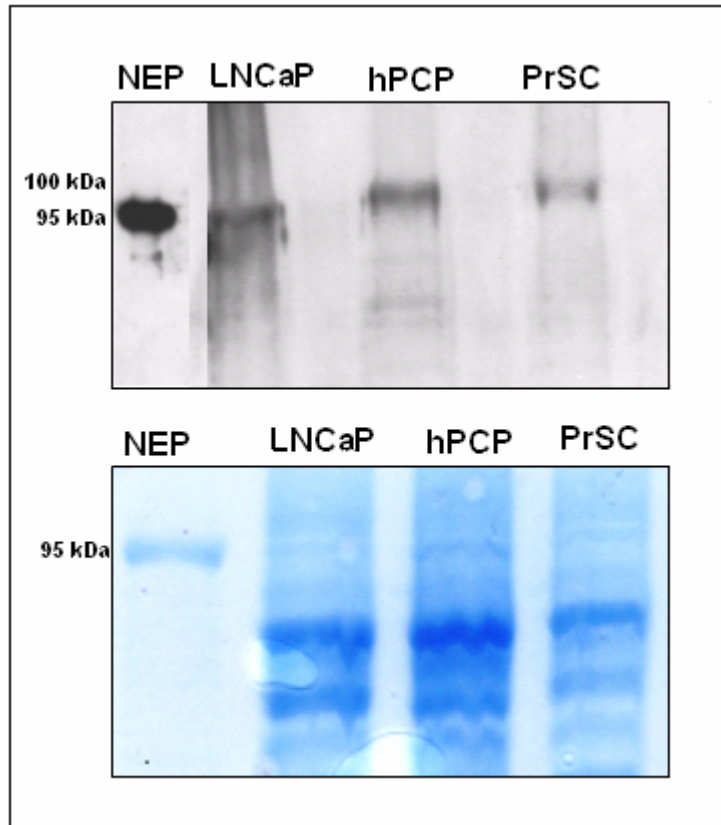


Abb. 4. zeigt die Western-Blot-Analyse des NEP Proteingehaltes innerhalb der verschiedenen Zelllinien. Dargestellt sind oben der Blot nach Entwicklung des Röntgenfilmes und unten die Coomassie-Blau-Färbung.

Als Referenz wurde aufgereinigte NEP ohne die intracytoplasmatische Domäne verwendet, die wir aus dem Labor von Dr. G. Dale erhielten. Das Molekulargewicht der NEP (ohne intracytoplasmatische Domäne) beträgt ca. 95 kDa. Unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern zeigten sich Signale für das NEP-Protein in den Fraktionen von gereinigtem Plasma der Zelllinien LNCaP, hPCP, und PrSC. Aufgrund der fehlenden intrazellulären Domäne erschien das Signal der Positivkontrolle von aufgereinigter NEP ein wenig niedriger als das der membrangebundenen NEP, das ungefähr bei 100 kDa lag.

Die subjektive Beurteilung der Bandenstärke zeigte folgendes Ergebnis:

	LNCaP	hPCP	PrSC
Bandenstärke	+++	++	+

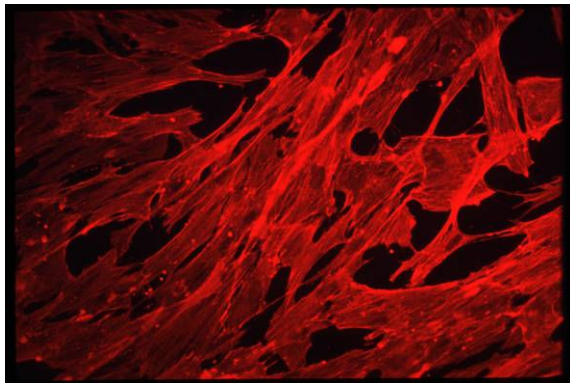


Es zeigte sich also, dass die untersuchte Proteinexpression korrelierende Ergebnisse zur NEP-Aktivität aufweist. Die Proteinexpression der LNCaP-Zellen war am stärksten, während die stromalen Zelllinien eine deutlich geringere Expression der NEP aufwiesen.

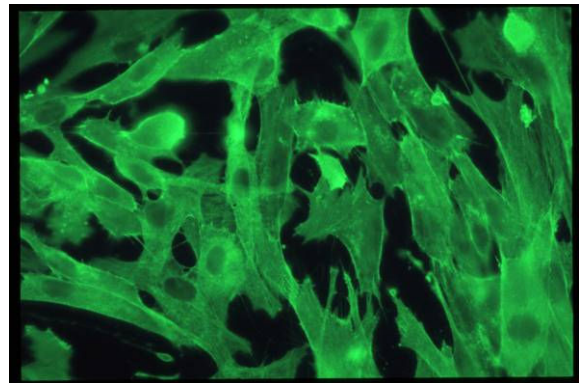
### **3. Immunfluoreszenzmikroskopie der Zelllinien**

Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die in unserem Labor erst neu etablierte Zelllinie der PrSC-Zellen genauer zu untersuchen.

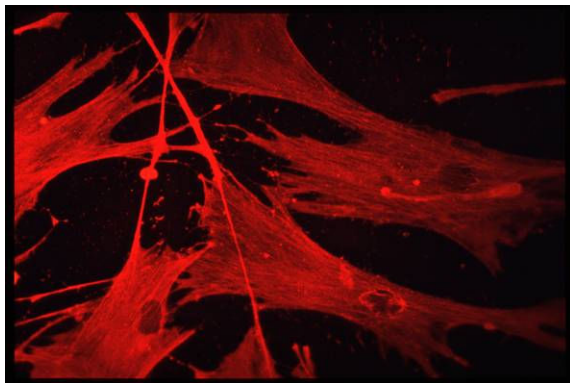
Da es sich hierbei um eine stromale Zelllinie handelt, die im Hinblick auf unsere Studien zum humanen Prostatakarzinom und der benignen Prostatahyperplasie neue Aspekte erbringen sollte, wurde sie vergleichend zu der in unserem Labor bekannten Zelllinie der hPCP-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Um die Zellstrukturen besser darzustellen, wurden die aufgearbeiteten Zelllinien zunächst mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen  $\beta$ -Aktin inkubiert, 1:600 verdünnt, einem Marker der spezifisch die Aktinfilamente anfärbt und so zur Unterscheidung zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen verwendet wird. Shapiro et al., (1992) konnten zeigen, dass Antikörper gegen  $\alpha$ -smooth muscle actin besonders zur Identifizierung glatter Muskelzellen in der humanen Prostata geeignet sind und Vorteile gegenüber den häufig verwendeten Desmin-Antikörpern aufweisen. Sie wiesen nach, dass sich im Gewebe der BPH überwiegend glatte Muskelzellen befinden.

Immunfluoreszenznachweis  $\beta$ -Aktin in PrSC

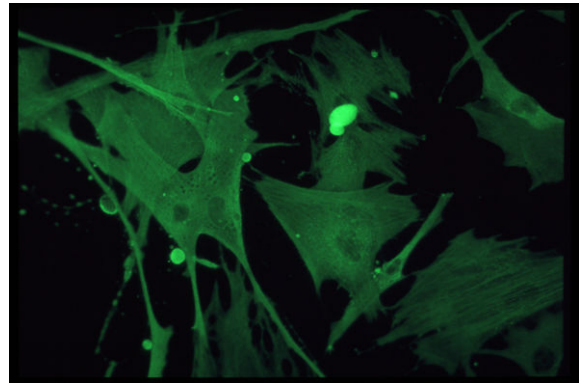
AK gegen  $\beta$ -Aktin, 1.600 verdünnt, cy 3, 40x Vergrößerung



AK gegen  $\beta$ -Aktin, 1.600 verdünnt, cy2, 63x Vergrößerung

Immunfluoreszenznachweis  $\beta$ -Aktin in hPCP

AK gegen  $\beta$ -Aktin, 1.600 verdünnt, cy 3, 40x Vergrößerung



AK gegen  $\beta$ -Aktin, 1.600 verdünnt, cy 2, 40x Vergrößerung

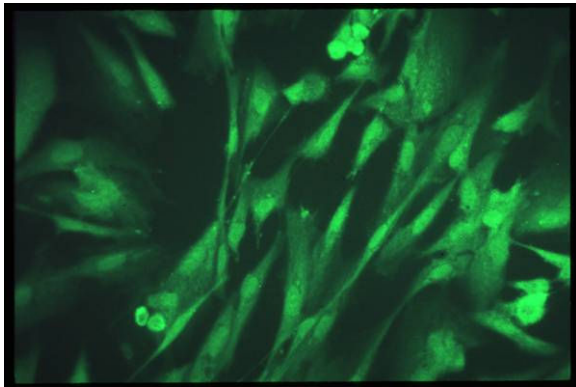
Abb. 5. Immunfluoreszenznachweis von  $\beta$ -Aktin in der PrSC-Zelllinie (oben) und in der hPCP-Zelllinie (unten)

Es zeigte sich, dass in beiden Zelllinien die glatten Muskelzellen als große polygonale Zellen vorliegen. Beide Zelllinien zeigten gleichfalls stark angefarbte radiär ausstrahlende Aktinfilamente in ihrem Cytoplasma. Besonders in der Umgebung der Zellkerne konnte eine deutliche Anreicherung des fluoreszierenden Farbstoffes nachgewiesen werden.

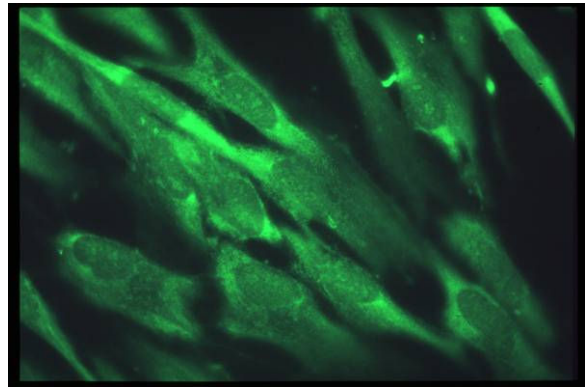
Wie bereits Shapiro et al. (1992) beschrieben hatten, zeigte sich auch in unseren Untersuchungen, dass das Prostatastroma hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und Fibroblasten besteht.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die PrSC-Zellen das integrale Membranenzym der Neutralen Endopeptidase enthalten. Verwendet wurde hierfür ein monoklonaler Primärantikörper gegen NEP (Anti-CD 10), 1: 100 verdünnt.

## Immunfluoreszenznachweis der NEP auf PrSC

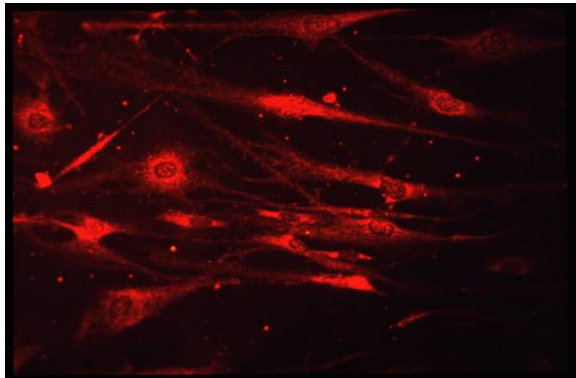


*AK gegen NEP, 1:100 verdünnt, cy 2,  
100x Vergrößerung*

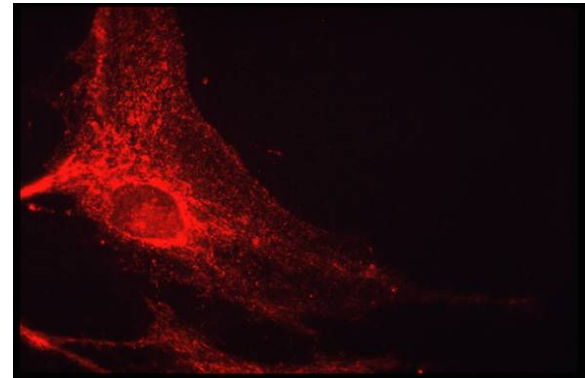


*AK gegen NEP, 1:100 verdünnt, cy 2,  
100x Vergrößerung*

## Immunfluoreszenznachweis der NEP auf hPCP



*AK gegen NEP, 1:100 verdünnt, cy 3,  
40x Vergrößerung*



*AK gegen NEP, 1:100 verdünnt, cy 3,  
100x Vergrößerung*

*Abb. 6. Immunfluoreszenznachweis der NEP in der PrSC-Zelllinie (oben) und in der hPCP-Zelllinie (unten)*

Es zeigte sich ein weitgehend einheitliches Verteilungsmuster der Immunreaktivität der NEP in beiden Zelllinien. Beide reagierten nur schwach positiv. Gelegentlich ließ sich eine überwiegend perinukleäre positive granuläre Anreicherung der NEP erkennen.

Die bisher dargestellten Befunde belegen das Vorkommen der Neutralen Endopeptidase in hoher Konzentration in der LNCaP-Zelllinie und in deutlich niedriger Konzentration in den beiden stromalen Zelllinien.

Um nun Aufschluss über die funktionelle Bedeutung der Neutralen Endopeptidase zu erhalten, wurden in vitro-Inkubationsversuche mit verschiedenen Stimulantien und

Inhibitoren der NEP-Aktivität durchgeführt. Dazu wurde eine Standardkurve der NEP-Aktivität zunächst mittels aufgereinigter NEP anschließend auch in den verschiedenen Zelllinien erstellt.

#### 4. NEP-Standardkurve

Hierfür wurde in einer 96-Well-Platte der oben bereits beschriebene Ansatz gegeben und anschließend mit Hilfe aufgereinigter NEP (Dr. G. E. Dale, F. Hoffmann-LaRoche, Basel) eine Verdünnungsreihe in folgenden Verdünnungen angelegt: 10000 ng/ml, 5000 ng/ml, 2500 ng/ml, 1250 ng/ml, 625 ng/ml, 312 ng/ml, 156 ng/ml, 78 ng/ml, 39 ng/ml, 19,5 ng/ml, und 9,8 ng/ml. Diese Verdünnungsreihe ist unten als Fotografie (Abb. 7.) dargestellt. Als Weiteres wurde die NEP-Aktivität der einzelnen Verdünnungen gemessen und in der unten gezeigten Kurve veranschaulicht. Um nachzuweisen, dass das verwendete Substrat auch wirklich durch die Neutrale Endopeptidase umgesetzt wird, untersuchten wir die spezifische Hemmung der Neutralen Endopeptidase durch Phosphoramidon (Oefner et al., 2000).

Hierfür wurden weitere Verdünnungsreihen wie oben beschrieben hergestellt und in jedes Well zusätzlich 30  $\mu$ l Phosphoramidon in 10 mM Konzentration in Eisessig gelöst hinzugegeben. Um unspezifische Interaktionen auszuschließen, wurde deshalb ebenfalls eine Standardkurve mit 30  $\mu$ l Eisessig erstellt. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen im ELISA-Reader sind in Abb. 8. dargestellt.

