

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

**Identifizierung von Membranproteinen
in der apikalen Plasmamembran und in Aposomen
der Koagulationsdrüse der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
(Dr. oec. troph.)

am Fachbereich der Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen
vorgelegt von

Heidi Post
aus Alsfeld-Eifa

Marburg 2003

Dissertation am Fachbereich
der Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Köhler

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Hans Brückner

1. Gutachter: Prof. Dr. Edgar Weigand

2. Gutachterin: Dr. Beate Wilhelm

Prüfer: Prof. Dr. Jürgen Seitz

Prüferin: Prof. Dr. Monika Neuhäuser-Berthold

Prüfer: Prof. Dr. Sven Schubert

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2004

Inhaltsübersicht.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Koagulationsdrüse (KD) der Ratte als Modell der apokrinen Sekretion.....	1
1.2 Alternative Sekretionsmechanismen im männlichen Reproduktions- trakt - Sekretionsmechanismen der humanen Prostata	9
1.3 Die apokrine Sekretion in weiteren Spezies und Geweben.....	18
1.4 Ektozytose.....	20
1.5 Caveolin, Caveolae und Lipid Rafts - funktionelle Einheiten der Plasmamembran.....	21
1.6 Zellkultursysteme der Rattenkoagulationsdrüse	23
1.7 Ziel der Arbeit.....	24
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Material und Versuchstiere.....	26
2.2 Methoden	27
3. ERGEBNISSE	53
3.1 Identifizierung von Proteinen der apikalen Koagulationsdrüsen- epithelzell- und der Aposomenmembran der Ratte.....	53
3.2 Untersuchungen zur Alkalischen Phosphatase (AP).....	69
3.3 Untersuchungen zur Neutralen Endopeptidase (NEP).....	76
3.4 Isolierung apikaler Plasmamembranproteine aus primären KDE- Zellen	77
3.5 Caveolin und apokrine Sekretion	81
4 DISKUSSION	84
4.1 Untersuchungen zur Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase (PMCA) in der KD sowie im KD-Sekret und in KDE-Zellen der Ratte	85
4.2 Die Alkalische Phosphatase (AP) in der KD.....	99

4.3	Die Neutrale Endopeptidase (NEP) in der KD.....	104
4.4	Identifizierung weiterer apikaler Proteine	105
4.5	Caveolin-1 und die apokrine Sekretion/Ektozytose	107
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6.	LITERATUR	112

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Koagulationsdrüse (KD) der Ratte als Modell der apokrinen Sekretion	1
1.1.1	Morphologie	1
1.1.2	Sekretionsmechanismen der KD	2
1.1.2.1	Die merokrine Sekretion	2
1.1.2.2	Die apokrine Sekretion - ein alternativer Exportmechanismus für Proteine	2
1.1.3	Das Koagulationsdrüsensekret (KD-Sekret)	3
1.1.4	Der Aufbau der Aposomenmembran und der apikalen Plasmamembran der Koagulationsdrüsenepithelzellen	7
1.1.5	Die hormonelle Regulation der apokrinen Sekretion der KD	8
1.2	Alternative Sekretionsmechanismen im männlichen Reproduktions- trakt - Sekretionsmechanismen der humanen Prostata	9
1.2.1	Sekretorische Proteine.....	9
1.2.2	Die Prostatosomen – Proteine der Prostatosomenmembran.....	9
1.3	Die apokrine Sekretion in weiteren Spezies und Geweben.....	18
1.4	Ektozytose.....	20
1.5	Caveolin, Caveolae und Lipid Rafts - funktionelle Einheiten der Plasmamembran	21
1.6	Zellkultursysteme der Rattenkoagulationsdrüse	23
1.7	Ziel der Arbeit.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Material und Versuchstiere.....	26
2.1.1	Reagenzien und Versuchsmaterial	26
2.1.2	Primärantikörper	26
2.1.3	Versuchstiere	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkulturmethoden	27
2.2.1.1	Isolierung und Kultivierung primärer Koagulationsdrüsen- epithelzellen (KDE-Zellen) der Ratte	27
2.2.1.2	Fraktioniertes Passagieren der KDE-Zellen ab Passage 1	28
2.2.1.3	Herstellung eines 3T3-Feederlayers.....	28

2.2.1.4	Stimulation von KDE-Zellen mit Dihydrotestosteron (DHT)	29
2.2.2	Biochemische Methoden.....	30
2.2.2.1	Entnahme von KD und Gewinnung von KD-Sekret	30
2.2.2.2	Isolierung von Membranen aus KDE-Zellen und KD-Gewebe.....	30
2.2.2.3	Isolierung apikaler Plasmamembranen.....	31
2.2.2.4	Dot Blot	34
2.2.2.5	Isolierung apikaler Membranproteine durch streptavidin-gekoppelte Dynabeads	35
2.2.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	35
2.2.2.7	Bestimmung der Mg ²⁺ -abhängigen und -unabhängigen Ca ²⁺ -ATPase-Aktivität nach Sikdar et al. (1991)	36
2.2.2.8	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität.....	37
2.2.2.9	Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase mittels NBT/BCIP	38
2.2.2.10	Bestimmung der Aktivität der Neutralen Endopeptidase (NEP) nach Albrecht et al. (2002)	39
2.2.2.11	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)	39
2.2.2.12	Coomassiefärbung von Proteingelen.....	41
2.2.2.13	Silbernitratfärbung von Proteingelen.....	41
2.2.2.14	Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western Blot)	42
2.2.2.15	Transfer von Proteinen auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran mit anschließender N-terminaler Sequenzierung.....	44
2.2.3	Morphologische Methoden.....	44
2.2.3.1	Herstellung von Semidünnschnitten	44
2.2.3.2	Herstellung von Kryostatschnitten	45
2.2.3.3	Indirekte Immunfluoreszenz an primären KDE-Zellen und Kryostatschnitten der KD	45
2.2.3.4	Doppelfluoreszenz-Markierung von KDE-Zellen	46
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	47
2.2.4.1	RNA-Isolierung mit TRIZOL	47
2.2.4.2	Spektrometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	48

2.2.4.3	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)....	48
2.2.4.4	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten.....	51
2.2.4.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	51
3.	ERGEBNISSE	53
3.1	Identifizierung von Proteinen der apikalen Koagulationsdrüsen- epithelzell- und der Aposomenmembran der Ratte.....	53
3.1.1	Untersuchungen zur Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase (PMCA)	53
3.1.1.1	Nachweis der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase in Mikrosomen aus der KD und primären KDE-Zellen	53
3.1.1.2	Expression der PMCA-Isoformen 1 und 4 in primären KDE- Zellen und in der KD der Ratte	54
3.1.2	Identifizierung der PMCA-Isoformen 1 und 4 in Mikrosomen primärer KDE-Zellen bzw. KD-Gewebe der Ratte durch Western Blot-Analyse.....	55
3.1.3	Lokalisation der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase in der KD der Ratte und auf KDE-Zellen.....	56
3.1.4	PMCA1 und Occludin sind in den primären KDE-Zellen der Ratte ko-lokalisiert.....	58
3.1.5	Mg ²⁺ -abhängige und -unabhängige Ca ²⁺ -ATPase-Aktivität in Mikrosomen von KDE-Zellen und KD-Gewebe bzw. im KD-Sekret	61
3.1.6	Die Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase-Aktivität im KD-Sekret liegt membrangebunden vor.....	63
3.1.7	Einfluss von Androgenen auf die Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase in der KD der Ratte	64
3.1.7.1	Lokalisation der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase auf Semidünnschnitten der KD der Ratte 14 Tage nach Kastration.....	64
3.1.7.2	Einfluss von DHT auf die Expression bzw. Aktivität der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase	65
3.2	Untersuchungen zur Alkalischen Phosphatase (AP).....	69
3.2.1	Messung der AP-Aktivität in Mikrosomen von KD, primären KDE- Zellen und in KD-Sekret.....	69

3.2.2	AP als Bestandteil der Aposomenmembran und als lösliche Form im Sekret.....	69
3.2.3	Histochemischer Nachweis der AP auf primären KDE-Zellen und Kryostatschnitten der KD	70
3.2.4	Temperaturabhängigkeit der Alkalischen Phosphatase-Aktivität aus KD-Gewebe und KD-Sekret	72
3.2.5	Nachweis der Expression der AP-mRNA in der KD bzw. in KDE-Zellen der Ratte	73
3.2.6	Sequenzanalyse	73
3.2.7	Einfluss von DHT auf die Expression und Aktivität der Alkalischen Phosphatase in primären KDE-Zellen.....	74
3.3	Untersuchungen zur Neutralen Endopeptidase (NEP).....	76
3.4	Isolierung apikaler Plasmamembranproteine aus primären KDE-Zellen	77
3.4.1	Anreicherung apikaler Plasmamembranen durch differentielle Zentrifugation mit anschließender Auftrennung über einen Saccharosegradienten	77
3.4.2	Präparation apikaler Plasmamembranen bzw. apikaler Plasmamembranproteine anhand der MgCl ₂ -Präzipitationsmethode	78
3.5	Caveolin und apokrine Sekretion	81
3.5.1	Caveolin-1 β wird in der KD und den KDE-Zellen der Ratte transkribiert	81
3.5.2	Caveolin-Nachweis in Mikrosomen der KD, in primären KDE-Zellen sowie im KD-Sekret der Ratte	81
3.5.3	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Caveolin auf KD-Gewebe und in KDE-Zellen der Ratte.....	82
4	DISKUSSION	84
4.1	Untersuchungen zur Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase (PMCA) in der KD sowie im KD-Sekret und in KDE-Zellen der Ratte	85
4.1.1	Die Gen- und Protein-Expression einer Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase in der KD und in KDE-Zellen der Ratte	85
4.1.2	Die subzelluläre Lokalisation der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase (PMCA)	91

4.1.3	PMCA im KD-Sekret	93
4.1.4	Einfluss von Androgenen/Androgenentzug auf die PMCA in der KD der Ratte und der KDE-Zellen.....	95
4.1.5	Mögliche Funktion von PMCA in der apikalen KD-Membran und den Aposomen.....	97
4.2	Die Alkalische Phosphatase (AP) in der KD.....	99
4.2.1	Nachweis der AP in KD und KDE-Zellen	99
4.2.2	Bestimmung der Isoform der AP in KD und KDE-Zellen.....	100
4.2.3	Die AP im KD-Sekret	101
4.2.4	Einfluss von DHT auf die mRNA-Transkription und die Enzymaktivität der AP	101
4.2.5	Mögliche Funktion der AP in der apikalen KD-Membran bzw. in den Aposomen.....	103
4.3	Die Neutrale Endopeptidase (NEP) in der KD.....	104
4.4	Identifizierung weiterer apikaler Proteine	105
4.5	Caveolin-1 und die apokrine Sekretion/Ektozytose	107
4.5.1	Lokalisation von Caveolin-1 in KDE-Zellen und in KD-Gewebe	107
4.5.2	Mögliche Funktionen Caveolins	108
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6.	LITERATUR	112

Abb. 1:	Der Prostata-Komplex der Ratte (modifiziert nach Hayashi et al., 1991).....	1
Abb. 2:	Schema der Sekretion merokriner und apokriner Proteine in der KD der Ratte.	5
Abb. 3:	Modell der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase (PMCA)	13
Abb. 4:	Membrantopologie der Alkalischen Phosphatase (modifiziert nach Zimmermann 1996)	15
Abb. 5:	Schematische Darstellung einer Caveola.....	22
Abb. 6:	Isolierung von Mikrosomen aus KD-Gewebe und KDE-Zellen nach Sikdar et al., 1991	31
Abb. 7:	Präparation biotinylierter apikaler Plasmamembranen nach Methode A und B	33
Abb. 8:	Schematische Darstellung des Blotaufbaus zum Proteintransfer.	42
Abb. 9:	Western Blot-Analyse der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase in Mikrosomen aus KD- Gewebe bzw. primären KDE-Zellen.	54
Abb. 10:	Nachweis der Expression der PMCA-Isoformen 1 und 4 in KD-Gewebe und KDE-Zellen durch RT-PCR.	55
Abb. 11:	Western Blot-Analyse der PMCA-Isoformen 1 und 4 in Mikrosomen aus KD-Gewebe bzw. primären KDE-Zellen.....	55
Abb. 12:	Nachweis der PMCA auf Kryostatschnitten von KD-Gewebe der Ratte mittels indirekter Immunfluoreszenz.	56
Abb. 13:	Nachweis der PMCA auf Semidünnschnitten von KD-Gewebe der Ratte mittels indirekter Immunfluoreszenz	57
Abb. 14:	Nachweis der PMCA auf primären KDE-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.	58
Abb. 15:	Untersuchung der Ko-Lokalisation von PMCA1 und Occludin auf primären KDE-Zellen..	59
Abb. 16:	Vergleich der Ko-Lokalisation von PMCA1 und Occludin auf primären KDE-Zellen in verschiedenen Bereichen der KDE-Zellen durch Laserscanning-Mikroskopie..	59
Abb. 17:	Ko-Lokalisation von PMCA1 und Occludin auf primären KDE-Zellen in verschiedenen Ebenen der KDE-Zellen.....	60
Abb. 18:	Einfluss der Ca ²⁺ -Kanal Inhibitoren Nifedipin, TFP und Verapamil sowie des Modulators Calmodulin auf die Aktivität der Mg ²⁺ -abhängigen bzw. -unabhängigen Ca ²⁺ -ATPase- Aktivität in Mikrosomen primärer KDE-Zellen, KD-Gewebe und in ausgetropftem KD- Sekret.	62
Abb. 19:	Die Aktivität der Mg ²⁺ -abhängigen bzw. -unabhängigen Ca ²⁺ -ATPase im KD Sekret nach Ultrazentrifugation.....	63
Abb. 20:	Lokalisation von PMCA1 bzw. PMCA4 auf Semidünnschnitten der KD der Ratte 14 Tage nach Kastration.	64
Abb. 21:	Nachweis des Androgenrezeptors in primären KDE-Zellen der Ratte mittels RT-PCR..	65
Abb. 22:	Analyse der Expression der PMCA1-mRNA in primären KDE-Zellen der Ratte nach 48- stündiger Stimulation mit DHT mittels semi-quantitativer-PCR.	66
Abb. 23:	Analyse der Expression der PMCA4-mRNA in primären KDE-Zellen der Ratte nach 48- stündiger Stimulation mit DHT mittels semi-quantitativer-PCR..	67
Abb. 24:	Mg ²⁺ -abhängige und -unabhängige Ca ²⁺ -ATPase-Aktivität in Mikrosomen primärer KDE- Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10 ⁻⁸ bis 10 ⁻⁶ M DHT..	68
Abb. 25:	Messung der AP-Aktivität in Pellet und Überstand des KD-Sekretes nach Ultrazentrifugation bei 100.000 x g.....	70

Abb. 26: Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase auf primären KDE-Zellen. 71

Abb. 27: Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase auf KD-Kryo-
Gewebeschnitten. 71

Abb. 28: Temperaturempfindlichkeit der Alkalischen Phosphatase-Aktivität aus KD-Mikrosomen
und KD-Sekret nach Hitzebehandlung. 72

Abb. 29: Nachweis der AP-mRNA in KD-Gewebe und primären KDE-Zellen mittels RT-PCR. 73

Abb. 30: Analyse der Expression der AP-mRNA in primären KDE-Zellen der Ratte nach 48-stün-
diger Stimulation mit DHT mittels semi-quantitativer-PCR. 74

Abb. 31: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Mikrosomen aus primären KDE-Zellen nach
Stimulation mit DHT. 75

Abb. 32: Nachweis der NEP-mRNA in KD und KDE-Zellen der Ratte mittels RT-PCR. 76

Abb. 33: Anreicherung apikaler Plasmamembranproteine primärer KDE-Zellen durch differentielle
Zentrifugation. 77

Abb. 34: Anreicherung apikaler Plasmamembranproteine mittels der MgCl₂-Methode. 79

Abb. 35: Affinitätsreinigung von Biotin-markierten apikalen Membranproteinen primärer KDE-
Zellen mit Dynabeads M-280 Streptavidin. 80

Abb. 36: Untersuchung der Transkription der Caveolin-1 Isoformen α und β in KD-Gewebe und
primären KDE-Zellen der Ratte mittels RT-PCR. 81

Abb. 37: Nachweis von Caveolin in Mikrosomen aus KD und KDE-Zellen sowie in KD-Sekret. 82

Abb. 38: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Caveolin auf Kryostat-schnitten von
KD-Gewebe. 82

Abb. 39: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Caveolin in den KDE-Zellen der
Ratte. 83

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxysulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CAH II	Carboanhydrase II
cDNA	komplementäre DANN
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Modifiziertes Eagle-Medium nach Dulbecco
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dP	dorsale Prostata
DP1	dorsales Prostata Protein1
DTE	Dithioerytriol
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epithelialer Wachstumsfaktor (epithelial growth factor)
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EZR	Extrazellulärraum
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glyzeraldehydphosphat-Dehydrogenase
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HBSS	Physiologische Salzlösung nach Hank
IG	Immunglobulin
IZR	Intrazellulärraum
KD	Koagulationsdrüse
kDa	Kilodalton
KDE-Zellen	Koagulationsdrüsenepithelzellen
LKN-Typ	Leber-Knochen-Niere-Isoform der Alkalischen Phosphatase
MCDB 153-Medium	Medium für die Kultivierung von KDE-Zellen
MEM-Medium	Modifiziertes Eagles-Medium
MG	Molekulargewicht
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MVDP	Maus <i>vas deferens</i> protein
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NEP	Neutrale Endopeptidase
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PMCA1	Isoform 1 der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PMCA4	Isoform 4 der Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA	p-Nitroanilid
pNPP	para-Nitrophenyl-Phosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	sarkoplasmatische/endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SRP	Signalerkennungspartikel (signal recognition particle)
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichlor-Essigsäure

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFP	Trifluorperazin
TGase	sekretorische Transglutaminase
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
vP	ventrale Prostata

Tab. 1:	Die sekretorischen Proteine des KD-Sekretes	4
Tab. 2:	Ausgewählte Proteine der Prostatomenmembran bzw. mit der Prostatomenmembran assoziierte Proteine	11
Tab. 3:	Aminosäure(AS)-Sequenzhomologie zwischen den humanen AP-Isoformen	16
Tab. 4:	Apokrin sezernierende Gewebe	19
Tab. 5:	Zusammensetzung der für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendeten Gellösungen	40
Tab. 6:	In der Western Blot-Analyse verwendete Antikörper und ihre Gebrauchskonzentra- tionen	43
Tab. 7:	In der Immunfluoreszenz verwendete Primär- und Sekundär-AK mit den entsprechen- den Verdünnungen	46
Tab. 8:	In der PCR verwendete Primerpaare	50
Tab. 9:	Mg ²⁺ -abhängige bzw. -unabhängige Ca ²⁺ -ATPase-Aktivität (µmol Pi/mg Protein/h) in Mikrosomenfraktionen primärer KDE-Zellen und KD-Gewebes bzw. in ausgetropftem KD-Sekret.	61
Tab. 10:	Spezifische AP-Aktivität in Mikrosomen aus KD-Gewebe, KD-Zellen und in KD-Sekret. Die Aktivität wurde mit pNPP als Substrat ermittelt.	69

1 EINLEITUNG

1.1 Die Koagulationsdrüse (KD) der Ratte als Modell der apokrinen Sekretion

1.1.1 Morphologie

Die Prostata der Ratte setzt sich aus drei morphologisch unterschiedlichen Anteilen zusammen, die nach ihrer Lage zur Harnblase als ventrale, laterale und dorsale Prostata bezeichnet werden. Die verschiedenen Prostatalappen synthetisieren androgenabhängig eine Vielzahl von Proteinen, die zur Abgabe in das Seminalplasma bestimmt sind. Die Koagulationsdrüse (Synonym: anteriore Prostata) wird entwicklungs geschichtlich ebenfalls zum Prostatakomplex gezählt, da sie sich wie die anderen Prostatalappen aus den Knospen des *Sinus urogenitalis* entwickelt (Narbaitz, 1974). Die anteriore Prostata ist eine paarige Drüse, deren linker und rechter Lappen jeweils der konkaven Seite der Bläschendrüse anliegt. Jeder der beiden Drüsenlappen wird von einem Hauptgang gebildet, der sich in 40-50 Äste mit tubulären bis tubulär-alveolären Endstücken aufzweigt und von einem stark gefalteten einschichtigen Epithel ausgekleidet wird (Hayashi et al., 1991).

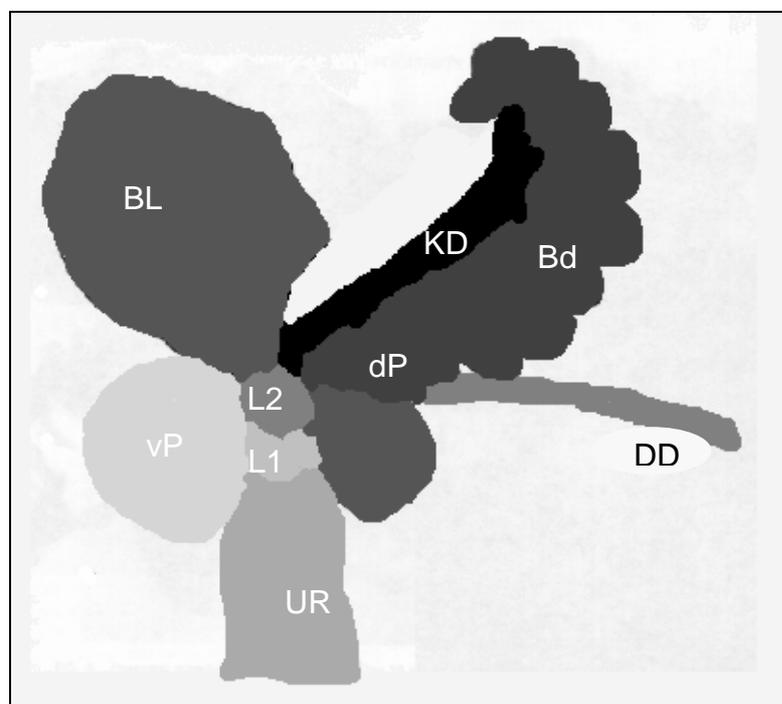


Abb. 1: Der Prostata-Komplex der Ratte (modifiziert nach Hayashi et al., 1991). BL: Harnblase, Bd: Bläschendrüse, KD: Koagulationsdrüse, vP: ventrale Prostata, dP: dorsale Prostata, L1/L2: laterale Prostata 1 und 2, UR: Urethra, DD: *Ductus deferens*

Koagulationsdrüsenepithelzellen besitzen morphologische Besonderheiten: große basal liegende Nuklei, ein endoplasmatisches Retikulum (ER) mit extrem weitlumigen Zisternen, einen gut ausgebildeten Golgi-Apparat, wenige Sekretvesikel und zahlreiche Aposomen, die sich wahrscheinlich aus Mikrovilli abschnüren (Aumüller & Adler, 1979; Aumüller & Seitz, 1990).

1.1.2 Sekretionsmechanismen der KD

Die sekretorischen Proteine der KD der Ratte werden über zwei unterschiedliche Sekretionsmechanismen parallel abgegeben: (1) merokrin, (2) apokrin.

1.1.2.1 Die merokrine Sekretion

Der klassische Mechanismus, durch den sekretorische Proteine exportiert werden, ist die merokrine Sekretion. Bei der Translation der mRNA an einem Ribosom wird ein hydrophobes N-terminales Signalpeptid gebildet, so dass das entstandene Protein an einen Signalerkennungspartikel (SRP, signal recognition particle) binden kann. Durch das Andocken an einen SRP-Rezeptor erfolgt die Translokation der Proteine in das Lumen des ER. An die meisten sekretorischen Proteine werden ko-translational N-Glykane gekoppelt. Auf dem Weg durch ER und Golgi-Apparat findet die weitere Prozessierung der Glykoproteine statt, z.B. Modifizierung der Zuckerreste, O-Glykosylierung und/oder posttranslationale Proteolyse. Nach Abschluss der Modifikationen werden die Proteine über Exozytose am apikalen Zellpol ausgeschleust (Palade, 1975).

1.1.2.2 Die apokrine Sekretion - ein alternativer Exportmechanismus für Proteine

Der Begriff der apokrinen Sekretion wurde erstmals von Schiefferdecker 1922 zur Beschreibung der Abgabe von Sekret durch Abschnürung von zytoplasmahaltigen Blasen am apikalen Zellpol verwendet. Neben der KD konnten auch in der dorsalen Prostata sowie im *Vas deferens* apokrin sezernierte Proteine identifiziert werden (Bartlett et al., 1984; Seitz et al., 1990; Manin et al., 1995). Zusätzlich wurde die apokrine Sekretion als morphologisches Phänomen vorwiegend in Drüsen mit reproduktiver Bedeutung, aber auch in apokrinen Schweißdrüsen und der laktierenden Milchdrüse beobachtet (Schaumburg-Lever & Lever, 1975; Kurosomi et al., 1984).

Apokrin sezernierte Proteine werden ohne hydrophobes N-terminales Signalpeptid an Polyribosomen im Zytoplasma translatiert. Sie können daher nicht in den klassischen merokrinen Sekretionsweg über ER, Golgi-Apparat mit anschließender Exozytose eintreten. Über einen bislang unbekanntem Mechanismus werden die Proteine in apokrinen Blasen (Aposomen), die von der apikalen Plasmamembran wahrscheinlich aus Mikrovilli gebildet werden, von der Zelle abgegeben. Bei der Abschnürung der Blasen ist vermutlich das Zytoskelett beteiligt (Aumüller & Adler, 1979; Aumüller et al., 1999). Proteine, die dem apokrinen Weg folgen, konnten durch Immunelektronenmikroskopie ausschließlich im Zytoplasma und in Aposomen, nicht aber im ER oder Golgi nachgewiesen werden. Gemeinsam ist allen apokrin sezernierten Proteinen, dass sie N-terminal blockiert sind (Aumüller & Seitz, 1990; Seitz et al., 1991; Manin et al., 1995; Wilhelm et al., 1998; Groos et al., 1999).

Neben den apokrinen Proteinen der KD konnten diese Charakteristika ebenfalls bei sekretorischen Proteinen anderer Organe mit bislang unbekanntem Sekretionsweg gefunden werden. Dazu gehören z.B. Interleukin 1, Parathymosin, Prothymosin, α 4-Thymosin und verschiedenen Transglutaminasen (Muesch et al., 1990).

1.1.3 *Das Koagulationsdrüsensekret (KD-Sekret)*

Das Sekret der KD setzt sich aus Proteinen des merokrinen und apokrinen Exportweges zusammen. Bislang wurden 5 Proteine identifiziert: ein merokrin exportiertes Protein (IgG bindendes Protein: 115 kDa; Wilhelm et al., 2002), zwei apokrin exportierte Proteine (TGase: 65 kDa, Seitz et al., 1990; Carboanhydrase II: 29 kDa, Wilhelm et al., 1996) sowie Albumin (66 kDa, Wilhelm et al., 1999). Esposito et al. (2001) beschrieben zusätzlich ein Kinesin-ähnliches Protein von 115 bzw. 120 kDa im KD-Sekret. Ob dieses Protein ebenfalls wie das IgG bindende 115 K Protein merokrin sezerniert wird, ist noch ungeklärt (Tab.1).

Tab. 1: Die sekretorischen Proteine des KD-Sekretes

Sekretorische Proteine der KD	Sekretionsweg	Molekulargewicht (kDa)	Glykosylierung	Literaturangaben
115 K IgG bindendes Protein/DP2	merokrin	115	N-Glykan	Groos et al., 1999 Wilhelm et al., 2002
Kinesin-ähnliches Protein	merokrin (?)	115 (120)		Esposito et al., 2001
TGase	apokrin	65	GPI-Anker, N-Glykan	Seitz et al., 1991 Esposito et al., 1995
Carboanhydrase II	apokrin	29	glykosyliert	Wilhelm et al., 1998
Serumalbumin	(apokrin)	66		Wilhelm et al., 1999

Immunhistochemische Untersuchungen belegen, dass die apokrin sezernierten Proteine (TGase, CAH II) ausschließlich im Zytoplasma, nicht jedoch in ER, Golgi-Apparat oder den Exozytosevesikeln lokalisiert sind. Die Lokalisation des merokrinen Proteins verhält sich genau umgekehrt (Seitz et al., 1990; Wilhelm et al., 1998; Groos et al., 1999). In Abb. 2 ist die apokrine Sekretion im Vergleich zur merokrinen, klassischen Sekretion gezeigt.

Den Proteinen des KD-Sekretes wird vor allem eine reproduktive Aufgabe zugesprochen. Die Funktion der Ca^{2+} -abhängigen TGase liegt in der Ausbildung des so genannten kopulatorischen Pfropfs (Williams-Ashman, 1984). Nach Einbringung der Spermien in den weiblichen Genitaltrakt wird die TGase zusammen mit der CAH II aus den Aposomen des Seminalplasmas freigesetzt. Die TGase katalysiert dabei die kovalente Vernetzung monomerer Proteine, die aus der Bläschendrüse in das Seminalplasma abgegeben worden waren. Durch die Ausbildung von ϵ -(γ -Glutamyl)lysinbindungen zwischen den Polypeptidketten entsteht ein dreidimensionales Netzwerk. Die Bedeutung des kopulatorischen Pfropfs wird in einer Barrierefunktion gesehen, die bei den Wasser liebenden Nagern das Auswaschen der Spermien verhindern soll. Außerdem soll durch die Pfropfbildung eine Superfecundatio unterbunden werden. Neben der KD wird die TGase auch von der ebenfalls apokrin sezernierenden dorsalen Prostata unter dem Namen dorsales Prostata Protein1 (DP1) synthetisiert (Wilson & French, 1980; Ho et al., 1992).

Die Carboanhydrase gilt i. A. als ein im Zytoplasma lokalisiertes Enzym, das nicht sezerniert wird. Wilhelm et al. (1998) konnten jedoch durch immunhistochemische

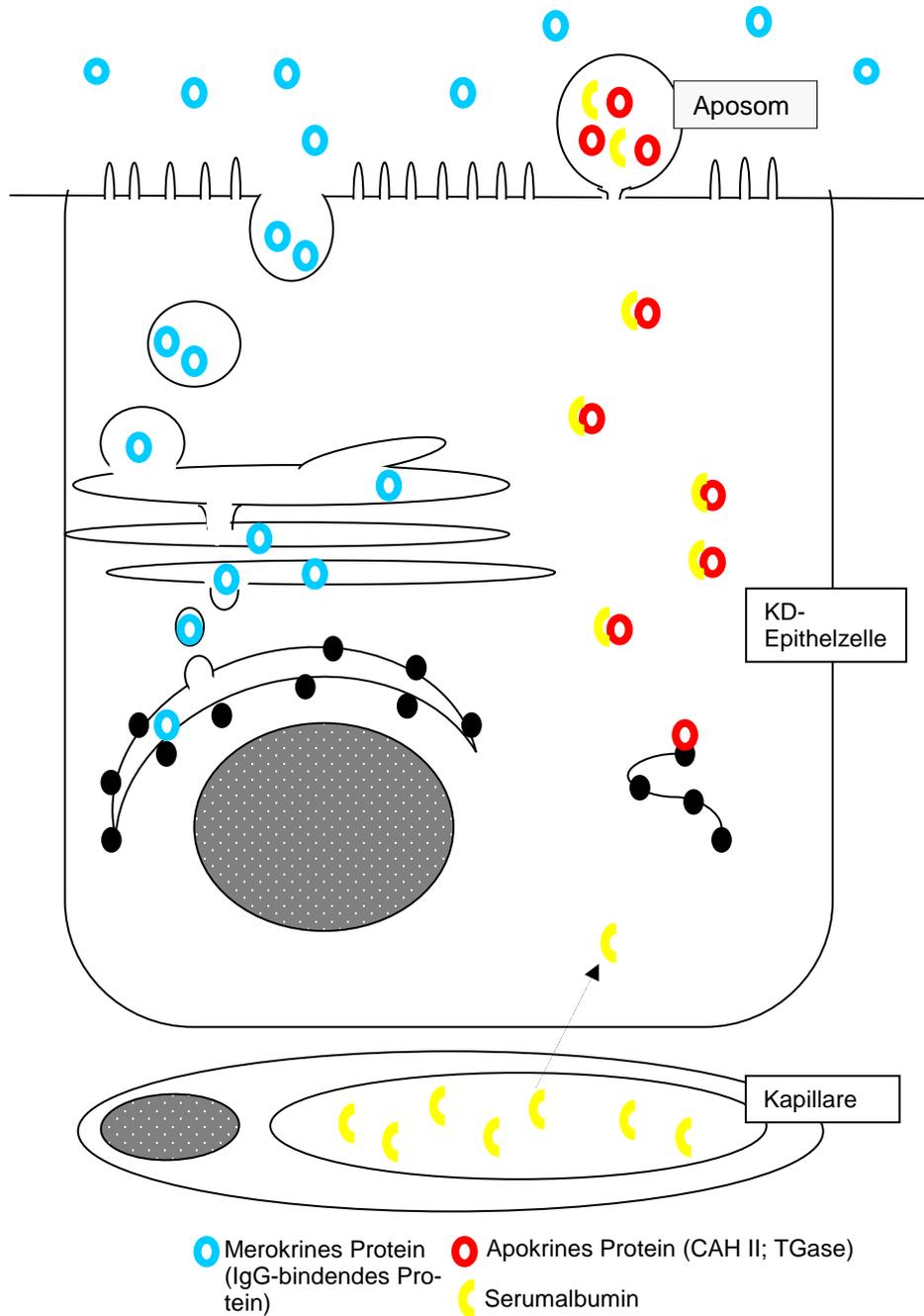


Abb. 2: Schema der Sekretion merokriner und apokriner Proteine in der KD der Ratte. Im Gegensatz zu dem merokrinen IgG-bindenden Protein, das über den klassischen Sekretionsweg über ER und Golgi-Apparat sekretiert wird, werden die apokrinen Proteine an zytoplasmatischen Polyribosomen transkribiert und in Aposomen von der Zelle abgegeben. Serumalbumin, das auf unbekanntem Weg wahrscheinlich aus dem Blut aufgenommen wird (Pfeil), dient möglicherweise als Carrier der apokrinen Proteine innerhalb der KD-Epithelzelle.

Untersuchungen belegen, dass die CAH II der KD über den apokrinen Exportweg in das Drüsenlumen abgegeben wird. Die cDNA der sekretorischen CAH II weist eine 100 %ige Homologie mit der zytoplasmatischen Form auf, was darauf hinweist, dass das Signal zur apokrinen Proteinsortierung erst posttranslational erfolgt (Wilhelm et al., 2003). Nach der Sekretion in apokrinen Blasen und Freisetzung des Sekretes nach Lyse der Blebs in den weiblichen Genitaltrakt ist die CAH II vermutlich an der Aufrechterhaltung bzw. Ausbildung eines optimalen pH-Niveaus beteiligt (Wilhelm et al., 1998).

Albumin konnte durch immunhistochemische Untersuchungen wie auch zuvor die CAH II und die TGase im Zytoplasma der KD und in den Aposomen lokalisiert werden. Es wird allerdings nicht von den Epithelzellen der KD synthetisiert, wie molekularbiologische Untersuchungen belegen, sondern gelangt auf unbekanntem Weg aus dem Blut in die Epithelzellen. Dort fungiert es möglicherweise als Carrier apokriner Proteine, indem es an diese bindet und mit ihnen in Aposomen verpackt aus der Epithelzelle ausgeschleust wird (Aumüller et al., 1999; Wilhelm et al., 1999).

Wilhelm et al. (1998) konnten zeigen, dass die als zytosolischer Marker bekannte Lactat-Dehydrogenase nicht mit den Aposomen aus der Zelle geschleust wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass o.g. Proteine bei der apokrinen Sekretion selektiv aus der Vielzahl der zytosolischen Proteine ausgewählt werden.

Die Funktion des merokrin exportierten IgG-bindenden 115 K Proteins ist noch ungeklärt. Es besitzt eine 85-100 %ige Sequenzhomologie in der Aminosäurenabfolge zum humanen IgGFc-bindenden Protein (Harada et al., 1997). Das humane IgGFc-bindende Protein besitzt eine muzin-ähnliche Struktur. Wilhelm et al. (2002) postulieren eine stabilisierende und protektive Funktion dieses Muzins bzw. des muzin-ähnlichen Proteins auf die apokrinen Blasen. Damit könnte ein vorzeitiges Platzen der Aposomen und das daraus resultierende Verklumpen der sekretorischen Proteine schon in den Ausführungsgängen der Drüse bzw. der Urethra verhindert werden.

Esposito et al. (2001) beschreiben für das 120 K Protein im KD-Sekret, das auf Aminosäureebene zu 80 % mit der schweren Kette des Kinesin identisch ist, eine mögliche Funktion als TGase-Substrat.

1.1.4 *Der Aufbau der Aposomenmembran und der apikalen Plasmamembran der Koagulationsdrüsenepithelzellen*

Vorraussetzung für die apokrine Sekretion und andere zielgerichtete Transportvorgänge ist die Polarität der Koagulationsdrüsenepithelzellen, d.h. die Kompartimentierung in funktionelle Bereiche, die durch die Ausbildung von *Zonula occludens* und *Macula adherens* gekennzeichnet ist (Manin et al., 1992). Die *Zonula occludens* oder *tight junctions* grenzen die apikale von der basalen Plasmamembran ab, die sich wesentlich in ihrer Protein- und Lipidkomposition voneinander unterscheiden (Simons & Fuller, 1985; Rodriguez-Boulan & Nelson, 1989). So sind z.B. Sphingolipide, die dem aggressiven luminalen Milieu trotzen können, vorwiegend in der apikalen Membran lokalisiert. Durch die *tight junctions* wird nicht nur das Ein- oder Austreten von Flüssigkeit von außen nach innen und umgekehrt verhindert, sondern auch der Austausch von Membranbestandteilen zwischen apikalem und baso-lateralem Membrankompartiment (Alberts et al., 1997).

Wenig ist bisher über den Aufbau der apikalen Plasmamembran der KD-Epithelzellen und der Aposomenmembran bekannt. Bisher konnte in der apikalen Plasmamembran der KD neben einer H^+ -ATPase auch Aquaporin 9 identifiziert werden (Herak-Kramberger et al., 2001; Pastor-Soler et al., 2001). Ob diese Proteine ebenfalls ein Bestandteil der Aposomenmembran sind, wurde jedoch nicht untersucht.

Aumüller et al. (1999) wiesen durch Immunfluoreszenzuntersuchungen eine Beteiligung verschiedener Proteine des Zytoskeletts in den Aposomen nach. Die Immunreaktivität für Myosin und Gelsolin war in den Aposomen homogen verteilt. Villin, Spektrin und α -Aktinin konnten dagegen nicht lokalisiert werden. Die Immunreaktivität für β -Aktin war unterschiedlich stark in den Aposomen verteilt. Ein besonders deutliches Signal konnte dort beobachtet werden, wo die sich abschnürenden Aposomen noch über eine Art Fortsatz mit der apikalen Plasmamembran verbunden waren. Daraus entwickelten Aumüller et al. (1999) die These, dass β -Aktin sowohl an der Aposomenbildung als auch an der Abdichtung der apikalen Zelloberfläche beteiligt ist. Wiche (2001) konnte mit Cy3-markiertem Gc-Globulin nachweisen, dass es sich bei dem in den Aposomen vorkommenden Aktin um globuläres Aktin (G-Aktin)

handelt. Dieses konnte wie auch F-Aktin ebenfalls unter der Koagulationsdrüsenepithelzellmembran detektiert werden.

1.1.5 Die hormonelle Regulation der apokrinen Sekretion der KD

Sowohl die merokrine als auch die apokrine Sekretion in der KD geschieht androgenabhängig. Nach Testosteronentzug durch Kastration der Ratten wurden schon nach sieben Tagen keine Aposomen mehr in der KD gebildet. Zusätzlich kam es in den Epithelzellen zu einer Abnahme an rauem ER und zum Fehlen sekretorischer Vesikel. Die Höhe der Epithelzellen war wie auch das Drüsenlumen vermindert (Seitz et al., 1990; Holterhus et al., 1993; Steinhoff et al., 1994).

Bei estradiolbehandelten Ratten konnten noch einige Blasen im Drüsenlumen beobachtet werden, die jedoch apoptotischen Ursprunges waren (Holterhus et al., 1993). Zusätzlich kam es zu einer veränderten Morphologie des Koagulationsdrüsenepithels, die sich in einer Verdickung der *Lamina propria*, des interstitiellen Stromas und der Schicht der glatten Muskelzellen manifestierte (Steinhoff et al., 1994).

Nach Kastration der Ratten mit anschließender Estradiolgabe konnte in der KD keine apokrine Sekretion mehr beobachtet werden. Es kam stattdessen zur Bildung von Apoptosevesikeln, die Zellorganellen enthielten (Steinhoff et al., 1992). Die Behandlung resultierte zusätzlich in einer Zunahme der *Lamina propria* sowie des interstitiellen Stromas und einer Verminderung des Drüsenlumens (Holterhus et al., 1993; Steinhoff et al., 1994).

Neben dem Hormonstatus beeinflusst auch die reproduktive Aktivität der Tiere die Bildung der apikalen Blasen. Seitz et al. (1990) konnten zeigen, dass es mit steigender reproduktiver Aktivität zu einer Zunahme der Aposomenbildung kam. Die Expression der apokrinen Proteine wird ebenfalls durch Androgene beeinflusst. Wilson & French (1980) konnten erst mit Beginn der Pubertät ab dem 20. Tag nach der Geburt TGase im Zytosol der KD bzw. der dorsalen Prostata nachweisen. Gleichzeitig wurde vier Wochen nach Kastration eine Reduzierung der TGase von 30 % auf 5 % des Gesamtproteins beobachtet. Diese Ergebnisse wurden von Ho et al. (1992) bestätigt, die bei kastrierten Ratten einen Rückgang der TGase-mRNA in der KD um 80 % nachweisen konnten. Auch das TGase-Protein war in der Ratten-KD sieben

Tage nach Kastration vermindert (Steinhoff et al., 1994). Beide Effekte waren durch Testosteronsupplementierung teilweise bis vollständig reversibel. Frühere Ergebnisse von Bartlett et al. (1984) belegen, dass durch 2tägige Androgengabe acht Tage nach Kastration die Expression der apokrin sezernierten TGase wie auch die des merokrin sezernierten 115 K Proteins wieder hochreguliert wurden.

Ähnliche Effekte konnten auch für andere apokrin sezernierende Drüsen bzw. apokrin sezernierte Proteine beobachtet werden. Die Expression des DP1/TGase der dorsalen Prostata wird ebenfalls durch Androgene reguliert. Bei Kastration wird die DP1 Expression vermindert, durch anschließende Androgengabe wieder erhöht (Wilson & French, 1980). Gleichmaßen wird auch das vom *Vas deferens* apokrin sezernierte MVDP nur in Anwesenheit von Androgenen synthetisiert (Dassouli et al., 1994; Fabre et al., 1994).

1.2 Alternative Sekretionsmechanismen im männlichen Reproduktions-trakt - Sekretionsmechanismen der humanen Prostata

Die humane Prostata sezerniert Proteine sowohl über den klassischen merokrinen Sekretionsweg als auch über einen alternativen Sekretionsmechanismus. Im Unterschied zur apokrinen Sekretion in der KD der Ratte werden hier Proteine, die von der Prostata synthetisiert werden, über so genannte Prostatasomen abgegeben.

1.2.1 Sekretorische Proteine

Zu den sekretorischen Proteinen, die über den merokrinen Sekretionsweg exportiert werden, gehören das prostataspezifische Antigen (PSA), die sekretorische saure Phosphatase (PAP) sowie das β -Microseminoprotein (β -MSP).

1.2.2 Die Prostatasomen – Proteine der Prostatasomenmembran

Prostatasomen werden als 40-500 nm große, granuläre Partikel beschrieben, die von tri-, penta- oder multilaminären Membranen umgeben sind. Bis zur Ausschleusung verbleiben sie in Speichervesikeln der Prostataepithelzelle. Zwei unterschiedliche Abgabemechanismen werden postuliert: (1) ihre Abgabe in das Lumen über merokrine Exozytose und (2) über die so genannte Diazytose, wobei die gesamten

Speichervesikel aus der Zelle in das Drüsenlumen abgegeben werden (Brody et al., 1981; Ronquist & Brody, 1985; Aumüller et al., 2002).

Arienti et al. (1997a) konnten die Fusion von Prostatosomen mit Spermien *in vitro* bei saurem pH nachweisen und leiteten aus diesen Ergebnissen eine Schutzfunktion der Prostatosomen auf die Spermien gegenüber dem sauren Vaginalmilieu ab. Die Lipidzusammensetzung von Spermium- und Prostatosomenmembran unterscheidet sich deutlich voneinander. In der Prostatosomenmembran dominieren Cholesterin und Sphingomyelin, während die Spermienmembran nur geringe Mengen an Cholesterin, jedoch große Mengen an ungesättigten Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylcholinresten besitzt. Durch die Fusion von Prostatosom und Spermium wird der Cholesterinanteil der Spermienmembran *in vitro* deutlich erhöht, wodurch die Fluidität der Spermienmembran abnimmt (Carlini et al., 1997; Arienti et al., 1998a). Neben dem Transfer von Lipiden wurde auch der Transfer der Enzyme Aminopeptidase N/CD13 und Dipeptidylpeptidase IV/CD 26 auf die ejakulierten Spermien *in vitro* beobachtet (Arienti et al., 1997b,c,d). Lilja & Laurell (1984) konnten außerdem eine Beteiligung der Prostatosomen an der Verflüssigung des Samens nachweisen. Mehrere Autoren postulieren zudem eine gesteigerte Spermienmotilität nach Inkubation mit Prostatosomen (Fabiani, 1994; Fabiani et al., 1995; Arienti et al., 1997a; Carlsson et al., 1997). Weitere beschriebene Funktionen bzw. Effekte, die den Prostatosomen zugeordnet werden, sind eine Neutralisierung der Immunantwort des weiblichen Genitaltraktes, indem sie u.a. die phagozytotische Aktivität herabsetzen und die Lymphozytenproliferation sowie die Produktion von Superoxidanionen durch Leukozyten hemmen, sowie eine Inhibierung viraler Aktivität (Kelly et al., 1991; Skibinski et al., 1992; Stridsberg et al., 1996; Arienti et al., 1998b). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über einige mit den Prostatosomen assoziierten Proteine und deren postulierte Funktion wieder.

