

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

Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie
Leiter: Prof. Dr. G. Aumüller

**Studien zur vegetativen Innervation
neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Roland Gerull
aus
Tübingen

Marburg 2002

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

Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie
Leiter: Prof. Dr. G. Aumüller

**Studien zur vegetativen Innervation
neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Roland Gerull
aus
Tübingen

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 20.06.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. G. Aumüller

Koreferent: Prof. Dr. R. Moll

Inhaltsverzeichnis		Seite
	Inhaltsverzeichnis	I-IV
	Abkürzungsverzeichnis	V-VIII
1.	Einleitung	1
1.1.	Aufbau von Drüsen	1
1.2.	Synthese von Sekretproteinen	1
1.3.	Sekretionsmechanismen	2
1.3.1.	Merokrine Sekretion	2
1.3.2.	Apokrine Sekretion	3
1.3.3.	Holokrine Sekretion	4
1.3.4.	Diacytose	5
1.4.	Zellen der Prostata	6
1.4.1.	Basalzellen	6
1.4.2.	Drüsenzellen	7
1.4.3.	Neuroendokrine Zellen	7
1.4.3.1.	Merkmale neuroendokriner Zellen	7
1.4.3.2.	Neuroendokrine Zellen der Prostata	8
1.4.3.3.	Achaete Scute Homologue in neuroendokrinen Zellen	10
1.5.	Innervation der Prostata	12
1.6.	Bedeutung der Innervation	13
1.7.	Funktionen von Neuropeptiden	13

1.8.	Zielsetzung der Arbeit	15
2.	Materialien und Methoden	17
2.1.	Geräte	17
2.1.1.	Gewebeaufbereitung und Mikroskopie	17
2.1.2.	in situ-Hybridisierung	17
2.1.3.	Elektrophorese und Blotting	17
2.1.4.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
2.2.	Gewebe	18
2.3.	Chemikalien	18
2.3.1.	Gewebeaufbereitung, Standardfärbung	19
2.3.2.	Immunhistochemie	19
2.3.2.1.	Antikörper	19
2.3.3.	in situ-Hybridisierung	21
2.3.4.	Polymerase-Kettenreaktion	23
2.3.4.1.	Oligonukleotid-Primer	23
2.3.5.	Isolierung eines DNA-Fragmentes	24
2.4.	Gewebeaufbereitung	25
2.4.1.	Fixierung	25
2.4.2.	Einbettung	25
2.4.3.	Vorbehandlung der Objektträger	26
2.4.4.	Herstellung der Schnitte	26
2.4.5.	Standardfärbung	27

2.5.	Immunhistochemische Methoden	27
2.5.1.	Enzymatische Reaktionen	27
2.5.1.1.	Avidin-Biotin-Komplex (ABC) –Reaktion	27
2.5.1.2.	Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) –Reaktion	28
2.5.1.3.	Doppelmarkierungen	29
2.6.	Molekularbiologische Methoden	29
2.6.1.	in situ-Hybridisierung (ISH)	29
2.6.2.	RNA-Gelelektrophorese	33
2.6.3.	Northern Blot	34
2.6.4.	RNA-RNA Hybridisierung	35
2.6.5.	RNA-Isolierung mit TRIzol und Reinigung der Gesamt RNA-Präparation von genomischer DNA	35
2.6.6.	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	36
2.6.7.	AMOC-Verfahren zur Erhöhung der cDNA-Ausbeute	37
2.6.8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.6.9.	DNA-Gelelektrophorese	38
2.6.10.	Bestimmung der RNA/DNA Konzentrationen	39
2.6.11.	Elution der DNA aus Agarosegelen nach QIAEX	39
2.6.12.	Ligation	40
2.6.13.	DNA-Transformation	41
2.6.14.	Mini-Präparation der Plasmid-DNA	41
2.6.15.	Sequenzierung	43
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Strategie des Vorgehens	44
3.2.	Immunhistochemische Ergebnisse	44
3.2.1.	Innervation neuroendokriner Zellen	44
3.2.2.	Korrelationen zwischen Zellmorphologie und Neuropeptiden	45
3.2.3.	Kolokalisationen von Neuropeptiden in neuroendokrinen Zellen	48

3.3.	Molekularbiologische Ergebnisse	54
3.3.1.	In situ-Hybridisierung	54
3.3.2.	Northern Blot	56
3.3.3.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	57
3.3.4.	Elution der DNA aus Agarosegel	58
3.3.5.	Sequenzierung	59
3.3.6.	Homologievergleich	60
3.3.7.	Gesamtergebnis der molekularbiologischen Untersuchungen	61
4.	Diskussion	62
4.1.	Immunhistochemische Ergebnisse	62
4.1.1.	Innervation neuroendokriner Zellen	62
4.1.2.	Morphologie neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata	65
4.1.2.1.	Altersabhängigkeit der Zellmorphologie	66
4.1.2.2.	Korrelation zwischen Zellmorphologie und Neuropeptiden	68
4.1.3.	Kolokalisationen von Neuropeptiden in neuroendokrinen Zellen	70
4.2.	Molekularbiologische Ergebnisse	75
5.	Zusammenfassung	80
6.	Literaturverzeichnis	82
7.	Anhang	101

Abkürzungsverzeichnis

Σ	Summe
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
5-HT	Serotonin
A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACh	Acetylcholin
AMOC	Arithmetic Multiplication of cDNA
Apes	Aminopropyltriethoxysilane
APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASC	Achaete Scute Complex
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate
Bom	Bombesin
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Rinder-Serum-Albumin
C	Cytosin
cDNA	copy-Desoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CgA	Chromogranin A
CGRP	Calcitonin-Gen-Related Peptide
Cox1	Cytochrom C oxidase subunit 1
DAB	Diaminobenzidin
DBH	Dopamin-Beta-Hydroxylase
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinase

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
G	Guanin
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GRP	Gastrin-Related-Peptide
h	Stunden (hours)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hASH	human Achaete-Scute Homologue
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
ISH	in situ-Hybridisierung
KAc	Kaliumacetat
kb	kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
L-ENK	Leu-Enkephalin
LNCaP	LymphNode Carcinoma of the Prostate
M	molar
MASH	Mammalian Achaete Scute Homologue
M-ENK	Met-Enkephalin
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	millimolar
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure
N.	Nervus
NA	Noradrenalin
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NANC	nicht adrenerg nicht cholinerg

NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NEC	neuroendokrine Zellen
NH ₄ -Puffer	Ammonium-Puffer
Ni	Nickel
nm	Nanometer
Nn.	Nervi
NO	Stickoxyd
NOS	Stickoxydsynthase
NPY	Neuropeptid Y
NSE	Neuronen Spezifische Enolase
p. a.	pro analysi
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PK	Proteinase K
PSA	Prostata Spezifisches Antigen
RER	Rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinase
RNasin	Ribonukleinase-Inhibitor
rpm	Runden pro Minute
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylphosphate
SK	Substanz K
Som	Somatostatin
SP	Substanz P
SSC	Standard Saline Citrate

T	Thymin
TBE	Tris-Borat/EDTA
TEA	Triethanolamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
t-RNA	transfer-Ribonukleinsäure
Trp1	Transient receptor potential 1
U	Units (internationale Einheiten)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
VMAT 1	vesikulärer Monoaminotransporter 1
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Aufbau von Drüsen

Drüsen sind Zellen oder Zellkomplexe, die aus niedermolekularen Vorstufen hochmolekulare Produkte synthetisieren. Sie sind auf die Produktion und Freisetzung verschiedener Sekrete spezialisiert und spielen bei vielen lebenswichtigen Vorgängen, wie der Nahrungsaufnahme und -verarbeitung, der Homöostase und der Reproduktion, eine entscheidende Rolle.

Drüsen können hinsichtlich mehrerer Kriterien eingeteilt werden:

1. nach der Existenz eines Ausführungsganges (exokrine/endokrine Drüsen)
2. nach der Histologie (einfache/verzweigte, einzellige/mehrzellige, tubulöse/azinöse Drüsen)
3. nach der Qualität des Sekretes (seröse/muköse Drüsen)
4. nach dem Sekretionsmechanismus (apokrine/merokrine/holokrine Drüsen)

Die produzierten Sekrete sind bei allen Drüsen nicht für die Drüsenzellen selbst von unmittelbarer Bedeutung, sondern werden an anderen Stellen des Körpers benötigt.

1.2. Synthese von Sekretproteinen

Drüsenzellen beziehen alle zur Synthese des Sekretes benötigten Substanzen aus dem Blut oder der interzellulären Flüssigkeit. So werden für die Synthese eines proteinreichen Sekretes, wie z.B. das der Prostata, Aminosäuren aus dem Blut durch die Kapillarwand und ihre Basalmembran sowie Basalmembran und Zellmembran in das Zytoplasma der Drüsenzelle aufgenommen, wo sie für die Proteinsynthese verwendet werden. Auch die anderen Bestandteile des Sekretes werden auf diesem Weg in die Zelle aufgenommen.

Zu Beginn der Proteinbiosynthese werden die in den Zellen exprimierten Gene abgelesen, d.h. die entsprechende Sequenz der DNA wird durch eine RNA-Polymerase in komplementäre RNA umgesetzt (Transkription). Dabei entsteht aus der

doppelsträngigen DNA eine einzelsträngige messenger-RNA (m-RNA). Diese m-RNA wird dann aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wo sich Ribosomen anlagern und die Übersetzung in eine Proteinkette mittels transfer-RNA (t-RNA) beginnt (Translation). Die Translation startet im Zytosol. Das entstehende Protein kann dann dort oder auf dem Weg durch das endoplasmatische Retikulum (ER) und Golgi-Apparat modifiziert werden. In letzterem Fall binden sich die Ribosomen mit der m-RNA an das ER. Nach Synthese einer Signalsequenz wird die Proteinkette in die Zisterne des ER geschleust. Zum Abschluß der Translation löst sich das Ribosom vom ER und hinterläßt die Proteinkette im Lumen des ER. Das Protein kann, wenn es als Glykoprotein sezerniert wird, N- oder O- glykosidisch mit Polysacchariden modifiziert werden. Anschließend wird es in Transportvesikel verpackt und in die Zisternen des Golgi-Apparates transportiert, in dem die Struktur des Proteins noch verändert werden kann. So können z.B. Disulfidbrücken eingefügt oder die Polysaccharidketten verändert werden. Dann wird das nun spezifische Protein in Vakuolen (Sekretgranula) in das Zytosol entlassen. Die Sekretgranula sammeln sich an der apikalen Seite der Zelle und können bei Bedarf in den Ausführungsgang der Drüse, bzw. ins Blut abgegeben werden.

1.3. Sekretionsmechanismen

1.3.1. Merokrine Sekretion

Drüsen mit einem merokrinen, früher auch ekkrin genannten, Sekretionsmechanismus gehören zu den häufigsten im Organismus. Es werden Sekretgranula, die vom perinukleären Teil der Zelle oder vom Golgi-Apparat kommen, im apikalen Teil für die Sekretion bereitgehalten. Dadurch sind die Drüsenzellen sekretionsbereit. Die Bläschen, die noch von der Membran des Golgi-Apparates umschlossen sind, lagern sich an die Innenfläche der Zellmembran an. Durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt es zur Verschmelzung der Membran der Granula mit der Zellmembran und als Folge zur Freisetzung des Inhaltes. So ist bei diesem Mechanismus keine Volumenschwankung der Zelle nachweisbar.

Die merokrine Sekretion kommt vor allem bei Drüsen mit hoher Sekretionsleistung, wie z.B. Speicheldrüsen, Drüsen des Geschlechtsapparates und allen endokrinen Drüsen vor.

In der Prostata wurde dieser Sekretionsmechanismus zuerst von Brandes (1966) beschrieben. Bestätigt wurde diese Beobachtung u.a. von Helminen und Ericsson (1970) sowie Flickinger (1974). Groos et al. (1999) konnten einen merokrinen Sekretionsmechanismus für ein 115k Protein nachweisen.

In den Glandulae urethrales, die sich aus tubulären Schleimdrüsen aufbauen und die Homologie der Prostata bei der Frau darstellen, konnte ebenfalls ein merokriner Sekretionsmechanismus nachgewiesen werden (Zaviacic et al. 2000).

1.3.2. Apokrine Sekretion

Bei der apokrinen Sekretion sammeln sich die Sekretproteine oder große Sekretgranula im apikalen Teil der Drüsenzelle. Diese schnüren sich bei der Sekretion mit einem Teil der Zellmembran in den Ausführungsgang ab. Dadurch nimmt das Zellvolumen nach mehrmaliger Sekretion ab und das Epithel wird niedriger. Diese lichtmikroskopische Beobachtung kann zum Teil auch auf die Kontraktion von Myoepithelzellen, welche das Drüsenendstück umfassen, zurückzuführen sein. Das entstandene Volumendefizit muß in den Ruhephasen der Zelle wieder ausgeglichen werden. So haben Drüsen diesen Typs verschieden hohe Epithelien und wechselnde Mengen Sekret in ihren alveolären Endstücken.

Apokrin sezernierende Zellen existieren in der Milchdrüse, Glandulae ceruminosae, Glandulae ciliares, Schweißdrüsen (Kurosumi et al., 1984), Plexus choroideus (Gudeman et al., 1989) und in menschlichen olfaktorischen Drüsen (Lucheroni et al., 1986).

Auch in der menschlichen Prostata (Mao et al., 1965; Aumüller, 1979), und in der Koagulationsdrüse der Ratte (Nicander et al., 1974, Aumüller und Adler, 1979) ist dieser Sekretionsmechanismus nachgewiesen worden. In der Koagulationsdrüse konnte nach Kopulation eine erhöhte Abschnürung apikaler Blasen mit 50-100 nm

Durchmesser nachgewiesen werden (Hawkins und Geuze 1977). Als sekretorisches Protein wird die sekretorische Transglutaminase von den Epithelzellen der Prostata auf diesem Weg sezerniert (Aumüller et al., 1989; Seitz et al., 1990). Wilhelm et al. (1998) wiesen diesen Mechanismus für die Sekretion von Carboanhydrase II in der Prostata nach. Auch ein 66k Protein wird durch apokrine Sekretion sezerniert (Wilhelm et al. 1999).

Cohen et al. (2000) fanden Hinweise darauf, daß ein apokriner Sekretionsmechanismus im gesunden Gewebe der Prostata vorkommt, wahrscheinlich aber nicht im Prostatakarzinom. Dabei geht jedoch nicht die Sekretionsfähigkeit verloren, denn eine Schleimsekretion ist auch im pathologischen Gewebe noch nachweisbar.

1.3.3. Holokrine Sekretion

Die holokrinen Drüsen besitzen ein mehrschichtiges Epithel. In diesem Epithel wandern die Zellen von der Basalmembran nach apikal und werden dort als Zelltrümmer in den Ausführungsgang abgestoßen. Gleichzeitig entstehen an der Basalmembran durch Mitose neue Zellen. Während der Wanderung werden so viele Sekretgranula gebildet, daß diese zum Schluß die ganze Zelle ausfüllen, der Zellkern wird pyknotisch und das Zytoplasma zerfällt. Als Folge zerplatzt die Zelle und entläßt ihren Inhalt in den Ausführungsgang der Drüse.

Typisches Beispiel für diesen Sekretionstyp sind die Talgdrüsen (*Glandulae sebaceae*), die an den Haarbälgen und in verschiedenen Schleimhäuten vorkommen, so z.B. in den Wangen und am Anus. Auch an Augenlid, Nasenflügel, Labium minus pudendi und im Praeputium penis sind sie vorhanden.

Zwischen holokriner und apokriner Sekretion konnten Stoeckelhuber et al. (2000) einen engen morphologischen Zusammenhang darstellen. In elektronenmikroskopischen Studien wiesen sie in verschiedenen Drüsen eine oberflächliche Schicht aus holokrinen Talgdrüsen mit darunterliegenden apokrinen Duftdrüsen nach. Redcrest et al. (2001) beschrieben ein enges Zusammenspiel dieser Drüsen bei der Thermoregulation. Ihre Sekrete sorgen durch Emulsifikation des

merokrin sezernierten Schweißes für eine gleichmäßige Schweißschicht auf der Haut. Somit wird eine Tropfenbildung auf der Haut und damit übermäßigen Wasserverlust verhindert und andererseits eine adäquate Wärmeabgabe gewährleistet.

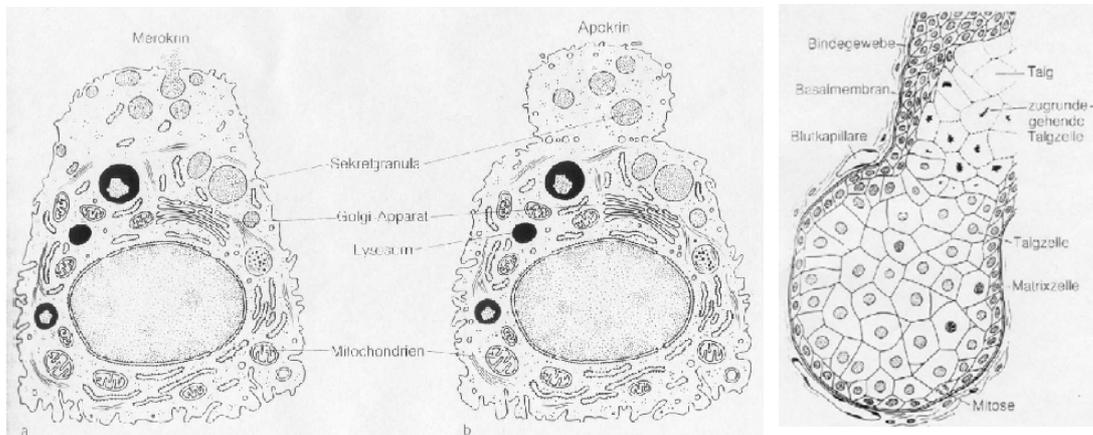


Abb. 1.1: Schematische Darstellung von merokriner, apokriner und holokriner Sekretion (aus Schiebeler, Schmidt: Anatomie, 5. Auflage)

1.3.4. Diacytose

Es handelt es sich um die Sekretion von Sekretgranula, die als ganzes, d.h. mit ihrer umgebenden Membran ausgeschleust werden. Brody et al. (1983) gaben diesem Sekretionsmechanismus den Namen „Diacytose“. In der humanen Prostata handelt es sich um Vesikel, Prostatasomen genannt, die von einer tri- oder multilamellären Membran umgeben sind. Sie können sowohl in der Prostata als auch in ihrem Sekret in großen Mengen nachgewiesen werden. Für die Prostatasomen wird noch ein zweiter Weg der Sekretion in das Drüsenlumen diskutiert: die Fusion der Membran der Granula mit der Zellmembran und Freisetzung der Prostatasomen (Brody et al., 1983). Nilsson et al. (1996) konnten einen monoklonalen Antikörper herstellen, der eine selektive Affinität zu einem 35 kd Protein der Prostatasomen hat und so eine spezifische Darstellung von Prostatasomen erlaubt. Weiterhin konnten in den Prostatasomen mehrere Neuropeptide nachgewiesen werden, die als Marker für neuroendokrine Zellen gelten. So konnten NPY, VIP, Chromogranin B und Synaphophysin dargestellt werden (Stridsberg et al. 1996). Ein interessantes Ergebnis über mögliche Funktionen der

Prostasomen lieferte eine Studie von Carlsson et al. (2000). Die Autoren konnten in Zellkulturen einen wachstumshemmenden Effekt auf Zelllinien von Prostatakarzinomen nachweisen.

In den meisten Drüsen ist nur ein Sekretionsmechanismus vorhanden. Es wurde jedoch auch nachgewiesen, daß mehrere Sekretionsmechanismen in einer Drüsenzelle vorkommen können. So konnte in der Brustdrüse apokrine und merokrine Sekretion nachgewiesen werden. Hier werden die Milchfette apokrin und die Milchproteine merokrin sezerniert. Auch in der Koagulationsdrüse der Ratte kommen innerhalb der selben Zelle apokrine (Transglutaminase) und merokrine (115 K Protein) Sekretion vor. Die Koexistenz von diesen beiden Mechanismen in der Prostata wurde u.a. von Kachar und Pinto da Silva (1980) beschrieben.

1.4. Zellen der Prostata

Die Prostata ist eine androgenabhängige akzessorische Geschlechtsdrüse, deren Epithel die folgenden drei verschiedenen Zelltypen enthält: 1. Basalzellen, 2. Drüsenzellen und 3. neuroendokrine Zellen.

1.4.1. Basalzellen

Die Basalzellen der Prostata sind zwischen der Basalmembran und den Oberflächenzellen lokalisiert. Morphologisch sind sie flach, oval oder linsenförmig und enthalten im Gegensatz zu den neuroendokrinen und Drüsenzellen keine Sekretgranula, haben also keine sekretorische Funktion.

Basalzellen gelten als Vorläuferzellen der Drüsenzellen (DeMazo et al. 1998). Durch Proliferation und Umwandlung in Drüsenzellen haben sie wichtige Funktionen bei der ständigen Zellerneuerung, insbesondere nach Epithelschädigung. So bilden sie den überwiegenden Teil der proliferierenden Zellen der Prostata (McNeal et al. 1995). Bei

der Erneuerung der Prostata nach Kastration und anschließender Androgenbehandlung konnte im Tierversuch den Basalzellen eine Schlüsselrolle nachgewiesen werden (Leav et al. 1978). Diese proliferativen Eigenschaften der Basalzellen lassen vermuten, daß sie auch bei der Genese des Prostatakarzinoms eine bedeutende Funktion haben, auch wenn im Karzinomgewebe keine Basalzellen nachgewiesen werden konnten (Yang et al. 1999).

1.4.2. Drüsenzellen

Die Drüsenzellen leiten sich aus den Basalzellen ab und wandern nach ihrer Differenzierung aufgrund der basalen Zellerneuerung in Richtung Drüsenlumen und werden schließlich in das Lumen abgestoßen. Ihre Funktion liegt u.a. in der Bildung des Sekretes der Prostata, welches unter anderem saure Phosphatase, Prostata spezifisches Antigen (PSA), Zitronensäure und Zink beinhaltet. Die dem Lumen zugewandten Zellen des Epithels werden in fünf funktionell unterschiedliche Zonen unterteilt: apikale, supranukleäre, Golgi, nukleäre, und basale Zone. Diacytose kommt in diesen Zellen als Sekretionsmechanismus für Prostatosomen vor, aber auch mero- und apokrine Sekretionsmechanismen wurden in der Prostata nachgewiesen (Hohbach und Ueberberg, 1982; Seitz et al., 1990)

1.4.3. Neuroendokrine Zellen

1.4.3.1. Merkmale neuroendokriner Zellen

Bei den neuroendokrinen Zellen handelt es sich um:

1. Nervenzellen, die Hormone bilden können, insbesondere Peptide und Amine,
2. Zellen peripherer Organe, die gleiche Hormone bilden können wie die hormonbildenden Nervenzellen.

Diese endokrinen Zellen enthalten gleichzeitig biogene Amine und/oder deren Vorläufer sowie Polypeptide mit hormonaler Aktivität. Weiterhin ist im Zytoplasma

eine hohe Aktivität verschiedener Aminosäuredecarboxylasen nachweisbar. Aus diesem Grund wurden diese Zellen, die in unterschiedlichen Geweben vorkommen (z.B. Pankreas, Magen-Darm-Trakt, Schilddrüse), unter dem Namen APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation)- Zellen zusammengefaßt. Dieser Name wurde von Pearse (1969) geprägt. Die Fähigkeit dieser Zellen biologisch aktive Vorstufen aufzunehmen, diese durch intrazelluläre Dekarboxylierung in aktive Amine zu verwandeln und sie dann in sekretorischen Vesikeln zu speichern, wurde erstmals von Pearse (1966) beschrieben. Die Sekretion der gespeicherten Amine aus Vesikeln ist pH-Abhängig. Blackmore et al. (2001) konnten zeigen, daß der pH-Wert durch die Amin-Transporter geregelt wird, welche durch Antiport bei Amin-Aufnahme die Azidität der Zelle senken. Heute werden über 40 verschiedene Zelltypen zu dieser Gruppe gezählt. Neben den genannten Gemeinsamkeiten zeigen sich in der Ultrastruktur weitere morphologische Kennzeichen:

1. großer Zellkern mit voluminösem Nukleolus,
2. viele Mitochondrien,
3. viel rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER),
4. großer Golgi-Apparat,
5. das Vorkommen 100-200 nm großer Sekretgranula, die sich im apikalen Teil der Zelle sammeln und die entsprechenden Peptide enthalten.

Diese Peptide müssen nicht ausschließlich von den Zellen synthetisiert werden, sondern können auch zum Teil in die Zelle aufgenommen werden. In den klassischen neuroendokrinen Zellen des Hypothalamus (neurosekretorische Zellen) werden die synthetisierten Peptide im Perikaryon in die Sekretgranula verpackt, welche dann im Axon mit dem axoplasmatischen Fluß zum Axonende transportiert werden. Dort können sie in die Kapillaren sezerniert werden.