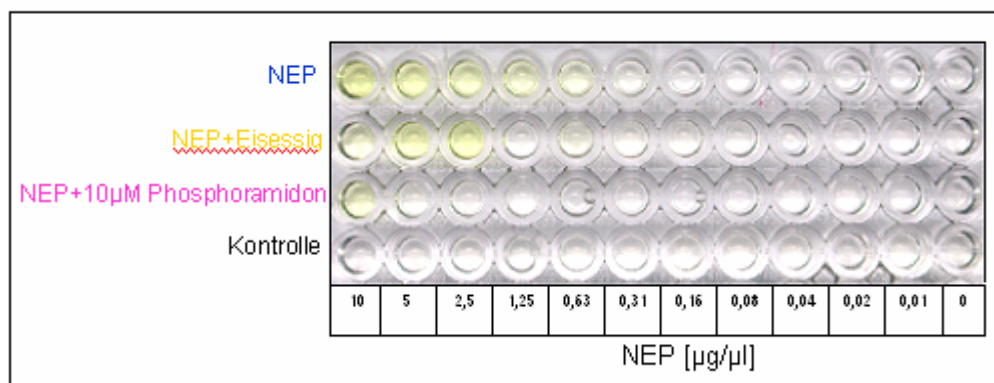


Abb. 7. NEP-Standardkurve, angelegt in einer 96-Well-Platte, in der die Reaktionen stattfanden. Man erkennt die abnehmende Färbung bei höher werdender Verdünnung. Diese wird anschließend im ELISA-Reader als Absorptionsänderung messbar.

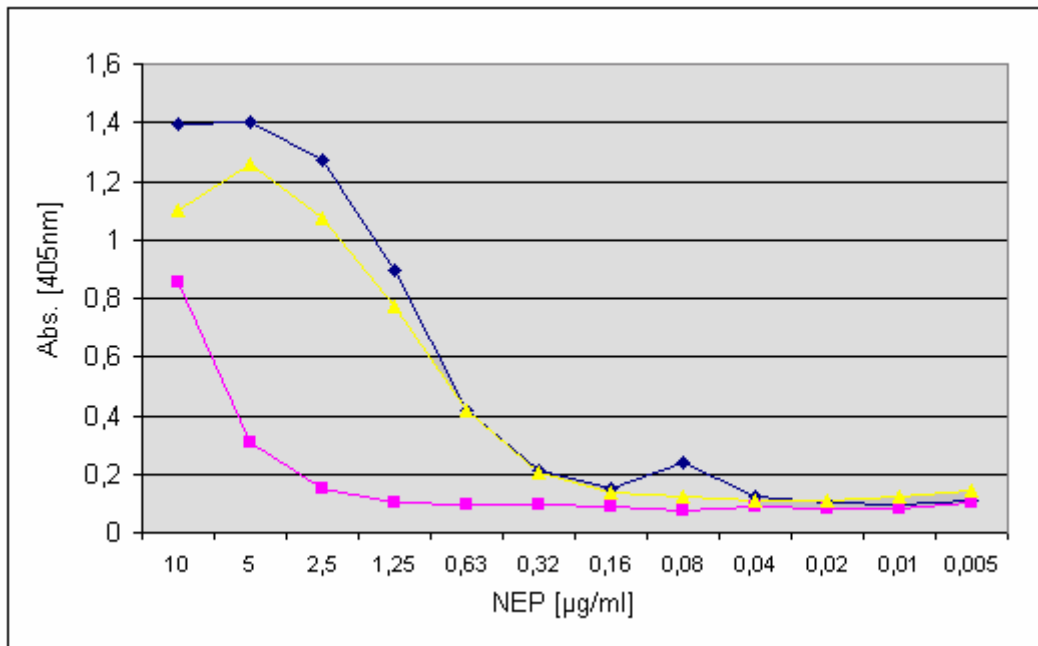


Abb. 8. zeigt die typische NEP Standardkurve (♦), für die aufgereinigte NEP in einer Verdünnungsreihe verwendet wurde, und den Einfluss von 1 µM Phosphoramidon (■) nach Messung der Absorption im ELISA-Reader bei 405 nm. Man kann erkennen, dass Eisessig (▲) kaum einen Einfluss auf die Aktivität der NEP zeigt.

Mit Hilfe dieser typischen NEP-Standardkurve ließ sich erkennen, dass mit zunehmender Verdünnung eine Abnahme der NEP-Aktivität auftritt, die ab einer Konzentration von 125 ng/ml die NEP-Aktivität kaum mehr messbar war. Da bei NEP Konzentrationen zwischen 10000 ng/ml und 5000 ng/ml kaum eine Abnahme der NEP-Aktivität zu erkennen war, kann man erwägen, ob es bei diesen Konzentrationen zu einer Sättigung des Enzyms kommt.

Unter spezifischer Hemmung mit Phosphoramidon sank die Aktivität der NEP bei 10000 ng/ml um ca. 50 % und konnte ab einer Konzentration von 2500 µg/ml kaum mehr nachgewiesen werden.

Auch die Aktivität der membrangebundenen NEP der einzelnen Zelllinien war nach Zugabe von Phosphoramidon ist deutlich vermindert. Für diesen Versuch wurden die epithelialen LNCaP- und stromalen hPCP-Zellen über 72 Stunden in 96-Well-Platten gezüchtet, anschließend das Medium sorgfältig abgenommen und der Ansatz für den NEP Assay, wie oben beschrieben, zugegeben und zusätzlich Phosphoramidon in einer Verdünnungsreihe, in den Konzentrationen 10000 nM, 5000 nM, 2500 nM, 1.250 nM, 625 nM, 312 nM, 156 nM, 78 nM, 39 nM, 19,5 nM, und 9,8 nM

hinzugefügt. Die Messungen der NEP-Aktivität/Zellzahl werden in Abbildung 9 dargestellt.

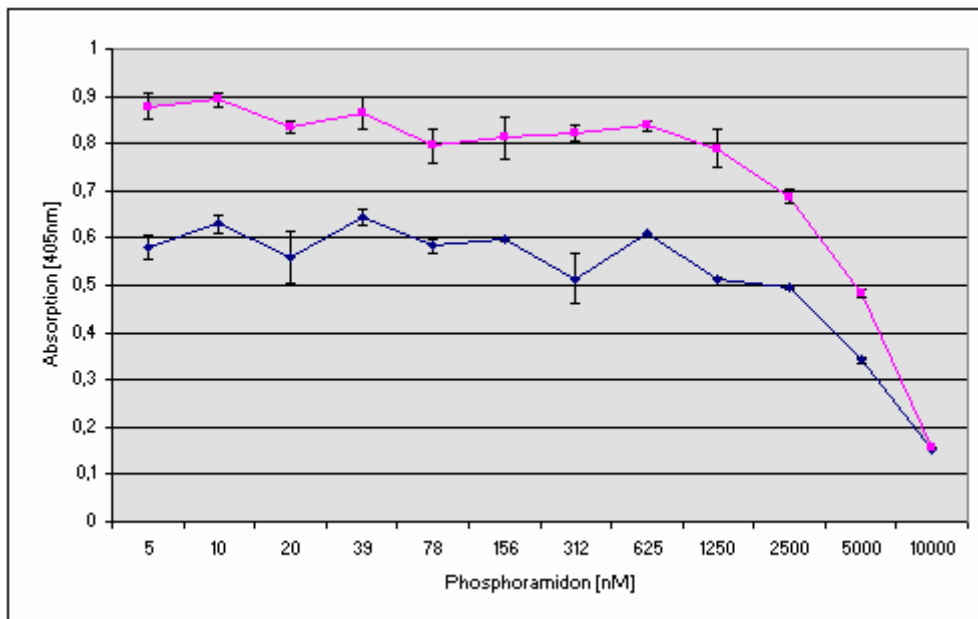


Abb. 9. Dargestellt wird die Hemmung der epithelialen LNCaP-Zelllinie (■) und der stromalen hPCP-Zelllinien (■) mit Phosphoramidon, einem spezifischen Hemmstoff der NEP. Vertikale Balken zeigen die Standardabweichung aus jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Es zeigt sich eine dosisabhängige Hemmung der NEP-Aktivität nach Inkubation der LNCaP-Zellen und hPCP-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von Phosphoramidon.

Zu Beginn zeigte sich erneut die um ca. ein Drittel höhere Aktivität der NEP in der epithelialen Zelllinie. Bei niedrigen Konzentrationen kam es in beiden Zelllinien jeweils nur zu einer geringen Hemmung der NEP Aktivität, während die Aktivität ab einer Konzentration von 625 nM Phosphoramidon deutlich absank. Dabei resultierte aus einer Zugabe von 5000 nM Phosphoramidon eine nahezu 50 %-ige Inhibition der NEP-Aktivität der einzelnen Zelllinien.

## 5. In vitro-Inkubationsversuche

Die beiden Zelllinien, die epitheliale und die stromale hPCP-Zellen wurden hierfür mit verschiedenen Substanzen behandelt. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die Versuche stets in gleicher Weise durchgeführt. Die Zelllinien wurden jeweils für 3 Tage unter regelmäßigen Medienwechseln in 96-Well-Platten angezüchtet. Die Medien enthielten die jeweils beschriebenen Konzentrationen an

Modulatoren. Das Zellwachstum wurde täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach 72 Stunden wurde das Medium sorgfältig abgegossen und die Versuchsanordnung durchgeführt. Für jeden Versuch wurden jeweils zwei 96-Well-Platten angelegt, wobei eine Platte der Aktivitätsmessung, wie oben beschrieben, die andere Platte der Proliferationsbestimmung, mittels Amidoblack-Assay, diente. Die Messung der Aktivität bzw. der Zellzahl erfolgte im ELISA-Reader. Alle Versuche wurden jeweils 3x in identischer Weise an aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Die Darstellung der Aktivität der Neutralen Endopeptidase erfolgte stets in Bezug auf die Zellzahl, um die verschiedenen Ergebnisse vergleichend beurteilen zu können.

Alle Modulatoren wurden in 2 verschiedenen Konzentrationen verwendet, um auch Trendeffekte erkennen zu können. Sie wurden jeweils in Bezug zu einer Kontrolle beurteilt, die ebenfalls über 3 Tage in Normalmedium jedoch ohne Zugabe von Modulatoren gewachsene Zellen der jeweiligen Zelllinie enthielt.

#### Behandlung der Zellen mit Dihydrotestosteron

Als erstes wurde der Effekt des Androgens Testosteron auf die Zelllinien untersucht. Für die Versuche wurde Dihydrotestosteron in den Konzentrationen  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M in gestripptem 10 % FKS Medium verwendet. Gestripptes Medium enthält keine weiteren Hormone und wurde verwendet, um additive Effekte durch im Serum vorhandene Androgene auszuschließen.

#### Legende zu den folgenden Abbildungen (Abb. 10 bis Abb. 18):

*Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen sind jeweils im linken Schaubild dargestellt, während die Ergebnisse der Proliferationsstudien rechts dargestellt sind. Innerhalb der Diagramme ist jeweils rechts die epitheliale Zelllinie dargestellt, links die stromale Zelllinie. Blaue Balken zeigen jeweils das Ergebnis als Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen, Standardabweichungen sind als vertikale Balken aufgetragen.*

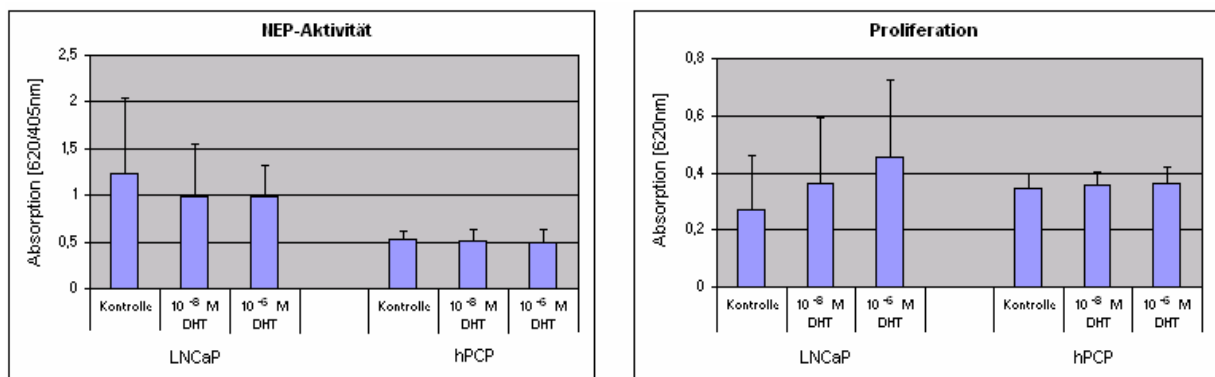


Abb.10. Behandlung der Zellen mit Dihydrotestosteron. Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien (gewachsen in gestripptem Medium), jeweils als Kontrolle ohne Zugabe von DHT und nach Inkubation mit DHT in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M. (Legende s.o.)

Es zeigte sich, dass Dihydrotestosteron auf die NEP-Aktivität und Proliferation der LNCaP-Zellen einen gegenläufigen Effekt ausübte. Mit Zunahme der Konzentration an DHT sank die NEP-Aktivität geringfügig, im Gegenzug dazu stieg jedoch die Proliferation um ca. 40 %.

Auf die NEP-Aktivität und auf die Proliferation der hPCP-Zellen hatte DHT keinen nachweisbaren Effekt.

#### Behandlung der Zellen mit Flutamid

Nach der Stimulation mit Androgenen erfolgte die Untersuchung von Antiandrogenen, da diese auch bei der Therapie des Prostatakarzinoms zum Einsatz kommen.

Die Stimulation erfolgte ebenfalls in gestripptem Medium mit 10 % FKS. Das Flutamid wurde in Alkohol gelöst. Es wurden deshalb Kontrollen mit reinem Ethanol ohne Flutamid mitgeführt. Es zeigte sich kein nachweisbarer Einfluss des Ethanols auf das Wachstum der beiden Zelllinien.



