

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. E. Weihe

Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie  
Leiter: Prof. Dr. Gerhard Aumüller

---

**Immunhistochemische und stereologische Untersuchungen  
zur  
Differenzierung und Verteilung neuroendokriner Zellen  
in der menschlichen Prostata**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
**Marcus Leonhard**  
aus Bergisch Gladbach

Marburg/Lahn 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 4.12.2003  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch  
Referent: Prof. Dr. G. Aumüller  
Korreferent: Prof. Dr. P. Barth

*Meinen Eltern in Dankbarkeit*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1 DIE ENTWICKLUNG DER MENSCHLICHEN PROSTATA.....	7
1.1.1 Die frühe foetale Entwicklung des Sinus urogenitalis, des Müllerschen Hügels und der Wolffschen Gänge.....	7
1.1.2 Die Bedeutung epithelio-stromaler Interaktionen.....	8
1.1.3 Die Endokrinologie der Prostataentwicklung .....	9
1.2. DIE ENTWICKLUNG DER PROSTATA BIS ZUR GEBURT .....	9
1.3 DIE WEITERE ENTWICKLUNG DER PROSTATA NACH DER GEBURT .....	10
1.4. DIE HISTOGENESE VERSCHIEDENER EPITHELZELLEN .....	11
1.4.1 Stromale Differenzierung.....	11
1.4.2 Bedeutung von Steroidhormonen und Wachstumsfaktoren.....	11
1.4.2.1 Bedeutung der Androgene .....	11
1.4.2.2 Bedeutung der Östrogene .....	12
1.4.2.3. Weitere Sekretionsprodukte und Wachstumsfaktoren.....	13
1.5. DIE INNERE GLIEDERUNG DER REIFEN PROSTATA.....	14
1.6. DIE NEUROENDOKRINEN ZELLEN DER PROSTATA .....	16
1.6.1. Über die Herkunft der prostatistischen neuroendokrinen Zellen.....	17
1.6.2. Die Morphologie der neuroendokrinen Zellen.....	19
1.6.3. Die Hormonabhängigkeit neuroendokriner Zellen.....	21
1.6.4. Die topographische Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der Prostata.....	22
1.6.5. Über die Nachweismethoden neuroendokriner Zellen.....	23
1.6.6. Über die Funktion der neuroendokrinen Zellen.....	23
1.7. NEUROENDOKRINE MARKER DER PROSTATA.....	25
1.7.1 Chromogranin A (CgA).....	25
1.7.2 Calcitonin.....	25
1.7.3. Serotonin (5-Hydroxytryptamin) .....	26
1.7. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....	27
<b>II. MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>28</b>
2.1. MATERIALHERKUNFT.....	28
2.2. AUFARBEITUNG DES MATERIALS FÜR DIE LICHTMIKROSKOPIE.....	28
2.2.1. Organgewinnung.....	28
2.2.2. Organfixierung und Paraffineinbettung.....	28
2.2.3. Das Anfertigen von Paraffinschnitten.....	29
2.2.4. Durchführung der APES-Beschichtung.....	29
2.3. IMMUNHISTOCHEMIE.....	30
2.3.1. Das Prinzip der ABC – Reaktion.....	30
2.3.2. Das Prinzip der APAAP- Reaktion (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase Reaktion).....	31
2.3.3. Die Doppelfärbung.....	31
2.4. Die verwendeten Antikörper.....	32
2.5. DIE VERSCHIEDENEN INKUBATIONSSCHEMATA.....	33
2.5.1. Vorbereitung der Schnitte .....	33
2.5.2. Das Inkubationsschema bei der ABC-Reaktion.....	33
2.5.3. Das Inkubationsschema bei der APAAP –Reaktion.....	35

2.5.4. <i>Das Inkubationsschema bei der Doppelfärbung</i> .....	36
2.6. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE.....	36
2.6.1. <i>Die Stereologie</i> .....	36
2.6.1.1. <i>Das manuelle Punktzählverfahren</i> .....	37
2.6.1.2. <i>Die computerassistierte digitale Bildanalyse</i> .....	37
2.6.2. <i>Quantitative Auswertung</i> .....	38
2.7. DOKUMENTATION.....	38
2.7.1. <i>Die Mikrophotographie</i> .....	38
<b>III. ERGEBNISSE</b> .....	<b>39</b>
3.1. FOETALES UND POSTNATALES WACHSTUM DER PROSTATA.....	39
3.2. DAS VERTEILUNGSMUSTER DER NEUROENDOKRINEN ZELLEN.....	41
3.3. DAS VERTEILUNGSMUSTER DER CALCITONIN-POSITIVEN NEUROENDOKRINEN ZELLEN .....	48
3.4. DAS VERTEILUNGSMUSTER DER SEROTONIN-POSITIVEN NEUROENDOKRINEN ZELLEN .....	49
3.5. BEFUNDE ZUM REZEPTORSTATUS DER NEUROENDOKRINEN ZELLEN .....	52
<b>IV. DISKUSSION</b> .....	<b>54</b>
4.1. CHROMOGRANIN A ALS MARKER NEUROENDOKRINER ZELLEN.....	54
4.2. DER ALTERSGANG DER NEUROENDOKRINEN ZELLEN IN DER PROSTATA .....	56
4.3. DIE TOPOGRAPHISCHE VERTEILUNG DER NEUROENDOKRINEN ZELLEN IN DER PROSTATA.....	58
4.4. DIE NEUROENDOKRINEN ZELLEN ALS ANDROGEN-UNABHÄNGIGE ZELLEN .....	62
4.5. DER NEUROGENE URSPRUNG DER NEUROENDOKRINEN ZELLEN .....	64
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>72</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>74</b>
<b>VII. ANHANG</b> .....	<b>89</b>
<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</b> .....	89
<b>DANKSAGUNG</b> .....	90



# I. Einleitung

## 1.1 Die Entwicklung der menschlichen Prostata

Das Verständnis der frühen Entwicklung der Prostata wurde v. a. als Schlüssel zum Verständnis der Pathologie angesehen (Lowsley, 1912; 1930), d.h. proliferative Vorgänge wie die Entwicklung der benignen Prostatahyperplasie (BPH) wurden am Modellfall der foetalen und postnatalen Entwicklung der Prostata orientiert.

### 1.1.1 Die frühe foetale Entwicklung des *Sinus urogenitalis*, des Müllerschen Hügels und der Wolffschen Gänge

Während der embryonalen Entwicklung durchläuft das Urogenitalsystem mindestens zwei Phasen, welche man als i) initiale ambisexuelle Phase und nachfolgend als ii) sexuelle Phase bezeichnet. Im Laufe der ambisexuellen Phase der Entwicklung sind die Gonaden morphologisch undifferenziert. Der mesonephrische (Wolffsche) und paramesonephrische (Müllersche) Gang und ihre Mündungen in den Sinus urogenitalis entwickeln sich als Vorläufer der inneren Genitalorgane. Für jede dieser Vorläuferstrukturen ist der Zeitpunkt der sexuellen Differenzierung geringfügig unterschiedlich. Unter dem Einfluß des „Mullerian duct inhibitor“ (ein Mitglied der Inhibin/Activin/transforming growth factor family) kommt es durch Apoptose (programmierten Zelltod) zu einer Regression der Müllerschen Gänge (Josso et al., 1976). Als Überrest verbleibt lediglich der Utriculus prostaticus in der Nähe der gemeinsamen Öffnung auf der Spitze des Müllerschen Hügels.

Der Sinus urogenitalis wird gewöhnlich in einen Beckenanteil und einen phallischen Anteil gegliedert. Der Beckenanteil, aus dem sich die Prostata entwickelt, drängt bei seiner Größenzunahme den phallischen Anteil mit seiner primitiven Urogenitalöffnung und der Urethralplatte vorwärts. Kontroversen bestehen bezüglich der Verbindung der oberen hinteren Sinus urogenitalis-Wand mit den Müllerschen und Wolffschen Gängen. Glenister (1962) zufolge hat das Epithel dieser Region verschiedene Ursprünge und entstammt zum einen dem endodermalen Sinus urogenitalis, zum anderen dem mesodermalen mesonephrischen (Wolffschen) und paramesonephrischen oder Müllerschen Zellen. Der Großteil des Epithels dieser Region ist jedoch endodermalen Ursprungs und differenziert in Prostata, Glandula bulbourethralis,

Urethra und periurethrale Drüsen (Cunha, 1986). Johnson (1922) und Mahoney (1940) zufolge entsteht ein Prostatahomologon auch im weiblichen Embryo.

### 1.1.2 Die Bedeutung epithelio-stromaler Interaktionen

Die elementare Bedeutung des Mesenchyms bei der Entwicklung der Prostata ist von Cunha und Mitarbeitern in sehr detaillierten Untersuchungen erarbeitet worden (1981, 1986). Sie konnten zeigen, daß sich in verschiedenen Säugetier-Spezies grundlegende Abläufe bei der Entwicklung der Urogenitalorgane gleichen und hoch konserviert sind. Für diese Entwicklung ist eine Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym erforderlich. In Rekombinationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß das Mesenchym des Sinus urogenitalis die Morphogenese des Gangsystems induziert, was wiederum über die Expression von epithelialelem Androgenrezeptor die Epithelproliferation reguliert und die Expression von Sekretionsproteinen der Prostata festlegt (Cunha 1972, 1980, 1981, 1983; Chung et al., 1983). Auch Kellohumpu-Lehtinen (1981) konnte zeigen, daß es zu einem engen Zusammenspiel des Epithels mit dem umgebenen Mesenchym kommen kann, indem die Kontinuität der Basalmembran aufgebrochen wird und das Epithel direkt mit dem Mesenchym in Kontakt kommt. Besondere Strukturen der Zellmembran zur Aufrechterhaltung des engen Zell-zu-Zell-Kontaktes konnten dabei jedoch nicht beobachtet werden.

Als morphogenetisches Signal steuern Androgene die Prostataentwicklung, wobei wiederum das androgensensitive Mesenchym die Androgenempfindlichkeit des von dem Sinus urogenitalis abstammenden Epithels reguliert. Diese Fähigkeit hat das Mesenchym jedoch nicht nur während der embryonalen und foetalen Entwicklung, sondern es kann z.T. auch auf das differenzierte, erwachsene Epithel erneut einwirken (Cunha et al., 1981). Auch Wachstumsfaktoren hat man eine wesentliche Rolle bei der epithelialen Differenzierung im Rahmen von epithelio-stromalen Interaktionen zugewiesen. Zu erwähnen sind insbesondere Insulin-like growth-factor (IGF), Platelet-derived growth-factor (PDGF), Nerve growth-factor (NGF), Epidermal growth-factor (EGF), die Transforming growth-factor-Familie (TGF) und Heparin-binding growth-factor-Familie. Beispielsweise fanden Graham et al. (1992) immunhistochemisch eine NGF- $\beta$ -Immunreaktivität im menschlichen Prostatastroma und



konnten gleichzeitig den NGF-Rezeptor (p75) im Epithel nachweisen, was eine parakrine Interaktion zwischen Stroma und Epithel nahe legt.

### 1.1.3 Die Endokrinologie der Prostataentwicklung

Die Entwicklung und das Wachstum der Prostata sind eindeutig androgenabhängig. Führt man bei männlichen fetalen Nagetieren in der ambisexuellen Phase der sexuellen Entwicklung, wenn die Hoden beginnen, Androgene zu produzieren, eine Ablatio testium durch, wird die weitere männliche Entwicklung verhindert (Jost, 1970). Gleiches geschieht, wenn man trächtigen Ratten Antiandrogene appliziert. Dosisabhängig wird in den männlichen Feten die Differenzierung des äußeren und inneren Genitale unterbunden (Elger et al., 1974; Neumann et al., 1974). Inhibiert man die 5 $\alpha$ -Reduktase, so wird die Entwicklung eines männlichen äußeren Genitale sowie der Harnröhre unterbunden, die Prostata selbst entsteht rudimentär. Hier reichen evtl. extrem niedrige Dihydrotestosteronspiegel oder andere Androgenspiegel aus, um eine Organdifferenzierung herbeizuführen (Imperato-McGinley, 1985).

Der Androgenrezeptor selbst konnte in den urogenitalen Geschlechtsanlagen von Feten (von Nagetieren) während der ambisexuellen Phase nur im Mesenchym nachgewiesen werden, im Epithel war er erst deutlich später zu detektieren (Husman et al., 1991).

### 1.2. Die Entwicklung der Prostata bis zur Geburt

Im Alter von sieben Wochen bildet sich bei männlichen Embryonen am kranialen Abschnitt der Urethra der Colliculus seminalis aus. Etwa ab der 10. Entwicklungswoche (entsprechend ca. 55 mm Scheitel-Steiß-Länge (SSL)) beginnt nahe den Mündungen der Wolffschen Gänge die eigentliche Ausbildung der Prostata mit dem Ausprießen mehrerer Knospen aus dem Epithel der Urethra in das umgebende Mesenchym. Ort, Anzahl und Wachstumsverhalten der einzelnen Drüsen sind dabei interindividuell sehr unterschiedlich ausgeprägt (Aumüller, 1979; Glenister, 1962). Dabei werden die ventralen Drüsenknospen nur vorübergehend angelegt. Sie verkümmern oder verschwinden gänzlich im Laufe des 4. Monats. Die Aufzweigung der Drüsenäste und die Ausbildung eines Lumens ist ab einer Größe von 70-75 mm SSL bzw.

am Ende der 11. SSW zu beobachten (Alesio, 1929a; Johnson, 1920). Im Alter von ca. vier Monaten (entsprechend 120-130 mm SSL) steht die endgültige Anzahl der Drüsenknospen fest. Die Entwicklung im Laufe der 16. – 22. SSW (120–190 mm SSL) ist durch drei Prozesse charakterisiert (Sinowatz und Kellokumpu-Lehtinen, 1994): i) Die Rückbildung der anterioren Drüsenknospen, ii) die Entwicklung des Utriculus prostaticus zu einer großen Zyste und iii) die Ausbildung einer muskulären Kapsel, welche sich aus den semizirkulären glatten Muskelzellen der Urethra fortsetzt. Mit fortschreitender Reifung der Prostata proliferiert das Drüsenepithel allmählich. In der 26. SSW ist erstmals eine PAS-positive Sekretion nachweisbar; diese erreicht zwischen der 34. und 36. SSW ihr Maximum (Zondek und Zondek, 1971).

### 1.3 Die weitere Entwicklung der Prostata nach der Geburt

Die postnatale Entwicklung der Prostata läßt sich am zutreffendsten wie nachfolgend aufgeführt einteilen (Aumüller, 1979; Andrews, 1951; Gundobin, 1912; Peter, 1927; Swyer, 1944 ):

- 1) Die peri- und nachfolgende postnatale *Involutionsphase*, welche bis zum zweiten Lebensmonat andauert. Sind zum Zeitpunkt der Geburt noch 90% der Azini von einem metaplastischen Plattenepithel mit sekretorischer Aktivität ausgekleidet, kommt es im Verlauf zu einer Abschilfern dieser Oberflächenzellen, die Basalzellen werden durch säulenförmiges Epithel ersetzt. Als Ursache für die Plattenepithelmetaplasie, die Proliferation und Alteration der Drüsengänge, die Ausbildung eines vollständig differenzierten Epithels sowie die zystische Erweiterung der Drüsengänge allgemein anerkannt sind die von der Mutter stammenden Östrogene (Zondek et al., 1974; Andrews, 1951)
- 2) Die kindliche *Ruhephase*, welche bis zum 10. – 13- Lebensjahr reicht. Ursächlich für das nur geringe Wachstum und die nur geringe Weiterentwicklung und weitere histologische Differenzierung ist das Fehlen der mütterlichen Östrogene (Peter, 1927; Stieve, 1930).
- 3) Die *Differenzierungs-* und nachfolgende *Reifungsphase* der Pubertät, welche vom ca. 12. bis zum 18. – 21. Lebensjahr reicht. Mit dem Beginn der Pubertät erhält die Prostata ihre endgültige äußere Form, und die Ausreifung des Drüsenepithels beginnt. Die Drüsengänge bekommen einen größeren Durchmesser, beginnen

sich aufzuzweigen und entwickeln neue Drüsenknospen (Stieve, 1930). Das dazwischenliegende Stroma wird dabei zurückgedrängt. Das Epithel transformiert zu einem mehrreihigen Zylinderepithel, wobei die oberste Schicht abgestoßen wird. Die sich bildenden Azini enthalten kleine Epithelpapillen und sind entweder von einem niedrigen, oder - insbesondere in der Peripherie - von einem kräftigen Epithel ausgekleidet, welches aus sekretorischen Zellen, Basal- und neuroendokrinen Zellen besteht.

#### 1.4. Die Histogenese verschiedener Epithelzellen

##### 1.4.1 Stromale Differenzierung

Die mesenchymalen Zellen, welche das Epithel umgeben, erscheinen zunächst als kaum differenzierte, multipolare Zellen mit einigen wenigen und zusammengedrängten Organellen. Nach Kellokumpu-Lehtinen (1981) bricht im weiteren Verlauf die Basalmembran an einigen Stellen auf, und ein direkter Kontakt zwischen dem Mesenchym und dem sich entwickelnden Epithel wird möglich. So soll eine direkte Steuerung der Differenzierung des Epithels in sekretorische Zellen möglich sein. Eine Transformation von mesenchymalen Zellen in Myoblasten beginnt zunächst in der Drüsenperipherie, wo später die Prostatakapsel entsteht, und setzt sich in das Drüseninnere fort. Die Zellen des die Gängepithelien konzentrisch umgebenden Mesenchyms beginnen sich zu verlängern und filamentartige Strukturen auszubilden. Mit Abschluß dieses Prozesses trennt eine Schicht abgeflachter Fibroblasten das Epithel von der Myoblastenschicht. Schließlich arrangieren sich die Myoblasten zu einem korbähnlichen Geflecht, welches die prostatistischen Gänge umgibt (Aumüller et al., 1979)

##### 1.4.2 Bedeutung von Steroidhormonen und Wachstumsfaktoren

###### *1.4.2.1 Bedeutung der Androgene*

Wie bereits weiter oben erwähnt, spielen Androgene eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Prostata, bzw. es konnte bei folgenden Abläufen eine Androgenabhängigkeit nachgewiesen werden (Neuman et al, 1974, Elger, 1974):

- 1.) Stabilisierung des Wolffschen Ganges und nachfolgend Entwicklung des *Ductus deferens*, des Nebenhodens und der Samenblasen
- 2.) Differenzierung der vom Sinus urogenitalis abstammenden akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata, Koagulationsdrüse der Ratte)
- 3.) Differenzierung des männlichen äußeren Genitales (Skrotum und Penis, Öffnung des Urogenitalkanals auf der Spitze des Phallus)
- 4.) Unterdrückung der Formierung einer Vagina und der Ausbildung von Mammae

Da die Untersuchungen an verschiedenen Spezies in unterschiedlicher Art und Weise durchgeführt wurden (Dosierungen, Behandlungsbeginn, Behandlungsdauer, usw.) kam zu entsprechend unterschiedlichen Beobachtungen.

Der Androgenrezeptor wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen immunhistochemisch bzw. durch in-situ Hybridisierung in der Prostata nachgewiesen (Chang et al., 1988; Prins et al., 1991; Aumüller et al., 1998). Bei Untersuchungen an Rattenprostaten fanden Prins et al. keinen Unterschied in der regionalen Verteilung entlang einer proximo-distalen Achse entlang der Drüsenabschnitte. Unterschiede in den regionalen Proliferationsaktivitäten scheinen demnach nicht auf einer unterschiedlichen Androgenabhängigkeit zu beruhen.

Aumüller et al. (1993) konnten bei eigenen Untersuchungen kindlicher und erwachsener Prostaten mit Antikörpern gegen den Androgenrezeptor bzw. die  $5\alpha$ -Reduktase ebenfalls keine Unterschiede in der regionalen Verteilung finden. Der Androgenrezeptor war in den Zellkernen der Drüsenzellen, Myozyten und den vaskulären Endothelzellen kräftig nachweisbar, in den Zellkernen der Basalzellen und interazinären Fibroblasten schwächer. Freie Bindegewebszellen waren negativ, die  $5\alpha$ -Reduktase fand sich immer verstärkt in den Basalzellen. In ihren Untersuchungen zur Androgenrezeptorexpression fanden Bonkhoff und Remberger (1993) in normalem Epithel eine verstärkte Immunreaktion in den normalen Drüsenzellen, in hyperplastischen Acini war die Rezeptorexpression in den Kernen der Basalzellen verstärkt.

#### *1.4.2.2 Bedeutung der Östrogene*

Die Prostata und der untere Anteil der intrapelvinen Harnröhre gelten allgemein als die östrogenempfindlichsten Bereiche der männlichen Genitalorgane. Nach Zondek et al. (1986) liegen in der 8. – 14. SSW große Mengen an Östrogenen vor, daneben

auch größere Mengen an Androgenen, welche in diesem Zeitraum ihre höchsten Spiegel haben (Kellokumpu-Lehtinen et al., 1980).

In Versuchen, bei denen man neugeborenen männlichen Mäusen Östrogene verabreichte, konnte gezeigt werden, daß sich der Nachweis von Östradiol-17 $\beta$  Hydroxysteroid-Oxidoreduktase im Bereich des Epithels der prostatistischen Harnröhre bzw. der urethranahen Hauptgänge (Sammelgänge) von Kontrolltieren nicht wesentlich unterschied. Hieraus schloß man, daß in diesen Regionen die Östrogene eine wichtige Rolle in der Regulierung der Androgenwirkung spielen (Pylkkänen et al., 1992).

Aumüller et al. (1998) hingegen konnten in eigenen Untersuchungen zur Östrogenrezeptorverteilung in foetalen und perinatalen humanen Prostatae eine spezifische Kernfärbung weder in Epithelzellen noch stromalen Zellen erkennen. Die Immunreaktivität im periurethralen und im Prostatastroma war nur schwach. Nicht außer acht gelassen werden darf jedoch die Tatsache, daß die ausgeprägte perinatale Plattenepithelmetaplasie auf eine erhöhte Sensitivität für maternale Östrogene zurückgeführt wird.

#### *1.4.2.3. Weitere Sekretionsprodukte und Wachstumsfaktoren*

Weiterhin ist in den Epithelzellen der Urethra und der Prostata bereits saure Phosphatase enzymhistochemisch nachweisbar, ein prostatatypisches Enzym, welches apokrin oder merokrin in das Drüsenlumen abgegeben wird und so in die Ausführungskanäle der Prostata gelangt (Kellokumpu-Lehtinen et al., 1983).

Aumüller (1993) untersuchte auch verschiedene Wachstumsfaktoren. In den pränatalen Prostatae war lediglich der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), begrenzt auf das periduktale Stroma, nachweisbar. NGF und EGF waren nicht nachweisbar. Bei wohl beeinträchtigter Antigenerhaltung konnten jedoch keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden. Im Gegensatz dazu konnten Graham et al. (1992) bei adulten Prostatae eine NGF- $\beta$ -Immunreaktivität im Stroma und den entsprechenden Rezeptor (p75) im Prostataepithel nachweisen. Weiterhin fand man im Drüsenepithel der Prostata eine erhebliche Konzentration des EGF (Jacobs et al., 1988), während in den Basalzellen der korrespondierende Rezeptor vorhanden ist (Maygarden et al., 1992), dessen Expression offensichtlich hormonell reguliert wird (Maddy et al., 1987).

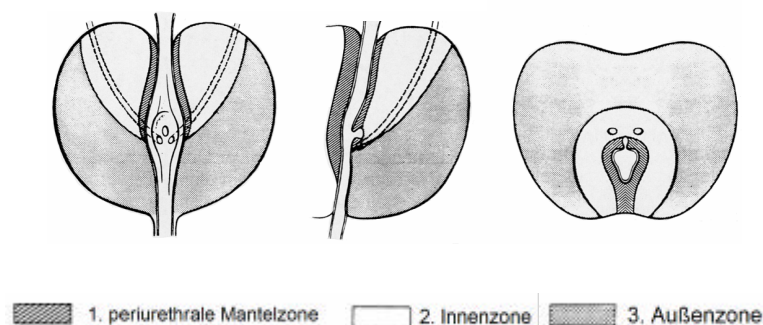
## 1.5. Die innere Gliederung der reifen Prostata

Lange Zeit wurden die Ergebnisse der Untersuchungen Lowsleys (1912) und seine Einteilung der Drüse in vier Lappen allgemein akzeptiert. Bezugspunkt für die Einteilung ist eine vertikale Achse, welche durch den Verlauf der Ductus ejaculatorii vorgegeben wurde. Diese Untersuchungen waren jedoch unvollständig, da keine adulten Drüsen untersucht wurden (Mc Neal, 1981). In späteren Untersuchungen von adulten Prostatae, in Zusammenhang mit der Abklärung der nodulären benignen Prostatahyperplasie (BPH), kam man zu dem Schluß, daß diese Lappen nicht existieren und entwickelte ein deutlich vereinfachtes Bild. Dieses unterschied lediglich eine innere und äußere Prostata-drüse (Franks, 1954). Tisell und Salander (1975) beschrieben jeweils paarig angelegte Hinterlappen, Seitenlappen und Mittellappen mit jeweils eigenen, in die Urethra mündenden Ausführungsgängen. Erst 1981 entwickelte McNeal, basierend auf einer speziellen Präpariertechnik, sowie embryologischen und pathoanatomischen Überlegungen ein dreidimensionales Modell der Prostata, welches heute allgemein Gültigkeit hat und die Prostata in verschiedene Zonen einteilt.

- 1.) Die *periphere Zone*, welche 70 - 75 % der glandulären Drüse ausmacht. Diese formt eine Art Gewebeplatte, deren Drüsengänge seitlich von der Urethra, seitlich und distal des Colliculus seminalis ausstrahlen.
- 2.) Die *zentrale Zone*, welche 25 – 30% der glandulären Drüse ausmacht. Ihre Gänge entspringen nahe der Mündungen der Ductus ejaculatorii, folgen diesen in ihrem proximalen Verlauf und zweigen sich seitlich nahe der Prostatabasis auf. Ihre seitliche Begrenzung verschmilzt mit der proximalen Grenze der peripheren Zone, insgesamt, in Fortsetzung mit der peripheren Zone, eine komplette Scheibe aus sekretorischem Gewebe bildend, welche in einer koronaren Ebene gelegen ist. Bemerkenswerte histologische Unterschiede zwischen der zentralen und peripheren Zone lassen wichtige biologische Unterschiede vermuten. Diskutiert wird unter anderem, daß die Prostata embryologisch betrachtet ein Organ mit zwei Ursprüngen ist. Demnach würden die periphere Zone und die Urethra aus dem Sinus urogenitalis entstehen, die zentrale Zone aus den Wolffschen Gängen. Untermuert wird diese These durch die Tatsache, daß sich in der zentralen Zone, wie auch in anderen Abkömmlingen der Wolffschen Gänge, nur selten Karzinome ausbilden (Mc Neal, 1981).