1.4.3.2. Neuroendokrine Zellen der Prostata

Die in der Prostata vorkommenden neuroendokrinen Zellen wurden zuerst von Pretl (1944) beschrieben und 1951 von Feyrter bestätigt. Sie können durch Elektronenmikroskopie (Fétissof et al., 1983; Abrahamsson et al., 1986) oder durch

verschiedene Färbemethoden (z.B. Silberfärbung, Fétissof et al., 1983; Abrahamsson, 1988) identifiziert werden. Charakteristisch für die Zellen ist das Vorkommen verschiedener Peptide, welche bei Bedarf sezerniert werden können. Hierbei handelt es sich z.B. um Neuropeptid Y (NPY), Substanz P (SP), vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), Calcitonin-gene-related Peptide (CGRP), Bombesin (Bom), Somatostatin (Som), Serotonin (5-HT) oder Dopamin- β -Hydroxylase (DBH). Über das Vorkommen der verschiedenen Peptide in der Prostata gibt es eine Vielzahl von Studien:

Larsen et al. (1981) beschrieben das Vorkommen von VIP in Nerven des menschlichen männlichen und weiblichen Genitaltraktes. Die Autoren beschrieben eine scheinbare Innervation von epithelialen Zellen und Gefäßen mit VIP-positiven Nervenfasern unter anderem in Prostata, Blase, Urethra und Ductus deferens. Die Innervation mit verschiedenen anderen peptidergen Nerven beschrieben Gu et al. (1983), welche die Anwesenheit von VIP, SOM, SP und peptide-like avian pancreatic polypeptide, ebenfalls in menschlichem Gewebe, nachwiesen. In dieser Studie wurde die Abwesenheit von Leu-Enkephalin (L-ENK) und Met-Enkephalin (M-ENK) postuliert, jedoch konnten auch diese Peptide bald nachgewiesen werden (Vaalasti et al., 1986; Aumüller et al., 1989, Jungblut et al., 1989). Auch NPY-immunreaktive Nervenfasern konnten beschrieben werden (Lange und Unger, 1990). In dieser Arbeit wurde die Abwesenheit des Peptides SP angenommen; SP wurde ebenfalls später nachgewiesen (Tainio, 1995). Auch DBH-immunreaktive und CGRP-immunreaktive Ganglienzellen und Nervenfasern konnten in humanem Gewebe identifiziert werden (Crowe et al., 1991).

In den neuroendokrinen Zellen liegt nicht ausschließlich nur ein einziges Neuropeptid vor, sondern es sind auch Kollokalisierungen verschiedener Peptide beschrieben worden: die Kollokalisierung von VIP mit Acetylcholin und NPY mit Tyrosinhydroxylase (TH) in adrenergen Nerven konnte nachgewiesen werden (Varndell und Polak, 1988; Sisto et al., 1989; Yuri, 1990). Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung daß es sich bei neuroendokrinen Zellen um Subpopulationen von sympathischen und parasympathischen Neuronen handelt (Vaalasti, 1994). In folgender Zeit wurden weitere Kollokalisierungen nachgewiesen: in neuroendokrinen Zellen der menschlichen Bläschendrüse, Ductus deferens und im fibromuskulären Stroma der Prostata liegt eine

Kolokalisation von TH und NOS vor (Jen et al., 1996). Weiterhin kommen Stickoxydsynthase (NOS)- und VIP-Immunreaktionen generell kolokalisiert in varikösen Nervenendigungen der humanen Prostata vor (Hedlund et al., 1997).

In den anderen Strukturen des männlichen Genitaltraktes wurden ähnliche Innervationen mit peptidergen Nerven festgestellt. So finden sich in Bläschendrüse und Ductus deferens die folgenden Peptide in absteigender Häufigkeit: NPY, VIP, CGRP, L-ENK (Tainio, 1995). Bei der Innervation der verschiedenen Drüsen wurden in dieser Studie auch einige Unterschiede festgestellt: M-Enkephalinerge und SP-positive Nervenfasern konnten zwar in der Prostata, jedoch nicht in der Bläschendrüse und im Ductus deferens nachgewiesen werden.

Im erwachsenen Goldhamster wurde auch eine altersabhängige quantitative Veränderung von peptidergen Nerven beschrieben (Chow et al., 1997). In diesem Experiment wurde eine Abnahme der Dichte NPY- und DBH-immunreaktiver Nerven um die Hälfte zwischen der zehnten und der 52. Lebenswoche nachgewiesen. In älteren Tieren änderte sich die Dichte nicht mehr.

1.4.3.3. Achaete Scute Homologue in neuroendokrinen Zellen

Die Helix-Loop-Helix (HLH)-Genfamilie bildet eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die eine bedeutende regulatorische Funktion in vielen Schritten der Differenzierung und Entwicklung haben (Murre et al., 1989; Sun und Baltimore, 1991). Diese beinhalten Regulation von Neurogenese, Myogenese, Zellproliferation, Differenzierung von Zelllinien und andere wichtige Prozesse im Organismus. Diese Familie beinhaltet über 200 Proteine, die ubiquitär vorkommen, so z.B. auch im Menschen und in Hefepilzen (Review von Littlewood und Evan 1995, sowie Massari und Murre 2000). Helix-Loop-Helix Proteine sind durch zwei hochkonservierte Domänen charakterisiert, die für DNA-Bindung und für Protein-Protein-Interaktion zuständig sind (Murre et al., 1994). Eine überwiegend basische (basic) Sequenz erlaubt HLH-Proteinen an ein spezifisches Hexanukleotid der DNA (E-Box) zu binden und auf diese Weise eine regulative Funktion auszuüben. Eine weitere Sequenz aus überwiegend hydrophoben Anteilen (helix-loop-helix) ermöglicht

die Bildung von Homo- oder Heterodimeren. Diese Region, von etwa 60 Aminosäuren Länge, beinhaltet zwei α -Helices, welche von einem kürzeren, aber in der Länge variablen Loop getrennt sind. Einige HLH-Proteine weisen ein häufiges Leucin-Repeat (Leucine Zipper) auf, das sich unmittelbar an die HLH-Region anschließt. Je nach Vorkommen dieser Domänen können mindestens folgende Hauptgruppen unterschieden werden:

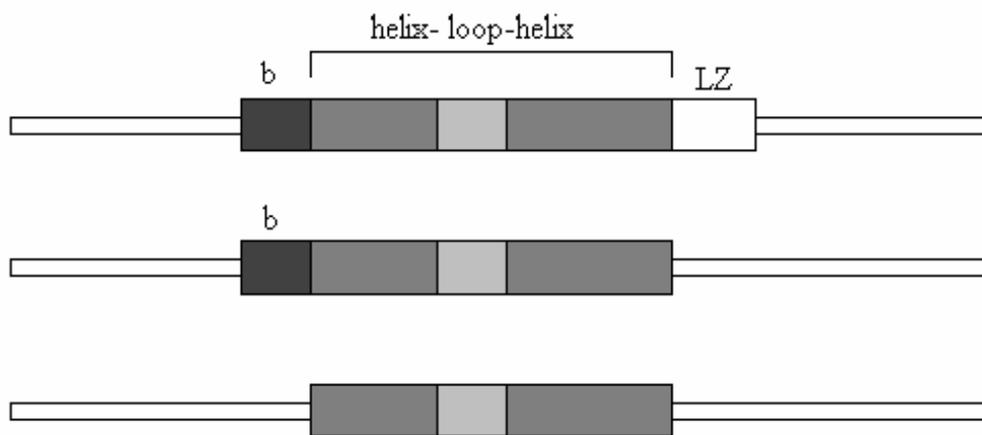


Abb. 1.2.: Schematische Struktur der vier HLH Proteinfamilien. Die basische (basic) Region (b) und Leucine Zipper (LZ) Domäne ist nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Zu der bHLH-Familie gehören auch Proteine mit dem Achaete Scute Complex (ASC). Sie kommen in verschiedenen Spezies mit unterschiedlichem Grad der Homologie vor. Nachgewiesen wurde es zum Beispiel in der *Drosophila* (Achaete Scute), verschiedenen Säugetieren (mammalian achaete scute homologue, MASH) und dem Menschen (human Achaete Scute Homologue, hASH), wo es auf Chromosom 12 lokalisiert wurde.

In verschiedenen Arbeiten wurde dargestellt, daß bei Unter- oder Überproduktion des MASH-Proteins erhebliche morphologische und funktionelle Defizite in entsprechenden Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems auftreten (Hirsch et al. 1998). Gliazellen werden im Gegensatz zu den Nervenzellen nicht betroffen (Guillemot et al. 1993).

Auch in neuroendokrinen Zellen und Tumoren mit neuroendokriner Differenzierung spielt die Expression von MASH eine wichtige Rolle. Lo et al. (1991) beschrieben, daß das Protein in Zellen exprimiert wird, die sich aus der Neuralleiste ableiten, welches vermutlich auch für neuroendokrine Zellen zutrifft. Chen et al. (1997) konnten Hinweise für das essentielle Vorkommen von MASH in neuroendokrinen Zellen finden. Auch die Regulation neuroendokriner Differenzierung in der fetalen Lunge der Maus wird von bHLH-Transkriptionsfaktoren, wie u.a. MASH, bestimmt (Ito et al. 2000).

1.5. Innervation der Prostata

Die Prostata erhält eine reichliche Innervation von sympathischen und parasympathischen Nerven. Die sympathische Innervation erfolgt über den sympathischen Grenzstrang und kurze adrenerge Neuronen (Owman und Sjöstrand, 1965). Vom Grenzstrang ausgehend erreichen die Fasern entweder über die Nn. hypogastrici dexter et sinister oder als Nn. splanchnici sacrales den Plexus hypogastricus inferior. Immunhistochemische Studien konnten nachweisen, daß diese Nerven über die Kapsel der Prostata und die glatte Muskulatur verlaufen und daß eine starke Innervation der Ausführungsgänge existiert (Vaalasti und Hervonen, 1980 a)

In normalem Prostatagewebe ist eine dichte Innervation mit adrenergen Nerven vorhanden. Diese Nerven innervieren vor allem die glatte Muskulatur (Norberg et al., 1967; Owman und Sjöstrand, 1965). Im Gegensatz dazu finden sich in der hyperplastischen Prostata, sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch nur noch sehr wenige adrenerge Nerven (Vaalasti und Hervonen, 1980a; Vaalasti und Hervonen, 1980b).

Die parasympathische Innervation der Prostata stammt aus den Segmenten S2-S5 des Rückenmarks; von dort gelangen sie als Nn. splanchnici pelvici über den N. pudendus zum Plexus hypogastricus inferior und weiter zur Prostata (Plexus prostaticus).

Die bevorzugte Lokalisation der cholinergen Nervenendigungen liegt in der Prostata unter der Basalmembran des Epithels. In ultrastrukturellen Studien (Vaalasti und Hervonen, 1979; Vaalasti und Hervonen, 1980 a) wurde nachgewiesen, daß sich dort

viele Nervenendigungen befinden, die die Basalmembran niemals durchbrechen. Ein direkter Kontakt von Nerven und Epithelzellen konnte nicht dargestellt werden. Vaalasti (1994) beschrieb cholinerge Nerven mit Kontakt zur glatten Muskulatur sowie Lokalisation um Blutgefäße.

1.6. Bedeutung der Innervation

Die Innervation des Epithels erfolgt hauptsächlich über cholinerge Nerven. Diese haben überwiegend Funktionen in der Steuerung der Sekretion.

Der Verabreichung von β -adrenergen Agonisten folgt in der Rattenprostata eine Zunahme der Produktion des sekretorischen Proteins PBP und eine Zunahme von m-RNA-expression (Thompson et al., 1987). Daraus schließen die Autoren auf eine Beteiligung der sympathischen, adrenergen Nerven an der Regulierung der m-RNA-Expression, Synthese und Sekretion der Prostata. Weiterhin sind in dieser Arbeit Katecholamine als mitogene Faktoren für verschiedene Zelltypen identifiziert worden, hierunter auch die stromalen Zellen der Prostata.

Die Innervation der glatten Muskulatur durch sympathische Nerven, die im ganzen männlichen Genitaltrakt vorhanden ist spielt bei der Ejakulation, Erektion und Emission eine bedeutende Rolle. Durch Kontraktion der glatten Muskulatur in den einzelnen Drüsen werden die verschiedenen Sekrete aus den Ausführungsgängen ausgepreßt.

1.7. Funktionen von Neuropeptiden

In den meisten Drüsen besteht eine Innervation durch Neurone in denen Neuropeptide vorhanden sind. Über deren Funktion in den männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen herrscht noch weitgehend Unklarheit, jedoch gibt es einige Studien über ihre Funktion in anderen Drüsen, z.B. den Speicheldrüsen.

In den sechziger Jahren wurde herausgefunden, daß die Produktion und Sekretion von Speichel nicht nur über die klassischen Transmitter des Sympathikus (Noradrenalin)

und des Parasympathikus (Acetylcholin) geregelt wird. So fanden Bertaccini und DeCaro (1965) heraus, daß Physalaemin die Speichelsekretion auslösen kann. Auch für SP konnte diese Wirkung kurze Zeit später nachgewiesen werden (Leeman und Hammerschlag, 1967; Lembeck und Starke, 1968). Diese Ergebnisse bezogen sich auf Tierversuche unter der Gabe von Substanzen, die die Wirkung von Acetylcholin (ACh) und Noradrenalin (NA) aufhoben. Später konnte auch gezeigt werden, daß eine Atropin-resistente Speichelsekretion unter Stimulation der parasympathischen Nerven bei Ratten (Thulin, 1976; Ekström et al. 1983) und Frettchen erfolgt (Ekström und Olgat, 1986). Etwa zeitgleich wurden verschiedene Neuropeptide in den Nerven der Speicheldrüsen entdeckt, z.B. SP (Hökfelt et al., 1977), VIP (Wharton et al., 1979; Uddman et al., 1980) und CGRP (Ekman et al., 1986).

Ekström (1987) fand in einem in vivo-Experiment an der Glandula parotis der Ratte heraus, daß es in der Abwesenheit von Atropin bei Reizung des parasympathischen Nerven zu einer nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Transmitterfreisetzung kommt. Als Transmitter wurden SP, VIP, CGRP und Substanz K (SK) beschrieben. Diese sind für die Sekretion von Amylase und auch für die wässrige Sekretion mitverantwortlich. Keines der genannten Peptide indiziert alleine die atropinresistente parasympathische Sekretion. Die Wirkung der einzelnen Peptide war unterschiedlich: SP und SK waren für eine wässrige Sekretion verantwortlich, während VIP eine kleine Menge eines amylasereichen Sekretes hervorrief. Es gibt also Hinweise auf den modulierenden und oder regulierenden Effekt der peptidergen Innervation auf die Sekretion von Speichel.

Im männlichen Genitaltrakt konnten ebenfalls Effekte von verschiedenen Neuropeptiden nachgewiesen werden: VIP inhibiert konzentrationsabhängig die Kontraktionen der glatten Muskulatur von Prostata, Blase, Urethra, und Ductus deferens (Larsen et al., 1981). Außerdem wird eine Funktion in der Regulation der Sekretion angenommen (Moss et al., 1987). Stickoxyd (NO) und die elektrische Stimulation von Nerven können eine durch Noradrenalin ausgelöste Kontraktion wieder relaxieren (Hedlund et al., 1997). Es existiert also wie auch bei VIP eine muskelrelaxierende Wirkung.

Dagegen ist für NPY eine kontrahierende Wirkung auf die glatte Muskulatur bekannt (Yuri, 1990). Dieses könnte bei dem Transport von Sekreten in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen eine Rolle spielen und könnte auch eine Rolle als Antagonist zu VIP bei der Kontrolle des Muskeltonus spielen (Larsen et al., 1981; Polak und Bloom, 1984).

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

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

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Über die neuroendokrinen Zellen in der menschlichen Prostata gibt es, wie oben dargestellt, schon verschiedene Untersuchungen. Aufgefallen sind vor allem eine Vielzahl an unterschiedlichen Peptiden, während es über die Funktionen noch keine genauen Vorstellungen gibt. Bei der histologischen Darstellung neuroendokriner Zellen der Prostata können verschiedene Zellmorphologien dargestellt werden, welche bisher erst selten Gegenstand von Forschungsarbeiten waren. Es können runde, bipolare und multipolare Zellen unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob eine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Zellmorphologien und den vorhandenen Neuropeptiden in den neuroendokrinen Zellen der menschlichen Prostata besteht. Dazu sollte die Immunhistochemie und die in situ-Hybridisierung als Methoden verwendet werden.

Im Einzelnen bestanden folgende Fragestellungen:

1. Besteht eine Innervation neuroendokriner Zellen in der Prostata?
2. Welche Neuropeptide können mittels der Immunhistochemie in den neuroendokrinen Zellen der menschlichen Prostata identifiziert werden?

3. In welchem Umfang bestehen Kollokationen verschiedener Neuropeptide in den neuroendokrinen Zellen?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Zellmorphologie und verschiedenen in den Zellen enthaltenen Neuropeptiden?
5. Können neuroendokrine Zellen durch die in situ-Hybridisierung mit geeigneten Sonden in der menschlichen Prostata dargestellt werden?

Fernziel der Arbeit sollte sein einen Beitrag zur Aufklärung der verschiedenen Funktionen neuroendokriner Zellen zu leisten. Sicherlich bedarf es auch nach Abschluß dieser Arbeit weiteren Untersuchungen, um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen und zu vertiefen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Geräte

2.1.1. Gewebeaufbereitung und Mikroskopie

Lichtmikroskop	Leica, Bensheim
Photomikroskop Leica DMRE+DMRD	Leica, Bensheim
Photomikroskop Olympus AX 70	Olympus, Hamburg
Schlittenmikrotom	Jung, Heidelberg

2.1.2. in situ-Hybridisierung

PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
--------------------------------	---------------------------------------

2.1.3. Elektrophorese und Blotting

Electrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia, Freiburg
Film: Polaroid 667 ohne Negativ	
Gelelektrophoreseapparatur	Pharmacia, Freiburg und Stratagene, Heidelberg
Rollenhybridisierungsöfen	MWG Biotech, Ebersberg
Sofortbildkamera	Polaroid MP-4 Land Camara
UV-Transilluminator	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf

2.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PTC 100 Programmable Thermal Cycler

Biozym Diagnostik,

Hess. Oldendorf

MilliQ-Reinstwasseranlage

Millipore, Eschborn

Ionenaustauscherbombe

Christ, Osterode/Harz

2.2. Gewebe

Es wurden Gewebeproben von den folgenden Organen bearbeitet: Prostata, Bläschendrüse, Ductus deferens, Hoden und Nebenhoden wurden bei einem 43jährigen Mann entnommen. Das postmortale Intervall bis zur Sektion und der Entnahme der Proben betrug ca. 2 h 30 min.

Das Gewebe wurde freundlicherweise von Dr. Larsch vom Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover, Außenstelle Oldenburg zur Verfügung gestellt. Als Vergleichsmaterial standen Paraffinschnitte aus Routineobduktionen standen Prostatae von etwa 20 weiteren Individuen im Alter zwischen 10. Schwangerschaftswoche und 67 Jahren zur Verfügung. In diesen Schnitten fanden sich auch Prostatae mit benigner Prostatahyperplasie und Karzinomen.

Weiterhin wurden die folgenden Kulturzellen verwendet:

LNCaP (LymphNode Carcinoma of the Prostate),

Du145,

hPCPs

2.3. Chemikalien

Die nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.3.1. Gewebeaufbereitung, Standardfärbung

Corbit Balsam	Merck, Darmstadt
Eosin Phloxin	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin nach Mayer	Merck, Darmstadt
Histocomp	Vogel, Gießen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt

2.3.2. Immunhistochemie

2.3.2.1. Antikörper

Tabelle 2.1.: verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Code	Quelle	Verdünnung	Spezies
Alkalische Phosphatase konjugiertes Anti-Kaninchen IgG	A 8025	Sigma, Deishofen	1:100	Ziege, polyklonal
Biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG (H+L)	BA-1000	Vector Laboratories, Burlingame, USA	1:200	Ziege, polyklonal
Biotinyliertes Anti-Maus IgG (H+L)	BA-2001	Vector Laboratories, Burlingame, USA	1:200	Pferd, polyklonal

Tabelle 2.2.: verwendete Primärantikörper

Antikörper	Code	Quelle	Verdünnung	Spezies
Calcitonin	1629	Immunotech, Marseille, Frankreich	unverdünnt	Kaninchen, polyklonal
CgA	A0430	DAKO A/S Dänemark	1:2000	Kaninchen, polyklonal
CgA	M 0869	DAKO A/S	1:1000	Maus, monoklonal
GRP	A 429	DAKO A/S	1:500	Kaninchen, polyklonal
NSE	NA 1237	Biotrend, Köln	1:1000	Kaninchen, polyklonal
PGP 9,5	V 3231	BIOMEDA Foster City, USA	1:4000	Maus, monoklonal
Serotonin	20080	Incstar Corporation, Stillwater, USA	1:4000	Kaninchen, polyklonal
VACHT		Prof. Dr. Weihe Uni Marburg	1:4000	Kaninchen, polyklonal
VEGF	Sc 152	Santa Cruz, Heidelberg	1:100	Maus, monoklonal
VEGF	SC 7269	Santa Cruz, Heidelberg	1:1000	Maus, polyklonal
VMAT1		Prof. Dr. Weihe, Uni Marburg	1:2000	Kaninchen, polyklonal
VMAT2		Prof. Dr. Weihe, Uni Marburg	1:2000	Kaninchen, polyklonal

weitere verwendete Chemikalien:

ABC (Avidin-Biotin-Complex) Vectastain ABC-kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
BSA (Rinder Serum Albumin)	Serva, Heidelberg
DAB (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat)	Sigma, Deishofen
Dinatriumhydrogenphosphat 2-hydrat	Merck, Darmstadt
Fast Red TR Salt	Sigma, Deishofen
H ₂ O ₂ , medizin. reinst	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nickel (Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat) purum >98%	Fluka, Buchs, CH

2.3.3. in situ-Hybridisierung

Amberlite Ionenaustauschergel	Serva, Heidelberg
Anti-DIG Fab alkalische Phosphatase Konjugat	Boehringer, Mannheim
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate)	Promega, Heidelberg
tRNA von Bierhefe	Boehringer, Mannheim
BSA Fraktion V	Serva, Heidelberg
Denhardts 50X	Eurobio, Frankreich
Dextransulfat	Eurobio, Frankreich
Dithiotreithol	Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Roth, Karlsruhe
Fixogum	Marabu, Tamm
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Serva, Heidelberg
Kaisers Glyceringelatine	Serva, Heidelberg
Levamisol	Sigma, Deisenhofen
NBT (Nitro Blue Tetrazolium)	Promega, Heidelberg
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen

Pronase

Sigma, Deisenhofen

Proteinase K

Roth, Karlsruhe

TEA (Triethanolamin)

Merck, Darmstadt

HASH1-Sonde:

1	CCCGAGACCC	GGCGCAAGAG	AGCGCAGCCT	TAGTAGGAGA	GGAACGCGAG
51	ACGCGGCAGA	GCGCGTTCAG	CACTGACTTT	TGCTGCTGCT	TCTGCTTTTT
101	TTTTTCTTAG	AAACAAGAAG	GCGCCAGCGG	CAGCCTCACA	CGCGAGCGCC
151	ACGCGAGGCT	CCCGAAGCCA	ACCCGCGAAG	GGAGGAGGGG	AGGGAGGAGG
201	AGGCGGCGTG	CAGGGAGGAG	AAAAAGCATT	TTCACCTTTT	TTGCTCCAC
251	TCTAAGAAGT	CTCCCGGGGA	TTTTGTATAT	ATTTTTTAAC	TTCCGTCAGG
301	GCTCCCGCTT	CATATTTCCCT	TTTCTTTCCC	TCTCTGTTCC	TGCACCCAAG
351	TTCTCTCTGT	GTCCCCCTCG	CGGGCCCCGC	ACCTCGCGTC	CCGGATCGCT
401	CTGATTCCGC	GACTCCTTGG	CCGCCGCTGC	GCA <u>ATG</u> GAAAG	CTCTGCCAAG
451	<u>ATG</u> GAGAGCG	GCGGCGCCGG	CCAGCAGCCC	CAGCCGCAGC	CCCAGCAGCC
501	CTTCCTGCCG	CCCGCAGCCT	GTTTCTTTGC	CACGGCCGCA	GCCGCGGCGG
551	CCGCAGCCGC	CGCAGCGGCA	GCGCAGAGCG	CGCAGCAGCA	GCAGCAGCAG
601	CAGCAGCAGC	AGCAGCAGCA	GCAG GCGCCG	CAGCTGAGAC	CGGCGGCCGA
651	CGGCCAGCCC	TCAGGGGGCG	GTCACAAGTC	AGCGCCCAAG	CAAGTCAAGC
701	GACAGCGCTC	GTCTTCGCCC	GAAGTATGTC	GCTGCAAACG	CCGGCTCAAC
751	TTCAGCGGCT	TTGGCTACAG	CCTGCCGCAG	CAGCAGCCGG	CCGCCGTGGC
801	GCGCCGCAAC	GAGCGCGAGC	GCAACCGCGT	CAAGTTGGTC	AACCTGGGCT
851	TTGCCACCCT	TCGGGAGCAC	GTCCCCAACG	GCGCGGCCAA	CAAGAAGATG
901	AGTAAGGTGG	AGACACTGCG	CTCGGCGGTC	GAGTACATCC	GCGCGCTGCA
951	GCAGCTGCTG	GACGAGCATG	ACGCGGTGAG	CGCCGCCTTC	CAGGCAGGCG
1001	TCCTGTGC	CACCATCTCC	CCCAACTACT	CCAACGACTT	GAACTCCATG
1051	GCCGGCTCGC	CGGTCTCATC	CTACTCGTCG	GACGAGPGCT	CTTACGACCC
1101	GCTCAGCCCC	GAGGAGCAGG	AGCTTCTCGA	CTTACCAAC	TGGTCT <u>AG</u>
1151	GGGCTCGGCC	TGGTCAGGCC	CTGGTGCGAA	TGGACTTTGG	AAGCAGGGTG
1201	ATCGCACAAAC	CTGCATCTTT	AGTGCTTTCT	TGTCAGTGGC	GTTGGGAGGG
1251	GGAGAAAAGG	AAAAGAAAAA	AAAAGAAGAA	GAAGAAGAAA	AGAGAAGAAG
1301	AAAAAAACGA	AAACAGTCAA	CCAACCCCAT	CGCCAATAA	GCGAGGCATG
1351	CCTGAGAGAC	ATGGCTTTCA	GAAAACGGGA	AGCGCTCAGA	ACAGTATCTT
1401	TGCACTCCAA	TCATTCACGG	AGATATGAAG	AGCAACTGGG	ACCTGAGTCA
1451	ATGCGCAAAA	TGCAGCTTGT	GTGCAAAAAGC	AGTGGGCTCC	TGGCAGAAGG
1501	GAGCAGCACA	CGCGTTATAG	TAACCTCCAT	CACCTCTAAC	ACGCACAGCT
1551	GAAAGTTCTT	GCTCGGGTCC	CTTACCTCC	CCGCCCTTTC	TTAGAGTGCA
1601	GTTCTTAGCC	CTCTAGAAAC	GAGTTGGTGT	CTTTC	

In der dargestellten Sequenz sind die möglichen Startcodons und ein Terminatorcodon unterstrichen. Auffällig ist das hervorgehobene CAG-Triplet repeat (bp 583-624).