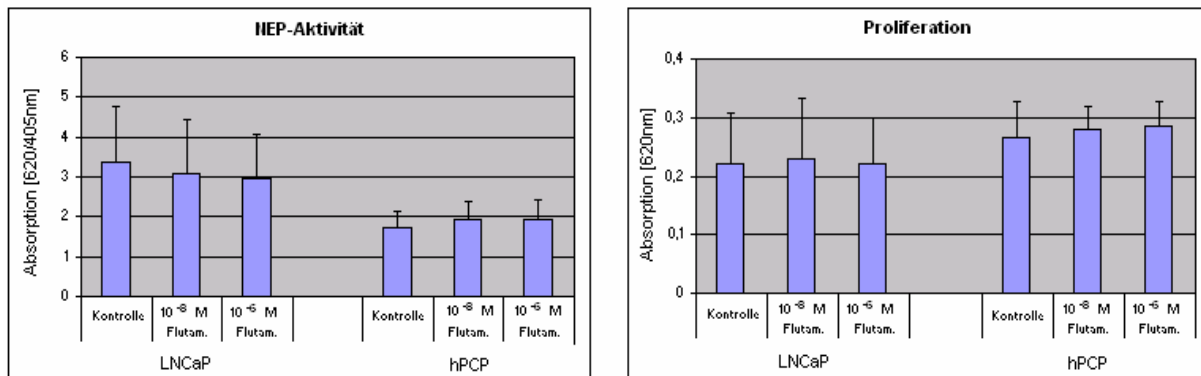


Abb. 11. Behandlung der Zellen mit Flutamid. Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien, jeweils als Kontrolle ohne Zugabe von Flutamid und nach Inkubation mit Flutamid in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M. (Legende s. o.)

Ein signifikanter Einfluss des Antiandrogens Flutamid war bei keiner der Zelllinien und weder auf die NEP-Aktivität noch auf die Proliferation zu erkennen.

#### Behandlung der Zellen mit $17\beta$ -Östradiol

Die Versuche wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden für diese Versuchsanordnung ebenfalls in gestripptem Medium mit 10 % FKS angezüchtet, um Wechselwirkungen mit den im Serum vorhandenen Hormonen zu minimieren.  $17\beta$ -Östradiol wurde in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M verwendet.

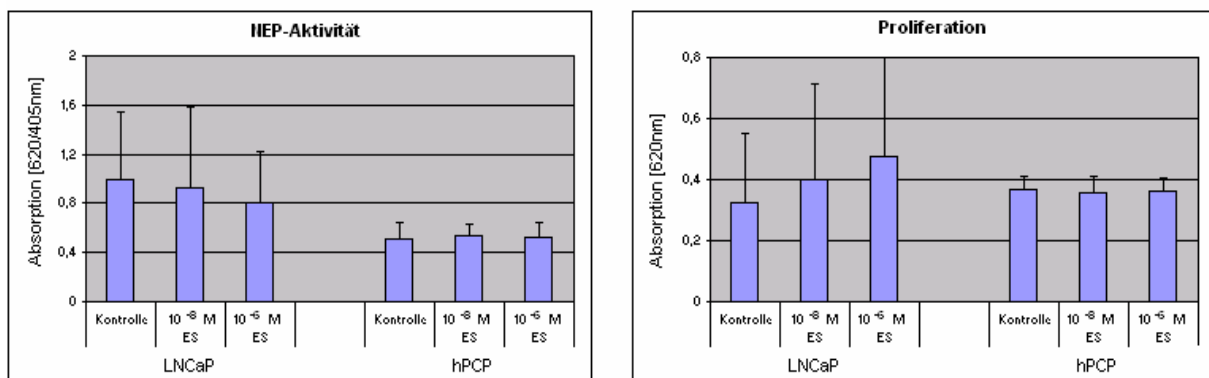


Abb. 12. Behandlung der Zellen mit  $17\beta$ -Östradiol (ES). Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien (gewachsen in gestripptem Medium), jeweils als

Kontrolle ohne Zugabe von  $17\text{-}\beta$  Östradiol und nach Inkubation mit  $17\text{-}\beta$ -Östradiol in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M. (Legende s. o.)

Ähnlich wie bei Stimulation mit Dihydrotestosteron zeigte sich bei den hPCP-Zellen Zellen weder ein Einfluß auf die NEP-Aktivität noch auf die Proliferation.

Auf die LNCaP-Zellen schien  $\beta$ -Östradiol eine gering proliferationssteigernde Wirkung zu haben, während die NEP-Aktivität geringfügig abnehmende Tendenz zeigte.

### Behandlung der Zellen mit Interleukin-1 $\beta$

Die Zellen wurden hier für 3 Tage in 10 % FKS Normalmedium angezchtet.

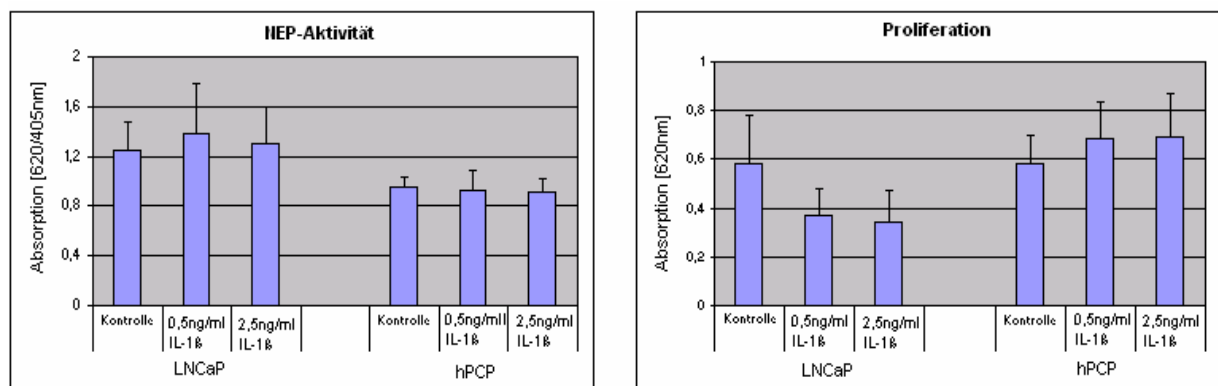


Abb.13. Behandlung der Zellen mit Interleukin-1 $\beta$ . Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien (gewachsen in Normalmedium), jeweils als Kontrolle ohne Zugabe von Interleukin-1 $\beta$  und nach Inkubation mit Interleukin-1 $\beta$  in den Konzentrationen 0,5 ng/ml und 2,5 ng/ml. (Legende s. o.)

Der Einfluss des Zytokin IL-1 $\beta$  zeigte auf die verschiedenen Zelllinien gegenläufige Effekte: einen deutlich antiproliferativen Effekt auf die epitheliale Zelllinie und einen proliferativen Effekt auf die stromale Zelllinie. Nach Zugabe von 0,5 ng/ml IL-1 $\beta$  nahm die Proliferation der LNCaP-Zellen um ungefähr ein Drittel ab, die Proliferation der hPCP-Zellen jedoch um ungefähr 18 % zu, und nach Zugabe von 2,5 ng/ml IL-1 $\beta$  sank die Proliferation der LNCaP-Zellen um ca. 40 %, während die Proliferation der hPCP-Zellen um ungefähr 20 % anstieg. Die Aktivität der NEP hingegen wurde bei beiden Zelllinien durch die Zugabe von IL-1 $\beta$  nicht verändert.

### Behandlung der Zellen mit CRL-1803 konditioniertem Medium

Man geht davon aus, dass die einzelnen Zelllinien während ihrer Wachstumsphase Hormone in das Medium abgeben. Bei den Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms ist dies vor allem Pro-Calcitonin (Schifter and Johnsen, 1994).

Um die Wirkung von Calcitonin, einem Neuropeptid, auf die Zelllinien zu untersuchen, wurden CRL-1803 Zellen für 3 Tage in RPMI Medium mit 10 % Serum inkubiert. Anschließend erfolgte die vorsichtige Abnahme des Mediums und die Untersuchung des Calcitoningehaltes. Im Labor der Klinischen Chemie der Universitätsklinik Marburg von Herrn Dr. Stief wurden in den mit CRL-1803 konditionierten Medien folgende Werte gemessen:

Proben	Pro-Calcitonin Gehalt
RPMI Medium mit 10 % Serum (Negativkontrolle)	0,197 ng/ml
LNCaP-Zellen in RPMI Medium mit 10 % Serum	0,203 ng/ml
CRL-1803 Zellen in RPMI Medium mit 10 % Serum	8,335ng/ml

Normwert für den Pro-Calcitonin Gehalt im humanen Serum < 0,5 ng/ml

Es zeigte sich, dass die LNCaP-Zellen nur in sehr geringem Ausmaß Pro-Calcitonin ins Serum abgaben, während nach Inkubation mit CRL-1803, die Konzentration von Pro-Calcitonin im Medium fast auf das 5-fache des Wertes der Negativkontrolle anstieg.

Für den Versuch wurden stromale Zellen (hPCP) und epitheliale Zellen (LNCaP) in dem konditionierten Medium kultiviert und anschließend wie bereits beschrieben jeweils NEP-Aktivität und Proliferation gemessen. Um Tendenzen besser erkennen zu können, wurden die Zelllinien in dem konditionierten Medium in 2 verschiedenen Verdünnungen (100 % konditioniertes Medium und 50 % konditioniertes Medium und 50 % frisches RPMI Medium mit 10 % FKS) inkubiert.

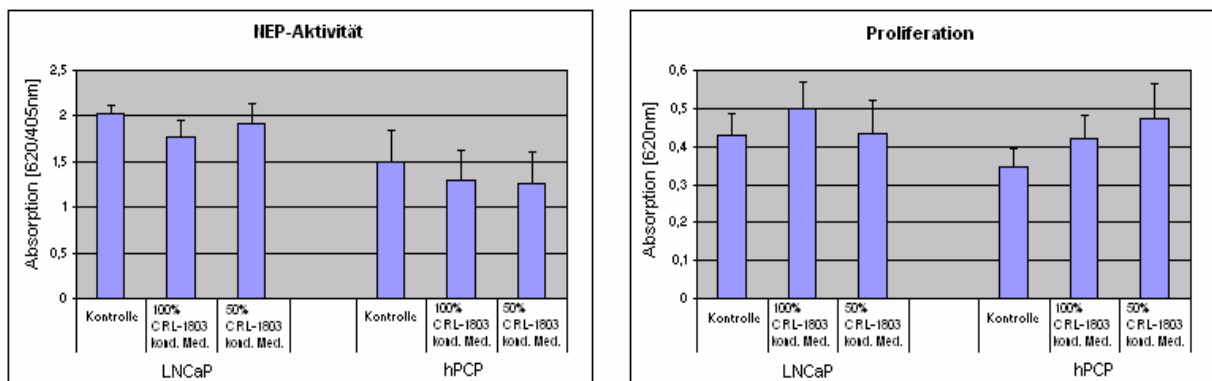


Abb. 14. Behandlung der Zellen mit Pro-Calcitonin mit Hilfe von mit CRL-1803-Zellen konditioniertem Medium. Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien (gewachsen in Normalmedium), jeweils als Kontrolle in RPMI-Medium und nach Inkubation mit konditionierten Medien zu 100 % und zu 50 % mit Normalmedium verdünnt. (Legende s. o.)

Die Zugabe von mit CRL-1803 Zellen konditioniertem Medium zeigte nur einen sehr geringen Effekt auf die Proliferation der LNCaP-Zellen, während die Zugabe von mit CRL-1803 Zellen konditioniertem Medium die Zellproliferation der hPCP-Zellen deutlich anregte. Die Zellproliferation stieg bei Zugabe von 50 % konditioniertem Medium um 37 % nach Zugabe von 100 % konditioniertem Medium um 21 %. Auf die NEP-Aktivität der Zellen schien das konditionierte Medium jedoch keinen Einfluss zu haben.

### Behandlung der Zellen mit Bombesin

Bombesin, ein weiteres Neuropeptid, wurde weiterhin im Hinblick auf seine Proliferations- und NEP-aktivitätsmodulierenden Wirkungen untersucht.

Stimulationsversuche erfolgten über 3 Tage, die Zellen wurden in Normalmedium kultiviert.

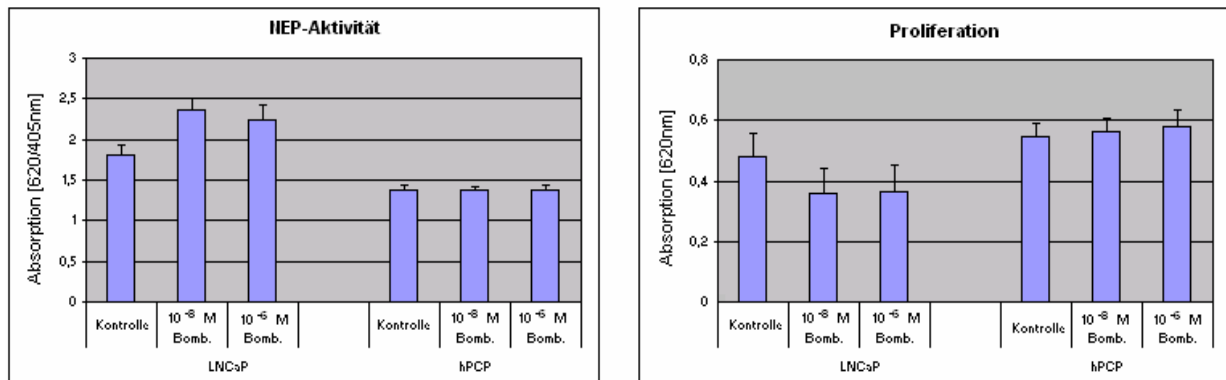


Abb.15. Behandlung der Zellen mit Bombesin. Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien (gewachsen in Normalmedium), jeweils als Kontrolle ohne Zugabe von Bombesin und nach Inkubation mit Bombesin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M. (Legende s. o.)

Die Zellproliferation der LNCaP-Zellen reduzierte sich nach 72 Stunden Inkubation mit Bombesin ( $10^{-8}$  M) um 25 % und bei Zugabe von  $10^{-6}$  M Bombesin um 23 %. Dagegen verhielt sich die Aktivität der NEP in den LNCaP-Zellen gegenläufig. Nach Stimulation mit einer Konzentration von  $10^{-8}$  M kam es zu einer Aktivitätszunahme um knapp ein Viertel, die unter Stimulation mit einer Konzentration von  $10^{-6}$  M ebenfalls geringfügig rückläufig war. Die Zellproliferation und NEP-Aktivität der hPCP-Zellen änderte sich hingegen nicht.

### Behandlung der Zellen mit Substanz P

Substanz P als Vertreter der Entzündungsmediatoren wurde ebenfalls untersucht. Die Inkubation erfolgte in RPMI-Medium mit 10 % FKS und Substanz P wurde in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M eingesetzt.