- 3.) Die *präprostatistische Region*, welche weniger als 5% der Prostatagesamtdrüse ausmacht. Der proximal des Colliculus seminalis gelegene Harnröhrenanteil knickt, bezogen auf das distale Harnröhrensegment, um 35° nach vorne ab. In dem proximalen Segment entspringen keine großen Drüsengänge, aber die seitlichen Reihen der Mündungen der Gänge aus der peripheren Zone setzen sich fort. Es gibt lediglich verkümmert ausgebildete Gänge, so daß nur eine schmale Übergangszone mit einigen periurethralen Gängen entsteht. Die Entwicklung dieser kleinen Gänge wird möglicherweise festgelegt und begrenzt durch die enge Beziehung zu einem periurethralen glattmuskulären Sphinkter, welcher nur proximal des Colliculus seminalis existiert. Die kleinen Gänge dieser begrenzten Region sind der Ort der nodulären Prostatahyperplasie (BPH). In das distale urethrale Segment münden die Ductus ejaculatorii und die Gänge von fast 95 % der Prostata-drüse. Es ist somit das einzige Segment, welches primär in die Ejakulationsfunktion involviert ist. (Mc Neal, 1989)
- 4.) Das *anteriore fibromuskuläre Stroma*. Dieses enthält keine Drüsen und bedeckt wie eine dicke Schürze die gesamte anteriore Oberfläche und versperrt dabei die Sicht auf die anteriore Oberfläche der drei Drüsenregionen. Es ist dabei untrennbar mit der eigentlichen Prostata-drüse verbunden (Mc Neal, 1981, 1972)

**Abb. 1: Die zonale Anatomie der Prostata (modifiziert nach Altenähr, 1982)**



a) Frontalschnitt    b) Sagittalschnitt    c) Horizontalschnitt

Insgesamt enthält die menschliche Prostata 30–50 (Stieve, 1930) oder 50–70 (v. Ebner, 1902) kleine, zusammengesetzte, tubuloalveolären Drüsen, welche mit insgesamt 16–32 Ausführungsgängen unabhängig voneinander in die Harnröhre münden (Aschoff, 1922).

## 1.6. Die neuroendokrinen Zellen der Prostata

Die stromalen und epithelialen Anteile der Prostata wurden bis vor einigen Jahren ausschließlich als Zielorgan hypothalamischer, hypophysärer, gonadaler und adrener Hormone aufgefaßt. Vermehrt hat sich das Interesse v. a. im Hinblick auf die weiterhin ungeklärte Pathogenese der BPH und des Prostata-Karzinoms auf lokale Steuerungsmechanismen in der Prostata gerichtet, wie in den Arbeiten von Cunha und Mitarbeiter zu den epithelio-stromalen Interaktionen (Cunha et al., 1994) und u.a. denen von McKeehan (1991) und Story (1991) zu den Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren zu erkennen ist.

Innerhalb des Prostataepithels kann man nach morphologischen Kriterien fünf verschiedene Zelltypen unterscheiden (Kastendieck, 1977, Übersicht bei Aumüller, 1979). Mc Neal (1989), unter anderen, differenziert lediglich drei unterschiedliche Zelltypen:

- 1.) Basalzellen (Typ I nach Kastendieck)
- 2.) Sekretorische luminale Zellen (Typ III nach Kastendieck)
- 3.) Neuroendokrine / Parakrine Zellen (Typ IV nach Kastendieck)

Die Basalzellen (Typ I) trennen, wie in anderen Drüsen auch, die sekretorischen Zellen von der Basalmembran und dem Stroma. Diese Zellen liegen gestreckt und abgeflacht parallel nebeneinander der Basalmembran auf, haben schlanke, filiforme und dunkle Zellkerne und besitzen normalerweise kaum Zytoplasma (Mao et al., 1966). In der Routinefärbungen entgehen sie dem Untersucher leicht, ein sicherer Nachweis gelingt z.B. mit dem Basalzell-spezifischen Keratin 34 $\beta$ -E12. Ein sicherer Nachweis von Basalzellen in einer Prostatagewebeprobe ist für die tägliche pathologische Diagnostik von erheblicher Bedeutung. Sind Basalzellen nicht nachweisbar, ist ein bedeutendes Kriterium für die Diagnose „infiltrierendes Prostatakarzinom“ erfüllt, spiegelt dies doch die klonale Proliferation karzinomatöser Zellen ohne eine entsprechende Prolifertion von Basalzellen wieder (Totten et al., 1953; Barwick und Mardi, 1983). In den letzten Jahren hat sich mehr und mehr herausgestellt, daß die Basalzellen die eigentliche Stammzellpopulation der Prostata darstellen (Bonkhoff, 1996; Bonkhoff und Remberger, 1996; Dermer, 1978; Cleary et al., 1983). Sie stellen das proliferierende Kompartiment des normalen und auch hyperplastischen Epithelwachstums dar (Bonkhoff, 1994). Der dualen Funktion der Prostata als einerseits urethrale und andererseits akzessorische Geschlechtsdrüse entsprechend, sezernier-



nen die sekretorischen luminalen Zellen (Typ II) eine ganze Reihe verschiedener Produkte in die Harnröhre, respektive in das Ejakulat. Zu erwähnen wären z.B. Calcium, Zink, Citrat, Spermin, Inositol, Cholesterin, TSH-like Protein, EGF, NGF- $\beta$ , PAP, Pepsinogen II, Lactoferrin und Gewebe-Plasminogen Aktivator (Aumüller, 1993; Reese, 1986; 1988). Die beiden wichtigsten sekretorischen Proteine sind die saure Phosphatase, deren Funktion bislang nicht eindeutig geklärt ist (Erstbeschreibung durch Kutscher und Wolbergs, 1935) und das sog. Prostata-spezifische Antigen (PSA), eine Serin-Protease, welche erstmals 1979 durch Wang charakterisiert wurde (Übersicht bei Allsbrock et al., 1992, 1993). Der Sekretionsmodus der Drüsenzellen ist außerordentlich differenziert und bei Menschen nicht in allen Einzelheiten geklärt (Aumüller und Seitz, 1990).

Die neuroendokrinen Zellen der Prostata (Typ III) wurden im Kontext der parakrinen Interaktionen in der Prostata lange Zeit vernachlässigt. Eine erstmalige ausführliche Beschreibung erfolgte schon 1944 durch K. Pretl, welcher die Zellen in ihrer Gesamtheit, anlehnend an die These Feyrters (1938, 1951), als diffuses endokrines epitheliales Organ bezeichnete. Nach weiteren Untersuchungen wurden sie als Amino-Precursor-Uptake and Decarboxylation (APUD) -System (Pearse, 1969), als diffuses neuroendokrines System oder auch Paraneurone (Fujita et al., 1988) bezeichnet. Nach bisherigen Untersuchungen sind sowohl ihre morphogenetische Abstammung als auch ihre genaue Funktion nicht eindeutig geklärt (Bonkhoff, 1998).

#### 1.6.1. Über die Herkunft der prostatistischen neuroendokrinen Zellen

Bezieht man sich auf Feyrters ursprüngliches Konzept (1938), so muß man davon ausgehen, daß alle im Organismus vorhandenen neuroendokrinen Zellen Abkömmlinge der Neuralleiste sind. Da sie im Urogenitaltrakt in Organen endodermalen Ursprungs, wie Prostata und Harnblase, vorkommen (erstmalig gezeigt durch Feyrter, 1951), wird auch für sie ein endodermaler Ursprung angenommen. Ein Vergleich zu den neuroendokrinen Zellen aus dem gastro-enteropankreatischen System liegt dabei nahe (Fujita, 1988). Eine Herkunft dieser Zellen aus dem Mesoderm gilt als unwahrscheinlich, kommen sie doch normalerweise in Geweben mesodermalen Ursprungs, wie z.B. Harnleiter und Nierenbecken, nicht vor. Eine Ausnahme bildet jedoch die Beobachtung Fetissofs (1983), daß in sog. Brenner-Tumoren, meist gutartigen Tu-

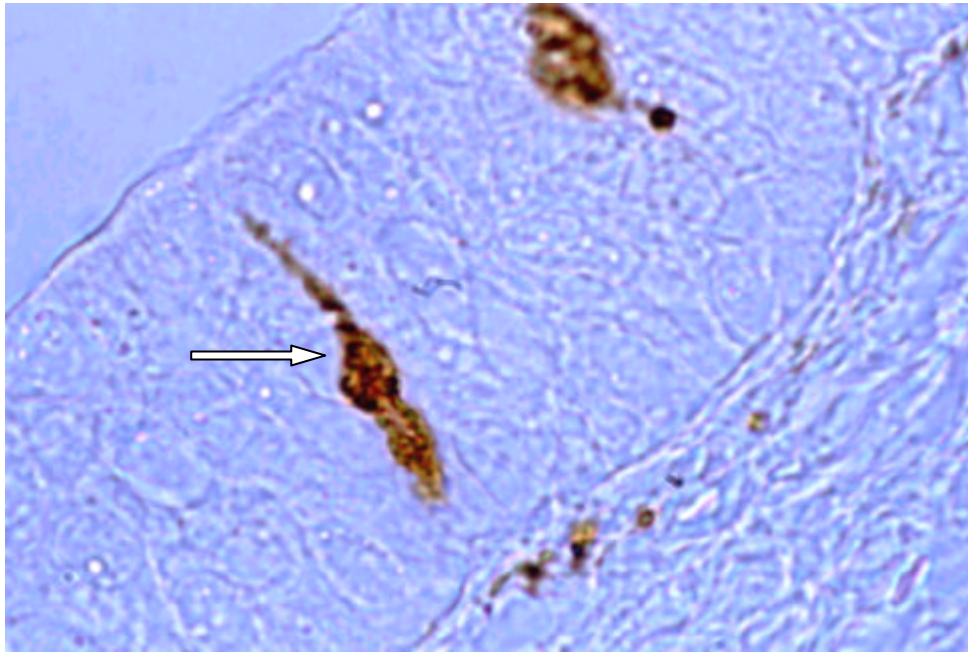
moren des vom Mesoderm abstammenden Ovars, neuroendokrine Zellen nachweisbar sind. Fetissof selbst interpretierte dies als Ausdruck des neoplastischen Prozesses, hielt aber eine mesodermale Herkunft der neuroendokrinen Zellen nicht für ausgeschlossen. Nach neueren Untersuchungen vermutet man für alle prostatistischen Epithelzellen, also auch die neuroendokrinen Zellen, eine gemeinsame Vorläuferzelle oder Stammzelle. Bei immunhistochemischen Untersuchungen von normalen Prostatae und Prostatakarzinomen mit Hilfe von Doppelmarkierungstechniken fand man Zellen welche eine Zwischenform zwischen den neuroendokrinen Zellen, den sekretorischen luminalen und den Basalzellen darstellten. Dabei wies man Zellen nach, welche gleichzeitig sowohl Basalzellen-spezifisches Zytokeratin und PSA oder basalzellen-spezifisches Zyokeratin und Chromogranin A exprimierten. Normale Basalzellen exprimieren PSA jedoch nicht. Betrachtet wurde diese Zwischenform als Stammzelle und somit auch als Vorläuferzelle der neuroendokrinen Zellen (Bonkhoff et al., 1994, 1998; Xue et al., 1998). Mit Unterstützung dieser Daten postuliert Bonkhoff ein Stammzellmodell der Prostata, welches bekannte Aspekte der benignen Prostatahyperplasie vereint (Bonkhoff et al., 1998). Demnach besteht das Epithel der menschlichen Prostata funktionell aus zwei Kompartimenten. Die Basalzellschicht repräsentiert das proliferierende Kompartiment und beheimatet sehr wahrscheinlich die prostatistischen Stammzellen. Die sekretorischen luminalen Zellen stellen mehr das sich differenzierende Kompartiment dar. Diese Zellen sind androgen-abhängig und haben noch eine begrenzte Möglichkeit zur Proliferation. Im Gegensatz dazu zeigen NE-Zellen keine Proliferationsaktivität - immunhistochemisch läßt sich das dafür typische Ki-67 und MIB-1-Antigen nicht nachweisen - sie sind also post-mitotische Zellen (Bonkhoff et al., 1995), auch der nukleäre Androgenrezeptor läßt sich nicht nachweisen (Bonkhoff et al., 1993; Krijnen et al., 1993). Eine ähnliche Theorie existiert auch für die neuroendokrinen Zellen des kolorektalen Epithels, welche lokaler klonaler Abstammung sein sollen (Kirkland, 1988).

Ganz im Gegensatz dazu steht ein Modell, welches Aumüller kürzlich entwickelte (Aumüller et al., 1998). Er geht dabei von einem dualen Stammzellmodell aus, wie man es z.B. auch in der Haut (Merkel-Zellen und epidermale Zellen), in der Nebenniere (Mark und Rinde) und in der Schilddrüse (C-Zellen und Thyreozyten) findet. In diesem dualen Stammzellmodell der Prostata sind die neuroendokrinen Zellen neurogenen Ursprungs und wandern in den *Sinus urogenitalis* ein. Sie können sich zu reifen neuroendokrinen Zellen weiterentwickeln oder in ein ruhendes Stadium über-

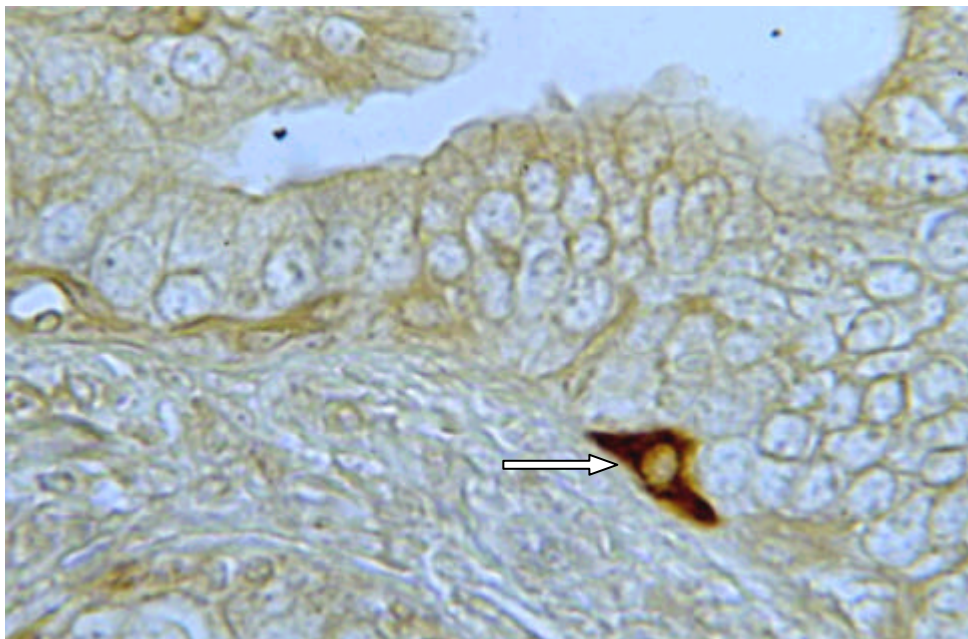
gehen, in dem man sie mit den üblichen neuroendokrinen Markern nicht nachweisen kann. Die reife neuroendokrine Zelle stimuliert die Proliferation Androgen-Rezeptor-negativer *Sinus urogenitalis* - Zellen, aus welchen entweder neue *Sinus urogenitalis* Stammzellen hervorgehen oder welche sich präpubertär in Basalzellen, intermediäre und adluminale unreife Zellen differenzieren. Dabei exprimieren nur die letztgenannten den Androgenrezeptor. Mit Beginn der Pubertät werden die unreifen intermediären und adluminalen Zellen durch Androgen-Rezeptor-positive Basal- und sekretorische Zellen ersetzt, welche somit das reife differenzierte Kompartiment bilden. Ausgangspunkt ist die Androgen-Rezeptor-negative Stammzelle, aus welcher die Basalzelle hervorgeht. Diese wiederum kann sich zu einer sekretorischen Zelle differenzieren.

#### 1.6.2. Die Morphologie der neuroendokrinen Zellen

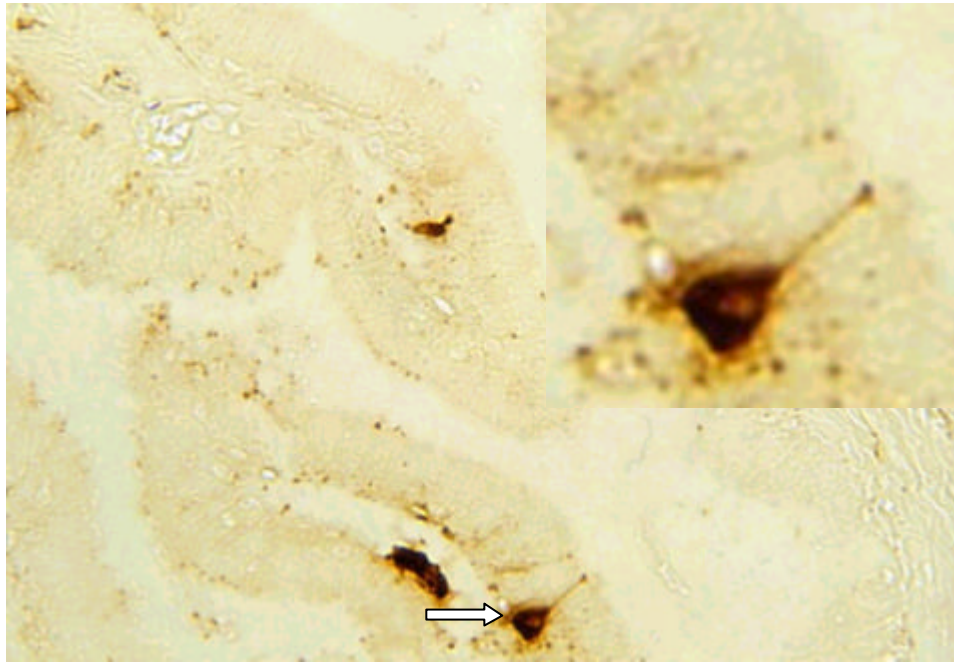
Nach ihrem äußeren Erscheinungsbild unterscheidet man unter den neuroendokrinen Zellen zwei unterschiedliche Typen (di Sant'Agnese, 1985). Zellen vom „offenen Typ“ (open type, siehe Abbildung 1.2) grenzen an das Drüsenlumen und besitzen apikal Fortsätze mit speziellen Mikrovilli. Zellen vom „geschlossenen Typ“ (closed type, siehe Abbildung 1.3, 1.4) haben keinen Kontakt zum Lumen. Beide Zelltypen sind überwiegend basalmembranorientiert und grenzen mit einem Anteil ihrer Zelloberfläche an die Basalmembran. Zahlreiche Zellen beider Typen besitzen z.T. lange dendritische Fortsätze, welche sich zwischen den benachbarten Epithelzellen ausbreiten und in einigen Fällen bis zu anderen neuroendokrinen Zellen reichen. Insgesamt scheinen die Zellen vom geschlossenen Typ zu überwiegen.



**Abb. 1.2: Neuroendokrine Zelle vom offenen Typ mit dendritischen Fortsätzen, Chromogranin A, Präp. 267, Knabe, 5 Jahre, x 160**



**Abb. 1.3: Neuroendokrine Zelle vom geschlossenen Typ, dreieckig geformt, der Basalmembran anliegend, Präp. 517 A, humane Prostata,  $\alpha$ -Calcitonin, x 400**



**Abb. 1.4: Neuroendokrine Zelle vom geschlossenen Typ, dreieckig geformt, mit langem dendritischen Fortsatz (Pfeil), Präparat 125, humane Prostata, 18 Jahre,  $\alpha$ -Chromogranin A, x 250, im Bild oben rechts Ausschnittsvergrößerung**

Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen bzgl. der Morphologie der neurosekretorischen Granula eine große Bandbreite, was eine Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen vermuten lässt (di Sant'Agnese, 1984). Nach der Größe der Granula unterteilt di Sant'Agnese (1984) die neuroendokrinen Zellen in drei Gruppen, und zwar in die vom i) kleingranulären Typ, ii) in Zellen mit mittelgroßen Granula und iii) in Zellen mit großen Granula. Zellen mit mittelgroßen Granula sollen zahlenmäßig überwiegen.

### 1.6.3. Die Hormonabhängigkeit neuroendokriner Zellen

Die Funktion der neuroendokrinen Zellen in der Prostata ist nicht geklärt. In zahlreichen Untersuchungen stellte sich die Frage nach der Androgenabhängigkeit dieser Zellen, womit sich eine übergeordnete Steuerung erklären ließe. Den Untersuchungen Nakadas (1993) zufolge sind sämtliche neuroendokrine Zellen, welche mit Chromogranin A (CgA) markiert wurden, androgenrezeptorpositiv, vergleichbar mit anderen sekretorischen Epithelzellen. Bonkhoff konnte diesen Befund bei seinen

Untersuchungen von Prostatagewebe verschiedener Dignität nicht bestätigen. In normalem und hyperplastischem Gewebe war in Chromogranin-A-markierten neuroendokrinen Zellen der Androgenrezeptor durchweg nicht nachweisbar. Eine unzweifelhafte Koexpression von CgA und Androgenrezeptor war lediglich spärlich in einigen Untergruppen endokrin differenzierter Tumorzellen von sowohl behandelten als auch unbehandelten Prostatakarzinomen nachweisbar (Bonkhoff, 1993). Nachdem von der erstgenannten Arbeitsgruppe die Untersuchungen mit einem anderen Antikörper gegen den Androgenrezeptor wiederholt wurden (di Sant'Agnese, 1994), wurden die Befunde von Bonkhoff bestätigt, so daß man heute allgemein davon ausgeht, daß die neuroendokrinen Zellen der Prostata keinen Androgenrezeptor exprimieren. Weitergehende Untersuchungen zum Östrogenrezeptorgehalt liegen bis dato nicht vor, in der vorliegenden Arbeit wurden daher sowohl ein monoklonaler Anti-Androgenrezeptor-Antikörper als auch ein monoklonaler Anti-Östrogen-Rezeptor-Antikörper eingesetzt (s.u.).

#### 1.6.4. Die topographische Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der Prostata

Während di Sant'Agnese einmal eine diffuse Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der Prostata beschrieb (1992), ein anderes Mal die größte Anzahl in den periurethralen Gängen des Samenügels, eine beträchtliche, insgesamt aber geringere Anzahl in der prostatistischen Urethra und den kleinen Drüsengängen und nur eine geringere Anzahl in der Drüsenperipherie beschrieb (1986), fand Aumüller bereits 1979 bei eigenen Untersuchungen eine Häufung neuroendokriner Zellen im periurethralen Mündungsbereich der Drüsengänge vor. Dieser Befund wurde sowohl von Cohen (1993) als auch Xue (2000) bestätigt. In der Regel wurde in den bislang veröffentlichten Publikationen jedoch lediglich eine qualitative Aussage gemacht. Mehr auch quantitativ über die topographische Verteilung der neuroendokrinen Zellen der Prostata zu erfahren war unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.6.5. Über die Nachweismethoden neuroendokriner Zellen

Typischerweise erfolgte bis in die 70er Jahre bei lichtmikroskopischen Untersuchungen der Nachweis der neuroendokrinen Zellen mittels Versilberungsverfahren, wie z.B. der nach Gros-Schultze oder Grimelius (Grimelius, 1968; Pretl, 1944, Feyrter, 1951, Kazzaz, 1974). Unterschieden wurde dementsprechend in argentaffine, und somit auch agyrophile oder lediglich agyrophile Zellen (Anm.: Argentaffinität besagt, das bestimmte Strukturelemente der Zellen und Gewebe ammoniakalische Silbernitratlösungen von sich aus *ohne* Anwendung eines weiteren Reduktionsmittels zu reduzieren, wobei ein schwarzer Silberniederschlag entsteht. Argyrophilie besagt, daß diese Schwärzung bestimmter Strukturen, bei den üblichen Silberimprägnierungsverfahren nur unter Einwirkung eines Reduktionsmittels entsteht, Psychrembel, Klinisches Wörterbuch, 255. Auflage). Mit zunehmender Verfügbarkeit spezifischer Anti-Peptid-Antikörper (wie z.B. gegen Serotonin, Calcitonin, Somatostatin, VIP und Bombesin) und Antikörpern gegen den panendokrinen Marker Chromogranin A sowie PGP 9.5 und NSE erfolgt der Nachweis in der Regel auf immunhistochemischem Weg. In der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere Anti-Chromogranin A, Anti-Serotonin und Anti-Calcitonin-Antikörper eingesetzt und damit markierte Gewebe für die Auswertung berücksichtigt.

### 1.6.6. Über die Funktion der neuroendokrinen Zellen

Die genaue Funktion der neuroendokrinen Zellen in der Prostata ist nicht bekannt. Als dem sog. diffusen neuroendokrinen oder APUD-System zugehörige Zellen enthalten sie sekretorische Granula von sehr heterogener Morphologie (siehe auch di Sant'Agnese et al., 1984). Dieses läßt vermuten, daß diese Zellen eine ganze Reihe verschiedener Funktionen ausüben, welche jedoch derzeit zu großen Teilen noch unbekannt sind. In anderen untersuchten Systemen welche ebenfalls neuroendokrine Zellen enthalten, wie z.B. Lunge, Pankreas und Nebenniere, schreibt man ihnen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung zu. So haben sich drei Theorien etabliert, die ihr Vorkommen auch in der Prostata erklären. (Deftos, 1998). Die erste und möglicherweise entscheidende ist die, daß diese Zellen und ihre Sekretionsprodukte das Zellwachstum in der Prostata

regulieren. Unterstützt wird diese Ansicht durch die Beobachtung, daß den neuroendokrinen Produkten, wie z.B. Calcitonin, Calcitonin gene related peptide (CGRP), Katalcalcin und Serotonin Wachstumsfaktoreigenschaften zugeschrieben werden (Abrahamsson, 1996; di Sant'Agnes, 1995; (Review bei Dalsgaard et al., 1989; Seuwen et al., 1990; Tutton und Barkla, 1987). Wie Bonkhoff und Mitarbeiter weiterhin zeigen konnten, haben neuroendokrine Zellen eine enge topographische Nachbarschaft zu proliferierenden Zellen in der Prostata, was einen parakrinen Wachstumseinfluß vermuten läßt. Bei ihren Untersuchungen in der normalen und hyperplastischen menschlichen Prostata markierten sie die neuroendokrinen Zellen mit Chromogranin A und die proliferierenden Zellen mit Ki-67 und fanden einen engen räumlichen Zusammenhang in der Expression beider Marker (Bonkhoff et al., 1991). Darüberhinaus ist die Prognose von Patienten mit einem neuroendokrin differenzierten Prostatakarzinom schlecht (di Sant'Agnes, 1995).

Weiter unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, daß neuroendokrine Zellen bereits zum Zeitpunkt der Geburt, während der fetalen Entwicklung und während der Pubertät nachweisbar sind, also während der typischen Wachstumsperiode. Nach di Sant'Agnes (1995) sollen sie aber in der Latenzphase / Nicht-Wachstumsphase nicht nachweisbar sein.

Die zweite Theorie besagt, daß die neuroendokrinen Zellen eine exokrine Funktion haben und mit ihren Sekretionsprodukten direkt auf die Zusammensetzung der Seminalflüssigkeit Einfluß nehmen. Hohe Spiegel von Bombesin, Somatostatin,  $\beta$ -Endorphin, Met-Enkephalin und Calcitonin (Sjoberg et al., 1980; Deftos, 1998) sind im Ejakulat nachweisbar. Die Calcitonin-Konzentration in der Samenflüssigkeit ist dabei z.T. 10 – 40-mal höher als im Serum. Dies gilt sowohl für vasktomierte als auch für nicht-vasktomierte Männer. Sowohl Calcitonin selbst als auch ein sinkender Calciumgehalt des Ejakulats inhibieren die Spermienmotilität. Dieses gilt sowohl *in vitro* (Gnessi et al., 1984) als auch *in vivo*. Die Wirkung erfolgt dabei rezeptorvermittelt (Silvestroni et al., 1987).