2.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

10x PCR-Puffer	Pan Systems, Aidenbach
5x RT-Puffer	Promega, Heidelberg
dNTP Mix	Promega, Heidelberg
MgCl ₂ 50mM	Pan Systems, Aidenbach
Mineralöl	Sigma, Deishofen
Oligo dT ₍₁₂₋₁₈₎ Primer	Promega, Heidelberg
reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg
RNasin	Promega, Heidelberg
Taq-Polymerase	Pan Systems

2.3.4.1. Oligonukleotid-Primer

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer, die für die PCR Verwendung fanden, wurden anhand des PC-Programmes DNASIS und PC/Gene entsprechend den Regeln für Primer-Konzepte (Taylor, 1993) erstellt. Die Primer wurden dabei auf ihre Sequenzspezifität überprüft und mit möglicherweise homologen Sequenzen in der EMBL-Datenbank (European Molecular Biology Laboratory) verglichen.

Die lyophilisiert gelieferten Primer (BioSource, Nivelles, Belgien) wurden jeweils durch Zugabe von 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurde die Primerkonzentration für die anschließenden Versuche durch Verdünnen mit Milliporewasser auf 50 pmol/µl eingestellt.

Tabelle 2.3.: Verwendete humane Oligonukleotid-Primer

Gen	Oligosequenz: sense antisense	Lokalisation, Fragmentgröße	Anlagerungs- temperatur
GAPDH (Glycerin- aldehyd-Phosphat- Dehydrogenase)	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3' 5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'	360-379 640-659 300 Basenpaare	60°C
HASH1 (human Achaete-scute homolog 1)	5'-GTC TTC GCC CGA ATC GAT G-3' 5'-TCG TCC GAC GAG TAG GAT G-3'	711-729 1067-1085 374 Basenpaare	55°C
HASH 1n	5'-ATG GAA AGC TCT GCC AAG AT-3' 5'-GCT GTC GCT TGA CTT GCT T-3'	433-452 688-706 274 Basenpaare	58°C

2.3.5. Isolierung eines DNA-Fragmentes

100 bp Marker	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL, Karlsruhe
alkalische Phosphatase	Pharmacia, Freiburg
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Ava I	Pharmacia, Freiburg
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CDP-Star	Tropix, Bedford, USA
DNA Mass Ladder	Gibco BRL, Karlsruhe
DNA-Bst E II Verdau	Biolabs, Schwalbach
DNase I	Boehringer, Mannheim
EcoR1	Pharmacia, Freiburg
Epicuran Coli SURE kompetente Zellen	Stratagene, Heidelberg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Hind III	Pharmacia, Freiburg

OPA (One-Phor-All Buffer PLUS)	Pharmacia, Freiburg
pCR II- Vector	Invitrogen, Leek, NL
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Pst I	Pharmacia, Freiburg
RNA-Marker	Gibco BRL, Karlsruhe
RNase A	Serva, Heidelberg
RNase Inhibitor (RNasin)	Promega, Heidelberg
Rotiphenol	Roth, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Leek, NL
Trizol	Gibco BRL, Karlsruhe
X-Gal	Gibco BRL, Karlsruhe

Kits:

Boehringer Rapid DNA Ligation Kit	Boehringer, Mannheim
DIG-RNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Dual Promoter TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, NL
QIAEX Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.4. Gewebeaufbereitung

2.4.1. Fixierung

Fixierungslösungen:

- a) 4% PFA in PBS
- b) 3,75% Formaldehyd in Leitungswasser

2.4.2. Einbettung

Die mit Lösung a) fixierten Gewebestückchen wurden 3 x 2 h mit PBS gespült, die mit Lösung b) fixierten Stückchen wurden 16 h lang mit PBS gespült. Anschließend war die

Behandlung einheitlich:

- je 2 h 70%, 80%, 90%, 96% Ethanol
- 3 x 24 h 100% Isopropanol
- 4 x 24 h Zedernholzöl
- 3 x 24 h Paraffin (Histocomp) bei 60 °C
- Ausgießen in Paraffin

2.4.3. Vorbehandlung der Objektträger

Die Objektträger wurden vor dem Auftragen der Schnitte mit Aminopropyltriethoxysilane (Apes) beschichtet um ein Abschwimmen der Schnitte während der Bearbeitung zu verhindern. Die Beschichtung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Entfettung in Aceton, 2 x 10 min
- Inkubation in Apes 3%, 5 min
- Spülung in Aqua dest. 3 x 5 min
- Inkubation über Nacht bei 90°C

2.4.4. Herstellung der Schnitte

Die Paraffinschnitte wurden auf einem Schlittenmikrotom hergestellt. Eine Petrischale mit autoklaviertem Aqua dest. wurde auf etwa 40°C erwärmt. Darin wurden die 3-5µm dicken Schnitte gestreckt und auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig) oder auf mit Apes-beschichtete Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C getrocknet.

2.4.5. Standardfärbung

Zur histologischen Beurteilung des Gewebes wurden einige Schnitte nach einem Standardverfahren mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt:

2.5. Immunhistochemische Methoden

Diese Methoden erlauben den Nachweis antigener Komponenten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern in Gewebsschnitten oder Zellausstrichen. Die Markierung kann hierbei durch antikörpergekoppelte, enzymatische Reaktionen, fluoreszierende Farbstoffe oder Goldpartikel (für die Elektronenmikroskopie) geschehen.

2.5.1. Enzymatische Reaktionen

2.5.1.1. Avidin-Biotin-Komplex (ABC) -Reaktion

Diese Methode nutzt die hohe Affinität von Avidin und Biotin zueinander. Als Detektionssystem diente biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper bzw. ein Pferd-Anti-Maus-Antikörper und ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex.

Die Inkubationen der Antiseren erfolgten in einer feuchten Kammer. Die Konzentrationen der Primärantikörper wurden für alle Markierungsversuche in Verdünnungsreihen ausgetestet und optimiert.

Für die Durchführung der Immunhistochemie wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase Methode unter zusätzlicher Nickel-Verstärkung verwendet. Sie wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

- Entparaffinierung in Xylol, 3 x 5 min
- Rehydrierung in Isopropylalkohol, 3 x 3 min
- absteigende Alkoholreihe, je 2 min (96%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%)
- Aqua dest.

- Blocken der endogenen Peroxidasen in 3% H₂O₂, 45 min
- Spülung in PBS, 2 x 5 min
- 5% BSA, 30 min in feuchter Kammer
- Abschütten des überschüssigen BSA
- Auftragen des Primärantikörpers in jeweiliger Konzentration
- Inkubation über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer
- Spülung in PBS, 2 x 5 min
- Auftragen des Sekundärantikörpers
- Inkubation 45 min bei 20°C in feuchter Kammer
- Spülung in PBS, 2 x 5 min
- Auftragen von ABC in der Konzentration 1:100
- Inkubation 45 min bei 20°C in feuchter Kammer
- Spülung in PBS, 2 x 5 min
- Vorinkubation in DAB-Ni, 5 min
- Zugabe von 35 µl H₂O₂ zum Starten der Farbreaktion
- Inkubation 15 min bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion in PBS
- Aqua dest.
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe
- Isopropanol, 3 x 3 min
- Xylol 3 x 5 min
- Eindecken in Corbit-Balsam (Duplex)

2.5.1.2. Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) -Reaktion

Die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) Reaktion (Sternberger 1970) wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, als Chromophor diente Fast Red. Der Ablauf war analog zur ABC-Technik. Die Reaktion wurde in Tris-HCl (pH 8,2) abgestoppt und anschließend mit Kaisers Glycingelatine eingedeckt.

2.5.1.3. Doppelmarkierungen

Bei den Doppelmarkierungen wurde die PAP-Reaktion mit der ABC-Reaktion kombiniert und nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Nach der zuerst durchgeführten PAP-Reaktion wurde auf ein weiteres Blocken der endogenen Peroxidasen verzichtet. Das Eindecken der Schnitte erfolgte auch hier mit Kaisers Glyceringelatine.

Phosphate buffered saline (PBS)	NaCl	8,7 g	
	Na ₂ HPO ₄	1,4 g	
	KH ₂ PO ₄	0,3 g	(pH 7,4)
	ad 1000 ml H ₂ O		
Waschpuffer	PBS		
Absättigungspuffer	Rinder Serum Albumin (BSA) 5%		
DAB-Reagenz	DAB	35 mg	
	Nickel	60 mg	
	PBS	100 ml	
	H ₂ O ₂	50 µl	
Tris-HCl	0,05 M		(pH 8,2)

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. in situ-Hybridisierung (ISH)

In der in situ-Hybridisierung wird die m-RNA eines Proteins im Zytoplasma mittels einer komplementären Sonde gebunden. Die Sonde ist mit einem Enzym gekoppelt an dem dann zur Visualisierung des Signals eine Farbreaktion abläuft.

Der mRNA-Nachweis durch ISH erfolgte auf Schnitten des in Formol fixierten Gewebes. Es handelt sich um eine modifizierte Methode nach Wilkinson (1992).

Durchführung:

- 15 min bei 60°C im Hybridisierungssofen 2 x 10 min Xylol
- je 5 min Ethanol 96%, 80%, 70%
- 2 x 5 min Aqua dest.
- Mikrowelle 3 x 3 min (800 W):
Schnitte in 200 ml 0,01 M NaCitrat (pH 6,0)
- nach jeweils 3 min verdunsteten NaCitrat-Puffer mit H₂O auffüllen
- 3 min PBS
- 20 min 0,2 M HCl 2 x 3 min PBS
- 5 min 0,3% TritonX-100 in PBS
- 2 x 3 min PBS
- Proteinase K-Verdau: 20 min bei 37°C, Proteinase K-Konz.: 1 µg/ml
Menge: 100 µl pro Schnitt
- 1 min in PBS waschen
- 5 min 0,2% Glycin in PBS
- 3 min PBS
- 10 min 4% PFA in PBS (pH 7,4) bei 4°C (frisch ansetzen)
- 2 x 3 min PBS
- Mikrowelle 3 x 3 min
- 1 min in 4°C PBS
- 5 min 0,1 M TEA (pH 8,0) 200 ml + 0,5 ml Essigsäureanhydrid
- 5 min PBS
- Prähybridisierung: 100 µl Prähybrid-Mix pro
- 2 h bei 60°C in feuchter Kammer
- Lösung absaugen
- Hybridisierung: 20-30 µl Hybrid-Mix pro Schnitt (Riboprobe-Endkonz.: 5 ng/µl)
- Eindecken mit sterilen, RNase-freien Deckgläschen;
- versiegeln mit Fixogum
- 10 min 80°C
- 60°C über Nacht

- Deckgläschen abziehen
- 30 min bei 53°C in 2x SSC waschen, 100 µl pro Schnitt
- 1 h bei 53°C in 1x SSC mit 50% Formamid (ca. 100 µl pro Schnitt)
- 2 x 10 min in 0,5x SSC
- 10 min in 0,2x SSC
- 10 min in Puffer I
- 30 min in Puffer II (100 µl) in feuchter Kammer
- 1. AK (30 µl pro Schnitt):
Anti-DIG-Fab-Fragment-Alk. Phosphatase: 1:500 in Puffer II
Inkubation über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer
- 2 x 15 min in Puffer I waschen
- 2 x in Puffer III
- Entwicklungs-Puffer 300 µl pro Schnitt in feuchter Kammer bei 37°C im Dunkeln
- 3 min Aqua dest.
- Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine

Falls nicht anders angegeben, wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Lösungen:

NaCl	5 M	autoklaviert
Proteinase K	1 mg/ml	in H ₂ O
Prähybrid-Mix	Formamid	50% (v/v)
	Tris HCl,	50 mM (pH 7,5)
	EDTA	25 mM
	NaCl	20 mM
	t-RNA	250 µg/ml
	Denhardt's	2,5x
		in H ₂ O
10x Grundmix	Tris-HCl,	200 mM (pH 7,5)
	EDTA,	10 mM (pH 8,0)
	t-RNA	5 mg/ml

	poly-A RNA	1 mg/ml	
	Denhardt's	10x	
	in H ₂ O		
50x Denhardt's	Ficoll 400		1% (w/v)
	PVP (Polyvinylpyrolidon 10.000)		1% (w/v)
	BSA		1% (w/v)
PFA 4%	Paraformaldehyd 4% (w/v) in PBS, (pH 7,4)		
0,1 M TEA	0,1 M Triethanolamin,		(pH 8,0)
20x SSC	3,0 M NaCl		
	0,3 M Na-Citrat		(pH 7,0)
Anti-Dig-Fab-AP	1:500 in Puffer II		
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure,	0,1 M	(pH 7,5)
	NaCl	0,15 M	
PK-Puffer 1x konz.	Tris	100 mM	(pH 8,0)
	EDTA	50 mM	
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM	(pH 7,5)
	EDTA	1 mM	
10x PBS	NaCl	1,3 M	
	Na ₂ HPO ₄	100 mM	
	KH ₂ PO ₄	18 mM	
	KCl	27 mM	(pH 7,0) autoklaviert
Dextransulfat	50% (w/v) in H ₂ O		
10x Puffer I	Tris	1,0 M	
	NaCl	1,5 M	(pH 7,5)
Puffer II	1,0% (w/v) Blocking-Reagenz (autoklaviert)		
	0,5% (w/v) BSA in Maleinsäurepuffer		
Puffer IIIa 2x konz.	Tris	400 mM	
	NaCl	400 mM	(pH 9,5)
Puffer IIIb 2x konz.	MgCl ₂	200 mM	

Puffer III	Puffer IIIa und IIIb vor Gebrauch 1:1 mischen	
Entwicklungspuffer	Puffer III	20 ml
	Levamisol	5 mg
	NBT	90 μ l
	BCIP	70 μ l

Die Angabe H₂O bezieht sich auf Wasser aus einer MilliQ-Reinstwasseranlage mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherbombe, das anschließend autoklaviert wurde. Alle verwendeten thermostabilen Lösungen wurden ebenfalls vor Gebrauch autoklaviert (120 °C und 1 bar, mind. 15 min).

2.6.2. RNA-Gelelektrophorese

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

Die Trennung der RNA in Agarosegelen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Trennung von DNA. Die hier durchgeführte Methode (Fourney et al., 1988) hat gegenüber dem Standardprotokoll (Sambrook et al., 1982) den Vorteil, daß die Banden im Gel gut sichtbar sind und eine schärfere Auftrennung der Banden erfolgt.

Der Geltrog wurde mit Tesafilm abgedichtet und der Kamm in die vorgesehene Stellung gebracht. Die fertig zusammengebaute Apparatur wurde dann mit 3% H₂O₂ gefüllt und zur Inaktivierung der RNasen mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde alles mit H₂O gespült.

Drei Gramm Agarose wurden in 260 ml H₂O durch Kochen gelöst und auf 50°C abgekühlt. Anschließend wurden 30 ml 10x MOPS und 15,3 ml 37 % Formaldehyd unter dem Abzug zugefügt. Nach kurzem Mischen wurde das Gel gegossen.

Zur Vorbereitung der Proben wurden Aliquots der isolierten RNA mit 20 μ l Probenpuffer versetzt und 15 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 1,5 μ l 0,3% Ethidiumbromid zugefügt.

Das polymerisierte Gel wurde mit 1x MOPS überschichtet und mit den Proben und zwei RNA-Größenmarker beladen. Die Trennung war nach ca. 2 h bei 90 V abgeschlossen. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert und zur Vorbereitung für ein Northern Blot 30 min mit 0,05 M NaOH äquilibriert.

Lösungen:

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

Probenpuffer	0,75 ml Formamid
	0,15 ml 10x MOPS-Puffer
	0,24 ml 37% Formaldehyd
	100 μ l H ₂ O
	100 μ l Glycerin
	80 μ l 1 % Bromphenolblau

2.6.3. Northern Blot

Um die Hybridisierung mit den RNA-Sonden zu ermöglichen wurde die aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) übertragen (Fourney et al., 1988; Sambrook et al., 1982).

Auf eine Glasplatte, welche über einem Pufferreservoir von 10x SSC lag, wurden 10 cm hoch Handtuchpapiere gestapelt. Darüber wurde 1 cm trockenes 3mm Whatman Filterpapier gelegt und darüber ein in 10x SSC angefeuchtetes Whatman Papier. Die vorher zurechtgeschnittene Membran wurde dem Gel von unten luftblasenfrei angelegt und beides zusammen auf den Stapel gelegt. Den Abschluß bildete ein Streifen Whatman Papier welches in 10x SSC angefeuchtet war und auf beiden Seiten bis in das

Pufferreservoir reichte. Der Transfer erfolgte über Nacht und wurde unter UV-Licht auf Vollständigkeit überprüft. Nach Lufttrocknung der Membran wurde die RNA durch UV fixiert (1,23 J/cm²).

2.6.4. RNA-RNA Hybridisierung

Die Membranen wurden in 2x SSC angefeuchtet und jeweils in eine Glasröhre gelegt. Die Prähybridisierung erfolgte mit 5 ml Hybridisierungspuffer pro Glasröhre, mindestens 2 h lang. Zur Hybridisierung wurden die Membranen über Nacht mit je 5 ml Hybridisierungspuffer inkubiert dem vorher 1 µg vorher kurz aufgekochte Sonde zugesetzt worden waren. Die Hybridisierung erfolgte in einem Rollenhybridisierungssofen bei 68 °C.

Lösungen:

Hybridisierungspuffer	25 ml 20x SSC
	1 ml 10 % Laurylsarcosin
	200 µl 10 % SDS
	20 ml 10 % Blocking Reagenz
	ad 100 ml H ₂ O

2.6.5. RNA-Isolierung mit TRIzol und

Reinigung der Gesamt RNA-Präparation von genomischer DNA

Die Total-RNA-Isolierung aus Kulturzellen und aus den Geweben erfolgte mittels der TRIzol-Methode (Gibco) modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (1987). Das zu untersuchende Gewebe wurde mit TRIzol-Reagenz im Verhältnis 100 mg Gewebe/ml TRIzol mit einem Micropistill homogenisiert und nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform/ml TRIzolTM mit 12000 rpm bei RT 5 min zentrifugiert. Man erhält auf diese Art drei Phasen:

Eine obere wässrige Phase mit Total-RNA, eine mittlere weissliche Phase, die Proteine enthält und eine untere rötliche Phase mit der genomischen DNA. Zur Eliminierung genomischer DNA-Verunreinigungen wurde der farblose Überstand mit RNase-freier DNase I nach folgendem Schema behandelt:

200 µl Probe mit total-RNA
 1 µl RNase-Inhibitor (RNasin, Promega, 10 U)
 10 µl RNase-freie DNase I (pro µg RNA/1-3 U
 DNase I)
 25 µl 10x DNase I-Puffer
 14 µl H₂O

Gesamtvolumen des Ansatzes 250 µl

10x DNase I-Puffer	Tris-HCl	0,1 M	(pH 8,3)
	KCl	0,5 M	
	MgCl ₂	15 mM	

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von 50 µl Phenol/Chloroform beendet. Der Ansatz wurde stark geschüttelt und 2 min mit 12000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0,5 ml 100% Ethanol/ml TRIzol und bei -20 °C 2 h gefällt. Es folgte die Zentrifugation der gefällten RNA mit 12000 x g bei 4 °C, 30 min. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, kurz luftgetrocknet und in autoklaviertem Wasser mit 0,5 µl RNase-Inhibitor (20 Einheiten) aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.6. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die mRNA der aus den Zellen und Geweben isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase nach dem Verfahren von Lee & Caskey (1990) in cDNA umgeschrieben. 1-3 µg der RNA in 10 µl Millipore wurden nach Zugabe von 1 µg Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ Primer für 10 min bei 70°C inkubiert. Die Probe blieb danach mindestens

2 min auf Eis stehen. Dann wurden 8 μ l Supermix und, nach einer Inkubation von 2 min bei 42 °C, 1 μ l Reverse Transkriptase (200 U, M-MLV RNase H-minus, Promega, Heidelberg) dazupipettiert und 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert.

Reaktionsansatz:

- 8 μ l 5x RT-Puffer
- 2 μ l dNTP Mix (ACGT, je 10 mM)
- 1 μ l RNasin (10 U)
- 6 μ l Autoklaviertes Millipore-Wasser

2.6.7. AMOC-Verfahren zur Erhöhung der cDNA-Ausbeute

Das AMOC-Verfahren (arithmetic multiplication of cDNA) ist eine Methode, die Effizienz der cDNA-Synthese zu erhöhen (Mangan und Butcher, 1993). Der ersten reversen Transkription wurde hierbei direkt eine Denaturierung bei 85 °C für 10 min und 3 min bei 95 °C angeschlossen und der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt. Es folgte die erneute Zugabe von 100 Einheiten reverser Transkriptase (Promega) und eine Inkubation für 30 min bei 37 °C.

2.6.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die exponentielle Amplifikation von DNA-Nukleotidsequenzen in vitro.. Die Reaktion gliedert sich in drei unterschiedliche Temperaturschritte. Zuerst erfolgt eine Denaturierung der zu vervielfachenden Nukleotidsequenzen, danach ein Anlagern der sequenzspezifischen Oligonukleotide an die komplementäre Sequenz („annealing“) und abschließend eine Nukleotid-Kettenverlängerung („Elongation“) in 20-40 Zyklen (Innis und Gelfand, 1990).

Es wurden je 2 μ l der cDNA mit 48 μ l PCR-Supermix versetzt, mit 30 μ l Mineralöl überschichtet, und anschließend in einem PCR-Thermocycler dem Temperaturprofil unterzogen, das für die jeweiligen Primerpaare spezifisch etabliert wurde. Zur Kontrolle der Integrität und Qualität der cDNA wurde das in allen eukaryotischen Zellen etwa

gleich stark exprimierte Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH) mit spezifischen Primern in der Kettenreaktion nachgewiesen.

PCR-Supermix	5 µl	10 x PCR-Puffer
	1 µl	dNTP Mix (ACGT, je 10 mM,)
	1 µl	3'-Primer (50 pmol/µl)
	1 µl	5'-Primer (50 pmol/µl)
	2 µl	50 mM MgCl ₂
	0,5 µl	Taq-Polymerase, 1U
	39,5 µl	Autoklaviertes Millipore-H ₂ O

Nach initialer Denaturierung der cDNA-Vorlage für 4 min bei 94 °C wurden 30-40 Zyklen, bestehend aus 20 s 94 °C, 60 s Primeranlagerung (x °C, Primer-spezifisch) und 90 s bei 72 °C Kettenverlängerung, durchgeführt. Bei der letzten Kettenverlängerung wurde 5 min bei 72 °C inkubiert, um vollständige doppelsträngige PCR-Fragmente zu erhalten.

2.6.9. DNA-Gelelektrophorese

Die Trennung der DNA in Agarosegelen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Trennung von RNA. Sie wurde jedoch in einem anderen Puffersystem durchgeführt.

Die Gele wurden nach Aufkochen der Agarose 1-2% in 1x TBE im Wasserbad auf etwa 50 °C abgekühlt und in den Geltrog mit Probenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels und Einsetzen in die Apparatur wurden die DNA-Proben (1:5 mit DNA-Probenpuffer versetzt) einpipettiert. Die Gelelektrophorese (Elektrodenpuffer: 1x TBE) lief bei 80 - 90 Volt Spannung für eine Dauer von 90 - 120 min. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mit einer Sofortbildkamera dokumentiert.