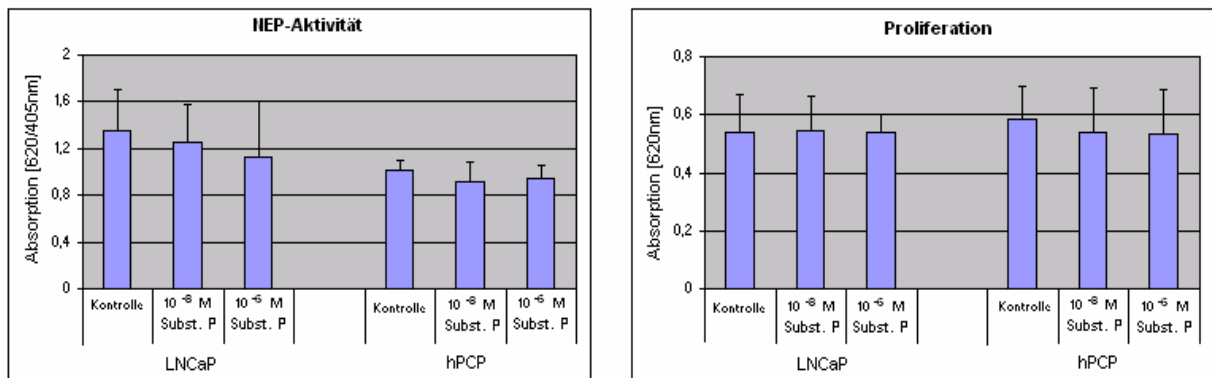


Abb. 16. Behandlung der Zellen mit Substanz P. Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien (gewachsen in Normalmedium,) jeweils als Kontrolle ohne Zugabe Modulatoren und nach Inkubation mit Substanz P in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M. (Legende s. o.)

Nach Inkubation mit Substanz P zeigte sich keine signifikante Aktivitäts- oder Proliferationsänderung der beiden untersuchten Zelllinien.

#### Behandlung der Zellen mit Dexamethason

Gezeigt wird hier die Stimulation über 3 Tage in gestripptem FKS. Gleichzeitig wurden die Inkubationen zum Ausschluss von Wechselwirkungen in nicht-gestripptem Normalmedium durchgeführt und es wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Insgesamt zeigte sich jedoch, dass die Aktivität der NEP in gestripptem FKS deutlich höher war als in ungestripptem FKS. Dexamethason wurde in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M verwendet.

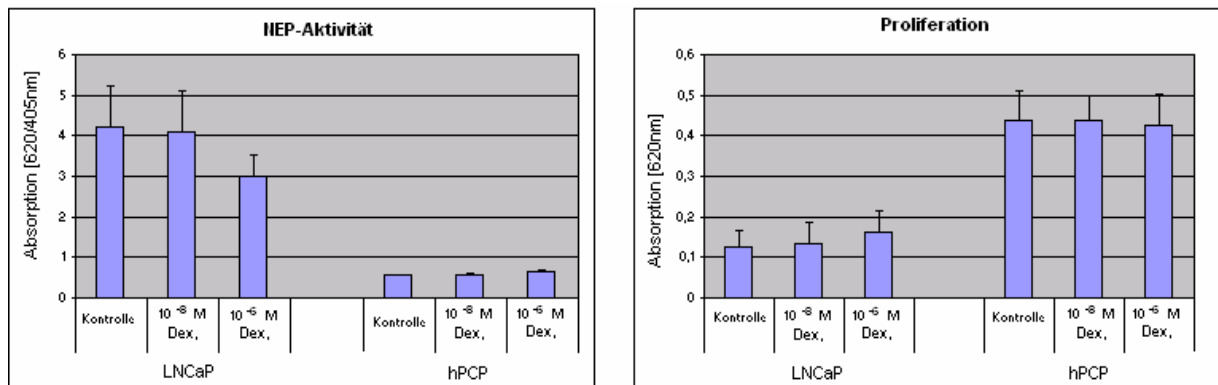


Abb. 18. Behandlung der Zellen mit Dexamethason. Gemessen wurden Aktivität und Proliferation der Zelllinien (gewachsen in gestripptem Medium,) jeweils als Kontrolle ohne Zugabe von Dexamethason und nach Inkubation mit Dexamethason in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M. (Legende s. o.)

Es zeigte sich bei hohen Dosen von Dexamethason ein hemmender Effekt auf die Aktivität der NEP der epithelialen Zelllinie mit einer Abnahme der Aktivität um ca. 20 %. Gleichzeitig kam es zu keinem statistisch signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Auf die stromale hPCP-Zelllinie ließ sich kein Einfluss nachweisen.

## V. Diskussion

### 1. Lokalisation, Expression und Aktivität der NEP im Prostata-Gewebe

In den letzten Jahren sind interessante Daten bezüglich der Bedeutung der NEP und der Funktion als neuropeptidspaltendes Enzym bei der Progression des androgen-unabhängigen Prostatakarzinoms (Dai et al., 2001; Papandreou et al., 1998; Sumitomo et al., 2000) veröffentlicht worden, aber nur wenige Studien wurden bisher zur NEP in stromalen Prostatazellen und ihrer Bedeutung und Beteiligung bei der Pathogenese der BPH durchgeführt (Renneberg et al., 2001; Muraki et al., 1996).

In unseren Untersuchungen wird näher auf die Lokalisation, Expression und enzymatische Aktivität der NEP sowohl im stromalen als auch im epithelialen Kompartiment der menschlichen Prostata eingegangen. Als stromale, humane Zelllinie der BPH werden hPCP-Zellen (human primary culture of the prostate stromal compartment) in ihrem Kultursystem verwendet (Janssen et al., 2000), sowie PrSC-Zellen („prostatic stromal cells“) der Firma Bio Whittacker, Walkersville, USA in ihrem Kultursystem. Vergleichend wurde die epitheliale Androgen-abhängige Zelllinie LNCaP der Firma American Type Culture Collection, Maryland, USA untersucht. Bei beiden stromalen Zelllinien konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie das Vorhandensein der Neutralen Endopeptidase nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von NEP in den epithelialen Zelllinien und in der hPCP Zelllinie war zuvor bereits beschrieben worden (Krongrad et al., 1997; Papandreou et al., 1998; Renneberg et al., 2001).

Nachgewiesen wurde die NEP weiterhin, wie einleitend schon beschrieben in vielen verschiedenen Geweben: Niere, Leber, Lunge (Sales et al., 1991), den Fibroblasten der Haut (Kletsas et al., 2000; Lorkowski et al., 1987), den stromalen Osteoblasten (Fried et al., 1996), in verschiedenen Abschnitten des weiblichen Genitaltraktes, wie der Theka interna, den Gelbkörperzellen, den epithelialen und stromalen Zellen des Endometriums (Casey et al., 1993; Zappulla and DesGroseillers, 2001).



Unsere Versuche zielten weiterhin auf die Quantifizierung der NEP-Aktivität ab. Verwendet wurde zur Messung der Aktivität der NEP ein enzymatischer Assay nach Papandreou et al., (1998), der für diesen Zweck aus der Literatur in unserem Labor etabliert wurde. Die Aktivität der NEP der stromalen BPH-Zelllinie sollte mit der einer epithelialen PC-Zelllinie verglichen werden; dies wurde in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen durchgeführt. Zunächst wurde gemäß der Assays nach Papandreou et al. (1998) die Aktivität der NEP in Zellfraktionen untersucht, anschließend wurde der Assay dahingehend modifiziert, dass die NEP-Aktivität auf den in Zellkulturplatten gewachsenen intakten Zellen gemessen werden konnte.

Da es sich bei der NEP um ein integrales Membranenzym handelt, konnten in den Membranfraktionen deutlich höhere und bei beiden Zelllinien unterschiedliche Werte gemessen werden, während die Aktivität der NEP bei beiden stromalen Zelllinien annähernd gleich zu sein schien.

Verglichen mit den PC-Zellen (LNCaP) wiesen die BPH-Zellen (hPCP) eine um fast 25 % geringere Aktivität der NEP im enzymatischen Assay auf.

Untersuchungen der Proteinexpression des Enzyms mittels Western-Blot-Analyse ergaben vergleichbare Ergebnisse.

Papandreou et al. (1998) hatten mittels Western- und Northern-Blot-Analysen herausgefunden, dass für die Androgen-abhängigen LNCaP-Zelllinie hohe Konzentrationen von NEP-mRNA und eine hohe Proteinexpression gemessen werden konnten, während die Androgen-unabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 wesentlich geringere Konzentrationen gemessen werden konnten. Einige Jahre früher hatten Krongrad et al (1997) bereits die Sekretion von elektronendichtem Material, das mit einer Endopeptidase assoziiert war, bei LNCaP-Zellen nicht aber bei der stark entdifferenzierten PPC-1 Prostata-Karzinomzelllinie festgestellt. Diese Daten untermauern die Vermutung, dass hochmaligne Zelllinien geringere Konzentrationen enzymatisch aktiver NEP auf ihrer Oberfläche besitzen, als besser differenzierte Zelllinien.

Aus der Literatur weiß man, dass die NEP die Phosphorylierung der fokalen Adhäsions-Kinasen (FAK) inhibiert ebenso wie die Prostata-Karzinomzellmigration (Sumitomo et al., 2000a; Sumitomo et al., 2000b). Daher scheint die NEP eine direkte Rolle im Hinblick auf die Invasivität und Metastasierung des PC zu spielen.

Als weiteren interessanten Fakt konnten Sumitomo et al. (2000b) beobachten, dass NEP die Phorbol-ester-induzierte Apoptose begünstigt (Sumitomo et al., 2000b), was

die höhere Metastasierungsrate der Androgen-unabhängigen PC-Zellen mit NEP-Mangel erklären könnte. Unter Verwendung eines Tetrazyklin-regulierten Genexpressionssystem konnten Dai et al. (2001) zeigen, dass NEP-supprimierte Mäuse, denen Tumorformationen orthotop direkt in die Prostata injiziert wurden, kürzere Überlebenszeiten zeigten als Tiere ohne NEP-Supprimierung, denen ebenfalls Tumorformationen orthotop in die Prostata injiziert worden waren. Aus diesen Ergebnissen leiteten Dai et al. (2001) einen Tumor-supprimierenden Effekt der NEP ab.

Die Neuropeptid-spaltende NEP spielt, wie oben bereits erwähnt, ebenfalls eine sehr wichtige Rolle beim Übergang von hormonell abhängigem Prostatakarzinom zum Androgen-unabhängigen PC und zeigt, wie auch Papandreou et al., (1998) nachweisen konnten, einen Tumor-supprimierenden Effekt auf epithelialen Zelllinien. Einen ursächlichen Zusammenhang sieht man darin, dass die NEP in der Prostata die mitogen wirkende Neuropeptide spaltet und inaktiviert, die von den sensorischen Nervenendigungen oder den neuroendokrinen Zellen freigesetzt werden (Aumueller et al., 1999; Aumueller et al., 2001; Mariot et al., 2002). Eine verminderte NEP-Aktivität führt daher zu einem verminderten Abbau der mitogen wirkenden Neuropeptide, die anschließend akkumulieren und so in der Lage sind ungehindert die Zellproliferation zu stimulieren (Papandreou et al., 1998). Aufgrund dieser Beobachtung nimmt man an, dass ein Langzeiteffekt einer herabregulierten NEP zu einem Selektionsvorteil für Zellen mit verminderter NEP-Aktivität führt, diese Zellen sprechen daraufhin stärker auf wachstumsverändernde Neuropeptide an, was schließlich zu einem vermehrten proliferativen Potenzial dieser Zellen führt.

Um den Einfluss von regulierenden Substanzen auf die Aktivität der NEP und die Zellproliferation sowohl der epithelialen als auch der stromalen Zelllinien zu verstehen, wurden in einzelnen Versuchsanordnungen jeweils die verschiedenen Substanzen auf die Zelllinien gegeben und ihre Wirkungen genauer untersucht.

## 2. Hormonelle Regulation der Proliferation und NEP-Aktivität im Prostata-Gewebe

### Behandlung der Zellen mit Androgenen, Antiandrogenen und Östrogenen

Androgene sind bekannt dafür wichtige Regulatoren der NEP in epithelialen Zellen darzustellen, und es gilt als gesichert, dass Androgenentzug eine Herabregulierung der NEP induziert, die wiederum zu dem Entstehen einer Neuropeptid-stimulierten Zell-Population führt (Papandreou et al., 1998).

Die hPCP-Zellkulturen enthalten sowohl Fibroblasten als auch glatte Muskelzellen und exprimieren Androgen- als auch Östrogenrezeptoren (Janssen et al., 2000). Zwei Androgen-Bindungsregionen konnten von Shen et al., (2000) an der nicht translatierten 3'-Region des menschlichen NEP-Gens nachgewiesen werden, und es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Transkription der NEP durch Androgene reguliert wird. Bei Androgen-ablativer Therapie sinkt die NEP-Expression, dadurch steigen die Konzentrationen mitogener Neuropeptide, und das Tumorwachstum beginnt erneut (Usmani et al., 2000)

Trotzdem zeigten unsere Versuche, dass die NEP-Aktivität weder durch die Stimulation mit Androgenen, wie Dihydrotestosteron (DHT), und Antiandrogenen, wie Flutamid noch durch Stimulation mit Östrogenen, wie 17 $\beta$ -Östradiol (ES), beeinflusst werden konnte.

Zuvor war bereits von Janssen et al., (2000) beschrieben worden, dass bei den hPCP-Zellen weder auf die Stimulation mit Dihydrotestosteron, Flutamid oder 17 $\beta$ -Östradiol eine Proliferationssteigerung nachgewiesen werden konnte, was sich auch in unseren Versuchen zeigte. Auch Taketa et al., (1990) konnten bereits in ihren Studien zeigen, dass DHT keine nachweisbaren Effekte auf die Proliferation der stromalen Zellen, gewonnen aus einer Rattenprostata, hatten. Peehl and Sellers, (1998) fanden keinen mitogenen Effekt von Androgenen auf stromale Zellen.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen der BPH-Zellen könnte eine Mutation im Androgenrezeptor sein, die verhindert, dass der Rezeptor das Androgen bindet bzw. die Rezeptorbindung an die DNA verhindert. Alternativ sind Mutationen denkbar, die in der 3'-Androgen-Bindungsregion lokalisiert sind und verhindern, dass diese Domänen den aktivierten Rezeptor binden.

Ergebnisse, die von Planz et al., (1998) erzielt wurden, zeigten, dass Androgene in den humanen stromalen Prostata-Zellen die Zellproliferation stimulieren. Allerdings zeigte die Charakterisierung der stromalen Zellen, die für die Untersuchungen verwendet wurden, dass sich in den Kulturen ca. < 9.5 % epitheliale Zellen befanden. Daher ist ein Androgen-induzierter mitogener parakriner Effekt, den die zurückgebliebenen epithelialen Zellen auf die stromalen Zellen ausüben nicht sicher auszuschließen.

### Behandlung der Zellen mit Interleukin-1 $\beta$

Ergebnisse von Scholzen et al. (2004) zeigen, dass die NEP eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen, wie zum Beispiel der Entstehung und Heilung verschiedenster Hauterkrankungen in vivo spielt und auch bei der Entstehung und Progression der BPH bzw. des PC Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen. Interleukine wie das IL-1 $\beta$ , das von Makrophagen sezerniert wird, spielen als Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle. Lemaire et al. (1991) beschrieben, dass die Sekretion des IL-1 $\beta$  von Makrophagen durch von den sensorischen Nervenendigungen oder den neuroendokrinen Zellen direkt freigesetzte Neuropeptide ausgelöst werden kann. Aufgrund dieser Überlegungen wurden auch die Wirkungen des Zytokins IL-1 $\beta$  auf die Aktivität der NEP und die Zellproliferation untersucht.