Die dritte Theorie besagt, daß die neuroendokrinen Zellen und ihre Sekretionsprodukte Mediatoren des autonomen Nervensystems sind. Peptiderge Neurone und Rezeptoren sind in einer großen Vielfalt (inklusive Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), Neuropeptid Y (NPY), Substanz P, Met- und Leu-Enkephalin und Somatostatin) in der Prostata nachweisbar. Ihre funktionelle Bedeutung ist jedoch noch unklar (McVary et al., 1998).



## 1.7. Neuroendokrine Marker der Prostata

### 1.7.1 Chromogranin A (CgA)

Als Mitglied der Granin-Familie, zu der man auch Chromogranin B, Sekretogranin II, III, IV, und V zählt, wurde Chromogranin A erstmals in den chromaffinen Vesikeln des Rindernebennierenmarks beschrieben (Blaschko et al., 1967). Es hat als gereinigtes Glykoprotein ein Molekulargewicht von 75 kD (Smith und Winkler, 1967; Smith und Kirshner, 1967), besteht zu ca. 24% aus sauren Aminosäuren (Winkler und Fischer-Colbrie, 1992) und liegt in einer sog. "random-coil"-Tertiärstruktur vor (Smith und Winkler, 1967). Durch Glukokortikoide aus der Nebennierenrinde wird die CgA-Synthese stimuliert (Fischer-Colbrie, 1988; Wohlfahrter et al., 1989). Nachdem man zunächst von einem Vorkommen nur in der Nebenniere ausging, konnte sehr bald eine weite Verbreitung auch im Magen-Darm-Trakt, dem Pankreas, der Schilddrüse und Nebenschilddrüse und insbesondere auch in den neuroendokrinen Zellen des diffusen neuroendokrinen oder sog. APUD-Systems von Mamma, Herz (ANF-Zellen), Lunge, Trachea, Harnblase und nicht zuletzt Urethra und Prostata nachgewiesen werden (Übersichten bei Lassmann et al., 1986; Nolan et al., 1985; Simon und Aunis, 1990, Winkler und Fischer-Colbrie, 1992).

Die Funktionen von CgA sind noch nicht vollständig geklärt. Vermutet wird u.a. eine Sortier- und Speicherfunktion für Sekretgranula und weiterhin Bestandteil einer Matrix respektive eines Gerüsts dieser Granula zu sein. Möglicherweise dient es auch als Vorläufer für aktiv sezernierte Peptide, wie z.B. das Pankreastatin, welches die glukosestimulierte Freisetzung von Insulin im Pankreas inhibiert (Tatemoto et al., 1986, Huttner et al., 1987, Eiden 1987).

### 1.7.2 Calcitonin

Das Peptidhormon Calcitonin wurde erstmals 1968 als Produkt der parafollikulären Zellen der Schilddrüse beschrieben (Foster et al., 1968). Es ist ein Peptid-Hormon mit einem Molekulargewicht von 3600 D, welches sich aus 32 Aminosäuren zusammensetzt.

Calcitonin senkt bei Hypercalcämie die Calcium- und Phosphatkonzentration im Serum über eine Verminderung der Osteoklastenaktivität, wodurch die Knochenresorp-

tion gehemmt wird. Ferner wird die Umwandlung von Osteoklasten in Osteoblasten gefördert und somit die Knochenbildung angeregt. An der Niere bewirkt Calcitonin, wie Parathormon, eine Abnahme der tubulären Phosphatreabsorption, die Ausscheidung von Calcium, Natrium und Chlorid wird gesteigert. In der Hypophyse bewirkt Calcitonin eine Verminderung der LH-Ausschüttung, welches eine wichtige Rolle bei der Androgensekretion spielt. Zusätzlich wird auch die Prolaktinsekretion, welche die Androgenwirkung auf die Prostata beeinflusst, reduziert (Leicht et al., 1974). Calcitonin wirkt als starkes Analgetikum, indem es die Sekretion von endogenen Opiaten und  $\beta$ -Endorphin stimuliert und die Empfindlichkeit wichtiger zentraler Schmerzbahnen reduziert. Darüberhinaus konnte man Calcitonin auch in anderen Geweben nachweisen, so daß weitere Funktionen in Betracht kommen. Zu erwähnen ist insbesondere der untere Urogenitaltrakt, beträgt doch z.B. die Calcitonin-Konzentration in der Seminalflüssigkeit das 10 bis 40-fache der Serumkonzentration, so daß man von einer direkten Sekretion dieses Peptids ausgegangen werden muß. Bereits 1986 konnte an humanen Spermatozoen eine hoch-affine Bindungsstelle für (Lachs-) Calcitonin nachgewiesen werden (Foresta et al., 1986).

### 1.7.3. Serotonin (5-Hydroxytryptamin)

Der Name wurde der Substanz vor ihrer chemischen Identifizierung aufgrund ihrer vasokonstriktorischen Wirkung gegeben. Der Nachweis gelang zunächst in den enterochromaffinen Zellen des Intestinums. Die Bildung von Serotonin erfolgt über die Dopa-Decarboxylase aus 5-Hydroxytryptamin, welches zuvor durch die Tryptamin-Hydroxylase aus Tryptamin gebildet wurde.

Der Abbau wird durch die Monoaminoxidase katalysiert, welche in den Mitochondrien lokalisiert ist. Insbesondere bekannt ist Serotonin als Neurotransmitter im Magen-Darm-Trakt, wo es auf verschiedene Reize hin die Peristaltik verändert (z.B. in Magen und Dickdarm vermindert, in Duodenum und Jejunum steigert, was zu schweren Diarrhoen beim Karzinoidsyndrom führt (Bülbring et al, 1958). Auf die glatte Muskulatur wirkt Serotonin konstriktorisch, so z.B. auf die Bronchien und Bronchiolen, wodurch es zu einer Blutdruckerhöhung im kleinen Kreislauf kommt. Durch diese vasoaktive Wirkung kann lokal indirekt auch ein Tumorstadium beeinflusst werden. Weiterhin wird Serotonin eine Wachstumsfaktor-Aktivität zuge-

wiesen. Die vermehrte DNA-Synthese in Hamsterfibroblasten beispielsweise scheint durch die Aktivierung des 5-HT<sub>1b</sub>-Rezeptors, welcher nur in Nagetieren exprimiert wird, vermittelt zu sein, die Proliferation von glatten Muskelzellen über eine Aktivierung des 5-HT<sub>1d</sub>-Rezeptors (Seuwen et al., 1988), auch eine Beteiligung bei der Morphogenese wird vermutet (Lauder et al., 1988).

### 1.7. Fragestellung der Arbeit

Wie bereits erwähnt, haben Bonkhoff und Mitarbeiter (1996; 1998) kürzlich ein interessantes Stammzellmodell des Prostatawachstums entworfen, wonach die endokrine Differenzierung in Prostatakarzinomen die Pluripotenz ihrer Stammzellen widerspiegelt. Eine Fragestellung dieser Arbeit war, den Entwicklungsgang der neuroendokrinen Zellen und semiquantitativ ihre Verteilung und Häufigkeit in unterschiedlichen Drüsenbereichen in Bezug auf die verschiedenen Gewebekompartimente wie Stroma, Epithel und Azinusgröße zu bestimmen. Ergänzend sollten diese Untersuchungen auch für die zwei am häufigsten vorkommenden Peptide, Serotonin und Calcitonin, durchgeführt werden. Mit dem Einsatz von Anti-Androgenrezeptor und Anti-Östrogenrezeptor-Antikörpern sollte weiterhin sollte die Frage nach der Steroidhormonabhängigkeit der neuroendokrinen Zellen geprüft werden.

## II. Material und Methode

### 2.1. Materialherkunft

Die untersuchten Gewebeproben waren zum einen Archivmaterial aus der Gasser-Strahlen'schen Sammlung des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg, und wurden zum anderen freundlicherweise von Dr. Larsch, Abteilung für Forensische Medizin, Städtisches Krankenhaus Oldenburg und der Abteilung für Pathologie, Klinik der Universität, Malmö, Schweden zur Verfügung gestellt. Im einzelnen wurden untersucht 10 µm dicke Schnittpräparate von Feten mit 55, 57, 58, 65 und 110 mm Scheitel-Steiß-Länge, entsprechend einem Gestationsalter von 10 – 16 Wochen, eines Neugeborenen (36. Schwangerschaftswoche), jeweils eines 3, 4 und 5-jährigen Knaben, jeweils eines 16, 17 und 18-jährigen Jugendlichen, sowie zwei Erwachsene, 40 und 50-jährige Männer.

### 2.2. Aufarbeitung des Materials für die Lichtmikroskopie

#### 2.2.1. Organgewinnung

Der größte Anteil des Materials stammt aus Sektionen, hier waren die Organe innerhalb von 8 – 12 Stunden post mortem entnommen worden, z.T. handelt es sich um Operationspräparate. Über die Herkunft der Embryonen aus der Gasser-Strahl'schen Sammlung ist bekannt, daß es sich hauptsächlich um Abortmaterial und extrauterine Graviditäten handelt.

#### 2.2.2. Organfixierung und Paraffineinbettung

Die entnommenen Organe wurden zur Fixierung zunächst für 24 Stunden in *Bouin'sche Lösung*, pH 7,3, gebracht, welche sich aus 15 Anteilen wäßriger gesättigter Pikrinsäurelösung, fünf Anteilen 37 %-iger Formaldehydlösung und einem Anteil 99,98 %-igem Eisessig zusammensetzt. Zum Herauslösen der *Bouin'schen Lösung* wurden die Präparate für 24 Stunden in 70-%igem Ethanol gebadet. Hiernach erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 80%, Ethanol

90%, Ethanol 96%, Isopropanol 98%) und zuletzt die Überführung in ein *Intermedium*, zusammengesetzt aus Methylbenzoat I-III (Benzoessäuremethylester) und Benzol I-III. Anschließend wurden die Organe für 30 Minuten bei 30 °C im Wärmeschrank in eine gesättigte Lösung von Paraffin in Benzol überführt. Hiernach erfolgte das Einbringen der einzelnen Organe für jeweils 2 x 1,5 Stunden bei 60 °C (Wärmeschrank) in flüssige Paraffine mit unterschiedlichen Schmelzpunkten (zwischen 46 und 58 °C). Nun konnten die einzelnen Organe aus den Gazesäckchen herausgenommen und mit flüssigem Paraplast (Fa. Merck, Darmstadt) in spezielle metallene Rähmchen eingebettet werden. Nach dem Erkalten erfolgte schließlich das Herauslösen und die Fixierung auf spezielle, Mikrotomhalterungen (Einzelheiten siehe Ro-meis, 1989).

### 2.2.3. Das Anfertigen von Paraffinschnitten

Mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) wurden 4-6 µm dicke Schnitte hergestellt und zum Strecken auf die Oberfläche eines ausreichend temperierten Wasserbades (*Aqua dest.*, 40-45 °C) gebracht. Anschließend wurden die Schnitte auf APES-beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet. Die APES-Beschichtung (*Aminopropyltriethoxysilane*, Fa. Fluka) sollte ein Abschwimmen der Schnitte bei den später folgenden Schritten einer immunhistochemischen Untersuchung verhindern.

### 2.2.4. Durchführung der APES-Beschichtung

1. Reinigung der OT in einer heißen Lösung aus Edisonid in *Aqua dest.* für mindestens zwei Stunden. Abspülen unter kaltem Leitungswasser.
2. Inkubation in Aceton für 5 Minuten
3. Inkubation in einer 2%-igen Lösung von APES in Aceton für 5 Minuten
4. Waschen in *Aqua dest.* für 2 x 3 Minuten.
5. Lufttrocknen in der Nacht bei Raumtemperatur.

Diese spezielle Form der Beschichtung war insbesondere notwendig, da für einige der verwendeten Antikörper nach Herstellerangabe eine spezielle Mikrowellenbe-

handlung zur Demaskierung (z.B. Lösung von Paraffinbrücken) der Epitope notwendig war (Iwamura et al., 1994, Gerdes et al., 1992, Shi et al., 1991).

## 2.3. Immunhistochemie

### 2.3.1. Das Prinzip der ABC – Reaktion

Diese Reaktion zählt zu den sogenannten drei-Schritt-indirekten Methoden. Dabei bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert, das heißt, Biotin, ein in einer Vielzahl von Geweben (z. B. Leber, Niere) vorkommendes Vitamin und Coenzym, ist kovalent an den Antikörper gebunden. Als drittes wird ein Avidin-Biotin-Komplex hinzugefügt. Um diesen Komplex zu erhalten, müssen das Avidinreagenz und das biotinylierte Enzym mindestens 0,5 Stunden vor Anwendung in einem optimalen Verhältnis miteinander gemischt werden. In dieser Zeit binden sich freie Bindungsstellen des enzymgekoppelten Avidin an das Biotin des Brückenantikörpers. Der sekundäre Brückenantikörper muß dabei nicht im Überschuß zugegeben werden, da freie  $F_{ab}$ -Arme für die Bindung nicht benötigt werden. Alle Inkubationen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Diese Methode nutzt die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin zu Biotin. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Wegen der Molekülkonfiguration binden in der Regel aber weniger als vier Biotinmoleküle. Nach Hsu et al. (1981) hat diese Methode aufgrund dieser starken Affinität und auch wegen des chemisch milden Biotinylierungsprozesses eine hohe Sensibilität und ist deutlich empfindlicher als die sog. PAP-Methode, welche von Sternberger seinerzeit vorgestellt wurde (Sternberger et al., 1979) und auf welche an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

#### **Schema 2.1: Das Prinzip der ABC-Methode:**

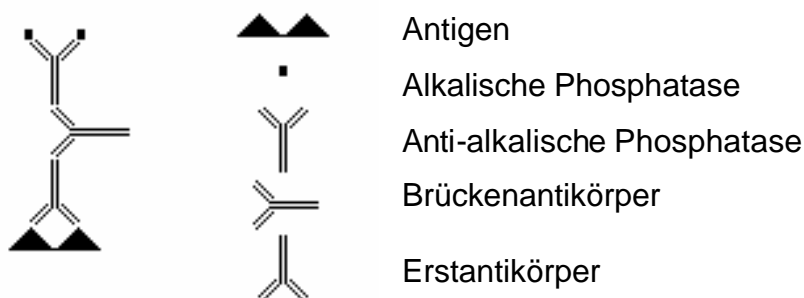


### 2.3.2. Das Prinzip der APAAP- Reaktion (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase Reaktion)

Dieses, manchmal auch als unmarkierte Antikörpertechnik (unlabeled antibody method, Cordell et al., 1984) bezeichnet immunhistochemische Verfahren, nützt die präformierten löslichen Enzym-anti-Enzymimmunkomplexe aus Antigen und den dagegen gerichteten Antikörpern. Um einen löslichen Enzym-anti-Enzymkomplex zu erhalten, muß Enzym im Überschuß zugeführt und die entsprechenden Präzipitate entfernt werden.

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches aus dem Darm von Kälbern gewonnen wird (MG 100 kD). Es hydrolysiert organische Naphtholphosphatester (Substrat) zu Phenylkomponenten und Phosphaten indem es die P-O Bindung zerbricht. Die Phenole binden an farblose Diazoniumsalze (Chromogene) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Für die Aktivierung der Phosphatase werden Metallionen benötigt. Die wichtigsten sind  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Cu^{2+}$ . Eine endogene AP-Aktivität des Knochengewebes, der Nieren, der Leber sowie einiger Leukozyten kann nach Angaben aus der Literatur (Ponder und Wilkinson, 1981) durch den Zusatz von 1 mM Levamisole zur Substratlösung unterdrückt werden. Zusätzliche Blockierungsschritte sind nicht erforderlich.

#### **Schema 2.2: Das Prinzip der APAAP-Reaktion:**



### 2.3.3. Die Doppelfärbung

Diese Methode wurde angewandt, um zwei Antigene auf einem Schnitt darstellen zu können. Dabei wurden ABC- und APAAP-Reaktion hintereinander durchgeführt

(modifiziert nach Nakada et al., 1993). Wichtigste Bedingung dafür ist, daß die jeweiligen Erstantikörper nicht aus derselben Tierspezies gewonnen wurden und einmal poly- und einmal monoklonal waren. Nach einigen Versuchen stellte sich heraus, daß die APAAP-Reaktion, wohl aufgrund der Nachweisantikörpergüte, besser zur Visualisierung der monoklonalen Erstantikörper geeignet war. Während bei der ABC-Reaktion DAB (Fa. Fluka) als Chromogen eingesetzt wurde, kamen bei der APAAP-Reaktion Fast-Red-TR-Salt und Fast-Blue BB-Salt zum Einsatz. Da deren Reaktionsprodukte in alkoholischen oder anderen organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden zum Einschließen Medien auf wäßriger Basis, wie z.B. Kaisers Glycerin Gelatine (Zusammensetzung siehe Romeis, 1989) verwendet.

#### 2.4. Die verwendeten Antikörper

**Tab. 2.1: Die eingesetzten Primärantikörper**

Bezeichnung (Antigen)	Species	Herkunft	Verdünnung
Chromogranin A, polyklonal	Kaninchen	Fa. Dako, Hamburg, D	1:2000
Chromogranin A, monoklonal	Maus	Fa. Dako, Hamburg, D	1:500
Serotonin (5-HT), polyklonal	Kaninchen	Fa. Affiniti, Mamhead, GB	1:3000
Calcitonin, polyklonal	Kaninchen	Firma Dako, Hamburg, D	1:1000
Androgen Rezeptor F 39.4.1, monoklonal	Maus	Fa. Sanbio/Monosan, Uden, NL	1:50
Östrogen Rezeptor ER 1 D5, monoklonal	Maus	Fa. Dianova, Hamburg, D	1:10
Östrogen Rezeptor, monoklonal	Maus	Fa. Dako, Hamburg, D	1:200



**Tab. 2.2: Die eingesetzten Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
ABC-Kit (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex)	Vector, CA, USA	1:200
APAAP-Komplex (alkaline Phosphatase- conjugated anti-rabbit IgG)	Amersham, GB	Brückenantikörper 1:100, APAAP-Komplex 1:100

## 2.5. Die verschiedenen Inkubationsschemata

### 2.5.1. Vorbereitung der Schnitte

Die auf Objektträger aufgezogenen Gewebeschnitte wurden zunächst in einer Xyloleihe (I-III) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert wobei sich die absteigende Alkoholreihe aus 3 x Isopropanol 96%, sowie Ethanol in absteigender Konzentration von 96% bis 50% zusammensetzt. Zuletzt werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in *Aqua dest.* überführt.

### 2.5.2. Das Inkubationsschema bei der ABC-Reaktion

1.) Im Anschluß an die Rehydrierung erfolgt zur Unterdrückung der unspezifischen endogenen Peroxidaseaktivität, und damit zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse und Verminderung einer „Hintergrundreaktion“, eine 15-minütige Inkubation in einer 3%-igen  $H_2O_2$ -Lösung. Wegen der Lichtempfindlichkeit von  $H_2O_2$  muß diese Reaktion im Dunkeln stattfinden.

2.) Nach einer 5 minütigen Spülung in PBS- Tween 20-Lösung (PBS = Phosphat buffered saline, pH 7,4; ein Liter dieser Lösung enthält 8,7 g Natriumchlorid (Fa. Roth), 0,3 g Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Merck) und 1,4 g Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Fa. Merck); Tween 20 entspricht Lauryl-Sorbitan-Polyethylen-Glykolether. Zum Herstellen der Lösung werden 0,5 ml Tween 20 in 1000 ml PBS gemischt) wurden die Schnitte für 30 min. mit einer 5%-igen BSA-PBS-Lösung (BSA = bovines Serumalbumin, Fa. Serva) inkubiert. Hierdurch sollen unspezifische Bindungstellen des Gewebes blockiert werden, um die „Hintergrundaktivität“ zu

vermindern. Um eine zwischenzeitliches Austrocknen der Schnitte zu verhindern, erfolgen alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer.

3.) Bei der Verwendung einiger Antikörper, insbesondere derjenigen, welche gegen Hormonrezeptoren gerichtet waren, wurde von den Herstellern, wie bereits oben erwähnt, eine spezielle Mikrowellenbehandlung empfohlen. Hierzu wurden die Schnitte in eine spezielle Plastikkuvette verbracht und in einem Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) in einem handelsüblichen Mikrowellengerät (Fa. Siemens, max. 650 Watt) für jeweils 2 x 5 Minuten gekocht. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern wurde zwischenzeitlich verdampfte Pufferlösung nach dem ersten Durchgang ersetzt. Anschließend erfolgte eine langsame Abkühlung über mind. 20 Minuten und hiernach die Überführung der Schnitte in PBS.

**Tab. 2.3: Die Zusammensetzung des Citratpuffers (Stammlösungen)**

Substanz	Stammlösung	Menge in g/1000 ml	Molarität
Zitronensäure ( $C_6H_8O_7$ )	A	21,01	0,1
Natrium-Citrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ )	B	29,41	0,1

Die Arbeitslösung setzte sich aus 9 ml der Stammlösung A und 41 ml der Stammlösung B, gelöst in 450 ml *Aqua dest.*

- 4.) Anschließend Spülen der Schnitte für 5 min. in PBS plus Tween 20.
- 5.) Entfernung der überflüssigen Spüllösung und Aufbringen der Primärantikörper in der jeweils geeigneten Verdünnung (siehe Tabelle 2.4), welche in Vorversuchen mit Hilfe von Verdünnungsreihen bestimmt wurde. Anschließend Inkubation der Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C
- 6.) Spülen in PBS plus Tween 20-Lsg. für 3 x 5 min.
- 7.) Nun Auftropfen der biotinylierten Sekundärantikörper (ABC-Kit, Vectastain) und Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur.
- 8.) Spülen der Schnitte für 3 x 5 min. in PBS plus Tween 20 Lsg..
- 9.) Anschließend erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem mindestens 0,5 h zuvor angesetzten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex.
- 10.) Erneutes Waschen für 3 x 5 min. in PBS plus Tween 20 Lsg..

11.) Zur Visualisierung erfolgte dann die Inkubation in einer DAB-Lösung (Diaminobenzidin, Fa. Sigma) für 10 min. (Zusammensetzung der DAB-Lösung: 15mg DAB und 50µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %-ig) gelöst in 100ml PBS).

12.) Hiernach wurden die Schnitte erneut in PBS gespült und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und in Xylol überführt.

13.) Zur Konservierung und Archivierung erfolgte zuletzt das Eindeckeln mit Depex (Fa. Serva).

### 2.5.3. Das Inkubationsschema bei der APAAP –Reaktion

Die APAAP-Reaktion wurde ausschließlich bei Doppelfärbungen eingesetzt, da die Konservierung der Schnitte wegen der abschließenden Eindeckelung mit Glycerin-Gelatine (keine wirkliche Luftdichtigkeit) und der größeren Lichtempfindlichkeit der Reaktionsprodukte (Farben verblassen mit der Zeit) schwieriger ist.

Die Ablauf gleicht prinzipiell der bei der ABC-Reaktion und bis einschließlich Schritt 6.) ist die Durchführung identisch.

7.) Als nächstes erfolgt das Auftropfen des sog. Brückenantikörpers. Bei monoklonalen Erstantikörpern ist dies ein Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Fa. Dianova) in einer Verdünnung von 1:200 und die Inkubation für 30 min.

8.) Anschließend werden die Schnitte 3 x 5 min in PBS plus Tween 20 gewaschen.

9.) Hiernach erfolgt das Auftropfen des APAAP-Komplexes (Fa. Dianova, Verdünnung 1:100) und erneute Inkubation für 30 min.

10.) Spülen der Schnitte für 3 x 5 min in PBS plus Tween 20.

11.) Um die Empfindlichkeit der Nachweisreaktion zu erhöhen, wurden die Schritte 7.) bis 10.) einmal wiederholt, die Inkubationszeiten dabei jedoch auf 10 min. reduziert. (Laut Cordell et al. (1984) hat eine längere Inkubationszeit keine weiteren Vorteile)

11.) Zur Visualisierung der Immunreaktion erfolgte anschließend die Reaktion mit den Chromogenen Fast-red RR-Salt (Fa. Sigma, ergibt ein kräftiges rot, welches sich vom braun-schwarz des DAB sehr gut abhebt, und eingesetzt wurde, wenn z.B. noch eine Kerngegenfärbung mit Meyer's saurem Hämatoxylin vorgesehen war) oder mit Fast-blue BB-Salt (Fa. Sigma, ergibt ein kräftig leuchtendes blau-violett) für insgesamt 30 min.

*Die Substratlösung setzt sich wie folgt zusammen:*

*2mg Naphtol AS-MX-Phosphat (Fa.Sigma) werden mit 0,2 ml Dimethylformamid (DMF) in einem Glasröhrchen gelöst (DMF löst Plastik). Anschließend werden 9,8 ml Tris-Puffer (0,1 M, pH 8,2) hinzugefügt. Zur Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase werden 10 µl 1 M Levamisole zugesetzt. Unmittelbar vor Gebrauch werden 10 mg Chromogen gelöst (ergibt eine wäßrige, etwas gelblich respektive gräulich-bläulich tingierte Lösung) und zur Entfernung kleinerer Ausfällungen direkt auf die Objektträger filtriert.*

12.) Anschließend waschen der Schnitte für 20 min in Aqua dest.

13.) Zuletzt erfolgt der Einschluß mit Deckgläschen mit Hilfe der zuvor im Wasserbad ausreichend verflüssigten Kaiser´s Glycerin-Gelatine.

#### 2.5.4. Das Inkubationsschema bei der Doppelfärbung

Bei der Doppelfärbung wurden beide oben beschriebenen Inkubationsschemata nacheinander, jeweils mit über-Nacht-Inkubationen, durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, daß jeweils ein monoklonaler mit einem polyklonalen Primärantikörper kombiniert wurde, um die Gefahr von Kreuzreaktionen und somit falsch positiven Resultaten zu verhindern.

### 2.6. Auswertung der Ergebnisse

#### 2.6.1. Die Stereologie

Ein Ziel der Arbeit war unter anderem der Versuch, Hinweise auf mögliche regionale Unterschiede in der Verteilung (Stereologie) bestimmter Zellpopulationen (insbes. der NE-Zellen) zu finden. Als Stereologie bezeichnet man auch eine mathematische Methode, mit deren Hilfe man in diesem Fall versucht, aus Resultaten einer Flächendichtemessung eines bestimmten Gewebebestandteils auf dessen Volumendichte zurückzuschließen (Weibel, 1979, Rüschoff, 1989).

### *2.6.1.1. Das manuelle Punktzählverfahren*

Für die Flächendichtemessung sind generell zwei Verfahren denkbar. Beim sogenannten Punktzählverfahren wird ein Punktgitter (Zähllokular, z.B. Fa. LEITZ), welches eine bestimmte Anzahl (20) von Testpunkten enthält, zufällig (randomisiert) auf das zu untersuchende Objekt gelegt. Das Punktgitter stellt sich dar als eine meanderförmige Linie, mit jedoch rechtwinkeligem und nicht bogenförmigen Verlauf, welche in regelmäßigem Abstand durch kleine Markierungsstriche unterbrochen wird. Nur Strukturen, welche unter diesen Markierungsstrichen liegen, dürfen gezählt werden, und nur so ist der Anteil der unter diesen Testpunkten liegenden zellulären Strukturen zu ihrer Volumendichte proportional. Bedingung für eine ausreichend hohe Genauigkeit ist eine ausreichend hohe Anzahl an Punktzählungen und damit ein ausreichend großer Stichprobenumfang. Grundsätzlich sind um so mehr Punktzählungen durchzuführen, je kleiner das zu erwartende Volumen der zu vermessenden Struktur ist. Empirisch läßt sich dieser nach der Methode von Romppanen (Romppanen, 1982) ermitteln. Erstellt man einen kumulativen Mittelwertplot (siehe hierzu auch Holterhus, 1994) des voraussichtlich kleinsten Gewebekompartimentes (hier neuroendokrine Zellen) ist ein Stichprobenumfang von 40 Gesichtsfeldern, entsprechend 800 Testpunkten, mehr als ausreichend, da noch ein deutlicher „Sicherheitsabstand“ eingehalten wird. Ab einer solchen Anzahl von Messungen hat sich also das Meßergebnis auf einen bestimmten, wahren Wert eingependelt und wird auch durch „Ausreißer“ in die eine oder andere Richtung nicht mehr entscheidend verändert. Es kommt allenfalls zu Veränderungen im Promillebereich.