6x DNA-Probenpuffer	Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
	Glycerin	30% (w/v)

Ethidiumbromid	Ethidiumbromid	1 g	
		in 100 ml. H ₂ O	
10x TBE (Tris-Borat/EDTA)	Tris	108 g	
	Borsäure	53 g	
	EDTA	20 ml 0,5 M,	(pH 8,0)
		ad 1000 ml H ₂ O	

2.6.10. Bestimmung der RNA/DNA Konzentrationen

DNA und RNA können bei 260 nm photometrisch quantifiziert werden. Dabei erhält man gleichzeitig durch den Quotient 260/280 nm einen Anhaltspunkt für die Reinheit der Probe. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, da der Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bei 260 nm und der für Proteine bei 280 liegt. Bei einer Messung gegen den gleichen Puffer entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA.

2.6.11. Elution der DNA aus Agarosegelen nach QIAEX

Die ausgeschnittenen Gelstückchen wurden gewogen und mit 300 µl QX 1 Puffer/100 mg Gel und 1/10 Volumenteile 1 M Mannitol versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei 50 °C gelöst. Anschließend wurden pro µg DNA 2 µl Quiaex-Suspension (diese wurde gründlich resuspendiert) hinzupipettiert und gemischt. Dieser Ansatz wird zur Bindung der DNA 10 min bei 50 °C inkubiert und alle 2 min gemischt. Danach wurde 30 s mit 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl QX 2-Lösung gelöst und erneut zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Der gleiche Vorgang erfolgte noch zweimal mit 500 µl QX 3-Lösung. Nach Lufttrocknung wurde das Pellet mit 15 µl H₂O homogenisiert (Vortex) und 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurde zentrifugiert und der Überstand aufgehoben. Dieser Vorgang wurde wiederholt und der Überstand mit dem ersten vereinigt. Dieser enthielt die DNA.

Lösungen:

QX1 (Lösungs- und Bindungspuffer)

Quiaex-Suspension

QX 2 (Waschpuffer)

QX 3 (Waschpuffer)

Die Konzentration der DNA wurde gelektrophoretisch bestimmt in dem die Intensität der Banden mit denen der DNA Mass Ladder verglichen wurden.

2.6.12. Ligation

Die Ligation von Vektor und DNA-Fragment erfolgte mit Reagentien des Boehringer Rapid DNA Ligation Kit. Zur Berechnung der notwendigen DNA-Menge für 50 ng Vektor bei einem Verhältnis DNA-Fragment/Vektor von 3:1 wurde folgende Formel eingesetzt:

$$X \text{ ng PCR-Produkt} = \frac{\text{bp des DNA-Fragmentes} \times 50 \text{ ng pCR II Vektor}}{\text{bp des pCR II Vektors}}$$

Die so errechneten Mengen an DNA-Fragment und Vektor wurden zusammen mit 2 µl 5x Dil. Puffer, 10 µl T4-DNA-Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase 15 min bei Raumtemperatur ligiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Lösungen:

Dilutions-Puffer

T4-DNA-Ligationspuffer

T4-DNA-Ligase (4 U/µl)

2.6.13. DNA-Transformation

100 μ l von auf Eis aufgetauten kompetenten SURE-Zellen wurden mit 1,7 μ l Mercaptoethanol und 5 μ l Ligationsansatz versetzt und 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 s bei 42°C wurde 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden kurz zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 75 μ l SOC-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden auf mit 50 μ g/ml Ampicillin und 40 μ g X-Gal (für die Blau-Weiß Selektion) (Sambrook et al., 1982) vorbehandelten Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.14. Mini-Präparation der Plasmid-DNA

Zum Selektionieren wurden für jede Sonde einige weiße Klone (Insertion im lacZ Gen) gepickt und jeweils in 5 ml LB-Medium mit 10 μ l Ampicillin bei 37°C über Nacht inkubiert.

Durchführung:

- 1,5 ml der Bakterienkultur entnehmen
- 1 Minute zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 300 μ l Puffer I resuspendieren
- 15 min bei Raumtemperatur inkubieren (in diesem Schritt wurde die Bakterien-RNA verdaut)
- Zugabe von 300 μ l Puffer II, anschließend sehr vorsichtiges Durchmischen
- 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zugabe von 300 μ l Puffer III, vorsichtiges Durchmischen
- 15 min zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C)
- Überstand mit 500 μ l Rotiphenol versetzen
- 5 min zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C)
- Überstand abheben und mit 500 μ l Chloroform versetzen

- erneut zentrifugieren
- Überstand überführen und mit 650 µl Isopropanol versetzen
- 30 min bei -20 °C fällen
- 15 min zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C)
- Überstand abkippen und mit 200 µl 70%igem Ethanol waschen
- 2 min zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C)
- Überstand abkippen und Pellet trocknen lassen
- Pellet in 50 µl H₂O aufnehmen und bei -20 °C aufbewahren

Lösungen:

LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Caseinhydrolysat		
	5 g Hefeextrakt		
	10 g NaCl		
	ad 1000 ml H ₂ O		(pH 7,0 autoklaviert)
RNase Stammlösung	50 mg lyophilisierte RNase A in 5 ml Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 15 mM NaCl) lösen, 15 min bei 100 °C kochen und nach Abkühlen bei -20 °C lagern.		
Puffer I	Tris/HCl Puffer	50 mM	(pH 8,0)
	EDTA	10 mM	
	Lysozym	4 mg/ml	
	4 ml RNase Stammlösung/100 ml		
Puffer II	NaOH	200 mM	
	1 % SDS		
Puffer III	KAc	2,55 M	(pH 4,8)

Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt.

Zur Analyse wurden je 1,5 µg der isolierten Plasmide mit geeigneten Enzymen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt.

2.6.15. Sequenzierung

Die Sequenzierung von 10 µg der aus der Minipräparation gewonnenen DNA wurde kommerziell von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Strategie des Vorgehens

In der Fachliteratur gibt es zur Zeit keine eindeutigen Angaben, ob neuroendokrine Zellen innerviert werden oder ob dieses nicht der Fall ist. Zur Klärung dieser Frage wurden in immunhistochemischen Doppelmarkierungen neuroendokrine Zellen und Nervenfasern mit unterschiedlichen Antikörpern dargestellt und die Dichte der Nervenfasern beurteilt. Da es noch keine Forschungsarbeiten über eine Korrelation zwischen der Zellmorphologie neuroendokriner Zellen der Prostata und den in den Zellen enthaltenen Neuropeptiden gibt, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob ein solcher Zusammenhang nachzuweisen ist. Dafür wurden immunhistochemisch markierte Zellen in Einzel- und Doppelmarkierungen nach ihrer Morphologie beurteilt. Ein weiteres Ziel sollte der Nachweis von Kolo-kalisationen verschiedener Neuropeptide in neuroendokrinen Zellen der Prostata sein.

Dem human Achaete Scute Homologue 1 (hASH 1) wird eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Nervenzellen zugeschrieben. Wie bereits beschrieben, wird dieses Protein vermutlich in Zellen, die sich aus der Neuralleiste ableiten, sowie in neuroendokrinen Zellen exprimiert. Um einen weiteren Hinweis auf den Ursprung dieser Zellen zu erhalten und deren vermutlich neuralen Ursprung zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, mit der in situ-Hybridisierung das hASH-Protein in neuroendokrinen Zellen der Prostata nachzuweisen.

3.2. Immunhistochemische Ergebnisse

3.2.1. Innervation neuroendokriner Zellen

Um eine Aussage über eine mögliche Innervation neuroendokriner Zellen im menschlichen Prostatagewebe machen zu können, wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen erstellt. Im ersten Schritt der Doppelmarkierung konnten

neuroendokrine Zellen durch Darstellung der CgA-Immunreaktivität identifiziert werden. Der zweite Schritt wurde mit dem panneuralen Marker PGP 9,5 durchgeführt um so alle Nervenfasern darstellen zu können. Auf diese Weise konnten die neuroendokrinen Zellen und die umgebenden Nervenfasern analysiert werden. Anschließend konnte die Dichte der Nervenfasern in der Umgebung der neuroendokrinen Zellen mit der Dichte der Nervenfasern im sonstigen Prostatagewebe verglichen werden.

In mehreren Schnitten wurde auf diese Weise festgestellt, daß sich die Nervenfaserdichte in der unmittelbaren Nähe der neuroendokrinen Zellen nicht von der Nervenfaserdichte in entsprechenden Gebieten der Prostata ohne neuroendokrine Zellen unterscheidet.

Diese Befunde bedeuten, daß kein Hinweis auf eine Innervation der neuroendokrinen Zellen gefunden werden konnte und daß die neuroendokrinen Zellen sehr wahrscheinlich nicht innerviert sind.

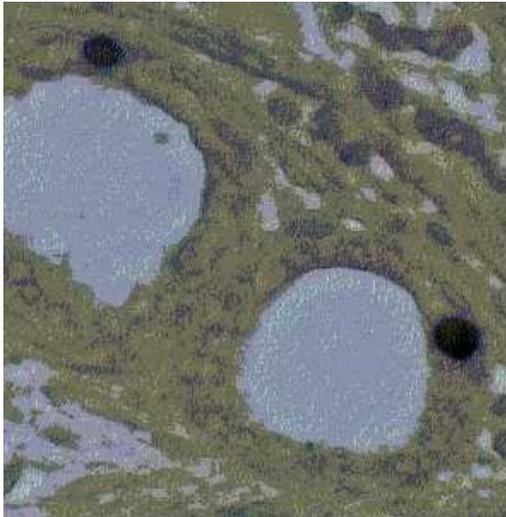
3.2.2. Korrelationen zwischen Zellmorphologie und Neuropeptiden

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Zellmorphologie und den in den Zellen vorhandenen Neuropeptiden besteht, wurden immunhistochemische Einzel- und Doppelmarkierungen mit verschiedenen Antikörpern, nach dem in 2.5.1.1. dargestellten Protokoll, durchgeführt. Mögliche Veränderungen der Zellmorphologie in Abhängigkeit vom Alter sollten durch immunhistochemische Reaktionen mit CgA an Prostatagewebeproben, von Patienten unterschiedlichen Alters nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der juvenilen Prostata beziehen sich auf die Prostata eines 15 Jahre alten Jungen, die adulte Prostata wurde einem 46 Jahre alten Mann nach Suizid entnommen. Weiterhin wurden Schnitte von pathologischem Gewebe (benigne Prostatahyperplasie und Prostata-karzinom) untersucht.

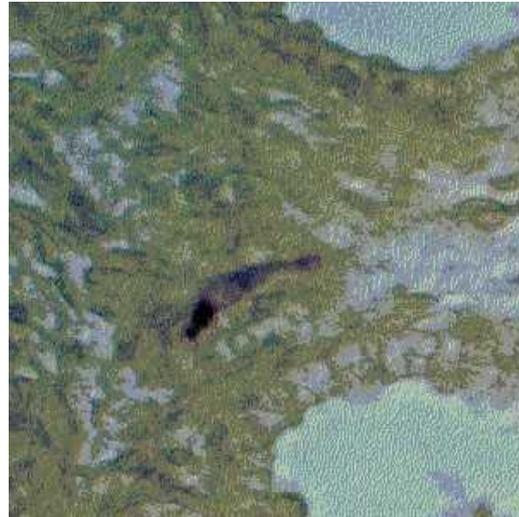
Verwendet wurden Antikörper gegen Serotonin (5-HT), vesikulären Monoaminotransporter 1 (VMAT1), Calcitonin, Chromogranin A (CgA), Gastrin-Related Peptide (GRP) und Neuronspezifische Enolase (NSE), in den in Tabelle 2.1. angegebenen Verdünnungen. Anschließend wurden die markierten Zellen nach ihrer

Morphologie in folgende vier Gruppen eingeteilt: runde Zellen, bipolare Zellen, multipolare Zellen und nicht klassifizierbare Zellen.

Abb. 3.1.: Beispiele für runde, bipolare, multipolare und nicht klassifizierbare Zellen



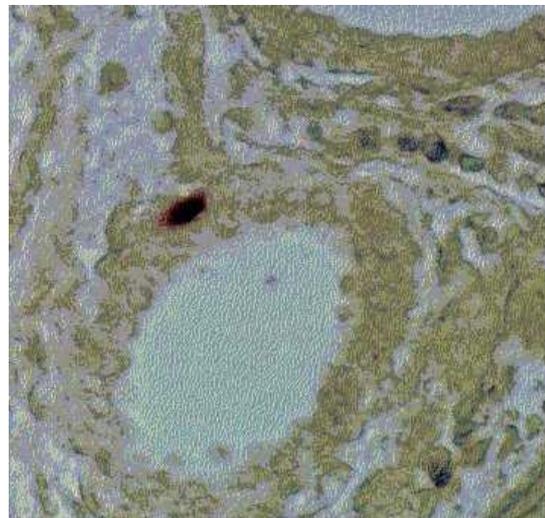
zwei runde Zellen: Die Abbildung zeigt die kreisrunde Morphologie dieser Zellen



bipolare Zelle: Die längliche Struktur dieser Zelle ist eindeutig zu erkennen



multipolare Zelle: Gut zu erkennen sind unterschiedliche Anteile der Zelle. In anderen Beispielen können auch weitreichende Zellfortsätze erkannt werden.



nicht klassifizierbare Zelle: Der Anschnitt läßt keine eindeutige Unterscheidung zu. In diesem Fall kommen runde und bipolare Zellmorphologie in betracht.

Wie in den Tabellen 3.1. bis 3.7. dargestellt zeigen sich mehrere Gemeinsamkeiten zwischen den mit verschiedenen Antikörpern markierten Zellen. So ist festzustellen, daß in allen Untersuchungen ein etwa gleich großer Anteil von runden und bipolaren neuroendokrinen Zellen nachzuweisen ist und diese beiden Zellmorphologien erheblich häufiger vorkommen als die multipolaren Zellen. In den Doppelmarkierungen haben die runden Zellen (42,0% - 49,6%) stets einen höheren Anteil als die bipolaren Zellen (32,5% - 39,2%). In den Einzelreaktionen zeigt 5-HT das gleiche Ergebnis, während CgA- und VMAT 1-immunreaktive Zellen das umgekehrte Bild zeigen: hier sind die bipolaren Zellen häufiger als die runden. Die multipolaren Zellen sind jeweils in geringster Zahl vorhanden und haben Anteile zwischen 6,8% und 13,0%.

Ein größerer Anteil an multipolaren Zellen besteht lediglich in der Einzeldarstellung mit VMAT 1 (21,5%). Das gehäufte Vorkommen von VMAT 1 in multipolaren Zellen spiegelt sich auch in der Doppelmarkierung mit CgA wider: hier sind lediglich 0,3% der multipolaren Zellen nur CgA-immunreaktiv. Die anderen multipolaren Zellen sind entweder nur VMAT1-immunreaktiv (4,0%) oder es findet sich eine Kollokalisierung beider Peptide (8,7%).

Ein besonders großer Teil der runden Zellen konnte in der Einzelmarkierung mit Calcitonin dargestellt werden. Er lag mit 47,0% erheblich über dem Anteil der runden Zellen in bei VMAT 1- (28,0%) und CgA-positiven Zellen (32,5%).

Tabelle 3.1.: CgA-Einzelmarkierung

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
juvenil (250 Zellen)	97 (38,8%, 46,4%)	86 (34,4%, 41,1%)	26 (10,4%, 12,4%)	41 (16,4%)	250
adult (250 Zellen)	85 (34,0%, 42,7%)	84 (33,6%, 42,2%)	29 (11,6%, 14,5%)	51 (20,4%)	250
pathologisch (200 Zellen)	65 (32,5%, 37,4%)	83 (41,5%, 47,7%)	26 (13,0%, 14,9%)	26 (13,0%)	200

Tab. 3.1.: Darstellung der Zellmorphologie neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata in Abhängigkeit vom Alter. Der erste Wert in Klammern zeigt den Anteil der Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen, der zweite Wert bezieht sich auf die klassifizierbaren Zellen.

Tabelle 3.2. : Einzelmarkierung, pathologisches Prostatagewebe

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
CgA (200 Zellen)	65 (32,5%)	83 (41,5%)	26 (13,0%)	26 (13,0%)	200
Serotonin (300 Zellen)	131 (43,7%)	98 (32,7%)	35 (11,7%)	36 (12,0%)	300
GRP (200 Zellen)	86 (43,0%)	57 (28,5%)	24 (12,0%)	33 (16,5%)	200
Calcitonin (200 Zellen)	94 (47,0%)	59 (29,5%)	19 (9,5%)	28 (14,0%)	200
VMAT 1 (200 Zellen)	56 (28,0%)	73 (36,5%)	43 (21,5%)	28 (14,0%)	200
NSE (200 Zellen)	84 (42,0%)	62 (31,0%)	20 (10,0%)	34 (17,0%)	200

Tab. 3.2.: Darstellung der verschiedenen Zellmorphologien in Abhängigkeit von der dargestellten Substanz

In der Darstellung der Zellmorphologie in Abhängigkeit vom Alter (Tabelle 3.1.) der Prostata konnte nachgewiesen werden, daß der Anteil der runden Zellen mit dem Alter abnimmt. Bei der juvenilen Prostata lag er noch bei 46,4%, während er in der adulten Prostata auf 42,7% abgenommen hat und in der pathologischen Prostata nur noch 37,4% betrug (jeweils bezogen auf den Anteil der klassifizierbaren Zellen).

Im Gegensatz dazu nimmt der Anteil der bipolaren Zellen und der multipolaren Zellen mit dem Alter zu. Der Anteil der bipolaren Zellen steigt von 41,1% in der juvenilen Prostata über 42,2% im adulten Gewebe auf 47,7% im pathologischen Gewebe. Einen geringeren Zuwachs zeigen die multipolaren Zellen: hier steigt der Anteil von 12,5% auf 14,5% und erreicht im pathologischen Prostatagewebe mit 14,9% den höchsten Anteil (die Prozentzahlen beziehen sich wiederum auf die klassifizierbaren Zellen).

3.2.3. Kolokalisationen von Neuropeptiden in neuroendokrinen Zellen

Ein weiteres Ziel der immunhistochemischen Untersuchungen war es, mögliche Kolokalisationen verschiedener Neuropeptide in den neuroendokrinen Zellen nachzuweisen. Hierfür wurden Doppelmarkierungen mit den oben angegebenen

Antikörpern angefertigt. Weil sich der größte Teil der neuroendokrinen Zellen mit CgA darstellen läßt, wurde jeweils zuerst ein Nachweis der CgA-immunreaktiven Zellen mit der PAP-Technik (2.5.1.2.) durchgeführt. Anschließend folgte die Darstellung des zweiten Peptids mit der ABC-Technik (2.5.1.1.). In den Markierungen zeigten sich die CgA-immunreaktiven Zellen rot, die mit der ABC-Technik dargestellten Zellen grau und die Zellen mit Kolokalisation beider Peptide rot-grau angefärbt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in allen Doppelreaktionen Kolokalisationen von CgA und dem zweiten dargestellten Peptid nachgewiesen werden konnten, der Grad der Kolokalisation jedoch erheblich variierte. Der geringste Grad der Kolokalisation zeigte sich zwischen CgA und 5-HT mit 22,0%, gefolgt von CgA und GRP mit 30,8%. Weitaus stärkere Kolokalisationen konnte zwischen CgA und Calcitonin (62,4%) nachgewiesen werden, während zwischen CgA und VMAT 1 (79,0%) ein noch höherer Grad der Kolokalisation bestand. Eine fast vollständige Kolokalisation zeigte sich zwischen CgA und NSE mit 88,5%. Bei letzterer Darstellung ist auffällig, daß sich keine Zellen fanden die ausschließlich CgA-immunreaktiv waren. Zellen ohne Kolokalisation waren lediglich NSE-immunreaktiv. Ein umgekehrtes Ergebnis lieferte die Doppelmarkierung von CgA und GRP. In dieser Darstellung wiesen nur 1,6% der Zellen eine Immunreaktivität für ausschließlich GRP auf.

Weiterhin konnte eine starke Veränderung des Grades der Kolokalisation zwischen juvenilem (6,0%) und adulten (62,4%) Gewebe in der Doppelmarkierung mit CgA und Calcitonin dargestellt werden, während die Verteilung der Morphologie gleich blieb (vergl. Tab. 3.5. und 3.9.). Die Veränderungen der NSE-CgA-Doppelmarkierung kann wegen vermutlich aufgetretener unspezifischer Kreuzreaktion nicht gewertet werden.

Tabelle 3.3. bis 3.7.: Doppelmarkierung, pathologisches Prostatagewebe

Tabelle 3.3. : CgA/Serotonin (5-HT) Doppelmarkierung (200 Zellen)

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
nur CgA positiv	60 (30,0%)	46 (23,0%)	15 (7,5%)	19 (9,5%)	140 (70,0%)
nur 5-HT positiv	9 (4,5%)	4 (2,0%)	3 (1,5%)	0 (0,0 %)	16 (8,0%)
Kolokalisation	16 (8,0%)	17 (8,5%)	8 (4,0%)	3 (1,5%)	44 (22,0%)
Σ	85 (42,5%)	67 (33,5%)	26 (13,0%)	22 (11,0%)	200 (100%)

Tabelle 3.4. : CgA/GRP Doppelmarkierung (250 Zellen)

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
nur CgA positiv	84 (33,6%)	53 (21,2%)	10 (4,0%)	22 (8,8%)	169 (67,6%)
nur GRP positiv	3 (1,2%)	1 (0,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (1,6%)
Kolokalisation	37 (14,8%)	28 (11,2%)	7 (2,8%)	5 (2,0%)	77 (30,8%)
Σ	124 (49,6%)	82 (32,8%)	17 (6,8%)	27 (10,8%)	250 (100%)

Tabelle 3.5. : CgA/Calcitonin Doppelmarkierung (250 Zellen)

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
nur CgA positiv	24 (9,6%)	18 (7,2%)	4 (1,6%)	7 (2,8%)	53 (21,2%)
nur Calcitonin positiv	24 (9,6%)	14 (5,6%)	2 (0,8%)	1 (0,4%)	41 (16,4%)
Kolokalisation	61 (24,4%)	66 (26,4%)	17 (6,8%)	12 (4,8%)	156 (62,4%)
Σ	109 (43,6%)	98 (39,2%)	23 (9,2%)	20 (8,0%)	250 (100%)

Tabelle 3.6. : CgA/VMAT 1 Doppelmarkierung (300 Zellen)

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
nur CgA positiv	15 (5,0%)	11 (3,7%)	1 (0,3%)	8 (2,7%)	35 (11,7%)
nur VMAT 1 positiv	4 (1,3%)	11 (3,7%)	12 (4,0%)	1 (0,3%)	28 (9,3%)
Kolokalisation	115 (38,3%)	82 (27,3%)	26 (8,7%)	14 (4,7%)	237 (79,0%)
Σ	134 (44,7%)	104 (34,7%)	39 (13,0%)	23 (7,7%)	300 (100%)

Tabelle 3.7. : CgA/NSE Doppelmarkierung (200 Zellen)

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
nur CgA positiv	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
nur NSE positiv	16 (8,0%)	3 (1,5%)	2 (1,0%)	2 (1,0%)	23 (11,5%)
Kolokalisation	78 (39,0%)	62 (31,0%)	24 (12,0%)	13 (6,5%)	177 (88,5%)
Σ	84 (42,0%)	65 (32,5%)	26 (13,0%)	15 (7,5%)	200 (100%)

Tabelle 3.8. bis 3.9.: Doppelmarkierung, juveniles Prostatagewebe

Tabelle 3.8. : CgA/Calcitonin Doppelmarkierung (250 Zellen)

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
nur CgA positiv	63 (31,5%)	51 (25,5%)	12 (6,0%)	43 (21,5%)	169 (84,5%)
nur Calcitonin positiv	8 (4,0%)	6 (3,0%)	2 (1,0%)	3 (1,5%)	19 (9,5%)
Kolokalisation	5 (2,5%)	3 (1,5%)	3 (1,5%)	1 (0,5%)	12 (6,0%)
Σ	76 (38,0%)	60 (30,0%)	17 (8,5%)	47 (23,5%)	200 (100%)

Tabelle 3.9. : CgA/NSE Doppelmarkierung (200 Zellen)

	rund	bipolar	multipolar	nicht klassifizierbar	Σ
nur CgA positiv	43 (28,7%)	52 (34,7%)	12 (8,0%)	21 (14,0%)	128 (85,3%)
nur NSE positiv	7 (4,7%)	4 (2,7%)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	13 (8,7%)
Kolokalisation	3 (2,0%)	3 (2,0%)	1 (0,7%)	2 (1,3%)	9 (6,0%)
Σ	53 (35,3%)	59 (39,3%)	14 (9,3%)	24 (16,0%)	150 (100%)

Darstellungen verschiedener neuroendokriner Zellen:

Abb. 3.2.:

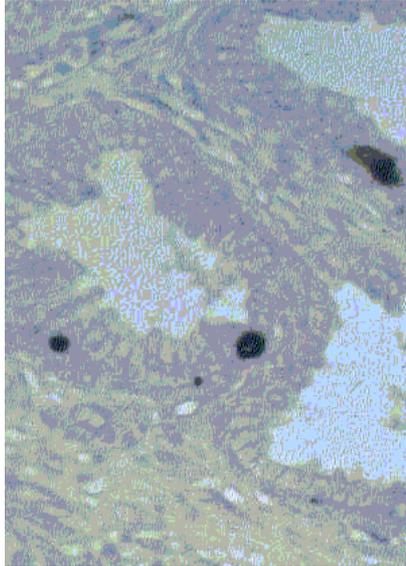


Abb. 3.3.:

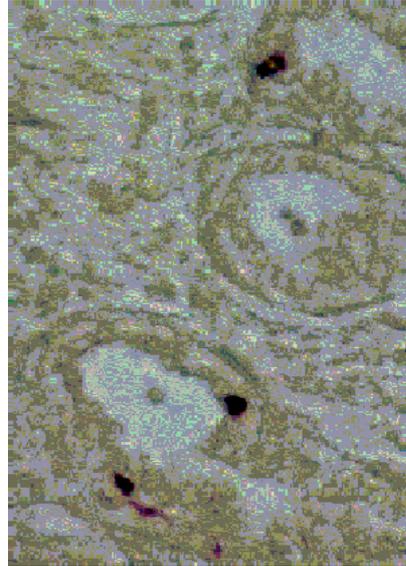


Abb. 3.2. : Diese Abbildung zeigt eine immunhistochemische Doppelmarkierung mit CgA und NSE. Neben der bipolaren Zelle, mit Kolokalisation beider Peptide und einer schwach zu erkennenden rötlichen Markierung, sind zwei runde Zellen dargestellt, welche lediglich NSE-positiv sind (keine rötliche Markierung erkennbar). Vergrößerung: 400-fach

Abb. 3.3. : Doppeldarstellung mit CgA und NSE. Wie in Tabelle 3.9 dargestellt fanden sich bei dieser Doppeldarstellung hauptsächlich Kolokalisationen. In dieser Abbildung sind vier Zellen mit Kolokalisationen beider Peptide gezeigt, eine rötliche Markierung ist neben der schwarzen zu erkennen. Vergrößerung: 400-fach

Abb. 3.4.:

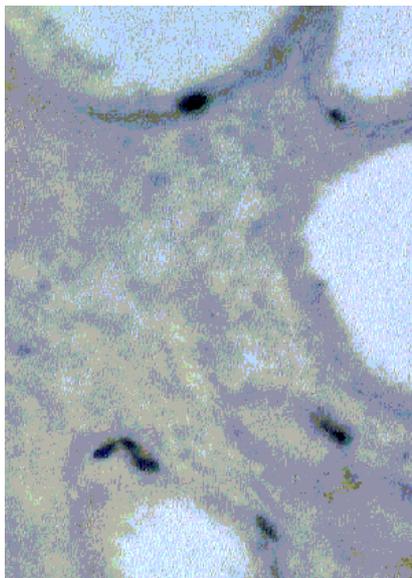


Abb. 3.5.:



Abb. 3.4. und Abb. 3.5. : In diesen beiden Abbildungen, der Doppeldarstellung mit CgA und VMAT1, zeigen sich besonders viele multipolare Zellen. Daß VMAT1-reaktive Zellen besonders oft diese Morphologie aufweisen zeigte sich vor allem auch in den Einzelmarkierungen (hier nicht dargestellt). Vergrößerung beider Abbildungen: 400-fach

Abb. 3.6.:

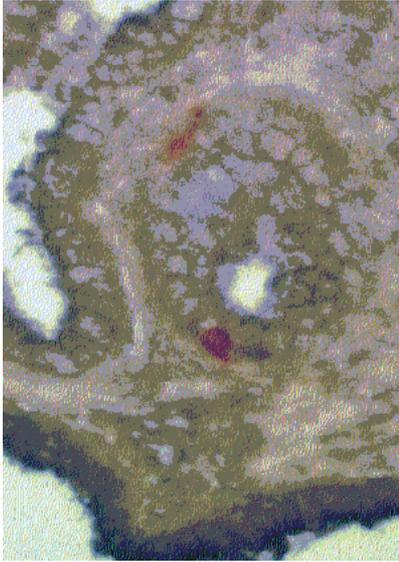


Abb. 3.7.:



Abb. 3.6. und Abb. 3.7. : Diese beiden Abbildungen zeigen immunhistochemische Doppelmarkierungen mit CgA und 5-HT. Neben den unterschiedlichen Zellmorphologien ist in Abb. 3.7 die Kolokalisation beider Substanzen in der neuroendokrinen Zelle zu sehen. Hier ist der basale Teil stark CgA-positiv (rot dargestellt), während der apikale Teil stärker 5-HT-positiv (schwarz) ist. Vergrößerung beider Abbildungen: 400-fach

Abb. 3.8.:



Abb. 3.9.:

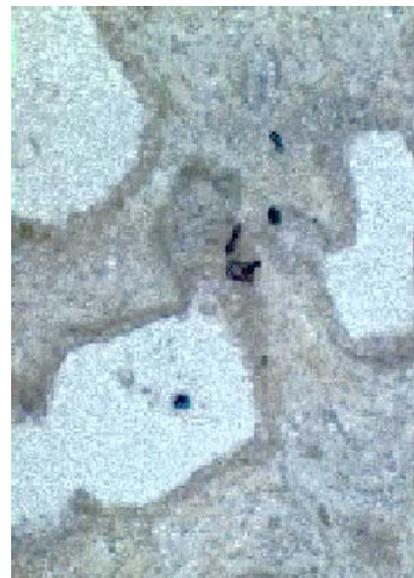


Abb. 3.8. : In dieser Doppelmarkierung mit CgA und GRP ist eine CgA-immunreaktiven Zelle (oben) und eine Zelle mit Kolokalisation (unten) dargestellt. Vergrößerung: 400-fach

Abb. 3.9. : Doppelmarkierung von CgA mit Calcitonin. Die vier dargestellten neuroendokrinen Zellen sind jeweils nur Calcitonin-immunreaktiv. Gut zu erkennen sind die unterschiedlichen Zellmorphologien: es ist jeweils eine runde, eine bipolare, eine multipolare und eine nicht klassifizierbare Zelle dargestellt. Vergrößerung: 400-fach

3.3. Molekularbiologische Ergebnisse

3.3.1. in situ-Hybridisierung (ISH)

Die in situ-Hybridisierung wurde mit der unter 2.3.3. dargestellten Sonde (Endkonzentration 5 ng/ μ l) nach 2.6.1. durchgeführt. Als Proteinase wurde Proteinase K (1 μ g/ml) verwendet. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 55°C zeigte sich nach Zugabe des Entwicklungspuffers schnell eine Färbung des Schnittes. So wurde die Detektion nach zwei Minuten durch Abwaschen des Entwicklungspuffers beendet.

Nach Durchführung der in situ-Hybridisierung auf Schnitten von menschlichem Prostatabewebe, zeigte sich eine Darstellung von Ganglien, Prostataepithel, Bläschendrüseneithel, Endothel und Nerven (vergl. Abb. 3.10. bis 3.15.). Besonders stark färbten sich das Epithel und die Ganglien an. Erwartet wurde eine selektiver Nachweis der neuroendokrinen Zellen und der Nervenzellen. Das detektierte Muster stimmte also nicht mit dem zu erwartenden Muster überein.

Abb. 3.10.:



Abb. 3.11.:

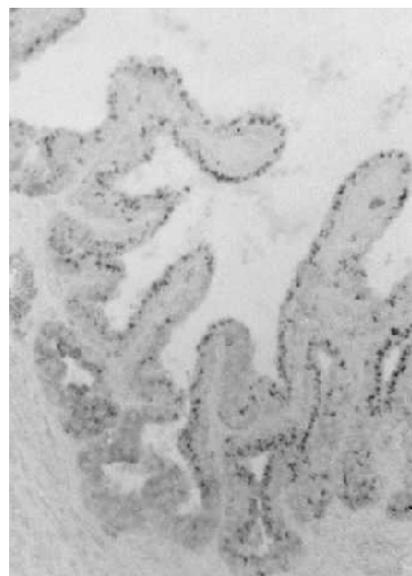


Abb. 3.10.: ISH der MASH-Sonde auf menschlichem Bläschendrüsengewebe. Dargestellt ist hier ein Ausschnitt aus dem Ductus ejaculatorius mit starker Markierung der Epithelzellen. Vergrößerung: 100-fach

Abb. 3.11.: Negativkontrolle des gleichen Ausschnittes des Präparates wie in Abb.9. Vergrößerung: 100-fach

Abb. 3.12.:

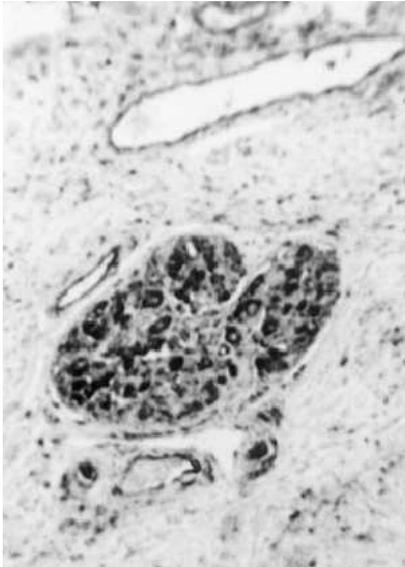


Abb. 3.13.:

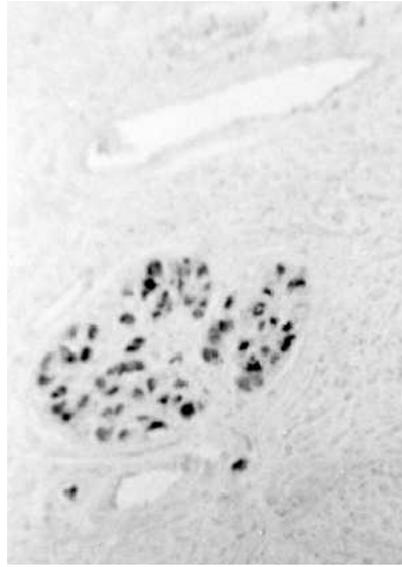


Abb. 3.12.: ISH der MASH-Sonde auf menschlichem Gewebe. Darstellung eines Ganglions. Weiterhin ist zu erkennen, daß auch das Endothel eine Reaktion zeigt, welches nicht mit den zu erwartenden Ergebnissen übereinstimmt.

Abb. 3.13.: Negativkontrolle des gleichen Ausschnittes des Präparates wie in Abb. 11.
Vergrößerung: 200-fach

Abb: 3.14.:

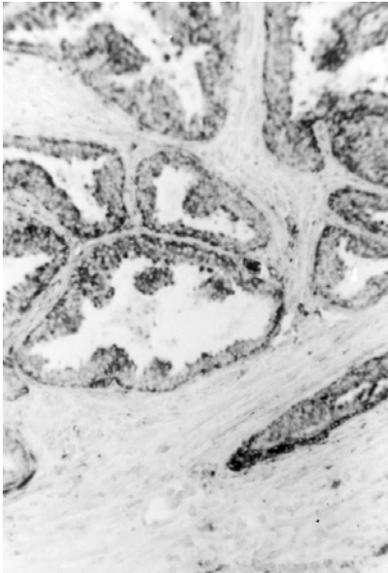


Abb: 3.15.:



Abb. 3.14.: ISH der MASH-Sonde auf menschlichem Prostatagewebe. Es zeigen sich eine sehr starke Reaktion des Epithels, sowie vereinzelte Darstellungen von Stromazellen

Abb. 3.15.: Negativkontrolle, ähnlicher Ausschnitt wie in Abb. 3.14. Vergrößerung: ca. 100-fach

3.3.2. Northern Blot

Da die in der in situ-Hybridisierung erhaltene Markierung keine selektive Darstellung der neuroendokrinen Zellen ergab, wurde ein Northern Blot, nach dem in 2.6.2. bis 2.6.4. angegebenen Protokoll, durchgeführt. Hiermit sollte überprüft werden, ob die Größe der detektierten m-RNA mit der in anderen Arbeiten beschriebenen Größe übereinstimmt. Verwendet wurde Total-RNA aus Proben dreier Prostatae mit benigner Prostatahyperplasie und die folgenden Kulturzellen: LNCaP, PC3, DU 145, P21. Bei der Visualisierung des Signals zeigte sich eine sehr schnelle und starke Schwärzung, die eine Belichtungszeit von lediglich 10 s erlaubte.

Das in Abb. 3.16. dargestellte Ergebnis zeigt eine Bande von 7,5 Kilobasen (kb) Größe. Dieses stimmt nicht mit der theoretisch zu erwartenden Größe der hASH-mRNA, welche eine Größe von 2,8-3,0 kb hat, überein.

Abb. 3.16.:

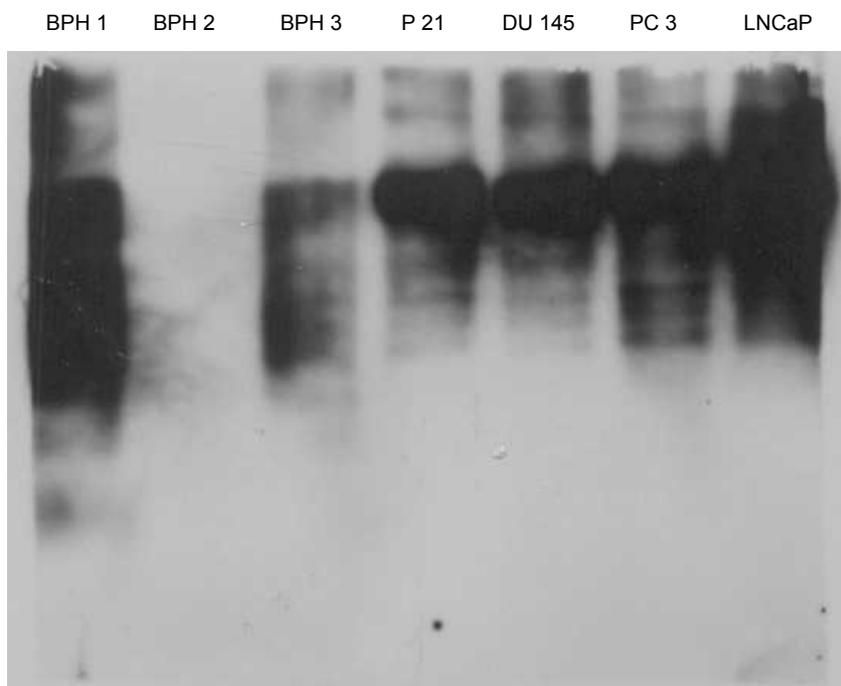


Abb 3.16.: Dargestellt ist das Ergebnis des Northern Blot, welches mit Total-RNA aus verschiedenen Gewebeproben bzw. Zellkulturen durchgeführt wurde. In 6 von 7 Proben ist eine starke Markierung dargestellt. Diese Bande entspricht einer Größe von 7,5 - 8,0 kb und ist nicht mit der zu erwartenden Größe vereinbar. Das Fehlen der Bande in der zweiten Spalte (BPH 2) läßt auf das Fehlen von RNA in diesem Versuchsansatz schließen.

3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die unter 3.3.2. dargestellte Diskrepanz zwischen der erwarteten Größe der hASH-mRNA und des im Northern Blot erhaltenen Signals zu untersuchen, sollte mit der PCR ein Fragment aus dem hASH-Gen amplifiziert, sequenziert und die erhaltene Sequenz mit der erwarteten Sequenz verglichen werden.

Mittels der in Tabelle 2.3. angegebenen Primer wurde aus Total-RNA aus LNCaP-Zellen das entsprechende Stück aus der hASH-mRNA amplifiziert. Zuerst wurde versucht, mit dem Primerpaar HASH 1 ein konstantes Signal zu erhalten. Dafür wurde die PCR mit „annealing“-Temperaturen zwischen 52°C und 60°C, verschiedenen Puffersystemen und unterschiedlich vielen Zyklen (zwischen 25 und 40 Zyklen) durchgeführt. Als Kontrolle diente das in Tabelle 2.3. beschriebene Primerpaar für GAPDH. Keine Versuchsbedingung lieferte mit dem Primerpaar HASH 1 ein konstantes Signal, während das Primerpaar für GAPDH unter den meisten Bedingungen eine klar abgrenzbare Bande lieferte (nicht gezeigt).

Das daraufhin neu konzipierte Primerpaar HASH 1n wurde unter den gleichen Bedingungen in der PCR eingesetzt. Es konnten auch hier, mit dem zu Beginn verwendeten NH_4^+ -Puffer, keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Mit dem anschließend verwendeten KCl-Puffer konnte dann jedoch eine Bande dargestellt werden, die mit etwa 270 bp der erwarteten Fragmentgröße entsprach. Als optimale Versuchsbedingung stellte sich eine „annealing“-Temperatur von 55°C bei 35 Zyklen heraus.

Um das Ergebnis zu verbessern wurde eine AMOC (arithmetic multiplication of cDNA) nach 2.6.7. durchgeführt. Wie in Abb. 3.17. und Abb. 3.18. dargestellt konnte durch dieses Verfahren die Bande deutlicher dargestellt werden, was auf eine höhere Effizienz der cDNA-Synthese schließen ließ.

Abb. 3.17.:

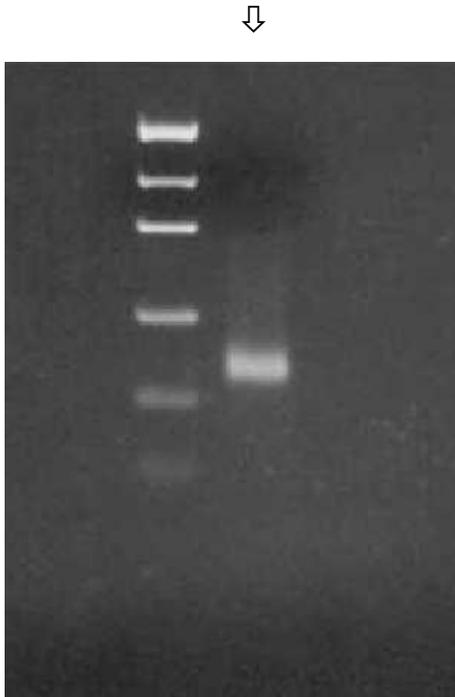


Abb. 3.18.:

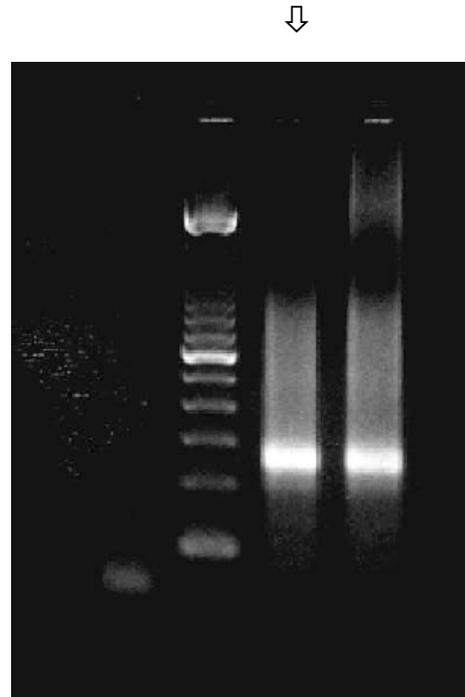


Abb. 3.17. und Abb. 3.18.: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. In beiden Abbildungen liefert die PCR eine klar abgrenzbare Bande, die der gewünschten Größe von ca. 270 bp entspricht. Die Bande ist nach der AMOC (Abb. 3.18.) sehr viel klarer sichtbar, was auf eine höhere Effizienz schließen lässt; in dieser Abbildung sind zwei Ansätze dargestellt. Ebenfalls dargestellt ist in beiden Abbildungen der 100-bp-Marker.

3.3.4. Elution der DNA aus Agarosegel

Die in Abb. 3.18. dargestellte Bande wurde durch die in 2.6.11. beschriebenen Methoden aus dem Gel eluiert und nach Ligation, DNA-Transformation und Mini-Präparation in einem Gel aufgetrennt um die erfolgreiche Durchführung zu überprüfen. Die in Abb. 3.19 dargestellte gelelektrophoretische Auftrennung zeigt die erhaltene Bande, die der Größe des PCR-Produktes entspricht und somit die erfolgreiche Durchführung bestätigt.

Abb. 3.19.:

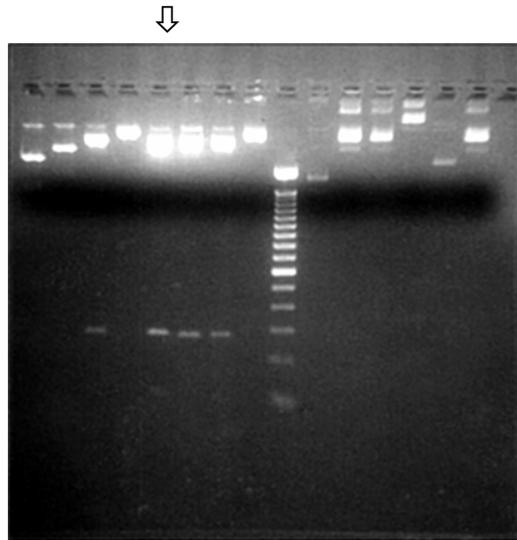


Abb. 3.19.: Gelelektrophoretische Auftrennung der Mini-Präparation. Neben dem 100-bp-Marker sind verschiedene Ansätze der Mini-Präparation erkennbar. Aus den vier Proben mit erfolgreicher Durchführung wurde die mit Pfeil markierte Probe ausgewählt und zur Sequenzierung verwendet.

3.3.5. Sequenzierung

Aus den verschiedenen Proben, die in der oben dargestellten gelelektrophoretischen Auftrennung der Mini-Präparation (Abb. 3.19.) die die gewünschte und klar abgrenzbare Bande lieferten, wurde die in Abb. 3.19. mit Pfeil markierte Probe ausgewählt und zur Sequenzierung verwendet. Die Sequenzierung des in der PCR gewonnenen und aufgereinigten Produktes ergab folgende Sequenz:

PCR-Sequenz (ASH9.SEQ) 254 bp

```

1  TTCGTCCGAC GAGTAGGATG GGTATTACTA TGAAGAAGAT TATTACAAAT
51  GCATGGGCTG TGACGATAAC GTTGTAGATG TGGTCATTAC CTAGAAGGTT
101 GCCTGGCTGG CCCAGCTCGG CTCGAATAAG GAGGCTTAGA GCTGTGCCTA
151 GGACTCCAGC TCATGCGCCG AATAATAGGT ATAGTGTTCC AATGTCTTTG
201 TGGTTTGTAG AGAATAGTCA ACGGTCGGCG AACATCAGTT CGGGCGAAGA
251 CAAG

```

3.3.6. Homologievergleich

Die erhaltene Sequenz sollte auf eine mögliche Homologie mit einer bekannten Sequenz überprüft werden. Dafür wurde mit der EMBL (European Molecular Biology Laboratory) -Datenbank Heidelberg ein Homologievergleich durchgeführt.

Das Ergebnis war eine 95,4%ige Übereinstimmung in einem 239 bp langen Abschnitt mit der Sequenz U31110 aus dem Trp-1 (Transient receptor potential-1) Gen. Im mittleren Abschnitt bp 21-236 stimmten 214 von 216 Basen überein (99,1% Homologie).

Gleichzeitig zeigte sich eine Homologie mit einer Sequenz der Cytochrome C oxidase subunit I (Cox I), welche sich jedoch rückwärts und homolog darstellt. In diesem Bereich (im Homologievergleich unterstrichen hervorgehoben) besteht eine 100%ige Homologie.

```

ASH9.SEQ      TTCGTCCGAC GAGTAGGATG GGTATTACTA TGAAGAAGAT TATTACAAAT
              ::          : ::   ::X  ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
U31110.SEQ    TTGCAAAGCT CATTATGAT- GGTATTACTA TGAAGAAGAT TATTACAAAT

ASH9.SEQ      GCATGGGCTG TGACGATAAC GTTGTAGATG TGGTCATTAC CTAGAAGGTT
              ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: : :::::::::::
U31110.SEQ    GCATGGGCTG TGACGATAAC GTTGTAGATG TGGTCGTTAC CCAGAAGGTT

ASH9.SEQ      GCCTGGCTGG CCCAGCTCGG CTCGAATAAG GAGGCTTAGA GCTGTGCCTA
              ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
U31110.SEQ    GCCTGGCTGG CCCAGCTCGG CTCGAATAAG GAGGCTTAGG GCTGTGCCTA

ASH9.SEQ      GGACTCCAGC TCATGCGCCG AATAATAGGT ATAGTGTTCC AATGTCTTTG
              ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
U31110.SEQ    GGACTCCAGC TCATGCGCCG AATAATAGGT ATAGTGTTCC AATGTCTTTG

ASH9.SEQ      TGTTTTGTAG AGAATAGTCA ACGGTCGGCG AACATCAGTT CGG-GCGAAG
              ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: : ::X::: ::
U31110.SEQ    TGTTTTGTAG AGAATAGTCA ACGGTCGGCG AACATCTCCT CGGAGCGCAG

ASH9.SEQ      ACAAG
              :
U31110.SEQ    CTGGG

```

Homologievergleich: Darstellung von Homologien zwischen dem PCR-Produkt (ASH9.SEQ), Trp 1 (U31110.SEQ) und COX 1 (unterstrichener Bereich, X62996.SEQ).