Inkubation der LNCaP Prostata-Karzinomzellen über 72 Stunden mit IL-1 $\beta$  zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität der NEP, obwohl man bereits herausfinden konnte, dass unter Stimulation eine Abnahme der Expression mRNA der NEP stattfindet (Albrecht et al., 2003). Dieses Phänomen ist vielleicht dadurch zu erklären, dass bis zu einem gewissen Punkt die enzymatische Aktivität der NEP trotz Abnahme der Expression durch eine Aktivitätszunahme der NEP durch IL-1 $\beta$  bzw. verwandte Zytokine auf einem konstanten Level gehalten werden kann.

Neben dem Einfluss auf die NEP-Expression konnten Kawada et al. (1999) zeigen, dass IL-1 $\beta$  einen starken antiproliferativen Effekt auf die LNCaP-Zellen zeigt, der auch in unseren Studien nachgewiesen werden konnte.

Einige Autoren postulierten weiterhin, dass Androgen-unabhängige Zellen in Tumorgewebe durch Suppression der Proliferation der Androgen-abhängigen Zellen einen Wachstumsvorteil erhalten, der durch einen wachstumshemmenden Effekt des

Zytokins IL-1 hervorgerufen wird (Hoosein, 1998). Sowohl IL-1 alpha als auch beta zeigen einen wachstumsinhibierenden Effekt auf die Androgen-abhängigen LNCaP-Zellen, was auch in unseren Ergebnissen deutlich wird; sie zeigen aber keinen Effekt auf die Proliferation der Androgen-unabhängigen Zelllinien DU-145 oder PC-3 (Hoosein, 1998).

Interessanterweise veränderte sich das morphologische Zellbild der LNCaP-Zellen nach Inkubation mit IL-1 $\beta$ . Die Zellen zeigten in lichtmikroskopischen Untersuchungen zunehmend neuronale Erscheinungsbilder, charakterisiert durch ein multipolares Erscheinungsbild mit dendritischen Ausläufern. Ähnliche Ergebnisse wurden auch schon von anderen Autoren erzielt, die die Zelllinien mit cAMP (Bang et al., 1994; Zelivianski et al., 2001), IL-6 (Qiu et al., 1998; Spiotto and Chung, 2000a; Spiotto and Chung, 2000b), und IL-1 (Chiao et al., 1999) oder in mit Hormonen bzw. Steroiden versetzten Medien (Burchardt et al., 1999; Zelivianski et al., 2001). (Albrecht et al., 2003) inkubiert hatten.

Insgesamt betrachtet kann man davon ausgehen, dass IL-1 $\beta$  die neuroendokrinen Entdifferenzierungsvorgänge in Prostata-Karzinomzellen unterstützt, was normalerweise mit einer erhöhten Aggressivität und vermehrten Invasivität der Prostatatumore einhergeht (Bollito et al., 2001; Hansson and Abrahamsson, 2001).

Die Beobachtungen, dass IL-1 $\beta$  die Transdifferenzierung der LNCaP-Zellen induziert und mit einer Inhibition des proliferativen Potenzials einhergeht, sind nicht sehr erstaunlich, da die Verminderung der Zellproliferation und die Induktion zur Differenzierung gängige Veränderungen sind, die bereits in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden konnten (Chiao et al., 1999; Costa et al., 2001; He and Jiang, 1999; Ryhanen et al., 1998).

Anders als die LNCaP-Zellen zeigen stromale hPCP-Zellen nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  Veränderungen des freien endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates (Albrecht et al., 2003), was Hinweis gibt auf eine vermehrte Protein-Biosynthese, die in einer erhöhten Zellproliferation resultiert. In unseren Proliferationsstudien zeigte sich bei Stimulation mit IL-1 $\beta$  in den Konzentrationen 0,5 ng/ml und 2,5 ng/ml ebenfalls ein geringer Proliferationszuwachs.

Bei den hPCP-Zellen konnte herausgefunden werden, dass nur die Inkubation der hPCP-Zellen mit IL-1 $\beta$  mit einer Konzentration von 0,5 ng/ml und nie die der LNCaP-Zellen oder die Inkubation mit irgendeinem anderen Stimulans eine Hochregulation der NEP Genexpression in den stromalen BPH-Zellen zur Folge hatte, während die

Applikation von 2.5 ng/ml IL-1 $\beta$  zu einem gegensätzlichen Effekt führte (Albrecht et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von anderen Gruppen gemacht, die die Zellen mit Insulin (Lowell und Flier, 1990) und TGF- $\alpha$  (Willard und Frawley, 1999) stimuliert hatten.

Chiao et al. (1999) zeigten, dass die neuroendokrinen Entdifferenzierungsvorgänge von LNCaP-Zellen von einem Anstieg von Chromogranin A und Serotonin begleitet sind. IL-1 $\beta$  vermindert die PSA-Expression und IL-1 $\beta$  und IL-6 erhöhen die Chromogranin A Expression und die Sekretion der LNCaP-Zellen (Diaz et al., 1998; Hoosein, 1998).

### Behandlung der Zellen mit Pro-Calcitonin

Obwohl die Funktion des sezernierten Pro-Calcitonin bisher noch nicht vollständig verstanden ist, weiß man, dass Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom erhöhte Werte von Vorstufen des Calcitonin aufweisen, ähnlich wie auch Patienten mit neuroendokrinen Tumoren wie zum Beispiel Phäochromozytom (Becker et al., 1978; Silva et al., 1974). Die von uns verwendete Zelllinie CRL-1803 wurde erstmals von Leong et al., (1977) beschrieben. Es ist bekannt, dass Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms in hohem Maße Calcitonin produzieren (Nelkin et al., 1984) und dass erhöhte Konzentrationen von Calcitonin zu einer Tumorprogression des Schilddrüsenkarzinoms führen (Zhang und DeGroot, 1997). Bereits 1986 konnte herausgefunden werden, dass neuroendokrine Zelllinien im PC ebenfalls Calcitonin produzieren (Fetissof et al., 1986) und dass die Anzahl der neuroendokrinen Zellen mit dem Level des produzierten Calcitonins korreliert (Davis et al., 1989). 1994 konnten Shah et al., 1994 nachweisen, dass Calcitonin auf PC-Zellen ebenfalls einen proliferativen Effekt ausübt und somit die Produktion von Calcitonin durch neuroendokrine Zellen zu einer Tumorprogression führt.

Untersuchungen von Chien et al., (2001) hatten bereits gezeigt, dass Calcitonin vermehrt von epithelialen PC-Zelllinien sezerniert wird und dass wahrscheinlich die erhöhten Konzentrationen wiederum zu vermehrter Calcitonin-Bildung in den Zellen führen. Unsere Ergebnisse zeigten eine geringe Erhöhung der Sekretion von Pro-Calcitonin durch LNCaP-Zellen ins Serum.

Dahingegen weiß man außerdem, dass in Geweben der BPH im Vergleich zu PC-Geweben einerseits signifikant geringere Konzentrationen von Calcitonin vorliegen, andererseits eine verminderte Anzahl von neuroendokrinen Zellen nachzuweisen ist (Abrahamsson et al., 2000).

Von Ritchie et al. (1997) konnte nachgewiesen werden, dass Calcitonin nur auf die Androgen-abhängige Zelllinie LNCaP einen proliferationssteigernden Effekt hat, während die Androgen-unabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 nicht auf die Stimulation mit Calcitonin reagieren. Außerdem fand die Arbeitsgruppe heraus, dass Calcitonin einen Effekt auf die chemotaktischen Eigenschaften der LNCaP-Zellen hat, was die Hypothese unterstützt, dass der Einfluss von Calcitonin auf die Prostatakarzinomzellen im Hinblick auf Tumorprogression und Metastasierung eine wichtige Rolle spielt.

In unseren Stimulationsversuchen konnten wir zeigen, dass erhöhte Konzentrationen von Calcitonin zu einer Proliferationssteigerung sowohl der BPH Zellen als auch in geringem Maße der PC Zellen führen. Außerdem fanden wir, dass nach Stimulation mit CRL-1803-Zellen konditioniertem Medium die NEP-Aktivität der LNCaP-Zellen deutlich herunterreguliert wurde. Auf die NEP-Aktivität der stromalen Prostatazellen schienen erhöhte Konzentrationen von Calcitonin keinen Einfluss zu haben. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Calcitonin nicht nur auf die Progression des PC einen Einfluss zu haben scheint, sondern in besonderem Maße auch auf die Progression der BPH. Unsere Ergebnisse sprechen im Hinblick darauf, dass die Aktivität der NEP in den Androgen-abhängigen Zellen durch Calcitonin aus den neuroendokrinen Zellen vermindert wird, für die zu Anfang beschriebene Hypothese zur Entstehung des Androgen-unabhängigen PC von Papandreou et al. (1998).

### Stimulation mit Bombesin

Calcitonin und das ebenfalls von uns untersuchte Neuropeptid Bombesin scheinen beide einen Apoptose verhindernden Effekt auf die Zellen des PC zu haben. Ergebnisse von Salido et al. (2000) zeigten, dass die Etoposid-induzierte Apoptose durch Zugabe von Bombesin und Calcitonin in den untersuchten Androgen-unabhängigen PC Zelllinien DU-145 und PC-3 und der Androgen-abhängigen Zelllinie LNCaP-Zellen nach Androgenentzug verhindert werden konnte. In diesen

Fällen wirken die Neuropeptide über eine Veränderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen, was normalerweise die Etoposid-induzierte Apoptose auslöst (Salido et al., 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die von den NE-Zellen freigesetzten Neuropeptide die Apoptose der Zellen in der Umgebung verhindern können (Salido et al., 2004). Daher scheinen diese Neuropeptide, die vor allem im Androgen-unabhängigen PC erhöhte Konzentrationen erreichen, entscheidend für das Wachstum, die Invasivität und Motilität der PC-Zellen verantwortlich zu sein (di Sant'Agnesse, 1998).

In unseren Untersuchungen konnten wir unter Stimulation mit Bombesin die Proliferation der Androgen-abhängigen Zelllinie um knapp 25 % senken, während hingegen die NEP-Aktivität bei Zugabe von Bombesin eine Zunahme um knapp ein Viertel zeigte. Eine mögliche Erklärung könnte in der Steigerung der Aktivität der NEP und daraus resultierenden vermehrten Inaktivierung von weiteren Neuropeptiden liegen, die wiederum zur weiteren Abnahme der Zellproliferation führen. Dieses Phänomen unterstützt die bereits mehrmals beschriebene Hypothese Papandreous und seiner Kollegen zur Entstehung des Androgen-unabhängigen PC. Ergebnisse von Larran Lopez et al. (2000) hatten bereits ergeben, dass die Stimulation mit Bombesin lediglich einen proliferativen Einfluss auf die Androgen-unabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 ausübt.

Die Zellproliferation und NEP-Aktivität der stromalen Zelllinie wurde in unseren Studien durch Stimulation mit Bombesin nicht beeinflusst.

#### Behandlung der Zellen mit Substanz P

Substanzen, wie Bombesin sowie Substanz P werden zu den Entzündungsmediatoren gezählt. Die NEP vermag solche Mediatoren zu spalten, weswegen ihr bei der Entstehung und Regulation von Entzündungen eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Bei der Entstehung der BPH lassen sich regelmäßig histologisch Entzündungszeichen nachweisen (Nickel et al., 1999), wie sie sich durch die Einwirkung von Neuropeptiden entwickeln.

Substanz P wird von den Nervenzellen sowie Immunzellen freigesetzt und konnte bisher bei verschiedenen Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt, des muskulo-skeletalen Systems und des Respirationstraktes nachgewiesen werden.



Neuere Ergebnisse von O'Connor et al. (2004) konnten zeigen, dass Inaktivierung von Substanz P durch die NEP eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Entzündungen spielt.

In unseren Studien zeigte sich, dass Substanz P die NEP-Aktivität in den LNCaP-Zellen gering herunterreguliert. Substanz P, die vor allem von den NE-Zellen des PC freigesetzt wird, könnte also durch Herabregulation der Aktivität der NEP anderen Neuropeptiden die Möglichkeit der vermehrten Stimulation geben und somit in Bezug zur Progression des PC stehen. Man weiß ebenfalls, dass Substanz P bei den Androgen-unabhängigen PC Zellen im Gegensatz zu den meisten Neuropeptiden durch Verringerung der Motilität der Zellen die Invasivität des PC vermindert (Nagakawa et al., 1998). Ob die verringerte Motilität im Zusammenhang mit der herabregulierten Aktivität der NEP steht, gilt es in weiteren Versuchen zu klären.

In Bezug auf die Proliferation der beiden Zelllinien ergab sich in unseren Studien keine Änderung. Auf die Aktivität der NEP der stromale Zelllinie schien Substanz P ebenfalls keinen Einfluss zu haben.

Aufgrund der Fähigkeit der NEP, proinflammatorische Peptide wie z. B. Substanz P zu spalten, rechnen einige Autoren ihr eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen zu. Scholzen et al. (2001) konnten zeigen, dass ein Fehlen von NEP in einer dysregulierten entzündlichen Hautreaktion resultiert und dass die NEP eine wichtige Rolle in der Genese verschiedener entzündlicher Hauterkrankungen, wie z. B. der allergischen Kontaktdermatitis spielt. Auch bei einigen weiteren neurogen evozierten Entzündungen spielt die NEP eine entscheidende Rolle, wie z. B. den durch neurogene Stimuli hervorgerufenen Lungenerkrankungen. Auch beim allergischen Asthma scheinen Neuropeptide eine wichtige Rolle zu spielen, so konnten z. B. nach Allergen-Provokation endobronchial vermehrt neurotrophe Mediatoren nachgewiesen werden (Virchow et al., 1998). Die Arbeitsgruppe um Renz et al. (2004) beschrieb weiterhin, dass die beim Asthma vorkommenden erhöhten Konzentrationen von neurotrophen Mediatoren die Aktivität der sensorischen und motorischen Nervenzellen im Bronchialsystem modifizieren, was zu einer vermehrten Freisetzung von Neuropeptiden führt. NEP kann diese Erkrankungen durch Spaltung der inflammatorisch wirksamen Neuropeptide, die aufgrund externer Stimuli in vermehrten Konzentrationen freigesetzt werden, regulieren und sogar beenden (Baraniuk et al., 1995; Di Maria et al., 1998).