Neben den in der Tab. 2 aufgeführten Proteinen werden auch noch eine Lactat-Dehydrogenase (Olsson & Ronquist, 1990), eine Phospholipase A2 (Lindahl et al., 1987), eine γ -Glutamyltransferase (Lilja & Weiber, 1983), eine Fucosyltransferase (Ronquist & Stegmayr, 1984) sowie eine Dipeptidyl-Peptidase (Arienti et al., 1997d) mit den Prostatosomen transportiert.

Tab. 2: Ausgewählte Proteine der Prostatosomenmembran bzw. mit der Prostatosomenmembran assoziierte Proteine

Membranprotein	Postulierte Funktion	Literaturangabe
Mg ²⁺ -abhängige Ca ²⁺ -ATPase (PMCA)	Ca ²⁺ -Transport in die Prostatosomen	Ronquist et al., 1978a,b
5'-Nukleotidase	Hydrolyse von 5'-AMP, 5'-IMP, 5'-GMP Möglicher Einfluss auf Spermienmotilität	Fabiani & Ronquist, 1993 Aumüller et al., 1997
Neutrale Endopeptidase	Modulator der Zellproliferation in der humanen Prostata	Renneberg et al., 2001
Alkalische Phosphatase	pH-Regulation	Fabiani & Ronquist, 1995
Aminopeptidase N	ubiquitäres Ecto-Enzym beteiligt an Zellwachstum und Zelldifferenzierung	Laurell et al., 1982
Fibronectin	Extrazelluläres Matrixenzym beteiligt an Bildung des seminal clot	Aumüller et al., 1997

Von der Verfasserin der vorliegenden Arbeit konnte in der KD neben einer Mg²⁺-abhängigen bzw. unabhängigen Ca²⁺-ATPase auch eine Alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Daher wird im Anschluss auf diese Enzyme explizit eingegangen. Die Expression der NEP-mRNA in KD konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit belegt werden. Da das Protein jedoch nicht weiter charakterisiert werden konnte, wird es im Weiteren nur kurz vorgestellt. Die Funktion der Mg²⁺-abhängigen Ca²⁺-ATPase in den Prostatosomen liegt möglicherweise im vektorialen Transport von Ca²⁺ in diese Vesikel. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass im Vergleich mit dem umgebenden Seminalplasma, Ca²⁺ in Prostatosomen konzentriert vorliegt (Stegmayr & Ronquist, 1982).

Die Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase

Eine funktionierende Ca²⁺-Homöostase ist für den Stoffwechsel tierischer Zellen von essentieller Bedeutung. Die Ca²⁺-Konzentration im Zytosol von Eukaryoten liegt bei 10⁻⁷ M, im Extrazellulärraum bei 10⁻³ M. Über Ca²⁺-Kanäle der Plasmamembran bzw. des ERs strömt Ca²⁺ entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle und steuert zelluläre Ereignisse. Entscheidend ist hierbei der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration als temporäres Ereignis, da eine ständig erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration den Zellstoffwechsel beeinträchtigen und u.a. zur Aktivierung von Proteasen, zur DNA-Fragmentierung oder zur Apoptose führen kann (Carafoli, 1987).

Schatzmann beschrieb 1966 erstmals die Ausschleusung von Ca²⁺ aus Erythrozyten durch ein ATP-abhängiges Enzym. 1979 gelang es Niggli et al. die Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase (PMCA) durch Calmodulin-Affinitätschromatografie zu isolieren. PMCA

ist neben dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert ist, für die Aufrechterhaltung einer geringen freien Ca^{2+} -Ionenkonzentration ($\leq 2 \mu\text{M}$) in nicht-muskulären Zellen verantwortlich (Carafoli, 1987). Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher besitzt eine hohe Transportkapazität verbunden mit einer geringen Affinität für Ca^{2+} , während dessen PMCA hochaffin Ca^{2+} mit geringer Transportrate aus der Zelle schleust (Carafoli, 1991). In Muskelzellen dagegen hat PMCA im Vergleich zu der sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die Ca^{2+} aus dem Zytosol in das ER transportiert, eine eher untergeordnete Bedeutung. Als Mitglied der Familie der P-Typ-ATPasen gewinnt PMCA wie auch SERCA Energie aus der Hydrolyse von ATP unter Ausbildung eines Aspartyl-Phosphat-Zwischenproduktes, um freies Ca^{2+} gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle zu schleusen (Carafoli & Stauffer, 1994). Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher dagegen koppelt den Transport von Ca^{2+} an den Transport von Na^+ , der mit den Konzentrationsgradienten vom EZR in das Zytosol verläuft. Dabei werden 3-4 Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion ausgetauscht (Philipson & Nicoll, 1992). Ein Ca^{2+} -Uniporter der Mitochondrienmembran, der Ca^{2+} zwar mit nur geringer Affinität bindet, trägt jedoch durch seine hohe Transportkapazität ebenfalls entscheidend zur Regulierung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol bei (Montero et al., 2000).

Der Anteil der PMCA ist gemessen an den gesamten Membranproteinen sehr gering und übersteigt selten 0,1-0,3 %. Eine Ausnahme bilden Neurone, in denen PMCA eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase zukommt (Stauffer et al., 1995; Carafoli et al., 1996).

Das PMCA-Protein besitzt 10 Transmembrandomänen (TMD) und ist mit dem C- bzw. N-terminalem Ende im Zytosol lokalisiert. Die erste intrazelluläre Schleife zwischen TMD 2 und 3 ist an der Konformationsänderung während des Transportzyklus beteiligt und besitzt eine Bindestelle für saure Phospholipide. Die zweite zytosolische Schleife zwischen den TMD 4 und 5 beinhaltet die Domäne, die die katalytische Hauptfunktion umfasst, darunter auch die ATP-Bindungsstelle wie auch den Aspartylrest, der während des Reaktionszyklus das phosphorylierte Zwischenprodukt bildet. Das C-terminale Ende enthält eine Calmodulin-Bindungsstelle, die in Abwesenheit von Calmodulin auch als autoinhibitorische Einheit fungiert. Ein Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} führt zu einem Anstieg an Ca^{2+} -Calmodulin, das hochaffin

an die autoinhibitorische Einheit bindet und zu einer Aktivierung der PMCA beiträgt (Abb. 3).

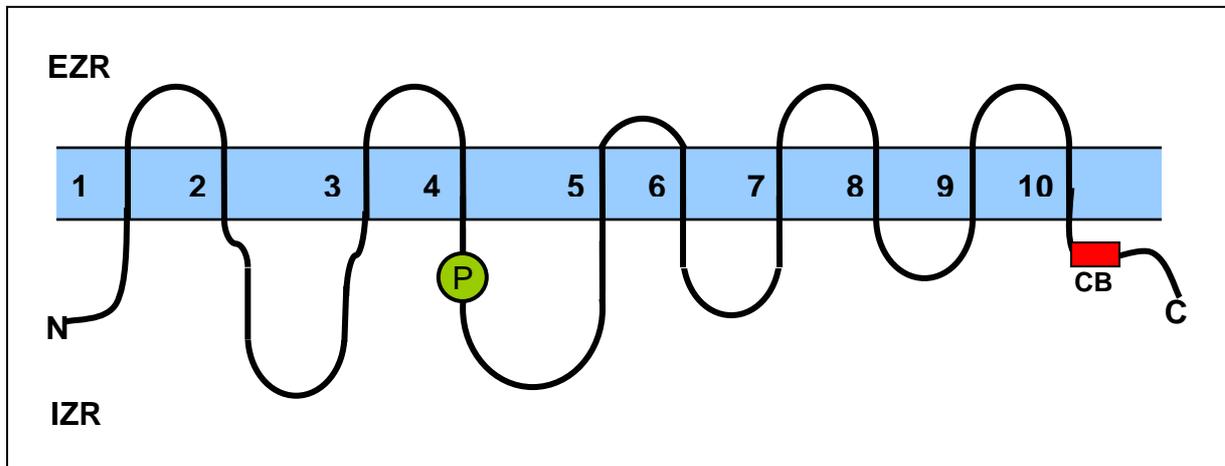


Abb. 3: Modell der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) (modifiziert nach Carafoli & Brini, 2000). N: NH_2 -Terminus, C: COOH -Terminus, P: Aspartylphosphat, CB: Calmodulin-Bindungsstelle, EZR: Extrazellulärraum; IZR: Intrazellulärraum

Die basale Ca^{2+} -Affinität des Enzyms ist gering ($K_m > 10 \mu\text{M}$), so dass PMCA bei physiologischen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen inaktiv vorliegt. Die Bindung an Calmodulin kann die Ca^{2+} -Affinität des Enzyms bis zu einer K_m von $0,2 \mu\text{M}$ steigern. Neben Calmodulin wird PMCA auch durch saure Phospholipide und Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A bzw. C aktiviert. In den meisten Organen benötigt PMCA außerdem Mg^{2+} als Kofaktor (Robinson, 1976; Carafoli & Crompton, 1978; Niggli et al., 1979).

In Säugern wurden bislang 4 Gene identifiziert, die für die PMCA-Isoformen 1-4 kodieren (Guerini & Carafoli, 1996). Die primären Transkripte dieser Gene, die durch alternatives Splicen am 3'-Ende entstehen, werden durch die Buchstaben a-d unterschieden (Carafoli, 1991). Insgesamt existieren etwa 30 durch alternatives Splicen entstandene Splicevarianten (Guerini & Carafoli, 1996). Die PMCA-Isoformen 1 und 4 sind in nahezu allen Geweben vorhanden, wogegen das Vorkommen von PMCA2 und 3 auf wenige Organe wie z.B. Gehirn, Herz und Haarzellen des Innenohres beschränkt ist (Stauffer et al., 1993). Die restriktive Verteilung von PMCA2 und 3 lässt gewebespezifische Eigenschaften vermuten. So konnten sowohl bei Spontanmutationen des PMCA2 Gens als auch bei transgenen PMCA2 „knock-out“ Mäusen Defekte in der Balance und im Hörvermögen beobachtet werden (Street et al., 1998; Dumont et al., 2001).

Auch der ubiquitär vorkommenden Isoform PMCA1 konnten neben ihrer bereits bekannten Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase weitere Funktionen zugeordnet werden. Afroze & Husain (1990) konnten zwei Bindungsstellen auf der PMCA1 Promotorsequenz glatter Muskelzellen für den Transkriptionsfaktor C-myb identifizieren. C-myb hat eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Zellproliferation unter Bedingungen wie Atherosklerose oder Restenose und ist ebenfalls an der Modulation der Apoptose über die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt. Die Bindung von C-myb führt zu einer Repression der PMCA1-Transkription während der G1/S-Phase des Zellzyklus. Eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors hemmt das Fortschreiten des Zellzyklus und führt zur Abnahme des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Dieser wird durch ein Ansteigen der PMCA1-mRNA- bzw. der PMCA1-Proteinmenge und der damit verbundenen verstärkten Ca^{2+} -Ausschleusung verursacht.

Neben der humanen Prostata bzw. den Prostatasomen wurde eine Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase in folgenden weiteren Teilen des männlichen Reproduktionstraktes identifiziert: Vanithakumari & Govindarajulu (1985) konnten das Enzym in der Bläschendrüse adulter Affen detektieren, Agrawal & Vanha-Perttula (1987) wiesen es in Partikeln des bovinen Bläschendrüsensekretes nach. Außerdem konnte eine Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Bullensperma (Vijaysarathai et al., 1980), in Mikrosomen aus Rattenhoden (Sikdar et al., 1991) und in der Prostata adulter Affen (Vanithakumari & Govindarajulu, 1985) detektiert werden.

Die Alkalische Phosphatase

Schon 1907 vermuteten Suzuki et al., dass Phosphatasen eine eigene Klasse von eukaryotischen Enzymen bilden. Grosser & Husler sowie von Euler konnten 1912 zeigen, dass dieses Enzym Glyzerophosphat und Fruktose-1-6-diphosphat hydrolysiert und in großen Mengen in der intestinalen Mukosa nachzuweisen ist. Der Begriff Phosphatase wurde 1912 von von Euler & Funke eingeführt.

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist in nahezu allen Spezies vom Bakterium zu höheren Tieren, mit Ausnahme einiger höherer Pflanzen, vorzufinden (Fernley 1971). Aufgrund ihrer breiten Substratspezifität können die APs aus 5'-Tri-, Di- und Monophosphaten P_i freisetzen und überdies PP_i hydrolysieren (Zimmermann, 1996; Fernley, 1971; Coleman, 1992). Die Enzymreaktion verläuft über ein kovalentes Serin-

Phosphat-Zwischenprodukt, wobei neben dem anorganischem Phosphat Alkohol entsteht (Schwartz & Lipmann, 1961). Die APs einer Vielzahl von Organismen weisen folgende Gemeinsamkeiten auf: (1) Hydrolase/Transferase-Aktivität; (2) Abhängigkeit der Aktivität von den Metallionen Zn^{2+} und Mg^{2+} ; (3) ein identisches Aminosäuremuster an den aktiven Zentren (McComb et al., 1979; Stigbrand, 1984a). Die AP gehört zu einer Gruppe von Membranenzymen, die in Eukaryonten über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden sind (Cross, 1987; Howard et al., 1987; Jemmerson & Low, 1987; Low, 1987; Takami et al., 1988). In dieser Form lagern sie sich häufig zu Tetrameren bis Octameren zusammen (Hawrylak & Stinson, 1988; Bublitz et al., 1993). Die so genannten löslichen Formen der AP können auch im Serum erscheinen. Sie werden vermutlich durch die phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipasen C bzw. D aus der membrangebundenen Form freigesetzt (Davitz et al., 1987; Hawrylak & Stinson, 1988; Low & Prasad, 1988). Abb. 4 zeigt die Topologie der AP in der Plasmamembran.

Bisher wurden 4 verschiedene Isoformen der AP identifiziert: eine gewebeunspezifische Isoform (Leber/Knochen/Niere-Isotyp; LKN-Isoform), eine intestinale Isoform, eine plazentäre Isoform und eine plazentaähnliche bzw. Keimzell-Isoform (Kam et al., 1985; Weiss et al., 1986; Henthorn et al., 1987; Millán & Manes, 1988).

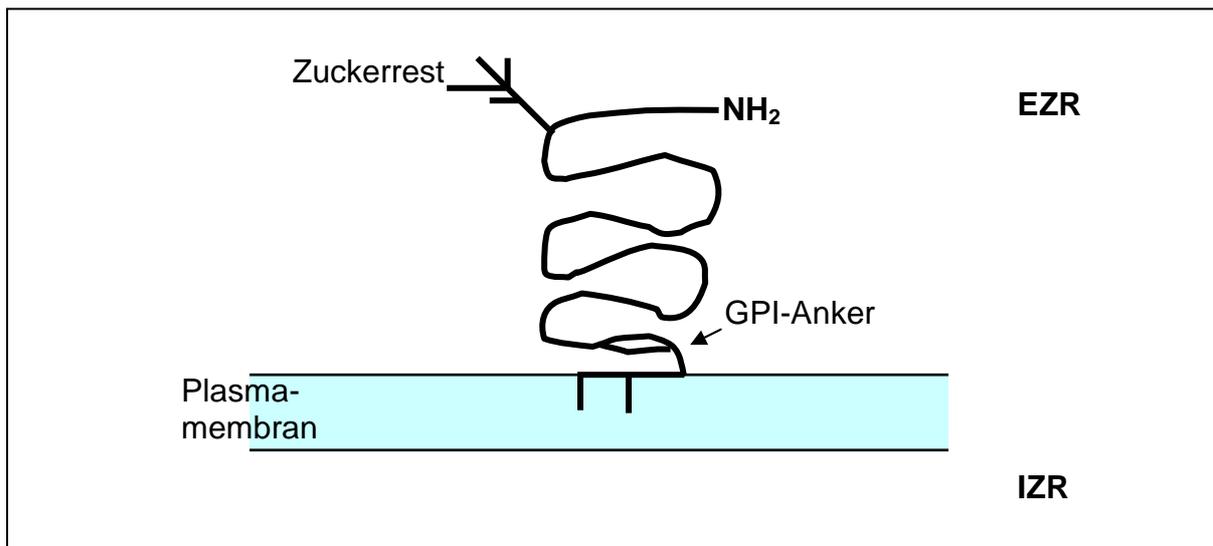


Abb. 4: Membrantopologie der Alkalischen Phosphatase (modifiziert nach Zimmermann 1996). EZR: Extrazellulärraum, IZR: Intrazellulärraum

Die Gensequenz der gewebeunspezifischen Isoform ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert, wogegen die Gensequenz der drei anderen Isoformen auf Chromosom 2 liegt (Griffin et al., 1987; Smith et al., 1988). Tab. 3 gibt eine Übersicht über die Homologie der Aminosäurenabfolge der 4 verschiedenen Isoformen wieder. Dabei zeigt sich, dass die Aminosäurenabfolge der Isoformen, deren Gensequenz auf Chromosom 2 lokalisiert ist, hoch homolog sind (86-98 %), während die Homologie zu den gewebeunspezifischen Isoformen deutlich geringer ist.

Tab. 3: Aminosäure(AS)-Sequenzhomologie zwischen den humanen AP-Isoformen

AP Isoform	AS-Sequenzhomologie
Plazenta AP – plazentaähnliche AP	98 %
Plazenta AP – intestinale AP	86,5 %
Plazenta AP – gewebeunspezifisch (LKN) AP	54 %
intestinale AP – gewebeunspezifisch (LKN) AP	56 %
intestinal AP – plazentaähnliche AP	87 %
Gewebeunspezifische (LKN) AP – plazentaähnliche AP	56 %

Neben den Unterschieden auf Transkriptionsebene bzw. in der Aminosäuresequenz, lassen sich die 4 Isoformen auch funktionell aufgrund unterschiedlicher Thermostabilität bzw. hinsichtlich ihres unterschiedlichen Verhaltens gegenüber Hemmstoffen unterscheiden (Harris, 1989). So weist die gewebeunspezifische Isoform die geringste Thermostabilität auf, während die Plazenta-Form bzw. die plazentaähnliche Form eine Stunde bei 65 °C erhitzt werden können, ohne ihre Aktivität einzubüßen. Die Hitzestabilität der intestinalen Form liegt dazwischen.

Hirano et al. (1984) wiesen der intestinalen Isoform der AP, die im Bürstensaum der Mukosaepithelzellen lokalisiert ist, eine Funktion bei der aktiven Aufnahme verschiedener Metabolite wie z. B. anorganischer Phosphate zu. Die Plazenta-Form der AP wird in der Plazenta ab etwa der 12. Woche der Schwangerschaft im Synzyotrophoblasten exprimiert. Auch ihr wird eine Rolle im Transport von Metaboliten zugewiesen (Sakiyama et al., 1979; Warren et al., 1985). In geringen Mengen ist sie auch in Lunge und Zervix vorhanden (Goldstein et al., 1980; Goldstein et al. 1982). Die mit der Plazenta-Isoform nahezu identische plazentaähnliche AP oder Keimzell-AP kann im gesunden Individuum in nur geringen Mengen im Hoden, Seminalplasma und Thymus detektiert werden (Chang et al., 1980; Goldstein et al., 1982; Millán

et al., 1982, McLaughlin, et al., 1986). In Seminomen dagegen ist sie in großen Mengen nachzuweisen (Harris, 1989). Die gewebeunspezifische AP Form ist, wie der Name impliziert, in nahezu allen Geweben vorhanden (Goldstein et al., 1982). Diese Isoform liegt mit hoher Aktivität im mineralisierenden Knochen vor, wo sie in der Plasmamembran von Osteoblasten nachzuweisen ist (Doty & Schofield, 1976).

Weiterhin ergaben sich aus einigen Studien Hinweise, dass APs an der Regulation von Proteinphosphorylierungen, Kollagen-Phagozytose, Zellwachstum, Apoptose und der zellulären Migration während der Embryogenese beteiligt sind (Chan & Stinson, 1986; Zackson & Steinberg, 1988; Hui et al., 1993; Hui et al., 1997; She et al., 2000). Außerdem gaben Untersuchungen an Mäusen mit defekter gewebeunspezifischer AP Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Enzyms am Pyridoxin-Metabolismus des ZNS (Waymire et al., 1995).

Von klinischer Bedeutung ist die Rolle der AP in der Diagnostik von Erkrankungen der Leber und des Knochens bzw. ihre Funktion als Tumormarker. Bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose, Diabetes mellitus und chronischer Nephritis wurde zudem ein erhöhter Spiegel an intestinaler AP gefunden.

Im männlichen Reproduktionstrakt sind APs nahezu ubiquitär verbreitet (Glogowski et al., 2002). Neben dem Hoden konnten APs in Prostatomen (Fabiani & Ronquist, 1995), in Plasmamembranen von Spermien (Soucek & Vary, 1984; Parks et al., 1987), im Seminalplasma und im Nebenhoden verschiedener Spezies durch Aktivitätstests nachgewiesen werden (Strzezek & Glogowski, 1979; Glogowski & Strzezek, 1980; Frenette et al., 1986; Glogowski, 1988; Iyer et al., 1988; Tang, 1998).

Die Neutrale Endopeptidase (NEP)

Die Neutrale Endopeptidase (NEP) ist eine weit verbreitete membranständige Metalloprotease der Metzincin-Familie, die Oligopeptide bevorzugt am Aminoende hydrophober Aminosäuren spaltet. Die NEP wird auch als Nephilysin/CD10, Enkephalinase bzw. CALLA (common acute lymphatic leukemia antigen) bezeichnet. Kerr & Kenny gelang es 1974 erstmals, die NEP aus Kaninchennieren aufzureinigen. Die NEP wird von einer großen Anzahl von Geweben exprimiert, wobei sich besonders

hohe Konzentrationen in den Epithelzellen der Bürstensaummembran proximaler Nierentubuli, Dünndarm und Plazenta finden (Checler et al., 1984; Shipp et al., 1991; Soleihac et al., 1992; Kenny, 1993). Außerdem konnte die NEP in Prostata, Lunge, auf Fibroblasten, lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks und Thymus, auf reifen Granulozyten sowie als lösliche Form im Serum detektiert werden (Ratti et al., 2001). Renneberg et al. (2001) konnten die NEP zudem in humanen Prostatasomen detektieren.

Die Funktion der NEP wird bedingt durch ihre Lokalisation. In der Niere spaltet das Enzym Peptide des Ultrafiltrates, Kinine sowie den „atrial natriuretic factor“; im ZNS Oligopeptide wie Substanz P und Enkephaline. Weitere Substrate der NEP sind Bombesin, Endothelin-1, Bradykinin, Neurotensin und Oxytozin (Monsees et al., 1996; Moody et al., 1998; Nagakawa et al., 1998). Studien an „knock-out“ Mäusen lassen eine erhöhte Sensibilität der Tiere für einen septischen Schock aufgrund des verminderten Abbaus von Endothelin, Bradykinin, Tachykininen oder Enkephalinen vermuten (Lu et al., 1995). Sumitomo et al. (2000a) zeigen, dass die Migration von Prostatakarzinomzellen bei einer fehlenden NEP-Expression gesteigert ist. Diese Daten stimmen mit früheren Beobachtungen von Papandreou et al. (1998) überein, die postulierten, dass NEP ein Modulator der Zellproliferation und des Zellwachstums der humanen Prostata bzw. der Prostatakarzinomzellen darstellt.

1.3 Die apokrine Sekretion in weiteren Spezies und Geweben

Die apokrine Sekretion wurde neben der KD in einer Reihe weiterer Gewebe beschrieben. Dabei stammen die meisten Daten aus rein morphologischen Studien. Proteine, die über diesen Sekretionsweg abgegeben werden, wurden kaum beschrieben. Tab. 4 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Gewebe, in denen diese Form der Sekretion stattfindet und listet, falls bekannt, die dazugehörigen apokrin sezernierten Substanzen auf.

Tab. 4: Apokrin sezernierende Gewebe

Gewebe	Spezies	Apokrin sezernierte Substanzen	Literaturangabe
Laktierende Milchdrüse	Mensch Ratte Rind	Lipide; lipidlös. Hormone; Wachstumsfaktoren, Leptin	Linzell & Peaker, 1971 Kurosomi et al., 1981 Shennan & Peaker, 2000
Ausführungsgänge Speicheldrüsen	Mensch Ratte Seehund		Testa-Riva et al., 1981; Lantini et al., 1990; Testa-Riva et al., 1995 Messelt 1982a; Thomopoulos et al., 2000 Messelt 1982b
Plexus choroideus	Ratte	Transthyretin, Aktin; vier nicht charakterisierte Proteine	Agnew et al., 1980 Gudeman et al., 1989
Clarazellen (Lunge)	Ratte Maus Kaninchen		Aumüller et al., 1985; Peao et al., 1993 Etherton et al., 1979; Clouter & Richards, 1997 Morgenroth & Hoerstebrock, 1978
Harderdrüse	Ratte; Maus Meerschweinchen Goldhamster		Djeridane 1996; Gesase et al. 1996 Thomopoulos et al., 1996 Gesase & Satoh, 2001
Apokrine Schweißdrüsen	Mensch Schwein		Schaumburg-Lever & Lever, 1975 Spielman et al., 1998 de Melo et al., 1984; Gargiulo et al., 1990
Duftdrüse Axilla	Mensch		Spielman et al., 1995; Zeng et al., 1996; Spielman et al., 1998
Zerumialdrüse	Mensch		Main & Lim, 1976; Testa-Riva & Puxeddu, 1980; Shugyo et al., 1988
Riechepithelzellen	Mensch		Lucheroni et al., 1986
Koagulationsdrüse bzw. anteriore Prostata	Ratten Maus Goldhamster Kaninchen Meerschweinchen	DPI/TGase CAH II	Wilson & French, 1980; Seitz et al., 1990 Wilhelm et al., 1998 Hawkins & Geuze, 1977; Aumüller & Adler, 1979 Samuel & Flickinger, 1986 Chow & Prang, 1989 Nicander et al., 1974 Wong & Tse, 1981
Dorsale Prostata	Ratte Goldhamster	DPI/TGase CAH II	Bartlett et al., 1984; Seitz et al., 1990 Wilhelm et al., 1996 Aumüller & Adler, 1979 Chow & Prang, 1989
Nebenhoden	Maus Ratte	MIF	Hermo et al., 2000; Eickhoff et al., 2001
Bläschendrüse	Mensch Ratte Rind	CAH II, TGase, Albumin	Kaunisto et al., 1990 Erkel, 2000 Riva, 1967 Ploen, 1980 Agrawal & Vanha-Perttula, 1987
Infraorbital-Drüse	Steinbock		Gerneke & Cohen, 1978; Atoji et al., 1987; Shugyo et al., 1988; Atoji et al., 1993
Ductus deferens	Mensch Maus	CAH II MVDP	Kaunisto et al., 1990 Manin et al., 1995

Gewebe	Spezies	Apokrin sezernierte Substanzen	Literaturangabe
Anale Duftdrüse	Kaninchen Waldmurmeltier Eichhörnchen Hund Erdwolf		Meyer et al., 2001 Smith & Hearn, 1979 Atoji et al., 1998 Stoeckelhuber et al., 2000
Duftdrüsen Scrotum	Katze		Sokolov & Shabadash, 1979; Meyer et al., 1987
Duftdrüsen Fuß	Impala Erdwolf		Welsch et al., 1998 Stoeckelhuber et al., 2000
Schädeldrüse	Dromedar		Taha et al., 1994

1.4 Ektozytose

Die so genannte Ektozytose, die 1991 von Stein & Luzio erstmals beschrieben wurde, stellt einen weiteren alternativen Exportweg zur merokrinen Sekretion von Proteinen dar. Dieser Exportmodus weist einige Parallelen zur apokrinen Sekretion auf. Auch hier werden Proteine in Vesikeln transportiert, die als gerichtete Antwort auf ein Signal von der Zelloberfläche abgegeben werden. Stein & Luzio (1991) konnten die signalgesteuerte Abschnürung von Vesikeln von der Oberfläche neutrophiler Granulozyten während der Komplementaktivierung beobachten. Die Ausschleusung des Komplementfaktors C9 in den Ektozytosevesikeln erfolgte als Reaktion auf eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Neben der Ausschleusung des Komplementfaktors konnte die Sortierung von Membranproteinen in die Vesikelmembran beobachtet werden. Zusätzlich wies die Membran der Ektozytosevesikel ein im Vergleich zur Plasmamembran verändertes Lipidspektrum auf, wobei der Cholesterolanteil in den Blebs doppelt so hoch wie in der Plasmamembran war. Das Phospholipidspektrum der Plasmamembran zeigte im Vergleich zu den Blebs keine Veränderung, das molare Verhältnis von Cholesterin zu Sphingomyelin war jedoch in den ektozytotischen Vesikeln verdoppelt.

Auch in Fibroblasten der humanen Vorhaut wurde der Mechanismus der Ektozytose beschrieben (Lee et al., 1993). Neben Aktin und β_1 -Integrin enthielten die ektozytierten Vesikel Annexin II und Annexin VI. Beide Proteine sind N-terminal blockiert und besitzen keine hydrophobe Signalsequenz. Damit weisen sie eine wichtige Gemeinsamkeit mit den apokrin sezernierten Proteinen auf. Annexin II und Annexin VI konnten von Wiche (2001) auch in Koagulationsdrüsenepithelzellen der Ratte nachgewiesen werden.

Mehrere Autoren beschrieben die Ektozytose als Exportmodus für Proteine. Sato et al. (1993) zeigten, dass Galektin-3 über diesen Exportmodus aus BHK-Zellen (Babyhamster-Nierenzellen) exportiert wird. In Fibroblasten konnten Hsu et al. (1997) Annexin I und Topoisomerase I in Ektozytosevesikeln aus Fibroblasten nachweisen. Hale & Wuthier (1987) und Stein & Luzio (1991) beschrieben zudem einen alternativen Exportmechanismus für die AP unter Beteiligung des Zytoskeletts bzw. für Aktin.

1.5 Caveolin, Caveolae und Lipid Rafts - funktionelle Einheiten der Plasmamembran

Caveolae und Lipid Rafts beschreiben strukturelle Mikrodomänen der Plasmamembran, die sich durch die Affinität bestimmter Lipide und Proteine zueinander ausformen (Kenworthy, 2002). Als Lipid Rafts werden glykosphingolipid- und cholesterinreiche Regionen der Zellmembran definiert, die zur Kompartimentierung der Membranproteine sowie zur Trennung von biochemischen Vorgängen in der Membran dienen. Zusätzlich fungieren sie als Plattform für den Transport von Lipiden und Proteinen vom trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran, wie z.B. GPI-verankerte Proteine (Simons & Ikonen, 1997). Beide, Caveolae und Lipid Rafts, sind am vesikulären Transport von Proteinen wie Endozytose, Pinozytose u.ä. beteiligt. Caveolae wurden erstmals von Yamada (1955) als 50-100 nm breite, unbemantelte flaschenförmige Einstülpungen in der Plasmamembran des Gallenblasenepithels beschrieben. Spätere Untersuchungen mittels Freeze-Fracture-Technik und Immunelektronenmikroskopie definierten sie neu als Cholesterol-Sphingolipid- und Caveolin-1-reiche Domänen der Plasmamembran mit variabler Krümmung (Rothberg et al., 1992; Fujimoto & Fujimoto, 1997; Fujimoto et al., 2000) (Abb.5). Obwohl Caveolin bisher nicht als Bestandteil der Lipid Rafts nachgewiesen werden konnte, werden die Caveolae von einigen Autoren als spezielle Form der Lipid Rafts bezeichnet (Anderson, 1998; Brown & London, 1998; Simons & Tomre, 2000). Aus der ungewöhnlichen Lipidzusammensetzung von Caveolae/Lipid Rafts geht als gemeinsames Charakteristikum ihre geringe Dichte sowie ihre Unlöslichkeit in milden ionischen Detergentien, wie Triton X-100 bei 4 °C, hervor (Brown & Rose, 1992; Sargiacomo et al., 1993).

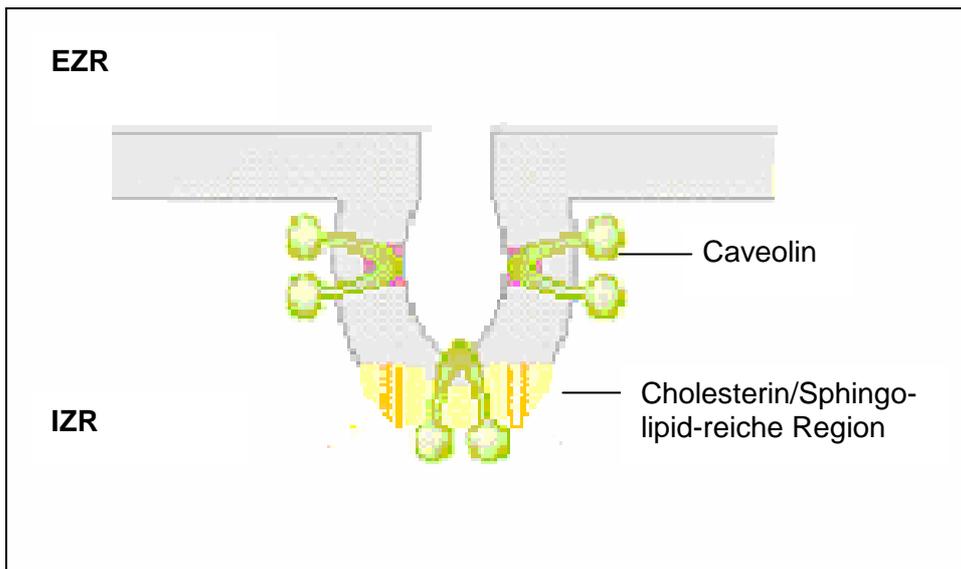


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Caveola (modifiziert nach Kenworthy, 2002). EZR: Extrazellulärraum, IZR: Intrazellulärraum

Außer in Caveolae wurde Caveolin auch in den Membranen des trans-Golgi-Netzwerkes nachgewiesen. Caveoline sind integrale Membranproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kDa, die eine haarnadelähnliche Struktur ausbilden und mit C- und N-Terminus im Zytoplasma lokalisiert sind (Parton, 1996). Caveolin-1 wurde von Rothberg et al. (1992) als Hauptprotein der Caveolae identifiziert. Caveolin-1 bindet die beiden Hauptkomponenten der Caveolae, Cholesterin und Sphingolipide, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Fra et al., 1995; Murata et al., 1995; Thiele et al., 2000). Hailstone et al. (1998) zeigten, dass erst nachdem eine Zelle einen bestimmten Cholesterin-Level erreicht hat, die Formation von Caveolae stattfinden kann. Zusätzlich zu dem Caveolin-1-Gen, aus welchem die Isoformen Caveolin-1 α sowie Caveolin-1 β hervorgehen, konnten außerdem Gensequenzen für Caveolin-2 und Caveolin-3 identifiziert werden (Way & Parton, 1995; Scherer et al., 1996; Tang et al., 1996). Caveolin-1 und Caveolin-2 sind ubiquitäre, ko-exprimierte Proteine, die am zahlreichsten in Adipozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Typ I Pneumozyten exprimiert werden (Scherer et al., 1996; Scherer et al., 1997). Caveolin-3 dagegen ist ein muskelspezifisches Protein, das hauptsächlich in Skelett- und Herzmuskel existiert (Parton, 1996; Song et al., 1996; Tang et al., 1996).

Neben dem Markerprotein Caveolin-1 ist ebenfalls eine beträchtliche Anreicherung von Glykosphingolipiden, Cholesterin, Sphingomyelin sowie von Proteinen, die über einen Lipid- bzw. GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden sind, in den Caveo-

lae zu beobachten. In einigen Zellarten wie z.B. Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, aber auch Typ I Pneumozyten und glatten Muskelzellen, sowie Epithelzellen sind Caveolae in größerem Umfang vorhanden (Lisanti et al., 1994). Außerdem konnten in isolierten Caveolae verschiedene Membranproteine wie eine Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase, eine H^+ -ATPase, der EGF-Rezeptor aber auch Strukturproteine wie Aktin, Annexin II und Annexin IV nachgewiesen werden (Fujimoto, 1993; Sargioacomo et al., 1993; Chang et al., 1994; Lisanti et al., 1994; Mineo & Anderson, 1996; Darby et al., 2000).

Ektozytotische Blebs bzw. die Proostasomenmembran zeichnen sich ebenfalls durch eine charakteristische Lipidverteilung mit einer starken Anreicherung von Cholesterol im Vergleich zur apikalen Plasmamembran aus (Arvidson et al., 1989, Stein & Luzio et al, 1991; Carlini et al., 1997; Arienti et al., 1998a). Zusätzlich finden sich in den Proostasomen neben einer Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase auch verschiedene GPI-Anker gekoppelte Proteine wie z.B. die Alkalische Phosphatase. Aktin konnte als Strukturprotein in den Aposomen bzw. den ektozytotischen Vesikeln nachgewiesen werden. Zusätzlich ist Annexin II als Ektozytosemarker ebenfalls Bestandteil der ektozytotischen Blebs. Wiche (2001) konnte Annexin II zusätzlich in der apikalen Plasmamembran einer primären Koagulationsdrüsenepithelzelllinie nachweisen.

1.6 Zellkultursysteme der Rattenkoagulationsdrüse

Wiche (2001) gelang es, ein Zellkultursystem primärer Epithelzellen der Rattenkoagulationsdrüse (KDE-Zellen) zu etablieren. Dabei wurde gezeigt, dass die Epithelzellen bis Passage 23 vermehrt werden konnten, ohne ihre typische Morphologie zu verlieren. Die Polarität der Epithelzellen wurde durch den immunhistochemischen Nachweis von Occludin, als Marker der *Zonula occludens*, und E-Cadherin, als Marker der *Zonula adherens*, belegt. Neben dem Epithelzellmarker Zytokeratin konnte auch die Expression und Translation der apokrinen Markerproteine TGase und CAH II sowie des merokrinen 115 K-Proteins durch RT-PCR und Western Blot-Analytik nachgewiesen werden. Wie zuvor von Wilhelm et al. (1999) für das KD-Gewebe gezeigt, konnte ebenfalls keine Expression von Albumin in den Zellen detektiert werden.

1.7 Ziel der Arbeit

Wie eingangs beschrieben werden einige Proteine der KD über den apokrinen Sekretionsweg mittels so genannter Aposomen sezerniert. Bislang war wenig über den Aufbau der apikalen Plasmamembran bekannt und ob Proteine der apikalen Plasmamembran in die Aposomen integriert werden.

Das zentrale Anliegen dieser Arbeit bestand in der Identifizierung von Proteinen des apikalen Koagulationsdrüsenepithels bzw. der Aposomenmembran.

Dazu sollten zunächst Proteine, die bereits als Bestandteil der Prostatasomenmembran identifiziert werden konnten, auf ihr Vorkommen im KD-Epithel und den Aposomen überprüft werden. Neben KD-Gewebe sollten auch primäre Epithelzellen der KD verwendet werden. Hierbei ergaben sich folgende Fragen zu den potentiell identifizierten Proteinen:

- Welche Isoform(en) des identifizierten Proteins ist/sind vorhanden?
- Falls es sich bei dem identifizierten Protein um ein Enzym handelt: Welche Aktivität weist es auf? Ist die Aktivität durch Modulatoren beeinflussbar?
- Ist das Protein in der apikalen Plasmamembran der KD lokalisiert?
- Kann das Protein im aposomenhaltigen KD-Sekret bzw. in den Aposomen identifiziert bzw. lokalisiert werden?
- Hat Dihydrotestosteron (DHT) Einfluss auf die mRNA-Spiegel oder auf die Enzymaktivität des identifizierten Proteins?

Zur Identifizierung weiterer Proteine sollten apikale Plasmamembranproteine primärer KDE-Zellen mit Sulfo-NHS-Biotin markiert und apikale Plasmamembranen isoliert und aufgereinigt werden. Durch streptavidin-gekoppelte Dynabeads sollten biotinylierte apikale Proteine selektiert werden. Eine Identifizierung einzelner Proteine sollte durch N-terminale Sequenzierung erfolgen. Identifizierte Proteine sollten, wie oben beschrieben, charakterisiert werden.

Ektozytotische Blebs bzw. die Prostatasomenmembran verfügen über eine charakteristische Lipidverteilung mit einer starken Anreicherung von Cholesterol (Stein & Luzio et al, 1991; Carlini et al., 1997; Arienti et al., 1998a). Ein ähnliches Lipidspektrum besitzen Caveolae, die eine wichtige Rolle an vesikulären Transportprozessen von Proteinen wie Endozytose, Pinozytose u.ä. innehaben. Caveolin-1 ist neben der besonderen Lipidzusammensetzung ein weiteres Charakteristikum von Caveolae. Um

zu prüfen, ob die Möglichkeit besteht, dass Caveolae ebenfalls an der apokrinen Sekretion beteiligt sind, sollte zunächst die Caveolin-1 mRNA- und Proteinexpression in KD und KDE-Zellen überprüft werden. Außerdem sollte die subzelluläre Lokalisation von Caveolin-1 in den KDE-Zellen und im KD-Epithel untersucht werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Caveolin-1 mit dem aposomenhaltigen KD-Sekret abgegeben wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material und Versuchstiere

2.1.1 Reagenzien und Versuchsmaterial

Alle Chemikalien waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad und wurden, falls nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Gibco (Berlin), KMF (Sankt Augustin), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und USB (Bad Homburg). Die Enzyme wurden von Amersham-Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg) und Pan Systems (Nürnberg) bezogen. Markierte Antiseren und Sekundär-Antikörper wurden von DAKO (Hamburg), CAT (Rockland), Amersham-Pharmacia (Freiburg), BioAffinities (Golden, USA), Dianova (Hamburg), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) und Cappel (Durham, USA) erworben. Verschiedene Reagenziensätze stammten von Invitrogen (De Schelp, Niederlande) und Qiagen (Hilden). Die Trägermembranen stammten von Roche Diagnostics (Mannheim), Schleicher & Schuell (Dassel) und Pall BioSupport (Dreieich). Das Plastikverbrauchsmaterial wurde von Greiner (Nürnberg), Schleicher & Schuell (Dassel) und Eppendorf (Hamburg) geliefert. Gewebekulturflaschen wurden von Sarstedt (Nümbrecht), Lochplatten von Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Steriles Wasser wurde mit Hilfe einer Anlage der Fa. Membrapure (Bodenheim) hergestellt. Das Photomaterial zur Dokumentation stammte von Fuji (Düsseldorf), Kodak (Braunschweig), Pharmacia (Braunschweig) und Polaroid (Besier, Mainz).

2.1.2 Primärantikörper

Die folgenden Primärantikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

- α -PMCA-ATPase, monoklonal (Clone 5F10, Affinity Bioreagents, Golden, USA)
- α -PMCA1-ATPase, polyklonal (Affinity Bioreagents, Golden, USA)
- α -PMCA4-ATPase, polyklonal (Affintiy Bioreagents, Golden, USA)
- α -Annexin IV, polyklonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- α -Occludin, polyklonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- α -Caveolin, polyklonal (Bd Biosciences, Erembodegem)

2.1.3 Versuchstiere

Die benötigten Organe wurden adulten männlichen Wistar-Ratten (Charles River Wiga, Sulzfeld), die durch CO₂-Narkose und nachfolgende zervikale Dislokation getötet wurden, entnommen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Epon-fixierten Organe kastrierter bzw. östradiolbehandelter Tiere lagen bereits aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Isolierung und Kultivierung primärer Koagulationsdrüsenepithelzellen (KDE-Zellen) der Ratte

Primäre Epithelzellen der KD der Ratte wurden nach der Methode von Wiche (2001) isoliert und kultiviert. 50 Tage alte männliche Wistar Ratten wurden nach CO₂-Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Die entnommenen KDs wurden in Hanks-Balanced Salt Solution (HBSS) gesammelt und zweimal mit Kulturmedium (s.u.) gespült. Die Organe wurden mit einem Skalpell in ca. 10 mm³ große Stücke zerkleinert und in Collagen IV (Sigma) beschichteten 75 cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Das im Medium enthaltene Cholera-toxin unterdrückte das Wachstum stromaler Zellen, so dass ein selektives Wachstum epithelialer Zellen gewährleistet war. Nach 8 Tagen wurden die Zellen auf einen Mitomycin C behandelten Feederlayer aus 3T3-Fibroblasten (s. 2.2.1.3) überführt und in u.g. Medium kultiviert. Die Kultivierung auf einem Feederlayer erfolgte, um ein polares Wachstum der KDE-Zellen zu gewährleisten.

Medium für primäre KDE-Zellen:

- basal MCDB 153-Medium (Biochrom KG, Berlin)
- 5 % fötales Kälberserum (FKS)
- 0,292 mg/ml L-Glutamin
- 100 U/10 mg/ml Penicillin/Streptomycin
- 5 µg/ml Insulin
- 10 ng/ml EGF
- 10 ng/ml Cholera-toxin
- 3 ng/ml Hydrokortisol

2.2.1.2 Fraktioniertes Passagieren der KDE-Zellen ab Passage 1

KDE-Zellen, die ab Passage 1 auf einem Feederlayer von 3T3-Fibroblasten kultiviert werden, verdrängen diese mit zunehmender Konfluenz. Zur Abtrennung restlicher 3T3-Fibroblasten wurde ein modifiziertes Protokoll durchgeführt.

Das Medium wurde dekantiert und die Zellen 3 x mit PBS und 2 x mit PBS/1 % EDTA gespült. Zum Entfernen der 3T3-Zellen wurde die Ko-Kultur 30s bei 37 °C mit 40 µl Trypsin/EDTA -Lösung pro cm² inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die in der Kultur verbliebenen 3T3-Zellen abgetrennt und durch dreimaliges Spülen mit PBS/1 % EDTA entfernt. Die verbliebenen KDE-Zellen wurden für 2 min mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Durch kräftiges Klopfen wurden die KDE-Zellen gelöst und die Reaktion durch Zugabe von etwas Medium abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden mit Medium in ein Falconröhrchen überführt und 10 min bei 500 x g pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen auf einem 3T3 Feederlayer bzw. collagenierten Platten (Collagen Typ IV aus humaner Plazenta, Sigma) ausgesät.