3.3.7. Gesamtergebnis der molekularbiologischen Untersuchungen

Nach den erfolgreich durchgeführten Untersuchungen ISH, Northern-Blot, PCR und Sequenzierung wurde festgestellt, daß die erhaltene Sequenz nicht mit der zu erwartenden Sequenz aus der hASH 1-mRNA übereinstimmt. Daraus folgt, daß ein spezifischer Nachweis der hASH-mRNA mit der verwendeten Sonde nicht möglich ist.

4. Diskussion

4.1. Immunhistochemische Ergebnisse

4.1.1. Innervation neuroendokriner Zellen

In der Fachliteratur finden sich keine eindeutigen Angaben über eine möglicherweise bestehende Innervation neuroendokriner Zellen (NEC). Wenn eine Innervation vorhanden ist, wäre in der unmittelbaren Umgebung der neuroendokrinen Zellen eine höhere Nervenfaserdichte zu erwarten. Dieser Erwartung entsprechend beschrieb Feyrter (1951) einen „plexus neuroepithelialis“ der aus einer dichten Relation von Nervenfasern und neuroendokrinen Zellen besteht und vor Beginn der Pubertät nachzuweisen ist. In einer ultrastrukturellen Studie wiesen Di Sant'Agnese und De Mesy Jensen (1984) ebenfalls dünne zytoplasmatische Fortsätze nach, welche sich zwischen epithelialen Zellen ausbreiten. Die Autoren konnten in der genannten Studie darstellen, daß es sich dabei um Fortsätze neuroendokriner Zellen handelt, die einerseits den genannten Kontakt zu epithelialen Zellen haben, andererseits konnte auch der Kontakt zu anderen neuroendokrinen Zellen nachgewiesen werden. Ein Hinweis auf eine mögliche Innervation neuroendokriner Zellen wurde von den Autoren nicht gefunden.

Um den Widerspruch zwischen den genannten Ergebnissen zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit in immunhistochemischen Doppelmarkierung neuroendokrine Zellen mit Antikörpern gegen CgA und gleichzeitig Nervenfasern mit dem panneuralen Marker PGP 9,5 nachgewiesen.

Die angefertigten Reaktionen haben nachgewiesen, daß die Dichte der Nervenfasern in der Gegend der neuroendokrinen Zellen der Nervenfaserdichte im entsprechenden Prostatagewebe ohne NEC entspricht. Diese Befunde bestätigen die oben genannten Ergebnisse von Di Sant'Agnese und De Mesy Jensen und bedeuten, daß kein Hinweis auf eine Innervation neuroendokriner Zellen gefunden werden konnte, so daß diese sehr wahrscheinlich nicht innerviert werden.

Über den Ursprung der neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes wurden eine Vielzahl von Studien mit widersprüchlichen Angaben veröffentlicht. Einige Autoren favorisierten eine Ableitung der NEC aus dem Endoderm (Kull 1925), Slack (1995) führte den Ursprung dieser Zellen auf Neuroektoderm zurück. Ein neurogener Ursprung wurde von Danisch (1924), Fujita (1959) und Pearse (1969) angenommen. Kramer und Andrew (1981) konnten dagegen nachweisen, daß weder insulinerge, noch glukagonerge noch somatostatinerge Zellen ihren Ursprung im Neuroektoderm haben. Auch enterochromaffine Zellen leiten sich nach Studien von Andrew (1963, 1976) nicht aus dem Neuroektoderm ab. Inzwischen gibt es vermehrt Hinweise, daß sich NEC des Gastrointestinaltraktes aus Stammzellen des Epithels ableiten. Klonale Arbeiten haben eine Differenzierung unspezifischer endokriner Zellen aus einer gemeinsamen Stammzelle in neoplastischen (Cox und Pierce, 1982; Kirkland, 1988) und normalem (Thompson et al., 1990; Novelli et al. 1996) Darmepithel demonstriert. Dieses Modell von pluripotenten Stammzellen wird auch von mehreren Autoren für die Differenzierung von NEC in der Prostata befürwortet: Bonkhoff et al. (1994) untersuchten, ob Zellen mit gemeinsamen Charakteristika verschiedener Zelltypen des Prostataepithels existieren. In Doppelmarkierungen fanden die Autoren endokrine Zellen, charakterisiert durch CgA, welche gleichzeitig spezifische Basalzellzytokeratine oder Prostata-spezifisches Antigen (PSA), einen spezifischen Marker für Drüsenzellen, exprimieren. Diese Zellen wurden als Zwischenstufen von Drüsenzellen, Basalzellen und NEC interpretiert. Aus diesen Befunden formulierten Bonkhoff und Remberger (1996) ein Stammzellmodell, bei dem sich pluripotente Stammzellen in der Basalzellschicht befinden und sich in die drei Zelltypen des Epithels differenzieren können. So erklärt Bonkhoff (1998) auch das Vorkommen neuroendokriner Tumorzellen, die sich nach seiner Theorie aus PSA-positiven Drüsenzellen ableiten. Dagegen hält er die direkte Herkunft dieser Zellen aus NEC für unwahrscheinlich, weil diese postmitotisch und ausdifferenziert sind. Der postmitotische Status konnte durch Fehlen der proliferations-assoziierten Antigene Ki-67 und MIB-1 (Bonkhoff et al., 1991; Bonkhoff et al., 1995), nachgewiesen werden. Auch Noordzij et al. (1996), die eine Proliferation neuroendokriner Zellen nach Androgenentzug beobachteten, formulierten ein Stammzellmodell, bei dem sich NEC

aus Zwischenstufen ableiten. Xue et al. (1997) unterstützen ein Stammzellmodell durch Untersuchung verschiedener Zytokeratine.

Das von den genannten Autoren propagierte Stammzellmodell kann einige Erkenntnisse, die über NEC in der Prostata bestehen nicht erklären. Beispielsweise ist die Anzahl der neuroendokrinen Zellen in der Prostata im Laufe der Entwicklung sehr konstant (Xue et al. 2000). Dagegen ist ein großer Anstieg der Basal- und Drüsenzellzahl in der Pubertät zu verzeichnen. Weiterhin ist das Verteilungsmuster der neuroendokrinen Zellen in der Prostata sehr unterschiedlich: hohe Anzahlen von NEC finden sich in den periurethralen Gängen, während in den peripheren Bereichen nur wenige neuroendokrine Zellen zu finden sind (Cohen et al. 1993; Cockett et al. 1993). Beide Beobachtungen lassen sich durch das Stammzellmodell nicht erklären. In diesem Modell wäre eine ähnliches Verhältnis zwischen Drüsen-, Basal- und neuroendokrinen Zellen, sowie eine gleichmäßige Verteilung der NEC innerhalb der Prostata zu erwarten.

Dem Stammzellmodell widersprechen Aumüller et al. (1999). Sie untersuchten Prostatagewebe in humanen Feten von früher 10. Woche bis zu pubertärem Gewebe mittels Immunhistochemie und ISH. In dieser Arbeit konnten sie nachweisen, daß keine NEC im urogenitalen Gewebe vor der 10. Woche erschienen. Mit zunehmendem Alter traten zuerst CgA-Immunreaktive Zellen in den Paraganglien des urogenitalen Mesenchyms auf. Anschließend konnte das Einwandern neuroendokriner Zellen aus den prävertebralen sympathischen Ganglien in das urogenitale Mesenchym und Epithel verfolgt werden. Weiterhin wurden in dieser Studie Untersuchungen durchgeführt, die das Vorkommen von Zwischenstufen verschiedener Prostataepithelzellen nachweisen sollten. In diesen Doppelmarkierung mit PGP 9,5 und CgA konnte jedoch in keinem Fall eine Kolo-kalisation dieser beiden Peptide nachgewiesen werden, welche als Zwischenstufe darstellbar sein sollten. Somit ergab sich ein Widerspruch zu den oben genannten Ergebnissen von Bonkhoff et al.

Diese Befunde sprechen für einen neurogenen Ursprung der NEC und gegen die oben erwähnte Stammzelltheorie. Ein weiteres Argument, das dieses Modell stützt ist die schon angeführte Tatsache, daß es sich bei NEC um postmitotische und endgültig ausdifferenzierte Zellen handelt und somit ein gemeinsames Merkmal zu Nervenzellen besteht.

In einer weiteren Arbeit von Aumüller et al. (2001) wird das Stammzellmodell zu einer „dualen Stammzellhypothese“ erweitert. Diese beinhaltet zwei Zellpopulationen: einerseits Zellen, die sich aus dem Sinus urogenitalis ableiten und die Basal- und Drüsenzellen bilden und andererseits Zellen, die neurogenen Ursprung haben, sich aus der Neuralleiste ableiten und neuroendokrine Zellen bilden. Durch Interaktionen zwischen diesen Populationen, und Ausdifferenzierung der verschiedenen Zellen werden die oben genannten Widersprüche in diesem Modell erklärt.

Weiterhin können die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Hinweise auf das Fehlen einer eigenen Innervation neuroendokriner Zellen ein Indiz für den neurogenen Ursprung dieser Zellen sein.

4.1.2. Morphologie neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata

Die Zellmorphologie neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata war bisher sehr selten Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten. Lediglich in zwei Arbeiten von di Sant'Agnesse et al. (1985) bzw. di Sant'Agnesse (1992) wurden verschiedene Zellmorphologien neuroendokriner Zellen beschrieben. Er unterschied zwischen einer offenen („open-type“) und einer geschlossenen („closed-type“) Form, die beide zum Teil dendritische Fortsätze aufweisen. Die offene Form hat einen weiten apikalen zytoplasmatischen Fortsatz, und entspricht weitgehend der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen bipolaren Morphologie, während die geschlossene Form der runden Zellmorphologie entspricht. In erstgenannter Arbeit wurden Doppelmarkierungen durch Silberfärbung und zusätzlicher immunhistochemischer Darstellung von Serotonin durchgeführt. Die Autoren beschrieben ein häufigeres Vorkommen der geschlossenen Morphologie als der offenen. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

In den hier durchgeführten immunhistochemischen Einzel- und Doppelmarkierungen wurden folgende vier unterschiedliche Zellmorphologien neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata beurteilt: runde Zellen, bipolare Zellen, multipolare Zellen und nicht klassifizierbare Zellen. Durch diese Untersuchungen konnten erstmals

Zusammenhänge zwischen Zellmorphologie und Neuropeptiden sowie eine Altersabhängigkeit der Zellmorphologie dargestellt werden.

Ein bei der Beurteilung der Zellmorphologie auftretendes Problem ist die Art des Anschnittes der neuroendokrinen Zellen. Beispielsweise kann eine längliche, bipolare Zelle quer angeschnitten sein und so eine runde Morphologie vortäuschen. Entsprechende Schwierigkeiten kann es auch bei Anschnitten multipolarer Zellen geben. Falsche Interpretationen der Zellmorphologien kann auch durch mikroskopisches Fokussieren nicht komplett ausgeschlossen werden.

Unklarheiten sind auch bei kleinen Anschnitten der Zellen aufgetreten, die keine eindeutige Zuordnung zuließen. Diese wurden dann zu nicht klassifizierbaren Zellen gezählt. Ebenfalls in diese Gruppe wurden Zellen eingeordnet, die zwar als ganzes zu sehen waren aber keine eindeutige Morphologie aufwiesen. Dieses waren aber erheblich weniger häufig als die zuerst genannte Gruppe.

4.1.2.1. Altersabhängigkeit der Zellmorphologie

In menschlichen Prostatagewebe unterschiedlichen Alters (15 und 46 Jahre) und pathologischem Prostatagewebe, mit enthaltener benigner Prostatahyperplasie (BPH) und Prostatakarzinom, wurden immunhistochemische Einzelnachweise mit Darstellung von CgA durchgeführt. Die Anteile der so angefärbten neuroendokrinen Zellen konnten nach der unterschiedlichen Zellmorphologie klassifiziert und verglichen werden.

Die Ergebnisse zeigen eine altersabhängige Abnahme der runden Zellen von 38,8% auf 34,0%. Gleichzeitig stieg der Anteil der bipolaren Zellen von 34,4% auf 41,5% und der Anteil der multipolaren Zellen von 10,4% auf 14,9% (Prozentzahlen beziehen sich auf juveniles Gewebe bzw. BPH-Gewebe).

Die dargestellten Ergebnisse sprechen dafür, daß morphologische Veränderungen der neuroendokrinen Zellen mit Zunahme des Alters vorkommen. Bei Geburt überwiegt der Anteil der runden Zellen, die dann eine bipolare Morphologie entwickeln und sich später noch zu multipolaren Zellen weiterentwickeln können. Außerdem wurde gezeigt, daß die Anteile der verschiedenen Zellmorphologien bereits im Alter von 15

Jahren denen der späteren relativ ähnlich sind. Dieses zeigt, daß die Ausbildung oder Umwandlung in verschiedene Zellmorphologien zum größten Teil schon zu einem früheren Zeitpunkt stattfindet.

Für eine frühe Differenzierung neuroendokriner Zellen sprechen Ergebnisse einer Arbeit von Xue et al. (2000). Sie fanden heraus, daß die Zelldichte neuroendokriner Zellen in der menschlichen Prostata nicht mit dem Gestationsalter humaner Feten bzw. juveniler bzw. adulter Prostatae korreliert. Eine lineare Beziehung bestand dagegen zwischen der Größe der Epithelfläche und der Zellzahl. Aus diesen Ergebnissen folgern die Autoren, daß die Zelldichte neuroendokriner Zellen in der Prostata zu einem frühen Zeitpunkt einen bestimmten Punkt erreicht und sie anschließend bis zum Erwachsenenalter konstant bleibt. Weiterhin wird die Hypothese aufgestellt, daß zu diesem Zeitpunkt die NEC einen „steady state“ erreicht haben, bei dem sich die Zellzahl von selbst aufrecht erhält. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, daß in der unmittelbaren Umgebung NEC vermehrt Mitosen gefunden werden, welche für einen parakrinen, proliferationsfördernden Effekt der NEC spricht (di Sant'Agnesse, 1992; di Sant'Agnesse, 1995). So könnte die Zellzahl der Prostata durch neuroendokrin vermittelte Proliferation einerseits und absterbende Zellen andererseits konstant bleiben. Zusätzliche Indizien liefert die Beobachtung, daß in proliferierendem Prostatagewebe (BPH) eine erhöhte Zahl neuroendokriner Zellen gefunden wurde, während in reifen Noduli eine verminderte Anzahl nachzuweisen ist (Cockett et al. 1993). Diese Theorie schreibt den NEC eine fundamentale Rolle bei der Homöostase der Prostata und ihrer glandulären Struktur zu.

Um die Theorie einer sich früh entwickelnden und morphologisch differenzierenden Zellpopulation neuroendokriner Zellen zu überprüfen, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Besonders aussagekräftig wären Untersuchungen an noch jüngeren Prostatae bzw. an Embryogewebe. Auch Untersuchungen an älteren Prostatae und Prostatakarzinomen eines späteren Stadiums könnten die Altersabhängigkeit der Zellmorphologie neuroendokriner Zellen bestätigen.

4.1.2.2. Korrelationen zwischen Zellmorphologie und Neuropeptiden

In der vorliegenden Arbeit wurden in immunhistochemischen Einzel- und Doppelmarkierungen die intrazellulären Neuropeptide bzw. -proteine in Abhängigkeit von der Zellmorphologie beurteilt. Grundsätzlich konnte nachgewiesen werden, daß runde Zellen und bipolare Zellen am häufigsten vorkommen. Sie haben Anteile zwischen 30 und 40%. In 17 von 21 Fällen hatten die runden Zellen einen mindestens so großen Anteil wie die bipolaren Zellen. Die multipolaren Zellen hatten immer einen kleineren Anteil als die runden und in 20 von 21 Fällen einen kleineren Anteil als die bipolaren Zellen. In der Darstellung mit VMAT1 konnten sie den größten Anteil vorweisen (21,5%), jedoch konnte dieses in der Doppeldarstellung nicht bestätigt werden.

Wie unter 4.1.2.1. dargestellt, verändert sich die Zellmorphologie mit steigendem Alter von rund über bipolar nach multipolar. Zusätzlich beinhalten die Zellen der jeweiligen Morphologie verschiedene neuroendokrine Substanzen. Wenn zusätzlich betrachtet wird, daß es sich bei NEC um postmitotische, ausdifferenzierte Zellen handelt, kann aus diesen Beobachtungen kann auf eine Veränderung der exprimierten Substanzen im Laufe des Lebens geschlossen werden. Im Falle des VMAT 1 würde dieses bedeuten, daß aufgrund der vermehrten Expression in multipolaren Zellen eine Zunahme mit dem Alter auftritt. Möglicherweise könnte diese wiederum im Zusammenhang mit der ebenfalls im Alter auftretenden BPH stehen.

Unter 4.1.2.1. wurde bereits beschrieben, daß eine Proliferation von Zellen in der unmittelbaren Umgebung neuroendokriner Zellen, besonders beim Auftreten der BPH, nachgewiesen werden kann. Diese Beobachtung wird auf einen parakrinen, proliferationsfördernden Effekt der NEC zurückgeführt, welcher wahrscheinlich durch einen Transmitter ausgelöst wird. Dieser Transmitter ist bisher noch unbekannt, aber aus den hier vorgelegten Ergebnissen ergeben sich Hinweise darauf, daß die Expression von VMAT 1 in diesem Zusammenhang ein bedeutende Rolle spielen könnte.

In den Einzelreaktionen mit Darstellung von Calcitonin-positiven Zellen ist der höchste Anteil (47,0%) an runden Zellen nachgewiesen worden. Da runde Zellen, wie beschrieben, vor allem im jüngeren Lebensalter auftreten, kann auf eine Funktion von

Calcitonin zu diesem Zeitpunkt geschlossen werden. In Arbeiten von di Sant'Agnesse und Cockett (1996) sowie Larran Lopez et al. (2000) werden proliferative Effekte von Calcitonin beschrieben. Letztere Arbeitsgruppe untersuchte die Wirkung von Bombesin und Calcitonin auf die Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3, DU-145 und LNCaP. Beide Substanzen förderten das Wachstum der Zelllinien PC-3 und DU-145, während kein Effekt auf die LNCaP nachgewiesen werden konnte. Die Hinweise von einem proliferativen Effekt einerseits und dem Auftreten in runden Zellen, und damit der Expression in jungem Alter, andererseits können Hinweise auf eine mögliche Funktion des Calcitonins bei der Entwicklung der Prostata sein. In den weiterhin durchgeführten Doppelmarkierungen konnte außerdem eine Veränderung des Grades der Kolo-kalisation mit dem Alter nachgewiesen werden, welche wiederum ein Hinweis für eine vermutlich proliferative Funktion des Calcitonins während der Entwicklung der Prostata sein könnte.

Eine quantitative Abnahme Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) -immunreaktiver Zellen in pathologischem Prostatagewebe (BPH) konnte von Cockett et al. (1993) nachgewiesen werden. Die Autoren folgerten aus ihren Befunden, daß 5-HT in der Kontrolle der Zellproliferation durch parakrine hormonale Mechanismen beteiligt ist und möglicherweise auch in der Pathogenese der BPH eine Rolle spielt. Auch der Nachweis einer wachstumsfördernden Aktivität des Serotonins konnte inzwischen gefunden werden (Abrahamsson, 1996; di Sant'Agnesse, 1995). Die Verminderung der Zellzahl könnte auf eine negative Rückkopplung zwischen Zellproliferation und Serotonin zurückzuführen sein. Ein weiterer Hinweis für diese Theorie wäre eine verminderte Anzahl multipolarer, serotoninerger Zellen in pathologischem Prostatagewebe. Dieses konnte aber nicht gefunden werden, die Zahl der serotoninergen, multipolaren Zellen (11,7%) ist nicht gegenüber der Anzahl sonstiger multipolarer Zellen (9,5-13,0%) herabgesetzt.

4.1.3. Kolokalisationen von Neuropeptiden in neuroendokrinen Zellen

Kolokalisationen verschiedener Neuropeptide in neuroendokrinen Zellen sind bisher Gegenstand einiger wissenschaftlicher Arbeiten gewesen. Auch im menschlichem Prostatagewebe gibt es verschiedene Ergebnisse über vorhandene Kolokalisationen, jedoch sind diese Angaben vielfältig und zum Teil widersprüchlich. Gerade die Vielzahl der exprimierten Substanzen hat eine abschließende Beurteilung noch nicht zugelassen. Um bisher erzielte Kenntnisse zu vertiefen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Neuropeptide in immunhistochemischen Doppeldarstellungen in neuroendokrinen Zellen nachgewiesen. Antikörper gegen folgende 6 Substanzen wurden verwendet:

- Chromogranin A (CgA),
- Serotonin (5-HT),
- Vesikulärer Monoaminotransporter 1 (VMAT 1),
- Gastrin-Related-Peptide (GRP),
- Calcitonin,
- Neuronspezifische Enolase (NSE)

Bei CgA handelt es sich um ein 49-Kilodalton großes Protein, das ausschließlich in neuroendokrinen Zellen produziert wird. Über die Funktion dieses Proteins gibt es noch keine abschließenden Ergebnisse. Multiple biologische Funktionen des CgAs und seiner proteolytischen Fragmente werden diskutiert. Angenommen werden z.B. eine intrazelluläre hormonbindende Funktion, ein inhibitorischer Effekt auf die Sekretion verschiedener neuroendokriner Hormone und es wird die Existenz als Vorstufe verschiedener kleinerer Fragmente diskutiert (Winkler und Fischer-Colbrrie, 1992; O'Connor et al., 1994). Auch die intrazelluläre Bindung von Calcium und damit die Regulierung der biologischen Effekte dieses Ions, sowie die Beteiligung bei der Speicherung und Sekretion von Hormonen sind vermutete, aber noch nicht bestätigte Funktionen.

In der Fachliteratur ist es weitgehend akzeptiert, daß sich neuroendokrine Zellen am besten durch eine Darstellung von CgA identifizieren lassen, weil es das am weitesten verbreitete Protein ist (Portela-Gomes et al., 1997). Es finden sich sogar Angaben, nach denen NEC über das Vorkommen von CgA definiert wird (Bonkhoff, 1998). Aus

diesem Grund wurde jeweils eine Darstellung der CgA-immunreaktiven Zellen durchgeführt und anschließend wurde das zweite Protein immunhistochemisch nachgewiesen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß möglichst alle neuroendokrinen Zellen erfaßt wurden und der größte Teil der Zellen beurteilt werden konnten.

Ein weiterer Grund für die Darstellung von CgA in allen Doppelmarkierungen ist das in letzter Zeit verstärkte wissenschaftliche Interesse an CgA, welche sich vor allem auf CgA als neuroendokriner Marker bei Neoplasien der Prostata und dem prognostischem Aussagewert von erhöhten Serumspiegeln konzentriert.

Besonderes Interesse muß auf die Früherkennung von neuroendokrinen Tumoren der Prostata gelegt werden. Diese Tumoren fallen durch Androgenresistenz auf und entziehen sich dadurch einer hormonellen Therapie, wodurch die schlechte Prognose begründet wird. Gerade hierfür ist es wichtig, weitere Erkenntnisse über neuroendokrine Zellen und Neuropeptide zu erwerben. Möglicherweise können die erworbenen Grundlagen zu Erfolgen auf diesem Gebiet führen.

Unter physiologischen Bedingungen stammt der Hauptteil des im Serum zirkulierenden CgA aus dem Nebennierenmark, während neuroendokrine Zellen nur einen kleinen Teil dazu beitragen (Winkler, 1976; O'Connor et al., 1983; Rindi et al., 1986; Fischer-Colbrie et al., 1987). Im Falle eines auftretenden Prostatakarzinoms mit Proliferation NEC steigt letzterer Teil und über den dann erhöhten CgA-Spiegel könnte das Karzinom diagnostiziert werden.

Erste Hinweise für die Bedeutung von CgA als Tumormarker sind inzwischen gefunden worden. Deftos et al. (1996) konnten darstellen, daß erhöhte Serumspiegel von CgA bei Patienten mit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen vorkommen, welche zum Teil keine erhöhten Serumspiegel für den Tumormarker Prostata spezifisches Antigen (PSA) aufwiesen. Auch Hoosein et al. (1995) und Cussenot et al. (1996) beschrieben erhöhte Serumspiegel von CgA bei androgenresistenten Tumoren. Weiterhin wurde in diesen Arbeiten eine Korrelation zwischen Fernmetastasen und neuroendokrinen Tumormarkern, aber keinen Zusammenhang mit lokaler Tumorprogression gefunden.

Angelsen et al. (1997) konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Tumorprogression und erhöhten CgA-Serumspiegeln nachweisen. Interessant war in dieser Studie, daß keine erhöhten Spiegel von NSE gefunden wurden, obwohl 77% der Fälle immunhistochemisch NSE-positiv waren. Diese Studie läßt vermuten, daß NSE, im Gegensatz zu CgA, für eine Früherkennung von Prostatakarzinomen nicht geeignet ist.