Des Weiteren ergaben Versuche von Sturiale et al. (1999), dass es durch verminderte Level von NEP über einen geringeren Abbau von Substanz P zu einer unkontrollierten neurogenen Entzündungsreaktion im Bereich des Kolons kommt und dass NEP in der Lage ist, hauptsächlich durch Abbau von Substanz P Antibiotika-assoziierte, durch Clostridium difficile verursachte Kolitiden zu beenden (Kirkwood et al., 2001). Andere Autoren fanden einen immunregulatorischen Effekt der Neuropeptide auf die Stromalen Zellen des Knochenmarks, der in einer Veränderung der Produktion von regulatorisch wirkenden Zytokinen, wie z.B. IL-7 and SCF führte (Janda et al., 2000; Manske et al., 1995). Auch wurde ein mitogener Effekt von Substanz P auf glatte Muskelzellen und Fibroblasten in vitro herausgefunden (Katayama and Nishioka, 1997).

Wie bereits beschrieben, scheinen sowohl bei der Entstehung der BPH als auch bei der Entstehung und Progression des PC Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle zu spielen (Nickel et al., 1999). Entzündungsmediatoren wie Bombesin und Substanz P, die in der Prostata von den neuroendokrinen Zellen und im Prostatastroma vorhandenen, freien afferenten Nervenendigungen freigesetzt werden, können beim PC im Serum nachgewiesen werden. Es gilt als gesichert, dass die neuroendokrine Differenzierung mit einer Tumorprogression der PC einhergeht und dass die Produkte der Neuroendokrinen Zellen, wie Somatostatin, Bombesin und Substanz P einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und die Invasivität des Tumors haben (Hansson and Abrahamsson, 2001). Daher wird ein besonderes Augenmerk auf die von den NE-Zellen produzierten und freigesetzten Neuropeptide gelegt. Als fraglich gilt es jedoch, ob diese Konzentrationen von Neuropeptiden als prognostische Marker verwendet werden können (Cussenot et al., 1996).

#### Behandlung der Zellen mit Dexamethason

Glukokortikoide sind im Gegensatz zu den bisher diskutierten proinflammatorisch wirkenden Neuropeptiden antiinflammatorisch wirkende Substanzen. Sie wirken als lipophile Botenstoffe über intrazelluläre Rezeptoren über direkte Bindung an die DNA. Man weiß seit einigen Jahren, dass in der Zell-DNA der Prostatazellen sowohl Androgenbindungsstellen als auch Glukokortikoidbindungsstellen vorhanden sind, die die Transkription der NEP regulieren können (Shen et al., 2000). Ebenso kann

die NEP-Expression in den Stromalen Zellen der Blutgefäße durch die Stimulation mit Glukokortikoiden und Proteinkinase C gesteigert werden (Graf et al., 1998).

In der Prostata können Glukokortikoide wie Dexamethason des Weiteren eine Erhöhung der Expression der Interleukin-6 Rezeptoren bewirken (Mori et al., 1998).

Man nimmt an, dass Interleukin 6 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und Differenzierung des PC spielt. Es konnte in Proben zu 80 % bei Patienten mit BPH nachgewiesen werden und zu nahezu 100 % bei Patienten mit PC (Siegsmond, 1994). Weiterhin kommt es häufig im Serum von Patienten mit PC in erhöhten Konzentrationen vor. Es konnte überdies nachgewiesen werden, dass sowohl epitheliale wie Stromale Zelllinien der Prostata große Mengen an IL-6 sezernieren und dass eine enge Korrelation zwischen IL-6 im Serum und der Morbidität des PC besteht (Twilley, 1995, Degeorges, 1996).

Glukokortikoide werden seit einiger Zeit in Kombinationstherapien, vor allem beim Therapie-refraktären PC eingesetzt (Tapazoglou et al., 1986), wobei besonders auch Dexamethason gute Langzeiterfolge („clinical response“) und eine Verbesserung der subjektiven Symptome aufweist (Koutsilieris et al., 2004). Man nimmt an, dass eine mögliche Erklärung für das gute Ansprechen der Glukokortikoidtherapie in der Suppression der Interleukin-6 Level im Serum liegt (Akakura et al., 2003).

Trotzdem ist über Effekte von Dexamethason auf primäre Stromale Prostatazellen bislang sehr wenig bekannt.

In unserem Versuchsansatz sollte der Effekt von Glukokortikoiden auf die Proliferation der epithelialen und Stromalen Zellen und Änderungen in der Aktivität untersucht werden. Dexamethason-Konzentrationen im Bereich zwischen  $10^{-6}$  M und  $10^{-8}$  M hatten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Zellproliferation und die NEP-Aktivität der Stromalen Zelllinie. Auf die epitheliale Zelllinie zeigte sich ein hemmender Effekt auf die NEP-Aktivität, mit einer Abnahme von ca. 20 %. Auf die Proliferation der epithelialen Zelllinie LNCaP schien es gleichzeitig zu keinem signifikanten Einfluss zu kommen. Nishimura et al. (2001) beschrieben zuvor bereits, dass sich auf Stimulation mit Dexamethason kein gesteigertes Zellwachstum ergeben hat; sie zeigten in ihren Versuchen aber auch, dass es bei den Androgen-unabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 zu einem Dosis-abhängigen wachstumsinhibierenden Effekt kam. Als Erklärung hierfür konnte die Arbeitsgruppe in den Zelllinien erhöhte Konzentrationen von NF-kappa-B in den androgenunabhängigen Zelllinien nachweisen. Akkumulation des Proteins im Zytosol

vermindert die Sekretion des Nuclear-factor-kappa-B abhängigen Zytokins IL-6 (Nishimura et al., 2001).

Beobachtungen von Albrecht et al., (2002) zeigten, dass nur hohe Konzentrationen von Dexamethason in gestripptem FKS eine verstärkte Zellproliferation bewirken. Dies könnte auf das Fehlen von Glukokortikoiden und anderen Steroidfaktoren im Medium mit gestripptem FKS zurückzuführen sein. Versuche, mit ungestripptem FKS, welches endogene Steroidhormone enthält, die ebenfalls parallel durchgeführt wurden, konnten diese Hypothese erhärten. In diesen Experimenten zeigte sich ein mitogener Effekt schon im Bereich zwischen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M Dexamethason.

### Zusammenstellung der in-vitro-Inkubationsversuche

Insgesamt liegen die verwendeten Hormon-Konzentrationen in der Regel über den in vivo im Blutserum gefundenen Hormon-Konzentrationen.

Dieser zum Teil um den Faktor 100 höhere Einsatz von Hormonen und Wachstumsfaktoren unter in vitro-Bedingungen ist zum einen auf das Fehlen einer Flüssigkeitszirkulation im Zellkultursystem und die damit einhergehende diskontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Hormonen zurückzuführen. Zum anderen ist eine Akkumulation zellulärer Stoffwechselprodukte trotz Wechsel des Kulturmediums unvermeidlich und kann sich negativ auf das Wachstum und Verhalten der Zellen nach Stimulation auswirken. Dies gilt es bei der Beurteilung von in vitro-Untersuchungen stets kritisch zu berücksichtigen.

**Hier ergänzend eine tabellarische Darstellung der bereits diskutierten Befunde**

	hPCP		LNCaP	
	NEP-Aktivität	Proliferation	NEP-Aktivität	Proliferation
Dihydrotestosteron	0	0	↓	↑
Flutamid	0	0	0	0
β-Östradiol	0	0	↓	↑
Interleukin-1β	0	↑	0	↓
CRL-1803 kond. Medium	0	↑	↓	↑
Substanz P	0	0	0	0
Bombesin	0	0	↑	↓
Dexamethason	0	0	↓	0

*Tab. 1. Zusammenfassung der Inkubationsversuche. 0: kein Einfluss, ↑ Steigerung der Aktivität/Proliferation, ↓ Verminderung der Aktivität/ Proliferation*

Insgesamt zeigte sich, dass die Zellen des stromalen Kompartiments, auf die in unseren Untersuchungen ein besonderes Augenmerk gelegt worden war, auf externe Stimulation kaum reagieren. Lediglich Stimulationen mit IL-1β und Pro-Calcitonin zeigten geringe Proliferationssteigerungen, während die NEP-Aktivität dieser Zelllinien durch externe Stimuli nicht beeinflusst werden konnte. Die relative geringe Sensitivität auf externe Stimuli unserer hPCP-Zellen, die auch bereits von Janssen et al. (2000) vorbeschrieben worden war, mag auf den Grund zurückzuführen sein, dass hPCP-Zellkulturen frei sind von epithelialen Zellen, und dass geringe Zahlen von epithelialen Zellen in einer Kultur essentiell sind, um die Reaktion stromaler Prostata-Zellen auf externe Stimuli zu unterhalten. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen werden weitere Studien notwendig sein.

Desweiteren fiel bei der Interpretation der Befunde auf, dass die Aktivität der NEP der LNCaP-Zellen sich in der Regel gegenläufig zur Proliferation verhält. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Ursachen zu diskutieren. Es könnte einerseits

der Fall sein, dass bei stärkerer Proliferation das Medium mit den enthaltenen Mengen an Modulatoren nicht alle Zellen in gleicher Weise erreichen kann und in umgekehrter Weise bei geringer Proliferation jede Zelle von mehr stimulierenden Substanzen erreicht wird. Andererseits könnte aber auch eine gesteigerte Aktivität der Neutralen Endopeptidase zu einer vermehrten Inaktivierung von proliferationssteigernden Substanzen und so zu einer verminderten Proliferation führen, was wiederum die Hypothese Papandreous unterstützt (Papandreou et al., 1998). Als weitere Erklärung für das Phänomen könnten Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielen, indem die Zellen, die sich teilen, benachbarte Zellen an der Proliferation hindern.

Dies gilt es sicherlich als weiteres Phänomen in Zukunft näher zu untersuchen, um neue therapeutische Ansätze im Hinblick auf die Zellproliferation des Androgen-abhängigen PC zu finden.

## VI. Zusammenfassung

Die humane Prostata ist eines der am häufigsten von benignen und malignen Erkrankungen betroffenen Organe des Mannes. Viele Fragen bezüglich der Ätiologie und Pathogenese dieser Veränderungen sind bislang noch ungeklärt. Unsere Untersuchungen sollten die bisher wenig untersuchten Stromalen Zelllinien insbesondere im Hinblick auf die Expression und Aktivität der Neutralen Endopeptidase, einem integralen Membranenzym, dem eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression sowohl der benignen Prostatahyperplasie als auch des Prostatakarzinoms zugesprochen wird, genauer untersuchen. Und in weiteren Versuchen sollte die Aktivität des Enzyms und das Proliferationsverhalten der Stromalen sowie auch der epithelialen Zelllinie nach Inkubation mit verschiedenen Botenstoffen beobachtet werden.

Zusammengefasst zeigen unsere Untersuchungen sowohl in Proteinexpression als auch in der Aktivität des Enzyms eine ungefähr um 25 % geringere Expression bzw. Aktivität der NEP in Stromalen Zelllinien verglichen mit der Androgen-abhängigen PC Zelllinie LNCaP.

Ein wesentlicher Befund ist, dass die Stromazellen der Prostata, auf die in unseren Untersuchungen ein besonderes Augenmerk gelegt worden war, kaum auf parakrine Stimulation reagieren. Lediglich die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und Pro-Calcitonin führte zu geringen Proliferationssteigerungen, während die Aktivität der NEP stets unverändert blieb. Vielleicht ist hier das Fehlen von epithelialen Zellen, die als parakrine Mediatoren wirken können von Bedeutung. Bei der Interpretation der Befunde nach in vitro-Behandlung der Zellen mit Steroidhormonen, Neuropeptiden und Cytokinen fällt auf, dass die Aktivität der NEP in den LNCaP-Zellen sich häufig gegenläufig zur Proliferation verhält. Dies könnte daran liegen, dass durch die Proliferation eine relative Unterversorgung der Zellen mit dem Stimulans eintritt oder eine gesteigerte Aktivität der Neutralen Endopeptidase zu einer vermehrten Inaktivierung der proliferationssteigernden Substanzen bzw. der Proliferation der Zellen führt. Damit würde die von Papandreou und Mitarbeitern aufgestellte Hypothese bestätigt. Diese Befunde betreffen jedoch nur die androgensensitiven LNCaP-Zellen; die androgen-insensitiven DU-145- und PC-3-Zellen reagierten kaum auf die in vitro-Stimulation. Die zu Anfang beschriebene Hypothese Papandreou et al. (1998), dass eine erhöhte parakrine Stimulation von Prostata-Karzinomzellen infolge verminderter Expression

der NEP an der Zelloberfläche und daher kontinuierlichem Einwirken der parakrinen Neuropeptide führt, konnte somit nur für die Androgen-sensitive LNCaP-Zelllinie bestätigt werden und scheint auf die stromale Zelllinie nicht zu treffen.

Wenn man die wichtige Rolle der NEP in Bezug auf die Inaktivierung entzündlicher Proteine, Neuropeptide bedenkt, kann man annehmen, dass in bestimmten Geweben besonders bei verminderter Aktivität der NEP ebensolche Proteine erhöhte Konzentrationen erreichen können. Diese Neuropeptide nun können Signaltransduktionswege initiieren, die die Gewebezusammensetzung verändern, wie es bereits für das PC und die BPH beschrieben wurde. Unsere Ergebnisse zeigten, dass das Neuropeptid Calcitonin, nicht nur auf die Progression des PC einen Einfluss zu haben scheint sondern in besonderem Maße auch auf die Progression der BPH.

Zu Beginn der Arbeit wurden die verschiedenen konservativen Therapie-Optionen der BPH und PC beschrieben. Insgesamt sind die Ergebnisse der konservativen Therapie bislang sehr unbefriedigend und dienen primär der Symptomlinderung, ohne die Weiterentwicklung der Erkrankungen zu verhindern. Es hat sich gezeigt, dass keiner der Therapie-Ansätze die Progression der Erkrankungen zu verhindern vermag. Die vorliegende Arbeit sollte einen kleinen Einblick in die unterschiedlichen Reaktionen der stromalen und epithelialen Zelllinien auf verschiedenen Stimulantien und im weitesten Sinne auch auf Therapeutika aufzeigen. Weitere Studien sollten folgen, um den Pathomechanismus der beiden Erkrankungen noch besser verstehen zu können und somit zu neuen Therapie-Ansätzen zu gelangen.