2.2.1.3 Herstellung eines 3T3-Feederlayers

Murine 3T3-Fibroblasten wurden in MEM-Medium (Sigma) mit 10 % FKS und 100 U Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO₂ bis zu einer 10-20 %igen Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und Mediumreste durch dreimaliges Spülen mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) entfernt. Um die weitere Proliferation der Zellen zu hemmen, wurden sie bis zu 4 h mit 1-2 ml mitomycinhaltigem DMEM Medium (mit 100 U Penicillin/Streptomycin) inkubiert. Hierbei wurden je 8 µg des Mitosehemmers Mitomycin C pro ml Medium eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden 3 x mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) gespült und in ca. 20 ml MCDB 153-Medium pro Zellkulturflasche kultiviert. Im Anschluss an diese Behandlung wurden primäre KDE-Zellen auf dem Feederlayer ausgesät.

Passagieren der Zellen

Primäre KDE-Zellen bzw. 3T3-Fibroblasten wurden auf folgende Weise passagiert. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen 3 x mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) gespült. Im Anschluss wurde 40 µl Trypsin/EDTA-Lösung pro cm² für 2 min zugegeben

und bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Klopfen vom Untergrund gelöst und die Reaktion wurde durch Zugabe von etwas Medium abgestoppt.

Abgelöste Zellen wurden in ein Falconröhrchen überführt und bei 500 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen mit frischem Medium (MCDB 153-Medium für KDE-Zellen bzw. MEM-Medium für 3T3-Fibroblasten) versetzt und ausgesät.

Einfrieren von Zellen

KDE-Zellen bzw. 3T3-Fibroblasten wurden abtrypsiniert, pelletiert (s.o.), in 900 µl Medium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 2-4 h bei 4 °C wurden die Zellen mit 900 µl Einfriermedium (20 % (v/v) DMSO in Kulturmedium) versetzt, bei -80 °C eingefroren und nach 1-2 Tagen bei -196 °C gelagert.

Zellen auftauen

Sowohl KDE-Zellen als auch 3T3-Fibroblasten wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und durch kurze Inkubation bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 500 x g wurden die Zellen pelletiert, der Überstand wurde dekantiert und die Zellen mit frischem Medium versetzt und ausgesät.

2.2.1.4 Stimulation von KDE-Zellen mit Dihydrotestosteron (DHT)

Primäre KDE-Zellen der Passagen 7 bis 18 wurden in basalem MCDB 153-Medium mit 10 % FKS bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Das weitere Wachstum der Zellen erfolgte für 48 h in basalem MCDB 153-Medium, dem DHT in einer Konzentration von 10^{-8} bis 10^{-6} M zugesetzt wurde. Das in diesem Medium verwendete FKS war zuvor mit Aktivkohle behandelt worden, die die im Medium vorhandenen Hormone bindet. Nach der Stimulation wurden die Zellen zur Präparation von Mikrosomen (s. 2.2.2.2) bzw. zur Isolierung von RNA (s. 2.2.4.1) verwendet.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Entnahme von KD und Gewinnung von KD-Sekret

Männliche adulte Charles Wistar Ratten (250-300 g) wurden nach CO₂-Betäubung durch zervikale Dislokation getötet. Die KDs wurden entnommen und das ausgetropfte Sekret wurde in TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) aufgefangen.

2.2.2.2 Isolierung von Membranen aus KDE-Zellen und KD-Gewebe

Herstellung von Mikrosomen aus KDE-Zellen und KD-Gewebe nach Sikdar et al. (1991)

KD-Gewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in Homogenisierungspuffer (s.u.) mit einem Glasstab gepottert. Primäre KDE-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert, mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) gespült, abgeschabt, in Homogenisierungspuffer aufgenommen und ebenfalls mit einem Glasstab gepottert. Das Homogenat wurde jeweils 10 min bei 600 x g (4 °C) zentrifugiert, um ganze Zellen und Nuklei abzutrennen (Abb. 6). Die Überstände wurden gesammelt. Das Pellet wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut bei 600 x g für 10 min zentrifugiert. Durch Zentrifugation des gepoolten Überstandes bei 12.000 x g für 15 min, 4 °C, wurden weitere zelluläre Bestandteile abgetrennt. Mittels einer Ultrazentrifugation der erhaltenen Überstände bei 100.000 x g (70.1.Ti-Rotor, Sorvall), 4 °C, für 1 h wurden die vesikulären Mikrosomen sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde in Homogenisierungspuffer gelöst und bis zur Messung der Mg²⁺-abhängigen bzw. -unabhängigen Ca²⁺-ATPase-Aktivität bei -20 °C gelagert. Die erhaltenen Mikrosomen wurden außerdem in der Western Blot-Analyse eingesetzt.

Homogenisierungspuffer: 25 mM Imidazol; pH 7,5
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 250 mM Saccharose
 0,5 µg Leupeptin/ml Puffer

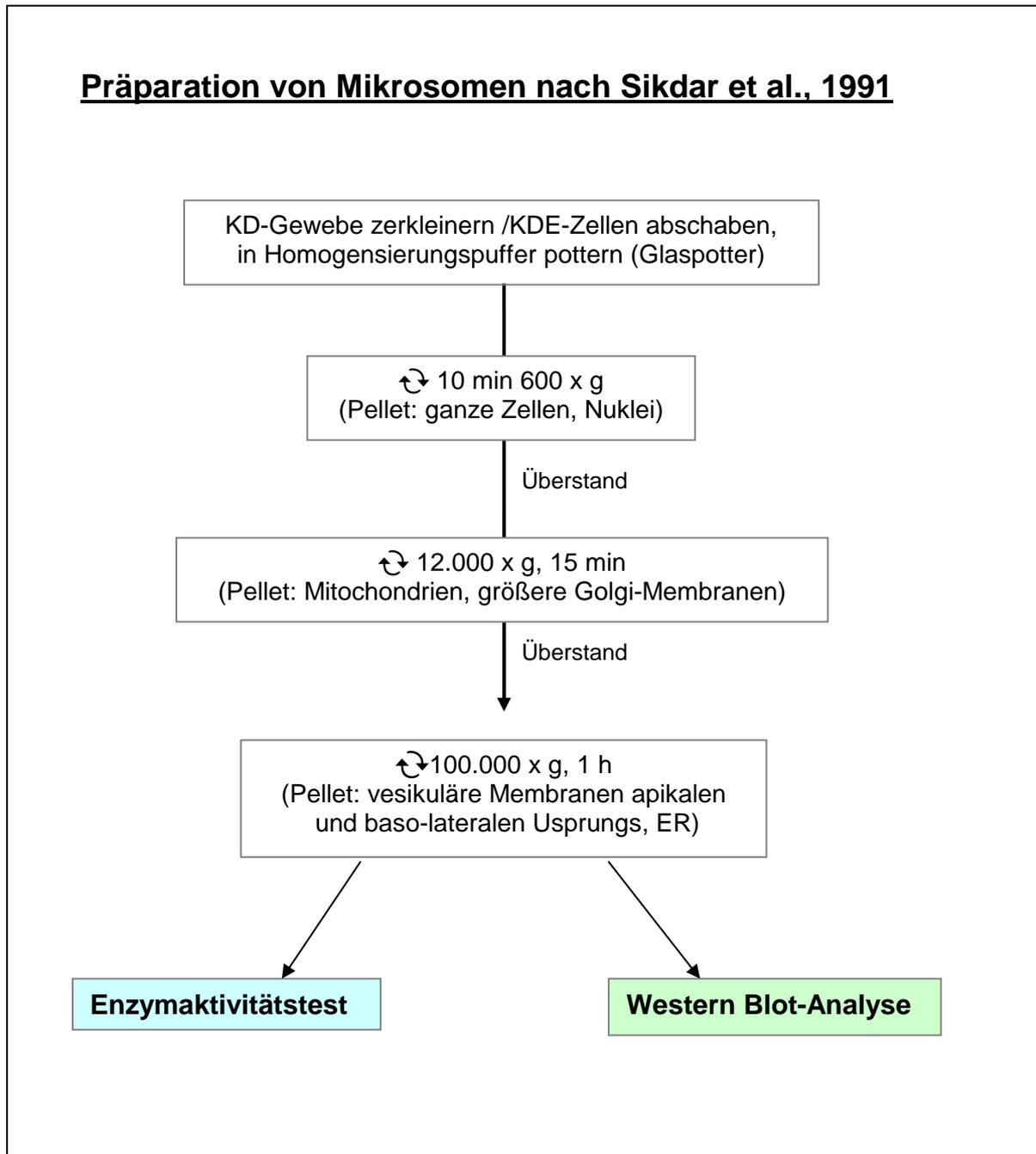


Abb. 6: Isolierung von Mikrosomen aus KD-Gewebe und KDE-Zellen nach Sikdar et al., 1991 (vereinfachte Darstellung)

2.2.2.3 Isolierung apikaler Plasmamembranen

Zur Trennung apikaler von baso-lateralen Plasmamembranen wurden zwei verschiedene Präparationsmethoden angewendet.

Biotinylierung apikaler Plasmamembranproteine

Die apikalen Membranproteine der primären KDE-Zellen wurden zunächst durch Sulfo-NHS-Biotin markiert, um (1) ihre Anreicherung während der Präparation verfolgen

zu können und um (2) apikale markierte Plasmamembranproteine durch streptavidin-gekoppelte Dynabeads zu reinigen.

Primäre KDE-Zellen wurden auf 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgegossen, die Zellen wurden 3 x mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) gespült und anschließend 2 x mit je 0,5 mg Sulfo-NHS-Biotin (Sigma) pro ml PBS für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Sulfo-NHS bindet unter Freisetzung von N-Hydroxysulfosuccinimid an Oberflächenproteine (primäre Amine).

Methode A: Differentielle Zentrifugation mit anschließender Aufreinigung über einen Saccharosegradienten (modifiziert nach Ellis et al., 1992)

Biotinylierte KDE-Zellen wurden mehrfach mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) gespült, abgeschabt und durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 500 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet in Homogenisierungspuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Glaspotters homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 3.000 x g zentrifugiert (Abb. 7). Das Pellet, das aus ganzen Zellen und Nuklei bestand, wurde verworfen. Dem Überstand wurde 1 M MgCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt und 15 min bei 4 °C inkubiert und 15 min bei 2.300 x g zentrifugiert und das Pellet verworfen. Durch Zentrifugation des Überstandes wurden apikale Epithelmembranen anschließend bei 100.000 x g für 60 min sedimentiert. Das erhaltene Pellet, das die Membranfraktion enthielt, wurde in Homogenisierungspuffer aufgenommen.

Die Membranfraktion wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (30 %, 35 %, 45 % w/v) geschichtet, wobei die oberste Schicht von der 30 %igen Saccharose gebildet wurde. Der Gradient wurde 2 h bei 100.000 x g in einem Swing-Out Rotor zentrifugiert. Danach wurden jeweils 1 ml Portionen von der obersten Schicht an gesammelt, und anschließend im Dot Blot (s. 2.2.2.4) die biotinylierten Fraktionen identifiziert.

Homogenisierungspuffer: 12 mM Tris/HCl; pH 7,4
 0,3 M Saccharose
 0,5 µg Leupeptin /ml Puffer

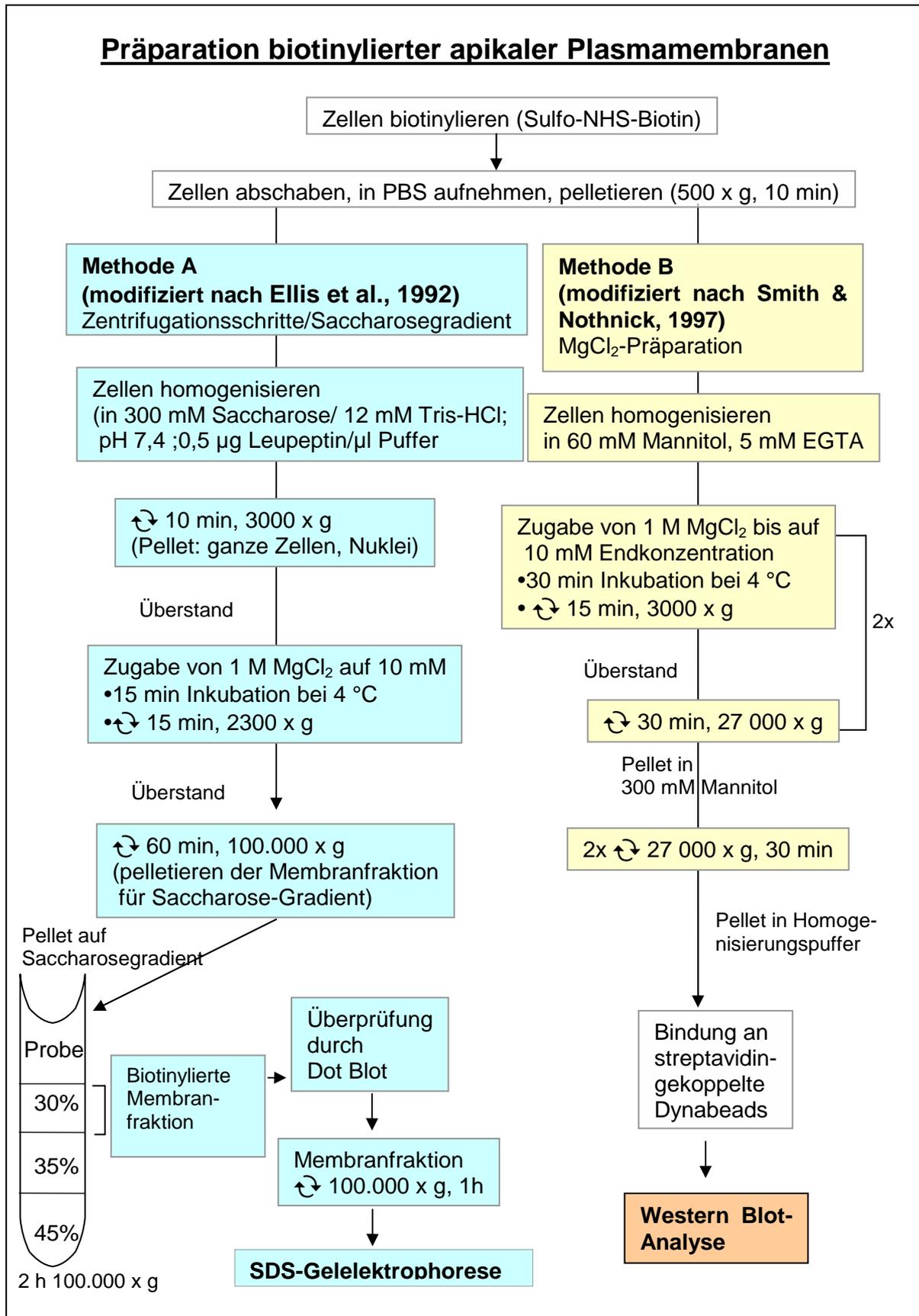


Abb. 7: Präparation biotinylierter apikaler Plasmamembranen nach Methode A und B

Methode B: MgCl₂-Präparationsmethode

Die Methode der differentiellen Membranpräzipitation (modifiziert nach Smith & Nothnick, 1997) macht sich die unterschiedliche Verteilung von Sialylsäureresten von Membranen zunutze. Membranen mit geringem Sialylsäuregehalt aggregieren nach Zugabe von Mg²⁺ und lassen sich durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit abtrennen. Apikale Epithelmembranen, die einen hohen Sialylsäuregehalt besitzen, formen dagegen Vesikel und lassen sich erst durch Zentrifugation mit hoher Geschwindigkeit pelletieren.

Puffer 1:	60 mM Mannitol 5 mM EGTA 1 µM PMSF; pH 7,4
Puffer 2:	60 mM Mannitol 7 mM EGTA 1 µM PMSF; pH 7,4
Puffer 3:	300 mM Mannitol; pH 7,4

KD-Gewebe bzw. biotinylierte KDE-Zellen wurden in 10 ml Puffer 1 mit einem Glaspotter homogenisiert. Durch die Inkubation mit 100 µl 1 M MgCl₂-Lösung für 30 min bei 4 °C wurden Membranen mit geringem Sialylsäuregehalt vernetzt und anschließend durch Zentrifugation bei 3.000 x g für 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde 30 min bei 27.000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer 2 gelöst und der Vorgang ab der MgCl₂-Zugabe wiederholt. Nach der letzten 30 minütigen Zentrifugation bei 27.000 x g, 4 °C wurde das Pellet, das die apikalen Epithelzellmembranen enthielt, in Puffer 3 gelöst. Die erhaltene Membranfraktion wurde an Dynabeads M-280 Streptavidin (s. 2.2.2.5) gebunden und in einer Western Blot-Analyse (s. 2.2.2.14) eingesetzt.

2.2.2.4 Dot Blot

Der Dot Blot diente dazu, die biotinylierte apikale Membranfraktion mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-(POX)-Komplexes unter den gesammelten Fraktionen des Saccharosegradienten zu identifizieren.

Zunächst wurde ein Aliquot (5 µl) jeder Fraktion auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µM; Schleicher & Schuell) getropft. Die Membran wurde luftgetrocknet und 30 min mit Rotiblock (Carl Roth GMBH, Karlsruhe) abgesättigt. Danach wurde die Membran 30 min mit einem Streptavidin-POX-Komplex (Pharmacia, 1:1000 in Rotiblock) inkubiert, 3 x 15 min mit Waschpuffer (s. 2.2.2.14) gewaschen und mit dem Chemilumineszenzsubstrat ECL (Amersham-Pharmacia, Freiburg) für 1 min benetzt. Durch Auflegen eines Röntgenfilms wurde das Ergebnis dokumentiert.

2.2.2.5 Isolierung apikaler Membranproteine durch streptavidin-gekoppelte Dynabeads

Die durch Methode B gewonnenen apikalen Plasmamembranen waren noch mit anderen, z.B. membran-assoziierten Proteinen verunreinigt. Zur weiteren Aufreinigung und Anreicherung der apikalen Membranproteine wurden streptavidin-gekoppelte Dynabeads verwendet.

Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna, Oslo) besitzen eine magnetische, polystyrene Matrix, an deren Oberfläche Streptavidin kovalent gebunden ist. 10 µg Protein wurden mit 100 µl Dynabeads M-280 versetzt und bei RT über Nacht in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in einem Dynal MPC-Magneten platziert, wodurch sich die magnetischen streptavidin-gekoppelten Dynabeads mit den daran gebundenen biotinylierten Proteinen von den nicht gebundenen Plasmamembranbestandteilen abtrennen ließen. Die so gewonnene, apikale biotinylierte Plasmamembranfraktion konnte durch 5 minütiges Erhitzen auf 95 °C in Probenpuffer (Laemmli, 1970) von den Dynabeads getrennt und anschließend in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.2.2.11) eingesetzt werden.

2.2.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch die Methode von Bradford (1976) ermittelt. Der Test basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 (Serva) bei Proteinbindung von 405 nm auf 595 nm. Diese Änderung kann photometrisch ermittelt werden. Als Standard wurde in 0,1 M NaOH gelöstes Ovalbumin verwendet.

20 µl Probe wurde mit je 1 ml Coomassie Blau G-250-Lösung versetzt und nach 10 min Inkubation bei RT inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer (Utrospec[®] III, Pharmacia, Freiburg) gegen einen Leerwert bestimmt. Für den Leerwert wurde jeweils die Proteinlösung durch den jeweiligen Puffer, in dem das Protein gelöst war, ersetzt. Anhand der Ovalbumin Eichkurve konnte jedem Extinktionswert eine Proteinkonzentration zugeordnet werden.

Coomassie Blau G-250:	100 mg Coomassie Blau G-250
	50 ml Ethanol
	100 ml 85 % (w/v) H ₃ PO ₄
	ad 1000 ml Aqua dest.

2.2.2.7 Bestimmung der Mg²⁺-abhängigen und -unabhängigen Ca²⁺-ATPase-Aktivität nach Sikdar et al. (1991)

Die Mg²⁺-abhängige bzw. -unabhängige Ca²⁺-ATPase spaltet ATP unter Freisetzung eines inorganischen Phosphates (P_i) zu ADP. Das freigesetzte P_i kann durch Zugabe von Ammoniummolybdat und Ascorbinsäure komplexiert und bei 820 nm kolorimetrisch bestimmt werden.

5-15 µg Mikrosomen (präpariert nach Sikdar et al., 1991) aus KDE-Zellen und KD-Gewebe bzw. 50 µg KD-Sekret wurde in einem Reaktionsvolumen von 250 µl mit dem Reaktionspuffer (Mg²⁺-abhängig: Histidin-Puffer/ Mg²⁺-unabhängig: Imidazol-Puffer) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 3 mM ATP gestartet. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 µl 30 %iger eiskalter TCA gestoppt und 550 µl Aqua dest. zugesetzt. Durch das Hinzufügen von je 100 µl 2 %iger Ascorbinsäure sowie 1,75 %igem Ammoniummolybdat erfolgte die Komplexierung des freigesetzten anorganischen Phosphates (P_i). Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und das komplexierte P_i bei 820 nm im Photometer gemessen. Die ermittelte Ca²⁺-ATPase-Aktivität ergab sich jeweils aus der Differenz der gemessenen Werte mit und ohne CaCl₂-Zugabe. Endogenes Ca²⁺ wurde dabei durch im Puffer befindliches EDTA komplexiert. Mittels einer KH₂PO₄ Standardkurve konnte für jeden Extinktionswert bei 820 nm das freigesetzte P_i als µmol P_i/mg Protein/h errechnet werden.

Mg²⁺-abhängige Ca²⁺-ATPase:

Histidin-Puffer: 54,5 mM Histidinhydrochlorid; pH 7,5
1 mM EDTA
25 mM Saccharose
0,1 mM DTT
1 mM MgCl₂
4 mM CaCl₂

Mg²⁺-unabhängige Ca²⁺-ATPase:

Imidazol-Puffer: 50 mM Imidazol; pH 8,5
0,1 mM EDTA
25 mM Saccharose
0,1 mM DTT
4 mM CaCl₂

Folgende Modulatoren der Mg²⁺-abhängigen bzw. -unabhängigen Ca²⁺-ATPase wurden verwendet:

Nifedipin (0,5 bzw. 0,25 mM; Sigma), Verapamil (0,1 bzw. 0,2 mM, Sigma), Trifluorperazin (TFP; 0,5 bzw. 0,25 µM, Sigma), Calmodulin (5 bzw. 10 Units, Sigma).

Die sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase (SERCA) wurde durch Zugabe von Thapsigargin (Sigma; 0,2 bzw. 0,1 µM) spezifisch gehemmt.

2.2.2.8 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität

In Mikrosomen der KD und in KD-Sekret:

Je 15 µg Protein aus KD-Mikrosomen (präpariert nach Sikdar et al., 1991) bzw. 50 µg KD-Sekretprotein wurde mit Reaktionspuffer auf ein Volumen von je 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Substratpuffer versetzt. Nach jeweils 30, 60, 90, 120 und 180 min wurde die Extinktion bei 405 nm bestimmt. Als Referenz wurde eine Standardkurve mit Alkalischer Phosphatase aus humaner Plazenta (Sigma) erstellt. Als spezifischer Inhibitor der AP diente Levamisol (Sigma) in einer Konzentration von 1 mM.

Auf primären KDE-Zellen:

Primäre KDE-Zellen wurden in einer 96-Lochplatte mit je 100 µl MCDB 153-Medium für 48 h kultiviert. Das Medium wurde in einer 96-Lochplatte gesammelt und je 100 µl

Substratpuffer zugegeben. Die Zellen wurde 3 x mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) gespült und ebenfalls anschließend mit je 100 μl Substratpuffer pro well versetzt. Beide Platten wurden bei 37 °C inkubiert und die Aktivität der AP im Zeitraum von 30 min bis zu 24 h bei 405 nm im Photometer bestimmt. Zur spezifischen Hemmung der AP diente Levamisol (Sigma) in einer Konzentration von 1 mM.

Reaktionspuffer:	0,1 M Glyzin 1 mM MgCl_2 1 mM ZnCl_2 ; pH 10,4
Substratpuffer:	1 mg pNPP/ml Reaktionspuffer

Hitzeinaktivierung der Alkalischen Phosphatase

Durch eine Hitzeinaktivierung bei 56 °C können hitzelabile von hitzestabilen AP-Isoformen unterschieden werden.

Je 50 μg KD-Mikrosomen (präpariert nach Sikdar et al., 1991) bzw. KD-Sekret wurden 0-60 min bei 56 °C inkubiert und anschließend einem AP-Aktivitätstest wie beschrieben unterzogen.

2.2.2.9 Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase mittels NBT/BCIP

Für den histochemischen Nachweis der AP wurden KDE-Zellen bzw. Kryostatschnitte der KD wie folgt vorbehandelt.

KDE-Zellen:

KDE-Zellen wurden in 24-Lochplatten auf Collagen-IV beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen 3 x mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) gespült und anschließend für 10 min in 4 %iger Paraformaldehydlösung (in PBS) fixiert. Die Zellen wurden erneut 3 x mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

KD-Gewebe:

7 μm dicke Kryostatschnitte wurden nach der Methode 2.2.3.2 angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden zunächst luftgetrocknet und anschließend für 6 h in 4 %iger PFA-Lösung (in PBS) fixiert. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen.

Für den histochemischen AP-Nachweis wurden sowohl die vorbehandelten Zellen als auch die Gefrierschnitte für 10 min mit 0,2 % Tween 20 in PBS inkubiert, wodurch die nachweisbare AP-Aktivität gesteigert werden soll. Danach folgte 10 minütiges Spülen in PBS. Die Gewebeschnitte bzw. die Zellen wurden danach mit NBT/BCIP-Reagenz gefärbt. Die Reaktion erfolgte im Dunkeln. Durch Zugabe von PBS/25 mM EDTA/5 mM Levamisol wurde die Reaktion gestoppt. Zusätzlich wurde als Kontrolle Levamisol in einer Konzentration von 5 mM dem NBT/BCIP-Reagenz zugesetzt.

Reaktionslösung:	50 µl NBT (0,33 mg/ml) 37,5 µl BCIP (80,17 mg/ml) auf 10 ml Reaktionspuffer
Reaktionspuffer	100 mM Tris-Cl 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ ; pH 9,5

2.2.2.10 Bestimmung der Aktivität der Neutralen Endopeptidase (NEP) nach Albrecht et al. (2002)

KDE-Zellen wurde in 96-Lochplatte bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 2fach mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) gespült. Anschließend wurden 200 µl Tris-HCl-Puffer, 20 µl Substrat und 10 µl Aminopeptidase M zugefügt. Nach 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 60 µl einer 50 %igen TCA gestoppt. Anschließend wurde der Farbumschlag bei 405 nm im ELISA Reader bestimmt.

Reaktionsansatz:	200 µl Tris-HCl (100 mM; pH 7,6) 10 µl Substrat (Suc-Ala-Ala-Phe-PNA; 20 mM) in DMSO 10 µl Aminopeptidase N (Enzymlösung: EC 3.4.11.2)
------------------	--

2.2.2.11 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Die Wanderung der Proteine von der Kathode zur Anode in einem elektrischen Feld wird durch deren Bindung an SDS-Anionen ermöglicht, wobei die Eigenladung der Proteine kompensiert wird und stark negativ geladene Komplexe entstehen. Die Pro-

teine werden zunächst durch ein Gel mit geringer Acrylamidkonzentration (Sammelgel) an einer Lauffront gesammelt, um anschließend in einem so genannten Trenngel der Größe nach aufgetrennt zu werden. Die Porengröße des jeweiligen Gels, die durch den Acrylamid/NN´Bisacrylamid-Gehalt bestimmt wird, ist für den Grad der Auftrennung verantwortlich (Tab. 5).

Gelherstellung

5 ml Trenngellösung wurde mit 2,5 µl TEMED und 25 µl APS versetzt und in die vorbereitete Mini-Gelkammer (6 x 8 cm x 1mm; Keutz) gefüllt. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Gelkante zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 30 min) wurde das Isopropanol verworfen und mit Aqua dest. nachgespült. 1 ml Sammelgel wurde mit 1 µl TEMED und 5 µl 10 %igem APS vermischt, auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingefügt. Die Polymerisation des Trenngels erfolgte über Nacht. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Tab. 5 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Gellösungen wieder.

Tab 5: Zusammensetzung der für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendeten Gellösungen

Sammelgel: 5 ml		Trenngel: 10 ml			
Acrylamidkonzentration	4 %	Acrylamidkonzentration	7,5 %	10 %	13 %
28,2 % Acrylamid/ 0,8 % N,N´Bisacrylamid (w/v) (Rotiphorese 30, Roth)	0,65 ml	28,2 % Acrylamid/0,8 % N,N´Bisacrylamid (w/v) (Ro- tiphorese 30, Roth)	2,5 ml	3,34 ml	4,33 ml
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8	1,25 ml	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS (w/v)	50 µl	10 % SDS-Lsg. (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
Aqua dest.	3 ml	Aqua dest.	4,9 ml	4,01 ml	3,07 ml
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
10 % APS (w/v)	25 µl	10 % APS (w/v)	50 µl	50 µl	50 µl

Probenpuffer:

4 ml Aqua dest.
1 ml 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8
0,8 ml Glycerin
1,6 ml 10 % (w/v) SDS
200 µl 0,05 % Bromphenolblau in Aqua dest.
640 mg Dithioerytriol (DTE)

Die denaturierten Proben wurden in die vorbereiteten Geltaschen gefüllt. Zusätzlich wurden Eichproteine (Biorad, München) mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen, um eine Größenordnung zu ermöglichen. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug ca. 50 min bei 200 V (konstant).

Im Anschluss wurden die Proteinbanden entweder mit Coomassie bzw. Silbernitrat gefärbt oder die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert.

Elektrophoresepuffer:	25mM Tris
	186 mM Glyzin
	3,5 mM SDS

2.2.2.12 Coomassiefärbung von Proteingelen

Die Proteinbanden wurden nach der Elektrophorese 30 min bei 65 °C in Coomassielösung gefärbt. Die Lösung wurde gegen den Entfärber ausgetauscht und das Gel weiterhin bei 65 °C inkubiert. Der Entfärber wurde mehrfach gewechselt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Coomassiefärbelösung:	0,1 % Coomassie-Blau R-250
	40 % Methanol
	10 % Essigsäure

Entfärbelösung:	40 % Methanol
	10 % Essigsäure
	0,5 % CuSO ₄

2.2.2.13 Silbernitratfärbung von Proteingelen

Die Silbernitratfärbung dient der Sichtbarmachung von Proteinmengen von unter 20 ng in einem SDS-Gel. Das Proteingel wurde mindestens 10 min in 10 %iger TCA (w/v) fixiert. Anschließend wurde das Gel 3 x 10 min in 30 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach der Vorbehandlung mit 0,02 % Natriumthiosulfat-Pentahydrat (w/v) für 1 min wurde das Gel 3 x mit Aqua dest. gespült und danach 10 min mit 0,2 % AgNO₃-Lsg. (w/v) inkubiert. Darauf folgten 2 Waschschrte mit Aqua dest.. Durch die Zugabe von 6 % Na₂CO₃ (w/v) mit 50 µl 37 % Formaldehyd (v/v)/100 ml Lsg. wurde

das Gel 1-5 min entwickelt. Die Reaktion wurde mit 10 %iger Essigsäure (v/v) gestoppt.

2.2.2.14 Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western Blot)

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Trägermembran mit anschließender Detektion von Proteinen durch Antikörper wird Western Blot genannt. Hierbei werden die durch ihre Bindung an SDS-Anionen negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld auf eine Trägermembran mit hoher Proteinaffinität übertragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Kathodenpuffer equilibriert und der Blot wie folgt aufgebaut (Abb. 8).

Kathodenpuffer:	40 mM Amino-n-Caprinsäure 25 mM Tris 20 % Methanol
Anodenpuffer:	30 mM Tris 20 % Methanol
konz. Anodenpuffer:	300 mM Tris 20 % Methanol
Ponceau S Lsg.:	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (w/v) Trichloressigsäure

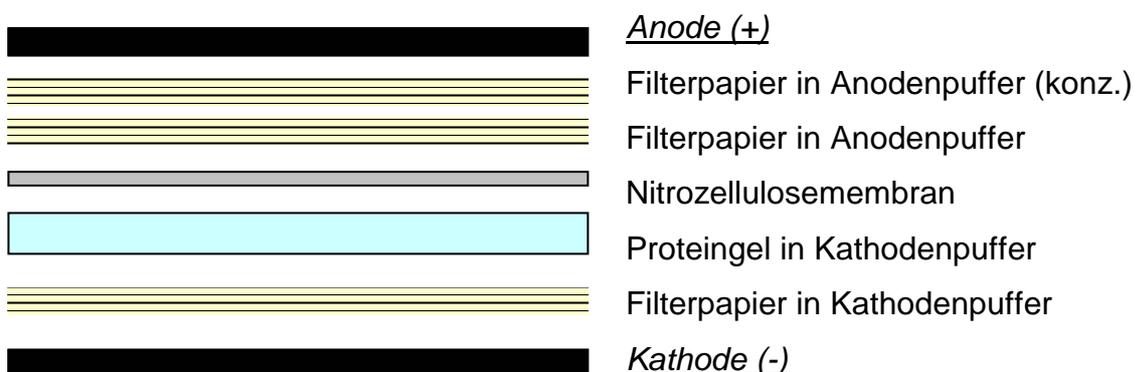


Abb. 8: Schematische Darstellung des Blotaufbaus zum Proteintransfer

Dabei wurde besonders auf die Vermeidung von Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten geachtet, so dass ein vollständiger Transfer der Proteine aus dem Gel auf

die Membran gewährleistet war. Die Proteine wurden bei Raumtemperatur für 1-1,5 h mit 0,8 mA pro cm² Gel geblottet. Im Anschluss daran wurde der Proteintransfer kontrolliert. Dazu wurde die Membran 2-3 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. entfärbt. Die Membran wurde in Roti-Block (Roth) überführt und 30 min bei RT inkubiert, um unspezifische potentielle Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Darauf folgte die Inkubation des Blots mit einem Primärantikörper über Nacht in einer feuchten Kammer. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für jeweils 20 min mit Waschpuffer entfernt. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT mit einem POX-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und in Folge nochmals mit Waschpuffer gewaschen (3 x 20 min). Der Nachweis des Immunkomplexes erfolgte mit dem "enhanced chemiluminescence system" (ECL, Amersham-Pharmacia, Braunschweig). Das in der POX-Reaktion freigesetzte Sauerstoffradikal (O₂²⁻) reagierte dabei mit Luminol. Durch ein Verstärkersystem kam es am Ort der Immunreaktion zur Emission von Licht, welches durch Auflage eines Röntgenfilms (Hyperfilm-ECL) für 20 s bis maximal 60 min detektiert wurde. Tab. 6 gibt Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper und ihre Gebrauchsverdünnungen.

Waschpuffer:	0,5 M Tris
	1,25 M NaCl
	14,8 mM EDTA
	0,25 % Tween 20

Tab. 6: In der Western Blot-Analyse verwendete Antikörper und ihre Gebrauchs-konzentrationen

Western Blot-Analyse			
Primär-AK	Verdünnung	Sekundär-AK	Verdünnung
α-PMCA (Klon 5F10) monoklonal, Maus (BioAffinities, USA)	1:1000	α-Maus-POX (Pierce)	1: 7 000
α-PMCA1 polyklonal, Kaninchen (BioAffinities, USA)	1:1000	α-Kaninchen-POX (Pierce)	1: 7 000
α-PMCA4 polyklonal, Maus (BioAffinities, USA)	1:1000	α-Maus-POX (Pierce)	1: 7 000
α-Caveolin polyklonal, Kaninchen (Bd Biosciences, USA)	1:5000	α-Kaninchen-POX (Pierce)	1:50 000

2.2.2.15 Transfer von Proteinen auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran mit anschließender N-terminaler Sequenzierung

Zur N-terminalen Sequenzierung wurde die apikale Plasmamembranfraktion nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die Membran vor dem Transfer zunächst kurz in reinem Methanol equilibriert. Der Proteintransfer erfolgte gemäß 2.2.2.14. Nach dem Transfer wurde die Membran nochmals in reinem Methanol inkubiert und anschließend für 1-2 min in Coomassie-Färbelösung für PVDF-Membranen gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 50 %igem Methanol. Anschließend wurde die Membran über Nacht in A dest. gespült, um überschüssige Salze zu entfernen. Danach wurden Proteinbanden ausgeschnitten und von Prof. Lottspeich (MPI, Martinsried) N-terminal ansequenziert.

Coomassie PVDF:	0,1 % Coomassie Blue R-250 7 % Essigsäure (v/v) 50 % Methanol
-----------------	---

Entfärber PVDF:	50 % Methanol
-----------------	---------------

2.2.3 *Morphologische Methoden*

2.2.3.1 Herstellung von Semidünnschnitten

Diese Methode wurde für Semidünnschnitte verwendet. Zunächst wurden KDs wie unter 2.2.2.1 entnommen. Die Drüsen wurden für 3 h in Ito-Karnovsky-Fixans bzw. für die Immunreaktion in Immunfixans fixiert, 3 x 5 min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und für 1-2 h osmiert. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50 %, 70 %, 90 %, 96 %, Isopropanol 100 %) wurde das Gewebe 2 x 10 min in Propylenoxid inkubiert. Anschließend erfolgte eine Infiltration in Propylenoxid/Epongemisch (1:1) für 2 h und eine Inkubation in Epongemisch über Nacht. Nach der Einbettung in Gelatine kapseln mit frischem, entgastem Epon 812-Gemisch erfolgte die Polymerisation bei 60 °C für 24 h.

Cacodylatpuffer :	0,1 M Na-Cacodylat; pH 7,3
-------------------	----------------------------

Immunfixans:	2,0-4,0 % Paraformaldehyd 0,1-0,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer; pH 7,3
--------------	---

Lösung nach Ito & Karnovsky (1968):

1,25 % Paraformaldehyd
2,5 % Glutaraldehyd
0,05 % Pikrinsäure
0,1 M in Cacodylatpuffer; pH 7,3

Osmierung:

3,0 % Kaliumferrozyanat
2,0 % OsO₄
Verhältnis 1:1 in Aqua dest.

Die Präparate wurden unter der Stereolupe trapezförmig angetrimmt, 1 µm dicke Schnitte mit einem Glasmessermikrotom angefertigt und auf Objektträger mit einem Tropfen Aqua dest. überführt. Schnitte für die Übersichtsfärbung wurden bei -80 °C getrocknet und 10 s in Toluidinblau-Farblösung auf der Heizplatte (85 °C) inkubiert. Nach Spülen in Aqua dest. erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Präparate. Die Schnitte für die Immunreaktionen wurden bei 37 °C getrocknet.

2.2.3.2 Herstellung von Kryostatschnitten

250-300 g schwere männliche Wistar Ratten wurden nach CO₂-Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Die entnommenen KDs wurden in Trockeneis gekühltem Isopentan schockgefroren. Die gefrorenen Gewebestücke wurden mit Tissue Tec (Miles, USA) auf einem Metallträger befestigt und in die Klammervorrichtung des Kryostaten (Jung, Frigocut 2800 E, Heidelberg) eingespannt. 5 µm dicke Kryostatschnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Super Frost Plus, Firma Menzel, Braunschweig) aufgebracht und bei -20 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz an primären KDE-Zellen und Kryostatschnitten der KD

Immunfluoreszenz an KDE-Zellen

Primäre KDE-Zellen wurden 3-8 Tage auf Collagen beschichteten Glasplättchen kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen 3 x mit PBS gespült. Die Zellen wurden 5 min mit 100 % Methanol fixiert und anschließend luftgetrocknet. Durch die nachfolgende 5 minütige Behandlung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS wurden die Zellen durchlässiger. Daraufhin wurden unspezifische Antikörperbindungs-

stellen für 1 h bei RT mit Roti-Block abgesättigt, gefolgt von einer Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Danach wurden die Zellen 3 x gewaschen (2 x mit PBS; 1 x mit PBS/0,1 % Tween 20) und anschließend für 1 h mit einem Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen nochmals gespült (s.o.). Die Glasplättchen wurden aus den Gewebekulturschalen herausgenommen, kurz mit Aqua dest. gespült und mit Propylgalat auf Objektträgern eingedeckt. Es wurden die in Tab. 7 beschriebenen Antikörper verwendet.

Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

20 µm dicke Kryostatschnitte wurden zunächst luftgetrocknet, danach in eiskaltem 100 %igem Methanol für 5 min fixiert und wiederum getrocknet. Die weitere Behandlung erfolgte wie an den Zellen.

Tab. 7: In der Immunfluoreszenz verwendete Primär- und Sekundär-AK mit den entsprechenden Verdünnungen

Immunfluoreszenz			
Primär-AK	Verdünnung	Sekundär-AK	Verdünnung
α-PMCA (Klon 5F10) (monoklonal, Maus) (BioAffinities)	1:100	α-Maus-Cy3 (DAKO)	1: 1 000
α-PMCA1 (polyklonal, Kaninchen) (BioAffinities)	1:100	α-Kaninchen-Cy3 (DAKO)	1: 1 000
α-PMCA1 (polyklonal, Kaninchen) (BioAffinities)	1:100	α-Kaninchen-Cy2 (DAKO)	1:50
α-PMCA4 (polyklonal, Kaninchen) (BioAffinities)	1:100	α-Maus-Cy3 (DAKO)	1: 1 000
α-Occludin (polyklonal, Ziege) (Santa Cruz)	1:200	α-Ziege-Cy3 (DAKO)	1:1 500
α-Caveolin (polyklonal, Kaninchen) (Bd Biosciences)	1:200	α-Kaninchen-Cy3 (DAKO)	1:1500

2.2.3.4 Doppelfluoreszenz-Markierung von KDE-Zellen

Analog zur indirekten Immunfluoreszenz an Zellen bzw. Gewebeschnitten können durch die Verwendung von Antikörpern, die in unterschiedlichen Spezies hergestellt wurden, auch mehrere Antigene simultan auf demselben Präparat detektiert werden. Hierzu wurde zunächst ein Primärantikörper A nachfolgend mit dem dazu passenden z.B. Cy3-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Ein weiterer Primärantikörper B

aus einer anderen Spezies wurde mit dem passenden z.B. Cy2 markierten Sekundärantikörper detektiert. Beide Antigene wurden im Fluoreszenzmikroskop mit der entsprechenden Wellenlänge des jeweiligen Fluorochroms lokalisiert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung mit TRIZOL

Aus KD-Gewebe und Gehirn der Ratte sowie aus primären KDE-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert. Die Isolierung der Gesamt-RNA folgte dem Prinzip der optimierten Guanidiniumthiocyanat/Phenol-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987). Die Trennung von RNA und DNA beruht auf dem unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten beider Nukleinsäuren in organischen Lösungsmitteln bei saurem pH-Wert. Dabei kommt es zur Auftrennung in drei Phasen, wobei die Gesamt-RNA die Fähigkeit besitzt, sich noch bei relativ saurem pH-Bereich (pH 4 - pH 4,2) in der oberen wässrigen Phase aufzuhalten. Die DNA dagegen befindet sich in der unteren Phenol-Chloroform-Phase. Die Interphase wird von Proteinen gebildet.

Für die RNA-Isolierung aus Zellen wurde zuerst das Medium entfernt, die Zellen 3 x mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml TRIZOL pro 75 cm^2 -Flasche versetzt, abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einer Insulinspritze mehrfach aufgezogen. Tiefgefrorenes Gewebe (je 50-100 mg Rattenhirn bzw. Rattenkoagulationsdrüse) wurde mit 1 ml Trizol gemörsert. Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung wurde durch Zugabe von 250 μl Chloroform bewirkt. Nach 15 s kräftigem Schütteln wurde die Probe für 10-15 min bei 12 000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Die obere RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. An dieser Stelle wurde ein DNase I-Verdau integriert, um evtl. Verunreinigungen durch genomische DNA zu eliminieren.

DNase -Verdau:

Ansatz pro 500 μl wässrige Phase:

- 60 μl 10 x DNase I-Puffer
- 5 μl RNase-Inhibitor (40 U/ μl)
- 20 μl DNase I (10 U/ μl , Promega)
- 15 μl Aqua dest. steril

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um Salze und Enzymreste aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde die Probe 2 x mit 600 µl Chloroform extrahiert und 15 min bei 12 000 x g, 4 °C, zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol 10 bis 15 min bei 4 °C präzipitiert. Die RNA wurde durch eine Zentrifugation bei 12 000 x g, 4 °C, für 30 min pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und unter Luftstrom getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 50-100 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Spektrometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Reinheit und Menge der erhaltenen RNA lässt sich durch eine photometrische Messung bestimmen, da Nukleotide substituierte Aromate darstellen, deren mittleres Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Bei einer optischen Dichte von 1 liegen in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm 50 µg/ml doppelsträngige DNA vor, 40 µg/ml einzelsträngige DNA oder RNA und 33 µg/ml Oligonukleotid. Die Reinheit der RNA ist über das Verhältnis von A₂₆₀ nm/A₂₈₀ nm bestimmbar. Im Idealfall (100 % RNA) sollte dieses Verhältnis 2:1 betragen. Ist der hierbei ermittelte Faktor > 2, so enthält die Probe Phenolverunreinigungen, bei Werten < 1,6 kann man von Proteinverunreinigungen ausgehen. Phenol kann durch eine nochmalige Chloroformextraktion entfernt werden. Bei Proteinverunreinigungen sollte die Probe nicht mehr verwendet werden.

2.2.4.3 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Reverse Transkription

Durch reverse Transkription wird nach Anlagerung spezifischer Primer mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase vom 3'Ende einer mRNA eine cDNA synthetisiert. Je 2,5 µg DNase I behandelte Gesamt-RNA wurde mit 2 µg Oligo dT Primer (Promega) versetzt, mit Aqua dest. auf ein Reaktionsvolumen von 22 µl aufgefüllt und 10 min bei 70 °C inkubiert und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von u.g. Reaktionsansatz wurde die Probe 2 min bei 42 °C inkubiert und mit 1 µl reverser Transkriptase (200 U, M-MLV RNase H-minus, Promega) versetzt. Anschließend wurde die Probe für 50 min bei 42 °C inkubiert.