Selbstverständlich sollte die Bestimmung von CgA im Serum nicht an Stelle von, sondern zusätzlich zur Bestimmung von PSA erfolgen. Weitere Studien müssen zeigen, ob auf diese Weise bei Patienten trotz negativer PSA-Werte ein vorhandenes Prostatakarzinom diagnostiziert werden kann und so eine frühere Therapie eingeleitet werden kann.

Gegen die Möglichkeit der Früherkennung von neuroendokrinen Tumoren über erhöhte CgA-Serumspiegel sprechen Ergebnisse von Van de Voorde et al. (1995). Diese Gruppe fand heraus, daß die Population der neuroendokrinen Zellen in verschiedenen Tumoren, vor allem Tumoren der peripheren Zone der Prostata, im Laufe der Tumorprogression ansteigt und so relevante Serumspiegel möglicherweise erst spät auftreten.

Einige Studien zur Therapie mit Somatostatinanaloga, generellen Inhibitoren der Sekretion neuroendokriner Hormonen, liegen vor: Das Somatostatinanalogon RC-160 inhibiert das Wachstum der androgenunabhängigen Prostatakarzinom-Zelllinie Dunning R-3327-AT-1 (Pinski et al., 1994) und der in Mäuse transplantierten humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU 145 (Pinski et al., 1993).

Um weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet der CgA-immunreaktiven Zellen zu sammeln, wurde ein besonderer Schwerpunkt auf diese Zellen gerichtet und CgA in allen immunhistochemischen Doppelmarkierungen dargestellt.

Seit längerem ist bekannt, daß Kolokalisationen von Neuropeptiden in adrenergen (Sisto et al. 1989) und cholinergen (Ottesen und Fahrenkrug, 1995) Nervenfasern vorkommen. Eine Vielzahl von Untersuchungen gibt es in verschiedenen Organen des Urogenitaltraktes. Beispielsweise konnten Kolokalisationen von NADPH-Diaphorase mit verschiedenen Neuropeptiden in ureterovesikalen Ganglien nachgewiesen werden (Grozdanovic und Baumgarten 1996). Jen et al. (1996, 1999) beschrieben in mehreren

Arbeiten Kolokalisationen von Neuropeptiden, Stickoxyd-Synthase (NOS), Katecholaminen und Tyrosin-Hydroxylase in Nervenfasern des Ductus deferens bzw. pelvinen Ganglien. Das Vorkommen von NPY in adrenergen Nervenfasern (Yuri, 1990) konnte somit bestätigt werden.

Dixon et al. (1997) verwendeten, wie auch in der vorliegenden Arbeit, immunhistochemische Doppelmarkierungen, um Kolokalisationen nachzuweisen. Ihnen gelang die Darstellung unterschiedlicher Neuropeptide in intramuralen Ganglien der humanen Blase. In dieser Arbeit konnten eine Reihe von Kolokalisationen verschiedener Neuropeptide in adrenergen (d.h. TH und DBH-positiven Neuronen) und cholinergen (d.h. TH- und DBH-negativen Neuronen) nachgewiesen werden. Im einzelnen wurden CGRP, NPY, NOS, SOM, und VIP untersucht.

Ein überwiegendes Vorkommen von VIP in cholinergen Nervenfasern konnte von Moss et al. (1987) nachgewiesen werden. Diese Fasern wurden hauptsächlich in der Submukosa von Ductus deferens und Samenblase gefunden.

Über Kolokalisationen von Neuropeptiden in neuroendokrinen Zellen der menschlichen Prostata gibt ebenfalls eine Reihe von Ergebnissen. Beispielsweise konnte in adenomatösen humanen Prostatae eine fast vollständige Kolokalisation zwischen Cholezystokinin (CCK) und 5-HT nachgewiesen werden (Cecio et al. 1993). Jen et al. (1996) untersuchten NOS und konnten feststellen, daß dieses Enzym, und entsprechend Stickoxyd (NO), teilweise in adrenergen Nervenfasern mit TH kolokalisiert vorkommt. In einer immunhistochemischen Studie konnten Hedlund et al. (1997) nachweisen, daß NOS und VIP in varikösen Nervenendigungen generell kolokalisiert vorkommen, dagegen sind NOS und CGRP nicht kolokalisiert, zeigen aber ein ähnliches Verteilungsmuster. Kaleczyc et al. (1999) konnten darstellen, daß in adrenergen Nervenfasern außer TH noch Enkephalin, NPY und Somastostatin vorkommen. Dagegen sind in nicht-adrenergen, und damit wahrscheinlich cholinergen Fasern, VIP, NPY und Somastostatin lokalisiert, während sensible Nervenfasern CGRP oder SP enthalten. Diese Arbeitsgruppe konnte also die oben angeführten Ergebnisse über VIP und NPY bestätigen, auch wenn diese Studie ist im Gegensatz zu den anderen genannten Studien nicht an humanen Prostatae, sondern an Schweineprostatae durchgeführt wurde.

Über mögliche Kollokationen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Neuropeptide konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. In den oben angegebenen Arbeiten zeigen sich nur Kollokationen anderer Substanzen, wobei eine Vielzahl von Kollokationen beschrieben werden konnten.

Die hier erzielten Ergebnisse zeigten, daß alle dargestellten Neuropeptide eine Kollokation mit CgA in neuroendokrinen Zellen der Prostata aufweisen. Große Unterschiede gab es bei dem Grad der Kollokation: in absteigender Reihenfolge konnten folgende Grade der Kollokationen nachgewiesen werden: NSE (88,5 %), VMAT 1 (79,0 %), Calcitonin (62,4 %), GRP (30,8 %), 5-HT (22,0 %).

Hervorzuheben sind nachgewiesene Veränderungen des Grades der Kollokation mit dem Alter. Dieses konnte vor allem in der Doppelmarkierung mit CgA und Calcitonin dargestellt werden. Im juvenilen Gewebe konnte eine Kollokation von lediglich 6,0% nachgewiesen werden, dagegen zeigte sich im pathologischen Gewebe eine Kollokation von 62,4%. Im Falle des Doppelnachweises mit CgA und NSE konnte ebenfalls ein großer altersabhängiger Unterschied festgestellt werden (juvenil 6,0%; adult 88,5% Kollokation). Die hier erschienenen Unterschiede sind jedoch wahrscheinlich auf unspezifische Kreuzreaktionen zurückzuführen (s.u.). Ob der Unterschied bei der Darstellung mit Calcitonin ebenfalls unspezifische Reaktionen vorliegen, konnte nicht abschließend geklärt werden.

In den immunhistochemischen Untersuchungen wurden hauptsächlich polyklonale Antikörper verwendet worden. Unter Versuchsbedingungen, in denen zwei monoklonale oder zwei polyklonale Antikörper verwendet wurden, sind unspezifische Kreuzreaktionen beschrieben worden (Petrusz, 1976; Swaab et al., 1977). Diese unspezifischen Reaktionen sollten durch Blocken mit Rinderserumalbumin (BSA) verhindert werden. Trotzdem scheinen unspezifische Signale aufgetreten zu sein. Im Falle der Doppelmarkierung mit CgA und NSE fand sich eine fast vollständige (88,5%) Kollokation und keine ausschließlich CgA-positive Zellen. So wären in den Einzelmarkierungen eine mindestens gleich hohe Zahl NSE-reaktiver Zellen zu erwarten gewesen. Dagegen sind in diesen Darstellungen eine erheblich kleinere Anzahl von NSE-positiven als von CgA-immunreaktiven Zellen gefunden worden.

Dieses wahrscheinlich aufgetretene Phänomen schränkt das Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen ein. Durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen CgA hätte ein eindeutigeres Ergebnis erzielt werden können, jedoch wurde auf diesen wegen des besseren Färbeverhaltens des polyklonalen Antikörpers verzichtet.

Ein weiteres aufgetretenes Problem bei den Doppelmarkierungen ist die in manchen Fällen schlechte Erkennbarkeit beider Farben. Besonders die bei der ABC-Technik erzeugte graue Farbe ist häufig so dominant gewesen, daß die in der PAP-Technik erzeugte rote Markierung, trotz verschiedener Versuche der Optimierung, nur schlecht zu erkennen war.

4.2. Molekularbiologische Ergebnisse

Wie bereits erwähnt haben verschiedene Studien den Verdacht nahegelegt, daß neuroendokrine Zellen eine neuronale Herkunft haben. Um weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu sammeln, sollte ein Protein nachgewiesen werden, welches in der Entwicklung von Nervenzellen eine wichtige Rolle spielt und damit Hinweise auf den Ursprung dieser Zellen gibt.

In Studien an der *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß Transkriptionsfaktoren mit einer Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne eine entscheidende Rolle in der Neurogenese spielen. Zu der HLH-Familie gehört auch das MASH (mammalian achaete scute homologue)- Protein, das ein „mammalian homologue“ des Achaete Scute Komplexes (ASC) ist. Das human Achaete Scute Homologue (hASH) ist das menschliche Analog dieses Komplexes, wobei zwischen beiden eine 89%ige Identität besteht. Verschiedene Arbeiten haben nachgewiesen, daß MASH1 Funktionen bei der Entwicklung und Differenzierung von Nervenzellen hat. So konnte dargestellt werden, daß in mindestens folgenden Strukturen die Expression von MASH1 für die funktionell und anatomisch fehlerfreie Entwicklung essentiell ist: Retina (Tomita et al. 1996), adrenerge und noradrenerge Zentren des ZNS (Hirsch et al. 1998), Telencephalon (Casarosa et al. 1999), enterische Neurone und autonome Nervenzellen (Lo et al.

1998). Das MASH1-Protein schien somit für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen geeignet.

In der HLH-Familie gibt es aktive und repressive Transkriptionsfaktoren. Während MASH1 ein aktiver Faktor ist, wird seine Wirkung von HES1 (hairy-enhancer-of-split-1) antagonisiert. Eine erhöhte Expression von HES führt demnach zu einer Repression von MASH1 und einer fehlerhaften Entwicklung von Nervenzellen in Gehirn und Retina. Null-Mutationen von HES zeigen eine erhöhte MASH1-Expression, welche zu einer beschleunigten Differenzierung von Nervenzellen führt und ebenfalls schwere Defekte zur Folge hat (Kageyama et al. 1997).

Borges et al. (1997) konnten zeigen, daß hASH essentiell für die Differenzierung neuroendokriner Zellen in der Lunge ist. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß bei Mäusen mit fehlender Expression von hASH1 keine neuroendokrinen Zellen der Lunge mehr nachweisbar waren. Außerdem wurde festgestellt, daß hASH1 selektiv in normalen fetalen neuroendokrinen Zellen der Lunge, sowie Lungentumoren mit neuroendokrinen Merkmalen, exprimiert wird. Eine Beschränkung der hASH1-Expression auf neuroendokrine Zelllinien konnten Chen et al. (1997) nachweisen.

Auch die Differenzierung von C-Zellen der Schilddrüse ist von der MASH1-Expression abhängig. In knockout-Mäusen fanden Lanigan et al. (1998) eine sehr stark reduzierte Anzahl von Calcitonin- und Serotonin-immunreaktiven Zellen. In Kulturzellen, die die beiden Neuropeptide noch exprimierten, war keine Aktivität von MASH1 nachzuweisen. Daraus kann geschlossen werden, daß MASH nicht direkt für die Expression benötigt wird.

Gegen den möglichen Nachweis von MASH1 in neuroendokrinen Zellen der adulten Prostata sprechen folgende Ergebnisse:

Lo et al. (1991) beschrieben in Studien an Rattenembryonen, daß eine Expression von MASH im peripheren Nervensystem ausschließlich in Vorläuferzellen von sympathischen und enterischen Neuronen vorkommt. Weiterhin konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß die Expression von MASH1 nur transient ist und daß das Protein gleichzeitig mit der Expression von neuronspezifischen Differenzierungsmarkern (z.B. Neurofilament oder SGC10) während der

Embryonalperiode verschwindet. Diese immunhistochemisch erzielten Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen: die *achaete-scute* mRNA-Expression in der *Drosophila* (Cabrera et al. 1987, Romani et al. 1989) und der Nachweis des MASH-Proteins (Cubas et al. 1991) zeigte ein ähnliches Ergebnis.

Aus den bisher geschilderten Ergebnissen ergibt sich der Verdacht, daß auch in neuroendokrinen Zellen der Prostata MASH1 nachgewiesen werden könnte. In diesem Falle wäre ein spezifischer Nachweis neuroendokriner Zellen in der ISH zu erwarten, die etwa dem Muster einer immunhistochemischen Reaktionen mit CgA entspricht. Bei einer transienten Expression (s.o.) von MASH1 wäre weder eine Darstellung neuroendokriner Zellen noch sonstiger Strukturen zu erwarten, weil die ISH auf Schnitten der adulten Prostata durchgeführt wurde. Um zu überprüfen, ob eine spezifische Darstellung neuroendokriner Zellen möglich ist, sollte in der vorliegenden Arbeit durch die *in situ*-Hybridisierung die MASH1-mRNA nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den erwarteten Mustern zeigte sich eine sehr intensive Markierung des gesamten Epithels, der Ganglien, des Endothels und auch von Stromazellen (vergl. Abb. 3.10. bis 3.15.). Ein unspezifischer Nachweis dieser Strukturen ist aufgrund der sehr kurzen Inkubationszeit bei der Detektion des Signals nicht zu erwarten. Auch bei der wiederholten Durchführung der ISH konnte das gleiche Ergebnis erzielt werden, so daß die Darstellung eines Artefaktes als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Für die Detektion eines spezifischen Signals spricht weiterhin der durchgeführte Northern-Blot. Diese Untersuchung wurde mit sechs verschiedenen Proben durchgeführt. Es handelte sich hierbei um Total-RNA aus Zellen die Geweben mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) entstammen, sowie aus folgenden Kulturzellen: LNCaP, (HPCPs) P 21, DU 145 und PC 3. In sechs dieser sieben Proben konnte eine klar abgrenzbare Bande dargestellt werden (vergl. Abb. 3.16.). Das Fehlen der Bande in einem dieser Versuchsansätze konnte durch das Fehlen von RNA in diesem Ansatz erklärt werden. Bei der Visualisierung des Signals erfolgte die Schwärzung des Röntgenfilmes ungewöhnlich schnell, so daß sich das beste Ergebnis bei einer Entwicklungsdauer von lediglich 10 s ergab. Diese schnelle Reaktion mit Darstellung

einer deutlich abgrenzbaren Bande ist ein weiterer Hinweis auf eine spezifische Hybridisierung der verwendeten MASH-Sonde. Die dargestellte Bande entsprach einer Größe der gebundenen RNA von 7,5 - 8,0 kb, welche nicht mit der erwarteten Größe von 2,8 - 3,0 kb (Johnson et al. 1990) übereinstimmt.

Die in Northern Blot aufgetretene Diskrepanz zwischen der theoretisch erwarteten und der erhaltenen Größe der Bande und damit der RNA kann beispielsweise auf eine Kreuzreaktion mit einer anderen Sequenz zurückzuführen sein. Jedoch konnte eine Kreuzreaktion der Sonde mit einer anderen RNA aufgrund der Länge der Sonde und dem Vergleich mit der EMBL-Datenbank (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) nicht erwartet werden. Um zu überprüfen ob diese trotzdem stattgefunden hat, wurde die PCR eingesetzt, um ein Stück aus der Sequenz des MASH-Genes zu amplifizieren, zu sequenzieren und zu vergleichen ob die Sequenz mit MASH übereinstimmt.

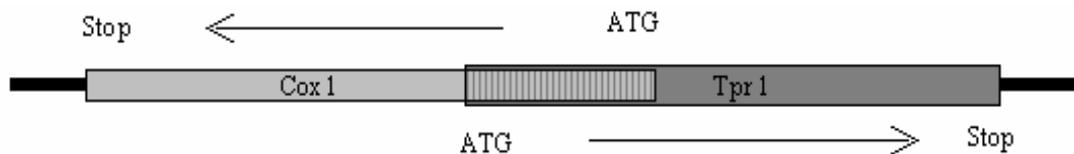
Für die Durchführung der PCR wurden die unter 2.3.4.2. angegebenen Primerpaare erstellt. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für das hASH-Gen wurden mit dem PC-Programm PC/Gene (Intelligenetics, Belgien) erstellt. Dabei wurden die Regeln für die Konzeption von Primern beachtet (Taylor, 1993). Die Primersequenzen wurden hinsichtlich möglicherweise auftretender Homologien mit der EMBL-Datenbank verglichen. Unter den angewendeten Bedingungen sollte keine Kreuzreaktion mit einer anderen Sequenz erfolgen.

Nach erfolgreicher Durchführung der PCR und Sequenzierung des erhaltenen 239 bp langen Produktes wurde diese Sequenz (vergl. 3.3.5.) mit der EMBL-Datenbank verglichen. In der erhaltenen Sequenz konnte keine Homologie des PCR-Produktes mit der MASH festgestellt werden. Auch die eingesetzten Primer stimmen nur zu einem kleinen Teil mit Anfang und Ende der erhaltenen Sequenz überein. Diese aufgetretenen Unterschiede zwischen Primersequenz und Anfang bzw. Ende des PCR-Produktes lassen keine Rückschlüsse auf die Ursache des Ergebnisses zu, d. h. es kann nicht erklärt werden, warum die Primer mit dieser Sequenz hybridisiert haben.

Bei dem anschließend durchgeführten Homologievergleich wurde eine 95,4%ige Homologie des PCR-Produktes mit einem Abschnitt des Trp-1 Gens (Transient receptor potential, Sequenz U31110) nachgewiesen (vergl. 3.3.6.). Gleichzeitig wurde eine 100%ige Homologie mit einer Sequenz aus der Cytochrom C Oxidase Subunit 1 (Cox1) festgestellt (unterstrichener Bereich im Homologievergleich, 3.3.6.). Diese befindet sich homolog und in umgekehrter Richtung im Abschnitt bp 5224-5546 der Sequenz X62996.

Diese Befunde bedeuten, daß sich möglicherweise innerhalb des Trp1-Genes ein zweites Gen (Cox1) befindet (vergl. Abb. 4.1.). Es ließ sich anhand der durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht bewiesen ob, dieses Modell für die untersuchten Sequenzen zutrifft. Zur Bestätigung dieses Modells bedarf es noch weiterer Versuche und Ergebnisse.

Abb. 4.1. : Schematische Darstellung der Genkarte



Auch nach Abschluß der durchgeführten Untersuchungen ist nicht zu erklären, warum die ISH kein eindeutiges Ergebnis lieferte. Es konnte auch nicht nachgewiesen werden, ob die eingesetzte Sonde mit der erhaltenen Sequenz oder einer anderen m-RNA in der ISH und im Northern Blot hybridisiert hat. Weiterhin kann nicht erklärt werden, warum die PCR nach Sequenzierung des Produktes das dargestellte Ergebnis lieferte.

Zusammenfassend kann lediglich festgestellt werden, daß eine spezifische Darstellung neuroendokriner Zellen mit der verwendeten MASH1-Sonde nicht möglich ist.

5. Zusammenfassung

Fragestellung. Über Funktionen neuroendokriner Zellen der menschlichen Prostata gibt es bisher wenige konkrete Kenntnisse. Vermutet werden regulative Funktionen bei Wachstum und metabolischen Prozessen. Um weitere Erkenntnisse zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Innervation dieser Zellen, Kolokalisationen verschiedener Substanzen in den Zellen sowie Zusammenhänge zwischen Zellmorphologie und verschiedenen exprimierten Substanzen untersucht. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf Chromogranin A gelegt, da dieses Protein zur Zeit als möglicher Tumormarker für neuroendokrine Tumoren der Prostata diskutiert wird.

Materialien und Methoden. Neuroendokrine Zellen wurden auf Schnitten menschlichen Prostatagewebes durch immunhistochemische Einzel- und Doppelmarkierungen dargestellt und anschließend nach der Nervenfaserdichte in der Umgebung, nach ihrer Morphologie, nach den markierten Substanzen, sowie deren Kolokalisationen beurteilt. Weiterhin sollten neuroendokrine Zellen durch die in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden, um mit der verwendeten MASH-Sonde Hinweise auf den möglichen neurogenen Ursprung dieser Zellen zu erlangen.

Ergebnisse/Schlußfolgerungen. In immunhistochemischen Doppelmarkierungen konnte keine erhöhte Nervenfaserdichte in der unmittelbaren Umgebung neuroendokriner Zellen dargestellt werden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß sehr wahrscheinlich keine Innervation neuroendokriner Zellen besteht.

In weiteren Untersuchungen konnten Hinweise auf eine Altersabhängigkeit der Zellmorphologie gefunden werden. Im juvenilen Gewebe wurden am meisten runde Zellen nachgewiesen. Mit zunehmendem Alter erhöhte sich der Teil der bipolaren Zellen, der größte Anteil multipolarer Zellen bestand im pathologischen Prostatagewebe. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine chronologische Veränderung von runder über bipolarer zu einer multipolaren Morphologie besteht.

Kolokalisationen bestanden zwischen Chromogranin A und allen untersuchten Substanzen. In absteigender Reihenfolge konnten Kolokalisationen mit NSE (88,5%), VMAT1 (79,0%), Calcitonin (62,4%), CGRP (30,8%) und 5-HT (22,0%) nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung der Altersabhängigkeit der Zellmorphologie und des Grades der Kolo-kalisation konnten Hinweise auf eine proliferative Funktion Calcitonins bei der Entwicklung der Prostata gefunden werden. Ebenfalls kann auf eine Bedeutung von VMAT 1 bei der Genese der benignen Prostatahyperplasie geschossen werden.

Eine selektive Darstellung neuroendokriner Zellen in der menschlichen Prostata durch in situ-Hybridisierung war mit der verwendeten Sonde nicht möglich. So kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob das MASH-Protein in diesen Zellen exprimiert wird und es konnte somit kein weiterer Hinweis auf den wahrscheinlich neurogenen Ursprung gefunden werden.

Bei den erzielten Ergebnissen handelt es überwiegend um erstmals untersuchte Thematiken, die in der Fachliteratur noch nicht diskutiert worden sind. Insbesondere deshalb bedarf es auch nach Abschluß der Untersuchungen weiterer Erkenntnisse um Zusammenhänge mit der noch nicht geklärten Funktion neuroendokriner Zellen herzustellen.

6. Literaturverzeichnis

Abrahamsson PA (1988) Neuroendocrine Differentiation and Secretory Proteins in the Parenchyma in Hyperplasia and in Carcinoma of the Prostate. Studentenliteratur, Malmö, Schweden

Abrahamsson PA (1996) Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate* 6: 3-8

Abrahamsson PA, Wadstöm LB, Alumets J, Falkmer S, Grimelius K. (1986) Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands. *Pathol. Res. Pract.* 181: 675-683

Andrew A (1963) A study of the developmental relationship between enterochromaffin cells and the neural crest. *J Embryol Exp Morphol* 11: 307-324

Andrew A (1974) Further evidence that enterochromaffin cells are not derived from the neural crest. *J Embryol Exp Morphol* 31: 589-598

Angelsen A, Syversen U, Haugen OA, Stridsberg M, Mjølmerød OKR, Waldum HL (1997) Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the prostate: Do neuroendocrine serum markers reflect immunohistochemical findings? *Prostate* 30: 1-6

Aumüller G (1979) Prostate Gland and Seminal Vesicles. In: Oksche A, Vollrath L (eds) *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, vol VII/6. Springer, Berlin Heidelberg New York

Aumüller G, Adler G (1979) Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* 121: 127-231

Aumüller G, Hüntemann S, Larsch KP, Seitz J (1989) Seminal proteins binding to spermatozoa. In: *Developments in Ultrastructure of Reproduction*. Motta P (eds), Liss Ind. NY: pp. 241-248

Aumüller G, Jungblut T, Malek B, Konrad S, Weihe E (1989) Regional distribution of opioidergic nerves in human and canine prostates. *Prostate* 14: 279-288

Aumüller G, Leonhardt M, Janssen M, Konrad L, Bjartell A, Abrahamsson, P (1999) Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* 53: 1041-1048

Aumüller G, Leonhardt M, Renneberg H, von Rahden B, Bjartell A, Abrahamsson PA (2001) Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate* 46: 108-115

Ball DW, Azzoli CG, Baylin SB, Chi D, Dou S, Donis-Keller H, Cumaraswamy A, Borges M, Nelkin BD (1993) Identification of a human achaete-scute homolog highly expressed in neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci* 99: 5648-5652

Bertaccini G, DeCaro G (1965) The effect of physalaemin and related polypeptides on salivary secretion. *J. Physiol. Lond.* 181: 68-81

Bologna M, Festuccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomeni M (1989) Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cell lines in vitro. *Cancer* 63: 1714-1720

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

Bonkhoff H (1998) Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Supplement* 8: 18-22

Bonkhoff H, Remberger K (1996) Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 28: 98-106

Bonkhoff H, Stein U, Remberger K (1994) Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. Simultaneous demonstration of cell specific epithelial markers. *Hum Pathol* 25: 42-46

Bonkhoff H, Stein U, Remberger K (1995) Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinomas are postmitotic cells. *Hum Pathol* 26: 167-170

Bonkhoff H, Wernert N, Dhom G, Remberger K (1991) Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. *Prostate* 18: 91-98

Borges MW, Linnoila RI, van de Velde HJK, Chen H, Nelkin BD, Mabry M, Baylin SB, Ball DW (1997) An achaete scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature*, 368: 852-855

Brandes D (1966) The fine structure and histochemistry of prostatic glands to sex hormones. *Int Rev Cytol* 20: 207-276

Brody I, Ronquist G, Gottfried A (1983) Ultrastructural localisation of the prostasome – an organelle in human seminal plasma. *Upsala J Med Sci* 88: 63-80

Cabrera CV, Martinez-Arias A, Bate M (1987) The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*. *Cell* 50: 425-433.