## VII. Literatur

- Abrahamsson, P.A., Dizeyi, N., Alm, P., di Sant'Agnesse, P.A., Deftos, L.J. and Aumueller, G. (2000) Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *Prostate*, **44**, 181-186.
- Akakura, K., Suzuki, H., Ueda, T., Komiya, A., Ichikawa, T., Igarashi, T. and Ito, H. (2003) Possible mechanism of dexamethasone therapy for prostate cancer: suppression of circulating level of interleukin-6. *Prostate*, **56**, 106-109.
- Albrecht, M., Janssen, M., Konrad, L., Renneberg, H. and Aumueller, G. (2002) Effects of dexamethasone on proliferation of and fibronectin synthesis by human primary prostatic stromal cells in vitro. *Andrologia*, **34**, 11-21.
- Albrecht, M., Mittler, A., Wilhelm, B., Lundwall, A., Lilja, H., Aumueller, G. and Bjartell, A. (2003) Expression and immunolocalisation of neutral endopeptidase in prostate cancer. *Eur Urol*, **44**, 415-422.
- Aprikian, A.G., Cordon-Cardo, C., Fair, W.R., Zhang, Z.F., Bazinet, M., Hamdy, S.M. and Reuter, V.E. (1994) Neuroendocrine differentiation in metastatic prostatic adenocarcinoma. *J Urol*, **151**, 914-919.
- Aumueller, G. (1989) [Functional morphology of the prostate]. *Urologe A*, **28**, 306-310.
- Aumueller, G. (1992) [Benign prostatic hyperplasia and growth factors: mechanisms and hypotheses]. *Urologe A*, **31**, 159-165.
- Aumueller, G., Leonhardt, M., Janssen, M., Konrad, L., Bjartell, A. and Abrahamsson, P.A. (1999) Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology*, **53**, 1041-1048.

- Aumueller, G., Leonhardt, M., Renneberg, H., von Rahden, B., Bjartell, A. and Abrahamsson, P.A. (2001) Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate*, **46**, 108-115.
- Bang, Y.J., Pirnia, F., Fang, W.G., Kang, W.K., Sartor, O., Whitesell, L., Ha, M.J., Tsokos, M., Sheahan, M.D., Nguyen, P. and 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.
- Baraniuk, J.N., Ohkubo, K., Kwon, O.J., Mak, J., Ali, M., Davies, R., Twort, C., Kaliner, M., Letarte, M. and Barnes, P.J. (1995) Localization of neutral endopeptidase (NEP) mRNA in human bronchi. *Eur Respir J*, **8**, 1458-1464.
- Becker, K.L., Snider, R.H., Silva, O.L. and Moore, C.F. (1978) Calcitonin heterogeneity in lung cancer and medullary thyroid cancer. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **89**, 89-99.
- Bollito, E., Berruti, A., Bellina, M., Mosca, A., Leonardo, E., Tarabuzzi, R., Cappia, S., Ari, M.M., Tampellini, M., Fontana, D., Gubetta, L., Angeli, A. and Dogliotti, L. (2001) Relationship between neuroendocrine features and prognostic parameters in human prostate adenocarcinoma. *Ann Oncol*, **12 Suppl 2**, S159-164.
- Bonkhoff, H. and Remberger, K. (1998) [Morphogenesis of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma]. *Pathologe*, **19**, 12-20.
- Bonkhoff, H., Stein, U. and Remberger, K. (1995) Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum Pathol*, **26**, 167-170.
- Bostwick, D.G., Qian, J., Pacelli, A., Zincke, H., Blute, M., Bergstralh, E.J., Slezak, J.M. and Cheng, L. (2002) Neuroendocrine Expression in Node Positive

- Prostate Cancer: Correlation With Systemic Progression and Patient Survival. *J Urol*, **168**, 1204-1211.
- Buljubasich, S., Lau, W.A., Pennefather, J.N. and Ventura, S. (1999) An immunohistochemical and pharmacological study of tachykinins in the rat and guinea-pig prostate glands. *Eur J Pharmacol*, **380**, 137-144.
- Burchardt, T., Burchardt, M., Chen, M.W., Cao, Y., de la Taille, A., Shabsigh, A., Hayek, O., Dorai, T. and Buttyan, R. (1999) Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *J Urol*, **162**, 1800-1805.
- Casey, M.L., Smith, J.W., Nagai, K. and MacDonald, P.C. (1993) Transforming growth factor-beta 1 inhibits enkephalinase (EC 3.4.24.11) gene expression in human endometrial stromal cells and sex skin fibroblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab*, **77**, 144-150.
- Chiao, J.W., Hsieh, T.C., Xu, W., Sklarew, R.J. and Kancherla, R. (1999) Development of human prostate cancer cells to neuroendocrine-like cells by interleukin-1. *Int J Oncol*, **15**, 1033-1037.
- Chien, J., Ren, Y., Qing Wang, Y., Bordelon, W., Thompson, E., Davis, R., Rayford, W. and Shah, G. (2001) Calcitonin is a prostate epithelium-derived growth stimulatory peptide. *Mol Cell Endocrinol*, **181**, 69-79.
- Cockett, A.T., di Sant'Agnese, P.A., Gopinath, P., Schoen, S.R. and Abrahamsson, P.A. (1993) Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. *Urology*, **42**, 512-519.
- Cohen, A.J., Bunn, P.A., Franklin, W., Magill-Solc, C., Hartmann, C., Helfrich, B., Gilman, L., Folkvord, J., Helm, K. and Miller, Y.E. (1996) Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res*, **56**, 831-839.

- Costa, S.L., Paillaud, E., Fages, C., Rochette-Egly, C., Plassat, J.L., Jouault, H., Perzelova, A. and Tardy, M. (2001) Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eur J Cancer*, **37**, 520-530.
- Cussenot, O., Villette, J.M., Valeri, A., Cariou, G., Desgrandchamps, F., Cortesse, A., Meria, P., Teillac, P., Fiet, J. and Le Duc, A. (1996) Plasma neuroendocrine markers in patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Urol*, **155**, 1340-1343.
- Dai, J., Shen, R., Sumitomo, M., Goldberg, J.S., Geng, Y., Navarro, D., Xu, S., Koutcher, J.A., Garzotto, M., Powell, C.T. and Nanus, D.M. (2001) Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*, **7**, 1370-1377.
- Davis, N.S., DiSant'Agnes, P.A., Ewing, J.F. and Mooney, R.A. (1989) The neuroendocrine prostate: characterization and quantitation of calcitonin in the human gland. *J Urol*, **142**, 884-888.
- Di Maria, G.U., Bellofiore, S. and Geppetti, P. (1998) Regulation of airway neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Eur Respir J*, **12**, 1454-1462.
- di Sant'Agnes, P.A. (1998) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update. *Prostate Suppl*, **8**, 74-79.
- Diaz, M., Abdul, M. and Hoosein, N. (1998) Modulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer by interleukin-1 and -2. *Prostate Suppl*, **8**, 32-36.
- Erdos, E.G., Wagner, B., Harbury, C.B., Painter, R.G., Skidgel, R.A. and Fa, X.G. (1989) Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) in human neutrophils. *J Biol Chem*, **264**, 14519-14523.

- Fetissof, F., Bertrand, G., Guilloteau, D., Dubois, M.P., Lanson, Y. and Arbeille, B. (1986) Calcitonin immunoreactive cells in prostate gland and cloacal derived tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, **409**, 523-533.
- Fried, A., Shamay, A., Wientroub, S. and Benayahu, D. (1996) Phenotypic expression of marrow cells when grown on various substrata. *J Cell Biochem*, **61**, 246-254.
- Gibbs, B.F., Wierecky, J., Welker, P., Henz, B.M., Wolff, H.H. and Grabbe, J. (2001) Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol*, **10**, 312-320.
- Gkonos, P.J., Krongrad, A. and Roos, B.A. (1995) Neuroendocrine peptides in the prostate. *Urol Res*, **23**, 81-87.
- Gohring, B., Holzhausen, H.J., Meye, A., Heynemann, H., Rebmann, U., Langner, J. and Riemann, D. (1998) Endopeptidase 24.11/CD10 is down-regulated in renal cell cancer. *Int J Mol Med*, **2**, 409-414.
- Gomes, I., Aumueller, G., Wennemuth, G., Bette, M. and Albrecht, M. (2003) Independent signals determine the subcellular localization of NEP in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **310**, 919-926.
- Graf, K., Koehne, P., Grafe, M., Zhang, M., Auch-Schwelk, W. and Fleck, E. (1995) Regulation and differential expression of neutral endopeptidase 24.11 in human endothelial cells. *Hypertension*, **26**, 230-235.
- Graf, K., Schaper, C., Grafe, M., Fleck, E. and 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.
- Hansson, J. and Abrahamsson, P.A. (2001) Neuroendocrine pathogenesis in adenocarcinoma of the prostate. *Ann Oncol*, **12 Suppl 2**, S145-152.

- He, Q. and Jiang, D. (1999) A novel aminosteroid is active for proliferation inhibition and differentiation induction of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Leuk Res*, **23**, 369-372.
- Hoosein, N.M. (1998) Neuroendocrine and immune mediators in prostate cancer progression. *Front Biosci*, **3**, D1274-1279.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Chu, T.M., Wajsman, Z.L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L.S., Kakati, S., Arya, S.K. and Sandberg, A.A. (1980) The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, **37**, 115-132.
- Ismail, A.H., Landry, F., Aprikian, A.G. and Chevalier, S. (2002) Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *Prostate*, **51**, 117-125.
- Janda, S.S., Boranic, M., Skodlar, J., Petroveckii, M., Nemet, D. and Labar, B. (2000) Effect of opioid peptide methionine-enkephalin in long-term cultures of human bone marrow. *Acta Med Croatica*, **54**, 99-105.
- Janssen, M., Albrecht, M., Moschler, O., Renneberg, H., Fritz, B., Aumueller, G. and Konrad, L. (2000) Cell lineage characteristics of human prostatic stromal cells cultured in vitro. *Prostate*, **43**, 20-30.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. and Jones, L.W. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*, **17**, 16-23.
- Katayama, I. and Nishioka, K. (1997) Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J Dermatol Sci*, **15**, 201-206.
- Kawada, M., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. (1999) Enhancement of antiproliferative effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on human prostate

- cancer LNCaP cells by coculture with normal fibroblasts through secreted interleukin-6. *Jpn J Cancer Res*, **90**, 546-554.
- Kirkwood, K.S., Bunnett, N.W., Maa, J., Castagliolo, I., Liu, B., Gerard, N., Zacks, J., Pothoulakis, C. and Grady, E.F. (2001) Deletion of neutral endopeptidase exacerbates intestinal inflammation induced by *Clostridium difficile* toxin A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **281**, G544-551.
- Kletsas, D., Pratsinis, H., Zervolea, I., Handris, P., Sevaslidou, E., Ottaviani, E. and Stathakos, D. (2000) Fibroblast responses to exogenous and autocrine growth factors relevant to tissue repair. The effect of aging. *Ann N Y Acad Sci*, **908**, 155-166.
- Kokkonen, J.O., Kuoppala, A., Saarinen, J., Lindstedt, K.A. and Kovanen, P.T. (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.
- Koutsilieris, M., Mitsiades, C.S., Bogdanos, J., Dimopoulos, T., Karamanolakis, D., Milathianakis, C. and Tsintavis, A. (2004) Combination of somatostatin analog, dexamethasone, and standard androgen ablation therapy in stage D3 prostate cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res*, **10**, 4398-4405.
- Krongrad, A., Atochina, E., Ryan, J.W. and Roos, B.A. (1997) Endopeptidase 24.11 activity in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PPC-1. *Urol Res*, **25**, 113-116.
- Larran Lopez, J., Aparicio Patino, J., Lopez Munoz, A. and Vilches Troya, J. (2000) [Effect of the neuropeptides bombesin and calcitonin on the growth of prostate cell lines, PC-3, DU 145, and LNCaP]. *Actas Urol Esp*, **24**, 779-784.
- Lemaire, I. (1991) Bombesin-related peptides modulate interleukin-1 production by alveolar macrophages. *Neuropeptides*, **20**, 217-223.

- Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Lu, M., Yao, S., Klausner, A., Preston, C., Holland, J.F. and Levine, A.C. (2002) 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.
- Lorkowski, G., Zijderhand-Bleekemolen, J.E., Erdos, E.G., von Figura, K. and Hasilik, A. (1987) Neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase). Biosynthesis and localization in human fibroblasts. *Biochem J*, **248**, 345-350.
- Lowell, B.B. and Flier, J.S. (1990) Differentiation dependent biphasic regulation of adiponin gene expression by insulin and insulin-like growth factor-1 in 3T3-F442A adipocytes. *Endocrinology*, **127**, 2898-2906.
- Manske, J.M., Sullivan, E.L. and Andersen, S.M. (1995) Substance P mediated stimulation of cytokine levels in cultured murine bone marrow stromal cells. *Adv Exp Med Biol*, **383**, 53-64.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M.F. and Prevarskaya, N. (2002) Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **277**, 10824-10833.
- Moody, T.W., Mayr, C.A., Gillespie, T.J. and Davis, T.P. (1998) Neurotensin is metabolized by endogenous proteases in prostate cancer cell lines. *Peptides*, **19**, 253-258.
- Mori, S., Murakami-Mori, K. and Bonavida, B. (1998) Dexamethasone enhances expression of membrane and soluble interleukin-6 receptors by prostate carcinoma cell lines. *Anticancer Res*, **18**, 4403-4408.
- Muraki, K., Nakata, Y., Simonaka, H., Inoue, J., Hirai, Y. and Akiyama, M. (1996) Neutral endopeptidase activity in serum and cerebrospinal fluid. *Hiroshima J Med Sci*, **45**, 109-112.



- Nagakawa, O., Ogasawara, M., Fujii, H., Murakami, K., Murata, J., Fuse, H. and Saiki, I. (1998) Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Lett*, **133**, 27-33.
- Nelkin, B.D., Rosenfeld, K.I., de Bustros, A., Leong, S.S., Roos, B.A. and Baylin, S.B. (1984) Structure and expression of a gene encoding human calcitonin and calcitonin gene related peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, **123**, 648-655.
- Nickel, J.C., Downey, J., Young, I. and Boag, S. (1999) Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU Int*, **84**, 976-981.
- Nishimura, K., Nonomura, N., Satoh, E., Harada, Y., Nakayama, M., Tokizane, T., Fukui, T., Ono, Y., Inoue, H., Shin, M., Tsujimoto, Y., Takayama, H., Aozasa, K. and Okuyama, A. (2001) Potential mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen-independent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1739-1746.
- O'Connor, O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., Shanahan, F. (2004) The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, **201**, 162-80
- Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F.K. and Dale, G.E. (2000) Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol*, **296**, 341-349.
- Oefner, C., Roques, B. P., Fournie-Zaluski, M. C., Dale, G. E.(2004) Structural Analysis of Neprilysin with Various Specific and Potent Inhibitors. *Acta Crystallogr., Sect.D* 60 pp. **392** (2004)
- Papandreou, C.N., Usmani, B., Geng, Y., Bogenrieder, T., Freeman, R., Wilk, S., Finstad, C.L., Reuter, V.E., Powell, C.T., Scheinberg, D., Magill, C., Scher, H.I., Albino, A.P. and Nanus, D.M. (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in

- metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med*, **4**, 50-57.
- Peehl, D.M. and Sellers, R.G. (1998) Basic FGF, EGF, and PDGF modify TGFbeta-induction of smooth muscle cell phenotype in human prostatic stromal cells. *Prostate*, **35**, 125-134.
- Pinto, F.M., Armesto, C.P., Magraner, J., Trujillo, M., Martin, J.D. and Candenias, M.L. (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., Wang, Q., Kirley, S.D., Lin, C.W. and McDougal, W.S. (1998) Androgen responsiveness of stromal cells of the human prostate: regulation of cell proliferation and keratinocyte growth factor by androgen. *J Urol*, **160**, 1850-1855.
- Qiu, Y., Robinson, D., Pretlow, T.G. and Kung, H.J. (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.
- Renneberg, H., Albrecht, M., Kurek, R., Krause, E., Lottspeich, F., Aumueller, G. and 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.
- Renz, H., Kerzel, S. and Nockher, W.A. (2004) The role of neurotrophins in bronchial asthma: contribution of the pan-neurotrophin receptor p75. *Prog Brain Res*, **146**, 325-333.