Reaktionsansatz: 4 µl 5 x RT-Puffer (Promega)
 1 µl dNTP Mix (ACGT, je 10 mM; Promega)
 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl, Promega)

AMOC-Verfahren zur Erhöhung der cDNA-Ausbeute

Das AMOC-Verfahren ("arithmetic multiplication of cDNA") ist eine Methode, um die cDNA-Ausbeute nach der reversen Transkription deutlich zu erhöhen (Mangan & Butcher, 1993). Der Gesamtansatz der aus der reversen Transkription erhaltenen cDNA wurde bei 85 °C für 10 min und anschließend bei 95 °C für 3 min inkubiert. Dann wurde die Probe für mindestens 2 min auf Eis gestellt, bevor 100 U einer reversen Transkriptase (M-MLV RNase H-minus, Promega) zugegeben wurden. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 42 °C inkubiert.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Im Anschluss an einen RT-Schritt wird sie zur Amplifizierung des erhaltenen Erststranges genutzt.

Reaktionsansatz: 5 µl 10 x PCR-Puffer (Pan Systems)
 1 µl dNTP Mix (ACGT, je 10 mM; Promega)
 2 µl MgCl₂ (2 mM, Pan Systems)
 1 µl 3' Primer (50 pmol, EUROGENTECH)
 1 µl 5' Primer (50 pmol, EUROGENTECH)
 0,25 ml Taq-Polymerase (2 U, Pan Systems)

Jeweils 2 µl cDNA wurde in einem Volumen von 50 µl in einem PCR-Thermocycler (Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany) amplifiziert: Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C erfolgte das Annealing (Anlagerung) der Primer bei der primerspezifischen Temperatur und Zeit. Danach erfolgte ein Prolongationsschritt bei 72 °C für 45 s. Die abschließende Endstrangsynthese wurde bei 72 °C für 5 min durchgeführt. Nach Abschluss der Reaktion wurden 10 - 20 µl des PCR-Produkts in einer Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde jeweils eine PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt; als Negativkontrolle diente jeweils eine Probe ohne cDNA.

Oligonukleotidprimer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer wurden jeweils mit dem Programm Primer 3 von Rosen & Skaletzky (1998) ausgewählt und anschließend mit Hilfe von BLAST (NCBI) auf mögliche homologe Sequenzen überprüft. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden, falls nicht anders angegeben, für die Spezies Ratte konzipiert. Tab. 8 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer.

Tab. 8: In der PCR verwendete Primerpaare

Gen	Oligonukleotidsequenz	Lokalisation Fragment- größe	Anlage- rungs- temperatur und -zeit	Zyklus- zahl
GAPDH (Tso et al., 1985)	5'-CAT TGT TGC CAT CAA CGA CC-3' 5'-TCA CAC CCA TCA CAA ACA TG-3'	111-431 320 bp	55 °C 30 s	24
PMCA1 (Shull & Greeb, 1988)	5'-CCG CCA AAT ATC CTG TCC TA -3' 5'-ATC TCA GAT GCA CCC TTG CT -3'	1783-2081 299 bp	60 °C 30 s	28-35
PMCA2 (Shull & Greeb, 1988)	5'-GAC AGC CAC TTG GGA AAA GA -3' 5'-CCC CAA ACC AAT CAA ACA AC -3'	1867-1867 346 bp	60 °C 30 s	30-35
PMCA3 (Shull & Greeb, 1988)	5'-CAA TGG ZGA ACT CCG AGG AT -3' 5'-GAT GCC ACA CTT AGC TGC AA -3'	2498-2816 319 bp	60 °C 30 s	30-35
PMCA4 (Keeton & Shull, 1995)	5'-CGA GGT CGA ACA AGA AAA GC -3' 5'-GAT GCA GGC TCC AGA GAA AG -3'	2375-2759 385 bp	60 °C 30 s	31-35
Alkalische Phosphatase (Noda et al., 1987)	5'-GCA CAA CAT CAA GGA CAT CG-3' 5'-AGG GAA GGG TCA GTC AGG TT-3'	629-928 300bp	60 °C 30 s	33-35
NEP (human) (Papandreou et al., 1998)	5'-TGT GGC CAG ATT GAT TCG TC-3' 5'-TTG TAG GTT CGG CTG AGG CT-3'	764-1174 410 bp	55 °C 30 s	35
Androgen-R (Misumi et al., 1988)	5'-GCC AGT GCG TGA GGA TGA G -3' 5'-GGT GAG CTG GTA GAA GCG C -3'	236 bp	55 °C 30 s	30
Caveolin 1 α (Vinten et al., 1994)	5'-ATGTCTGGGGGTAATACGTAGA-3' 5'-CTATATCTCTTCCTGCGTGCTG-3'	1-537 537 bp	60 °C 45 s	30
Caveolin 1 β (Vinten et al., 1994)	5'-ATGGCAGACGAGGTGAATG-3' 5'-CTATATCTCTTCCTGCGTGCTG-3'	1-444 444 bp	60 °C 45 s	30

Semi-quantitative RT-PCR

Die Methode der semi-quantitativen PCR dient der Quantifizierung von Nukleinsäuren. In dieser Arbeit wurde sie verwendet, um den Einfluss von Androgenen auf den

Transkriptionsstatus bestimmter mRNAs (PMCA1, PMCA4, AP) in primären KDE-Zellen zu untersuchen.

Zunächst wurde RNA aus mit DHT stimulierten KDE-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die einzusetzende cDNA-Menge wurde mit Hilfe eines externen Standards, des "housekeeping"-Gens GAPDH (Apostolakos et al., 1993), bis auf 15 % abgeglichen und in der PCR eingesetzt. Die Zyklenzahl wurde für jedes Primerpaar jeweils so gewählt, dass sich der Anstieg der Produktmenge in der exponentiellen Phase befand. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt, fotografiert und die Bandenintensität nach dem Einscannen mit dem Programm Scion Image für Windows, beta 4.0.2. (Scion Corp., Frederick, Maryland/USA) bestimmt.

2.2.4.4 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Ein erhaltenes PCR-Produkt aus der Rattenkoagulationsdrüse von 300 bp wurde in eine T-overhang pCR®II-TOPO Vektor entsprechend der Herstellerhinweise (Invitrogen, de Schelp, Niederlande) einkloniert und in den *E. coli* Stamm inv-alpha F' transformiert. Die Plasmid-Präparation wurde mit einem Plasmid-Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Das Plasmidprodukt wurde anschließend von beiden Seiten mit den Standardprimern M13rev(-29) und M13un(-21) von MWG (Ebersberg) ansequenziert.

2.2.4.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt. Sie wandern aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und dem Molekulargewicht der Nukleinsäuren eine lineare Abhängigkeit besteht (Southern, 1979). Die Porengröße des Gels, die durch die Agarosekonzentration bestimmt wird, ist für den Grad der Auftrennung verantwortlich. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren, so dass diese ab einer Menge von etwa 5 ng als violette Banden auf dem UV-Schirm (Transluminator, MAGV GmbH, Rabenau-Londorf) sichtbar gemacht werden können.

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels wurde 3,75 g Agarose mit 250 ml TBE-Puffer durch Erhitzung in der Mikrowelle aufgelöst. Die auf ca. 60 °C abgekühlte Lösung wurde mit 20 µl 0,1 %iger Ethidiumbromidlösung versetzt und in den vorbereiteten Gelträger (Pharmacia, Freiburg bzw. Stratagene, Heidelberg) gegossen. Der Gelträger mit dem auspolymerisierten Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TBE Puffer überschichtet. Anschließend wurden die Proben (1:5 mit Probenpuffer versetzt) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V für ca. 2 h durchgeführt. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde fotografisch dokumentiert (Polaroid MP-4 Lnad Camera; Film Polaroid 667).

TBE-Puffer:	54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0
Probenpuffer:	0,4 % Bromphenolblau 0,4 % Xylencyanol 50 % (v/v) Glyzerol
EtBr-Stammlösung:	1 g EtBr ad 100 ml Aqua dest.; 1:10 verdünnt einsetzen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung von Proteinen der apikalen Koagulationsdrüsenepithelzell- und der Aposomenmembran der Ratte

Die humane Prostata sezerniert wie die KD der Ratte Proteine über einen alternativen Sekretionsweg. Die von der Prostata synthetisierten Proteine werden über so genannte Prostrasomen abgegeben. Bisher konnten zahlreiche Proteine der Prostrasomenmembran identifiziert werden. Neben einer Neutralen Endopeptidase (Renneberg et al., 2001) und einer 5'-Nukleotidase (Aumüller et al., 1999) wurde auch eine Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase (Ronquist et al., 1978a, b, Ronquist und Brody, 1985) sowie eine AP (Fabiani und Ronquist, 1995) beschrieben. Ob einige dieser Membranproteine auch Bestandteil der Aposomenmembran bzw. der apikalen Membran der Koagulationsdrüsenepithelzellen sind, sollten nachfolgende Untersuchungen klären.

3.1.1 Untersuchungen zur Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA)

Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase gehört zu den ersten Enzymen, die als Bestandteil der Prostrasomen identifiziert werden konnten. Daher wurden auch das KD-Epithel bzw. die Aposomen zunächst auf ihr Vorhandensein untersucht.

3.1.1.1 Nachweis der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in Mikrosomen aus der KD und primären KDE-Zellen

Aus KD-Gewebe und KDE-Zellen wurden nach der Methode von Sikdar et al. (1991) Mikrosomen präpariert und in eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Dort konnte PMCA in Mikrosomen aus KD-Gewebe und aus KDE-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 9). In der KD wurde eine Doppelbande mit einer Größe von 180 und 140 kDa detektiert, während die Epithelzellen nur eine schwache Bande in Höhe von etwa 180 kDa zeigten.

Der verwendete monoklonale Antikörper, α -PMCA (Klon5F10), ist gegen ein hochkonserviertes Epitop (Aminosäuresequenz 724-783) aus der Hinge-Region der ex-

trazellulären Schleife der humanen Erythrozyten- Ca^{2+} -ATPase gerichtet (Borke et al., 1989). Aufgrund dessen zeigt er Kreuzreaktivität mit allen 4 PMCA-Isoformen.

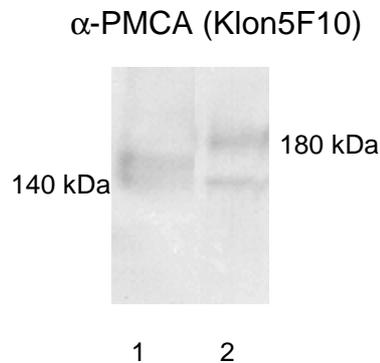


Abb. 9: Western Blot-Analyse der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in Mikrosomen aus KD-Gewebe bzw. primären KDE-Zellen. Spur 1: Mikrosomen aus KD-Gewebe, Spur 2: Mikrosomen aus KDE-Zellen. Je 25 μg Protein wurden auf einem 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem monoklonalen α -PMCA-Antikörper Klon 5F10 (1:1000) detektiert.

3.1.1.2 Expression der PMCA-Isoformen 1 und 4 in primären KDE-Zellen und in der KD der Ratte

Nachdem das PMCA Protein in der KD und den KDE-Zellen detektiert werden konnte, sollte mit Hilfe der RT-PCR Aufschluss über die mRNA-Expression der PMCA-Isoformen in Zellen und Gewebe gewonnen werden. Dabei konnte die mRNA der PMCA-Isoformen 1 und 4 sowohl im KD-Gewebe als auch in den primären KDE-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10). Da im Gehirn alle 4 PMCA-Isoformen exprimiert werden, wurde Rattenhirn als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Probe ohne cDNA. Die Integrität der eingesetzten cDNA wurde mittels GAPDH-PCR überprüft (ohne Abb.).

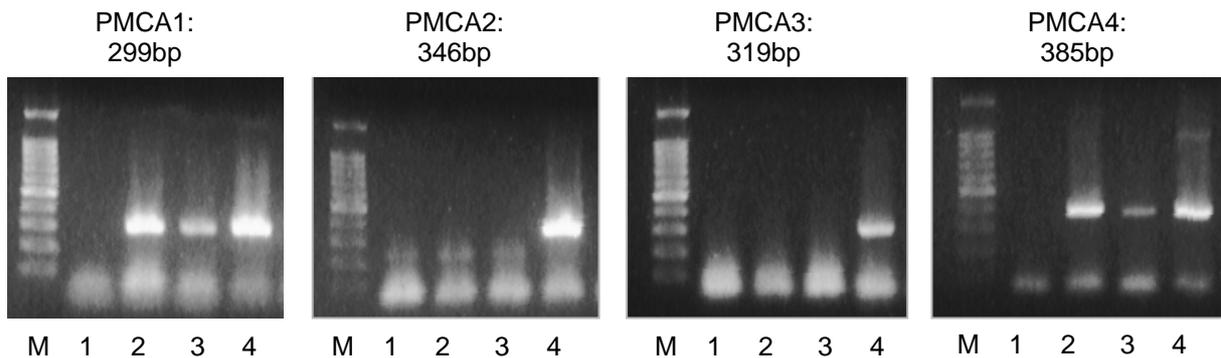


Abb. 10: Nachweis der Expression der PMCA-Isoformen 1 und 4 in KD-Gewebe und KDE-Zellen durch RT-PCR. M: 100 bp Marker, Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: KD-Gewebe, Spur 3: KDE-Zellen, Spur 4: Positivkontrolle (Gehirn)

3.1.2 Identifizierung der PMCA-Isoformen 1 und 4 in Mikrosomen primärer KDE-Zellen bzw. KD-Gewebe der Ratte durch Western Blot-Analyse

Inzwischen waren auch isoformspezifische Antikörper verfügbar. Die Western Blot-Analyse sollte klären, ob die durch RT-PCR im KD-Gewebe und in den primären KDE-Zellen nachgewiesenen PMCA-mRNAs außerdem translatiert werden.

Hierzu wurden spezifische Antikörper gegen die PMCA-Isoformen 1 und 4 verwendet, die die Splicevarianten PMCA1a und b bzw. PMCA4a und b erkennen. α -PMCA1 zeigte prominente Banden in Mikrosomen der KD und der Epithelzellen in Höhe von etwa 139 kDa. PMCA4 konnte in der KD als deutliche Doppelbande mit einem MG von 129 bzw. 133 kDa detektiert werden. In den KDE-Zellen war das Protein nur schwach nachzuweisen (Abb. 11)

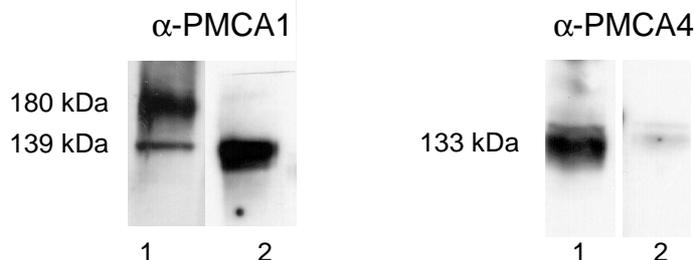


Abb. 11: Western Blot-Analyse der PMCA-Isoformen 1 und 4 in Mikrosomen aus KD-Gewebe bzw. primären KDE-Zellen. Spur 1: Mikrosomen aus KD-Gewebe, Spur 2: Mikrosomen aus KDE-Zellen. Je 25 μ g Protein wurde auf einem 7-12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit den entsprechenden Primärantikörpern (jeweils 1:1000) detektiert.

Um zu untersuchen, ob eine der PMCA-Isoformen ebenfalls in der Aposomenmembran nachzuweisen ist, wurde ausgetropftes aposomenhaltiges KD-Sekret ebenfalls in einer Western Blot-Analyse mit den drei o.g. Antikörpern eingesetzt. Dabei konnte jedoch weder das PMCA1 noch das PMCA4 Protein nachgewiesen werden. Auch der isoformunspezifische Antikörper zeigte keine positive Reaktion (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Lokalisation der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in der KD der Ratte und auf KDE-Zellen

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurde PMCA1 bzw. 4 in Mikrosomen der KD sowie in Mikrosomen primärer KDE-Zellen nachgewiesen (s. 3.2.2). Da es sich bei den verwendeten Mikrosomen um keine reine apikale Plasmamembranfraktion handelte, sollten die nachfolgenden Untersuchungen die subzelluläre Lokalisation der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase aufklären.

Für die Lokalisation der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase im Organ wurden methanolfixierte Kryostatschnitte bzw. mit PFA/Glutaraldehyd fixierte Semidünnschnitte der KD der Ratte sowie primäre KDE-Zellen genutzt. Hier wurden neben dem gegen alle PMCA-Isoformen gerichteten Antikörper (α -PMCA Klon 5F10) auch die isoformspezifischen Antikörper α -PMCA1 und α -PMCA4 verwendet.

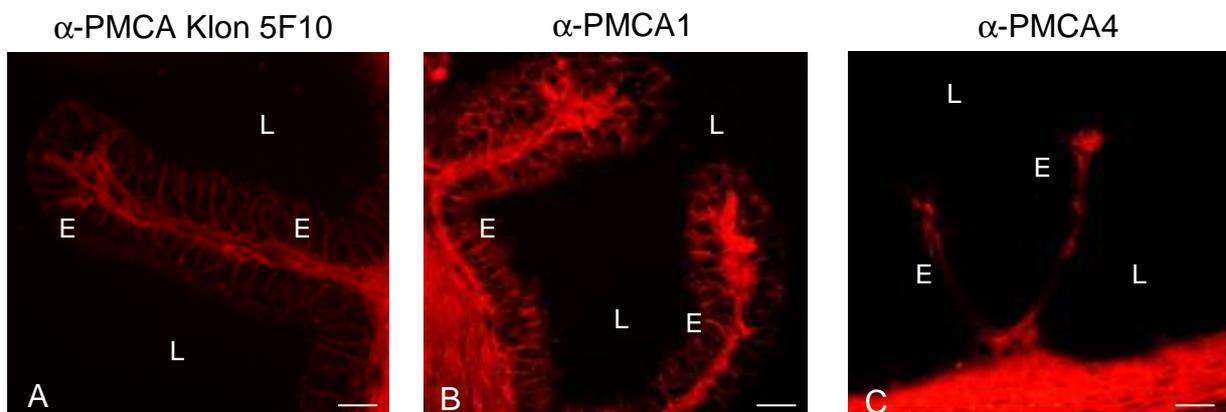


Abb. 12: Nachweis der PMCA auf Kryostatschnitten von KD-Gewebe der Ratte mittels indirekter Immunfluoreszenz A: α -PMCA (isoformunspezifischer Antikörper, Klon 5F10), B: α -PMCA1, C: α -PMCA4; E: Epithel, L: Drüsenlumen; Der Balken entspricht 20 μm . Als Sekundärantikörper wurde jeweils ein Cy3-markierter Antikörper verwendet.

Auf Kryostatschnitten zeigte α -PMCA Klon 5F10 eine schwach positive Färbung des lateral-apikalen Epithels (Abb. 12). PMCA1 konnte ebenfalls deutlich in der lateral-apikalen Epithelzellmembran nachgewiesen werden. (Abb. 12B). PMCA4 dagegen zeigte im KD-Epithel keine spezifische Reaktion (Abb. 12C). Bemerkenswert ist, dass alle drei verwendeten Antikörper eine starke Reaktion mit dem Stroma aufwiesen (Abb. 12A-C).

Die Immunreaktion auf Semidünnschnitten entsprach im Wesentlichen der auf den Kryostatschnitten. Vor allem das apikale Epithel zeigte eine stark positive Reaktion mit dem gegen alle Isoformen gerichteten Antikörper bzw. mit PMCA1 (Abb. 13). Im Unterschied zu den Kryostatschnitten waren auf den Semidünnschnitten die Aposomen durch beide Antikörper stark angefärbt. Auf den Kryostatschnitten waren keine Aposomen vorhanden und konnten daher nicht angefärbt werden. PMCA4 konnte auf den Semidünnschnitten ebenfalls nicht im Epithel nachgewiesen werden.

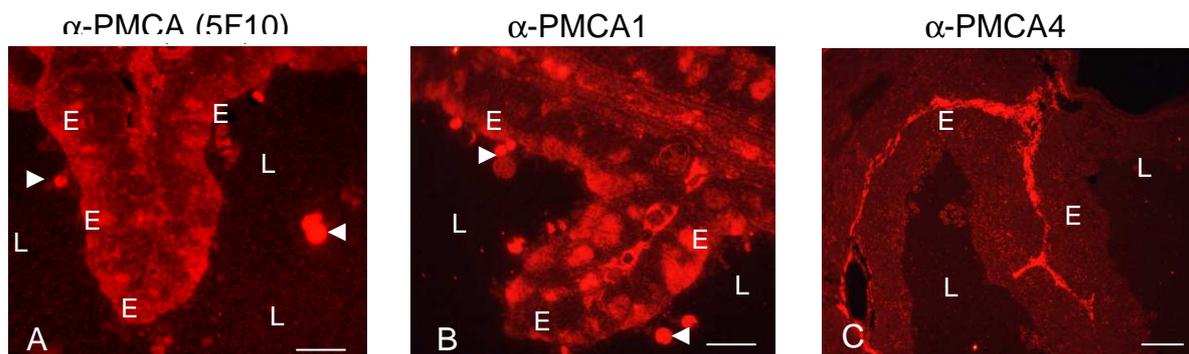


Abb. 13: Nachweis der PMCA auf Semidünnschnitten von KD-Gewebe der Ratte mittels indirekter Immunfluoreszenz A: α -PMCA (isoformunspezifischer Antikörper, Klon 5F10), B: α -PMCA1, C: α -PMCA4; E: Epithel, L: Drüsenlumen; Als Sekundärantikörper wurde jeweils ein Cy3-markierter Antikörper verwendet. Die Pfeile zeigen die angefärbten Aposomen. Balken: 20 μ m

In den primären KDE-Zellen der Ratte führte α -PMCA-5F10 zu einer schwachen Färbung der Plasmamembran (Abb. 14A). Auffällig war eine starke Kernfärbung bzw. eine diffuse granuläre Färbung. PMCA1 dagegen war deutlich in der Plasmamembran nachzuweisen (Abb. 14B). Auch hier kam es zusätzlich zu einer Kernfärbung. PMCA4 konnte, wie auch zuvor im KD-Gewebe, nicht in der Plasmamembran der Epithelzellen lokalisiert werden. Die Antikörperreaktion mit PMCA4 führte ebenfalls zu einer diffusen Kernfärbung (Abb. 14C).

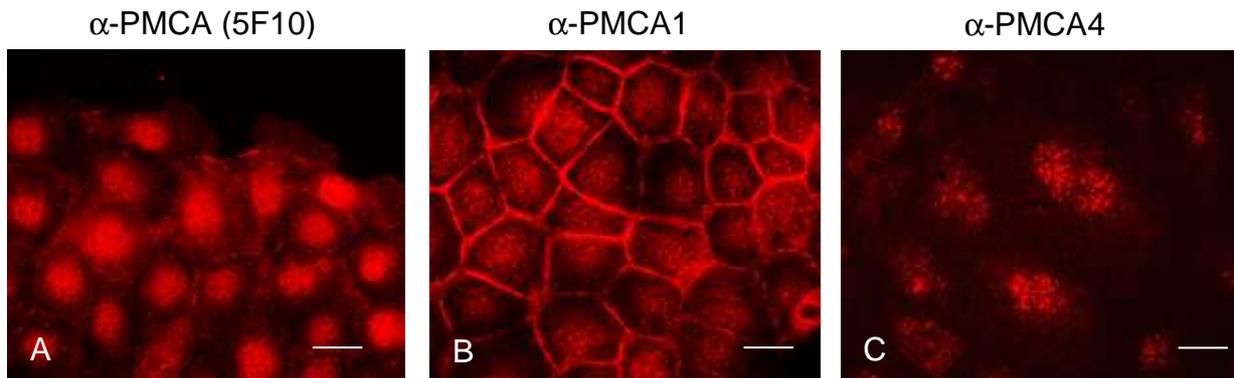


Abb. 14: Nachweis der PMCA auf primären KDE-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz A: isoformunspezifischer Antikörper (Klon 5F10), B: α -PMCA1, C: α -PMCA4. Primäre KDE-Zellen wurden 5 Tage auf Collagen IV-beschichteten 24-Lochplatte kultiviert und nach Methanolfixierung und Blockierung mit Roti-Block mit einem der o.g. Primärantikörper detektiert. Als Sekundärantikörper wurde jeweils ein Cy3-markierter Antikörper verwendet. Der Balken entspricht 15 μ m.

3.1.4 *PMCA1 und Occludin sind in den primären KDE-Zellen der Ratte kolo-* *lokalisiert*

PMCA wird in der Literatur im Allgemeinen als baso-laterales Protein beschrieben. Lee et al. (1997) postulieren jedoch, dass PMCA in der Speicheldrüse und im Pankreas sowohl baso-lateral als auch apikal lokalisiert ist. Eine Doppelfärbung der polaren primären KDE-Zellen mit Antikörpern gegen PMCA1 und Occludin sollte aufklären, ob das Enzym in den primären KDE-Zellen ebenfalls am luminalen bzw. apikalen Zellpol zu finden ist. Der Polaritätsmarker Occludin liegt in der *Zonula occludens*, welche die Grenze zwischen baso-lateralem und apikalem Zellpol bildet.

Primäre KDE-Zellen wurden 5 Tage auf Kollagen-beschichteten 24-Lochplatte kultiviert. Nach Methanolfixierung und Blockierung wurden sie nacheinander zuerst mit α -Occludin/Sekundär-Ak-Cy3 und danach mit α -PMCA1/Sekundär-Ak-Cy2 inkubiert. Occludin wurde ebenfalls an den Zellgrenzen in der *Zonula occludens* detektiert (Abb. 15B). Durch eine aufeinander folgende Belichtung mit einem Cy2/Cy3 Filter wird in Abb. 15C durch die resultierende Gelbfärbung der Bereich der Kolo-Lokalisation beider Proteine dargestellt (Abb. 15C). Diese Daten lassen vermuten, dass PMCA1 als auch Occludin im Bereich der *Zonula occludens* lokalisiert sind.

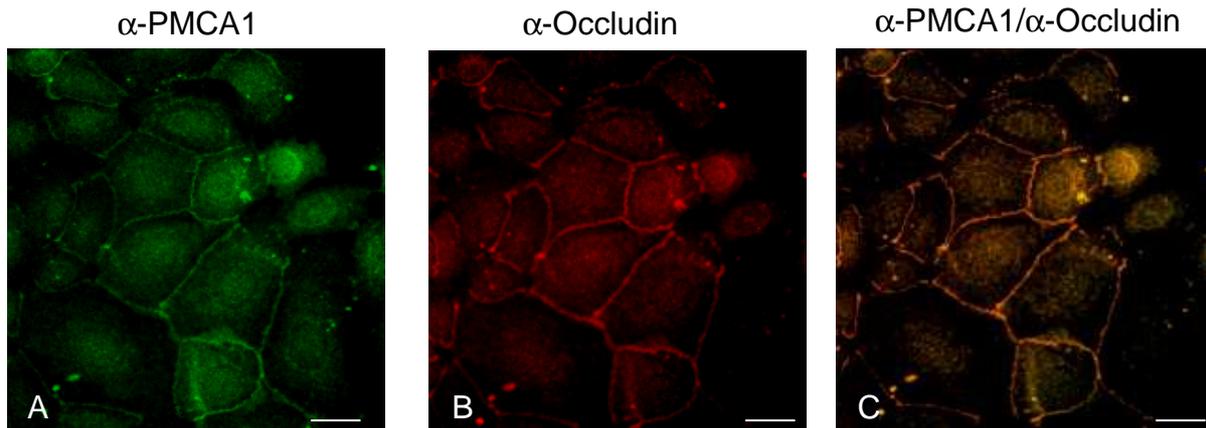


Abb. 15: Untersuchung der Ko-Lokalisation von PMCA1 und Occludin auf primären KDE-Zellen. A: PMCA1-Cy2; B: Occludin-Cy3; C: Doppelbelichtung PMCA1-Cy2, Occludin-Cy3; grün: PMCA1; rot: Occludin; gelb: Ko-Lokalisation PMCA1/Occludin. Der Balken entspricht 15 μm .

Da mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop nicht abschließend ermittelt werden konnte, ob sich PMCA und Occludin in einer Ebene befinden, wurde eine Analyse mit einem Laserscanningmikroskop (Olympus; AG Weihe) angeschlossen.

Abb. 16 zeigt die Lokalisation von PMCA1 und Occludin in verschiedenen Bereichen der KDE-Zellen.

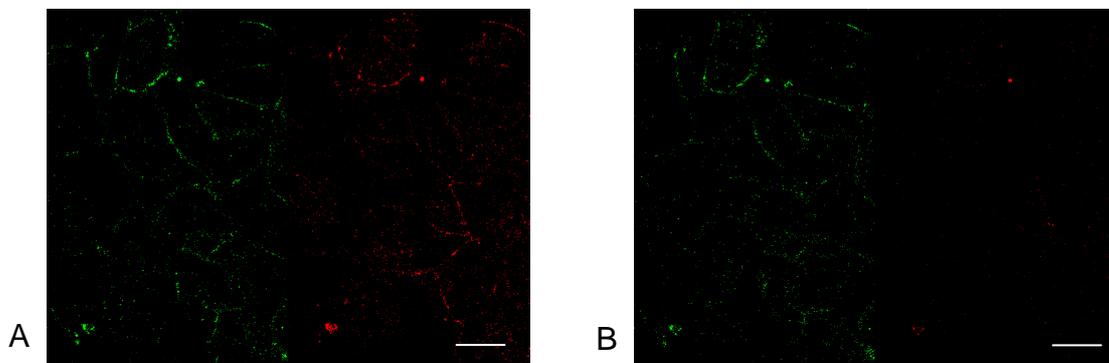


Abb. 16: Vergleich der Ko-Lokalisation von PMCA1 und Occludin auf primären KDE-Zellen in verschiedenen Bereichen der KDE-Zellen durch Laserscanning-Mikroskopie. A: Verteilung von PMCA (grün) und Occludin (rot) in der *Zonula occludens* B: Verteilung von PMCA-Cy2 (grün) und Occludin-Cy3 (rot) 0,3 μm der *Zonula occludens*. Balken: 15 μm .

In der *Zonula occludens* waren PMCA1 und Occludin an den Zellgrenzen ko-lokalisiert (Abb. 16A und 17A). Neben den Zellgrenzen zeigten die Zellkerne für beide Proteine ebenfalls ein schwaches positives Signal. Abb. 16B stellt die Verteilung von PMCA1 und Occludin um 0,3 μm in Richtung des apikalen Poles von der *Zonula*

occludens dar. PMCA1 konnte immer noch in gleichem Ausmaß detektiert werden, wogegen Occludin in dieser Ebene nahezu verschwunden war. Aufgrund der schwachen Fluoreszenz in diesem Bereich war eine Doppelbelichtung ohne ein Nachlassen der Fluoreszenzintensität nicht möglich, so dass daher darauf verzichtet wurde.

Die Verteilung PMCA1 und Occludin basal der *Zonula occludens* wurde im Anschluss untersucht (Abb. 17). In Richtung des basalen Zellpols veränderte sich die Verteilung beider Proteine. Occludin war an den Zellgrenzen nur noch schwach detektierbar, während die starke Reaktion des Occludin-Antikörpers in den Zellkernen weiterhin bestand (Abb. 17B). PMCA1 war dagegen immer noch in der Plasmamembran lokalisiert, wobei auch die Zellkerne verstärkt mit dem α -PMCA1-Antikörper reagierten.

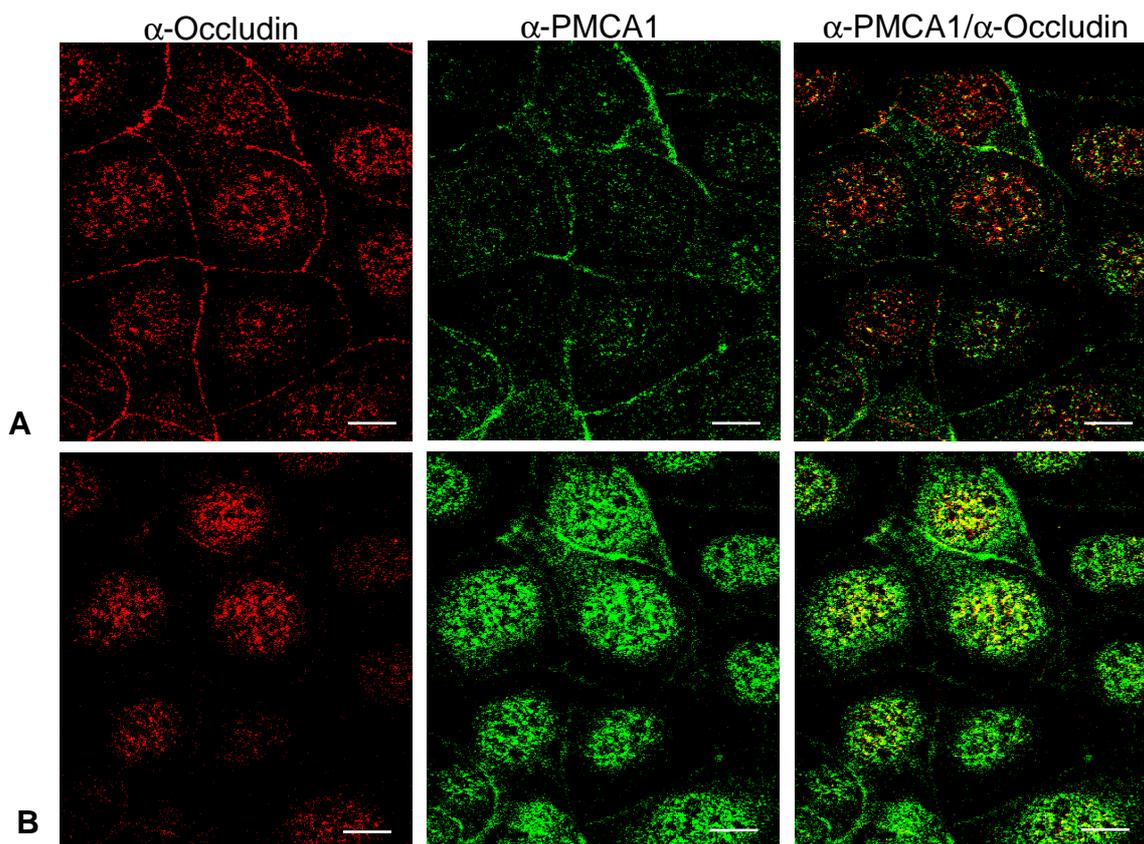


Abb. 17: Ko-Lokalisation von PMCA1 und Occludin auf primären KDE-Zellen in verschiedenen Ebenen der KDE-Zellen. A: Lokalisation von Occludin und PMCA1 in der *Zonula occludens*. B: Lokalisation von Occludin und PMCA1 basal der *Zonula occludens*. grün: PMCA1; rot: Occludin, gelb: Ko-Lokalisation PMCA1/Occludin. Der Balken entspricht 5 μ m.

3.1.5 Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Mikrosomen von KDE-Zellen und KD-Gewebe bzw. im KD-Sekret

Zunächst wurde die Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen bzw. -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase in Mikrosomen (präpariert nach Sikdar et al., 1991) aus KDE-Zellen, KD und im KD-Sekret bestimmt. Anhand einer KH_2PO_4 -Standardkurve wurde das freigesetzte P_i als $\mu\text{mol } P_i/\text{mg Protein/h}$ aus den gemessenen Extinktionswerten_{820 nm} errechnet. Durch den Einsatz von $0,1 \mu\text{M}$ Thapsigargin wurde die Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) gehemmt und die spezifische PMCA-Aktivität ermittelt. Sowohl in Mikrosomen der primären KDE-Zellen als auch in Mikrosomen des KD-Gewebes konnte eine Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität detektiert werden (Tab. 9). Die Aktivität war im KD-Gewebe stärker als in den primären KDE-Zellen. Obwohl in der Western Blot-Analyse kein PMCA-Protein im KD-Sekret nachgewiesen werden konnte, zeigte dieses eine deutliche, wenn auch im Vergleich zu KD-Gewebe und KDE-Zellen schwache Mg^{2+} -abhängige bzw. -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität. Bemerkenswert war hierbei die fehlende Hemmung bzw. die leichte Steigerung der Aktivität durch Thapsigargingabe, die auf ein Fehlen des SERCA-Enzyms schließen ließ.

Tab. 9: Mg^{2+} -abhängige bzw. -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität ($\mu\text{mol } P_i/\text{mg Protein/h}$) in Mikrosomenfraktionen primärer KDE-Zellen und KD-Gewebes bzw. in ausgetropftem KD-Sekret. Die ATPase-Aktivität errechnet sich jeweils aus der Differenz der gemessenen Aktivität in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen.

	Mg^{2+}-abhängige Ca^{2+}-ATPase-Aktivität in $\mu\text{mol } P_i/\text{mg Protein/h}$		Mg^{2+}-unabhängige Ca^{2+}-ATPase-Aktivität in $\mu\text{mol } P_i/\text{mg Protein/h}$	
	Gesamt ATPase-Aktivität	Spezifische PMCA-Aktivität*	Gesamt ATPase-Aktivität	Spezifische PMCA-Aktivität*
Primäre KDE-Zellen	$57 \pm 3^{\#}$	$34,2 \pm 4^{\#}$	$70 \pm 4^{\#}$	$39,5 \pm 1,8^{\#}$
KD-Gewebe	$69 \pm 3^{\#}$	$53,8 \pm 0,5^{\#}$	$128 \pm 3,7^{\#}$	$112 \pm 2^{\#}$
KD-Sekret	$7 \pm 1,1^{\#}$	$7 \pm 0,6^{\#}$	$8,6 \pm 0,1^{\#}$	$8,7 \pm 0^{\#}$

*ermittelt durch Zugabe von $0,1 \mu\text{M}$ Thapsigargin [#] Mittel \pm Standardabweichung (N), N = 3

Nachfolgend an die Bestimmung der Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen bzw. -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase in Mikrosomen von primären KDE-Zellen und KD-Gewebe sowie in ausgetropftem KD-Sekret wurde die Wirkung des Modulators Calmodulin bzw. der Inhibitoren Nifedipin, Trifluorperazin (TFP) und Verapamil auf die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität untersucht (Abb. 18).

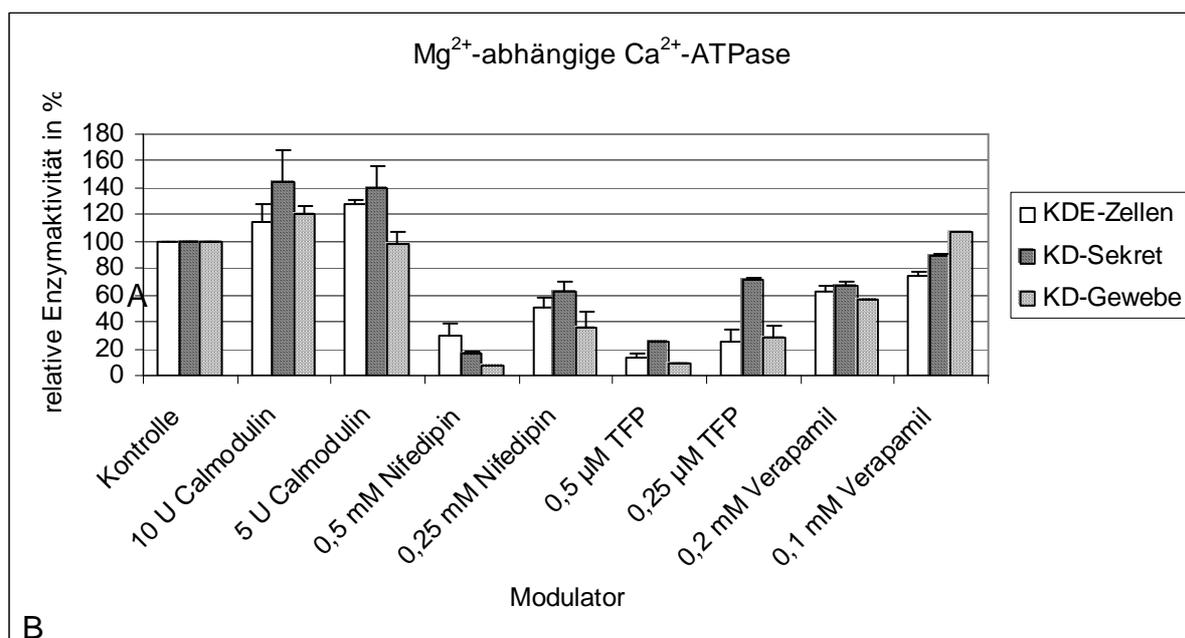
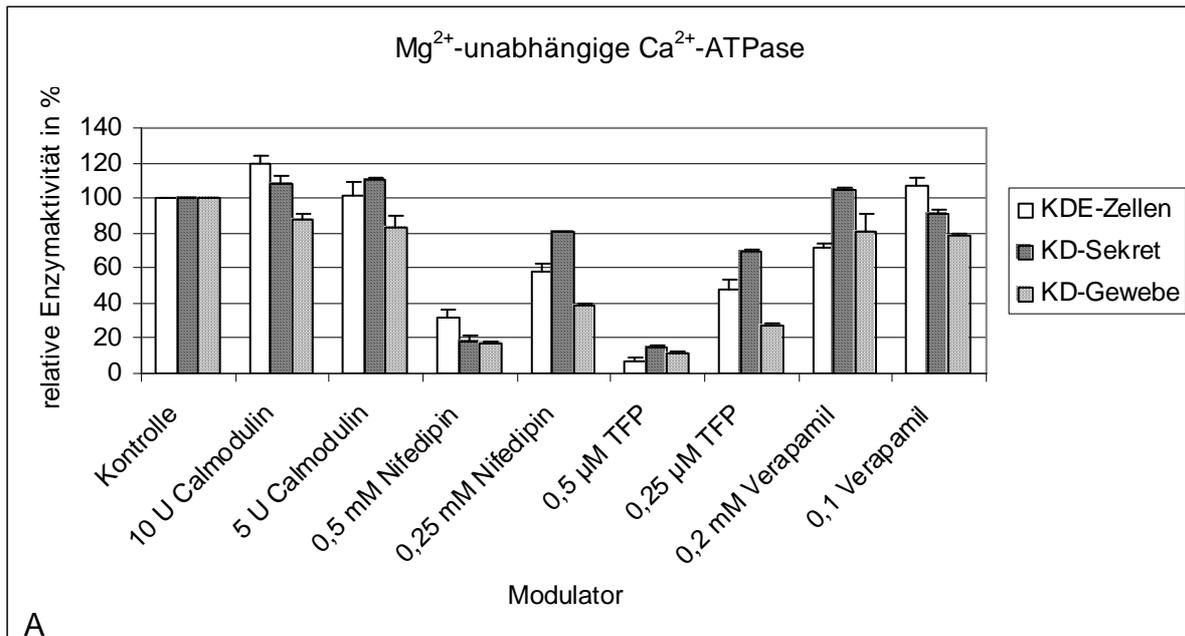


Abb. 18: Einfluss der Ca²⁺-Kanal Inhibitoren Nifedipin, TFP und Verapamil sowie des Modulators Calmodulin auf die Aktivität der Mg²⁺-abhängigen bzw. -unabhängigen Ca²⁺-ATPase in Mikrosomen primärer KDE-Zellen, KD-Gewebe und in ausgetropftem KD-Sekret. A: Mg²⁺-abhängige Ca²⁺-ATPase, B: Mg²⁺-unabhängige Ca²⁺-ATPase. Die ATPase-Aktivität ergab sich jeweils aus der Differenz der gemessenen Aktivität in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen wieder. (N = 3)

Calmodulin führte sowohl in Mikrosomen primärer KDE-Zellen und des KD-Gewebes als auch in KD-Sekret zu einer leichten Erhöhung der Aktivität. Im Gegensatz dazu bewirkten die Ca²⁺-Kanalhemmer Nifedipin, Verapamil und Trifluorperazin (TFP) jeweils eine dosisabhängige Hemmung der Ca²⁺-ATPase.

3.1.6 Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase-Aktivität im KD-Sekret liegt membran-gebunden vor

Um zu überprüfen, ob die im KD-Sekret gemessene Ca^{2+} -ATPase-Aktivität membran-gebunden vorliegt, wurde das KD-Sekret zunächst einer Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$, 1 h) unterzogen. Im resultierenden Pellet bzw. im Überstand wurde anschließend die Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur im Membranpellet Aktivität gemessen werden konnte (Abb. 19).

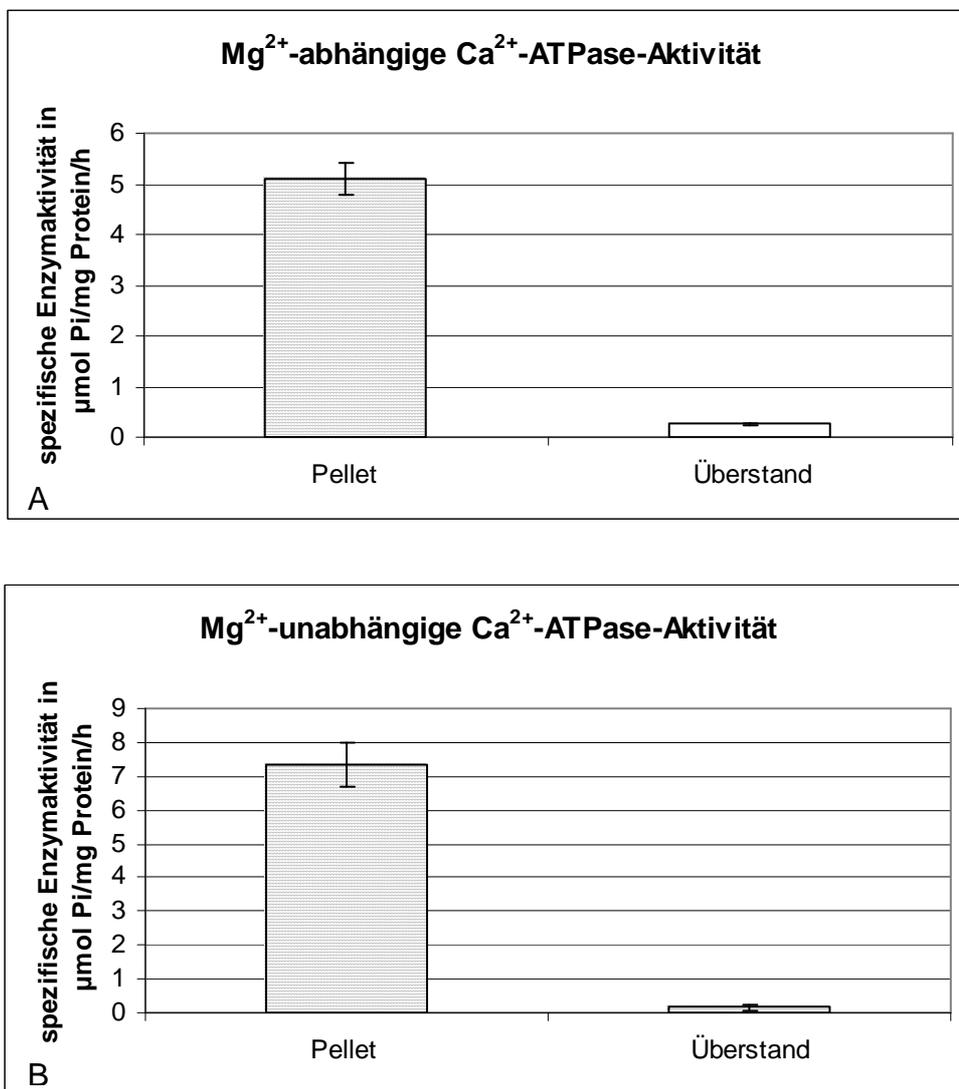


Abb. 19: Die Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen bzw. -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase im KD Sekret nach Ultrazentrifugation. A: Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität. B: Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -Aktivität. Das KD-Sekret wurde für 1 h bei $100.000 \times g$ pelletiert und anschließend je $50 \mu\text{g}$ des in Tris-Puffer gelösten Pellets bzw. des Überstandes auf Ca^{2+} -ATPase-Aktivität untersucht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. (N = 3)

3.1.7 Einfluss von Androgenen auf die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in der KD der Ratte

Die Bildung von Aposomen in der KD unterliegt dem Einfluss von Testosteron bzw. DHT. Wird es durch Kastration entzogen, werden keine Aposomen gebildet (Steinhoff et al., 1992; Holterhus et al., 1993). Inwieweit ein Androgenentzug durch Kastration Einfluss auf die Protein-Expression der PMCA hat, wurde mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen an Semidünnschnitten von kastrierten Tieren untersucht.