Carlsson L, Lennartsson L, Nilsson BO, Nilsson S, Ronquist G (2000) Growth-inhibitory effect of prostasomes on prostatic cancer cell lines in culture. *Eur Urol* 38: 468-476

Casarosa S, Fode C, Guillemot F (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126: 525-534.

Cecio A, Cocca T, Masotti MT, La Mura E, Vittoria A (1993) CCK-containing paraneurons in human adenomatous prostate. *Biosci Rep Oct*; 13: 251-258

Chen H, Biel MA, Borges MW, Thiagalingam A, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW (1997) Tissue-specific expression of human achaete-scute homologue-1 in neuroendocrine tumors: transcriptional regulation by dual inhibitory regions. *Cell Growth Differ Jun*; 8: 677-686

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159

Chow PH, Dockery P, Cheung A (1997) Innervation of accessory sex glands in the adult male golden hamster and quantitative changes of nerve densities with age. *Andrologia* 29: 331-342

Cockett ATK, di Sant'Agnesse PA, Gopinath P, Schoen SR, Abrahamsson P-A (1993) Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. *Urology* 42: 512-519

Cohen JR, McNeal JE, Redmond SL, Meehan K, Thomas R, Wilce M, Cawkins HJ (2000) Luminal contents of benign and malignant prostatic glands: correspondence to altered secretory mechanisms. *Hum Pathol* 31: 94-100

Cohen RJ, Gleason G, Taylor LF, Grundle HA, Naude JH (1993) The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *J Urol* 150: 365-368

Cox WF, Pierce GB (1982) Endodermal origin of the endocrine cells of an adenocarcinoma of the colon of the rat. *Cancer* 50: 1530-1538

Crowe R, Cahpple CR, Burnstock G (1991) The human prostate gland: a histochemical and immunohistochemical study of neuropeptides, serotonin, dopamine beta-hydroxylase and acetylcholinesterase in autonomic nerves and ganglia. *Br. J. Urol.* 68: 53-61

Cubas P, de Celis JF, Campuzano S, Modolell J (1991) Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* 5: 996-1008.

Cussenot O, Villette J, Valeri A, Cariou G, Desgrandchamos F, Cortese A, Meria P, Teillac P, Piet J, Le Duc A (1996) Plasma neuroendocrine markers in patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 155: 1340-1343

Danisch (1924) Zur Histogenese der sog. Appendixcarcinoide. *Zieglers Beitr Path Anat* 72: 687-698

Deftos LJ, Nakada S, Burton DW, di Sant'Agnesse PA, Cockett AT, Abrahamsson PA (1996) Immunoassay and immunohistology studies of chromogranin A as a neuroendocrine marker in patients with carcinoma of the prostate. *Urology* 48: 58-62

DeMazo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS (1998) Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol* 160: 2381-2392

di Sant'Agnesse PA (1992) Endocrine Aspects of the Prostate. In: Lechago, J und Gould, V, eds: *Bloodworth's Endocrine Pathology*, 3rd ed

di Sant'Agnesse PA (1992) Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 23: 287-296

di Sant'Agnesse PA (1995) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: Recent findings and new concepts. *Cancer* 75: 1850-1859

di Sant'Agnesse PA, Cockett AT (1996) Neuroendocrine differentiation in prostate malignancy. *Cancer* 78: 357-361

di Sant'Agnesse PA, De Mesy Jensen KL (1984) Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra: an ultrastructural study. *Hum Pathol* 15: 1034-41

di Sant'Agnesse PA, Mesy Jensen MS, Churukian CJ, Agarwal MM, (1985) Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells: Distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity in silver stains. *Arch Pathol Lab Med* 109: 607-612

Dixon JS, Jen PY, Gosling JA (1997) : A double-label immunohistochemical study of intramural ganglia from the human male urinary bladder neck. *J Anat* 190: 125-134

Ekman R, Ekström J, Hakanson R, Sjögren S, Sundler F (1986) Calcitonin related peptide in rat salivary glands. *J. Physiol. Lond.* 381: 36P

Ekström J (1987) Neuropeptides and secretion. *J Dent Res* 66: 524-530

Ekström J, Mansson B, Tobin G, Garrett JR, Thulin A (1983) Atropine-resistant secretion of parotid saliva on stimulation of the auriculo-temporal nerve. *Acta Physiol Scand* 119: 169-175

Ekström J, Olgart, L (1986) Substance P evoked salivary secretion in the ferret. *J Physiol. Lond.* 372: 41P

Fétissof F, Dubois MP, Arbeville-Brssart B, Lanson Y, Boivin F, Jobart P (1983) Endocrine cells in the prostate gland, urothelium and Brenner tumors: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch. B.* 42: 53-64

Feyrter (1951) Über das Helle-Zellen-System des Menschen. *Z Mikrosk Anat Forsch* 57: 342-344

Fischer-Colbrie R, Hagn C, Schober M (1987) Chromogranins A, B and C: widespread constituents of secretory vesicles. *Ann NY Acad Sci* 493: 120-134

Flickinger CF (1974) Protein secretion in the rat ventral prostate and the relation of golgi vesicles, cisternae and vacuoles, as studied by electron microscope radioautography. *Anat Rec* 180: 407-426

Fourney RM, Dietrich KD, Aubin RA, Paterson MC (1988) HindIII polymorphism in the human c-sis proto-oncogene. *Nucleic Acids Res.* 16: 8197.

Fujita T (1959) Histological studies on the neuroinsular complex in the pancreas of some mammals. *Z Zellforsch* 50: 98-109

Fujita T, Kanno T, Kobayashi S (1988) *The Paraneuron*. Tokyo, Springer Verlag

Groos S, Wilhelm B, Renneberg H, Riva A, Reichelt R, Seitz J, Aumüller G (1999): Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating gland. *Cell Tissue Res* 295: 495-504.

Grozdanic Z, Baumgarten HG (1996) Colocalisation of NADPH-diaphorase with neuropeptides in ureterovesical ganglia of humans. *Acta histochem* 98: 245-253

Gu J, Polak JM, Probert L, Islam KN, Marangos PJ, Mina S, Adrian TE, McGregor GP, O'Shaughnessy DJ, Bloom SR (1983) Peptidergic innervation of the human male genital tract. *J Urol* 130: 386-391

Gudeman DM, Brightman MW, Merisko EM, Merrill CR (1989): Release from live choroid plexus of apical fragments and electrophoretic characterization of their synthetic products. *J Neurosci Res* 24: 184-191

Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75: 463-476

Hawkins WE, Geuze JJ (1977): Secretion in the rat coagulating gland after copulation. *Cell Tissue Res* 181: 519-529

Hedlund P, Ekstrom P, Larsson B, Alm P, Andersson KE (1997) Heme oxygenase and NO-synthase in the human prostate – relation to adrenergic, cholinergic and peptide-containing nerves. *J Auton Nerv Syst* 63: 115-126

Helminen HJ, Ericsson JLE (1970) On the mechanism of lysosomal enzyme secretion. Electron microscopic and histochemical studies on the epithelial cells of the rat's ventral prostate lobe. *J Ultrastruct Res.* 33: 528-549

Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF, Goridis C (1998) Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development*, 125: 599-608

Hohbach C, Ueberberg H (1982) Ultrastructure and histochemical aspects of prostatic secretion in dog. *Pathol. Res. Pract.* 173: 225-235

Hökfelt T, Johansson O, Kjellert JO, Ljungdahl A, Nilsson G, Nygard A, Pernow B (1977) Immunohistochemical Detection of Substance P. In: Substance P, U.S. von Euler and B Pernow, Eds., New York: Raven Press, pp. 117-145

Hoosein N, Abdul M, McCabe R, Gero A, Deftos L, Banks M, Hodges S, Finn L, Logothetis C (1995) Clinical significance of elevation in neuroendocrine factors and interleukin-6 in metastatic prostate cancer. *Urol Oncol* 2: 246-251

Innis MA, Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JT (eds.) PCR Protocols – a Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego pp 3-13

Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okuleda K, Hayashi H, Sudo T, Guillemot F, Kageyama R, Kitamura H (2000) Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development* 127: 3913-3921

Jen PY, Dixon JS, Gearhart JP, Gosling JA (1996) Nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase are colocalized in nerves supplying the postnatal human male genitourinary organs. *J. Urol* 155: 1117-1121

Jen PY, Dixon JS, Gosling JA (1996) Co-localisation of tyrosine hydroxylase, nitric oxide synthase and neuropeptides in neurons of the human postnatal male pelvic ganglia. *J Auton Nerv Syst* 59: 41-50

Jen PY, Dixon JS, Gosling JA (1999) Colocalisation of neuropeptides, nitric oxide synthase and immunomarkers for catecholamines in nerve fibres of the adult human vas deferens. *J Anat* 195: 481-489

Johnson JE, Birren SJ, Anderson DJ (1990) Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346: 858-861

Jungblut T, Aumüller G, Malek B, Melchior H (1989) Age-dependency and regional distribution of enkephalinergic nerves in human prostate. *Urol. Int.* 44: 352-356

Junqueira und Carneiro: Histologie. 3. Auflage, 1991, Springer-Verlag

Kachar B, Pinto da Silva P (1980) Freeze-fracture study of rat ventral prostate: secretory mechanisms in the epithelial cell. *Anat Rec.*198: 549-565

Kageyama R, Ishibashi M, Takebayashi K, Tomita K (1997) bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 12: 1389-1399

Kalczyk J, Timmermans JP, Majewski M, Lakomy M, Scheuermann DW (1999) Immunohistochemical properties of nerve fibres supplying accessory male genital glands in the pig. A colocalisation study. *Histochem Cell Biol* 111: 217-228

Kirkland SC (1988) Clonal origin of columnar, mucous and endocrine cell lineages in human colorectal epithelium. *Cancer* 61: 1359-1363

Kramer B, Andrew A (1981) Further investigation into the source of pancreatic endocrine cell types. *Gen Comp Endocrinol* 44: 279-87

Kull H (1925) Die chromaffinen Zellen des Verdauungstraktes. *Z Mikrosk Anat Forsch* 2: 163-200

Kurosumi K, Shibasaki S, Ito T (1984): Cytology of the secretion in mammalian sweat glands. *Int Rev Cytol* 87: 253-329

Lange W, Unger J (1990) Peptidergic innervation within the prostate gland and seminal vesicle. *Urol Res* 18: 337-340

Lanigan TM, DeRaad SK, Russo AF (1998) Requirement of the MASH-1 transcription factor for neuroendocrine differentiation of thyroid C cells. *J. Neurobiol* 34: 126-34

Larran Lopez J, Aparicio Patino J, Lopez Munoz A, Vilches Troya (2000) Effect of the neuropeptides bombesin and calcitonin on the growth of prostate cell lines, PC3, DU145, LNCaP. *Actas Urol Esp* 24: 779-784

Larsen JJ, Ottesen B, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L (1981) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the male genitourinary tract: concentration and motor effect. *Invest Urol* 19: 211-213

Leav I, Merk FB, Ofner P, Goodrich G, Kwan PWL, Stein BM, Sar M, Stumpf WE (1978) Bipotentiality of response to sex hormones by the prostate of castrated or hypophysectomized dogs. *Am J Pathol* 93: 69-92

Lee CC, Caskey CT (1990) cDNA cloning using degenerate primers. In: Innis M, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JT (eds.) *PCR Protocols – a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego pp 46-53

Leeman SE, Hammerschlag R (1967) Stimulation of Salivary Secretion by a Factor Extracted from Hypothalamic Tissue. *Endocrinol* 81: 803-810

Lembeck F, Starke K (1968) Substanz P und Speichelsekretion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 318: 281-287

Littelwood TD, Evan GI (1995) Helix-loop-helix proteins. *Protein Profile* 2: 621-702

Lo L, Tiveron MC, Anderson DJ. (1998) MASH1 activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* 125: 609-20

Lo L, Johnson JE, Wuenschell CW, Tetsuichiro S, Anderson DJ (1991) Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Develop* 5: 1524-1537

Lucheroni A, Maurizi M, Palmerini CA, Binazzi M (1986): Some aspects of secretory activity of the human olfactory glands. *Rhinology* 24: 57-60

Mao P, Nakao K, Bora R, Geller J (1965) Human benign prostatic hyperplasia. *Arch Path* 79: 270-283

Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20: 429-440

McNeal JE, Halliot O, Yemoto C (1995) Cell proliferation in dysplasia of prostate: analysis by PCNA immunostaining. *Prostate* 24: 114-118

Moss HE, Crowe R, Burnstock G (1987) The seminal vesicle in eight week streptozotocin-induced diabetic rats: Adrenergic, cholinergic and peptidergic innervation. *J Urol* 138: 278-286

Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engle I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR, Stuver MH (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218: 129-135

Murre C, McCaw SS, Baltimore D (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD and myc proteins. *Cell* 56: 777-783

Nicander L, Ploen L, Larsson M (1974) Specific apocrine secretion in the anterior lobe of the prostate gland of rabbits. *Cell Tissue Res* 151: 69-77

Nilsson BO, Jin M, Ronquist G (1996) Immunolocalisation of prostasomes in the human prostate. *Ups J Med Sci* 101: 149-157

Noordzij MA, van Weerden WM, de Ridder CM, van der Kwast TH, Schroder FH, van Steenbrugge GJ (1996) Neuroendocrine differentiation in human prostatic tumor models. *Am J Pathol* 149: 859-871

Norberg KA, Risley PL, Ungerstedt U (1967) Adrenergic Innervation of the male reproductive ducts in some mammals. I. The distribution of adrenergic nerves. *Z. Zellforsch.* 76: 278-286

Norton JD (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113: 3879-3905

Novelli MR, Williamson JA, Tomlinson IPM, Elia G, Hodgson SV, Talbot IC, Bodmer WF, Wright NA (1996) Polyclonal origins of colonic adenomas in an X0/XY patient with FAP. *Science* 272: 1187-1190

O'Connor DT, burton C, Deftos LJ (1983) Chromogranin A: immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands. *Life Sci* 33: 1657-1664

O'Connor DT, Wu H, Gill BM, Rosansky DJ, Tang K, Mahata SK, Mahata M, Eskeland NL, Videen JS, Zhang X, Takiyyuddin MA, Parmer RJ (1994) Hormone storage vesicle proteins. Transcriptional basis of the widespread neuroendocrine expression of chromogranin A, and evidence of its diverse biological actions, intracellular and extracellular. *Ann NY Acad Sci* 733: 36-45

Ottesen B, Fahrenkrug MD (1995) Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive, intestinal polypeptide-derived biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 172: 1615-1631

Owman C, Sjöstrand N-O (1965) Short adrenergic neurons and catecholamine containing cells in vas deferens and accessory male genital glands of different mammals. *Z Zellforsch* 66: 300-320

Pearse AGE (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

Persson K, Johansson K, Alm P, Larsson B, Andersson KE (1997) Morphological and functional evidence against a secretory and sympathetic origin of nitric oxide synthase-containing nerves in the rat lower urinary tract. *Neuroscience* 77: 271-281

Petrusz (1976) Specificity in immunocytochemical staining. *J Histochem Cytochem* 24: 1110-1114

Pinski J, Halmos G, Schally AV (1993) Somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of androgen-independent DU 145 human prostate cancer in nude mice. *Cancer Letters* 71: 189-196

Pinski J, Reile H, Halmos G, Groot K, Schally AV (1994) Inhibitory effects of somatostatin analogue RC-160 and androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Research* 54: 169-174

Polak JM, Bloom SR (1984) Localisation and measurement of VIP in the genitourinary system of man and animals. *Peptides* 5: 225-30

Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Johansson H, Grimelius L (1999) Co-localisation of synaptophysin with different neuroendocrine hormones in the human gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 111: 49-54

Porter AM (2001) Why do we have apocrine and sebaceous glands? *J T Soc Med* 94: 236-237

Pretel K, (1944) Zur Frage der Endokrinie der menschlichen Vorsteherdrüse. *Virchows Arch (A)* 312: 392-404

Rindi G, Buffa R, Sessa F, Tortora O, Solcia E (1986) Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules. *Histochemistry* 85: 19-28

Romani S, Campuzano S, Macagno ER, Modolell J (1989) Expression of achaete and scute genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev* 3: 997-1007.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, New York

Seitz J, Keppler C, Rausch U, Aumüller G (1990) Immunohistochemistry of secretory transglutaminase from rodent prostate. *Histochemistry* 93: 525-530

Shah G, Rayford W, Noble M, Austenfeld M, Weigel J, Vamos S, Mebust W (1994) Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor mediated increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and cytoplasmic Ca^{2+} transients. *Endocrinology* 134: 596-602

Sisto T, Tainio H, Vaalasti A (1989) Neuropeptides in the human internal mammary artery. *Acta Physiol Scand* 136: 615-616

Slack JMW (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-1580

Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315-33.

Stoeckelhuber M, Silwa A, Welsch U (2000) Histo-physiology of the scent-marking glands of the penile pad, anal pouch, and the forefoot in the aardwolf (*Proteles cristatus*). *Anat Rec* 259: 312-326

Stridsberg M, Fabiani R, Lukinius A, Ronquist G (1996) Prostatosomes are neuroendocrine-like vesicles in human semen. *Prostate* 29: 287-295

Sun X, Baltimore D (1991) An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64: 459-467

Swaab DF, Pool CW, Van Leeuwen FW (1977) Can specificity ever be proved in immunocytochemical staining? *J Histochem Cytochem* 25: 338-341

Tainio H (1995) Peptidergic innervation of the human prostate, seminal vesicle and vas deferens. *Acta histochem* 97: 113-119

Taylor GR (1993) Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: *PCR A practical approach*. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR (eds.) 1-13, IRL Press

Thompson EM, Fleming KA, Evans DJ, Fundele R, Surani MA, Wright NA (1990) Gastric endocrine cells share a clonal origin with other gut cell lineages. *Development* 110: 477-481

Thompson TC, Zhau H, Chung LWK (1987) Catecholamines are involved in the growth and expression of prostate binding protein by rat ventral prostatic tissues. In: Coffey DS, Bruchowsky N, Gardner WA, Resnick MI, Karr JP (eds). *Current Concepts and Approaches to the Study of Prostate Cancer*. New York: Alan R. Liss; Inc., pp. 239-248

Thulin (1976) Motor and secretory effects of nerves on the parotid gland of the rat. *Acta Physiol Scand* 96: 506-511

Tomita K, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (1996) MASH1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells* 1: 765-774

Uddman R, Fahrenkrug J, Malm L, Alumets J, Hakanson R Sundler F (1980) Neuronal VIP in Salivary Glands: Distribution and Release. *Acta Physiol Scand* 110: 31-38

Vaalasti A (1994) Autonomic Innervation of the Human Male Accessory Sex Gland. In Riva A, Testa Riva F, Motta PM : „Ultrastructure of Male Urogenital Glands: Prostate, Seminal Vesicles, Urethral and Bulbourethral Glands“ Kluwer Academic Publishers

Vaalasti A, Hervonen A (1979) Innervation of the ventral prostate of the rat. *Am J Anat* 154: 231-244

Vaalasti A, Hervonen A (1980 a) Autonomic innervation of the human prostate. *Invest Urol* 17: 293-297

Vaalasti A, Hervonen A (1980 b) Nerve endings in the human prostate. *Am J Anat* 157: 41-47

Vaalasti A, Tainio H, Pelto-Huikko M, Hervonen A (1986) Light and electron microscope demonstration of VIP- and enkephalin-immunoreactive nerves in the human genitourinary tract. *Anat Rec* 215: 21-27

Van de Voorde MW, Van Poppel HP, Verbeken EK, Oyen RH, Baert LV, Lauweryns JM (1995) Morphologic and neuroendocrine features of adenocarcinoma arising in the transition zone and in the peripheral zone of the prostate. *Mod Pathol* 8: 594-598

Varndell IM, Polak JM (1988) The ultrastructure of peptid-containing neurons. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol.6: The Peripheral Nervous System*. A Björklund, T Hökfelt, C Owman (eds). Amsterdam: Elsevier, pp 143-159

Wharton J, Polak JM, Bryant MG, Van Noorden S, Bloom SR, Pearse AGE (1979) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- like Immunoreaktivität in salivary glands. *Life Sci.* 25: 273-280

Wilhelm B, Keppler C, Hoffbauer G, Lottspeich F, Linder D, Meinhardt A, Aumüller G, Seitz J (1998) Cytoplasmic carbonic anhydrase II of rat coagulating gland is secreted via the apocrine export mode. *J Histochem Cytochem* 46: 505-511

Wilhelm B, Meinhardt A, Renneberg H, Linder D, Gabius HJ, Aumüller G, Seitz J (1999) Serum albumin as a potential carrier for the apocrine secretion of proteins in the rat coagulating gland. *Eur J Cell Biol* 78: 256-264

Wilkinson DG (1992) *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, pp. 15-32, IRL Press, Oxford

Winkler H (1976) The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* 1: 65-80

Winkler H, Fischer-Colbrie R (1992) The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49: 497-528

Xue Y, Verhofstad A, Lange W, Smedts F, Debruyne F, de la Rosette J, Schalken J (1997) Prostatic neuroendocrine cells have a unique keratin expression pattern and do not express Bcl-2: Cell kinetic features of neuroendocrine cells in the human prostate. *Am J Pathol* 151: 1759-1765

Xue Y, Smedts F, Verhofstad A, Debruyne F, de la Rosette J, Schalken J (1998) Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate* 8: 62-73

Xue Y, van der Laak J, Smedts F, Schoots C, Vernhofstad A, de la Rosette J, Schalken J (2000) Neuroendocrine Cells during human prostate development: does neuroendocrine cell density remain constant during fetal as well as postnatal life? *Prostate* 42: 116-123

Yang JY, Lecksell K, Gaudin P, Epstein JI (1999) Rare expression of high-molecular weight cytokeratin in adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 23: 147-152

Yuri K (1990) Immunohistochemical and enzyme histochemical localization of peptidergic, aminergic and cholinergic nerve fibers in the rat seminal vesicle. *J Urol* 143: 194-198

Zaviacic M, Jakubovska V, Belosovic M, Breza J (2000) Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat Embryol* 201: 51-61

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Roland Gerull
Geburtstag: 17.11.1973
Geburtsort: Tübingen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

07.1979 – 06.1984 Laborschule Bielefeld
07.1984 – 06.1993 Max-Planck-Gymnasium Bielefeld
06.1993 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

SS 1994 – WS 2000 Humanmedizin Philipps-Universität Marburg
26.03.1996 Ärztliche Vorprüfung
25.08.1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 05.1998 Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Marburg bei Prof. Dr. G. Aumüller
27.08.1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.05.2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01.07.2001 Arzt im Praktikum an der Universitätskinderklinik Mannheim

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren an der Philipps-Universität Marburg die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Barth, Baum, Christiansen, Daut, Eckhorn, Fruhstorfer, Fuhrmann, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Grzeschik, Habermehl, Happle, Hesse, Hoffmann, Kälble, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kroll, Lang, Lehmann, Lennartz, Maisch, Moosdorf, Müller, Oertel, Remschmidt, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Seitz, Seyberth, Steiniger, Thomas, Vohland, von Wichert, Weihe, Werner und Wolf

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Aumüller für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft und die Diskussionen über die erreichten Ergebnisse herzlich danken.

Herrn Dr. Lutz Konrad danke ich dafür, daß er mir als Ansprechpartner für die molekularbiologisch durchgeführten Untersuchungen zur Seite stand und mich gewissenhaft an die molekularbiologische Methodik herangeführt hat.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Heiner Renneberg, der mir oft praktische Hilfestellung gab und durch häufige Diskussion ein schnelleres Erreichen der Ergebnisse ermöglichte.

Vielen Dank auch an Herrn Michael Dreher, der mich in das praktische Arbeiten bezüglich der Immunhistochemie eingeführt hat und immer zur freundlichen Hilfestellung bereit war.

Weiterhin danke ich Frau Claudia Keppler, Frau Elke Völk-Badouin die mir bei den praktischen Arbeiten der Molekularbiologie mit Rat und Tat zur Seite standen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Sabine aussprechen, die durch ihren Zuspruch und wissenschaftlichen Rat die Arbeit erheblich erleichterte. Ohne ihre Unterstützung hätte mich die Fertigstellung der Arbeit sicherlich mehr Zeit und Nerven gekostet.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Studien zur vegetativen Innervation der endokrinen Zellen der menschlichen Prostata im Institut Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg, unter Leitung von Prof. Dr. G. Aumüller, mit Unterstützung von Dr. L. Konrad, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher in keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mannheim, den 22.02.2002

(Roland Gerull)