- Ritchie, C.K., Thomas, K.G., Andrews, L.R., Tindall, D.J. and Fitzpatrick, L.A. (1997) Effects of the calcitropic peptides calcitonin and parathyroid hormone on prostate cancer growth and chemotaxis. *Prostate*, **30**, 183-187.
- Ruijter, E., van de Kaa, C., Miller, G., Ruiten, D., Debruyne, F. and Schalken, J. (1999) Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocr Rev*, **20**, 22-45.
- Ryhanen, S., Jaaskelainen, T., Saarela, J.T. and Maenpaa, P.H. (1998) Inhibition of proliferation and induction of differentiation of osteoblastic cells by a novel 1,25-dihydroxyvitamin D3 analog with an extensively modified side chain (CB1093). *J Cell Biochem*, **70**, 414-424.
- Sales, N., Dutriez, I., Maziere, B., Ottaviani, M. and Roques, B.P. (1991) Neutral endopeptidase 24.11 in rat peripheral tissues: comparative localization by 'ex vivo' and 'in vitro' autoradiography. *Regul Pept*, **33**, 209-222.
- Salido, M., Vilches, J. and Lopez, A. (2000) Neuropeptides bombesin and calcitonin induce resistance to etoposide induced apoptosis in prostate cancer cell lines. *Histol Histopathol*, **15**, 729-738.
- Salido, M., Vilches, J., Lopez, A. and Roomans, G.M. (2002) Neuropeptides bombesin and calcitonin inhibit apoptosis-related elemental changes in prostate carcinoma cell lines. *Cancer*, **94**, 368-377.
- Salido, M., Vilches, J. and Roomans, G.M. (2004) Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int*, **28**, 397-402.
- Schiebler, T.H., Histologie: Histologie und mikroskopische Anatomie unter Berücksichtigung der Histophysiologie; Junqueira, L.C., Carneiro, J.; 4. Auflage (1996), 640-641

- Schifter, S. and Johnsen, A.H. (1994) Calcitonin gene-related peptide in medullary thyroid carcinomas: characterization of molecular forms including the amidated C-terminus. *Peptides*, **15**, 897-905.
- Scholzen, T.E., Steinhoff, M., Bonaccorsi, P., Klein, R., Amadesi, S., Geppetti, P., Lu, B., Gerard, N.P., Olerud, J.E., Luger, T.A., Bunnett, N.W., Grady, E.F., Armstrong, C.A. and Ansel, J.C. (2001) Neutral endopeptidase terminates substance P-induced inflammation in allergic contact dermatitis. *J Immunol*, **166**, 1285-1291.
- Scholzen, T.E., Luger, T.A. (2004) Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme - key enzymes terminating the action of neuroendocrine mediators. *Exp Dermatol*, **13** Suppl 4, 22-6
- Schulz, J., Dettlaff, S., Fritzsche, U., Harms, U., Schiebel, H., Derer, W., Fusenig, N.E., Hulsén, A. and Böhm, M. (1994) The amido black assay: a simple and quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation, and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (HaCaT) and other cell types growing adherently or in suspension. *J Immunol Methods*, **167**, 1-13.
- Sehgal, I., Powers, S., Huntley, B., Powis, G., Pittelkow, M. and Maihle, N.J. (1994) Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4673-4677.
- Seymour, A.A., Norman, J.A., Asaad, M.M., Fennell, S.A., Abboa-Offei, B., Little, D.K., Kratunis, V.J., Delaney, N.G., Hunt, J.T. and Di Donato, G. (1991) Possible regulation of atrial natriuretic factor by neutral endopeptidase 24.11 and clearance receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **256**, 1002-1009.
- Shah, G.V., Rayford, W., Noble, M.J., Austenfeld, M., Weigel, J., Vamos, S. and Mebust, W.K. (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.

- Shapiro, E., Hartanto, V. and Lepor, H. (1992) Quantifying the smooth muscle content of the prostate using double-immunoenzymatic staining and color assisted image analysis. *J Urol*, **147**, 1167-1170.
- Shapiro, E., Hartanto, V., Perlman, E.J., Tang, R., Wang, B. and Lepor, H. (1997) Morphometric analysis of pediatric and nonhyperplastic prostate glands: evidence that BPH is not a unique stromal process. *Prostate*, **33**, 177-182.
- Shen, R., Sumitomo, M., Dai, J., Hardy, D.O., Navarro, D., Usmani, B., Papandreou, C.N., Hersh, L.B., Shipp, M.A., Freedman, L.P. and Nanus, D.M. (2000) Identification and characterization of two androgen response regions in the human neutral endopeptidase gene. *Mol Cell Endocrinol*, **170**, 131-142.
- Shipp, M.A., Tarr, G.E., Chen, C.Y., Switzer, S.N., Hersh, L.B., Stein, H., Sunday, M.E. and Reinherz, E.L. (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.
- Silva, O.L., Becker, K.L., Primack, A., Doppman, J. and Snider, R.H. (1974) Ectopic secretion of calcitonin by oat-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **290**, 1122-1124.
- Spiotto, M.T. and Chung, T.D. (2000a) STAT3 mediates IL-6-induced growth inhibition in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate*, **42**, 88-98.
- Spiotto, M.T. and Chung, T.D. (2000b) STAT3 mediates IL-6-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *Prostate*, **42**, 186-195.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H. and Paulson, D.F. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*, **21**, 274-281.
- Sturiale, S., Barbara, G., Qiu, B., Figini, M., Geppetti, P., Gerard, N., Gerard, C., Grady, E.F., Bunnett, N.W. and Collins, S.M. (1999) Neutral endopeptidase

- (EC 3.4.24.11) terminates colitis by degrading substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11653-11658.
- Sumitomo, M., Shen, R., Goldberg, J.S., Dai, J., Navarro, D. and Nanus, D.M. (2000a) Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuropeptide-induced protein kinase C delta degradation. *Cancer Res*, **60**, 6590-6596.
- Sumitomo, M., Shen, R., Walburg, M., Dai, J., Geng, Y., Navarro, D., Boileau, G., Papandreou, C.N., Giancotti, F.G., Knudsen, B. and Nanus, D.M. (2000b) Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest*, **106**, 1399-1407.
- Taketa, S., Nishi, N., Takasuga, H., Okutani, T., Takenaka, I. and Wada, F. (1990) Differences in growth requirements between epithelial and stromal cells derived from rat ventral prostate in serum-free primary culture. *Prostate*, **17**, 207-218.
- Tapazoglou, E., Subramanian, M.G., Al-Sarraf, M., Kresge, C. and Decker, D.A. (1986) High-dose ketoconazole therapy in patients with metastatic prostate cancer. *Am J Clin Oncol*, **9**, 369-375.
- Usmani, B.A., Harden, B., Maitland, N.J. and Turner, A.J. (2002) Differential expression of neutral endopeptidase-24.11 (neprilysin) and endothelin-converting enzyme in human prostate cancer cell lines. *Clin Sci (Lond)*, **103 Suppl 1**, 314S-317S.
- Usmani, B.A., Shen, R., Janeczko, M., Papandreou, C.N., Lee, W.H., Nelson, W.G., Nelson, J.B. and Nanus, D.M. (2000) Methylation of the neutral endopeptidase gene promoter in human prostate cancers. *Clin Cancer Res*, **6**, 1664-1670.
- Ventura, S., Lau, W.A., Buljubasich, S. and Pennefather, J.N. (2000a) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits contractions of the prostatic stroma of the rat but not the guinea-pig. *Regul Pept*, **91**, 63-73.

- Ventura, S., Lau, W.A., Buljubasich, S. and Pennefather, J.N. (2000b) Species differences in the actions of sensory neuropeptides on contractility of the smooth muscle of the rat and guinea-pig prostate. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **27**, 917-921.
- Virchow, J.C., Julius, P., Lommatzsch, M., Luttmann, W., Renz, H. and Braun, A. (1998) Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med*, **158**, 2002-2005.
- Vlahovic, P. and Stefanovic, V. (1998) Kidney ectopeptidases. Structure, functions and clinical significance. *Pathol Biol (Paris)*, **46**, 779-786.
- Willard, S.T. and Frawley, L.S. (1999) TGF- $\alpha$  exerts biphasic effects on estrogen- and phytoestrogen-mediated gene expression in breast cancer cells. *Endocrine*, **11**, 69-74.
- Xue, Y., Smedts, F., Verhofstad, A., Debruyne, F., de la Rosette, J. and Schalken, J. (1998) Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate Suppl*, **8**, 62-73.
- Yu, D.S., Hsieh, D.S., Chen, H.I. and Chang, S.Y. (2001) The expression of neuropeptides in hyperplastic and malignant prostate tissue and its possible clinical implications. *J Urol*, **166**, 871-875.
- Zappulla, J.P. and DesGroseillers, L. (2001) Neutral endopeptidase is expressed on the follicular granulosa cells of rabbit ovaries. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **129**, 863-870.
- Zelivianski, S., Verni, M., Moore, C., Kondrikov, D., Taylor, R. and Lin, M.F. (2001) Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype. *Biochim Biophys Acta*, **1539**, 28-43.

Zhang, R. and DeGroot, L.J. (1997) A monoclonal antibody against rat calcitonin inhibits the growth of a rat medullary thyroid carcinoma cell line in vitro. *Endocrinology*, **138**, 1697-1703.

Zhao, G.Q., Holterhus, P.M., Dammshäuser, I., Hoffbauer, G. and Aumüller, G. (1992) Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate*, **21**, 183-199.



## VIII. Anhang

1. Lebenslauf
2. Akademische Lehrer
3. Danksagung
4. Ehrenwörtliche Erklärung

## 1. Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Sonja Gillen  
 Geboren am: 20. Juni 1977  
 Geburtsort: Freiburg im Breisgau  
 Adresse: Gaiglstr. 8, 80335 München  
 Telefon: +49 (0) 89 44451089  
 Mobiltelefon: + 49 (0) 177 6802659  
 E-mail Adresse: Sonja.gillen@web.de

### Schulbildung

**1983 – 1987** Wentzinger–Grundschule in Ehrenkirchen  
**1987 – 1996** Faust–Gymnasium in Staufen  
**19. 06. 1996** **Allgemeine Hochschulreife**

**1996 – 1997** **Freiwilliges Soziales Jahr** (Deutsches Rotes Kreuz, Freiburg)

### Studium der Humanmedizin

**1997 – 2002** **Studium an der Philipps Universität, Marburg**  
**22.03. 1999** Ärztliche Vorprüfung  
**23. 03. 2000** 1. Abschnitt ärztliche Prüfung  
**09. 09. 2002** 2. Abschnitt ärztliche Prüfung  
**2002 – 2003** **Studium an der Ludwigs-Maximilians-Universität, München (Praktisches Jahr)**  
 Kantonsspital Luzern, Univ. Zürich, CH,  
 Royal Lancaster Infirmary, Univ. Manchester, UK  
 Städt. KH Neuperlach, München

**05. 11. 2003** 3. Abschnitt ärztliche Prüfung (Gesamtnote 1,6)  
**01.10.2004** Approbation  
**Seit Feb. 2004** Tätigkeit am Klinikum Rechts der Isar der TU München, Abteilung Chirurgie.

## 2. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. R. Arnold	Prof. Dr. E. Lammel
Prof. Dr. G. Aumüller	Prof. Dr. R. E. Lang
Prof. Dr. P.J. Barth	Prof. Dr. H. Lennartz
Prof. Dr. H.-D. Basler	Prof. Dr. B. Maisch
Prof. Dr. E. Baum	Prof. Dr. R. Moll
PD Dr. J Beyer	Prof. Dr. A. Neubauer
Prof. Dr. Y. Cetin	Prof. Dr. W.H. Oertel
PD Dr. H. Christiansen	Prof. Dr. Dr. H. Remschmid
Prof. Dr. Feuser	Prof. Dr. K.-H. Röhm
Prof. Dr. A. Geus	Prof. Dr. M. Rothmund
Prof. Dr. L. Gotzen	Prof. Dr. D.-O. Schachtschnabel
Prof. Dr. P. Griss	Prof. Dr. H. Schäfer
Prof. Dr. A. Habermehl	Prof. Dr. K.-D. Schulz
Prof. Dr. R. Happle	Prof. Dr. J. Seitz
PD Dr. A. Hellinger	PD Dr. H.-W. Vohland
PD Dr. L. Hesse	Prof. Dr. E. Weihe
Prof. Dr. R. Hofmann	Prof. Dr. J. A. Werner
Prof. H. F. Kern	PD Dr. R. Westermann
Prof. Dr. H.-D. Klenk	Prof. Dr. P. von Wichert
Prof. Dr. J. Kohlmann	Prof. Dr. Zielke
Prof. Dr. J.-C. Krieg	

### 3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Aumüller für die Bereitstellung des Themas, die freundliche und gute Betreuung meiner Arbeit, viele wertvolle Anregungen und die hilfsbereite Unterstützung jederzeit.

Für hilfreiche, konstruktive Vorschläge und die ununterbrochene freundliche Hilfe, die gute Stimmung und viel Freude bei den Arbeiten möchte ich mich bei Herrn Dr. Martin Albrecht bedanken.

Einen ganz besonderen Dank an Wega Gutschank für die großartige Unterstützung in der Zellkultur und die liebevolle Versorgung meiner Zellen.

Frau Andrea Dersch für die Hilfe beim Blotten gebührt mein großer Dank.

Herrn Dr. Stief für die freundliche Unterstützung und Messung der Calcitoninkonzentrationen.

Frau Irmgard Dammshäuser und für die Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Danken möchte ich weiterhin allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, für die stets freundliche, unkomplizierte und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Vielen Dank an die Marburger mit denen ich fünf tolle Jahre verbringen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Christine und Wolfgang Gillen, die mir mit so viel Liebe und Unterstützung mein Studium und noch vieles mehr ermöglicht haben. Meiner Oma Else Freiberg, die ein so bewundernswerter Mensch ist, und meinen beiden lieben Brüdern Tobias und Nicolas.

Danke Stefan.

#### **4. Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Hormonelle Regulation der Enzymaktivität, Proteinexpression und Bedeutung der Neutralen Endopeptidase in Gewebezelllinien der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms“

im 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- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

München, Januar 2005

Sonja Gillen