3.1.7.1 Lokalisation der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase auf Semidünnschnitten der KD der Ratte 14 Tage nach Kastration

Die Lokalisation der PMCA-Isoformen 1 und 4 wurde auf Semidünnschnitten eines Tieres, das 14 Tage nach Kastration getötet wurde, mit Hilfe der o.g. spezifischen Antikörper untersucht. Dabei wurde beim kastrierten Tier neben dem völligen Fehlen von Aposomen auch eine stark verminderte Lokalisation von PMCA1 am apikalen Pol der Epithelzellen beobachtet (Abb. 20). Im Kontrolltier konnte dagegen PMCA1 sowohl in den Aposomen als auch am apikalen Zellpol nachgewiesen werden. PMCA4 war sowohl im kastrierten Tier als auch im Kontrolltier ausschließlich im Stroma detektierbar.

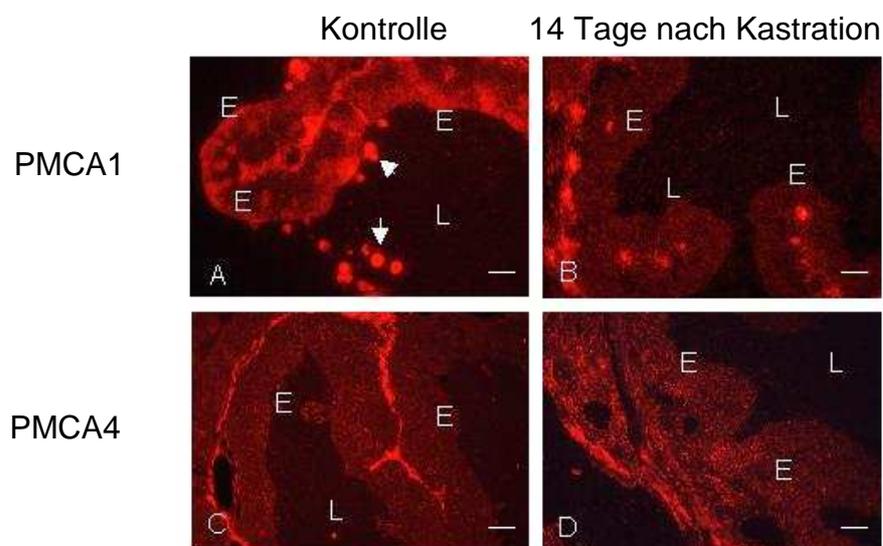


Abb. 20: Lokalisation von PMCA1 bzw. PMCA4 auf Semidünnschnitten der KD der Ratte 14 Tage nach Kastration. A: α -PMCA1 Kontrolltier, B: α -PMCA1 14 Tage nach Kastration, C: α -PMCA4 Kontrolltier, D: α -PMCA4 14 Tage nach Kastration. E: Epithel, L: Lumen, Pfeile: Aposomen. Balken: 20 μm .

3.1.7.2 Einfluss von DHT auf die Expression bzw. Aktivität der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase

Aufgrund der Ergebnisse in 3.1.7.1 wurde im Anschluss der Einfluss von DHT auf die Expression und Aktivität der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in primären KDE-Zellen geprüft. Die primären Epithelzellen wurden für 48 h mit 10^{-8} bis 10^{-6} M DHT stimuliert. Aus den Zellen wurden Mikrosomen (präpariert nach Sikdar et al., 1991) für Aktivitätstests bzw. RNA für den Einsatz in der semi-quantitativen PCR präpariert.

Molekularbiologischer Nachweis der Expression des Androgenrezeptors in KDE-Zellen

Voraussetzung für einen möglichen Einfluss von DHT auf die Proteinexpression in primären KDE-Zellen ist das Vorhandensein eines Androgenrezeptors. Mit Hilfe der RT-PCR konnte die mRNA des Proteins in den KDE-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21).

Androgen-Rezeptor:
236 bp



M 1 2

Abb. 21: Nachweis des Androgenrezeptors in primären KDE-Zellen der Ratte mittels RT-PCR. M: Marker, Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: KDE-Zellen.

Einfluss von DHT auf die Expression der PMCA1- bzw. PMCA4-mRNA in primären KDE-Zellen der Ratte

Der Einfluss von DHT auf die Expression der mRNA der PMCA-Isoformen 1 und 4 wurde mittels semi-quantitativer PCR untersucht. Hierbei wurde eine konzentrationsabhängige Induktion der PMCA1-Genexpression durch DHT-Gabe mit einer Steigerung bis zu 40 % bei einer DHT-Konzentration von 10^{-6} M beobachtet (Abb. 22).

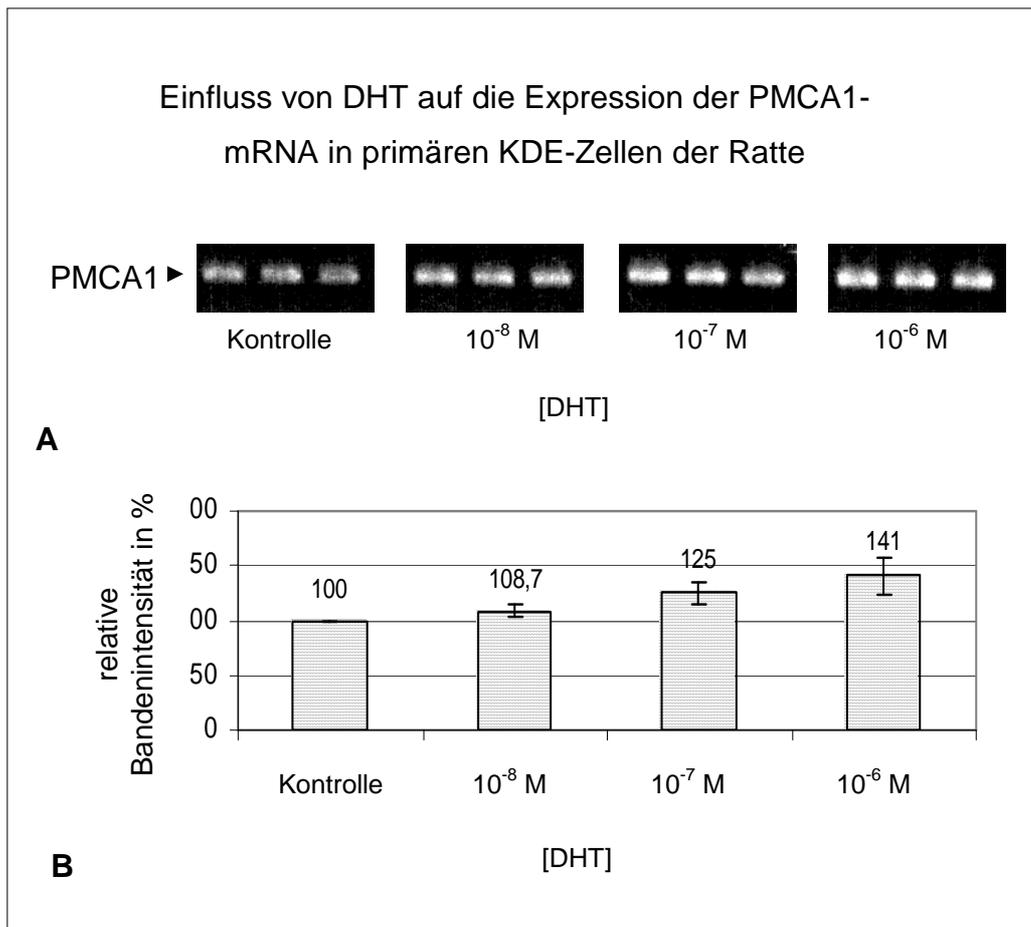


Abb. 22: Analyse der Expression der PMCA1-mRNA in primären KDE-Zellen der Ratte nach 48-stündiger Stimulation mit DHT mittels semi-quantitativer-PCR. A: Beispiel einer PCR. Je 20 μ l jedes PCR-Produktes wurden auf einem 1 %igen, Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensität mit dem Programm Scion Image bestimmt. B: Relative Bandenintensität. KDE-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von DHT stimuliert. Aus den Zellen wurde jeweils RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Mit GAPDH-Primern wurde die einzusetzende cDNA-Menge auf eine Schwankungsbreite von etwa 15 % abgeglichen. Der Versuch wurde in 2 unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die PCR mit PMCA1-spezifischen Primern wurde mit einer Zyklenzahl von 28 Zyklen durchgeführt, so dass die Produktmenge noch im exponentiellen Bereich lag. Für jede DHT-Konzentration wurde eine PCR im 3fachen Ansatz durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der unabhängigen Versuche wieder. (N = 2)

Die Genexpression der PMCA4-mRNA konnte durch DHT nur gering gesteigert werden. Bei DHT-Konzentrationen von 10^{-7} bzw. 10^{-6} M nahm die Genexpression nur um ca. 25 % zu. Eine DHT-Konzentration von 10^{-8} führte dagegen zur Repression der PMCA4-mRNA-Expression (Abb. 23).

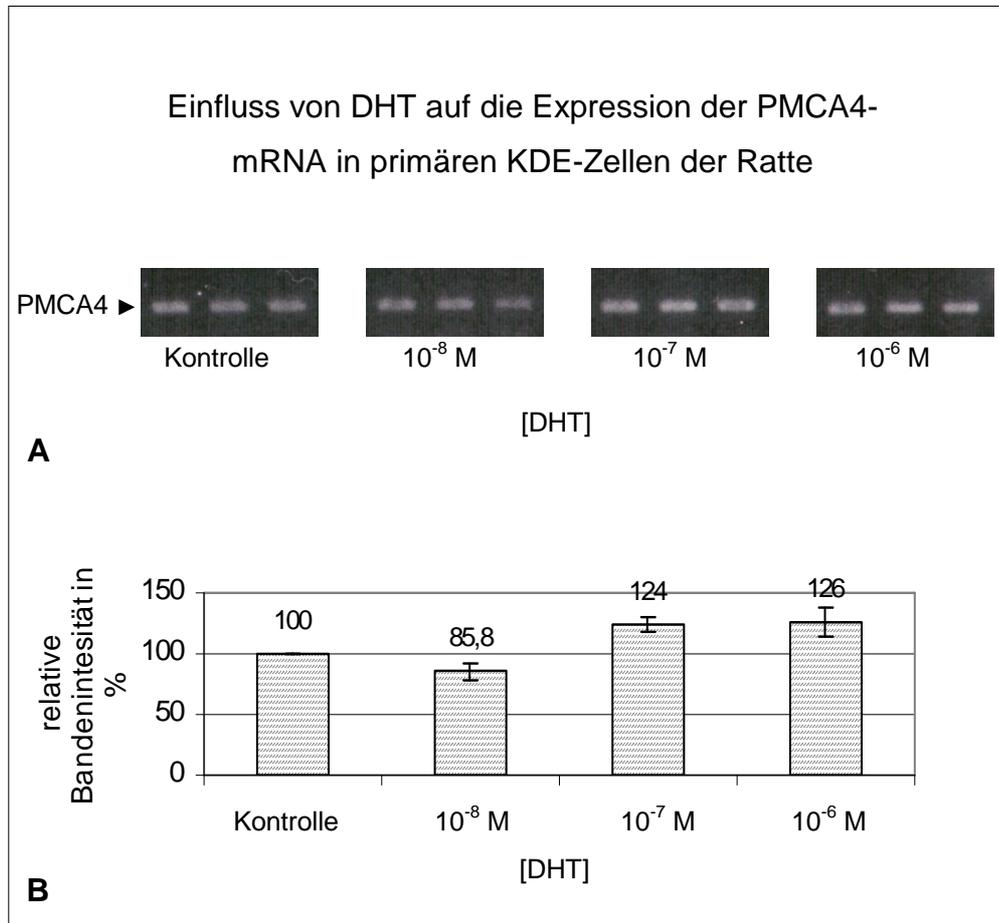


Abb. 23: Analyse der Expression der PMCA4-mRNA in primären KDE-Zellen der Ratte nach 48-stündiger Stimulation mit DHT mittels semi-quantitativer-PCR. A: Beispiel einer PCR. Je 20 μ l jedes PCR-Produktes wurden auf einem 1 %igen, Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensität mit dem Programm Scion Image bestimmt. B: Relative Bandenintensität. KDE-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von DHT stimuliert. Aus den Zellen wurde jeweils RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Mit GAPDH-Primern wurde die einzusetzende cDNA-Menge auf eine Schwankungsbreite von etwa 15 % abgeglichen. Der Versuch wurde in 2 unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die PCR mit PMCA4-spezifischen Primern wurde mit einer Zyklenzahl von 31 Zyklen durchgeführt, so dass die Produktmenge noch im exponentiellen Bereich lag. Für jede DHT-Konzentration wurde eine PCR im 3fachen Ansatz durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der unabhängigen Versuche wieder. (N = 2)

Einfluss von DHT auf die Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase

Neben der Bestimmung des DHT-Einflusses auf die Transkriptionsrate der PMCA-mRNAs der Isoformen 1 und 4 wurden zusätzlich Aktivitätstests nach der Methode nach Sikdar et al. (1991) durchgeführt. DHT führte zu einer Steigerung der Proteinaktivität bei der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase, wobei bei einer Konzentration von 10^{-7} M DHT die jeweils höchste Aktivität gemessen wurde (Abb. 24).

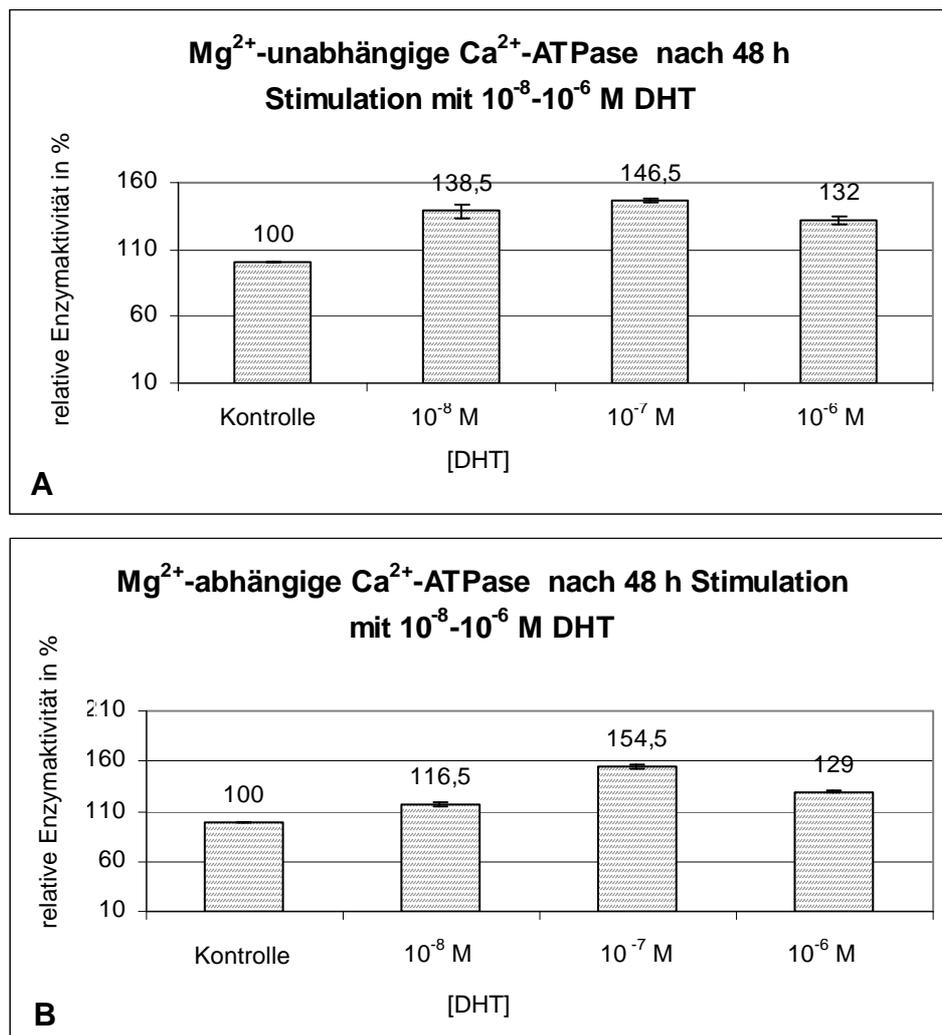


Abb. 24: Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Mikrosomen primärer KDE-Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 10^{-8} bis 10^{-6} M DHT. A: Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase B: Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. (N = 3)

3.2 Untersuchungen zur Alkalischen Phosphatase (AP)

Die AP wurde von Fabiani & Ronquist (1995) als Bestandteil der Prostatosomen identifiziert. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit dieses Enzym auch in den KDE-Zellen oder im KD-Sekret von Bedeutung ist.

3.2.1 Messung der AP-Aktivität in Mikrosomen von KD, primären KDE-Zellen und in KD-Sekret

Als Nachweismethode für das funktionsfähige AP-Enzym wurde ein Aktivitätstest mit p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) als Substrat durchgeführt. Da pNPP auch für andere Enzyme als Substrat dient, wurde jeweils parallel eine Hemmung mit dem spezifischen AP-Hemmer Levamisol vorgenommen. Die AP-Aktivität entspricht der mit Levamisol gehemmten Aktivität. Zur Erstellung einer Standardkurve diente die Alkalische Phosphatase der humanen Plazenta.

Die höchste AP-Aktivität wurde in KD-Mikrosomen gemessen (Tab. 10). Im KD-Sekret und in Mikrosomen aus KDE-Zellen war diese im Vergleich zu den KD-Mikrosomen um ein 2-3faches vermindert.

Tab. 10: Spezifische AP-Aktivität in Mikrosomen aus KD-Gewebe, KD-Zellen und in KD-Sekret. Die Aktivität wurde mit pNPP als Substrat ermittelt.

	Alkalische Phosphatase-Aktivität in pmol Pi/mg Protein/h*
Primäre KDE-Zellen	33,3 ± 7,5 [#]
KD-Gewebe	209,7 ± 1 [#]
KD-Sekret	66,6 ± 9,9 [#]

* ermittelt nach Zugabe von 1 mM Levamisol, [#]Mittel = Standardabweichung, N = 5

3.2.2 AP als Bestandteil der Aposomenmembran und als lösliche Form im Sekret

Die gewebeunspezifische Isoform der AP kann sowohl über einen GPI-Anker membrangebunden vorliegen oder als freies Enzym ins Serum abgegeben werden (Harris, 1989). Um zu ermitteln, ob die im KD-Sekret gemessene AP als freies Enzym oder an die Aposomenmembran gebunden vorliegt, wurde ausgetropftes KD-Sekret für 1 h bei 100.000 x g pelletiert und sowohl im Überstand als auch im gelösten Pel-

let die AP-Aktivität bestimmt. Die ermittelte Enzymaktivität war im Pellet etwa 15 % stärker als im Überstand (Abb. 25), d.h. die AP liegt sowohl membrangebunden als auch als freies Enzym vor.

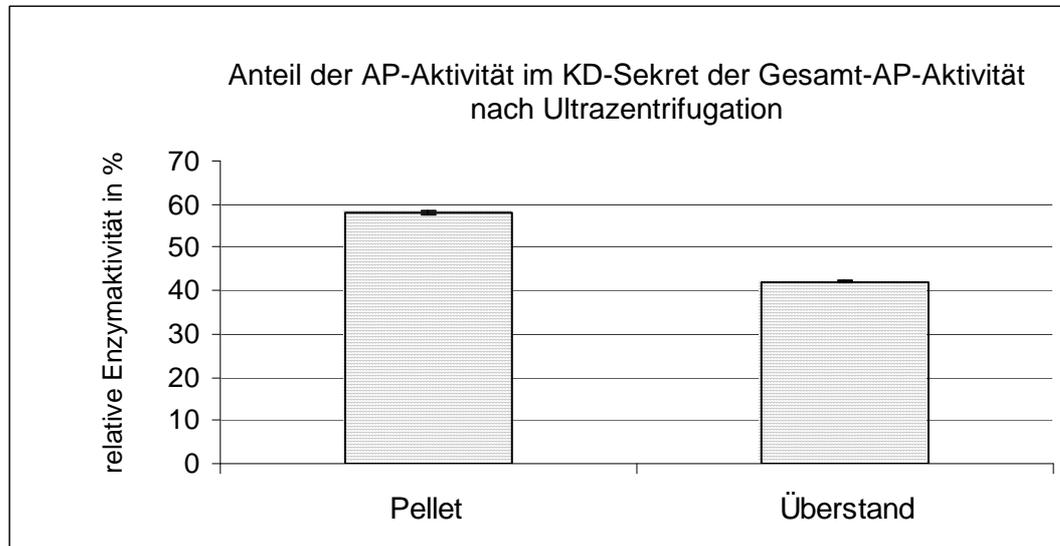


Abb. 25: Messung der AP-Aktivität in Pellet und Überstand des KD-Sekretes nach Ultrazentrifugation bei 100.000 x g. Je 25 µg Sekretprotein wurde mit 100 µg pNPP als Substrat für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Freisetzung von Nitrophenol bei 405 nm im Photometer bestimmt. Durch Zugabe von 1 mM Levamisol wurde die AP-Aktivität bestimmt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (N = 3)

3.2.3 Histochemischer Nachweis der AP auf primären KDE-Zellen und Kryostatschnitten der KD

Es ist derzeit kein kommerzieller Antikörper verfügbar, der mit der Alkalischen Phosphatase aus Ratten-KD kreuzreagiert. Daher wurde ein histochemischer Nachweis der AP durchgeführt. Zur Lokalisierung des aktiven AP-Enzyms wurden primäre KDE-Zellen mit NBT/BCIP inkubiert, das von dem Enzym zu einem präzipitierenden Farbstoff umgesetzt wird. Hierbei zeigten vor allem Zellen, die am Rande eines Zellclusters lokalisiert waren, Enzymaktivität, wogegen von den zentral gelegenen Zellen nur einige wenige das Substrat umsetzen konnten (Abb. 26A).

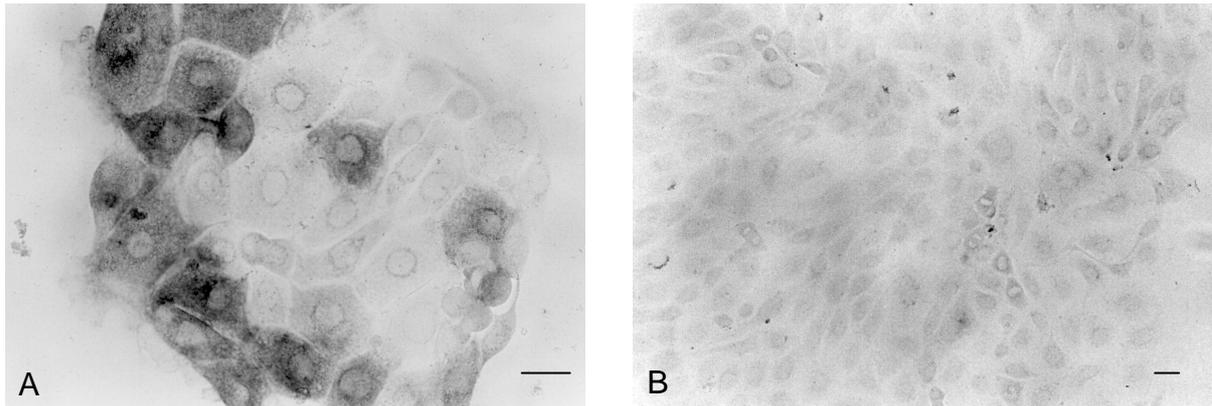


Abb. 26: Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase auf primären KDE-Zellen, A: Inkubation mit NBT/BCIP, B: Inkubation mit NBT/BCIP unter Zugabe von 1mM Levamisol, Balken: 30 µm

Als Negativkontrolle dienten Zellen, die zusätzlich zu NBT/BCIP mit 1mM Levamisol als spezifischer Inhibitor der Alkalischen Phosphatase, inkubiert worden waren. Diese konnten das Substrat nicht umsetzen, so dass kein Niederschlag zu erkennen war (Abb. 26B).

Auf Kryostatschnitten der KD präzipitierte das umgesetzte Substrat der AP auf der basalen Seite der Epithelzellen bzw. im Stroma der KD (Abb. 27). Der apikale Saum der Epithelzellen zeigt dagegen eine nur schwache Färbung (s. Pfeile).

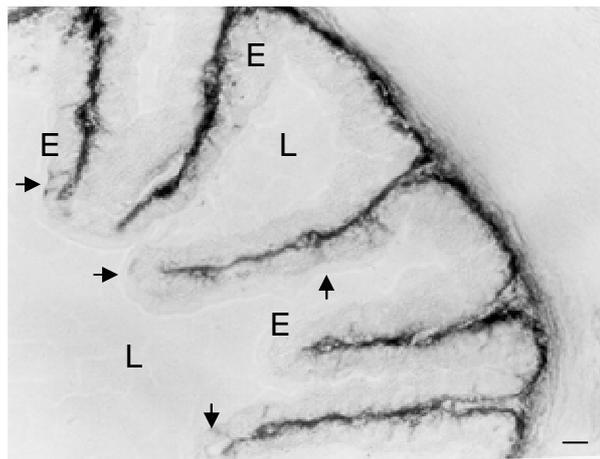


Abb. 27: Histochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase auf KD-Kryo-Gewebeschnitten. E: Epithel; L: Drüsenlumen; Pfeil: apikales Epithel, Balken: 20 µm

3.2.4 Temperaturabhängigkeit der Alkalischen Phosphatase-Aktivität aus KD-Gewebe und KD-Sekret

Die Isoformen der Alkalischen Phosphatase lassen sich anhand ihrer Temperaturstabilität unterscheiden. Als weitgehend hitzestabil gelten die Isoform aus der Plazenta sowie die intestinale Form der Alkalischen Phosphatase. Die gewebeunspezifische Isoform (Knochen, Leber, Niere) dagegen ist hitzelabil (Harris, 1989).

Durch den Test auf Temperaturabhängigkeit der AP-Aktivität in KD und KD-Sekret kann die dort vorliegende Isoform bestimmt werden. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich AP aus der humanen Plazenta ebenfalls hitzebehandelt und anschließend die Enzymaktivität ermittelt. Schon nach 15 minütiger Inkubation bei 56 °C nahm die Aktivität der AP in den KD-Mikrosomen drastisch ab. Nach 60 min bestanden nur noch ca. 15 % der ursprünglichen Aktivität. Die AP-Aktivität im KD-Sekret sank weniger rapide ab und zeigte auch nach 45 minütiger Inkubation 35-40 % der Ausgangsaktivität. Die AP aus der humanen Plazenta wurde durch die Hitzebehandlung nicht beeinflusst (Abb. 28).

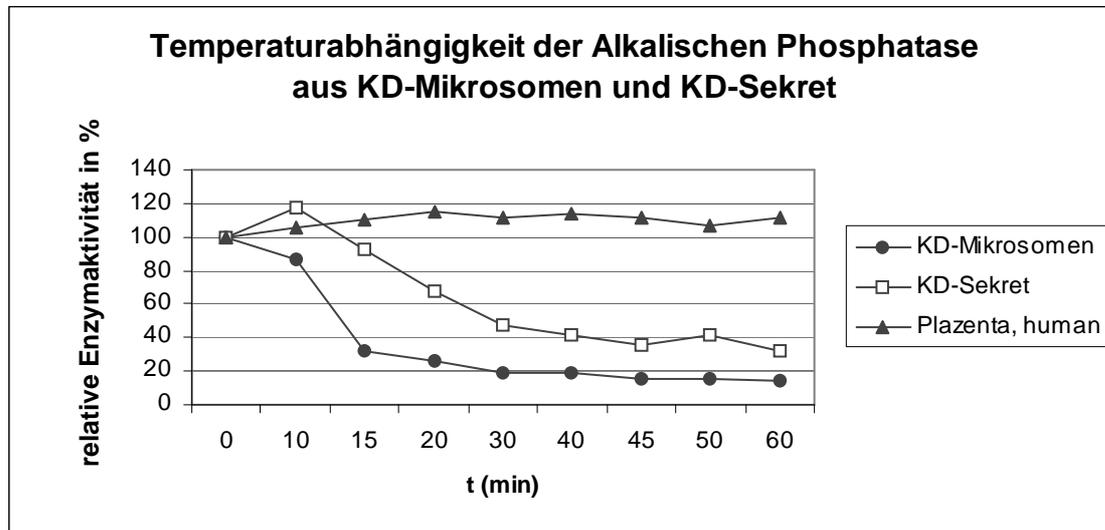


Abb. 28: Temperaturempfindlichkeit der Alkalischen Phosphatase-Aktivität aus KD-Mikrosomen und KD-Sekret nach Hitzebehandlung. Je 50 µg KD-Mikrosomen bzw. 50 µg KD-Sekretprotein wurden 0-60 min bei 56 °C inkubiert und anschließend die AP-Aktivität mit p-Nitrophenyl-Phosphat bei 37 °C bestimmt. (N = 5)

3.2.5 Nachweis der Expression der AP-mRNA in der KD bzw. in KDE-Zellen der Ratte

Die Untersuchungen zur Hitzestabilität der AP in der KD bzw. im KD-Sekret lassen vermuten, dass es sich dabei um die gewebeunspezifische Form handelt. Mittels RT-PCR mit spezifischen Primern wurde dieses Ergebnis überprüft. Hierbei ergab sich sowohl in der KD als auch in den primären KDE-Zellen ein positives Signal für die gewebeunspezifische Isoform (Abb. 29). Die Intaktheit der verwendeten Probe wurde jeweils durch eine PCR mit den Housekeeping-Gen GAPDH überprüft. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein PCR-Ansatz ohne cDNA durchgeführt.

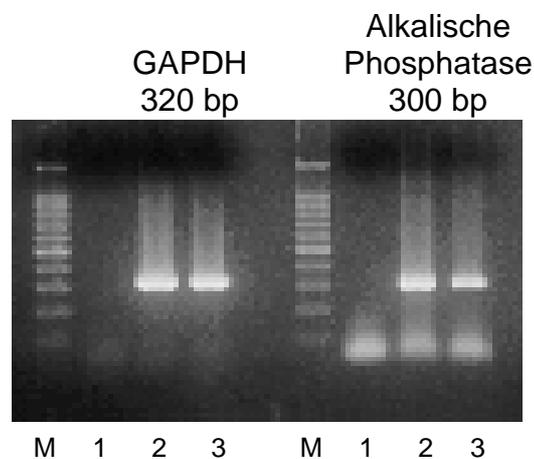


Abb. 29: Nachweis der AP-mRNA in KD-Gewebe und primären KDE-Zellen mittels RT-PCR. M: 100 bp Größenmarker, Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2: primäre KDE-Zellen, Spur 3: KD-Gewebe. Je 20 μ l PCR-Produkt wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend fotografisch dokumentiert.

3.2.6 Sequenzanalyse

Die aus der RT-PCR erhaltene Sequenz wurde mit den bekannten Sequenzen in den Datenbanken (Blast) verglichen. Der Vergleich ergab eine 99 %ige Identität mit der mRNA der Alkalischen Phosphatase der gewebeunspezifischen Isoform der Spezies *Rattus norvegicus* (Noda et al., 1987).

3.2.7 Einfluss von DHT auf die Expression und Aktivität der Alkalischen Phosphatase in primären KDE-Zellen

Die Inkubation der Zellen mit DHT in Konzentrationen von 10^{-7} bzw. 10^{-8} M führte zu einer Repression der AP-mRNA im Vergleich zur Kontrolle um 30-40 % (Abb. 30). Eine weitere Erhöhung der DHT-Konzentration zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Transkriptionsrate.

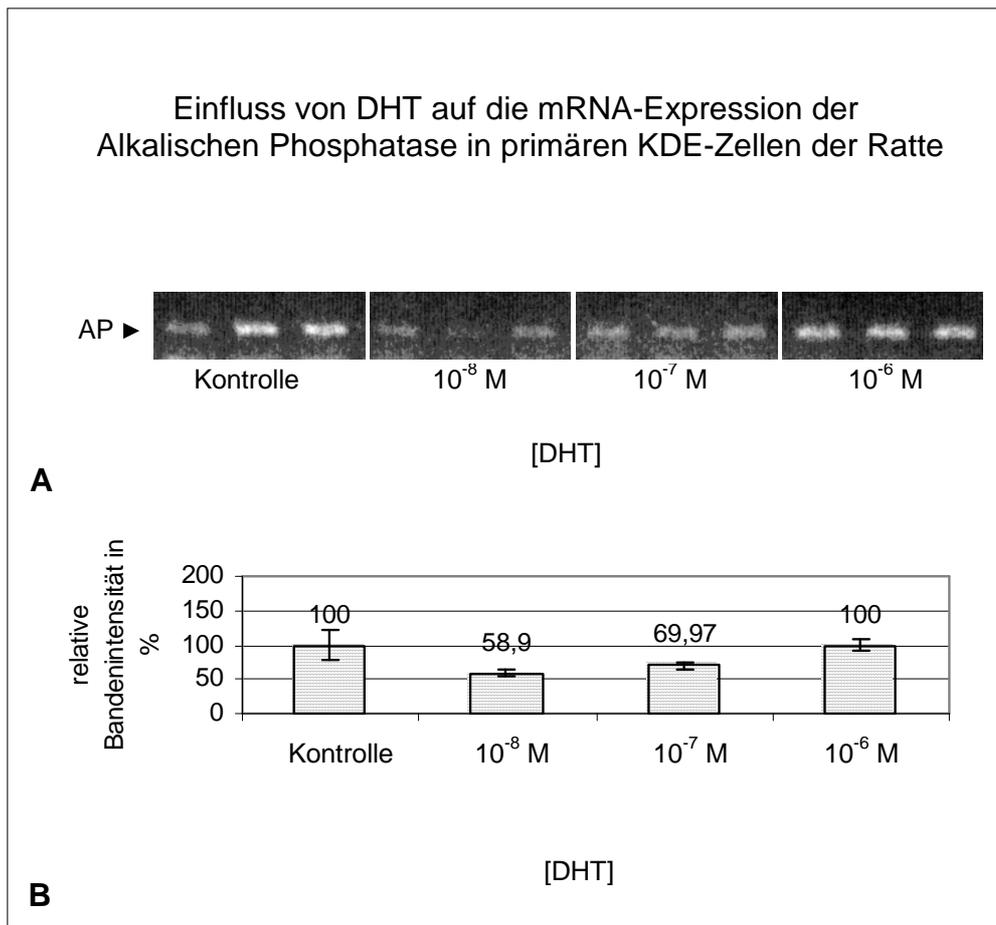


Abb. 30: Analyse der Expression der AP-mRNA in primären KDE-Zellen der Ratte nach 48stündiger Stimulation mit DHT mittels semi-quantitativer-PCR. A: 1 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt. B: Bestimmung der relativen Bandenintensität anhand des Programms Scion Image. Aus mit DHT stimulierten KDE-Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Mit GAPDH-Primern wurde die einzusetzende cDNA-Menge auf eine Schwankungsbreite von etwa 15 % abgeglichen. Für jede DHT-Konzentration wurden drei PCR-Ansätze mit einer Zyklenzahl von 33 Zyklen durchgeführt, so dass die Produktmenge noch im exponentiellen Bereich lag. Je 20 μ l des PCR-Produktes wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensität mit dem Programm Scion Image bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. (N = 2)

Zusätzlich zum quantitativen Nachweis der AP-mRNA nach Stimulation mit DHT wurde die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase durch die Hydrolyse von

p-Nitrophenyl-Phosphat in Mikrosomen aus KDE-Zellen bestimmt (Abb. 31). Hierbei konnte kein deutlicher Effekt von DHT auf die Enzymaktivität der AP in den Mikrosomen beobachtet werden.

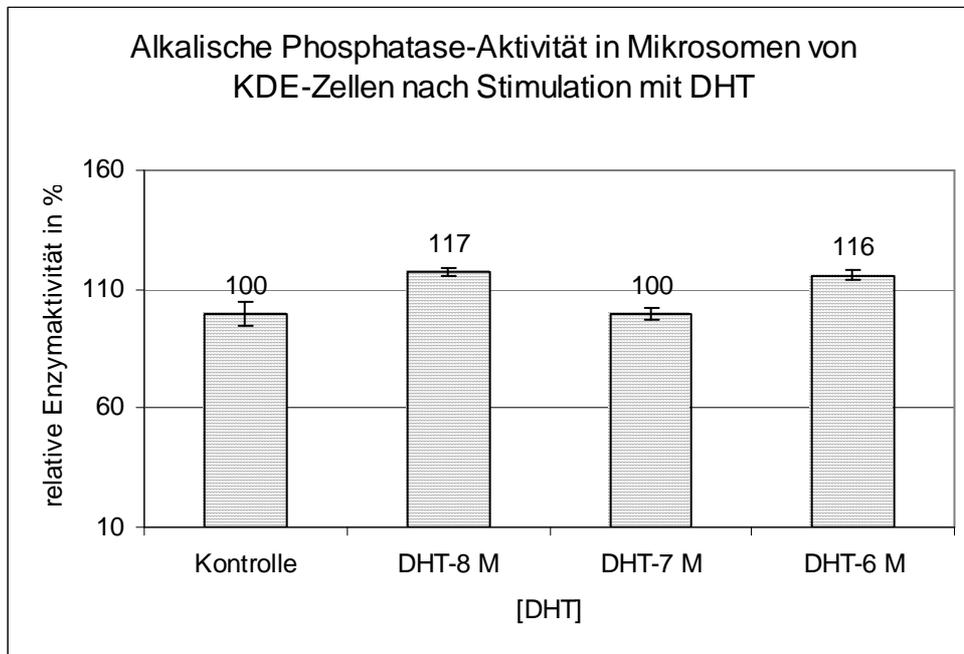


Abb. 31: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Mikrosomen aus primären KDE-Zellen nach Stimulation mit DHT. KDE-Zellen wurden 48 h mit 10^{-8} bis 10^{-6} M DHT stimuliert und Mikrosomen nach Sikdar et al. (1991) präpariert. Je $50 \mu\text{g}$ Mikrosomenprotein wurden bei 37°C mit je $100 \mu\text{g}$ pNPP als Substrat inkubiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. (N = 3)

3.3 Untersuchungen zur Neutralen Endopeptidase (NEP)

Renneberg et al. (2001) gelang es, die NEP in den Prostatasomen sowie im Epithel der humanen Prostata zu identifizieren. Ob auch die KD bzw. KDE-Zellen diese Endopeptidase exprimieren, wurde im Folgenden untersucht.

Die Expression der NEP-mRNA wurde zunächst durch RT-PCR überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die KD als auch die KDE-Zellen die NEP-mRNA transkribieren (Abb. 32).

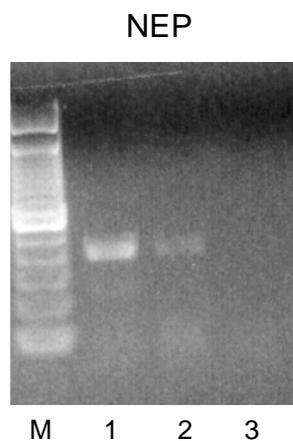


Abb. 32: Nachweis der NEP-mRNA in KD und KDE-Zellen der Ratte mittels RT-PCR. M: 100 bp Größenmarker, Spur 1: KD, Spur 2: KDE-Zellen, Spur 3: Negativkontrolle

Die Intaktheit der verwendeten Probe wurde jeweils durch eine PCR mit den House-keeping-Gen GAPDH überprüft (ohne Abb.). Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz ohne cDNA durchgeführt.

Im Weiteren wurde versucht, das NEP-Protein durch Western Blot-Analyse in KD und KDE-Zellen nachzuweisen. Dies war nicht möglich. Auch der Nachweis bzw. die weitere Charakterisierung des Proteins über die Messung der NEP-Aktivität nach einem Aktivitätsassay modifiziert nach Albrecht et al. (2002) gelang nicht.

3.4 Isolierung apikaler Plasmamembranproteine aus primären KDE-Zellen

3.4.1 Anreicherung apikaler Plasmamembranen durch differentielle Zentrifugation mit anschließender Auftrennung über einen Saccharosegradienten

Zur Präparation der apikalen Membranen aus primären KDE-Zellen wurde eine differentielle Zentrifugation mit anschließendem Saccharosegradienten nach der Methode von Ellis et al. (1992) durchgeführt. Die apikalen Membranproteine der primären Epithelzellen wurden zuvor mit Sulfo-NHS-Biotin markiert, um ihre Anreicherung während der Präparation verfolgen zu können.

Die nach der differentiellen Zentrifugation erhaltene Mikrosomenfraktion (100.000 x g Pellet) enthielt noch verschiedene Organellen wie z.B. baso-laterale Membranen, raues und glattes ER (Ford & Graham, 1991) u.a. (Abb. 33A). Mittels anschließendem dreistufigem Saccharosegradienten (30 %, 35 %, 45 % (w/v) Saccharose) sollten diese Verunreinigungen von den apikalen Plasmamembranen abgetrennt werden.

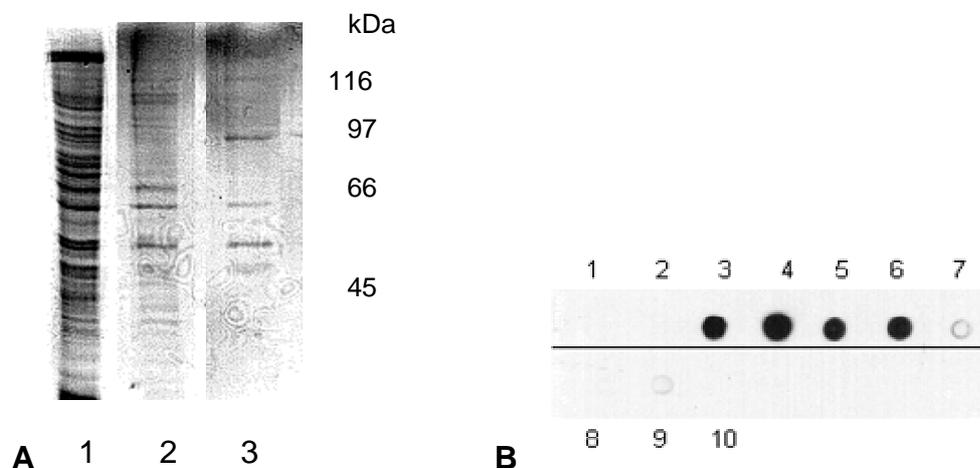


Abb. 33: Anreicherung apikaler Plasmamembranproteine primärer KDE-Zellen durch differentielle Zentrifugation. A: Auftrennung der Membranproteine nach den verschiedenen Zentrifugationsschritten in der SDS-Page (13 %): Spur 1: Gesamthomogenat KDE-Zellen (20 µg), Spur 2: 100.000 x g Pellet KDE-Zellen - Mikrosomenfraktion (10 µg) Spur 3: apikale Plasmamembranproteine nach der Saccharosegradientenzentrifugation (10 µg). B: Dot Blot aus den gesammelten Fraktionen (1-2: oberste Phase, 3-5: 30 % Saccharose, 6-8: 35 % Saccharose, 9-10: 45 % Saccharose) wurde jeweils ein Aliquot von 5 µl auf eine Nitrozellulosemembran getropft. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden biotinmarkierte Proteine mit Streptavidin-POX detektiert.

Im Verlauf der Präparation zeigte sich, dass das Proteinspektrum im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Gesamthomogenat) stark abnahm, wobei gleichzeitig einzelne Proteinbanden angereichert werden konnten. Die Fraktionen, die die mit Sulfo-NHS-Biotin markierten, apikalen Plasmamembranproteine enthielten, wurden im Anschluss an den Saccharosegradienten durch Dot Blot-Analyse (Abb. 33B) identifiziert. Die Fraktionen drei bis sechs zeigten ein deutliches Signal, d.h. die biotinylierten Plasmamembranproteine wurden in der 30 %igen Saccharose angereichert. Die Interphase zwischen 30 %iger und 35 %iger Saccharose war ebenfalls positiv.

Die resultierende Proteinmenge war jedoch so gering, so dass keine weiteren Versuche (Sequenzierung, Aktivitätstest etc.) möglich waren. Daher wurde eine weitere Methode zur Isolierung apikaler Plasmamembranen versucht.