### *2.6.1.2. Die computerassistierte digitale Bildanalyse*

Das zweite denkbare Verfahren, welches hauptsächlich zur Anwendung kam, ist die Flächendichtemessung mit Hilfe der computerassistierten digitalen Bildanalyse. Dabei werden Ausschnitte des zu untersuchenden Objektes, (ein histologisches Präparat, an welchem zuvor mit Hilfe die Immunhistochemie oder konventioneller Färbemethoden verschiedene Kompartimente verschiedenfarbig visualisiert wurden) mit Hilfe einer CCD-Kamera ( Fa. Sony ) in einer entsprechenden Vergrößerung durch das Mikroskop aufgenommen und digitalisiert. Anschließend kann mit verschiedenen Farbfiltern, mit deren Hilfe eine bestimmte Farbbandbreite (z.B. was alles ist „rot“?)

definiert wurde, das jeweils interessierende Kompartiment markiert werden. Anschließend erfolgte durch den Rechner die Flächenberechnung. Durch geschickte Wahl der Maske kann so die Fläche der neuroendokrinen Zellen, des Epithels, der Azini und des Stromas gemessen werden. Um nun Aussagen über die Verteilung treffen zu können, wurden die zu vermessenden Areale zwar primär willkürlich (randomisiert) ausgewählt, nach der Messung aber, entsprechend einer zonalen Gliederung (s.o.) der i) zentralen, urethranahen Zone, der ii) peripheren, urethrafernen Zone oder iii) einem mittleren Bereich zugeordnet. Pro Zone wurden dabei mindestens drei Stichproben untersucht.

## 2.6.2. Quantitative Auswertung

Nach jeder Messung erfolgte zunächst die Übertragung der Meßwerte in eine zuvor angelegte Excel-Tabelle, und anschließend mit deren Hilfe die weitere Verarbeitung der Daten. Insgesamt wurden bei dieser Methode pro Schnitt mind. neun Gesichtsfelder ausgewertet, nach Möglichkeit drei pro Zone. Aufgrund der Größe (besser Kleinheit) der Präparate und aufgrund der gewählten Vergrößerung (40fach) war dies jedoch nicht immer möglich, z. T. konnte das gesamte Objekt bei der Vermessung erfaßt werden.

Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Fa. Microsoft) wurden für die einzelnen interessierenden Gewebekompartimente und die entsprechenden Zonen Durchschnittswerte errechnet und anschließend sowohl die zonale Häufigkeitsverteilung als auch der Altersgang graphisch in verschiedenen Balkendiagrammen dargestellt.

## 2.7. Dokumentation

### 2.7.1. Die Mikrophotographie

Die fotografische Bilddokumentation der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte mit dem Photomikroskop „Axiomat“ der Fa. ZEISS und dem Farbdiafilm Fujicolor Superia 100 bei einer Vergrößerung von 1,2- bis 40-fach.

### III. Ergebnisse

#### 3.1. Foetales und postnatales Wachstum der Prostata

Ein Ziel der Arbeit war es, die Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der Prostata von der Embryonalentwicklung bis ins Alter zu untersuchen. Zugleich erfolgte eine Untersuchung, bzw. Beurteilung anderer Kompartimente des Organs. Mittels semi-quantitativer, computerunterstützter Analyse wurde demnach auch der relative Anteil an der Gesamtdrüse von folgenden Gewebebestandteilen in verschiedenen Drüsen aus verschiedenen Altersstufen bestimmt (siehe auch Tabelle 3.1. und Diagramm 3.1.):

- 1) Stroma (inkl. Muskulatur, Bindegewebe)
- 2) Azinusgröße, bzw. das das Lumen umgebende Epithel
- 3) Lumen

Insgesamt betrachtet fällt dabei die deutliche Zunahme der Azinusgröße selbst sowie die des Lumens auf. Der relative Anteil des Stromas nimmt ab. Betrachtet man den Altersgang, stellt sich die Entwicklung wie folgt dar: Bleiben vom Zeitpunkt der Geburt an für lange Jahre die einzelnen Bestandteile in ihrem relativem Verhältnis zueinander recht konstant (Azinus 35-40%, Lumen 10%, Stroma 60-65%, Epithel 25-30%), kommt es durch ein weiteres Drüsenwachstum im Rahmen der Pubertät zu einer deutlichen Zunahme der Azini auf einen Anteil von ca. 60%. Weiterhin augenfällig ist die Ausbildung eines Lumens. Die Lumina vergrößern sich im gleichen Zug auf ca. 20-25% und erreichen damit ihren endgültigen Anteil am Gesamtprostatavolumen.

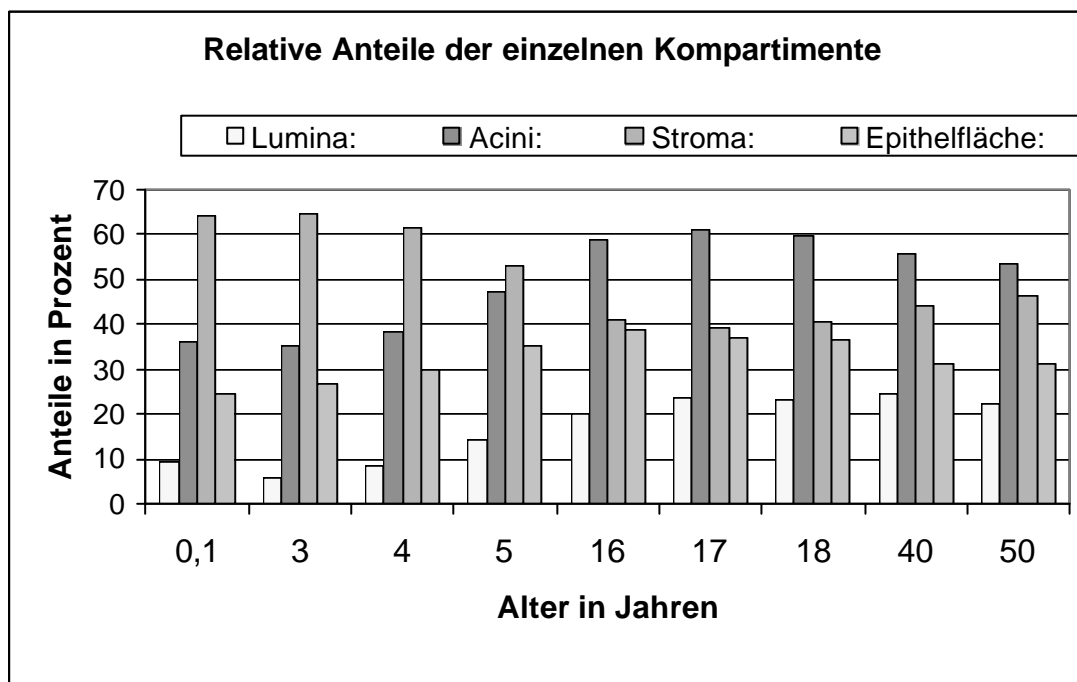
Auch bei den untersuchten Organen des 40- und 50jährigen verändert sich dieser Anteil nicht wesentlich. Die Zunahme der Azinusfläche geschieht insbesondere auf Kosten des Stromas. Sein Anteil sinkt während der Pubertät von zuvor über 60% auf ca. 40% ab, nimmt erst später - möglicherweise im Rahmen einer beginnenden benignen Prostatahyperplasie (BPH) - wieder langsam zu, und erreicht bei dem hier untersuchten 50jährigen insgesamt 46%. Der Anteil des Epithels nimmt im Laufe der Pubertät auf ca. 37% zu (war 25-30% zuvor), um dann später wieder auf ca. 30% abzunehmen.

**Tabelle 3.1: Relative Anteile der Gewebekompartimente (Angaben in Prozent):**

Präparat (Nr.)	82	47/86	235	267	316	40	125	138	201
Alter (Jahren):	(36. SSW)	3-4	4	5	16	17	18	40	50
Lumina:	9,25	5,9	8,3	14,3	20,1	23,8	23,13	24,3	22,3
Acini:	35,9	35,3	38,2	47,0	58,8	60,9	59,6	55,7	53,6
Stroma:	64,3	64,6	61,7	52,9	41,1	39,1	40,4	44,2	46,4
Epithelfläche:	24,5	26,5	29,9	35,0	38,7	37,02	36,4	31,4	31,0

(Anm.: Da ein Acinus aus Epithel und dem von ihm umgebenden Lumen besteht, ist die Summe in den einzelnen Spalten größer als 100 %.)

**Diagramm 3.1: Relativer Anteil der einzelnen Kompartimente in Prozent**

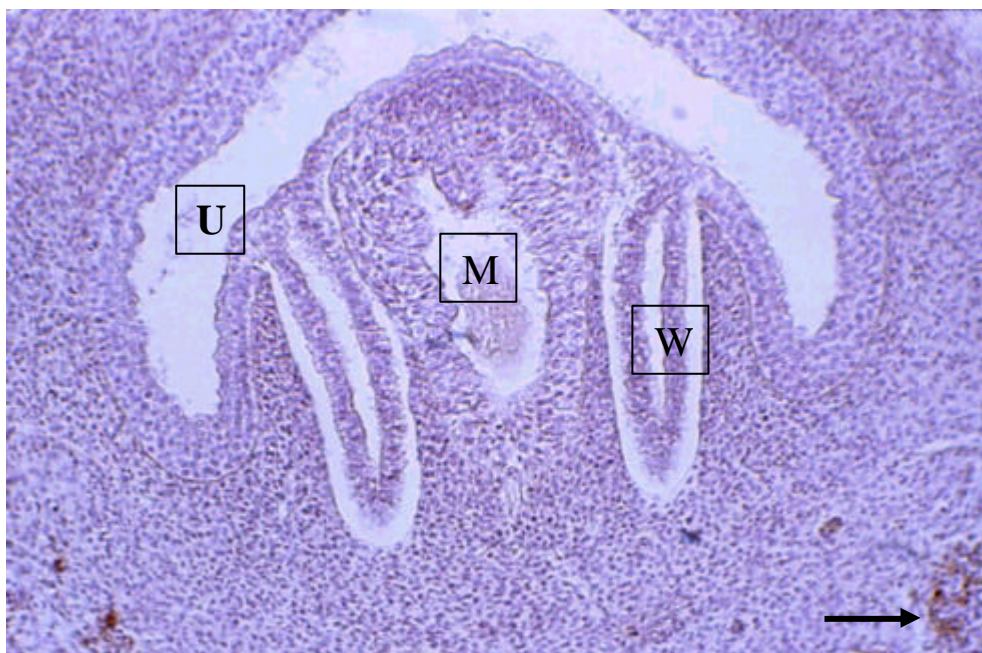




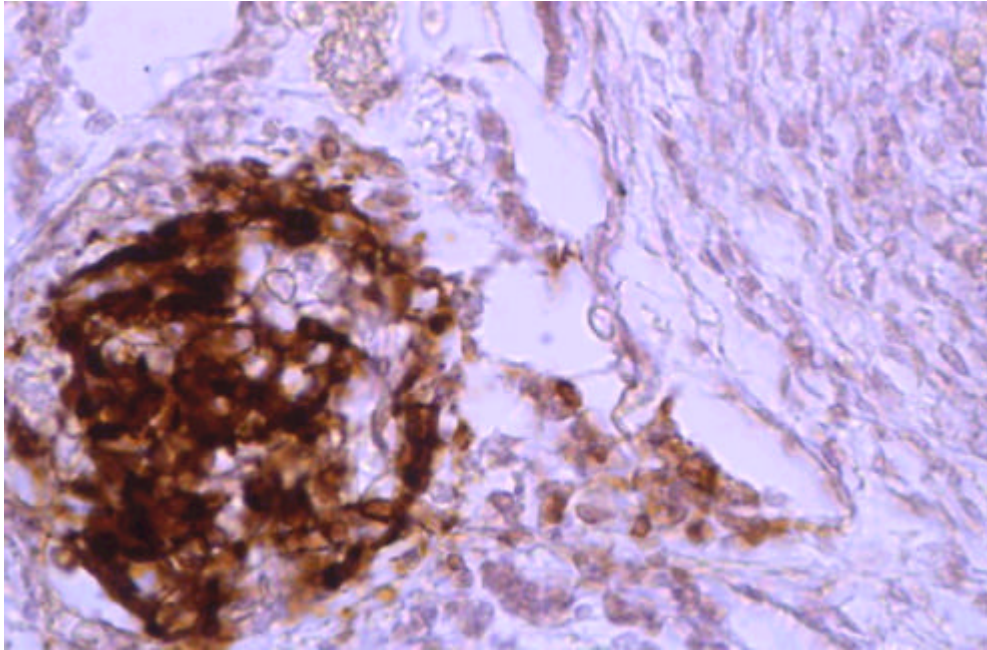
### 3.2. Das Verteilungsmuster der neuroendokrinen Zellen

Für die semiquantitative Auswertung mittels computerassistierter Bildanalyse wurden menschliche Organe aus einem Entwicklungszeitraum von der 36. SSW bis zum 50. Lebensjahr untersucht. Für eine rein deskriptive Untersuchung konnten jedoch auch menschliche Organe aus früheren Entwicklungsstufen, beginnend in der 10.-12. SSW, berücksichtigt werden. Aufgrund der geringen Organgröße, die eine entsprechende Morphometrie nach dem ansonsten angewandten Schema mit Hilfe der computerassistierten Bildanalyse nicht zuließ und aus der Tatsache heraus, dass keine Serienschritte angefertigt worden waren, wurden nur immunhistochemisch Chromogranin A markierte Schnitte ausgewertet.

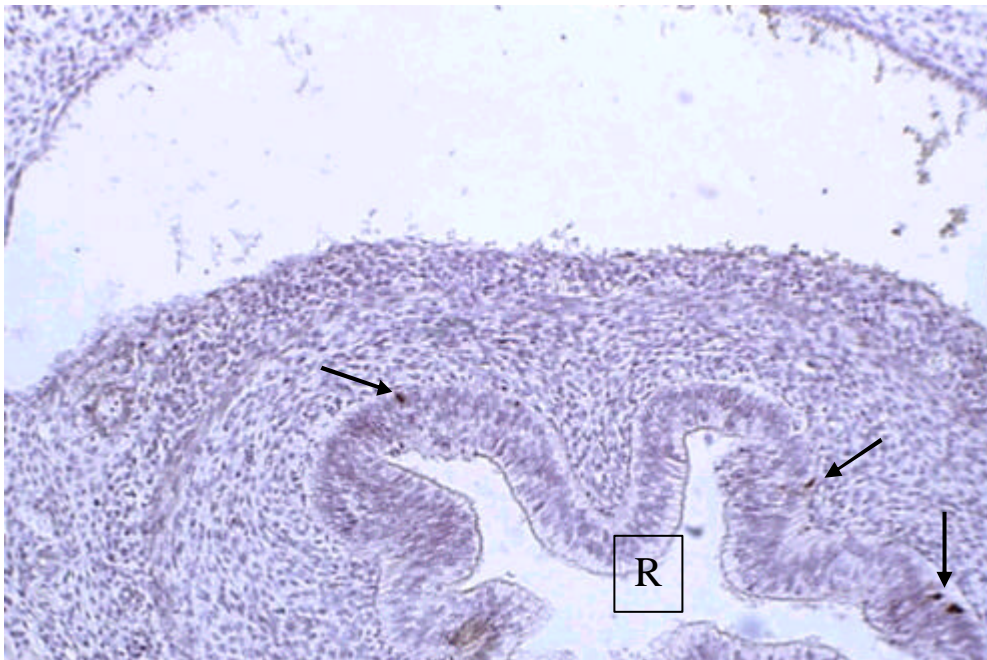
Dabei fanden sich bei einem Embryo mit 57 mm SSL, entsprechend etwa der 10. SSW, innerhalb des Stromas und des Epithels des *Sinus urogenitalis* keinerlei immunreaktive Zellen, in einigen dorsolateral des Sinus urogenitalis gelegenen Ganglien jedoch zahlreiche Chromogranin A-positive Zellen (siehe Abb. 3.1. und 3.2.).



**Abb. 3.1:** Übersicht über den Sinus urogenitalis (U), die Wolffschen Gänge (W) und den Müllerschen Gang (M). Im Epithel des Sinus urogenitalis sind keine Chromogranin A-positiven Zellen nachzuweisen, in einem lateral gelegenen Paraganglion (Pfeil) finden sich einige immunreaktive Zellen. Homo 57 mm,  $\alpha$ -Chromogranin A, x 63.

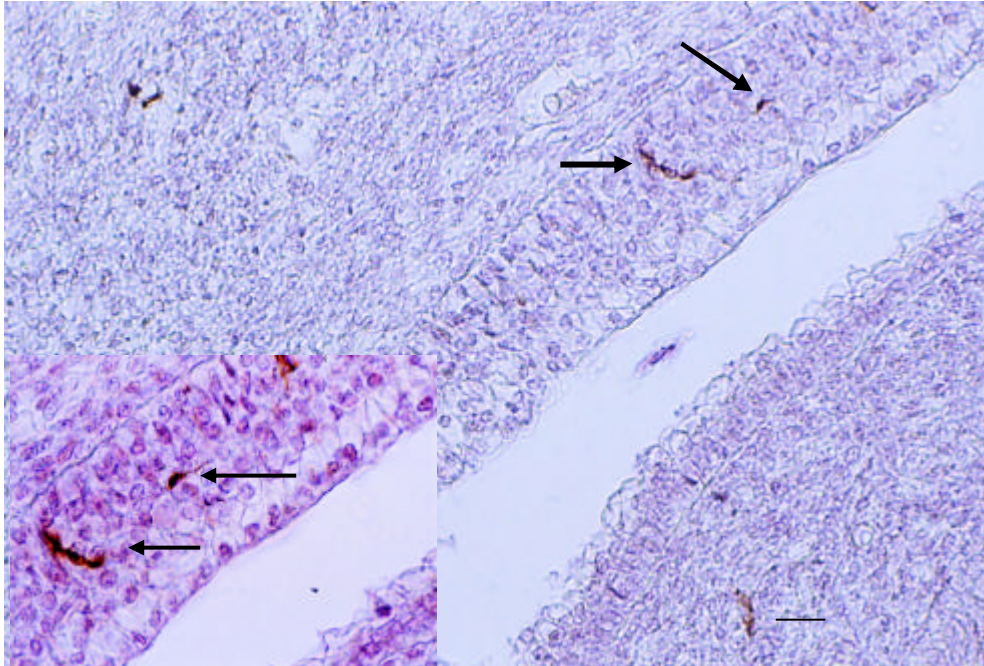


**Abb. 3.2:** Chromogranin A-immunreaktives Ganglion lateral des Sinus urogenitalis. Homo 65 mm SSL, x 250



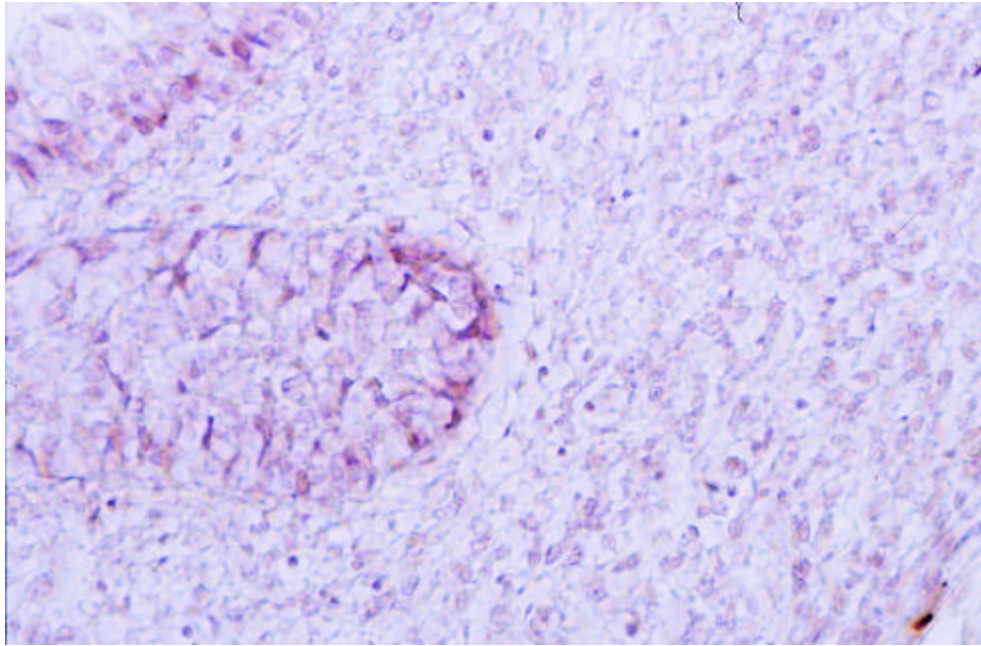
**Abb. 3.3:** Rektum (R) mit einigen immunreaktiven Epithelzellen (Pfeile). Diese dienen quasi als interne Positivkontrolle bei der Immunhistochemie. Im Epithel des Sinus urogenitalis sind zu diesem Entwicklungszeitpunkt noch keine Chromogranin A-immunreaktiven Zellen nachzuweisen. Homo 58 mm SSL,  $\alpha$ -Chromogranin A, x 63.

Bei einem Embryo mit einer SSL von ca. 60 mm, entsprechend einem Gestationsalter etwa Ende der 10., Anfang der 11. Schwangerschaftswoche, konnten zahlreiche Chromogranin A-positive Zellen innerhalb des urethralen Epithels nachgewiesen werden. Zusätzlich fanden sich immer auch einige Zellen in dem umgebenden Mesenchym.

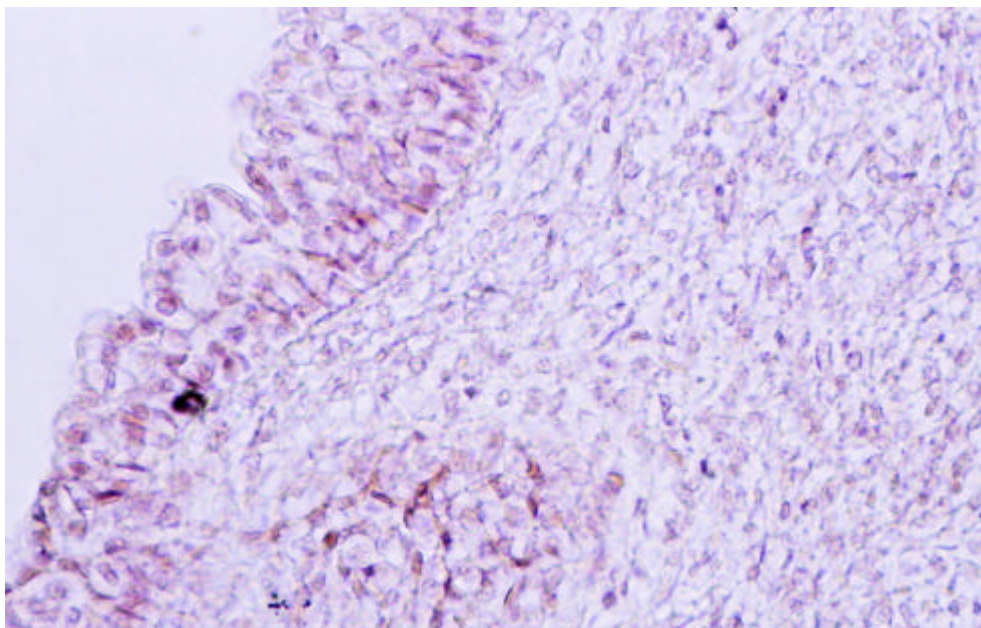


**Abb. 3.4:** Immunreaktive Zellen (große Pfeile) im Epithel des Sinus urogenitalis. Im Bild unten rechts immunreaktive Zelle (kleiner Pfeil) im Mesenchym. Homo 65 mm.  $\alpha$ -Chromogranin A, x 160. Im Bild unten links Ausschnittvergrößerung des gleichen Präparates, x 250.

Ab ca. 65 mm SSL, entsprechend etwa der 12. SSW, zeigten sich solide epitheliale Knospen, welche den urethralen neuroendokrinen Zellen eng benachbart sind. Sie sprießen in das pericolliculäre und das periurethrale Mesenchym aus. Nachfolgend (12. und 13. Schwangerschaftswoche) fanden sich in der pericolliculären und intermediären Region der zukünftigen Drüse dünne und sich aufzweigende Knospen, z. T. solide, z. T. mit leeren Lumina. Auch diese enthielten zahlreiche Chromogranin A-positive Zellen. Ihre Zahl war aber, verglichen mit der im urethralen Epithel, vergleichsweise gering.



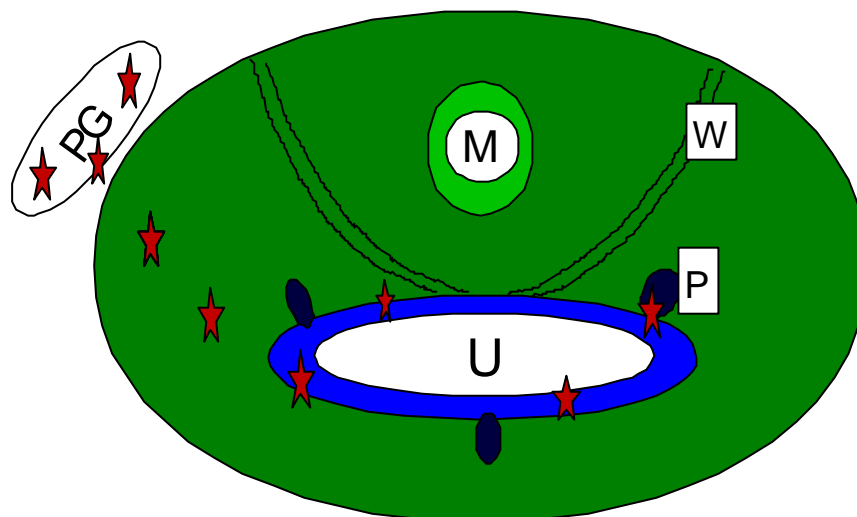
**Abb. 3.5:** Aussproßende Epithelknospe (K), noch ohne Lumen, mit einigen immunreaktiven Zellen. Im Bild links angeschnitten, Epithel der Harnröhre mit zahlreichen immunreaktiven Zellen. Homo 65 mm SSL,  $\alpha$ -Chromogranin A, x 250.



**Abb. 3.6:** Weiteres Beispiel für eine aussproßende Epithelknospe, noch ohne Lumen mit einigen immunreaktiven Zellen sowohl in der Knospe als auch im Epithel der Harnröhre. Homo, 65 mm SSL,  $\alpha$ -Chromogranin A, x 250.

Zusammenfassend läßt sich Entwicklung der Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der frühen embryonalen Phase wie folgt beschreiben: Die neuroendokrinen Zellen sind neurogenen Ursprungs und wandern über Paraganglien, welche zwischen dem Neuralrohr entstammenden sympathischen Ganglien und dem Sinus urogenitalis gelegen sind, in den Sinus urogenitalis ein. Etwa um die 10. SSW herum, wenn die Entwicklung der Prostata gerade beginnt, haben neuroendokrine Zellen das Epithel des Sinus urogenitalis erreicht. Über das in das umgebende Mesenchym ausknospende Epithel des Sinus urogenitalis gelangen die neuroendokrinen Zellen in die sich entwickelnde Prostata.

Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der Prostata



**Schema 3.1:** Zusammenfassung der Entwicklung der Verteilung der neuroendokrinen Zellen (rote Sternchen) in periprostatishen Paraganglien (PG), im Mesenchym des Sinus urogenitalis (SUG) (dunkelgrün), im Epithel des SUG (blau) und in den Drüsenknospen der Prostata (P, dunkelblau) etwa um die 9. – 11. Schwangerschaftswoche. Im Müllerschen Gang (M, hellgrün) und den Wolffschen Gängen (W, dünne schwarze Linien) finden sich keine Chromogranin A-immunreaktiven Zellen.

Im Laufe der weiteren foetalen Entwicklung kommt es mit dem Aussproßen weiterer Drüsenknospen aus der Urethra in die sich entwickelnde Prostata zu einem relativen

Rückgang der Anzahl der neuroendokrinen Zellen in der Urethra. Mit zunehmender Verzweigung der Drüsenanlagen werden die neuroendokrinen Zellen weiter in das Innere und die Peripherie der entstehenden Drüse transportiert. Häufig enthalten die ganz peripheren Anteile bzw. die Spitzen der Drüsenknospen keine neuroendokrinen Zellen, z.T. enthalten ganze Aufzweigungen keine neuroendokrinen Zellen. Im Gegensatz dazu enthalten wiederum andere Drüsenäste, insbesondere die, welche im mittleren Anteil der späteren Drüse gelegen sind, zahlreiche neuroendokrine Zellen. Diese waren nicht selten auch in Gruppen angeordnet. Dabei erscheint die Verteilung der neuroendokrinen Zellen auf die einzelnen Drüsenäste eher zufällig und eher von der Clustergröße an jener Stelle abzuhängen, wo sich der Drüsenbaum später aufzweigt. In einigen Fällen fanden sich Chromogranin A-immunreaktive, Haufen bildende Zellen auch im peripheren Stroma der foetalen Drüsen und in dem von Neugeborenen. Häufig stehen sie in engem Kontakt zu soliden Epithelknospen oder Blutgefäßen.

Betrachtet man die absolute Zahl und die räumliche Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der Prostata in verschiedenen Entwicklungsstufen (siehe Tab. 3.2), finden sich in den „jüngsten“ Drüsen die meisten neuroendokrinen Zellen in den urethralen Abschnitten. Zur Peripherie hin nimmt ihre Zahl schrittweise ab. Dieses Verteilungsmuster spiegelt offensichtlich einen Migrationsgradienten wieder, welcher von der Urethra in Richtung periphere Zone gerichtet ist.

In der morphometrischen Analyse der kindlichen, präpubertären, postpubertären sowie erwachsenen bzw. reifen Drüse konnte festgestellt werden, inwieweit dieses Verteilungsmuster zusätzlich durch die relative Größe des Epithels innerhalb der Drüse beeinflusst wird.

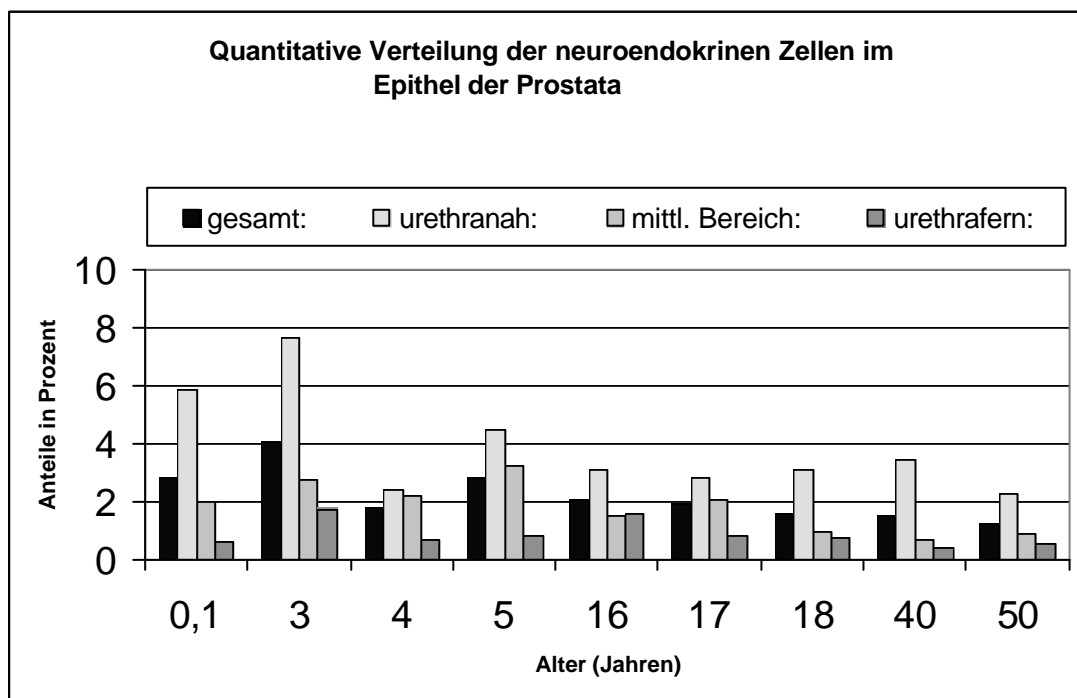
Wie in der nachfolgenden Tabelle und der dazugehörigen Grafik zu erkennen ist, nimmt die Zahl der neuroendokrinen Zellen zwar im Altersgang gering ab, bleibt aber im wesentlichen konstant. So kann man quasi von einem Verdünnungseffekt der neuroendokrinen Zellen durch einen steigenden Anteil von sekretorischen Zellen und Basalzellen sprechen. Auf absolute Zahlenwerte zurückgeführt ist nur die kleine Fraktion von etwa 1 bis 2% des Drüsenepithels neuroendokrin differenziert. Es bestehen jedoch große regionale Unterschiede. In den jüngsten Drüsen sind urethranah 4,5 bis 7,5% des Epithels neuroendokriner Natur, im reifen Organ sind es lediglich noch etwa 3%. Im mittleren Bereich ist ihr Anteil bereits deutlich geringer. In den jüngsten Drüsen beträgt er 2 bis fast 3%, um dann in der reifen Drüse bis auf deutlich

unter 1% abzunehmen. Im urethrafernen Kompartiment sind die Unterschiede bei weiterhin abnehmender und damit insgesamt nur geringer Anzahl nicht so gravierend. Aber auch hier läßt sich im Vergleich zwischen der postpubertären Drüse und dem reifen Organ eine Abnahme feststellen.

**Tabelle 3.2:** Verteilung der neuroendokrinen Zellen in den verschiedenen Drüsenzonen (Anteile in Prozent)

Präparat (Nr.):	82	47/86	235	267	316	40	125	138	201
Alter (Jahren):	36. SSW	3	4	5	16	17	18	40	50
Gesamt:	2,81	4,03	1,75	2,82	2,05	1,88	1,58	1,49	1,21
Urethranah:	5,83	7,65	2,36	4,48	3,1	2,8	3,04	3,4	2,26
Mittlerer Bereich:	1,99	2,72	2,19	3,18	1,47	2,06	0,96	0,7	0,84
Urethrafern:	0,61	1,72	0,7	0,8	1,59	0,8	0,73	0,38	0,55

**Diagramm 3.2:** Verteilung der neuroendokrinen Zellen im Epithel der verschiedenen Drüsenzonen (Anteile in Prozent)



### 3.3. Das Verteilungsmuster der Calcitonin-positiven neuroendokrinen Zellen

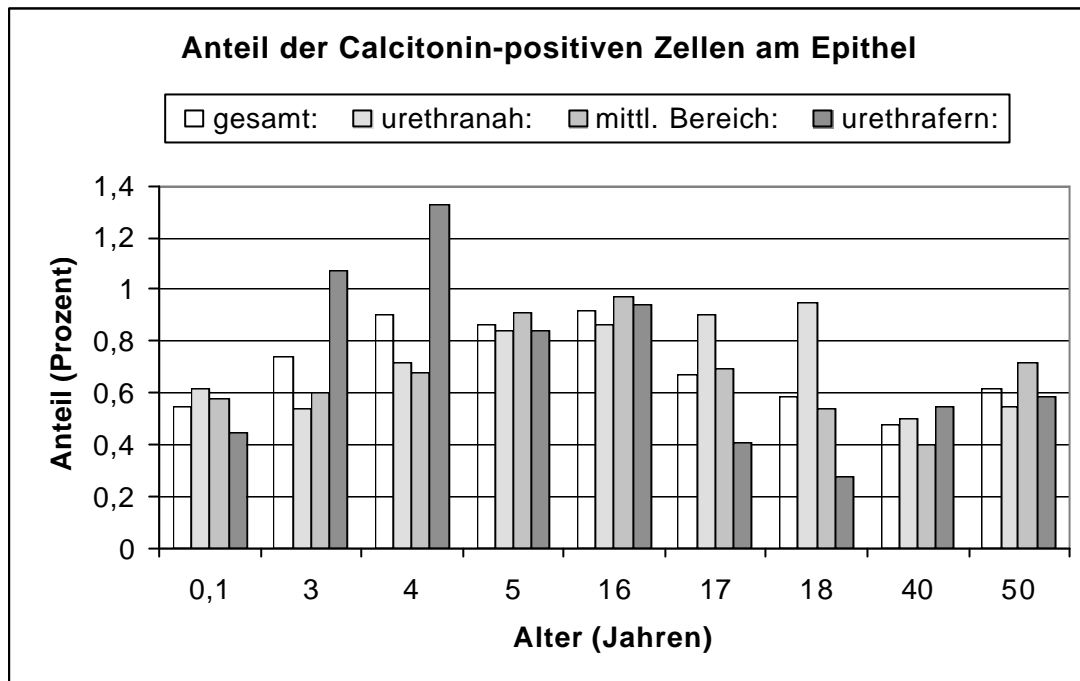
Neben Chromogranin-A positiven Zellen wurde auch das Verteilungsmuster Calcitonin-positiver Zellen untersucht. Insgesamt betrachtet ist ihr Anteil am Epithel nochmals niedriger als das der Chromogranin A-positiven Zellen und beträgt unter 1%. In dem Präparat aus der 36. SSW ist ihr Anteil in den drei verschiedenen Kompartimenten relativ gleich und liegt am untersuchten Präparat bei durchschnittlich 0,55%. Betrachtet man den Altersgang, so kommt es insgesamt gesehen bis zum Ausreifen der Drüse zunächst zu einem leichten Anstieg des relativen Anteils bis auf über 0,8%, um dann im weiteren Verlauf wieder auf Ausgangswerte abzufallen. Im urethranahen Kompartiment der gerade postpubertären Drüse finden sich erneut die meisten positiven Zellen, ihr Anteil beträgt fast 1% am Gesamtepithel. Auffälligerweise ist der zuvor für die Chromogranin A positiven Zellen beschriebene Gradient von zentral nach peripher für Calcitonin positive Zellen nicht so eindeutig nachweisbar. Beim Neugeborenen, sowie im Präparat des 5, 16, 40 und 50jährigen gibt es quasi keinen Gradienten, beim 17 und 18jährigen kommt es sogar zu einer Abnahme zur Peripherie hin, beim 4 und 5jährigen zu einer relativen Zunahme.

**Tabelle 3.3:** Verteilung der Calcitonin-positiven Zellen im Epithel der verschiedenen Drüsenzonen (Anteile in Prozent)

Präparat (Nr.)	82	47/86	235	267	316	40	125	138	201
Alter (Jahre):	36. SSW	3	4	5	16	17	18	40	50
Gesamt:	0,55	0,74	0,9	0,86	0,92	0,67	0,59	0,48	0,62
Urethranah:	0,62	0,54	0,72	0,84	0,86	0,9	0,95	0,5	0,55
Mittlerer Bereich:	0,58	0,6	0,68	0,91	0,97	0,7	0,54	0,4	0,72
Urethrafern:	0,45	1,07	1,33	0,84	0,94	0,41	0,28	0,55	0,59



**Diagramm 3.3:** Verteilung der Calcitonin-positiven Zellen im Epithel der verschiedenen Zonen (Angaben in Prozent)



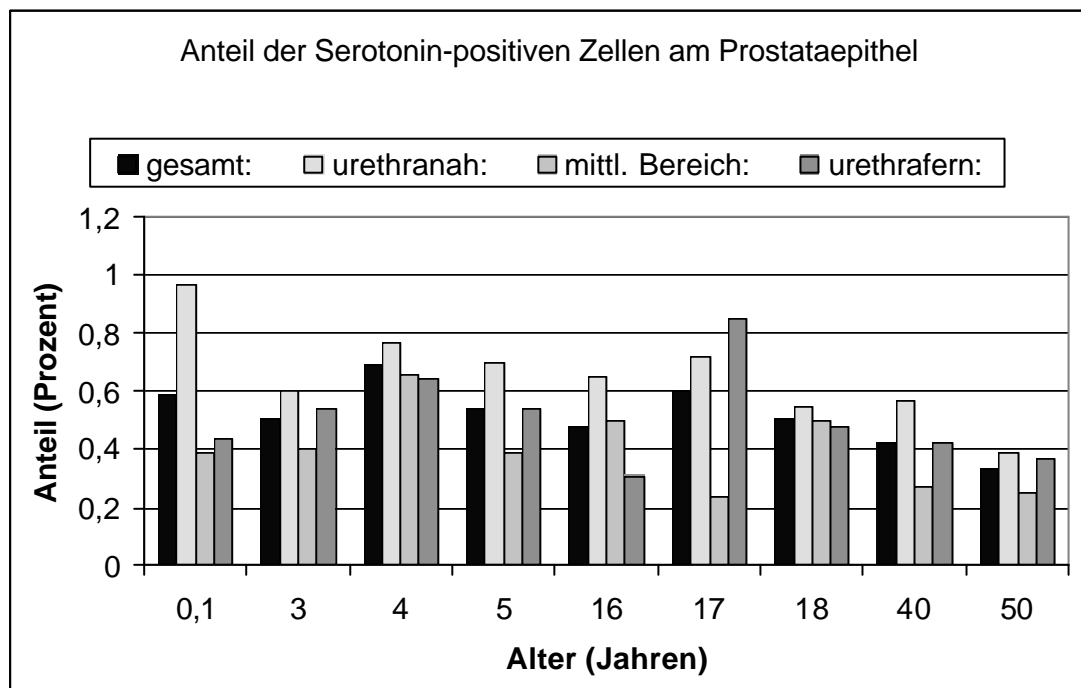
#### 3.4. Das Verteilungsmuster der Serotonin-positiven neuroendokrinen Zellen

Als dritte Fraktion wurde die regionale Verteilung und der Altersgang der Serotonin-positiven Zellen morphometrisch untersucht. Betrachtet man die Graphik, ähneln sich die beiden Kurven für Calcitonin und Serotonin. Der Gesamtanteil der Serotonin-positiven Zellen liegt insgesamt bei lediglich 0,3 – 0,7% mit einer Tendenz zu niedrigeren Gesamtanteilen in den älteren Drüsen. In diesen liegt der Anteil am Epithel zwischen 0,3 und 0,4%. Urethranah ist die Dichte zum Zeitpunkt der Geburt noch relativ hoch und liegt bei fast 1%. Betrachtet man dieses Kompartiment im weiteren Verlauf, ergibt sich zunächst insgesamt eine leichte Abnahme, um sich dann aber zwischen 0,5 und 0,7% zu bewegen. Im mittleren Bereich bewegt sich der Anteil lange bei 0,4 bis 0,5%, um in älteren Drüsen des 40- und 50jährigen unter 0,35% abzufallen. Im urethrafernen Kompartiment sind die Werte uneinheitlich. In den jungen Drüsen der „Ruhephase“ vor der Pubertät, steigt der Anteil zunächst geringfügig an, um dann in der reifen Drüse wieder abzufallen. Bei den einzelnen Messungen war aber gerade in diesem Kompartiment die Streubreite sehr hoch.

**Tabelle 3.4:** Verteilung der Serotonin-positiven Zellen im Epithel der verschiedenen Drüsenzonen (Anteile in Prozent):

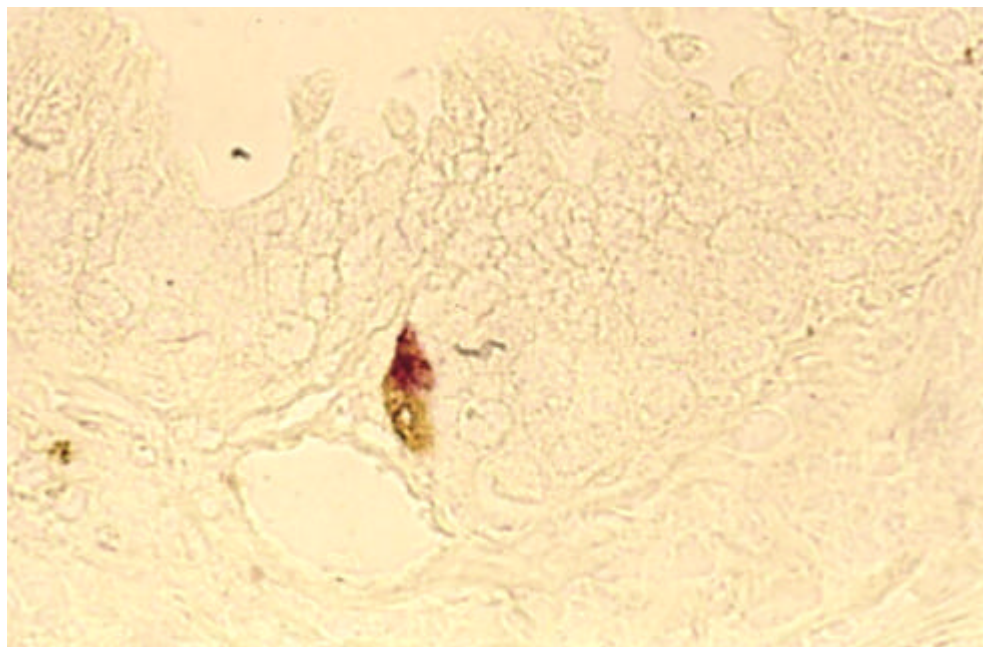
Präparat (Nr.)	82	47/86	267	235	316	40	125	138	201
Alter (Jahre)	36. SSW	3	5	4	16	17	18	40	50
gesamt:	0,59	0,51	0,54	0,69	0,48	0,6	0,51	0,42	0,33
Urethranah:	0,97	0,6	0,7	0,77	0,65	0,72	0,55	0,57	0,39
mittlerer Bereich:	0,39	0,4	0,39	0,66	0,5	0,24	0,5	0,27	0,25
Urethrafern:	0,44	0,54	0,54	0,64	0,31	0,85	0,48	0,42	0,37

**Diagramm 3.4:** Verteilung der Serotonin positiven Zellen im Epithel der verschiedenen Drüsenzonen (Angaben in Prozent)





**Abb. 3.7:** Neuroendokrine Zelle im Prostataepithel. Eine Doppelfärbung mit  $\alpha$ -Chromogranin A und  $\alpha$ -Serotonin zeigt die Kolokalisation in einer Zelle, x 250.

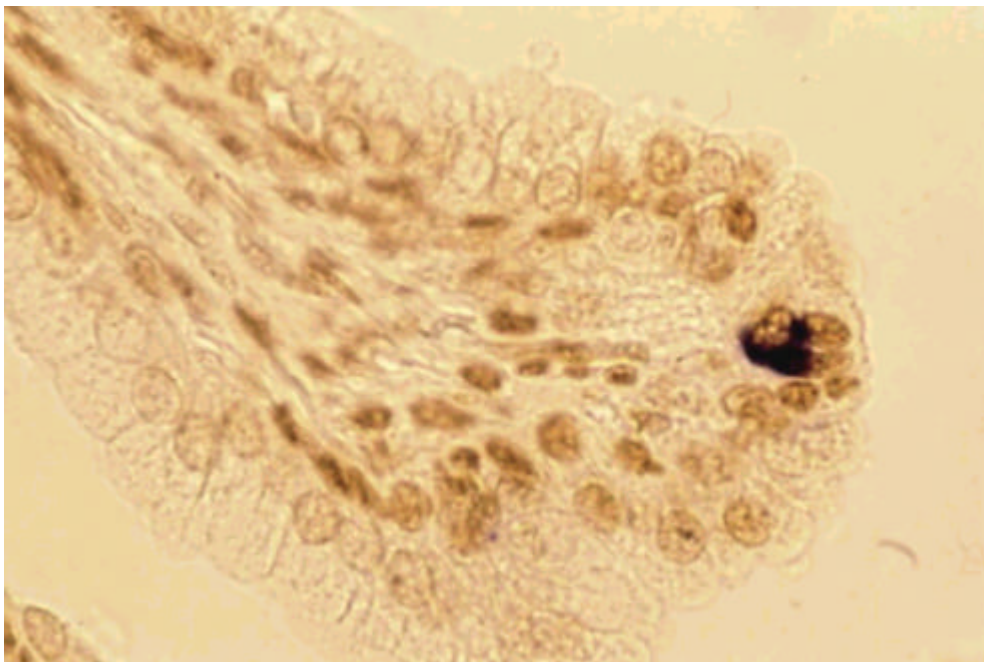


**Abb. 3.8:** Weiteres Beispiel für eine Kolokalisation von Chromogranin A (braun) und Serotonin (rot) in einer Zelle. (x 250)

### 3.5. Befunde zum Rezeptorstatus der neuroendokrinen Zellen

Bezüglich des Androgenrezeptornachweises kamen in einer Versuchsreihe verschiedene Antikörper zum Einsatz. Erst durch den kommerziell zu erwerbenden Antikörper F39.4.1 der Fa. Sanbio, Niederlande, stand jedoch ein Antikörper zur Verfügung, mit dem reproduzierbare und qualitativ gute Ergebnisse zu erzielen waren. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Prostatakarzinompräparat mitgeführt, welches typischerweise androgenrezeptorpositiven Epithel- und Stromazellen zeigte.

In entsprechenden Doppelmarkierungsuntersuchungen mit Nachweis von Chromogranin A und dem Androgenrezeptor konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Zellkerne Chromogranin A positiver Zellen nicht androgenrezeptorpositiv sind und diese Zellpopulation somit nicht einer direkten Kontrolle durch Androgene unterliegt. Doppelmarkierungsuntersuchungen wurden auch für den Östrogenrezeptor durchgeführt, als Positivkontrolle entsprechend das Präparat eines Mamma-Karzinoms mitgeführt, jedoch auch ein oben bereits erwähntes Prostatakarzinompräparat.



**Abb. 3.9:** Ausschnitt aus dem Epithel eines Prostatakarzinompräparats. Kollokalisierung von Östrogenrezeptor (braun, Zellkern) und Chromogranin A (blau, Cytoplasma) in einer Epithelzelle, x 400.

Zum einen ließen sich mit dem monoklonalen Antikörper der Fa. Dako im Gegensatz zu dem der Fa. Dianova, sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse darstellen, zum anderen ließ sich auch hier in den „gesunden“ Organen keine Kolokalisation von Chromogranin A und Östrogenrezeptor nachweisen. Interessanterweise fanden sich jedoch in dem Prostatakarzinompräparat einige Kolokalisationen.

## IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde semiquantitativ die Verteilung neuroendokriner Zellen in Prostatae verschiedener Altersstufen untersucht. Eine Markierung der Zellen erfolgte immunhistochemisch mit dem panneuroendokrinen Marker Chromogranin A. Hinzu kamen zwei weitere Peptide, Calcitonin und Serotonin, welche neben zahlreichen anderen Peptiden typischerweise in neuroendokrinen Zellen nachzuweisen sind und über deren genaue Funktion bei physiologischen wie pathologischen Abläufen weiterhin Unklarheiten bestehen. Mit Hilfe der computerassistierten semiquantitativen Bildanalyse wurden die markierten neuroendokrinen Zellen in Relation zu anderen Kompartimenten des Prostatagewebes gebracht, und ihre regionale Verteilung aufgeschlüsselt, indem die Prostata systematisch in verschiedene Zonen aufgeteilt wurde, wobei die Harnröhre bzw. die Kapsel als typische Orientierungspunkte dienten. Mit dem Einsatz von Antikörpern gegen den Androgen- und Östrogenrezeptor, wurde die Steroidhormonabhängigkeit der neuroendokrinen Zellen untersucht.

### 4.1. Chromogranin A als Marker neuroendokriner Zellen

Wurden noch bis in die 70er Jahre insbesondere Versilberungsmethoden eingesetzt, um sich die argentaaffinen bzw. agyrophilen Eigenschaften neuroendokriner Zellen zu nutze zu machen, wie beispielsweise die Versilberung nach Grimelius (1968), die agyrophile Reaktion nach Churukian-Schenk (1979) und die argentaaffine Reaktion nach Fontana-Masson (1926), so haben sich heute durch die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper immunhistochemische Methoden durchgesetzt. Konnten Azzopardi und Evans (1971) in lediglich 10 % von untersuchten Prostatakarzinomen argentaaffine Zellen nachweisen, wenig später Kazzaz (1974) insgesamt 16 % sowohl agyrophile als auch argentaaffine Zellen, so wiesen di Sant´Agnese und de Mesy Jensen (1987) in 47 % ihrer untersuchten Präparate, sowohl Versilberungs- als immunhistochemische Methoden einsetzend, eine neuroendokrine Differenzierung nach. Abrahamsson et al. (1986, 1987) schließlich konnten, durch den Einsatz mehrerer neuroendokriner Marker in sämtlichen untersuchten Präparaten eine neuroendokrine Differenzierung nachweisen. Neben der Sensitivität der neuen Antikörper wurde dieser Befund jedoch auch auf den Einsatz der Bouinsche Fixierung zurückgeführt.

Nach Angaben von di Sant´Agnese besteht das Epithel der Prostata nur zu etwa 0,1 % aus neuroendokrinen Zellen (1992). Nichts desto trotz gibt es eine ganze Reihe von Berichten, denen zufolge die Anzahl der neuroendokrinen Zellen in der Prostata deutlich variiert, wenn man unterschiedliche Marker, wie z.B. Chromogranin A (Cg A), Serotonin, Calcitonin, Neuronen-spezifische Enolase (NSE), Monoamin-Transporter (Beobachtungen von Weihe und Aumüller, nicht veröffentlicht) und verschiedene Neuropeptide einsetzt.