3.4.2 Präparation apikaler Plasmamembranen bzw. apikaler Plasmamembranproteine anhand der $MgCl_2$ -Präzipitationsmethode

Eine weitere Methode zur Isolierung apikaler Plasmamembranen beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Sialylsäuren an den Membranproteinen. Membranen mit geringem Sialylsäuregehalt (z.B. baso-laterale Plasmamembranen) aggregieren nach Zugabe von Mg^{2+} und lassen sich durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit abtrennen. Apikale Epithelmembranen, die einen hohen Sialylsäuregehalt besitzen, formen dagegen Vesikel und lassen sich erst durch Zentrifugation mit hoher Geschwindigkeit abtrennen.

Diese $MgCl_2$ -Präparationsmethode nach Smith & Nothnick (1997) wurde zur Isolierung primärer KDE-Zellen modifiziert. Analog zur ersten Methode erfolgte zuvor eine Markierung der apikalen Membranproteine der primären Epithelzellen durch Sulfo-NHS-Biotin. Dadurch konnte ihre Anreicherung während der Präparation verfolgt werden, zum anderen war es möglich, die erhaltenen apikalen Plasmamembranproteine mit Hilfe von streptavidin-gekoppelten Dynabeads anzureichern und von möglichen, noch vorhandenen basolateralen Plasmamembranproteinen abzutrennen.

Im Verlauf der Aufarbeitung kam es zu einer deutlichen Verminderung des Proteinspektrums (Abb. 34). Das Gesamthomogenat enthielt neben den Membranen verschiedener Organellen (Plasmamembranen, Golgi, ER), Nuklei und größere Zelltrümmer. Gemäß dem Protokoll nach Smith & Nothnick (1997) sollte sich nach Zu-

gabe von $MgCl_2$ die nicht-apikalen Membranen durch Zentrifugation mit $3.000 \times g$ entfernen lassen. Der resultierende Überstand enthielt neben apikalen Membranvesikeln noch Reste nicht-apikaler Membranen und zytosolische Proteine. Letztere sollten jedoch durch Zentrifugation bei $27.000 \times g$ im Überstand verbleiben, während sich im Pellet die vesikulären Membranen befinden. Durch wiederholte $MgCl_2$ -Gabe sollten auch die restlichen Verunreinigungen entfernt werden. Nach der letzten Zentrifugation mit $27.000 \times g$ sollten sich im verbleibenden Pellet Proteine der apikalen Membranfraktion angereichert haben. Im Vergleich zum Gesamthomogenat konnten einige Proteinbanden aufkonzentriert werden (Pfeile, Abb. 34), während andere völlig wegfielen.

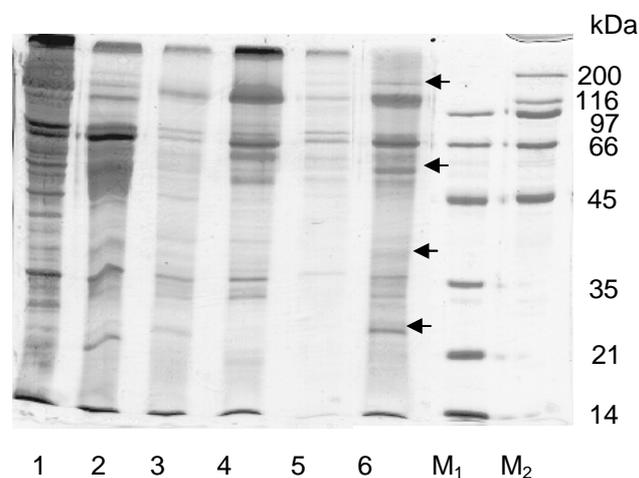


Abb. 34: Anreicherung apikaler Plasmamembranproteine mittels der $MgCl_2$ -Methode. Spur 1: Gesamthomogenat aus KDE-Zellen ($20 \mu g$), Spur 2: Überstand $3.000 \times g$ ($20 \mu g$), Spur 3: Pellet $27.000 \times g$ ($15 \mu g$), Spur 4: Überstand $3.000 \times g$ ($20 \mu g$), Spur 5: Überstand $27.000 \times g$ ($10 \mu g$), Spur 6: Pellet $27.000 \times g$ = apikale Membranfraktion ($20 \mu g$), M_1/M_2 : Eichproteine. Die Proteine wurden auf einem 13%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Pfeile: angereicherte Membranproteine.

Um apikale, Biotin-markierte Membranproteine von möglicherweise noch enthaltenen Nicht-Membranproteinen unterscheiden zu können, wurde eine Western Blot-Analyse mit Streptavidin-POX-Konjugat abgeschlossen. Dabei zeigte sich, dass nicht alle Proteine des $27.000 \times g$ Pellets biotinyliert waren und es sich daher vermutlich nicht um eine reine apikale Membranfraktion handelt (ohne Abb.). Deshalb wurden die aus der $MgCl_2$ -Präparation erhaltenen apikalen Plasmamembranen durch die Bindung an streptavidin-gekoppelte Dynabeads weiter angereichert. Im folgenden Western Blot konnte mit Streptavidin-POX-Konjugat eine große Anzahl biotinylierter

Proteine detektiert werden (Abb. 35). Sechs dieser Proteinbanden konnten Banden im SDS-Gel zugeordnet werden. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden diese Banden ausgeschnitten und von Prof. Lottspeich (MPI, Martinsried) N-terminal ansequenziert.

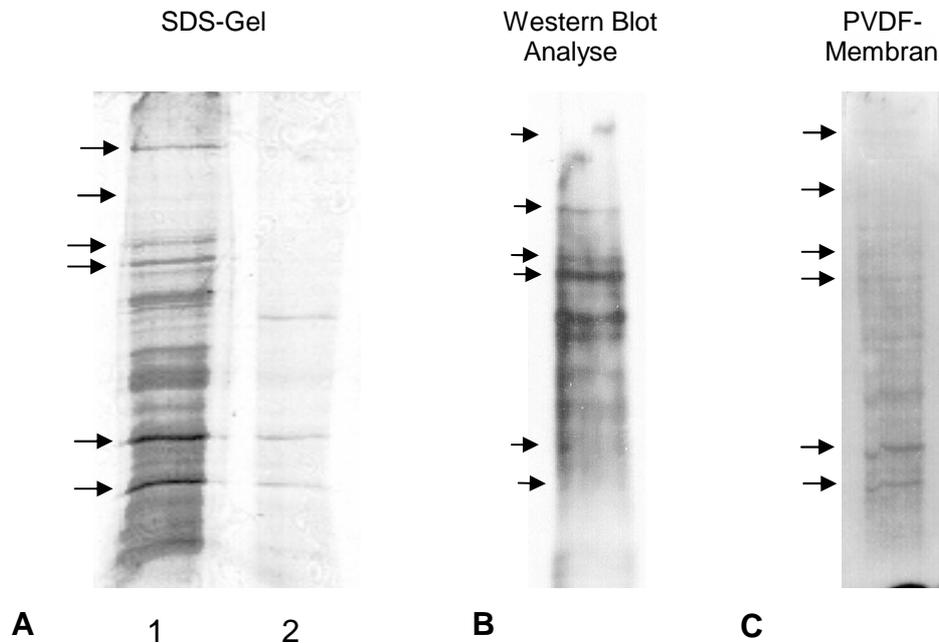


Abb. 35: Affinitätsreinigung von Biotin-markierten apikalen Membranproteinen primärer KDE-Zellen mit Dynabeads M-280 Streptavidin. A: 13 %iges SDS-Gel: Spur 1: apikale biotinylierte Plasmamembranfraktion nach Smith & Nothnick (1997) (15 μ g); Spur 2: apikale biotinylierte Membranfraktion nach Bindung an Dynabeads M-280 Streptavidin (20 μ l); M: Größenmarker. Die Proteine wurden mit Coomassie angefärbt. B: Western Blot: Detektion der affinitätsgereinigten biotinylierten apikalen Membranproteinen mit Streptavidin-POX-Konjugat (1:1000). C: Transfer der affinitätsgereinigten Membranproteine auf eine PVDF-Membran und anschließende Färbung mit Coomassie. Die mit Pfeilen markierten Banden wurden für die Sequenzierung ausgewählt.

Von den 6 ansequenzierten Proteinen konnten Hsp-90 (97 kDa), Actin (45 kDa) und Annexin II (38,5 kDa) identifiziert werden. Hierbei handelt es sich jedoch um keine "echten" Membranproteine, sondern um membran-assoziierte Proteine. Bei den anderen Proteinen war eine Sequenzierung nicht möglich.

Die Ausbeute der apikalen Membranen war jedoch auch hier insgesamt sehr gering, so dass nicht überprüft werden konnte, ob die Membranfraktion Ca^{2+} -ATPase-Aktivität bzw. AP-Aktivität aufwies.

3.5 Caveolin und apokrine Sekretion

Caveolae sind cholesterin- und sphingolipidreiche Regionen der Plasmamembran zahlreicher Gewebe. Diese charakteristische Lipidverteilung lässt sich sowohl in der Prostatomenmembran als auch in der Membran ektozytotischer Vesikel beobachten (Stein & Luzio, 1991; Carlini et al., 1997; Arienti et al., 1998a). Zusätzlich konnten Darby et al. (2000) eine Anreicherung der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in den Caveolae beobachten. Ferner sind GPI-Anker-gekoppelte Proteine dort vermehrt lokalisiert. Nachfolgende Untersuchungen sollten klären, ob Caveolae ebenfalls Bestandteil der apikalen Plasmamembran der KD bzw. der Aposomenmembran sind.

3.5.1 *Caveolin-1 β wird in der KD und den KDE-Zellen der Ratte transkribiert*

Zunächst wurde die mRNA-Transkription der Caveolin-1 Isoformen Caveolin-1 α und Caveolin-1 β in der KD und KDE-Zellen untersucht.

Caveolin-1 α -mRNA konnte weder in der KD noch in den KDE-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 36). Die Caveolin Isoform 1 β wurde dagegen in der Drüse und in den Zellen transkribiert.

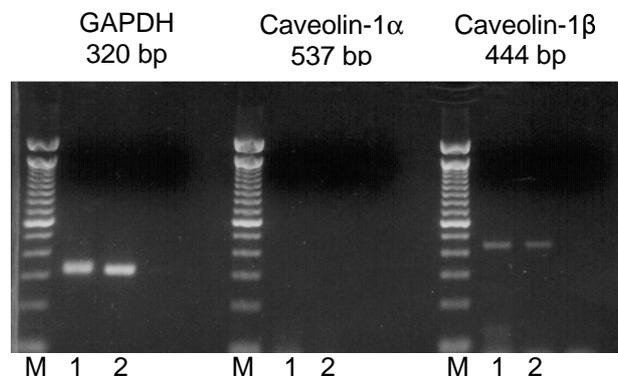


Abb. 36: Untersuchung der Transkription der Caveolin-1 Isoformen α und β in KD-Gewebe und primären KDE-Zellen der Ratte mittels RT-PCR. M: 100 bp Größenmarker, Spur 1: KD-Gewebe, Spur 2: primäre KDE-Zellen, Spur 3: Negativkontrolle. Je 20 μl PCR-Produkt wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend fotografisch dokumentiert.

3.5.2 *Caveolin-Nachweis in Mikrosomen der KD, in primären KDE-Zellen sowie im KD-Sekret der Ratte*

Caveolin konnte durch Western Blot-Analyse in Mikrosomen aus der KD, aus KDE-Zellen und in ausgetropftem KD-Sekret nachgewiesen werden (Abb. 37). Als Positiv-

kontrolle diente ein Homogenat von Endothelzellen, die Caveolin in hohem Ausmaß exprimieren.

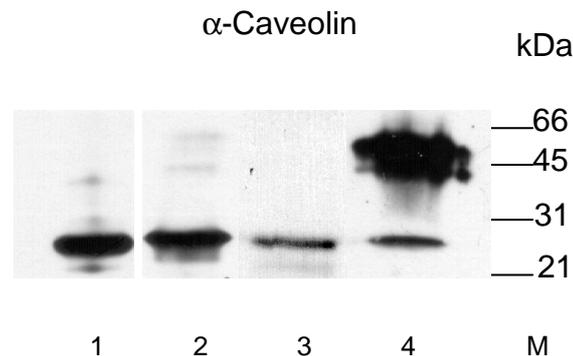


Abb. 37: Nachweis von Caveolin in Mikrosomen aus KD und KDE-Zellen sowie in KD-Sekret. 1: Positivkontrolle, 2: KD-Mikrosomen; 3: KDE-Mikrosomen, 4: KD-Sekret. Je 20 μ g Protein wurde auf einem 13 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit α -Caveolin detektiert.

3.5.3 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Caveolin auf KD-Gewebe und in KDE-Zellen der Ratte

Das Stroma zeigte auf Kryostatschnitten des KD-Gewebes die größten Vorkommen an Caveolin. Dabei war das Protein über die gesamten Zellen gleichmäßig verteilt. Im KD-Epithel war eine weitaus geringere Menge vorhanden. Doch auch hier erschien Caveolin nicht auf die Plasmamembran beschränkt vorzuliegen, sondern auch innerhalb des Zytoplasmas inhomogen lokalisiert zu sein (Abb. 38).

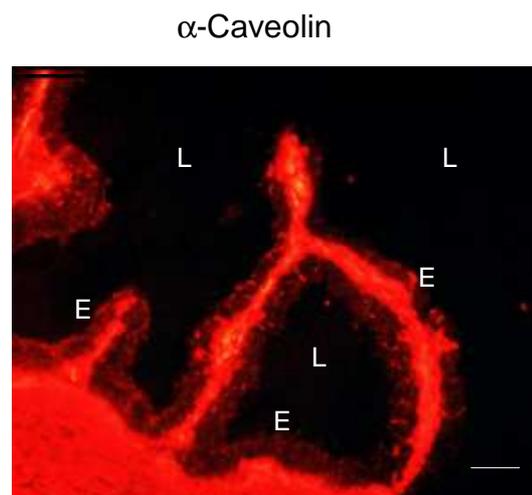


Abb. 38: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Caveolin auf Kryostatschnitten von KD-Gewebe. Als Zweitantikörper diente ein Cy-3 gekoppelter Antikörper. L: Drüsenlumen, E: Epithel, Balken: 50 μ m.

Auch auf mit Glutaraldehyd-PFA fixierten Semidünnschnitten wurde versucht, Caveolin zu lokalisieren (ohne Abb.). Auch hier zeigte vor allem das Stroma eine starke Reaktion mit dem Antikörper. Im Epithel konnte Caveolin nicht detektiert werden.

Auf KDE-Zellen der Ratte wird das auf den Kryostatschnitten beobachtete Ergebnis bestätigt. Auch die Zellen zeigen eine starke intrazelluläre Färbung, wobei Caveolin besonders im Bereich um die Nuklei lokalisiert war. Die Zellkerne wie auch die basolateralen Membranen waren ausgespart (Abb. 39).

α -Caveolin

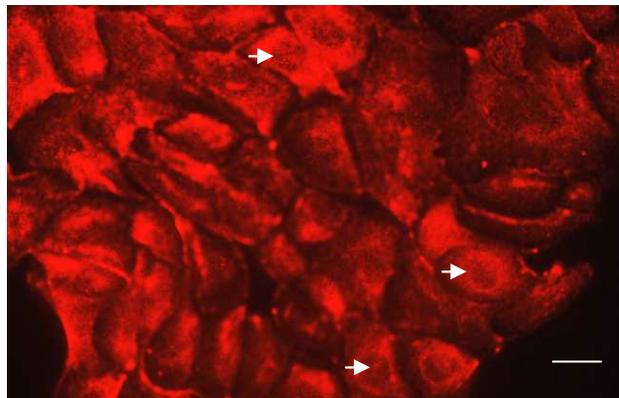


Abb. 39: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Caveolin in den KDE-Zellen der Ratte. Als Zweitantikörper diente ein Cy-3 gekoppelter Antikörper. Balken: 15 μ m. Pfeil: Nuklei

4 DISKUSSION

Die Epithelzellen der KD sezernieren Proteine wie eingangs beschrieben unter anderem über den so genannten apokrinen Sekretionsweg. Dabei werden Proteine aus dem Zytoplasma mittels so genannter Aposomen exportiert, die aus der apikalen Plasmamembran entstehen. Wenig ist bisher über den Aufbau der Aposomenmembran bekannt. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sollten dazu beitragen zu klären, ob Membranproteine aus der apikalen Plasmamembran in die Aposomenmembran integriert werden und mit ihnen exportiert werden.

Ein weiterer alternativer Exportmechanismus, der viele Gemeinsamkeiten mit der apokrinen Sekretion besitzt, ist die sog. Ektozytose. Untersuchungen von Stein & Luzio (1991) haben gezeigt, dass die Vesikel bei der Ektozytose eine von der Plasmamembran unterschiedliche Protein- und Lipidzusammensetzung aufweisen, d. h. bei dem Sekretionsmechanismus der Ektozytose werden die Membranbestandteile offensichtlich neu sortiert. Bislang gab es jedoch noch keine Daten darüber, welche Membranproteine in den Ektozytosevesikeln nachzuweisen sind. Wie anfänglich beschrieben, werden Proteine der humanen Prostata ebenfalls über einen alternativen Sekretionsweg mittels sog. Prostrasomen exportiert. Die Prostrasomen zeichnen sich desgleichen durch eine besondere Lipidzusammensetzung aus (Arvidson et al., 1989; Arienti et al., 1998a). In der Prostrasomenmembran wurden unlängst einige Proteine identifiziert, wie z. B. die Ca^{2+} -ATPase (Ronquist et al., 1978a, b), die AP (Fabiani & Ronquist, 1995) und die NEP (Renneberg et al., 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst zu untersuchen, ob diese Proteine auch in den Aposomen der KD und der apikalen Plasmamembran des KD-Epithels vorhanden sind. Für die Untersuchungen der Membranen wurde neben KD-Gewebe auch eine primäre Epithelzelllinie der KD verwendet, die Wiche (2001) im Rahmen ihrer Promotionsarbeit etabliert hatte. Diese Zellen exprimieren neben den Polaritätsmarkern Occludin und E-Cadherin auch die apokrinen Markerproteine TGase und CAH II sowie das merokrin sezernierte 115 K Protein. Zur Analyse der Aposomen wurde KD-Sekret verwendet.

4.1 Untersuchungen zur Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) in der KD sowie im KD-Sekret und in KDE-Zellen der Ratte

4.1.1 *Die Gen- und Protein-Expression einer Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in der KD und in KDE-Zellen der Ratte*

Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase wurde erstmals von Schatzmann (1966) in der Plasmamembran von Erythrozyten beschrieben.

Um zu untersuchen, ob eine Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase ebenfalls in der KD bzw. in KDE-Zellen exprimiert wird, wurden zunächst Western Blot-Analysen mit Mikrosomen aus KDE-Zellen und KD-Gewebe unter Verwendung eines gegen alle PMCA-Isoformen gerichteten Antikörpers durchgeführt. Dieser monoklonale Antikörper ist gegen ein Epitop einer hoch konservierten Region der intrazellulären Schleife der Erythrozyten- Ca^{2+} -ATPase (zwischen AS 724-783), gerichtet. Daher werden alle bisher bekannten PMCA-Isoformen verschiedener Spezies, darunter die PMCA der Ratte, erkannt (Borke et al., 1989). In Epithelzellen wurde eine Doppelbande von etwa 135 und 140 kDa lokalisiert (s. Abb. 9). In der KD wurde neben einer Bande von 140 kDa eine weitere distinkte Bande von 180 kDa detektiert (s. Abb. 9). Aus den Primärsequenzen der 4 Isoformen lassen sich die Molekulargewichte kalkulieren: So ergibt sich für PMCA1 ein MG von 139 kDa, für PMCA2 ein MG von 137 kDa, für PMCA3 ein MG von 138 und für PMCA4 ein MG von 129 bzw. 133 kDa (Shull & Greeb, 1988; Caride et al., 1996; Filoteo et al., 1997). Die Doppelbanden mit 135 und 140 kDa lassen daher die Translation verschiedener Isoformen in den KDE-Zellen vermuten. Sie könnten aber auch auf das Vorkommen verschiedener post-translationaler Modifikationen der PMCA-Proteine wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen hinweisen.

Um zu untersuchen, welche PMCA-Isoform überhaupt von der KD bzw. den KDE-Zellen exprimiert wird, wurden RT-PCRs mit spezifischen Primern gegen die PMCA-Isoformen 1 bis 4 durchgeführt (s. Abb. 10). Dabei konnten sowohl in den KDE-Zellen als auch im KD-Gewebe die mRNA der PMCA-Isoformen 1 und 4 nachgewiesen werden. Die mRNA der Isoformen 2 und 3 konnte dagegen nicht in Zellen bzw. Gewebe detektiert werden.

Mittlerweile waren auch Antikörper gegen die PMCA-Isoformen 1 und 4 erhältlich. Die Western Blot-Untersuchungen mit diesen Antikörpern bestätigten die Ergebnisse der RT-PCR und zeigten die Translation der Proteine auf. In Mikrosomen aus KDE-Zellen als auch KD-Gewebe konnte jeweils eine Bande mit einer Größe von etwa 139 kDa mit dem Antikörper gegen PMCA1 detektiert werden (s. Abb. 11), die sich auch in Versuchen mit dem gegen alle PMCA-Isoformen gerichteten Antikörper zeigte (s. Abb. 10). In der KD wurde zudem mit dem PMCA1-Antikörper eine weitere Bande von ca. 180 kDa detektiert (s. Abb. 11), die ebenfalls mit dem gegen alle Isoformen gerichteten Antikörper beobachtet werden konnte (s. Abb. 10). Um welche der beiden PMCA1-Splicevarianten 1a bzw. 1b es sich handelt, konnte durch diese Untersuchungen nicht geklärt werden. Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte Gutberlet (2002, persönliche Mitteilung) die PMCA1-cDNA der KD klonieren. Die Sequenzierung ergab, dass es sich um die PMCA1-Splicevariante 1b handelte. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass zumindest die Splicevariante PMCA1b in der KD exprimiert wird.

PMCA4 konnte im KD-Gewebe und in den KDE-Zellen jeweils als Doppelbande mit einer Größe von etwa 133 kDa nachgewiesen werden, wobei PMCA4 im Gewebe in weitaus größerem Umfang vorhanden war (s. Abb. 11). Bei den Doppelbanden handelt es sich vermutlich um die Splicevarianten PMCA4a bzw. PMCA4b, die eine Größe von 133 kDa bzw. 129 kDa aufweisen (Caride et al., 1996; Filoteo et al., 1997). Die mit dem gegen alle PMCA-Isoformen gerichteten Antikörper in KD-Gewebe und KDE-Zellen detektierten PMCA-Isoformen besaßen dagegen ein MG von ca. 135 - 140 kDa. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei der Bande von 135 kDa um eine PMCA4-Splicevariante handelt.

Die Isoformen PMCA1 und PMCA4, die auf mRNA- und Proteinebene in KD und KDE-Zellen detektiert werden konnten, sind nahezu ubiquitär vorhanden. PMCA2 und PMCA3 sind dagegen auf wenige Gewebe wie glatte Muskulatur oder Gehirn begrenzt (Greeb & Shull, 1989; Stahl et al., 1992; Stauffer et al., 1993; Carafoli & Stauffer, 1994; Keeton & Shull, 1995). Obwohl PMCA4 in nahezu allen Geweben vorkommt, ist dennoch die Verteilung der Splicevarianten gewebespezifisch. Die Beta-Zellen des Pankreas z.B., deren Sekretion Ca^{2+} -abhängig verläuft, exprimieren ausschließlich die Splicevariante 4b. Die Alpha- und Gamma-Zellen dagegen weisen

beide Splicevarianten auf (Caride et al., 1996; Filoteo et al., 1997). PMCA1 scheint in den KDE-Zellen in größerem Umfang vorhanden zu sein als PMCA4, was die Ergebnisse von Stauffer et al. (1993) unterstützt, die eine durchschnittliche Transkriptionsrate von PMCA1 zu PMCA4 von 1: 0,67 postulierten. Carafoli (1994) und Hammes et al. (1994) beschrieben PMCA1b und PMCA4a als die am weitesten verbreiteten Isoformen und bezeichnen sie daher als ubiquitäre Haushaltsgene. Andere Autoren postulieren PMCA1b als dominante Isoform in Ca^{2+} -transportierenden Geweben wie Intestinum, Niere und Knochen (Keeton et al., 1993; Meszaros & Karin, 1993). Reinhardt et al. (2000) detektierten in der ebenfalls apokrin sezernierenden laktierenden Milchdrüse die Expression der PMCA-Isoformen 1, 2 und 4 mittels Western Blot-Analyse, wobei die Isoformen 2 und 4 in deutlich höherem Umfang nachgewiesen werden konnten als die Isoform 1.

Zum Nachweis des funktionsfähigen Ca^{2+} -ATPase-Proteins wurden Aktivitätstest nach Sikdar (1991) angeschlossen. Die verwendeten Mikrosomen aus KD bzw. KDE-Zellen lagen als inside-out-Vesikel vor (Sikdar et al., 1999), so dass exogenes ATP, das nicht durch die Plasmamembran diffundieren kann, dennoch an die Substratbindestelle gelangte. Die meisten Ca^{2+} -ATPasen sind Mg^{2+} -abhängige Enzyme (Robinson 1976; Carafoli & Crompton, 1978; Niggli et al., 1979). Auch Ronquist beschrieb 1987 in Prostrasomen eine Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität, die einige Charakteristika der PMCA, wie z.B. die Inhibierung durch La^{3+} und Calmidazolium, aufwies. Zusätzlich schilderten verschiedene Autoren eine Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase in Mikrosomen aus glatten Muskelzellen, Rattenhoden, Ziegen- und Bullenspermien sowie in der Bläschendrüse und der Prostata adulter Affen und in Partikeln des bovinen Bläschendrüsensekretes (Thorens, 1979; Vijaysarathai al.1980; Vanithakumari & Govindarajulu, 1985; Agrawal & Vanha-Perttula, 1987; NagDas et al., 1988; Sikdar et al., 1991;). In Mikrosomen aus der KD und aus KDE-Zellen konnten Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivitäten detektiert werden (s. Tab. 9). Bei den präparierten Mikrosomen handelte es sich jedoch um keine reine Plasmamembranfraktion, sondern um eine Mikrosomenfraktion, die noch durch ER-Membranen verunreinigt war. Die gemessene Aktivität setzte sich daher aus PMCA- und SERCA-Aktivität zusammen. Die spezifische PMCA-Aktivität wurde nach Zugabe eines spezifischen Inhibitors der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase, Thapsigargin, ermittelt (Kennedy & Mangini, 1996; Guerini, 1998a). Die resultierenden Enzymaktivi-

täten betragen 80-90 % der Ausgangsaktivität in den Mikrosomen aus KD-Gewebe bzw. 60 % der Ausgangsaktivität in den Mikrosomen aus KDE-Zellen (s. Tab. 9). Die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase wird schon durch eine Thapsigarginkonzentration von 30 nM um 50 Prozent gehemmt (Furuya et al., 1994). Die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität war für KDE-Zellen und KD-Gewebe höher als die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität. In den Mikrosomen aus der KD war die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase um etwa 15 % höher als in den Mikrosomen aus KDE-Zellen. Die spezifische Aktivität der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase des Gewebes lag sogar um 30 % über der der Zellen (s. Tab. 9). NagDas et al. (1988) konnten in Mikrosomen aus Rattenhoden eine sogar um 50 % höhere Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität im Vergleich zum Mg^{2+} -abhängigen Enzym detektieren.

Durch die Zugabe der verschiedenen Modulatoren Calmodulin, Nifedipin, TFP und Verapamil wurde versucht, die gemessenen Mg^{2+} -abhängigen bzw. -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivitäten zu charakterisieren (s. Abb. 18).

Calmodulin ist der wichtigste Aktivator der PMCA (Carafoli, 1992). Es übt seine Wirkung aus, indem es die Affinität des Enzyms für Ca^{2+} steigert. Die höchste Ca^{2+} -Affinität weist PMCA2 auf, wogegen PMCA1 und 4 eine nur geringe Affinität für Ca^{2+} besitzen (Guerini, 1998b). In der vorliegenden Arbeit konnte in den Mikrosomen der KDE-Zellen die Mg^{2+} -abhängige und Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität durch eine direkte Calmodulingabe um etwa 20 % stimuliert werden. Auch war die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in den Mikrosomen des KD-Gewebes um 20 % induzierbar (s. Abb. 18A), während Calmodulin auf die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase des Gewebes keinen bzw. einen eher hemmenden Einfluss hatte (s. Abb. 18B). Der stimulierende Einfluss von Calmodulin auf die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase wird von einer Reihe von Autoren beschrieben. So konnten Bewaji & Bababunmi (1987) in Erythrozytenmembranen vom Schwein eine Steigerung der Enzymaktivität durch Calmodulin um das 5fache des Ausgangswertes beobachteten. Reinach & Holmberg (1987) erzielten in einer Membranfraktion der bovinen Cornea durch die Gabe von 6 μM Calmodulin ein ähnliches Ergebnis. Hier kam es zu einer Aktivitätssteigerung der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase um 53 %. In der Erythrozytenmembran liegen die PMCA-Isoformen 1 und 4 vor, wobei das Verhältnis von

PMCA1 zu PMCA4 1:4 beträgt (Stauffer et al., 1995). Dies steht im Gegensatz zu den meisten Geweben, in denen die Isoform PMCA1 gegenüber der Isoform PMCA4 überwiegt (Stauffer et al., 1993). Auch in den Plasmamembranen anderer Gewebe wurde der Effekt von Calmodulin auf eine Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase beschrieben. Adeoya-Osiguwa & Fraser (1996) schilderten eine durch Calmodulin stimulierbare Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Membranen muriner Spermienköpfe. Die von Ronquist (1987) in den Prostatomen beschriebene Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase war dagegen nicht durch direkte Calmodulingabe stimulierbar, sondern erst im Anschluss an eine vorherige Hemmung mit Calmidazolium. Es ist nicht bekannt, um welche Isoform es sich bei den oben beschriebenen Ca^{2+} -ATPasen handelt.

Die Gabe des als Calmodulinantagonist bekannten Trifluorperazin (TFP; 0,5 μ M, 0,25 μ M) und der Ca^{2+} -Kanal-Hemmer Nifedipin (0,5 mM; 0,25 mM) sowie Verapamil (0,2 mM; 0,1 mM) führten sowohl in Mikrosomen aus KDE-Zellen und KD zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Mg^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase (s. Abb. 18). Gietzen et al. (1982) bzw. Santos et al. (1994) beobachteten ebenfalls in Erythrozyten bzw. in synaptischen Membranen eine Hemmung der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase durch TFP. Sikdar et al. (1991) beschreiben die konzentrationsabhängige Hemmung einer Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase sowie einer Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase in der Membran von Ziegenspermien durch TFP in Konzentrationen von 50-300 μ M.

Die Wirkung des Ca^{2+} -Kanal Hemmers Verapamil wird dagegen für verschiedene Organe unterschiedlich beschrieben. Eine calmodulin-stimulierbare Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase aus Erythrozyten ließ sich durch Verapamil in einer Konzentration von 0,01 bis 5 mM bzw. 10 mM hemmen (Raess & Gersten, 1987; Kim & Raess, 1988; Raess & Record, 1990). Juneja et al. (1990) dagegen erzielten eine stimulierende Wirkung von Verapamil auf die Ca^{2+} -ATPase und den Ca^{2+} -Transport in Meerschweinchenspermien. Der Ca^{2+} -Kanal-Hemmer wurde den Tieren in verschiedenen Dosen über 4 bzw. 12 Wochen oral verabreicht. Dieser Effekt war auch noch bis zu 6 Wochen nach Absetzen des Präparates zu beobachten.

Der Effekt von Nifedipin auf die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase wird widersprüchlich auch innerhalb einzelner Organe beschrieben. Olorunsogo et al. (1991; 1992) zeigten eine dosisabhängige Hemmung auf die basale Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-

Aktivität aus Erythrozyten durch Nifedipin in Konzentrationen ab 300 μM . Raess & Gersten (1987) sowie Kim & Raess (1988) und Raess & Record (1990) konnten jedoch keinen Effekt von Nifedipin in Konzentrationen von 1-10 nM auf die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase aus humanen Erythrozyten nachweisen, möglicherweise aufgrund der geringen Dosierung. Kanwar et al. (1993) zeigten, dass die Behandlung humaner Spermien mit 0,1-100 μM Nifedipin in einer Hemmung der Ca^{2+} -ATPase sowie einer verminderten Spermienmotilität resultierte. Dagegen konnten Juneja et al. (1992) nach oraler Gabe von 1-2,5 mg Nifedipin/kg Körpergewicht eine Steigerung der Ca^{2+} -ATPase in Spermienmembranvesikeln des Meerschweinchens beobachten. Dieser Effekt war teilweise bis vollständig reversibel. Ob es sich bei der oben beschriebenen ATPase um die Mg^{2+} -abhängige oder -unabhängige Form handelt, wurde nicht ausgewiesen.

Die direkte Steigerung der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität durch Calmodulin sowie die ähnlichen Effekte, die die verwendeten Inhibitoren Verapamil und TFP auf die Mg^{2+} -abhängige Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase in KDE-Zellen und KD ausüben (s. Abb. 18), lassen den Schluss zu, dass es sich um das gleiche Enzym handelt wie in Erythrozyten. Die unterschiedliche Calmodulinwirkung auf die in der Literatur beschriebene PMCA der Erythrozyten und auf die ATPasen aus KD-Gewebe bzw. KDE-Zellen lässt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Verteilung der PMCA1- bzw. PMCA4-Isoformen erklären.

Ob es sich bei der Mg^{2+} -abhängigen und der Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase um identische Moleküle handelt, ist ungewiss. Sikdar et al. (1993) gelang es, in Mikrosomen aus Ziegenspermien eine Mg^{2+} -abhängige und eine -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität zu detektieren. Sie postulieren das Modell eines Enzyms, das zwei verschiedene katalytische Seiten besitzt. Die einheitlichen Effekte, die in dieser Arbeit durch die verwendeten Inhibitoren auf das Mg^{2+} -abhängige bzw. Mg^{2+} -unabhängige Enzym erzielt werden konnten, würden diese Theorie unterstützen, wie auch die Induzierbarkeit der untersuchten Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase in KDE-Zellen durch Calmodulin. Da in der vorliegenden Arbeit Thapsigarginkonzentrationen von bis zu 200 nM eingesetzt wurden, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der gemessenen Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität um SERCA handelt. Die uneinheitliche Wirkung von Calmodulin auf die Mikrosomen aus KD-Gewebe (s.

Abb. 18A, B) deutet dagegen auf die Anwesenheit zweier verschiedener Enzyme hin. Kwan et al. (1986) beschreiben neben einer Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase ebenfalls ein Mg^{2+} -unabhängiges, jedoch nicht durch Calmodulin stimulierbares Enzym in der glatten Muskulatur der Aorta.

4.1.2 Die subzelluläre Lokalisation der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA)

Immunfluoreszenzuntersuchungen an Semidünn- und Kryostatschnitten der KD wurden angeschlossen, um zu untersuchen, ob die PMCA in der apikalen Membran und den Aposomen vorhanden ist. Auf mit PFA/Glutaraldehyd fixierten Semidünnschnitten wurde PMCA1 neben der apikalen Plasmamembran auch in den Aposomen detektiert, was auf eine Anreicherung und Integration der PMCA in die Aposomen hindeutet (s. Abb. 13). Auf methanol-fixierten Kryostatschnitten der KD wurde PMCA1 ebenfalls in der apikalen und lateralen Plasmamembran der KD-Epithelzellen nachgewiesen (s. Abb. 12). Auf den Kryostatschnitten der KD konnten jedoch keine Aposomen detektiert werden. Möglicherweise wirkte sich die fehlende Fixierung negativ auf den Erhalt bzw. die Stabilität der Aposomen aus. Auf primären KDE-Zellen konnte PMCA1 deutlich in der Plasmamembran lokalisiert werden und bestätigt die Lokalisation auf den Gewebeschnitten (s. Abb. 14). Zusätzlich wurde der Bereich der Zellkerne durch den Antikörper angefärbt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um unspezifische Reaktionen. Die Ergebnisse bestätigen die Resultate der RT-PCR (s. Abb. 10) und unterstützen die Befunde aus der Western Bot Analyse (s. Abb. 9/Abb. 11), in der PMCA1 in KDE-Zellen und in KD-Gewebe in gleichem Umfang detektiert werden konnte. Dies lässt sich durch die Anreicherung des Proteins in der Plasmamembran erklären.

α -PMCA4 reagierte auf Kryostat- und Semidünnschnitten der KD sehr stark mit den Plasmamembranen stromaler Zellen, ohne das KD-Epithel oder die Aposomen zu färben (s. Abb. 12/Abb. 13). Auf den KDE-Zellen konnte PMCA4 ebenfalls nicht in der Plasmamembran nachgewiesen werden, sondern es kam auch hier zu einer unspezifischen Färbung der Zellkerne (s. Abb. 14). Die Ergebnisse zur Lokalisation von PMCA4 in KD-Gewebe und auf KDE-Zellen lassen eine eher untergeordnete Rolle des Proteins im KD-Epithel vermuten. Dies wird auch durch die Western Blot-Ergebnisse unterstützt, wobei PMCA4 in Mikrosomen aus KDE-Zellen nur in gerin-

gem Umfang vorhanden war (s. Abb. 11). Die Mikrosomen aus KD-Gewebe wiesen dagegen einen hohen Anteil an PMCA4 auf. Da es sich bei den Mikrosomen des KD-Gewebes um ein Gemisch von Plasmamembranen verschiedener Zelltypen handelte, resultierte dieses Ergebnis wahrscheinlich aus dem hohen Anteil an Plasmamembranen stromaler Zellen.

Unter Verwendung eines gegen alle PMCA-Isoformen gerichteten Antikörpers (α -5F10) wurden PMCA1 und 4 sowohl im KD-Gewebe (Epithel und Stroma) als auch auf den KDE-Zellen nachgewiesen und damit die Ergebnisse mit den spezifischen Antikörpern bestätigt (vgl. Abb. 12/13/14). Die Intensität der Färbung fiel jeweils geringer aus. Die ubiquitäre Verteilung, die Stauffer et al. (1993) für PMCA1b und PMCA4 postulierte, erklärt die deutliche Anwesenheit beider Proteine im Stroma der KD.

Da die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen keine Aussage darüber zuließen, ob PMCA apikal oder baso-lateral lokalisiert ist, wurden Ko-Lokalisationsstudien mit Occludin, dem Markerprotein der *Zonula occludens*, angeschlossen. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wiesen zunächst auf eine Ko-Lokalisation beider Proteine an den Zellgrenzen der KDE-Zellen hin (s. Abb. 15). Um PMCA1 genauer lokalisieren zu können, wurde eine Analyse mittels Laser-scanningmikroskopie angeschlossen. Diese ergab, dass PMCA in geringem Umfang im apikalen Bereich der KDE-Zellen detektiert werden konnten (s. Abb. 16). In weit-aus größerem Umfang jedoch liegt das Protein ko-lokalisiert mit Occludin im Bereich der *Zonula occludens* bzw. im basalen Bereich der KDE-Zelle vor (s. Abb. 15/ Abb. 17).

Analog zur Lokalisation der PMCA1 in Aposomen und dem KD-Epithel postulierten Reinhardt et al. (2000) für die apokrin laktierende Milchdrüse die apikale Lokalisation und die Abgabe der PMCA-Isoform 2b mittels membranöser Vesikel in die Milch. PMCA2b wird mit Beginn der Laktation am apikalen Pol des milchproduzierenden Epithels exprimiert und an die globulären Membranen des Milchfettes gebunden in die Milch abgegeben. Zusätzlich werden PMCA1 und PMCA4 in geringem Umfang in der laktierenden Milchdrüse exprimiert, wobei die Isoform 4 deutlich überwiegt. Keine

der beiden letztgenannten Isoformen ist apikal lokalisiert, noch werden sie in die Milch abgegeben.

Stauffer et al. (1993) beschrieben die PMCA ursprünglich als baso-laterales Protein. Dennoch dokumentierten weitere Autoren ebenfalls eine sowohl basale als auch apikale Verteilung der PMCA. In MDCK-Zellen ist die PMCA Isoform 4b, die hauptsächlich in der basalen Plasmamembran lokalisiert ist, dominierend. Dennoch konnte PMCA4b neben der PMCA-Isoform 1b in geringem Umfang in der apikalen Plasmamembran detektiert werden (Kip & Strehler, 2003). Auch Lee et al. (1997) wiesen die Expression einer nicht spezifizierten PMCA-Isoform im baso-lateralen und im luminal-apikalen Bereich der Epithelzellen von Pankreas und Speicheldrüsen nach. Street et al. (1998) und Dumont et al. (2001) lokalisierten PMCA2b in den Haarzellen des Innenohres am apikalen Zellpol.

4.1.3 *PMCA im KD-Sekret*

Aumüller & Adler (1979) postulieren, dass die Aposomen ihren Ursprung in der apikalen Plasmamembran der KD-Epithelzellen haben. Entsprechend dieser Theorie müssten Proteine der apikalen Plasmamembran in die Aposomen integriert werden. Die starken Reaktionen des PMCA1-Antikörpers bzw. des gegen alle PMCA-Isoformen gerichteten Antikörpers mit den Aposomen weisen darauf hin, dass PMCA in die Aposomen integriert und mit den Aposomen sekretiert wird.

Durch Western Blot-Analyse konnte keine der PMCA-Isoformen im KD-Sekret detektiert werden (ohne Abb.). Das KD-Sekret besteht allerdings hauptsächlich aus sekretorischen Proteinen. Nur ein geringer Teil der Proteine liegt membrangebunden vor. Daher ist es durchaus denkbar, dass der geringe im KD-Sekret enthaltene Anteil an PMCA-Protein unter der Nachweisgrenze der in dieser Arbeit verwendeten Western Blot-Methode liegt.

Der Nachweis von Mg^{2+} -abhängiger bzw. -unabhängiger Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in ausgetropftem KD-Sekret unterstreicht dieses Ergebnis. Die im KD-Sekret gemessene spezifische Mg^{2+} -abhängige bzw. -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität war um ein Vielfaches geringer als in Mikrosomen aus KD-Gewebe bzw. KDE-Zellen (s. Abb. 18). Dies könnte ebenfalls in dem vergleichsweise geringen Anteil membrangebundener Proteine innerhalb der Gesamtsekretproteine begründet liegen. Aposomen

schnüren sich von der apikalen Plasmamembran ab, so dass das aktive Zentrum der PMCA *in vivo* im Inneren der Aposomen liegen würde. Somit würde kein ATP hydrolysiert, d.h. es könnte keine Aktivität gemessen werden. *In vitro* weisen die Aposomen jedoch eine nur geringe Stabilität auf, wodurch die Isolierung intakter Aposomen aus ausgetropftem KD-Sekret unmöglich ist (persönliche Mitteilung B. Wilhelm). Daher ist davon auszugehen, dass die Vesikelstruktur *in vitro* nicht erhalten bleibt und ATP an das aktive Zentrum der PMCA gelangen und somit PMCA-Aktivität detektiert werden kann.

Um zu überprüfen, ob die Ca^{2+} -ATPase-Aktivität tatsächlich an die Aposomen gebunden vorliegt, wurde KD-Sekret durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g in membranöse und lösliche Bestandteile aufgetrennt. Hierbei zeigte nur die pelletierte Membranfraktion Mg^{2+} -abhängige und -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivitäten (s. Abb. 19A, B). Im Überstand konnte dagegen keine Aktivität detektiert werden. Dieses Resultat unterstützt die Annahme, dass PMCA als aktives Enzym in die Aposomenmembran integriert wird und unterstreicht die Lokalisation von PMCA in Aposomen der KD-Gewebeschnitte.

Ronquist (1987) kam zu ähnlichen Ergebnissen, nachdem er prostasomenhaltige Seminalflüssigkeit einer Ultrazentrifugation bei 105.000 x g unterzog und ausschließlich in dem erhaltenen Pellet Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität messen konnte. Im Gegensatz zur Mg^{2+} -abhängigen bzw. -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in KD-Gewebe und in KDE-Zellen zeigte Thapsigargin auf die Mg^{2+} -abhängige bzw. -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität im KD-Sekret keinen Einfluss. Dies beweist, dass die gemessene Aktivität nicht aus dem ER möglicherweise lysierter Zellen stammte. Zudem belegten Wilhelm et al. bereits 1999, dass keine LDH und damit keine Bestandteile des Zytosols in die Aposomen abgegeben werden.

Der PMCA-Aktivatoren Calmodulin führte im KD-Sekret zu einer bis zu 45 %igen Steigerung der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und wies damit einen um etwa 20 % höheren Effekt auf als in den Mikrosomen (s. Abb. 18A). Möglicherweise war die in den Mikrosomen aus KD-Gewebe und KDE-Zellen vorliegende Enzymaktivität der PMCA durch bereits endogen vorliegendes Calmodulin weniger stark stimuliert.

bar. Die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität im KD-Sekret wurde dagegen nur um maximal 11 % gesteigert (s. Abb. 18B).

Die Inhibitoren TFP, Nifedipin und Verapamil zeigten wie schon zuvor bei den Mikrosomen aus KDE-Zellen und KD eine konzentrationsabhängige Hemmung der Mg^{+} -abhängigen und -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität (s. Abb. 18A, B).

4.1.4 *Einfluss von Androgenen/Androgenentzug auf die PMCA in der KD der Ratte und der KDE-Zellen*

In der Literatur gibt es Hinweise, dass die PMCA im Genitaltrakt androgenabhängig reguliert wird. Arunakaran et al. (1990) belegten, dass die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in der Prostata und der Bläschendrüse des Haubenaffen durch Kastration vermindert wird. Dieser Effekt war durch die Gabe von DHT, Testosteron-Propionat bzw. Prolaktin reversibel. Die Bildung der Aposomen in der KD ist, wie auch die Synthese der apokrin sezernierten Proteine, ein androgenabhängiger Prozess (Holterhus et al., 1993). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass PMCA mit den Aposomen aus der KD-Epithelzelle exportiert wird. Somit ist ein Androgeneinfluss auf die PMCA-Expression nahe liegend.

Immunhistochemische Untersuchungen an der KD von Ratten, 14 Tage nach Kastration, zeigten, dass sich die Lokalisation von PMCA1 im Vergleich zum Kontrolltier stark veränderte. Während im Kontrolltier PMCA1 sowohl im apikalen KD-Epithel als auch in den Aposomen lokalisiert war, konnte das Enzym bei Androgenentzug nur noch im Stroma der KD detektiert werden (s. Abb. 20A, B). Die Expression von PMCA1 im KD-Epithel ist demzufolge abhängig von Androgenen. Im Stroma dagegen hatte der Androgenentzug keinen Einfluss auf die Verteilung des Enzyms.

PMCA4 konnte in vorhergehenden immunhistochemischen Untersuchungen ausschließlich im Stroma der KD detektiert werden (s. Abb. 20C). Auch im kastrierten Tier war PMCA4 ausschließlich im Stroma lokalisiert (s. Abb. 20D), so dass auch eine mögliche hemmende Wirkung von Androgenen auf die PMCA4-Expression im KD-Epithel ausgeschlossen werden kann.

Da diese Ergebnisse auf eine Beteiligung von Androgenen an der Expression der PMCA1 im KD-Epithel hinwiesen, wurden Untersuchungen zur direkten Wirkung von

DHT auf die PMCA1- bzw. PMCA4-mRNA-Expression und Ca^{2+} -ATPase-Aktivität angeschlossen. KDE-Zellen wurden über 48 h mit DHT in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-8} M inkubiert. Mittels einer semi-quantitativen RT-PCR wurde die mRNA-Expression und durch Aktivitätstests die Menge des funktionsfähigen Enzyms detektiert. Eine DHT-Konzentration von 10^{-8} M zeigte einen nur geringen Effekt auf die PMCA1-mRNA-Spiegel der KDE-Zellen, wogegen DHT-Konzentrationen von 10^{-7} bzw. 10^{-6} M eine signifikante Steigerung der PMCA1-Transkriptionsrate um 25 bzw. 42 % bewirkten (s. Abb. 22).

In KDE-Zellen wurde die PMCA4-mRNA-Expression durch die Stimulation mit 10^{-8} M DHT auf etwa 85 % des Ausgangswertes vermindert. DHT-Konzentrationen von 10^{-7} bzw. 10^{-6} M führten zu einem Anstieg der PMCA4-mRNA-Spiegel um 20 bzw. 26 % (s. Abb. 23). Da der Abgleich des internen Standards, der GAPDH-mRNA, auf 15 % erfolgte, kann nicht von einem stimulierenden Effekt auf die PMCA4-mRNA Transkription in KDE-Zellen ausgegangen werden. Zusammen mit den immunhistochemischen Untersuchungen ergaben sich keine deutlichen Hinweise auf einen möglichen Einfluss von Androgenen auf die PMCA4-Expression im KD-Epithel.

Zur genaueren Quantifizierung der Veränderung der PMCA1- bzw. PMCA4-mRNA wäre der Einsatz der sog. Real-Time-PCR von Nutzen, um bereits geringe Veränderungen zu detektieren und um die Fehlerrate, die schon beim Abgleich des bei der semi-quantitativen PCRs verwendeten Standards auftritt, zu vermindern bzw. auszuschließen (Bustin, 2000).

Untersuchungen zur Enzymaktivität zeigten, dass im Gegensatz zur Transkriptionsrate der PMCA1-mRNA bei einer DHT-Konzentration von 10^{-7} M die Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase am stärksten, d.h. um 54 %, gesteigert wurde (s. Abb. 24B). Eine DHT-Gabe von 10^{-8} bzw. 10^{-6} M erhöhte die Aktivität des Enzyms dagegen nur um 16 % bzw. 30 %. Die Enzymaktivität scheint bei einer DHT-Konzentration von 10^{-7} M im Sättigungsbereich zu liegen.

Die Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase wurde durch DHT-Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-8} M um etwa 30 % gesteigert (s. Abb. 24A). Die höchste Aktivitätssteigerung um 46 % wurde auch hier bei einer DHT-Konzentration von 10^{-7} M beobachtet. Die

Ergebnisse zum Einfluss von DHT auf die Aktivität der PMCA in KDE-Zellen belegen die steigernde Wirkung des Steroidhormons.

4.1.5 *Mögliche Funktion von PMCA in der apikalen KD-Membran und den Aposomen*

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur subzellulären Lokalisation von PMCA1 lassen die Schlussfolgerungen zu, dass die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (1) neben der baso-lateralen auch in der apikalen Plasmamembran der KD-Epithelzellen lokalisiert ist, (2) in den Aposomen angereichert vorliegt und (3) mit ihnen aus den Epithelzellen transportiert wird. Diese Schlussfolgerungen unterstützen die Theorie von Aumüller & Adler (1979), die besagt, dass sich die Aposomenmembran aus der apikalen Plasmamembran des KD-Epithels rekrutiert.

Wie bereits geschildert, ist die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle mit 10^{-7} M bei Eukaryoten weitaus geringer als im Extrazellulärraum, wo sie 10^{-3} M beträgt. Im Rahmen zellulärer Ereignisse, z.B. einer Signalkaskade, kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom über Ca^{2+} -Kanäle. Schon eine geringe Imbalance der Ca^{2+} -Homöostase kann weitreichende Schäden des Zellstoffwechsels nach sich ziehen. Die Funktion der PMCA liegt hierbei in der Wiederherstellung der ursprünglichen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

Auch für die in der apikalen Membran des KD-Epithels detektierte PMCA wäre die Beteiligung des Enzyms an der Aufrechterhaltung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration denkbar. Diese Theorie wird unterstützt von Lee et al. (1997), die ebenfalls die Expression der PMCA im baso-lateralen und im luminal-apikalen Bereich der Epithelzellen von Pankreas und Speicheldrüsen beschrieben und die Hauptfunktion der PMCA in der Kontrolle der Ca^{2+} -Konzentration im luminalen Bereich der Epithelzellen vermuteten. Zusätzlich postulierten sie eine Rolle der PMCA im Ca^{2+} -Signalgebungskomplex. In der Parotis konnten Bruce et al. (2002) ebenfalls eine PMCA in der apikalen Epithelzellmembran detektieren und wiesen dem Enzym ebenfalls eine Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase zu. Hierbei betonten sie die besondere Bedeutung der PMCA im Bereich der Mikrovilli. Dort fehlt aufgrund der starken Ausstülpungen der apikalen Plasmamembran das ER und damit die sarkoplasmatische

Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die ebenfalls als wichtiger Regulator der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration fungiert.

Die Beteiligung der PMCA an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der KD wird durch Untersuchungen an der Harderdrüse unterstützt. In der Harderdrüse, der apokrin sezernierenden Tränendrüse des Hamsters, ist während des apokrinen Sekretionsvorgangs der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel erhöht (Gesase & Sa-toh, 2001). Geht man davon aus, dass auch in der KD während der apokrinen Sekretion der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ansteigt, könnte die Rolle der PMCA in der Nivellierung der lokal erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im Anschluss an den apokrinen Sekretionsvorgang liegen. In den Aposomen kann eine ähnliche Funktion diskutiert werden. Falls während der apokrinen Sekretion die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration tatsächlich erhöht wäre, so würde auch in den Aposomen eine hohe Ca^{2+} -Konzentration vorherrschen. Da die Aposomen aus der apikalen Plasmamembran entstehen, ist die PMCA so orientiert, dass sie Ca^{2+} aus den Aposomen exportiert. Als aktives Enzym der Aposomenmembran unterstützt die PMCA möglicherweise ebenfalls die Wiederherstellung bzw. die Aufrechterhaltung der ursprünglichen Ca^{2+} -Konzentration in den Aposomen. Dies wäre besonders wichtig, da die Aposomen eine sekretorische TGase enthalten, ein Ca^{2+} -abhängiges Enzym, dass schon ab einer Ca^{2+} -Konzentration von 3 mM aktiviert wird und Proteine quervernetzt (Williams-Ashman, 1984). Durch die PMCA-Aktivität und der damit einhergehenden Verminderung der intra-aposomalen Ca^{2+} -Konzentration würde auf diese Weise das Verklumpen von Proteinen innerhalb der Aposomen verhindert.

Die Ergebnisse zum Einfluss von DHT auf die Expression der PMCA1 im KD-Epithel und zur Lokalisation von PMCA1 in der KD unter Androgenentzug belegen, dass die PMCA1-Expression im KD-Epithel androgenabhängig reguliert wird. Es gibt Indizien, dass der Ca^{2+} -ATPase im männlichen Genitaltrakt eine Rolle in der Fertilität zukommt. Brody et al. (1981) konnten in Personen mit vermindertem Serum-Testosteronspiegel eine verminderte Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Prostatasomen bzw. in sekretorischen Vesikeln feststellen. Außerdem sind die für die Befruchtung einer Eizelle obligatorischen Spermienfunktionen (Motilität, Kapazitation und Akrosomreaktion) abhängig von der intrazellulären spermalen Ca^{2+} -Konzentration (Yanagimachi & Usui, 1974; Babcock et al., 1979; Breitbart et al.,

1985). Kirchhoff & Hale (1996) beschrieben den Zell-zu-Zell-Transfer eines GPI-verankerten Proteins durch die Fusion von Vesikeln des Nebenhodens mit Spermien. Es ist denkbar, dass die Aposomen ebenfalls mit Spermien fusionieren und auf diese Weise, die PMCA1 oder weitere fertilitätsfördernde Komponenten auf Spermien übertragen werden. PMCA1 könnte zur Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der Spermien beitragen und somit indirekt an der Fertilität beteiligt sein.

Wie oben beschrieben, ist die Spermienmotilität gleichermaßen abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Untersuchungen von Breitbart et al. (1985) an Widderspermien unterstützen diese Vermutung. Nach Hemmung der Ca^{2+} -ATPase zeigten die Spermien eine verminderte Motilität.

4.2 Die Alkalische Phosphatase (AP) in der KD

4.2.1 Nachweis der AP in KD und KDE-Zellen

Ronquist (1993) beschrieb in humanem Prostatasekret neben einer Mg^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -ATPase-Aktivität auch eine AP-Aktivität. Im Sekret der dorsalen und ventralen Prostata der Ratte konnten Fischer et al. (1955) ebenfalls eine AP-Aktivität detektieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die AP in KDE-Zellen und KD bzw. in KD-Sekret zunächst durch Bestimmung der Enzymaktivität mittels pNPP als Substrat nachgewiesen. Dabei war die spezifische AP-Aktivität in Mikrosomen aus der KD um das 7fache größer als in KDE-Mikrosomen (s. Tab. 10).

Ein derzeit kommerzieller Antikörper, der mit der AP aus der Ratten-KD kreuzreagiert, war nicht verfügbar. Daher wurde ein histochemischer Nachweis der AP-Aktivität auf Kryostatschnitten der KD durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass im KD-Gewebe der stärkste Substratumsatz am basalen Pol der Epithelzellen sowie im Stroma stattfand (s. Abb. 27). Nur vereinzelt zeigten auch die Epithelzellen eine geringe Enzymaktivität. Die hohe Aktivität der AP am basalen Zellpol erstaunt, da die AP, z.B. bei Zellfraktionierungen, häufig als apikaler Marker des Bürstensaums herangezogen wird (Ellis et al., 1992). Die Untersuchungen von Saga & Morimoto (1995) unterstützen jedoch diese Daten. Sie detektierten durch histochemische Un-

tersuchungen an apokrinen Schweißdrüsen AP-Aktivität an der Basalmembran sekretorischer Zellen sowie an den Zellmembranen von Myoepithelzellen. Merokrine Schweißdrüsen wiesen dagegen keine AP-Aktivität auf. Dort war die AP-Aktivität auf die Membranen der interzellulären Canaliculi beschränkt. Auch auf KDE-Zellen setzten nicht alle Zellen das Substrat gleichmäßig um. Der Substratumsatz fand hier vor allem in den peripheren Bereichen der Zellcluster statt (s. Abb. 26).

4.2.2 *Bestimmung der Isoform der AP in KD und KDE-Zellen*

Im Anschluss an den Nachweis der AP in KD-Gewebe und auf KD-Zellen wurde versucht, die Isoform zu bestimmen. Wie bereits beschrieben, sind 4 Isoformen der AP bekannt (Kam et al., 1985; Weiss et al., 1986; Henthorn et al., 1987; Millán & Manes, 1988). Diese lassen sich anhand ihrer Hitzestabilität bei 56 °C unterscheiden. Die gewebeunspezifische AP wird schon nach einer Inkubation von 7 min, die intestinale AP-Form erst nach mehr als 1 h um 50 % gehemmt. Die Plazenta-Form sowie die plazentaähnliche Form der AP sind nahezu unbegrenzt bei 56 °C inkubierbar, ehe eine 50 %ige Hemmung eintritt (Harris, 1989). Die in dieser Arbeit gemessene AP-Aktivität in Mikrosomen aus der KD verminderte sich in Abhängigkeit von der Dauer der Hitzeeinwirkung bei 56 °C (s. Abb. 28). Die AP-Aktivität in KD-Mikrosomen fiel schon nach etwa 15 min auf einen Endwert von 20 % der Ausgangsaktivität. Der schnelle Abfall der AP-Aktivität lässt die Vermutung zu, dass es sich hier um die hitzelabile gewebeunspezifische AP handelt. Durch RT-PCR mit spezifischen Primern konnte die mRNA des gewebeunspezifischen Typs sowohl in der KD als auch in den KDE-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 29). Die Sequenzierung des PCR-Produktes bestätigte das Ergebnis.

Durch Hitzestabilitätsuntersuchungen identifizierte Fabiani (1994) ebenfalls die gewebeunspezifische AP in Prostatomen. In Spermien und Seminalflüssigkeit wurde gleichfalls eine AP des gewebeunspezifischen Typs beschrieben (Singer et al., 1980). McLaughlin et al. (1986) wiesen zusätzlich zur gewebeunspezifischen Isoform die keimzellspezifische bzw. plazentaähnliche AP-Isoform in humanem Seminalplasma und Hoden nach. Ihre Menge war an die Spermienzahl gekoppelt und fiel bei Vasektomie auf nicht mehr detektierbare Werte ab.

4.2.3 *Die AP im KD-Sekret*

Die im KD-Sekret gemessene AP-Aktivität war etwa doppelt so hoch wie in den KDE-Zellen, und um mehr als das 3fache geringer als in KD-Mikrosomen (s. Tab. 10).

Durch Hitzestabilitätsuntersuchungen wurde die gewebespezifische AP auch im KD-Sekret identifiziert. Die AP-Aktivität im KD-Sekret fiel dabei auf einen Endwert von 40 % der Ausgangsaktivität ab (s. Abb. 28). Da erst nach 30 min bei 56 °C die resultierende Basisaktivität erreicht wurde, liegt im KD-Sekret möglicherweise eine weitere AP-Isoform vor. In humanem Seminalplasma ist neben der gewebeunspezifischen Isoform die keimzellspezifische bzw. plazentaähnliche AP-Isoform detektiert worden (McLaughlin et al., 1986). Um zu überprüfen, ob dies auch für das KD-Sekret zutrifft, müssten jedoch weitere Untersuchungen wie z.B. RT-PCR mit den spezifischen Primern weiterer Isoformen, Aktivitätsmessungen unter dem Einsatz verschiedener Inhibitoren bzw. die Detektion mittels spezifischer Antikörper durchgeführt werden.

Die AP kann in freier Form aber auch als durch einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verbundenes Protein vorliegen (Cross, 1987; Davitz et al., 1987; Low, 1987). Daher wurde das Sekret einer Ultrazentrifugation unterzogen und die AP-Aktivität jeweils in dem resultierenden Überstand und der erhaltenen Membranfraktion bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass im Gegensatz zur Ca^{2+} -ATPase im Pellet und im Überstand AP-Aktivität gemessen werden konnte (s. Abb. 25). Die Aktivität im Überstand war im Vergleich zur Membranfraktion um 20 % vermindert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die AP im KD-Sekret jeweils in etwa zur Hälfte membrangebunden und zur Hälfte als freies Enzym vorliegt.

4.2.4 *Einfluss von DHT auf die mRNA-Transkription und die Enzymaktivität der AP*

Verschiedene Autoren beobachteten bisher einen regulierenden Einfluss von Steroidhormonen auf die Expressionsrate der AP in unterschiedlichsten Zelllinien. Albert et al. (1990) belegten, dass Estradiol eine regulierende Wirkung auf die Plazenta-AP in einer Adenokarzinomzelllinie des Endometriums ausübte. Di Lorenzo et al. (1991) postulierten einen regulatorischen Effekt von Progesteron auf eine AP der humanen Brustkrebszelllinie T47D. Gianni et al. (1993) zeigten, dass Retinsäure, ein Retinolderivat mit steroidhormoneller Wirkung, die Expression der gewebeunspezifischen

AP in L929-Fibroblasten induzierte. Zusätzlich berichteten Vaslenko & Sergienko (1985) von einem Absinken der AP-Aktivität in der Rattenprostata nach Gonadektomie. Durch anschließende Androgensubstitution konnte dieser Effekt aufgehoben werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsversuche an KDE-Zellen mit DHT-Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-8} M führten bei einer DHT-Konzentration von 10^{-8} M zu einer Verminderung der AP-mRNA-Transkriptionsrate um etwa 40 % (s. Abb. 30). Eine höhere DHT-Konzentration von 10^{-7} M verringerte die AP-mRNA um etwa 30 %. Bei 10^{-6} M DHT erreichte die Transkriptionsrate den Ausgangswert. Erstaunlich ist, dass die AP-mRNA bei der geringsten DHT-Konzentration am meisten reprimiert wird. Gleichzeitig ist mit steigender DHT-Konzentration eine Steigerung der AP-mRNA-Menge bis zum Kontrolllevel zu beobachten. Die vorliegenden Daten lassen keine eindeutige Aussage zum Einfluss von DHT auf die Expressionsrate der gewebe-spezifischen AP in KDE-Zellen zu.

Die anschließenden Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass die AP-Aktivität in Mikrosomen der KDE-Zellen durch DHT-Gabe nicht wesentlich beeinflusst wurde (s. Abb. 31). Diese Ergebnisse werden von Rastogi et al. (1979) unterstützt, die postulierten, dass in der Bläschendrüse von Mäusen die AP-Aktivität weder durch Kastration noch durch anschließende DHT-Gabe beeinflusst werden konnte. Mohanty & Chainy (1989) dagegen beobachteten im Hoden der Moschusmaus eine Zunahme der AP-Aktivität nach Supplementation mit Testosteron. Auch Goyal & Vig (1984) zeigten eine stimulierende Wirkung von Androgenen auf die AP. Nach Orchidektomie sank die epitheliale AP-Aktivität im Nebenhoden zunächst ab, durch Testosterongabe konnte diese jedoch wieder hergestellt werden.

Möglicherweise ist auch die AP-Aktivität in der KD erst im Anschluss an einen künstlich erzeugten DHT-Mangel durch DHT-Gabe wieder herstellbar bzw. stimulierbar. Gleichzeitig wäre eine DHT-Menge, die im oder über der physiologischen Konzentration liegt, ohne stimulierenden Einfluss.

4.2.5 *Mögliche Funktion der AP in der apikalen KD-Membran bzw. in den Aposomen*

Über eine mögliche Funktion der AP in den Aposomen bzw. im KD-Sekret gibt es bisher keine Daten. Generell wird die Aufgabe der AP mit dem Transport von Phosphaten in Verbindung gebracht (Hirano et al., 1984).

Die membrangebundene Form könnte, wie es Kirchhoff & Hale (1996) für ein GPI-gekoppeltes Protein des Nebenhodens beschrieben, auf Spermien übertragen werden. Diese Theorie würde von verschiedenen Autoren unterstützt werden, die eine AP neben der Seminalflüssigkeit auch in der Spermienmembran nachweisen konnten (Soucek & Vary, 1984; Parks et al., 1987). Der hohe Anteil freier AP im KD-Sekret lässt die Vermutung zu, dass die Bindung an die Aposomen keine Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des Enzyms im KD-Sekret darstellt. Da sich das aktive Zentrum der AP dagegen extrazellulär befindet, ist davon auszugehen, dass beide Formen, die membrangebundene und freie Form, wahrscheinlich die gleichen Aufgaben besitzen.

Tang (1998) vermutete, dass die AP die Glykosylierung der Spermienoberfläche durch die Hydrolyse von Nukleotidzuckern verhindert. Zusätzlich weisen verschiedene Autoren der AP in Spermien bzw. im Seminalplasma eine ganze Reihe möglicher Substrate zu wie: Phosphatester verschiedener Mononukleotide, Zucker, Glycerophosphat und Pyridoxal-5-Phosphat, ATP oder AMP (Glogowski, 1988; Ciereszko et al., 1994; Minelli et al., 1995). Als Enzym mit einer großen Substratbreite kommen der AP in Aposomen bzw. im KD-Sekret möglicherweise unspezifische Aufgaben zu. Trotz der Substratvielfalt scheint die AP ebenfalls eine Rolle bei der Fertilität zu besitzen. McLaughlin et al. (1986) gelang es, eine signifikante Korrelation zwischen männlicher Fertilität und der plazentaähnlichen AP-Menge im Seminalplasma herzustellen. Sie schlossen daraus, dass die AP-Spiegel möglicherweise die Keimzellfunktion widerspiegeln. Falls auch in der KD die plazentaähnliche AP exprimiert wird, wäre eine ähnliche Funktion denkbar.

Auch in nicht-reproduktiven Geweben, wie dem Pankreas, wird der AP eine Rolle in der Regulation von Chloridkanälen zugesprochen (Becq et al., 1993). Diese Kanäle sind auch in Spermien zu finden und sind möglicherweise an der Akrosomreaktion beteiligt (Meizel, 1997), die eine Voraussetzung für die Fertilitätsfunktion des Spermiums darstellt.

4.3 Die Neutrale Endopeptidase (NEP) in der KD

Die NEP wird in zahlreichen Geweben exprimiert. Ihre Funktion ist abhängig von ihrer Lokalisation. Neben verschiedenen Neuropeptiden wie Bombesin, Calcitonin, Bradykinin oder Neurotensin zählt auch der vasokonstriktive Faktor Endothelin1 zu den Substraten der NEP. Endothelin1 gehört zu den Proteinen des humanen Seminalplasmas und wird von einigen Prostatakarzinomzelllinien erzeugt. Zudem ist die NEP Bestandteil humaner Prostatasomen bzw. des humanen Prostatasekretes (Renneberg et al., 2001). Eine besondere Bedeutung kommt der NEP in Prostatakarzinomzelllinien zu. Papandreou et al. (1998) untersuchten die Expression der NEP in androgenabhängigen sowie androgenunabhängigen Prostatakarzinomzelllinien. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich die androgenabhängigen Zelllinien hohe NEP-mRNA-Spiegel aufwiesen, woraus die Theorie abgeleitet wurde, dass hochmaligne Zelllinien möglicherweise eine verminderte NEP-Expression bzw. Aktivität aufweisen. Diese Ergebnisse werden von neueren Untersuchungen von Sumitomo et al. (2000a) unterstützt, die zeigen konnten, dass eine fehlende NEP-Expression mit einer gesteigerten Migration der Prostatakarzinomzellen einhergeht. Zudem wird die phorbolster-induzierte Apoptose durch die NEP gefördert (Sumitomo et al., 2000b).

Durch RT-PCR konnte die mRNA-Expression der NEP in KD und KDE-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 32). Der Nachweis des NEP-Proteins durch Western Blot-Analyse bzw. durch Enzymaktivitätsassays gelang dagegen nicht (ohne Abb.). Möglicherweise wurde das Protein in so geringer Menge translatiert, dass beide verwendeten Methoden nicht sensitiv genug waren. Denkbar wäre auch, dass überhaupt keine Translation der vorhandenen mRNA stattfand. Ronco et al. (1988) dagegen beschrieben eine ubiquitäre Verteilung der NEP durch immunhistochemische Untersuchungen in verschiedenen Organen der Ratte, darunter in Prostata sowie in Bläschendrüse.

Wie Shipp et al. (1991) vermuteten, liegt die Funktion der NEP in benignen Prostataepithelzellen vermutlich in der Reduktion der lokalen Konzentration von Neuropeptiden. Neuropeptide in der Prostata werden von den neuroendokrinen Zellen des Prostataepithels synthetisiert und besitzen dem Anschein nach eine Funktion in der Signaltransduktion.

4.4 Identifizierung weiterer apikaler Proteine

Zusätzlich zum Nachweis von Plasmamembranproteinen, die schon für die Protsomenmembran beschrieben worden waren, sollte versucht werden, weitere apikale Membranproteine zu isolieren.

Die für die oben beschriebenen Untersuchungen verwendeten Mikrosomen enthielten ein Gemisch von apikalen und baso-lateralen Plasmamembranen sowie Membranen des ERs. Um weitere Membranproteine in der apikalen Plasmamembran zu identifizieren, sollte daher versucht werden, apikale Membranen von baso-lateralen bzw. Membranen des ERs zu trennen.

Zur Isolierung apikaler Plasmamembranen aus primären KDE-Zellen wurden zwei Methoden durchgeführt. Die apikalen Membranproteine wurden zuvor mit Biotin markiert, um sie während der Aufarbeitung verfolgen zu können.

Mit Methode A (modifiziert nach Ellis et al., 1992) wurde zunächst ein Zellgesamthomogenat durch differentielle Zentrifugation vorgereinigt. Die daraus resultierende Membranfraktion enthielt neben der erwünschten Plasmamembranfraktion auch Membranen der Zellorganellen (Ford & Graham, 1991), die durch einen dreistufigen Saccharosegradienten (30 %, 35 %, 45 % Saccharose w/w) voneinander getrennt wurden (s. Abb. 33A). Die anschließende Dot Blot-Analyse zeigte, dass die biotinylierten Plasmamembranproteine in der 30 %igen Saccharosefraktion angereichert worden waren (s. Abb. 33B). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ellis et al. (1992), die apikale Plasmamembranen aus Caco-2-Zellen in der Interphase zwischen 35 %iger und 45 %iger Saccharose nachwies. Dies ist möglicherweise in der unterschiedlichen Verteilung von Proteinen in den Plasmamembranen begründet, die durch die unterschiedliche Funktion beider Membranen bedingt wird (KD-Epithel: Sekretion; Kolonepithel: Aufnahme von Substanzen). Tietz et al. (1995) dagegen identifizierten bei einer Präparation apikaler und baso-lateraler Plasmamembranen aus Cholangiozyten die apikale Fraktion in der Interphase zwischen 31 %iger und 34 %iger Saccharose, wogegen die baso-laterale Fraktion in der Interphase zwischen 34 %iger und 38 %iger Saccharose zu finden war.

Die Auftrennung der fraktionierten Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese ergab, dass die Anzahl der Proteinbanden im Vergleich zum Gesamthomogenat stark vermindert war, was auf eine hohe Reinheit der isolierten Membranen hinweist. Die Ausbeute war jedoch auch bei vergrößerten Ausgangsmengen sehr gering, so dass sich diese Methode als unpraktikabel erwies.

Methode B, eine $MgCl_2$ -Präzipitationsmethode nach Smith & Nothnick (1997), basiert auf der unterschiedlichen Glykosylierung von Membranproteinen apikaler und basaler Membranen mit Sialylsäure. Durch Zugabe von $MgCl_2$ wurden sialylsäurereiche Membranen von solchen mit geringem Sialylsäuregehalt separiert, da letztere aggregierten und durch Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Mit dieser Methode wurde das Bandenspektrum der isolierten Membranproteine im SDS-Gel im Vergleich zum Gesamthomogenat weniger stark reduziert als mit Methode A, d.h. die gewonnenen Membranproteine enthielten vermutlich noch Verunreinigungen durch Nicht-Membranproteine (s. Abb. 34). Da die apikalen Membranproteine mit Biotin markiert waren, wurde die erhaltene Membranfraktion zur weiteren Aufreinigung an streptavidin-gekoppelte Dynabeads gebunden. Im Anschluss konnte im Western Blot mit Streptavidin-POX-Konjugat Proteinbanden detektiert werden (s. Abb. 35B), von denen sechs Proteinbanden von 200, 116, 97, 95, 50 und 40 kDa nach Auftrennung auf einem SDS-Gel und Transfer auf eine PVDF-Membran N-terminal ansequenziert wurden (s. Abb. 35C). Von den sechs Proteinen wurden drei Proteine identifiziert: Hsp-90 (97 kDa), Aktin (45 kDa) sowie Annexin II (38,5 kDa). Keines dieser drei identifizierten Proteine ist ein charakteristisches Membranprotein, sondern es handelt sich um membran-assoziierte Proteine. Da es sich bei der SDS-Gelelektrophorese um ein eindimensionales Verfahren handelt, ist es denkbar, dass biotinylierte Membranproteine von den o.g. membran-assoziierten nicht-biotinmarkierten Proteinen mit identischen MG überlagert wurden. Auch haben Membranproteine im Gegensatz zu z. B. den Strukturproteinen einen relativ geringen Anteil am Gesamtprotein einer Zelle, z.B. PMCA (0,1-0,2 % am Gesamtprotein), so dass die Sequenzierung des im Überschuss vorliegenden Proteins wahrscheinlich ist. Zur weiteren Trennung von Proteinen mit identischem MG müsste daher eine zwei-D-Gelelektrophorese durchgeführt werden.

Ein weiteres Problem liegt darin begründet, dass 70 % aller Proteine N-terminal blockiert vorliegen, so dass keine Sequenzierung des N-Terminus möglich ist (Lottspeich, 1998). Dies könnte auch auf die hier ausgewählten Proteine zutreffen.

4.5 Caveolin-1 und die apokrine Sekretion/Ektozytose

Die an alternativen Exportwegen beteiligten Prostatasomen sowie Ektozytosevesikel besitzen ein besonderes Lipidspektrum mit hohem Cholesterol- und Phospholipidanteil (Arvidson et al., 1989; Stein & Luzio, 1991; Carlini et al., 1997; Arienti et al., 1998a). Es ist denkbar, dass dies auch auf die apokrin sezernierten Aposomen zutrifft. Eine besondere Lipidzusammensetzung ist abgesehen von Caveolin ein weiteres Charakteristikum der Caveolae. Schnitzer et al. (1995) konnten außerdem eine Anreicherung von PMCA in Caveolae aufzeigen. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob auch Caveolin mit den Aposomen aus der KDE-Zelle geschleust wird.

4.5.1 Lokalisation von Caveolin-1 in KDE-Zellen und in KD-Gewebe

Caveolin-1 α ist das in den Caveolae hauptsächlich vorhandene Caveolin. Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression von Caveolin-1 α zunächst in KDE-Zellen und der KD belegt (s. Abb. 36). Eine weitere Splicevariante ist Caveolin-1 β , die sich am N-Terminus von Caveolin-1 α unterscheidet. Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass es sich um verschiedene mRNAs handelt (Kogo & Fujimoto, 2000). Die anschließende Western Blot-Analyse bestätigte diese Ergebnisse, indem Caveolin in Mikrosomen von KDE-Zellen, KD und auch im KD-Sekret detektiert werden konnte (s. Abb. 37). Im KD-Sekret war dabei neben der erwarteten Bande in Höhe von 22 kDa (Conrad et al., 1995) eine weitere Bande in Höhe von etwa 45 kDa zu erkennen. Vermutlich handelte es sich hierbei um ein Aggregat Caveolins. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich um ein detergenzienresistentes Homo-Oligomer Caveolins handelt, wie es Monier et al. (1995) und Sargiacomo et al. (1995) bereits beschrieben. Anschließende Immunfluoreszenzuntersuchungen sollten über die Lokalisation von Caveolin in KDE-Zellen und in KD-Gewebe Aufschluss geben. Dabei konnte gezeigt werden, dass Caveolin besonders im Stroma nachzuweisen war (s. Abb. 38). Die Epithelzellen wiesen dagegen ein nur schwaches inhomogenes Caveolinsignal auf.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen verschiedener Autoren, die beschreiben, dass Caveolin in einigen Zelltypen in besonders hohem Ausmaß vorkommt. Dazu gehören neben Fibroblasten, Adipozyten, glatte Muskelzellen, gestreifte Muskulatur, Endothelzellen und Typ1-Pneumozyten (Palade, 1953; Napolitano,

1963; Mobley & Eisenberg, 1975; Gabella, 1976; Gil, 1983). Epithelzellen dagegen werden nicht als caveolin-reich beschrieben.

Auch Untersuchungen an KDE-Zellen zeigten die inhomogene Verteilung Caveolins. Das Protein war besonders im Bereich um die Nuklei granulär zu finden (s. Abb. 39). Im Fluoreszenzmikroskop ist nicht zu erkennen, ob es sich dabei um das Trans-Golgi Netzwerk oder die apikalen Membranen handelt. Eine deutliche Färbung der lateralen Plasmamembran war ebenfalls nicht zu erkennen. Um präzisere Aussagen zu der Lokalisation von Caveolin in der Plasmamembran der KDE-Zellen zu ermöglichen, müsste ein immunologischer Nachweis des Proteins durch Immunelektronenmikroskopie oder Laserscanningmikroskopie erfolgen.

4.5.2 *Mögliche Funktionen Caveolins*

Caveolae werden eine Reihe von Funktionen zugeschrieben. Darunter die Beteiligung an zahlreichen vesikulären Transportprozessen wie Endozytose, Transzytose und Pinozytose (Razani et al., 2002). Diese Funktion wäre auch in KD-Epithelzellen denkbar.

Da Caveolin zusätzlich in ausgetropftem KD-Sekret nachgewiesen werden konnte, könnte dies auf eine zusätzliche Beteiligung von Caveolae an der apokrinen Sekretion hinweisen.

Wie zuvor bereits erwähnt, verfügen Ektozytosevesikel wie auch Prostatosomen über ein besonderes Lipidspektrum mit hohem Cholesterin- und Sphingolipidanteilen. Die Anwesenheit dieses Lipidmusters in den Aposomen würde eine Beteiligung von Caveolae an diesem Transportprozess ebenfalls unterstützen. Verschiedene Autoren postulierten außerdem die Bindung von Caveolin-1 an die Hauptbestandteile der Caveolae, nämlich an Cholesterin und Sphingolipiden (Fra et al., 1995; Murata et al., 1995; Thiele et al., 2000). Gleichzeitig wird eine hohe Affinität von Cholesterin zu Caveolin-1 beschrieben, so dass sogar in Anwesenheit starker Detergenzien die Bindung an Caveolin erhalten bleibt (Murata et al., 1995).

Aufgrund der Anwesenheit von PMCA und IP₃-regulierten Ca²⁺-Kanälen in diesen Strukturen vermutete Anderson (1993) eine Rolle der Caveolae als intrazelluläre Ca²⁺-Speicher. Die apikale Verteilung der PMCA in den Epithelzellen der KD lassen eine ähnliche Funktion der Caveolae im KD-Epithel vermuten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der Koagulationsdrüse (KD) der Ratte findet ein alternativer Exportmechanismus zur merokrinen Sekretion statt, die apokrine Sekretion. Proteine, die kein N-terminales Signalpeptid für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) besitzen, werden von den KD-Epithelzellen (KDE-Zellen) an zytoplasmatischen Polyribosomen translatiert und in sog. Aposomen, die aus der apikalen Plasmamembran entstehen, aus der Zelle ausgeschleust. Bislang ist nicht bekannt, welche Proteine Bestandteil der apikalen Plasmamembran sind und ob diese in die Aposomen integriert werden. Die humane Prostata exportiert über einen ebenfalls alternativen Exportmechanismus Proteine mittels sog. Prostrasomen. Einige dieser Prostrasomenproteine, darunter eine Ca^{2+} -ATPase (PMCA), eine Alkalische Phosphatase (AP) und eine Neutrale Endopeptidase (NEP), sind bereits bekannt. Das zentrale Anliegen dieser Arbeit bestand in der Identifizierung von Proteinen der apikalen KD-Epithel- bzw. der Aposomenmembran. Dazu sollten (1) Proteine, die bereits in den Prostrasomen nachgewiesen wurden, auf ihr Vorkommen im apikalen KD-Epithel und den Aposomen überprüft werden und (2) apikale Plasmamembranen aus KDE-Zellen isoliert und weitere apikale Proteine identifiziert werden.

Im KD-Epithel und in den Aposomen konnten eine Mg^{2+} -abhängige und eine Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase sowie einer AP identifiziert werden. Die Expression der NEP konnte durch Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nur auf der Ebene der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) gezeigt werden. Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt: Die mRNA der Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) der Isoformen 1 und 4 konnte in KDE-Zellen und KD detektiert werden. In Mikrosomenfraktionen aus KDE-Zellen und KD ließen sich im Western Blot die Proteine PMCA1 und PMCA4 nachweisen. PMCA1 konnte durch immunhistochemische Methoden im apikalen und basalen Bereich der KDE-Zellen, in der apikalen Membran des KD-Epithels und in Aposomen nachgewiesen werden. PMCA4 konnte nur schwach in den KDE-Zellen und vorwiegend im Stroma des KD-Gewebes lokalisiert werden. Zusätzlich wurde die Mg^{2+} -abhängige und Mg^{2+} -unabhängige Ca^{2+} -ATPase-Aktivität in Mikrosomen von KDE-Zellen, KD und in KD-Sekret, das die Aposomen enthält, bestimmt. Die Aktivität war durch Calmodulin stimulierbar und durch Trifluorperazin, Nifedipin und Verapamil konzentrationsabhängig hemmbar. Nach Ultrazentrifugation des KD-Sekretes war die Enzymaktivität auf das Pellet beschränkt, was auf die Membranständigkeit (Aposomen) des Enzyms schließen lässt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gen- und Proteinexpression der PMCA androgenabhängig reguliert wird. Auf Gewebeschnitten der KD von kastrierten Tieren ließ sich PMCA1 im Gegensatz zum Kontrolltier nicht in der apikalen Plasmamembran bzw. den Aposomen detektieren. Versuche zur Stimulation von KDE-Zellen mit Dihydrotestosteron (DHT) in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-6} M führten tendenziell zu einer erhöhten Transkriptionsrate der PMCA1-mRNA, wogegen DHT auf die PMCA4-mRNA-Menge keinen sichtbaren Effekt zeigte. Die Aktivität der Mg^{2+} -abhängigen und Mg^{2+} -unabhängigen Ca^{2+} -ATPase wurde bei einer mittleren DHT-Konzentration von 10^{-7} M am stärksten gesteigert.

In Mikrosomen aus KDE-Zellen, KD und in KD-Sekret wurde ebenfalls eine AP-Aktivität detektiert. Nach Ultrazentrifugation des KD-Sekretes war die AP-Aktivität nicht auf die Membranfraktion beschränkt, sondern die AP lag zu 50 % gelöst und zu 50 % membrangebunden im Sekret vor. Histochemische Untersuchungen lokalisierten die AP-Aktivität auf KDE-Zellen und an Gewebeschnitten hauptsächlich auf der basalen und vereinzelt auf der apikalen Seite des KD-Epithels. Durch Untersuchungen der Hitzestabilität des Enzyms und durch anschließende RT-PCR wurde die gewebeunspezifische Isoform der AP identifiziert und bestätigt. Stimulationsversuche mit DHT ließen keine eindeutige Aussage über die Androgenabhängigkeit der AP in den KDE-Zellen zu.

Um weitere apikale Membranproteine des KD-Epithels zu identifizieren und aus KDE-Zellen zu isolieren, wurden zwei Methoden angewandt: Methode A, eine differentielle Zentrifugation mit anschließender Aufreinigung über eine Saccharosegradienten und Methode B, einer $MgCl_2$ -Präparationsmethode. Die durch Methode A erhaltene Plasmamembranfraktion wies einen hohen Reinheitsgrad auf, besaß jedoch eine äußerst geringe Ausbeute. Methode B dagegen führte zu einer höheren Ausbeute an Plasmamembranen, mit verminderter Reinheit. Diese Membranproteine wurden dennoch in einem präparativen Gel aufgetrennt, Proteinbanden in der Größe von 40 bis 200 kDa ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert. Hierbei konnten drei Polypeptide (Aktin, Annexin II und Hsp 90) identifiziert werden. Bei keinem dieser drei Proteine handelte es sich jedoch um ein klassisches membranintegriertes Protein, vielmehr sind sie nur assoziiert.

Aufgrund der Anreicherung von PMCA in Caveolae und deren besonderer Lipidzusammensetzung, die u.a. auch Prostatomen aufweisen, wurde die Expression von Caveolin, einem Markerprotein für Caveolae, in KDE-Zellen und KD-Gewebe unter-

sucht. Die mRNA-Expression von Caveolin-1 β wurde in KDE-Zellen und in der KD nachgewiesen. Zusätzlich konnte Caveolin-1 in Mikrosomen aus KDE-Zellen, KD und in KD-Sekret im Western Blot detektiert werden.

Das zentrale Anliegen dieser Arbeit, Proteine zu identifizieren, die sowohl Bestandteil des apikalen KD-Epithels als auch der Aposomenmembran sind, konnte teilweise erreicht werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass PMCA1 sowohl im apikalen KD-Epithel als auch in den Aposomen nachzuweisen ist. Die Untersuchungen zur AP weisen auf einen Export des Enzyms aus den KDE-Zellen sowohl an Aposomen gebunden als auch in freier Form hin. Eine endgültige Aussage zur Lokalisation des Enzyms in den KDE-Zellen bzw. den Aposomen war jedoch mangels eines spezifischen Antikörpers nicht möglich. Caveolin-1 konnte weder im apikalen KD-Epithel noch in den Aposomenmembranen identifiziert werden.