So zum Beispiel konnten Verhofstad et al. (Beobachtungen, nicht publiziert, zitiert in Xue et al., 1998) in durchschnittlich 63,3% aller neuroendokrinen Zellen sowohl Chromogranin A als auch Serotonin nachweisen, wohingegen Serotonin und Chromogranin A allein nur in jeweils 27,1% bzw. 11,1% nachgewiesen werden konnten. Xue et al. (1998) vermuten daher, dass neuroendokrine Zellen kurzfristig ihre Sekretionsprodukte verändern können. Di Sant´Agnese zufolge eignen sich Chromogranin A und Serotonin am ehesten, um eine neuroendokrine Differenzierung nachzuweisen, einen leichten Vorteil, mehr Zellen zu detektieren, sieht er für Cg A (di Sant´Agnese, 1998). Auch Abrahamsson zufolge ist das vorherrschende Produkt neuroendokriner Zellen in der Prostata Chromogranin A (Abrahamsson, 1999). Di Sant´Agnese Beobachtungen folgend muß einschränkend jedoch gesagt werden, daß Cg A gelegentlich normales sekretorisches Epithel und den apikalen Anteil von Tumorzellen färbt, so daß man meinen könnte, exokrine sekretorische Granula würden gefärbt. Diese Areale sollten nicht irrtümlich für eine neuroendokrine Differenzierung gehalten werden (di Sant´Agnese, 1998). Eine weitere Frage, welche aufgeworfen wird, ist die, ob es den *einen* Marker gibt, welcher sämtliche neuroendokrinen Zellen in einem Gewebe detektieren kann oder ob man vielmehr ein ganzes Arsenal von Markern einsetzen muß, um ein Gewebe nach diesen Zellen zu durchforsten (Xue et al., 1998; Aumüller et al., 2001). Darüber hinaus wäre auch eine Art Ruhestadium vorstellbar (s.u.), in dem keiner der vorbeschriebenen Marker nachweisbar wäre (Aumüller et al., 2001). Nicht zuletzt werfen Xue et al. (1998) daher die Frage auf, ob es sinnvoll ist, lediglich die Gesamtpopulation einer Zellart und diese nur mit einem Marker, nämlich Cg A, zu detektieren, wenn dieser möglicherweise nicht in Wachstum und Differenzierung involviert ist, oder ob man nicht vielmehr das Vorkommen von Zellen mit biologisch aktiven Sekretionsprodukten suchen sollte. In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Chromogranin A daher auch die Verteilung von Serotonin und Calcitonin untersucht.

#### 4.2. Der Altersgang der neuroendokrinen Zellen in der Prostata

Bei den durchgeführten Untersuchungen ließen sich in sämtlichen Präparaten aller Altersstufen Chromogranin A markierte Zellen nachweisen. Auch Calcitonin- und Serotonin-positive Zellen waren immer zu finden. Ein erster Nachweis von neuroendokrinen, mit Chromogranin A markierten Zellen in der Urethra war bei einem Feten von ca. 60 mm SSL, entsprechend der etwa 10. – 11. Schwangerschaftswoche, möglich. Wenig später beginnt die Entwicklung der Prostata in direkter Nachbarschaft zu den neuroendokrinen Zellen der Urethra in Form aussprossender Epithelknospen (siehe auch Aumüller et al., 2001). Diese Befunde decken sich mit denen von Xue und Mitarbeitern (2000). Bei ihren Untersuchungen von Feten aus der 12. bis 36. Schwangerschaftswoche, präpubertären sowie jungen Erwachsenen konnten sie neuroendokrine Zellen erstmals in der 13. Schwangerschaftswoche nachweisen, ab der 21. SSW enthielten alle Prostatae neuroendokrine Zellen.

Gleichartige Befunde konnten auch Jen und Dixon (1995) bei ihren Untersuchungen zur Entwicklung der peptidergen Innervation der Prostata erheben, bei denen sie CGRP-positive Zellen (= Calcitonin-gene related peptide) im Epithel, welches die Urethra säumt bzw. die Azini auskleidet, bereits bei Feten in der 13. Schwangerschaftswoche erstmals nachwies. Sie differenzierten Zellen vom *offenen* oder *geschlossenen* Typ, welche z.T. lange dendritische Fortsätze aufwiesen. Die Frage, ob auch schon zu früheren Zeitpunkten ein positiver Nachweis zu führen wäre, bleibt von ihnen unbeantwortet, da entsprechende Präparate nicht untersucht wurden.

Bei der hier durchgeführten Untersuchung zeigte sich, daß in den Prostatae verschiedener Alterstufen die Anzahl der neuroendokrinen Zellen mit zunehmendem Alter zwar gering abnimmt, im Wesentlichen aber konstant bleibt, man quasi von einem Verdünnungseffekt der neuroendokrinen Zellen durch eine zunehmende Anzahl von sekretorischen Zellen und Basalzellen sprechen kann.

Auch von Battaglia et al. (1994) wurde die Verteilung von endokrinen Zellen der Prostata in Abhängigkeit vom Alter untersucht. Die Zellen wurden mit Cg A markiert, die Auswertung erfolgte mittels halbautomatischem Bildanalyseprogramm. Der ermittelte Wert wurde als Anzahl von positiven Zellen pro Millimeter Epithel angegeben. Dabei konnten sie mit 0,366 Zellen / mm die höchste Dichte in der Gruppe



der 25 –54jährigen nachweisen, sowohl bei den Älteren ( 0,261 Zellen / mm) als auch bei den Jüngeren (0,311 Zellen / mm) unterschied sich die Anzahl signifikant. Erklärt wurde dieser Befund mit dem häufigeren Vorkommen von nicht ausgereiften Drüseneinheiten in der jüngeren Gruppe einerseits und der Ausbildung neuer Azini in Zusammenhang mit der glandulären Hyperplasie mit zunehmendem Alter andererseits. Einschränkend muß zu dieser Arbeit allerdings bemerkt werden, daß nur Drüsen von Jugendlichen und Männern im Alter von 14 bis 74 Jahren untersucht wurden, die Präparate also von peri-, eher noch postpubertärer Natur waren. So kamen wesentliche Perioden in der Entwicklung der Drüse nicht zur Beurteilung. Auch wurden keine Aussagen zur Verteilung in verschiedenen Kompartimenten / Zonen der Prostata gemacht. Nicht zuletzt erscheint die Maßangabe in Form von positiven Zellen pro Millimeter Epithel unglücklich, da sie mit Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen nicht vergleichbar ist. Eine Angabe in Prozent als Anteil des Epithels erscheint sinnvoller und wurde hier entsprechend durchgeführt.

Bei Untersuchungen von Cohen et al. (1993) zur Population der neuroendokrinen Zellen in der menschlichen Prostata, in denen Präparate von Säuglingen bis hin zu 70Jährigen untersucht und als Marker neben Chromogranin A auch Calcitonin und Neuronen-spezifische Enolase eingesetzt wurden, wurden unter anderem zwei auffällige Befunde erhoben. Zum einen war in den untersuchten Drüsen präpubertärer Knaben ein positiver Nachweis neuroendokriner Zellen in den Azini nur den ersten Lebensmonaten zu führen, negativ zwischen dem 3. und 13. Lebensjahr, und dann erst wieder ab dem 14. Lebensjahr möglich, zum anderen konstatierte man, daß die Anzahl der neuroendokrinen Zellen in den periurethralen Drüsen und den Hauptgängen zeitlebens relativ konstant bleibt. Nach Ansicht der Autoren haben fluktuierende Androgenblutspiegel im Zeitraum um die Geburt, die Pubertät und im Alter wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Zahl dieser Zellen in diesen beiden Bereichen. Sie postulieren aber, daß neuroendokrine Zellen in den Azini nur zu Zeiten ansteigender Androgenblutspiegel präsent sind. Bei den Neugeborenen sei dies auf den Einfluß maternaler Progesterone und während der postpubertären Phase auf den Einfluß testikulärer Androgene zurückzuführen. Das Fehlen von neuroendokrinen Zellen in den Azini über einen gewissen Zeitraum konnte in der hier vorgestellten Untersuchung und auch von Xue et al. (2000) nicht bestätigt werden. Nichts desto trotz gab es auch Azini, die frei von Zellen diesen Typs waren, so daß die Verteilung mehr zufällig erscheint und eher davon abhängt, ob sich in dem Bereich einer Aufzwei-

gung von Drüsenästen / -knospen neuroendokrine Zellen befinden. Die Ergebnisse lassen sich jedoch nicht genau miteinander vergleichen, da in der vorliegenden Arbeit die Prostata unabhängig von den histologischen Strukturen aufgeteilt wurde und bei der computerassistierten Bildanalyse nicht zwischen Azinus und Ductus unterschieden wurde. Andererseits ist der von Cohen et al. vermutete direkte Einfluß von Androgenen auf die neuroendokrinen Zellen nicht möglich, da sie nachweislich keinen Androgenrezeptor exprimieren (s.u.). Darüber hinaus wurden bei den Untersuchungen von Cohen et al. (1993) die ermittelten Zellzahlen Chromogranin A- und NSE-markierter Zellen gemittelt, da zwischen beiden kein signifikanter Unterschied bestanden habe. Auch wenn NSE in zahlreichen neuroendokrinen Zellen nachweisbar ist, ist sie kein geeigneter Marker für die selektive Markierung dieser Zellen, da sie als Isoenzym des an der Glykolyse beteiligten Enzyms Enolase auch in Neuronen und ihren Fortsätzen sehr verbreitet ist, so daß auch zahlreiche Zellen außerhalb des Epithels markiert werden (Carlei und Polak, 1986; Schmechel, 1985). Genaue Angaben zu der Häufigkeit der neuroendokrinen Zellen in der Prostata fehlten bislang oder wurden nur in einem recht engen Zeitfenster, respektive nur regionbegrenzt oder an fremden Species untersucht. So fanden di Sant´Agnese et al. (1987) bei ihren Untersuchungen zur Anzahl von Serotonin-immunreaktiven Zellen und des Gewebegehaltes von Serotonin von Meerschweinchenprostatatae einen hochsignifikanten Anstieg beider Parameter mit zunehmendem Alter bis um den Faktor 14 bis 16. Während die Zahl der positiven Zellen im Bereich der Harnröhre und der Drüsengänge relativ gleich blieb, stieg ihre Zahl in der Peripherie deutlich an. In der hier vorgestellten Untersuchung, welche ausschließlich an menschlichen Prostatatae durchgeführt wurde und einen Zeitraum ab etwa der 10. Schwangerschaftswoche bis zum etwa 50. Lebensjahr beinhaltet, konnten keine vergleichbaren Befunde erhoben werden. Vielmehr fand sich mit zunehmendem Alter nach der Pubertät in allen jeweils untersuchten Zonen ein Rückgang der Serotonin-positiven Zellen (s.u.).

#### 4.3. Die topographische Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der Prostata

Bei seinen Untersuchungen zur Charakterisierung der neuroendokrinen Zellen der Prostata untersuchten di Sant´Agnese et al. (1985) unter anderem die Verteilung von

immunohistochemisch markierten Serotonin-positiven Zellen. Die untersuchten Präparate stammten sowohl von radikal prostatektomierten Patienten als auch aus Sektionen. Es fanden sich Serotonin-positive Zellen in sämtlichen Schnittpräparaten und in sämtlichen Drüsenregionen außer den Samenblasen und den Ductus ejaculatorii. Die größte Anzahl von Zellen fand sich in den periurethralen Gängen des Samenhügels, eine beträchtliche, insgesamt aber doch geringere Anzahl, in der prostatistischen Urethra und den kleineren Drüsengängen, eine nur geringe Anzahl in der Drüsenperipherie. Selten fand er eine größere Anzahl in den Azinusgebieten. Dabei war das Verteilungsmuster unregelmäßig. Es gab Areale mit fokalen Häufungen der Zellen und daneben Areale, in denen kaum positive Zellen nachweisbar waren. Gelegentlich lagen die Zellen clusterartig nebeneinander. Eine gesonderte Aufschlüsselung der Untersuchungsergebnisse erfolgte nicht.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Cohen et al. (1993). Bei ihren Untersuchungen von reifen Drüsen fanden sie eine Häufung der mit Chromogranin A markierten Zellen in periurethralen sowie ductalen Zonen und deutlich weniger Zellen in den Acini. Ein ähnliches Verteilungsmuster zeigten Calcitonin-markierte Zellen, der Unterschied zwischen der periurethralen Zone und dem Bereich der Ductus war jedoch nicht signifikant. In beiden Zonen kamen positive Zellen in einer großen Anzahl vor, zur Organperipherie hin war jedoch eine deutliche Abnahme zu verzeichnen.

In der hier vorgestellten Untersuchung wurde die transversal geschnittene Prostata in drei Bereiche eingeteilt, nämlich einen periurethralen / paracollikulären, einen mittleren, sowie einen subkapsulären Bereich, in einem Verhältnis von 1:3:1. Wegen der geringen Größe der fötalen Drüsen war bei diesen eine solche Einteilung nicht sinnvoll, sie konnten daher nicht der computerunterstützten Bildanalyse zugeführt werden und wurden rein deskriptiv beurteilt. Insgesamt fand sich bei den mit Chromogranin A markierten Zellen während der Fetalperiode und dem frühen postnatalen Entwicklungszeitraum ein Dichtegradient mit einer sehr hohen Zelldichte im urethralen Bereich, eine abnehmende Zellzahl im kollikulären Bereich und den mittleren Anteilen der Prostatagänge und eine mehr irreguläre Verteilung bei geringer Zelldichte in der peripheren subkapsulären Zone der Drüse. Gleichartige Verteilungsmuster fanden sich auch in den Drüsen von Pubertierenden und Erwachsenen (siehe auch Aumüller, 1979). Hier war allerdings die Gesamtzahl der neuroendokrinen Zellen relativ vermindert, was auf den gleichzeitigen Anstieg von Basal- und sekretorischen Zellen zurückzuführen ist, welche von einer urogenitalen Epithelzelllinie abstammen. Die

Zahl der neuroendokrinen Zellen wird quasi verdünnt, insgesamt bilden sie aber einen relativ stabilen Pool in der reifen Prostata. Ein gänzlich Verschwinden dieser Zellen in der peripheren Zone in einem Zeitraum kurz nach der Geburt bis zur Pubertät, wie von Cohen (1993) beschrieben (s.o.), konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Kürzlich wurde von Xue et al. (2000) die topographische Verteilung sowie die Dichte der neuroendokrinen Zellen in der sich entwickelnden Prostata untersucht. Grundsätzlich kamen sie zu den gleichen Ergebnissen. Sie fanden, daß sich in der normalen Prostata die neuroendokrinen Zellen im Wesentlichen auf die Azinus- und Gangregion beschränken, während in den meisten Drüsenknospen keine neuroendokrinen Zellen nachzuweisen waren. Ihrer Ansicht nach bleibt in den Azini / Gängen selbst die Dichte der neuroendokrinen Zellen bei Feten bis zu jungen Erwachsenen hin wahrscheinlich konstant. Allerdings sind die Ergebnisse nicht genau zu übertragen, da Xue et al. die Prostatapräparate nicht, wie hier geschehen, symmetrisch aufgeteilt, sondern differenziert haben, ob es sich bei dem untersuchten Areal um einen Drüsengang / Azinus oder z.B. die Spitze einer Drüsenknospe handelt. Sie begründen ihr Vorgehen damit, daß in den verschiedenen Zonen die Drüsenarchitektur unterschiedlich ist, daß z.B. in der Drüsenperipherie sowohl solide Drüsenspitzen als auch gangähnliche Strukturen vorkommen. Gleiches gelte für die mehr zentralen Bereiche, in denen ebenfalls solide epitheliale Strukturen vorzufinden seien, welche unzweifelhaft Knospenspitzen von Aufzweigungen wären. In ihren eigenen, bislang nicht veröffentlichten Daten (siehe Xue et al., 2000) plädieren sie dafür, die anatomische Einteilung der Drüse, welche sich auf die Urethra oder die Kapsel bezieht, zu verlassen und eine Unterteilung in verschiedene Segmente, welche entweder Knospenspitzen, Azini oder Sammelgänge enthält, vorzunehmen. Ihren Untersuchungen zufolge seien diese verschiedenen Segmente nicht nur histologisch sondern auch immunhistochemisch aufgrund unterschiedlicher Keratinexpression sowie mittels Tenascin-C (ein Marker für epithelio-stromale Interaktionen) zu identifizieren und würden zusätzlich typische Unterschiede in ihrer Proliferationsaktivität zeigen.

Untersuchungen mit Calcitonin als Marker neuroendokriner Zellen in der Prostata wurden erstmals von di Sant'Agnese (1986) durchgeführt. Die Präparate wurden sämtlich bei radikalen Zystoprostektomien gewonnen. Seinen Befunden zufolge ist in weniger als 5 % der neuroendokrinen Zellen Calcitonin nachweisbar, was im Gegensatz zu den hier erhobenen Befunden steht, in denen die Calcitonin-positiven Zellen

len insgesamt einen nur geringen Prozentsatz der Epithelzellen ausmachen, z.T. liegt ihr Anteil an den neuroendokrinen Zellen bei deutlich über 30 %. Ursächlich mag ein Antikörper mit größerer Sensitivität sein. Leider werden über die Altersstruktur keine Angaben gemacht, erwartungsgemäß dürften die Präparate jedoch von älteren Männern stammen. Im Gegensatz dazu stimmen die Befunde darin überein, daß es kein klares regionäres Verteilungsmuster der Calcitonin-positiven Zellen gibt, da auch in den gleichen Altersstufen die Zellzahlen nicht sehr einheitlich sind. Nicht zuletzt sind diese Schwankungen auch auf die geringe Größe dieser Zellpopulation zurückzuführen.

Auch von Abrahamsson et al. (1986) wurde die Verteilung von Peptid-Hormon und Serotonin-immunreaktiven Zellen in normalen (Präparate von jungen Erwachsenen) und in hyperplastischen Prostatae (Präparate von transurethralen Resektionen und Adenomenukleationen, durchgeführt wegen einer infravesikalen Obstruktion) untersucht. Zum Einsatz kamen sowohl Versilberungsmethoden als auch Antikörper gegen Calcitonin, Serotonin, TSH (Thyroidea stimulierendes Hormon) und Somatostatin. Insgesamt waren die Calcitonin-positiven Zellen deutlich seltener als die vorherrschenden Serotonin-haltigen, üblicherweise vom „geschlossenen Typ“ und lediglich im Zylinderepithel der Azini und Gänge, dahingegen nicht im Urothel der prostatistischen Harnröhre nachzuweisen. In den Präparaten mit nodulärer benigner Hyperplasie stieg die Anzahl der endokrinen Zellen insgesamt gleichmäßig an, wobei es schwierig war, für die Calcitonin-positiven Zellen wirkliche Unterschiede abzuleiten, da sie insgesamt sehr selten waren.

Überraschenderweise konnten Abrahamsson et al. in der prostatistischen Harnröhre keine Calcitonin-positiven Zellen nachweisen, was in der hier vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden konnte. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Fetissof et al. (1986), welche eine Calcitonin-Immunreaktivität sowohl in den Prostatae als auch in der prostatistischen Harnröhre und der Blasenschleimhaut nachweisen konnte. Aufgrund ihrer zusätzlichen Befunde bei gleichzeitigen Markierungen der endokrinen Zellen durch Versilberungsmethoden, vermuten sie, daß die meisten Serotonin-haltigen Zellen auch Calcitonin enthalten.

Erst kürzlich wurde von Abrahamsson et al. (2000) das Vorkommen von Calcitonin in der menschlichen Prostata immunhistochemisch und mittels Radioimmunoassay erneut untersucht. Die Präparate wurden bei radikalen Prostatektomien gewonnen und in Zonen von normalem Gewebe, benigner Hyperplasie und Karzinom aufge-

teilt. Dabei konnte in sämtlichen Präparaten Calcitonin nachgewiesen werden. Bei der benignen Prostatahyperplasie fand sich ein signifikant niedrigerer Spiegel für Calcitonin als in normalem Gewebe, gleichzeitig ließen sich auch weniger Calcitonin-positive Zellen nachweisen, grundsätzlich gleiches -jedoch statistisch nicht signifikant- fand sich in den Karzinomen. In Zusammenschau mit Befunden aus früheren Untersuchungen bezüglich der benignen Prostatahyperplasie, bei denen man in großen, reifen BPH-Knoten nur noch eine geringe Anzahl neuroendokriner Zellen nachweisen konnte (Cockett et al., 1993) schloß man, daß nur in unreifen, noch wachsenden Arealen zahlreiche neuroendokrine Zellen enthalten sind (Abrahamsson et al., 2000). Dieses würde sich mit Befunden von Bonkhoff et al. (1991) decken, welcher in direkter Nachbarschaft zu neuroendokrinen Zellen im Epithel KI-67, einen Proliferationsmarker, nachweisen konnte, zumal auch Calcitonin zugeschrieben wird, Tumorzellwachstum zu stimulieren (Ritchie et al., 1997; Shah et al., 1994).

#### 4.4. Die neuroendokrinen Zellen als Androgen-unabhängige Zellen

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen in Form der Doppelmarkierungen war in normalen, nicht pathologisch alterierten Prostatae niemals eine Kolokalisation von Chromogranin A und Androgen- oder Östrogen-Rezeptor nachzuweisen. Es fanden sich jedoch lediglich in einem Präparat der Kontrollgruppe ganz sporadisch Zellen, welche eine Kolokalisation von Chromogranin A und Östrogenrezeptor aufwiesen. Dieses Präparat wurde bei einer Zystoprostatektomie gewonnen, neben dem Blasenkarzinom hatte der Patient auch ein Prostatakarzinom entwickelt. Ein gleichartiger Befund für den Androgenrezeptor ließ sich in den untersuchten Präparaten in keinem Fall nachweisen.

Diese Befunde decken sich nicht mit den Ergebnissen von Nakada et al. (1993), welcher bei seinen Untersuchungen zum Androgenrezeptorstatus in adulten Drüsen eine Kolokalisation von Androgenrezeptor und Cg A nachweisen konnte und das sogar in bis zu 95% der neuroendokrinen Zellen. Er beschrieb das klassische Erscheinungsbild der neuroendokrinen Zelle in den basalen Gangabschnitten der Prostata als eine Zelle mit dendritischen Fortsätzen und positivem Nachweis für den Androgenrezeptor im Zellkern. Die untersuchten Präparate wurden im Rahmen von radikalen Prostatektomien und transvesikalen Adenomektomien gewonnen. Gerade bei der Entstehung dieser beiden Erkrankungen schreibt man den neuroendokrinen Zellen einen nicht unerheblichen Einfluß zu. So konnten beispielsweise Iwamura et al.

(1998) bei Dünnschnittuntersuchungen von bei radikalen Prostatektomien gewonnenen Präparaten eine Kolo-kalisation von Chromogranin A und dem EGF- (Epidermal growth factor) Rezeptor in einigen Zellen nachweisen. Der epidermale Wachstumsfaktor wirkt stark mitogen, eine wichtige Beteiligung bzgl. Wachstum und Differenzierung in den verschiedensten Geweben und Zelllinien konnte bereits nachgewiesen werden. Zusätzlich vermutet man, daß der EGF möglicherweise einige sekretorische Zellen reguliert, wie es z.B. für HCG (humanes Choriongonadotropin) gezeigt werden konnte. Seine Produktion wird stimuliert, die Sekretion aber inhibiert (Iwamura et al., 1998).

Zurückkommend auf die oben aufgeführten Befunde von Nakada et al. (1993) hat möglicherweise auch die spezielle Fixierung, welche bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Aceton erfolgte, sowie die weitere Behandlung mit Methylbenzoat und Xylen einen weiteren Einfluß in Form einer erheblichen Veränderung der Epitope und nachfolgend falsch positiven Befunden. Um bei den eigenen Untersuchungen Formalin-fixierter Präparate den Androgenrezeptor zu demaskieren, wurde, den Empfehlungen von Iwamura et al. (1994) folgend, eine entsprechende Mikrowellenbehandlung durchgeführt, welche sich in der Praxis bewährte. Insgesamt muß aber gerade für neuroendokrine Zellen in Prostatakarzinomen erwähnt werden, daß diese nicht einen typischen Vertreter dieser Zellspezies darstellen. Möglicherweise handelt es sich bei ihnen um Zellen, welche erst unter dem Einfluß von externen Faktoren und Mediatoren zu Zellen mit neuroendokrinen Eigenschaften differenzieren (s.u.).

Wie oben bereits erwähnt, fanden Cohen et al. (1993) bei ihren Untersuchungen zu den neuroendokrinen Zellen der Prostata, daß über einen gewissen Zeitraum, nämlich von kurz nach der Geburt bis zum 13. Lebensjahr, in den Azini keine neuroendokrinen Zellen nachweisbar sind. Als Ursache vermuteten sie einen direkten Einfluß von Androgenen auf deren Entwicklung, bzw. sie vermuteten zwei funktionelle Typen von neuroendokrinen Zellen, nämlich einen Androgen-abhängigen und einen Androgen-unabhängigen, wobei in der Drüsenperipherie entsprechend Androgen-abhängige neuroendokrinen Zellen nur zu Zeiten ansteigender Androgen-Blutspiegel nachweisbar sind. Auf diese Befunde fußen sie ein eigenes Stammzellkonzept für neuroendokrine Zellen der Prostata in denen die einen möglicherweise endodermalen Ursprungs, die anderen evtl. Abkömmlinge des Neuralrohrs sind. Demnach wäre die Beobachtung, daß die in den peripheren Azini gelegenen neuroendokrinen Zellen unter hormonellem Einfluß stehen, damit zu begründen, daß eine epitheliale (endo-

dermale) Stammzelle sich abweichend differenziert, und daß die periurethralen und in den Gängen gelegenen, offensichtlich nicht androgenabhängigen neuroendokrinen Zellen, Neuralrohrabkömmlinge sind (Cohen et al., 1993).

Diese Befunde decken sich auch nicht mit den Befunden von Bonkhoff et al. (1993) und Krijnen et al. (1993), welche bei ihren immunhistochemischen Untersuchungen, (auch in der Arbeitsgruppe um Bonkhoff wurde der gleiche Androgenrezeptor-Antikörper F39.4.1 (Fa. Sanbio) wie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt), ebenfalls keine Kolokalisation von Chromogranin A und Androgenrezeptor nachweisen konnten, die neuroendokrinen Zellen somit nicht androgensensitiv sind. Die eventuellen biologischen Funktionen, welche neuroendokrine Zellen möglicherweise über endokrine, parakrine oder lumenokrine Mechanismen ausüben, sind damit offensichtlich durch androgen-unabhängige Prozesse gesteuert.

#### 4.5. Der neurogene Ursprung der neuroendokrinen Zellen

Bislang noch nicht eindeutig geklärt ist die Herkunft der neuroendokrinen Zellen in der Prostata. Zu erklären sind immerhin die Phänomene, daß die neuroendokrinen Zellen a) bereits etwa 15 Jahre vor den Epithelzellen nicht nur erstmals erscheinen sondern auch ausreifen, b) die Anzahl der neuroendokrinen Zellen erheblich geringer ist als die der sekretorischen und Basalzellen, c) ihr Verteilungsmuster innerhalb der Prostata äußerst unregelmäßig ist mit einer hohen Anzahl in den zentralen paracolliculären und einer niedrigen Anzahl in den peripheren subkapsulären Bereichen der Prostata und d) ihre Anzahl im Laufe der Drüsenentwicklung / -reifung insgesamt sehr stabil ist, wohingegen die Anzahl der Basal- und sekretorischen Epithelzellen deutlich ansteigt. Diese Fragen können mit *einem* Modell beantwortet werden, wenn man die Verteilung der neuroendokrinen Zellen als eine Art Matrix innerhalb des Epithels des Sinus urogenitalis betrachtet, wie es von Aumüller (1999) vorgeschlagen wurde.