6. LITERATUR

Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR (1996) Evidence for Ca^{2+} -dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 44: 111-120

Afroze T, Husain M (1990) c-Myb-binding sites mediate G(1)/S-associated repression of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase-1 promoter. *J Biol Chem* 275: 9062-9069

Agnew WF, Alvarez RB, Yien TG, Crews AK (1980) Protein synthesis and transport by the rat *choroid plexus* and *ependyma*: an autoradiographic study. *Cell Tissue Res* 208: 261-281

Agrawal Y, Vanha-Perttula T (1987) Effect of secretory particles in bovine seminal vesicle secretion on sperm motility and acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 79: 409-419

Albert JL, Sundstrom SA, Lyttle CR (1990) Estrogen regulation of placental alkaline phosphatase gene expression in a human endometrial adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 50: 3306-3310

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JC (1997) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, VCH Weinheim

Albrecht M, Gillen S, Wilhelm B, Doroszewicz J, Aumüller G (2002) Expression, localization and activity of neutral endopeptidase in cultured cells of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* 168: 336-342

Anderson RGW (1993) Caveolae: Where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10909-10913

Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67: 363-381

Apostolakos MJ, Schuermann WH, Frampton MW, Utell MJ, Willey JC (1993) Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 213: 277-84

Arienti G, Carlini E, Palmerini CA (1997a) Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *J Membr Biol* 155: 89-94

Arienti G, Carlini E, Polci A, Cosmi EV, Palmerini CA (1998a) Fatty acid pattern of human prostatic lipid. *Arch Biochem Biophys* 358: 391-395

Arienti G, Carlini E, Saccardi C, Palmerini CA (1998b) Interactions between prostasomes and leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1425: 36-40

Arienti G, Carlini E, Verdacchi R, Cosmi EV, Palmerini CA (1997b) Prostatic prostatic lipid transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). *Biochim Biophys Acta* 1336: 533-538

- Arienti G, Carlini E, Verdacchi R, Palmerini CA (1997c) Transfer of aminopeptidase activity from prostasome to sperm. *Biochim Biophys Acta* 1336: 269-274
- Arienti G, Polci A, Carlini E, Palmerini CA (1997d) Transfer of CD26/dipeptidyl peptidase IV (EC. 3.5.4.4) from prostasome to sperm. *FEBS* 410: 343-346
- Arunakaran J, Mohamed HS, Srinivasan N, Govidarajulu P (1990) Influence of prolactin, androgens and bromocriptine on seminal vesicular and prostatic adenosine triphosphatases in castrated adult monkeys *macaca radiata*. *Indian J Exp Biol* 28: 1128-1131
- Arvidson G, Ronquist G, Wikander G, Ojeteg AC (1989) Human prostasome membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering. *Biochim Biophys Acta* 984: 167-173
- Atoji Y, Hori Y, Sugimura M, Suzuki Y (1987) Lectin histochemical study on the infraorbital gland of the japanese serow (*capricornis crispus*). *Acta Morphol Neerl Scand* 25: 201-213
- Atoji Y, Yamamoto Y, Suzuki Y (1993) Apocrine secretion in the infraorbital gland of the japanese serow, *capricornis crispus*: a scanning electron-microscopic study. *Acta Anat* 148: 8-13
- Atoji Y, Yamamoto Y, Suzuki Y (1998) Apocrine sweat glands in the circumanal glands of the dog. *Anat Rec* 252: 403-412
- Aumüller G, Adler G, (1979) Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res* 198: 145-158
- Aumüller G, Renneberg H, Schiemann PJ, Wilhelm B, Seitz J, Konrad L, Wennemuth G (1997) The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. *Adv Exp Med Biol* 424: 193-219
- Aumüller G, Seitz J (1990) Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* 121: 127-231
- Aumüller G, Seitz J, Heyns W, Kirchner C (1985) Ultrastructural localization of uteroglobin immunoreactivity in rabbit lung and endometrium, and rat ventral prostate. *Histochemistry* 83: 413-417
- Aumüller G, Seitz J, Song S, Albrecht M, Bjartell A, Wilhelm B (2002) Prostatic secretory mechanisms and the formation of prostasomes. In: *Prostasomes* (ed. G Ronquist, B Nilsson) *Wenner-Gren International Series* 81: 41-53, Portland Press, London
- Aumüller G, Wilhelm B, Seitz J (1999) Apocrine secretion-fact or artifact? *Anat Anz* 181: 437-46
- Babcock DF, Singh JP, Lardy HA (1979) Alteration of membrane permeability to calcium ions during maturation of bovine spermatozoa. *Dev Biol* 69: 85-93

- Bartlett RJ, French FS, Wilson EM (1984) *In vitro* synthesis and glycosylation of androgen-dependent secretory proteins of rat dorsal prostate and coagulating gland. *Prostate* 5: 75-91
- Becq F, Fanjul M, Merten M, Figarella C, Hollande E, Gola M (1993) Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatase in pancreatic duct cells. *FEBS Lett* 327: 337–342
- Bewaji CO, Bababunmi EA (1987) Further characterization of the membrane-bound ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase from porcine erythrocytes. *Int J Biochem* 19: 721-724
- Borke JL, Caride A, Verma AK, Penniston JT, Kumar R (1989) Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules. *Am J Physiol* 257: 842–849
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Breitbart H, Rubinstein S, Nass-Arden L (1985) The role of calcium and Ca^{2+} -ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J Biol Chem* 260: 11548-11553
- Brody I, Ronquist G, Gottfries A, Stegmayr B (1981) Abnormal deficiency of both Mg^{2+} and Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase and secretory granules and vesicles in human seminal plasma. *Scand J Urol Nephrol* 15: 85-90
- Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-136
- Brown, DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533–544
- Bruce JI, Yule DI, Shuttleworth TJ (2002) Ca^{2+} -dependent protein kinase-a modulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in parotid acinar cells. *J Biol Chem* 277: 48172-48181
- Bublitz R, Armesto J, Hoffmann-Blume E, Schulze M, Rhode H, Horn A, Aulwurm S, Hannappel E, Fischer W (1993) Heterogeneity of glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase of calf intestine. *Eur J Biochem* 217: 199-207
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193
- Carafoli E (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56: 395-433
- Carafoli E (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 71: 129-153
- Carafoli E (1992) The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267: 2115-2118

- Carafoli E (1994) Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 8: 993-1002
- Carafoli E, Brini M, (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol* 4: 152-161
- Carafoli E, Crompton M (1978) The regulation of intracellular calcium. *Curr Top Membr Trans* 10: 151-216
- Carafoli E, Garcia-Martin E, Guerini D (1996) The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia* 52: 1091-1100
- Carafoli E, Stauffer T (1994) The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* 25: 312-324
- Caride AJ, Filoteo AG, Enyedi A, Verma AK, Penniston JT (1996) Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using Isoform-specific monoclonal antibodies. *Biochem J* 316: 353-359
- Carlini E, Palmerini CA, Cosmi EV, Arienti G (1997) Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys* 343: 6-12
- Carlsson L, Ronquist G, Stridsberg M, Johansson L (1997) Motility stimulant effects of prostatic inclusion in swim-up medium on cryopreserved human spermatozoa. *Arch Androl* 38: 215-221
- Chan JR, Stinson RA (1986) Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 261: 7635-7639
- Chang CH, Angellis D, Fishman WH. (1980) Presence of the rare D-variant heat-stable, placental-type alkaline phosphatase in normal human testis. *Cancer Res* 40: 1506-1510
- Chang WJ, Ying YS, Rothberg KG, Hooper NM, Turner AJ, Gambliel HA, De Gunzburg J, Mumby SM, Gilman AG, Anderson RG (1994) Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *Cell Biol* 126: 127-138
- Checler F, Emson PC, Vincent JP, Kitabgi P (1984) Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the Pro10-Tyr11 bond by endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and a peptidase different from proline-endopeptidase. *J Neurochem* 43: 1295-1301
- Chomczynsky P, Sacchi N (1987) Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159
- Chow PH, Prang SF (1989) Ultrastructure of secretory cells of male accessory sex glands of golden hamster (*mesocricetus auratus*) and effect of melatonin. *Acta Anat* 134: 327-340

- Ciereszko A, Glogowski J, Demianowicz W, Strzezek J (1994) Stimulation of aspartate aminotransferase from farm animal semen by pyridoxal 59-phosphate. *Anim Reprod Sci* 34: 327–341
- Clouter A, Richards RJ (1997) Extracellular biotransformation potential in mouse airways. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 521-527
- Coleman JE (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 441-483
- Conrad PA, Smart EJ, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS (1995) Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J Cell Biol* 131: 1421-1433
- Cross GAM (1987) Eukaryotic protein modification and membrane attachment via phosphatidylinositol. *Cell* 48: 179-181
- Darby PJ, Kwan CY, Daniel EE (2000) Caveolae from canine airway smooth muscle contains the necessary components for a role in Ca^{2+} handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1226-1235
- Dassouli A, Manin M, Veyssiere G, Jean C (1994) Androgens regulate expression of the gene coding for a mouse *vas deferens* protein related to the aldo-keto reductase superfamily in epithelial cell subcultures. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48: 121-128
- Davitz MA, Hereld D, Shak SKJ, Enlund PT, Nussenzweig V (1987) A glycan-phosphatidyl-specific phospholipase D in human serum. *Science* 238: 81-84
- De Melo VR, Valeri V, Orsi AM (1984) The fine structure of the swine sweat gland. I. The acini. *Anat Anz* 156: 51-56
- Di Lorenzo D, Albertini A, Zava D (1991) Progestin regulation of alkaline phosphatase in the human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res* 51: 4470-4475
- Djeridane Y (1996) Comparative histological and ultrastructural studies of the harderian gland of rodents. *Microsc Res Tech* 34: 28-38
- Doty SB, Schofield BH (1976) Enzyme histochemistry of bone and cartilage cells. *Prog Histochem Cytochem* 8: 1-38
- Dumont RA, Lins K, Filoteo AG, Penniston JT, Kocher B, Gillespie PG (2001) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2a is the PMCA of hair bundles. *J Neurosci* 21: 5066-5078
- Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, Wennemuth G, Bacher M, Linder D, Bucala R, Seitz J, Meinhardt A (2001) Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med* 7: 27-35

- Ellis JA, Jackman MR, Luzio JP (1992) The post-synthetic sorting of endogenous membrane proteins examined by the simultaneous purification of apical and basolateral plasma membrane fractions from Caco-2 cells. *Biochem J* 283: 553-560
- Erkel J (2000) Nachweis und Charakterisierung der Transglutaminase im menschlichen Ejakulat. Dissertation, Marburg
- Esposito C, Cozzolino A, Amoresano A, Orru S, Porta R, (2001) The coagulating gland secretion contains a kinesin heavy chain-like protein acting as a type IV transglutaminase substrate. *Biochemistry* 24: 4966-4971
- Esposito C, Pucci P, Amoresano A, Marino G, Cozzolino A (1995) Transglutaminase from rat coagulating gland secretion. *J Biochem Chem* 271: 27416-27423
- Etherton JE, Purchase IF, Corrin B (1979) Apocrine secretion in the terminal bronchiole of mouse lung. *J Anat* 129: 305-322
- Fabiani R (1994) Functional and biochemical characteristics of human prostasomes. *Ups J Med Sci* 99: 73-112
- Fabiani R, Johannsson I, Lundkvist O, Ronquist G (1995) Prolongation and improvement of prostatic promotor effect on sperm forward motility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 58: 191-198
- Fabiani R, Ronquist G (1993) Characteristics of membrane-bound 5'-nucleotidase on human prostasomes. *Clin Chim Acta* 216: 175-182
- Fabiani R, Ronquist G (1995) Association of some hydrolytic enzymes with the prostatic membrane and their differential responses to detergent and PIPLC treatment. *Prostate* 27: 95-101
- Fabre S, Manin M, Pailhoux E, Veysiere G, Jean C (1994) Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase-like protein specific to the mouse *vas deferens*. *J Biol Chem* 269: 5857-5864
- Fernley HN (1971) Mammalian alkaline phosphatases. In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, Vol 4. Academic Press, New York, p 420
- Filoteo AG, Elwess NL, Enyedi A, Caride A, Aung HH, Penniston JT (1997) Pattern of alternative splices seen by isoform-specific antibodies. *J Biol Chem* 272: 23741-23747
- Filoteo AG, Enyedi A, Verma AK, Elwess NL, Penniston JT (2000) Plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 3f is weakly stimulated by calmodulin. *J Biol Chem* 275: 4323-4328
- Fischer MH, Tikola AO, Mawsou CA (1955) Zinc, Carbonic anhydrase, and phosphatase in the prostatic glands of the rat. *Can J Biochem Physiol* 33: 181-190

- Ford TC, Graham JM (1991) An introduction to centrifugation. BIOS Scientific Publishers, Oxford
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci* 92: 8655-8659
- Frenette G, Dube JY, Tremblay RR (1986) Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Arch Androl* 6: 235-241
- Fujimoto T (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 120: 1147-1157
- Fujimoto T, Fujimoto K (1997) Metal sandwich method to quick-freeze monolayer cultured cells for freeze fracture. *J Histochem Cytochem* 45: 595-598
- Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T (2000) Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci* 113 Pt 19: 3509-3517
- Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT (1994) The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res* 54: 6167-75
- Gabella G (1976) Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig *taenia coli*. *Cell Tissue Res* 170: 161-186
- Gargiulo AM, Pedini V, Ceccarelli P (1990) The process of secretion in swine apocrine sweat glands. *Anat Histol Embryol* 19: 264-268
- Gerneke WH, Cohen M (1978) The micromorphology of the apocrine glands of the intermandibular region of the steenbok (*Raphicerus campestris*). *Onderstepoort J Vet Res* 45: 67-74
- Gesase AP, Satoh Y (2001) Sexual differences and effects of castration of secretory mode and intracellular calcium ion dynamics of golden hamster Harderian gland. *Cell Tissue Res* 304: 81-90
- Gesase AP, Satoh Y, Ono K (1996) Secretagogue-induced apocrine secretion in the harderian gland of the rat. *Cell Tissue Res* 285: 501-507
- Gianni M, Terao M, Sozzani S, Garattini E (1993) Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells. *Biochem J* 296: 67-77
- Gietzen K, Sadorf I, Bader H (1982) A model for the regulation of the calmodulin-dependent enzymes erythrocyte Ca^{2+} -transport ATPase and brain phosphodiesterase by activators and inhibitors. *Biochem J* 207: 541-548
- Gil J (1983) Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung. *Fed Proc* 42: 2414-2418

- Glogowski J (1988) Alkaline phosphatase of boar reproductive tract. *Acta Academicae Agriculturae ac Technicae Olstenensis*; 31 (suppl B): 1–53
- Glogowski J, Danford DR, Cieresko A (2002) Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *J Androl* 23: 783-792
- Glogowski J, Strzezek J (1980) Molecular forms of alkaline phosphatase of ram seminal plasma. *Anim Reprod Sci* 3: 307–323
- Goldstein DJ, Blasco L, Harris H (1980) Plazental alkaline phosphatases in non-malignant human cervix. *PNAS* 77: 4226-4228
- Goldstein DJ, Rogers C, Harris H (1982) A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissues: demonstration of its occurrence in lung, cervix, testis and thymus. *Clin Chim Acta* 125: 63-75
- Goyal HO, Vig MM (1984) Histochemical activity of alkaline phosphatase and acid phosphatase in the epididymis of mature intact and androgen-deprived bulls. *Am J Vet Res* 45: 444-450
- Greeb J, Shull GE (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 18569-18576
- Griffin CA, Smith M, Henthorn PS (1987) Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-137. *Am J Hum Genet* 41: 1025-1034
- Groos S, Wilhelm B, Renneberg H, Riva A, Reichelt R, Seitz J, Aumüller G (1999) Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating gland. *Cell Tissue Res* 295: 495-504
- Grosser P, Husler J (1912) *Biochem Z* 39: 1, zitiert nach Coleman JE (1992)
- Gudeman DM, Brightman MW, Merisko EM, Merrill CR (1989) Release from live *choroid plexus* of apical fragments and electrophoretic characterisation of their synthetic products. *J Neurosci Res* 24: 184-191
- Guerini D (1998a) The Ca^{2+} pump and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. *Biometals* 11: 319-330
- Guerini D (1998b) The significance of the isoform of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res* 292: 191-197
- Guerini D, Carafoli E (1996) The targeting of the plasma membrane calcium pump in the cell. *Biosci Rep* 16: 129-137
- Hailstone D, Sleur LS, Parton RG, Stanley KK (1998) Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res* 39: 369-379

- Hale JE, Wuthier RE (1987) The mechanism of matrix vesicle formation. *J Biol Chem* 262: 1916-1925
- Hammes A, Oberdorf S, Strehler EE, Stauffer T, Carafoli E, Vetter H, Neyses L (1994) Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *FASEB J* 8: 428-35
- Harada N, Iijima S, Kobayashi K, Yoshida T, Brown WR, Hibi T, Oshima A, Morikawa M (1997) Human IgG Fc binding protein (FcγBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J Biol Chem* 272: 15232-15241
- Harris H (1989) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 186: 133-150
- Hawkins WE, Geuze JJ (1977) Secretion in the rat coagulating gland after copulation. *Cell Tissue Res* 181: 519-529
- Hawrylak K, Stinson RA (1988) The solubilization of tetrameric alkaline phosphatase from human liver and its conversion into various forms by phosphatidylinositol phospholipase C or proteolysis. *J Biol Chem* 263: 14368-14373
- Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR (1991) Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Rep* 45: 308-321
- Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH (1987) Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase close homology to placental alkaline phosphatases. *PNAS* 84: 1234-1238
- Herak-Kramberger CM, Breton S, Brown D, Kraus O, Sabolic I (2001) Distribution of the vacuolar H⁺-ATPase along the rat and human male reproductive tract. *Biol Reprod* 64: 1699-1707
- Hermo L, Adamali HI, Andonian S (2000) Immunolocalization of CAH II and H⁺-V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J Androl* 21: 376-391
- Hirano K, Iizumi Y, Sugiura M, Mori Y, Toyoshi K, Iino S, Suzuki H, Oda T (1984) A role of alkaline phosphatase in phosphate transport. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 32: 198-204
- Ho KC, Quarmby VE, French FS, Wilson EM (1992) Molecular cloning of rat prostate transglutaminase complementary DNA. The major androgen-regulated protein DPI of rat dorsal prostate and coagulating gland. *J Biol Chem* 267: 12660-12667
- Holterhus PM, Zhao GQ, Aumüller G (1993) Effects of androgen deprivation and estrogen treatment on the structure and protein expression of the rat coagulating gland. *Anat Rec* 235: 223-232
- Howard AD, Berger J, Gerber L, Familletti P, Udenfriend S (1987) Characterization of the phosphatidylinositol-glycan membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. *PNAS* 84: 6055-6059

- Hsu TC, Lee TL, Tsay GJ (1997) Autoantigen components recognizable by scleroderma sera are exported via ectocytosis of fibroblasts. *Br J Rheumatol* 36: 1038-1044
- Hughes RC (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochem Biophys Acta* 1473: 172-185
- Hui MZ, Hu M, Tenenbaum HC (1993) Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res* 274: 429-437
- Hui MZ, Tenenbaum HC, McCulloch CA (1997) Collagen phagocytosis and apoptosis are induced by high level alkaline phosphatase expression in rat fibroblasts. *J Cell Physiol* 172: 323-333
- Ito S, Karnovsky MY (1968) Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J Cell Biol* 39: 168a
- Iyer SK, Daron HH, Aull JL (1988) Purification and properties of alkaline phosphatase from boar seminal plasma. *J Reprod Fertil* 82: 657-664
- Jemmerson R, Low MG (1987) Phosphatidylinositol anchor of HeLa cell alkaline phosphatase. *Biochemistry* 26: 5703-5709
- Juneja R, Gupta I, Wali A, Chakravarti RN, Majumdar S (1990) Verapamil stimulates Ca^{2+} -uptake and Ca^{2+} -ATPase in plasma membrane vesicles of guinea pig spermatozoa. *Contraception* 41: 419-429
- Juneja R, Gupta I, Wali A, Chakravarti RN, Majumdar S (1992) Calcium transport and Ca^{2+} -ATPase activity in spermatozoal plasma membrane vesicles of nifedipine-administered guinea pigs. *Contraception* 45: 387-394
- Kam W, Clauser E, Kim YS, Kan YW, Rutter WJ (1985) Cloning, sequencing and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *PNAS* 82: 8715-8719
- Kanwar U, Anand RJ, Sanyal SN, (1993) The effect of nifedipine, a calcium channel blocker, on human spermatozoal functions. *Contraception* 48: 453-470
- Kaunisto K, Parkkila S, Tammela T, Rönnerberg L, Rajaniemi H (1990) Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes in the human male reproductive tract. *Histochemistry* 94: 381-386
- Keeton TP, Burk SE, Shull GE (1993) Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. *J Biol Chem* 268: 2740-2748
- Keeton TP, Shull GE (1995) Primary structure of rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A. *Biochem J* 306: 779-785

- Kelly RW, Holland P, Skibinski G, Harrison C, McMillan L, Hargreave T, James K (1991) Extracellular organelles (prostasomes) are immunosuppressive components of human semen. *Clin Exp Immunol* 86: 550-556
- Kennedy BG, Mangini NJ (1996) Plasma membrane calcium ATPase in cultured human retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 63: 574-556
- Kenny J (1993) Endopeptidase-24.11: putative substrates and possible roles. *Biochem Soc Trans* 21: 663-668
- Kenworthy A (2002). Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem Sci* 27: 435-437
- Kerr MA, Kenny AJ (1974) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 137: 477-488
- Kim HC, Raess BU (1988) Verapamil, diltiazem and nifedipine interactions with calmodulin stimulated ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase. *Biochem Pharmacol* 37: 917-920
- Kip SN, Strehler EE (2003) Characterization of PMCA isoforms and their contribution to transcellular Ca^{2+} flux in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F122-132
- Kirchhoff C, Hale G (1996) Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 2: 177-184
- Knauff PA, Proverbio F, Hoffman JF (1974) Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca^{2+} -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase in human red cell ghosts. *J Gen Physiol* 63: 324-336
- Kogo H, Fujimoto T (2000) Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative initiation and splicing. *FEBS Lett* 465: 119-123
- Kurosumi K, Shibasaki S, Ito T (1984) Cytology of secretion in mammalian sweat glands. *Int Rev Cytol* 87: 253-329
- Kurosumi K, Shibuichi I, Tosaka H (1981) Ultrastructural studies on the secretory mechanism of goblet cells in the rat jejunal epithelium. *Arch Histol Jpn* 44: 263-284
- Kwan CY, Kostka P, Grover AK, Law JS, Daniel EE (1986) Calmodulin stimulation of plasmalemmal Ca^{2+} -pump of canine aortic smooth muscle. *Blood Vessels* 23: 22-33
- Kyhse-Andersen J (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-209
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Lantini MS, Proto E, Puxeddu P, Riva A, Testa-Riva F (1990) Fine structure of excretory ducts of human salivary glands. *J Submicrosc Cytol Pathol* 22: 465-475
- Laurell CB, Weiber H, Ohlsson K, Rennevik G (1982) A zinc-dependent peptidase in prostatic organelles present in seminal. *Clin Chim Acta* 126: 161-170
- Lee MG, Xu X, Zeng W, Diaz J, Kuo TH, Wuytack F, Racymackerst L, Muallem S (1997) Polarizes expression of Ca²⁺ pumps in pancreatic and salivary gland cells. *J Biol Chem* 272: 15771-15776
- Lee TL, Lin YC, Mochitate K, Grinnell F (1993) Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and β_1 integrin receptors. *J Cell Sci* 105: 167-177
- Lilja H, Laurell CB (1984) Liquefaction of coagulated semen. *Scand J Clin Lab Invest* 44: 447-452
- Lilja H, Weiber H (1983) Gamma-glutamyltransferase bound to prostatic subcellular organelles and in free form in human seminal plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 43: 307-312
- Lindahl M, Tagesson C, Ronquist G (1987) Phospholipase A2 activity in prostasomes from human seminal plasma. *Urol Int* 42: 385-389
- Linzell JL, Peaker M (1971) Intracellular concentrations of sodium, potassium and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J Physiol* 216: 683-700
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126: 111-126
- Lottspeich F, Haralabos Z (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag
- Low MG (1987) Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem J* 244: 1-13
- Low MG, Prasad ARS (1988) A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. *PNAS* 85: 980-984
- Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF JR, Bozza M, Zurakowski D, Finco O, Carroll MC, Gerard C (1995) Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J Exp Med* 181: 2271-2275
- Lucheroni A, Maurizi M, Spreca A, Palmerini CA, Binazzi M. (1986) Some aspects of the secretory activity of the human olfactory glands. *Rhinology* 24: 57-60
- Main T, Lim D (1976) The human external auditory canal, secretory system - an ultrastructural study. *Laryngoscope* 86: 1164-1176

- Mangan JA, Butcher PD (1993) Running AMOC with *SuperscriptTM II Reverse Transcriptase*. Focus 15: 67-69
- Manin M, Lecher P, Martinez A, Tournadre S, Jean C (1995) Exportation of mouse *vas deferens* protein, a protein without a signal peptide, from mouse *vas deferens* epithelium. A model of apocrine secretion. Biol Reprod 52: 50-62
- Manin M, Veyssiere G, Chayvialle D, Chavalier M, Lecher P, Jean C (1992) *In vitro* androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse *vas deferens*. Endocrinology 131: 2378-2386
- McComb RB, Bowers GN, Posen S (1979) Alkaline phosphatases. New York: Plenum
- McLaughlin PJ, Lewis-Jones I, Hutchinson GE, Johnson PM (1986) Placental-type alkaline phosphatase in human seminal plasma from fertile and infertile men. Fertil Steril 46: 934-937
- Meizel S (1997) Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. Biol Reprod 56: 569-574
- Messelt EB (1982a) Ultrastructural studies on apical bleb formation in seal and rat submandibular gland striated ducts. Acta Odontol Scand 40: 25-33
- Messelt EB (1982b) Ultrastructural studies on apical blebs of striated ducts in the rat submandibular gland. Acta Odontol Scand 40: 103-111
- Meszaros JG, Karin NJ (1993). Osteoblasts express the PMCA1b isoform of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. J Bone Miner Res 8: 1235-1240
- Meyer W, Tsukise A, Neurand K (1987) Histochemical observations on the apocrine glands of the scrotal skin of the cat and dog. Gegenbaurs Morphol Jahrb 133: 163-173
- Meyer W, Tsukise A, Neurand K, Hirabayashi Y (2001) Cytological and lectin histochemical characterisation of secretion production and secretion composition in the tubular glands of the canine anal sacs. Cell Tiss Org 168: 203-219
- Millán JL, Manes T (1988) Seminoma-derived nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. PNAS 85: 3024-3028
- Millán JL, Stigbrand T, Ruoslahti E, Fishman WH (1982) Characterization and use of an allotype-specific monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase in the study of cancer-related phosphatase polymorphism. Cancer Res 42: 2444-2449
- Minelli A, Miscetti P, Proietti A, Luizi L, Mezzasoma I (1995) Adenosine triphosphate catabolism in bovine spermatozoa. Comp Biochem Physiol B 110: 605-611
- Mineo C, Anderson RG (1996) A vacuolar-type proton ATPase mediates acidification of plasmalemmal vesicles during photocytosis. Exp Cell Res 224: 237-242

- Misumi Y, Tashiro K, Hattori M, Sakaki Y, Ikehara Y (1988) Primary structure of rat liver alkaline phosphatase deduced from its cDNA. *Biochem J* 249: 661-668
- Mobley BA, Eisenberg BR (1975) Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J Gen Physiol* 66: 31-45
- Mohanty N, Chainy GB (1989) Testosterone propionate induced changes in testicular phosphatases of musk shrew (*Suncus murinus* L.). *Andrologia* 21: 34-39
- Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia T (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes *in vivo* and *in vitro*. *Mol Biol Cell* 6: 911-927
- Monsees TK, Miska W, Schill WB (1996) Enzymatic digestion of bradykinin by rat seroli cell cultures. *J Androl* 17: 375-381
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Alvarez J (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2: 57-61
- Moody TW, Mayr CA, Gillespie TJ, Davis TP (1998) Neurotensin is metabolized by endogenous proteases in prostate cancer cell lines. *Peptides* 19: 253-258
- Morgenroth K, Hoerstebroek U (1978) Transmission and scanning electron microscopic investigation of the structure of so-called clara cells of the bronchial system. *Arzneimittelforschung* 28: 911-917
- Muesch A, Hartmann E, Rohde K, Rubartelli A, Sitia R, Rapoport T (1990) A novel pathway for secretory proteins? *TIBS* 15: 86-88
- Murata M, Peramen J, Schreiner R, Weiland F, Kurzchalia T, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 92: 10339-10343
- Nagakawa O, Ogasawara M, Fujii H, Murakami K, Murata J, Fuse H, Saiki I (1998) Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Lett* 133: 27-33
- NagDas SK, Mukherjee S, Mazumder B, Sen PC (1988) Identification and characterization of a Mg^{2+} -dependent and an independent Ca^{2+} -ATPase in microsomal membranes of rat testis. *Mol Cell Biochem* 79: 161-169
- Napolitano LM (1963) The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *J Cell Biol* 18: 663-679
- Narbaiz R (1974) Embryology, anatomy, and histology of the male accessory sex glands. In: Brandes D (ed.) *Male sex accessory organs*. Academic Press, New York, p.7
- Nicander L, Plöen L, Larsson M (1974) Specific apocrine secretion in the anterior lobe of the prostate gland of rabbits. *Cell Tiss Res* 151: 69-77

- Niggli V, Ronner P, Carafoli E, Penniston JT (1979) Effects of calmodulin on the (Ca^{2+} + Mg^{2+}) ATPase partially purified from erythrocyte membranes. *Arch Biochem Biophys* 198: 124-130
- Noda M, Yoon K, Thiede M, Buenaga R, Weiss M, Henthorn P, Harris H, Rodan GA (1987) cDNA cloning of alkaline phosphatase from rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *J Bone Miner Res* 2: 161-164
- Olorunsogo OO, Bababunmi EA (1992) Calmodulin antagonism and inhibition of erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -pump by nifedipine, a calcium channel blocker. *Afr J Med Sci* 21: 17-21
- Olorunsogo OO, Onatola OO, Lawal SO, Bababunmi EA, Falase AO, Okunade WG (1991) Inhibition of erythrocyte membrane Ca^{2+} -pumping ATPase of hypertensive humans by nifedipine, a calcium entry blocker. *Afr J Med Med Sci* 20: 61-65
- Olsson I, Ronquist G (1990) Isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase associated with human prostasomes. *Urol Int* 45: 346-349
- Palade G (1975): Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358.
- Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Physiol* 24: 1424-1436
- Palmerini CA, Carlini E, Nicolucci A, Arienti G (1999) Increase of human spermatozoa intracellular Ca^{2+} -concentration after fusion with prostasomes. *Cell Calcium* 25: 291-296.
- Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 4: 50-57
- Parks JE, Arion JW, Foote RH (1987) Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 37: 1249-1258.
- Parton RG (1996) Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 8: 542-548
- Pastor-Soler N, Bagnis C, Sabolic I, Tyszkowski R, McKee M, Van Hoek A, Breton S, Brown D (2001) Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod* 65: 384-393
- Peao MN, Aguas AP de Sa CM, Grande NR (1981) Anatomy of clara cell secretion: surface changes observed by scanning electron microscopy. *J Anat* 182: 377-388
- Philipson KD, Nicoll DA (1992). Sodium-calcium exchange. *Curr Opin Cell Biol* 4: 678-683
- Ploen L (1980) Electron microscopic observations on the epithelium of ram seminal vesicles. *J Anat* 130: 507-512

- Raess Bu, Gersten MH (1987) Calmodulin-stimulated plasma membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) –ATPase: inhibition by calcium channel entry blockers. *Biochem Pharmacol* 36: 2455-2459
- Raess BU, Record DM (1990) Inhibition of erythrocyte Ca^{2+} -pump by Ca^{2+} antagonists. *Biochem Pharmacol* 40: 2549-2555
- Rastogi RK, Milone M, Di Meglio M, Caliendo MF, Chieffi G. (1979) Effects of castration, 5 alpha-dihydrotestosterone and cyproterone acetate on enzyme activity in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil* 57: 73-77
- Ratti H, Zhang M, Kunkel G (2001) Correlation between neutral endopeptidase (NEP) 3.4.24.11 in serum and the degree of the bronchial hyperreactivity. *Regul Pept* 97: 181-186
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002) Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54: 431-467
- Reinach P, Holmberg N (1987) Ca-stimulated Mg dependent ATPase activity in a plasma membrane enriched fraction of bovine corneal epithelium. *Curr Eye Res* 6: 399-405
- Reinhardt TA, Filoteo AG, Penniston JT, Horst RL (2000) Ca^{2+} -ATPase protein expression in mammary tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1595-C1602
- Renneberg H, Albrecht M, Kurek R, Krause E, Lottspeich F, Aumüller G, Wilhelm B (2001) Identification and characterization of neutral endopeptidase (EC 3. 4. 24. 11) from human prostatesomes localized in prostatic tissue and cell lines. *Prostate* 46: 173-183
- Riva A (1967) Fine structure of human seminal vesicle epithelium. *J Anat* 102: 71-86
- Robinson JD (1976) Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of rat brain microsomal membranes preparation. *Arch Biochem Biophys* 176: 366-374
- Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ (1989) Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245: 718-725
- Ronco P, Pollard H, Galceran M, Delauche M, Schwartz JC, Verroust P (1988) Distribution of enkephalinase (membrane metalloendopeptidase, E.C. 3.4.24.11) in rat organs. Detection using a monoclonal antibody. *Lab Invest* 58: 210-7
- Ronquist G (1987) Effects of modulators on prostatesome membrane-bound ATPase in human seminal plasma. *Eur J Clin Invest* 17: 231-236
- Ronquist G, Brody I (1985) The prostatesome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta* 822: 203-218
- Ronquist G, Brody I, Gottfries A, Stegmayr B (1978a) An Mg^{2+} and Ca^{2+} -stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid. Part I *Andrologia* 10: 261-272

- Ronquist G, Brody I, Gottfries A, Stegmayr B (1978b) An Mg^{2+} and Ca^{2+} -stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid. Part II *Andrologia* 10: 427-433
- Ronquist G, Stegmayr B (1984) Prostatic origin of fucosyl transferase in human seminal plasma - a study on healthy controls and on men with infertility or with prostatic cancer. *Urol Res* 12: 243-247
- Rosen S, Skaletzky HJ (1998) Primer 3 (Internet)
- Rossato M, Di Virgillio F, Rizzuto R, Galeazzi C, Foresta C (2001) Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod* 7: 119-128
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-682
- Saga K, Morimoto Y (1995) Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in human eccrine and apocrine sweat glands. *J Histochem Cytochem* 43: 927-932
- Sakiyama T, Robinson JC, Chou JY (1979) Characterization of alkaline phosphatases from human first trimester placentas. *J Biol Chem* 254: 935-938
- Samuel LH, Flickinger CJ, (1986) Intracellular pathway and kinetics of protein secretion in the coagulating gland of the mouse. *Biol Reprod* 34: 107-117
- Santos DL, Lopes MC, Carvalho CM (1994) Calcium channel blockers inhibit the (Ca^{2+} + Mg^{2+}) ATPase activity and the ^{125}I -calmodulin binding in brain membranes. *Eur J Pharmacol* 267: 307-316
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z-L, Lubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP (1995) Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci* 92: 9407-9411
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP (1993) Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122: 789-807
- Sato S, Burdett I, Hughes RC (1993) Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose - binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-golgi complex. *Exp Cell Res* 207: 8-18
- Satoh Y, Habara Y, Kanno T, Ono K (1993) Carbamylcholine-induced morphological changes and spatial dynamics of $[Ca^{2+}]$ in harderian glands of guinea pigs: calcium-dependent lipid secretion and contraction of myoepithelial cells. *Cell Tissue Res* 274: 1-14
- Schatzmann HJ (1966) ATP-dependent Ca^{2+} -extrusion from human red cells. *Experientia* 22: 364-365

- Schaumburg-Lever G, Lever FW (1975) Secretion from human apocrine glands: an electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 64: 38-41
- Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 are co-localized and form a stable hetero-oligomeric complex *in vivo*. *J Biol Chem* 272: 29337-29346
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci* 93: 131-135
- Schiefferdecker P (1922) Die Hautdrüsen des Menschen und der Säugetiere, ihre biologische und rassenanatomische Bedeutung, sowie die *muscularis sexualis*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart
- Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dovorak AM (1995) Caveolae from luminal plasma-lemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca^{2+} -ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 1759-1763
- Schwartz JH, Lipmann F (1961) Phosphate incorporation into alkaline phosphatase of *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci* 47: 1996-2005
- Seitz J, Keppler C, Hüntemann S, Rausch U, Aumüller G (1991) Purification and molecular characterization of a secretory transglutaminase from coagulating gland of the rat. *Biochem Biophys Acta* 1078: 139-146
- Seitz J, Keppler C, Rausch U, Aumüller G (1990) Immunohistochemistry of rat secretory transglutaminase from rodent prostate. *Histochemistry* 93: 525-530
- She QB, Mukherjee JJ, Chung T, Kiss Z (2000) Placental alkaline phosphatase, insulin, and adenine nucleotides or adenosine synergistically promote long-term survival of serum-starved mouse embryo and human fetus fibroblasts. *Cell Signal* 12: 659-665
- Shennan DB, Peaker M (2000) Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev* 80: 925-951
- Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL (1991) CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10662-10666
- Shugyo Y, Sudo N, Kanai K, Yamashita T, Kumazawa T, Kanamura S (1988) Morphological differences between secretory cells of wet and dry types of human ceruminous glands. *Am J Anat* 181: 377-384
- Shull GE, Greeb J (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na^{+} , K^{+} and other cation transport ATPases. *J Biol Chem* 263: 8646-8657

- Sikdar R, Ganguly U, Chandra GA, Sen PC (1993) Calcium uptake and Ca^{2+} -ATPase activity in goat spermatozoa membrane vesicles do not require Mg^{2+} . J Biosci 18: 73-82
- Sikdar R, Ganguly U, Pal P, Mazumder B, Sen PC (1991) Biochemical characterization of a calcium ion stimulated-ATPase from goat spermatozoa. Mol Cell Biochem 103: 121-130
- Sikdar R, Roy K, Mandas AK, Sen PC (1999) Phosphorylation and dephosphorylation of Mg^{2+} -independent Ca^{2+} -ATPase from goat spermatozoa. J Biosci 24: 317-321
- Simons K, Fuller SD (1985) Cell surface polarity in epithelia. Annu Rev Cell Biol 1: 243-288
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569-572
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid Rafts and signal transduction. Nature Rev Mol Cell Biol 1: 31-39
- Singer R, Barnet M, Allalouf D, Schwartzman S, Sagiv M, Landau B, Segenreich E, Servadio C (1980) Some properties of acid and alkaline phosphatase in seminal fluid and isolated sperm. 5: 195-199
- Skibinski G, Kelly RW, Harkinss D, James K (1992) Immunosuppression by human seminal plasma - extracellular organelles (prostasomes) modulate activity of phagocytic cells. Am J Reprod Immunol 28: 97-103
- Smith JC, Hearn GW (1979) Ultrastructure of the apocrine-sebaceous scent gland of the woodchuck, *marmota monax*: evidence for apocrine and merocrine secretion by a single cell type. Anat Rec 193: 269-292
- Smith M, Weiss MJ, Griffin CA, Murray JC, Buetow KH, Emanuel BS, Henthorn PS, Harris H (1988) Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. Genomics 2: 139-143
- Smith TT, Nothnick WB. (1997) Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. Biol Reprod 56: 83-89
- Sokolov VE, Shabadash SA (1979) Histochemical characteristics of the anal sacs of the cat. Biol Bull Acad Sci USSR 6: 751-763
- Soleilhac JM, Lucas E, Beaumont A, Turcaud S, Michel JB, Ficheux D, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1992) A 94-kDa protein, identified as neutral endopeptidase-24.11, can inactivate atrial natriuretic peptide in the vascular endothelium. Mol Pharmacol 41: 609-614
- Song KS, Li Shengwen, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP (1996) Co-purification and direct interaction of ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. J Biol Chem 271: 9690-9697

- Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP (1996b) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271: 15160-15165
- Soucek DA, Vary JC (1984) Some properties of acid and alkaline phosphatases from boar sperm plasma membranes. *Biol Reprod* 31: 687-693
- Southern EM (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth Enzymol* 68: 152-176
- Spielman AI, Sunavala G, Harmony JA, Stuart WD, Leyden JJ, Turner G, Vowels BR, Lam WC, Yang S, Preti G (1998) Identification and immunohistochemical localization of protein precursors to human axillary odors in apocrine glands and secretions. *Arch Dermatol* 134: 813-818
- Spielman AI, Zeng XN, Leyden JJ, Preti G (1995) Proteinaceous precursors of human axillary odor: isolation of two novel odor-binding proteins. *Experientia* 51: 40-47
- Stahl WL, Eakin TJ, Owens JW Jr, Breiniger JF, Filuk PE, Anderson WR (1992) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by *in situ* hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 16: 223-231
- Stauffer TP, Guerini D, Carafoli E (1995) Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A study using specific antibodies. *J Biol Chem* 270: 12184-12190
- Stauffer TP, Guerini D, Celio MR, Carafoli E (1997) Immunolocalization of the plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms in the rat brain. *Brain Res* 748: 21-29
- Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE (1993) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 268: 25993-26003
- Stegmayr B, Ronquist G (1982) Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 10: 253-257
- Stein JM, Luzio JP (1991) Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J* 274: 381-386
- Steinhoff M, Eicheler W, Holterhus PM, Rausch U, Seitz J, Aumüller G (1994) Hormonally induced changes in apocrine secretion of transglutaminase in the rat dorsal prostate and coagulating gland. *Eur J Cell Biol* 65: 49-59
- Steinhoff M, Seitz J, Aumüller G (1992) Hormone-dependence of apocrine secretion in rat coagulating gland. *Eur J Cell Biol* 57 (suppl 36; abstr. 36)
- Stigbrand T (1984a) Human alkaline phosphatases. Introduction and nomenclature. *Prog Clin Biol Res* 166: xix-xxiii

- Stigbrand T (1984b) Present status and future trends of human alkaline phosphatases. *Prog Clin Biol Res* 166: 3-14
- Stoeckelhuber M, Sliwa A, Welsch U (2000) Histophysiology of the scent - marking glands of the penile pad, anal pouch, and the forefoot in the aardwolf (*Proteles cristatus*). *Anat Rec* 259: 312-326
- Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, Temple BL, Noben-Trauth K (1998) Mutations in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nature Genet* 19: 390-394
- Stridsberg M, Fabiani R, Lukinius A, Ronquist G (1996) Prostatosomes are neuroendocrine-like vesicles in human semen. *Prostate* 29: 287-295
- Strzezek J, Glogowski J (1979) Molecular forms of alkaline phosphatase in bull seminal plasma. I. Isolation and characterization of two forms. *Int J Biochem* 10: 135-146
- Sumitomo M, Shen R, Goldberg JS, Dai J, Navarro D, Nanus DM (2000b) 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 CN, Giancotti FG, Knudsen B, Nanus DM (2000a) Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signalling. *J Clin Invest* 106: 1399-1407
- Suzuki U, Yohimura K, Takaishi M (1907) *Bull Coll Agric Tok Imp Univ* 7: 503, zitiert nach Coleman JE (1992)
- Taha AA, Abdel-Magied EM, Abdalla MA, Abdalla AB (1994) The poll glands of the dromedary (*camelus dromedarius*): ultrastructural characteristics. *Anat Histol Embryol* 23: 269-274
- Takami N, Ogata S, Oda K, Misomi Y, Ikehara Y (1988) Biosynthesis of placental alkaline phosphatase and its post-translational modification by glycopospholipid for membrane-anchoring. *J Biol Chem* 263: 3016-3021
- Tang Y (1998) Galactosyltransferase, pyrophosphatase and phosphatase activities in luminal plasma of the cauda epididymidis and in the rete testis fluid of some mammals. *J Reprod Fertil* 114: 277-285
- Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271: 2255-2261
- Testa-Riva F, Congiu T, Lantini MS, Puxeddu R, Riva A (1995) The main excretory duct (Stensen's) of the human parotid gland: a transmission and scanning electron microscope study. *Arch Histol Cytol* 58: 435-48

- Testa-Riva F, Puxeddu P (1980) Secretory mechanisms of human ceruminous glands: a transmission and scanning microscopic study. *Anat Rec* 196: 363-372
- Testa-Riva F, Puxeddu P, Riva A, Diaz G (1981) The epithelium of the excretory duct of the human submandibular gland: transmission and scanning electron microscopic study. *Am J Anat* 160: 381-393
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2: 42-49
- Thomopoulos GN, Garrett JR, Proctor GB (2000) Ultrastructural histochemical studies of secretory processes in rat submandibular granular tubules during intermittent sympathetic nerve stimulation. *Eur J Morphol* 38: 69-79
- Thomopoulos GN, Garrett JR, Proctor GB, Harlley R, Zhang XS (1996) Exocytosis from rat submandibular granular tubules during cyclocitidine stimulation unusual features, including changes in the granule membrane. *Microsc Res Tech* 35: 365-376
- Thorens S (1979) Ca^{2+} -ATPase and Ca uptake without requirement for Mg^{2+} in membrane fractions of vascular smooth muscle. *FEBS Lett* 98: 177-180
- Tietz PS, Holman RT, Miller LJ, LaRusso NF (1995) Isolation and characterization of rat cholangiocyte vesicles enriched in apical or baso-lateral plasma membrane domains. *Biochemistry* 34: 15436-15443
- Travis AJ, Merdiushev T, Vargas LA, Jones BH, Purdon MA, Nipper RW, Galatioto J, Moss SB, Hunnicutt GR, Kopf GS. (2001) Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and guinea pig spermatozoa. *Dev Biol* 240: 599-610
- Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13: 2485-2502
- Vanithakumari G, Govindarajulu P (1985) Adenosine triphosphate systems in genital tract of testosterone treated male adult monkeys. *Indian J Physiol Pharmacol* 29: 1-6
- Vaslenko AS, Sergienko Liu (1985) Acid and alkaline phosphatases of the rat prostate and the androgenic status of the body. *Probl Endokrinol (Mosk)* 31: 57-62
- Vijaysarathai S, Shivaja S, Balaram P (1980) Plasma membrane bound Ca^{2+} in bull sperm. *FEBS Lett* 114: 45-48
- Vinten J, Voldstedlund M, Carlsen J, Christiansen K, Clausen H, Tranum-Jensen J (1994) Immuno-electronmicroscopical identification of caveolin in rat adipocyte plasma membranes. Unpublished (swiss prot)
- Von Euler H (1912) *Z Physiol Chem* 79: 375, zitiert nach Coleman JE (1992)
- Von Euler H, Funke Y (1912) *Z Physiol Chem* 77: 488, zitiert nach Coleman JE (1992)

- Warren RC, McKenzie CF, Rodeck CH, Moscoso G, Brock DJ, Barron L (1985) First trimester diagnosis of hypophosphatasia with a monoclonal antibody to the liver/bone/kidney isoenzyme of alkaline phosphatase. *Lancet* 2: 856-858
- Way M, Parton RG (1995) M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 376: 108-112
- Waymire KG, Mahuren JD, Jaja JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR (1995) Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet* 11: 45-51
- Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H (1986) Isolation and characterization of a cDNA encoding a human/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *PNAS* 83: 7182-7186
- Welsch U, van Dyk G, Moss D, Feuerhake F (1998) Cutaneous glands of male and female impalas (*aepyceros melampus*): seasonal activity changes and secretory mechanisms. *Cell Tissue Res* 292: 377-394
- Wiche R (2001) Etablierung von zwei Kulturmodellen der Rattenkoagulationsdrüse zur Untersuchung der apokrinen Sekretion *in vitro* und funktionelle Studien zu diesem alternativen Proteintransportweg. Dissertation, Marburg
- Wilhelm B, Geyer H, Geyer R, Aumüller G, Seitz J (2003) Die sekretorische CAH II der Koagulationsdrüse der Ratte ist unkonventionell glycosyliert. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft* 185: 42
- Wilhelm B, Keppler C, Geyer R, Schwarz R, Lottspeich F, Linder D, Möbius J, Seitz J (1996) Secretory carbonate dehydratase of rat coagulating gland and dorsal prostate. *Eur J Cell Biol* 69 (Suppl. 42): 433
- Wilhelm B, Keppler C, Henkeler A, Schilli-Westermann M, Linder D, Aumüller G, Seitz J (2002) Identification and characterization of an IgG binding protein in the secretion of the rat coagulating gland. *Biol Chem* 383: 1959-1965
- Wilhelm B, Keppler C, Hoffbauer G, Lottspeich F, Linder D, Meinhardt A, Aumüller G, Seitz J (1998) Cytoplasmic carbonic anhydrase II of rat coagulating gland is secreted via the apocrine export mode. *J Histochem Cytochem* 46: 505-511
- Wilhelm B, Meinhardt A, Renneberg H, Linder D, Gabius HJ, Aumüller G, Seitz J (1999) Serum albumin as a potential carrier for the apocrine secretion of proteins in the rat coagulating gland. *Eur J Cell Biol* 78: 256-264
- Williams-Ashman HG (1984) Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Mol Cell Biochem* 58: 51-61
- Wilson EM, French FS (1980) Biochemical homology between rat dorsal and coagulating gland. *J Biol Chem* 22: 10946-10953

Wong YC, Tse MK (1981) Fine structural and functional study of the prostatic complex of the guinea pig. *Acta Anat* 109: 289-312

Yamada E (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1: 445-457

Yanagimachi R, Usui N (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 89: 161-174

Zackson SL, Steinberg MS (1988) A molecular marker for cell guidance information in the axolotl embryo. *Dev Biol* 127: 435-442

Zeng C, Spielman AI, Vowels BR, Leyden JJ, Biemann K, Preti G (1996) A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc Natl Acad Sci* 93: 6626-6630

Zimmermann H (1996) Extrazellular purine metabolism. *Drug Dev Res* 39: 337-352

Danksagung

Frau Dr. Beate Wilhelm sowie Herrn Prof. Dr. Aumüller möchte ich für die Bereitstellung des Themas sowie für die Betreuung der Arbeit und die vielen guten Hinweise und Ratschläge danken.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Edgar Weigand für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch allen, die mir immer und jederzeit mit praktischen Tipps zur Seite gestanden haben: Frau Anne Henkeler, Frau Claudia Keppler, Frau Suada Fröhlich, Frau Elke Völck-Badouin, Frau Gudrun Hoffbauer, Frau Irmgard Dammshäuser, Frau Andrea Dersch, Frau Wega Gutschank und Herrn Michael Dreher.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Seitz für viele nützliche Tipps sowie für die Nutzung des Zellkulturlabors danken. Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt bedanke ich mich für die Hilfe am Lasercanningmikroskop.

Nennen möchte ich außerdem meine Mitdoktoranden und „Leidensgenossen“ der letzten drei Jahre: Dr. Regina Wiche, Miriam Wiegand, Dr. Silvia Sanchez-Luengo, Simone Gränz, Anja Lewen, Ruth Müller, Iara Gomez. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Regina Eickhoff für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Jutta Will für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, dass sie mich während der vergangenen Jahre unerschütterlich aufgebaut und mental unterstützt haben. Ebenso bedanke ich mich bei meiner Schwester und meinem Schwager, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit ohne fremde Hilfe lediglich unter Verwendung der zitierten Literatur angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.