In einer früheren Untersuchung von Aumüller et al. (1999), bei dem embryonales und fetales humanes Gewebe untersucht wurde, ergaben sich eindeutige Hinweise darauf, daß die neuroendokrinen Zellen der Prostata neurogenen Ursprungs sind und aus den sympathischen Ganglien/dem Grenzstrang -einem Abkömmling des Neuralrohrs- über Paraganglien in den Sinus urogenitalis einwandern. In der vorliegenden



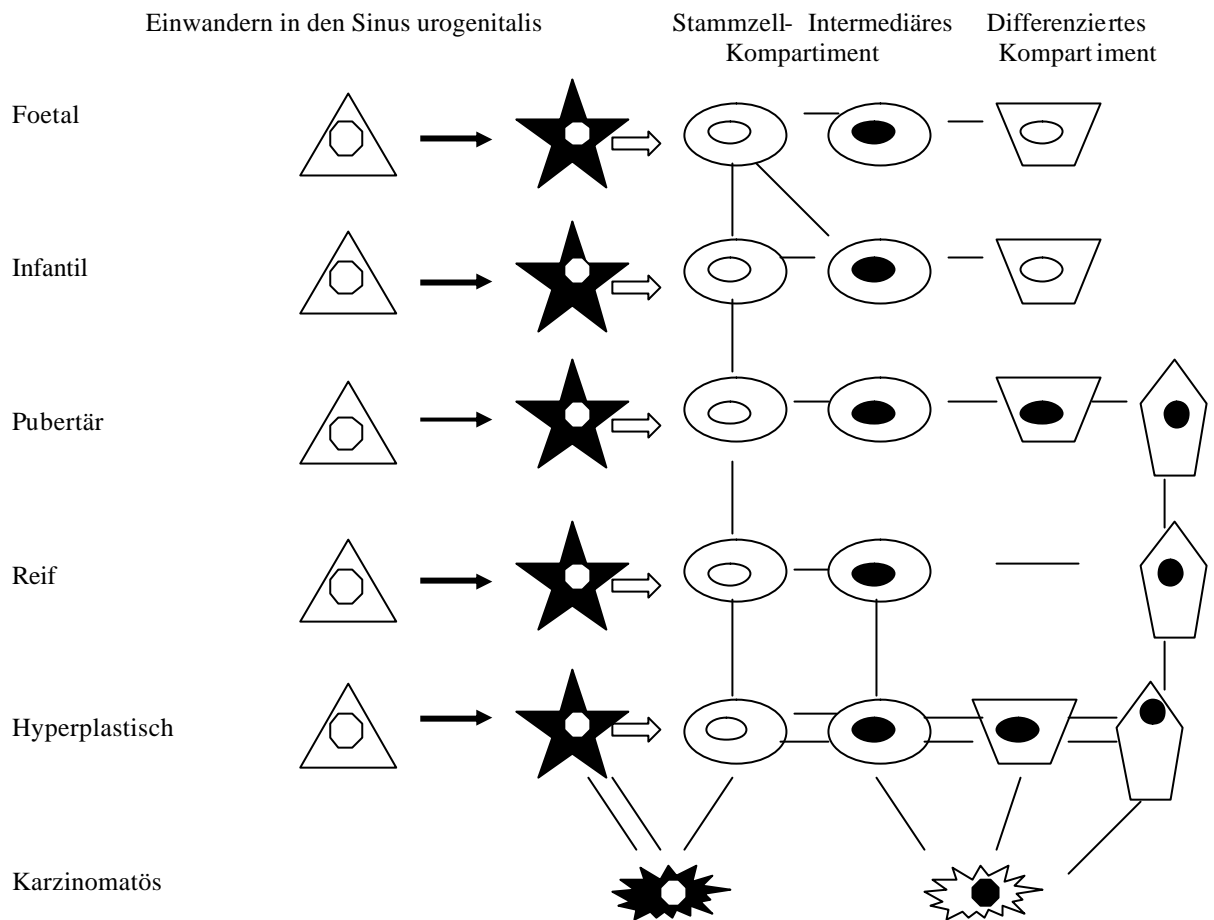
Untersuchung bei männlichen Feten mit einem Gestationsalter von ca. 10 Wochen sind in dem Epithel des Sinus urogenitalis noch keine neuroendokrinen Zellen nachzuweisen. Es finden sich jedoch zahlreiche Chromogranin A-immunreaktive Zellen in den Paraganglien jeweils lateral des urogenitalen Mesenchyms. Wenig später, etwa gegen Ende der 10. Schwangerschaftswoche, sind erstmals Chromogranin A-immunreaktive Zellen *im* urogenitalen Mesenchym nachweisbar. Ab etwa der 12. Woche finden sich positive Zellen erstmals auch *im* Epithel des Sinus urogenitalis. Diese Zellen gelangen über die aussprossenden Epithelknospen in die sich entwickelnde Drüse. Dabei dient das Epithel der Urethra als Reservelager. Als kleiner, noch fehlender Moakstein konnten bei diesen Untersuchungen keine Chromogranin A-positiven Zellen dokumentiert werden, welche die Basalmembran des Sinus urogenitalis gerade durchwandern. So konnte ein letzter eindeutiger Beweis nicht geführt werden. Andererseits konnten, als eine Art interne Positivkontrolle, regelmäßig Chromogranin A-immunreaktive Zellen im mit angeschnittenen Darmepithel demonstriert werden, und dies bereits in Präparaten aus der 10. Gestationswoche, wo niemals entsprechende Zellen innerhalb des Mesenchyms des *Sinus urogenitalis* nachzuweisen waren. Dies wäre ein weiteres Argument für die unterschiedliche Herkunft der neuroendokrinen Zellen aus Prostata und Gastrointestinaltrakt (s.u.). Für die These, daß die neuroendokrinen Zellen sich nicht aus gemeinsamen Stammzellen ableiten lassen, spricht weiterhin die Tatsache, daß ihre Anzahl über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg relativ konstant zu bleiben scheint und die scheinbare Abnahme ihrer Anzahl durch einen Verdünnungseffekt des im Vergleich deutlich zunehmenden Epithels zu erklären ist. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der, daß im Gegensatz zum Epithel der Prostata, welches erst mit der Pubertät vollständig ausreift und seine Funktion aufnimmt, die neuroendokrinen Zellen offensichtlich bereits zur Mitte der Schwangerschaft ausdifferenziert sind, also deutlich mehr als 10 Jahre früher. Auch dies spricht gegen eine gemeinsame Vorläuferzelle.

Aumüller faßt die Hypothese, daß die neuroendokrinen Zellen der Prostata ihren Ursprung in der Neuralleiste haben und die Epithelzellen aus dem Sinus urogenitalis stammen zusammen, und entwickelte daraus ein duales Stammzellkonzept (Aumüller et al., 1999, 2001, siehe Abb. 4.1). Die neuroendokrinen Zellen wandern über Paraganglien, welche zwischen den sympathischen, von der Neuralleiste stammenden Ganglien und dem Sinus urogenitalis gelegen sind, in den Sinus urogenitalis ein. Zum Zeitpunkt des Beginns der Prostataentwicklung, etwa um die 10. Schwanger-












**Abb. 4.1: Duales Stammzellkonzept der Prostata (nach Aumüller, 1999)**

Entwicklungsstadium

Neuroendokrine Zelllinie Urogenitale / prostatiche Zelllinie



Zeichenerklärung:

- |   |                          |   |                                  |   |   |             |
|---|--------------------------|---|----------------------------------|---|---|-------------|
|  | Ruhende NE-Zelle         |  | Prostatastammzelle               |  |  | Tumor-zelle |
|  | Reife NE-Zelle           |  | Basalzelle                       |   |   |             |
|  | Androgenrezeptor negativ |  | Adluminal Prostatazelle (unreif) |   |   |             |
|  | Androgenrezeptor positiv |  | Sekretorische Prostatazelle      |   |   |             |
|  | Induktion                |  | Differenzierung/Proliferation    |   |   |             |

schaftswoche herum, erreichen neuroendokrine Zellen erstmals das Epithel des Sinus urogenitalis. Mit dem Ausknospen des Epithels gelangen sie dann in die sich ausformende Drüse. Dabei dient das Epithel der Urethra als Reservelager für die neuroendokrinen Zellen. Diese sind zunächst undifferenziert und reifen im weiteren Verlauf heran oder stimulieren eine weitere ruhende neuroendokrine Zelle. Die reife neuro-

endokrine Zelle stimuliert die Proliferation Androgen-Rezeptor negativer Sinus urogenitalis-Stammzellen, welche sich wiederum zu neuen Stammzellen teilen oder sich präpubertär in Basalzellen, intermediäre oder adluminale unreife Zellen differenzieren. Von diesen exprimieren nur die letztgenannten den Androgen-Rezeptor. Mit dem Einsetzen der Pubertät werden die intermediären und adluminalen Zellen durch Androgen-Rezeptor-positive Basal- und sekretorische Zellen ersetzt, welche damit das Kompartiment der differenzierten Zellen bilden. Neue Basalzellen, welche sich zu sekretorischen Zellen differenzieren, entwickeln sich dabei aus Androgen-Rezeptor-negativen Stammzellen.

Dieses Konzept steht im Gegensatz zu bislang vorgestellten Stammzellkonzepten, wie sie z.B. von Xue et al. (1998) und insbesondere Bonkhoff (1991, 1996 und 1998) vertreten werden. Bonkhoff et al. gehen vielmehr von einer in situ-Entwicklung der endokrinen Zellen aus einer undifferenzierten Vorläuferzelle aus. In sehr komplexen Epithelien muß eine Population sich selbst regenerierender Zellen (= Stammzellen), welche in der Basalzellschicht gelegen ist, proliferieren und sich in Tochterzellen teilen. Diese wiederum migrieren zum Lumen oder zur Körperoberfläche hin, differenzieren sich weiter und gehen dann durch programmierten Zelltod zugrunde. Für Gewebe mit hohem Turnover, inklusive der mit Basalzellen ausgekleideten Krypten des Darmtrakts, den Basalzellen in der Epidermis und der Mamma und den Epithelzellen des Endometriums, sind Stammzellen nachweisbar (Xue et al., 1998). Sie haben typischerweise folgende Eigenschaften: 1. Sie sind relativ undifferenziert, 2. ihre Anzahl ist festgelegt und sie können diese aufrecht erhalten indem sie in Form einer asymmetrischen Zellteilung zumindest eine weitere Stammzelle bilden können, 3. sie haben ein unbegrenztes Proliferationspotential, 4. sie sind pluripotent und in der Lage, eine ganze Reihe von unterschiedlichen Zelltypen in dem entsprechendem Gewebe hervorzubringen, 5. sind sie zur Geweberegeneration fähig, und 6. können sie sich verändernden Umwelteigenschaften anpassen und auf äußere Faktoren reagieren. Die wichtigste dieser Eigenschaften dabei ist sicher die Pluripotenz, die Fähigkeit von Stammzellen, in die verschiedensten Zelltypen eines speziellen Gewebes zu differenzieren (Kinbara et al., 1996). Obwohl man für die neuroendokrinen Zellen des diffusen endokrinen oder APUD-Systems einen gemeinsame Ursprung vermutete, nämlich das Neuralrohr, so hat man über embryologische Studien Belege dafür finden können, daß die pulmonalen und gastroenteralen Abkömmlinge endodermalen Ursprungs sind (Sidhu et al., 1979; Andrew et al., 1982). Gleiches gilt für das Pankreas,

wo verschiedene Arbeitsgruppen zeigen konnten, daß weder die Insulin-, die Glukagon- noch die Somatostatin-produzierenden Zellen Neuralrohrabkömmlinge sind (s. Andrew et al., 1982). Daß allgemein auch für die in der Prostata vorhandenen Zelltypen gleiches gelten könnte, ließe sich auch damit begründen, daß Prostata und der Anorektalkanal den gleichen endodermalen Ursprung in der primitiven Kloake haben. Erwartungsgemäß würde man in beiden Organen bezüglich der endokrinen Zellen das gleiche Hormonprofil finden. Dies konnte jedoch von di Sant'Agnese (1986) nicht bestätigt werden.

Für die Hypothese, auch die neuroendokrinen Zellen der Prostata wären endodermalen Ursprungs, werden von verschiedensten Autoren eine Reihe von weiteren Erklärungen geliefert. Bei Untersuchungen zur neuroendokrinen Differenzierung bei der benignen Prostatahyperplasie und dem Adenokarzinom der Prostata konnten Aprikian et al. (1993) u.a. eine Koexpression von Chromogranin A und PSA nachweisen, was für eine gemeinsame endodermale Herkunft spricht, da PSA typischerweise in den sekretorischen Epithelzellen zu finden ist. Eine Koexpression des high-molecular weight cytokeratins mit Chromogranin A ließ sich dagegen nicht nachweisen, was darauf schließen läßt, daß neuroendokrine Zellen sich phänotypisch von dem Basalzellkompartiment unterscheiden, in welchem man die prostatichen epithelialen Stammzellen vermutet (Aprikian et al., 1993).

Die Ergebnisse von Bonkhoff et al. (1994) konnten diese Befunde nur teilweise bestätigen. In einer immunhistochemischen Untersuchung mit Einsatz von Doppelfärbungen wurde neben den bekannten Zelltypen der sekretorischen luminalen Zellen, der Basalzellen sowie der neuroendokrinen Zellen ein weiterer Zelltyp identifiziert, welcher als intermediär bezeichnet wurde. Dieser Zelltyp exprimierte zB. sowohl Chromogranin A und PSA als auch Chromogranin A und Basalzellen-spezifisches Zytokeratin. Hauptsächlich auf dieser Beobachtung fußt sein Stammzellkonzept (Bonkhoff et al., 1996), in dem er einen undifferenzierten, pluripotenten Vorläufer für alle prostatichen Epithelzellen postuliert, welcher mutmaßlich in der Basalzellschicht beheimatet ist.

Für die neuroendokrinen Zellen selbst konnten Bonkhoff et al. (1995) nachweisen, daß diese keine Proliferationsaktivität mehr zeigen, es sich also um postmitotische, terminal differenzierte Zellen handelt, da typische Marker für Zellteilung, KI-67 und MIB-1, immunhistochemisch nicht nachzuweisen waren.

Diese Befunde konnten von Xue et al. (1997) bestätigt werden, als sie bei einer immunhistochemischen Untersuchung das Zytokeratinprofil von neuroendokrinen Zellen mit dem der Basal- und der luminalen prostatichen Zellen verglichen. Dabei kamen sie zu dem Schluß, daß neuroendokrine Zellen, was die Expression von Zytokeratinen betrifft, sowohl Merkmale der Basalzellen als auch der luminalen Zellen besitzen. Dieses wurde als starker Hinweis dafür gewertet, daß alle drei Zelltypen von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen. Bcl-2 dahingegen, ein Mitglied der Anti-Apoptose-Faktor Familie (Apoptose = programmierter Zelltod) konnte in den neuroendokrinen Zellen nicht nachgewiesen werden, was dafür spricht, daß es sich um terminal differenzierte Zellen handelt (Xue et al., 1997).

Im Gegensatz zu diesen pathohistologischen Studien konnten Aumüller et al. (2001) bei ihren Untersuchungen von Prostatae Pubertierender oder junger Erwachsener niemals eine Koexpression von Chromogranin A und PSA oder Chromogranin A und Basalzellen-spezifisches Zytokeratin nachweisen, was klar gegen die Existenz dieser Zwischenform von „amphikrinen“ Zellen spricht.

Das Vorkommen einer undifferenzierten nicht-sekretorischen Stammzellform der neuroendokrinen Zellen wurde kürzlich durch Andrew et al. (1998), in Hinblick auf die intestinalen neuroendokrinen Zellen, bestritten. Diese sollen vielmehr von *einer* pluripotenten Vorläuferzelle der Enterozyten abstammen. Wahrscheinlich ist jedoch die Situation im Magen-Darmtrakt nicht mit der in der Prostata zu vergleichen. Aumüller et al. (2001) konnten in jungen männlichen und weiblichen Embryonen niemals neuroendokrine Zellen in den subepithelialen Lagen des gastro-enteropankreatischen Systems nachweisen, wohingegen sie in Mesenchym des Sinus urogenitalis zahlreich vorkamen. Allerdings waren schon frühzeitig neuroendokrine Zellen mit ihrer typischen Morphologie im Darmepithel selbst nachweisbar, was bei den hier durchgeführten Untersuchungen als interne Positivkontrolle für die Immunhistochemie mit Chromogranin A genutzt wurde.

Die derzeit laufende Diskussion über die Herkunft der neuroendokrinen Zellen wird von den Befürwortern einer endodermalen Herkunft auch durch Befunde gestützt, welche man bei Versuchen mit Zellkulturen erheben konnte. Für die experimentelle Prostatapathologie stehen eine Reihe von gut charakterisierten Zellkulturmodellen, wie LNCaP und PC-3, zur Verfügung. Bereits Bang et al. (1994) konnten bei ihren Versuchen mit der androgen-sensitiven Prostatakarzinomzelllinie LNCaP zeigen, daß man über die Erhöhung des intrazellulären cAMP (cyklisches Adenosin-Mono-

phosphat), wie man sie durch die Zugabe eines Phosphodiesterasehemmers oder eines cAMP-Analogons erreichen kann, eine neuroendokrine Differenzierung bewirken kann. Wie sich dabei elektronenmikroskopisch zeigt, bilden die Zellen kleine dichte Granula aus, wie sie typischerweise in den neuroendokrinen Zellen vorkommen, weiterhin sind die Zellen positiv für die Marker Chromogranin A, NSE und auch S-100, einem neuronalen Marker. Darüber hinaus induzierte die Zugabe von cAMP eine G<sub>1</sub>-Synchronisation, einen Wachstumsstop, sowie einen Verlust der Klonogenität, was für eine terminale Differenzierung spricht (Bang et al., 1994). Gleiche Befunde wurden von Cox et al. (1999, 2000) bei Untersuchungen u.a. an LNCaP-Zellen erhoben, wobei sie zusätzlich zeigen konnten, daß das Erlangen neuroendokriner Eigenschaften von Prostatakarzinomzellen reversibel ist, wenn man ihnen das verursachende, die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhende, Agens entzieht (Cox et al., 1999). Kim et al. (2002) konnten weiterhin zeigen, daß der Hb-EGF (Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlicher Wachstumsfaktor), einer aus der glatten Muskulatur der Prostata stammender mitogener Faktor, ebenfalls eine neuroendokrine Differenzierung herbeiführen kann, daß also Faktoren welche aus dem Stroma selbst stammen, dazu führen, daß Prostatakarzinomzellen Eigenschaften neuroendokriner Zellen annehmen. Diese Zellen müßten also nicht einen gemeinsamen Ursprung im Sinne einer gemeinsamen endodermalen Vorläuferzelle haben, sondern sie nehmen über in der Umgebung vorhandene Faktoren einfach nur bestimmte Eigenschaften an.

Insgesamt muß die Übertragung von Befunden aus diesen Systemen auf die normale menschliche Prostata kritisch betrachtet werden, da z.B. die LNCaP-Zelle einen mutierten Androgenrezeptor aufweist, der auch durch Bindung von Antiandrogenen androgene Wirkungen vermittelt. Wiederum ist in anderen etablierten Zelllinien, wie der PC-3-Zelllinie, kein Androgenrezeptor nachweisbar, und in dieser Zelllinie werden PSA und PAP nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen synthetisiert (s. Aumüller, 1993). Erst kürzlich von Sawicki und Rothman (2002) bei Untersuchungen von Prostataepithelzellen von Mäusen entdeckte Hinweise auf das Vorkommen von Zellen mit Stammzeleigenschaften bedürfen noch der weiteren Bestätigung. Nach Ansicht von Angelsen et al. (1997) sind aber sowohl Ratten, Meerschweinchen, Katzen und Hunde keine geeigneten Tiermodelle für physiologische Studien von neuroendokrinen Zellen. Als entscheidender Nachteil muß also weiterhin das Fehlen von etablierten Zelllinien oder anderen Modellen angesehen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die vorliegende Arbeit mit der differenzierten Beobachtung der Verteilung und des Altersganges der neuroendokrinen Zellen, mit Chromogranin A, Serotonin und Calcitonin als Marker, klar das Stammzellkonzept von Aumüller unterstützt. Neuroendokrine Zellen exprimieren keinen Androgenrezeptor, sie sind also nicht steroidhormonabhängig. Auf welche Weise sie reguliert werden, ist nicht bekannt. Auch über ihre genaue Funktion läßt sich nur spekulieren, es lassen sich jedoch die verschiedensten Peptidhormone und Rezeptoren nachweisen. Mit ihren langen dendritischen Fortsätzen erreichen sie sich z. T. untereinander, so daß man eine Kommunikation und gegenseitige Steuerung vermuten kann. Darüber hinaus erreichen neuroendokrinen Zellen vom offenen Typ das Drüsenlumen, so dass auch eine Steuerung durch Bestandteile des Drüsensekrets denkbar ist.

## V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung der neuroendokrinen Zellen in der menschlichen Prostata bezüglich ihrer Herkunft, der Verteilung sowie ihres Altersganges.

Das Untersuchungsmaterial umfaßte männliche Embryonen von 57 mm bis 65 mm SSL, entsprechend der 9. bis ca. 13. Schwangerschaftswoche, einen Feten aus der 36. Schwangerschaftswoche sowie kindliche, jugendliche (um den Zeitraum der Pubertät) und erwachsene Prostatapräparate. Die Schnitte wurden immunhistochemisch - z. T. mit einer neu etablierten Doppelmarkierungstechnik - mit verschiedenen Primärantikörpern gegen neuroendokrine Zellen ( $\alpha$ -Chromogranin A,  $\alpha$ -Serotonin und  $\alpha$ -Calcitonin) und Steroidhormonrezeptoren ( $\alpha$ -Androgenrezeptor,  $\alpha$ -Oestrogenrezeptor) gefärbt und die Reaktion semiquantitativ mittels computerunterstützter Bildanalyse ausgewertet.

Der Gesamtanteil der Chromogranin A-positiven neuroendokrinen Zellen am Epithel der Prostata liegt bei ca. 2 %, der Anteil der Serotonin- bzw. Calcitonin-positiven Zellen liegt noch einmal deutlich niedriger bei etwa 1 %. Erstmals konnte gezeigt werden, daß bei einem Embryo von 57 mm SSL, entsprechend etwa der 9. SSW, noch keine neuroendokrinen Zellen im Epithel des Sinus urogenitalis nachzuweisen sind (jedoch schon im Epithel des Rektums), diese jedoch in dorsolateral des Sinus urogenitalis gelegenen Paraganglien in großer Anzahl vorliegen. Erst bei einem Embryo mit 60 mm SSL finden sich im Stroma, im Epithel und etwas später auch in den aussproßenden Drüsenknospen der sich entwickelnden Prostata des Sinus urogenitalis, Chromogranin A-positiv neuroendokrine Zellen. Die stromalen immunreaktiven Zellen sind zum Teil zwischen den Paraganglien und dem Epithel des Sinus urogenitalis lokalisiert. Für die neuroendokrinen Zellen in der sich ausbildenden Prostata konnte darüber hinaus eine von zentral nach peripher hin abnehmende Dichte nachgewiesen werden.

Zusammenfassend sprechen diese Befunde für eine Migration der neuroendokrinen Zellen aus den Paraganglien - und damit indirekt aus der Neuralleiste - in das Epithel des Sinus urogenitalis und damit für eine neurogene Herkunft der neuroendokrinen Zellen der Prostata, auch wenn keine Zellen direkt an, bzw. beim Durchtritt durch die Basalmembran des Epithels gefunden wurden.



So läßt sich das bisher bestehende Stammzellkonzept der Prostata, in dem man von nur einem einzigen Stammzelltypus ausgeht, in ein duales Stammzellkonzept mit eigenen Vorläuferzellen sowohl für die Basalzellen und Epithelzellen als auch für die neuroendokrinen Zellen erweitern. Letztendlich kann jedoch eine autochthone Genese der neuroendokrinen Zellen nicht ganz ausgeschlossen werden, so daß weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die diese Frage abschließend beantworten zu können.

Bei den Doppelmarkierungsversuchen konnte klar gezeigt werden, daß neuroendokrine Zellen in gesundem Prostatagewebe keinen Androgenrezeptor exprimieren. Androgene könnten also allenfalls indirekt wirken.

Gerade im Hinblick auf die Genese der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms finden die neuroendokrinen Zellen heute große Beachtung und man schreibt ihnen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung dieser Krankheiten zu. Umso wichtiger ist das Etablieren wirklich geeigneter Modelle, um diese Fragen beantworten zu können.

## VI. Literaturverzeichnis:

1. Abrahamsson P.A. 1999. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *The Prostate* 39: 135-148.
2. Abrahamsson P.A., D. Nishtman, P. Alm, P.A. di Sant'Agnesse, L.J. Deftos und G. Aumüller. 2000. Calcitonin and calcitonin gene related peptide in the human prostate gland. *The Prostate* 44: 181-186.
3. Abrahamsson P.A., J. Alumets, S. Falkmer und L. Grimelius. 1986. Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostatic glands. *Path. Res. Pract.* 181: 675-683.
4. Abrahamsson P. A., J. Alumets, S. Falkmer und L. Grimelius. 1987. Peptide-hormone- and Serotonin-immunoreactive tumour cells in carcinoma of the prostate. *Path. Res. Pract.* 182: 298-307.
5. Abrahamsson P.-A.. 1996. Neuroendocrine differentiation in hormon-refractory prostate cancer. *Prostate* 6: 3-8.
6. Alesio C.. 1929. Ricerche sullo sviluppo e sull'istogenesi della prostata nell'uomo. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 27: 232-275.
7. Allsbrock W. C. und W. W. Simms. 1992. Histochemistry of the prostate. *Hum. Pathol.* 23: 297-305.
8. Allsbrock W. C., W. W. Simms und J. Steinsapir. 1993. On the identification and characterization of prostate specific antigen. *Hum. Pathol.* 24: 811-812.
9. Altenähr E. 1982. Pathologie des Prostatakarzinoms. In: H. Klosterhalfen, E. Alenähr, H. D. Franke (eds.). *Das Prostatakarzinom, Pathologie – Diagnostik – Therapie.* Thieme, Stuttgart – New York.
10. Andrew A, B. Kramer und B.B. Rawdon. 1998. The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells - the last word? *J Pathol* 186: 117-118.
11. Andrew A., B. Kramer und B.B. Rawdon. 1982. The embryonic origin of endocrine cells of the gastrointestinal tract. *Gen Comp Endocrinol* 47: 249-265.
12. Andrews, G.S. 1951. The Histology of human fetal and prepubertal prostates. *J. Anat.* 85: 44-54.

13. Angelsen A., R. Mecsei, A. K. Sandvik und H. L. Waldum. 1997. Neuroendocrine cells in the prostate of the rat, guinea pig, cat and dog. *Prostate* 33: 18-25.
14. Aprikian A. G., C. Cordon-Cardo, W. R. Fair und V. E. Reuter. 1993. Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma. *Cancer* 71 (12): 3952-3965.
15. Aschoff, L. 1922. Über die paraprostatistischen Drüsen und ihre Beziehungen zur Prostatahypertrophie. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 33: 19-23.
16. Aumüller G. und J. Seitz. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int. Rev. Cytol.* 121: 127-231.
17. Aumüller G., H.W. Goebel, M. Bacher, W. Eicheler, U. Rausch. 1993. Aktuelle morphologische und funktionelle Aspekte der Prostata. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 77: 1-18.
18. Aumüller G., S. Groos, H. Renneberg, L. Konrad und M. Aumüller. 1998. Embryology and postnatal development of the prostate. *In* C. S. Foster und D. G. Bostwick (eds.): *Pathology of the Prostate*, Vol. 34 in the series: "Major problems in pathology", W. B. Saunders Company, Philadelphia.
19. Aumüller G..1979. Prostate glands and seminal vesicles. *In* Oksche A. und L. Vollrath (Hrsg.): *Handbuch der mikroskopischen Anatomie*, vol. 7, Teil 6. Berlin: Springer-Verlag.
20. Aumüller G., P.-M. Holterhus und L. Konrad. 1998. Immunohistochemistry and in-situ hybridization of the androgen receptor in the developing human prostate. *Anat Embryol* 197: 199-208.
21. Aumüller G., M. Leonhard, H. Renneberg, B. v. Rahden, A. Bjartell und P.-A. Abrahamsson. 2001. Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate* 46: 108-115.
22. Aumüller G., M. Leonhard, M. Janssen, I. Konrad, A. Bjartell, P.-A. Abrahamsson. 1999. Neurogenic origin of human prostatic endocrine cells. *Urology*. 53: 1041-1048.

23. Azzopardi J. G. und D. J. Evans. 1971. Argentaffin cells in prostatic carcinoma: Differentiation from lipofuscin and melanin in prostatic epithelium. *J. Pathol.* 104: 247-251.
24. Bang Y.-J., F. Pirnia, W.-G-Fang, W.K. Kang, O. Sator u. a.. 1994. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci* 91: 5330-5334.
25. Battaglia S., A. Casali und A. Boticelli. 1994. Age-related distribution of endocrine cells in the human prostate: A quantitative study. *Virchows Arch.* 424: 165-168.
26. Barwick K.W. und J.A. Mardi. 1983. An immunohistochemical study of the myoepithelial cell in prostate hyperplasia and neoplasia, *Lab. Invest.* 48: 7A.
27. Blaschko H., R. S. Comline, F. H. Schneider, M. Silver und A. D. Smith. 1967. Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* 215: 58-59.
28. Bonkhoff H. 1998. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostatic tissue: morphogenesis, proliferation and androgen-receptor status. *Prostate (Suppl)* 8: 18-22.
29. Bonkhoff H. und K. Remberger. 1996. Differentiation pathways and histogenic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate.* 28: 98-106.
30. Bonkhoff H., N. Wernert, G. Dhom, K. Remberger. 1991. Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic und neoplastic human prostate. *Prostate* 19: 91-98.
31. Bonkhoff H., U. Stein und K. Remberger. 1994. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 24; 224-28.
32. Bonkhoff H., U. Stein und K. Remberger. 1995. Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum Pathol* 26: 167-170.
33. Bonkhoff H., U. Stein, K. Remberger. 1993. Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Virchows Arch. [A]* 423: 291-94.

34. Bonkhoff H., U. Stein, K. Remberger. 1994, Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. Simultaneous demonstration of cell specific epithelial markers. *Hum. Path.* 25: 42-46.
35. Bonkhoff H.. 1996. Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: a stem cell concept for the development of prostate cancer. *Eur. Urol.* 30: 201-205.
36. Bonkhoff, H. und K. Remberger. 1998. Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Arch* 433: 195-202.
37. Bülbring E. und R. C. Lin. 1958. The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis; the local production of 5-HAT and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity. *J. Physiol. (London)* 140: 381-407.
38. Carlei F. und M. Polak. 1986. Antibodies to neuron-specific enolase for the delineation of the entire diffuse neuroendocrine system in health and disease. *Semin Diagn Path* 1: 59-70.
39. Chang C., J. Kokontis und S. Liao. 1988. Structural analysis of complementary DNA amino acid sequences of human and rat androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 7211-7215.
40. Chung L.W.K. und G.R. Cunha. 1983. Stromal epithelial interactions. II. Regulation of prostatic growth by embryonic urogenital sinuns mesenchyme. *Prostate* 4: 503-511.
41. Churukian C. J. und E. A Schenk. 1979. A modificatin of Pascual's argyrophil method. *J. Histotech.* 2: 102-103.
42. Cleary K.R., H.Y. Choi, A.G. Ayala. 1983. Basal cell hyperplasia of the prostate. *Am. J. Clin. Pathol.* 80: 850-854.
43. Cockett A.T.K., P.A. di Sant`Agnese, P. Gopinath, S.R. Schoen and P.-A. Abrahamson. 1993. Realationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. *Urology* 42: 512-519.
44. Cohen R., G. Glezerson, L.F. Taylor, H.A.J. Grundle und J.H. Naude. 1993. The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *J. Urol.* 150: 365-68.

45. Cordell J.L., B. Falini, W.N. Erber, Ghosh A.K., Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein and D. Y. Mason. 1984. Immunoenzymatic labeling of monoklonal antibodies using the immune complexes of alkaline phosphatase and monoklonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes); *J. Histochem. Cytochem.* 32: 219-229.
46. Cox M.E., P.D. Deeble, E.A. Bissonette und S.J. Pearsons. 2000. Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *J Biol Chem* 275 (18): 13812-13818.
47. Cox M.E., P.D. Deeble, S. Lakhani und S.J. Pearsons. 1999. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res* 59 (15): 3821-3830.
48. Cunha G.R., B.A. Reese und M. Sekkingstad. 1980. Induction of nuclear androgen-binding sites in epithelium of the embryonic urinary bladder by mesenchyme of the urogenital sinus of embryonic mice. *Endocrinology* 107: 1767-1770.
49. Cunha G.R., J.M. Shannon, B.L. Neubauer, L.M. Sawyer, H. Fujii, O. Taguchi und L.W.K. Chung. 1981. Mesenchymal-epithelial interactions in sex differentiation. *Hum. Genet.* 58: 68-77.
50. Cunha G.R., L.W.K. Chung und J.M. Shannon. 1983. Hormone-induced morphogenesis and growth: Role of mesenchymal-epithelial interactions. *Recent Progr. Hormone Res.* 39: 559-598.
51. Cunha G.R.. 1972. Epithelio-mesenchymal interactions in primordial gland structures which become responsive to androgenic stimulation. *Anat. Rec.* 172: 179-196.
52. Cunha G. R., A. A. Donjacour und Y. Sugimura. 1986. Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem. Cell Biol.* 64: 608-614.
53. Cunha G.R.. 1986. Development of the male urogenital tract. *In* Raifer J. (Hrsg.): *Urologic endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders. Seiten 6-16.
54. Cunha G.R.. 1994. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of male urogenital glands. *In* Riva A., F. Riva Testa und

- P.M. Motta (Hrsg.): Ultrastructure of the male urogenital glands. Boston: Kluwer Academic. Seiten 14-34.
55. Dalsgaard C.J., A. Hultgardh Nilsson, A. Haegerstrand und J. Nilsson. 1989. Neuropeptides as growthfactors. Possible roles in human diseases. Regul. Pept. 25: 1.
  56. Deftos L.J.. 1998. Granin A, Parathyroid hormon-related protein, and Calcitonin gene products in neuroendocrine prostate cancer. Prostate (Suppl.) 8: 23-31.
  57. Dermer G.B.. 1978. Basal cell proliferation in benign prostatic hyperplasia. Cancer 41: 1857-1862.
  58. di Sant´Agnese P. A.. 1986. Calcitoninlike immunoreactive and Bombesinlike immunoreactive endocrine-paracrine cells of the human prostate. 1986. Arch. Path. Lab. Med. 110: 412-415.
  59. di Sant´Agnese P. A. und K. De Mesy Jensen. 1984. Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra; an ultrastructural study. Hum. Pathol. 15: 1034-1041.
  60. di Sant`Agnese P. A. 1998. Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: A review of morphologic aspects. Urology 51 (Suppl. 5A): 121-124.
  61. di Sant`Agnese P. A. and A. T. K. Cockett. 1994. The prostatic endocrine–paracrine (neuroendocrine) regulatory system and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: A review and future directions in basic research. J. Urol.152: 1927-1931.
  62. di Sant´Agnese P. A. 1992. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. Cancer (Suppl.) 70(1): 254-268.
  63. di Sant´Agnese P. A., N. S. Davis, M. Chen und K. L. de Mesy Jensen. 1987. Age-related changes in the neuroendocrine (endocrine-paracrine) cell population and the serotonin content of the guinea pig prostate. Lab. Invest. 57: 729-735.
  64. di Sant´Agnese P. A. und K. L. de Mesy Jensen. 1987. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. Hum. Pathol. 18: 849-856.

65. di Sant'Agnesse P.A.. 1995. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: Recent findings and new concepts. 75: 1850-1859.
66. di Sant'Agnesse P. A., K. L. de Mesy Jensen, C. J. Churukian und M. M. Agarawal. 1985. Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells. Distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains. Arch. Pathol. Lab. Med. 109: 607-612.
67. Eiden L. E..1987. Is chromogranin a prohormone? Nature 325: 301
68. Elger W., K.J. Graf und H. Steinbeck. 1974. Hormonal control of sexual development. Adv. Biosci. 13: 41-69.
69. Fetissov F., G. Bertrand, D. Guilloteau, M.P. Dubois, Y. Lanson und B. Arbeille. 1986. Calcitonin immunoreactive cells in prostate gland and cloacal derived tissues. Virch Arch A 409: 523-533.
70. Fetissov F., M.P. Dubois, B. Arbeille-Brassart, Y. Lanson, F. Boivin und O. Jobard. 1983. Endocrine cells in the prostate gland, urothelium and Brenner tumors. Virchows Arch. [B] 42: 53-64.
71. Feyrter F. 1951. Über das urogenitale Helle Zellen-System des Menschen. Z. Mikroskop. Anat. Forsch. 57: 324-344.
72. Feyrter F.. 1938 Über diffuse endokrine epitheliale Organe. Verlag: Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
73. Fischer-Colbrie R., A. Iacangelo und L. E. Eiden. 1988. Neural and humoral factors separately regulate neuropeptide Y, enkephalin, and chromogranin A and B mRNA levels in rat adrenal medulla. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 85: 3240-3244.
74. Fontana A.. 1926. Über die Silberdarstellung des Treponema pallidum und anderer Mikroorganismen in Ausstrichen. Dermatolog. Z. 46: 291-293.
75. Foresta C., A. Caretto, M. Indino, C. Betterle und C. Scandellari. 1986. Calcitonin in human seminal plasma and its localization on human spermatozoa. Andrologia 18: 470-473.
76. Foster G. V.. 1968. Calcitonin (thyreocalcitonin). N. Engl. J. Med. 279: 349-360.
77. Franks, L. M.. 1954. Benign hyperplasia of the prostate: a review. Ann. Coll. Surg. Engl. (London) 14: 92-106.



78. Fujita T., T. Kanno und S. Kobayashi. 1988. The Paraneuron. Tokyo. Springer-Verlag.
79. Gerdes J., J. Becker und G. Key. 1992. Immunohistochemical detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J. Pathol.* 168: 85-89.
80. Glenister T.W.. 1962. The development of the utricle and the so-called middle or median lobe of the human prostate. *J. Anat. (London)* 96: 443-455.
81. Gnassi L., L. Silvestroni, A. Fabri, C. Moretti, A.E. Panerai, V. Bonifacio und F. Fraioli. 1984. Salmon calcitonin inhibits human sperm motility in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 199
82. Graham C.W., J.H. Lynch und D. Djakiew. 1992. Distribution of nerve growth factor-like protein and nerve growth factor protein receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. *J. Urol.* 147: 1444-1447.
83. Grimelius L. 1968. A silver nitrate stain for  $\alpha_2$ -cells in human pancreas islets. *Acta Soc Med Ups* 73: 244-326.
84. Gundobin N. P. 1912. Die Besonderheiten des Kindesalters. Grundlegende Tatsachen zur Erkenntnis der Kinderkrankheiten (S. Rubinstein, ed.) Berlin: Allg. Med. Verlagsanstalt.
85. Holterhus P. M.. 1994. Immunhistochemische, stereologische und ultrastrukturelle Untersuchungen zur hormonabhängigen differentiellen Organinvolution der Koagulationsdrüse der Ratte. Inaugural-Dissertation, Universität Marburg. 52-53.
86. Hsu S. M., L. Raine und H. Fanger. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (4): 577-580.
87. Husman D. A., M. McPhaul, und J. D., Wilson. 1991. Androgen receptor expression in the developing rat prostate is not altered by castration, flutamide, or suppression of the adrenal axis. *Endocrinology* 128: 1902-1906.
88. Huttner W. B. und U. M. Benedum. 1987. Chromogranin A and pancreastatin. *Nature* 325: 305

89. Imperato-McGinley J., Z. Binienda und A. Arthus. 1985. The development of a male pseudohermaphroditic rat using an inhibitor of the enzyme  $5\alpha$ -reductase. *Endocrinology* 116: 807-812.
90. Iwamura M., K. Koshiba und A. T. K. Cockett. 1998. Receptors for BPH growth factors are located in some neuroendocrine cells. *The Prostate (Suppl.)* 8: 14-17.
91. Iwamura M., P. A. Abrahamsson, C. M. Benning, A. T. K. Cockett und P. A. di Sant'Agnes. 1994. Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. 1994. *J. Histochem. Cytochem.* 42 (6): 783-788
92. Jacobs S. C., M. T. Story, J. Sasse und R. K. Lawson. 1988. Characterization of growth factors derived from the rat ventral prostate. *J. Urol.* 139: 1106-1110.
93. Jen P.Y.P. und J.S. Dixon. 1995. Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland. *J. Anat.* 187: 169-179.
94. Johnson F. P. 1920. The later development of the urethra in the male. *J. Urol.* 4: 447-503.
95. Johnson F.P., 1922. The homologue of the prostate in the female. *J. Urol.* 8: 13-27.
96. Josso N., J.Y. Picard, und D. Tran. 1976. The anti-mullerian hormone. *Rec. Progr. Hormone Res.* 33: 117-167.
97. Kastendieck H.. 1977. Ultrastrukturpathologie der menschlichen Prostatadrüse: Cyto- und Histomorphogenese von Atrophie, Hyperplasie, Metaplasie, Dysplasie und Carcinom. *Veröffentl. aus der Pathologie*, H. 106, Fischer, Stuttgart – New York.
98. Kazzaz B.A.. 1974. Argentaffin and argyrophil cells in the prostate. *J.Pathol* 112: 189-193.
99. Kellokumpu-Lehtinen P., R. Santti und L.J. Pelliniemi. 1980. Correlation of early cytodifferentiation of the human fetal prostate and Leydig cells. *Anat. Rec.* 196: 263-273.
100. Kellokumpu-Lehtinen P..1980. The histochemical localization of acid phosphatase in human fetal urethral and prostatic epithelium. *Invest. Urol.* 17 (6): 435-440.

101. Kellokumpu-Lehtinen P., R. Santti und L. J. Pelliniemi. 1981. Development of human fetal prostate in culture. *Urol. Res.* 9: 89-98.
102. Kellokumpu-Lehtinen P.. 1983. Localization of acid phosphatase activity in testosterone-treated prostatic urethra of human fetuses. *The Prostate.* 4: 265-270.
103. Kim J., R.M. Adam und M.R. Freeman. 2002. Activation of the erk mitogen-activated protein kinase pathway stimulates neuroendocrine differentiation in LNCaP cells independently of cell cycle withdrawal and STAT3 phosphorylation. *Cancer Res* 62 (5): 1549-1554.
104. Kinbara H., G. R. Cunha, E. Boutin, N. Hayashi und J. Kawamura. 1996. Evidence of stem cells in the adult prostatic epithelium based upon responsiveness to mesenchymal inductors. *Prostate.* 29: 107-116.
105. Kirkland S.C. 1988. Clonal origin of columnar, mucous, and endocrine cell lineages in human colorectal epithelium. *Cancer* 61: 1359.
106. Krijnen, J.L.M., P.J.A. Janssen und J.A. Ruizeveld de Winter. 1993. Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *J Histochem* 100: 393-398.
107. Kutscher W. und H. Wolbergs. 1935. Prostataphosphatase. *Z. Physiol. Chem.* 236: 237-240.
108. Lassmann H., C. Hagn, R. Fischer-Colbrie und H. Winkler. 1986. Presence of chromogranin A, B and C in bovine endocrine and nervous tissue: a comparative histochemical study. *Histochem. J.* 18: 380-386.
109. Lauder J.M., H. Tamir und T.W. Sadler. 1988. Serotonin and morphogenesis: Part I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development* 102: 709-720.
110. Leicht E., G. Biro, K.S. Weinges. 1974. Inhibition of releasing hormone-induced secretion of TSH and LH by calcitonin. *Horm Metab Res* 6: 410.
111. Lowsley O.S.. 1912. The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. *Am. J. Anat.* 13: 299-349.
112. Lowsley O.S.. 1930. Embryology, anatomy and surgery of the prostata gland. *Am. J. Surg.* 8: 526-541.

113. Mao P. und A. Angrist. 1966. The fine structure of the basal cell of the human prostate. *Lab. Invest.* 15: 1768-1782.
114. Maygarden S. Y., S. Strom und J. L. Ware. 1992. Localization of epidermal growth factor receptor by immunohistochemical methods in human prostatic carcinoma, prostatic intraepithelial neoplasia and benign hyperplasia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116: 269-273.
115. Maddy S. Q., G. D. Chisholm R. A. Hawkins und F. K. Habib. 1987. Localization of epidermal growth factor receptors in the human prostate by biochemical and immunocytochemical methods. *J. Endocrin.* 113: 147-153.
116. McKeehan W. L.. 1991. Growth factors receptors and prostate cell growth. 1991. *Cancer Surveys* 11: 165-175.
117. McNeal J. E.. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* 2: 35-49.
118. McNeal J. E.. 1989. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* 12: 619-633.
119. McNeal J. E..1972. The prostate and prostatic urethra. A morphologic synthesis. *J. Urol.* 107: 1008-16.
120. McVary, K.T., K.E. Mc Kenna und C. Lee. 1998. Prostate innervation. *Prostate (Suppl.)* 8: 2-13.
121. Nakada S. Y., P. A. di Sant'Agnes, R. A. Moynes, R. A. Hiipakka, S. Liao, A. T. Cockett und P.-A. Abrahamsson. 1993. The androgen receptor status of neuroendocrine cells in human benign and malignant prostatic tissue. *Cancer Res.* 53: 1967-1970.
122. Neumann F., K.J. Graf und W. Elger. 1974. Hormone-induced disturbances in sexual differentiation. *Adv. Biosci.* 13: 71-101.
123. Nolan J., J. Trojanowski und R. Hogue-Angeletti. 1985. Neurons and neuroendocrine cells contain chromogranin: detection of the molecule in normal bovine tissue by immunochemical and immunohistochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 791-798.
124. Pearse A.G.E.. 1969. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J. Histochem. Cytochem* 17: 303-313.

125. Peter K.. 1927. Männliche Geschlechtsorgane. In: Handbuch der Anatomie des Kindes (K. Peter, G. Wetzell, F. Heiderich, eds.) Vol. II: 42-113. München: Bergmann.
126. Ponder B. A. und M. M. Wilkinson. 1981. Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 981-987
127. Pretl K.. 1944. Zur Frage der Endokrinie der menschlichen Vorsteherdrüse. *Virchows Arch [A]* 312: 392-404.
128. Prins G.S., P.A. Cooke und L. Birch. 1991. Androgen rezeptor expression and 5 $\alpha$ -reduktase activity along the proximo-distal axis of the rat prostatic duct. *Endocrinology* 130: 3066-3073.
129. Pylkkänen L., R. Santti und O. Mäentausta. 1992. Distribution of estradiol-17 $\beta$  hydroxysteroid oxidoreductase in the urogenital tract of control and neonatally estrogenized male mice: Immunohistochemical, enzyme histochemical and biochemical study. *Prostate* 20: 59-72.
130. Reese J. H., J. E. McNeal, E. A. Redwine, T. A. Stamey und F. S. Freiha. 1988. Tissue plasminogen activator as a marker for functional zones within the human prostate gland. *Prostate* 12: 47-54.
131. Reese J. H., J. E. McNeal, E. A. Redwine, I. M. Samloff und T. A. Stamey. 1986. Differential distribution of pesinogen II between the zones of the human prostate and the seminal vesicle. *J. Urol.* 136 1148-1151.
132. Ritchie C.K., K.G. Thomas, L.R. Andrews, T.J. Tindall und L.A. Fitzpatrick. 1997. Effects of the calcitonin and the parathyreoid hormone on prostate cancer growth and chemotaxis. *The Prostate* 30: 183-187.
133. Romeis B.. 1989. *Mikroskopische Technik*. 17. neubearbeitete Auflage, herausgegeben von P. Böck. Urban und Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore.
134. Romppanen, T. 1982. Practical approach to a morphometrical study. In: Collan Y. und T. Romppanen, *Morphometry in morphological diagnosis*. Kuopio University Press, Kuopio: 47-63.

135. Rüschoff J.. 1989. Methoden der lichtmikroskopischen Morphometrie. In: Romeis, Mikroskopische Technik. 17. neubearbeitete Auflage, herausgegeben von P. Böck. Urban und Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore, 327-338.
136. Sawicki J. A. und C. J. Rothman. 2002. Evidence for stem cells in cultures of mouse prostate epithelial cells. *Prostate* 50: 46-53.
137. Schmechel D.E. 1985. Subunit of the glycolytic enzyme enolase: non-specific or neuron specific? *Lab Invest* 110: 239-242.
138. Seuwen K., I. Magnaldo und J. Pouyssegur. 1988. Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT<sub>1b</sub> receptors coupled to a G<sub>i</sub>-protein. *Nature* 335: 254.
139. Seuwen K. und J. Pouyssegur. 1990. Serotonin as a growth factor. *Biochem. Pharmacol.* 39: 985-990.
140. Shah G.V., W. Rayford, M.J. Nobel, M. Austenfeld, J. Weigel, S. Vemos und W.K. Mebust. 1994. Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3',5' monophosphates and cytoplasmatic Ca<sup>2+</sup> transients. *Endocrinology* 134: 596-602.
141. Shi S.-R., M. E. Key und K. L. Kaira. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 741-746.
142. Sidhu G.S.. 1979. The endodermal origin of digestive and respiratory tract APUD-cells. *Am J Pathol* 96: 5-20.
143. Silvestroni L., A. Menditto, G. Fajesse und L. Gnassi. 1987. Identification of CT-receptors in human spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 742-746.
144. Simon J. P. und D. Aunis. 1990. Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochem. J.* 262: 1-13.
145. Sinowatz F., Kellokumpu-Lehtinen P. und W. Amselgruber. 1994. Normal and abnormal development of human male accessory sex glands. In Riva A., F. Riva Testa und P.M. Motta (Hrsg.): *Ultrastructure of the male urogenital glands*. Boston, Kluwer Academic. Seiten 1-14.

146. Sjöberg H.E., S. Arver und E. Bucht. 1980. High concentration of immunoreactive calcitonin of prostatic origin in human semen. *Acta Physiol. Scand.* 110: 101-102.
147. Smith A. D. und H. Winkler. 1967. Purification and properties of an acidic protein from chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* 103: 483-492.
148. Smith W. J. und N. Kirshner. 1967. A specific soluble protein from the catecholamine storage vesicles of bovine adrenal medulla. *Mol. Pharmacol.* 3: 52-62
149. Sternberger I. A.. 1979. *Immunocytochemistry*, 2nd edition, John Wiley and Sons Inc., New York.
150. Stieve H.. 1930. Die Vorsteherdrüse. *In* W.V. Möllendorf (Hrsg.): *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. VII. Harn- und Geschlechtsapparat; 2. Männliche Genitalorgane. Berlin: Springer-Verlag. Seiten 246-272.
151. Story M.. 1991.. Polypeptide modulators of prostatic growth and development. *Cancer Surv.* 11: 123-146.
152. Swyer G.I.M.. 1944. Postnatal growth changes in the human prostate. *J. Anat. (Lond.)* 78: 130-145.
153. Tatemoto K., S. Efendic, V. Mutt, G. Makk, Feistner G. J. und J. D. Barchas. 1986. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 324: 476-478.
154. Tisell L. E. und H. Salander. 1975. The lobes of the human prostate. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 9: 185-191.
155. Totten R.S., M.W. Heinemann und P.B. Hudson. 1953. Microscopic differential diagnosis of latent carcinoma of the prostate. *Arch. Pathol.* 55: 131-141.
156. Tutton P.J. und D.H. Barkla. 1987. Biogenic amines as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells (review). *Anti-cancer Res.* 7:1.
157. von Ebner, V. 1902. Männliche Geschlechtsorgane. *In*: A. v. Koellicker, *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*. 6. Aufl., Bd. 3, pp. 402-505. Leipzig: W. Engelmann.

158. Weibel E. R. .1979. Stereological methods. Vol. 1: Practical methods for biological morphometry. Academic Press, London.
159. Winkler H. und R. Fischer-Colbrie. 1992. The chromogranin A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49: 497-528.
160. Wohlfarther T., A. Laslop, C. Humpel, R. Fischer-Colbrie und H. Winkler. 1989. Three patterns of modification of the secretory cocktail in adrenal medulla. Abstracts zum 12. ISN Meeting, Algarve, Portugal, 86 D. *J. Neurochem.* 52 (Suppl.).
161. Xue Y., F. Smedts, A. Verhofstad, F. Debruyne, J. de la Rosette und J. Schalken. 1998. Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives . *Prostate (Suppl 8)* 62-73.
162. Xue Y., J. van der Laak, F. Smedts, C. Schoots, A. Verhofstad, J. de la Rosette und J. Schalken. 2000. Neuroendocrine cells during human prostate development: Does neuroendokrine cell density remain constant during fetal as well as postnatall life? *Prostate* 42: 116-123.
163. Xue Y., W. Lange, A. Verhofstad, F. Smedis, F. Debruyne und J. Schalken. 1997. Neuroendocrine cells have a unique keratin expression and do not express bcl-2: cell kinetic features of neuroendocrine cells in the human prostate. *Am J Pathol* 151: 1759-1765.
164. Zondek L. H. und T. Zondek. 1971. The foetal and neonatal prostate in congenital malformation of the urinary tract. *Virch. Arch. Pathol. Anat.* 354: 197-208.
165. Zondek L. H. und T. Zondek. 1974. The prostatic utricle in the fetus and infant. *Urol. Int.* 29: 458-465.
166. Zondek T., M.D. Mansfield und S.L. Attree. 1986. Hormone levels in the foetal and neonatal prostate. *Acta Endocrinol.* 112: 447-456.



## VII. Anhang

### **Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren**

in Marburg:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Bautz-Holz Herr, Doss, Engel, Eschenbach, Fruhstorfer, Ganz, Gemsa, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happel, Havemann, Huffmann, Hupe, Joseph, Kleinsasser, Klenk, Klose, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kummer, Lennartz, Maisch, Mannheim, Mennel, Pfab, Pflüger, Pohlen, Portig, Prinz, Remschmidt, Riedmiller, Rothmund, Schüffel, Schulz, Schwerk, Seyberth, Stempel, Sturm, Thomas, Tuohimaa, Unsicker, v. Wichert, Voigt, Zelder.

in Aachen:

Dallacker, Schmidt, Freyer,

in Bonn:

Hinterberger

## **Danksagung:**

An erster Stelle möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber meinem akademischen und wissenschaftlichen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Gerhard Aumüller zum Ausdruck bringen. Er hat mir das Thema überlassen und die Voraussetzungen für die Arbeit geschaffen. Dank seiner großen Geduld, seiner Ausdauer und Unterstützung konnte ein langjähriges Projekt nun abgeschlossen werden. Aus den Untersuchungen gingen zwei Publikationen hervor, die 1999 in „Urology“ und 2001 in „The Prostate“ erschienen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Michael Dreher, der mich in die Techniken der Immunhistochemie einarbeitete und mich im Laboralltag begleitete, sowie Frau Dammshäuser und Herrn Jennemann für die kleinen Anregungen und Hilfestellungen zwischendurch.

Vielen Dank auch Stephanie Groos und Julia Möbius für die zahlreichen aufmunternden Gespräche.

Danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner Oma, die mich während des gesamten Studiums nach besten Kräften unterstützt haben.

Liebe Tine, ich bin besonders froh und dankbar, Dich seit so langer Zeit an meiner Seite zu wissen. Dank Deines Verständnisses, Deiner emotionalen Unterstützung sowie der abschließenden kritischen und konstruktiven Durchsicht der Arbeit konnte ein lange gegebenes Versprechen nun eingelöst werden.